



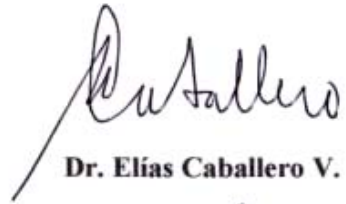
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Farmacología

**Determinación de la DL50 y de toxicidad retardada a siete días del extracto de
Allium Ampeloprasum en ratones**

**Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Grado de LICENCIADO EN
MEDICINA VETERINARIA.**

Catalina Verónica Román Barrientos
Valdivia Chile 2000

PROFESOR PATROCINANTE:



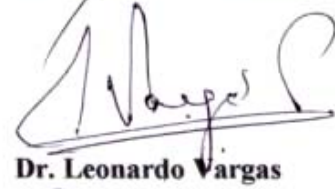
Dr. Elías Caballero V.

PROFESOR COPATROCINANTE:



Dr. Frederick Ahumada M.

PROFESORES CALIFICADORES:



Dr. Leonardo Vargas



Dr. Rafael Burgos A.

FECHA DE APROBACION:

19 de Octubre de 2000.

INDICE

1. Resumen	1
2. Summary	2
3. Introducción	3
4. Material y Método	9
5. Resultados	13
6. Discusión	17
7. Conclusiones	23
8. Bibliografía	24
Anexos	27
Agradecimientos	33

“DETERMINACION DE LA DL₅₀ Y DE TOXICIDAD RETARDADA A SIETE DIAS DEL EXTRACTO DE *Allium Ampeloprasum* EN RATONES”

1.RESUMEN

La evaluación toxicológica de los extractos acuosos de *Allium ampeloprasum*, mediante los estudios de toxicidad aguda y retardada a siete días se llevó a cabo con el objetivo de aportar información acerca de la inocuidad o toxicidad del extracto, además de ayudar a que el "ajo chilote" pueda ser validado como planta medicinal para que los agricultores de la Isla de Chiloé puedan comercializar este producto con un respaldo científico.

Se utilizaron 120 ratones Rockefeller, machos y hembras de aproximadamente 20 gramos de peso.

En el estudio de toxicidad aguda se emplearon cuatro series de 20 animales cada una (10 machos y 10 hembras), a las que se les administró el extracto por vía oral a tres series, dosis de 1.600 mg/kg, 6.400 mg/kg, y 25.600 mg/kg respectivamente. La cuarta serie se utilizó como grupo control y se le administró agua potable.

Después de administrar el extracto, se observaron a los animales en busca de letalidad durante 24 horas y aquellos animales que sobrevivieron fueron observados por una semana para evaluar la existencia de alguna reacción tóxica posterior. Una vez terminado el periodo de observación, se realizó la necropsia a todos los animales.

En el estudio de toxicidad retardada a siete días, se utilizaron series de 20 animales cada una (10 machos y 10 hembras), a los cuales se les administró diariamente, en el agua de bebida una dosis de 2.560 mg/kg. Para el grupo control se le administro agua potable durante los siete días. Los animales fueron observados durante ese periodo de tiempo, en busca de letalidad o signos de toxicidad. Posteriormente, todos los animales fueron sometidos a necropsia.

No se presentaron muertes en ninguno de los dos estudios. En el estudio de toxicidad aguda se observó disminución del reflejo palpebral y enderezamiento, al igual que una conducta pasiva, con la dosis más elevada utilizada.

A las dosis aplicadas, tanto en el estudio de toxicidad aguda como retardada, no hay indicio de toxicidad del extracto de *Allium ampeloprasum*.

**"DETERMINATION OF LD₅₀ AND THE SEVEN-DAY SUBACUTE TOXICITY OF
Allium Ampeloprasum EXTRACT IN MICE."**

2. SUMMARY

The toxicological evaluation of the aqueous extracts of *Allium ampeloprasum* by means of acute and seven-day subacute toxicology studies were done with the objective of giving information concerning the safety of the extract, as well as helping to validate the "elephant garlic" as a medicinal plant so that farmers from Chiloé Island may commercialize this product with scientific support.

One hundred and twenty Rockefeller mice, male and female with approximately 20 grams of body weight were used for the experiment.

In the acute toxicity study, four groups of 20 animals each (10 males and 10 females) were used. The extract was administered orally to three of the groups, at doses of 1600 mg/kg, 6400 mg/kg, and 25600 mg/kg. The fourth group, the control group was given tap water.

After the extract was administered, the animals were observed during 24 hours, looking for lethal effects. The animals that survived were observed throughout the rest of the week to evaluate the appearance of any toxic reaction. Once the observation period was over, a postmortem examination was done to all of the animals.

In the subacute toxicity evaluation, during the seven-day period, groups of 20 animals each (10 males and 10 females) were used. Daily, 2560 mg/kg of the extract was administered in the drinking water. The control group on the other hand received only drinking water during those seven days. The animals were observed during this time, looking for lethality and signs of toxicity. Afterwards, all of the animals were submitted to postmortem evaluation.

Death was not observed in any of the two studies. During the analysis of acute toxicity, a diminution of the palpebral and straightening reflex was noted, as well as having passive conduct, with the highest dose used.

As a result of the acute and subacute toxicity studies, one can conclude that there is no indication of toxicity *for Allium ampeloprasum* at the doses applied.

3. INTRODUCCION

3.1 MEDICINA TRADICIONAL Y FITOTERAPIA

La mística de qué comemos y de cómo los alimentos nos afectan, ha sido una de las preocupaciones básicas del hombre (Lewis, 1977).

Las primeras informaciones detalladas sobre hierbas y sus formas de empleo que se conocen provienen de la antigua China (Hoffmann, 1992).

En el siglo XI aparecen las primeras escuelas de medicina en Italia y, al mismo tiempo, los monasterios se convierten en los centros más importantes de estudio y cultivo de las hierbas medicinales (Hoffmann, 1992).

Hoy, alrededor del 80% de los habitantes del planeta cubren principalmente con medicamentos tradicionales sus necesidades de atención primaria de salud (Akerele, 1993).

En América Latina, con poquísimas excepciones, y dando espaldas a la realidad, seguimos perdidos en un mar de riquezas verdes. Esto es debido a una falta general de información sobre los beneficios que la planta medicinal nos brinda, no solamente para la salud, sino también para la economía. Como consecuencia de esta ignorancia, los países de esta región no tienen políticas acordes con las tendencias globales y descuidan la investigación y desarrollo en disciplinas indispensables, al lado de tener un total desconocimiento del mercado internacional, a pesar de las continuas recomendaciones e informes de la OMS y de muchas otras instituciones internacionales (Cabieses, 1995).

Dentro de los objetivos de una política nacional de medicamentos, se considera como primordial garantizar la seguridad del uso de los fármacos que se emplean en el país, mediante estudios farmacodinámicos, farmacocinéticos y de biodisponibilidad (Rivas, 1995).

Entre los estudios mencionados anteriormente hay que considerar la farmacognosia, ciencia que estudia todas las drogas simples, es decir, todas las materias primas naturales utilizadas como medicamentos y provenientes de los reinos animal, vegetal y mineral. Se ocupa de plantas que se utilizan en la alimentación y de las llamadas plantas tóxicas para el hombre y el ganado. (Magalhaes, 1999).

El término Medicina tradicional se refiere al uso de una amplia gama de preparados a partir de plantas utilizados ancestralmente y a los cuales se les atribuye propiedades curativas no siempre demostrados científicamente (Magalhaes, 1999).

Fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas, siendo una de las ramas más antiguas de la terapéutica, cuyo objetivo es restablecer el equilibrio interno por medio de las plantas medicinales (Magalhaes, 1999).

Los principios activos que se encuentran en los fitoterápicos son sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento. En todas las especies se puede encontrar al mismo tiempo principios activos y sustancias inertes; siendo estas últimas las que determinan la eficiencia del medicamento vegetal, al acelerar o enlentecer la absorción de los principios en el organismo (Briones, 1990).

Desde hace unos años existe una fuerte tendencia a medicarse con plantas, sin que se advierta el peligroso juego que representa el mal uso o abuso de conocimientos heredados por la tradición verbal (Magalhaes, 1999).

Si la fitoterapia o las plantas medicinales van a ser utilizadas para uso clínico, es esencial de que apruebe exámenes efectuados. La seguridad y eficiencia necesitan ser evaluadas y documentadas. Solo así los usuarios van a tener confianza en las plantas medicinales que van a ocupar. Sin importar el tiempo consumido o los costos en que se tiene que invertir, esto va a tener que ser sobrepasados si es que existe interés en utilizar la herencia de las plantas medicinales. Los mejores cerebros y recursos necesitan ser puestos, no sólo en el área de la estandarización, sino también en áreas tales como estudios farmacocinéticos con plantas, evaluaciones clínicas, desarrollo de modelos toxicológicos en el tercer mundo, donde más estas plantas son utilizadas. Sólo así se podría utilizar apropiadamente la fitoterapia o descubrir nuevas medicinas a partir de plantas en este nuevo siglo (Chaudhury, 1992).

La O.M.S. propone que un estudio sistemático del tema debería incluir los siguientes objetivos:

1. Inventario y clasificación terapéutica de las plantas;
2. Criterios científicos para asegurar la calidad de las preparaciones y su eficacia para el tratamiento de condiciones específicas y de algunas enfermedades.
3. Desarrollo de estándares internacionales;
4. Métodos para el uso seguro y efectivo de los agentes fitoterapéuticos, y
5. Crear Centros de Investigación Científica

No se pretende despertar la idea que solamente por su origen natural las plantas son elementos útiles. Para lograr, mediante su empleo, beneficios en salud deben cumplir los requisitos de todo fármaco, es decir, conocimiento de sus propiedades, efectos colaterales y adecuada prudencia en su utilización (Montes y col., 1992).

3.1 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

Paracelsus (1493-1541) dijo que "Todas las sustancias son venenos; no hay ninguno que no sea veneno. La dosis correcta diferencia el veneno del remedio" (Goodman and Gillman's 1996).

Según Loomis (1982), el único factor que determina el grado de nocividad de un compuesto es su dosis. A medida que aumenta la dosis de cualquier agente químico desde niveles mínimos a máximos, no aparecen súbitamente efectos indeseables sino que la respuesta, sea beneficiosa o perjudicial, es gradual y está relacionada con los progresivos cambios de la dosis.

Una de las observaciones más fundamentales que puede hacerse con respecto a cualquier efecto biológico de un agente químico es la relación existente entre la dosis (o concentración) y la respuesta obtenida.

A partir de lo anterior, es importante el estudio de la toxicología.

La toxicología es una disciplina científica que se preocupa de los efectos adversos de distintos agentes en los sistemas biológicos. Es un área multidisciplinaria que extrae información de diversas disciplinas relacionadas, que incluyen la biología, química, fisiología, inmunología, patología, farmacología, y salud pública (Kalant y col, 1998).

Según Jurado (1989), es la ciencia que estudia los efectos de las interacciones de las sustancias químicas con el organismo animal vivo, en las circunstancias que las rodean y con tendencia a una finalidad preventiva, y la valoración del riesgo del empleo de dichas sustancias.

La muerte de las especies experimentadas es la respuesta que más comúnmente es utilizada en pruebas toxicológicas ("toxicological testing") preliminares. Cuando una sustancia está siendo evaluada inicialmente, los rangos tóxicos específicos deben ser caracterizados. Generalmente, una dosis es administrada, y/o aumentada o disminuida hasta que un rango crítico haya sido encontrado. Este rango va desde que todos los animales sobreviven hasta que todos mueran. (Ottoboni, 1997).

DL significa dosis letal, y 50 significa que la dosis es agudamente letal para el 50% de los animales a quienes la sustancia en cuestión fue administrada bajo condiciones de laboratorio controlada. Un nivel "subíndice 0" significa que la dosis no fue letal para ninguno de los animales y un nivel "subíndice 100" significaría de que la dosis fue letal para el 100% de los animales. Las unidades de DL_{50} son mg/kg, que significa miligramos de la sustancia por kilogramo de peso corporal del animal. Mientras menor la DL_{50} , menor son los miligramos de la sustancia por kilogramo de peso corporal que es requerido para matar a los animales, y mayor es la toxicidad aguda. Viceversa, mientras mayor la DL_{50} , menor es la toxicidad aguda. DL_{50} y toxicidad aguda están inversamente relacionadas (Malachowski, 1995).

El término de dosis letal media (DL_{50}) es el más representativo de la toxicidad aguda de una sustancia y se empezó a desarrollar en 1927 por J.W.Trevan (Jurado, 1989).

El valor de la DL_{50} , está fundamentado en los numerosos factores que influyen en ella, los mismos que constituyen los factores que afectan la toxicidad, es decir:

1. La especie animal
2. La edad de los animales
3. El peso de los animales
4. El sexo de los animales
5. La línea genética
6. El estado sanitario
7. La dieta
8. La privación de alimento
9. El método de administración de la sustancia y su estado físico.
10. La temperatura ambiental

11. El alojamiento
 12. El período estacional
- (Jurado, 1989).

La experiencia demuestra que las variaciones biológicas en respuesta a una sustancia por individuos de una especie son generalmente pequeñas. La variabilidad biológica entre especies podría ser bastante amplia. El objetivo principal de la experimentación es cuantificar esa respuesta. Este es el propósito de los estudios de dosis-respuesta (Ottobani, 1997).

La relación dosis-tiempo muestra dos tipos distintos de toxicidad que deben ser distinguidos uno de otro: la toxicidad aguda de la crónica. La toxicidad aguda de una sustancia se refiere a la habilidad de ésta para producir daño sistémico como resultado de una exposición única a cantidades relativamente altas de la sustancia (Malachowski, 1995), o en ocasiones en multidosas recibidas en 24 horas (Jurado, 1989). La toxicidad crónica se refiere a la habilidad de una sustancia de producir daño sistémico como resultado de varias exposiciones repetidas durante un periodo prolongado de tiempo, en niveles relativamente bajos (Malachowski, 1995).

Los resultados o respuestas se desarrollan en un periodo de tiempo, por ende es importante establecer un periodo de observación fijo (Kalant y col., 1998), aunque normalmente es de 24 horas (Jurado, 1989) en el caso de la toxicidad aguda.

La información adquirida de un estudio de toxicidad aguda es la naturaleza de la relación dosis-respuesta y observaciones de efectos tóxicos y el tiempo que demoran los animales en morir, en el caso de que algún animal muera. Es importante que el rango de dosis utilizado sea lo suficientemente amplio para que los efectos tóxicos puedan manifestarse en las dosis más altas utilizadas, a menos que esto signifique utilizar dosis irreales en relación con la dosis esperada o vía de exposición generalmente utilizada. El rango de dosis y el método de administración van a estar influenciados por la vía que se esperaría utilizar y la probable dosis o concentración a utilizar (Timbrell, 1995).

Los estudios iniciales de toxicidad generalmente son realizados para determinar un rango aproximado de la dosis tóxica. A su vez, incluye la observación de animales con el fin de adquirir comprensión en los posibles efectos tóxicos (Timbrell, 1995).

Entre las pruebas de observación se encuentran los signos clínicos de comportamiento, como actividad o inactividad espontánea, agresividad, sedación, posiciones extrañas, lagrimeo, moqueo, excretas, disnea, piloerección, cianosis, características de las heces, tono muscular, posiciones anormales, etc., así como la muerte, que es una de las características más precisas de la toxicidad crónica y que dio lugar al concepto de dosis letal crónica. Todas estas observaciones deben realizarse diariamente (Jurado, 1989).

Estas determinaciones implican estudios integrales de las propiedades tóxicas; la demostración de dosis que no producen efectos negativos observables; el establecimiento de relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta; estudios quimicobiocinéticos y de biotransformación (Lu, 1992).

3.2 ALLIUM AMPELOPRASUM, INFORMACION BOTANICA Y PROPIEDADES

- **Nombre científico:** *Allium ampeloprasum*
- **Nombres populares:** Ajo chilote, Ajo blandino, Ajo elefante, Great headed garlic
- **Clase:** monocotiledóneas
- **Familia:** *Alliaceae* (*Liliaceae*)
- **Genero:** *Allium*
- **Especie:** *ampeloprasum*
(Celis 1997).

Esta especie y sus variedades botánicas son originarias de la zona comprendida entre el oeste de Portugal y el este de Irán. El *Allium ampeloprasum* se utiliza generalmente en huertos caseros y, ocasionalmente, en cultivos de poca extensión. En Chile, el cultivo de esta hortaliza se realiza fundamentalmente en huertas caseras de las regiones del sur, siendo la mayor producción en la IX y X región (Celis, 1999). Según la CORFO (1987), se cultiva en Chiloé y en otras zonas del país, La Serena, Santiago, y Valdivia.

Las características botánicas de ajo chilote son muy parecidas a las de ajo común, excepto por ser un hexaploide (48 cromosomas), la planta presenta una apariencia general mucho más robusta, con una mayor talla, un mayor ancho y largo de hojas, un bulbo muy grande, con aproximadamente 6 bulbillos de gran tamaño y otros pequeños, y un largo escapo floral con una gran umbela con flores blancas a púrpuras. Las flores rara vez llegan a formar semillas y, cuando éstas se forman serían estériles, por lo que se propaga a través de los bulbillos o dientes (Celis, 1999).

Está más relacionada, botánicamente, con el puerro que con el ajo verdadero. Forma una planta de tamaño grande, hojas anchas y gruesas. Su bulbo alcanza unos 8-10 cm de diámetro, cuyo peso es de unos 80-100 gramos, de color blanco-amarillento. Este "ajo" forma un tallo floral grueso y de 1-2 metros de longitud. Sus bulbillos tienen menos sabor y olor que el ajo verdadero. (CORFO, 1987).

Las características quizás más reconocidas del género *Allium* son su olor y sabor típicos, dados por compuestos azufrados que son liberados al dañarse o destruirse sus células. Estos compuestos han generado un renovado interés en el grupo, ya que presentan beneficios cada vez más reconocidos para la salud humana (Celis, 1999).

Entre los compuestos azufrados encontrados en los distintos tipos de *Allium*, el que se encuentra en mayor proporción y tiene mayor importancia es la aliina. Es un aminoácido azufrado, insaturado, de fórmula empírica $C_6H_{10}OS_2$ y precursor de la alicina, la cual es una molécula dienoica con un grupo sulfóxido, de fórmula empírica $C_6H_{10}OS_2$. Se forma al romperse la estructura del bulbo del ajo, cuando la aliinasa liberada produce la reorganización de dos moléculas de aliina; posee sólo un débil olor a ajo y tiene propiedades antienzimáticas, antitumorales y bactericidas (Adrián y Frangne, 1990).

Se han atribuido al ajo (*Allium sativum*) propiedades asociadas a la salud, los cuales incluyen actividad antibiótica, bociogénica debido al disulfuro, actividad fibrinolítica y prevención de enfermedades cardiacas, quizás en parte debido a la habilidad de algunos derivados de cisteína para disminuir el nivel de colesterol en la sangre y quizás, en parte, a la prostaglandina A1 (Schwimmers, 1981).

El ajo (*Allium sativum*) y otros con componentes organosulfurados relacionados han sido reportados de tener propiedades antioxidantes, antitumorales, antibióticos. (Wang y col. 1996).

Reacciones endocrinas, hormonales de extracto de ajo han sido reportadas en estudios experimentales, con ratas y gatos mostrando efectos estrogénicos y tipo ACTH. A su vez la ingestión de bulbo de ajos, extracto de ajo o aceite de ajo podría causar náusea, vómito, y diarrea, siendo este último atribuido al contenido de adenosina como laxante secretomotor (Keller y Hansel, 1992). También se encuentran presentes en la planta diversos fermentos, vitamina A y del complejo B. (Hoffmann, 1992).

Extractos de bulbos y aceite de ajo han sido reportado en demostrar acción bactericida, antiviral, antifúngico, de disminución del contenido de lípidos y colesterol, en prolongar el tiempo de sangría y coagulación, inhibir agregación plaquetaria, y incrementar las actividades fibrinolíticas (Keller y Hansel, 1992).

Lucero (1999) señala que el "ajo chilote" es considerado una planta hipotensora, el cual produce una disminución significativa de la presión arterial sistólica y diastólica. Lo mismo señaló Hoffmann (1992) para el *Allium sativum*. No es la misma planta, pero contienen en su mayoría los mismos componentes.

El ajo elefante contiene además una alta concentración de oligo y polifruetosacáridos (125-235mg/g), los cuales resisten la hidrólisis y digestión en el tracto intestinal superior del humano y por ende representa un edulcorante de bajas calorías (Losso y Nakai, 1997).

Como se puede observar, el ajo chilote tiene una variedad de propiedades benéficas, pero el objetivo de este trabajo es evaluar la toxicidad aguda de *Allium ampeloprasum*, al igual que los posibles efectos tóxicos que pudieran presentarse posteriormente, mediante el estudio de toxicidad retardada a siete días.

La hipótesis que se someterá a prueba en este trabajo es la siguiente: "El extracto de *Allium ampeloprasum* es tóxico, produciendo efectos letales, tanto en su exposición aguda como retardada".

4. MATERIAL Y METODO

4.1 LUGAR DE REALIZACION Y DURACION DEL EXPERIMENTO

El experimento se realizó en el Instituto de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, Provincia de Valdivia, X región.

El periodo experimental tuvo una duración de tres meses aproximadamente.

4.2 MATERIAL

4.2.1. Material Biológico:

En el estudio de toxicidad aguda se emplearon 80 ratones Rockefeller, adulto jóvenes de los cuales 40 eran machos y 40 hembras, de un peso de 20 gramos promedio al momento del experimento.

En el caso del estudio de toxicidad retardada, se utilizó 40 ratones, los cuales tenían las mismas características que aquellos empleados en el estudio de toxicidad aguda.

Los animales utilizados provenían del Bioterio de Experimentación del Instituto de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

4.2.2. Material Farmacológico:

Extracto acuoso liofilizado de *Allium ampeloprasum*, donado por el Sr. Alvaro Celis M. , Ing. Agr. de INIA, Remehue, Osorno y elaborado en el Laboratorio de la Dra. Juana Núñez, en el Instituto de Química de la Facultad de Ciencias.

4.3 METODO

4.3.1. Toxicidad Aguda:

4.3.1.1. Peso Corporal: Se pesó en función de seleccionar a los animales el día de inicio del trabajo. El peso se expresó en gramos.

4.3.1.2. Series Experimentales: Para seleccionar las dosis a utilizar en las series experimentales, se llevó a cabo un tanteo con lotes de cuatro animales.

La distribución de los animales se realizó en forma aleatoria en cuatro series de 20 ratones cada una (diez machos y diez hembras). A tres de las series formadas se les administró una concentración diferente de extracto y la cuarta serie se utilizó como grupo control. Las dosificaciones empleadas fueron las siguientes:

- **Serie 1:** Solución de extracto de *Allium ampeloprasum* en una concentración de 160 mg/ml y una dosis de 1.600 mg/kg de peso corporal.
- **Serie 2:** Solución de extracto de *Allium ampeloprasum*, en una concentración de 640 mg/ml y una dosis de 6.400 mg/kg.
- **Serie 3:** Solución de extracto de *Allium ampeloprasum*, en una concentración de 2.560 mg/ml y una dosis de 25.600 mg/kg.
- **Serie 4:** agua potable.

4.3.1.3. Condiciones Experimentales: Los ratones eran mantenidos en un ambiente con una temperatura controlada de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un ciclo de luz/oscuridad de 12: 12 h, cuyas horas luz correspondían al lapso comprendido entre las 07:30 y las 19:30 horas.

La experimentación se realizó durante el fotoperíodo de horas luz.

Los animales se mantuvieron en gavetas plásticas, con agua y alimento ad-libitum.

Previo al inicio de la experimentación se sometió a los animales a dos horas de ayuno, manteniéndolos en gavetas especiales, en las que se les daba agua ad-libitum. En estas gavetas permanecían por dos horas posteriores a la administración del extracto, luego de las cuales eran devueltos a sus gavetas originales en las cuales contaban con alimento y agua ad-libitum.

4.3.1.4. Procedimiento y tiempo de observación: La vía de administración utilizada fue la oral, utilizando para ello una jeringa con una sonda buco-esofágica de polietileno. La administración del extracto se realizó en una dosis única de 0.2 ml por animal, correspondiendo dicho volumen al 1% del peso corporal, excepto en la serie 3, en la cual se le administró en dos bolos de 0.2 ml cada vez, o sea 0.4 ml en total, el cual corresponde al 2% del peso corporal.

Luego de administrar el extracto a los animales, éstos fueron observados en busca de letalidad durante un día, en los siguientes intervalos de tiempo: a los 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 12 horas, y 24 horas.

Posterior a esto, los animales que sobrevivieron fueron apartados y observados a intervalos diarios por una semana, ante la eventual aparición de toxicidad retardada. Se empleó para esto la "Pauta de Observación Programada para Ratones" (Anexo 1).

Finalizado el tiempo de observación, todos los animales fueron sometidos a necropsia para visualizar la presencia o ausencia de procesos patológicos que no fueron visibles externamente. Para ello, se utilizó la pauta contemplada en el anexo 2, en la cual los siguientes órganos fueron examinados.

- Corazón
- Pulmones
- Hígado
- Bazo
- Ríñones

4.3.2. Toxicidad Retardada:

4.3.2.1. Fase experimental: En este estudio, se utilizaron dos lotes de animales, compuestos por veinte animales cada uno, los que tenían iguales características y bajo las mismas condiciones que los utilizados en el estudio de toxicidad aguda.

La cantidad de agua de bebida suministrada durante el fotoperíodo de oscuridad fue de 48 ml, dato que fue obtenido a partir de la tesis de Claudia González (1999).

Con el propósito de asegurar el consumo del extracto y para aumentar la avidez por el líquido en el caso de ser este poco palatable, los animales fueron sometidos a un ayuno de agua, dos horas previas a la administración del líquido. Se administró 2.560 mg/kg de extracto en 48 ml de agua.

4.3.2.2. Series experimentales: Los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos de 20 ratones cada uno; de los cuales diez eran machos y diez hembras.

Las series utilizadas para este estudio de toxicidad retardada fueron las siguientes:

- **Serie 1:** Solución del extracto de *Allium ampeloprasum* en una concentración de 256 mg/ml y una dosis de 2.560 mg/kg de peso corporal, aplicados en 48 ml de agua de bebida.
- **Serie 2:** Agua potable, en una cantidad de 48 ml.

4.3.2.3. Peso Corporal: Los ratones fueron pesados como lote entero, diariamente y a la misma hora durante todo el ensayo.

4.3.2.4. Condiciones experimentales: Los ratones fueron mantenidos en iguales condiciones ambientales, de bebida y de alimentación que el estudio de toxicidad aguda.

A los animales se les mantuvo en ayuno de agua durante dos horas previas a la administración del extracto.

Al finalizar la administración durante las 12 horas del fotoperíodo de oscuridad, se mantenían con agua potable por el resto del día.

4.3.2.5. Procedimiento y tiempo de observación: A los 48 ml de agua de bebida, se le adicionaron 2.560 mg del extracto de *Allium ampeloprasum*.

La administración del extracto se realizó por un período de siete días, en el lapso entre las 19:30 y las 7:30 horas, correspondientes al fotoperíodo de oscuridad.

Los animales fueron observados durante siete días, a partir del inicio del experimento, en busca de letalidad u otra alteración visible externamente, utilizando para ello una pauta de observación igual a la empleada para la evaluación de la toxicidad aguda. (Anexo 1).

Al terminar el periodo de observación, todos los animales fueron sometidos a necropsia, según la pauta del anexo 2. Los órganos examinados fueron: corazón, pulmones, bazo, hígado y riñones. Los órganos fueron enviados a la Universidad Iberoamericana, Santiago, para su análisis anatómico e histopatológico.

4.3.3.3. Análisis de los resultados:

4.3.3.1. Toxicidad aguda: Se realizó una descripción de los hallazgos correspondientes a la letalidad, comportamiento y necropsia.

4.3.3.2. Toxicidad retardada: Para letalidad y estudio del comportamiento se hizo una descripción de los hechos observados.

Se analizó el peso corporal de los grupos en estudio utilizando la prueba t de Student para establecer si existían o no diferencias significativas considerando $p \leq 0,05$ como significativo.

Para el análisis histopatológico, se empleó el método de escalamiento lineal de Likert, según Hernández y col. (1993).

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA.

5.1.1. Dosis letal media (DL₅₀)

La tabla N° 1 muestra los resultados de la administración de los extractos de *Allium ampeloprasum*.

- **Tabla N° 1:** Letalidad observada según dosis y sexo para *Allium ampeloprasum*.

<i>Dosis A.ampeloprasum</i>	<i>Machos</i>		<i>Hembras</i>	
<i>(mg/kg)</i>	<i>N^a ratones</i>	<i>N^o ratones muertos</i>	<i>N^o ratones</i>	<i>N^o ratones muertos</i>
1.600	10	0	10	0
6.400	10	0	10	0
25.600	10	0	10	0
Total	30	0	30	0

La tabla N° 1 muestra que no se observó letalidad en los extractos de *Allium ampeloprasum*, tanto en machos como hembras, con respecto a las dosis utilizadas.

5.1.2. Observación del comportamiento.

Posterior a la administración de los extractos se pudo observar una disminución leve del reflejo de enderezamiento, conducto pasiva y piloerección en sólo algunos casos que se mantenía hasta aproximadamente una hora post-administración en el caso de las dos primeras series. En el caso de la tercera serie, además de lo anterior, se observó además una disminución leve del reflejo palpebral en algunos casos, que en uno de ellos se mantuvo hasta 24 horas post administración.

5.1.3. Necropsias

En este estudio, ningún animal murió a las dosis utilizadas. Al realizar la necropsia no se encontraron diferencias entre los órganos de los animales tratados y los controles, excepto en un solo caso de los animales tratados en que se observó uno de los riñones pálido.

5.2. TOXICIDAD RETARDADA

5.2.1. Letalidad

No se observó letalidad en la dosis utilizada.

5.2.2. Observaciones post administración (siete días)

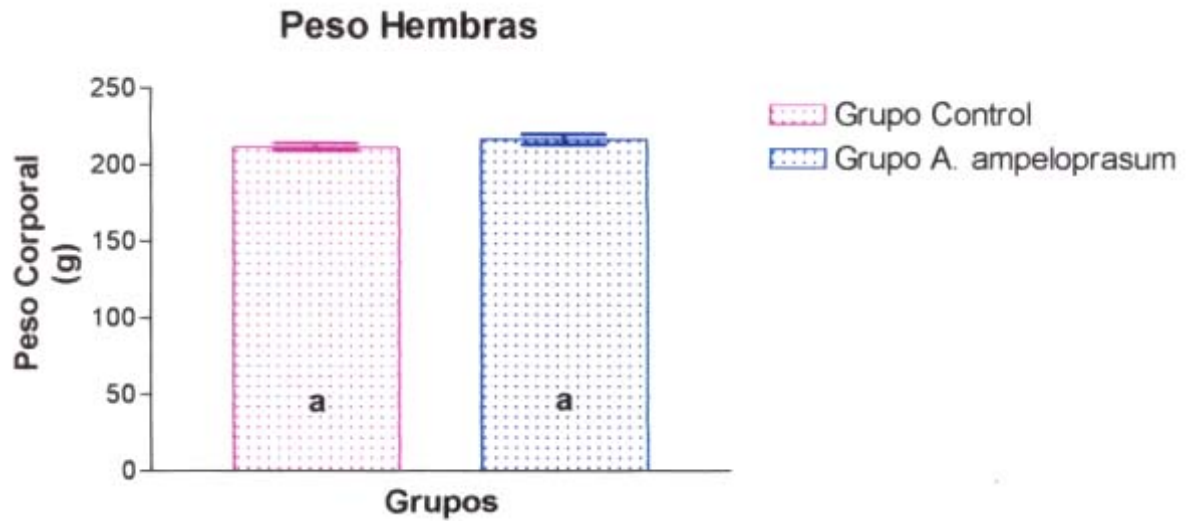
Al final de los siete días, no se encontró letalidad ni alteración del comportamiento en ninguno de los animales, tanto tratados como controles.

5.2.3. Peso Corporal

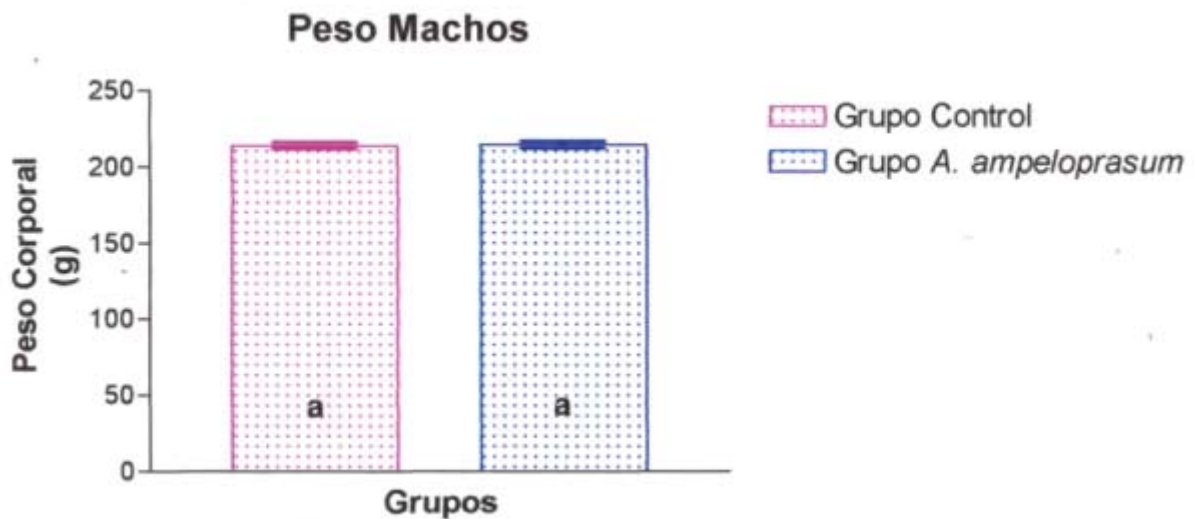
• **Tabla N° 2:** Muestra los pesos corporales de los animales tratados y de los controles, (machos y hembras) valores obtenidos todos los días.

PESO EN GRAMOS				
DÍA	CONTROL H.	EXTRACTO H.	CONTROL M.	EXTRACTO M
1	203	205	205	206
2	205	209	208	208
3	208	211	212	211
4	212	217	214	215
5	215	220	217	218
6	217	225	219	220
7	220	230	221	223

El análisis de los pesos corporales con la prueba de t de Student mostró que no existían diferencias significativas entre los grupos tratados y no tratados, tanto en las hembras como en los machos (Gráficos N° 1 y N° 2).



- **Gráfico N° 1:** Muestra los valores para los pesos de los grupos tratados y los controles en el caso de las hembras.



- **Gráfico N° 2:** Muestra los valores para los pesos de los grupos tratados y los controles en el caso de los machos.

5.2.4. Necropsia

No se observó alteraciones macroscópicas en los órganos examinados.

5.2.5. Análisis histopatológico

En el análisis histopatológico de hígado y riñones, el cual se analizó según la escala de Lickert, se observó nefritis intersticiales leves (Grado 1), patologías de carácter inflamatorio crónico, de origen infeccioso, tanto en machos como hembras, pero sin trascendencia para los fines del estudio. También se encontró una congestión renal intensa (Grado 3) y hemorragia renal en la zona medular (Grado 1) en el caso de las hembras tratadas. Sin embargo, la mayoría de las alteraciones se atribuyeron a la técnica de necropsia.

- Grado lesión 1: Leve
- Grado lesión 2: Moderado
- Grado lesión 3: Intenso

6. DISCUSION

El principal propósito de las pruebas de toxicidad es de proveer una base de datos que pueda ser utilizada para evaluar el riesgo (o peligro) a humanos asociados con la situación en que el agente químico, el sujeto, y las condiciones de exposición son definidos. Es evidente que la situación ideal es uno en que el agente, el sistema biológico, y las condiciones de exposición utilizados para las pruebas de toxicidad sean idénticas a aquellos para los cuales estas pruebas están siendo determinadas (Klaassen, 1986).

En esta situación, el agente y las condiciones (vía oral) son las mismas, aunque el sistema biológico cambia. El ratón y el humano son distintos seres, pero al ser ambos mamíferos, como dice Lu (1992), la mayoría de los efectos de las sustancias tóxicas son similares.

Existen dos principios que hay que tener en cuenta cuando se realizan tests de toxicidad en animales. Primero, los efectos producidos en los animales a causa de las sustancias administradas, cuando son correctamente utilizadas, si se aplican a toxicidad en el hombre. Cuando se calcula sobre la base de peso corporal, el humano generalmente es más vulnerable que los animales de experimentación. El segundo principio es que la exposición de animales de experimentación a agentes tóxicos en dosis altas es un método necesario y válido para descubrir posibles peligros a humanos que están expuestos a dosis mucho más bajas. (Goodman and Gillman's, 1996).

Según Malachowski (1995), los resultados deben ser aplicables a humanos en la base de dosis por unidad de valor y que la sobreexposición de animales a agentes tóxicos es necesario para descubrir los posibles peligros a humanos. Los tests de toxicidad no están diseñados para demostrar que una sustancia es inocua, sino más bien para caracterizar que efectos tóxicos un producto podría provocar.

La DL₅₀ es a veces utilizada para estimar las dosis letales para humanos; sin embargo, cuando se hace, debe ser reconocido que son basados en animales de experimentación. La razón y el juicio deben ser utilizados para poder traducir su significado a términos humanos. Cuando se utiliza una DL₅₀ oral para estimar la cantidad de sustancia que podría ser potencialmente letal para un niño o adulto, el peso de la persona (en kg) es multiplicado por el valor de la DL₅₀ para la sustancia en particular (en mg) (Kalant y col., 1998).

La determinación de la DL₅₀ se ha vuelto un asunto público por la creciente preocupación por la protección y bienestar hacia animales de laboratorio. Sin embargo, la DL₅₀ es esencial para caracterizar los efectos tóxicos de sustancias químicas y por ende determinando los peligros potenciales a humanos. En la determinación de la DL₅₀ se obtiene más que un número. Se obtiene información acerca de los tipos de efectos tóxicos producidos, sobre la aparición de toxicidad, la duración de toxicidad, etc. Esta información es esencial para el tratamiento racional de humanos expuesto a una sustancia determinada y para el diseño de experimentos que asesoran la toxicidad de la sustancia química a dosis repetidas (Klaassen, 1986).

6.1. ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA

6.1.2 Letalidad

En toxicología, la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) es generalmente el primer experimento utilizado en una sustancia analizada. En la práctica, es experimentalmente determinada comúnmente utilizando ratones o ratas y utilizando la vía oral u intraperitoneal como vía de administración. Como mínimo 10 ratones son utilizados por dosis (Klaassen, 1986).

En general, la rata y el ratón son los animales que se seleccionan para determinar la DL₅₀. Su preferencia emana del hecho de que son económicos, se consiguen con facilidad y son fáciles de manejar. Además, existen más datos toxicológicos acerca de estas especies de animales, hecho que facilita comparaciones de las toxicidades de otras sustancias químicas (Lu, 1992).

Por lo general los tóxicos deben administrarse por la misma vía por la cual seres humanos quedarían expuestos. La ruta oral es la que se utiliza más comúnmente. Cuando se ha de administrar una sustancia química por tal modo debe darse por alimentación forzada. Mezclar una sustancia química en la dieta tiene la desventaja de una dosificación imprecisa y generalmente reduce la toxicidad de la sustancia (Lu, 1992).

En este caso, los extractos de *Allium ampeloprasum* no presentaron letalidad en dosis de hasta 25600 mg/kg administrados por vía oral.

Al no producirse letalidad en los animales, fue imposible determinar la DL₅₀ exacta para los extractos de *Allium ampeloprasum* administrados por vía oral. En relación a esto hay que tener en consideración que como lo explica Jurado (1989), en la mayoría de los tóxicos, la magnitud de la respuesta biológica está relacionada con la dosis y no todos los individuos responderán con igual intensidad ante una misma exposición.

Ahora, en esta situación, no se aplicaron dosis mayores en el estudio porque no fue posible concentrar más el extracto tanto física como técnicamente, presentando dificultad para administrar el extracto a los ratones a mayores concentraciones.

A su vez, se debe pensar que la toxicidad de plantas varía con la parte de la planta evaluada, la maduración, crecimiento, y variación genética. Plantas cultivadas en algunas partes del país ó en ciertos años pueden ser tóxicas, pero pueden ser ingeridas con impunidad en otras ocasiones o lugares (Klaassen, 1986).

Dentro del extracto de ajo, el compuesto que se encuentra en mayor proporción es la aliina, que por una reacción enzimática se transforma en alicina y luego en disulfuro de alilo (Hoffmann, 1992).

Toxicidad aguda de alicina está caracterizado por valores de DL₅₀ de 120 mg/kg s.c y 60 mg/kg e.v. en ratones (Keller y Hansel, 1992). Al leer estos datos, hay que tomar en cuenta de que la alicina es un solo componente del ajo chilote, en el estudio realizado, se utilizo el extracto completo, pudiendo interactuar otras sustancias que afectarían su mecanismo de acción,

Incluyendo su potencial como tóxico. Además, hay que considerar el hecho de que las vías utilizadas por Keller y Hansel (1992) son distintas a aquella empleada en este estudio.

Para extractos de ajo (*Allium sativum*), el cual es comparable con *Allium ampeloprasum* por tener varios de los mismos componentes, los rango de valores de DL50 van entre 0,5 ml/kg y más de 30 ml/kg p.o, i.p y s.c. en ratones (Keller y Hansel, 1992).

Por otro lado, disulfuro de alilo, un componente de sabor del ajo fresco, ha sido demostrado en proteger en contra de toxicidad química-inducida y carcinosis en animales. (Wang y col., 1996).

Allium spp., particularmente *Allium sativum*, pero también *Allium ampeloprasum*, cultivados en climas helados, están sujetos a estrés, el cual se manifiesta en una disminución de la síntesis de metil tiosulfatos, posiblemente por una destrucción selectiva de aliinasa metil específica (Lawson y Hughes, 1991). El ajo utilizado, proveniente de la zona sur, contempla de un clima frío, lo que significaría que están bajo estrés, provocando una disminución en sus componentes y como resultado una posible disminución de sus efectos tóxicos.

6.1.3. Observaciones post administración (siete días).

Primero, simplemente registrando la muerte no es una vía adecuada de conducir un estudio con una nueva sustancia. Un elemento esencial es realizar una observación cuidadosa, disciplinada y detallada del animal intacto extendiéndose desde el tiempo de administración del tóxico hasta la muerte del animal (Klaassen, 1986).

La observación debe ser de por lo menos una semana y con los datos obtenidos se puede llegar a ciertas conclusiones respecto del centro y mecanismo de la acción de los compuestos sometidos a prueba (Loomis, 1982).

Durante este tiempo se observó una disminución del enderezamiento, conducta pasiva y disminución del reflejo palpebral. Tal comportamiento podría atribuirse a un efecto de tipo depresor a nivel central o por una caída en la presión. Se tendría que realizar mayores estudios para llegar a una conclusión más clara.

6.1.4. Necropsias

Deben practicarse necropsias globales a todos los animales que hayan muerto y también cuando menos a algunos de los sobrevivientes, en especial aquellos que sean patológicos a la terminación del experimento. La necropsia puede proporcionar información útil acerca del órgano objetivo, especialmente cuando la muerte no se presenta poco después de la administración de la dosis (Lu, 1992).

Durante la examinación, sólo se observó en un caso riñones pálidos, el cual según Straffus (1987), se debería a la posición al momento de morir. En el cadáver, el riñón superior aparece pálido y blanquecino, o sea no se podría atribuir este efecto al *Allium*.

6.2. TOXICIDAD RETARDADA

6.2.1. Letalidad

Se señala que la administración debe realizarse todos los días, pues se ha observado que, si se efectúa cinco días de la semana, en lugar de los siete, el descanso de las 48 horas puede permitir la recuperación de los efectos tóxicos (Jurado, 1989).

Durante la evaluación, no se observó letalidad a la dosis empleada, lo que significa que a 2560 mg/kg en 48 ml de agua por siete días no es letal, lo cual es coincidente con lo que ocurrió en el estudio de toxicidad aguda.

Los seres humanos están expuestos con mayor frecuencia productos químicos en niveles mucho más bajos que los que son agudamente fatales, pero están expuestos en periodos o tiempos más largos. Para evaluar la naturaleza de los efectos tóxicos en estas situaciones más reales, se realizan estudios de toxicidad a corto y a largo plazo (Lu, 1992).

6.2.2. Observaciones post administración (siete días)

El periodo de observación debe ser lo suficientemente largo para que no se omitan los efectos retardados, entre ellos la muerte. El periodo suele ser de 7-14 días (Lu, 1992).

La exposición aguda de los agentes que son rápidamente absorbidos probablemente van a producir efectos tóxicos inmediatos, pero la exposición aguda también puede producir toxicidad retardada que puede o no ser similar a los efectos tóxicos de la exposición crónica. Viceversa, la exposición crónica de un agente tóxico puede producir algunos efectos inmediatos (tipo agudo) después de cada administración, además de los efectos de la toxicidad crónica. Al caracterizar la toxicidad de un agente en específico, es evidente que la información requerida no es solamente para la dosis única (aguda) y retardada, sino para las exposiciones de duraciones intermedias (Klaassen, 1986).

La toxicidad diferida depende de tres principales factores: la dosis, el compuesto químico y la reiteración. Ello comporta como consecuencia que en la toxicidad diferida no sólo es suficiente conocer los efectos inmediatos de las sustancias tóxicas, sino que también interviene el tiempo de administración de dosis pequeñas (Jurado, 1989).

En estudios de toxicidad crónica con extractos de ajos (*Allium sativum* y otros de la familia *Alliaceae*) demuestra retardo en el crecimiento y heridas estomacales. También se ha reportado reacciones alérgicas (dermatitis por contacto y ataques asmáticos) a las sustancias que contiene el ajo, que sería alicina y disulfuro de alilo (Keller y Hansel 1992).

Durante este análisis, no se observó letalidad ni alteración en el comportamiento en los animales evaluados, tanto en los tratados como los controles. Esto puede deberse al hecho de que

el tiempo de observación fue menor a los estudios realizados anteriormente por Keller y Hansel (1992), los cuales tuvieron una duración de dos años.

Muchos de los síntomas de una intoxicación crónica leve se demoran en desarrollarse; por eso, la conexión entre exposición y enfermedad pueden estar opacadas (Kalant y col, 1998).

6.2.3. Peso corporal

En general, la cantidad de un veneno que se necesita para producir síntomas tóxicos se halla en relación con el peso del animal, ya que el peso indica la cantidad de tejido expuesto a la acción del veneno. Por esta razón, es preferible indicar las dosis letales medias en términos de unidades de peso (Garner, 1970).

Ahora, para poder relacionar lo anteriormente dicho con los seres humanos, estos son cualitativamente similares a otros animales en la respuesta a sustancias tóxicas. Este hecho forma la base de la extrapolación de datos de animales a humanos. Sin embargo, existen diferencias cuantitativas entre especies. Como regla, los seres humanos son más susceptibles que los animales, en especial cuando la dosis se expresa en términos de mg/kg de peso corporal, por prudencia, se considera que los seres humanos son más sensibles en ausencia de cualesquiera datos que demuestran lo contrario (Lu, 1992).

En relación al presente estudio, de los gráficos N° 1 y 2 se observa que existe un aumento de peso, aunque leve de los grupos tratados, tanto machos como hembras, respecto a los grupos controles. Al analizar los pesos corporales con la prueba t de Student, este demostró que no existían diferencias significativas al hacer las comparaciones entre machos y entre hembras (control y tratados). Esto indica la baja toxicidad del extracto, pues como lo señala Lu (1992), la pérdida de peso corporal es un índice simple pero sensible de los efectos tóxicos.

6.2.4. Necropsia

Microscópicamente, no se observó alteración en los órganos examinados.

6.2.5. Análisis histopatológico

Un estudio de letalidad comúnmente está respaldado por un examen histológico de los órganos y tejidos principales en busca de alteraciones. De estas observaciones, uno generalmente puede obtener información más específica de los eventos que llevan al efecto letal, órgano(s) afectados, y a veces sugiere el posible mecanismo de toxicidad (Klaassen, 1986)

De los órganos examinados, solo el riñón evidenció alteraciones y solamente en el caso de los tratados, tanto en las hembras como en los machos.

Las sustancias tóxicas son eliminadas del cuerpo por varias vías. El riñón es un órgano importante para la excreción de los venenos, y más sustancias químicas son eliminadas del cuerpo por esta vía que cualquiera otra (Klaassen, 1986).

En relación a la congestión más intensa observada, según Thomson (1988) estaría presente en animales que mueren en decúbito lateral, o sea, según la posición en que se encontraba el animal al momento de morir.

La hemorragia renal (zona medular) leve, tendrían dos explicaciones, ya sea por trauma directo a los riñones o por trastornos de la sangre, como hemofilia o Coagulación Intravascular Diseminada (**C.I.D**) (Thomson, 1988). En este caso, es más probable la primera, ya que se hubieran presentado otro tipo de signología antemortem en cualquiera de las otras dos opciones.

Según el análisis histopatológico realizado, el daño sería atribuible al estrés sufridos por los animales al momento de la muerte y no a causa del extracto de *Allium ampeloprasum*.

7. CONCLUSIONES

El extracto acuoso de *Allium ampeloprasum* no es tóxico por vía oral a las dosis administradas y no presenta toxicidad aguda en dosis de hasta 25.600 mg/ kg.

Igualmente, no se observó efectos letales ni signos histopatológicos graves según la escala de Lickert, a la dosis utilizada en el estudio de toxicidad retardada.

8. BIBLIOGRAFIA

- ADRIAN, T., R. FRANGNE. La Ciencia de los Alimentos de la A a la Z. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- AKERELE, O. 1993. Las Plantas Medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud: Revista Internacional de Desarrollo Sanitario*. 14, (4), 390-395. O.M.S., Ginebra.
- BRIONES, F. 1990. Manual de Medicina Veterinaria Homeopática. Editorial Universitaria San Francisco. Santiago, Chile.
- CABIESES, F., S. RIVAS, 1995. En: 2° Congreso de Plantas Medicinales-Chile 95. 28 al 31 de Octubre. Centro el Canelo de Nos, San Bernardo, Chile.
- CELIS, A. 1997. Ajo Chilote en la X Región: En Busca de Calidad y Manejo Agronómico. *Tierra Adentro*. N° 14: 26-28. St-INIAB. Chile.
- CELIS, A. 1999. Ajos Chilotes o Blandinos: Una importante alternativa de exportación. *Agroanálisis*. pp. 36-37. Osorno, Chile.
- CHAUDHURY, R. 1992. Herbal Medicine for Human Health. World Health Organization. New Delhi, India.
- CORFO, 1987. Monografías Hortícolas: ajo, cebolla, coliflor, repollito de bruselas, pimentón y ají haba. Universidad Católica de Chile, Santiago.
- GARNER, R.J. 1970. Toxicología Veterinaria. 3ª Edición. Editorial Acribia, España.
- GOODMAN and GILLMANS. 1996. The Pharmacological Basis of Therapeutics. International Edition. 9th Edition. The McGraw-Hill Companies. U.S.A.
- GONZALEZ, C. 1999. Determinación de la DL50 y estudio de toxicidad retardada a siete días de extractos de *Stachytarpheta cayennensis* en ratones. Tesis, M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia. Chile.
- HERNANDEZ, R., C. FERNÁNDEZ, P. BAPTISTA. 1993. Metodología de la Investigación. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México.
- HOFFMANN, A. 1992. Plantas Medicinales de Uso Común en Chile. 2ª Edición. Ediciones Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile.
- KALANT, H., W. ROSCHLAV, MCGUIGAN, WELLS. 1998. Principles of Medical Pharmacology. 6th Edition. Oxford University Press, New York, U.S.A.

- KELLER, K., R. HANSEL. 1992. Adverse Effects of Herbal Drugs. Vol.I. Edited by P.A.G.M. Berlin, Germany.
- KLAASSEN, C 1986. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 3rd Edition. Macmillan Publishing Company, New York.
- LAWSON, L.D., B.G. HUGHES. 1991. HPLC Analysis of Allicin and other Thiosulfinates in Garlic Clove Homogenates. *Planta Medica*. 57, (3), 263-270.
- LEWIS, W. 1977. Medical Botany Plants Affecting Man's Health. Wiley-Interscience Publication. New York, U.S.A.
- LOOMIS, T. 1982. Fundamentos de Toxicología. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- LOSSO, J.N., S. NAKAI. 1996. Molecular Size of Garlic Fructooligosaccharides and Fructopolysaccharides by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 45, (11), 4342-4346.
- LU, F. 1992. Toxicología Básica: Riesgos por exposición a sustancias tóxicas. Editorial Harla S.A. México.
- LUCERO, A. 1999. Evaluación del efecto sobre la presión arterial de extractos **de *Allium Ampeloprasum***. Tesis, M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.
- JURADO, R. 1989. Toxicología Veterinaria. 2^a Edición. Salvat Editores S.A. Madrid, España.
- MAGALHAES, H. 1999. Farmacología Veterinaria. Temas Escoltados. Livraria e Editora Agropecuaria. Brasil.
- MALACHOWSKI, M.J. 1995. Health Effects of Toxic Substances. Government Institute Inc. Rockville, Maryland, U.S.A.
- MONTES, M.T; L. WILKOMIRSKY, L. VALENZUELA. 1992. Plantas Medicinales. Edición de la Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- OTTOBONI, M.A. 1997. The Dose That Makes the Poison. 2nd Edition. International Thomson Publishing Company.
- STRAFUSS, A. 1987. Necropsy: Procedures and Basic Diagnostic Methods for Practicing Veterinarians. Charles C. Thomas Publisher. Illinois, U.S.A.
- SCHWIMMERS, S. 1981. Source Book of Food Enzymology. The Avi Publishing Company Inc. Conneticut, U.S.A.

TIMBRELL, J.A. 1995. Introduction to Toxicology. 2nd Edition. Taylor and Francis. London, U.K.

THOMSON, R.G. 1988. Special Veterinary Pathology. B.C. Decker Inc. Toronto, Canada.

WANG,E., Y. LI., M. LIN., L. CHEN., A. STEIN., C. YANG. 1996. Protective Effects of Garlic and Related Organosulfur Compounds on Acetaminopheninduced Hepatotoxicity in Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 136, (1), 146-154. Academic Press Inc. New Jersey, U.S.A.

ANEXO 1

PAUTA DE OBSERVACION PROGRAMADA PARA RATONES

Efectuado por:

Evaluado por:

Fecha	:	Animal N°	:	Filiación	:
Solvente	:	Sexo	:	Color	:
Concentración	:	Peso	:	ml adm.	:
Dosis	:	mg/kg	:	Tiempo	:
Extracto	:				

TIEMPO POST ADMINISTRACION	10	30	1	6	12	24	2	3	4	5	6	7
Disminución act. motora												
Aumento act. Motora												
Perdida refl. Enderezamiento												
Reflejo palpebral												
Lagrimación												
Mucosas pálidas												
Mucosas hiperémicas												
Mucosas cianóticas												
Erección de cola												
Piloerección												
Diarrea												
Agresivo												
Pasivo												
Atemorizado												

Sobrevivencia al completar el experimento:

Tiempo de muerte post administración :

ANEXO 2**PAUTA DE NECROPSIA****1. CORAZÓN**

Latiendo:

Detenido:

Tamaño aumentado:

Comentario:

2. HIGADO

Normal:

Peteq. Hemorr.:

Tamaño aumentado:

Comentario:

3. BAZO

Normal:

Peteq. Hemorr.:

Tamaño aumentado:

Atrofiado :

Comentario:

4. PULMONES

Normal:

Petequiado Hemorrágico:

Comentario:

5. RIÑONES

Normal:

Petequiado Hemorrágico:

Comentario:

6. PARED PERITONEAL

Comentario:

ANEXO 3

- Valores estadísticos obtenidos a partir de las mediciones diarias de peso corporal en el estudio de toxicidad retardada.

	Hembras Control	Hembras Tratadas	Machos Control	Machos Tratados
N° de valores	7	7	7	7
Mínimo	203.0	205.0	205.0	206.0
Máximo	220.0	230.0	221.0	223.0
Media	211.4	216.7	213.7	214.4
Desviación Standard	6.347	8.995	5.823	6.347
Error Standard	2.399	3.400	2.201	2.399
Bajo 95%	205.6	208.4	208.3	208.6
Sobre 95%	217.3	225.0	219.1	220.3
Test de Normalidad				
Distancia KS	0.1417	0.1659	0.1423	0.1417
Valor de P	P>0.10	P>0.10	P>0.10	P>0.10
Pasa test normalidad	sí	sí	sí	sí
Resumen de valor de P	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo

ANEXO 4

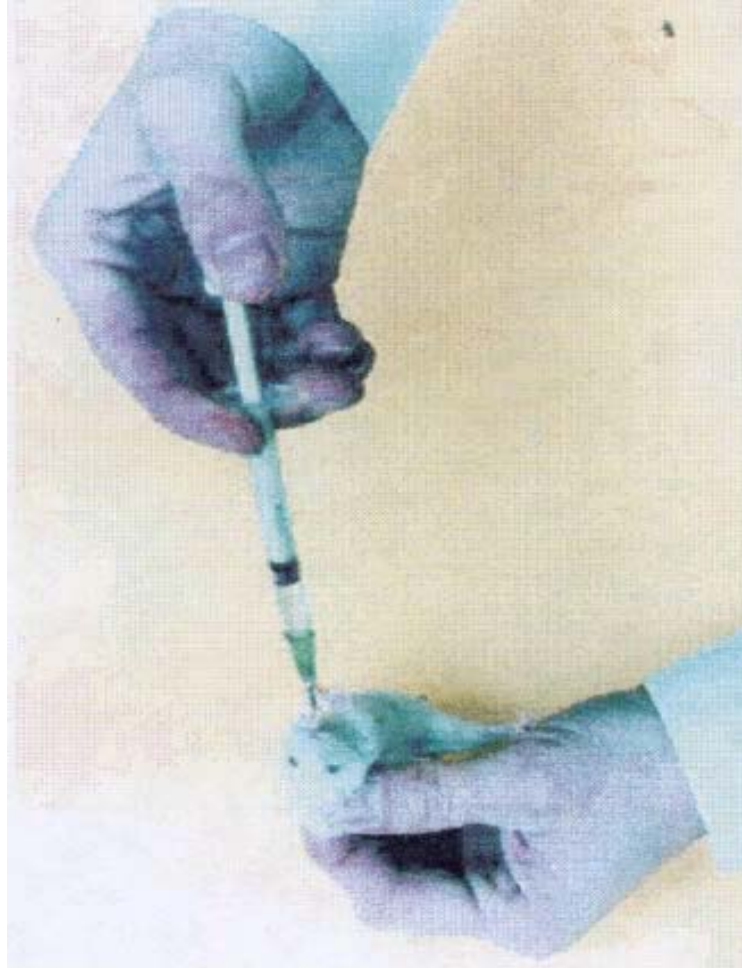


FOTO 1: Método de administración de *Allium ampeloprasum* en ratones.

ANEXO 5



FOTO 2 : *Allium ampeloprasum* "ajo chilote"

ANEXO 6



FOTO 3: Comparación entre *Allium sativum* (ajo común) y *Allium ampeloprasum* (ajo chilote).

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me ayudaron en forma directa e indirecta en el desarrollo de esta tesis, Muchas Gracias:

- Dr. Elías Caballero V., profesor patrocinante, por su ayuda, orientación y comprensión con mis viajes al extranjero.
- Dr. Frédérick Ahumada M., profesor copatrocinante, por su ayuda y cooperación en el desarrollo de este trabajo.
- Dr. Marcos Moreira por su gran disposición a recibir consultas y entregar valiosas sugerencias.
- Dr. Flavio Briones, por su ayuda con el estudio histológico realizado a los órganos evaluados.
- Dra. Bárbara Fertilio G. por realizar los cortes histológicos.
- Sr. Alvaro Celis M., Ing. Agr. quien donó los ajos, sin los cuales hubiera sido posible el trabajo.
- Sra. Nury Sánchez por la preparación de los extractos utilizados en este trabajo.
- Sr. Darío Salazar por su ayuda en el manejo de los animales durante la parte experimental de la tesis.
- Sra. Juanita Vargas, por su buena disposición.
- Sr. Raúl Vela del Instituto de Fisiología, por su cooperación con los materiales para la parte práctica de la tesis.
- Srta. Francis Carrasco por ser una buena amiga, estando en las buenas y las malas, y por su paciencia cuando estaba soñando.
- Sr. Luis Améstica por su ayuda computacional.
- Sr. Giorgio Stingo y Jorge Oyarce por su ayuda en la toma de fotografías.
- A todos mis amigos de la escuela que me han apoyado, aconsejado y entregado una gran amistad.