



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

Profesor Patrocinante
M.Sc. ELIANA SANCHEZ M.
Instituto de FARMACIA
Facultad de CIENCIAS

Profesor Co-patrocinante
M.Sc. JUANA NUÑEZ D.
Instituto de QUIMICA
Facultad de CIENCIAS

CARACTERIZACION QUIMICA DE EXTRACTOS DE "PALO BRUJO"
(*Latua pubiflora* (Griseb.) Phil.), CON PROPIEDADES DEPRESORAS DEL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL, Y SU CARACTERIZACION FARMACOLOGICA EN RATONES

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al título de Químico Farmacéutico

MARCO ANTONIO ROJAS CARDENAS

VALDIVIA – CHILE

2002

Este trabajo está dedicado a mi Madre, agradezco
todo lo que me ha entregado, el apoyo, el amor,
los valores y su esfuerzo.

Agradecimientos

A la profesora Eliana Sánchez por haberme permitido trabajar con ella y por la orientación y apoyo prestado para llevar a cabo este proyecto.

A la profesora Juana Nuñez por compartir conmigo su tiempo, experiencia y apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

A Joel Pardo Rivas por su gran e importante ayuda y colaboración en el desarrollo de este trabajo de tesis.

A los profesores: Sra. Rita Fuchslocher (Instituto de Prod. Animal), al Sr. Francisco Marin (Instituto de Bioestadística), a la profesora Susan Hess (Instituto de Química) por su disposición a atender mis consultas.

A la Sra. M. Quiñones, Srta. M.T. Carmóna y al Sr. J.C. Paredes por compartir su laboratorio y colaboración en la preparación de los extractos.

A Vivian, Vicente y Lukas por hacerme la vida mucho más feliz y darme más razones por las cuales seguir luchando.

A los amigos que estuvieron dispuestos a compartir su tiempo, su ayuda y apoyo cuando lo solicité: Carlos Smith, Javier Rodríguez, Leonardo Manque, Marcela Boeckemeyer, Cristina Mónfil y Dahiana Nicolas.

A todos los profesores del Intituto de Química y del Instituto de Farmacia de la Universidad Austral de Chile

El presente trabajo de tesis contó con el financiamiento del
Proyecto DID S 2001-67 de la Dirección de Investigación de
la Universidad Austral de Chile

INDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Summary | 2 |
| 3. Introducción | 3 |
| 3.2 Formulación de la Hipótesis | 8 |
| 3.3 Objetivo General | 9 |
| 3.4 Objetivos Específicos | 9 |
| 4. Materiales y Método | 10 |
| 4.1 Reactivos | 10 |
| 4.2 Planta | 12 |
| 4.3 Preparación del extracto Alcaloideo | 12 |
| 4.4 Preparación del extracto sin Alcaloides | 13 |
| 4.5 Preparación de la fracción que contiene cumarina sin alcaloides (extracto cumarínico) | 13 |
| 4.6 Reconocimiento de compuestos en los extractos | 15 |
| 4.6.1 Reconocimiento de alcaloides y cumarina por comparación con estándares, en cromatografía en capa fina | 15 |
| 4.6.2 Comparación de compuestos presentes y estándares por HPLC | 16 |
| 4.6.3 Determinación del rango de mayor absorvancia de los extractos mediante espectroscopía UV visible. | 16 |

| | |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.7 Dosis de los extractos | 16 |
| 4.8 Animales | 17 |
| 4.9 Estudios conductuales | 17 |
| 4.9.1 Tiempo de sueño inducido por pentobarbital | 17 |
| 4.9.2 Laberinto elevado en cruz | 18 |
| 4.10 Análisis estadístico | 21 |
| 5. Resultados | 22 |
| 5.1 Reconocimiento de alcaloides y comparación con estándar | 22 |
| 5.2 Reconocimiento de cumarinas y comparación con estándar | 27 |
| 5.3 Test conductuales | 28 |
| 5.3.1 Efecto sobre el Tiempo de Sueño Inducido por Pentobarbital | 28 |
| 5.3.2 Efecto sobre el test de Laberinto Elevado en Cruz | 29 |
| 6. Discusión | 32 |
| 7. Literatura Citada | 39 |

1.0 Resumen.

Latua pubiflora es un arbusto nativo, pertenece a la familia de las Solanáceas y crece en el sur de Chile. Un estudio previo, *in vivo*, demostró producir en ratones efectos sedante, ansiolítico e incoordinación motora. Otro estudio *in vitro*, en membrana de corteza de rata, demostró el desplazamiento del [H^3]Flunitrazepam de su sitio de unión.

En presente trabajo se prepararon tres extractos de *Latua pubiflora* los cuales fueron probados en el test de sueño y en el laberinto elevado en cruz, para evaluar sus efectos sedantes y ansiolíticos, respectivamente. El análisis químico de los extractos demostró la presencia de al menos cinco alcaloides, dos de los cuales son atropina y escopolamina. Un compuesto en común entre los extractos es escopoletina, una cumarina que también se encuentra en una cantidad importante en *Latua pubiflora*.

El objetivo del trabajo es evaluar la interacción de algún compuesto presente en *Latua pubiflora* con el receptor GABA_A-Benzodiazepinico, mediante el uso del laberinto elevado en cruz y el antagonista del receptor, Flumazenil. El compuesto aludido, se encuentra en el extracto alcaloideo de *Latua pubiflora* ya que el resultado obtenido fue una reversión del efecto ansiolítico, evaluado en el test del laberinto.

El extracto alcaloideo tiene propiedades sedante y ansiolítica que involucran la participación del receptor GABA_A; el extracto no alcaloideo presenta propiedad sedante no asociada a GABA_A. Escopoletina no presenta propiedades depresoras del Sistema Nervioso Central. Los extractos alcaloideo y no alcaloideo alteran la actividad locomotora, este efecto no es revertido por Flumazenil, antagonista Gabaérgico.

2.0 Summary

Latua pubiflora, is a native shrub of the Solanaceas family that grows in the south of Chile. A previous study, *in vivo*, has demonstrated sedative effects, anxiolytic action and motor incoordination, in mice. Another study *in vitro*, in cortex membrane of rat, demonstrated the displacement [H^3]Flunitrazepam from GABA_A receptor.

In the present study , three extracts of *Latua pubiflora* were assayed in the sleeping time test and in the elevated plus-maze test, in order to evaluate its sedative and anxiolytic effects, respectively. The chemical analysis of the extracts demonstrated the presence of at least five alkaloids, two of which are atropine and scopolamine. Scopoletin, a coumarin, is the mayor compound present in alkaloid and non-alkaloid extracts.

The aim of this work is to evaluate the possible interaction between some compound present in *Latua pubiflora* and the GABA_A-benzodiazepine receptor, through the reversion of the anxiolytic effect in plus-maze test produced by Flumazenil, antagonist of GABA_A. The results revealed that such a compound is present in the alkaloid extract of *Latua pubiflora*.

The alkaloid extract has sedative and anxiolytic properties that involve the participation of the GABA_A receptor. The non-alkaloid extract does not present sedative effect associated to GABA_A. Scopoletin does not present depressant properties of the Central Nervous System. The alkaloid extracts and non-alkaloid extract alter the locomotor activity and this effect is not reverted by Flumazenil.

3.0 Introducción.

Por siglos las plantas medicinales han sido uno de los pilares de la medicina tradicional, como tratamiento de diversas enfermedades. Debido a que la medicina herbácea está muy arraigada en la población y al gran interés que ha despertado en la actualidad el uso de productos naturales, se hace necesario garantizar la inocuidad de su uso y de los productos derivados de ella.

A menudo se afirma que las plantas por su origen natural no son tóxicas, tampoco se puede generalizar y afirmar que sí lo son, ya que la actividad de cada planta depende y está relacionada con los constituyentes químicos que contienen y en la medida que podamos conocer más estos constituyentes tendremos la posibilidad de ampliar su utilización, a partir de éstos encontrar nuevos agentes terapéuticos o simplemente dar la voz de alerta de lo peligroso que resultarían (Montes y col, 1992).

Como decía Paracelso: “ todo tóxico puede ser un remedio y un remedio puede ser un tóxico, todo depende de la dosis”, de esto se puede deducir que no existen plantas tóxicas, sino un uso indebido de ellas. “El Palo de los Brujos”, nombre como se conoce a *Latua pubiflora*, hace alusión al uso que se le daba a la planta y a las características mágicas que se le atribuyen por el estado de euforia y alucinaciones que produce después de la administración de una infusión de ésta, lo que es descrito por el antropólogo Juan Carlos Olivares en su libro “El umbral roto”, en donde se relatan “Prácticas alucinógenas entre los moradores de la Cordillera de la Costa”.

Su nombre científico *Latua pubiflora* (Grisev.) Phil., proviene del nombre que los mapuches le daban a esta planta: “Latué, Latúe o Latuy”; que es una contracción de los vocablos “Latue-hue” que literalmente significa “lo que causa la muerte”, con esta

definición se reconocen las propiedades venenosas de la planta y el uso que se hacía de ella en ciertos rituales mágicos realizados por las machis (Ramírez, 1979). *Latua pubiflora* es un arbusto nativo que crece en el sur de Chile, en un área restringida de la Cordillera de la Costa, entre Valdivia y Chiloé (40° a 43° de latitud sur). En la provincia de Valdivia prospera entre 500 y 900 metros de altitud, más al sur desciende al nivel del mar. El Latué es un arbusto espinoso que mide de 3 a 5 metros de altura, pertenece a la familia de las Solanáceas.

Las Solanáceas constituyen una importante familia de plantas herbáceas, a veces arbustos, propios de los países cálidos y templados. Desde el punto de vista químico, las Solanáceas se caracterizan por proporcionar a la terapéutica principios activos de naturaleza alcaloídea, que son clasificados como: derivados del núcleo del tropano (hioscinamina, atropina y escopolamina), nicotina (alcaloide volátil que se encuentra en el tabaco) y glucoalcaloides esteroídeos o solaninas (Gros y col, 1985).

En un estudio previo de *Latua pubiflora* se analizó un extracto de la planta, este extracto fue preparado siguiendo el método general para la obtención de alcaloides, con lo cual se obtuvo un extracto que al análisis cromatográfico, placa fina sílica gel, mostraba la presencia de al menos cinco alcaloides, dos de los cuales fueron identificados como atropina y escopolamina, los otros alcaloides no se han aislado aún dado que se encuentran en baja concentración. Este extracto, se probó, *in vivo*, en ratones y los resultados mostraron un aumento en el tiempo de sueño inducido por pentobarbital, no así en el periodo de latencia, produce incoordinación motora en el test de rodillo rodante, efecto ansiolítico y depresor de la actividad motora en el laberinto elevado en

cruz y efecto antidepresivo caracterizado por una disminución del tiempo de inmovilidad en el nado forzado (Reyes, 2000).

Atropina y escopolamina, son antagonistas competitivos de las acciones del neurotransmisor Acetilcolina y otros agonistas muscarínicos; compiten con dichos agonistas por un sitio de fijación sobre el receptor muscarínico. Los receptores muscarínicos están situados en las terminales postganglionares autónomas y las acciones que se clasifican como muscarínicas comprenden: inhibición cardíaca, vasodilatación periférica, contracción de la pupila ocular, aumento de la salivación y del flujo de la mayoría de las glándulas secretoras, y contracciones y acción peristáltica de los tractos gastrointestinales y urinario (Foye y col, 1995).

Atropina y escopolamina difieren desde el punto de vista cuantitativo en sus acciones antimuscarínicas, sobre todo en su habilidad para afectar el Sistema Nervioso Central. La base de esta diferencia es, probablemente, la mayor permeación de la escopolamina a través de la barrera hematoencefálica. A dosis terapéuticas (0.5 a 1.0 mg), la atropina produce solo excitación vagal leve, como resultado de estimulación del bulbo raquídeo y de los centros cerebrales superiores. Con dosis tóxicas de atropina, se vuelve más notable la excitación central, y esto da por resultado inquietud, irritabilidad, desorientación, alucinaciones o delirio. Con dosis aún mayores, la estimulación va seguida de depresión, que culmina en colapso circulatorio e insuficiencia respiratoria después de un periodo de parálisis y coma. La escopolamina genera, a dosis terapéuticas, en condiciones normales depresión del SNC que se manifiesta por somnolencia, amnesia, fatiga e incapacidad de ensoñación, con reducción de la etapa de sueño de movimientos oculares rápidos. También produce euforia y, por tanto, es

motivo de cierto abuso. Este compuesto origina a veces excitación, inquietud, alucinaciones o delirio, estos efectos excitadores, que semejan a las dosis tóxicas de atropina, se producen con regularidad después de administrar grandes dosis de escopolamina (Goodman y col, 1996). Especies vegetales tales como *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* y varias representantes del género *Datura* son conocidas por su toxicidad, debido a alcaloides del tropano (White, 1994).

El extracto alcaloideo de *Latua pubiflora*, en un estudio posterior, en experimentos *in vitro*, mostró comportarse como un agonista competitivo del receptor benzodiazepinico al desplazar de su sitio de unión al [H^3]Flunitrazepam (Sánchez y col, 2001). Teniendo en cuenta estos dos estudios y la similitud que se observa con los efectos farmacológicos de un grupo de drogas muy conocido, como son las benzodiazepinas, se trabajará con diferentes extractos, para determinar la fracción en la cual se encuentra el o los compuestos que pudieran estar interactuando con el receptor Benzodiazepinico y establecer una correlación de las observaciones *in vitro* con aquellas *in vivo*.

El mecanismo de acción molecular de las benzodiazepinas, se basa en dos hechos fundamentales: facilita la transmisión fisiológica de carácter inhibitor mediada por GABA y se fijan en el Sistema Nervioso Central a sitios específicos con una afinidad que guarda estrecha relación con su potencia. Las benzodiazepinas interactúan en el SNC en forma específica con un receptor, el receptor $GABA_A$ -benzodiazepinico, que es miembro de una superfamilia genética de canales iónicos asociados a receptores, es una glucoproteína heterooligomérica compuesta posiblemente por cuatro subunidades

(α , β , γ y δ). De las distintas combinaciones de estas subunidades se forman distintos tipos de receptores los cuales se diferencian tanto en su ubicación como en los ligandos para los cuales presentan el sitio de unión (Siegel y Buhr, 1997). Es posible asociar la ocupación creciente de estos receptores con una acción progresiva, expresada en efectos de intensidad creciente, esta progresión se inicia con el efecto ansiolítico cuando la ocupación de receptores es baja. Avanza hacia el efecto anticonvulsivante y sedante, y culmina con la actividad miorelajante cuando la ocupación es máxima (Florez, 1997).

Se ha encontrado otros compuestos, tanto endógenos como exógenos, los cuales poseen afinidad con el receptor, e incluso con el mismo sitio de unión, pero que presentan actividades farmacológicas distintas. Estos son los agonistas inversos los que al interactuar con el receptor benzodiazepínico interfieren con la acción del GABA disminuyendo la frecuencia de apertura del canal, provocando así acciones opuestas a las benzodiazepinas clásicas. El Flumazenil es el primer antagonista benzodiazepínico introducido en el arsenal terapéutico, se trata de un agonista parcial con una mínima actividad intrínseca (Florez, 1997). Estudios en ratones han demostrado que el Flumazenil al ser más potente que las benzodiazepinas desplaza en dosis muy bajas a éstas del receptor, esta capacidad ha hecho que se use para revertir la unión de ciertos fármacos al sitio de unión de benzodiazepinas (Maruyama y col 1998), en dosis bajas (0.3 mg/kg); y presenta efectos ansiogénicos a dosis elevadas (5.0 a 20.0 mg/kg)(Lee y Rodgers, 1991).

Los efectos de sedación, hipnosis, disminución de la ansiedad, relajación muscular, amnesia anterógrada y actividad anticonvulsiva son los efectos más relevantes que producen las benzodiazepinas por sus acciones sobre el Sistema Nervioso Central (Goodman,1996). Los efectos de sedación, ansiolítico e incoordinación motora producidos por el extracto alcaloideo de *Latua pubiflora* asemejan a los de las benzodiazepinas y podrían deberse a un mecanismo común.

En este estudio mediante el uso del laberinto elevado en cruz y la administración conjunta de extractos de *Latua pubiflora* y un fármaco que es antagonista del receptor GABA_A-benzodiazepinico, el Flumazenil, siguiendo la metodología descrita por Lee y Rodgers (1991) y Maruyama y col.(1998), se estudiará, en ratones, el efecto del extracto alcaloideo y de aquellos extractos que den resultados positivos en el test de sueño y el test del laberinto elevado en cruz, lo cual podría entregar evidencia significativa en cuanto a la acción farmacológica, de uno o más compuestos presentes en estos extractos, con el receptor GABA_A-benzodiazepinico y elucidar si es el mecanismo involucrado en los efectos observados.

3.1 Formulación de la Hipótesis.

Los efectos psicomotores observados en ratones luego de la administración de un extracto de *Latua pubiflora* nos hace pensar que: “ existe por lo menos un componente en dicho extracto cuyos efectos se deben a su interacción sobre el receptor farmacológico GABA_A-Benzodiazepinico”.

3.2 Objetivo General.

Estudiar los efectos psicofarmacológicos de dos extractos y fracciones de extractos de *Latua pubiflora* sobre el Sistema Nervioso Central en ratones, y un posible sitio de acción de estos componentes.

3.3 Objetivos Específicos.

- Determinar si los efectos psicofarmacológicos observados en ratones, al administrar extractos de *Latua pubiflora*, se deben a la presencia de alcaloides del tropano o a otros compuestos presentes en la planta.
- Evaluar en forma cualitativa, por cromatografía en capa fina y HPLC, la composición de los dos extractos principales (alcaloídeo y no alcaloídeo) y además de alguna fracción de extracto de la misma planta.
- Estudiar la influencia de la administración intraperitoneal de ambos extractos de *Latua pubiflora*, sobre el periodo de latencia y tiempo de sueño inducido por pentobarbital en ratones.
- Determinar y relacionar la acción ansiolítica y actividad motora de ambos extractos de *Latua pubiflora*, administrados intraperitonealmente en ratones, por medio del Laberinto Elevado en Cruz.
- Evaluar la influencia sobre el receptor GABA_A-benzodiazepínico del o de los extractos que hayan resultado positivos en los tests anteriores, por medio del uso del fármaco antagonista de este receptor, Flumazenil.

4.0 Materiales Y Método.

4.1 Reactivos:

- Como fármaco depresor del Sistema Nervioso Central: Pentobarbital (Nembutal[®]), laboratorio SIGMA.

Nombre IUPAC: 5-etil-5-(1-metil butil)-2,4,6-trioxohexahidropirimidina

- Como fármaco ansiolítico de referencia: Diazepam (Valium[®]), laboratorio Roche.

Nombre IUPAC: 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2-H-1,4-benzodiazepin-2-ona.

- Como fármaco antagonista del receptor benzodiazepínico: Flumazenil (Lanexat[®]), laboratorio Roche

Nombre IUPAC : etil-8-fluoro-5,6-dihidro-5-metil-6-oxo-4H-imidazol(1,5)(1,4) benzodiazepin-3-carboxilate.

- Controles : Tween 80 10%, laboratorio Merck.
- Para preparación del extracto alcaloídeo:
 1. Acido clorhídrico: HCl (Merck).
 2. Cloroformo: triclorometano CHCl₃(Merck).
 3. Etanol de 95° (Merck).
 4. Amoniac acuoso: hidróxido de amonio (Merck).

5. Tween 80 (Merck).

- Para preparación del extracto sin alcaloides.

1. Acetato de etilo (Merck)

2. Eter de petróleo (Merck)

3. Tween 80 (Merck).

- Para identificación de alcaloides:

1. Reactivo Dragendorff

- Para placas de cromatografía en capa fina (CCF) y eluyentes:

1. Metanol (Merck).

2. Acetona: propanona (Merck).

3. Cloroformo: triclorometano CHCl_3 (Merck).

4. Hidróxido de sodio: NaOH (Merck).

5. Sílica gel (Merck).

- Para HPLC:

1. Metanol grado HPLC (Merck).

2. Fosfato diácido de potasio: KH_2PO_4 (Merck).

3. Agua destilada grado HPLC (Merck).

4.2 Planta.

La planta en estudio, *Latua pubiflora*, fue recolectada durante el mes de diciembre de 1999, en la cordillera de la costa de la provincia de Valdivia. La identificación taxonómica de la autenticidad de la especie recolectada fue realizada por el botánico, Licenciado en Ciencias, Sr. Carlos Lehnebach del instituto de Botánica de la Universidad Austral de Chile. Un ejemplar se encuentra en el Herbario del Instituto de Botánica de la Universidad Austral de Chile.

4.3 Preparación del extracto Alcaloideo.

La preparación de este extracto se realizó de la misma forma como lo hizo Reyes (2000) en su estudio. Se orientó a la obtención general de alcaloides, para lo cual se utilizó una técnica de extracción sólido-liquido a temperatura ambiente (Montes y cols,1992).

Se pesó 0.5 Kg de hojas y ramas, secas y molidas y se dejó macerar por 24 horas en dos litros de etanol con ácido clorhídrico al 1%, se filtró en papel filtro Whatman N°1. Este procedimiento se realizó tres veces para agotar la extracción. Al extracto soluble en etanol se le agregó 0.5 L de agua, se filtró nuevamente para separar restos de resinas y grasas que precipitan y se neutralizó con amoníaco hasta pH 11; posteriormente se realizó una extracción con cloroformo tendiente a obtener alcaloides base. La fase acuosa y clorofórmica se separaron en un embudo de decantación y el extracto clorofórmico se concentró en un rotavapor, formándose una solución pastosa.

A esta solución se le extrajo los restos de agua en un liofilizador. Finalmente el extracto seco se suspendió con tween 80 al 10% en agua bidestilada para su administración en los animales.

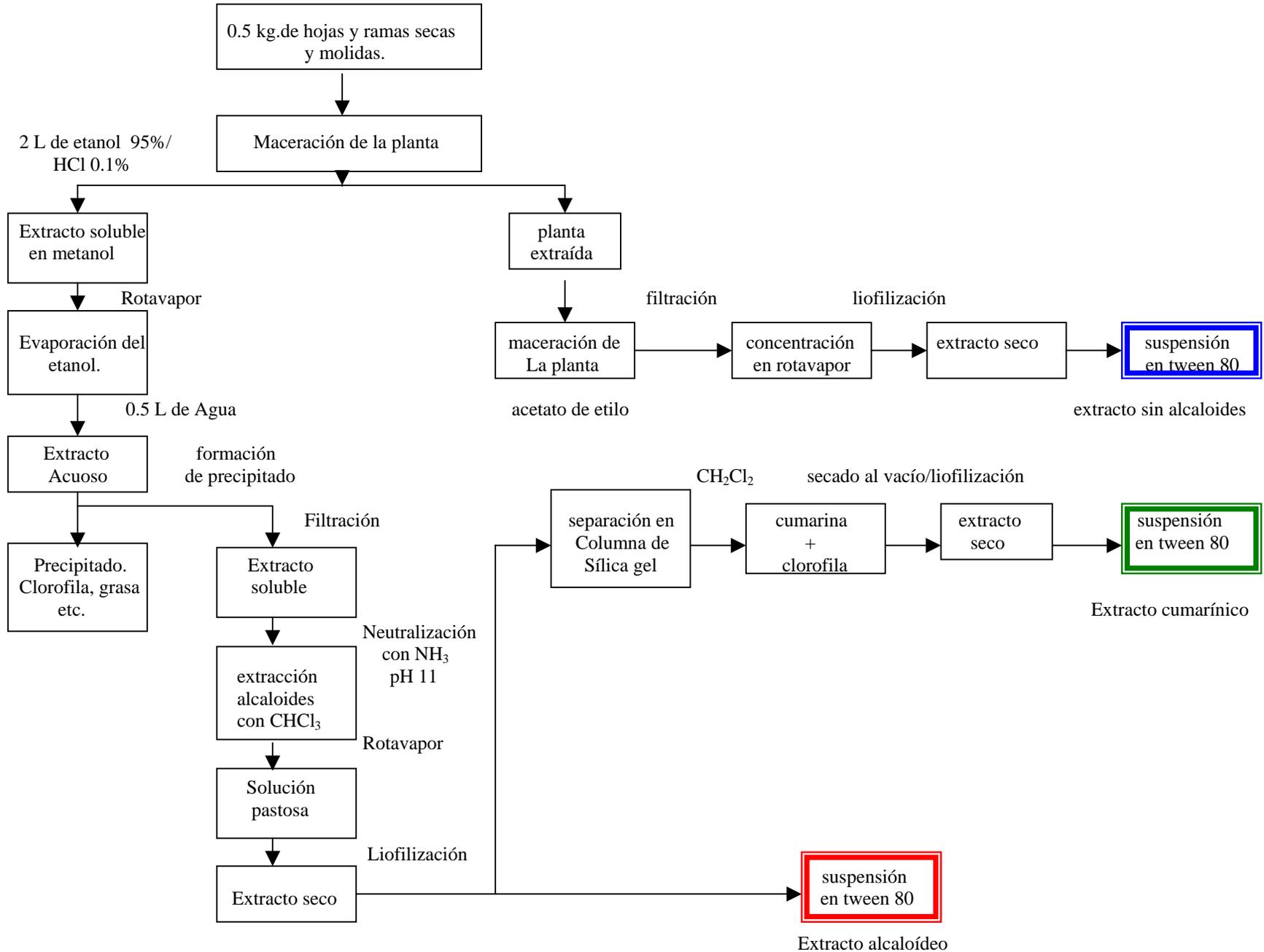
4.4 Preparación del extracto sin alcaloides.

La preparación de este extracto se hizo en la planta previamente usada para extraer los alcaloides, se tomaron 0.5 Kg de planta molida y se dejaron macerar por 24 horas en aproximadamente 2 L de acetato de etilo luego se filtra. Este procedimiento se realizó tres veces para agotar la extracción. Este extracto luego se concentró en el rotavapor y se liofilizó para finalmente suspenderlo en tween 80 al 10%.

4.5 Preparación de la Fracción que contiene cumarina sin alcaloides (extracto cumarínico).

La preparación de esta fracción se hizo a partir del extracto alcaloideo, mediante una separación en columna de sílica gel, usando solventes de polaridad creciente, se separó con diclorometano una fracción en la cual, según HPLC el 97% del extracto es escopoletina, este extracto se secó al vacío y se liofilizó y posteriormente se suspendió en tween 80 10% para ser administrado a los ratones.

Flujograma N°1: Preparación de los extractos de *Latua pubiflora*.



4.6 Reconocimiento de compuestos en los extractos.

Para realizar la identificación de los compuestos presentes en los extractos de *Latua pubiflora* se realizaron tres estudios cualitativos:

4.6.1 Reconocimiento de alcaloides y cumarina por comparación con estándares, en cromatografía de capa fina.

Esto se llevó a cabo con la técnica de cromatografía en placa fina de sílica gel, para lo que se usó como solución de revelado el reactivo de Dragendorff, el cual indica la presencia de alcaloides, coloreándolos de color naranja y para visualizar las cumarinas se usó la luz ultravioleta, las cuales presentan, en general, una intensa fluorescencia azul o azul-verdosa, por lo que es muy fácil detectarlas cromatográficamente (Gros y col, 1985). Se tomaron los extractos, alcaloideo, sin alcaloides y la cumarina aislada, se colocaron una pequeña cantidad en la placa. Se usó como eluyente una solución de 5 partes de cloroformo y 1 de metanol. Se tomó la placa se llevó a la luz UV y aparecen las cumarinas de color azul a la misma altura en los diferentes compuestos, después de esto se pulveriza solución de Dragendorff sobre la placa y se deja secar, esto revela la presencia de alcaloides con una mancha de color naranja.

4.6.2 Comparación de compuestos presentes y estándares por HPLC.

La cromatografía líquida de alta resolución permite, mediante diferencias en el tiempo de retención en la columna, tener una separación de los compuestos y poder comparar con un estándar en las mismas condiciones. Esto además permite una estimación de las proporciones en las cuales se encuentran los componentes dentro del extracto.

4.6.3 Determinación del rango de mayor absorbancia de los extractos mediante espectroscopía UV visible.

Consiste en hacer un barrido por las longitudes de onda de absorción UV de cada extracto, lo cual permite determinar cuál es el rango en el que se encuentran los diferentes componentes y así permite acotar el rango en el cual haremos las mediciones en el HPLC.

4.7 Dosis de los extractos.

La dosis del extracto alcaloideo a usar será 150 mg/kg, la misma usada en el estudio de Reyes (2000), ya que este será el control positivo para este estudio. La dosis del extracto sin alcaloides a usar es 150 mg/kg, determinada según los resultados del HPLC, y resultados en test de sueño. La dosis del extracto cumarínico se determinó considerando porcentaje de escopoletina presente en los extractos anteriores según HPLC, 7.5 mg/kg.

4.8 Animales.

Los animales usados en este estudio fueron ratones de la especie *Mus musculus*, de la cepa Rockefeller, machos de dos meses de edad con pesos entre 30 y 45 g adquiridos en el vivero del Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile,. El lugar de experimentación fue el laboratorio de la escuela de Química y Farmacia, lugar al cual los animales eran trasladados con 24 horas de anticipación para su habituación donde se mantenían con ciclos de luz de 12 h, agua y alimentación *ad libitum*, y temperatura ambiente de 21° C aproximadamente, Los tests se realizaron entre el periodo de tiempo comprendido entre las 12 y 17 horas, ya que los animales tienen un ritmo circadiano y es en este momento del día en que su actividad diurna es máxima (Paeile y Saavedra, 1990).

4.9 Estudios Conductuales.

Los tests conductuales se realizaron en sesiones separadas, en cada sesión se trabajó con un grupo control.

4.9.1 Tiempo de sueño inducido por pentobarbital.

El test de sueño inducido por pentobarbital es un modelo que permite evaluar la capacidad hipnótica de una droga, la cual es evaluada por el periodo de latencia, periodo que va desde la aplicación de la droga al ratón, hasta que pierde el reflejo de enderezamiento; y el efecto sedante el cual es evaluado por el tiempo de sueño, que corresponde al tiempo que transcurre entre la pérdida del reflejo de enderezamiento y la recuperación de éste.

Para cada extracto se usaron dos grupos de 10 ratones cada uno. A un grupo se le administró el extracto y al otro grupo una solución control que correspondió al vehículo usado en el extracto, tween 80 10%. Treinta minutos después de administrado el extracto se le administra el pentobarbital en una dosis de 40 mg/kg en forma intraperitoneal, después de esta inyección se mide cronométricamente el tiempo que demora en perder el reflejo de enderezamiento y cuánto tiempo transcurre hasta recuperar dicho reflejo (Matsumoto y cols, 1996).

4.9.2 Laberinto elevado en cruz.

El test del laberinto elevado en cruz es un modelo de evaluación de ansiedad y actividad locomotora en ratones, éste ha sido usado por un gran número de investigadores y compañías farmacéuticas que lo han utilizado como primer ensayo para compuestos con potencial ansiolítico (Hogg, 1996). Este test está basado en la aversión natural de los ratones a los espacios abiertos, se asume que cuando el ratón se encuentra en las ramas abiertas experimenta sensaciones de vértigo, agarofobia y xenofobia, los cuales son los estímulos naturales que pueden inducir ansiedad en humanos (Dawson y Tricklebank, 1995). Se realiza en una estructura con forma de cruz simétrica en una plataforma elevada, la cual posee dos de sus ramas abiertas y dos cerradas; este test da dos medidas de ansiedad, el número de entradas en las ramas abiertas y cerradas; y el tiempo de permanencia en las ramas abiertas (Lister, 1987).

El laberinto es una estructura en forma de cruz, de acrílico, ubicada en una plataforma de madera a 40 cm de altura y está compuesto de dos ramas de 30 x 5 cm cerradas por

paredes opacas de 10 cm de altura y dos ramas abiertas transparentes de 30 x 5 cm, unidas por una plataforma central opaca de 8 x 8 cm (Maruyama y col, 1998).

El laberinto, se ubicó en una habitación con paredes negras, la iluminación era dada por un tubo fluorescente de 40 w, sobre el laberinto a una altura aproximada de 1.5 metros de ubicó una cámara, la cámara está conectada a un videograbador, en el cual se graban los cinco minutos de permanencia de cada ratón en el laberinto, y a un monitor que están en una habitación contigua a la sala del laberinto.

La prueba comienza colocando el ratón en el centro del laberinto con la cabeza mirando hacia una de las ramas cerradas. Durante cinco minutos, se registra el número total de entradas y salidas a cada una de las ramas. Se define como entrada cuando las cuatro patas del ratón se encuentran dentro y como salida, cuando las cuatro patas están fuera, se registra el tiempo total de permanencia en las ramas abiertas. Este tiempo se expresa en porcentaje del total del tiempo que el ratón permanece en el laberinto, también el total de entradas a las ramas cerradas se expresa como porcentaje del número total de entradas. Se considera como medidas de ansiedad el porcentaje de tiempo de permanencia en las ramas abiertas y el número de entradas en las ramas abiertas (Fernández, 1997) y como medida de evaluación de la actividad motora el número total de entradas y el número de entradas en las ramas cerradas (Hogg, 1996).

El experimento se realizó dividiendo los animales en siete grupos de 10 ratones cada uno, estos ratones fueron inyectados intraperitonealmente antes de realizar el test de la siguiente forma:

1. Tween 80 10%, como control en volumen de 0.01 mL/kg 30 minutos antes de realizar el test.
2. Diazepam, como fármaco de referencia en dosis de 1.0 mg/kg 30 minutos antes de realizar el test.
3. Diazepam, como fármaco de referencia en dosis de 1.0 mg/kg 30 minutos antes de realizar el test + Flumazenil 0.3 mg/kg en forma subcutánea 10 minutos antes de realizar el test.
4. Extracto alcaloideo de *Latua pubiflora*, en dosis de 150 mg/kg 30 minutos antes de realizar el test.
5. Extracto alcaloideo de *Latua pubiflora*, en dosis de 150 mg/kg 30 minutos antes de realizar el test + Flumazenil 0.3 mg/kg en forma subcutánea 10 minutos antes del test.
6. Extracto sin alcaloides de *Latua pubiflora*, en dosis de 150 mg/kg 30 minutos antes de realizar el test.
7. Extracto sin alcaloides de *Latua pubiflora*, en dosis de 150 mg/kg 30 minutos antes de realizar el test + Flumazenil 0.3 mg/kg en forma subcutánea 10 minutos antes de realizar el test.

4.10 Análisis Estadístico.

Los datos son expresados como la media \pm SEM. Se considera un valor de $p < 0.05$ como indicador de diferencia estadísticamente significativa. Las diferencias entre grupos experimentales son evaluadas mediante análisis de varianza. Para observaciones pareadas, como en el test de sueño y análisis de actividad motora en el laberinto elevado en cruz, se usa la prueba t de Student, y para los porcentajes de tiempo de permanencia en el laberinto elevado en cruz, la prueba Ji-cuadrado .

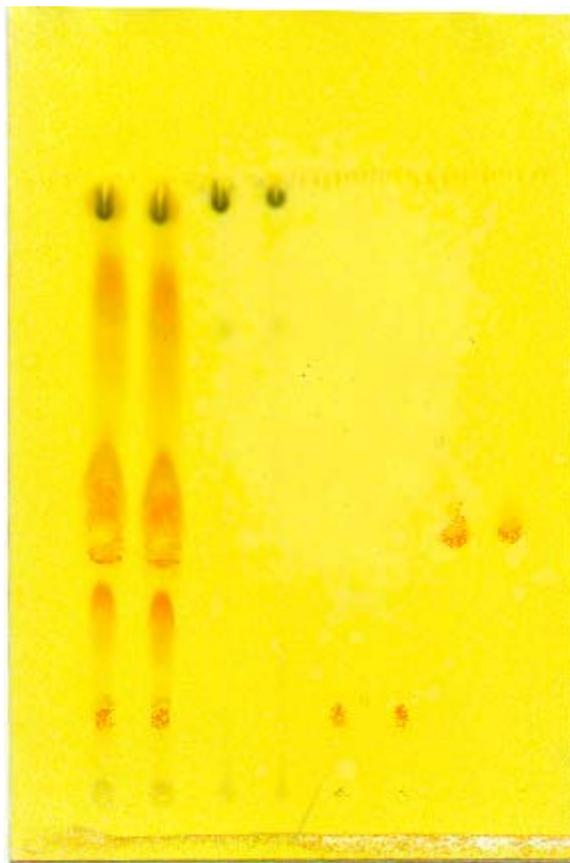
5.0 Resultados.

Los resultados los hemos dividido en dos partes, la primera corresponde a los análisis químicos cualitativos de identificación, y tiene como objetivo demostrar la presencia de algunos componentes por comparación con estándar de referencia. Y la segunda parte corresponde a los tests farmacológicos realizados con los compuestos lo que tiene como objetivo corroborar los efectos psicoactivos y comprobar interacción con el receptor GABA_A-benzodiazepinico.

5.1 Reconocimiento de Alcaloides y comparación con estándar.

Para el reconocimiento de alcaloides presentes en el extracto alcaloideo, se hicieron análisis de cromatografía de capa fina en sílica gel, en la que se observó la presencia de cinco alcaloides, de los cuales dos son conocidos, uno es similar al estándar de escopolamina y el segundo corresponde a atropina. Los otros tres no se han identificado. En esta oportunidad se cambió la fase móvil de la placa o eluyente por una mezcla de CHCl₃/MeOH en proporción 5/1 con lo cual se obtuvo una separación mayor de los compuestos en el extracto.

Figura N°1: Cromatografía en placa fina de sílica gel.



1 2 3 4 5 6 7 8

1 y 2 extracto alcaloideo de *L pubiflora*.

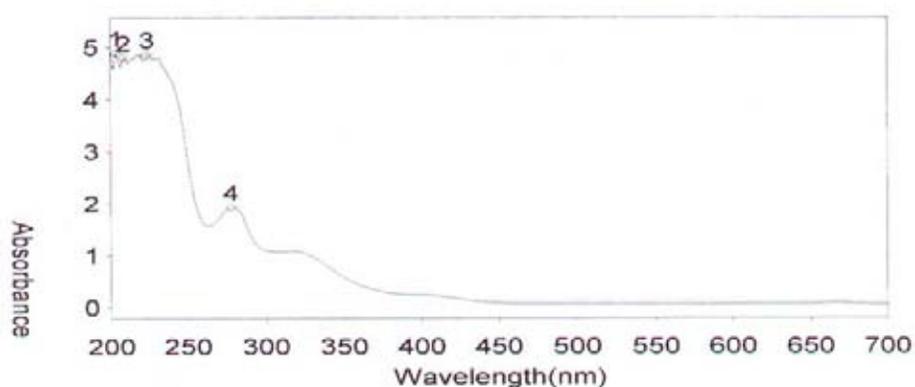
3 y 4 extracto sin alcaloides de *L pubiflora*.

5 y 6 estándar de atropina.

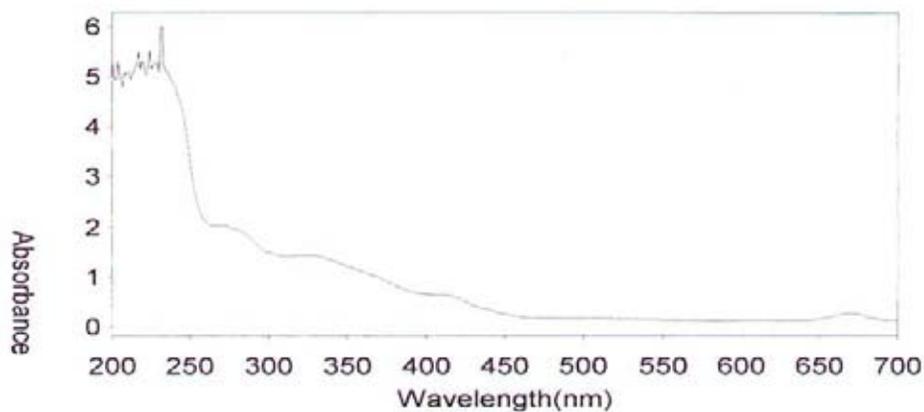
7 y 8 estándar de escopolamina.

Para determinar la longitud de onda en la cual se harían las mediciones de los extractos por el método de HPLC, se hizo un análisis de absorción UV visible de los extractos en estudio. Se determinó trabajar a una longitud de onda de 220 nm, ya que ésta es la longitud de mayor absorción de los alcaloides y además coincide con el rango de mayor absorción de los extractos, lo que se observa en las gráficas siguientes:

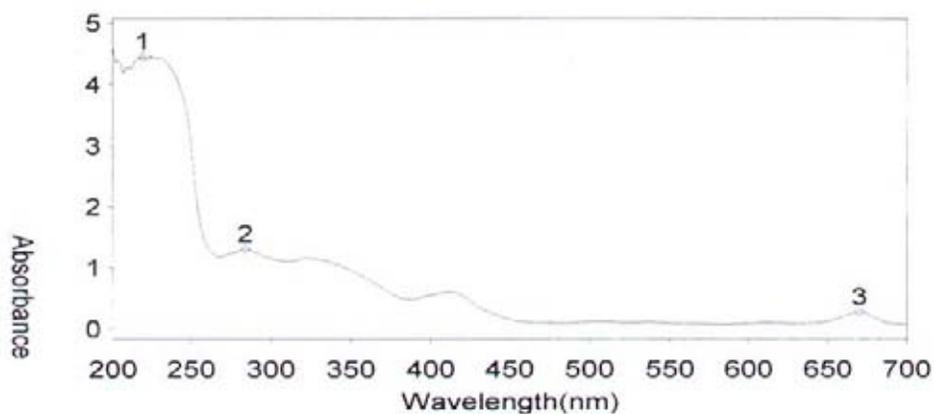
1.0 Espectro UV-visible del extracto alcaloideo.



2.0 espectro UV-visible del extracto sin alcaloides.

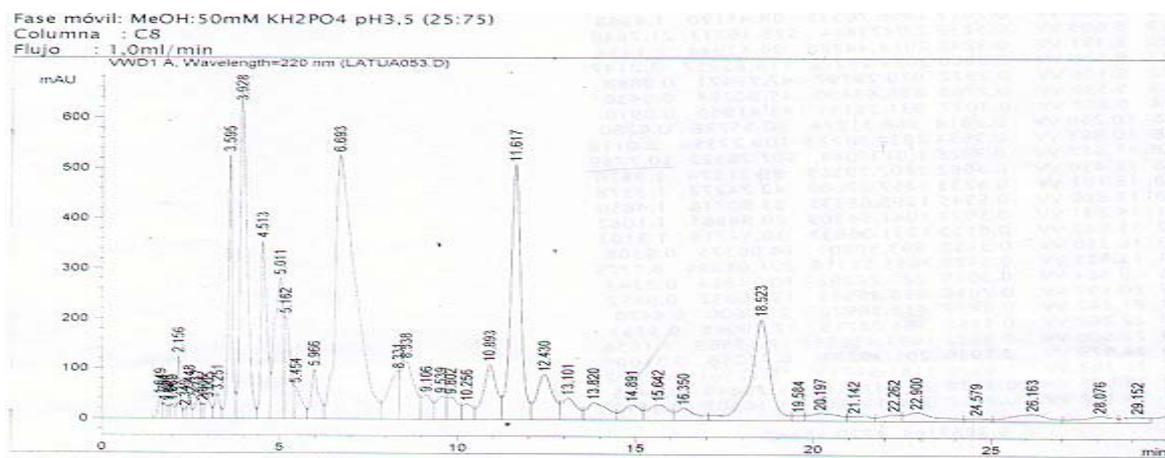


3.0 espectro UV-visible del extracto cumarínico.



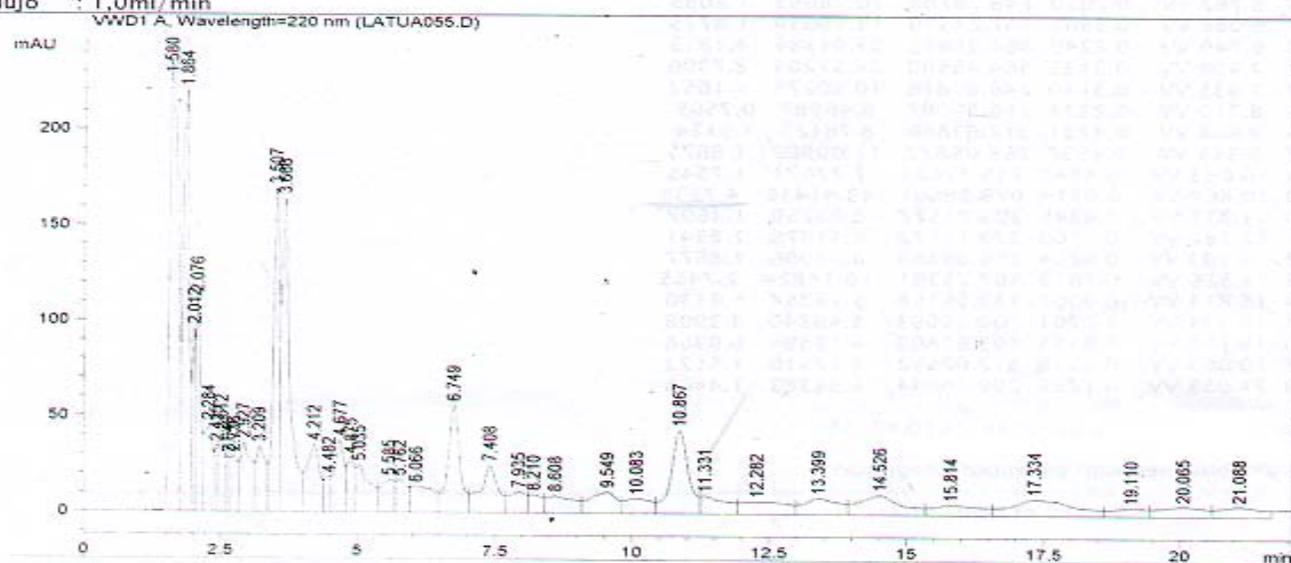
Posteriormente, se realizaron los análisis de HPLC con los extractos y se comparó con una solución en la cual solo hay atropina y escopolamina, lo cual, confirma lo observado anteriormente en la cromatografía en placa fina de sílica gel, se presentan picos similares, a iguales tiempos de retención.

HPLC de extracto alcaloideo.



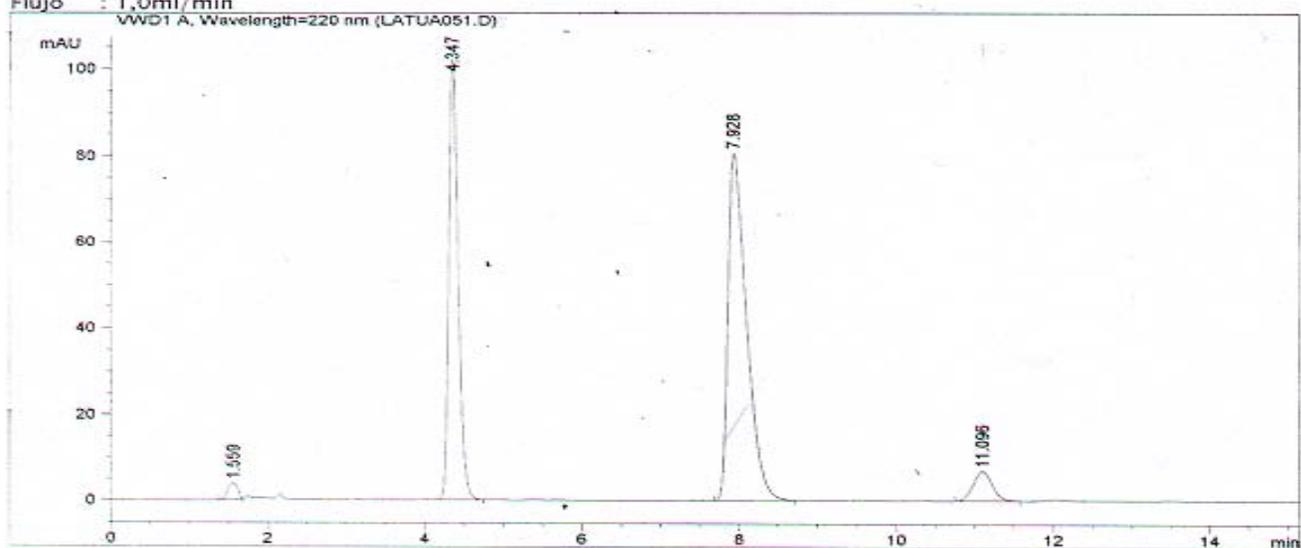
HPLC de extracto sin alcaloides.

Fase móvil: MeOH:50mM KH₂PO₄ pH3,5 (25:75)
Columna : C8
Flujo : 1,0ml/min



HPLC de estándar Atropina y Escopolamina.

Fase móvil: MeOH:50mM KH₂PO₄ pH3,5 (25:75)
Columna : C8
Flujo : 1,0ml/min

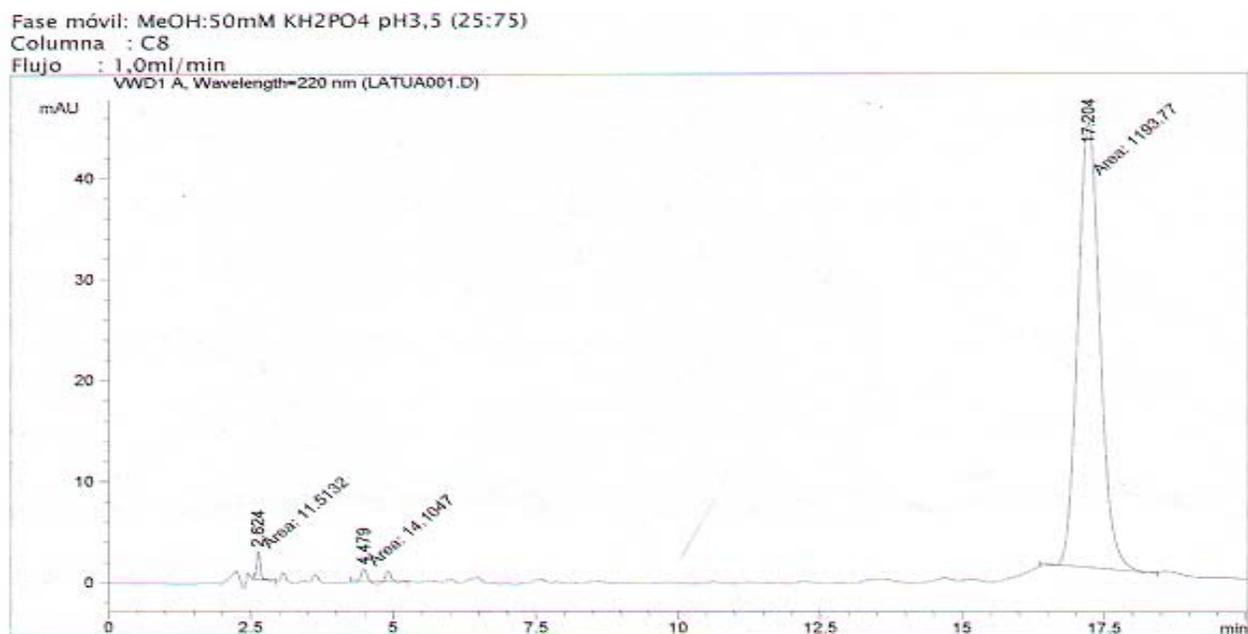


5.2 Reconocimiento de cumarinas y comparación con estándar.

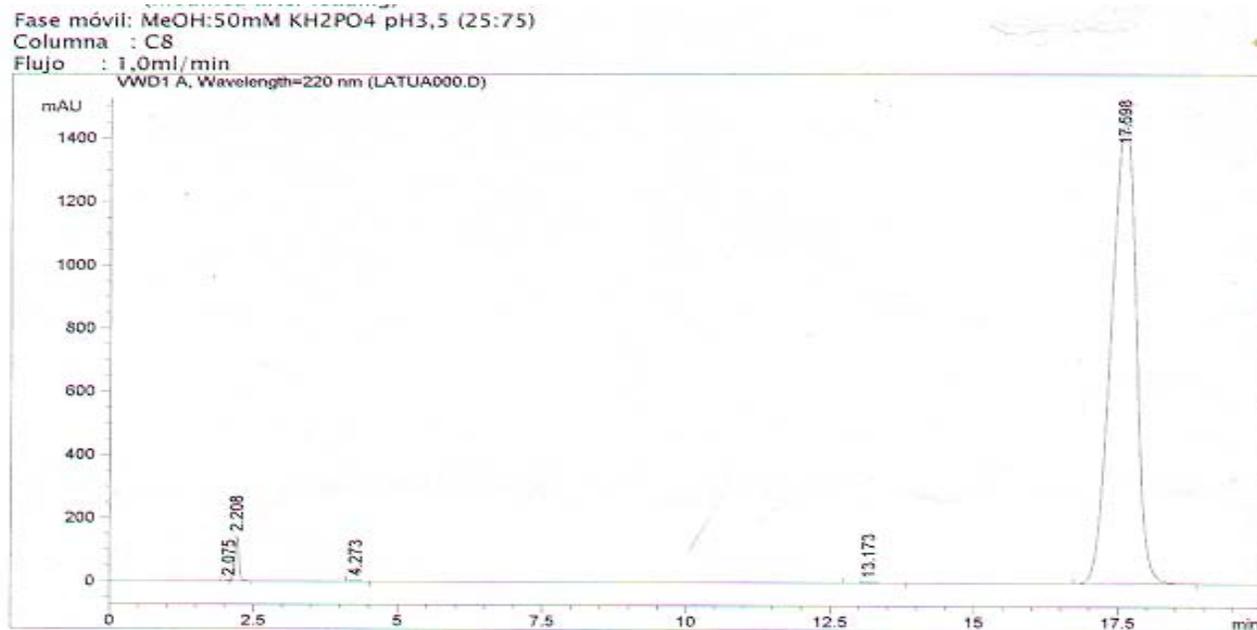
Este reconocimiento también se hizo mediante cromatografía en capa fina de sílica gel, para esto se comparó con el estándar de escopoletina y se observó a la luz UV, en la cual se presenta como una mancha fluorescente de color azul. Este compuesto se encontró en gran cantidad en los dos extractos preparados, alcaloideo y sin alcaloides, por lo que se separó una fracción que contenía 97% de escopoletina (extracto cumarínico).

Se procedió de igual forma como con los alcaloides, se hizo HPLC con el extracto y se comparó con un estándar de escopoletina lo cual confirmó lo observado en la cromatografía en capa fina de sílica gel.

HPLC de extracto cumarínico.



HPLC de estándar de escopoletina.



5.3 Test conductuales.

5.3.1 Efecto sobre el Tiempo de Sueño Inducido por Pentobarbital.

Como se observa en la Tabla N^o1, el test de sueño para los extractos alcaloideo y sin alcaloides arrojó diferencias significativas entre los extractos y sus controles para el tiempo de sueño, pero no para el periodo de latencia. El extracto cumarínico, no presentó diferencias con el control.

Tabla N°1: Evaluación de efecto hipnótico y sedante de los extractos en estudio mediante el test de sueño inducido por pentobarbital (40.0 mg/kg)

| Extracto | Tiempo Latencia | Tiempo Sueño |
|----------------------------------------|-----------------|---------------|
| Extracto sin alcaloides (150 mg/kg) | 4.52 ± 0.47 | 33.97 ± 3.23* |
| Control (tween 80 10%) | 5.38 ± 0.25 | 23.83 ± 2.87 |
| Extracto alcaloideo (150 mg/kg) | 4.02 ± 0.29 | 37.77 ± 0.85* |
| Control (tween 80 10%) | 4.61 ± 0.26 | 28.74 ± 1.78 |
| Extracto cumarínico (7.5 mg/kg) | 6.74 ± 0.64 | 18.65 ± 3.64 |
| Control (tween 80 10%) | 5.99 ± 1.30 | 21.34 ± 3.42 |

Los resultados se expresan como promedio ± SEM.

- * $p < 0.05$, diferencia significativa con respecto al grupo control por t de Student

5.3.2 Efecto sobre el test de Laberinto elevado en cruz.

Como se muestra en la Tabla N° 2, este test permite observar que hay diferencia significativa con respecto al control para el extracto alcaloideo y para Diazepam, este último como fármaco de referencia, en el porcentaje de tiempo de permanencia en las ramas abiertas, esto no ocurre con el extracto sin alcaloides que no presenta diferencias estadísticamente significativa a esta dosis.

Tabla N°2: Evaluación de la actividad ansiolítica de los diferentes extractos en el test de laberinto elevado en cruz.

| Tratamiento | Porcentaje de tiempo en las ramas abiertas |
|--------------------------------------|--------------------------------------------|
| Control (tween 80 10%, 0.01ml/kg) | 32.55 ± 1.69 % |
| Extracto alcaloideo (150 mg/kg) | 78.84 ± 2.84 %* |
| Extracto sin alcaloides (150 mg/kg) | 36.67 ± 2.31 % |
| Diazepam (1.0 mg/kg) | 58.30 ± 2.20 %* |
| Extracto alcaloideo + Flumazenil | 43.04 ± 2.70 %** |
| Extracto sin alcaloides + Flumazenil | 36.26 ± 4.53 % |
| Diazepam + Flumazenil | 35.45 ± 3.55 %** |

Los datos son presentados como promedio ± SEM. En las últimas tres filas el extracto es administrado en la misma concentración que se indica arriba y el flumazenil es en dosis de 0.03 mg/kg.

- $p < 0.05$, diferencia significativa entregada por análisis de varianza para todo el grupo de datos.
- * $p < 0.05$, diferencia significativa con respecto al grupo control, según prueba ji-cuadrado.
- * $p < 0.05$, diferencia significativa con respecto al grupo tratado sólo con el extracto, según prueba ji-cuadrado.

Para establecer la interacción de algún componente del extracto con el receptor GABA_A-benzodiazepinico se utilizó el antagonista GABA_A, Flumazenil, el cual revirtió el efecto del extracto alcaloideo y del diazepam, pero no hubo variación en el test realizado para el extracto sin alcaloides al usar el Flumazenil.

En cuanto a la actividad motora general, el test mostró una disminución estadísticamente significativa en los extractos alcaloideo, sin alcaloides y diazepam, la disminución de la actividad motora fue revertida por el Flumazenil sólo para Diazepam.

Tabla N°3: Evaluación de la actividad motora en el laberinto elevado en cruz.

| Tratamiento | Nº total de entradas | Nº de entradas en ramas cerradas. |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Control (tween 80 10%,0.01ml/kg) | 25.10 ± 1.55 | 13.00 ± 1.03 |
| Ext. Alcaloideo (150 mg/kg) | 5.10 ± 1.59* | 1.60 ± 0.51* |
| Ext. Sin Alcaloides (150 mg/kg) | 21.80 ± 1.27* | 9.50 ± 0.89* |
| Diazepam (1.0 mg/kg) | 13.60 ± 2.10* | 4.50 ± 0.52* |
| Ext. Alcaloideo + Flumazenil | 3.50 ± 1.30*† | 2.20 ± 0.96* |
| Ext. Sin Alcaloides + Flumazenil | 20.50 ± 2.37 | 10.30 ± 0.80* |
| Diazepam + Flumazenil | 18.70 ± 1.71*† | 8.20 ± 0.60*† |

Los datos son presentados como promedio ± SEM. En las últimas tres filas el extracto es administrado en la misma concentración que se indica arriba y el Flumazenil es en dosis de 0.03 mg/kg.

* p < 0.05, diferencia estadísticamente significativa con respecto al control por t de Student.

† p < 0.05, hay diferencia significativa con el grupo del mismo extracto sin Flumazenil.

6.0 Discusión.

Con respecto a las dosis de extracto utilizadas en los tests se determinó, que como el extracto alcaloideo es el control positivo, la dosis a usar fue la misma que en el estudio de Reyes: 150 mg/kg. En cuanto a la dosis del extracto sin alcaloides, se trabajó con la misma dosis del extracto alcaloideo, ya que al hacer un test de sueño con esa dosis se observa el efecto sedante y, según la teoría de ocupación de receptores es posible asociar una ocupación creciente de los receptores con la acción progresiva, y esta progresión se inicia con la actividad ansiolítica, avanza hacia el efecto anticonvulsivante y sedante, y culmina con el efecto miorrelajante (Florez, 1997). Además el análisis con HPLC muestra diferentes compuestos que se encuentran en concentraciones menores, y presentan similitud en los picos y tiempos de retención en parte de estos. Para el extracto en el cual estaba sólo la cumarina, ya que este compuesto estaba presente en los dos extractos anteriores, se ajustó la dosis de manera de administrar una cantidad de escopoletina equivalente a la que era administrada en esos extractos, por lo tanto la dosis a administrar se estimó en 7.5 mg/kg, concentración que es equivalente a la cantidad de escopoletina administrada en el extracto sin alcaloides.

Los resultados obtenidos por Reyes en su trabajo con *Latua pubiflora*, en primavera son reproducibles en verano. El test de sueño para el extracto sin alcaloides entregó como resultado un aumento en el tiempo de sueño de un 42.6% al comparar con el grupo control; estos datos comparados con los obtenidos del extracto alcaloideo, un aumento de 52.4% de tiempo en comparación al grupo control. Ambos extractos presentan

diferencia estadísticamente significativa con respecto a su grupo control lo que indica que presentan efecto sedante al ser administrados en ratones en estas dosis.

El estudio químico de la composición de los extractos confirmó que *Latua pubiflora* contiene dos alcaloides que se encuentran en gran cantidad, que son escopolamina y atropina, más otros tres alcaloides que se encuentran en menor concentración. Además se identificó otro compuesto el cual en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se observa en gran proporción en los extractos, tanto alcaloideo como sin alcaloides, que corresponde a la cumarina escopoletina, al hacer en ratones un test de sueño con un extracto en el cual el componente principal era escopoletina (97%), este no presentó variación estadísticamente significativa con respecto a su grupo control, extracto 18.65 ± 3.64 minutos y control 21.34 ± 3.42 minutos, lo que indica que este componente no estaría involucrado en los efectos depresores del Sistema Nervioso Central, que se estudiaron, por lo tanto se descartó su utilización en el test del laberinto elevado en cruz.

En el laberinto elevado en cruz la medida de evaluación de ansiedad corresponde al aumento en el tiempo de permanencia en las ramas abiertas. En este test el extracto sin alcaloides entregó como resultado 36.67% y el grupo control 32.55%, lo que indica que al no haber diferencia significativa, no hay efecto ansiolítico. Los datos obtenidos para diazepam, 58.30%, fármaco de referencia, y para el extracto alcaloideo, 78.84%, los cuales si presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control, lo que implica que estos presentan efecto ansiolítico, datos que además son comparables a los resultados obtenidos por Reyes.

El extracto alcaloideo al ser administrado en los ratones presentó un aumento en el tiempo de permanencia en las ramas abiertas y una disminución en el número de entradas en las ramas cerradas, al compararlas con el grupo control; en el grupo de ratones al cual se le administró el extracto alcaloideo más Flumazenil, se observó que el tiempo de permanencia en las ramas abiertas fue significativamente menor al observado al administrar el extracto solo, pero no se observó una variación apreciable en el número de entradas en las ramas cerradas con respecto a lo observado en los ratones a los cuales no se les administró el antagonista Gabaérgico. Lo que indica que el Flumazenil al ser administrado en forma conjunta con el extracto, inhibe el efecto del extracto en las concentraciones administradas en esta especie de ratones, lo que estaría indicando que el efecto ansiolítico observado sería producido por la acción de algún componente del extracto sobre el complejo receptor GABA_A-benzodiazepínico (Maruyama y col, 1998).

El efecto del diazepam al ser administrado, en conjunto con Flumazenil, en la especie de ratones *Mus musculus*, cepa Rockefeller, presenta como resultado para el porcentaje de tiempo en las ramas abiertas 35.45% y número de entradas en las ramas cerradas 8.20 ± 0.60 y para el diazepam sin Flumazenil: tiempo de permanencia en las ramas abiertas 58.30% y número de entradas en las ramas cerradas 4.50 ± 0.52 , en comparación con el control, porcentaje de permanencia en las ramas abiertas 32.55% y número de entradas a las ramas cerradas 13.00 ± 1.03 . Resultados que indican que para esta especie de ratones el efecto de diazepam, sobre la ansiedad y actividad

locomotora, es inhibido por Flumazenil como ocurre con ratones DBA/2 (Lee y Rodgers, 1991), CBA y C57BL/6 (File y col, 1998) y BALB/c (Maruyama y col, 1998).

El extracto sin alcaloides posee efecto sedante y no hipnótico en las dosis administradas a los ratones (150 mg/kg). En el laberinto elevado en cruz, el porcentaje de tiempo de permanencia en las ramas abiertas no presenta diferencia significativa con respecto del grupo control, por lo tanto se descarta que presente un efecto ansiolítico, pero sí se observa una disminución en el número de entradas totales y hacia las ramas cerradas lo cual se puede asociar a una disminución de la actividad motora general (Hogg, 1996). El mecanismo responsable no sería la unión de algún compuesto de este extracto con el receptor GABA_A-benzodiazepínico ya que al usar Flumazenil, el antagonista del receptor, no hay reversión de los efectos.

En el extracto alcaloideo se puede suponer que no es sólo un compuesto el responsable de los efectos observados en los ratones, ya que como se observa en el extracto sin alcaloides, hay efecto sedante y disminución de la actividad motora no asociado al receptor GABA_A-benzodiazepínico, ya que, no se revierte el efecto al usar el fármaco Flumazenil, esto además descarta que este efecto sea producido por los alcaloides.

Los resultados obtenidos por Reyes en su trabajo con *L. pubiflora* son reproducibles, y además estos han servido como control positivo en la realización del actual estudio. Efectivamente además el Flumazenil, en administración subcutánea en una dosis baja, 0.3 mg/kg, (Maruyama, 1998), antagonizó el efecto de una dosis de Diazepam de 1.0 mg/kg en esta cepa de ratones, lo cual resulta de gran importancia, tanto para este

estudio como para estudios posteriores en los cuales se quiera medir la unión de algún fármaco al complejo receptor GABA_A-benzodiazepínico.

El principal aspecto que cabe destacar de este estudio, es la confirmación de la hipótesis de trabajo, que dice que existe uno o más compuestos en *L. pubiflora* que interactúa con el receptor GABA_A-benzodiazepínico. Esta hipótesis se confirma con los resultados obtenidos, que indican claramente que el complejo receptor GABA_A-benzodiazepínico está involucrado en el efecto ansiolítico del extracto alcaloídeo, después de su administración, en el test del laberinto elevado en cruz, al haber revertido el efecto producido por este extracto sobre los ratones. Este resultado es comparable a los obtenidos en un estudio similar de Maruyama y col (1998) con un principio activo llamado Honokiol, el cual posee acción depresora del sistema nervioso central y efecto ansiolítico a muy bajas dosis.

El extracto cumarínico, en el test de sueño inducido por pentobarbital, no presentó efecto en relación con el grupo control, por lo tanto de poseer alguna propiedad sobre el Sistema Nervioso Central, ésta no es sedante y el mecanismo involucrado no sería el receptor GABA_A-benzodiazepínico.

Además se puede concluir que el extracto en donde se encuentra el compuesto, o los compuestos, que estarían interactuando con el receptor farmacológico GABA_A-benzodiazepínico es el extracto alcaloídeo.

Finalmente, podemos señalar que *Latua pubiflora*, posee muchos y diferentes compuestos de los cuales al menos uno interactúa con el complejo receptor GABA_A-

benzodiazepínico, y este compuesto se encuentra en el extracto alcaloídeo estudiado, podría haber además otros compuestos presentes en el extracto sin alcaloides que tienen otra acción depresora central.

Los resultados obtenidos nos permiten hacer las siguientes proyecciones:

- Existe un compuesto en *L. Pubiflora* que actúa en el complejo receptor farmacológico GABA_A-benzodiazepínico, el cual debería ser estudiado ya que en la actualidad hay gran uso de las benzodiazepinas, las que poseen variados efectos adversos y podríamos encontrarnos frente a un compuesto que pueda tener similares efectos a las benzodiazepinas pero sin los efectos adversos de éstas.
- *Latua pubiflora* además posee al menos un compuesto sedante del sistema nervioso central el cual no interactúa con el complejo receptor GABA_A-benzodiazepínico, compuesto que al ser estudiado podría llegar a ser un aporte al arsenal farmacológico existente.
- Uno de los compuestos que se encuentra en mayor cantidad en *Latua pubiflora* es la cumarina llamada escopoletina, la cual posee propiedades como relajación del tejido muscular, inhibición de prostaglandinas, antimicrobianas, antinociceptivas e hipotensivas (Hussein y Samuelsson, 1991); este compuesto al encontrarse en gran cantidad en la planta permitiría tener una buena fuente para obtenerla para realizar estudios sobre ella.

- La técnica descrita por C. Lee y Rodgers (1991), S. File y cols.(1998), Y. Maruyama y cols. (1998), sobre el uso de Flumazenil para antagonizar el efecto de compuestos que se unen al complejo receptor farmacológico GABA_A-benzodiazepínico pueden ser aplicadas y dan resultados similares a las referencias bibliográficas al ser aplicadas en los ratones de la especie *Mus musculus*, cepa Rockefeller con los cuales se cuenta en el vivero del Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile, lo que permite poder seguir aplicando esta técnica a futuro en la búsqueda de nuevas drogas con propiedades sobre el receptor farmacológico antes mencionado.
- El saber que compuestos están presentes en *L. pubiflora*, además de ser un aporte al conocimiento Químico y Farmacológico, permite aportar un fundamento más para justificar la conservación de esta especie que ha sido de gran importancia para la cultura mapuche.

7.0 Literatura Citada.

- Dawson, G. And Tricklebank, M (1995). Uses elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *TiPS*. 16;33-36.
- Fernández Espejo, E. (1997). *Behavioural Brain Research*. Vol 86;105-112.
- File, S., Mahal, A., Mangiarini, L. And Bates, G. (1998). Striking changes in anxiety in Huntington's disease transgenic mice. *Brain Resear*, 805;234-240.
- Florez, J. (1997). *farmacología Humana*. 3ª ed. Masson, S.A., Barcelona, España.
- Foye, W., Lemke, T. y Williams, D.. *Principies of Medicinal Chemistry*. Fourt Edition, 1995.
- Goodman, A., Rall, T., Nies, A., Taylor, P., (1997). *Las bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9ª ed. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina.
- Gros, E., Pomilio, A. y Burton, G. (1985). *Introducción al estudio de los productos Naturales*. Serie Química, monografía N° 30. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional Científico y Tecnológico, Washington. 48-53, 113-129.
- Hogg, S. A (1996). *Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-Maze as an Animal Model of Anxiety*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Vol. 54 N° 1; 21-30.

- Hussein Farah, M., Samuelsson G. (1991). Pharmacologically Active Phenylpropanoids from *Senra incana*. *Planta Médica* 58;14-18.
- Lee, C. y Rodgers, J.(1991). Effects of Benzodiazepine Receptor Antaginst, Flumazenil, on Antinociceptive and beavioural Responses to the Elevated Plus-Maze in Mice. *Neuropharmacolgy* vol. 30 N° 12^a;1263-1267.
- Lister, R. (1987). The use of a Plus-Maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 92;180-185.
- Maruyama, Y., Kuribara, H., Stavinoha,W.(1998) Behavioural Pharmacological Characteristics of Honokiol, an Anxiolytic Agent Present in Extracts of Magnolia Bark, Evaluated by an Elevated Plus-Maze Test in Mice. *J.Pharm. Pharmacol.*vol 50;819-826.
- Matsumoto,K., Ojima, K., Watanabe, H..(1996). Neurosteroidal Modulation of social-isolation-induced decrease in pentobarbital sleep in mice.*Brain research*;708 :1-6.
- Montes, M., Wilkomirsky, T.,Valenzuela,L.(1992). *Plantas Medicinales*. Ediciones Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Peile, C. y Saavedra, H. (1990). *El dolor aspectos básicos y clínicos*. Medicina serie práctica, Editorial Mediterráneo. Santiago, Chile. Pp; 80-82.
- Ramírez, C. (1979). *El Mágico Latué y sus propiedades tóxicas*. El correo de Valdivia.

- Sánchez,E., Berríos,N., Nuñez,J., Pardo,J. ,Ortíz,J.G.(2001). Effect of *L. pubiflora* extract on binding of [H^3]Flunitrazepam in cortex membranes of rats. 42^o Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca, México. P 179.
- Siegel, E. y Buhr, A. (1997). The Benzodiazepine Binding sit of GABA_A receptors. TIPS vol 18; 425-429.
- White,William E.,(1994). Tropane Alkaloids. oucsace.cs.ohiou.edu. Octubre.