

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias

Escuela de Química y Farmacia

Estudio fitoquímico y evaluación de las actividades analgésicas y antiinflamatorias de una especie altiplanica Chilena, *Malesherbia Auristipulata* Ricardi

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

Profesor Patrocinante: Dra. Carla Delporte Vergara - Depto. Química Farmacológica y Toxicológica - Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas - Universidad de Chile.

Oriana Marja Rojas Moraleda

Valdivia Chile 2003

Contenido

Profesor Co-Patrocinante .	1
Dedicatoria .	3
Agradecimientos .	5
Abreviaturas .	7
..	9
RESUMEN .	11
SUMMARY .	12
Abreviaturas . .	13
.	14
INTRODUCCION .	15
I. ANTECEDENTES GENERALES DE MALESHERBIA AURISTIPULATA RICARDI .	19
I.1. Clasificación taxonómica . .	19
I.2. Descripción botánica .	20
I.3. Estudios anteriores de especies del género <i>Malesherbia</i> .	21
II. HIPOTESIS .	23
III. OBJETIVOS .	25
III.1. Objetivos generales .	25
III.2. Objetivos específicos . .	25
IV. MATERIALES . .	27
IV.1. Estudio químico: .	27
IV.1.1. Equipos . .	27
IV.1.2. Material cromatográfico . .	27
IV.1.3. Reactivos de coloración .	28
IV.1.4. Material de uso general .	28
IV.1.5. Disolventes de uso extractivo . .	28
IV.2. Estudio farmacológico . .	28

IV.2.1. Evaluación de la toxicidad aguda . .	28
IV.2.2. Evaluación del efecto analgésico . .	28
IV.2.3. Evaluación del efecto antiinflamatorio . .	29
V. METODOS . .	31
V.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO .	31
V.1.1. Recolección de la muestra vegetal: .	31
V.1.2. Obtención de los extractos vegetales: .	31
V.1.3. Análisis cromatográfico de los extractos . .	33
V.1.4. Identificación por semejanza a estándares .	34
V.1.5. Fraccionamiento de los extractos activos .	35
V.1.6. Técnicas Espectroscópica . .	41
V.1.7. Obtención de los infusos: .	41
V.2. Estudio farmacológico .	41
V.2.1. Determinación de la toxicidad aguda por vía oral .	42
V.2.2. Determinación de la actividad analgésica .	42
V.2.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica .	44
VI. RESULTADOS .	47
VI.1. Estudio Fitoquímico . .	47
VI.1.1. Obtención de los extractos . .	47
VI.1.2. Análisis Cromatográfico de los extractos .	48
VI.1.3. Identificación de metabolitos secundarios por comparación con estándares .	48
VI.1.4. Determinación del residuo seco/mL del infuso . .	49
VI.1.5. Análisis espectroscópico para la identificación de <i>Malesh-17</i> y <i>Malesh-2</i> .	50
VI.2. Estudio Farmacológico .	55
VI.2.1. Determinación de la toxicidad aguda . .	55
VI.2.2. Determinación de la actividad analgésica . .	56
VI.2.3. Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica .	58
VII. DISCUSION . .	67

VIII. CONCLUSION .	71
BIBLIOGRAFIA .	73
ANEXOS .	77

Profesor Co-Patrocinante

Sra. Juana Nuñez Donoso - Instituto de Química - Facultad de Ciencias - Universidad Austral de Chile.

Dedicatoria

Dedicado A dos personas importantes en mi vida Mi madre y mi hijo

Agradecimientos

Quiero agradecer a las profesoras que integran el Departamento de Productos Naturales de la Universidad de Chile, por haberme aceptado dirigir esta Memoria, por orientarme y apoyarme en la realización de la misma, especialmente:

A la Dra. Carla Delporte, por su constante apoyo, cariño, comprensión y excelente disposición en cada momento que lo necesité.

A las profesoras Rosa Negrete y Silvia Erazo, por haberme entregado su tiempo, paciencia y toda su ayuda en experiencia y conocimientos.

A la Dra. Nadine Backhouse, por su disposición en todo momento y constante preocupación por mi persona.

Para todas ellas mi más sinceros afectos y reconocimientos.

A los tesisistas Pedro Salinas y Juan Carlos Calderón por su amistad y ayuda en la realización de las pruebas con animales y a Anibal San Martín por su colaboración en el desarrollo de parte importante de este trabajo.

A Elba, Anita y Marcela quienes colaboraron en el desarrollo de esta tesis. De igual forma quisiera agradecer a David y Sra. Ema por su cooperación brindada y compañía.

A los QF Ximena Silva y Juan Otarola del Instituto de Salud Pública, por otorgarme las facilidades para realizar todos los ensayos farmacológicos con animales. También al auxiliar Patricio Troncoso por su ayuda en el trabajo de laboratorio al cuidado de los animales de experimentación.

Quiero agradecer a los profesores de la Universidad Austral de Chile, que contribuyeron en asesorar este trabajo la Prof. Juana Nuñez y Dr. Humberto Dölz y a la secretaria de escuela Patricia por su gestión y ayuda en todo momento.

A mis amigos Marcela y Christian quienes han estado siempre a mi lado.

A mis compañeras y amigas por haber compartido conmigo su amistad y su entrega en esta etapa de mi vida, especialmente: Linet Fuentes, Ruth Jaramillo, Maritza Aburto, Alejandra Muñoz y Magdalena Barrera, como también a Myrna Escobillana y María Victoria Naudon.

A toda la familia Espinoza Montenegro por la comprensión, cariño, disposición y apoyo entregado.

Finalmente quiero agradecer a mi madre por su arduo esfuerzo, paciencia, comprensión, estímulo y motivación para que llegara este momento, por lo que no creo tener nunca como agradecer. A mi padre por su preocupación y apoyo, a mis hermanos Rodrigo y Nadia por su cariño y su total disposición entregada, a mi hijo Akhan por todo el tiempo que me ha entregado para desarrollar esta memoria, a todos ellos les dedico este trabajo y mi eterno agradecimiento.

Abreviaturas

- AA:** Ácido araquidónico
ACET: Acetato de etilo
AlCl₃: Tricloruro de aluminio
c.c.f.: Cromatografía de capa fina
DCM: Diclorometano
EDCM: Extracto diclorometato
EHEX: Extracto hexánico
EMET: Extracto metanólico
Esp: Espectro
Ext: Extracto
FDCM: Fracción del EDCM
FeCl₃: Tricloruro de fierro
FMET: Fracción del EMET
GC/MS: Cromatografía de Gas- Masas
HEX : Hexano
i.p.: Intraperitoneal
LTB4: Leucotrienos B4
MET: Metanol
NH₃: Amoniaco
p/v: Peso volumen
SEM: Error estándar
TMS: Tetrametil silano
TPA: 12-O-tetradecanoil 13-acetato
Tr: Tiempo de retención
UV: Ultravioleta

“El día que hayáis envenenado el último río, abatido el último árbol, asesinado el último animal. Cuando no existan flores ni pájaros, Os daréis cuenta de que El dinero no se come”
Cacique Seattle. *Valoremos y cuidemos la Biodiversidad No a la sobre explotación extractiva de recursos naturales No a la tala indiscriminada de arboles nativos Garantizaremos la supervivencia humana*

RESUMEN

Las especies vegetales del altiplano chileno de la I región, están siendo estudiadas por diferentes científicos y constituyen una fuente potencial de búsqueda de productos naturales de interés farmacológico para el hombre, por lo que es importante preservar estos recursos naturales no sólo para conocerlas y evaluar su real potencial si no también para dar a sus habitantes nuevas formas de desarrollo que les permitan subsistir alcanzando mejores condiciones de vida.

En la presente investigación fue evaluado el efecto analgésico y antiinflamatorio de la parte aérea de la especie *Malesherbia auristipulata* Ricardi, especie vegetal autóctona que se encuentra ubicada en las quebradas pedregosas de la región de Arica al interior del valle de Azapa y que carece de estudios farmacológicos y fitoquímicos.

El estudio comenzó con la extracción del exudado resinoso, a partir del material vegetal fresco, usando como disolvente diclorometano. Posteriormente la muestra desprovista de resina, seca y molida se sometió a extracciones sucesivas usando disolventes de polaridad creciente, comenzando con hexano, diclorometano y finalmente metanol. También se comprobó ambas actividades farmacológicas con el infuso al 10%.

La actividad analgésica se determinó en ratones, por el método de disminución de las contorsiones inducidas por ácido acético al 0,6% vía i.p., administrando a los animales, vía oral, extractos a una dosis de 600 mg/Kg y para extractos más purificados, dosis de 200 y 100 mg/Kg. Se utilizó como fármaco de referencia naproxeno sódico. La actividad antiinflamatoria tópica se determinó por el método de inducción de edema en oreja de ratón, por aplicación de agentes flogísticos como el ácido araquidónico (AA) y

12-O-tetradecanoilforfol 13-acetato (TPA), utilizando nimesulida e indometacina como fármacos de referencia, respectivamente. Se aplicaron tópicamente extractos a una dosis de 3,0 mg/20 μ L y para extractos más purificados se usaron dosis de 1,0 a 0,5 mg/20 μ L.

Los extractos que presentaron mayor actividad analgésica, fueron el extracto diclorometano y el exudado resinoso (60,3% y 67,9%, respectivamente, a una dosis de 600 mg/Kg). El efecto producido por el extracto diclorometano, pudo explicarse en parte por el β -sitosterol, sustancia extraída e identificada por cromatografía de Gas-Masas, en el exudado resinoso se le atribuyó el efecto a una mezcla de ácidos grasos, principalmente el ácido palmítico. El infuso al 10%, demostró poseer un efecto analgésico importante (49,3%) a la dosis 402 mg/Kg.

Los extractos de hojas y tallos de *M. auristipulata* presentaron un efecto antiinflamatorio tópico tanto para el modelo de inflamación con TPA como para AA. Para el ensayo con TPA, el efecto fue mayor para los extractos diclorometano y metanólico (84,7% y 85,2%, respectivamente, a una dosis de 3,0 mg/20 μ L). El efecto demostrado por el extracto diclorometano, se explica en parte por un compuesto de valorada actividad antiinflamatoria, el β -sitosterol. Para el ensayo con AA, el efecto fue mayor para el extracto diclorometano y para el exudado resinoso (54,7% y 50%, respectivamente, a una dosis de 3,0 mg/20 μ L). El infuso al 10%, demostró poseer un efecto antiinflamatorio tópico bajo.

Todos los extractos de hojas y tallos, no presentaron toxicidad aguda ni letalidad en ratones a una dosis 2g/Kg.

Este estudio demostró científicamente que la especie altiplánica estudiada, presentó propiedades analgésicas y antiinflamatorias, las que la validan como planta medicinal y que justificarían su uso en la medicina tradicional.

SUMMARY

The vegetables species of the chilean highland of the I region, they are being studied for several scientists and they constitute a potential source of search of natural products of interest pharmacology for the man, for what it is important preserve these natural resources I don't sole in order to know them and evaluate their true potential if not also in order to give their inhabitants new forms of development that allow them to subsist reaching better conditions of life.

In this letter investigation was evaluated the analgesic effect and antiinflammatory of the air part of the species *Malesherbia auristipulata* Ricardi, vegetable autochthonous species that is located in the stony gulches of the region of Arica to the inside of the valley of Azapa and it lack studies pharmacologys and phytochemistrys

The study began with the extraction of the resinous starting from the material fresh vegetable, using like solvent dichlomethane. Later on the sample lacking resin, dry and milled it underwent to successive extractions using solvent of growing polarity, beginning with hexane, dichlomethane and finally methanol. It also was proven both activities

farmacologys with the infused to the 10%.

The analgesic activity was determined in mouse for the method of decrease of the contortions induced by acetic acid to the 0.6% via i.p., administering to the animal extracts to a dose of 600 mg/Kg, for extracts more purified was used dose of 200 - 100 mg/Kg and it was used sodium naproxene as the reference drug. The activity topical antiinflammatory was determined for the method of induction of edema of ear of mouse, for application of agents inflammatory as acid arachidonic (AA) and 12-O-tetradecanoilphorfol acetate (TPA), using nimesulide and indometacine as the reference drugs, respectively. The extracts were applied to a dose of 3.0 mg/ 20 μ L and for extracts more purified was used dose of 1.0 to 0.5 mg/ 20 μ L.

The extracts that presented old analgesic activity were the extract dichloromethane and the resinous (60,3% and 67,9%, respectively, to a dose of 600 mg/Kg), the effect produced by extract dichloromethane could explain for the b-sitosterol, substance extracted and identified for the chomatografic of Gas-Masa, and for the resinous attributes the effect to a mixture of fatty acids, mainly for the sour acid palmitic, the infusion to the 10%, it demonstrated possess an analgesic important effect (49,3%) to the dose 402 mg/ Kg.

The extracts of leaves and shafts of *M. auristipulata* presented an effect topical so much antiinflammatory for the model of inflammation with TPA as for AA, for the rehearsal with TPA, the effect was old for extracts dichloromethane, and the extract methanolic (84,7% and 85,2%, respectively, to a dose of 3.0 mg/20 μ L), the effect demonstrated by the extract dichloromethane is explained for a made up of valuing activity antiinflammatory the b-sitosterol, for the rehearsal with AA, the effect was old for extracts dichloromethane and for the resinous (54,7% and 50%, respectively, to a dose of 3.0mg/20 μ L), the infusion to the 10%, it demonstrated possess an effect topical antiinflammatory under.

All the extracts of leaves and shafts, didn't present acute toxicity neither lethality in mouse to a dose 2g/ Kg.

This study demonstrates scientifically that the species study presents analgesics properties and antiinflammatory properties that validate it how medicinal plant and that they would justify their use in the traditional medicine.

Abreviaturas

AA: Ácido araquidónico

ACET: Acetato de etilo

AlCl₃ : Tricloruro de aluminio

c.c.f.: Cromatografía de capa fina

DCM: Diclorometano

EDCM: Extracto diclorometato

EHEX: Extracto hexánico

EMET: Extracto metanólico

Esp: Espectro

Ext: Extracto

FDCM: Fracción del EDCM

FeCl₃ : Tricloruro de hierro

FMET: Fracción del EMET

GC/MS: Cromatografía de Gas- Masas

HEX : Hexano

i.p.: Intraperitoneal

LTB4: Leucotrienos B4

MET: Metanol

NH₃ : Amoníaco

p/v: Peso volumen

SEM: Error estándar

TMS: Tetrametil silano

TPA: 12-O-tetradecanoil 13-acetato

Tr: Tiempo de retención

UV: Ultravioleta

*“El día que hayáis envenenado el último río, abatido el último árbol, asesinado el último animal. Cuando no existan flores ni pájaros, Os daréis cuenta de que El dinero no se come” **Cacique Seattle.** Valoremos y cuidemos la Biodiversidad No a la sobre explotación extractiva de recursos naturales No a la tala indiscriminada de arboles nativos Garantizaremos la supervivencia humana*

INTRODUCCION

Desde el principio de los tiempos, el hombre ha utilizado las plantas o sus partes, para alimentarse, vestirse, construir su vivienda y recuperar su salud, es decir, con fines medicinales. A través de la observación del medio que lo rodeaba y por el error y el acierto, fue capaz de distinguir entre plantas venenosas de las que no lo eran (Evans, 1991). Gradualmente este proceso intuitivo adquirido, se traspasa a las comunidades, generalmente por medio de ciertas personas que cuidaron la sabia información, permitiendo resguardar diversas plantas e informando cuales provocan efectos beneficiosos para la salud y cuales no (Alonso, 1998). El ser humano antes de perder su fino y natural instinto, estaba dotado para distinguir entre las muchas plantas, aquellas que precisamente necesitaba para librarse de cierto daño, como lo observamos aún en algunos animales.

Las plantas contienen elementos activos que las protegen de los insectos, mohos y otros parásitos, así como de los rayos ultravioletas del sol, entre otros factores. Muchos de estos componentes ya sean de forma individual o en diferentes combinaciones poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el hombre. En efecto, las plantas poseen numerosas sustancias con lo cual se explica que muchas de ellas que son reconocidas como plantas medicinales, puedan lidiar a la vez con diversas enfermedades o carencias específicas en la salud humana (Cositorto, 1995).

Tomando esa sabiduría ancestral como punto de partida, se investiga hoy los productos naturales de manera de recuperar tal conocimiento y revelar la presencia de estos elementos activos, validar sus beneficios y aprovechar tal recurso para el desarrollo

de nuevas drogas que permitan paliar contra una amplia gama de patologías, como también se busca el desarrollo económico de las comunidades que se ven involucradas en su estudio.

Tradicionalmente el primer paso en la investigación de productos naturales, es la elección del material vegetal que será estudiado en búsqueda de nuevos elementos activos. Los métodos de selección más básicos son:

- Recolectar plantas de un determinado lugar al azar, sin tener en cuenta el conocimiento previo sobre el uso de las mismas (se ha probado que esta estrategia proporciona en realidad muy pocos principios activos).
- Elegir plantas de una determinada familia o género consideradas de interés por producir cierto tipo de compuestos, procedimiento que es conocido como criterio quimiotaxonómico.
- Escoger aquellas plantas que un determinado grupo humano utiliza tradicionalmente con fines terapéuticos, método difundido como criterio etnomédico.
- La teoría ecológica orienta la búsqueda de plantas que se desarrollan en un hábitat particular o que producen metabolitos secundarios para defenderse contra agentes ambientales (Cox y Balick, 1994).

Posteriormente se aíslan y purifican los metabolitos secundarios de manera de probar si tienen actividad biológica.

El presente trabajo de investigación, plantea realizar el estudio farmacológico y fitoquímico de la especie vegetal antiplánica autóctona *Malesherbia auristipulata* Ricardi, como una fuente potencial de sustancias biológicamente activas de posible aplicación terapéutica. Además de contribuir al conocimiento de la flora autóctona particular que habita el Altiplano chileno de la I región.

La vida de un ser vivo, está estrechamente relacionada a las condiciones físicas de su ambiente, de modo que una especie vegetal para sobrevivir en un conjunto particular de circunstancias ambientales, puede sufrir adaptaciones que influyan directamente en su composición química (Robbers y col., 1996).

Ciertamente el Altiplano chileno es un lugar de gran interés para los científicos, por ser un ecosistema único en el mundo que presenta una alta diversidad biológica y posee un hábitat peculiar. Su población vegetal está expuesta a cambios ambientales muy extremos, como es una altura de 4000 ms.n.m., encerrada entre imponentes montañas con temperaturas que varían hasta 40 grados entre el día y la noche, además de su limitada disponibilidad de agua y una alta radiación solar (el Altiplano ciencia y conciencia en los Andes, 1993), esto hace conjeturar que dichas plantas que habitan esta zona presenten ciertos tipos de metabolitos que colaboran en su sobrevivencia y éstos a su vez presentan efectos biológicos en el hombre, como queda demostrado por ejemplo con la comprobación de la actividad analgésica y antiinflamatoria de la especie vegetal *Fabiana densa* REMY var. *ramulosa* WEDD (Ramírez, 2002). También se hace interesante la investigación, por la probabilidad de encontrar nuevas moléculas, como fue el caso de los estudios realizados por Loyola y sus colaboradores de la Universidad de Antofagasta, quienes descubrieron nuevos diterpenos para las especies vegetales del altiplano de la

segunda Región (Loyola y col., 1997; Loyola y col., 1998) entre otros trabajos. Además de las investigaciones realizadas por el grupo de productos naturales de la Facultad de Ciencias Química y Farmacéuticas (Erazo y col., 2002 a y b).

Hemos entrado en un nuevo siglo donde se redescubren y se toma conciencia de los efectos terapéuticos de los principios activos que forman parte de las plantas medicinales, es por ello que nuestro estudio contribuirá a la validación de una técnica ancestral, donde se espera la posible revelación de nuevos metabolitos secundarios y que estos se empleen como fitofármacos.

Los fitofármacos no se contraponen con los medicamentos de síntesis, sino que constituyen una real alternativa válida en determinados momentos del proceso evolutivo de una enfermedad. Incluso pueden complementarse para beneficios del paciente. Es por ello que su uso debe ser racional como cualquier otro fármaco y es de gran importancia que los profesionales farmacéuticos estén al tanto de estas investigaciones y sean capaces de proporcionar una información adecuada a los pacientes cuando estos la soliciten.

Principios internacionales para investigación biomédica con animales

La experimentación con animales es fundamental en las ciencias biomédicas, no sólo para comprender los mecanismos celulares que son la base de la vida que conocemos, sino también para favorecer el desarrollo de mejores métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades que afectan al ser humano y a los animales. En los ensayos farmacológicos con productos naturales, el uso de animales de experimentación es necesario, para probar y validar sustancias aisladas biológicamente activas o extractos de la planta en estudio. Se realizan pruebas de potencia, alcance y toxicidad, de manera de certificar el real potencial de la especie vegetal en cuestión, con el fin de evitar su uso cuando represente un riesgo para la salud o por el contrario aportar con sus beneficios para el desarrollo de nuevas alternativas que permitan mitigar una amplia gama de patologías.

La utilización de animales de experimentación en el laboratorio de productos naturales se rige según las **Normas Internacionales**, en las cuales destacamos los siguientes puntos:

PRINCIPIOS INTERNACIONALES PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA QUE INVOLUCRA EL USO DE ANIMALES. Elaborado en Ginebra, 1990.

1. El avance del conocimiento en el área de la biología, y el desarrollo de mejores medios para la protección de la salud y bienestar tanto en el hombre como en animales, requiere como recurso, la experimentación con animales vivos, intactos, de una gran variedad de especies.

2. Los experimentos con animales deben ser encarados solamente después de estudiar su importancia y relevancia para la salud y el avance del conocimiento.

3. Los animales seleccionados para un experimento deben ser de la especie y calidad apropiadas para el mismo; debe usarse el mínimo número necesario para la obtención de resultados científicos válidos.

4. Los investigadores y todo el personal involucrado nunca deben dejar de tratar a los

animales como seres sensibles; deben tener en cuenta su cuidado y uso adecuado tratando de minimizar su dolor, mortificación y estrés como imperativos éticos.

5. Al final, o en el momento adecuado durante un experimento, aquellos animales que sufran dolor crónico o incapacidad irreversible deben ser sacrificados sin dolor.

6. Deben procurarse las mejores condiciones de habitabilidad para los animales; el cuidado de los mismos debe estar bajo supervisión de veterinarios o profesional con experiencia en animales de laboratorio.

7. Es responsabilidad del director de un instituto o departamento que utiliza animales, asegurar que los investigadores y personal tengan las calificaciones o experiencia adecuadas para conducir experimentos con animales.

La utilización de animales para propósitos científicos plantea un consenso general de que la crueldad deliberada es inaceptable, el trato sensible y apaciguador del dolor de los animales de experimentación es el apropiado.

El reconocimiento por los investigadores que están ejerciendo un privilegio y no un derecho sobre los animales es trascendental, se asegura su empleo para el real beneficio en los avances de la ciencia y la salud pública.

Los principios mencionados son adoptados para esta investigación en el desarrollo de las pruebas farmacológicas, empleada en la **Unidad de Mantenimiento de Animales del Instituto de Salud Pública "ISP"**.

Los ensayos que ejecuta el grupo de investigación del **Laboratorio de Productos Naturales**, con animales de experimentación cuentan con la aceptación de la Comisión de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

I. ANTECEDENTES GENERALES DE MALESHERBIA AURISTIPULATA RICARDI

I.1. Clasificación taxonómica

Clase : *Dicotyledoneas*

Orden : *Passiflorales*

Familia : *Malesherbiaceae*

Género : *Malesherbia*

Especie : *M. auristipulata*

Nombre científico: *Malesherbia auristipulata* Ricardi

Nombre vulgar : Ají de zorra



FIGURA 1. *Malesherbia auristipulata* Ricardi.

I.2. Descripción botánica

Sufrútice erguido, de 40-80 cm de altura, leñoso, tallo principal cortísimo, ramificado desde ras de suelo, muy veloso y glanduloso. Los órganos están cubiertos por un indumento denso, compuestos por pelos unicelulares finos y pelos glandulosos rojizos (Ricardi, 1965).

Las ramas son muy hojosas, leñosas, de color pardo verdoso, terminadas en racimos de flores. Las hojas tienen una disposición alterna, van disminuyendo su tamaño hacia la inflorescencia, son vellosas, especialmente en las nervaduras, de forma lanceoladas u oblongo-lanceoladas, margen lobulado, cada lóbulo con 3-7 dientes terminados en un grueso pelo glanduloso, nervadura hundida en la haz, sobresaliente en el envés. Estípulas 2, auriculiformes. Inflorescencia en racimos simples. Las flores son numerosas, persistentes, axilares, caedizas cuando maduran los frutos. Brácteas 2, subpuestas y vellosas. Receptáculo obcónico, membranoso, de color rojo pálido, hirsuto por fuera, glabro por dentro. Sépalos 5, casi lineares, de color rojo pálido, densamente veloso en ambas caras. Pétalos 5, linear-oblongos, veloso en ambas caras, de color rojo, ápice levemente emarginado, terminando en un grueso pelo glanduloso. Corona levemente dentado-obtusa en el ápice, de color purpúreo. Estambres 5, sobrepasan en mucho a los sépalos y presenta un mismo color que los pétalos. Pistilos 3, más cortos que los estambres. Ovario obtuso-cónico, más o menos globoso y veloso. Semillas numerosas, aovadas, con finas costillas longitudinales y transversales sobresaliente (Ricardi, 1965).

Por su inflorescencia y el colorido de las flores esta especie es muy vistosa.

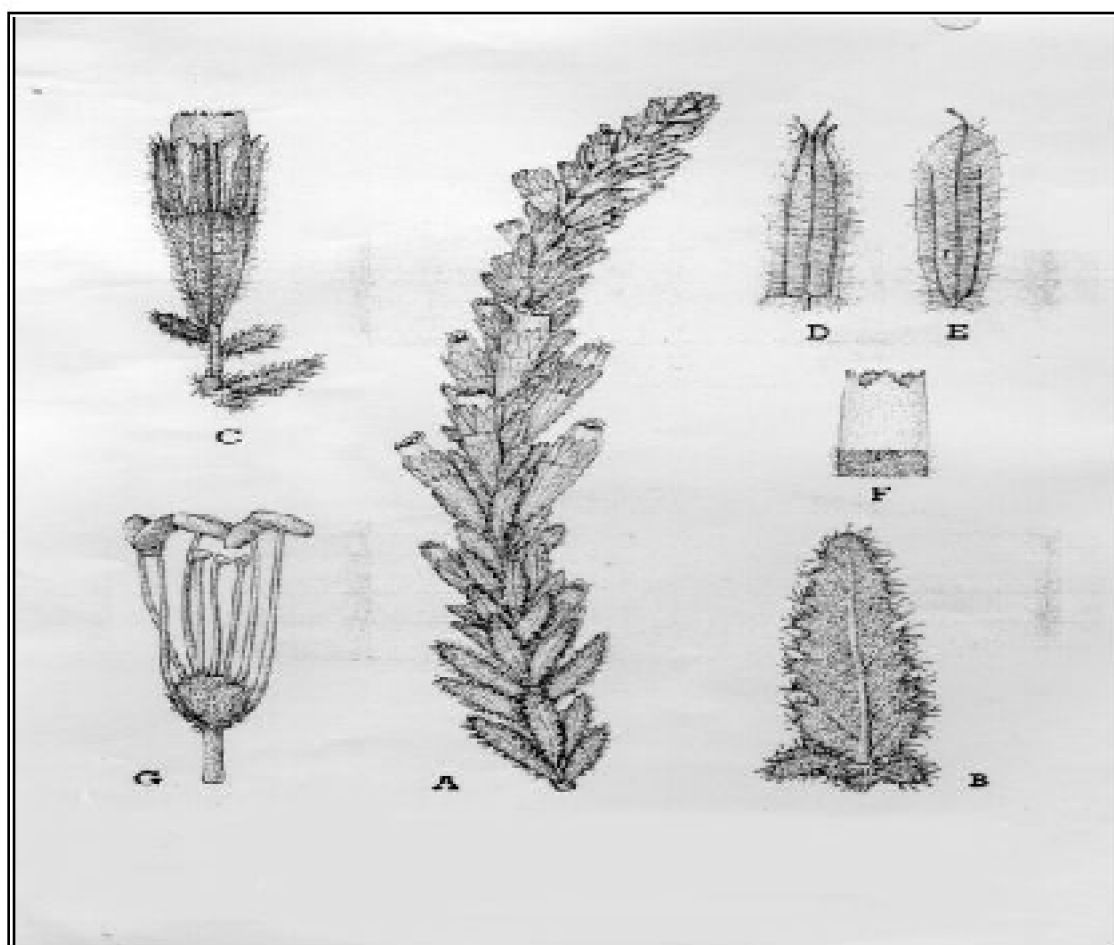


FIGURA 2. *Malesherbia auristipulata* Ricardi: **A**, rama (x 1); **B**, hoja inferior envés (x 2); **C**, ramita florífera (x 2); **D**, sépalo (x 5); **E**, pétalo (x 5); **F**, corona (x 2); **G**, estambres y pistilos (x 3) (Ricardi-Marticorena-matthei: 25). Dib. N. Moya.

Tiene afinidad con *Malesherbia turbinea* Macbride, pero se diferencia de ella por el indumento no tan denso, las hojas inferiores más grandes que van decreciendo hacia la inflorescencia, el margen lobulado y dentado y los sépalos truncado-dentados en el ápice.

Distribución geográfica: Sufrútice preandino componente de la vegetación de quebradas pedregosas de la región de Arica, interior del valle de Azapa, 1850-2100 ms.n.m. Sé trataría de un endemismo de área muy reducida (18° 30 S) (Ricardi, 1965).

I.3. Estudios anteriores de especies del género

Malesherbia

Según la información obtenida en la bibliografía consultada, no se han realizado estudios farmacológico o de toxicidad aguda para el género *Malesherbia*, sin embargo, se han implementado ensayos químicos para la especie vegetal *Malesherbia fasciculata* (Cramer, 1969), donde se describe el método utilizado para revelar la presencia de glucósidos cianogénéticos, taninos y tres tipos de alcaloides.

También se han desarrollado estudios microbiológicos con la especie vegetal *Malesherbia linearifolia* Poir, la cual dió como resultado la ausencia de respuesta frente a ciertas cepas gram (+) y gram (-) como: *Sarcina lutea*, *Staphilococcus aureus*, *Echerichia coli* (Pacheco y col., 1977).

Se han clasificado taxonómicamente dieciocho especies autóctonas principalmente ubicadas desde la región de Tarapacá hasta Coquimbo (Marticorena y Quezada, 1985).

De las especies autóctonas registradas, la medicina folclórica no les atribuye una actividad terapéutica conocida (Castro y col., 1982).

II. HIPOTESIS

Dado que nuestra especie vegetal en estudio *Malesherbia auristipulata* crece en un hábitat de características climáticas extremas para la supervivencia de ella misma, nos hace suponer que puede sintetizar ciertos metabolitos secundarios nuevos o no, que permitan la vitalidad de dicha planta y que éstos a su vez presenten efectos terapéuticos en el hombre.

Nuestros ensayos preliminares han demostrado que esta especie presenta efectos antibacterianos y analgésicos, por lo tanto, dado que los mecanismos de acción de una sustancia analgésica se encuentran estrechamente relacionados con la actividad antiinflamatoria (Goodman y col., 1996), se espera también encontrar este último efecto farmacológico.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivos generales

Contribuir al conocimiento farmacológico de las especies vegetales de la alta cordillera y/o altiplano chileno de la I Región, validando científicamente las propiedades terapéuticas de estas plantas.

Debido a la ausencia de estudios sobre las propiedades analgésicas y antiinflamatorias de *Malesherbia auristipulata*, es de nuestro interés estudiar ambas actividades farmacológicas, ya que existe una estrecha relación bioquímica entre los mecanismos de acción que regulan ambas respuestas.

III.2. Objetivos específicos

Evaluar la toxicidad aguda de los extractos obtenidos desde los tallos y hojas de *M. auristipulata*.

Evaluar las propiedades analgésica por vía oral y antiinflamatoria por vía tópica de los extractos de la parte aérea de la planta, obtenidos con hexano, diclorometano y

metanol de la especie *M. auristipulata* y del exudado resinoso extraído con diclorometano a partir de la planta fresca.

Evaluar las actividades antiinflamatoria y analgésica por vía tópica y oral respectivamente, del infuso al 10 % p/v de las hojas y tallos de *M. auristipulata*.

Identificar el o los metabolito(s) mayoritario(s) de los extractos farmacológicamente activos, mediante un estudio químico y espectroscópico.

IV. MATERIALES

IV.1. Estudio químico:

IV.1.1. Equipos

- Molino de cuchillo
 - Balanza granataria Ohaus
 - Rotavapor Büchi 461 Water Bath
 - Balanza de precisión
 - Baño termostático

IV.1.2. Material cromatográfico

- Cromatoláminas de gel de sílice tipo 60 con indicador de fluorescencia
 - Lámpara de luz UV a longitud de onda 254 y 366 nm
 - Columna de gel de sílice tipo 60

- Columna Sephadex

IV.1.3. Reactivos de coloración

- Reactivo de Dragendorff - Reactivo de Liebermann- Burchard - Reactivo p-anisaldehído sulfúrico	- Reactivo de $AlCl_3$ al 2% - Reactivo de $FeCl_3$ - Reactivo de NP/PEG
--	--

IV.1.4. Material de uso general

Matraces de vidrio Pipetas de diferente graduación Embudo de vidrio Probeta de vidrio Espátula	Papel filtro Whatman #1 Varilla de vidrio Capilares de vidrio Balón de vidrio Frascos
--	---

IV.1.5. Disolventes de uso extractivo

Grado pro-análisis

Eter Hexano Diclorometano	Acetato de etilo Metanol
---------------------------	--------------------------

IV.2. Estudio farmacológico

El material usado para cada evaluación farmacológica fue el siguiente:

IV.2.1. Evaluación de la toxicidad aguda

- Sonda gástrica de 4 french
 - Celda individualizada para cada ratón
- Balanza

IV.2.2. Evaluación del efecto analgésico

- Sonda gástrica de 4 french
 - Jeringa de 1 ml
- Celda individualizada para cada ratón

- Recipientes de vidrio transparente
- Solución de ácido acético al 0,6% p/v
- Goma arábica disuelta el NaCl al 9%0

IV.2.3. Evaluación del efecto antiinflamatorio

- Micropipetas P-20, P-200
 - Celdas individualizada para cada ratón
 - Sacabocado con un diámetro de 6mm
 - Ácido araquidónico (AA) 2 mg/20ul (Sigma)
 - 12-0-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) 2,5 ug/20ul (Sigma)
 - Balanza de precisión Sartorius Basic
 - Puntas plásticas estériles
 - Pinzas

V. METODOS

V.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

V.1.1. Recolección de la muestra vegetal:

La especie vegetal se recolectó durante el mes de diciembre del 2001 desde su hábitat natural en la zona preandina de la Primera Región al interior del valle de Azapa, 1850-2100 ms.n.m., presenta una distribución restringida a las quebradas próximas a la Cuesta El Águila (18° 30' sur). La recolección y identificación en terreno, fue realizada por la Botánica, Ms. Eliana Belmonte Prof. de la Universidad de Tarapacá.

V.1.2. Obtención de los extractos vegetales:

Como esta especie vegetal se encuentra recubierta con un exudado resinoso, para su extracción se introdujo la muestra, aún estando fresca (1,715 Kg de tallos y hojas), en el disolvente diclorometano (DCM) durante tres minutos, procedimiento que se repitió hasta agotar la resina.

El exudado resinoso fue concentrado en un evaporador rotatorio al vacío, el que

permitió separar la resina del disolvente orgánico volátil a una temperatura inferior a su punto de ebullición.

De esta manera se obtuvo 21,20 g del primer extracto en estudio, el exudado resinoso (ERES).

La parte aérea de la planta desprovista del exudado resinoso, fue secada a temperatura ambiente y a la sombra y posteriormente se pulverizó en un molino de cuchillos. El material vegetal se depositó en un percolador y a continuación se sometió a extracciones sucesivas a temperatura ambiente, con disolventes de polaridad creciente como son hexano, diclorometano y metanol, hasta agotamiento total del material vegetal con los distintos disolventes.

Los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida y a temperaturas inferiores de 60 °C y se llevaron a sequedad usando corriente de aire tibia para eliminar el resto de disolvente, como resultado se obtuvieron 2,3 g de extracto hexánico (EHEX), 8,8 g de extracto diclorometano (EDCM) y 75,5 g del extracto metanólico (EMET).

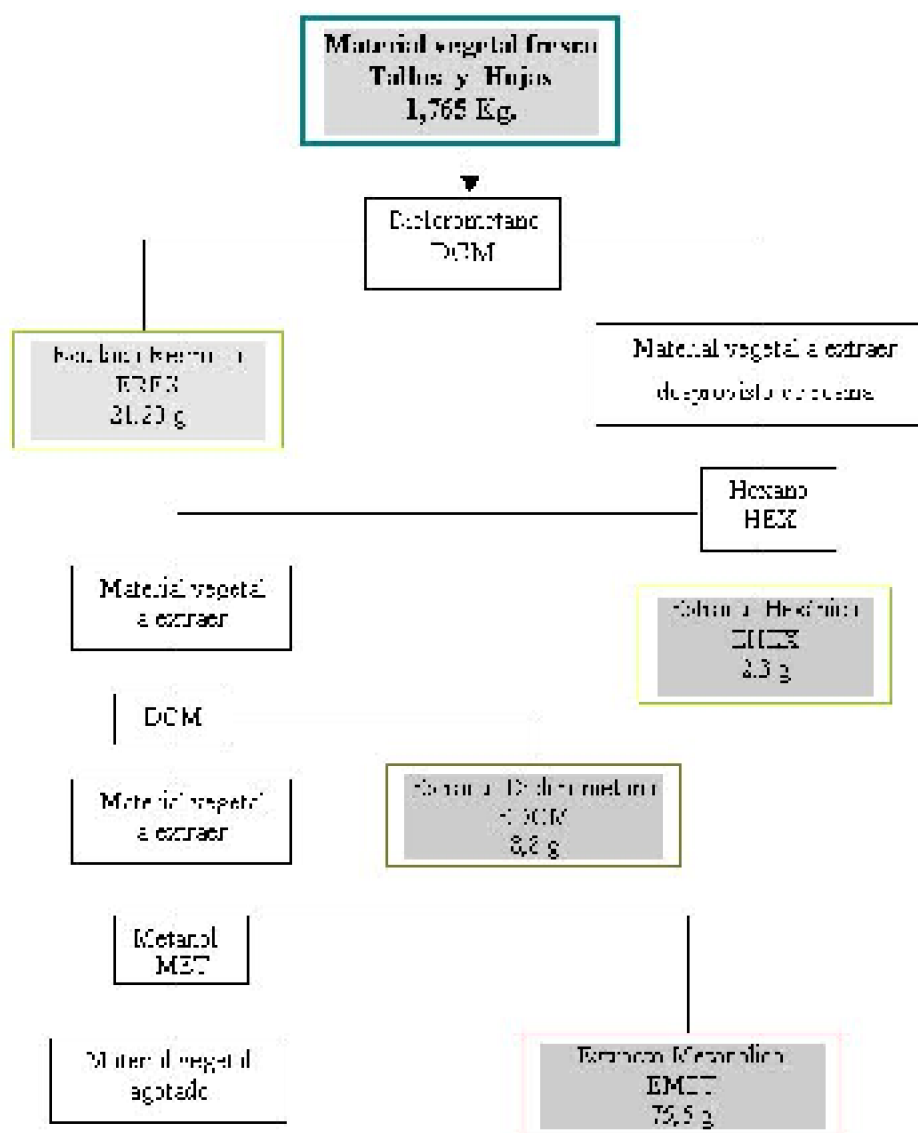


FIGURA 3. Esquema de extracción del material vegetal seco de *Malesherbia auristipulata*.

V.1.3. Análisis cromatográfico de los extractos

La composición química de los extractos hexánicos, diclorometano, metanólico y exudado resinoso se analizó por medio de la técnica de cromatografía en capa fina (c.c.f.), empleando cromatoláminas de gel sílice tipo 60 con indicador de fluorescencia (fase estacionaria). Las fases móviles utilizadas fueron disolventes orgánicos o mezclas de éstos, con polaridad definida, actuando como eluyentes sobre la cromatolámina, permitiendo la partición diferencial de las moléculas entre el adsorbente y el disolvente llevando consigo la separación. Las cromatoláminas fueron observadas bajo una lámpara de luz UV a 254 y 366 nm y reveladas con diferentes reactivos de coloración para la identificación de los diferentes grupos de compuestos químicos.

En el siguiente esquema, se describen las fases móviles utilizadas sobre los diferentes extractos en estudio, para la identificación de los principales metabolitos secundarios. A continuación se detallan los reactivos reveladores utilizados.

Metabolitos Secundarios	Mezcla de disolventes
Alcaloides, terpenos, triterpenos y esteroides	diclorometano: acetato de etilo (9:1)
Antraquinonas	diclorometano: acetato de etilo (8:2)
Flavonoides y Coumarinas	diclorometano: acetato de etilo (1:1)
Compuestos Cianogénéticos	acetato de etilo: metanol (9:1)
Taninos	acetato de etilo: metanol (8:2)

FIGURA 4. Disolventes usados sobre los diferentes extractos en estudio para la identificación de compuestos químicos.

Los reactivos de coloración utilizados fueron los siguientes:

◇ *Reactivo de Dragendorff*: Permite la detección de alcaloides y aminas cuaternarias. Éste reactivo está constituido por yoduro doble de bismuto y potasio y los alcaloides tienen la capacidad de combinarse con metales pesados tales como el bismuto y el yodo formando sales dobles que se visualizan por la aparición de una coloración anaranjada (Merck, 1972).

◇ *Reactivo de Lieberman-Burchard*: Se empleó para la observación de distintos compuestos orgánicos por ejemplo triterpenos, (al revelar presentan color morado) y esteroides (cuya coloración varía en el tiempo desde el color rosado al verde y posteriormente al pardo), entre otros. El reactivo está constituido por partes iguales de anhídrido acético y de ácido sulfúrico (Merck, 1972).

◇ *Reactivo de Börntrager*: Esta reacción se empleó para investigar la presencia de

grupos antraquinónicos en vegetales. Consiste en agregar un reactivo alcalino (NH_3 o solución de NaOH o KOH) ya sea, directamente sobre la droga en polvo o los principios ya extraídos. La aparición de una coloración roja indica la presencia de este tipo de compuesto (Merck, 1972).

◊ *Reactivo de NH_3 y AlCl_3 al 2% en etanol*: Estos permitieron identificar flavonoides y cumarinas, los cuales se caracterizan por presentar fluorescencia a la luz UV a 254 y 366 nm. Al exponer los flavonoides a los vapores de amoníaco dan una coloración amarilla al visible y su fluorescencia se intensifica al exponerlos a la luz UV. Además los flavonoides dan diversas coloraciones con AlCl_3 al 2% en etanol al espectro visible e intensificación del color a la luz UV, en tanto que las cumarinas dan fluorescencia de color celeste a la luz UV y la intensifican con los reactivos anteriormente nombrados (Mabry y col., 1970).

◊ *Reactivo de FeCl_3* : Se utilizó para identificar compuestos que posean en su estructura una función fenólica, como los taninos. Según la naturaleza química del tanino se observarán coloraciones que varían desde el azul (pirogálicos) hasta el verde (catéquicos). Compuestos como los flavonoides pueden generar coloraciones verdes (Merck, 1972).

◊ *Reactivo de *p*-anisaldehído sulfúrico*: Este reactivo preparado con anisaldehído, ácido acético glacial y ácido sulfúrico, permitió detectar la presencia de terpenos, aceites esenciales y saponinas triterpénicas, por medio de la aparición de coloraciones que variaron del azul al violeta (Wagner y col., 1984).

◊ *Reactivo NP/PEG*: Este reactivo se empleó para detectar flavonoides y glicósidos de flavonas, consiste en una mezcla de difenilboriloxietilamina (NP) y polietilenglicol etanólico 4000 (PEG) en una razón de (5:4). Produjo inmediatamente después de rociada la placa y bajo luz UV a 366 nm una intensa fluorescencia que emite un color que va desde anaranjado, amarillo verdoso y verde oscuro, dependiendo de la estructura de los flavonoides (Wagner y col., 1984).

◊ *Índice de espuma*: Este ensayo permitió detectar la presencia de saponinas (sustancias con propiedades tensioactivas) a través de la formación de espuma persistente (durante 15 min), usando 1g de droga o de extracto vegetal seco, en un volumen apropiado de agua destilada (Gautier, 1954).

V.1.4. Identificación por semejanza a estándares

La identificación de sustancias presentes en los distintos extractos de *Malesherbia auristipulata* se realizó mediante c.c.f, basándose en el comportamiento cromatográfico de estas sustancias comparadas con estándares. Las características cromatográficas desarrolladas por la sustancia en estudio frente a diversos reactivos de coloración en diferentes sistemas de disolventes o mezcla de ellos y la distancia de migración recorrida, expresada como relación frontal (Rf), fueron comparados con la conducta cromatográfica de diversos patrones, estableciendo la presencia o ausencia del metabolito conocido.

V.1.5. Fraccionamiento de los extractos activos

Esta etapa fue dirigida sobre la base de resultados preliminares que se realizaron a los diferentes extractos, tales como, pruebas antimicrobianas, farmacológicas (prueba de analgesia y antiinflamación) y químicas a través de c.c.f., se decidió descartar el EHEX por presentar menor actividad biológica y se purificaron aquellos extractos de mayor actividad, tales como: ERES, EDCM y EMET.

La técnica utilizada para separar los componentes de los extractos activos, fue la cromatografía de columna rápida y seca y la columna con Sephadex LH-20. La preparación y elución se detalla a continuación:

Se montó una columna de vidrio cuyo diámetro depende del peso de la muestra (Hardwood, 1982), en su interior contiene frita en la base y sobre ésta se rellena con adsorbente seco (gel de sílice tipo 60 que constituye la fase estacionaria), colocando previamente papel filtro en el fondo. Usualmente se recomienda una relación de adsorbente v/s muestra (10:1) en el relleno de la columna, se golpea suavemente la columna para que el empaque sea uniforme, y se aplica vacío para compactarla, con el fin de obtener un medio homogéneo y lograr una mejor separación. Posteriormente la columna debe estar completamente impregnada con el eluyente menos polar (hexano disolvente que corresponde a la fase móvil) antes de proceder a colocar la muestra, de manera de humectar y eliminar el aire contenido en el adsorbente, nuevamente aplicando vacío para lograr una mayor compactación (Fischer y col., 1989).

Por otra parte se preparó la cabeza de la columna (mezcla del adsorbente y muestra a separar), siendo la muestra un compuesto sólido (extracto seco), ésta debe disolverse en una pequeña cantidad de eluyente para luego mezclar con una mínima cantidad del adsorbente (gel de sílice tipo 60). Una vez seca la mezcla se tamiza para homogenizar.

La cabeza se puso en la columna separada por dos papeles filtros y se compactó. Se procedió a eluir la muestra aplicando cantidades fijas de disolvente y en polaridad creciente colectando las diferentes fracciones a la salida de la columna en un matraz Kitazato. Las fracciones fueron concentradas por medio de la utilización de un evaporador rotatorio, para posteriormente lograr la separación del compuesto activo y su identificación.

Por medio de c.c.f. se hizo un seguimiento a las fracciones colectadas de la columna rápida seca, observándolas a la luz UV (254 y 366 nm) y revelando con reactivo p-anisaldehído sulfúrico.

La columna de Sephadex LH- 20 se utilizó para purificar las fracciones obtenidas de la columna anterior, que contienen clorofila la que interfiere en la visualización de las cromatoplasmas y ensayos biológicos. Debido a que presenta un alto peso molecular es eluida en las primeras fracciones separándose de las restantes. Básicamente se preparó la columna de la misma forma que la columna anterior, tomando como precaución, nunca dejar que la columna se seque ya que de lo contrario permite la formación de canales haciendo la separación poco eficiente, de modo que debe estar completamente impregnada con el eluyente y por otra parte se recomienda una relación adsorbente v/s

muestra (30:1), en el momento de llenar la columna con el adsorbente seco.

V.1.5.1. Fraccionamiento del Exudado Resinoso:

V.1.5.1.1. Fraccionamiento del Exudado Resinoso, Primera Columna (A):

Se realizó una primera columna que se resume en la figura 5, en la cual se fraccionaron 15 g de ERES, usando como primer disolvente HEX puro. Una vez agotada la columna con este disolvente se prosiguió agregando incrementos de un 50 % de disolvente DCM hasta llegar al DCM puro, del mismo modo se aumentó en un 50 % de disolvente MET hasta eluir la columna con MET puro. Procedimiento que permitió orientar en que etapa del fraccionamiento del exudado resinoso se encuentran los componentes mayoritarios y que son de nuestro interés identificarlos, de esta columna se separaron 5 fracciones.

1. Fracción HEX 100%
2. Fracción HEX:DCM (1:1) → (10 g)
3. Fracción DCM 100%
4. Fracción DCM:MET (1:1)
5. Fracción MET 100%

FIGURA 5. *Fraccionamiento del Exudado Resinoso, Primera Columna (A).*

Todos estos extractos fueron cromatografiados en cromatoláminas de gel sílice usando como líquido de desarrollo DCM:ACET (9:1) para las fracciones 1, 2 y 3 y ACET:MET (1:1) para las fracciones 4 y 5 y revelados con reactivo p-anisaldehído sulfúrico. La fracción 2 constituido por HEX:DCM (1:1) presentaba la mayor cantidad de constituyentes, seleccionándose esta fracción para realizar un nuevo fraccionamiento en una segunda columna.

V.1.5.1.2. Fraccionamiento de la Segunda Columna (B):

La cabeza de la columna se preparó usando 10g de las fracciones HEX:DCM (1:1) obtenidas de la columna anterior.

El primer disolvente utilizado para eluir la columna fue HEX puro en volúmenes de 300 ml luego se continuó con la mezcla de disolvente HEX:DCM (1:1), se incrementó paulatinamente en un 10 % con DCM hasta llegar a DCM puro. Del mismo modo se agregó un incremento de un 10 % de ACET hasta llegar al ACET puro para terminar con un aumento de un 10 % de MET hasta llegar a MET puro. Todas las fracciones colectadas de esta columna fueron analizadas por c.c.f. y reveladas por medio del reactivo p-anisaldehído sulfúrico.

Entre las fracciones 17 y 36 obtenidas con la mezcla de disolvente HEX: DCM (3:7) se observó, al evaporar el disolvente, un sólido de color blanco que da una mancha de

color café al ser cromatografiada y revelada con reactivo p-anisaldehido sulfúrico, no da fluorescencia al exponerlo bajo una lámpara de luz UV 366nm. Se comparó su comportamiento cromatográfico con los siguientes patrones, ácido ursólico, friedelina, lupeol y prunasina en una fase móvil DCM:HEX (8:2), no coincidiendo con ninguno de ellos. Este sólido fue separado y purificado de manera de obtener un precipitado blanco al cual denominaremos ***Malesh* – 17**. Este compuesto fue sometido a análisis espectroscópico mediante cromatografía de Gas-Masas.

Entre las fracciones 300 y 429 obtenidas por medio de un sistema de dilución DCM:ACET (7:3), se separó una vez evaporado el disolvente, un líquido transparente, pegajoso de aspecto aceitoso, dando una mancha de color azul morado al ser revelado con reactivo p-anisaldehido sulfúrico, líquido al cual denominaremos ***Malesh* – 1**.

Debido a que la fracción anterior comprendida entre los tubos 300 y 429 se encontraba impurificada con clorofila se procedió a realizar una columna con Sephadex LH-20 de manera de eliminar esta interferencia, utilizando un sistema de disolventes de HEX:DCM:MET (3:6,5:0,5).

A continuación, la figura 6 resume el fraccionamiento de 10 g de la fracción HEX:DCM (1:1) del exudado resinoso de tallos y hojas de *Malesherbia auristipulata*, desarrollada en una segunda columna (B).

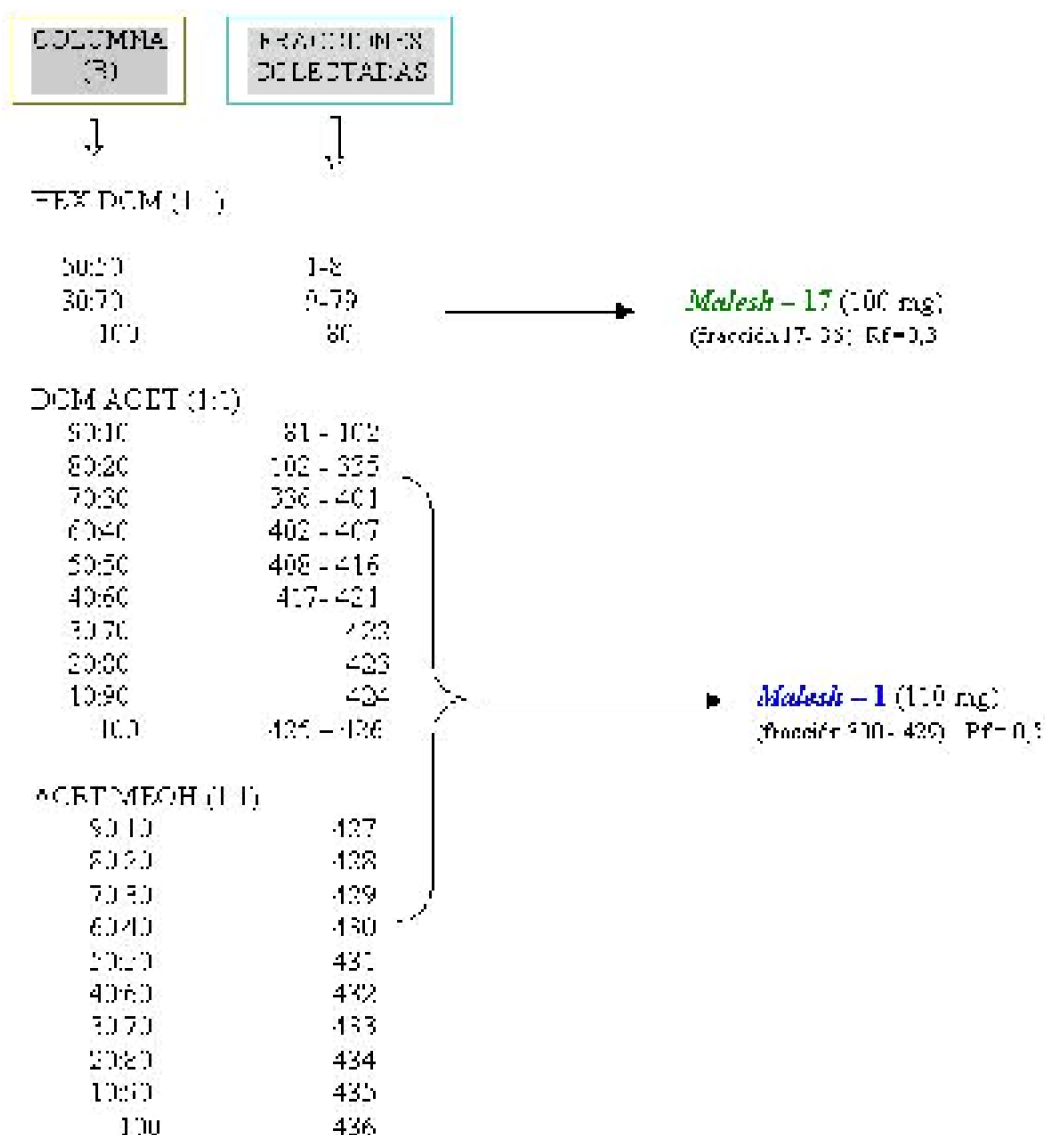


FIGURA 6. Fraccionamiento de la segunda columna (B).

V.1.5.2. Fraccionamiento del Extracto Diclorometano

El EDCM (6,0 g) fue fraccionado en una columna rápida seca (columna C), usando como primer disolvente, HEX puro. Una vez agotada la columna con este disolvente, se prosiguió agregando incrementos de un 50 % de disolvente DCM hasta llegar a DCM puro. Del mismo modo se agregó un 50% de ACET hasta llegar a ACET puro y finalmente se incrementó la polaridad de la fase móvil en un 50% con MET hasta eluir la columna con MET puro. De este estudio se obtuvieron las fracciones que se detallan en la figura 7.

Por medio de cromatografía de capa fina, se visualizaron en las fracciones DCM y DCM:ACET (1:1) varios componentes, luego de ser revelado con reactivo p-anisaldehído sulfúrico. Como dichas fracciones contenían clorofila se procedió a purificarlas a través de columna de Sephadex LH-20 (columna D y F respectivamente) las que fueron eluidas con un sistema HEX:DCM:MET (3:6,5:0,5).

Las fracciones obtenidas desde el extracto DCM purificado, fueron cromatografiadas en capa fina, observándose que en las quince primeras predominaba un compuesto de naturaleza esteroidal y en las restantes se encontraban productos con características de flavonoides. Se juntaron las primeras quince fracciones y las denominamos *fracción esteroide 1* y las restantes que contenían los flavonoides originaron la *fracción flavonoide 1*. De igual manera las fracciones purificadas provenientes del extracto DCM:ACET (1:1) fueron cromatografiadas en capa fina observándose que en las primeras fracciones se encontraba aunque en cantidad inferior (respecto al extracto clorofórmico) otros productos esteroidales (*fracción esteroide 2*) y en las siguientes predominaban los flavonoides (*fracción flavonoide 2*).

De la *fracción esteroide 1* se obtuvo una sustancia que en c.c.f. usando como líquido de desarrollo DCM puro y posteriormente revelada con p-anisaldehído sulfúrico, presentó color morado con un $R_f = 0,6$ y que se designó como **Malesh-2**. Se comparó con estándares tales como β -sistosterol y ácido ursólico.

Con el fin de purificar mejor el producto **Malesh-2** se preparó una nueva columna rápida, seca de gel de sílice (columna E).

Para la columna E se utilizó como cabeza la *fracción esteroide 1* y como primer disolvente HEX puro. Se continuó paulatinamente agregando incrementos de un 10% de disolvente de polaridad creciente DCM, ACET y MET hasta eluir la columna con MET puro.

La sustancia que denominamos **Malesh-2** se separó entre las fracciones 30 y 35 obtenidas por medio de un sistema de dilución HEX:DCM (8:2), separándose un precipitado blanco aproximadamente de 5 mg, que luego de ser recristalizado se sometió a un estudio espectroscópico a través de cromatografía de Gas – Masas.

En la *fracción flavonoide 2* se observaron por c.c.f. y bajo luz UV 366nm, varios compuestos que emiten fluorescencia de color celeste pálido, amarillo intenso y pálido al ser revelado con el reactivo NP/PEG. Las sustancias presentes fueron comparadas con los siguientes patrones, ácido clorogénico, ácido cafeico, canferol, quercetina y la cumarina escopoletina.

Los compuestos de esta fracción se encontraban impuros, de modo que se purificaron mediante una nueva columna de Sephadex LH-20 (columna G), utilizando un sistema de elución HEX:DCM:MET (3:6,5:0,5).

Entre las fracciones 15 y 19 obtenidas de la columna G, destaca un compuesto que tiene un $R_f = 0,5$ usando un sistema móvil de DCM:ACET (8:2) y al ser revelado con NP/PEG dió un color amarillo oro, este compuesto se denominó **Malesh-3** y se comparó con patrones como quercetina y canferol.

A continuación la figura 7 resumen el fraccionamiento del extracto DCM de hojas y tallos de *Malesherbia auristipulata*.

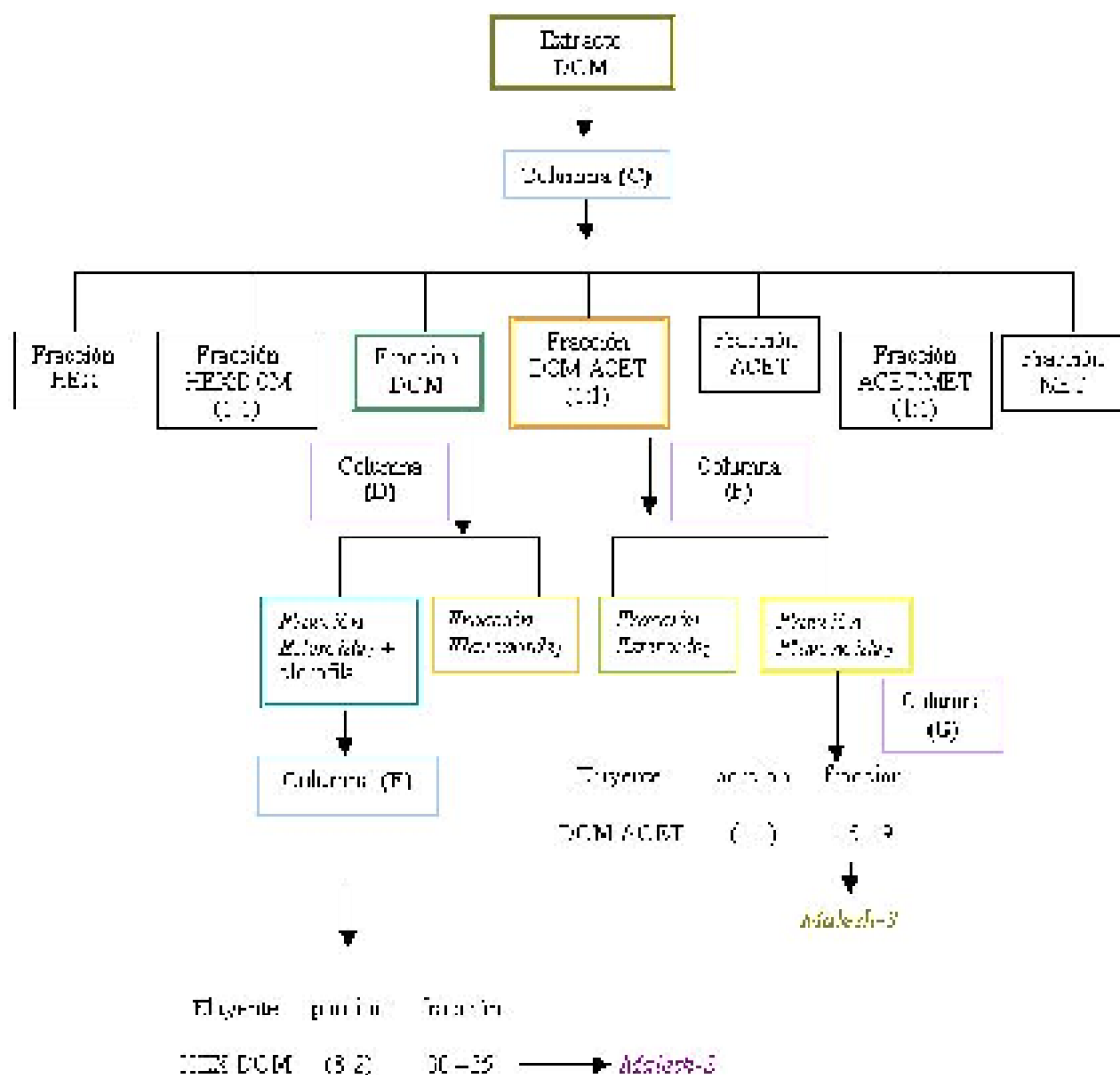


FIGURA 7. Esquema del Fraccionamiento del extracto DCM.

V.1.5.3. Fraccionamiento del Extracto Metanólico

El EMET (20g) fue fraccionado en una columna rápida seca (columna H), usando como primer disolvente, HEX puro. Se continuó agregando incrementos de un 50% de disolvente de polaridad creciente hasta llegar a MET puro, fraccionamiento que se resumen en el siguiente figura 8:

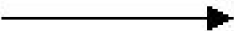
1. Fracción HEX 100%
2. Fracción HEX:DCM (1:1)
3. Fracción DCM 100%
4. Fracción DCM:ACET (1:1)  *Malesh-4*
5. Fracción ACET 100%
6. Fracción ACET:MEOH (1:1)
7. Fracción MET 100%

FIGURA 8. Fraccionamiento del EMET en columna (H).

Por c.c.f. se detectó en la fracción 4 utilizando una fase móvil DCM:ACET (1:1), la presencia de un compuesto que emite una fluorescencia amarilla al ser revelado con NP/PEG y observado bajo luz UV 366nm. Se trataría de un flavonoide al cual se le denominó *Malesh-4* y se comparó con patrones tales como canferol y quercetina.

V.1.6. Técnicas Espectroscópica

La identificación estructural de los compuestos de nuestro interés, se realizó mediante la técnica espectroscópica Gas - Masas.

Los espectros de Gas – Masas se registraron en un Cromatógrafo GC-MS Fisions modelo MB800, usando una columna Hewlett Packard ultra 2, de 15 m de longitud, espesor 0,25 μm , diámetro 0,32 mm.

V.1.7. Obtención de los infusos:

La preparación de los infusos al 10 % p/v, se realizó vertiendo 20 mL de agua destilada hirviendo sobre 2 g de material seco y molido correspondiente a tallos y hojas de *Maleshebia auristipulata*, se dejó enfriar y filtró.

Del infuso se determinó el residuo seco/mL, llevando 1 mL de la preparación anterior a sequedad en una cápsula de porcelana la cual se dejó en un desecador durante 24 hrs, posteriormente el residuo seco fue pesado en una balanza analítica.

V.2. Estudio farmacológico

V.2.1. Determinación de la toxicidad aguda por vía oral

Las pruebas de toxicidad aguda son un procedimiento fundamental para detectar riesgos que ocurren durante un breve lapso o con posterioridad a la administración de una dosis, para lo cual se suministran dosis únicas grandes hasta el nivel letal de manera de determinar la dosis máxima tolerada, si se llegara a producir muerte en los animales determinaríamos la dosis letal 50 (DL₅₀) o sea la dosis que mata el 50% de los animales (Katzung, 1999).

La toxicidad aguda permite establecer un margen seguridad determinando el rango de dosificación para los ensayos farmacológicos.

Para realizar este ensayo se utilizaron 10 ratones de la cepa CF1 no consanguíneos, las condiciones que presentaron estos animales no manipulados fueron: estar en ayuna durante las 24 horas previas a la prueba, sólo con acceso a agua *ad libitum* y pesar entre 20–25 g.

Los distintos extractos secos de *Malesherbia auristipulata* fueron suspendidos en goma arábiga al 5 % (en NaCl 0,9 %), administrado por vía oral, en dosis única de 2 g/kg de peso y en volúmenes de 0,4 mL, utilizando para ello una sonda gástrica de 4 french (Delporte y col., 1998).

Luego los animales se individualizaron y enumeraron en distintas celdas observando las primeras manifestaciones una vez ingerido los distintos extractos, de esta manera se mantuvieron durante una semana en condiciones adecuadas, tales como, una temperatura estable (8 a 20 °C) alimento normal y agua.

Se controló durante 7 días la variación del peso de los animales y ésta se comparó con la variación del peso de los animales controles.

V.2.2. Determinación de la actividad analgésica

Para determinar si tallos y hojas de *Malesherbia auristipulata* producen anti-nocicepción, es necesario activar los receptores del dolor en los animales de prueba. Se indujo un modelo de dolor agudo, por medio de la estimulación química, el cual se caracteriza por la respuesta al estímulo en forma automática y en un desarrollo temporal breve (Ortega, 2002). Se utilizó un modelo estandarizado de dolor visceral, localizando el estímulo doloroso en la cavidad peritoneal de los ratones, produciendo contorsiones, éstas definidas como una distensión exagerada del abdomen combinada con el estiramiento de las patas traseras (Reichert y col., 2002).

Para este ensayo se realizó el método de contorsiones inducidas con una solución acuosa al 0,6 % p/v de ácido acético inyectando por vía intra peritoneal a ratones con ayuna previa de 24 horas y mantenidos con agua *ad libitum* (Delporte y col., 2002).

Se utilizaron 10 ratones de la cepa CF1, de ambos sexos, no consanguíneos, de 30 a 35 días de edad que presentaron pesos entre 20 – 25 g y fueron elegidos a la azar. Para cada ensayo se utilizaron 8 animales tratados y 2 animales controles (Nakamura y

Shizimu, 1981). Para calcular los efectos se utilizaron un total de 16 animales controles. Para usar un mínimo de animales, se llevó un historial con efectos de animales que fueron sometidos a las mismas condiciones en similares ensayos.

Los distintos extractos de *Malesherbia auristipulata* fueron suspendidos en goma arábica 5 % (en NaCl 0,9 %) como vehículo, sus características permiten suspender el extracto y no interfiere en el ensayo.

La dosis única de los extractos es de 600 mg/kg de peso, fue administrada por vía oral en volúmenes de 0,4 mL para cada ratón, utilizando para ello una sonda gástrica de 4 french. Los animales controles sólo recibieron el vehículo. Para compuestos o extractos más purificados la dosis se redujo.

Luego de transcurrida una hora, se le inyectó a cada animal 0,5 mL de ácido acético al 0,6% p/v, vía intra peritoneal, los animales fueron colocados en el interior de unos recipientes de vidrio transparente, individualizados del 1 al 10.

Una vez administrado el agente algésico se esperaron 5 minutos para iniciar el conteo de las contorsiones. Se registró el número total de contorsiones en los 30 minutos siguientes a la administración de ácido acético. Una vez concluido el ensayo, los animales fueron sacrificados inmediatamente por un método indoloro como es la dislocación cervical.

Para obtener el porcentaje de efecto analgésico de la muestra en estudio, junto con su correspondiente error estándar (SEM), se calculó la mediana del número contorsiones producidas por cada lote (C_m , grupo muestra) y se comparó con la mediana de las contorsiones observadas en el grupo que recibe solamente el ácido acético (C_c , grupo control) (Nakamura y Shizimu, 1981).

Se utilizó la mediana ya que es una medida de tendencia central que se prefiere al promedio en muestras cuyos valores presentan distribuciones asimétricas. Es un parámetro estadístico que no se ve afectado por valores extremos, dividiendo una distribución de frecuencia en dos mitades y dando en ambas un mismo valor (Neave, 1980).

Posteriormente se calculó el porcentaje de dolor (% D), mediante la siguiente fórmula:

Fórmula N°1: Porcentaje de dolor (%D).

$$\%D = \frac{C_m}{C_c} \times 100$$

Finalmente el porcentaje de efecto analgésico (%An), se determinó con esta fórmula:

Fórmula N°2: Porcentaje de analgesia (%An).

$$\%An = 100 - \%D$$

El error estándar de las medidas de los grupos control (C_c) y grupos con muestra

(Cm), se calculó con:

Fórmula N°3: Determinación del error estándar (SEM).

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n - 1}}$$

Siendo σ la desviación estándar y n el número de los animales utilizado en el ensayo

Luego de obtener el % efecto analgésico de la muestra, éste fue comparado con un medicamento de demostrada efectividad analgésica, para ello se realiza la misma prueba utilizando como fármaco de referencia, naproxeno sódico (donado por el laboratorio Saval), éste es administrado en los animales en solución acuosa y en distintas dosis (desde 1,6 a 16 mg/kg) presentando un efecto dependiente de la dosis. El efecto máximo registrado fue de 12,5 mg/kg de peso, obteniendo un valor de 70 % efecto de analgésico (Cabezas, 1997; Delporte y col, 2002).

Siendo este un ensayo práctico son muchas las variables que pueden interferir en los resultados de la prueba es por ello que se debe someter el ensayo a una prueba estadística que nos certifique la significancia al efecto que estamos calculado y no que este resultado se deba al azar, de modo que se utilizó la prueba estadística de Wilcoxon, para datos independientes, se consideró un valor estadísticamente significativo cuando el $p < 0,05$ (Neave, 1980; Hollander y Wolfe, 1973).

V.2.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica

La inflamación es un mecanismo de compensación que se produce como respuesta del tejido vivo frente a una agresión y tiene como objetivo destruir o inactivar el agente proinflamatorio. Para este ensayo se provocó una inflamación aguda tópica, que se caracteriza por un aumento de flujo sanguíneo en la zona lesionada, resultado de una dilatación arteriolar y de la abertura de los lechos capilares. Esta mayor permeabilidad produce acumulación de líquido extracelular rico en proteínas, dando origen al exudado lo cual observamos como enrojecimiento, dolor, calor y la hinchazón denominada edema (Jurlow, 1996).

El estudio de esta actividad se basó en la producción de edema por aplicación tópica de agentes inflamatorios, ácido araquidónico (AA) y 12-O-tetradecanoiforbol 13-acetato (TPA), en orejas de ratones (Lloret y Moreno, 1995), utilizando 10 ratones para cada prueba y dejando dos de control. Se usaron ratones de la cepa CF-1 convencional, de ambos sexos, no consanguíneos, de 30 a 35 días de edad y peso entre 20 y 25 g. Los que permanecieron 24 horas en ayunas antes de cada ensayo solo con agua *ad libitum*.

Para realizar esta evaluación, se aplicaron los diferentes extractos y fracciones de tallos y hojas de *M. auristipulata* sobre la oreja derecha del animal, disuelto previamente en un disolvente volátil, éste permite aplicar la muestra y a la vez se volatiliza con el fin de no interferir en la formación del edema (Payá y col., 1993), se usó acetona, hexano y

etanol dependiendo de la naturaleza de cada extracto, de acuerdo a esto, el ERES se disolvió mejor en etanol 80% y sus fracciones en acetona, el EHEX se disolvió en hexano, el EDCM, sus fracciones y el EMET en acetona, el infuso se disolvió en etanol 70 % y finalmente para los agentes flogístico AA y TPA se usó acetona.

Los distintos extractos y sus fracciones se aplicaron sobre la oreja derecha, a una dosis de 3,0 mg/20 µL y 1,0 a 0,5 mg/20 µL respectivamente para la prueba con TPA, mientras que en el ensayo con AA se utilizó una dosis de 3,0 mg/20 µL para los extractos globales y 1,0 mg/20 µL para las fracciones. Los 20 µL se adicionan por medio de una micropipeta aplicando en la oreja derecha 10 µL sobre la cara interna y otros 10 µL sobre la cara externa. De esta misma manera, se adicionó solamente el vehículo sobre la oreja izquierda.

Una vez aplicado el extracto en estudio se esperaron 5 minutos, cumplido este tiempo se aplicó el agente flogístico sobre la oreja derecha. En la oreja izquierda se adicionó el vehículo del agente inflamatorio (acetona). La dosis aplicada de AA y de TPA fueron 2 mg/20 µL y 2,5 µg/20 µL respectivamente, adicionando 10 µL en la cara interna y 10 µL en la cara externa de la oreja derecha del animal (Delporte y col, 2002).

Los animales controles sólo recibieron el agente flogístico en la oreja derecha y vehículo en la izquierda.

Transcurrido el tiempo de inflamación máxima, que para el caso del AA es de una hora y para el TPA de 4 horas (Delporte y col, 2002), se procedió a sacrificar a los animales inmediatamente, por el método de dislocación cervical, para luego cortar a través de un sacabocado una porción de 6 mm de diámetro de la oreja derecha y otra de la izquierda. Estos dos trozos de un mismo ratón fueron pesados en una balanza de precisión de manera de obtener la diferencia de peso de ambas orejas y de la misma forma se procede con los demás ratones.

La inflamación se estableció como el aumento de peso de la porción de la oreja en la cual se aplicó el agente inflamatorio, con respecto al peso de la porción de la otra. La mediana de las diferencias entre el peso de ambas porciones proporciona la magnitud del edema de cada lote, asignando el valor 100 al grupo que recibe sólo el AA o TPA.

El fármaco de referencia nimesulida (donado por el Laboratorio Chile) para el ensayo con AA e indometacina (donado por el Laboratorio Madex) al utilizar TPA. Nimesulida a la dosis de 1 mg/20 µL alcanzó un efecto anti-inflamatorio tópico de 48,8% e indometacina en una dosis de 0,5 mg/20 µL, presentó un efecto antiinflamatorio de 81,8% (Delporte y col, 2002; Vidal, 2000).

La actividad antiinflamatoria tópica se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

Formula N°4: Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica.

$$\%Ainf.T = \frac{[D \text{ control} - D \text{ muestra}]}{D \text{ control}} \times 100$$

-% Ainf.T: Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico

-D control (Dc): La diferencia de peso (mediana) de las orejas derechas e izquierdas de los animales controles

-D muestra(Dm): La diferencia de peso (mediana) de las orejas derechas e izquierdas de los animales que recibieron la muestra

El error estándar se determinó de acuerdo a la fórmula 3.

La significación del efecto se calculó con la prueba estadística de Wilcoxon para datos independientes considerando un valor estadísticamente significativo cuando el $p \leq 0,05$ (Neave, 1980; Hollander y Wolfe,1973).

VI. RESULTADOS

VI.1. Estudio Fitoquímico

VI.1.1. Obtención de los extractos

A partir de 1,765 Kg de hojas y tallos de *M. auristipulata*, se obtuvieron las siguientes cantidades de extractos luego de las sucesivas extracciones con disolventes orgánicos:

TABLA 1. Rendimiento del material vegetal.

Extractos	Peso (gramos)	Rendimiento (%)
ERES	21,20	1,24
EHEX	2,3	0,14
EDCM	8,8	0,51
EMET	75,5	4,4

El rendimiento corresponde a la cantidad de extracto obtenido respecto a la cantidad de planta total utilizada.

VI.1.2. Análisis Cromatográfico de los extractos

Analizando los diferentes extractos de *M. auristipulata* por c.c.f. y a través de una fase móvil descrita para cada metabolito secundario se pudo evidenciar la presencia o no de estos compuestos los cuales se resumen en la tabla 2.

En cada uno de los casos el símbolo (+) indica que la reacción es positiva frente a la reacción de identificación y el símbolo (-) indica reacción negativa.

TABLA 2. Resultados del estudio fitoquímico de los extractos globales.

Reactivos	Fase móvil	ERES	EHEX	EDCM	EMET
Alcaloides (Dragendorff)	DCM:ACET (9:1)	-	-	-	-
Triterpenos – Esteroides (Liebermann – Burchard)	DCM:ACET (9:1)	+	+	+	-
Antraquinonas (Borntrager)	DCM:ACET (8:2)	-	-	-	-
Flavonoides (AlCl ₃ y Vap.NH ₃)	DCM:ACET (1:1)	+	-	+	+
Taninos (FeCl ₃)	DCM:MET (8:2)	-	-	-	++
Terpenos (p – anisaldehído)	DCM:ACET (9:1)	+	+	+	-
Saponinas (índice de espuma)	DCM:ACET (9:1)	-	-	-	+
Cumarinas (Luz UV. Vapores de NH ₃ y AlCl ₃)	DCM:ACET (1:1)	-	-	+	+
Cianogénicos (Prunasina y papel picrosolado)	ACET:MET (9:1)	-	-	-	-

(*) La reacción de identificación toma un color azul que corresponde a taninos pirogálicos.

VI.1.3. Identificación de metabolitos secundarios por comparación con estándares

La comparación de compuestos mayoritarios con estándares conocidos, por medio de c.c.f., permite confirmar o no la presencia del metabolito conocido.

El compuesto *Malesh-2* separado del EDCM, presentó una coloración característica al ser revelado con p-anisaldehído sulfúrico (morado a café), fue comparado con el estándar β -sistosterol. A continuación se detallan ambos comportamientos cromatográficos (Rf):

TABLA 3. Comparación cromatográfica del compuesto *Malesh-2* frente a β – sistosterol.

Sistema de disolventes	Rf: <i>Malesh-2</i>	Rf: β - sistosterol	Reactivo: p-anisaldehido sulfúrico
DCM:ACET (8:2)	0,6	0,6	+
DCM:ACET (9:1)	0,75	0,75	+

El compuesto *Malesh-3* que obtuvimos del EDCM, destacaba por presentar una coloración característica al ser revelado con NP/PEG (amarillo oro), este compuesto se comparó con patrones como canferol y quercetina. El comportamiento cromatográfico de estas sustancias se detallan en la siguiente tabla:

TABLA 4. Comparación cromatográfica del compuesto *Malesh-3* frente a canferol y quercetina.

Sistema de disolventes	Rf: <i>Malesh-3</i>	Rf: canferol	Rf: quercetina	Reactivo:NP/PEG
DCM:ACET (8:2)	0,5	0,51	0,2	+
DCM:ACET (1:1)	0,68	0,69	0,3	+
DCM:ACET (7:3)	0,43	0,43	0,18	+

VI.1.4. Determinación del residuo seco/mL del infuso

El residuo seco/mL de hojas y tallos de *M. auristipulata*, se determinó mediante la diferencia de peso de cápsulas de porcelana en ausencia y presencia del residuo obtenido a partir de 1 mL de infuso secado en desecador. En la siguiente tabla se muestra la cantidad obtenida.

TABLA 5. Residuo seco/mL de los infusos de hojas y tallos de *Malesherbia auristipulata*.

Infuso al 10% p/v	Residuo seco/ mL (mg/mL)
Hojas y Tallos	25,1

Esta información es muy valiosa para calcular las dosis y concentraciones administradas del infuso al 10 % p/v en el ensayo de analgesia.

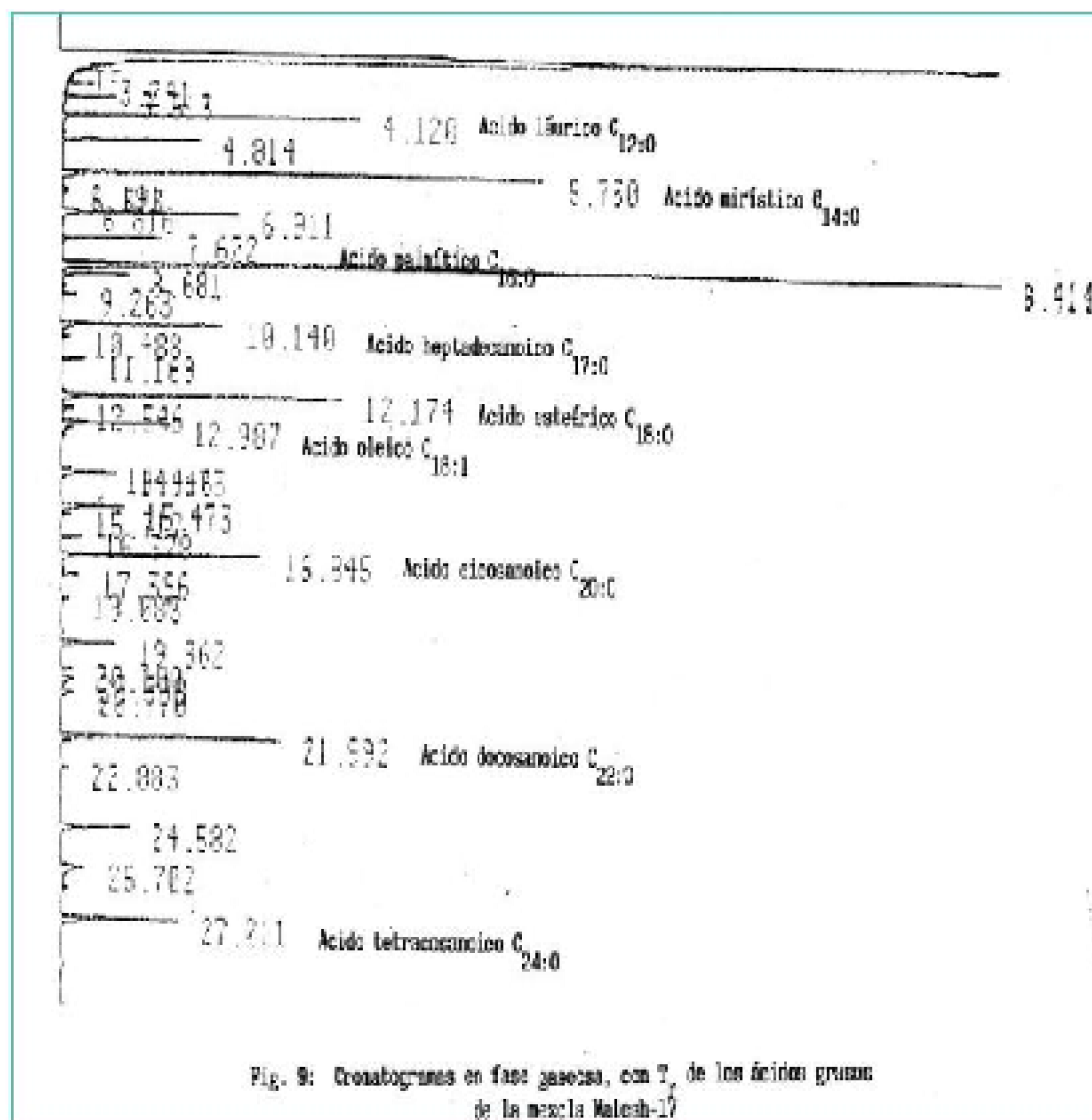


FIGURA 9

VI.1.5. Análisis espectroscópico para la identificación de *Malesh-17* y *Malesh-2*

Del ERES de la columna (B) se obtuvieron 100 mg del compuesto *Malesh-17*. Sus características fisicoquímicas fueron un precipitado de color blanco, que al ser cromatografiado usando como líquido de desarrollo DCM: ACET (7:3) dió una mancha de color café con el reactivo p-anisaldehído sulfúrico presentando un $R_f = 0,3$. Al determinar el punto de fusión se observó que este fue inferior a 63 °C.

Al analizar la cromatografía de Gas-Masas, se pudo comprobar que sus componentes son ácidos grasos altamente saturados en un 78 %, detectándose una mezcla de ácidos grasos de cadena corta, mediana y larga (ver cromatograma en fig.9). La presencia de ácidos grasos monoinsaturados es baja del orden 9 %, representada

principalmente por el ácido oleico y varios isómeros. La poliinsaturación también es baja 6% constituida principalmente por ácido linoleico, algunos isómeros y en un muy bajo porcentaje de ácido linolénico.

Destaca el ácido palmítico como el más abundante ($T_r = 8,414$) del producto *Malesh-17*. La estructura de los ácidos grasos saturados más abundantes se muestra en la tabla 6 y el listado de los ácidos grasos que constituyen la mezcla de *Malesh-17* se muestra en la tabla 7.

TABLA 6. Compuestos identificados de la muestra vegetal *Malesh-17*, por Gas-Masas.




Nombre común	Notación química	Línea estructural
ácido palmítico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	
ácido mirístico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$	
ácido esteárico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$	

TABLA 7. Composición de ácidos grasos *Malesh-17*, expresado como porcentaje de Esteres Metílicos.

Estudio fitoquímico y evaluación de las actividades analgésicas y antiinflamatorias de una especie altiplánica Chilena, *Malesherbia Auristipulata* Ricardi

ACIDOS GRASOS		<i>Malesh-17</i>	Tiempos de Retención de Muestra (min.)	Tiempos de Retención de Estandar (min.)
AC. CAPRÍLICO	C8:0	0.33 ± 0.00	3.241	
AC. CÁPRICO	C10:0	0.66 ± 0.00	3.613	3.637
AC. LAURICO	C12:0	3.98 ± 0.00	4.120	4.123
AC. TRIDECANOICO	C13:0	2.13 ± 0.00	4.814	4.819
AC. MIRISTICO	C14:0	8.34 ± 0.12	5.730	5.767
AC. MIRISTOLEICO	C14:1	0.20 ± 0.01	6.191	
AC. PENTADECANOICO	C15:0	3.58 ± 0.00	6.911	6.985
AC. PENTADECAENOICO	C15:1 isómero probable	2.28 ± 0.00	7.622	
AC. PALMITICO	C16:0	27.68 ± 0.10	8.414	8.483
AC. PALMITOLEICO	C16:1	1.56 ± 0.02	8.681	
AC. HEXADECADIENOICO	C16:2 isómero probable	0.45 ± 0.00	9.263	
AC. HEPTADECANOICO	C17:0	4.09 ± 0.00	10.140	10.211
AC. HEPTADECAENOICO	C17:1 probable	0.35 ± 0.00	10.488	
NO IDENTIFICADO		0.70 ± 0.00	11.169	
AC. ESTEARICO	C18:0	7.64 ± 0.01	12.174	12.276
AC. OCTADECAENOICO	C18:1 w9 trans	0.46 ± 0.01	12.546	12.797
AC. OLEICO	C18:1 w9 cis	3.20 ± 0.05	12.987	13.180
AC. LINOLEICO	C18:2 w6	2.76 ± 0.01	14.473	14.640
AC. OCTADECADIENOICO	C18:2 isómero probable	1.88 ± 0.01	15.473	
AC. OCTADECADIENOICO	C18:2 isómero probable	0.38 ± 0.00	15.717	
AC. LINOLENICO	C18:3 w3	0.70 ± 0.00	16.378	16.465
AC. EICOSANOICO	C20:0	6.08 ± 0.00	16.845	16.954
AC. EICOSAENOICO	C20:1 w9	0.66 ± 0.00	17.396	
AC. EICOSADIENOICO	C20:2 probable	0.30 ± 0.00	18.083	
AC. HENEICOSANOICO	C21:0 probable	1.77 ± 0.00	19.362	19.451
NO IDENTIFICADO		0.46 ± 0.00	20.100	
NO IDENTIFICADO		0.88 ± 0.00	20.388	
NO IDENTIFICADO		0.59 ± 0.00	20.770	
AC. DOCOSANOICO	C22:0	7.52 ± 0.00	21.992	22.168
AC. DOCOSAENOICO	C22:1	0.27 ± 0.32	22.883	23.049
NO IDENTIFICADO		2.14 ± 0.03	24.582	
NO IDENTIFICADO		1.44 ± 0.00	25.702	
AC. TETRACOSANOICO	C24:0	3.98 ± 0.00	27.211	27.353

Acidos Grasos Saturados Totales : 78.3%

Acidos Grasos Monoinsaturados Totales : 9.0%

Acidos Grasos Poliinsaturados Totales : 6.2%

No Identificados : 6.5%

Desde el EDCM mediante la columna (E) se obtuvo el compuesto **Malesh-2**. Se aislaron 5 mg de precipitado blanco y se llevaron al cromatógrafo Gas-Masas, identificándose el esteroide β -sistosterol dentro de una mezcla de compuestos (ver cromatograma en fig.11).

La señal que se observa ($T_r = 23,658$) representa el compuesto β -sistosterol presente en la mezcla de compuestos esteroideos, sin embargo, se obvió un compuesto que aparece como el mayor denominado dioctilsulfato ya que este correspondería a una contaminación.

A continuación la figura 10 muestra la estructura del β -sistosterol y en la figura 12 se observan el espectro de masas del β -sistosterol presente en la mezcla **Malesh-2** (Esp. 1) comparado con el espectro de masas del β -sistosterol de referencia (Esp. 2). Ambos espectros fueron registrados con los productos derivatizados (sililados con TMS).

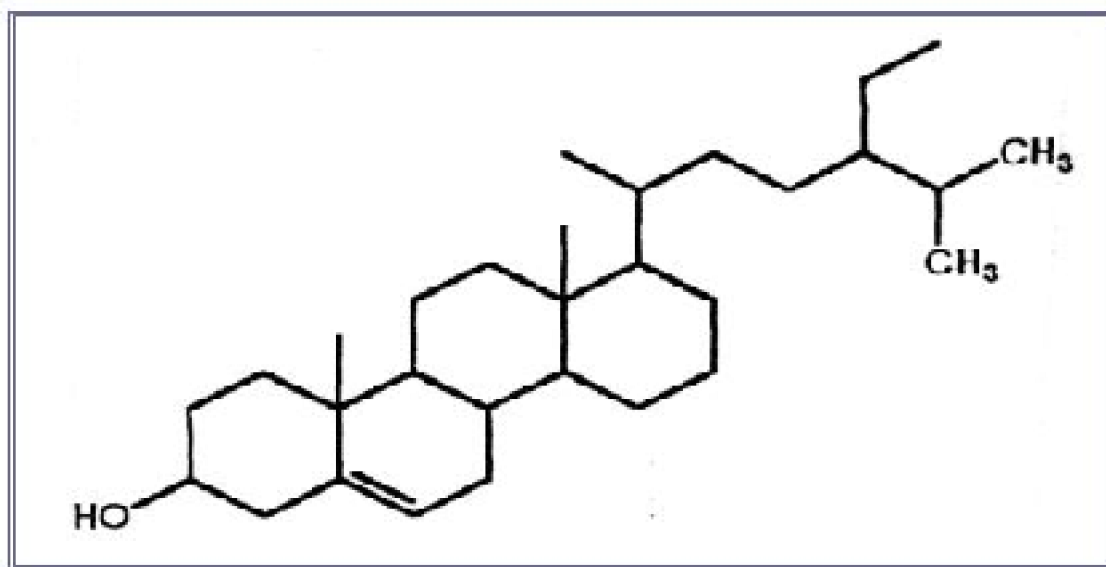


FIGURA 10. El compuesto β -sistosterol identificado de la muestra vegetal **Malesh-2**, por Gas-Masas.

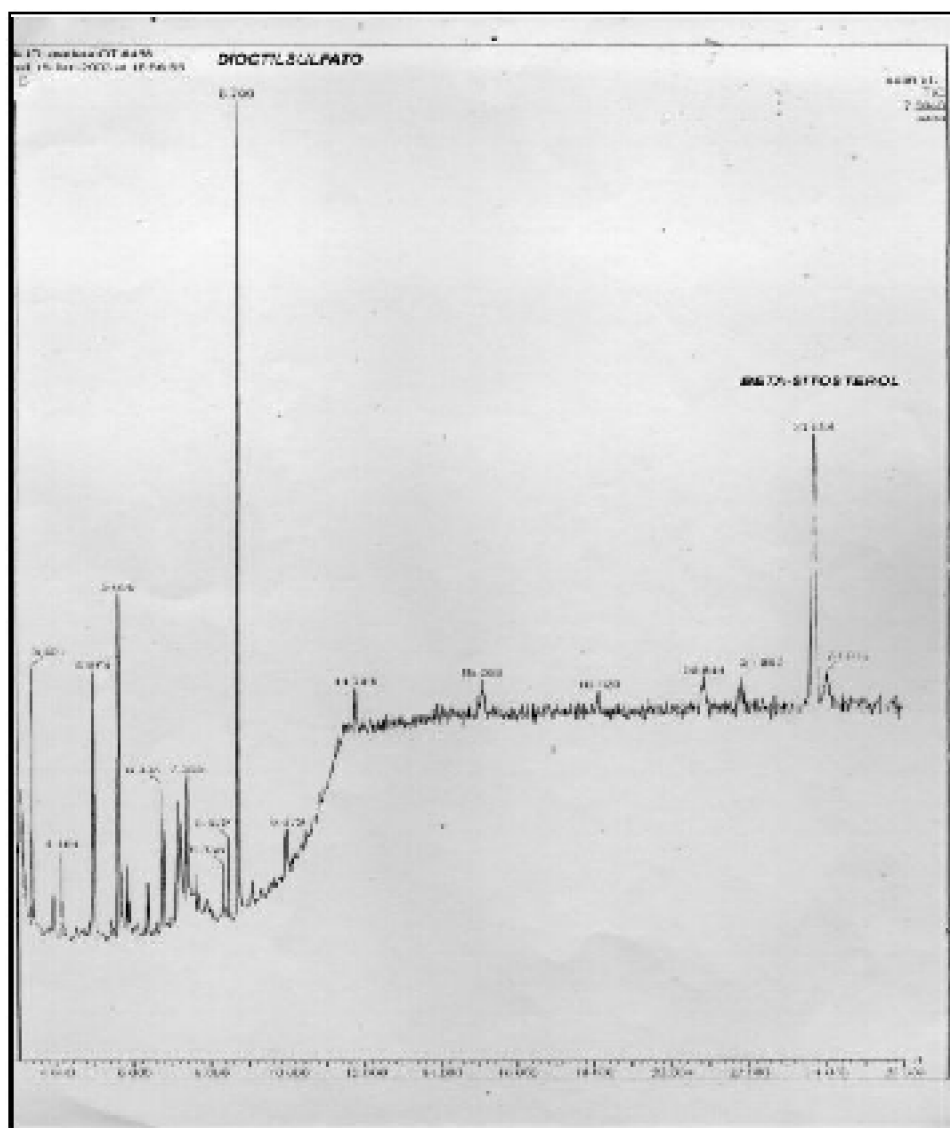


FIGURA 11. Cromatograma de la muestra Malesh-2, por cromatografía Gas-Masas (β -sistosterol, $T_r = 23,658$).

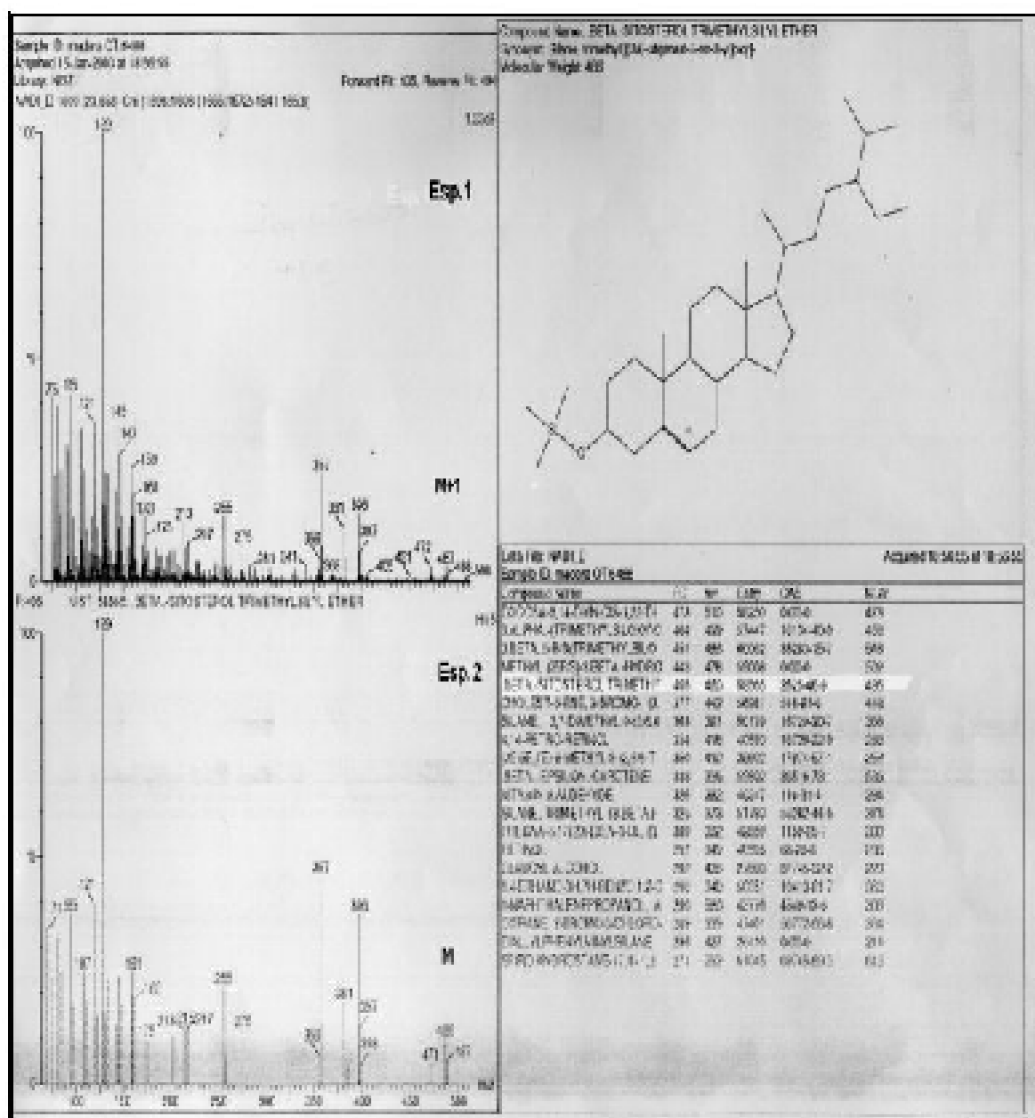


FIGURA 12. Espectros de masas de β -sistosterol presente en Malesh-2 (Esp.1) comparado con el espectro de β -sistosterol de referencia (Esp.2).

VI.2. Estudio Farmacológico

VI.2.1. Determinación de la toxicidad aguda

Los extractos globales (ERES, EDCM, EHEX y EMET) fraccionados de tallos y hojas de *M. auristipulata* fueron suspendidos en goma arábica a la dosis de 2g/Kg.

Después de suministrada la muestra, se observaron los animales durante algunas horas, manifestando ningún signo de toxicidad aguda ni letalidad, tampoco presentaron

efectos indeseables durante los 6 días siguientes, incluso se observó un aumento normal del peso de acuerdo a las mediciones que se realizaron diariamente.

VI.2.2. Determinación de la actividad analgésica

VI.2.2.1. Evaluación de la actividad analgésica a los extractos globales e infuso

El efecto analgésico obtenido por los extractos globales e infuso de *M. auristipulata* se resumen en la tabla 8 y se compararon con naproxeno sódico (fármaco de referencia), se agrega además la dosis para cada muestra y la significancia del ensayo representada por el "p".

TABLA 8. Comparación del efecto analgésico de los extractos globales e infuso de *M. auristipulata* con naproxeno sódico.

Muestra	Dosis(mg/Kg)	n	Cm ± SEM	m	Cc ± SEM	% An ± σ	p *
ERES	600	8	12,5 ± 5,2	16	39,0 ± 2,0	67,9 ± 13,4	0,0016
EHEX	600	8	34,0 ± 5,1	16	39,0 ± 2,3	12,8 ± 13,1	0,0043
EDCM	600	8	15,5 ± 5,6	16	39,0 ± 2,0	60,3 ± 14,4	0,0043
EMET	600	8	16,0 ± 3,8	16	39,0 ± 2,4	59,0 ± 9,8	0,0017
INFUSO	402	8	19,0 ± 4,2	16	37,5 ± 2,9	49,3 ± 11,2	0,0015
Naproxeno sódico	12,5	8	12,6 ± 1,8	16	42,0 ± 1,4	70,0 ± 4,3	0,0069

(*)Es considerando un valor estadísticamente significativo cuando el $p \leq 0,05$; test de Wilconson.

Cm = mediana al N° de contorsiones totales del lote de animales que recibe la muestra, Cc = mediana al N° de contorsiones del lote de animales control, % An = porcentaje de analgesia, σ = desviación estándar, SEM = error estándar, n = N° de animales que recibe la muestra, m = N° de animales control.

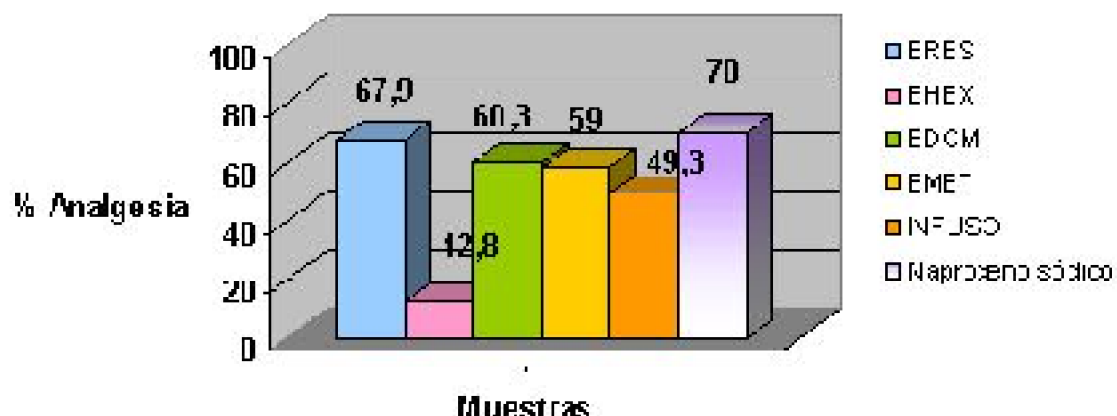


GRAFICO 1. Gráfico comparativo de la actividad analgésica de los extractos globales e infuso de *Malesherbia auristipulata* con naproxeno sódico.

De los extractos estudiados ninguno sobrepasó o igualó al fármaco de referencia, sin embargo, los siguientes extractos presentaron un efectos analgésicos significativos importantes: ERES (67,9%), EDCM (60,3%) y MET (59,0%), resultados que demuestran que se deban continuar estudiándolos.

El infuso también fue inferior al fármaco de referencia y a los extractos globales anteriormente mencionados, sin embargo, demostró poseer un efecto analgésico importante (49,3%).

El EHEX mostró el efecto más bajo(12,8%), cuyo resultado proporciona una información valiosa para la continuación del análisis de los extractos seriados.

Todos los resultados obtenidos en los ensayos realizados para las distintas muestras, resultaron ser estadísticamente significativas.

VI.2.2.1.1. Evaluación de la actividad analgésica a las fracciones de los extractos globales activos:

A partir de los resultados anteriores, los extractos globales que presentaron mayor efecto analgésico fueron purificados con motivo de identificar los metabolitos responsables de tal efecto, sin embargo, no fue factible evaluar la actividad analgésica de dos mezclas de compuestos aisladas del ERES, debido a que no hubo disponibilidad de ellos y sólo se evaluó la actividad analgésica de siete fracciones seriadas del EDCM (ver fig7, pag 25), sus resultados se resumen en la tabla 9, se agrega además el EDCM y naproxeno sódico como referencia.

TABLA 9. Tabla comparativa del efecto analgésico de las fracciones del EDCM de *M. auristipulata* con naproxeno sódico.

Muestra	Dosis (mg/Kg)	n	Cm \pm SEM	m	Cc \pm SEM	% An \pm σ	p *
EDCM	600	8	15,5 \pm 5,6	16	39,0 \pm 2,0	60,3 \pm 14,4	0,0043
FDCM 100 %	200	7	22,0 \pm 3,9	16	39,0 \pm 2,4	43,6 \pm 9,9	0,0028
FDCM 100 % <i>esteroide1</i>	100	5	10,0 \pm 3,4	16	37,5 \pm 2,1	73,3 \pm 9,1	0,0008
FDCM 100 % <i>flavonoide1</i>	100	8	30,5 \pm 3,1	16	37,5 \pm 2,1	18,7 \pm 8,3	0,0017
FDCM:ACET (1:1)	200	8	11,0 \pm 2,7	16	39,0 \pm 2,4	71,8 \pm 6,9	0,0000
FDCM:ACET (1:1) <i>esteroide2</i>	100	8	25,5 \pm 4,4	16	37,5 \pm 2,1	32,0 \pm 11,7	0,0307
FDCM:ACET (1:1) <i>flavonoide2</i>	100	8	20,5 \pm 3,1	16	39,0 \pm 2,0	47,4 \pm 7,9	0,0020
FMET 100%	100	8	25,0 \pm 5,3	16	37,5 \pm 2,1	33,3 \pm 14,2	0,0401
Naproxeno sódico	12,5	8	12,6 \pm 1,8	16	42,0 \pm 1,4	70,0 \pm 4,3	0,0069

(*)Es considerando un valor estadísticamente significativo cuando el $p \leq 0,05$; test de Wilconson.

Cm = mediana al N° de contorsiones totales del lote de animales que recibe la muestra, Cc = mediana al N° de contorsiones del lote de animales control, % An =

porcentaje de analgesia, σ = desviación estándar, SEM = error estándar, n = N° de animales que recibe la muestra, m = N° de animales control.

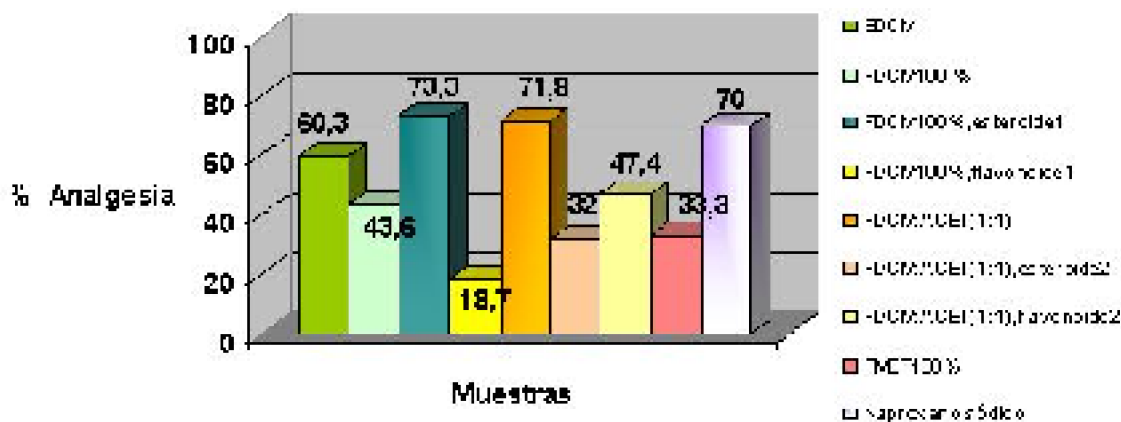


GRAFICO 2. Gráfico comparativo de la actividad analgésica de las fracciones del EDCM de *Malesherbia auristipulata* con Naproxeno sódico.

La actividad analgésica para algunas fracciones del EDCM experimentó un aumento considerablemente superior al fármaco de referencia y a los extractos globales, este aumento fue estadísticamente significativo como también para las demás muestras. De las fracciones estudiadas dos de ellas presentaron un efecto analgésico superior, la fracción DCM:ACET(1:1) (71,8%) y la fracción DCM100% *esteroide1* (73,3%), de este última fracción se separó por c.c.f y se identificó por Gas-Masas el compuesto beta-sitosterol .

Las fracciones DCM 100% y DCM:ACET(1:1) *flavonoide2*, demostraron tener un efecto analgésico importante 43,6 % y 47,4 % respectivamente, en esta última fracción se identificó por c.c.f posiblemente el compuesto canferol.

La fracción DCM 100% *flavonoide1* presentó el efecto más bajo 18,7%.

VI.2.3. Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica

VI.2.3.1. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica a los extractos globales e infuso usando como agente inflamatorio TPA.

Se resume en la tabla 10 el efecto antiinflamatorio tópico de los extractos globales e infuso de *M. auristipulata*, usando TPA como agente flogístico y se compararon con indometacina (fármaco de referencia), además se calculó el error estándar para cada extracto, la dosis utilizadas para cada muestra y la significancia del ensayo representada por el "p".

TABLA 10. Tabla comparativa del efecto antiinflamatorio tópico de los extractos globales e infuso de *M. auristipulata* con indometacina, usando como agente flogístico TPA.

Muestra	Dosis	n	Dm \pm SEM	m	Dc \pm SEM	% Ainf.T \pm σ	p *
ERES	3mg/20 μ L	8	23,0 x 10 ⁻³ \pm 6,0 x 10 ⁻⁴	16	10,0 x 10 ⁻³ \pm 9,0 x 10 ⁻⁴	77,0 \pm 7,9	0,0010
EHEX	3mg/20 μ L	8	15,0 x 10 ⁻³ \pm 6,0 x 10 ⁻⁴	16	9,8 x 10 ⁻³ \pm 9,0 x 10 ⁻⁴	65,3 \pm 4,9	0,0001
EDCM	3mg/20 μ L	8	26,0 x 10 ⁻³ \pm 5,0 x 10 ⁻⁴	16	7,5 x 10 ⁻³ \pm 10,0 x 10 ⁻⁴	84,7 \pm 8,6	0,0001
EMET	3mg/20 μ L	8	13,0 x 10 ⁻³ \pm 10,0 x 10 ⁻⁴	16	8,8 x 10 ⁻³ \pm 8,0 x 10 ⁻⁴	85,2 \pm 14,0	0,0003
INFUSO	3mg/20 μ L	8	94,0 x 10 ⁻³ \pm 30,4 x 10 ⁻³	16	10,0 x 10 ⁻³ \pm 7,0 x 10 ⁻⁴	6,0 \pm 9,3	0,0001
Indometacina	0,5mg/20 μ L	8	1,4 x 10 ⁻³ \pm 2,0 x 10 ⁻⁴	16	7,7 x 10 ⁻³ \pm 6,0 x 10 ⁻⁴	81,8 \pm 2,0	0,0000

(*) es considerando un valor estadísticamente significativo cuando el $p \leq 0,05$; test de Wilconson.

%Ainf.T = Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico, Dm = mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales que recibieron la muestra, Dc = mediana de la diferencia de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales control, σ = desviación estándar, SEM = error estándar, n = N° de animales que recibe la muestra, m = N° de animales control.



GRAFICO 3. Gráfico comparativo de la actividad antiinflamatoria tópica de los ext. globales e infuso de *M. auristipulata* con indometacina, usando como agente flogístico TPA.

Todos los extractos globales tuvieron un efecto antiinflamatorio tópico estadísticamente significativos, destacan los extractos que presentan un efecto superior al fármaco de referencia como fueron el EDCM (84,7%) y el EMET (85,2 %) y los que

tuvieron un efecto importante como el ERES (77,0%) y el EHEX (65,3 %).

El infuso seco demostró un efecto antiinflamatorio muy inferior al fármaco de referencia y a los extractos globales dando un efecto 6,0 %.

VI.2.3.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica a las fracciones de los extractos globales activos usando como agente inflamatorio TPA.

Los extractos globales de mayor efecto antiinflamatorio tópico fueron purificados de manera de identificar los metabolitos responsables de tal efecto. Para el ERES se dispuso de dos mezclas de compuestos aislados, que denominamos *Malesh-1* y *Malesh-17* (ver fig. 6 pag 22), del EDCM se valoraron dos fracciones que presentaron un efecto analgésico superior y que llamamos; fracción DCM 100% *esteroide1* y la fracción DCM:ACET(1:1) *flavonoide2*, finalmente del EMET, se probó una fracción que llamamos fracción DCM:ACET (1:1), estas fracciones y los compuestos aislados se compararon con los resultados obtenidos con el fármaco de referencia indometacina, estos resultados y con los extractos globales farmacológicamente activos se resumen en la tabla 11.

TABLA 11. Tabla comparativa del efecto antiinflamatorio tópico de las fracciones de los extractos globales activos de *M. auristipulata* con indometacina, usando como agente flogístico TPA.

Muestra	Dosis	n	Dm \pm SEM	m	Dc \pm SEM	% Ainf.T \pm σ	p *
ERES	3mg/20 \square L	8	23,0 x 10 ⁻³ \pm 6,0 x 10 ⁻⁴	16	10,0 x 10 ⁻³ \pm 9,0 x 10 ⁻⁴	77,0 \pm 7,9	0,0010
<i>Malesh-1</i>	0,5mg/20 \square L	7	6,6 x 10 ⁻³ \pm 14,0 x 10 ⁻⁴	16	7,5 x 10 ⁻³ \pm 9,0 x 10 ⁻⁴	12,0 \pm 16,5	0,0200
<i>Malesh-17</i>	0,5mg/20 \square L	8	4,8 x 10 ⁻³ \pm 7,0 x 10 ⁻⁴	16	8,8 x 10 ⁻³ \pm 8,0 x 10 ⁻⁴	45,5 \pm 8,4	0,0039
EDCM	3mg/20 \square L	8	26,0 x 10 ⁻³ \pm 5,0 x 10 ⁻⁴	16	7,5 x 10 ⁻³ \pm 10,0 x 10 ⁻⁴	84,7 \pm 8,6	0,0001
FDCM 100%, <i>esteroide1</i>	1mg/20 \square L	8	3,7 x 10 ⁻³ \pm 4,0 x 10 ⁻⁴	16	9,8 x 10 ⁻³ \pm 7,0 x 10 ⁻⁴	62,2 \pm 4,5	0,0021
FDCM:ACET(1:1) <i>flavonoide2</i>	1mg/20 \square L	8	5,6 x 10 ⁻³ \pm 7,0 x 10 ⁻³	16	9,8 x 10 ⁻³ \pm 7,0 x 10 ⁻⁴	42,9 \pm 10,5	0,0022
EMET	3mg/20 \square L	8	13,0 x 10 ⁻³ \pm 10,0 x 10 ⁻⁴	16	8,8 x 10 ⁻³ \pm 8,0 x 10 ⁻⁴	85,2 \pm 14,0	0,0003
FMET; DCM:ACET (1:1)	3mg/20 \square L	8	6,6 x 10 ⁻³ \pm 8,0 x 10 ⁻⁴	16	10,0 x 10 ⁻³ \pm 8,0 x 10 ⁻⁴	34,0 \pm 9,8	0,0116
Indometacina	0,5mg/20 \square L	8	1,4 x 10 ⁻³ \pm 2,0 x 10 ⁻⁴	16	7,7 x 10 ⁻³ \pm 6,0 x 10 ⁻⁴	81,8 \pm 2,0	0,0000

(*) es considerando un valor estadísticamente significativo cuando el $p \leq 0,05$; test de Wilconson.

%Ainf.T = Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico, Dm = mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales que recibieron la muestra, Dc = mediana de la diferencia de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales control, σ = desviación estándar, SEM = error estándar, n = N° de animales que recibe la muestra, m = N° de animales control.

Todos los ensayos realizados para las distintas muestras, resultaron ser estadísticamente significativas.

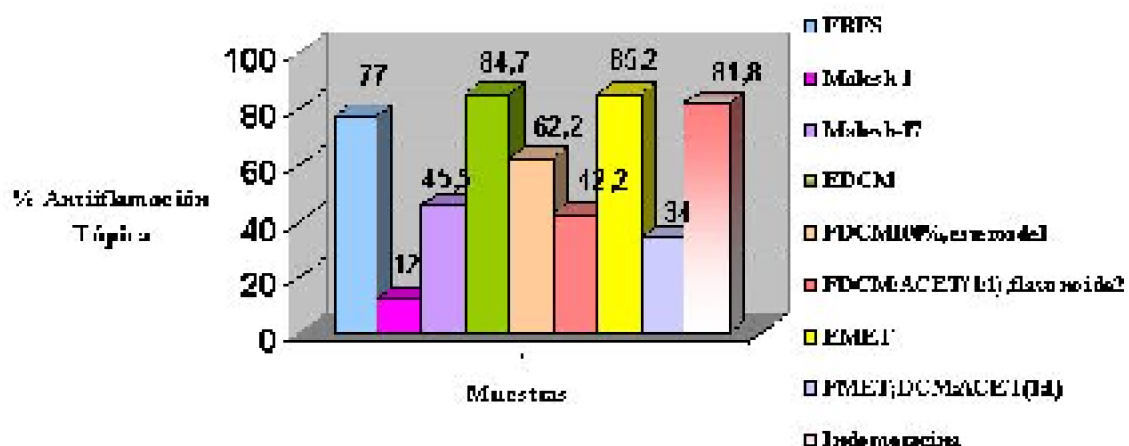


GRAFICO 4. Gráfico comparativo de la actividad antiinflamatoria tópica de las fracciones de los ext. globales activos de *M. auristipulata* con indometacina, usando como agente flogístico TPA.

De los compuestos aislados y fracciones estudiadas ninguna superó el efecto antiinflamatorio tópico del fármaco de referencia y de los extractos globales activos, sin embargo, tres de ellas mostraron un efecto importante, fueron: fracción DCM 100% esteroide1 (62,2%), fracción DCM:ACET (1:1) flavonoide2(42,2 %) y *Malesh-17* (45,5%).

Probablemente los resultados de ambos compuestos aislados, serian los responsables del efecto antiinflamatorio tópico que ha demostrado tener el ERES, uno de estos compuestos *Malesh-17* fue identificado por el cromatógrafo de Gas-Masas identificando una mezcla de ácidos grasos saturados entre ellos el más abundante es el ácido palmítico. Lo mismo ocurre con ambas fracciones del EDCM su unión sería responsable del efecto antiinflamatorio tópico que presenta dicho extracto, siendo muy superior a lo que obtuvimos con los extractos más purificados.

La fracción del EMET; DCM:ACET(1:1) presentó una actividad antiinflamatoria tópica baja (34%), en este extracto por c.c.f. se separó un compuesto que denominamos *Malesh-4* y se trataría de un flavonoide aún no identificado.

VI.2.3.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica a los extractos globales e infuso usando como agente inflamatorio AA:

Se detalla en la siguiente tabla los efectos antiinflamatorios tópico evaluados a los extractos globales e infuso de *M. auristipulata*, usando como agente flogístico AA y se compararon con los efectos del fármaco de referencia nimesulida, además se añade el error estándar para cada extracto, las dosis utilizadas en cada muestra, el número de animales usados como control y muestra y la significancia del ensayo representada por el "p".

TABLA 12. Tabla comparativa del efecto antiinflamatorio tópico de los extractos globales e infuso de *M. auristipulata* con nimesulida, usando como agente flogístico AA

Muestra	Dosis	n	Dm \pm SEM	m	Dc \pm SEM	% Ainf.T \pm σ	p *
ERES	3mg/20 μ L	8	4,2 \times 10 ⁻³ \pm 7,0 \times 10 ⁻⁴	16	8,4 \times 10 ⁻³ \pm 2,0 \times 10 ⁻⁴	50,0 \pm 8,8	0,0000
EHEX	3mg/20 μ L	8	4,9 \times 10 ⁻³ \pm 1,2 \times 10 ⁻⁴	16	7,9 \times 10 ⁻³ \pm 4,0 \times 10 ⁻⁴	38,0 \pm 12,6	0,0375
EDCM	3mg/20 μ L	8	3,4 \times 10 ⁻³ \pm 4,0 \times 10 ⁻⁴	16	7,5 \times 10 ⁻³ \pm 4,0 \times 10 ⁻⁴	54,7 \pm 6,1	0,0001
EME0H	3mg/20 μ L	8	7,7 \times 10 ⁻³ \pm 7,0 \times 10 ⁻⁴	16	8,4 \times 10 ⁻³ \pm 5,0 \times 10 ⁻⁴	8,3 \pm 7,9	0,0484
INFUSO	3mg/20 μ L	8	8,4 \times 10 ⁻³ \pm 1,0 \times 10 ⁻³	16	9,9 \times 10 ⁻³ \pm 5,0 \times 10 ⁻⁴	15,2 \pm 11,3	0,0934 (n/s)
Nimesulida	1,0mg/20 μ L	8	4,6 \times 10 ⁻³ \pm 7,0 \times 10 ⁻⁴	16	8,6 \times 10 ⁻³ \pm 5,0 \times 10 ⁻⁴	48,8 \pm 2,0	0,0004

(*) es considerando un valor estadísticamente significativo cuando el $p \leq 0,05$; test de Wilconson.

%Ainf.T = Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico, Dm = mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales que recibieron la muestra, Dc = mediana de la diferencia de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales control, σ = desviación estándar, SEM = error estándar, n = N° de animales que recibe la muestra, m = N° de animales control.

Los ensayos realizados a los extractos globales resultaron ser estadísticamente significativos, mientras que el infuso resultó no ser significativo ($p > 0,05$) entendiéndose este resultado como un 9% aproximadamente del efecto obtenido por el infuso es atribuible al azar.

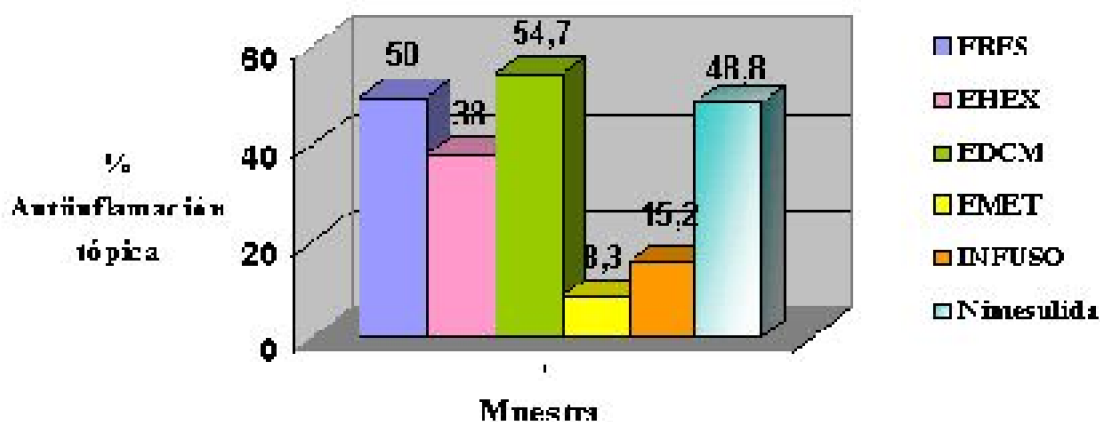


GRAFICO 5. Gráfico comparativo de la actividad antiinflamatoria tópica de los ext.

globales e infuso de M. auristipulata con nimesulida, usando como agente flogístico AA

La actividad antiinflamatoria tópica experimentó un aumento considerablemente superior al fármaco nimesulida para dos extractos globales, se trató del ERES (50%) y el EDCM (54,7%), de acuerdo a estos resultados se prosiguió analizarlos, mientras que el EHEX presentó una actividad antiinflamatoria importante (38%).

El infuso seco presentó una actividad antiinflamatoria baja (15,2%) correspondiendo a un 30% de la actividad producida por el fármaco nimesulida en las mismas condiciones.

El EMET manifestó la actividad antiinflamatoria más baja (8,3%).

VI.2.3.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica a las fracciones de los extractos globales activos usando como agente inflamatorio AA:

A partir de los resultados anteriores se evaluó el efecto antiinflamatorio tópico de *Malesh-1* y *Malesh-17* dos mezclas de compuestos del ERES (ver fig. 6 pag. 22), ambos compuestos presentaron actividad antiinflamatoria tópica con el agente flogístico TPA y tres fracciones del EDCM, fracción HEX:DCM (1:1), fracción DCM 100% *esteroide1* y la fracción DCM:ACET(1:1) *flavonoide2*, las últimas dos fracciones presentaron actividad analgésica y antiinflamatoria tópica con uso del agente flogístico TPA, en la tabla N°13 se muestran los resultados de estos compuestos y fracciones y son comparados con nimesulida, además se comparan estos resultados con los extractos globales activos.

TABLA 13. Tabla comparativa del efecto antiinflamatorio tópico de las fracciones de los extractos globales activos de *M. auristipulata* con nimesulida, usando como agente flogístico TPA.

Muestra	Dosis	n	Dm \pm SEM	m	Dc \pm SEM	% Ainf.T \pm σ	p *
ERES	3mg/20 μ L	8	4,2 x 10 ⁻³ \pm 7,0 x 10 ⁻⁴	16	8,4 x 10 ⁻³ \pm 2,0 x 10 ⁻⁴	50,0 \pm 8,8	0,0000
<i>Malesh-1</i>	1,0 mg/20 μ L	7	13,2 x 10 ⁻³ \pm 8,0 x 10 ⁻⁴	16	8,6 x 10 ⁻³ \pm 9,0 x 10 ⁻⁴	0,0 \pm 9,3	1,0000 (n/s)
<i>Malesh-17</i>	1,0mg/20 μ L	8	11,7x 10 ⁻³ \pm 7,0 x 10 ⁻⁴	16	7,9x 10 ⁻³ \pm 8,0 x 10 ⁻⁴	0,0 \pm 15,0	0,8212 (n/s)
EDCM	3mg/20 μ L	8	3,4 x 10 ⁻³ \pm 4,0 x 10 ⁻⁴	16	7,5 x 10 ⁻³ \pm 4,0 x 10 ⁻⁴	54,7 \pm 6,1	0,0001
FDCM 100% HEX:DCM (1:1)	1mg/20 μ L	8	8,3 x 10 ⁻³ \pm 2,0 x 10 ⁻³	16	8,9 x 10 ⁻³ \pm 5,0 x 10 ⁻⁴	6,7 \pm 20,4	0,0270
FDCM 100%, <i>esteroide1</i>	1mg/20 μ L	8	8,9 x 10 ⁻³ \pm 7,0 x 10 ⁻³	16	9,5 x 10 ⁻³ \pm 4,0 x 10 ⁻⁴	6,3 \pm 10,5	0,1711 (n/s)
FDCM:ACET(1:1) <i>flavonoide2</i>	1mg/20 μ L	8	9,7 x 10 ⁻³ \pm 1,4 x 10 ⁻³	16	9,8 x 10 ⁻³ \pm 5,0 x 10 ⁻⁴	1,0 \pm 16,0	0,5160 (n/s)
Nimesulida	1,0mg/20 μ L	8	4,6 x 10 ⁻³ \pm 7,0 x 10 ⁻⁴	16	8,6 x 10 ⁻³ \pm 5,0 x 10 ⁻⁴	48,8 \pm 2,0	0,0004

(*) es considerando un valor estadísticamente significativo cuando el $p \leq 0,05$; test de Wilconson.

%Ainf.T = Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico, Dm = mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales que recibieron la muestra, Dc = mediana de la diferencia de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales control, σ = desviación estándar, SEM = error estándar, n = N° de animales que recibe la muestra, m = N° de animales control.

El porcentaje de significación estadística establecieron que los efectos antiinflamatorio tópico de los compuestos *Malesh-1* y *Malesh-17* y de dos fracciones del EDCM, fracción DCM 100% *esteroide1* y la fracción DCM:ACET(1:1) *flavonoide2*, resultaron no ser significativas ($p \geq 0,05$).

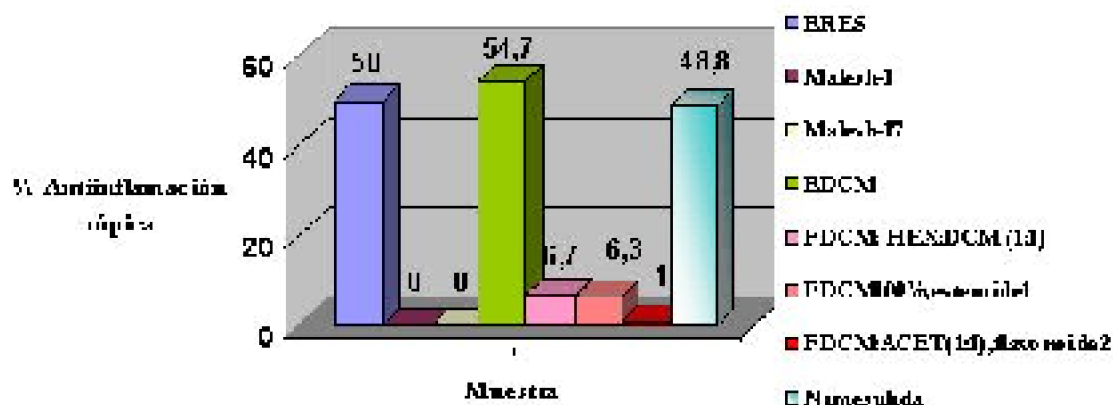


GRAFICO 6. Gráfico comparativo de la actividad antiinflamatoria tópica de las fracciones de los extractos globales activos de *M. auristipulata* con nimesulida, usando como agente flogístico AA.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo, ninguna fracción del EDCM presentó un efecto importante, si bien hubo actividad, esta fue baja y solo la fracción HEX:DCM(1:1) presentó el mayor efecto de antiinflamación tópica y estadísticamente significativa con un 6,7%, representando un valor menor a la cuarta parte del obtenido con nimesulida (48,8 %).

Las dos mezclas de compuestos *Malesh-1* y *Malesh-17* obtenidos de la purificación del ERES no presentaron ningún efecto antiinflamatorio tópico frente al agente inflamatorio AA.

En consecuencia debieran ser otros los componentes involucrados ante el demostrado efecto antiinflamatorio tópico del ERES y EDCM usando como agente inflamatorio el ácido araquidónico, probablemente se podrán analizar estos extractos en un próximo estudio.

VII. DISCUSION

El rendimiento del proceso extractivo de hojas y tallos de *Malesherbia auristipulata* resultó ser bajo, de acuerdo a esto habría que establecer si la época de recolección fue la más adecuada. Se dispuso de una reducida cantidad de exudado y extractos del material vegetal para su análisis, siendo el ERES y EMET los que presentaron mayor cantidad, por tal motivo fue necesario optimizar todas las etapas siguientes del estudio para realizar los ensayos descritos en los objetivos. De todas formas no hubo cantidad suficiente de algunos extractos purificados y compuestos aislados para ser evaluados farmacológicamente. Para continuar el estudio obligatoriamente se deberá repetir el proceso extractivo a partir de una nueva recolección de la planta.

Los principales tipos de metabolitos secundarios presentes en la especie en estudio se indicaron en la tabla 2. Por medio de cromatografía de capa fina (c.c.f.), se determinó que el EHEX presentó la menor cantidad de constituyentes, mientras que los demás extractos aislados concentraron la mayor cantidad de metabolitos secundarios a medida que incrementaron su polaridad deduciendo que los compuestos mayoritarios son de estructura de mediana polaridad y polares. Se confirmó la presencia de taninos (pirogálicos) y la ausencia de compuestos cianogenéticos y alcaloides descritos por la literatura para otra especie del género *Malesherbia* (Cramer, 1969).

La naturaleza de los principios activos aislados e identificados por técnicas cromatográfica (c.c.f. y Gas-Masas) de los distintos extractos activos de la planta, permitió confirmar la presencia de sustancias conocidas y distribuidas en varias especies vegetales. El ERES presentó compuestos liposolubles. Los principales grupos de

constituyentes presentes son ácidos grasos de cadena larga y saturados (de C8 hasta C24), predominando el ácido palmítico y en pequeñas cantidades los ácidos mirístico, esteárico, eicosanoico y docosanoico. El EDCM presentó un fitoesterol que se identificó como constituyente principal el β -sitosterol, además posee flavonoides entre los que se encuentran probablemente el canferol. Del extracto activo EMET se reconocieron como constituyentes principales diferentes tipos de flavonoides. Se espera a futuro identificar las sustancias presentes en este extracto.

De la prueba de toxicidad aguda oral efectuada a los diferentes extractos globales y exudado resinoso de la parte aérea de *M. auristipulata*, se observó que no existen diferencias significativas entre el grupo de animales tratados con los extractos globales y el grupo de animales controles, de modo que hojas y tallos de *M. auristipulata* pueden clasificarse como no tóxico, con una DL50 superior a 2000 mg/Kg, sin embargo, será necesario realizar otros estudios para determinar la inocuidad de esta especie para el ser humano.

Al analizar los resultados obtenidos para la actividad analgésica, se determinó que el EHEX presentó menor efecto analgésico (12,8 %), si tenemos en cuenta que trabajamos con extractos totales podemos suponer que el o los componentes responsables de dicha actividad se encuentran en proporción minoritaria, respecto de los demás extractos globales, todos presentaron un efecto analgésico favorable, para el modelo de contorsiones inducidas por ácido acético.

El ERES presentó un efecto analgésico superior a los restantes extractos totales (67,9%), por tal motivo se purificó, separando dos compuestos de características lipídicas, sin embargo, no hubo cantidad suficiente de las sustancias aisladas como para evaluarlas farmacológicamente, básicamente porque este ensayo requiere mayor cantidad de muestra. Se identificó el ácido palmítico como el compuesto más abundante del exudado, ácido graso para el que ha sido descrita una actividad analgésica, demostrándose el requerimiento de éste en la dieta (Wallace y col., 2001).

Del EDCM (60,3%) se analizaron sus extractos más purificados demostrando que a menor dosis el EDCM aumentaba considerablemente su efecto analgésico (fracción DCM:ACET 1:1 (71,8%) y la fracción DCM 100% *esteroide1*(73,3%), esto puede deberse a que a menor concentración, otros componentes no ejercen un efecto inhibitorio sobre el componente activo. La fracción DCM 100% *esteroide1* presentó el mayor efecto analgésico esto pudo deberse en gran parte a la sustancia identificada con la utilización del cromatógrafo Gas-Masas, el β -sitosterol, cuya propiedad antinociceptiva ha sido reportada en la especie *Phyllanthus corcovadensis* (Santos y col., 1995).

Cabe señalar que en el presente estudio se utilizó un modelo de contorsiones abdominales cuya vía específica de transmisión antinociceptiva no discrimina si es central o periférica y por ende nuestros compuestos activos pueden responder a nivel central como los analgésicos opiáceos, como por ejemplo la morfina (Reichert y col., 2002) o periféricos como los AINEs, ejemplo el ácido acetilsalicílico (Nakamura y Shizimu, 1981).

El infuso al 10% de la parte aérea de la planta demostró poseer un efecto analgésico importante (49,3%), lo que justificaría su uso en la medicina tradicional.

Los efectos de la inflamación inducida por la aplicación tópica de agentes flogísticos

como ácido araquidónico(AA) y 12-0-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), han sido evaluados y comparados, determinándose que ambos responden con la formación del edema, sin embargo, esta inflamación dérmica ocurre por diferentes vías. El AA produce un edema de formación rápida pero de corta duración y se asocia principalmente con un marcado aumento de las prostaglandinas (PGE_2 , 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, PGF $_2$) y una mínima infiltración celular, mientras que el TPA produce un edema de formación lenta pero de larga duración que se asocia con la entrada de neutrófilos, mastocitos y la formación predominante de leucotrienos (LTB $_4$) (Rao y col., 1993), esto sugiere que el TPA induce entre otros la biosíntesis de LTB $_4$ a través de la vía de las lipooxigenasa y el AA induce la formación de prostaglandinas a través de la vía de la ciclooxigenasa.

El efecto antiinflamatorio tópico de hojas y tallos de *M. auristipulata* posee un efecto dual de las dos vías del metabolismo del ácido araquidónico es decir que sus metabolitos secundarios actuarían tanto a través de la vía de la ciclooxigenasa como por las vía de la lipooxigenasa.

Para el modelo de edema inducido por TPA se obtuvieron resultados significativos, en el cual la respuesta antiinflamatoria fue en aumento a medida que los extractos eran más polares, destacándose el EDCM (84,7%) y EMET (85,2%), se analizaron sus extractos más purificados determinando que el EDCM el efecto se distribuyo en dos fracciones. Una de las fracciones se le atribuye en gran parte la actividad mostrada por el EDCM, presentó un 62,2 % de efecto antiinflamatorio a una dosis de 1mg/oreja (FDCM 100% esteroide 1) en ella se identificó el compuesto β -sitosterol, su efecto antiinflamatorio ha sido estudiado y básicamente radica en inhibir fuertemente la actividad de la enzima mieloperoxidasa logrando afectar la migración de leucocitos al sitio inflamado (Gómez y col., 1999).

Del exudado resinoso se evaluaron dos componentes aislados entre ellos la mezcla de ácidos grasos en la que el componente mayoritario es el ácido palmítico, éste presentó un efecto antiinflamatorio significativo (45,5%), ha sido reportada su actividad antiinflamatoria en varias especie como por ejemplo el *Plantago major* (Ringbom y col., 2001), su acción radicaría en reducir la peroxidación lipídica y con ello reducir los niveles de la enzima ciclooxigenasa-2 (Cox-2) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α)(Nanji y col., 1997).

Para el modelo de edema inducido por AA se obtuvieron efectos significativos, en los extractos globales, la respuesta antiinflamatoria se vió favorecida en extractos menos polares (EDCM (54,7%) y ERES (50%)), deduciendo que las sustancias responsables de tal efecto presenten similares características, se analizaron fracciones más purificadas y compuestos aislados de los extractos activos, resultando un nulo efecto antiinflamatorio tópico, esto pudo deberse a que la parte activa de la planta se encuentra formada por numerosos componentes y su acción farmacológica es superior a la que se obtiene con los principios activos aislados. Es decir sus componentes actuarían sinérgicamente, sin embargo, un futuro estudio confirmaría esta interacción y los componentes responsables de tal efecto.

El infuso al 10% de hojas y tallos de *M. auristipulata* demostró poseer un efecto antiinflamatorio tópico bajo, teniendo en cuenta que el modelo de edema inducida con

agentes flogísticos tiene como ventaja utilizar poca muestra y además la respuesta observada se debe a un efecto local evitando fenómenos de metabolización y excreción de los componentes, el efecto logrado por el infuso no validaría su uso medicinal por esta vía de administración.

Se continuará trabajando en la extracción y fraccionamiento bioguiado de los extractos con el objetivo de aislar y identificar los compuestos responsables de las actividades aquí mencionadas.

VIII. CONCLUSION

El rendimiento logrado en el proceso extractivo de hojas y tallos de *M. auristipulata* resulto ser bajo, el ERES y EMET fueron los de mayor rendimiento, por lo tanto, los compuestos mayoritarios son de estructura de mediana polaridad y polares.

De la muestra fitoquímica realizada a cada uno de los extractos obtenidos de *M. auristipulata*, se observó que la especie contiene triterpenos, esteroides, flavonoides y terpenos y en menor cantidad taninos, saponinas y cumarinas además se confirmó la ausencia de compuestos cianogénicos y alcaloides descritos por la literatura a otra especie del género *Malesherbia*.

La identificación de metabolitos secundarios a través de patrones conocidos confirman la presencia del compuesto β -sitosterol y posiblemente el canferol en las fracciones del EDCM.

En el exudado resinoso de hojas y tallos de *M. auristipulata* se identificó por Gas-Masas una mezcla de ácidos grasos saturados, en el cual destacaba el ácido palmítico y en menor cantidad los ácidos esteárico, mirístico, eicosanoico y docosanoico. En el extracto DCM se identificó a través del cromatógrafo Gas-Masas el compuesto β -sitosterol.

En el estudio de la toxicidad aguda realizado a los diferentes extractos de *M. auristipulata* resultaron ser no tóxico ni letal en ratones a una dosis de 2g/Kg, se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos en la investigación con animales no son extrapolables directamente a la clínica humana, sin embargo, nos dan una estimación de

lo que puede suceder en el hombre.

La especie *M. auristipulata* presentó propiedades analgésicas y antiinflamatorias, (no reportada previamente para esta especie) efectos que fueron demostrados en los ensayos realizados en este estudio.

La prueba de analgesia confirma que los compuestos responsables son de naturaleza semipolar, detectando el mayor efecto en el ERES y el EDCM, las fracciones más purificadas del EDCM presentaron un efecto analgésico muy superior, el cual puede atribuirse al metabolito mayoritario aislado el fitoesteroide β -sitosterol.

El infuso al 10% de tallos y hojas de *M. auristipulata* demostró poseer un efecto analgésico importante 49,3%.

La actividad antiinflamatoria tópica determinada por el modelo de edema inducido con TPA y AA demostró que la parte aérea de *M. auristipulata* posee un efecto dual en ambas vías del metabolismo del ácido araquidónico, es decir, que sus componentes secundarios actuarían tanto a través de la vía de la lipooxigenasa, como por la vía de la ciclooxigenasa.

El infuso al 10% de tallos y hojas de *M. auristipulata* no presentó un efecto antiinflamatorio tópico.

Este estudio demostró los efectos analgésicos y antiinflamatorios de *Malesherbia auristipulata* y la ausencia de toxicidad aguda vía oral.

BIBLIOGRAFIA

- Alonso, J. (1998). "Tratado de Fitomedicina", ISIS Ed., Buenos Aires, pág.17-18.
- Cabezas, V. (1997). "Estudio antipirético, antiinflamatorio y analgésico de extractos de *Cestrum parqui* L'Herit", Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico de la Univesidad de Chile.
- Castro, M., Villagran, C. y Kalin - Arroyo, M.T. (1982). "Estudio etnobotánico en la Precoyuntura y Altiplano de los Andes del Norte de Chile (18°-19°S)", Volumen en síntesis-Proy. MAB-6-UNEP-UNESCO, Santiago de Chile, II, 133-205.
- Cositoro, A. (1995). "Enciclopedia de Ciencias Naturales Medio Ambiente y Ecología", Tercer tomo, Ed Oriente S. A. España, pág. 313-315.
- Cox, P.A. and Balick, M.J. (1994). "The ethnobotanical approach to drug discovery", *Scientific American*, pág. 82-87.
- Cramer, M. (1969). "Estudio químico *Malesherbia fasciculata*, especie medicinal autóctona", Tesis para optar a Químico Farmacéutico de la Universidad de Chile.
- Davies, N.M., Rooseth, A.G., Appleyard, C.B., Mcknight, W., Del Soldato, P., Calignano, A., Cirino, G., Wallace, J.I. (1997). "NO-naproxen vs Naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti- inflammatory effects", *Aliment Pharmacol, Ther.* 11:69-79.
- Delporte, C., Backhouse, N., Negrete, R., Salinas, P., Rivas, P., Cassels, B.K. and San Feliciano, A. (1998). "Antipyretic, hypothermic and antiinflammatory activities and

- metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood”, *Phytotherapy Research*, 12:118-122.
- Delporte, C., Muñoz, O., Rojas, J., Fernández, M., Payá, M., Erazo, S., Negrete, R., Maldonado, S., San Feliciano, A. and Backhouse, N. (2002). “Pharmaco-Toxicological study of *Kageneckia oblonga*, Rosaceae”, *Z. Naturforsch*, 57c:100-108.
- “El Altiplano Ciencia y Conciencia en los Andes (1993)”. Actas del Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos. 19 al 21 de octubre de 1993, Arica, Chile.
- Erazo, S., Negrete, R., Zaldivar, M., Backhouse, N., Delporte, C., Silva, I., Belmonte, E., López – Pérez, J. L. and San Feliciano, A. (2002a). “Methyl psilate: a new antimicrobial metabolite from *psila bolierensis*”, *Planta med*, 68: 66-67.
- Erazo, S., Zaldivar, M., Delporte, C., Backhouse, N., Tapia, P., Belmonte, E., Dellemonache, F. and Negrete, R. (2002b). “Antibacterial diterpenoids from. *Fabiana densa* var. *Ramulosa*”, *Planta med*, 68: 361-363.
- Evans, W.C. (1991). “Farmacognosia”, Trigésima edición, McGraw-Hill. Interamericana, México. pág. 3-4.
- Fisher, R. and Peters, S. (1989). “Compendio de Análisis Químico Cuantitativo”, Interamericana, México.
- Gautier, E. (1954). “*Apuntes de trabajos prácticos de farmacognosia*”, Editorial Universitaria, Santiago, 12-13.
- Gomez, M.A., Saenz, M.T., Garcia, M.D. and Fernandez, M.A. (1999). “Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models”, *Z. Naturforsch [C]*, Nov;54(11):937-41.
- Goodman, A., Hardmans, J., Limbird, L., Molinoff, P. and Ruddon, R. (1996). “Las bases Farmacológicas de la Terapéutica”, Novena edición, McGraw-Hill. Interamericana, México. pág. 619-707.
- Harwood, L. M. (1982), Comunicación Personal, Univ. de Manchester.
- Hollander, M. and Wolfe, D. (1973). “Nonparametric Statistical Methods”, John Wiley and Sons, New York, pág. 68-70.
- Jurlow, E. (1996). “Inflamación y reparación tisular” Centro de extensión Biomédica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Ed. Mediterráneo, Santiago, pág. 7.
- Katzung, B. (1999). “Farmacología básica y clínica”, Séptima edición, Manual moderno, México. pág. 79.
- Lloret, S. and Moreno, J.J. (1995). “Effects of an antiinflammatory peptide (antiflammim 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and edema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application”, *Biochemical Pharmacology*, vol.50, N°3, pág. 347-353.
- Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G. and San Martin, A. (1997). “A diterpenoid with a new”, *Phytochemistry*, 44:649
- Loyola, L.A., Bórquez, J., Morales, G., San Martin, A., Manriquez, V. and Wittke Azorellanol, O. (1998). “A diterpenoid with a new carbon skeleton from *Azorella compacta*”, *Tetrahedrom*. 54: 15533-15540.
- Mabry, T.J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970). “*The systematic identification of flavonoids*”, Editorial Springer-Verlag, N. Y., 35.

- Marticorena, C. y Quezada, M. (1985). "Flora vascular de Chile", *Gayana Bot*, 42: 130.
- Merck (1972). "Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel", Editorial Merck, Darmstadt, Alemania, 18.
- Nakamura, H. and Shizimu, M. (1981). "Site of analgesic action of a non-steroidal, antiinflammatory drug, tolmetin sodium, in rats", *Br. J. Pharmacol*, 73:779-785.
- Nanji, A.A., Zakim, D., Rahemtulla, A., Daly, T., Miao, L., Zhao, S., Khwaja, S., Tahan, S.R. and Dannenberg A.J. (1997). "Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alfa and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat", *Hepatology*, Dec;26(6):1538-45.
- Neave, H. R. (1980). "Tablas estadísticas", DIFEL, Difusao Editorial S.A., Sao Paulo, pág. 35.
- "Normas Internacionales para la Investigación biomédica con animales (1990)". *Boletín Sanitaria Panamericana*, 108 (5-6): 637-641.
- Ortega, A., Roca, A. and Micó, J.A. (2002). "Animal models of pain. A critical view", *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 9:447-453.
- Pacheco, P., Chiang, M.T., Marticorena, M. and Silva, M. (1977). "Química de las plantas chilenas usadas en medicina popular", Universidad de Concepción, Instituto Central de Biología, Departamento de Botánica, Laboratorio de Química de Productos Naturales, pág. 246 – 259.
- Payá, M., Ferrándiz, M., Sanz, M., Bustos, G., Blasco, R., Rios, J. and Alcaraz, M. (1993), "Study of the antiiodema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean Coast in mice", *Phytotherapy Research*, 7:159-162.
- Ramírez, F. (2002). "Estudio químico y farmacológico de *Fabiana densa* REMY var. *Ramulosa* WEDD, especie medicinal altiplánica chilena", Memoria para optar a Químico Farmacéutico de la Universidad de Chile.
- Rao, T.S., Currie, J.L., Shaffer, A.F. and Isakson, P.C. (1993). "Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation", *Inflammation*, Dec;17(6):723-41.
- Reichert, J. A., Daughthers, R. S., Rivard, R. and Simone, D. A. (2002), "Peripheal and preemptive opioid antinoception in a mouse visceral pain model", *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 9:423-431.
- Ricardi, M. (1965). "*Estudios en Malesherbia auristipulata y Malesherbia splendens*", *Gayana Bot*. 12:3-9.
- Ringbom, T., Huss, U., Stenholm, A., Flock, S., Skattebol, L., Perera, P. and Bohlin, L. (2001). "Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids", *J. Nat. Prod.*, Jun;64(6):745-9.
- Robbers, J., Speedie, M. and Tyler, V. (1996). "Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology", Ed. Williams and Wilkins, USA, pág. 10-11.
- Santos, A.R., Niero, R., Filho, V.C., Yunes, R.A., Pizzolatti, M.G., Delle Monache, F. and Calixto, J.B. (1995). "Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice", *Planta Med.*, Aug;61(4):329-32.
- Vidal, P. (2000), "Estudio farmacológico y químico de *Proustia pyrifolia* DC, especie medicinal autóctona", Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico de la

Universidad de Chile.

Wagner, H., Bladt, S. and Zgainski, E. M. (1984). "*Plant Drug Analysis*", Editorial Springer-Verlag, N. Y., 299 y 305.

Wallace, F.A., Miles, E.A., Evans, C., Stock, T.E., Yaqoob, P. and Calder, P.C.(2001) "Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines", J. Leukoc. Biol., Mar, 69(3):449-457

ANEXOS

Parque nacional Lauca

