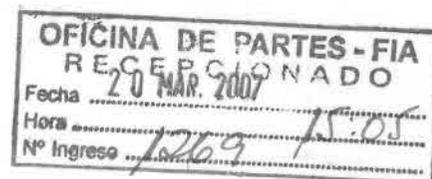


INFORME TÉCNICO FINAL
Proyecto: FIA-ES-C-2005-1-A-042



NOMBRE DEL ESTUDIO: *Buddleja globosa*: Evaluación de Marcadores que permitan caracterizar la materia vegetal y los extractos orientados a la formulación de fitofármacos cicatrizantes u otros usos.

REGIONES DE EJECUCIÓN: Región Metropolitana y VII Región

FECHA DE INICIO (dd/mm/aaaa):	Noviembre / 01/ 2005
FECHA DE TÉRMINO (dd/mm/aaaa):	Marzo/ 20/ 2007
DURACIÓN (meses)	16

AGENTE POSTULANTE O EJECUTOR

- Nombre : Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
Universidad de Chile.
- RUT : 60.910.000-1
- Dirección : Olivos 1007
- Región : Metropolitana
- Ciudad : Santiago
- Fono : 56-2-678 2812
- Fax : 56-2-737 8920
- E-mail : decano@ciq.uchile.cl
- Web : www.faciqyf.cl
- Cuenta Bancaria (Tipo, N°, banco): -----

AGENTES ASOCIADOS

Agente Asociado N°1

- Nombre : Universidad de Talca
- RUT : 70.885.500-6
- Dirección : 2 Norte 685, Talca
- Región : VII Región del Maule
- Ciudad : Talca
- Fono : 56-71-200200
- Fax : 56-71-200212
- E-mail : comunicaciones@utalca.cl
- Web : www.utalca.cl
- Cuenta Bancaria (Tipo, N°, banco): Cta. Cte. Banco Santander 74-0007103-3

Agente Asociado N°2

- Nombre : Laboratorios Ximena Polanco
- RUT :
- Dirección : Dresden N°4640, San Miguel.
- Región : Metropolitana
- Ciudad : Santiago
- Fono : 56-2-5515336
- Fax : 56-2-5515336
- E-mail : ximenapolanco@xpolanco.com
- Web : www.xpolanco.com
- Cuenta Bancaria (Tipo, N°, banco) : Cta. Cte, N°504-39-010001678

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
e-mail: mel@ciq.uchile.cl

COORDINADOR DEL ESTUDIO

- Nombres y Apellidos : María Eugenia Letelier Muñoz
- Dedicación al Estudio (% año) : 30%
- Cargo o actividad que realiza : Académico. Profesor Asistente
- Dirección y Comuna : Olivos 1007- Independencia
- Región : Metropolitana
- Ciudad : Santiago
- Fono : 56-2-678 2885
- Fax : 56-2-7378920
- E-mail : mel@ciq.uchile.cl

COSTO TOTAL DEL PROYECTO

Programado y real

COSTO TOTAL DEL ESTUDIO (Valores Reajustados)	: \$	35.406.158		
FINANCIAMIENTO SOLICITADO A FIA (Valores Reajustados)	: \$	19.999.996	56,5	%
APORTE DE CONTRAPARTE (Valores Reajustados)	: \$	15.406.162	43,5	%

PERÍODO DE EJECUCIÓN

Programado y real

FECHA DE INICIO (dd/mm/aaaa):	Noviembre/ 27/ 2006
FECHA DE TÉRMINO (dd/mm/aaaa):	Marzo/20/2007
DURACIÓN (meses)	12

I. RESUMEN EJECUTIVO

Buddleja globosa es una planta utilizada por la medicina nativa principalmente como antiinflamatorio y cicatrizante. Cabe señalar que la primera fase del proceso de cicatrización corresponde a un proceso inflamatorio en el cual se generan especies reactivas del oxígeno, altamente reactivas. Existen algunos estudios *in vitro* relacionados con la actividad antioxidante y los efectos sobre la estimulación de la proliferación de fibroblastos de extractos de *Buddleja globosa*; ambos fenómenos serían los responsables de la actividad cicatrizante asociada a *Buddleja globosa*.

En este trabajo desarrollamos un modelo en ratas Sprague Dawley que permitiera estudiar las fases del proceso de cicatrización de una herida de piel. Previamente, el extracto de *Buddleja globosa* a utilizar fue evaluado respecto de su concentración de polifenoles y capacidad de proteger los lípidos y los tioles microsómicos de la oxidación inducida por ROS. Más aún, dado a que no existen en la literatura estudios de dosis de preparados naturales, se realizaron pruebas sanguíneas en los animales tratados oralmente con el extracto; no se observaron diferencias significativas en el hemograma y el perfil bioquímico entre las ratas tratadas durante 12 días y las no tratadas con el extracto de *Buddleja globosa*, indicando la ausencia de efectos adversos de la dosis utilizada en estos ensayos.

Los estudios de cicatrización se realizaron en colgajos de la herida cortante realizada en la piel de las ratas. Las pruebas histoquímicas mostraron claras diferencias entre el grupo control y los tratados oral y tópicamente y sólo oral con el extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* estandarizado. Estas diferencias se observaron principalmente en las fases iniciales e intermedias del proceso: las heridas se mantienen limpias de coágulos y detritus celulares, cierran antes y el tejido de granulación se constituye más rápidamente. Por otra parte, se realizaron pruebas inmuno-histoquímicas en las cuales se evaluaron marcadores moleculares como la enzima COX-; esta, proteína se induce en presencia de procesos inflamatorios y su inhibición está directamente relacionada con la disminución de procesos inflamatorios. Nuestros resultados confirmaron los estudios *in vitro* que muestran que esta enzima es inhibida por diferentes extractos de hojas de *Buddleja globosa*.

Paralelamente a este estudio se han tomado muestras de plantas de diferente origen, silvestre y cultivado, de diferentes tratamientos de riego, fechas de cosecha y

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

hojas de diferente edad para seleccionar el material genético y las técnicas de manejo que permitan obtener material vegetal con mayor actividad potencial. Además las hojas se sometieron a diferentes tratamientos de secado para poder definir el procedimiento más adecuado. De las muestras de droga vegetal de cada una de las condiciones mencionadas se prepararon los respectivos extractos hidroalcohólicos, los cuales fueron caracterizados de acuerdo a: su concentración de polifenoles totales y su capacidad de prevenir la oxidación de los lípidos y los tioles proteicos de retículo endoplásmico hepático de hígado de rata. El análisis preliminar de estos resultados muestra que la capacidad antilipoperoxidante estaría en estrecha relación con la concentración de polifenoles totales de las muestras.

Para identificar *Buddleja globosa* en una droga o extracto, se buscaron marcadores químicos. Resultados preliminares muestran como posible molécula un derivado glicosidado de verbascosido, que permitiría diferenciar químicamente *Buddleja davidii* (matico ornamental) de *Buddleja globosa* (matico medicinal). De este análisis se puede establecer que este metabolito esta presente tanto en *B. davidii* como en *B. globosa*, diferenciándose en las concentraciones, siendo el metabolito mayoritario en *B. globosa*. Cabe señalar que se han aislados otros productos con el objeto de encontrar un marcador más específico; estos fueron analizados por RMN y los datos se están procesando.

II. INFORME TÉCNICO (Texto Principal)

1. RESUMEN DEL PERÍODO

Los estudios agronómicos y farmacológicos de *Buddleja globosa*, como la búsqueda de marcadores se han terminado.

Respecto de los estudios agronómicos, hemos establecido las mejores condiciones de cultivo y cosecha que permiten la preparación de extractos con mayor actividad antioxidante, característica involucrada en los mecanismos farmacológicos responsables de los efectos terapéuticos asociados a *Buddleja globosa*.

Los estudios farmacológicos nos permitieron estandarizar un extracto hidroalcohólico de hojas de *Buddleja globosa* cuyas características nos permiten proponerlo como estrategia terapéutica en patologías especialmente asociadas a estrés oxidativo y procesos inflamatorios. Dado lo interesante de estos resultados, se inició el proceso de patentamiento de este extracto.

Por otra parte, disponemos a la fecha de un marcador químico que aunque no es específico de *Buddleja globosa* es más abundante en esta especie que en la especie ornamental *Buddleja davidii*. Desgraciadamente este marcador se encuentra en muy pequeña cantidad y es muy polar, lo cual dificulta su purificación y aislamiento.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivos Generales

Completar la monografía de Buddleja globosa. Ello requiere a) Evaluar marcadores que caractericen la materia vegetal y los extractos y b) Evaluar in vivo los efectos cicatrizante y antiinflamatorio asignados a Buddleja globosa., los cuales representan los principales usos de esta planta medicinal.

Objetivos Específicos

1. *Seleccionar el material genético y determinar las técnicas de manejo que permitan obtener material vegetal con mayor actividad potencial y búsqueda de un clon con menor vello en las hojas.*

Se ha obtenido el material vegetal correspondiente a las siguientes condiciones de cultivo y secado: seis accesiones cultivadas, dos poblaciones silvestres, cinco fechas de cosecha, dos condiciones de riego, tres edades de hoja, seis tratamientos de deshidratado.

El material vegetal fue entregado a Laboratorios Ximena Polanco para la elaboración de los extractos hidro-alcohólicos estandarizados y luego se realizaron los estudios de la actividad antioxidante de ellos la cual se ha finalizado.

2. *Desarrollar un método para identificar a *Buddleja globosa* en una droga vegetal y en un preparado mediante marcadores químicos.*

Mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) se chequearon los distintos extractos preparados en el Laboratorio de Ximena Polanco y otros preparados en nuestro laboratorio: M1 (*Buddleja Globosa*), M2 (Matico peruano), M3 (*Buddleja davidii*) y M4 (*Buddleja Globosa*, hoja sin pelos). Se aislaron los 6 compuestos mayoritarios para posteriores análisis. Los resultados mostraron como posible molécula marcadora, un derivado glicosidado de verbascosido, que permitiría diferenciar químicamente *Buddleja davidii* (matico ornamental) de *Buddleja globosa* (matico medicinal). De este análisis se puede establecer que este metabolito está presente tanto en *B. davidii* como en *B. globosa*, diferenciándose en las concentraciones, siendo el metabolito mayoritario el de *B. globosa*.

Se aisló además un marcador específico, pero la pequeña cantidad aislada en forma pura de este compuesto no ha permitido determinar su estructura; éste se obtuvo mediante cromatografía en capa fina preparativa de la fracción 41 de matico previamente trabajada mediante cromatografía en columna de sílica gel.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

3. *Caracterizar extractos hidro-alcohólicos de hojas de *Buddleja globosa* provenientes de las distintas condiciones de cultivo y secado a través de a) la cuantificación de polifenoles; b) la evaluación de su capacidad de proteger biomoléculas (lípidos y proteínas de membrana microsómica) de la acción oxidante de ROS.*

La cuantificación de polifenoles y la evaluación de su capacidad de proteger biomoléculas (lípidos y proteínas de membrana microsómica) de la acción oxidante de ROS ha sido terminada. La actividad antilipoperoxidante de membrana de los extractos analizados se correlacionó directamente con la concentración de polifenoles presentes en ellos.

4. *Entregar los argumentos científicos que justifiquen el uso terapéutico asignado a *Buddleja globosa* por la medicina popular. Para ello se evaluará el proceso de cicatrización de heridas de la piel de ratas Sprague Dawley mediante la determinación de mediadores bioquímicos específicos involucrados en este proceso.*

Para llevar a cabo este objetivo, se utilizó un extracto de *Buddleja globosa* aportado por Laboratorios Ximena Polanco y caracterizado de acuerdo a sus características físico-químicas, concentración de polifenoles y capacidad de prevenir la oxidación de lípidos y proteínas microsómicas de la oxidación inducida por ROS.

Antes de iniciar los estudios farmacológicos se evaluó la dosis a utilizar en ratas. Para ello, ratas normales fueron tratadas oralmente con una dosis del extracto de *Buddleja globosa* aproximadamente 12 veces mayor a las dosis recomendadas de fitomedicamentos formulados como preparados hidroalcohólicos registrados por Laboratorios Ximena Polanco. Para ello se evaluó el estado general de los animales mediante las pruebas sanguíneas: hemograma y perfil bioquímico; además se controlaron los parámetros macroscópicos y morfológicos del bazo mediante estudios histoquímicas.

Los efectos de *B. globosa* sobre la cicatrización de una herida de la piel de los animales se evaluó mediante pruebas histoquímicas e inmunológicas realizadas en los colgajos de la herida de la piel de los animales.

La velocidad de cicatrización fue significativamente mayor en los animales tratados con el extracto de *B. globosa* que en aquellos que no recibieron el tratamiento.

2. ACTIVIDADES EJECUTADAS Y ANÁLISIS DE BRECHA (COMPARATIVO)

AÑO 2005 – 2007

Objetivo Especifico N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término	Cumplimiento de Objetivos
N°1 Caracterización de material proveniente de distintas condiciones. + Seleccionar el material genético y determinar las técnicas de manejo.	1.1	Prácticas de manejo de cultivo y tratamientos de postcosecha	Noviembre del 05	Junio del 06	Cumplido
	1.2	Búsqueda de un clon sin vellosidad	Noviembre del 05	Junio del 06	Cumplido
	1.3	Toma y entrega de muestras para análisis	Diciembre 05	Junio del 06	Cumplido
N°2 Método para identificar a <i>Buddleja globosa</i> en una droga vegetal y en un preparado mediante marcadores químicos	2.1	Investigación bibliográfica	Diciembre del 05	Enero del 06	Cumplido
	2.2	Determinación del contenido de agua	Enero del 06	Febrero del 06	Cumplido
	2.3	Preparación del extracto de la droga cruda	Febrero del 06	Abril del 06	Cumplido
	2.4	Caracterización y cuantificación individual de los flavonoides, fenilpropanos, iridoides y terpenos	Abril del 06	Julio del 06	Cumplido

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

	2.5	Identificación de los marcadores químicos	Junio del 06	Septiembre del 06	Cumplido
	2.6	Identificación y cuantificación mediante CCF	Octubre del 06	Octubre del 06	Cumplido
Nº3 Caracterización de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Buddleja globosa</i> provenientes de las distintas condiciones de cultivo y secado	3.1	Obtención de extractos Cuantificación de polifenoles	Febrero del 06	Abril del 06	Cumplido
	3.2	Capacidad antilipoperoxidante	Febrero del 06	Mayo del 06	Cumplido
	3.3	Capacidad de proteger tioles proteicos	Mayo del 06	Junio del 06	Cumplido
Nº4 Cicatrización de heridas de la piel de ratones	4.1	Tratamiento de los animales y obtención de muestras de la herida de la piel de los ratones	Mayo del 06	Junio del 06	Cumplido
	4.2	Tinciones histológicas de las muestras y observación y análisis de imágenes de las mismas	Junio del 06	Julio del 06	Cumplido
	4.3	Tinciones inmunohistoquímicas de las muestras y observación y análisis de imágenes de las mismas	Julio del 06	Agosto del 06	Cumplido
Nº5 Definición de los marcadores de la droga vegetal y del preparado.	5.1	Discusión global de resultados	Agosto del 06	Septiembre del 06	Cumplido
	5.2	Preparación del Informe Final para su entrega a FIA	Octubre del 06	Octubre del 06	Cumplido

CARTA GANT PROPUESTA PARA EL PERÍODO Diciembre - Marzo

Obj.	Actividad	DIC	ENE	FEB	MAR
1.2	Clon sin vellosidad				
2.5	Identificación marcadores químicos				
2.6	Identificación mediante CCF				
5.1	Discusión global resultados				
5.2	Preparación informe final				
	Entrega del Informe Final				

RAZONES QUE EXPLICAN LAS DISCREPANCIAS ENTRE LAS ACTIVIDADES PROGRAMADAS Y LAS EFECTIVAMENTE REALIZADAS

- **Entrega de Informes**

La propuesta final señala como fecha de inicio del proyecto noviembre-01-2005, fecha de término noviembre-27-2006. El primer Informe Técnico de Avance, se entregó el 12 - abril - 2006 y fue aprobado con fecha 12 - mayo -2006. Dado a que tuvimos algunas dificultades para hacer uso de la primera remesa de dinero, se solicitó una prórroga para la entrega del Informe Financiero, la cual fue aprobada por FIA: es por ello que la entrega del Informe Financiero se entregó diferidamente el 11- Mayo-2006; este Informe fue aprobado con observaciones el 25 - julio-2006 y la aprobación final fue recibida con fecha 22- noviembre-2006.

Como se mencionó anteriormente y de acuerdo a contrato, en esta oportunidad nos correspondía entregar el Informe Final de nuestro proyecto. Sin embargo, se nos solicitó adelantar actividades de difusión de nuestros resultados y se creó además, la posibilidad de patentar parte de ellos. Es por ello que solicitamos una extensión de plazo para la entrega de nuestro Informe Final. Esta prórroga fue aprobada en las condiciones siguientes: a) entrega de un Informe parcial al 27-noviembre-2006 y entrega del Informe final el 20-marzo-2007.

)

- **Actividades de Difusión.**

➤ **“Primer Simposio Internacional: Materias primas para la Industria Plantas Medicinales y Aromáticas. Puntos críticos y rol de las Universidades”** organizado por la Universidad Santo Tomás - Escuela de Agronomía, FIA - Ministerio de Agricultura y tuvo lugar en la ciudad de Los Ángeles – VIII – Región – Chile los días 14 y 15 de Noviembre del 2006. Fuimos invitados a presentar los avances en la monografía de *Buddleja globosa*, lo cual se realizó mediante una presentación oral y nuestra participación en una mesa redonda dedicada a las monografías de plantas medicinales chilenas que están en elaboración. El título de nuestra presentación fue: **“*Buddleja globosa hope* utilizada por la medicina nativa principalmente como cicatrizante de heridas y antiinflamatorio”**.

➤ **“Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia. Contribuciones de la flora regional a la medicina actual”** realizado en ciudad de México desde el 30 de noviembre al 2 de diciembre de 2006. Título de la presentación: **“*Buddleja globosa Hope: Producción de hojas para su uso medicinal*”**. Para cumplir con esta invitación solicitamos fondos a FIA a través de un proyecto Difusión y Captura. FIA aprobó este proyecto (proyecto FIA-CD-V-2006-1-A-114) pero no la totalidad de los fondos solicitados; la diferencia fue financiada por CYTED y fondos personales de los asistentes del grupo de la monografía de *Buddleja globosa* asistentes al Congreso, Ximena Polanco y María Eugenia Letelier.

Además de la presentación oral de la monografía de *Buddleja globosa* antes mencionada, se presentó en este Congreso parte de los resultados en una sesión de posters. El título de esta presentación fue **“Actividad antioxidante de *Buddleja globosa* medida por su capacidad de atrapar radicales DPPH y de prevenir la oxidación de biomoléculas inducida por ROS”**.

El informe técnico de este Proyecto de Difusión (FIA-CD-V-2006-1-A-114) fue entregado el 28 de enero de 2007 y el informe financiero se entregará el 25 de enero de 2007.

➤ **Patente en trámite.** Los trámites de patentamiento del extracto estandarizado y sus usos principales, antecedentes la mayoría obtenidos a través de este proyecto. Para ello, la Universidad de Chile está actuando como EAPI, empresa encargada de realizar la presentación de la solicitud de patente al Ministerio de Economía y conseguir los fondos CORFO para financiar los trámites que este proceso involucra.

- **Experimentos agronómicos:** no tenemos discrepancias con las actividades programadas.

- **Estudios farmacológicos:** para realizar estos estudios se utilizó un extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* aportado y caracterizado por Laboratorios Ximena Polanco. Previamente, tuvimos que realizar estudios de Control de la dosis a utilizar, estudio no contemplado en el Proyecto aprobado. Para cumplir este objetivo se procedió como sigue:

- **Control de la dosis administrada a las ratas mediante pruebas sanguíneas de los animales.** Existe la creencia en la población que los extractos naturales no son tóxicos. Por otra parte, existen escasos estudios farmacocinéticos de preparados naturales que apoyen la formulación de fitofármacos. Así por ejemplo, no disponemos de rangos terapéuticos que nos permitan aconsejar dosis a administrar, problema repetidamente consultado por las empresas que formulan fitofármacos.

Así, como no teníamos antecedentes al respecto, se controló previamente los posibles efectos adversos de la dosis oral a utilizar evaluando el estado general de los animales mediante pruebas sanguíneas: hemograma y perfil bioquímico. Estos resultados fueron informados en el Primer informe del proyecto entregado.

- **Actividad GSH-transferásica microsómica y citosólica.** La GSH-transferasa es un enzima marcador de estrés oxidativo. Se encuentra localizada en la mayoría de las células y fundamentalmente en el hígado en el citosol y el retículo endoplásmico de la célula. Esta enzima se induce por estrés oxidativo y por la presencia de algunos xenobióticos lipofílicos, entre ellos principios activos naturales. Es por ello, que se midió la actividad GSH-transferásica en ratas controles y en las expuestas al corte de piel tratadas

y no tratadas con el extracto de *Buddleja globosa*. Estos resultados fueron informados en el Informe anterior.

3. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

I. Metodología para cumplir el objetivo específico N°1: Determinar las técnicas de postcosecha y manejo que permitan obtener material vegetal con mayor actividad potencial

Obtención del material vegetal. Como material vegetal se tomaron muestras de las mismas seis accesiones ya establecidas en un diseño experimental en la Estación Experimental de la Universidad de Talca. Tres de estas accesiones son de procedencia silvestre y tres corresponden a clones de plantas madres cultivadas tradicionalmente en huertos caseros.

Se enviaron muestras de las seis procedencias cultivadas, de dos poblaciones silvestres y hojas deshidratadas bajo las siguientes condiciones al Laboratorio Ximena Polanco:

- secado bajo sombra a temperatura ambiente
- secado bajo sol
- secado en estufa a 40° C
- secado en estufa a 60° C
- Secado en estufa a 80° C
- lavado de hojas seguido por un secado en estufa a 40° C

Desde noviembre hasta marzo se tomaron muestras para estudiar la fluctuación durante la temporada. En marzo se cosecharon hojas de plantas sometidas a diferentes tratamientos de riego (20 y 40 cb). Se cosecharon hojas de diferente edad dentro de las mismas plantas: joven (superiores), madura (central) y senescente (inferior). Estas muestras se secaron a temperatura ambiente bajo sombra y serán enviados al Laboratorio Ximena Polanco próximamente.

II. Metodología para cumplir el objetivo específico N°2: Desarrollar un método para identificar a *Buddleja globosa* en una droga vegetal y en un preparado mediante marcadores químicos.

Investigación bibliográfica exhaustiva científica sobre los estudios fitoquímicos realizados en *Buddleja globosa*, identificándose cinco posibles marcadores químicos. A partir de las muestras de *B. globosa* cultivadas y silvestres, matico peruano (*Piper angustifolius*), matico ornamental (*Buddleja davidii*) y *Buddleja Globosa*, hoja sin pelos se prepararon extractos metanólicos e hidro-alcohólicos. Mediante técnicas cromatográficas se procedió a aislar los posibles marcadores químicos.

Los extractos luego de filtrados fueron inyectados en un equipo de cromatografía líquida (HPLC) de la firma Merck-Hitachi, compuesto de una bomba L7400 y un detector de arreglo de diodos L7455, los datos fueron procesados por el software suministrado por la misma firma. Luego de comparar diferentes procedimientos para optimizar la separación se procedió a escoger las siguientes condiciones:

Columna: RP18 de 250-4

Flujo fase móvil: 1,0 mL/min

Temperatura columna: 20°C

Fase móvil:

A- ácido Fosfórico al 0,3%

B- Acetonitrilo

C- Metanol

Programa:

Tiempo	A	B	C
0	100	0	0
30	60	25	15
40	5	80	15
42	100	0	0
45	100	0	0

Detector:

Rango de longitud de onda de escaneo: 200 a 400 nm

Monitoreo de longitud de onda: 270 nm

III. Metodología para cumplir el objetivo específico N°3: Caracterizar extractos hidro-alcohólicos de hojas de *Buddleja globosa* provenientes de las distintas condiciones de cultivo y secado a través de a) la cuantificación de polifenoles; b) la evaluación de su capacidad de proteger biomoléculas (lípidos y proteínas de membrana microsómica) de la acción oxidante de ROS.

A. Preparación de extractos hidro-alcohólicos. Para estos estudios se utilizaron las muestras de droga vegetal provenientes de las distintas condiciones de cultivo y cosecha (Universidad de Talca). Los extractos fueron preparados por Laboratorios Ximena Polanco.

B. Cuantificación de polifenoles totales. La cuantificación de los polifenoles presentes en los extractos de *Buddleja globosa* se realizó de acuerdo al método de Price y cols. (1989). Para cuantificar los polifenoles presentes en los extractos se utilizó como referencia, catequina [(+) – cianidol – 3 – (2R, 3S) – 2-(4,4-dihidroxifenil) – 3,4-dihidro – 1(2H) – benzopiran – 3,5,7-triol – (+) – trans-3,3',4',5,7 – pentahidroxi flavona)].

C. Capacidad de proteger biomoléculas de la acción oxidativa inducida por ROS.

Para medir la capacidad antioxidante de los preparados se utilizó una preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático de rata, organelo subcelular constituido por fosfolípidos y proteínas. Entre las proteínas se encuentran las principales enzimas de biotransformación de xenobióticos que metabolizan los metabolitos naturales; estas proteínas contienen en su estructura aminoacídica, cisteína, aminoácido fundamental en su actividad biológica. La metodología va dirigida a evaluar la capacidad de los preparados de proteger los lípidos y las proteínas de este organelo subcelular de la oxidación inducida por Cu^{2+} /ascorbato, sistema generador de radicales libres del oxígeno.

a. Animales de experimentación. Se utilizaron ratas machos de 3 meses de edad de la cepa Sprague Dawley. Los animales fueron mantenidos con una dieta normal (pellet Kimber), agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiente de 21°C. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de ciencias químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Durante la experimentación los animales fueron controlados bajo las normas del Comité de bioética sobre la investigación en

animales de la Universidad de Chile conforme a su "PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO 2004".

b. Preparación de microsomas y citosol hepático de rata. Los microsomas corresponden a una preparación experimental enriquecida en retículo endoplásmico y el citosol corresponde a la fracción sobrenadante del pellet microsómico. El retículo endoplásmico está constituido fundamentalmente de fosfolípidos y proteínas. Entre estas proteínas se encuentra: a) los sistemas enzimáticos que representan las vías mayoritarias de biotransformación de xenobióticos, entre ellos los principios activos de las plantas medicinales (Sistema oxidativo del citocromo P₄₅₀, UDP-glucuroniltransferasa, GSH-transferasa); b) Las enzimas encargadas de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga saturados y no saturados (>14 átomos de carbono); entre estos ácidos se encuentra el araquidónico que es el precursor de las prostaglandinas. Asimismo, el citosol corresponde a la preparación subcelular citoplasmática que esta enriquecida en los componentes antioxidantes celulares. Ambas fracciones subcelulares hepáticas se prepararon de acuerdo a la técnica descrita en Letelier y cols. (1985). La proteína de las fracciones microsómica y citosólica se determinó por el método espectrofotométrico de Lowry y cols. (1951), utilizando albúmina de bovino, fracción IV como estándar.

c. Lipoperoxidación microsómica. La lipoperoxidación se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por el método descrito en Letelier y cols. (2005). Para ello se utilizó Cu²⁺/ascorbato como fuente generadora de ROS. El malondialdehído generado como producto de descomposición de los lipoperoxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532 nm y su coeficiente de extinción es 156 mM⁻¹ x cm⁻¹. Se realizaron las curvas concentración-respuesta para determinar los IC₅₀, concentración que inhibe el 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu²⁺/ascorbato. De esta forma se compara la capacidad anti-lipoperoxidante de los extractos.

d. Determinación de tioles totales. La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols. (2005). Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos

sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412 nm y su coeficiente de extinción es $13.600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. El contenido de tioles será expresado en nmoles de tioles/ mg de proteína microsómica.

e. **Análisis Estadístico.** Los resultados están expresados como el promedio de los valores obtenidos en al menos 4 experimentos independientes \pm las desviaciones estándar de las observaciones de las muestras en relación con sus promedios. Para realizar el análisis de las muestras y el de las diferencias entre los grupos controles y las muestras, se exigió en cada caso un 95% de certeza ($p < 0,05$).

IV. Metodología para cumplir el objetivo específico N°4: “Entregar los argumentos científicos que justifiquen el uso terapéutico asignado a *Buddleja globosa* por la medicina popular. Para ello se evaluará el proceso de cicatrización de heridas de la piel de ratones, mediante la determinación de mediadores bioquímicos específicos involucrados en este proceso”.

1. **Animales de experimentación.** Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos de 3 meses de edad, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales fueron mantenidos con una dieta normal (pellet Kimber), agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiente de 21°C. Durante la experimentación los animales fueron controlados bajo las normas del Comité de bioética sobre la investigación en animales de la Universidad de Chile conforme a su “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO 2004”.

2. **Diseño experimental y Tratamiento de los animales.** Se utilizaron 72 animales, ratas adultas machos de 3 meses de edad de un peso promedio $310 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ los cuales fueron distribuidos en tres grupos experimentales de 24 animales cada uno; cada grupo fue mantenido en jaulas independientes de 3 animales cada una.

El grupo N° 1 (24 animales) recibió $100 \mu\text{l}$ del extracto hidro-alcohólico de *Buddleja globosa* vía oral cada 8 horas durante 3 días. El extracto natural se administró

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

directamente al esófago de las ratas mediante una aguja de intubación especialmente diseñada para estos fines, la cual posee un diámetro adecuado a la especie y una punta roma en forma esférica que evita el daño y por consiguiente el rechazo del animal. A continuación, a los 72 animales en estudio se les realizó una lesión cortante de dirección longitudinal a nivel de la región dorsal cervical en el sentido del eje principal del cuerpo (Reddy y cols., 2002). Los cortes de 1 cm de longitud fueron realizados con una hoja de bisturí N° 4, bajo estado de anestesia con Ketamina y Xilacina (90 mg /Kg y 10 mg/Kg respectivamente vía IP) (Iyaniwura y Okonkwo, 2004). El grupo N° 1 continuó con la dosis oral del extracto y además, se le administró tópicamente 100 µl del mismo extracto sobre la herida cada 8 horas por 8 días. Al grupo N° 2 sólo se le administró el extracto de forma tópica sobre la herida cada 8 horas por 8 días. Al grupo N° 3 sólo se le realizó la incisión en la piel y se mantuvo en observación durante los 8 días. Todos los animales fueron controlados diariamente en su estado general y peso.

Los animales fueron sacrificados realizando la eutanasia de ellos de acuerdo a uno de los métodos aceptados por la "Asociación Médico Veterinaria de América" (www.ivis.org) y la "Asociación Chilena de Ciencias de Animales de Laboratorio (ASOCHICAL)", el que contempla la utilización de una guillotina especial para realizar la decapitación de los animales, procurando una muerte rápida, con mínimo sufrimiento, además de respetar el área de la piel donde se realizó la incisión. Este proceso se comenzó sacrificando 3 animales de cada grupo inmediatamente después de realizar el corte de la piel sacrificando, luego a las 3 hr, 6 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 6 y 8 días después de la realización del corte de la piel. A continuación se extrajeron colgajos de piel de cada animal que incluían en su interior la herida experimental. Además, se perfundieron los hígados de los animales *in situ* para eliminar la sangre remanente, los que posteriormente fueron pesados y luego homogeneizados para preparar las fracciones subcelulares microsomal y citosólica hepática (ver preparación de microsomas y citosol hepáticos descrita en la metodología del objetivo 3), las cuales fueron utilizadas para determinar la actividad GSH-transferasa.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

3. Técnicas Histoquímicas e Inmuno-histoquímicas.

a) **Preparación de los colgajos de piel para el desarrollo de las técnicas histoquímicas.** Los colgajos de piel fueron fijados en formol neutro (pH 7,2) por 24 horas a temperatura ambiente; luego se pasaron por una batería de alcoholes ascendentes para deshidratar el tejido, que incluye el paso por alcohol de 70° (30 a 45 minutos), alcohol 95° (30 a 45 minutos por 3 veces), alcohol de 100° (30 a 45 minutos por 3 veces), xilol (30 a 45 minutos por 3 veces). Finalmente los colgajos fueron incluidos en parafina de punto de fusión entre 56 y 58°C, pasando por 3 baños de 30 minutos cada uno y así la inclusión del tejido en la parafina permitió obtener los moldes para su utilización en la preparación de cortes seccionados de 4 micrómetros de espesor y las posteriores tinciones histoquímicas e inmuno-histoquímicas.

b) **Tinciones histoquímicas.** Para llevar a cabo estas tinciones los cortes fueron previamente desparafinados e hidratados en una batería que incluye xilol (2 pasos), alcohol 100% (2 pasos), alcohol 95%, alcohol 70% y finalmente agua destilada.

- **Hematoxilina/eosina:** determina la histología tisular mediante microscopía óptica. Se diferenciaron leucocitos, eritrocitos, fibroblastos, células epiteliales, fibras colágenas, vasos sanguíneos. (Mc Manus and Mowry, 1965). Las muestras desparafinadas e hidratadas se sometieron primero a la tinción nuclear con Hematoxilina de Harris (hematoxilina (5g), alcohol absoluto (50 ml), alumbre de potasio (100g), agua destilada (1000mL) y óxido rojo de mercurio (2,5g) y se lavaron con abundante agua corriente durante 10 minutos. Luego se realizó la tinción citoplasmática con eosina 1% durante 1 a 2 minutos y nuevamente las muestras se lavaron rápidamente en agua destilada. Posteriormente los cortes se deshidrataron en alcohol 50%, alcohol 70%, alcohol 95% y alcohol 100% (2 veces) y finalmente se aclararon con dos lavados con xilol.

La observación microscópica muestra los núcleos de color azul, mientras que el citoplasma y otros elementos celulares se aprecian de color rosado a rojo.

- **Picrosirius,** tinción que permite diferenciar colágeno tipo I y III fundamentalmente. En este caso las muestras se tiñeron con solución picrosirius, la cual contiene Rojo Sirius al 0.1 % en solución acuosa saturada con ácido pícrico. A continuación se lavaron en agua corriente para finalmente ser deshidratadas y aclaradas.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

La observación de las muestras se realiza en microscopio de polarización. Con esta tinción el colágeno tipo I se aprecia amarillo brillante, naranja o rojo; el colágeno tipo II se observa azul o amarillo claro, y el colágeno tipo III de color verde.

c) Preparación de las muestras para realizar las tinciones Inmuno-Histoquímicas. Los cortes de tejido incluidos en parafina, de 4 μm de espesor, fueron montados en portaobjetos tratados con Silane (como adherente) y secados a temperatura ambiente por 12 h. Luego fueron desparafinados hasta el agua destilada y calentados en buffer citrato pH 6.0 durante 20 minutos a 93-95°C en una vaporera eléctrica marca Oster® para la recuperación de actividad antigénica. Luego se realizó un bloqueo de la peroxidasa endógena con el Reactivo de Bloqueo (H_2O_2 3%) a T° ambiente durante 5 minutos. A continuación las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios durante 18 horas a 4°C; posteriormente se lavaron con buffer fosfato salino 10 mM pH 7,3 (PBS) y se incubaron con los anticuerpos secundarios biotinilados específicos para cada uno de los marcadores en estudio (COX-2, Ki-67, CD-4 y CD-8) durante 20 minutos a T° ambiente. Luego, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con el conjugado Estreptavidina-Peroxidasa por 20 minutos a T° ambiente, se lavaron con PBS y se revelaron con la solución sustrato-cromógenos (DAB) incubando durante 5 minutos, controlando al microscopio la unión del cromógeno a la Estreptavidina que es lo que produce la coloración del marcador. A continuación las muestras se lavaron con agua destilada. Luego se realiza una contra-tinción con Hematoxilina durante 30 segundos a T° ambiente y las muestras se lavan con agua corriente; finalmente se deshidratan, se aclaran y se montan en Entellan.

d) Tinciones Inmuno-Histoquímicas:

- **COX-2.** Esta enzima inducible cataliza la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, segunda etapa de la cascada inflamatoria. Se localiza tanto en la membrana celular como en el citoplasma y participa en la fase inflamatoria del proceso de cicatrización. La presencia de esta enzima se determinó por la técnica inmuno-histoquímica descrita por Ranger y cols., 2004. La tinción de color café debe observarse en citoplasma y membrana celular donde se encuentra la enzima.

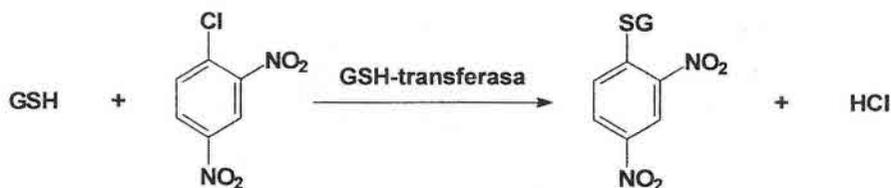
• **Ki-67.** Es una proteína nuclear de gran tamaño que interviene en el mantenimiento del ciclo celular, encontrándose en las fases G1, S, G2 y M. El antígeno de la Ki67 es considerado como un marcador de la proliferación celular. La tinción de color café debe observarse en los núcleos en proceso de mitosis.

e) Análisis de imágenes. Las imágenes obtenidas de los métodos de infiltración celular y de las reacciones de inmuno-histoquímica se analizaron a través de imágenes digitalizadas. Para ello se utilizó una cámara fotográfica incorporada al microscopio, usando objetivos de 6,3x y 16x, con ocular de cámara de 3.0x.

f) Determinación de la actividad GSH-transferásica.

La GSH-transferasa es una de las enzimas mayoritariamente asociadas a los mecanismos enzimáticos que responden a la capacidad antioxidante celular. Esta enzima se induce (*síntesis de novo*) por estrés oxidativo y además, por algunos xenobióticos lipofílicos. Como una forma de evaluar posible estrés oxidativo inducido por el tratamiento de los animales, se determinó la actividad microsómica hepática y citosólica de esta enzima de todos los animales expuestos al tratamiento como también de aquellos utilizados para controlar la dosis de *Buddleja globosa*.

La actividad GSH-transferásica se midió de acuerdo a la técnica espectrofotométrica descrita por Habig y cols., (1974). La conversión del sustrato en conjugado de GSH, produce un cambio en las propiedades espectrales del sustrato que se aprovecha para cuantificar la actividad de la enzima. La reacción química catalizada por la GSH-transferasa es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1 mL: amortiguador fosfato 0,1M pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenzene 1mM; GSH 4mM; proteína citosólica 10 µg/mL o proteína microsómica 100 µg/mL. El blanco contenía todos los reactivos, a excepción del GSH. La actividad se determinó midiendo la absorbancia del

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

conjugado formado enzimáticamente a 340 nm, en forma continua durante 2 min a 25°C. La velocidad enzimática se cuantificó utilizando el coeficiente de extinción del conjugado formado: $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, descrito por Habig y cols. (1974).

Referencias

1. Habig, W., Pabst, M. and Jakoby, W. 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249(22)**: 7130-7139.
2. Iyaniwura, T.T., Okonkwo, C.A. (2004). The acute intraperitoneal toxicity of cypermethrin. *Vet. Hum. Toxicol.* **46(2)**: 91-92.
3. Letelier, M.E., Del Villar, E., Sánchez, E. (1985). Drug tolerance and detoxicating enzymes in *Octodon degus* and Wistar rats. A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* **80(1)**: 195-198.
4. Letelier, M.E., Lepe, A.M., Faúndez, M., Salazar, J., Marín, R., Aracena P., Speisky, H. (2005). Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **151**: 71-82.
5. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-273.
6. McManus, J.F.A., Mowry, R.W. (1968). Staining Methods. *Histologic and Histochemical. Special Methods for the Constituents of Cell and Tissues.* Hoerber International Reprints. pp: 124-128.
7. Price, P.W., Waring, G.L., Julkunen-Tiitto, R., Tahvanainen, J., Mooney, H.A., Craig, T.P. (1989). Carbon-nutrient balance hypothesis in within species phytochemical variation of *Salix lasiolepis*. *J. Chem. Ecol.* **15**: 1117-1131.
8. Ranger, G.S, Thomas, V., Jewell, A., Mokbel, K. (2004). Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with distant metastases in breast cancer. *Anticancer Res.* **24(4)**: 2349-2351.
9. Reddy, J.S., Rao, P.R., Reddy, M.S. (2002). Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* and *Acalypha indica* in rats. *J. Ethnopharmacol.* **79**: 249-251.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
e-mail: mel@ciq.uchile.cl

4. RESULTADOS E HITOS

A. Caracterización de material proveniente de distintas condiciones. Selección del material genético y determinación de las técnicas de manejo. Las diferentes muestras fueron tomadas, deshidratadas y entregadas o a punto de entregar (ver tablas a continuación).

Clon de vellosidad: se ha observado que en los meses de noviembre y diciembre las plantas generalmente presentan escasa vellosidad, mientras que en marzo ya es abundante. Es por ello que, al muestrear las poblaciones silvestres durante el mes de noviembre, no se encontró diferencia en la vellosidad de los individuos.

Muestras tomadas de diferentes condiciones agronómicas y de deshidratado

CLONES CULTIVADOS EN PANGUILEMO

Código	Origen	Fecha Cosecha	Fecha Envío
GC1	huerto casero Penciahue	10-11-2005	09-01-2006
GC2	huerto casero Talca	10-11-2005	09-01-2006
GC3	población silvestre Los Ruiles	10-11-2005	09-01-2006
GC4	población silvestre Tolhuaca	10-11-2005	09-01-2006
GC5	huerto casero San Javier	10-11-2005	09-01-2006
CG6	población silvestre Los Queñes	10-11-1950	09-01-2006

MATERIAL RECOLECTADO EN POLACIONES SILVESTRE

Código	Origen	Fecha Cosecha	Fecha Envío
GS1	Los Ruiles (Km 23-22 camino Cauquenes a Chanco)	17-11-2005	09-01-2006
GS2	Los Queñes	25-11-2005	09-01-2006

TRATAMIENTOS DE POSTCOSECHA

Código	Tratamiento	Fecha Cosecha	Tiempo Secado
P1	secado bajo sombra	27-12-2005	9 días
P2	secado bajo sol	03-01-2006	32 horas
P3	secado en estufa a 40°C	27-12-2005	48 horas
P4	secado en estufa a 60°C	02-01-2006	8 horas
P5	secado en estufa a 80°C	03-01-2006	6 horas
P6	lavado de hojas y secado en estufa a 40°C	27-12-2005	48 horas

FLUCTUACIÓN ANUAL

Código	Mes	Fecha Cosecha	Fecha Envío
A1	Noviembre	10-11-2005	
A2	Diciembre	20-12-2005	
A3	Enero	13-01-2006	
A4	Febrero		
A5	Marzo		

EDAD DE LA HOJA

Código	Tipo de hoja	Fecha Cosecha
E1	Joven (Superior)	13-01-2006
E2	Madura (Central)	13-01-2006
E3	Senescente (Inferior)	13-01-2006

RIEGO

Código	Tratamiento	Fecha Cosecha
R1	Bien regado (20 cb)	
R2	Estresado (40 cb)	

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Humedad residual de las muestras

Código	Repetición	Peso Inicial	Peso Final	% H ₂ O	%H° Residual
P1	1	164,6	74,8	63	9,4
P1	2	280,5	122,9	61	9,2
P1	3	188,1	85,8	62	9,4
P1	4	203,0	89,7	63	9,4
P2	1	165,7	75,2	63	7,6
P2	2	245,5	110,8	61	7,8
P2	3	222,6	97,3	63	6,4
P2	4	174,3	78,4	63	7,0
P3	1	204,7	85,4	66	7,2
P3	2	178,5	76,4	66	7,6
P3	3	345,3	139,9	64	7,0
P3	4	177,6	80,0	63	6,6
P4	1	273,2	112,5	64	7,8
P4	2	268,1	114,6	63	7,8
P4	3	258,3	105,0	65	8,2
P4	4	186,3	77,0	67	7,2
P5	1	190,4	83,3	64	5,8
P5	2	271,8	116,0	63	5,8
P5	3	245,2	104,2	63	7,2
P5	4	184,2	80,6	64	6,3
P6	1	251,2	103,4	65	7,4
P6	2	262,5	105,0	66	7,0
P6	3	171,0	74,4	65	7,2
P6	4	240,1	95,5	67	7,2

Tratamiento	Fecha Cosecha	Tiempo Secado	Prom.% H ₂ O	Prom.% H° Res.
Secado bajo sombra	27-12-2005	9 días	62,38	9,4
Secado bajo sol	03-01-2006	32 horas	62,53	7,2
Secado en estufa a 40°C	27-12-2005	48 horas	64,55	7,1
Secado en estufa a 60°C	02-01-2006	8 horas	64,73	7,8
Secado en estufa a 80°C	03-01-2006	6 horas	63,58	6,3
lavado de hojas y secado en estufa a 40°C	27-12-2005	48 horas	65,60	7,2

Signif. ** Signif. **

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

B. Capacidad antioxidante de las muestras de droga vegetal obtenidas de las distintas condiciones de cultivo y cosecha. De las hojas de *Buddleja globosa* se prepararon extractos hidroalcohólicos al 50% utilizando para ello la misma técnica estandarizada con la cual se preparó el extracto utilizado en los experimentos de cicatrización en ratas.

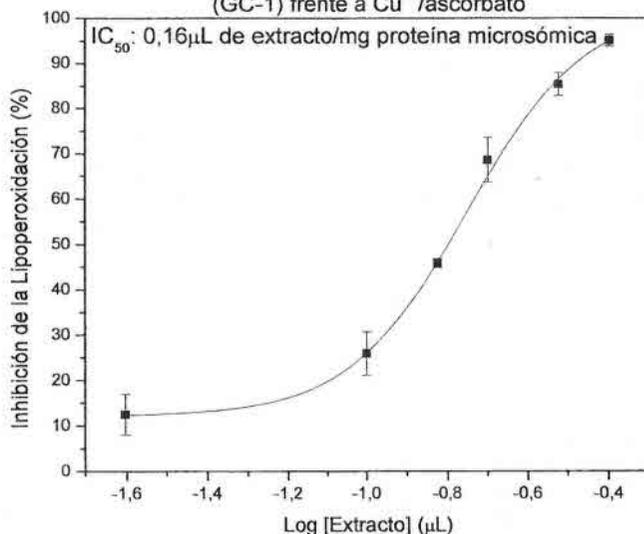
B.1. Cuantificación de polifenoles. Los resultados están expresados como nmoles de catequina/ μ L de extracto, que fue el estándar utilizado como referencia. Los valores representan el promedio de 4 determinaciones \pm SD.

Extracto	nmoles de catequina/ μ L de extracto	\pm SD
P1	43,13	0,57
P2	40,49	1,20
P3	40,41	0,91
P4	25,06	1,12
P5	32,82	0,68
P6	38,40	0,76
GC1	47,75	0,62
GC2	58,78	0,21
GC3	57,65	2,48
GC4	54,46	1,62
GC5	55,84	0,91
GC6	57,85	2,05
GS1	54,94	3,21
GS2	41,99	0,63
A1	52,42	0,20
A2	47,81	1,19
A3	40,26	0,40
A4	44,04	0,20
A5	41,66	1,98
E1	45,02	1,58
E2	43,48	0,59
E3	36,21	1,78
R1	41,80	0,20
R2	45,15	0,20

B.2. Lipoperoxidación microsómica. Se determinó el efecto de los extractos sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema oxidante Cu^{2+} /ascorbato.

B2.1. Determinación del IC_{50} para el extracto GC-1. Los microsomas fueron previamente incubados con el extracto durante 10 min a 37°C , antes de inducir la lipoperoxidación con Cu^{2+} /ascorbato. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato, en ausencia del extracto. El valor IC_{50} representa la concentración de extracto que inhibe el 50% de la lipoperoxidación microsómica y fue calculado considerando como 100% el valor obtenido en ausencia de extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

IC_{50} de lipoperoxidación de extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa*
(GC-1) frente a Cu^{2+} /ascorbato



B.2.2. Determinación del efecto antilipoperoxidante de los extractos. Para estos experimentos se utilizó la concentración IC₅₀ (0,16 µL) obtenida de la curva concentración-respuesta antilipoperoxidante del extracto GC-1. El procedimiento fue igual a aquel utilizado para determinar el valor IC₅₀ de la prevención de lipoperoxidación del extracto GC-1 (B.2.1). los valores representan el promedio de 6 experimentos ± SD

Extracto	% de Prevención lipoperoxidación	± SD
P1	54,38	1,55
P2	63,88	1,21
P3	51,67	1,53
P4	41,30	1,85
P5	62,21	1,78
P6	63,94	0,26
GC1	50,00	0
GC2	71,09	2,26
GC3	64,61	1,63
GC4	60,78	1,77
GC5	62,90	2,04
GC6	57,61	0,87
GS1	68,40	1,91
GS2	67,67	0,89
A1	63,55	0,36
A2	63,01	0,89
A3	52,49	0,62
A4	55,81	1,14
A5	64,79	0,35
E1	65,62	0,96
E2	66,74	0,81
E3	67,68	0,97
R1	62,14	2,86
R2	62,18	0,98

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

B.3. Efecto de los extractos de *Buddleja globosa* sobre la oxidación de tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato. El efecto protector de los tioles microsómicos fue significativamente inferior al efecto antilipoperoxidante de los extractos. Es por ello que utilizamos en este caso 3 μL de cada uno de los extractos (aproximadamente 20 veces más extracto) para realizar estos experimentos. Los microsomas fueron previamente incubados con el extracto durante 10 min a 37°C , antes de inducir la oxidación de los tioles con Cu^{2+} /ascorbato. El porcentaje de inhibición fue calculado considerando como 100% el valor de la oxidación de tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato, en ausencia del extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar

Extracto	% Prevención Oxidación de tioles	\pm SD
P1	47,92	2,69
P2	46,71	3,91
P3	37,20	2,69
P4	39,97	3,18
P5	43,77	1,71
P6	41,52	3,43
GC1	40,66	1,71
GC2	32,70	3,67
GC3	37,89	4,65
GC4	41,87	2,94
GC5	25,61	2,45
GC6	27,51	2,69
GS1	31,32	0,73
GS2	43,08	2,69
A1	29,07	2,45
A2	30,97	2,69
A3	40,66	1,71
A4	43,94	2,45
A5	42,91	3,91
E1	39,62	4,16
E2	33,74	2,20
E3	29,76	3,43
R1	37,54	2,69
R2	47,92	2,69

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

C. Método para identificar a *Buddleja globosa* en una droga vegetal y en un preparado mediante marcadores químicos.

Disponemos de la literatura completa de *Buddleja globosa* y otras especies similares del mismo género.

C.1. Compuestos seleccionados de la literatura que sólo aparecen presentes en *Buddleja globosa*

Compuesto	Metodología
Dehydrobuddlein A	Liao et al, 1999 (Raiz)
Maytenone	Mensah et al, 2000 (corteza)
p- methoxycinnamoyl catalpol	Houghton & Hikino, 1989
Deoxybuddlejone	Mensah et al, 2000 (corteza)
Sutellarein-7-O-glucoside	Marín et al, 1979 (Hoja)
β-amyrin acetate	López et al, 1979 (Hoja)
7-p-methoxycinnamoylaucubin	Houghton & Hikino, 1989 (hoja)
7-p-methoxycinnamoylcatalposide	Houghton & Hikino, 1989 (hoja)
Hydroxybuddlejone	No
Lupeol	Marín et al, 1979 (Hoja)
Zerumbone	Liao et al, 1999 (Raiz)

C.2. Determinación del contenido de agua

Código	Repetición	Peso Inicial	Peso Final	% H ₂ O	%H° Residual
P1	1	164,6	74,8	63	9,4
P1	2	280,5	122,9	61	9,2
P1	3	188,1	85,8	62	9,4
P1	4	203,0	89,7	63	9,4
P2	1	165,7	75,2	63	7,6
P2	2	245,5	110,8	61	7,8
P2	3	222,6	97,3	63	6,4
P2	4	174,3	78,4	63	7,0
P3	1	204,7	85,4	66	7,2
P3	2	178,5	76,4	66	7,6
P3	3	345,3	139,9	64	7,0
P3	4	177,6	80,0	63	6,6
P4	1	273,2	112,5	64	7,8
P4	2	268,1	114,6	63	7,8
P4	3	258,3	105,0	65	8,2
P4	4	186,3	77,0	67	7,2
P5	1	190,4	83,3	64	5,8
P5	2	271,8	116,0	63	5,8
P5	3	245,2	104,2	63	7,2
P5	4	184,2	80,6	64	6,3
P6	1	251,2	103,4	65	7,4
P6	2	262,5	105,0	66	7,0
P6	3	171,0	74,4	65	7,2
P6	4	240,1	95,5	67	7,2

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Código	Tratamiento	Tiempo Secado	Prom.% H ₂ O	Prom.% H° Res.
P1	secado bajo sombra	9 días	62,38 c	9,4 A
P2	secado bajo sol	32 horas	62,53 c	7,2 B
P3	secado en estufa a 40°C	48 horas	64,55 ab	7,1 B
P4	secado en estufa a 60°C	8 horas	64,73 ab	7,8 B
P5	secado en estufa a 80°C	6 horas	63,58 bc	6,3 C
P6	lavado de hojas y secado en estufa a 40°C	48 horas	65,60 a	7,2 B

Signif. ** Signif. **

C.3. Preparación del extracto de la droga cruda

Código	Peso Seco	% H° Residual	1° extracto	2° extracto	3° extracto	TOTAL
M1	546,4	7,9	91,80	38,30	32,60	162,70
M2	562,7	8	110,19	53,53	26,40	190,12
M3	430,7	8	76,70	42,20	25,20	144,10
M4	408,3	8,5	66,77	26,01	25,40	118,18
M5	476,0	10,9	51,34	46,00	63,12	162,46
M6	611,2	8,2	77,05	53,20	50,87	181,12

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

C.4. Caracterización y cuantificación individual de los flavonoides, fenilpropanos, iridoides y terpenos

Cuantificación de polifenoles de los extractos estandarizados

N° muestra	% Fenoles totales (E.A.T.)	Taninos %	% Flavonoides Totales (a)	% Flavonoides Totales (b)
A1	1,72	0,69	0,32	0,34
A2	1,35	0,62	0,30	0,32
A3	1,17	0,51	0,12	0,32
A4	1,09	0,33	0,13	0,21
A5	1,20	0,40	0,19	0,22
P1	1,74	0,80	0,14	0,36
P2	1,21	0,55	0,23	0,32
P3	1,10	0,60	0,21	0,34
P4	0,91	0,48	0,13	0,24
P5	0,92	0,40	0,18	0,32
P6	1,40	0,60	0,19	0,32
GC1	1,75	0,80	0,26	0,32
GC2	1,28	0,50	0,28	0,31
GC3	1,96	0,80	0,34	0,47
GC4	1,96	0,96	0,34	0,47
GC5	1,95	0,80	0,34	0,45
GC6	1,96	0,70	0,32	0,44
GS1	1,50	0,80	0,24	0,39
GS2	1,40	0,58	0,18	0,33
R1	1,18	0,70	0,36	0,21
R2	1,13	0,55	0,20	0,26
E1	1,15	0,70	0,36	0,33
E2	1,20	0,56	0,26	0,22
E3	1,06	0,50	0,24	0,25
<i>Buddleja Globosa</i>	10,20	1,40	0,25	
<i>Buddleja davidi</i>	8,50	1,30	0,32	
<i>Buddleja Globosa</i> (hojas sin pelos)	6,30	1,10	0,24	

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Fenoles totales: Metodo de Folin-Ciocalteu; sustancia de referencia Acido tanico (100ug/ml); máxima absorción: 725 nm.

Taninos: precipitación con pvpp. y luego se cuantificaron por el método de Folin-Ciocalteu.

Flavonoides totales: (a) método alemán G.Frank und H.Koehler; (b) método colorimétrico del triclورو de aluminio; solución de referencia Quercetina (50ug/ml).

C.5. Análisis de extractos de matico

Mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) se chequearon los distintos extractos preparados en el Laboratorio de Ximena Polanco y otros preparados en nuestro laboratorio.

Muestra analizadas:

Código*	Código*	Código*	Código*	Código*	Código*	Código#
GC1	GS1	P1	A1	E1	R1	M1
GC2	GS2	P2	A2	E2	R2	M2
GC3		P3	A3	E3		M3
GC4		P4	A4			M4
GC5		P5	A5			
GC6		P6	A6&			

* Extractos preparados en el Laboratorio de Ximena Polanco

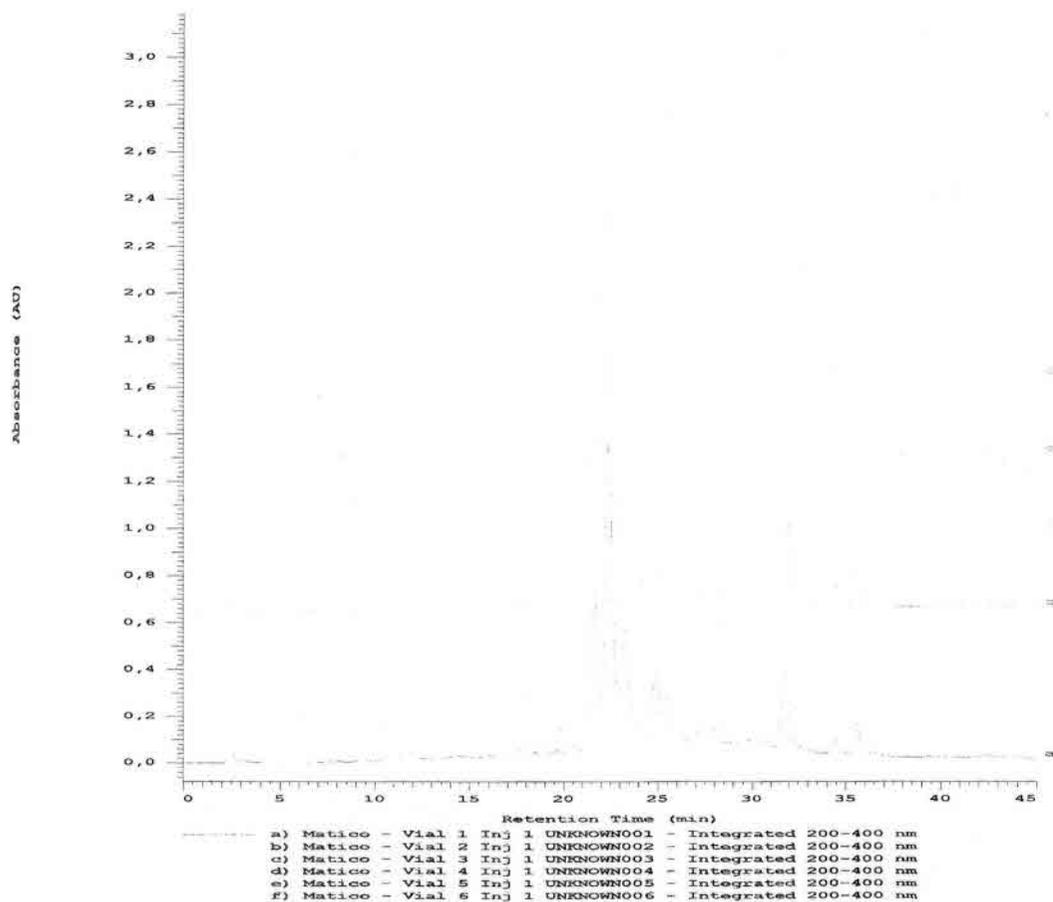
Extractos preparados en el Laboratorio de Plantas Aromáticas-Utalca

& No recibido

A continuación se entregan la comparativa de los cromatogramas y un análisis de seis de las señales más representativas de estos.

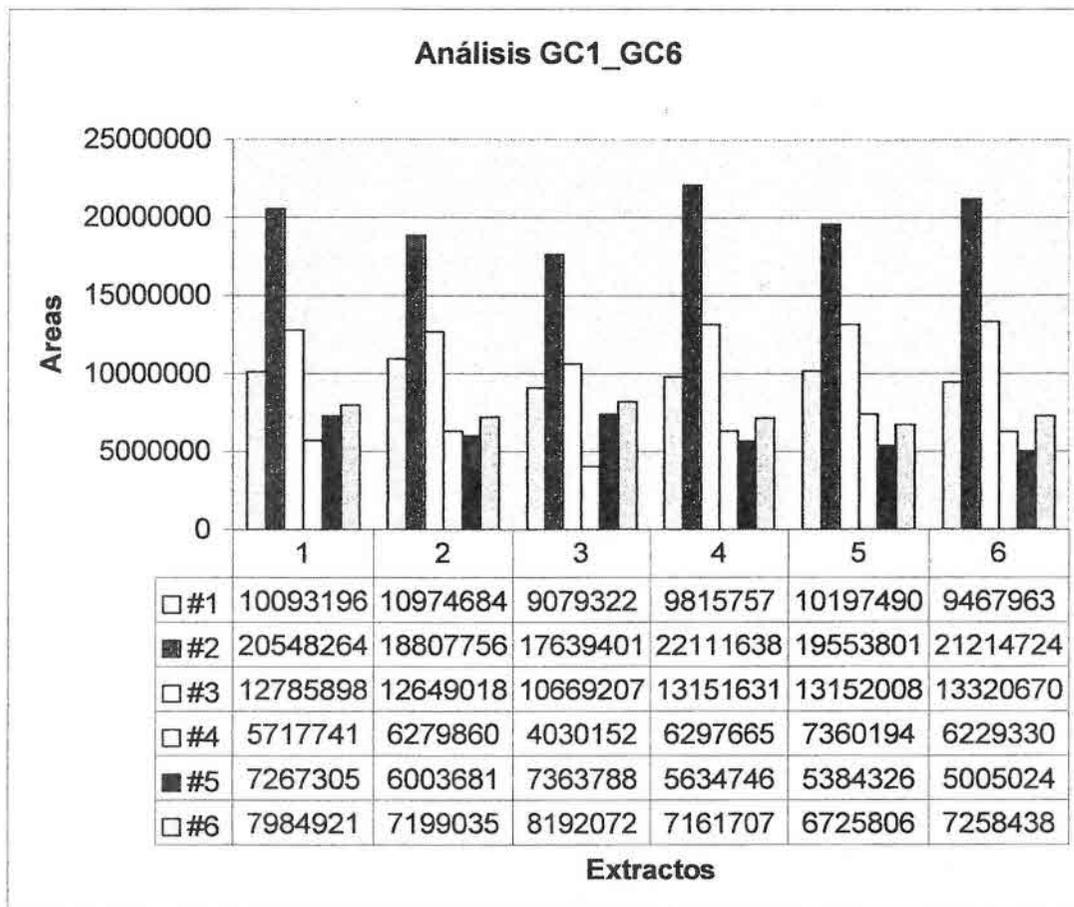
C.5.1. Análisis de los extractos GC1 al GC6

Comparación de cromatogramas:



Extractos: a) GC1; b) GC2; c) GC3; d) GC4; e) GC5; f) GC6

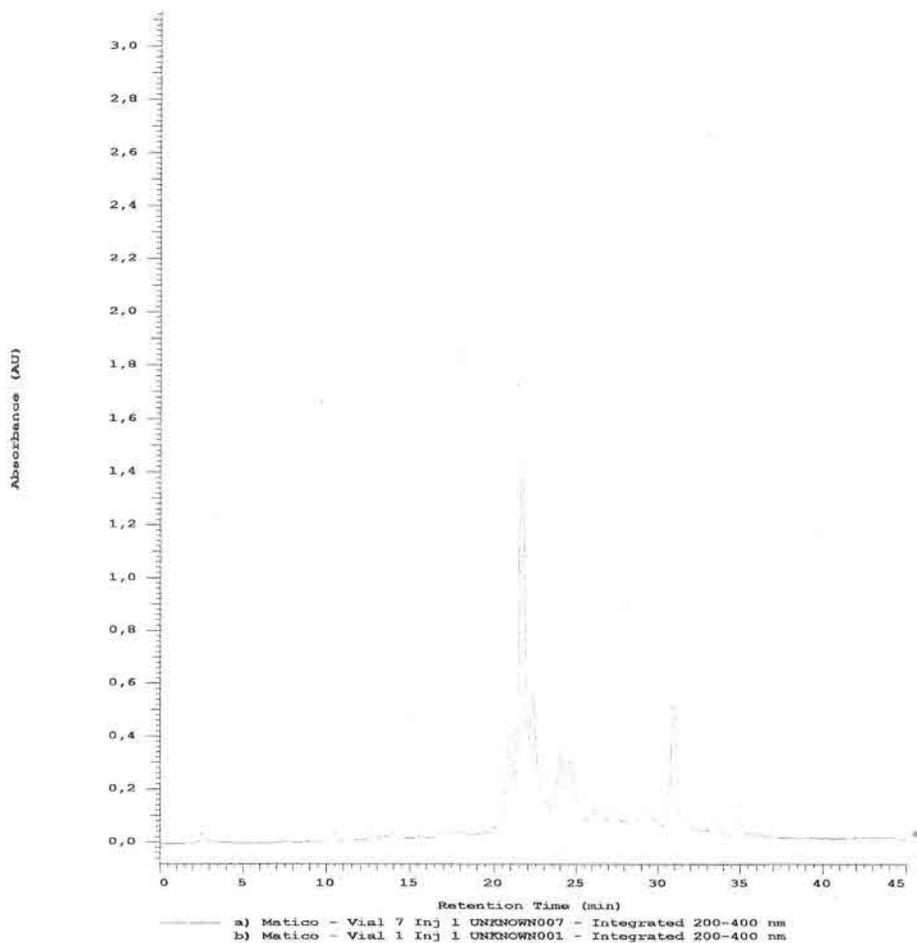
Resultados del análisis de los seis compuestos mayoritarios



Extractos GC1=1; GC2=2; GC3=3; GC4=4; GC5=5; GC6=6.

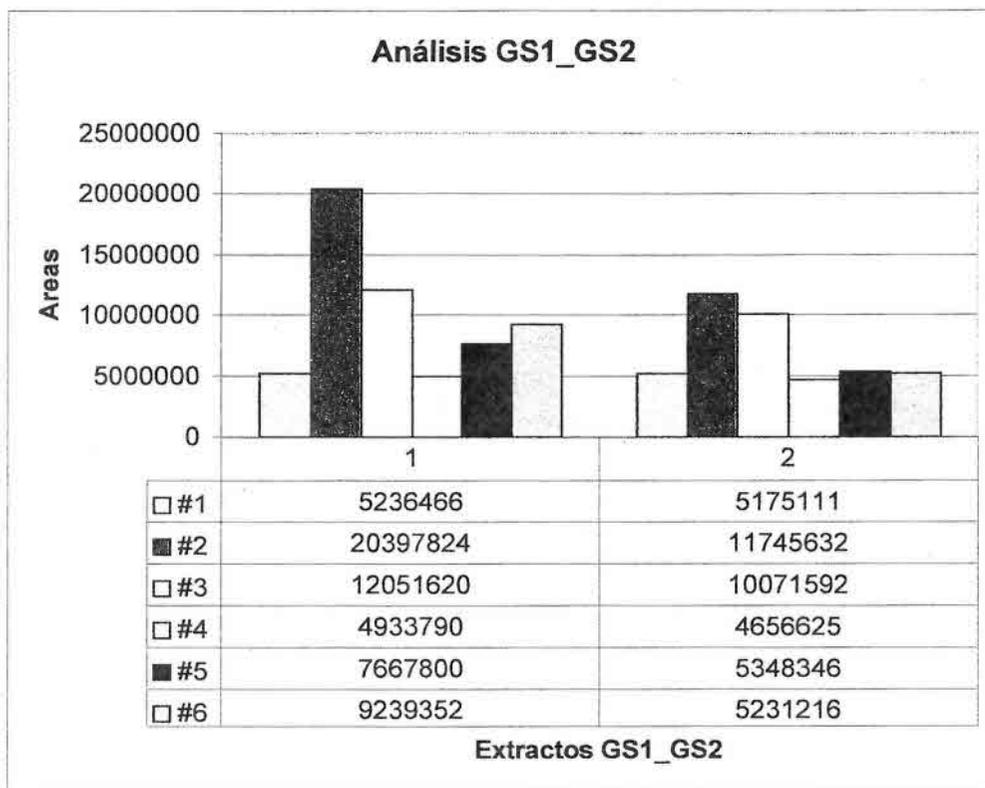
C.5.2. Análisis de los extractos GS1 y GS2

Comparación de cromatogramas



Extractos: a) GS1; b) GS2

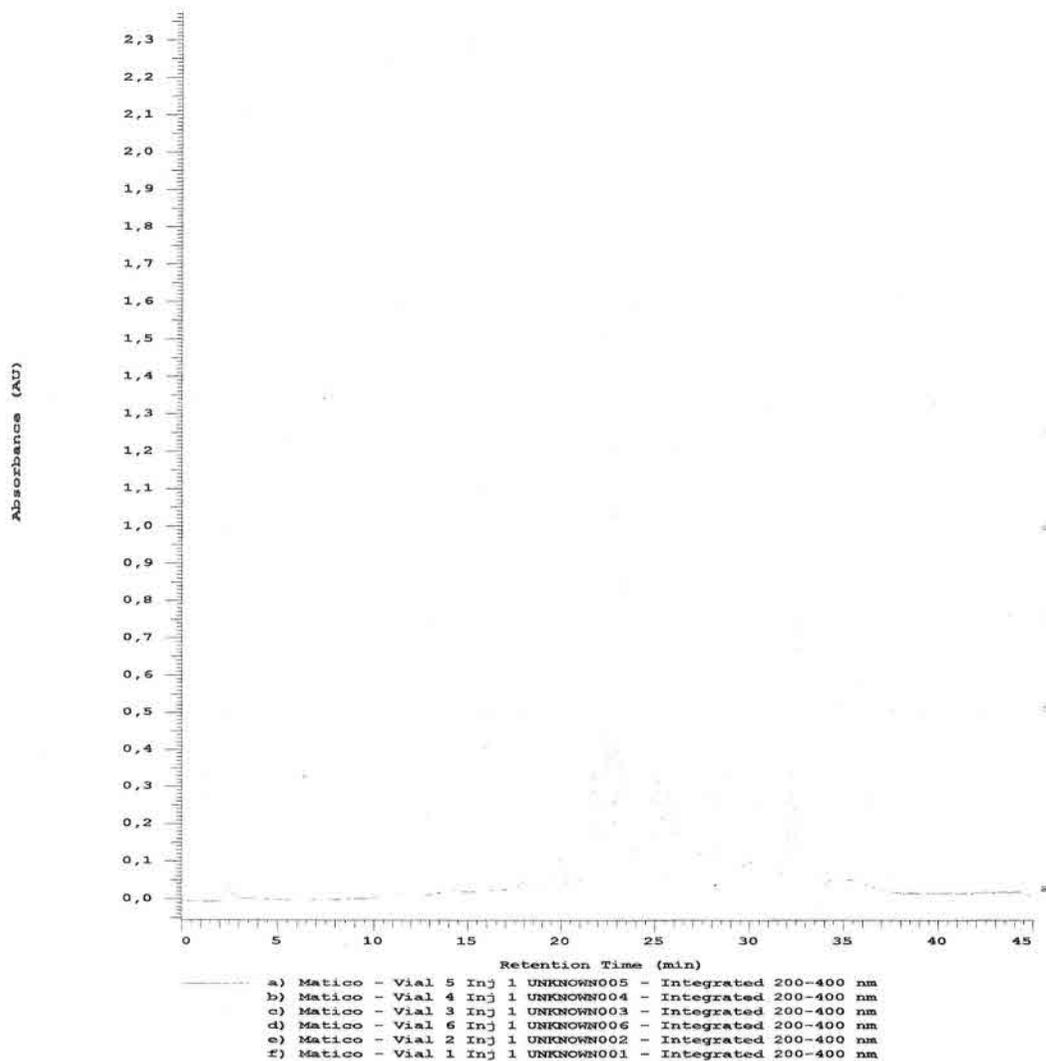
Resultados del análisis de los seis compuestos mayoritarios



Extractos: 1) GS1; 2) GS2

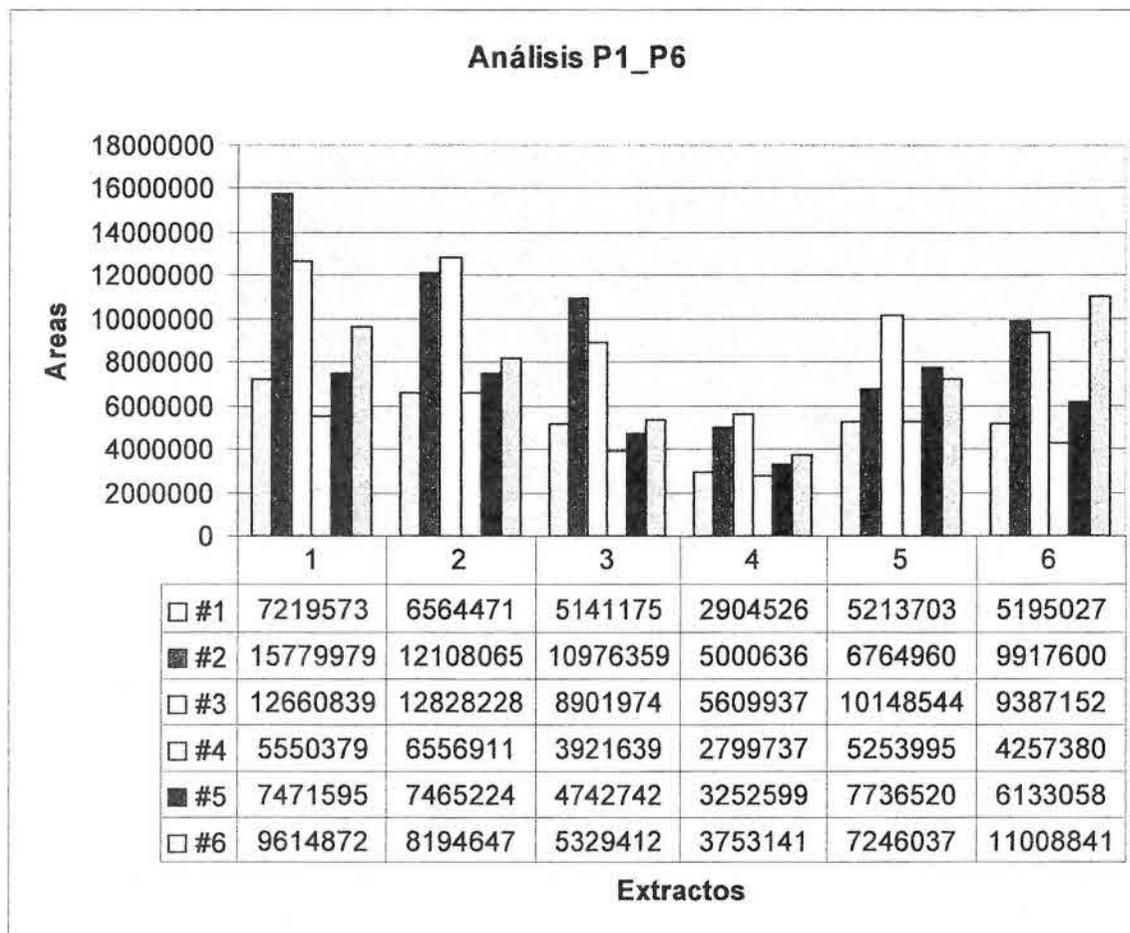
C.5.3. Análisis de los extractos P1 al P6

Comparación de cromatogramas



Extractos: a) P5; b) P4; c) P3; d) P6; e) P2; f) P1

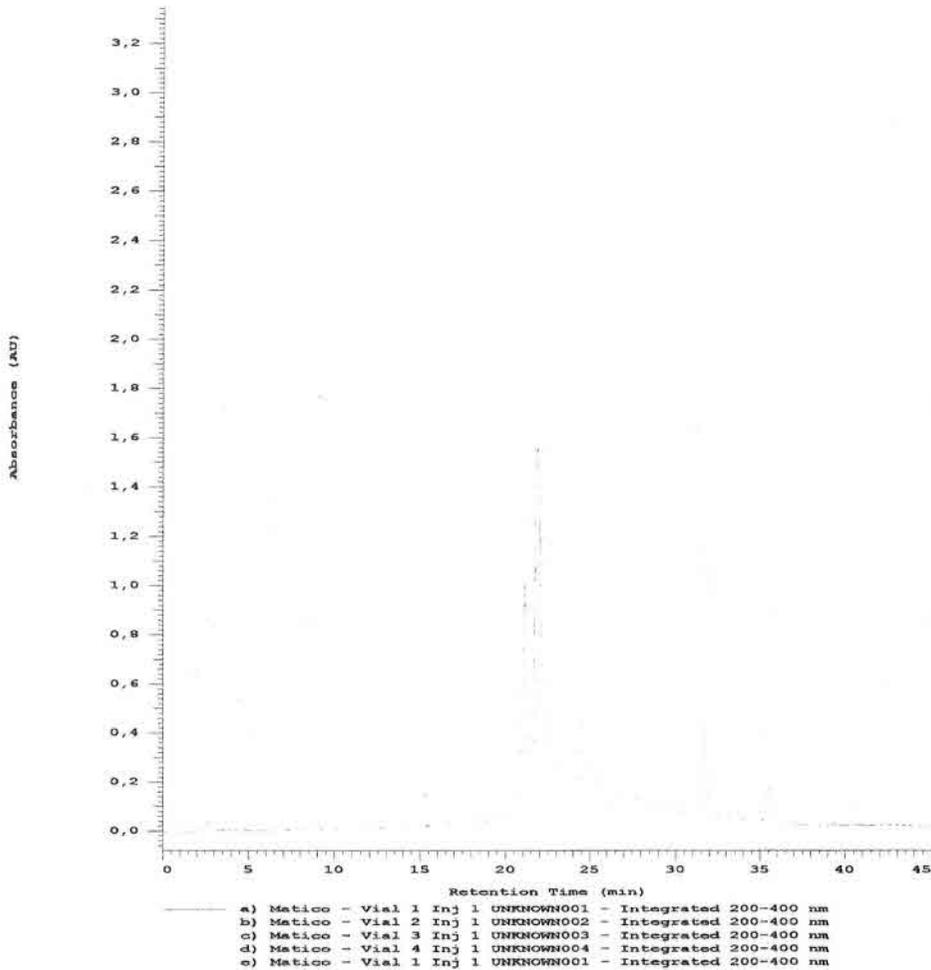
Resultados del análisis de los seis compuestos mayoritarios



Extractos: P1=1; P2=2; P3=3; P4=4; P5=5; P6=6.

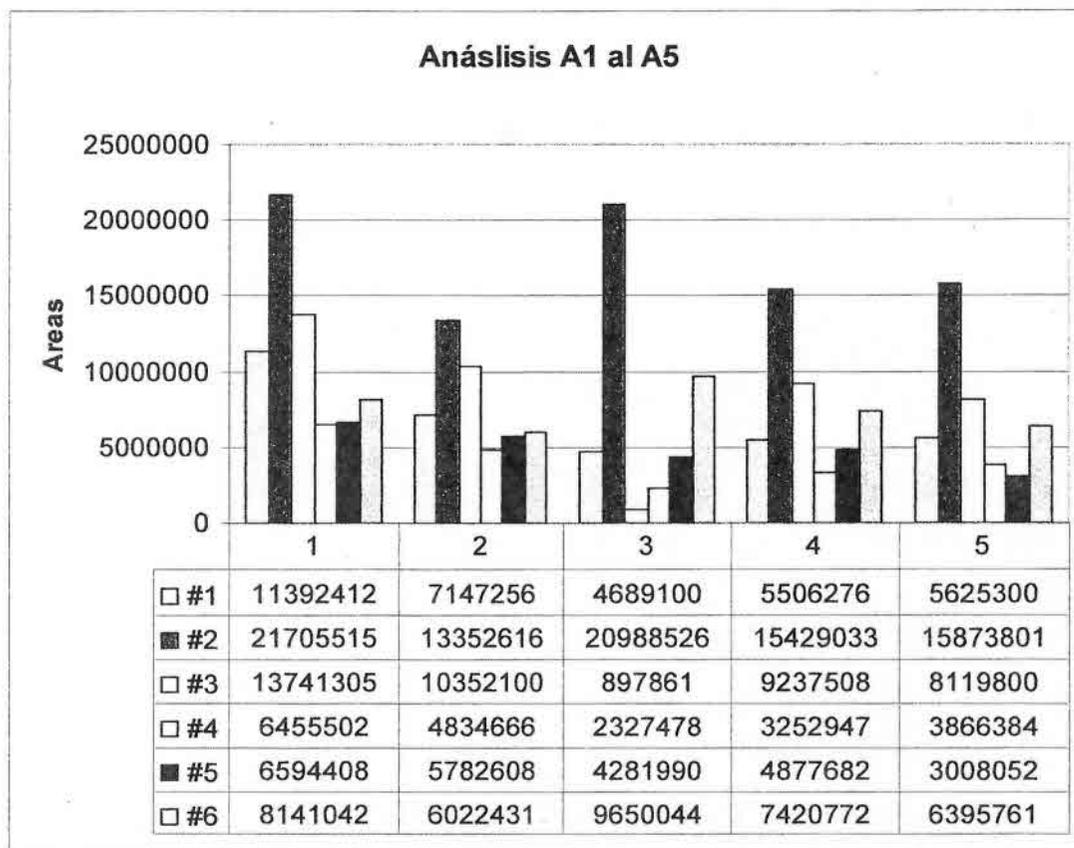
C.5.4. Análisis de los extractos A1 al A5

Comparación de cromatogramas:



Extractos: a) A1; b) A2; c) A3; d) A4; e) A5

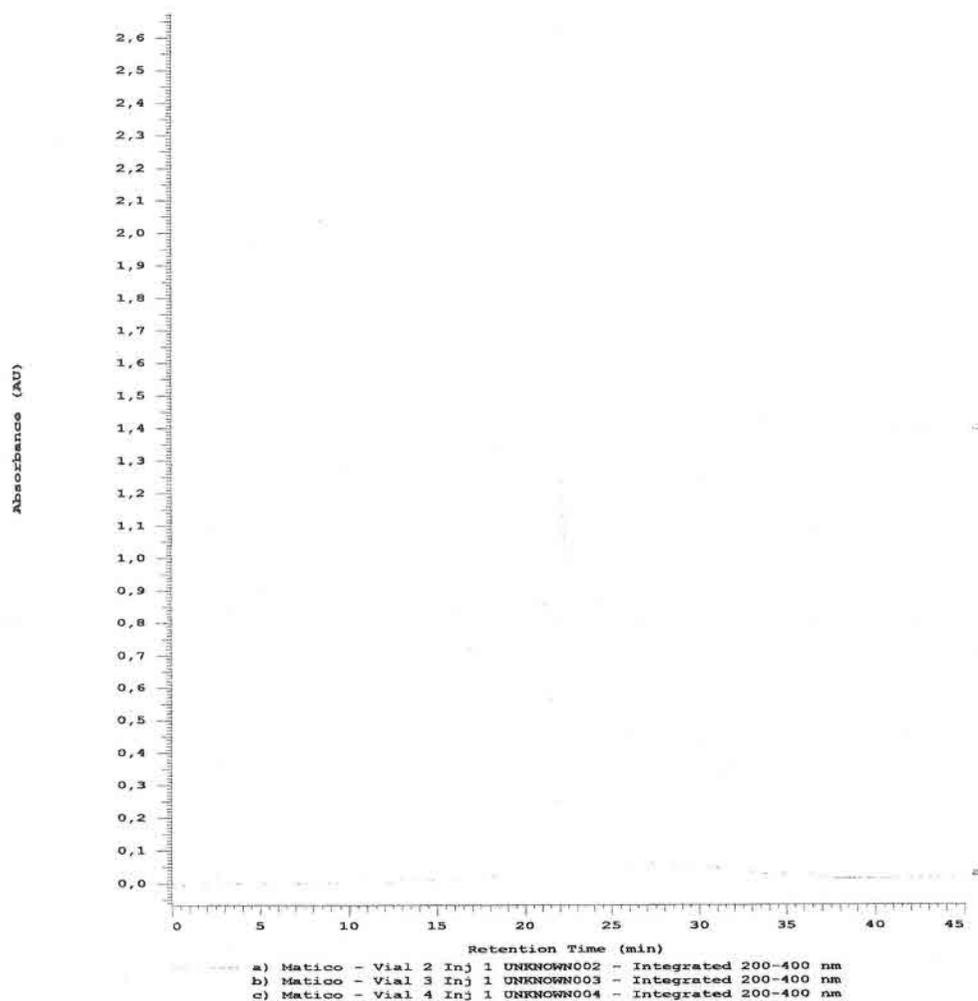
Resultados del análisis de los seis compuestos mayoritarios



Extractos: 1) A1; 2) A2; 3) A3; 4) A4; 5) A5

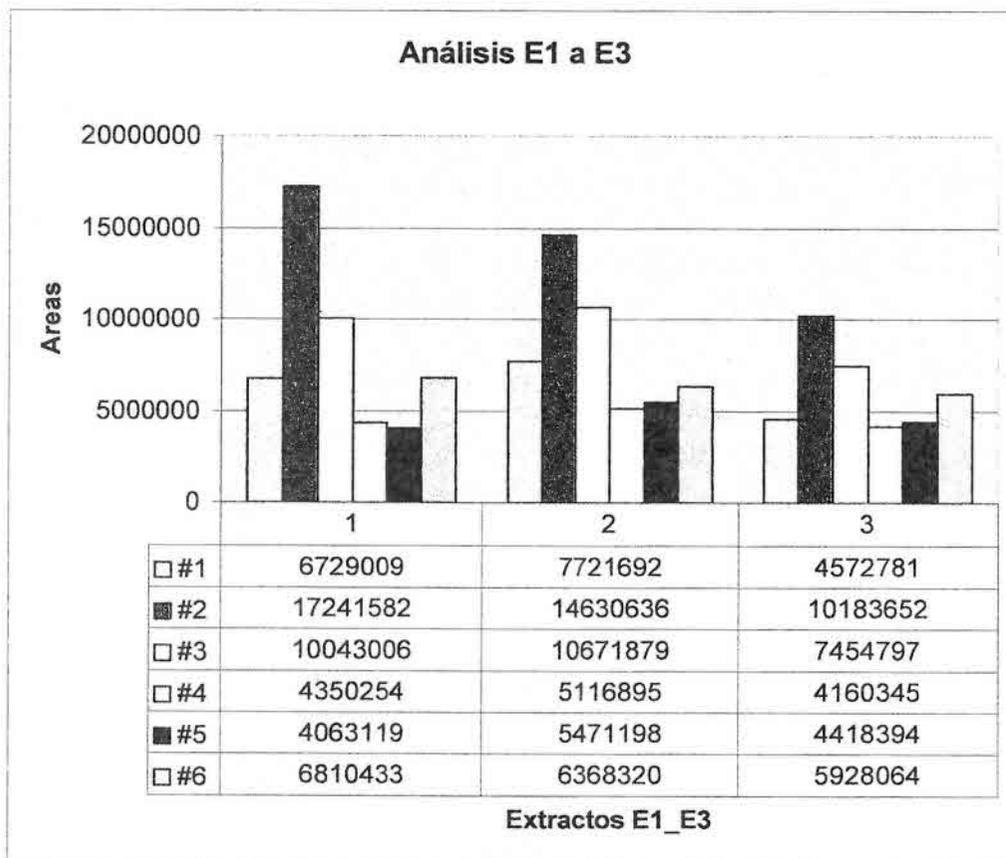
C.5.5. Análisis de los extractos E1 al E3

Comparación de cromatogramas:



Extractos: a) E1; b) E2; c) E3

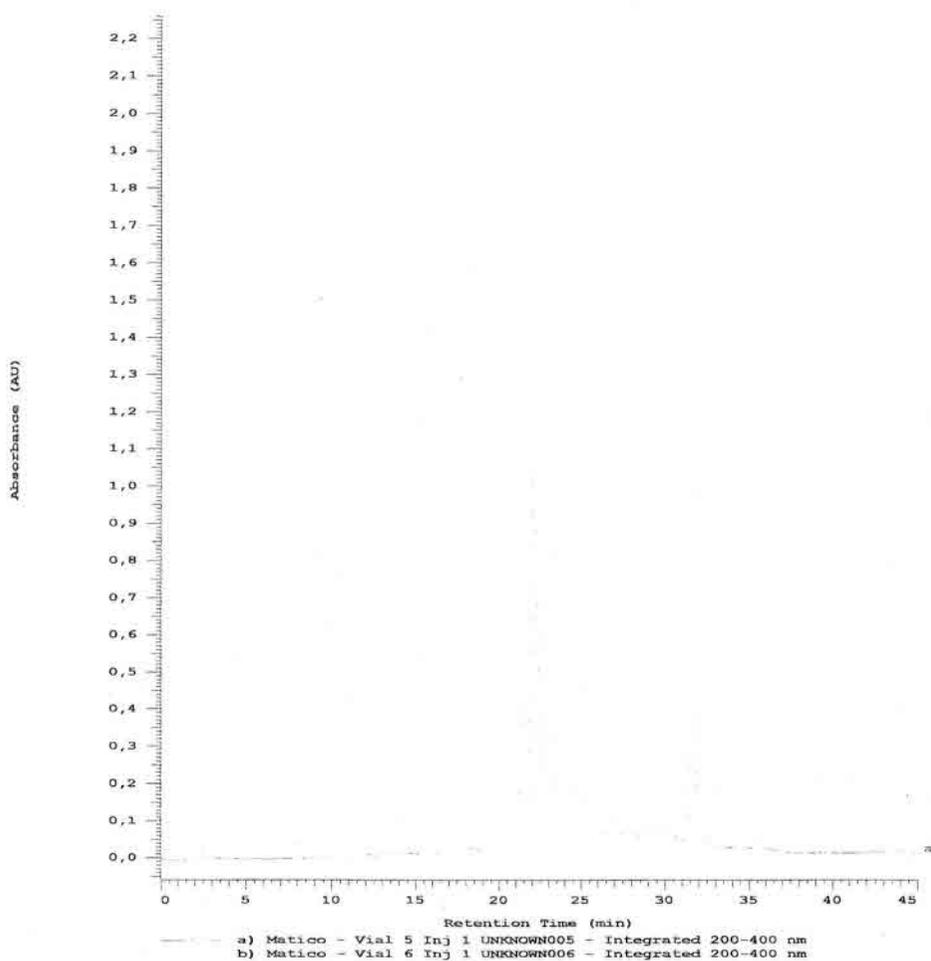
Resultados del análisis de los seis compuestos mayoritarios



Extractos: 1) E1; 2) E2; 3) E3

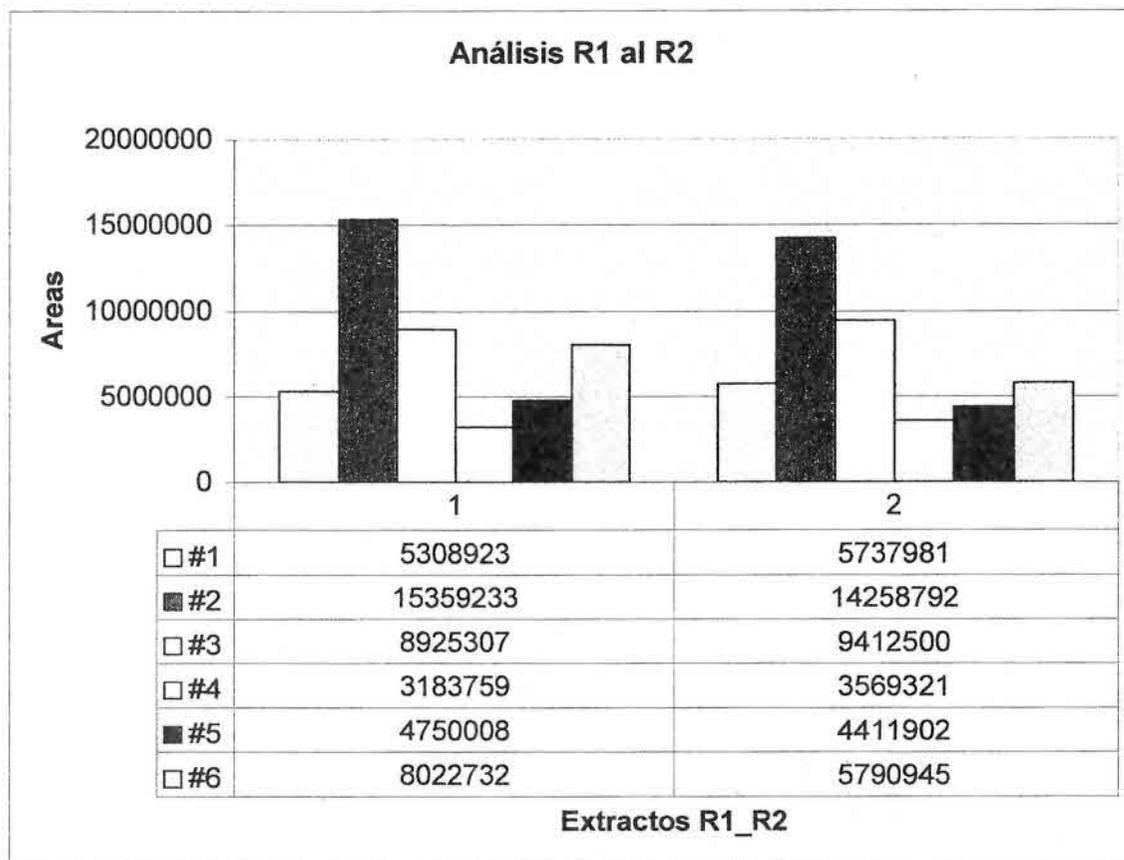
C.5.6. Análisis de los extractos R1 al R2

Comparación de cromatogramas



Extractos: a) R1; b) R2

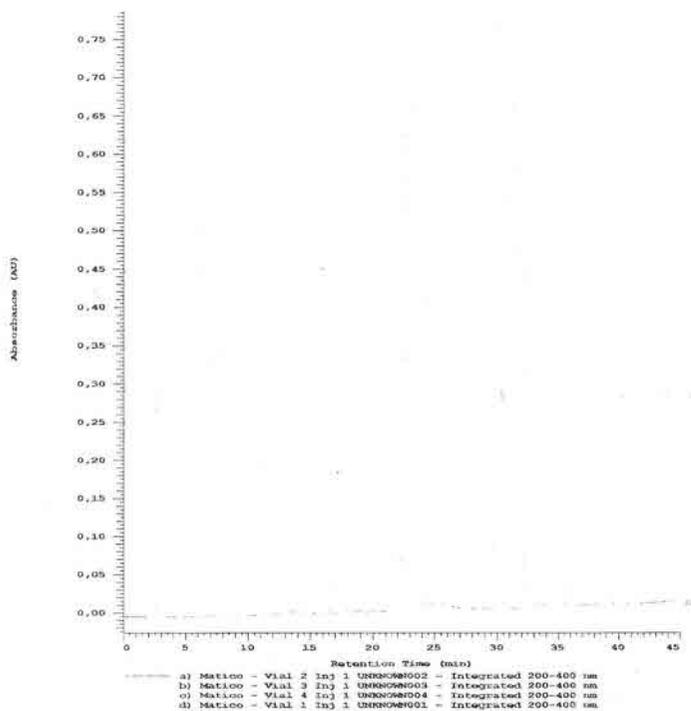
Resultados del análisis de los seis compuestos mayoritarios



Extractos: R1=1; R2=2

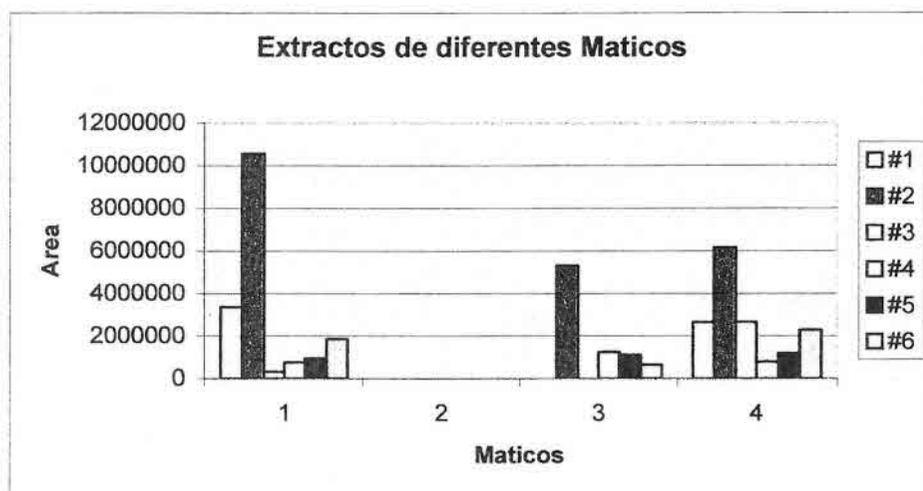
C.5.7. Análisis de los extractos M1 al M4

Comparación de cromatogramas



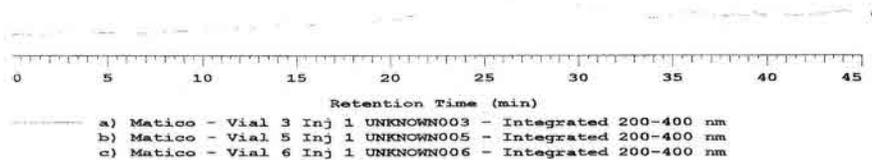
Extractos: 1) M1 (*Buddleja Globosa*); 2) M2 (Matico peruano); 3) M3 (*Buddleja davidii*); 4) M4 (*Buddleja Globosa*, hoja sin pelos)

Resultados del análisis de los seis compuestos mayoritarios



Extractos: 1) M1 (*Buddleja Globosa*); 2) M2 (Matico peruano); 3) M3 (*Buddleja davidii*); 4) M4 (*Buddleja Globosa*, hoja sin pelos)

C.5.8. Cromatogramas comparativos de compuesto 41 y *B. davidii*



Extractos: a) *Buddleja davidii*; b) Compuesto 41; c) Mezcla *Buddleja davidii* más compuesto 41.

C.6. Identificación de los marcadores químicos

Compuesto 31-1: fue obtenido a partir de la fracción 31-40 obtenida previamente mediante cromatografía en columna de sílica gel. Este compuesto fue aislado mediante placa fina preparativa de gel de sílice empleando como fase móvil Acetato de etilo, Ácido acético y agua en proporción 10:2:3, obteniéndose verbascósido como producto mayoritario. Por su parte el análisis de esta molécula mediante Cromatografía líquida de alta presión empleando detector de arreglo de diodo ha permitido establecer un tiempo de retención para este metabolito de 20,31 minutos empleando una gradiente de Ácido fosforico al 1%: Acetonitrilo:Metanol corrido en 65 minutos. Los compuestos fueron monitoreados a 270 nm, previo barrido en un rango de 200 a 400 nm, empleando una columna RP18 de 250 mm. De este análisis se puede establecer que este metabolito esta presente tanto en *B. davidii* como en *B. globosa*, diferenciándose en las concentraciones siendo el metabolito mayoritario en *B. globosa*.

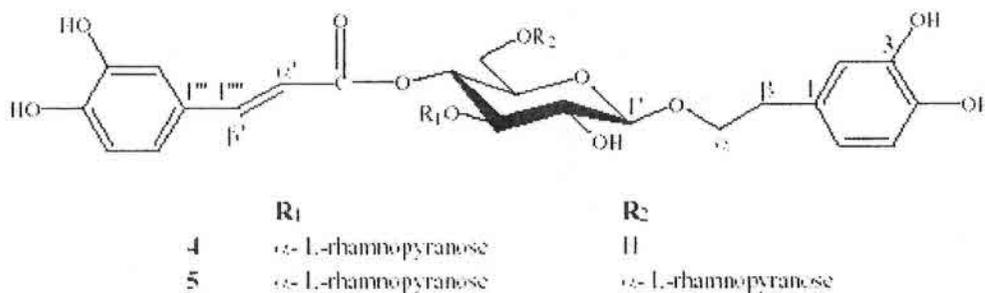


Figure 2. Phenylethanoid glycosides isolated from *V. glaberrima* *var. lasiocarpa*.

$\alpha = -3.43$ (MeOH, c 0.321)

UV (MeOH): 332, 285, 240

Aparentemente 31-1 corresponde con 4

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
e-mail: mel@cig.uchile.cl

Los datos de RMN en DMSO-d₄ se muestran en la siguiente tabla. La asignación de cada una de las señales se muestran en la Tabla siguiente.

Posición	δ_H (ppm) J(Hz)	^{13}C
Aglicona		
1	-	129.30
2	6.71 d(1.77)	116.42
3	-	146.07
4	-	144.58
5	6.69 d(8.08)	118
6	6.57 (1.77)	119.73
α_a	2,60 m	69
α_b	3.79 t(9.3)	-
β	2.78 m	24.16
Glucosa		
1	4.43 d(7.83)	104
2	3.30 t(8.34)	75
3	3.67 m	79.64
4	4.79 t(9.60)	67
5	3.47 m	78
6	3.57-3.78 m	60
Ramnosa		
1"	5.12 s	104
2"	3,70m	71
3"	3,36 dd (3,3; 9,35)	70
4"	3.20 t(9.35)	72
5"	3,40 m	69
6"	1.05 d(6.06)	
Ácido cafeico		
1	-	127
2	7.09 s	118
3	-	144.58
4	-	147
5	6.78 d(8.34)	115
6	6.99 d (7.83)	120
A	6.24 d(15.66)	116.42
β	7.50 d(15.66)	146.07
C=O	-	174

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Estos datos han sido comparados con reportes previos de literatura a fin de comparar y verificar la estructura propuesta, existiendo concordancia entre los datos reportados en literatura y los encontrados en este trabajo.

- Zeliha S. Akdemir I. Irem Tatli, Erdal Bedir, Ikhlas A. Khan. (2004) Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Verbascum lasianthum*. Turk J. Chem 227-234.
- TUBITAK. (Datos tabla 2, ver a continuación)
- Tesis doctoral: Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: *Dioscorea sylvatica* (Dioscoreaceae), *Urginea altissima* (Liliaceae), *Jamesbrittenia fodina* and *Jamesbrittenia elegantissima* (Scrophulariaceae). Anne-Laure Cogne.

http://www.unil.ch/cyberdocuments/pratique/acces/sciences/these_Cogne.pdf

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@cig.uchile.cl

Table 2. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) and ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) data of compounds 4 and 5

Position	C _{Atom}	4			5		
		δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	<i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	<i>J</i> (Hz)
Aglycone							
1	C	131.0	-	-	130.0	-	-
2	CH	116.7	6.66 s	-	117.1	6.63 s	-
3	C	145.0	-	-	144.4	-	-
4	C	144.0	-	-	144.4	-	-
5	CH	116.4	6.66 d	7.6	116.4	6.49 d	8.0
6	CH	120.5	6.52 s	-	120.4	6.64 d	8.0
<i>o</i> _a	CH ₂	71.0	3.67 brt	7.7	71.2	3.70 †	-
<i>o</i> _b	-	-	3.91 brt	7.7	-	3.88 †	-
<i>d</i>	CH ₂	35.9	2.73 m	-	35.9	2.70 m	-
β-D-Glucose							
1'	CH	103.3	4.37 d	7.7	103.2	4.38 d	7.8
2'	CH	75.4	3.26 t	8.2	75.2	3.32 m	-
3'	CH	80.1	3.68 †	-	79.7	3.83 m	7.9
4'	CH	69.6	4.75 t	9.5	69.7	4.74 t	9.6
5'	CH	75.4	3.45 m	-	73.8	3.60 m	-
6'a	CH ₂	61.7	3.45-3.70 †	-	66.8	3.36 m	10.0
6'b	-	-	3.45-3.70 †	-	-	3.60 †	-
α-L-Rhamnose							
1''	CH	102.0	5.08 brs	-	101.3	5.03 brs	-
2''	CH	71.5	3.72 †	-	71.2	3.60 d	1.6
3''	CH	70.1	3.35-3.50 †	-	71.1	3.29 dd	2.8/0.4
4''	CH	72.7	3.15 t	9.2	72.5	3.14 t	9.0
5''	CH	69.6	3.35-3.50 †	-	69.6	3.51 m	-
6''	CH ₂	19.0	1.00 d	5.8	19.0	0.96 d	6.1
α-L-Rhamnose							
1'''	CH	-	-	-	102.1	4.50 brs	-
2'''	CH	-	-	-	71.4	3.60 d	1.6
3'''	CH	-	-	-	71.3	3.40 dd	3.1/0.4
4'''	CH	-	-	-	72.7	3.22 t	9.0
5'''	CH	-	-	-	69.3	3.51 m	-
6'''	CH ₂	-	-	-	18.6	1.04 d	6.1
Acyl moiety							
1 ^{'''} (^{'''})	C	127.0	-	-	126.0	-	-
2 ^{'''} (^{'''})	CH	115.6	7.04 s	-	115.3	7.02 s	-
3 ^{'''} (^{'''})	C	146.0	-	-	145.8	-	-
4 ^{'''} (^{'''})	C	149.0	-	-	146.6	-	-
5 ^{'''} (^{'''})	CH	114.7	6.79 d	7.7	113.8	6.75 d	8.0
6 ^{'''} (^{'''})	CH	122.2	6.97 d	7.5	122.5	6.97 d	7.7
<i>o</i> '	CH	117.2	6.20 d	15.8	116.6	6.20 d	15.8
<i>f</i>	CH	146.3	7.48 d	15.8	146.7	7.48 d	15.8
C=O	C	169.0	-	-	166.6	-	-

† nuclear due to overlapping

(^{'''}) for compound 5

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Verbascoside, or acteoside.

3,4-dihydroxy- β -phenethyl-O- α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-4-O-caffeoyl- β -glucopyranoside.

$C_{29}H_{36}O_{15}$

MW 624

Yellow amorphous powder

$[\alpha]_D^{20} = -84.9$ (MeOH, c.0.1)

Mp 145-149

UV λ_{max}^{MeOH} 330, 290, 246

APCI-MS m/z (rel. Int.): 642.0 $[M+H_2O]^+$ (100); 624.9 (8); 479.0 (20); 470.9 (10); 356.9 (15); 325.0 (85); 195.1 (32); 163.2 (55)

ESI-MS m/z (rel. Int.): 641.9 $[M-H_2O]^+$ (18); 624.8 (15); 478.7 (55); 324.9 (100); 210.8 (27); 163.0 (48).

1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): see Table 8

^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): see Table 9

Table 9. ^1H NMR and ^{13}C signals of compound **C** (500/125 MHz, in methanol- d_4 , TMS as interna: standar); chemical shifts in ppm

Signals	^1H	$^{13}\text{C}^a$
PhPr		
1	-	131.41
2	6.56 d, $J=7.8$ Hz	121.24
3	6.67 d, $J=8.8$ Hz	116.27
4	-	144.60
5	-	146.05
6	6.70 s	117.08
7	2.80 s	36.51
8	3.72 q, $J=8$ Hz	72.22
Glc		
1'	4.38 d, $J=10.8$ Hz	104.42
2'	3.38 t, $J=8.5$ Hz	76.14
3'	3.81 t, $J=9.0$ Hz	81.63
4'	4.90 t, $J=9.3$ Hz	70.51
5'	3.54 m	75.94
6'	3.54-3.56 ^{2b} 3.62 d, $J=9.8$ Hz	62.30
Rha		
1''	5.20 s	102.99
2''	3.92 s	72.29
3''	3.58 t, $J=10.1$ Hz	71.99
4''	3.28 t, $J=9.0$ Hz	73.73
5''	3.54-3.56 ^{2b}	70.38
6''	1.08 d, $J=5.9$ Hz	18.44
CM		
1'''	-	127.60
2'''	7.06 s	115.18
3'''	-	146.76
4'''	-	149.72
5'''	6.79 d, $J=8.3$ Hz	116.48
6'''	6.95 d, $J=8.3$ Hz	123.21
7'''	7.60 d, $J=16.2$ Hz	147.98
8'''	6.27 d, $J=15.6$ Hz	114.64
9'''	-	168.26

^a Signal unclear due to overlapping

Multiplicities: m: multiplet, s: singlet, d: doublet

Ph Pr: phenylpropane; Glc: glucose; Rha: rhamnose; CM: caffeoyl moiety

Compuesto 41-3: se obtuvo mediante cromatografía en capa fina preparativa de la fracción 41 de matico previamente trabajada mediante cromatografía en columna de sílica gel, la cual fue eluida en la fase orgánica del sistema formado por acetato de etilo: ácido acético: agua, en proporción 10:2:3, existen algunas similitudes de señales de protones entre este metabolito y el compuesto K aislado durante el desarrollo de la tesis: *Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: Dioscorea sylvatica* (Dioscoreaceae), *Urginea altissima* (Liliaceae), *Jamesbrittenia fodina* and *Jamesbrittenia elegantissima* (Scrophulariaceae). Anne-LaureCogne.

http://www.unil.ch/cyberdocuments/pratique/acces/sciences/these_Cogne.pdf

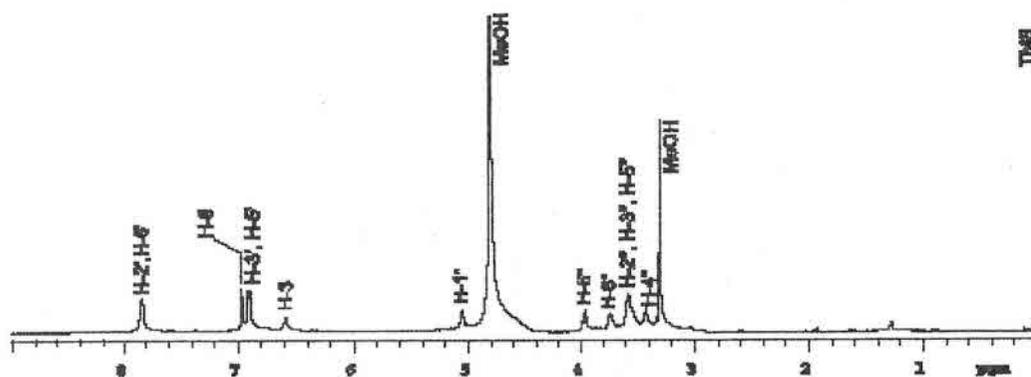
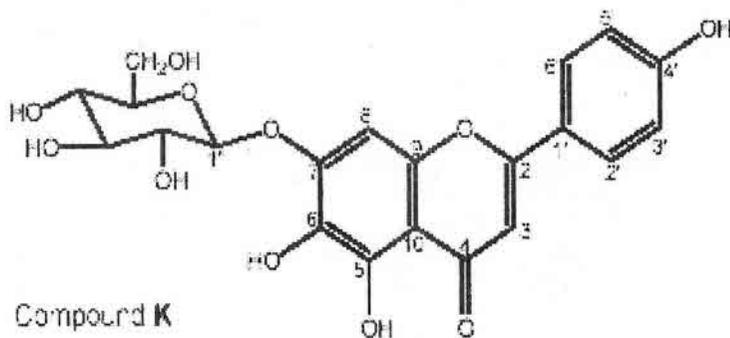


Figure 68. $^1\text{H-NMR}$ of K (500 MHz, in methano- d_4).



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

¹ H		
7.73 (9.85)	d	
7.60 (8.5)	d	
6.97 (8.5)	d	
6.91 (8.84)	d	
6.40 (6.06, 15.92)	dd	
5.88 (12.89)	d	
4.96 (MeOH)	s	
4.78 (7.07)	d	
4.15 (12.6)	d	
4.05 (8.3)	d	
3.90	m	
3.85	s	
3.33	s	
2.33 (MeOH)	s	
1.30	s	
1.18 (6.06)	d	

Table 21. ¹H NMR signals of the pure compounds **J**, **K** and **L** (methanol-d₄, 500 MHz, TMS as int. standard) chemical shifts in ppm.

¹ H	J	K	L
2	-	-	-
3	-	6.59 br s	6.62 br s
5	-	-	-
6	5.16 d, J=1.5 Hz	-	-
7	-	-	-
8	5.38 d, J= 1.5 Hz	6.96 s	6.92 s
2'	8.05 d, J= 8.8 Hz	7.84 d, J= 6.8 Hz	7.86 d, J= 6.8 Hz
3'	5.88 d, J= 8.8 Hz	6.91 d, J= 7.3 Hz	6.98 d, J= 7.3 Hz
4'	-	-	-
5'	6.88 d, J= 8.8 Hz	6.91 d, J= 7.3 Hz	6.98 d, J= 7.3 Hz
6'	8.05 d, J= 8.8 Hz	7.84 d, J= 6.8 Hz	7.86 d, J= 6.8 Hz
Glc			
1''	5.22 d, J= 7.3 Hz	5.08 d, J= 5.9 Hz	5.05 d, J= 5.9 Hz
2''	3.42 u	3.59 u	3.58 m
3''	3.44 u	3.55 m	3.70 ^a
4''	3.31 m	3.43 t, J= 8.0 Hz	3.46 m
5''	3.21 m	3.59 u	3.54 m
6''	3.53 dd, J= 11.6, 5.4 Hz	3.74 m	3.70 ^a
	3.69 dd, J= 11.6, 2.4 Hz	3.96 d, J= 11.7 Hz	4.06 d, J= 9.3 Hz
Rha			
1'''			4.72 s
2'''			3.57 s
3'''			3.68 u
4'''			3.32 m
5'''			3.65 u
6'''			1.16 d, J= 6.3 Hz

multiplicities: m: multiplet, s: singlet, d: doublet, u: multiplicity unclear due to overlapped signals

^a interchangeable signals

C.7. Identificación y cuantificación mediante CCF



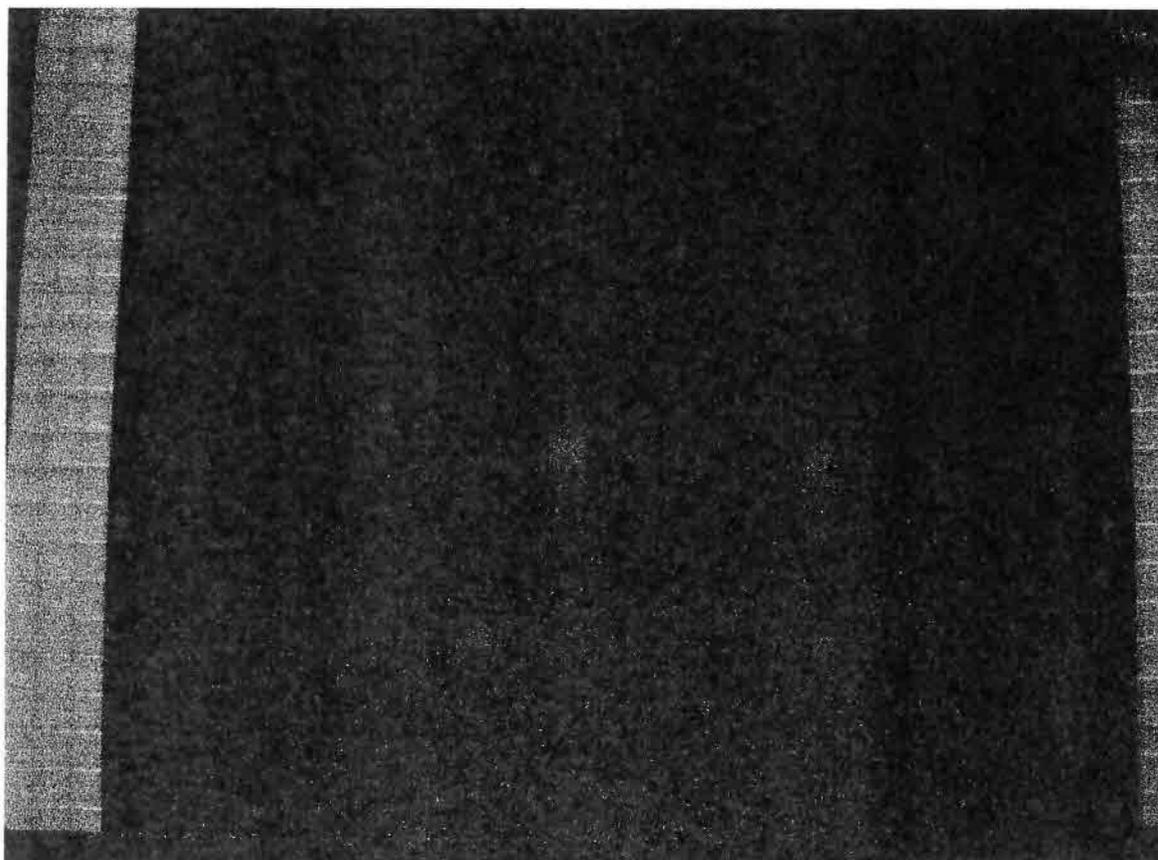
UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl



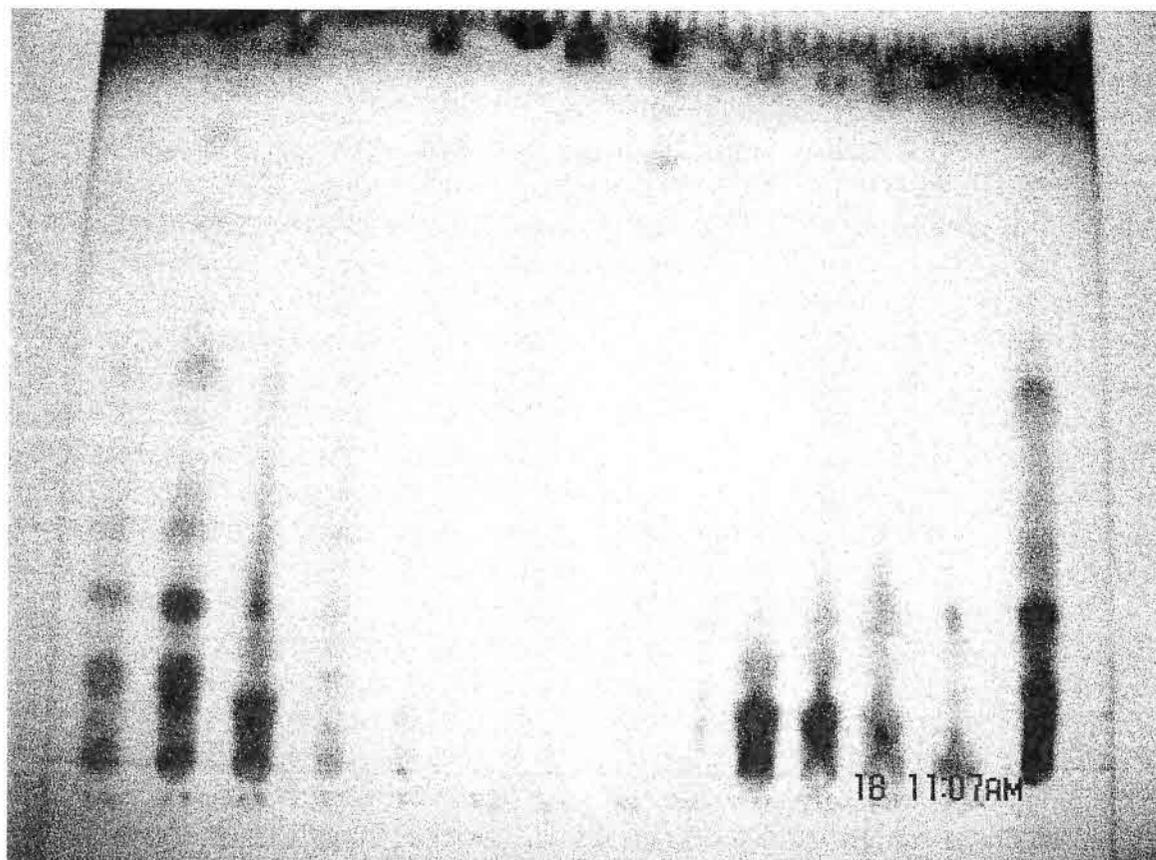
UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: me1@ciq.uchile.cl



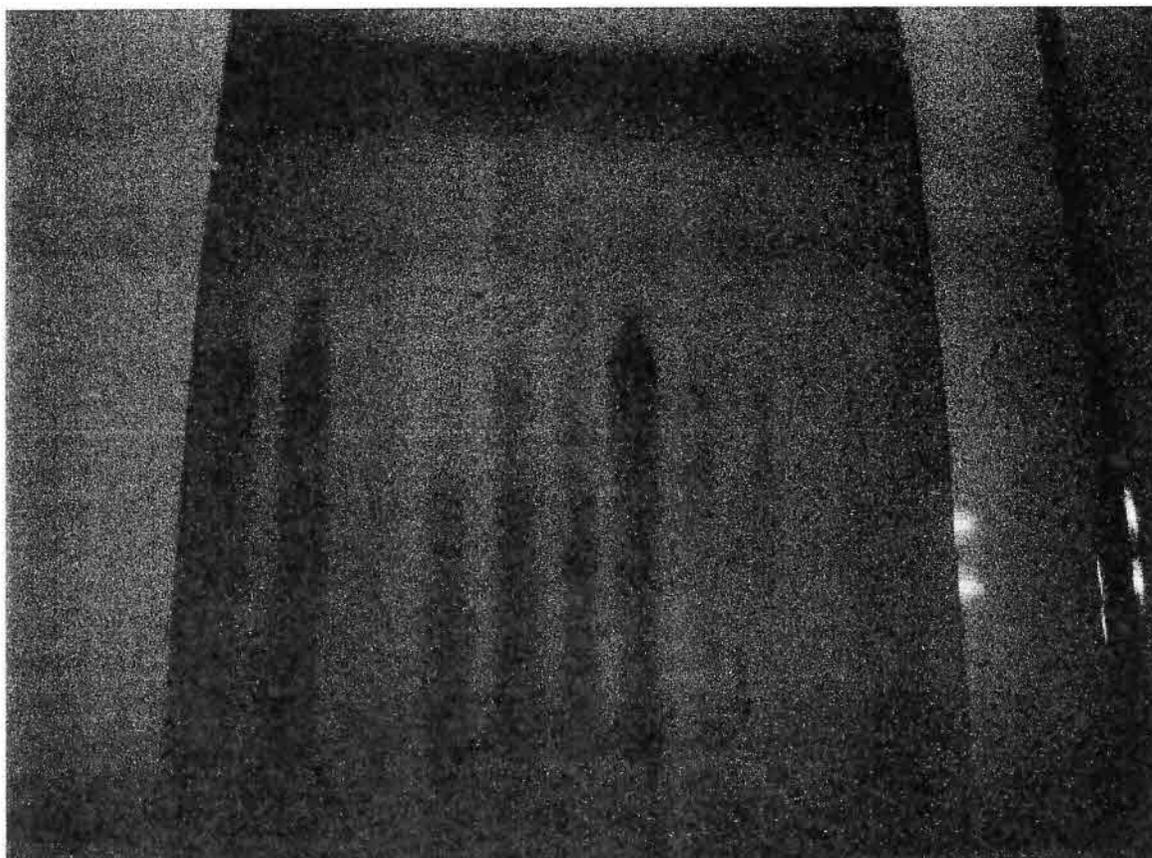
UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl



D. Caracterización del extracto hidro-alcohólico de hojas de *Buddleja globosa* utilizado para la realización de los experimentos de cicatrización.

D.1. Caracterización realizada por Laboratorios Ximena Polanco

Producto	: Matico Extracto 1:3,8	Fecha	: 11.11.05
Serie	: 11 962 5	Nº Registro	: **SE- 616
Código	: 1110031		* B- 371

Características botánicas	Especificación	Análisis
<u>Especie</u>	<i>Buddleja globosa</i>	Cumple
Parte de la planta utilizada	Hojas	Cumple
Características organolépticas		
Aspecto	Líquido	Cumple
Color	Café oscuro	Cumple
Olor	Característico	Cumple
Características Físico-Químicas		
pH	4,0 – 7,00	5,2
Graduación Alcohólica (15°C)	N.D.	59° GL
Peso específico (20°C)	N.D.	0,913 g/mL
Residuo sólido (peso constante)	N.D.	4,5 %
Identificación		
Flavonoides	Positivo	Cumple
Taninos	Positivo	Cumple
Saponinas	Positivo	Cumple
Azúcares reductores	Positivo	Cumple

(*) Identificación Botánica:

Las características de género y especie de una muestra de material vegetal corresponden a material vegetal estándar por confrontación de muestras.

(*) Identificación Química:

Las manchas de identificación en CCF de una alícuota de muestra son similares a las manchas de identificación de una alícuota estándar.

D.2. Cuantificación de polifenoles

Extracto	Contenido Polifenoles
<i>Buddleja globosa</i> N° de serie 119625 Noviembre 2006	30,6 ± 2,36 nmoles catequina/ μ L extracto
	116,28 μ moles de catequina /g de droga vegetal

D.3. Efecto del extracto hidro-alcohólico de *Buddleja globosa* sobre la Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Determinación del IC_{50} .

Los microsomas (1 mg de proteína) fueron previamente incubados con el extracto durante 10 min a 37°C, antes de inducir la lipoperoxidación con Cu^{2+} /ascorbato de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de inhibición que aparecen en la figura 1 fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato, en ausencia del extracto. El valor IC_{50} (0,13 μ L del extracto /mg de proteína microsómica) fue calculado del gráfico semilogarítmico que se muestra a continuación y representa la concentración de extracto que inhibe el 50% la lipoperoxidación microsómica; fue calculado considerando como 100% el valor obtenido en ausencia de extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

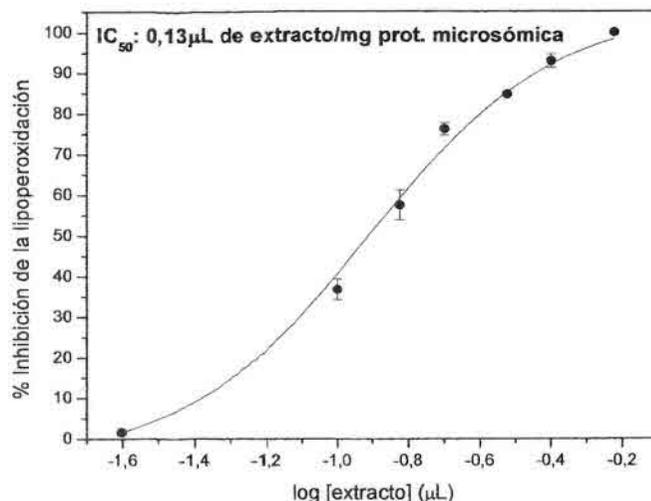
UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

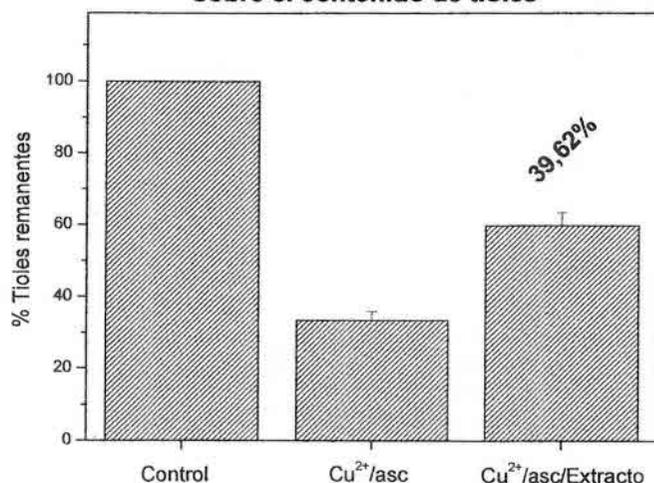
Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl



D.4. Efecto del extracto hidro-alcohólico de *Buddleja globosa* serie N° 119625 sobre la oxidación de tioles microsómicos inducida por Cu²⁺/ascorbato. Los microsomas (1 mg de proteína) fueron previamente incubados con el extracto (3 µL) durante 10 min a 37°C, antes de inducir oxidación de tioles con Cu²⁺/ascorbato de acuerdo a lo descrito en Métodos. El porcentaje que aparece sobre la barra Cu²⁺/ascorbato/extracto en la figura que se muestra a continuación fue calculado considerando como 100% la diferencia entre los tioles del control (medidos en ausencia de Cu²⁺/ascorbato y extracto) y los remanente en presencia de Cu²⁺/ascorbato. La concentración de extracto utilizada corresponde al valor IC₅₀ obtenido en los experimentos de lipoperoxidación (Figura 1: 0,13 µL del extracto /mg de proteína microsómica) Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± su desviación estándar.

**Efecto de extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa*
sobre el contenido de tioles**



D.5. Correlación de los datos agronómicos con los de la actividad antioxidante de los extractos.

1. Tratamiento de postcosecha. Los extractos obtenidos de diferentes tratamientos de postcosecha mostraron la mayor cantidad de polifenoles secando las hojas a temperatura ambiente bajo sombra, las que disminuyen drásticamente con el secado a temperaturas elevadas (60 y 80°C). Es interesante observar que entre los tratamientos de secado a 40°C y lavado con posterior secado a la misma temperatura no se observen diferencias significativas. Esto significa que las hojas sucias se pueden lavar antes del secado sin perder polifenoles.

Los extractos mostraron el mayor efecto antilipoperoxidante cuando las hojas se secaron al sol, a 80°C o se sometieron a un lavado antes de secarlas en estufa a 40°C.

Las diferencias entre los efectos protectores de grupos tiólicos proteicos mostraron muy poca diferencia entre los tratamientos de secado. Destacan los tratamientos de secado a temperatura ambiente que tuvieron efectos significativamente mayores que el tratamiento de secado en estufa a 40°C, pero no se diferencian de los tratamientos con secado a 80°C ni lavado y posterior secado a 40°C. Por otra parte, no se observa una diferencia significativa entre los tratamientos de secado a 40°C, con y sin lavado.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

En general se puede concluir que los extractos obtenidos de hojas secadas al sol, a 80°C o lavados con posterior secado a 40°C tienen buenos efectos protectores de la oxidación, a pesar de contener menos polifenoles que los extractos obtenidos de hojas secadas bajo sombra.

Cuadro 1: Contenido de polifenoles y efectos antilipoperoxidante y protección de grupos tiólicos proteicos en extractos obtenidos de hojas con diferente tratamiento de poscosecha

Tratamientos		Polifenoles	Antilipoperoxidant e	Tioles
Postcosecha		Media	Media	Media
P1	sombra	43,1 a	54,4 b	47,9 a
P2	sol	40,5 b	63,9 a	46,7 ab
P3	40°C	40,4 bc	51,7 b	37,2 c
P4	60°C	25,1 e	41,3 c	40,0 bc
P5	80°C	32,8 d	62,2 a	43,8 abc
P6	Lavar + 40°C	38,4 c	63,9 a	41,5 abc
Sig.	0,05			
Tes t		Kruskal-Wallis	Tukey	Tukey

2. Efectos de la fecha de cosecha y la edad de la hoja. Mientras que el contenido de polifenoles en los extractos es mayor cuando las hojas se cosecharon en noviembre, seguido por diciembre, la mayor protección de grupos tiólicos se observa en extractos cuyas hojas se cosecharon entre enero y marzo (Cuadro 2). Los efectos antilipoperoxidantes son mayores cuando las hojas se cosechan en marzo y noviembre, seguido por diciembre.

En general, se observan buenos efectos protectores cuando la fecha de cosecha es en marzo, a pesar de que el contenido de polifenoles haya declinado. El fin de la temporada también es indicado para la cosecha porque hay una gran cantidad de hojas.

Por otra parte, en noviembre y diciembre las hojas son jóvenes, momento en que sus efectos protectores de tioles son mayores, como se puede deducir del cuadro 3.

Las hojas senescentes, presentes al final de la temporada, contienen menos polifenoles y efectos protectores de tioles que las hojas jóvenes, pero no pierden su efecto antilipoperoxidante.

Cuadro 2: Contenido de polifenoles y efectos antilipoperoxidante y protección de grupos tiólicos proteicos en extractos obtenidos de hojas cosechadas en diferentes fechas

Tratamientos		Polifenoles	Antilipoperoxidante	Tioles
Mes de cosecha		Media	Media	Media
A1	Noviembre	52 a	64 ab	29,1 b
A2	Diciembre	48 b	63 b	31,0 b
A3	Enero	40 d	52 d	40,7 a
A4	Febrero	44 c	56 c	43,9 a
A5	Marzo	42 d	65 a	42,9 a
Sig.	0,05			
Test	Tukey			

Cuadro 3: Contenido de polifenoles y efectos antilipoperoxidante y protección de grupos tiólicos proteicos en extractos obtenidos de hojas de diferente edad

Tratamientos		Polifenoles	Antilipoperoxidante	Tioles
Edad de la hoja – posición en la planta		Media	Media	Media
E1	Joven-superior	45,02 a	65,6 b	39,6 a
E2	Madura-central	43,48 a	66,7 ab	33,7 b
E3	Senescente-inferior	36,21 b	67,7 a	29,8 b
Sig.	0,05			
Test	LSD			

3. **Efecto del riego.** Los extractos obtenidos de hojas cosechadas en plantas sometidas a estrés hídrico muestran mayores contenidos de polifenoles y buenos efectos protectores.

Sin embargo, el estrés hídrico disminuye el rendimiento de hojas, por lo que se recomienda aplicar solo un estrés moderado y evitar abundante riego.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Cuadro 4: Contenido de polifenoles y efectos antilipoperoxidante y protección de grupos tiólicos proteicos en extractos obtenidos de hojas con estrés hídrico

Tratamientos		Polifenoles	Antilipoperoxidant e	Tioles
		Media	Media	Media
R1	Bien regado (20 cb)	41,80 b	62,14 a	37,5 b
R2	Estresado (40 cb)	45,15 a	62,18 a	47,9 a
Sig. 0,05				
Test LSD				

4. Efecto de las accesiones y del cultivo. Las accesiones de matico cultivadas corresponden a clones de tres plantas cultivadas en huertos caseros (Pencahue, Talca, San Javier), dos de plantas silvestres de Los Ruiles y Tolhuaca y la descendencia obtenida por semilla en el caso de la población silvestre de Los Queñes. Todas las plantas recibieron el mismo tratamiento en cultivo.

En el caso del efecto antilipoperoxidante las plantas de la accesión "Talca" obtuvieron los mejores resultados, pero a la vez los efectos protectores de tioles no fueron tan buenos. En este último ensayo destacaron plantas de "Pencahue", "Los Ruiles" y "Tolhuaca".

Al comparar las plantas cultivadas de Los Ruiles y Los Queñes con sus progenitores silvestres se observa una mejor protección de la lipoperoxidación y de los grupos tiólicos en plantas silvestres, mientras que el contenido de polifenoles es menor (Cuadro 6).

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
 Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
 Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
 e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Cuadro 5: Contenido de polifenoles y efectos antilipoperoxidante y protección de grupos tiólicos proteicos en extractos obtenidos de plantas cultivadas de diferente origen

Tratamientos		Polifenoles	Antilipoperoxidante	Tioles
Procedencia cultivada		Media	Media	Media
GC1	Pencahue	47,8 c	50,0 c	40,7 a
GC2	Talca	58,8 a	71,1 a	32,7 bc
GC3	Los Ruiles*	57,7 ab	62,9 bc	37,9 ab
GC4	Tolhuaca*	54,5 b	57,6 d	41,9 a
GC5	San Javier	55,8 ab	64,6 b	25,6 c
GC6	Los Queñes*	57,9 ab	60,8 cd	27,5 c
Sig	0,05			
Test		Tukey	Kruskal-Wallis	Tukey

* Accesiones de poblaciones silvestres

Cuadros 6a, b, c: Extractos obtenidos de dos poblaciones silvestres y sus respectivos clones cultivados y sus efectos sobre a) contenido de polifenoles; b) antilipoperoxidantes; c) protección de grupos tiólicos proteicos

a) Polifenoles

	Silvestre media	Cultivado media	Promedio	Diferencia silvestre- cultivado
Los Ruiles	54,9 a	57,7 a	56,29±3,03	ns
Los Queñes	42,0 b	57,9 a	49,92±8,59	*
Promedio	48,46 ±7,25	57,75 ±2,11		
Diferencia procedencias	*	ns		

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
 Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
 Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
 e-mail: mel@ciq.uchile.cl

b) Antilipoperoxidante

	Silvestre media	Cultivado media	Promedio	Diferencia silvestre- cultivado
Los Ruiles	68,4 a	64,6 a	66,51±2,61	ns
Los Queñes	67,7 a	57,6 b	62,64±5,44	*
Promedio	68,04 ±1,43	61,11 ±3,94		
Diferencia procedencias	ns	*		

c) Tioles

	Silvestre media	Cultivado media	Promedio	Diferencia silvestre- cultivado
Los Ruiles	31,3 b	37,9 a	34,60±4,67	*
Los Queñes	43,1 a	27,5 b	35,30±8,69	*
Promedio	37,20±6,55	32,70±6,57		
Diferencia procedencias	*	*		

E. Evaluación de la Dosis a utilizar en el tratamiento de los animales.

El extracto de *Buddleja globosa* utilizado para estos experimentos fue el correspondiente al Número de serie: 119625. Para el cálculo de la dosis a administrar se tomó como referencia la dosis utilizada en humanos de GUG/X, fitofármaco formulado por Laboratorios Ximena Polanco. Este fitofármaco es una mezcla hidro-alcohólica compuesta por 3 extractos, entre ellos *Buddleja globosa*.

El cálculo de la dosis para las ratas se realizó de la siguiente forma:

- Dosis utilizada en humanos de GUG/X: 500 µL de extracto cada 8 horas, considerando un peso promedio del individuo de 70 Kg.
- El peso promedio de las ratas fue 310 g ± 20. Considerando este valor la dosis para la rata sería 2,2 µL de extracto/animal. Sin embargo, la velocidad del metabolismo de las ratas es 4 veces mayor al ser humano. Por lo tanto, la dosis semejante a humanos en

rata sería $2,2 \times 4 = 8,8 \mu\text{L}$ de extracto cada 8 horas. En experimentos previos de nuestro laboratorio realizados en ratones obtuvimos buena cicatrización con dosis 10 veces superior. Por lo tanto, la dosis elegida fue $100 \mu\text{L}$ de extracto cada 8 horas.

Hemograma y Perfil Bioquímico. Para realizar estos análisis muestras de sangre fueron extraídas de cada animal por punción cardiaca, antes de eutanasiar los animales. Cada muestra se dividió en dos recipientes: a) $2,5 \text{ ml}$ en un tubo con anticoagulante EDTA (hemograma) y b) $2,5 \text{ ml}$ en un tubo sin anticoagulante para realizar el perfil bioquímico.

Las Tablas que se muestran a continuación muestran estos resultados. **GRUPO A:** animales tratados vía oral con $100 \mu\text{L}$ de extracto de *Buddleja globosa*; **GRUPO B:** animales controles. Las pruebas sanguíneas analizadas fueron:

Hemograma:

a) **Serie roja:** Eritrocitos, Hematocrito, Hemoglobina, Volumen corpuscular medio (VCM); Hemoglobina corpuscular media (HCM); Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM); Morfología; Plaquetas; Velocidad de eritro-sedimentación (VHS).

b) **Serie blanca:** Leucocitos, Neutrófilos, Mielocitos, Juveniles, Baciliformes, Basófilos, Eosinófilos, Linfocitos, Monolitos, Morfología.

Perfil bioquímico: Calcio, Fósforo, Glicemia, Nitrógeno Ureico Sanguíneo (NUS) (BUN), Colesterol total, Proteínas, Albúmina, Bilirrubina Total, Fosfatasa alcalina (FA), Lactato deshidrogenada (LDH), Aspartato amino-transferasa (GOT o AST), Creatinina.

El análisis estadístico de los resultados de hemograma: serie roja y serie blanca, como también de perfil bioquímico demostraron que los resultados obtenidos de las ratas controles como de las tratadas oralmente con el extracto de *Buddleja globosa* no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Los resultados mostrados en la tablas que aparecen a continuación representan la media aritmética \pm desviación estándar, $n = 4$.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

VALORES SERIE ROJA

DIA 3 DE TRATAMIENTO	U. de Medida	Rango normal	GRUPO A Promedios	GRUPO B Promedios
Eritrocitos	mill. x mm ³	6,5 - 7,6	6,6 ± 0,75	5,8 ± 0,44
Hematocrito	%	42-49	42,7 ± 2,52	39,7 ± 1,15
Hemoglobina	gr/dl	14,1 - 16,7	14,2 ± 0,78	14,3 ± 0,50
VCM	Fl	56,5 - 62,2	62,3 ± 1,98	63,3 ± 1,16
HCM	Pg		21,7 ± 1,42	22,9 ± 1,83
CHCM	%	31 - 34	33,2 ± 0,31	33,5 ± 0,67
Morfología		normal	normal	Normal
Plaquetas	mil x mm ³	843.000 - 1.243.000	1.086.667 ± 61.533	1.207.500 ± 45.961
VHS	mm/hora	2 - 15	3,0 ± 1,00	5,3 ± 1,53

DIA 8 DE TRATAMIENTO	U. de Medida	Rango normal	GRUPO A Promedios	GRUPO B Promedio
Eritrocitos	mill.mm ³	6,5 - 7,6	6,7 ± 0,12	6,4 ± 0,68
Hematocrito	%	42-49	40,7 ± 1,15	43,0 ± 1,73
Hemoglobina	gr/dl	14,1 - 16,7	13,6 ± 0,31	14,2 ± 0,40
VCM	Fl	56,5 - 62,2	60,5 ± 1,59	62,9 ± 2,10
HCM	Pg		20,2 ± 0,32	22,3 ± 1,54
CHCM	%	31 - 34	33,4 ± 0,36	33,1 ± 0,35
Morfología		normal		Normal
Plaquetas	mil x mm ³	843.000- 1.243.000	1.236.333 ± 156.308	931.333 ± 164.609
VHS	mm/hora	2 - 15	6,3 ± 2,08	3,3 ± 1,53

DIA 12 DE TRATAMIENTO	U. de Medida	Rango normal	GRUPO A Promedio	GRUPO B Promedio
Eritrocitos	mill.mm ³	6,5 - 7,6	7,0 ± 0,49	6,5 ± 0,91
Hematocrito	%	42-49	42,7 ± 2,08	42,8 ± 1,71
Hemoglobina	gr/dL	14,1 - 16,7	14,2 ± 0,49	14,1 ± 0,51
VCM	Fl	56,5 - 62,2	61,0 ± 1,72	62,0 ± 1,00
HCM	Pg		20,3 ± 0,64	21,9 ± 3,30
CHCM	%	31 - 34	33,4 ± 0,64	33,1 ± 0,13
Morfología		normal	Normal	Normal
Plaquetas	mil x mm ³	843.000- 1.243.000	1.176.500 ± 60.104	936.000 ± 94.809
VHS	mm/hora	2 - 15	4 ± 1	5,3 ± 2,22

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

VALORES SERIE BLANCA

DIA 3 DE TRATAMIENTO	U. de Medida	Rango normal	GRUPO A Promedios	GRUPO B Promedios
Leucocitos	x mm ³	2.400- 9.400	3.250 ± 1011	3.193 ± 467
Neutrófilos	%	20	20,0 ± 0,6	21,1 ± 1,13
Mielocitos	%	0	0	0
Juveniles	%	0	0	0
Baciliformes	%	0,2 - 0,36	0,33 ± 0,02	0,3 ± 0,58
Basófilos	%	0,2 - 0,36	0,3 ± 0,58	0,2 ± 0,00
Eosinófilos	%	0,4 - 3	2,3 ± 3,21	1,5 ± 0,39
Linfocitos	%	62,4 - 79,8	70,0 ± 5,71	63,7 ± 5,69
Monocitos	%	0,5 - 4,5	3,5 ± 0,79	3,7 ± 1,21
Morfología		Normal	normal	Normal

DIA 8 DE TRATAMIENTO	U. de Medida	Rango normal	GRUPO A Promedio	GRUPO B Promedio
Leucocitos	mil x mm ³	2400- 9400	2300 ± 264,6	3236 ± 859
Neutrófilos	%	20	16,0 ± 5,29	18,0 ± 2,85
Mielocitos	%	0	0	0
Juveniles	%	0	0	0
Baciliformes	%	0,2 - 0,36	0	0
Basófilos	%	0,2 - 0,36	2,0 ± 2,00	0,3 ± 0,58
Eosinófilos	%	0,4 - 3	2,3 ± 0,58	2,7 ± 1,58
Linfocitos	%	62,4 - 79,8	75,3 ± 5,13	66,3 ± 4,73
Monocitos	%	0,5 - 4,5	4,2 ± 0,53	3,5 ± 0,71
Morfología		Normal	Normal	Normal

DIA 12 DE TRATAMIENTO	U. de Medida	Rango normal	GRUPO A Promedio	GRUPO B Promedio
Leucocitos	mil x mm ³	2400- 9400	2766 ± 763	3487 ± 396
Neutrófilos	%	20	20 ± 1,10	19 ± 2
Mielocitos	%	0	0,0	0,0
Juveniles	%	0	0,0	0,0
Baciliformes	%	0,2 - 0,36	0,0	0,0
Basófilos	%	0,2 - 0,36	1,0 ± 1,0	1 ± 1,4
Eosinófilos	%	0,4 - 3	2,3 ± 1,53	3,0 ± 0,87
Linfocitos	%	62,4 - 79,8	66,0 ± 5,66	72,0 ± 3,56
Monocitos	%	0,5 - 4,5	4,0 ± 0,70	3,8 ± 1,89
Morfología		Normal	Normal	Normal

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

VALORES PERFIL BIOQUIMICO

DIA 3 DE TRATAMIENTO	Und. de Medida	Rango normal	GRUPO A Promedios	GRUPO B Promedios
Calcio	mg/dL	11,3 - 14,7	11,0 ± 0,25	12,2 ± 0,42
Fósforo	mg/dL	12,9 - 26	13,4 ± 1,72	20,7 ± 0,95
Glicemia	mg/dL	152 - 343	105,3 ± 14,01	120,7 ± 4,73
BUN	mg/dL	15 - 22	15,7 ± 3,06	13,7 ± 2,08
Colesterol total	mg/dL	60 - 82	53,0 ± 5,57	55,0 ± 7,55
Proteínas	gr/dL	6 - 8,9	6,0 ± 0,15	6,0 ± 0,12
Albúmina	gr/dL	3,6 - 3,9	3,5 ± 0,38	3,4 ± 0,31
Bilirrubina Total	mg/dL	0,2 - 0,3	0,30 ± 0,07	0,36 ± 0,05
FA	UI/L	206 - 251	130,3 ± 27,06	106,3 ± 30,01
LDH	UI/L	921 - 3206	1331,0 ± 843,2	1909,0 ± 377,8
GOT	UI/L	275 - 465	133,3 ± 93,2	100,3 ± 22,3
Creatinina	mg/dL	1,1 -1,3	0,9 ± 0,18	0,9 ± 0,21

DIA 8 DE TRATAMIENTO	U. de Medida	Rango normal	GRUPO A Promedio	GRUPO B Promedio
Calcio	mg/dL	11,3 - 14,7	12,4 ± 0,40	11,7 ± 1,20
Fósforo	mg/dL	12,9 - 26	20,7 ± 1,84	19,9 ± 4,68
Glicemia	mg/dL	152 - 343	140,0 ± 19,67	110,0 ± 18,36
BUN	mg/dL	15 - 22	17,5 ± 2,12	15,0 ± 1,73
Colesterol total	mg/dL	60 - 82	73,0 ± 5,72	62,3 ± 4,16
Proteínas	gr/dL	6 - 8,9	6,2 ± 0,12	6,4 ± 0,23
Albúmina	gr/dL	3,6 - 3,9	3,5 ± 0,10	3,6 ± 0,21
Bilirrubina Total	mg/LI	0,2 - 0,3	0,28 ± 0,03	0,38 ± 0,10
FA	UI/L	206 -251	219,7 ± 16,9	145,0 ± 37,04
LDH	UI/L	921 - 3206	1574,7 ± 85,1	1771,0 ± 70,71
GOT	UI/L	275 - 465	156,0 ± 36,1	122,3 ± 32,6
Creatinina	Mg/dL	1,1 -1,3	1,0 ± 0,10	1,00 ± 0,10

DIA 12 DE TRATAMIENTO	U. de Medida	Rango normal	GRUPO A Promedio	GRUPO B Promedio
Calcio	mg/dL	11,3 - 14,7	11,0 ± 0,42	9,4 ± 5,37
Fósforo	mg/dL	12,9 - 26	15,6 ± 0,51	15,1 ± 0,26
Glicemia	mg/dL	152 - 343	84,0 ± 11,79	118,3 ± 16,52
BUN	mg/dL	15 - 22	15,0 ± 1,00	16,5 ± 1,73
Colesterol total	mg/dL	60 - 82	56,3 ± 5,51	59,5 ± 7,92
Proteínas	gr/dL	6 - 8,9	5,2 ± 0,46	6,4 ± 0,25
Albúmina	gr/dL	3,6 - 3,9	2,6 ± 0,30	2,8 ± 0,23
Bilirrubina Total	mg/dL	0,2 - 0,3	0,28 ± 0,06	0,31 ± 0,11
FA	UI/L	206 - 251	78,0 ± 18,36	169,0 ± 6,48
LDH	UI/L	921 - 3.206	2.150,7 ± 371,6	2.465,8 ±1137,4
GOT	UI/L	275 - 465	150,3 ± 43,00	193,5 ± 15,0
Creatinina	mg/dL	1,1 -1,3	0,92 ± 0,27	0,95 ± 0,23

E.2. Pruebas Histoquímicas.

E.2.1. Hematoxilina-Eosina.

Los resultados obtenidos luego de la tinción de los cortes con Hematoxilina/Eosina y su posterior análisis al microscopio, se describen a continuación.

Entre las 0 y 6 horas no se observaron mayores diferencias histológicas entre los 3 grupos. Sin embargo, los grupos 1 y 2 presentan una herida limpia, a diferencia del grupo control donde se observan coágulos y detritus celulares adheridos a los labios de la herida (Figura N° 1).

A las 24 horas de tratamiento, los 3 grupos presentan una herida en pleno proceso de reepitelización. Las diferencias radican en que los grupo 1 y 2 presentan una herida cerrada y una mayor infiltración de fibroblastos, mientras que el grupo control mantiene una herida abierta y con una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio y glóbulos rojos (Figura N° 2).

A las 48 horas de tratamiento los 3 grupos muestran una reepitelización completa. Sin embargo, sólo en los grupos 1 y 2 se ha conformado el tejido de granulación, observándose gran cantidad de fibroblastos en la zona de cicatrización (Figura N° 3).

En las muestras tomadas a las 72 horas se observa que los grupos 1 y 2 presentan una mayor organización del tejido de granulación. El grupo control en cambio, aún presenta un infiltrado inflamatorio, con glóbulos rojos y detritus celulares distribuidos en la herida (Figura N° 4).

Al 5° día los grupos 1 y 2 presentan una mayor cantidad de colágeno y una disminución de la infiltración fibroblástica respecto del grupo control. Este último por su parte, aún presenta un epitelio inmaduro y una costra (Figura N° 5).

Al 7° día la diferencia entre los grupos, en cuanto a la organización de fibras colágenas, cantidad de fibroblastos, infiltrado inflamatorio y maduración del tejido de granulación es casi imperceptible.

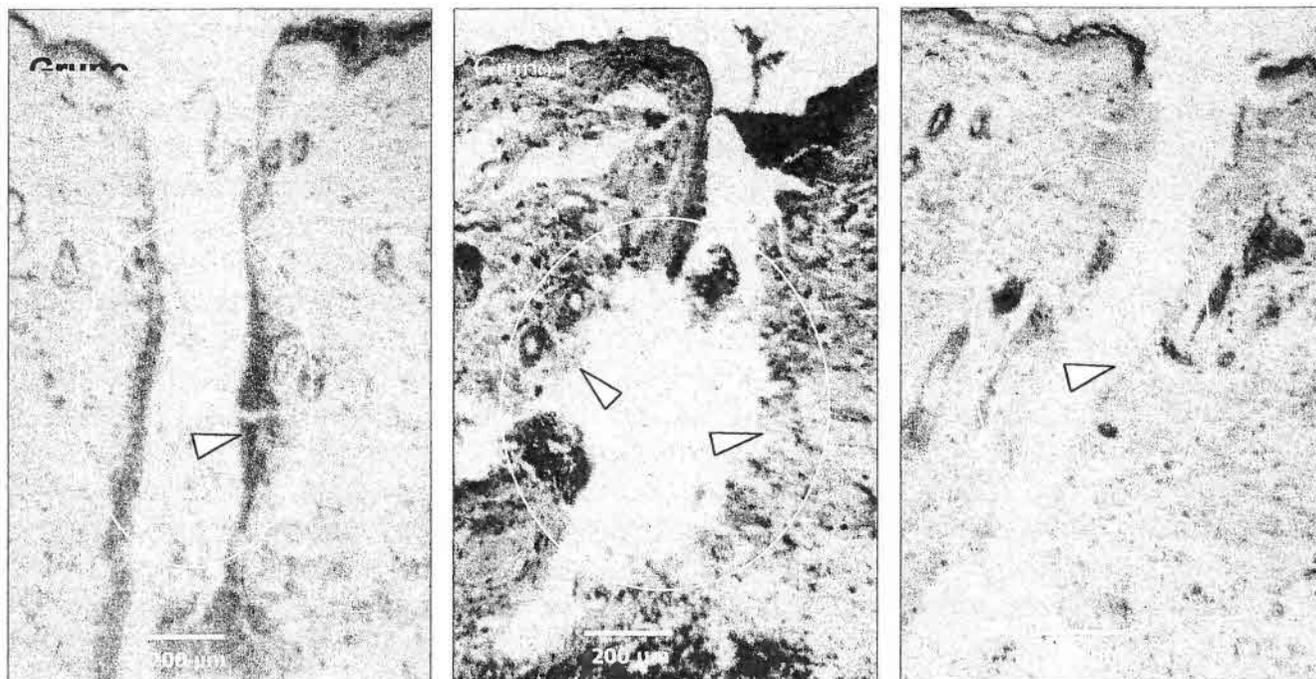


Figura N° 1. Microfotografías tomadas a las 6 horas de realizada la incisión. Las flechas blancas muestran los labios de la herida. Los grupos 1 y 2 presentan una herida limpia, sin coágulos ni detritus celulares; el grupo control mantiene coágulos adheridos a los labios de

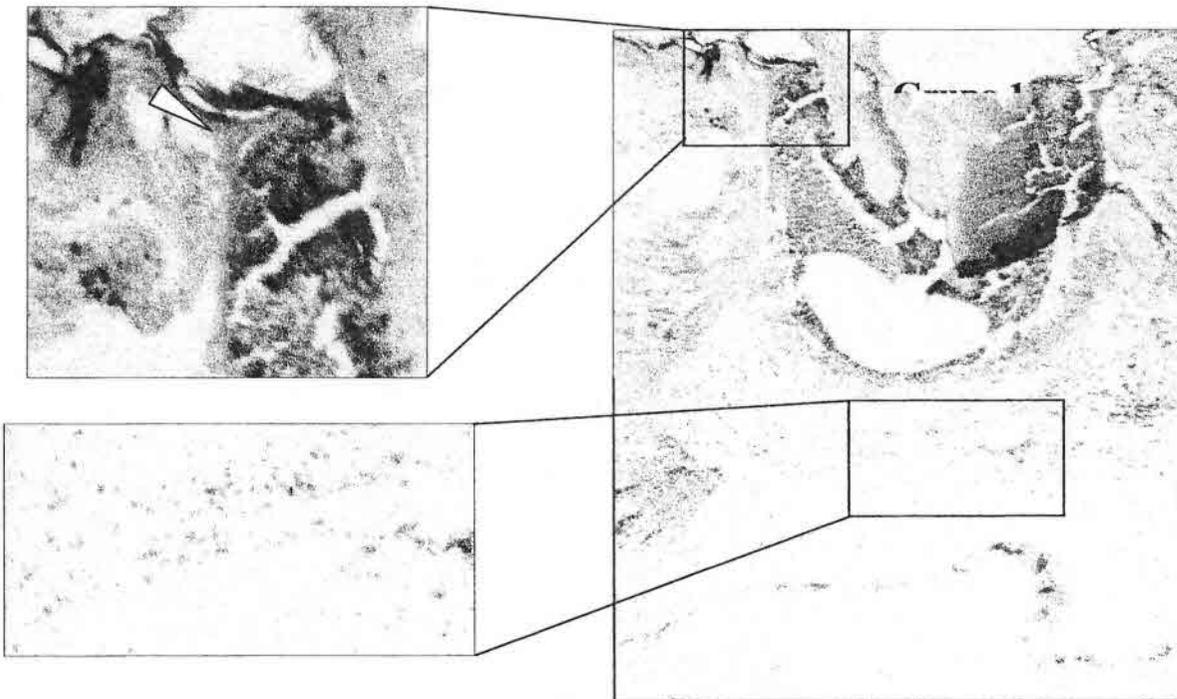
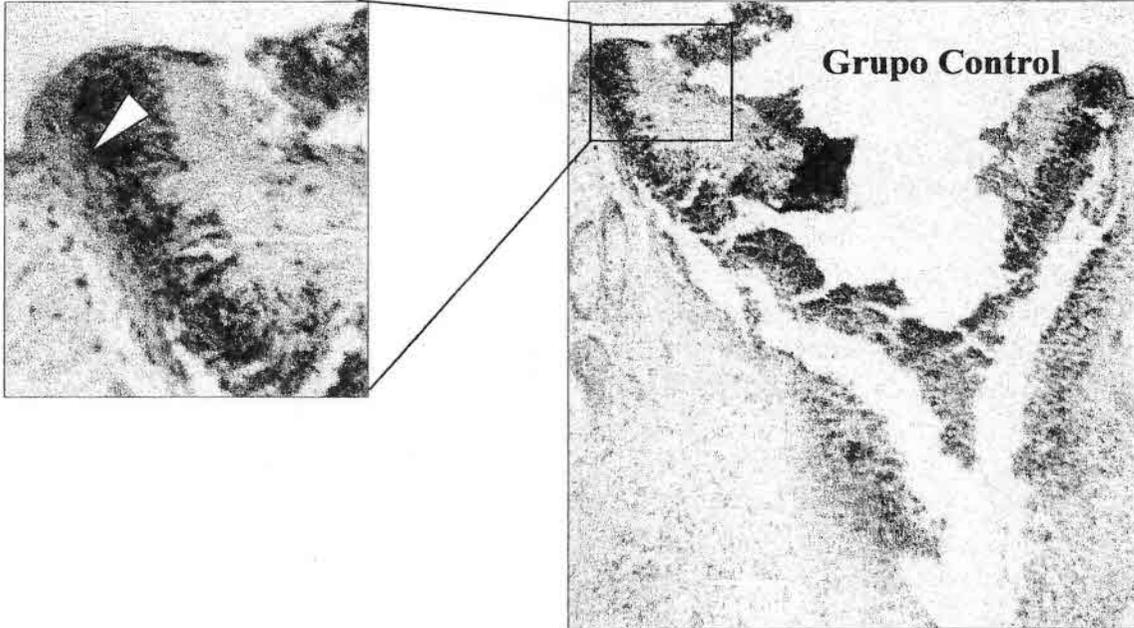
UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Figura Nº 2. A las 24 horas de tratamiento los tres grupos presentan una herida en pleno proceso de reepitelización. La diferencia radica en que los grupos 1 y 2 presentan una herida cerrada y una mayor infiltración de fibroblastos, mientras que el grupo control mantiene la herida abierta y con una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio y glóbulos rojos.



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

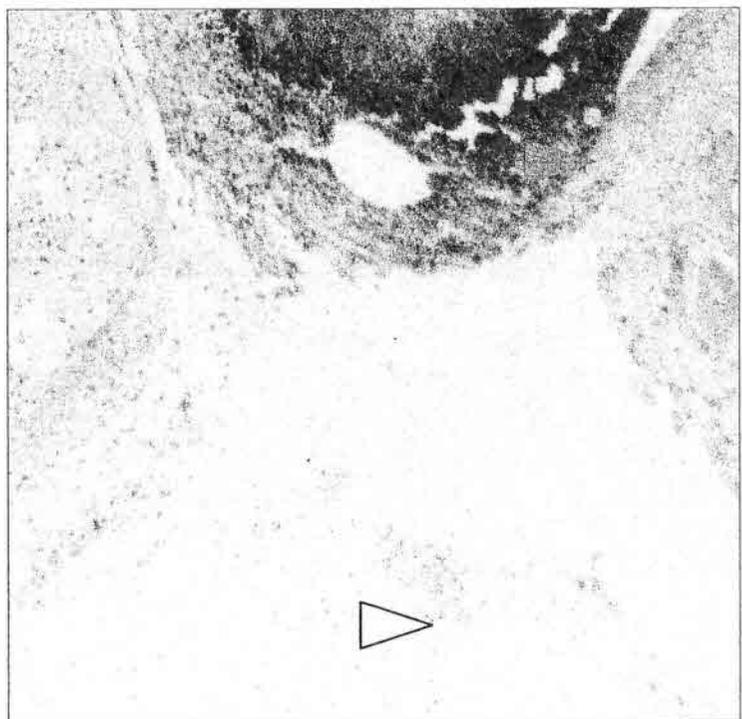
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl



Figura N° 3. A las 48 horas de tratamiento los tres grupos muestran una reepitelización casi completa (flecha celeste). Sin embargo, sólo en los grupos 1 y 2 se ha conformado el tejido de granulación, observándose gran cantidad de fibroblastos (flecha blanca).



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

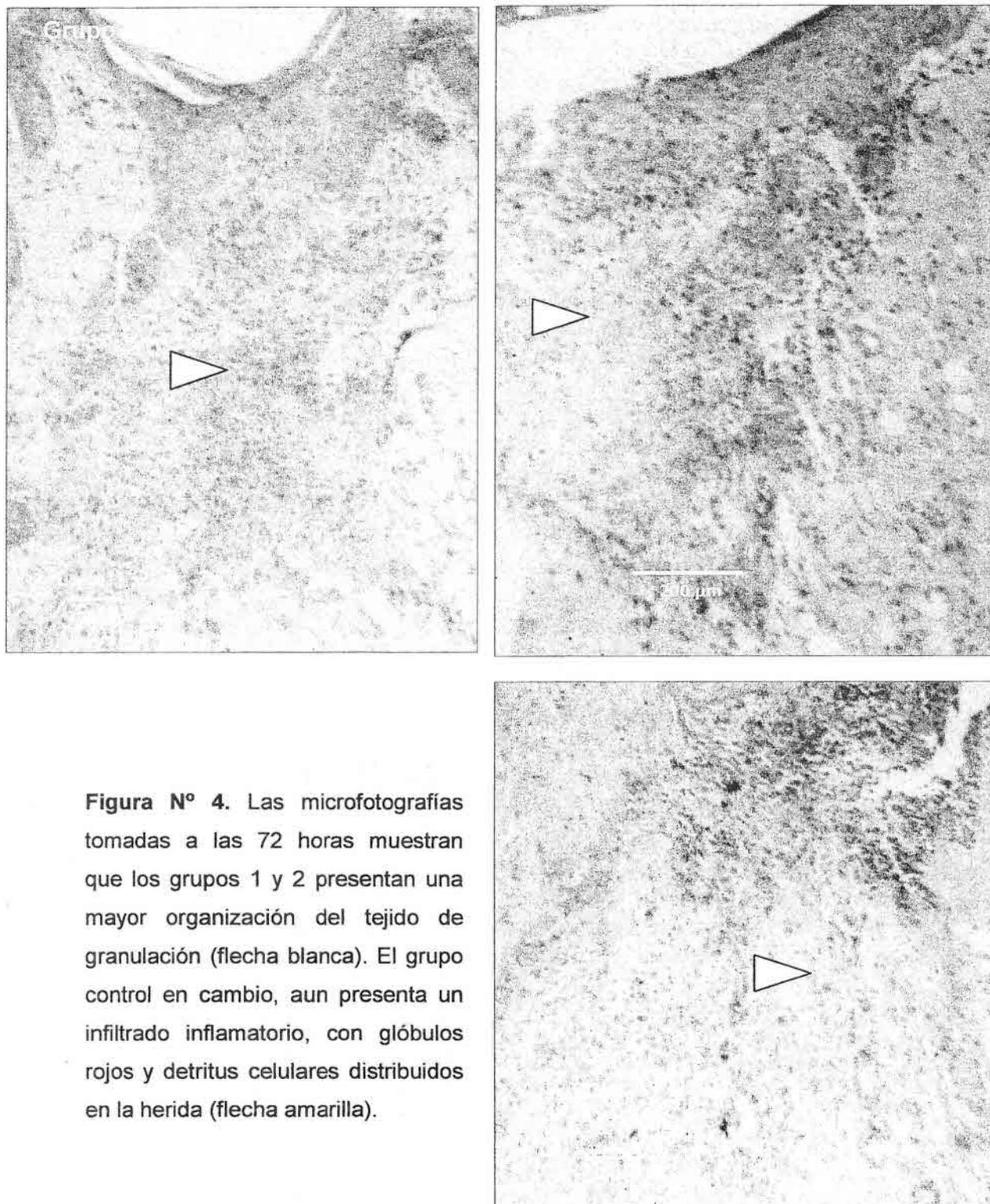


Figura N° 4. Las microfotografías tomadas a las 72 horas muestran que los grupos 1 y 2 presentan una mayor organización del tejido de granulación (flecha blanca). El grupo control en cambio, aun presenta un infiltrado inflamatorio, con glóbulos rojos y detritus celulares distribuidos en la herida (flecha amarilla).

UNIVERSIDAD DE CHILE

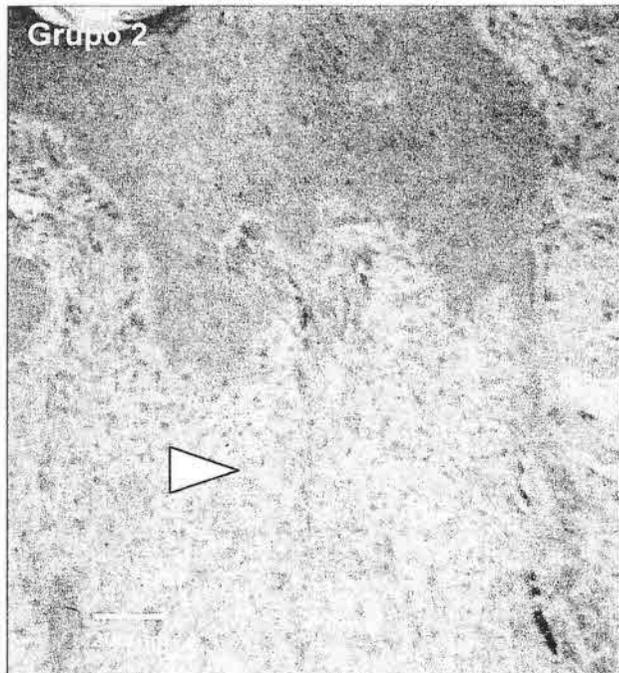
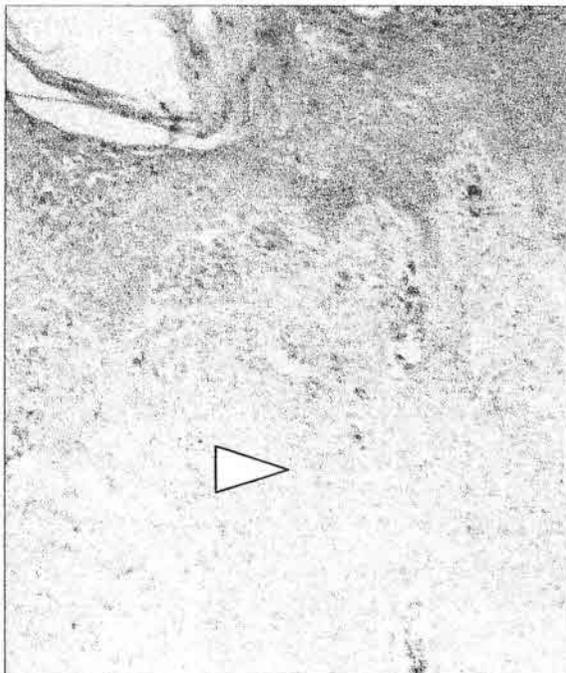
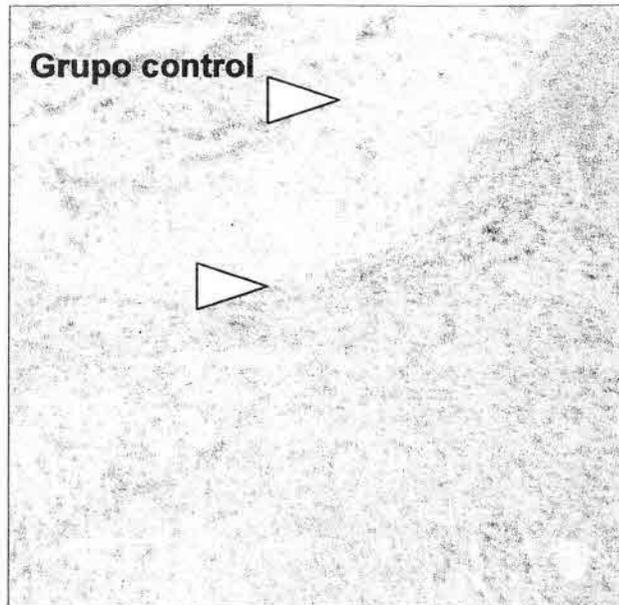
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

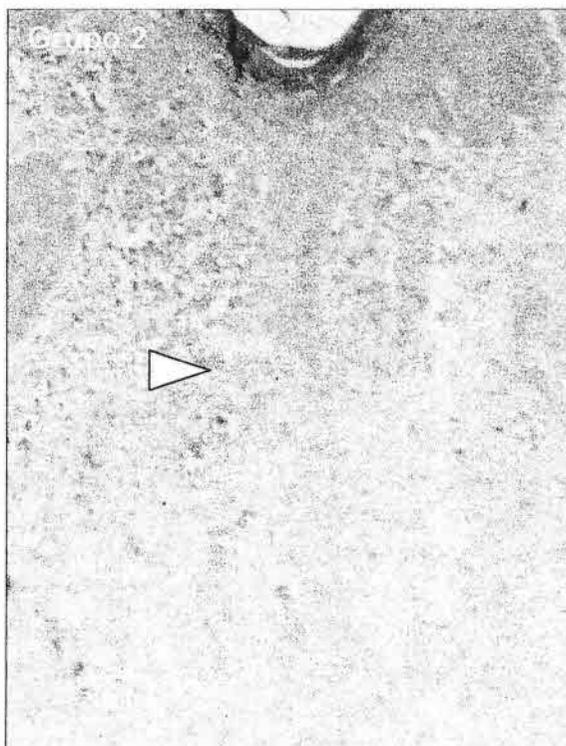
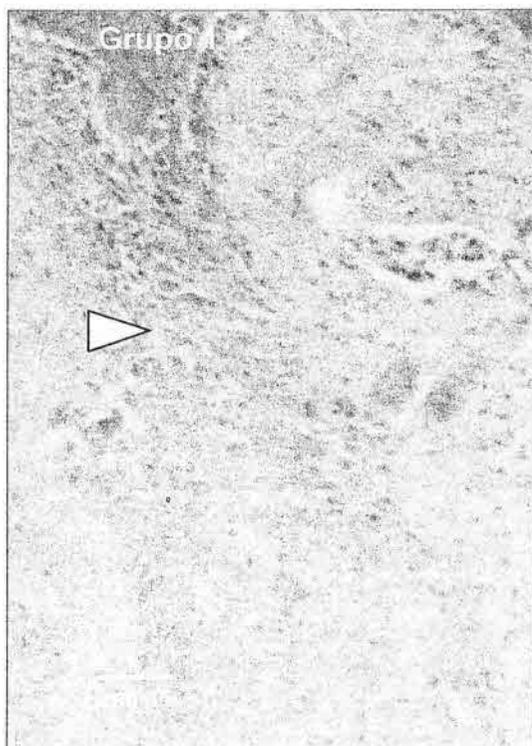
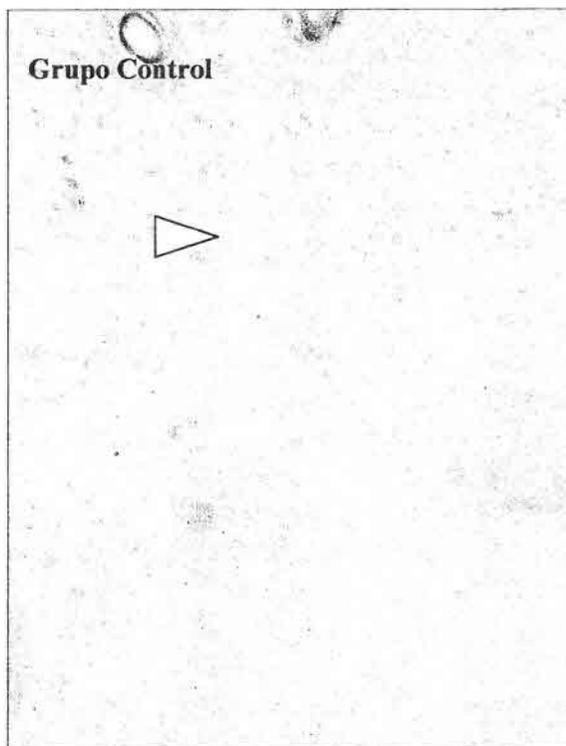
Figura N° 5. Al 5° día los grupos 1 y 2 presentan una mayor cantidad de colágeno y una disminución de la infiltración fibroblástica respecto del grupo control (flecha blanca). El grupo control presenta un epitelio inmaduro y costra (flecha amarilla).



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Figura N° 6. Al 7° día la diferencia entre los grupos, en cuanto a la organización de fibras colágenas, cantidad de fibroblastos, infiltrado inflamatorio y maduración del tejido de granulación es casi imperceptible (flecha blanca).



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

E.2.2. Picrosirius

La técnica utilizada para la observación y posterior análisis de la formación y maduración de colágeno en la herida, se realizó mediante la observación en microscopio de polarización la tinción picrosirius; esta tinción genera una birrefringencia al ser iluminada con luz polarizada, lo que permite diferenciar los tres tipos de colágeno mediante diferencias de color. En la Tabla N° 1 se indican las diferencias entre los tipos de colágeno y las diferencias de color que presentan a la tinción picrosirius.

Tabla N° 1. Tipos de Colágeno

Tipo de Colágeno	Color a la Tinción Picrosirius
Colágeno 1	Amarillo brillante, rojo o naranja
Colágeno 2	Amarillo claro o azul
Colágeno 3	Verde

La clasificación y la comparación de resultados fueron realizadas en muestras de ratas eutanasiadas los días 3, 5 y 7, posterior a la realización de la incisión, debido a que de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas histoquímicas Hematoxilina-Eosina, los sucesos de evolución y reparación de tejido en la herida se concentraron entre estos días. Para la evaluación de los parámetros más relevantes se trabajaron Criterios de Comparación, tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- Organización de Fibras Colágenas.
- Formación de Colágeno 3.
- Maduración de Colágeno 3 a Colágeno 1.

Los criterios de clasificación utilizados para evaluar las muestras se muestran en la Tabla N° 2 que se muestra a continuación

Tabla N° 2. Criterios de Clasificación

Clasificación	Símbolo	Criterio
1	+	Ausencia de colágeno 3, presencia de la malla de fibrina inicial y presencia de colágeno 1 anterior a la injuria.
2	++	Mínima presencia de colágeno 3 con una mínima organización de fibras colágenas, presencia de malla de fibrina en reducción y presencia de colágeno 1 en proceso inicial de regeneración.
3	+++	Mayor presencia de colágeno 3 con una pobre organización de fibras colágenas, presencia de malla de fibrina reducida y presencia de fibras delgadas de colágeno 1 en proceso de regeneración.
4	++++	Presencia importante de colágeno 3 con una organización mas avanzada de fibras colágenas, malla de fibrina casi inexistente y presencia de fibras más gruesas y en mayor cantidad de colágeno 1.
5	+++++	Mínima presencia de fibras de colágeno 3 con una mayor organización y grosor de fibras de colágeno 1 y ausencia de malla de fibrina.

Al observar un corte de piel normal con tinción Picrosirius en el microscopio de polarización, se aprecia la disposición de las fibras de colágeno, las cuales presentan un ordenamiento característico. En la Figura N° 7 que se muestra a continuación se observan dos fotografías de cortes de piel normal con tinción Picrosirius, con dos aumentos distintos.

En el periodo entre las 0 y 6 horas, todos los grupos presentan una imagen similar, donde se aprecia una herida abierta o bien la falta de desarrollo de fibras de colágeno (Figura N° 8).

A las 24 horas se observa una clara diferencia entre el grupo control y los grupos tratados. Mientras los grupos 1 y 2 presentan formación de colágeno, con predominio de las fibras tipo 3, el grupo control aún tiene una herida sin formación de colágeno (Figura N° 9)

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

A las 48 horas los grupos 1 y 2 presentan un incremento en la cantidad de fibras de colágeno tipo 1 y 3; además, el colágeno tipo 1 se ve más grueso. En el grupo control en cambio, se observa una herida con escasa formación de colágeno en la zona de cicatrización (Figura N° 10).

A las 72 horas los grupos 1 y 2 presentan mayor cantidad de fibras colágenas distribuidas en el corte que el grupo control, además, las fibras de colágeno tipo 1 se ven más gruesas. Más aún, el grupo control no sólo presenta fibras colágenas más delgadas, sino que existe un predominio de colágeno tipo 3 (Figura N° 11).

En el 5° día, las diferencias ya son menos notorias. El grupo 2 presenta fibras de colágeno tipo 1 más gruesas y organizadas. Las fibras del grupo 1 tienen una organización similar a las del grupo control (Figura N° 12).

En el 7° día de tratamiento no se observan diferencias en las fibras de colágeno tipo 1 de los grupos 1, 2 y control; estas fibras se observan gruesas y con una organización similar, conformando ya una cicatriz madura (Figura N° 13).

En la tabla N° 3 se expone la clasificación realizada a las muestras según los criterios expuestos en la Tabla N° 2 que se muestra a continuación.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
 Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
 Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
 e-mail: mel@ciq.uchile.cl

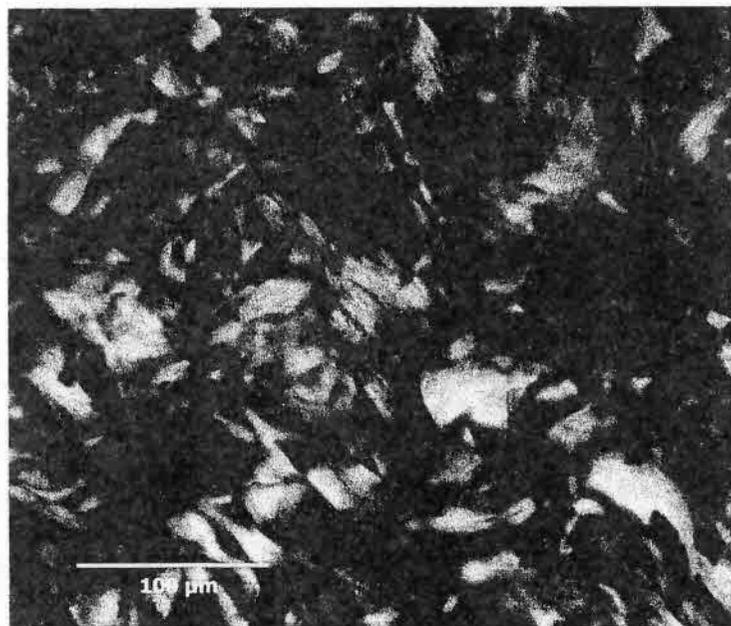
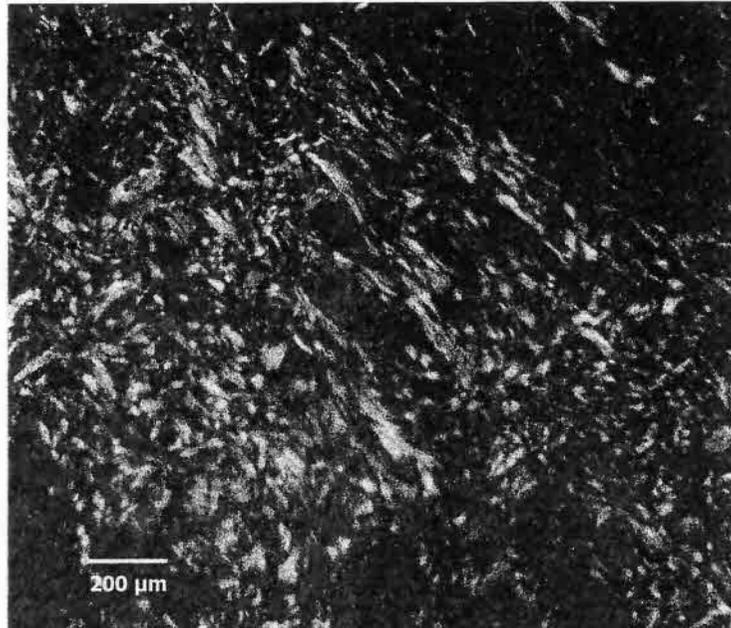
Tabla Nº 2. Resultados de la Tinción Picrosirius

Horario	Grupo 1		Grupo 2		Grupo control	
	rata Nº	clasificación	rata Nº	clasificación	rata Nº	clasificación
0 hrs.	1	+	25	+	49	+
	2	+	26	+	50	+
	3	+	27	+	51	+
3 hrs.	4	+	28	+	52	+
	5	+	29	+	53	+
	6	+	30	+	54	+
6 hrs.	7	+	31	+	55	+
	8	+	32	+	56	+
	9	+	33	+	57	+
24 hrs.	10	++	34	++	58	+
	11	++	35	++	59	+
	12	++	36	+++	60	+
48 hrs.	13	+++	37	+++	61	+
	14	+++	38	++	62	++
	15	+++	39	+++	63	++
72 hrs.	16	++++	40	++++	64	+++
	17	++++	41	++++	65	+++
	18	++++	42	++++	66	+++
5° día	19	++++	43	++++	67	+++
	20	++++	44	++++	68	++++
	21	++++	45	++++	69	++++
7° día	22	++++	46	++++	70	++++
	23	++++	47	++++	71	++++
	24	++++	48	++++	72	++++

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Figura N° 7. Microfotografías Digitales en Polarización de una zona normal de piel con tinción Picrosirius, en dos diferentes aumentos. Las fibras de colágeno tipo 1 en rojo y naranja se ven gruesas y con una organización característica; entre éstas se ven tonos verdes y amarillos correspondientes a estadios tempranos de maduración del colágeno (colágeno tipo 3).



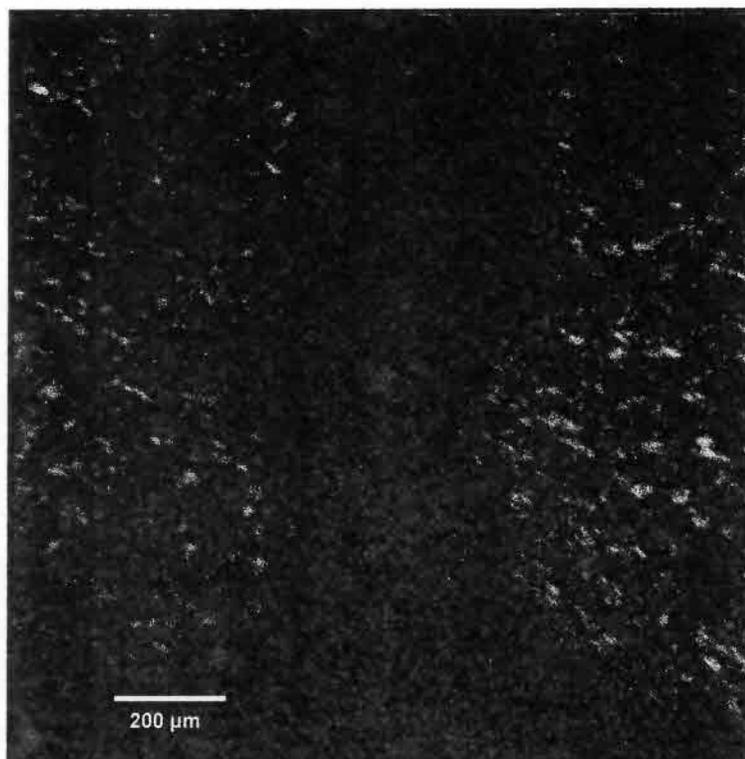
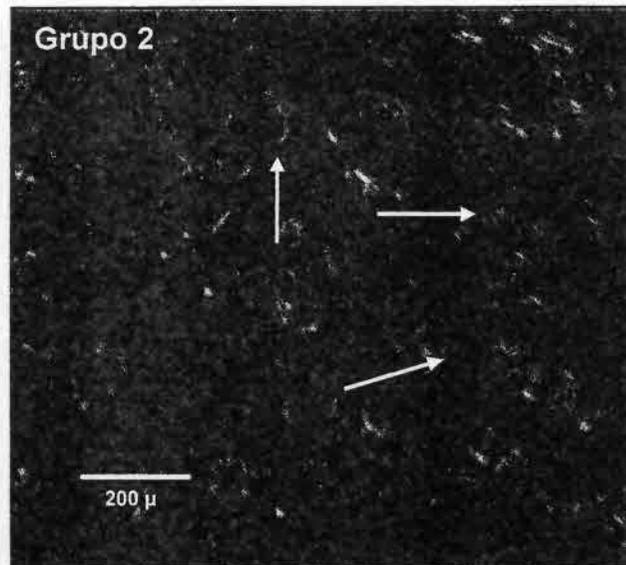
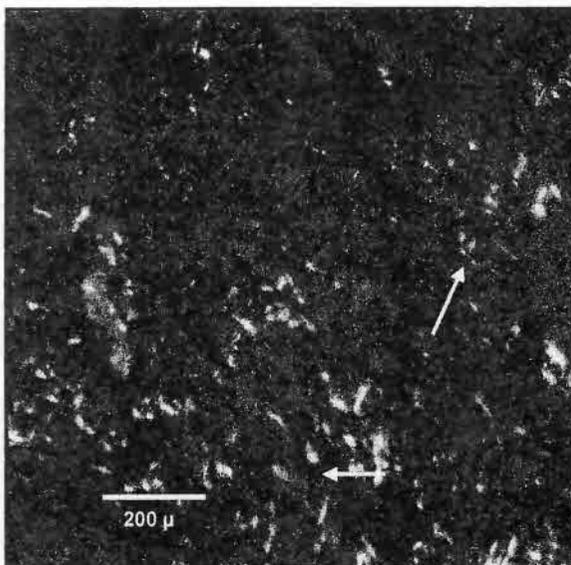
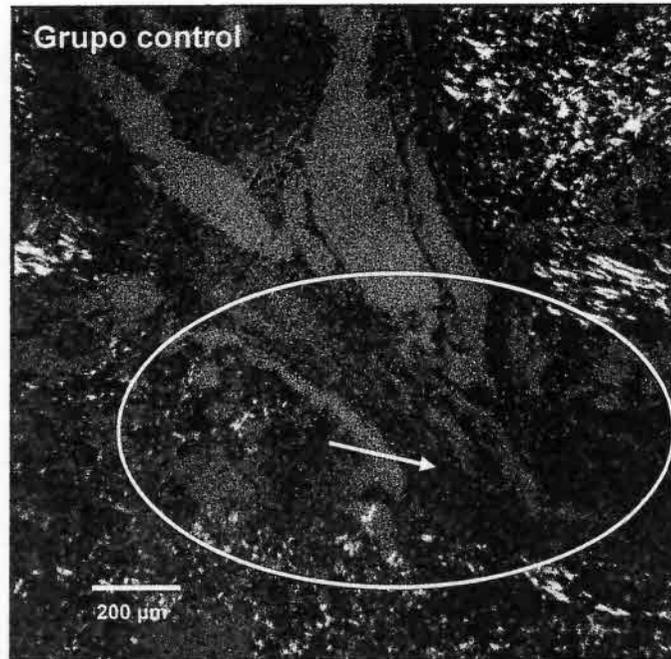


Figura N° 8. Microfotografía Digital en Polarización de una incisión en piel de ratas Sprague Dawley con tinción Picrosirius. Se nota claramente la falta de tejido en la zona de la incisión. Esta condición se vio de igual forma en los grupos 1, 2 y control a las 6 horas de realizada la incisión, por lo que aquí se presenta una fotografía representativa de dicha condición.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
e-mail: mel@ciq.uchile.cl

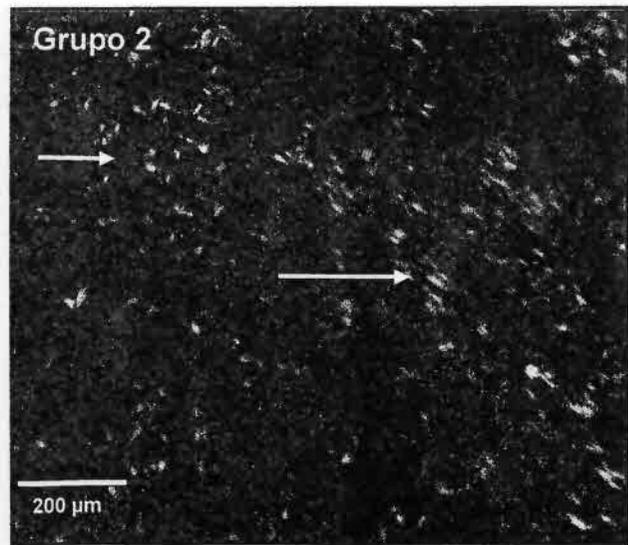
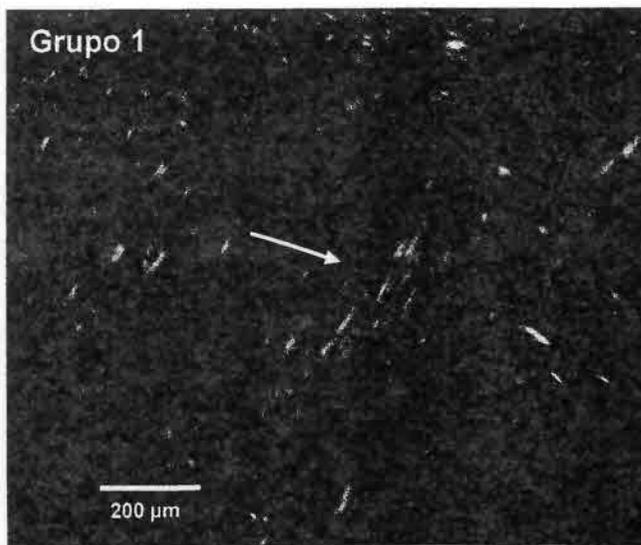
Figura Nº 9. A las 24 horas se observa una clara diferencia entre el grupo control y los grupos 1 y 2. Los grupos 1 y 2 presentan formación de colágeno con predominio de las fibras tipo tres en color verde (flecha blanca), en cambio el grupo control aun tiene una herida sin formación de colágeno (flecha celeste).



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920
e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Figura N° 10. A las 48 horas los grupos 1 y 2 presentan un incremento en la cantidad de fibras de colágeno tipo 1 y 3; además, el colágeno tipo 1 se ve más grueso (flecha blanca). El grupo control en cambio, presenta una herida con escasa o casi nula formación de colágeno (flecha celeste).



UNIVERSIDAD DE CHILE

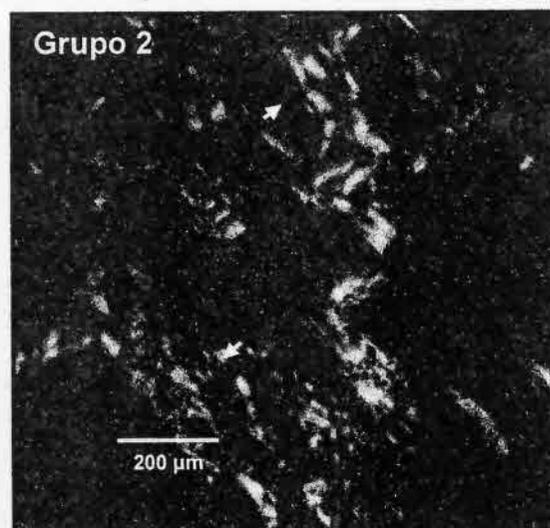
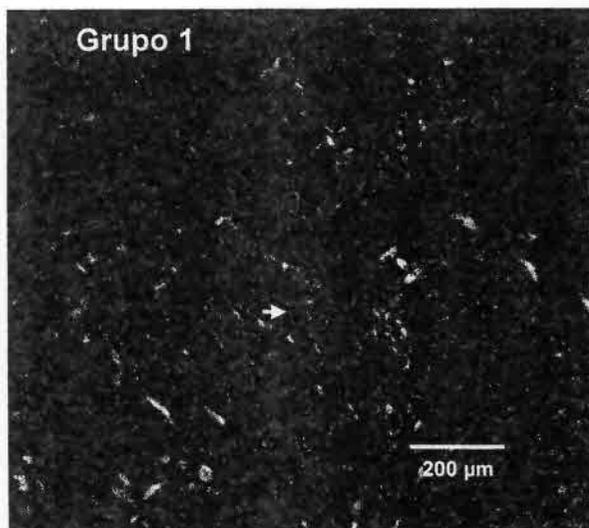
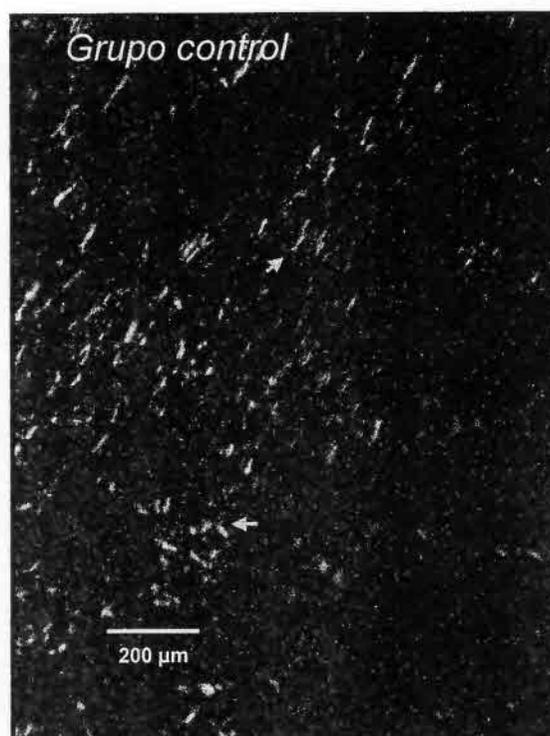
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Figura 11. A las 72 horas los grupos 1 y 2 presentan mayor cantidad de fibras colágenas (tejido más denso) que el grupo control, además, las fibras de colágeno tipo 1 se ven más gruesas (flecha blanca). Más aún, el grupo control no sólo presenta fibras colágenas más delgadas, sino que, predomina el colágeno tipo 3 (flecha celeste).



UNIVERSIDAD DE CHILE

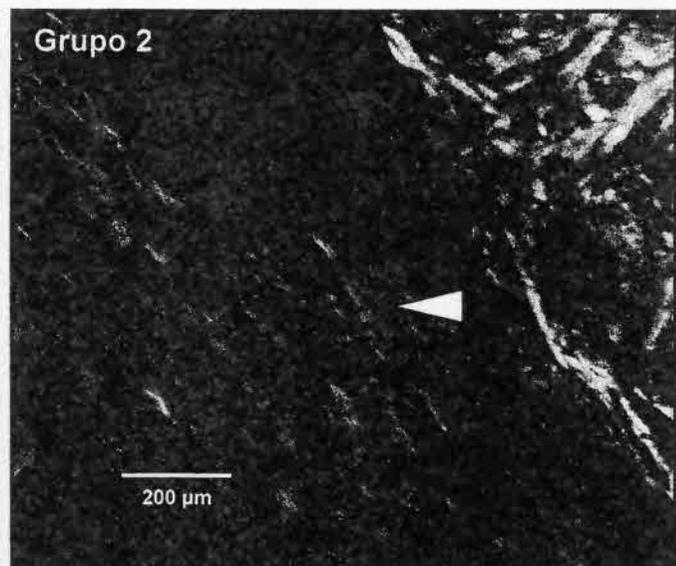
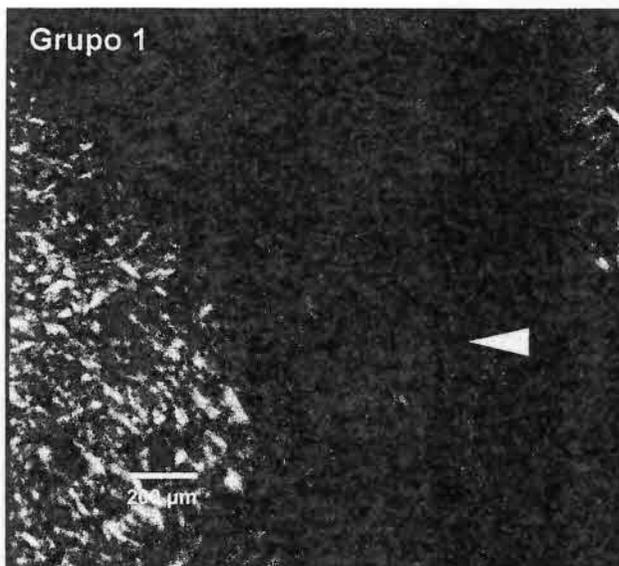
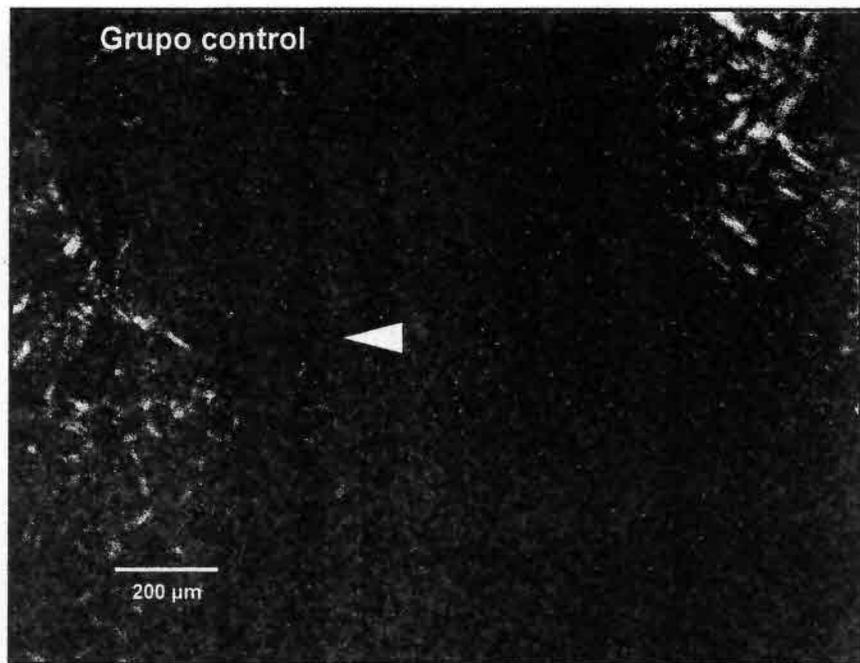
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Figura N° 12. En el 5° día, las diferencias ya son menos notorias. El grupo 2 presenta fibras de colágeno tipo 1 más gruesas y organizadas (flecha blanca). Las fibras del grupo 1 tienen una organización similar a las del grupo control (flecha celeste).



UNIVERSIDAD DE CHILE

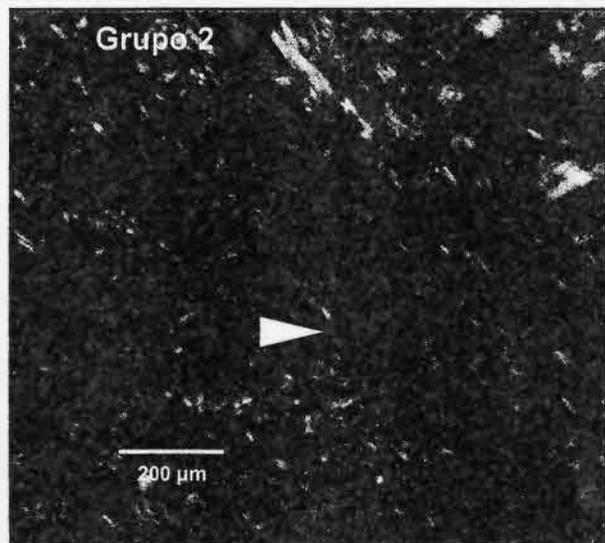
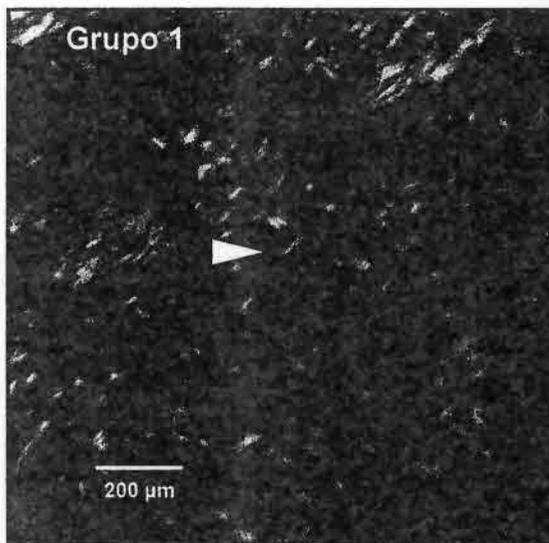
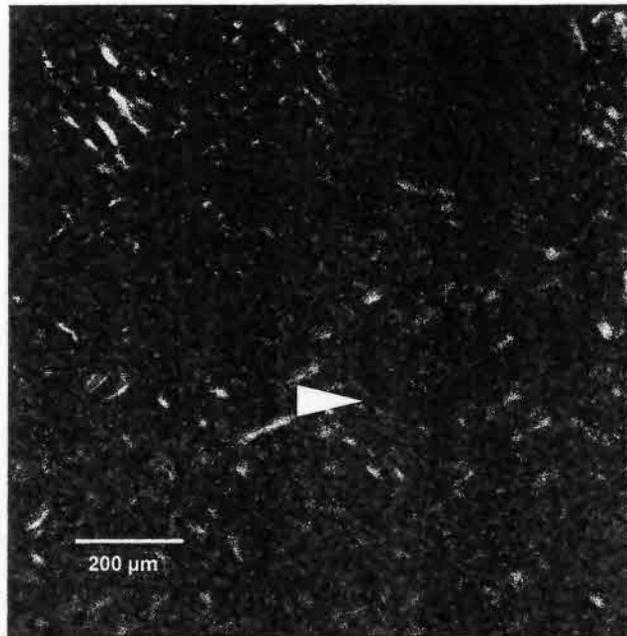
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@cig.uchile.cl

Figura N° 13. En el 7° día de tratamiento no se observan diferencias en las fibras de colágeno tipo 1 de los grupos 1, 2 y control; estas fibras se observan gruesas y con una organización similar, conformando ya un tejido cicatricial (flecha blanca).



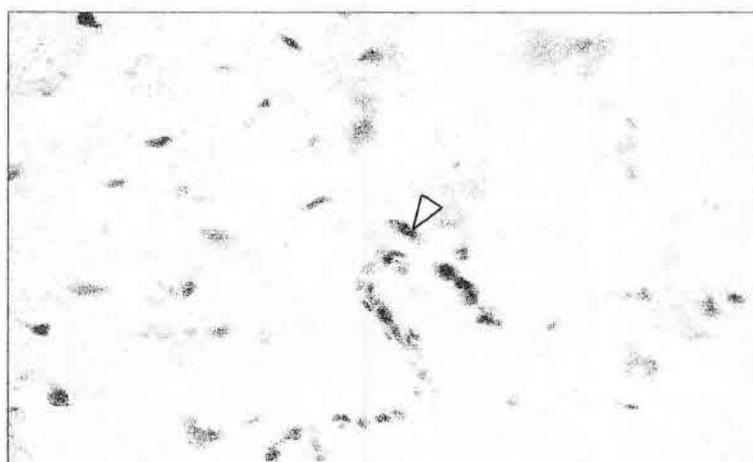
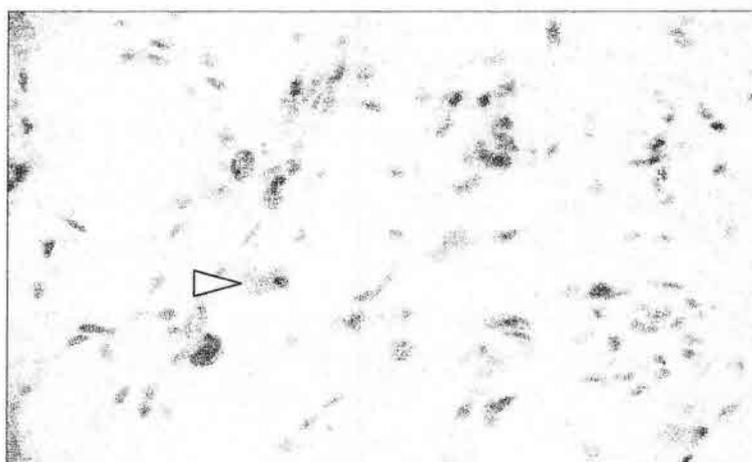
E.3. Pruebas Inmuno-histoquímicas.

E.3.1. COX-2

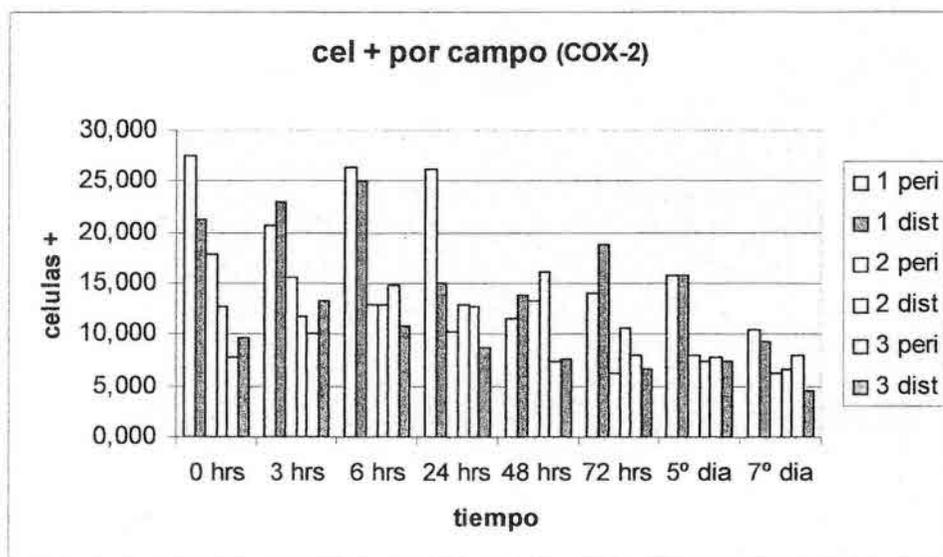
El análisis de los cortes posterior a la tinción de inmuno-histoquímica específica para COX-2 se llevó a cabo realizando un conteo en el microscopio de las membranas celulares y/o citoplasmas positivos a la tinción, en adelante células positivas. Para esto se tomó en cuenta una zona peri-incisional, correspondiente a la región de la herida y una zona distal, correspondiente a una región alejada de la incisión, es decir, una zona de piel normal.

A continuación se muestran imágenes de dermis de rata, que corresponden las zonas fotografiadas para obtener los datos, distinguiéndose claramente las Tinciones Positivas en color café, de las negativas a la tinción en color azul/morado.

Microfotografías digitales
cortes de piel teñidos con la técnica de inmuno-histoquímica específica para COX-2. Las flechas blancas muestran Tinciones Positivas en color café: A, tejido peri-incisional; B, tejido distal. Los núcleos se ven en color azul/morado.



Los resultados obtenidos, expresados como promedio de células positivas por campo, se muestran en la figura a continuación.

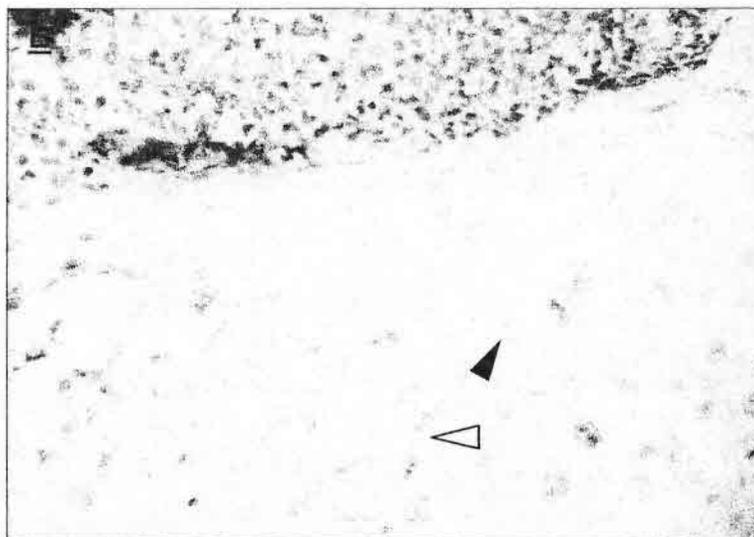
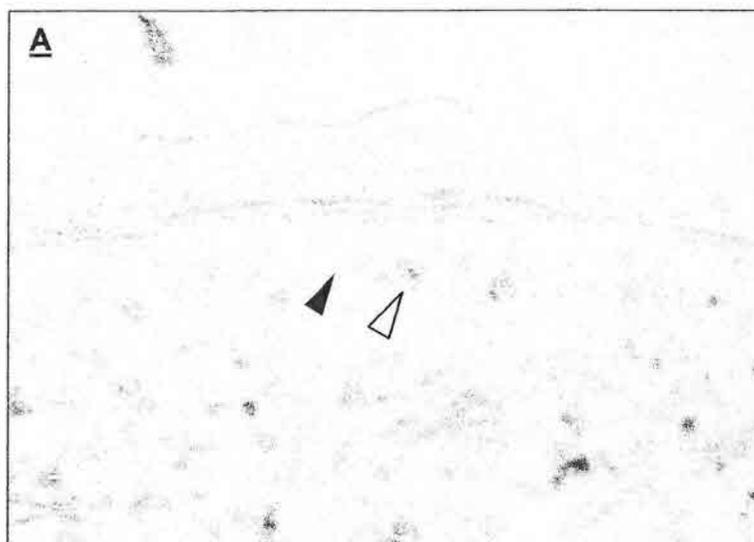


Se observa un mayor N° de células positivas en las primeras 24 horas de tratamiento en los grupos 1 y 2, especialmente en el grupo 1 que es el que recibió el tratamiento oral y tópico. A las 48 horas la cantidad de células positivas se reduce en todos los grupos, pero los grupos 1 y 2 se mantienen más altos que el control. Las células positivas continuaron bajando hasta igualarse los 3 grupos en el séptimo día que fue el día de término del experimento. El análisis estadístico de estos resultados fue realizado utilizando el test de ANOVA, el cual confirmó las diferencias antes mencionadas ($p < 0,05$).

E.3. 2. Ki-67

A continuación se muestran imágenes de dermis de rata, que corresponden las zonas fotografiadas para obtener los datos

Microfotografía digital: la tinción inmuno-histoquímica específica para Ki-67. Las flechas blancas muestran núcleos positivos a la tinción en color café, y las flechas negras muestran núcleos negativos a la tinción: A-epidermis distal; B-epidermis peri-incisional.



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

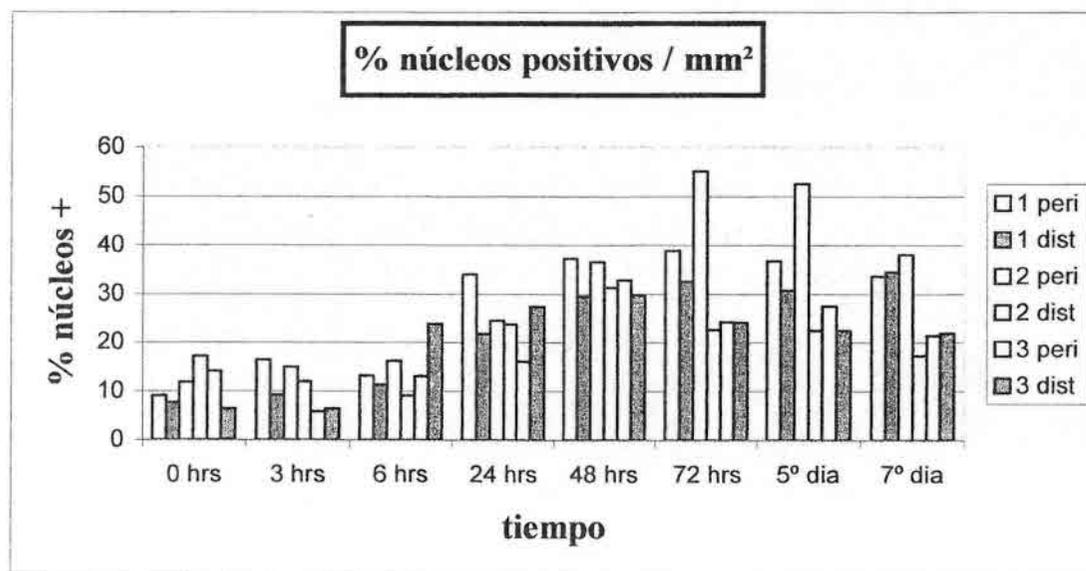
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Los resultados obtenidos luego de la tinción de los cortes con la tinción de inmunohistoquímica específica para Ki-67 y su posterior análisis al microscopio, se describen a continuación.

- **% de núcleos positivos:** corresponde al % de núcleos positivos a la tinción específica para Ki-67 en un área determinada en las microfotografías obtenidas, diferenciando las zonas peri-incisional y distal.



El gráfico muestra el % de núcleos positivos por mm² en un área predeterminada, de las microfotografías obtenidas. Se observa una clara tendencia al aumento en el número de células positivas en el tiempo en los 3 grupos de animales siendo mayor en los grupos de animales tratados (Grupos 1 y 2). Cabe señalar además, que este aumento fue significativamente mayor en las zonas peri-incisionales. Este fenómeno alcanza su máximo a las 72 horas de tratamiento. La magnitud de estas diferencias disminuye a medida que avanzan los días de tratamiento, observándose una tendencia a igualar el número de núcleos positivos de ambas zonas distal y peri-incisional en los 3 grupos en el estudio. El análisis estadístico de estos resultados fue realizado utilizando el test de ANOVA, el cual confirmó las diferencias antes mencionada ($p < 0,05$)

UNIVERSIDAD DE CHILE

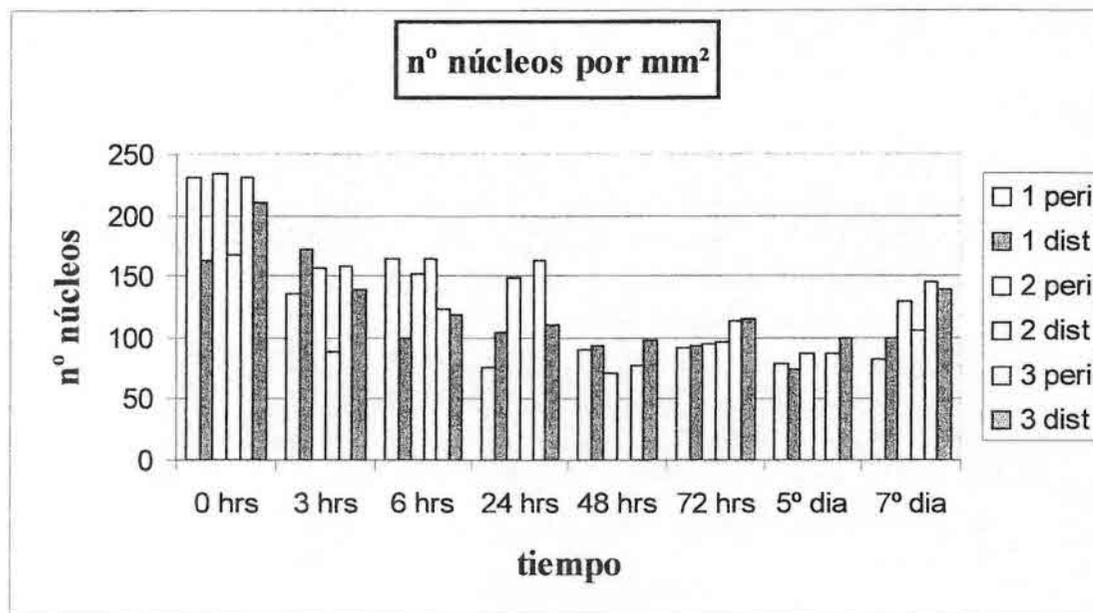
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

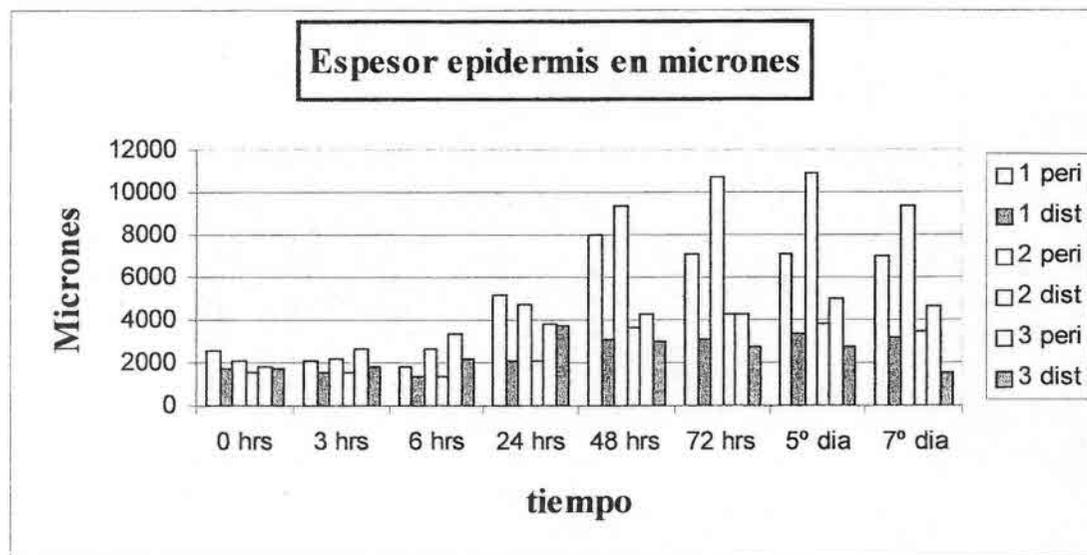
e-mail: mel@cia.uchile.cl

- **Nº de núcleos totales:** corresponde al conteo total de núcleos observados por mm^2 , en un área predeterminada en cada una de las microfotografías obtenidas. Los resultados se muestran en la figura a continuación.



En la figura se observa que la cantidad de núcleos disminuye a medida que avanza el tiempo de tratamiento; sin embargo, ocurre hasta sólo las 48 horas de tratamiento. Posteriormente el número de núcleos totales se igualó en los 3 grupos y permaneció constante hasta el final del tratamiento (7 días de tratamiento). Cabe señalar además, que al séptimo día de tratamiento los valores fueron significativamente más bajos que los de la hora 0 de tratamiento. El análisis estadístico de estos resultados fue realizado utilizando el test de ANOVA, el cual confirmó las diferencias antes mencionadas ($p < 0,05$); sin embargo, las diferencias observadas entre las zonas distal y peri-incisional de cada grupo en los distintos tiempos ensayados no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$).

- **Espesor epidermis:** las microfotografías obtenidas con la tinción Ki67 permite medir espesor de epidermis. Por lo tanto, para confirmar las diferencias anteriormente mencionadas realizamos la medición del espesor de la epidermis en las microfotografías de los cortes teñidos.



El gráfico muestra el espesor de la epidermis medido en micrones, de los diferentes grupos en las zonas peri-incisional y distal. Entre las 0 y 6 horas de tratamiento no se observan diferencias significativas entre los grupos como tampoco entre las zonas distal y peri-incisional de cada grupo ($p > 0,05$). A las 24 de tratamiento, la zona peri-incisional de los grupos 1 y 2 presenta un aumento significativo respecto de la distal y de magnitud mayor que la del grupo control ($p < 0,05$); en el grupo control este fenómeno comienza a aparecer y levemente a las 48 horas de tratamiento de los animales lo que se mantiene hasta el final del tratamiento. Cabe señalar que desde las 24 horas hasta el séptimo día de tratamiento se mantuvo el mayor espesor de las zonas peri-incisionales respecto de las distales en los 3 grupos, fenómeno no observado en las primeras horas de tratamiento (0 a 6 horas). El análisis estadístico de estos resultados fue realizado utilizando el test de ANOVA, el cual confirmó las diferencias antes mencionadas.

F. Actividad GSH transferásica hepática.

Peso hígado (g/ rata)	13,6 ± 2,20
Proteína microsómica (mg/ g de hígado)	48,8 ± 6,31
Proteína citosólica (mg/ g de hígado)	216,2 ± 27,23

- **Actividad GSH transferásica citosólica hepática.** No se observaron diferencias en la actividad GSH-transferásica citosólica de los 3 grupos analizados: a) ratas con la incisión en la piel y sin tratamiento con *Buddleja globosa* (control), b) ratas con incisión en la piel y aplicación tópica del extracto de *Buddleja globosa* en la herida, c) ratas tratadas oralmente durante 3 días previos a la incisión en la piel y a las cuales se les administró oralmente y tópicamente el extracto de *Buddleja globosa* (Metodología para cumplir el objetivo específico N°4: tratamiento de los animales).

La actividad GSH- transferásica promedio fue $2,29 \pm 0,148$ μ moles/min/mg de proteína citosólica.

- **Actividad GSH-transferásica microsómica hepática.** No se observaron cambios significativos en la actividad GSH-transferásica microsómica de los grupos de ratas no tratado con *Buddleja globosa* (control) y en el tratado sólo tópicamente con *Buddleja globosa*. Sin embargo, de la actividad GSH-transferásica del grupo de animales tratados oral y tópicamente con el extracto de *Buddleja globosa* presentó un aumento significativo a las 24 horas de tratamiento; este aumento fue disminuyendo en el tiempo hasta llegar a valores normales a los 5 días de tratamiento de los animales. Existen antecedentes científicos acerca de la activación de esta enzima por ROS; además, se ha demostrado

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

que algunos flavonoides inducen la síntesis de esta enzima. Por lo tanto, el aumento de la actividad GSH-transferásica microsómica podría ser explicado por inducción enzimática y/o activación por ROS, postulado que debe ser confirmado experimentalmente.

Grupos de animales	Actividad GSHT Citosólica (μ moles de conjugado formado/min/ mg de proteína)	Actividad GSHT microsómica (μ moles de conjugado formado/min/ mg de proteína)
Control	2,19 \pm 0,194	0,233 \pm 0,0136
Tratamiento tópico	2,31 \pm 0,119	0,226 \pm 0,0118
Tratamiento oral y tópico	2,29 \pm 0,140	-----

Tiempo de tratamiento	Actividad GSht microsómica (μ moles de conjugado formado/min/ mg de proteína)
0 horas	0,235 \pm 0,0148
3 horas	0,239 \pm 0,0132
6 horas	0,227 \pm 0,0122
24 horas	0,439 \pm 0,0164
48 horas	0,341 \pm 0,0153
72 horas	0,332 \pm 0,0120
5 días	0,227 \pm 0,0117
7 días	0,221 \pm 0,0109

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

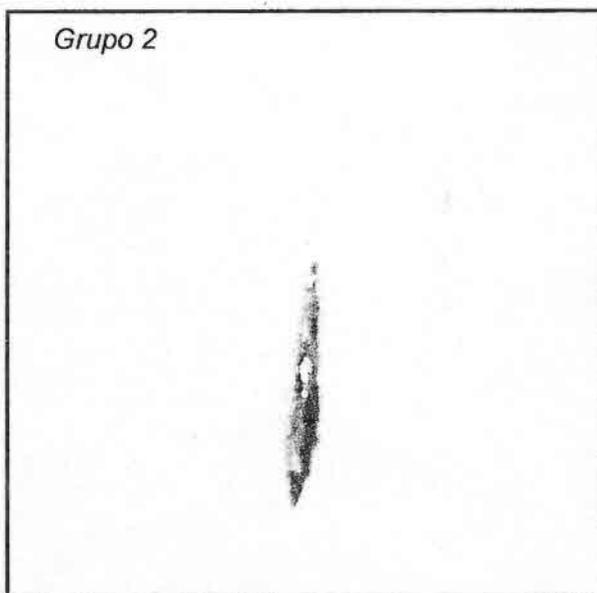
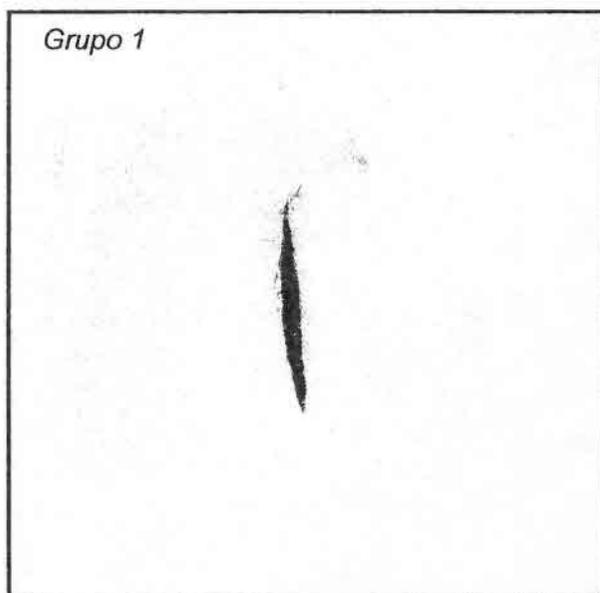
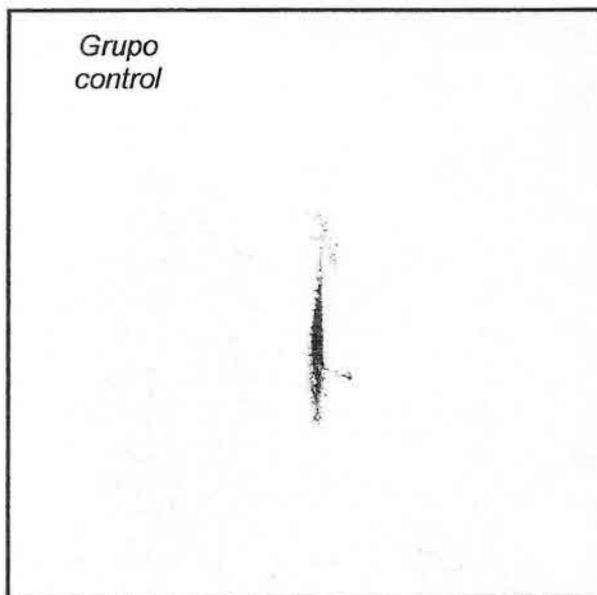
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

G. Visualización macroscópica de la piel de los animales

0 hrs de Tratamiento. Las fotos muestran las pieles con la incisión recién realizada.



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

48 hrs de Tratamiento. A las 48 horas la diferencia que se observa entre los grupos radica en que el Grupo Control mantiene una cicatriz inmadura donde se ve tejido de granulación. Los grupos 1 y 2 muestran una cicatrización más avanzada, observándose un tejido en contracción y menos brillante.

Grupo control



Grupo 1



Grupo 2



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@cia.uchile.cl

7° día de Tratamiento. En el 7° día se observa una clara diferencia entre los grupo, donde los animales tratados han logrado una cicatrización muy avanzada, a diferencia del grupo control en donde el proceso de cicatrización esta en un estadio más temprano, observándose una costra sobre el tejido en reparación.

Grupo control



Grupo 1

Grupo 2

PRINCIPALES LOGROS ALCANZADOS HASTA AHORA

1. **Condiciones de Cultivo y Cosecha.** Los resultados de las distintas condiciones de cultivo y cosecha se correlacionaron con la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos. Esto nos permitió establecer las mejores condiciones de producción de la materia vegetal (hojas).

Cabe señalar además que se encontró un clon de *B. globosa* sin vello. Lugar: PROFO Lampa.

2. **Marcadores Químicos.** El estudio de marcadores muestra a la fecha la presencia de metabolito que está presente tanto en *B. davidii* como en *B. globosa*, diferenciándose en las concentraciones siendo el metabolito mayoritario en *B. globosa*. De los restantes productos estamos esperando los resultados de RMN que se están realizando en Santiago, la mayor dificultad ha sido lo altamente polar de los compuestos y la pequeña cantidad aislada en forma pura.

3. **Estudios de Cicatrización.** Como una forma de buscar marcadores celulares y moleculares de respuesta fisiológica frente al proceso de cicatrización, se provocó una injuria aguda en la piel de las ratas.

A. **Control de Dosis.** Las pruebas sanguíneas realizadas para controlar la dosis utilizada en los estudios de cicatrización podría servir como base para elaborar un protocolo para estudiar rangos terapéuticos de diferentes preparados necesarios para la formulación de fitofármacos. Estas pruebas permiten evaluar el estado general del animal y por tanto, deberían alterarse frente a reacciones adversas provocadas por las drogas.

B. **Estudios histoquímicos.** Los resultados hasta ahora obtenidos muestran claras diferencias entre el grupo control y los tratados con el extracto hidro-alcohólico de *Buddleja globosa*, principalmente en las fases iniciales e intermedias del proceso; la herida se mantiene limpia de coágulos y detritus celulares, cierra antes y el tejido de granulación se constituye más rápidamente. Sin embargo, el resultado final, es decir la

formación de la cicatriz, ocurrió en un tiempo similar en los tres grupos, pero el cierre de la herida fue más rápido y la cicatriz más organizada y aséptica en las ratas tratadas con el extracto de *Buddleja globosa* que en las no tratadas.

C. Publicaciones. Los estudios *in vivo* e *in vitro* de los efectos del *Buddleja globosa* sobre cicatrización serán publicados en una revista científica de difusión internacional. Sin embargo, cabe señalar que los manuscritos serán enviados sólo cuando se presente la solicitud de patente al Ministerio de Economía; la información que tenemos de la Comisión de la Universidad de Chile que está a cargo de estos trámites nos ha informado que esto ocurrirá dentro 3 meses más o menos. Por otra parte, podemos escribir la monografía de *Buddleja globosa* sin adelantar en ella los resultados que están en proceso de patentamiento.

Tablas de impactos logrados a la fecha

Impactos Tecnológicos

Logro	Número a la fecha			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	Extracto hidroalcohólico estandarizado químicamente y farmacológicamente	---	---	Este extracto y sus usos están en trámite de patentamiento.
Proceso	---	---	---	---
Servicio	Protocolo para establecer dosis de preparados herbales			Modelo animal para establecer dosis terapéutica de preparados naturales

Impactos científicos

Logro	Número a la fecha	Detalle (citas, título, descripción)
Publicaciones (por ranking)	2	<p>Conferencia: “<i>Buddleja globosa hope</i> utilizada por la medicina nativa como cicatrizante de heridas y antiinflamatorio”. María Eugenia Letelier M. Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia “Contribuciones de la flora regional a la medicina actual”. México D. F. México. 30 de Noviembre al 2 de Diciembre del 2006. Revista de Fitoterapia. Libro de Resúmenes PC11, pág. 78</p> <p>Presentación Poster: “Actividad antioxidante de <i>Buddleja globosa</i> medida por su capacidad de atrapar radicales DPPH y de prevenir la oxidación de biomoléculas inducida por ROS”. María Eugenia Letelier M., Víctor González-Lira, Margarita Montoya K. y Dante Miranda W. Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia “Contribuciones de la flora regional a la medicina actual”. México D. F. México. 30 de Noviembre al 2 de Diciembre del 2006. Libro de Resúmenes, página 32.</p> <p>Estas actividades fueron financiadas parcialmente por el proyecto FIA-CD-V-2006-1-A-114.</p>
Eventos de divulgación científica	3	<p>Conferencia: “<i>Buddleja globosa hope</i> utilizada por la medicina nativa principalmente como cicatrizante de heridas y antiinflamatorio”. Primer Simposio Internacional: Materias primas para la Industria Plantas Medicinales y Aromáticas. Puntos críticos y rol de las Universidades organizado por la Universidad Santo Tomás - Escuela de Agronomía, FIA - Ministerio de Agricultura y tuvo lugar en la ciudad de Los Ángeles – VIII– Región – Chile los días 14 y 15 de Noviembre del 2006.</p>

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mei@ciq.uchile.cl

		<p>Seminario de Difusión del Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia. Contribuciones de la flora regional a la medicina actual realizado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago, 26 de Enero de 2007.</p>
Integración a redes de Investigación	2	<p>Laboratorios:</p> <ul style="list-style-type: none">• Dr. Fernando Gable. Anatómo Patólogo. Campus Centro-Sur. Facultad de Medicina. Hospital Clínico San Borja-Arriarán.• Prof. Dante Miranda. Laboratorio Inmuno-Bioquímica. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Olivos 1007 – Independencia – Santiago, Chile – Fono: 978 2885 – Fax: 737 8920

e-mail: mel@ciq.uchile.cl

Impactos en formación

Logro	Número a la fecha	Detalle (Título, grado, lugar, institución)
Pregrado	2	<ul style="list-style-type: none">• Tesis para optar al Título de Médico Veterinario. Escuela de Medicina Veterinaria. Fac. de Ciencias Silvo-gropecuarias. Universidad Mayor. Título de la Tesis: Efecto cicatrizante de un extracto hidro-alcohólico de hojas de <i>Buddleja globosa</i> en piel de ratas Sprague Dawley. Alumno: Rodrigo Esteban Jones Cayazzo.• Tesis para optar al Título de Médico Veterinario. Escuela de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Silvo-Agropecuarias. Universidad Mayor. Título de la Tesis: Efectos de un extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Buddleja globosa</i> sobre la morfología e histología del bazo, el hemograma y el perfil bioquímico en ratas Sprague Dawley. Alumno: Carolina Alejandra López Otárola.
Posgrado	1 Unidad de Investigación	Víctor Manuel González Lira: Estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Título de la Unidad: Actividad antioxidante de extractos naturales determinada por distintos métodos: decoloración de DPPH y protección de lípidos y tioles microsómicos de la oxidación inducida por ROS.
Pasantías	1	Alfredo Molina. Estudiante de Química y Farmacia. Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Título de la Unidad: Inhibición de las actividades enzimáticas biotransformantes de xenobióticos inducida por extractos naturales.
Cursos de capacitación	-----	-----

5. PROBLEMAS ENFRENTADOS

- **Administrativos.** Como académicos no tenemos el conocimiento técnico para elaborar los informes financieros solicitados y la elaboración de estos Informes se nos dificulta.

- **Técnicos.** Como no existen antecedentes bibliográficos acerca de las dosis terapéuticas de preparados naturales a utilizar, debimos crear un protocolo para ello que nos demoró el comienzo de los experimentos *in vivo*.

Por otra parte, Durante el desarrollo del objetivo N°2 (Búsqueda de marcadores químicos) se presento el inconveniente de la rotación del asistente de investigación. Durante el primer tercio trabajo Sylvana Soto Ingeniera Agrónoma, quien hizo todo el estudio bibliográfico y la preparación de los extractos, se retiro al ser aceptada en el programa de doctorado en ciencias agronómicas. Su trabajo fue altamente eficiente y mostró gran autonomía de trabajo. A continuación en su reemplazo se contrato a Paula Acevedo también Ing. Agrónoma, a quien le correspondió iniciar el trabajo de separación de los principios activos, de personalidad mucho más pasiva y con poca iniciativa no se le continuo el contrato, a ella le corresponde el trabajo en TLC. Finalmente se integro en los últimos tres meses Margarita Gutiérrez, Doctora en Química de Productos Bioactivos a quien le correspondió el aislamiento y caracterización de los compuestos aislados. Su incorporación se produjo tarde debido a que estaba concluyendo su programa doctoral. Si bien su trabajo fue eficiente, no tuvo el tiempo suficiente para hondar más en la caracterización de los marcadores químicos, de que por si resultaron muy complejos por la alta polaridad de los compuestos presentes en la hojas de matico

- **Segunda entrega de fondos.** La segunda entrega de fondos de FIA se atrasó al parecer por el cambio de autoridades en FIA y recibimos esos fondos afines de Octubre del 2006.

- **Eventos de difusión no programados en el proyecto.** Se nos invitó a participar en reuniones de difusión no previstas en este proyecto. Postulamos un proyecto de Difusión a FIA el que fue aprobado pero el financiamiento fue parcial.

MEDIDAS TOMADAS PARA ENFRENTAR CADA UNO DE ELLOS

- Los inconvenientes administrativos los enfrentamos internamente solicitando la colaboración de personas con experiencia en estos trámites administrativos y así la coordinadora del proyecto pudo elaborar los informes financieros requeridos por FIA.

- La falta de antecedentes para establecer la dosis a administrar a los animales se solucionó mediante la elaboración de un protocolo que permitiera evaluar el estado general de los animales. Este protocolo implicó las pruebas sanguíneas: hemograma y perfil bioquímico, para lo cual no se solicitaron fondos. Por lo tanto, estos estudios fueron financiados por el Laboratorio de la Prof. María Eugenia Letelier.

- La demora en la entrega de fondos se solucionó con la ayuda de FIA, las entidades participantes de este proyecto y solicitando a los proveedores que nos dieran más plazo para cancelar las facturas.

- La coordinadora del proyecto preparó las presentaciones orales y escritas y los fondos faltantes para nuestra asistencia a estas reuniones de difusión fueron absorbidos por las personas integrantes del proyecto.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- a) Los objetivos propuestos a la fecha se cumplieron.
- b) Los resultados obtenidos aportarán las bases farmacológicas que permitan el desarrollo de nuevos fitofármacos como de tinturas madres.
- c) Se creó la posibilidad de iniciar el trámite para patentar parte de nuestros hallazgos. Más aún, este estudio abrió nuevas posibilidades de patentamiento en el área agronómica, cosmética y de alimentos elaborados. Para esto estamos analizando las posibilidades de solicitar fondos CORFO-FIA.
- d) Los resultados obtenidos darán los antecedentes necesarios para publicar manuscritos de impacto internacional.
- e) Este estudio permitió reunir los antecedentes científicos necesarios para elaborar la monografía de *Buddleja globosa*, trabajo que se ha recientemente comenzado.
- f) Se formó un equipo interdisciplinario que permitió y permitirá abordar globalmente el estudio y desarrollo de nuestras plantas medicinales, favoreciendo así su uso racional, como su comercialización a nivel nacional e internacional sustentada científicamente.