



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES**

**EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANALGÉSICAS,
ANTIINFLAMATORIAS, ANTIOXIDANTES Y
ANTIMICROBIANAS DE LAS HOJAS DE *ARISTOTELIA
CHILENSIS* Y DE SUS POTENCIALES EFECTOS
TÓXICOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

VANESSA ALEJANDRA TORRES ROSAS

**PROFESORA PATROCINANTE
DRA. CARLA DELPORTE V.**

**DIRECTORAS DE MEMORIA
DRA. NADINE BACKHOUSE ERAZO
DRA. CARLA DELPORTE VERGARA**

SANTIAGO, CHILE
2007

A mi madre

"ALGO LE DUELE A LA NEGRA / VINO EL MÉDICO DEL PUEBLO
RECETÓ EPLASTO DEL BARRO / PERO DEL BARRO MÁS NEGRO
QUE LE DIERON A LA NEGRA / SUMO DEL MAQUI DEL CERRO"

Casamiento de negros, Violeta Parra

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos quienes han colaborado en la realización de esta memoria, en especial a la Doctora Carla Delporte, por su gran ayuda, paciencia y dedicación.

A la Doctora Nadine Backhouse por su ayuda y conocimientos entregados, a la profesora Silvia Erazo por su colaboración y apoyo. Al Doctor Hugo Miranda por su ayuda y conocimientos aportados.

Quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos que me han acompañado en el transcurso de mi carrera, en forma especial a Alexis Cornejo por su gran apoyo y amistad.

A mi madre por su cariño y confianza depositados siempre en mí.

A Juan Alberto por su amor y compañía.

A Santiago por el solo hecho de existir y poder amarlo cada día más.

A todos ustedes, muchas gracias.

Esta memoria fue financiada por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) a través del proyecto:

Determinación de las actividades antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de Aristotelia chilensis (maqui). Identificación de los compuestos activos (FIA-ES-C-2005-1-A-040)

Cuya investigadora responsable es la prof. Dra. Carla Delporte Vergara

TABLA DE CONTENIDO

	Página
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II HIPÓTESIS	3
CAPÍTULO III OBJETIVOS	4
3.0 Objetivos generales.....	4
3.1 Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO IV ANTECEDENTES	5
4.0 Clasificación taxonómica.....	5
4.1 Distribución geográfica.....	5
4.2 Descripción botánica.....	5
4.3 Estudios anteriores.....	6
CAPÍTULO V MATERIALES Y MÉTODOS	8
5.0 Estudio anatómico de las hojas de maqui.....	8
5.0.1 Descripción anatómica de las hojas.....	8
5.1 Estudio químico.....	8
5.1.1 Recolección del material vegetal.....	8
5.1.2 Obtención de los extractos, infuso y fracción rica en alcaloides.....	8
5.1.3 Identificación de las familias de compuestos químicos por cromatografía en capa fina (c.c.f.) de los extractos y FADM.....	10
5.2 Estudios farmacológicos <i>in vivo</i>	12
5.2.1 Aspectos éticos a considerar para el trabajo con animales.....	12
5.2.2 Evaluación de la actividad analgésica por vía tópica...	12
5.2.2.1 Ensayo de la formalina en la cola.....	12
5.2.2.2 Ensayo del latigazo de la cola (tail flick).....	13
5.2.3 Evaluación de la actividad analgésica por vía oral.....	15

5.2.3.1	Ensayo de las contorsiones abdominales.....	15
5.2.4	Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía tópica.....	16
5.2.4.1	Ensayo de la inducción de edema en orejas.....	16
5.2.5	Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral.....	17
5.2.5.1	Ensayo del edema plantar inducido por λ-carragenano.....	17
5.2.6	Evaluación de la toxicidad aguda por vía oral y determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀).....	18
5.2.7	Prueba de irritación dérmica a través del Test de Draize.....	20
5.2.7.1	Determinación de la irritación primaria (SPI) e índice de irritación primaria (PII).....	21
5.3	Estudios farmacológicos <i>in vitro</i>	22
5.3.1	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de maqui por el ensayo Bioautografía.....	22
5.3.2	Evaluación de la actividad antioxidante a través del ensayo de la xantino oxidasa.....	24
5.3.3	Evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres a través del ensayo de DPPH.....	26
CAPÍTULO VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.0	Estudio anatómico de las hojas de maqui.....	28
6.0.1	Descripción anatómica de las hojas de maqui.....	28
6.1	Estudio químico.....	28
6.1.1	Rendimiento de los extractos vegetales y FADM obtenidos a partir de las hojas de maqui.....	28
6.1.2	Identificación de las familias de compuestos por c.c.f. de los extractos y FADM.....	29
6.2	Estudio farmacológico <i>in vivo</i>	30
6.2.1	Evaluación de la actividad analgésica por vía tópica....	30

6.2.1.1	Ensayo de la formalina en la cola.....	30
6.2.1.2	Ensayo del latigazo de la cola.....	31
6.2.2	Evaluación de la actividad analgésica por vía oral.....	35
6.2.2.1	Ensayo de las contorsiones abdominales.....	35
6.2.3	Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía tópica.....	36
6.2.3.1	Ensayo de la inducción de edema en orejas.....	36
6.2.4	Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral.....	39
6.2.4.1	Ensayo del edema plantar inducido por λ - carragenano.....	39
6.2.5	Evaluación de la toxicidad aguda y determinación de la DL ₅₀	41
6.2.6	Prueba de irritación dérmica a través del test de Draize.....	43
6.3	Estudio farmacológico <i>in vitro</i>	43
6.3.1	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de maqui por el ensayo Bioautografía.....	43
6.3.2	Evaluación de la actividad antioxidante a través del ensayo de la xantino oxidasa.....	44
6.3.3	Evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres a través del ensayo de DPPH.....	45
CAPÍTULO VII	CONCLUSIONES	48
CAPÍTULO VIII	BIBLIOGRAFÍA	50
GLOSARIO	55
MATERIAL	COMPLEMENTARIO	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Esquema de extracción de <i>Aristotelia chilensis</i>	9
FIGURA 2. Efecto analgésico tópico comparativo de los diferentes extractos de las hojas de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) en el ensayo de la formalina en la cola.....	31
FIGURA 3. Relación concentración - efecto analgésico tópico del EH de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola.....	32
FIGURA 4. Relación concentración - efecto analgésico tópico del EDM de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola.....	33
FIGURA 5. Relación concentración - efecto analgésico tópico del EM de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola.....	33
FIGURA 6. Relación concentración - efecto analgésico tópico de la FADM de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola.....	34
FIGURA 7. Efecto analgésico tópico máximo comparativo de los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola.....	34
FIGURA 8. Efecto analgésico comparativo <i>p.o.</i> de los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (naproxeno sódico) mediante ensayo de las contorsiones abdominales.....	36
FIGURA 9. Efecto antiinflamatorio tópico comparativo frente a AA de los EH, EDM, EM, Infuso, FADM y el fármaco de referencia (nimesulida).....	37
FIGURA 10. Efecto antiinflamatorio tópico comparativo frente a TPA de los EH, EDM, EM, Infuso, FADM y el fármaco de referencia (indometacina).....	38

FIGURA 11. Curva comparativa del cambio de peso de los ratones después de la administración de los EDM y EM y de los animales controles.....	42
FIGURA 12. Gráfico comparativo de la actividad atrapadora de radicales libres de los EH, EDM, EM y del fármaco de referencia (quercetina).....	47

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Evaluación de la irritación primaria de la piel de conejo.....	21
TABLA 2. Categorías de índice de irritación primaria (PII) mediante el Test de Draize.....	22
TABLA 3. Fases móviles de las c.c.f. para el ensayo Bioautografía.....	23
TABLA 4. Microorganismos utilizados para todos los ensayos microbiológicos.....	24
TABLA 5. Protocolo del ensayo de inhibición de la xantino oxidasa.....	25
TABLA 6. Protocolo del ensayo de DPPH.....	26
TABLA 7. Rendimiento de los extractos.....	28
TABLA 8. Identificación de las familias de compuestos químicos por c.c.f. de los extractos y FADM.....	29
TABLA 9. Actividad analgésica vía tópica mediante ensayo de la formalina en la cola de los diferentes extractos de las hojas de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno).....	30
TABLA 10. Comparación de la actividad analgésica vía tópica mediante ensayo latigazo de la cola de los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno).....	32
TABLA 11. Valores de la CE ₂₅ analgésica tópica de los diferentes extractos, FADM y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola.....	35
TABLA 12. Actividad analgésica vía oral mediante el ensayo de las contorsiones abdominales de los extractos de las hojas de maqui y el fármaco de referencia (naproxeno sódico).....	35
TABLA 13. Actividad antiinflamatoria tópica frente a AA de los diferentes extractos y FADM de las hojas de maqui y el fármaco de referencia (nimesulida).....	37
TABLA 14. Actividad antiinflamatoria tópica frente a TPA de los diferentes extractos y FADM de las hojas de maqui y el fármaco de	

referencia (indometacina).....	38
TABLA 15. Actividad antiinflamatoria oral inducida por λ -carragenano de los diferentes extractos, FADM y el fármaco de referencia (naproxeno sódico).....	39
TABLA 16. Registro comparativo de los pesos de los ratones después de la administración <i>p.o.</i> de los EDM y EM para la evaluación de la toxicidad aguda.....	41
TABLA 17. Determinación del índice de irritación primaria (PII).....	43
TABLA 18. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los EH, EDM y EM de las hojas de maqui.....	43
TABLA 19. Evaluación de la actividad inhibitoria de la xantino oxidasa para los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (alopurinol).....	44
TABLA 20. Valores de la CE_{50} en el ensayo de DPPH para los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (quercetina).....	45
TABLA 21. Resultados de la evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres mediante el ensayo de DPPH para los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (quercetina).....	45

RESUMEN

Evaluación de las actividades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de *Aristolelia chilensis* y de sus potenciales efectos tóxicos

Aristolelia chilensis (Mol.) Stuntz, Elaeocarpaceae, de nombre vulgar maqui, es una especie vegetal autóctona que crece en terrenos húmedos, y se distribuye entre las IV y XI Región en ambas cordilleras, en el Valle Central y en el Archipiélago de Juan Fernández. En relación a los usos del maqui, los antecedentes bibliográficos nos sugieren que las hojas de esta especie podrían presentar efectos antiinflamatorios, analgésicos y antimicrobianos, lo que nos motivó a investigar en esta memoria los efectos farmacológicos de las hojas de maqui y de esta forma ampliar la información científica de esta especie. Para alcanzar estos objetivos, se recolectaron las hojas de maqui en el Campus Juan Gómez Millas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Después de secar y moler las hojas se prepararon los diferentes extractos agotando el material vegetal en forma sucesiva con hexano, diclorometano y metanol.

Cada extracto fue concentrado y llevado a sequedad. Los rendimientos fueron los siguientes: extracto hexánico (**EH**) 1,3 %, extracto de diclorometano (**EDM**) 6,7 % y extracto metanólico (**EM**) 9,9 %; además se preparó un **infuso** al 10% con un rendimiento de 25%. Desde el EDM se obtuvo una fracción rica en alcaloides (**FADM**) con un rendimiento del 10,9 %. Se identificaron las familias de compuestos presentes en los diferentes extractos mediante cromatografías en capa fina y utilizando distintos reactivos reveladores. Es así como en el EM e infuso, los principales metabolitos secundarios presentes fueron los compuestos fenólicos. Los alcaloides fueron detectados en los EDM, EM, FADM e infuso, siendo el EM el extracto que contiene una mayor cantidad de estos compuestos nitrogenados. El EDM concentró la mayor cantidad de compuestos del tipo terpenoides. En el infuso se pudo observar una cantidad pequeña de cumarinas. Los diferentes extractos fueron sometidos a las evaluaciones farmacológicas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los resultados obtenidos en los estudios *in vivo* demostraron que los extractos que presentaron mayor actividad analgésica tópica frente al ensayo del latigazo de la cola en ratones, fueron los EH (46,5%), EM (55,2%) y la FADM (58,2%), éstos fueron

similares al efecto del fármaco de referencia (ibuprofeno); en el ensayo de la formalina en la cola los extractos más activos como analgésicos tópicos fueron el EM (74,1%), EDM (59,7%) e infuso (55,2%). Respecto de los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad analgésica *p.o.* mediante el ensayo de las contorsiones abdominales en ratones, los extractos que exhibieron mayor efecto fueron EH y EDM, ambos con un 89,2 % de efecto, éste fue superior al efecto máximo alcanzado por el fármaco de referencia (naproxeno sódico). En relación a la evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica en ratones frente a TPA, los más activos fueron EM (66%) y EDM (63,9%), sin embargo estos efectos fueron menores al efecto máximo del fármaco de referencia, indometacina (92,9%), en cambio frente a la inflamación tópica inducida por AA, el más activo fue el infuso (56,2%), cuyo efecto fue superior al efecto máximo del fármaco de referencia, nimesulida (48,8%). Los diferentes extractos no presentaron efectos antiinflamatorios por vía oral frente al edema plantar inducido por λ -carragenano en cobayos. Respecto de los estudios de toxicidad aguda, los EDM y EM no produjeron muerte a los animales de experimentación, no se presentaron efectos tóxicos ni alteraciones de los diferentes órganos. Los ratones subieron de peso en forma similar a los animales controles (animales no tratados). Además, ambos extractos no exhibieron edema ni irritación dérmica frente al test de Draize en conejos, siendo el índice de irritación primaria (PII) en la zona con y sin abrasión igual a cero tanto para el EDM y EM. Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el ensayo Bioautografía demostraron que los EH, EDM y EM presentaron un débil efecto antimicrobiano sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y no presentaron actividad antifúngica. La actividad antioxidante fue investigada debido a su relación con la actividad antiinflamatoria. El EM exhibió significativas actividades como inhibidor de la enzima xantino oxidasa (62,7%) así como atrapador de radicales libres (CE_{50} 9,7 $\mu\text{g/mL}$) en el ensayo de decoloración del radical DPPH. Estos efectos antioxidantes fueron menores a los de los fármacos de referencia alopurinol cuyo efecto máximo fue de (93,7 %) y quercetina (CE_{50} 3,6 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente.

Finalmente podemos concluir que los resultados de los estudios pre-clínicos obtenidos con las hojas de maqui, proporcionan un respaldo a los usos de las hojas como analgésica y antiinflamatoria, exhibiendo además efecto antioxidante.

SUMMARY

Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory, free radical scavenger and antimicrobial properties of *Aristolelia chilensis* leaves and its potencial toxic effects

Aristolelia chilensis (Mol.) Stuntz, Elaeocarpaceae, vernacular name “maqui”, is a native species growing in humid lands between the IV and XI Region, in the Central Valley and the Archipelago of Juan Fernández. According to the folk medicinal use of this species it suggest that the leaves could present anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial effects, these led us has to evaluate the pharmacological effects of maqui leaves and to scientifically support its therapeutic properties.

The maqui leaves were collected at the Science Faculty (Campus Juan Gómez Millas) of the University of Chile. After dried and ground, the leaves were extracted successively with solvents of increasing polarity hexane, dichloromethane and methanol. Each extract was concentrated to dryness, yielding hexanic extract (**EH**) 1.3%, dichloromethane extract (**EDM**) 6.7% and methanolic extract (EM) 9,9%. Also an infusion at 10% was prepared yielding 25% w/w after drying. From the EDM a rich in alkaloids fraction was obtained (**FADM**), with a yield of 10.9%.

Different chemical families were identified in the different extracts by means of thin layer chromatography (TLC) and using different developing reagents. Phenolic compounds were visualized in the EM and infusion. Alkaloids were detected in the EDM, EM, FADM and infusion, being especially abundant in the EM extract. The EDM concentrated the highest amount of terpenoids. Also a small amount of coumarins were observed in the infusion. The different extracts were subjected to the *in vivo* and *in vitro* pharmacological evaluations.

The EH, EM and the FADM extracts showed the highest analgesic topic effect in the tail flick assay in mice (46.5%, 55.2%, 58.2% respectively), similar to the reference drug (ibuprofen); in the formalin assay in the mice tail, the most active extracts were the EM (74,1%), EDM (59,7%) and infusion (55,2%). Among *in vivo p.o* assays, analgesic activity determined by the writhing test in mice, showed that the most active extracts were EH and EDM, both with 89,2 effect%, higher to the maximum effect reached by the reference drug (sodium naproxen). in relation to the evaluation of the

topical anti-inflammatory activity in mice against TPA edema induction, the most active were EM (66%) and EDM (63,9%), however these effects were smaller than the maximum effect of indomethacin used as reference drug (92,9%). By the other hand in topical inflammation induced by AA, the most active was the infusion (56.2%) with an effect superior to the maximum effect of nimesulide (reference drug) (48,8%). The different extracts did not present anti-inflammatory effects *p.o.* in the λ -carrageenan induced edema in guinea pigs.

When evaluating the acute toxicity studies, the EDM and EM extracts produced no death in the experimental animals, no toxic effects; neither alteration of the different organs was presented. Mice weight increased in similar form to control animals (not treated). Also, both extracts did not exhibit edema neither dermal irritation in the Draize test in rabbits, reaching a primary irritation index (PII) with and without abrasion, similar to zero for both EDM and EM extracts.

The results of the antimicrobial evaluation by means of the bioautography assay, demonstrated that EH, EDM and EM presented weak effect against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and did not present antifungal activity.

The antioxidant activity was investigated due to its relationship with inflammatory process. The EM exhibited significant activities as inhibitor of the xanthin oxidase enzyme (62.7%) as well as free radicals scavenger activity (CE₅₀ 9.7 $\mu\text{g/mL}$) in the DPPH method. These effects were smaller to the reference drugs activities alopurinol whose maximum effect was 93,7% and quercetin (CE₅₀ 3.6 $\mu\text{g/mL}$) respectively.

Finally we can conclude that the results of the pre-clinical studies obtained with the maqui leaves, provide a support to the uses of the leaves as analgesic and anti-inflammatory, also exhibiting antioxidant effect.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

El uso de preparados de origen vegetal se remonta a la época prehistórica, y actualmente siguen siendo muy utilizados por la medicina folclórica, medicina que existe en todas las culturas. En forma poco frecuente la planta entera tiene valor medicinal; normalmente los compuestos útiles se concentran en alguna de sus partes como por ejemplo: hojas, semillas, flores, cortezas y raíces (Wichtl y Antón, 2003).

Las formas de aplicación son variadas; frecuentemente las especies vegetales a las cuales se les atribuyen propiedades medicinales son empleadas por parte de la medicina folclórica por vía oral en forma de infusión y tinturas. Las formas de aplicación tópica son los emplastos y cataplasmas. Menos frecuente es la utilización de la vía aérea, que consiste por ejemplo en inhalar el humo de la combustión del material vegetal (Muñoz “et al”, 1981).

Frecuentemente la investigación de las propiedades terapéuticas de una especie vegetal se basa en sus usos, investigando las propiedades que le atribuye la medicina folclórica e identificando los principios activos.

La industria farmacéutica utiliza en un gran porcentaje extractos estandarizados química y farmacológicamente, es decir extractos de los cuales se conoce su actividad farmacológica y el contenido de principios activos. A partir de éstos, se desarrollan fitofármacos o productos farmacéuticos cuyos ingredientes activos son exclusivamente, las preparaciones a base de drogas vegetales (puras o mezcladas). Pero también se utilizan sustancias puras de origen vegetal.

La investigación de las propiedades medicinales de una planta es una labor compleja, por este motivo es que el Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, realiza constantemente trabajos

de investigación que permitan respaldar científicamente el uso folclórico de plantas e identificar los compuestos químicos responsables de la actividad farmacológica (Delporte “et al”, 2007, 2005, 2003 y 1998; Backhouse “et al”, 1994).

Es así como fue seleccionada para ser estudiada la especie *Aristotelia chilensis*, Elaeocarpaceae, más conocida como "maqui", "clon", "maquie", "queldron" o "koelon". La familia Elaeocarpaceae está conformada por 10 géneros y alrededor de 400 especies, con distribución en regiones tropicales y templadas del mundo con excepción del continente africano (Muñoz, 1966).

El maqui es un árbol originario de Chile y en la naturaleza es una especie que invade los terrenos abandonados, formando extensos bosques. La mayoría de los estudios previos relacionados con esta especie, son referidos a los frutos, los que son explotados económicamente como alimento y fuente de colorantes (Miranda-Rottman “et al”, 2002).

En cuanto a las propiedades atribuidas por la medicina folclórica, la infusión de las hojas de maqui se utiliza tradicionalmente para calmar el dolor de garganta y la inflamación de las amígdalas. Con sus hojas se preparan cataplasmas para el dolor de riñones y los dolores de espalda. A las hojas secas pulverizadas se les atribuyen propiedades cicatrizantes de heridas o quemaduras, para úlceras y otras lesiones de la boca. Los frutos son utilizados como antidiarreicos y en disentería, como astringentes, para el tratamiento de las hemorroides y para facilitar el parto, además de curar diversas heridas (Muñoz “et al”, 1981).

Considerando los antecedentes anteriormente señalados, en la presente memoria de título estudiaremos las propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes además de los potenciales efectos tóxicos de las hojas de *Aristotelia chilensis*.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS

Las hojas de *Aristolelia chilensis* presentan efectos analgésicos, antiinflamatorios, antimicrobianos y antioxidantes.

Esta hipótesis se basa en las propiedades atribuidas a esta especie por la medicina folclórica (Muñoz “et al”, 1981).

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.0 Objetivos generales

Proporcionar un respaldo científico al uso de las hojas de maqui utilizadas por la medicina folclórica como analgésica y antiinflamatoria.

Demostrar las propiedades antibacterianas y antioxidantes.

3.1 Objetivos específicos

Descripción anatómica de las hojas que permitan su identificación cuando el material vegetal esté fracturado o .pulverizado

Obtener los extractos a partir de las hojas de *Aristotelia chilensis* para su evaluación farmacológica.

Evaluar *in vivo* la actividad analgésica y antiinflamatoria por vía oral y tópica de los diferentes extractos y fracciones de éstos.

Evaluar *in vivo* los potenciales efectos tóxicos por vía oral de los extractos farmacológicamente más activos.

Evaluar *in vivo* el potencial de irritación dérmica de los extractos farmacológicamente más activos.

Evaluar las actividades antibacteriana y antimicótica de los diferentes extractos.

Evaluar la acción antioxidante y atrapadora de radicales libres de los diferentes extractos.

CAPITULO IV ANTECEDENTES

4.0 Clasificación taxonómica

FAMILIA	: Elaeocarpaceae
GÉNERO	: <i>Aristotelia</i>
ESPECIE	: <i>Aristotelia chilensis</i>
NOMBRE VULGAR	: maqui, clon, maquie, queldron, koelon.
SINÓNIMOS	: <i>Cornus chilensis</i> Mol.; <i>Aristotelia macqui</i> L'Hér.; <i>A. macqui</i> L'Hér. var. <i>andina</i> Phil.; <i>A. macqui</i> L'Hér. var. <i>alpestris</i> Reiche; <i>A. macqui</i> L'Hér. var. <i>leucocarpa</i> Dimitri; <i>A. glandulosa</i> Ruiz & Pav.

4.1 Distribución geográfica

Maqui se encuentra desde la IV a la XI región, hasta los 2.500 metros s.n.m., también en el archipiélago de Juan Fernández y Argentina. Habita en lugares con suelo rico en materia orgánica, siendo una especie colonizadora de lugares abiertos. Muchas veces forma comunidades puras las que reciben el nombre de macales. Frecuentemente se encuentra en los Tipos Forestales: Esclerófilo, Palma Chilena, Roble-Hualo, Roble-Raulí-Coihe, Siempreverde y Ciprés de la Cordillera (Muñoz "et al", 1981)

4.2 Descripción botánica

El maqui es un árbol dioico, pequeño, alcanza de 4 a 5 m de altura, siempreverde, de tronco dividido, ramas abundantes, delgadas y flexibles, de corteza

lisa que se desprende en largas tiras fibrosas.

Sus hojas son perennes, simples, opuestas, decusadas, péndulas, de forma oval-lanceolada, con borde aserrado, glabras, de textura coriácea, con nervadura marcada y provista de un pecíolo largo y rojizo.

Flores unisexuales por aborto, axilares, reunidas en corimbos cortos, cáliz campanulado formado por 5 o 6 sépalos fusionados, corola formada por 5 o 6 pétalos libres de color amarillento, alternos a los lóbulos del cáliz. Las masculinas con 10-15 estambres y un estilo rudimentario, mientras que las femeninas poseen un ovario grueso con un estigma dividido en tres rodeado por estaminodios.

El fruto es una baya negra brillante de 4-6 mm de diámetro, que en su interior tiene 4-8 semillas angulosas de 3x2 mm.

4.3 Estudios anteriores

En estudios anteriores, se demostró que las hojas de maqui presentan propiedades antibacterianas frente a *Sarcinea lutea* y *Staphylococcus aureus*. Además se evidenció la presencia de alcaloides indólicos e isoquinolínicos; a los alcaloides indólicos se les han demostrado efectos sobre la musculatura lisa (Silva “et al”, 1992 y 1995; Bittner, 1978; Watson, 1989; Céspedes, 1993). Los frutos son comestibles y utilizados como fuente de colorantes antocianicos y se les han demostrado propiedades antioxidantes, además de ser utilizados como antidiarreicos, astringentes y en disentería. También son utilizados como antihemorroidal, para facilitar el parto, y también para curar heridas (Escribano-Bailón “et al”, 2006; McDonald, 1977; Muñoz “et al”, 1981; Sansana, 2001; Rodríguez, 2004; Miranda-Rottman “et al”, 2002). El contenido de pigmentos del tipo antocianinas de los frutos fue determinado por Escribano-Bailón “et al” (2006) como se muestra a continuación:

Antocianinas del fruto del maqui. Contenidos (expresados en equivalentes en delfinidino 3- glucósido) e identidades propuestas de las antocianinas detectadas en los frutos de *Aristotelia chilensis*.

Antocianinas	cantidad (mg/100g)
Delfinidin-3- sambubioside-5-glucósido	46,4 ± 0,1
Delfinidin-3,5-diglucósido	23,7 ± 0,2
Cyanidin-3- sambubioside-5-glucósido	18,7 ± 0,2
Cyanidin-3,5-diglucósido	
Delfinidin-3- sambubioside	14,2 ± 0,1
Delfinidin-3-glucósido	17,1 ± 0,2
Cyanidin-3- sambubioside	8,9 ± 0,04
Cyanidin-3-glucósido	8,6 ± 0,05
Antocianinas totales	137,6 ± 0,04

CAPITULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

5.0 Estudio anatómico de las hojas de maqui

5.0.1 Descripción anatómica de las hojas

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

5.1 Estudio químico

5.1.1 Recolección del material vegetal

Las hojas de *Aristotelia chilensis* fueron recolectadas en el mes de diciembre del año 2005 en el Campus Juan Gómez Millas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, guardando un testigo en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (SQF 22257).

5.1.2 Obtención de los extractos, infuso y fracción rica en alcaloides

Las hojas de *Aristotelia chilensis* se secaron a temperatura ambiente y posteriormente fueron molidas. Se pesaron 1.105 gramos de hojas secas las cuales se maceraron en disolventes de polaridad creciente para así realizar las extracciones sucesivas del material vegetal.

Finalmente los extractos fueron secados para eliminar totalmente el disolvente y posteriormente someterlos a los diferentes ensayos farmacológicos. Las extracciones se realizaron hasta total agotamiento dejando entre cada una secar las hojas antes de adicionar el siguiente disolvente. Los disolventes utilizados para obtener los diferentes extractos fueron los siguientes de acuerdo al orden de polaridad creciente: hexano,

diclorometano y metanol.

Para obtener el infuso al 10 %, a 200 gramos de hojas secas de *A. chilensis* pesadas y molidas, se le adicionaron 2000 mililitros de agua destilada hirviendo y luego se maceró durante 30 minutos, posteriormente fue filtrado y secado en corriente de aire tibio y estufa a presión reducida, su composición química fue determinada utilizando diferentes reactivos reveladores.

El EDM (45 g) fue fraccionado por columna de SEPHADEX (LH-20) para sacar principalmente la clorofila. Se eluyó la columna con 2 litros de una mezcla de hexano-diclorometano-metanol (5:4:1), obteniéndose 45 fracciones de 100 mL. Las fracciones de la 20 a la 30 y que dieron la reacción de Dragendorff positivo, se reunieron en una y se le denominó FADM. La fracción FADM está siendo fraccionada en columna de silicagel G para aislar los alcaloides.

FIGURA 1. Esquema de extracción de *Aristolelia chilensis*

FIGURA 1a. Esquema de extracción desde las hojas secas y molidas

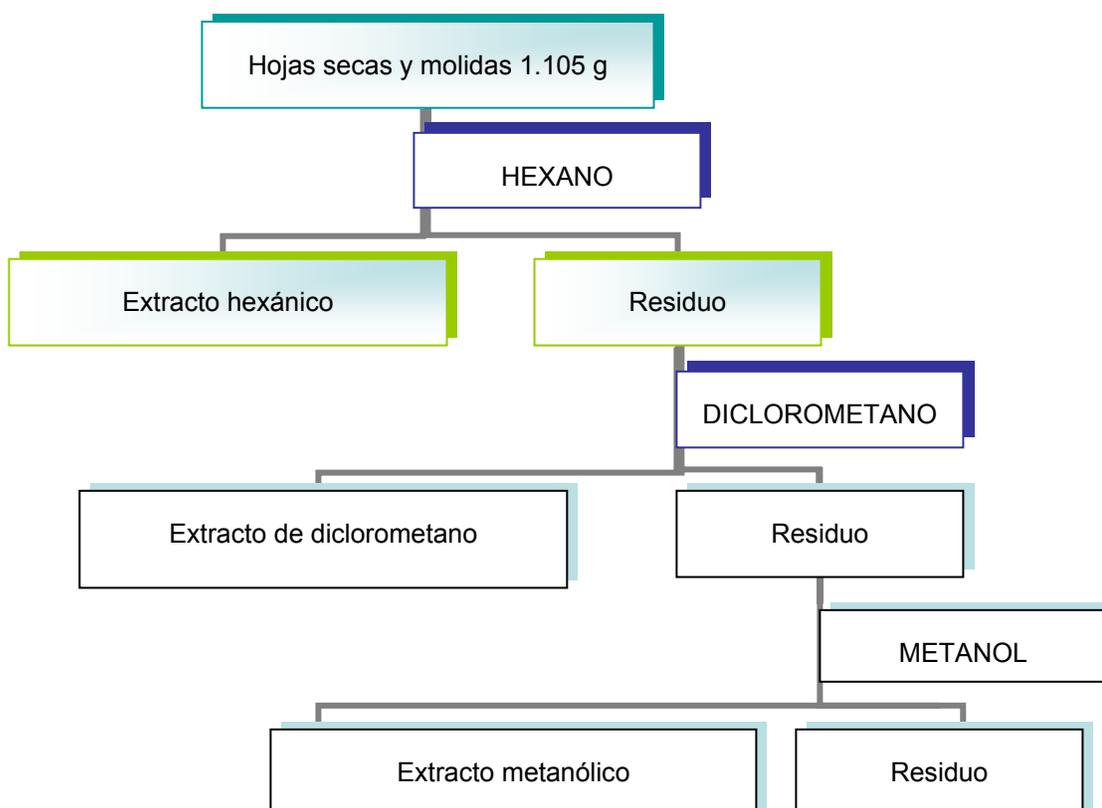
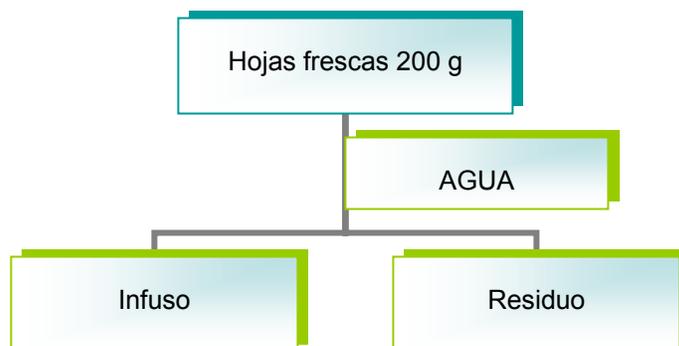
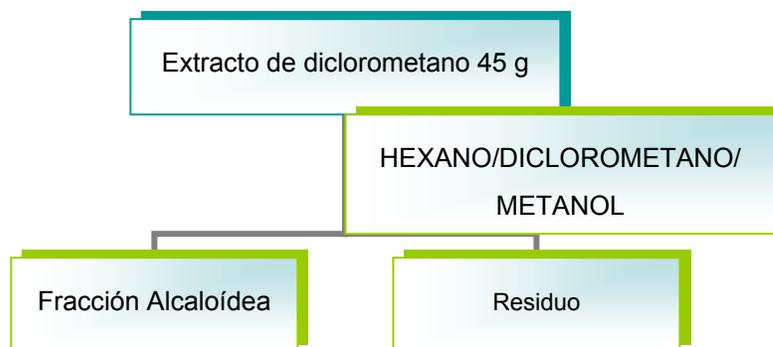


FIGURA 1b. Esquema de extracción desde las hojas frescas**FIGURA 1c. Esquema de extracción desde el EDM**

5.1.3 Identificación de las familias de compuestos químicos por cromatografía en capa fina (c.c.f.) de los extractos y FADM

Con el objetivo de identificar los principales grupos químicos presentes en los diferentes extractos y FADM, se empleó la técnica de c.c.f., utilizando cromafolios de aluminio con gel de sílice G-60 como adsorbente (Merck) y distintos sistemas de disolventes como fase móvil, según la polaridad de los extractos y de la FADM. Una vez desarrolladas las placas, se visualizan en una lámpara UV a 254 y 366 nm y posteriormente se revelan con diferentes reactivos de coloración para observar e identificar las distintas familias de compuestos químicos.

Los reactivos reveladores utilizados fueron:

- Reactivo p-anisaldehído sulfúrico: este reactivo se preparó con 0,5 mL de anisaldehído, 10 mL ácido de acético glacial, 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado: La placa rociada con este reactivo fue calentada a 100°C por 5-10 minutos y observada bajo luz visible. Este reactivo permite detectar la presencia de terpenos (aceites esenciales) y triterpenos, por medio de la aparición de coloraciones que varían desde el azul al violeta (Wagner "et al", 1984)

- Reactivo Liebermann-Burchard: este reactivo se preparó con 5 mL de anhídrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 50 mL de etanol absoluto. La placa rociada con este reactivo fue calentada a 100°C por 5-10 minutos y observada bajo luz visible. Se emplea para la observación de distintos compuestos orgánicos como triterpenos (color morado) y esteroides cuya coloración varía con el tiempo desde rosado al verde y posteriormente pardo (Merck, 1972)

- Reactivo NP/PEG: Este reactivo se empleó para detectar compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides y sus glicósidos. Consiste en una mezcla de difenilboriloxietilamina (NP) y polietilenglicol etanólico 4000 (PEG), en una razón de (5:4). Inmediatamente después de rociar la placa se observó, bajo luz UV a 366 nm. Los flavonoides presentan una intensa fluorescencia de colores que varían entre el amarillo, el anaranjado y el verde y los ácidos fenólicos exhiben fluorescencia blanca brillante.

- Vapores de amoníaco: Estos permiten identificar flavonoides y cumarinas, las que se caracterizan por presentar fluorescencia a la luz UV a 366 nm (Mabry "et al", 1970).

- Reactivo Dragendorff: este reactivo está constituido por yoduro doble de bismuto y potasio y permite la detección de alcaloides y aminas cuaternarias. Los alcaloides tienen la capacidad de combinarse con el bismuto y el potasio, formando sales dobles que se visualizan por la aparición de una coloración anaranjada (Merck, 1972)

5.2 Estudios farmacológicos *in vivo*

5.2.1 Aspectos éticos a considerar para el trabajo con animales

En virtud al trato humanitario y mitigador del dolor de los animales utilizados en esta investigación, se consideran las “Normas Internacionales en Investigación Biomédicas que involucra el uso de animales”. Esta reglamentación ha sido elaborada por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias médicas en Ginebra (Boletín Oficina Sanitaria Panamericana, 1986), y son aplicadas por la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), unidad en donde se desarrollaron los ensayos farmacológicos.

5.2.2 Evaluación de la actividad analgésica por vía tópica

5.2.2.1 Ensayo de la formalina en la cola

Este ensayo tiene como objetivo evaluar la analgesia vía tópica de los distintos extractos de *Aristolelia chilensis*, para este propósito se utilizaron ratones de la cepa CF-1 de ambos sexos, entre 20 a 25 g de peso y de edad de 30 a 35 días de la Unidad de pruebas Biológicas del I.S.P.

En todos los casos los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 horas previas al ensayo con agua *ad libitum* y a una temperatura controlada de 20° C.

Para realizar el ensayo, los animales fueron seleccionados aleatoriamente. Se utilizaron 10 animales, de los cuales 8 fueron tratados con la muestra y 2 como controles, a los que se les aplicó sólo el agente algésico. Para cada ensayo se tomaron 2 controles hasta formar un “pool” de 16, número que fue utilizado para calcular los efectos farmacológicos

Se ha descrito que el ensayo de la formalina en la cola presenta solamente la fase I de dolor, lo cual significa que se observa solamente algesia en los primeros 5 minutos y que no hay una segunda fase, caracterizada por la expresión de mecanismos proinflamatorios, a diferencia de lo que se observa al inyectar formalina i.d en la pata, donde si se aprecian las dos fases anteriormente descritas. Este ensayo identifica principalmente analgésicos periféricos (Kolesnikov “et al”, 2004; Delporte “et al”, 2007).

La muestra en estudio se aplicó vía tópica, introduciendo la cola, en un tubo de

ensayo que contiene la solución del extracto en DMSO al 5%, durante 3 minutos. Se sacó la cola, se secó y se le inyectó el agente algésico (20 μ L de solución de formalina al 10% p/v en agua estéril).

Posterior a la inyección se procedió a contar el tiempo máximo durante el cual el animal se lame la cola (Kolesnikov “et al”, 2004).

Para contabilizar el tiempo de lamidas los ratones se dispusieron en una cámara de vidrio de 25 x 25 cm con espejos para optimizar la observación. El fármaco de referencia fue ibuprofeno.

Tratamiento estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente por el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativos para un $p \leq 0,05$.

El porcentaje de efecto analgésico se calculó en base a las medianas del tiempo de lamidas del grupo tratado y del grupo control mediante las siguientes ecuaciones:

$$\%D = \frac{\text{Med Tlat M} \times 100}{\text{Med Tlat C}}$$

Ecuación 5.1: Porcentaje de dolor.

$$\%AT = 100 - \%D$$

Ecuación 5.2: Porcentaje de efecto analgésico vía tópica mediante el ensayo de la formalina en la cola

Donde:

%D porcentaje dolor; **Med Tlat C** mediana del tiempo de lamidas del grupo control; **Med Tlat M** mediana del tiempo de lamidas de animales tratados; **%AT** porcentaje efecto analgésico

5.2.2.2 Ensayo del latigazo de la cola (tail flick)

En este ensayo se utilizaron grupos de 6 ratones de la cepa CF-1 de ambos sexos, entre 28 ± 2 g, los cuales son ambientados a las condiciones del laboratorio dos horas previas al ensayo. Este ensayo identifica principalmente los analgésicos que

actúan a nivel central. Se indujo un dolor agudo térmico mediante la aplicación de radiaciones I.R. en la cola del ratón en el punto de su incidencia. Se utilizó un algiesómetro (Ugo Basile, Italia), el que mide el tiempo que el animal es capaz de soportar el calor (tiempo de latencia), lo que es proporcional al efecto analgésico de la muestra (Miranda *“et al”*, 2003). Se determinaron y compararon los valores de los tiempos de latencia de los animales sin aplicar la muestra en estudio y después de aplicar la muestra (ensayo pareado). Los extractos y la FADM fueron aplicados disueltos en DMSO, con este fin se sumergió la cola del animal en la solución por un tiempo de 3 minutos y posteriormente, se esperó 5 minutos antes de realizar la algiesometría. Para determinar si el efecto analgésico era dependiente de la concentración se construyeron curvas concentración-respuesta de las muestras administradas, las cuales se ensayaron a las concentraciones de 1,25; 2,5; 5 y 10 % p/v para los EH, EDM y EM. La FADM fue evaluada a las siguientes concentraciones 0,125; 0,25; 0,5 y 1% p/v.

Tratamiento estadístico

La significancia estadística entre los grupos fue calculada por el test de student. Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. La concentración que produce un 25 % del efecto máximo, se calculó mediante análisis de regresión lineal de los cuadrados mínimos (Miranda *“et al”*, 2003). El fármaco de referencia fue ibuprofeno al 5%.

Los resultados fueron expresados como la diferencia en el tiempo de latencia (media \pm S.E.M.) entre: **Lat 1** o media de las dos lecturas de los animales antes de aplicar la muestra (controles) y **Lat 2** o tiempo de latencia experimental (media de dos lecturas de los animales después de aplicar la muestra), datos con los cuales se calculó el MPE% (Maximun Possible Effect) mediante la siguiente ecuación:

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

Ecuación 5.3: Porcentaje del efecto máximo de analgesia vía tópica mediante el ensayo del latigazo de la cola

Donde:

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

5.2.3 Evaluación de la actividad analgésica por vía oral

5.2.3.1 Ensayo de las contorsiones abdominales

Se utilizaron ratones de la cepa CF1, de ambos sexos con un peso de 28 ± 2 g. Los extractos fueron administrados mediante una sonda gástrica en dosis de 200 mg/kg en goma arábica salina. Los animales tratados fueron 8 y dos controles, éstos últimos fueron incorporados a un pool hasta completar 16 animales controles.

Transcurridos 60 min de la administración de la muestra, los animales fueron inyectados vía i.p. con 0,5 mL/25 g ratón de ácido acético al 0,6 %. El número de contorsiones fue contabilizado luego de 5 minutos de la administración del ácido acético y durante un intervalo de 5 min (Delporte “et al”, 2007).

Se describe como contorsión, a la contracción de los músculos abdominales, acompañados por una elongación del cuerpo y extensión de las patas traseras. El fármaco de referencia fue naproxeno sódico a dosis de 12,5 mg/kg.

Tratamiento estadístico

La significancia estadística de los resultados fue calculada mediante el test método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973). Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Los resultados son expresados como % de efecto analgésico oral \pm S.E.M. La actividad antinociceptiva fue calculada comparando la mediana del número de contorsiones de los animales tratados con respecto de la mediana de los animales controles, los cuales sólo recibieron el vehículo (goma arábica salina).

$$\% \text{ AO} = 100 - (\text{c.m}/\text{c.c}) * 100$$

Ecuación 5.4: Porcentaje de analgesia oral por el ensayo de las contorsiones abdominales

Donde:

%AO porcentaje analgesia vía oral; **c.m** mediana de las contorsiones de los animales tratados; **c.c** mediana de las contorsiones de los animales controles

5.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía tópica

5.2.4.1 Ensayo de la inducción de edema en orejas

El ensayo se realizó utilizando dos tipos de agente inflamatorio; ácido araquidónico (AA) y 12-miristato-13-acetato forbol (TPA), los cuales al ser aplicados localmente producen una reacción inflamatoria aguda caracterizada por aumento de la permeabilidad vascular, edema e influjo celular, diferenciándose en el tiempo de acción y mediadores químicos involucrados en los diferentes procesos (Lloret y Moreno, 1995; De Young “et al”, 1989).

Sobre la oreja derecha del ratón se aplicó la muestra en estudio a la dosis de 3 mg/oreja para los tres extractos y 1 mg/oreja para la FADM, aplicando 10 μ L con una micropipeta en la cara externa y otros 10 μ L en la cara interna de la oreja; de igual forma se procedió en la oreja izquierda, pero aplicando solo el vehículo utilizado (Delporte “et al”, 2003). Después de 5 min y de la forma ya descrita se aplicó el agente inflamatorio (AA o TPA) en la oreja derecha y en la izquierda el vehículo (Delporte “et al”, 2003).

Pasado el tiempo de inflamación máxima (4 ½ horas en el ensayo con TPA y 1 hora en el ensayo con AA), los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a cortar ambas orejas con un sacabocados de 6 mm de diámetro, obteniendo así porciones uniformes. Éstas fueron pesadas para obtener por diferencia de peso entre ambas, el peso del edema producido. Para calcular el efecto se comparó el edema desarrollado por los animales tratados con el edema de los 16 animales controles.

El vehículo utilizado para las muestras, así como también para ambos agentes inflamatorios fue acetona, la que no interfiere en el proceso de inflamación.

Tratamiento estadístico

La significancia de los resultados fue calculada mediante el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativos para un $p \leq 0,05$. Los resultados son expresados como el % de efecto \pm S.E.M .

La actividad antiinflamatoria tópica de cada muestra se obtuvo comparando la mediana de los edemas desarrollados por los animales tratados y controles.

El porcentaje de efecto se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%EAIT = \frac{(ODC-OIC) - ((ODM-OIM) * 100)}{(ODC-OIC)}$$

Ecuación 5.5: Porcentaje de inflamación tópico por edema en oreja

Donde:

%EAIT porcentaje de efecto antiinflamatorio vía tópica; **(ODC-OIC)** mediana de la diferencia de los pesos de las orejas derecha e izquierda de los animales controles; **(ODM-OIM)** mediana de la diferencia de los pesos de las orejas derecha e izquierda de los animales que recibieron la muestra.

El AA fue aplicado a la dosis de 2mg/ 20µL/ oreja y el fármaco utilizado como referencia fue nimesulida, cuyo efecto máximo fue de 48,8% a la dosis de 1mg/ 20µL/ oreja.

El TPA fue aplicado a la dosis de 5µg/ 20µL/ oreja. El fármaco de referencia fue indometacina cuyo efecto máximo fue de 92,9% a la dosis de 0,5mg/ 20µL/ oreja.

5.2.5 Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral

5.2.5.1 Ensayo del edema plantar inducido por λ-carragenano

La actividad antiinflamatoria vía oral de los EH, EDM, EM y FADM, se determinó mediante el método del edema plantar inducido por λ-carragenano. La dosis a evaluar para cada extracto fue de 200 mg/kg y para la FADM fue de 100 mg/kg.

Se utilizaron cobayos cepa Pirbright de E.E.U.U, de ambos sexos, de 2 a 4 semanas de edad con un peso aproximado de 250 g. Previo al estudio se mantuvieron en ayunas por 24 horas con agua *ad libitum*, a una temperatura entre 18-20 °C. Se trabajó con 10 animales como grupo tratado y 2 como controles. A los animales del grupo tratado se les administraron los extractos utilizando como vehículo una solución de goma arábica salina al 5%, mientras que al grupo control se le administró solamente el vehículo.

Para la administración *p.o* se utilizó una sonda de alimentación gástrica de 6 french. El volumen administrado por vía oral tanto de la muestra como del vehículo fue de 1 mL.

Al iniciar el ensayo se midió en un pletismómetro Ugo Basile (3 veces) el volumen inicial de la pata de cada animal previamente marcada y se calculó el

promedio de estos tres valores.

Transcurrida una hora de la administración para ambos grupos, se procedió a inducir el edema plantar, para lo cual se inyectó 0,1 mL de la solución de λ -carragenano por vía s.c. al 1% en solución salina estéril, en la aponeurosis plantar, y al cabo de tres horas se midió el volumen final (3 veces) de la pata de cada animal (Backhouse "et al", 1994).

El fármaco de referencia utilizado fue naproxeno sódico cuyo efecto máximo fue de 54,6% a la dosis de 4 mg/kg.

Tratamiento estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente por el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativos para un $p \leq 0,05$. Los resultados son expresados como % de efecto antiinflamatorio oral \pm S.E.M.

Para determinar la actividad antiinflamatoria oral, se calculó la mediana del %I de las patas de los animales tratados (**Im**) y se comparó con la mediana del %I de los animales controles (**Ic**), como se muestra en las ecuaciones descritas a continuación.

$$\%I = (V_f - V_i) / V_i \times 100$$

Ecuación 5.6: Porcentaje de inflamación mediante ensayo del edema plantar

$$\%EAIO = (I_c - I_m) / I_c \times 100$$

Ecuación 5.7: Porcentaje de efecto antiinflamatorio vía oral mediante ensayo del edema plantar

Donde:

%I porcentaje de inflamación; **Vf** volumen final de la pata del animal; **Vi** volumen inicial de la pata del animal; **%EAIO** porcentaje de efecto antiinflamatorio vía oral; **Ic** mediana del % de inflamación de los animales controles; **Im** mediana del % de inflamación de los animales tratados

5.2.6 Evaluación de la toxicidad aguda por vía oral y determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

Se evaluó la toxicidad aguda de los EDM y EM ya que fueron los extractos que

presentaron la mayor actividad farmacológica. El número de animales (hembras y machos) para cada ensayo fue entre 6 y 8 para el grupo tratado y 6 animales para el grupo control. La dosis inicial administrada a través de una sonda gástrica fue de 2g/kg de extracto suspendido en goma arábiga salina al 5% en volúmenes de 0,4 mL para ratones de 25 g de peso. Los animales del grupo control recibieron solamente el vehículo. Los animales se mantuvieron en observación por catorce días con alimentación, agua y temperatura normal, controlando su peso diariamente (Delporte "et al", 1998; Olivares, 2001). Luego de la administración los animales fueron observados para detectar mortalidad o la aparición de los siguientes signos clínicos:

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

Signos respiratorios: jadeos y cianosis.

Signos gastrointestinales: diarrea y emesis

Salivación y pilo erección

Fue importante realizar una observación constante durante las primeras 4 horas ya que es más probable que en este periodo se manifiesten con mayor intensidad las potenciales alteraciones fisiológicas de los animales.

Se debía realizar la necropsia a los animales que mueren durante el experimento, como a aquellos que queden vivos una vez terminado el periodo de observación, con el objetivo de determinar si hubo alteraciones en las características de los órganos en comparación con los animales controles.

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

Los órganos observados fueron: esófago, estómago, intestino delgado, hígado, riñón, bazo, páncreas, gónadas, corazón y pulmones.

Aunque los animales fueron pesados diariamente, sólo se compararon estadísticamente los pesos de los ratones de los días 1 y 14 con el fin de detectar si hubo diferencia estadísticamente significativa entre el periodo inicial y final.

Si se produjese muerte de los animales en este ensayo se debe determinar la dosis letal cincuenta (DL₅₀ dosis que produce la muerte al 50 % de los animales) para

lo cual se administran distintas dosis y para el cálculo de la DL_{50} se utiliza el programa PCS Farm, al cual se ingresan las distintas dosis y los niveles de respuesta, en este caso mortalidad, para cada dosis. El programa realiza la regresión lineal dada por la relación probit-log de la dosis según el método gráfico numérico modificado para computadores de Lichfield y Wilcoxon, que entrega la DL_{50} y el intervalo de confianza al 95% (Cubillos “et al”, 1999).

5.2.7 Prueba de irritación dérmica a través del Test de Draize

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

Se trazó una línea central a lo largo de cada conejo con un lápiz quirúrgico para observar al animal desde la cabeza hasta el rabo desde dos áreas: la izquierda, denominada A y la derecha, denominada B.

Se realizó sobre el área dorsal B de cada animal, una leve abrasión con una aguja 21G x 1½, desechando y cambiando la aguja entre cada animal.

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

Se aplicaron sobre las cámaras 20 µL de cada uno de los extractos y del disolvente como zona control, todos en duplicado para ser aplicados en las áreas A y B: La concentración a evaluar fue la concentración máxima posible de disolver en 20 µL en etanol o agua. Como las muestras eran líquidas, en cada cámara se colocó un papel filtro para evitar su derrame en el momento de colocar los parches sobre el lomo del conejo.

Se aplicaron los parches desde la parte inferior, presionando las cámaras desde abajo hasta arriba, para que salga el aire, haciendo coincidir la línea dibujada sobre el parche con la dibujada sobre el lomo del conejo. Se presionó cada una de las cámaras con el dedo para que se distribuyesen uniformemente las muestras dentro de ésta, presionado además en las esquinas del parche para asegurar una buena adherencia.

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

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

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

TABLA 1. Evaluación de la irritación primaria de la piel de conejo

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

5.2.7.1 Determinación de la irritación primaria (SPI) e índice de irritación primaria (PII)

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

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

pueden resumir en la siguiente ecuación:

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

Ecuación 5.8: Valor de irritación primaria mediante Test de Draize

Donde:

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

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

Según el valor del PII obtenido para cada muestra, ésta será clasificada de acuerdo con TABLA 2.

TABLA 2. Categorías de índice de irritación primaria (PII) mediante el Test de Draize

VALOR	PII
0-0,4	imperceptible
0.5 – 1.9	levemente irritante
2-4.9	moderada irritación
5 -8	irritación severa

5.3 Estudios farmacológicos *in vitro*

5.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de maqui por el ensayo Bioautografía

Mediante este ensayo se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos, los cuales fueron sembrados en cromatofolios de gel de sílice 60 (Merck) y se determinó la fase móvil más apropiada para cada uno de ellos (TABLA 3).

Se prepararon caldos de cultivo de las diferentes cepas (TABLA 4), utilizando como medio líquido de cultivo TSB (Tryptona soy Broth) para bacterias y PDB (potatoes dextrose broth) para hongos. Cada microorganismo en estudio fue resuspendido en

duplicado mediante un asa de micrón estéril en 3 mL de su correspondiente medio según sea bacteria u hongo, los cuales fueron obtenidos de una siembra de agar inclinado (Erazo “et al”, 2002). Las bacterias fueron incubadas a 37 °C por 24 horas y los hongos a 28 °C por 48 horas. Los cromatofolios fueron expuestos a la luz U.V. (λ 254 nm), durante 30 minutos con el fin de esterilizarlos previo a realizar el ensayo.

En un tubo estéril se adicionaron 350 μ L de caldo de cultivo de cada microorganismo al cual se agregó 7 mL de agar fundido, TSA para bacterias y PDA para hongos, se homogenizó en un agitador mecánico y esta solución se dejó escurrir sobre los cromatofolios los cuales se encuentran dentro de una cápsula de petri. Una vez solidificado la solución sobre la placa, se adicionaron 350 μ L de agua destilada estéril a cada lado con el fin de evitar que las placas se resequen.

Las placas se dejaron incubar por 24 horas a 37 °C para bacterias y por 48 horas a 28 °C en el caso de hongos.

Las placas fueron reveladas con el reactivo MTT (sal de tetrasolium), el cual reconoce una deshidrogenasa bacteriana dando una coloración azul/violeta. Se consideró por lo tanto, como resultado positivo de actividad antimicrobiana si en la placa se observó un halo de inhibición de color blanco (Rahalison “et al”, 1991).

TABLA 3. Fases móviles de las c.c.f. para el ensayo Bioautografía

Fracción o Compuesto	Fase Móvil
EH	DCM:AE (7:3)
EDM	DCM: AE (7:3)
EM	AE:M (8:2)

Donde:

DCM disolvente diclorometano; **AE** disolvente acetato de etilo; **M** disolvente metanol

TABLA 4. Microorganismos utilizados para todos los ensayos microbiológicos

Bacterias gram negativas	Tipo de cultivo
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 14207
<i>Salmonella aviatum</i>	ATCC 12228
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	muestra clínica
Bacterias Gram Positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC 10290
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
Hongo	
<i>Candida albicans</i>	Muestra clínica aislada desde el laboratorio de microbiología de la Fac. de Cs. Qcas. Y Farmacéuticas, Universidad de Chile
Levadura	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Muestra aislada del ambiente desde el laboratorio de microbiología de la Fac. de Cs. Qcas. y Farmacéuticas, Universidad de Chile

ATCC: American type Culture Collections

5.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante a través del ensayo de la xantina oxidasa

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

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

Los extractos fueron evaluados a 50 µg/mL (Theoduloz “et al”, 1991). A las muestras en estudio se les adicionó 3 a 4 gotas de DMSO y a continuación el agua bidestilada, sonicando cuando se requirió para lograr la solubilidad. Las muestras fueron evaluadas en duplicado. Para finalizar el ensayo se utilizó HCl 1 N (40,9 mL de ácido concentrado en 500 mL de agua bidestilada). El protocolo del ensayo se detalla en la TABLA 5.

TABLA 5. Protocolo del ensayo de inhibición de la xantino oxidasa

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

Una vez agregados los reactivos 1, 2, 3 y 4 se preincubaron las mezclas a 25°C por 15 minutos. A continuación se adicionó a todos los tubos X y se incubó a 25°C por 30 min (para que la X esté a la temperatura de las muestras se colocó en el baño junto con éstas). Para finalizar, la reacción fue detenida con HCl y se procedió a leer la absorbancia (A) del ácido úrico a 290 nm (Noro “et al”, 1983), en un espectrofotómetro UNICAM (Kalckar, 1947).

El porcentaje de inhibición (%In) se calculó según la siguiente ecuación:

$$\%In = [(Aa - Ab) - (Ac - Ad) / (Aa - Ab)] * 100$$

Ecuación 5.8: Porcentaje de inhibición de la XO

Donde:

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

El fármaco de referencia utilizado fue el alopurinol y para determinar su concentración inhibitoria cincuenta (CI_{50}) se ensayaron diferentes concentraciones de este fármaco. Del gráfico % Inhibición vs concentración se obtuvo el CI_{50} que resultó ser 0,035 $\mu\text{g/mL}$.

La significancia de los resultados se calculó con el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativos para un $p \leq 0,05$. Los resultados son expresados como % de inhibición \pm D.S.

5.3.3 Evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres a través del ensayo de DPPH

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

Para ello se utilizó una solución metanólica recién preparada del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) de 20 mg/L. Se prepararon soluciones metanólicas de las muestras dentro de un rango de concentraciones de 1 a 200 $\mu\text{g/mL}$ de acuerdo a la actividad encontrada y siguiendo el protocolo presentado en la TABLA 6.

TABLA 6. Protocolo del ensayo de DPPH

	Control	Blanco	Muestra
Extracto	0 μL	375 μL	375 μL
DPPH (20mg/mL)	750 μL	0 μL	750 μL
Metanol	375 μL	750 μL	0 μL
Volumen total	1125 μL	1125 μL	1125 μL

El cálculo del porcentaje de decoloración que corresponde a la capacidad atrapadora de radicales libres se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%De = 1 - (Am / Ac) * 100$$

Ecuación 5.9: Porcentaje de decoloración

Donde:

% **De** porcentaje de decoloración; **Am** absorbancia de la muestra; **Ac** absorbancia del control

Un valor igual a cien corresponde a la máxima capacidad atrapadora de radicales libre y un valor cercano a cero indica una nula capacidad, por lo que el grado de decoloración indica la eficiencia de los extractos como atrapadores de radicales libres. Como compuesto de referencia se utilizó quercetina. Cada determinación se realiza en triplicado, calculando el promedio del % de decoloración \pm D.S.

Los resultados también fueron expresados como CE₅₀ (concentración efectiva cincuenta) (Feresin "et al", 2002).

CAPITULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.0 Estudio anatómico de las hojas de maqui

6.0.1 Descripción anatómica de las hojas de maqui

En los cortes transversales de las hojas se observaron células epidérmicas constituidas por una capa de células (ambas epidermis monoestratificadas) con una membrana cuticular delgada y los estomas se presentan a nivel de la superficie epidérmica. No se observaron pelos tectores. A continuación debajo de la epidermis en el haz se vieron dos capas de parénquima en empalizada y a continuación se observó un abundante parénquima esponjoso con amplios espacios intercelulares. En el nervio medio se comprobó la existencia de colénquima del tipo laminar y abundantes fibras lignificadas sobre el floema (ver Anexo I en Material Complementario: fotografías de: A frutos; B1 hoja entera; B2 nervadura de la lámina foliar; C cortes transversales de la lámina de la hoja).

6.1 Estudio químico

El estudio químico realizado a las hojas de *Aristotelia chilensis* mostró los siguientes resultados.

6.1.1 Rendimiento de los extractos vegetales y FADM obtenidos a partir de las hojas de maqui

El rendimiento de los diferentes extractos a partir del material vegetal se detalla en la TABLA 7, además se señalan los rendimientos del infuso y FADM.

TABLA 7. Rendimiento de los extractos

Extractos	EH	EDM	EM	Infuso
Peso del extracto (g)	14,8	76,3	100,9	50
Rendimiento (%)	1,3	6,7	9,9	25

Donde:

EH: extracto hexánico; **EDM** extracto de diclorometano; **EM** extracto metanólico

La cantidad obtenida de FADM a partir del EDM fue de 4,9 g lo que equivale a un rendimiento de 10,9%.

6.1.2 Identificación de las familias de compuestos por c.c.f. de los extractos y FADM

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

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

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

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

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

FADM: diclorometano 100%; acetona y gotas de NH₃

Los resultados del rastreo fitoquímico inicial (screening) para pesquisar las principales familias de compuestos en los extractos y FADM, utilizando distintas fases móviles y reactivos reveladores, están presentados en la TABLA 8, indicando con un símbolo + o -, la presencia o ausencia de las familias de metabolitos secundarios.

TABLA 8 Identificación de las familias de compuestos químicos por c.c.f. de los extractos y FADM

Metabolitos Secundarios	Revelador	EH	EDM	EM	FADM	Infuso
Alcaloides	Dragendorff	-	+	++	+	+
Terpenos	Lieberman Burchard	+	++	-	+	+
Esteroides	Lieberman Burchard	+	+	-	+	-
Terpenos	p-anisaldehído	+	++	-	+	+
Compuestos fenólicos	NP/PEG (UV 366 nm)	-	+	+++	+	+++
Cumarinas o flavonoides	Vapores de amoniaco (UV 366 nm)	-	-	-	-	+

Donde:

EH extracto hexánico; **EDM** extracto de diclorometano; **EM** extracto metanólico; **FADM** fracción alcaloídea del EDM; **+++** presenta mayor cantidad relativa del compuesto; **++** presenta menor cantidad relativa del compuesto; **+** presenta escasa cantidad relativa del compuesto; **-** no presenta el compuesto.

En el EM e infuso, los metabolitos secundarios encontrados en mayor cantidad fueron los compuestos fenólicos. Los alcaloides están presentes en EDM, EM, FADM e infuso, siendo el EM, el extracto que contiene una mayor cantidad de estos compuestos nitrogenados. El EDM concentra la mayor cantidad de compuestos del tipo terpenoides. En el infuso se pudo observar una cantidad pequeña de cumarinas.

6.2 Estudio farmacológico *in vivo*

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las evaluaciones de las diferentes actividades farmacológicas a las cuales fueron sometidos los diferentes extractos y FADM.

6.2.1 Evaluación de la actividad analgésica por vía tópica

6.2.1.1 Ensayo de la formalina en la cola

Los resultados de la evaluación de la analgesia vía tópica mediante el ensayo de la formalina en la cola para los EH, EDM, EM e infuso se detallan en la TABLA 9 y en la FIGURA 2. La FADM no fue evaluada.

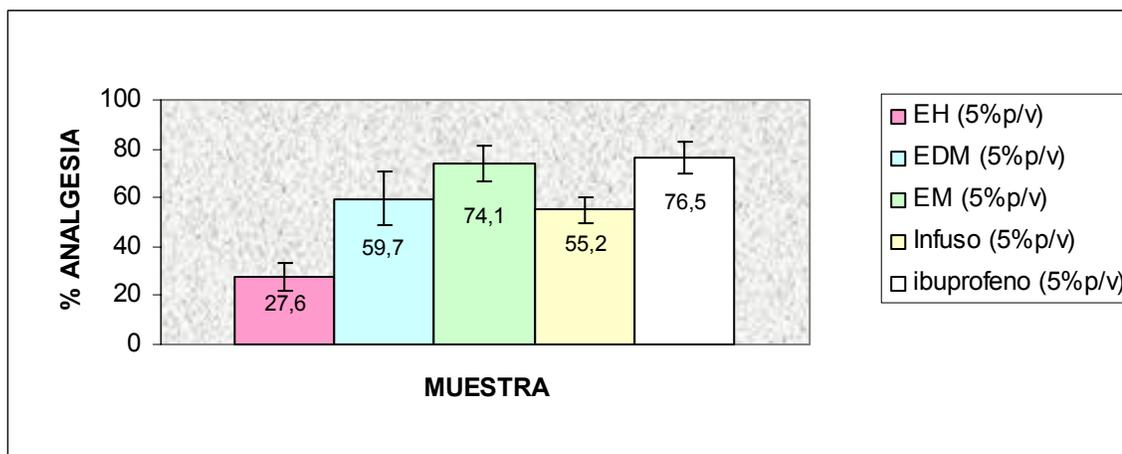
TABLA 9. Actividad analgésica vía tópica mediante el ensayo de la formalina en la cola de los diferentes extractos de las hojas de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno)

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

Donde:

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

FIGURA 2. Efecto analgésico tópico comparativo de los diferentes extractos de las hojas de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) en el ensayo de la formalina en la cola



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

6.2.1.2 Ensayo latigazo de la cola

Los resultados de la evaluación de la analgesia vía tópica mediante el ensayo latigazo de la cola para los EH, EDM, EM y FADM se detallan en la TABLA 10 y en las FIGURAS 3, 4, 5 y 6. El infuso no fue evaluado.

TABLA 10. Comparación de la actividad analgésica vía tópica mediante ensayo latigazo de la cola de los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno)

Muestra	n	% p/v (DMSO)	% AT ± SEM	p
EH	6	1,25	9,3 ± 3,6	0,000
	6	2,5	17,4 ± 3,3	0,000
	6	5	26,6 ± 2,4	0,000
	6	10	↑46,5 ± 6,5	0,000
EDM	6	1,25	8,4 ± 2,4	0,000
	6	2,5	15,9 ± 4,5	0,000
	6	5	24,3 ± 3,8	0,000
	6	10	↑37,8 ± 3,8	0,000
EM	6	1,25	9,9 ± 2,3	0,000
	6	2,5	21,1 ± 1,4	0,000
	6	5	37,3 ± 3,0	0,000
	6	10	↑55,2 ± 4,3	0,000
FADM	6	0,125	12,0 ± 3,8	0,000
	6	0,25	24,0 ± 3,0	0,000
	6	0,5	40,5 ± 5,2	0,000
	6	1	↑58,2 ± 4,8	0,000
ibuprofeno	6	5	↑50,0 ± 0,1	0,000

Donde:

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

FIGURA 3. Relación concentración - efecto analgésico tópico del EH de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola

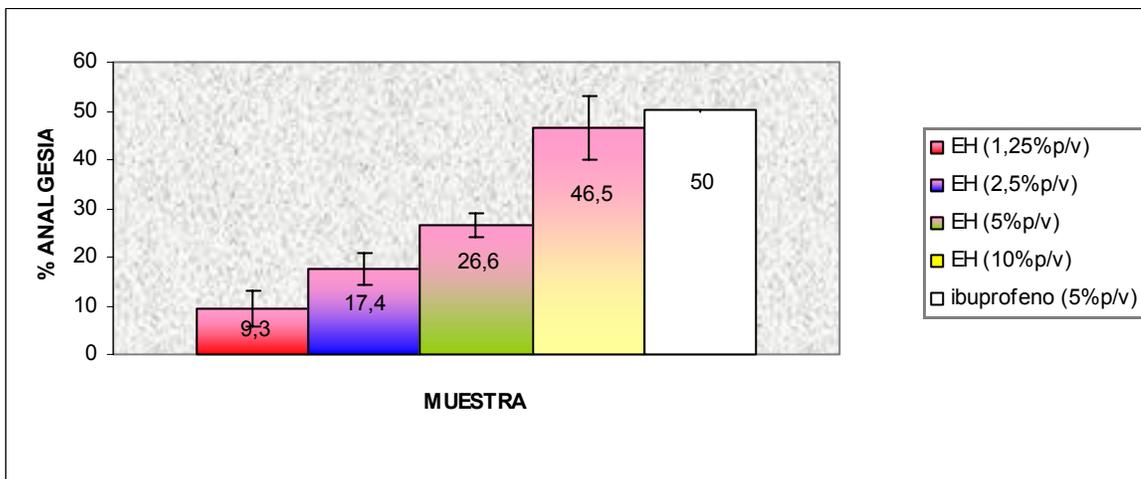


FIGURA 4. Relación concentración - efecto analgésico tópico del EDM de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola

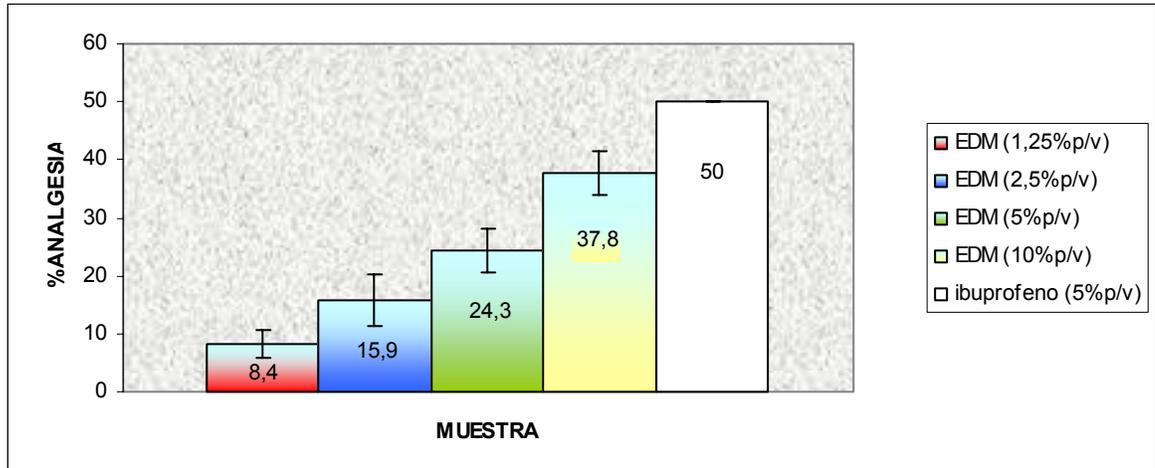


FIGURA 5. Relación concentración - efecto analgésico tópico del EM de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola

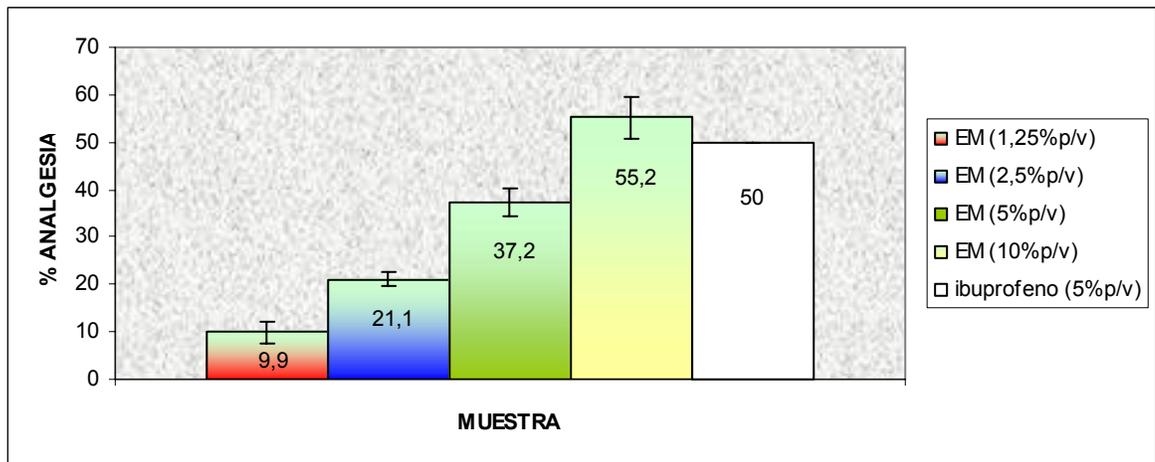


FIGURA 6. Relación concentración - efecto analgésico tópico de la FADM de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola

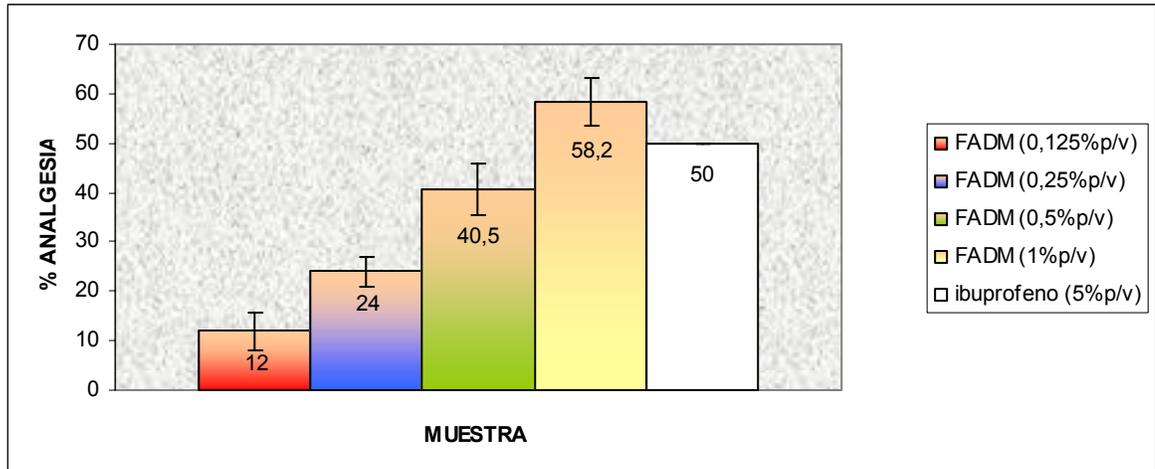
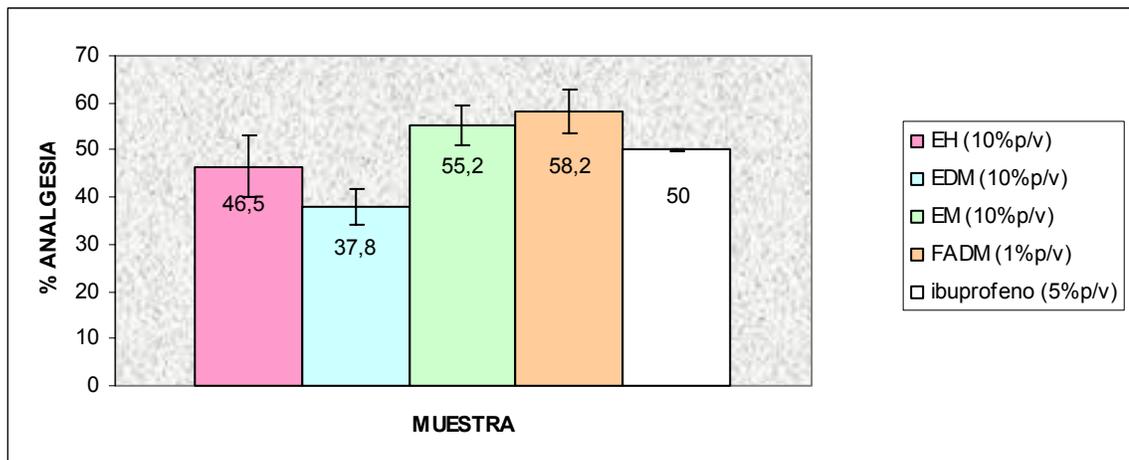


FIGURA 7. Efecto analgésico tópico máximo comparativo de los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola



De la FIGURA 3, 4, 5 y 6 se puede observar que todos los extractos presentaron un efecto analgésico concentración - dependiente frente al ensayo latigazo de la cola. Los efectos máximos de los extractos se alcanzaron a la concentración de un 10% y para la FADM esta concentración fue de un 1%. Al comparar los resultados

obtenidos a las concentraciones en que se alcanzó el efecto máximo, ver FIGURA 7, podemos apreciar que el mayor efecto analgésico máximo lo presentó la FADM (58,2%), y con menores efectos máximos encontramos a los EM (55,2 %) y el EH (46,5%); el EDM (37,8%) fue el que presentó un efecto analgésico máximo más débil.

TABLA 11. Valores de la CE_{25} analgésica tópica de los diferentes extractos, FADM y el fármaco de referencia (ibuprofeno) mediante el ensayo latigazo de la cola

Extracto	$CE_{25} \pm S.E.M.$
EH	$3,5 \pm 0,5$
EDM	$4,5 \pm 0,4$
EM	$2,7 \pm 0,2$
FADM	$0,2 \pm 0,0$
ibuprofeno	$0,8 \pm 0,1$

Donde:

EH extracto hexánico; **EDM** extracto de diclorometano; **EM** extracto metanólico; **FADM** fracción alcaloidea del EDM; **ibuprofeno** fármaco de referencia; **CE_{25}** concentración a la que se produce el 25% del efecto máximo; **S.E.M.** error estandar de la media.

En los resultados presentados en la TABLA 11 se puede apreciar que la potencia de los extractos respecto de la del ibuprofeno es baja. Sin embargo la FADM presentó una potencia superior a la del fármaco de referencia.

6.2.2 Evaluación de la actividad analgésica por vía oral

6.2.2.1 Ensayo de las contorsiones abdominales

A continuación en la TABLA 12 y FIGURA 8 se presentan los resultados comparativos obtenidos en la evaluación de la actividad analgésica *p.o.* de los diferentes extractos y el fármaco de referencia, naproxeno sódico.

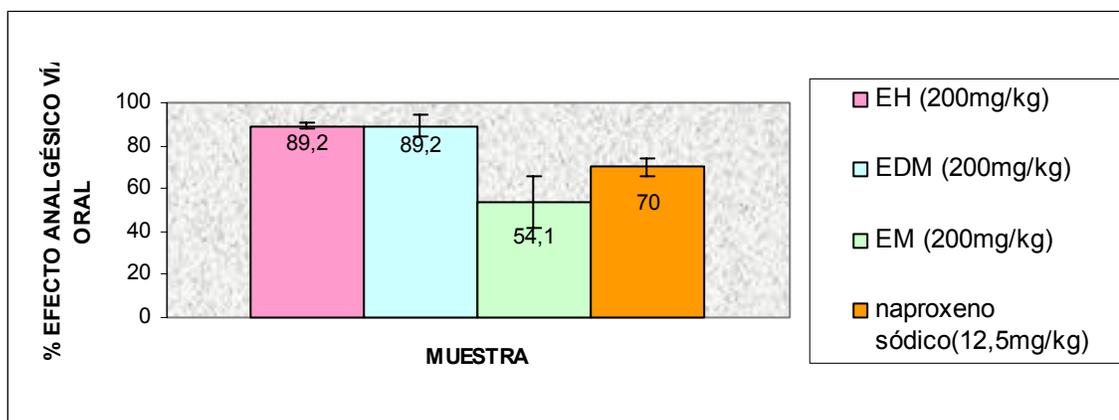
TABLA 12. Actividad analgésica vía oral mediante ensayo de contorsiones abdominales de los extractos de las hojas de maqui y el fármaco de referencia (naproxeno sódico)

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

Donde:

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

FIGURA 8. Efecto analgésico comparativo p.o, de los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (naproxeno sódico) mediante ensayo de las contorsiones abdominales



Al analizar los resultados presentados en la TABLA 12 y FIGURA 9, podemos concluir que los EH y EDM exhibieron un efecto mayor a la del naproxeno sódico. El EM es el que mostró un menor efecto.

El hecho de que los distintos extractos presentaron efecto analgésico frente a los distintos métodos utilizados (latigazo de la cola, formalina en la cola, contorsiones abdominales), nos permite plantear la hipótesis de que los principios activos responsables de la analgesia podrían actuar tanto a nivel central como periférico (Kolesnikov “et al”, 2004; Miranda “et al”, 2002; Pinardi “et al”, 2003).

6.2.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía tópica

6.2.3.1 Ensayo de la inducción de edema en orejas

En la TABLA 13 y 14 y FIGURA 9 y 10 se detallan los resultados obtenidos para la inflamación tópica inducida por AA y TPA de los diferentes extractos y FADM.

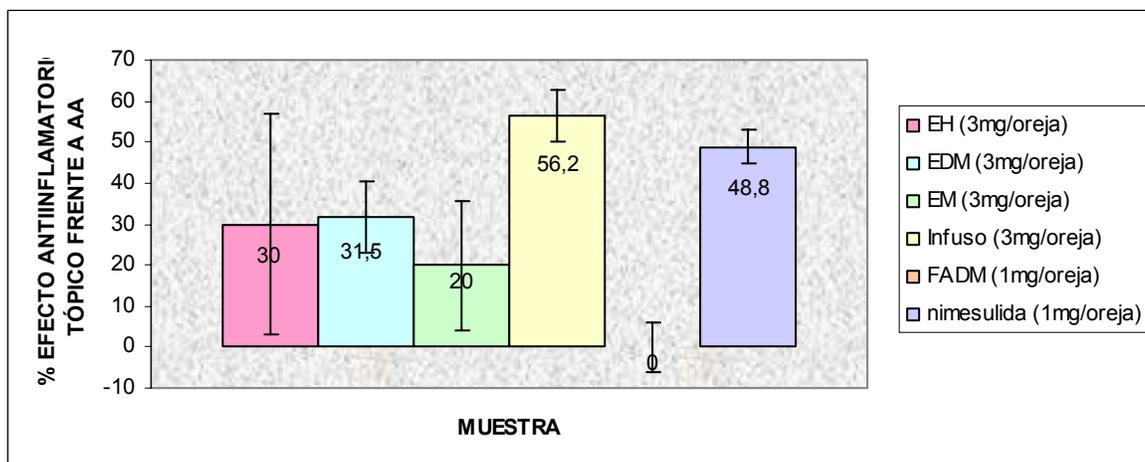
TABLA 13. Actividad antiinflamatoria tópica frente a AA de los diferentes extractos y FADM de las hojas de maqui y el fármaco de referencia (nimesulida)

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

Donde:

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

FIGURA 9. Efecto antiinflamatorio tópico comparativo frente a AA de los EH, EDM, EM, Infuso, FADM y el fármaco de referencia (nimesulida)



Los resultados de evaluación antiinflamatoria frente a AA de las diferentes muestras nos permiten observar que el Infuso (56,2%) alcanza el mayor efecto antiinflamatorio tópico, seguido por EDM (31,5%) y EH (30%) que presentan un efecto menor; el EM (20%) tiene una leve actividad antiinflamatoria tópica: Los resultados obtenidos con todas las muestras fueron significativos por presentar un $p \leq 0,05$. La FADM no presentó actividad antiinflamatoria tópica frente a AA.

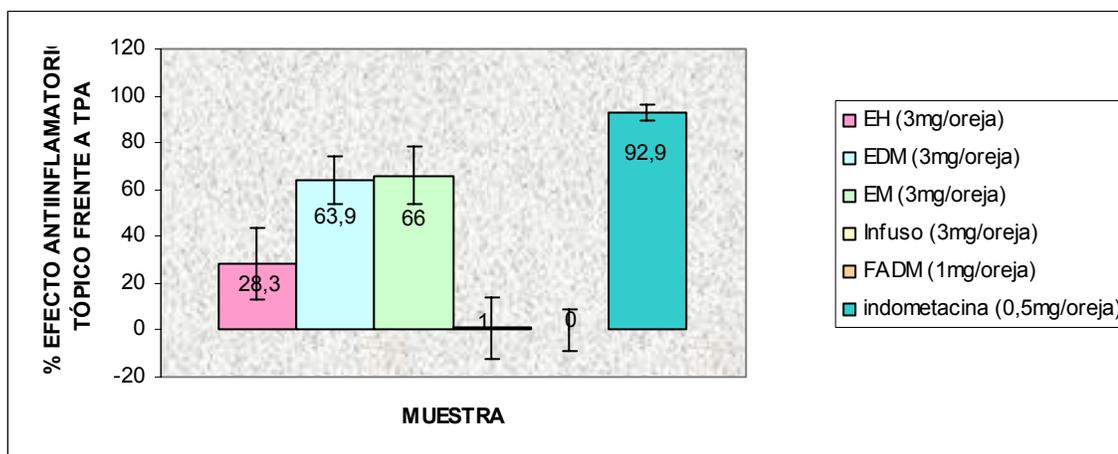
TABLA 14. Actividad antiinflamatoria tópica frente a TPA de los diferentes extractos y FADM de las hojas de maqui y el fármaco de referencia (indometacina)

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

Donde:

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

FIGURA 10. Efecto antiinflamatorio tópico comparativo frente a TPA de los EH, EDM, EM, Infuso, FADM y el fármaco de referencia (indometacina)



Los resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria frente a TPA de las diferentes muestras nos permiten concluir que el EM (66,0%) y el EDM (63,9%) son los extractos más activos, mientras que el EH presenta baja actividad (28,3%). Los Infuso y FADM no presentaron efectos antiinflamatorios en este ensayo.

6.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral

6.2.4.1 Ensayo del edema plantar inducido por λ -carragenano

En la TABLA 15 se detallan los resultados obtenidos para la evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral de los diferentes extractos y FADM. El infuso no fue evaluado.

TABLA 15. Actividad antiinflamatoria oral inducida por λ -carragenano de los diferentes extractos, FADM y el fármaco de referencia (naproxeno sódico)

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

Donde:

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

En la evaluación de la actividad antiinflamatoria frente al λ -carragenano *p.o.*, tanto los extractos seriados como la FADM fueron inactivas.

Analizando los resultados obtenidos en los estudios pre-clínicos podemos destacar que todos los extractos seriados presentaron efectos analgésicos y antiinflamatorios por la vía tópica. Además, la FADM presentó sólo efectos analgésicos tópicos y fue inactiva como antiinflamatoria tópica.

Sin embargo por la vía oral fueron inactivos como antiinflamatorios tanto los extractos seriados como la FADM.

La actividad antiinflamatoria tópica de los distintos extractos seriados se presentó frente a AA y TPA, lo que nos permite plantear que los extractos presentan distintos compuestos con distintos mecanismos de acción. El AA produce una inflamación

rápida y de corta duración, hay un aumento de la permeabilidad vascular y los mediadores proinflamatorios liberados después de aplicar el AA son principalmente la mieloperoxidasa y elastasa producida por los neutrófilos, además de una alta concentración de anión superóxido. Se producen también PGE₂ (prostaglandinas E₂), NO y LTB₄ (leucotrieno B₄). La aplicación del TPA produce una inflamación lenta y sostenida en el tiempo, produciendo altas cantidades PGE₂ y NO (a diferencia de las cantidades relativas que produce el AA), ya que induce la expresión de COX-2 (enzima ciclooxigenasa inducible) e iNOS (enzima óxido nítrico sintasa inducible) respectivamente. Además el TPA produce un mayor aumento de la permeabilidad vascular en comparación a la que produce el AA (Lloret y Moreno, 1995; De Young “et al”, 1989).

Es importante señalar que el proceso inflamatorio es muy complejo y que existen diversas sustancias endógenas proinflamatorias, por lo tanto, el mecanismo de acción de una sustancia antiinflamatoria puede ser muy diferente, pudiendo actuar por ejemplo, a través de la inhibición de procesos oxidativos, o mediante la reducción de la actividad de los macrófagos y del complemento, como también mediante la inhibición de enzimas pro-inflamatorias como las COX, iNOS, metaloproteinasas entre otras (Florez, 2003; Szabo “et al”, 2004; Kim “et al”, 2005; Boscá “et al”, 2005).

La ciclooxigenasa se presenta como mínimo en dos formas isoméricas: la COX-1 (constitutiva), que media la formación de las prostaglandinas que cumplen funciones fisiológicas tales como la protección de la mucosa gastrointestinal, hemostasis y flujo sanguíneo renal; y la COX-2 (inducible), la cual cataliza la producción de altas concentraciones de PGE₂ (Simmons “et al”, 2004).

El hecho de que los extractos seriados presentaran efectos analgésicos y antiinflamatorios puede ser explicado en parte, como consecuencia de que las propiedades analgésicas y antiinflamatorias están muy relacionadas. Los antiinflamatorios pueden exhibir actividad analgésica si su mecanismo de acción es mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), como ya se señaló, ésta produce entre otros, la prostaglandina PGE₂ que causa dolor e inflamación en los tejidos en donde se produce. El dolor es consecuencia de la inflamación en la mayoría

de los tejidos, donde la PGE₂ sensibiliza los terminales nociceptivos a estímulos físicos y químicos (Florez, 2003).

6.2.5 Evaluación de la toxicidad aguda y determinación de la DL₅₀

En la TABLA 16 se detallan los valores obtenidos en el estudio de la toxicidad aguda *p.o.* de los dos extractos farmacológicamente más activos (EDM y EM). La dosis para los extractos fue de 2g/kg de ratón suspendidos en goma arábiga salina. No fue posible de administrar una dosis única más alta, debido a la solubilidad de los extractos.

TABLA 16. Registro comparativo de los pesos de los ratones después de la administración *p.o.* de los EDM y EM para la evaluación de la toxicidad aguda

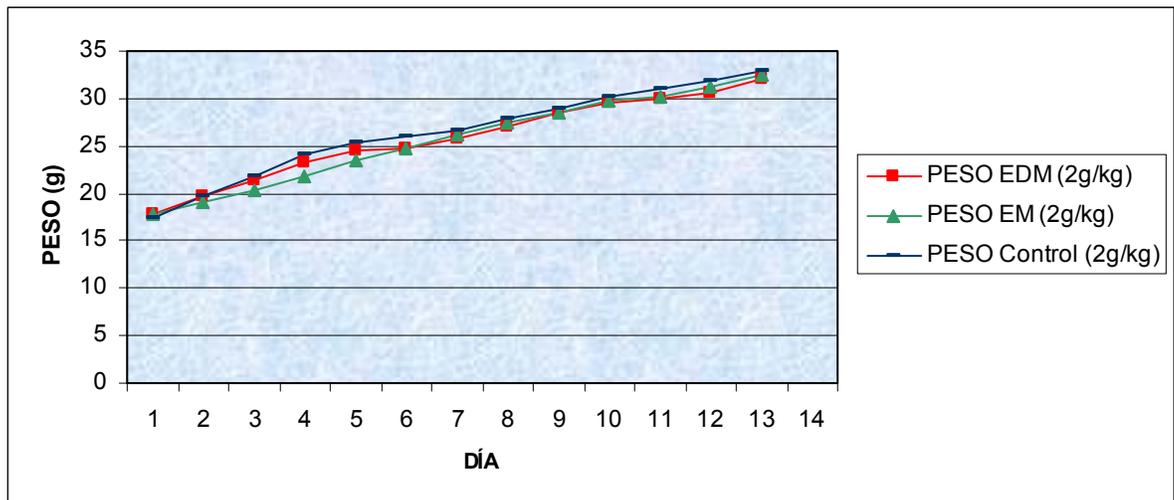
DIA*	EDM mediana del peso (g) ± SEM	n1	EM mediana del peso (g) ± SEM	n2	controles mediana del peso (g) ± SEM	N
1	17,8 ± 0,3	6	17,8 ± 0,6	8	17,3 ± 0,3	6
4	23,2 ± 1,4	6	21,8 ± 1,5	8	24,1 ± 0,6	6
5	24,5 ± 1,6	6	23,5 ± 1,6	8	25,3 ± 0,7	6
6	24,8 ± 2,0	6	24,8 ± 1,7	8	26,0 ± 0,7	6
7	25,8 ± 2,2	6	26,3 ± 1,8	8	26,6 ± 0,9	6
10	30,5 ± 3,2	6	27,9 ± 1,9	8	27,4 ± 1,0	6
11	29,6 ± 3,0	6	29,7 ± 2,3	8	30,1 ± 1,0	6
12	29,9 ± 3,1	6	30,1 ± 2,4	8	31,1 ± 1,3	6
13	30,7 ± 3,1	6	31,3 ± 2,6	8	31,8 ± 1,3	6
14	32,0 ± 3,1	6	32,4 ± 2,6	8	32,8 ± 1,5	6

*Días 2, 3, 8, 9 corresponden a fines de semana, período en que no se registró el peso.

Donde:

EDM extracto de diclorometano; **EM** extracto metanólico; **SEM** error estándar de la media; **n1** número de animales tratados para el ensayo con el EDM; **n2** número de animales tratados para el ensayo con el EM; **N** número de animales controles para cada ensayo

FIGURA 11. Curva comparativa del cambio de peso de los ratones después de la administración de los EDM y EM y de los animales controles



A analizar y comparar las curvas presentadas en la FIGURA 11 se puede concluir que los animales tratados con EDM o EM, subieron de peso en forma normal y no hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar el aumento de peso de los animales tratados y de los animales controles.

Durante las primeras horas no se observaron alteraciones fisiológicas en los animales, siendo los signos motores, respiratorios y gastrointestinales normales, además no se observó salivación o pilo erección.

Todos los animales vivieron hasta el periodo final del ensayo, por lo tanto la DL_{50} sería mayor a 2 g/kg. Fueron seleccionados al azar aquellos animales a los que se les realizó la necropsia. Después de analizar los distintos órganos entre los animales del grupo muestra y grupo control, se puede concluir que los EDM y EM no alteraron los distintos órganos ya que su tamaño, forma, color y textura fueron iguales a las de los animales controles.

6.2.6 Prueba de irritación dérmica a través del test de Draize

A continuación en la TABLA 17, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación del potencial de irritación dérmica de los EDM y EM.

TABLA 17. Determinación del índice de irritación primaria (PII)

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

Donde:

EDM extracto de diclorometano; **EM** extracto metanólico; **PII** índice de irritación primaria.

En la evaluación de la potencial capacidad de producir irritación dérmica de los EDM y EM, se pudo concluir que no hubo irritación ni edema después de aplicar los extractos, tanto en la zona sin abrasión como en la con abrasión. Los PII para ambos extractos fue cero tanto en las zonas con y sin abrasión.

6.3. Estudio farmacológico *in vitro*

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de las actividades *in vitro*.

6.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de maqui por el ensayo Bioautografía

En la TABLA 18 se detallan los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los EH, EDM y EM.

TABLA 18. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los EH, EDM y EM de las hojas de maqui

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

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

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

Donde:

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

Al analizar los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana frente a distintas cepas, podemos concluir, en forma general, que los extractos no exhiben una importante actividad; exceptuando al EM, el cual presentó una moderada actividad frente a *Staphylococcus aureus* (ver en Anexo 1 en Material complementario: fotografía de: A c.c.f. del EM; B bioautografía del EM frente a *S. aureus*), resultado que confirma los estudios previos de las hojas de maqui (Silva “et al”, 1992 y 1995).

6.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante a través del ensayo de la xantino oxidasa

En la TABLA 19 se detallan los resultados de la actividad inhibidora de los EH, EDM y EM; además del fármaco de referencia, alopurinol.

TABLA 19. Evaluación de la actividad inhibitoria de la xantino oxidasa para los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (alopurinol)

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

Donde:

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

La evaluación realizada en este ensayo determinó que todos los extractos inhibieron la enzima xantino oxidasa, pero con marcadas diferencias en cuanto a porcentajes de inhibición de los tres extractos. El EM, exhibió el porcentaje de inhibición más alto (62,7 %). El alopurinol, fármaco de referencia presentó una CI_{50} a la concentración de 0,035 µg/mL. El EH presentó una leve inhibición y el EDM fue

prácticamente inactivo.

6.3.3 Evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres a través del ensayo de DPPH

Los resultados obtenidos para el ensayo de decoloración de DPPH se detallan en la TABLA 20 y 21.

TABLA 20. Valores de la CE_{50} en el ensayo de DPPH para los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia quercetina

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

Donde:

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

TABLA 21. Evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres mediante el ensayo de DPPH para los diferentes extractos de maqui y el fármaco de referencia (quercetina)

Extracto hexánico		
concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% decoloración	SD
0	0	0
54,2	7,7	0,9
108,4	7,6	2,3
216,7	26,9	0,8

Extracto de diclorometano		
concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% decoloración	SD
0	0	0
13,6	7,0	0,4
27,5	13,7	0,3
55	30,1	1,0
110	42,3	4,4
220	71,2	2,0

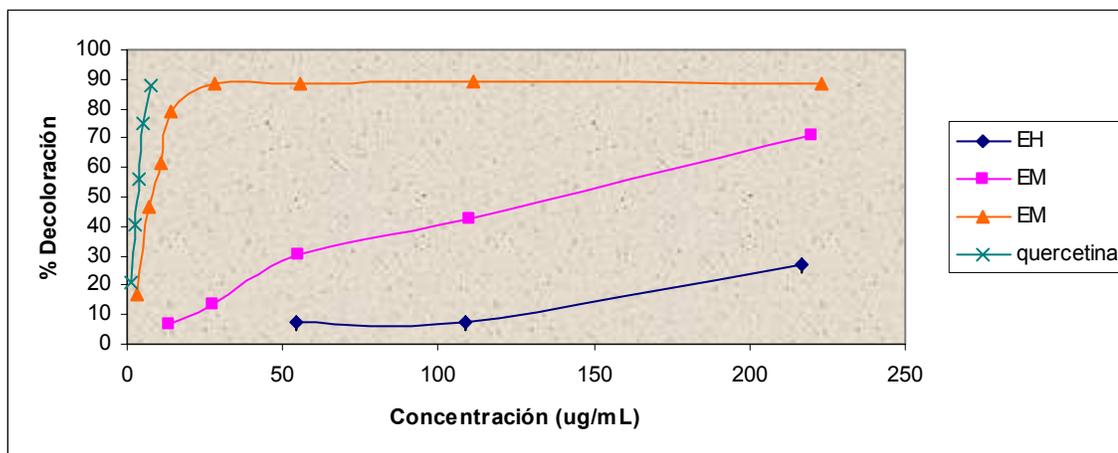
Extracto metanólico

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

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

Con respecto a la actividad atrapadora de radicales libres de los diferentes extractos, el EM es el más activo, y esta actividad podría deberse a los compuestos polifenólicos presentes en este extracto (Pérez, 2003). Sin embargo la actividad exhibida por el EM es menor a la presentada por la quercetina, compuesto de referencia (FIGURA 12).

FIGURA 12. Gráfico comparativo de la actividad atrapadora de radicales libres de los EH, EDM, EM y del fármaco de referencia (quercetina)



Los resultados de la actividad antioxidante frente a la XO y DPPH, muestran que el EM es el extracto que presentó mayor actividad.

Parte de los resultados obtenidos en esta memoria dieron origen a 3 presentaciones a congresos internacionales, cuyos resúmenes se adjuntan en el Anexo II en Material Complementario. Y son las siguientes:

- Torres V., Erazo S., Inostroza V., Silva X., Backhouse N., Miranda H., Negrete R., Muñoz O., Delporte C. (2006). Actividad analgésica de las hojas de *Aristotelia chilensis*. Societa Italo Americana Di Etnomedicina (SILAE), Perugia, Italia, 23 al 28 de septiembre.
- Delporte C., Torres V., Erazo S., Silva X., Negrete R., Muñoz O., Backhouse N. (2006). Actividad antiinflamatoria y antimicrobiana de *Aristotelia chilensis*, especie nativa chilena. Simposio FAPRONATURA 20 al 24 de noviembre, Varadero, Cuba.
- Farías M., Backhouse N., Peredo N., Goñy L., Negrete R., Aguirre M.C., Silva X., Erazo S., Miranda H.F., Apablaza C., García R., Torres V., Delporte C. (2007). LAS 3 M EN PRODUCTOS NATURALES. IV Congreso de Químicos Farmacéuticos de la Industria Centro de eventos. Casa Piedra los días 18, 19 y 20 de abril.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

- Del proceso de extracción a los que fueron sometidas las hojas de *Aristolelia chilensis*, el EM (9,9 %) y el infuso (25 %) fueron los que presentaron mayor rendimiento.
- Los alcaloides están en mayor proporción en el EM y en menor porcentaje en los EDM y FADM. El EDM presenta principalmente compuestos del tipo terpenoides y esteroidales.
- En la analgesia tópica evaluada en el ensayo de la formalina en la cola, los extractos más activos fueron el EM (74,1%), EDM (59,7) e infuso (55,2%).
- Los EH, EM y la FADM son los que presentaron mayor actividad analgésica tópica frente al ensayo latigazo de la cola y los efectos fueron dependientes de la dosis. Los efectos analgésicos del EM y FADM fueron superiores al efecto analgésico del fármaco de referencia, ibuprofeno. El mayor efecto máximo lo presentó la FADM (58,2 % a la concentración de 1%). Los efectos máximos se alcanzaron para todos los extractos seriados a la concentración de 10%.
- La potencia de la FADM como analgésica tópica frente al ensayo del latigazo de la cola fue superior a la del fármaco de referencia (ibuprofeno).
- Los EH y EDM (89,2% ambos extractos) exhibieron una importante actividad analgésica oral en el ensayo de las contorsiones, éste efecto fue superior a la del fármaco de referencia naproxeno sódico.
- El infuso fue el más activo como antiinflamatorio frente a AA (56,2% de efecto). Este efecto fue superior al efecto máximo alcanzado por la nimesulida (48,8 %). La FADM fue inactiva.
- Los EM (66 %) y EDM (63,9 %) fueron los extractos que exhibieron mayor actividad antiinflamatoria tópica frente a TPA, en cambio frente a AA sus efectos fueron leves (20 y 31,5 % respectivamente). Sin embargo estos efectos fueron menores al efecto máximo del fármaco de referencia, indometacina (92.9 %). El infuso y FADM fueron inactivos frente a la inflamación inducida por TPA.

- Los diferentes extractos seriados y la FADM no presentaron efectos antiinflamatorios por vía oral.
- Los EM y EDM no presentaron *p.o.* toxicidad, los ratones tratados subieron de peso al igual que los animales controles. No se advirtieron efectos adversos visibles, ni alteraciones en los diferentes órganos estudiados. Por vía tópica no exhibieron edema ni irritación dérmica, siendo el PII (índice de irritación primaria) igual a cero para ambos extractos tanto en la zona con y sin abrasión.
- Los diferentes extractos seriados presentaron un débil efecto antimicrobiano sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y no presentaron actividad antifúngica.
- El EM exhibió las actividades más importantes como inhibidor de la xantino oxidasa y atrapador de radicales libres. Esta última actividad podría deberse principalmente a los compuestos fenólicos.
- El que los distintos extractos seriados presentaran efectos analgésicos frente a los distintos métodos utilizados (latigazo de la cola, formalina en la cola, contorsiones abdominales), nos permite plantear la hipótesis de que los principios activos responsables de la analgesia podrían actuar tanto a nivel central como periférico.
- La actividad antiinflamatoria tópica de los distintos extractos seriados se presentó frente a AA y TPA, por lo tanto los extractos podrían contener compuestos antiinflamatorios con distintos mecanismos de acción.
- Los resultados de los estudios pre-clínicos y de las evaluaciones farmacológicas *in vitro* nos permiten validar el uso de las hojas de maqui como analgésicas y antiinflamatorias, demostrándose además el efecto antioxidante de sus hojas.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

- AMIÉ D. "et al". Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 2003. 76(1): 55-61.
- ALCALDE- EON C. "et al". Anthocyanins in Berries of maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Phytochemical Analyst*, 2006. 17: 8-14
- BACKHOUSE N. "et al". Antiinflammatory and antipyretic activities of *Maytenus boaria* Mol. por *Int. Journal of Pharmacology*, 1994. 32: 239-244.
- BITTNER M. "et al". Indole Alkaloids from *Aristotelia chilensis*. *J. Chem. Soc. Commun.*, 1978. 79p.
- BOLETÍN OFICINA SANITARIA PANAMERICANA Ginebra, Suiza, 1986. 108 (5-6): 637-641.
- BOSCÁ L. "et al". Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*, 2005. 208: 249-258.
- CÉSPEDES C. "et al". A quinoline alkaloid from *Aristotelia chilensis*. *Phytochemistry*, 1993. 34:881.
- CUBILLOS A. "et al". Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) de alcaloides del lupino en pollas de reposición blancas y marrones. *Archivo . Médico. Veterinario*, 1999. 31 (2): 249 -256.
- DE YOUNG L. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, 1989. 26:335-341.
- DELPORTE C. "et al". Pharmaco-Toxicological study of new diterpenoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003 11: 1187-1190. . ISI=1.795.
- DELPORTE C., "et al". Analgesic- antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005. 99(1): 119- 124.
- DELPORTE C. "et al". *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. doi: 10.1016/j.jep.2007.02.018.

- DELPORTE C. "et al". Antipyretic, hypothermic and antiinflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. *Phytotherapy*, 1998. 12:118-122. ISI=0,525.
- DELPORTE C. "et al". 2006. Actividad antiinflamatoria y antimicrobiana de *Aristolelia chilensis*, especie nativa chilena. En: Simposio FAPRONATURA, 20 al 24 de noviembre del 2006. Varadero, Cuba. pp. s.p.
- ERAZO S. "et al". Methyl psilate: A new antimicrobial metabolite from *Psila boliviensis*. *Planta Médica*, 2002. 68: 66-67.
- ESCRIBANO- BAILÓN M.T. "et al". Anthocyanins in Berries Of Maqui (*Aristolelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Phytochemical Analysts*, 2006. 17: 8- 14.
- FARÍAS M. "et al". 2007. Las 3 M en productos naturales. En: IV Congreso de Químicos Farmacéuticos de la Industria: 18, 19 y 20 de abril del 2007. Santiago, Chile. Centro de eventos. Casa Piedra. pp. s.p.
- FERESIN, G. "et al". Free radical scavengers, anti- inflammatory and analgesic activity of *Acaena magellanica*. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2002. 54: pp 835- 844.
- FLOREZ J. *Farmacología Humana* 4ª ed., España, Ed. Masson, 2003. 1400p.
- HOLLANDER M., Wolfe D.. *Nonparametric Statistical Methods*. New York, John Wiley & Sons, 1973, pp 27-321, 62-70
- INOSTROZA V.. Evaluación de las actividades analgésicas *in vivo* de *Ugni molinae* Turcz. y sus potenciales efectos antimicrobianos e inhibitorios de la xantina oxidasa. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2005. 56p
- JIMÉNEZ I., Padilla C., Toxicidad aguda oral del *Xantium strumarium* L. (guizazo de caballo). *Revista Cubana de plantas medicas*. 1999. 1(4): p 30- 40
- KALCKAR H.M.. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 1947. 167: pp.429- 443
- KIM SF., HURI DA., SNYDER SH.. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science*. 2005. 310: pp.1966-1969.

- KOLESNIKOV "et al". Evaluation of the tail formalin test in mice as a new model to assess local analgesic effects, *Brain Research*, 2004. 1029: 217-223
- LLORET S, Moreno, G.. Effects of an antiinflammatory peptide (antiinflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and edema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol acetate application. *Biochemical Pharmacology*, 1995. 50 (3): 347- 353.
- MABRY T.J., MARKHAM K.R., THOMAS M.B.. The systematic identification of flavonoids. New York, USA. Ed. Springer- Verlag, 1970. 354 p.
- MACDONALD G.. A dictionary of Natural Products. Ed. Plexus Publishing, Inc Medford, U.S.A., 1997. 70p.
- MAZZANTI G. "et al". Biological evaluation of a polyvinyl siloxane impression material. *Dental Materials*, 2005. 21:371–374.
- MERCK. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel. Darmstadt, Alemania. Ed. Merck, 1972. 130 p.
- MIRANDA H.F., SIERRALTA F., PINARDI G.. Neostigmine interactions with nonsteroidal anti- inflammatory drugs. *Brain. Journal of. Pharmacology*, 2002. 135: 1591- 1597.
- MIRANDA H.F., LEMUS I., PINARDI G.. Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Brain research bulletin*, 2003. 61. 471- 425.
- MIRANDA-ROTTMAN S. "et al". Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation *in vitro* and protected human endothelial cells against oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. 50: 7542-7547
- MUÑOZ M., BARRERA E., MEZA S.. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile, Publicación ocasional N°33. Museo Nacional de Historia Natural. Santiago, Chile. 1981. pp 3, 37.
- NORO T.. Inhibitors of Xanthine oxidase from the flowers and bud of *Daphne genkwa*. *Chem. Pharm. Bull.*, 1992. 31 (11): 3984- 3987,
- OLIVARES B.. Efecto hepatoprotector de *Artemisa douglasiana* Besser. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. San Luis, Argentina

Universidad Nacional de San Luis. Facultad de Químicas, Bioquímica y Farmacia, 2001. 55p

- PÉREZ G.. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Revista Cubana de Investigación Biomédica, 2003. 22(1): 48-57.
- PINARDI G., SIERRALTA F., MIRANDA H.. Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail- flick test of mice. Pharmazie, 2003. 60 (7), 593- 43.
- RAHALISON L., "et al". A bioautographic agar overlay method for detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochemical Analysis, 1991. 2: 199-203.
- RODRÍGUEZ G., RODRÍGUEZ R., BARRALES H.L.. Plantas ornamentales chilenas. Concepción, Chile Ed. Anibal Pinto S.A., 2004. 38p
- SANZANA E.. Evaluación de la actividad antioxidante e inhibitoria de la formación de cataratas de *Amomyrtus meli* y *Aristotelia chilensis*. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Concepción, Chile. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Químicas, 2001. 63p.
- SILVA M.. En: Química de la Flora de Chile. O. Muñoz, Santiago, Chile Ed..Andes y Andes S.A., 1992. 153p.
- SILVA M. "et al". En: 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Gupta M, Colombia. Ed. Presencia Ltda., 1995. 261p.
- SIMMONS DL, BOTTING RM y HLA T.. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacological Reviews, 2004. 56: 387-437.
- SZABO KA, ABLIN RA, SINGH G. Matrix metalloproteinases and the immune response. Clinical and Applied Immunology Reviews, 2004. 4:295-319.
- THEODOLUZ C., PACHECO P., SCHMEDA- HIRSHMANN G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Chilean myrtaceae. Journal of Ethnopharmacology, 1991. 33: 253- 255.
- TORRES V., "et al". 2006. Actividad analgésica de las hojas de *Aristotelia chilensis*. En: Societa Italo Americana Di Etnomedicina (SILAE), 23 al 28 de septiembre del 2006. Perugia, Italia. pp. s.p.

- WAGNER H., BLADT S, ZGAINSKY E.. Plant drug Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. Springer- Verlag. Berlin Heidelberg, 1984. pp359- 362.
- WATSON W.H., "et al". Acta Crystallographica Section C- Crystal Structure Communications, 1989.Vol. 45, Iss SEP pp 1322-1324.
- WICHTL M., Anton R.. Plantes Thérapeutiques. 2^a èd.. París.Editions Tec & Doc., 2003. 692p.

GLOSARIO

%AO	: porcentaje de analgesia vía oral
%AT	: porcentaje de analgesia vía tópica
%D	: porcentaje de dolor
%EAIO	: porcentaje de efecto antiinflamatorio oral
%EAIT	: porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico
%I	: porcentaje de inflamación
%p/v	: porcentaje peso volumen
A	: absorbancia
AA	: ácido araquidónico
ATTC	: American type Culture Collections
c.c.f.	: cromatografía en capa fina
CE ₂₅	: concentración a la que se produce el 25% del efecto
CE ₅₀	: concentración a la que se produce el 50% del efecto
CI ₅₀	: concentración inhibitoria 50
DMSO	: dimetilsulfóxido
DPPH	: radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo
EDM	: extracto de diclorometano
EH	: extracto hexánico
EM	: extracto metanólico
EtOAc	: solución de acetato de etilo
FADM	: fracción alcaloídea de extracto de diclorometano
IR	: infrarojo
MeOH	: solución metanólica
mM	: micromolar
MPE%	: máximo efecto posible
MTT	: sal de tetrasolium
NP/PEG	: natural products/ polyethylene glycol reagent
<i>p.o.</i>	: vía oral

PDA	: potato dextrose agar
PDB	: potato dextrose broth
PII	: índice de irritación primaria
s.c	: subcutánea
S.D	: error estándar
s.n.m.	: sobre el nivel del mar
SEM	: error estándar de la media
SPI	: valor de irritación primaria
TPA	:12-miristato-13acetato forbol
TSA	: tryptic soy agar
TSB	: tryptic soy broth
UV	: ultravioleta
X	: solución de xantina
XO	: enzima xantino oxidasa
µL	: microlitros

ANEXO I. FOTOGRAFÍAS

Fotografías de *Aristolelia chilensis*; frutos, hojas y corte transversal.



A Frutos



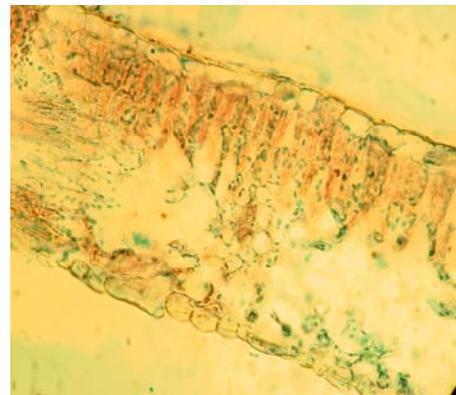
B1 Hoja entera



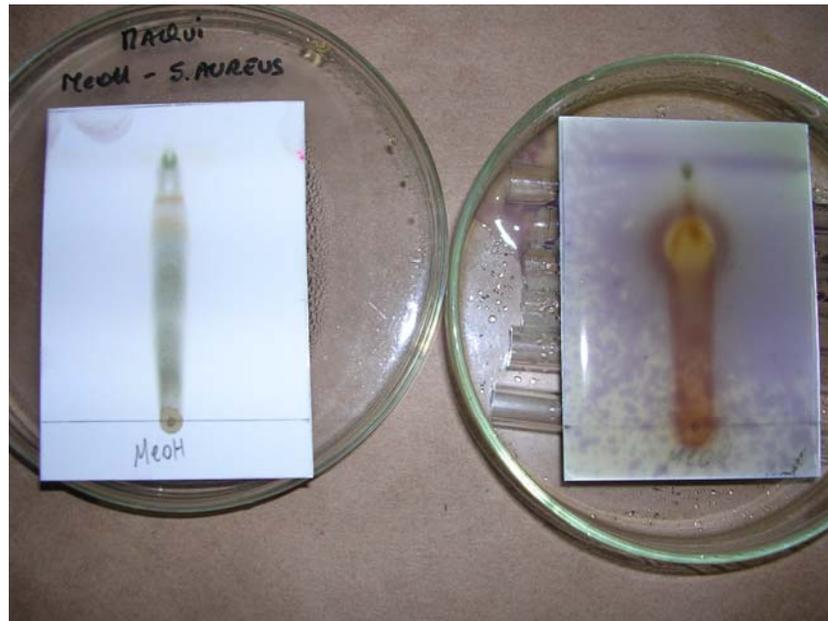
B2 Nervadura de la lámina foliar



C Cortes transversales de la lámina de la hoja



Fotografía de la Bioautografía del EM.



A
c.c.f. del EM

B
Bioautografía del EM
frente a *S. aureus*

ANEXO II. PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

Societa Italo Americana Di Etnomedicina (SILAE), Perugia, Italia, 23 al 28 de septiembre de 2006

Actividad analgésica de las hojas de *Aristotelia chilensis*

Torres V., Erazo S., Inostroza V., Silva X., Backhouse N., Miranda H., Negrete R., Muñoz O., Delporte C.

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Aristotelia chilensis (Eleaocarpaceae) n.v maqui es un árbol muy abundante que crece en terrenos húmedos con distribución entre la I y X Región de Chile. La medicina folclórica le atribuye a las hojas propiedades para aliviar afecciones de garganta y amígdalas. La mayoría de los estudios previos relacionados con esta especie, son referidos a los frutos, los que son explotados económicamente como alimento y fuente de colorantes.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad analgésica de las hojas de *Aristotelia chilensis*, con miras a validar su uso por parte de la medicina folclórica.

Después de recolectar las hojas, éstas fueron secadas, molidas y extraídas en forma sucesiva y hasta total agotamiento con disolventes de polaridad creciente, obteniéndose los extractos de hexano, diclorometano y metanol. Una vez eliminado totalmente el disolvente, los extractos fueron sometidos a los ensayos farmacológicos.

Para evaluar la actividad analgésica se utilizaron ratones a los que se le aplicó el extracto por vía tópica durante tres minutos y posteriormente la analgesia se evaluó mediante dos modelos: 1) **ensayo de formalina en la cola**: se inyectó la formalina en la cola como agente algésico. A continuación, se procedió a contar el tiempo de lamidas en la cola que realizaron los ratones durante cinco minutos 2) **ensayo del latigazo en la cola**: se indujo dolor agudo térmico utilizando un algésiómetro el que mide el tiempo en que el animal es capaz de soportar el calor.

Resultados: en ambos ensayos *in vivo*, los tres extractos presentaron efecto analgésico, siendo el extracto metanólico el de mayor actividad en ambos ensayos.

Agradecimientos: Proyecto FIA-ES-C-2005-1-A-040 y al Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) por los animales de experimentación.

IV Congreso de Químicos Farmacéuticos de la Industria Centro de eventos. Casa Piedra los días 18, 19 y 20 de abril del 2007.

LAS 3 M EN PRODUCTOS NATURALES

Farías M., Backhouse N., Peredo N., Goity L., Negrete R., Aguirre M.C., Silva X., Erazo S., Miranda H.F., Apablaza C., García R., **Torres V.**, Delporte C.

Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile

Las 3 M (murtilla, matico y maqui) son especies autóctonas cuyas hojas son utilizadas por la medicina folclórica como antiinflamatoria y analgésica. La murtilla (*Ugni molinae*, Myrtaceae), el matico (*Buddleja globosa*, Buddlejaceae) y el maqui (*Aristolelia chilensis*, Elaeocarpaceae).

Objetivos: demostrar su eficacia como analgésica y antiinflamatoria, mediante la aplicación de ensayos farmacológicos *in vivo* e identificar los principios activos.

Metodología: después de recolectar las hojas de cada especie, por separado éstas fueron secadas, molidas y extraídas en forma sucesiva y hasta total agotamiento con disolventes de polaridad creciente, obteniéndose los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo, y metanol. Una vez eliminado totalmente el disolvente, los extractos fueron sometidos a los ensayos farmacológicos. La actividad antiinflamatoria vía tópica fue evaluada en ratones a los que se les indujo una inflamación dérmica en la oreja con ácido araquidónico (AA) y 12-decanoilforbol 13-acetato (TPA), en ambos ensayos el extracto fue aplicado 5 min antes del agente inflamatorio. La actividad analgésica se determinó *in vivo* frente a distintos modelos farmacológicos (formalina en cola de ratón y tail flick). Los principios activos aislados por repetidas columnas cromatográficas e identificados por completos estudios espectroscópicos.

Resultados: el extracto de acetato de etilo de murtilla fue uno de los más activos, presentando significativos efectos antiinflamatorios y analgésicos, atribuyéndose estas propiedades a la presencia de los ácidos triterpénicos (alfitólico, corosólico y asiático). Por otra parte, el extracto etanólico de matico fue el que presentó mayor efecto de analgésico y antiinflamatorio. Los compuestos responsables de las actividades fueron los siguientes compuestos: 7-O - glucósido de luteolina, apigenina y quercetina, y el verbascósido. Finalmente, respecto del maqui, los extractos de diclorometano y metanólico fueron los que exhibieron la mayor actividad farmacológica.

Conclusiones: estos resultados permiten respaldar las propiedades atribuidas por la medicina folclórica a las hojas de las tres especies estudiadas.

Las importantes y significativas actividades farmacológicas encontradas para cada especie, justifican su uso por parte de la medicina folclórica y son fuente de principios activos para desarrollar preparados dermatológicos.

Agradecimientos. Proyectos: FIA-ES-C-2005-1-A-040, Proyecto N° Mult 04/22-2, Proyecto DID Salud 01/2000.

Simposio FAPRONATURA 20 al 24 de noviembre de 2006, Varadero, Cuba

Actividad antiinflamatoria y antimicrobiana de *Aristolelia chilensis*, especie nativa chilena

Delporte C., **Torres V.**, Erazo S., Silva X., Negrete R., Muñoz O., Backhouse N.

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Introducción: *Aristolelia chilensis* (Eleoocarpaceae) n.v maqui es un árbol muy abundante que crece en terrenos húmedos con distribución entre la I y X Región de Chile. La medicina folclórica le atribuye a las hojas propiedades para aliviar afecciones de garganta y amígdalas. La mayoría de los estudios previos relacionados con esta especie, son referidos a los frutos, los que son explotados económicamente como alimento y fuente de colorantes. El objetivo de este estudio fue evaluar las actividades antiinflamatoria y antimicrobiana de los distintos extractos obtenidos desde las hojas de *Aristolelia chilensis*, con miras a validar su uso por parte de la medicina folclórica. Resultados previos sobre la evaluación de la actividad analgésica mostraron que los diferentes extractos obtenidos desde las hojas exhibieron actividad analgésica.

Metodología: después de recolectar las hojas, éstas fueron secadas, molidas y extraídas en forma sucesiva y hasta total agotamiento con disolventes de polaridad creciente, obteniéndose los extractos de hexano, diclorometano y metanol. Una vez eliminado totalmente el disolvente, los extractos fueron sometidos a los ensayos farmacológicos. La actividad antiinflamatoria vía tópica fue evaluada en ratones a los que se les indujo una inflamación dérmica en la oreja con ácido araquidónico (AA) y 12-decanoilforbol 13-acetato (TPA), en ambos ensayos el extracto fue aplicado 5 min antes del agente inflamatorio. La actividad antimicrobiana se evaluó con el bioensayo bioautografía.

Resultados: en ambos ensayos *in vivo*, los tres extractos presentaron efectos antiinflamatorios, siendo el extracto de diclorometano el de mayor actividad antiinflamatoria tópica, 63,9 y 31,5% frente a TPA y AA respectivamente. Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana mostraron un leve efecto inhibitorio de todos los extractos sobre el crecimiento de *S. aureus*, *B. subtilis* y *E. coli* siendo activos los extracto de hexano y diclorometano en tanto que el extracto metanólico mostró actividad solamente *S. aureus*. No presentaron actividad frente a los hongos *C. albicans* ni frente a *S. cerevisiae*.

Agradecimientos: Proyecto FIA-ES-C-2005-1-A-040 y al Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) por los animales de experimentación.