



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

PROFESOR PATROCINANTE
PROF. Rosa Negrete Córdova.

DIRECTORES DE MEMORIA
DRA. Carla Delporte Vergara.
DRA. Nadine Backhouse Erazo.

ESTUDIO QUÍMICO BIoguiado DE LOS
EXTRACTOS CON ACTIVIDAD
ANALGÉSICA Y ANTIINFLAMATORIA DE
***Adesmia atacamensis* Phil.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

ANDREA TIAP-LING LAM LAY

SANTIAGO-CHILE
2004

A mis padres y hermano, que se encuentran en Arica;

*A un gran hombre que lo quiero mucho Roberto Catriao, que
está presente en todo momento y me ha entregado fuerza, incentivo,
apoyo y ayuda desde que lo conocí.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los profesores del Laboratorio de Productos Naturales, que contribuyeron a la realización de esta memoria, en especial:

A la profesora Nadine Backhouse por el incentivo, paciencia, confianza, ayuda y amistad entregada en los años que la conozco y especialmente en esta memoria.

A la profesora Carla Delporte por el apoyo, incentivo, sugerencias y colaboración compartidos para realizar esta memoria.

A las profesoras Rosita Negrete y Silvia Erazo por sus valiosas experiencias, disposición y apoyo en la realización de esta memoria.

A Claudia Riquelme por toda la ayuda y facilidades en el desarrollo de esta memoria. También a Vanessa, Tania, Romina e Ivonne por la amistad y apoyo.

A mis compañeros tesistas Cristina Aguirre, Paola Mella, Macarena Pedrasa y Felipe Gigoux por la colaboración, incentivo y conocimiento brindado durante todo este tiempo.

A mis compañeros de carrera Nidia Schemmel, Fernando Sepúlveda, Carla Ortiz, Cristian Acosta, Claudio González, Pamela Blanco, Delai González y Vania Herol por la amistad en el transcurso de esta carrera.

A todos que contribuyeron directa o indirectamente en la realización de esta memoria.

Un especial agradecimiento a los QFs Ximena Silva y Juan Otárola de la Unidad de Mantenimiento de Animales del Instituto de Salud Pública (I.S.P.) por la disposición y facilidades brindadas para la realización del estudio con los animales.

En virtud al trato humanitario y mitigador del dolor de los animales utilizados en esta investigación, se consideran las “Normas Internacionales en Investigación Biomédicas que involucra el uso de animales”. Esta reglamentación ha sido elaborada por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas en Ginebra 1986 (Boletín Oficina Sanitaria Panamericana, 108(5-6): 637-641), y son aplicadas por la Unidad de Mantenimiento de Animales del Instituto de Salud Pública de Chile (I.S.P.), lugar donde se desarrollaron las pruebas farmacológicas.

Los ensayos que se realizaron por el grupo de investigación del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, con animales de experimentación, cuentan con la aprobación de la Comisión de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
CAPITULO I	
INTRODUCCION.....	1
 CAPITULO II	
HIPOTESIS.....	3
 CAPITULO III	
OBJETIVOS.....	4
3.1. Objetivo general.....	4
3.2. Objetivos específicos.....	4
 CAPITULO IV	
ANTECEDENTES GENERALES.....	5
4.1. Clasificación taxonómica.....	5
4.2. Distribución geográfica.....	5
4.3. Descripción botánica.....	6
4.4. Uso en la medicina popular.....	6
4.5. Estudios anteriores.....	7
4.5.1. Estudios químicos y farmacológicos anteriores del género <i>Adesmia</i>	7
 CAPITULO V	
MATERIALES Y METODOS.....	10
5.1. Análisis químico.....	10
5.1.1. Recolección.....	10
5.1.2. Preparación de los extractos.....	10

5.1.3. Obtención del aceite esencial.....	10
5.1.4. Estudio cromatográfico.....	
5.1.5. Estudio espectroscópico.....	13
5.1.6. Fraccionamiento y aislamiento.....	13
5.1.6.1. Fraccionamiento del extracto resinoso de <i>Adesmia atacamensis</i> Phil.....	14
5.1.6.2. Fraccionamiento de AaResC.....	14
5.2. Estudio farmacológico <i>in vivo</i>	16
5.2.1. Animales de experimentación.....	16
5.2.2. Determinación de la actividad analgésica.....	16
5.2.3. Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica..	17
5.3. Estudios <i>in vitro</i>	19
5.3.1. Determinación de la actividad atrapadora del radical DPPH.....	19
5.3.2. Determinación de la inhibición de la enzima xantina oxidasa.....	20
5.3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	21
5.3.3.1. Actividad antimicrobiana por bioensayo en siembra radial.....	21
5.3.3.2. Actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía.....	22
5.3.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto aislado activo.....	23
CAPITULO VI	
RESULTADOS Y DISCUSION.....	24
6.1. Análisis químico.....	24
6.1.1. Fraccionamiento del extracto resinoso de <i>Adesmia</i> <i>atacamensis</i> Phil.....	24

6.1.2. Obtención del aceite esencial y comparación con las distintas fracciones.....	24
6.1.3. Identificación de los compuestos AaC1 y AaC2.....	26
6.2. Estudios farmacológicos <i>in vivo</i>	40
6.2.1. Actividad analgésica vía oral.....	40
6.2.2. Actividad antiinflamatoria tópica frente a AA.....	42
6.2.3. Actividad antiinflamatoria tópica frente a TPA.....	45
6.3. Estudio <i>in vitro</i>	50
6.3.1. Evaluación de la capacidad antioxidante.....	50
6.3.1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH.....	50
6.3.1.2. Inhibición de la enzima xantina oxidasa.....	54
6.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	56
6.3.2.1. Actividad antimicrobiana por siembra radial.....	56
6.3.2.2. Actividad antimicrobiana por bioensayo bioautografía.....	57
6.3.2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto activo.....	59
6.4. Otros estudios de los compuestos aislados y sus derivados.....	60
CAPITULO VII	
CONCLUSIONES	61
CAPITULO VIII	
BIBLIOGRAFIA	63

INDICE DE ILUSTRACIONES

	Página
FIGURA N°1 <i>Adesmia atacamensis</i> Phil.....	6
FIGURA N°2 Esquema de extracción de <i>A. atacamensis</i>	12
FIGURA N°3 Esquema de fraccionamiento de <i>A. atacamensis</i>	15
FIGURA N°4 c.c.f. comparativa de AaResB con AaEs.....	25
FIGURA N°5 Cromatografía gaseosa comparativa de AaResB (NA_2) y AaEs (NA_1).....	25
FIGURA N°6 Estructuras químicas de los compuestos aislados.....	29
FIGURA N°7 Espectro ¹³ C-RMN de 3-O-metilgalangina (AaC1).....	30
FIGURA N°8 Espectro ¹³ C-RMN de 3-O-metilgalangina (AaC1).....	31
FIGURA N°9 Espectro ¹ H-RMN de 3-O-metilgalangina (AaC1).....	32
FIGURA N°10 Espectro ¹ H-RMN de 3-O-metilgalangina (AaC1).....	33
FIGURA N°11 Espectro ¹³ C-RMN de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2).....	34
FIGURA N°12 Espectro ¹³ C-RMN de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2).....	35
FIGURA N°13 Espectro ¹ H-RMN de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2).....	36
FIGURA N°14 Espectro HMBC de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2).....	37
FIGURA N°15 Espectro HMBC de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2).....	38
FIGURA N°16 Espectro HMBC de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2).....	39
FIGURA N°17 Comparación del efecto analgésico de las fracciones obtenidas de AaRes y naproxeno sódico.....	41

FIGURA N°18	Comparación del efecto antiinflamatorio tópico frente a AA (%EAI _T) de fracciones obtenidas de AaRes y nimesulida (NIM).....	43
FIGURA N°19	Comparación del efecto antiinflamatorio tópico frente a AA (%EAI _T) de AaRes, AaResC, compuestos aislados de AaResC, galangina y nimesulida (NIM).	44
FIGURA N°20	Comparación del efecto antiinflamatorio tópico frente a TPA (%EAI _T) de las fracciones obtenidas de AaRes e indometacina (IND).....	46
FIGURA N°21	Comparación del efecto antiinflamatorio tópico frente a TPA (%EAI _T) de AaRes, AaResC, los compuestos aislados de AaResC: AaC1 y AaC2, galangina e indometacina (IND).....	47
FIGURA N°22	Comparación de la actividad atrapadora de radicales libres de las fracciones obtenidas de AaRes con quercetina y catequina.....	51
FIGURA N°23	Comparación de la actividad atrapadora de radicales libres de AaRes, AaResC, los compuestos aislados con galangina, quercetina y catequina.....	52
FIGURA N°24	Comparación de la inhibición de la xantina oxidasa (%I) de las fracciones obtenidas de AaRes y alopurinol.....	54

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA N° 1 Resumen de las actividades ensayadas <i>in vivo</i> para <i>Adesmia atacamensis</i> , <i>Adesmia verrucosa</i> y los compuestos aislados de <i>A. verrucosa</i> .	8
TABLA N°2 Resumen de las actividades ensayadas <i>in vitro</i> para <i>Adesmia atacamensis</i> , <i>Adesmia verrucosa</i> y los compuestos aislados de <i>A. verrucosa</i> .	9
TABLA N°3 Resumen de las fracciones, compuestos aislados y mezcla de solventes con que se eluyeron las columnas cromatográficas de AvRes.	14
TABLA N°4 Protocolo del ensayo de decoloración de DPPH.	19
TABLA N°5 Protocolo del ensayo de xantina oxidasa.	20
TABLA N°6 Fases móviles de cromatogramas de bioautografías.	22
TABLA N°7 Análisis de ¹³ C-RMN y ¹ H-RMN del compuesto AaC1 aislado de la fracción AaResC.	27
TABLA N°8 Análisis de ¹³ C-RMN y ¹ H-RMN del compuesto AaC2 aislado de la fracción AaResC.	28
TABLA N°9 Resultados de la actividad analgésica de las fracciones de <i>A. atacamensis</i> y naproxeno sódico (NAP).	40
TABLA N°10 Resultados de la actividad antiinflamatoria vía tópica frente a AA de las fracciones obtenidas de AaRes, compuestos aislados desde AaResC y nimesulida (NIM).	42

TABLA N°11	Resultados de la actividad antiinflamatoria vía tópica frente a TPA de las fracciones obtenidas de AaRes, compuestos aislados desde AaResC, aceite esencial (AaEs) e indometacina (IND).	45
TABLA N°12	Resultados de la actividad atrapadora de radicales libres de las fracciones obtenidas desde AaRes y compuestos aislados desde AaResC y quercetina.	50
TABLA N°13	Resultados de la inhibición de la xantina oxidasa de las fracciones obtenidas de AaRes y alopurinol.	54
TABLA N°14	Resultados del bioensayo de siembra radial de las fracciones AaResB, AaResC, AaResD y AaResE.	56
TABLA N°15	Resultados de la evaluación antimicrobiana mediante el bioensayo de bioautografía de las fracciones obtenidas de AaRes.	57
TABLA N°16	Resultados del bioensayo de bioautografía de los compuestos aislados de AaResC.	58
TABLA N°17	Resultado de la CMI de los compuestos AaC1 y AaC2	59

ABREVIATURAS

A	: absorbancia.
AA	: ácido araquidónico.
AaC1	: compuesto 1 de <i>A. atamensis</i>
AaC2	: compuesto 2 de <i>A. atamensis</i>
AaEDM	: extracto diclorometano <i>A. atacamensis</i> .
AaEH	: extracto hexánico <i>A. atacamensis</i> .
AaEM	: extracto metanólico <i>A. atacamensis</i> .
AaEs	: aceite esencial de <i>A. atacamensis</i>
AaRes	: exudado resinoso <i>A. atamensis</i>
AaRes A	: exudado resinoso <i>A. atamensis</i> fracción A.
AaRes B	: exudado resinoso <i>A. atamensis</i> fracción B.
AaRes C	: exudado resinoso <i>A. atamensis</i> fracción C.
AaRes D	: exudado resinoso <i>A. atamensis</i> fracción D.
AaRes E	: exudado resinoso <i>A. atamensis</i> fracción E.
AcEtO	: acetato de etilo.
AS	: p-anisaldehído sulfúrico.
Av1	: compuesto 1 de <i>A. verrucosa</i> , 7-O-glucósido de naringenina.
Av2	: compuesto 2 de <i>A. verrucosa</i> , 7-O-glucósido de eriodictiol.
Av3	: compuesto 3 de <i>A. verrucosa</i> , cirsimarina.
Av4	: compuesto 4 de <i>A. verrucosa</i> , hispidulina.
Av5	: compuesto 5 de <i>A. verrucosa</i> , eriodictiol.
AvEM	: extracto metanólico de <i>A. verrucosa</i> .
ccf	: cromatografía en capa fina.
DCM	: diclorometano.
DEPT	: distortionless enhanced polarization transfer.
DMSO	: dimetilsulfóxido.
DPPH	: radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo.
Hex	: hexano.
HMBC	: heteronuclear multiple bond correlation.
HMQC	: heteronuclear multiple quantum correlation.
IC ₅₀	: concentración inhibitoria cincuenta.
IND	: indometacina.
iNOS	: óxido nítrico sintasa inducible.
NF κ -B	: factor nuclear kappa-B.
LO	: 5-lipooxigenasa.

MTT	: sal de tetrazolium.
NAP	: naproxeno sódico.
NIM	: nimesulida.
PDA	: potatoes dextrose agar.
PDB	: potatoes dextrose broth.
PLA ₂	: fosfolipasa A 2.
SEM	: error estándar medio.
TPA	: 12-miristato, 13-acetato forbol.
Tr	: tiempo de retención.
TSA	: triptic soy agar.
TSB	: triptic soy broth.
UV	: ultravioleta.
XO	: xantina oxidasa.
λ	: longitud de onda.
% EAn	: porcentaje de efecto analgésico.
%D	: porcentaje de dolor.
%EAI _T	: porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico.

RESUMEN

ESTUDIO QUIMICO BIOGUIADO DE LOS EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANALGÉSICA Y ANTIINFLAMATORIA DE *Adesmia atacamensis* Phil.

El género *Adesmia* (145 especies) en Chile se encuentra distribuido a lo largo de la Cordillera de los Andes y varias de sus especies son empleadas para el tratamiento de la inflamación y del dolor. Recientemente, en una investigación paralela, se ha podido demostrar la actividad analgésica, antiinflamatoria, atrapadora de radicales libres y antimicrobiana de *A. verrucosa*.

Continuando con el estudio de las especies de este género, los resultados preliminares del exudado resinoso de *A. atacamensis*, han demostrado propiedades antiinflamatorias y analgésicas.

Mediante un fraccionamiento bioguiado del exudado resinoso (64,3 g) de *A. atacamensis*, se obtuvieron las siguientes fracciones: AaResA (2,5 g), AaResB (9 g), AaResC (8 g), AaResD (14,3 g) y AaResE (19,4 g) a las que se les determinó su actividad farmacológica. La actividad analgésica oral se evaluó mediante la inducción del efecto algésico por ácido acético al 0,6%, la actividad antiinflamatoria tópica por inducción del edema de oreja por ácido araquidónico (AA) y por 12-miristatoforbol 13-acetato (TPA). Además, se les evaluó la capacidad atrapadora de radicales libres por el método del DPPH, así como también, su capacidad antioxidante por la inhibición de la enzima XO y por último, la actividad antimicrobiana mediante bioautografías, determinando la concentración mínima inhibitoria de los metabolitos activos.

Las fracciones bioactivas AaResB, AaResC, AaResD y AaResE, presentaron una importante actividad antiinflamatoria frente a TPA (todas superior a 70%), siendo la E la más activa. Un efecto bastante menor, se observó al inducir la inflamación con AA.

Al evaluar la actividad atrapadora de radical libre (DPPH), todas las fracciones resultaron inactivas y por ende, sólo se determinó la posible inhibición de XO a las fracciones AaResD y AaResE por visualizar en su composición mayor cantidad de derivados fenólicos, resultando levemente positivas (< al 50%).

Las fracciones AaResB, AaResC y AaResD presentaron actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* y *Staphylococcus aureus*.

El aceite esencial se asemeja a la fracción AaResB en cuanto a los terpenos presentes, pero difiere de ésta, en que no posee flavonoides. El aceite esencial, a diferencia de la fracción AaResB, no presentó actividad antiinflamatoria tópica.

De la fracción C se aislaron dos flavonoides AaC1 y AaC2 usando columnas rápidas de gel de sílice, identificados por espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C como 3-O-metilgalangina y 3-O-metil-6-metoxicanferol. Ambos compuestos presentaron actividad antiinflamatoria frente a TPA (81,7% y 73,1% respectivamente), siendo el compuesto AaC2 activo frente a AA (36,7%). Ambos flavonoles, fueron inactivos como atrapadores de radicales libres. El compuesto AaC2 presentó actividad antimicrobiana contra *B. subtilis* y *S. aureus* (CMI 150 y 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente), mientras que AaC1 sólo presentó actividad contra *B. subtilis* (CMI: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Los resultados hasta ahora encontrados proporcionan un respaldo científico al uso de *A. atacamensis*, destacando su propiedad antiinflamatoria. Las actividades demostradas por la fracción C se deberían a la presencia de flavonoides, entre otros, lo que merece continuar el estudio químico y farmacológico de las otras fracciones obtenidas de esta especie.

SUMMARY

A BIOGUIDED CHEMICAL STUDY OF ANTIINFLAMMATORY AND ANALGESIC ACTIVE EXTRACTS OF *Adesmia atacamensis* Phil.

In Chile the genus *Adesmia* (145 species) is distributed along the Los Andes mountain and are employed in folklore medicine for the treatment of several ailments as pain and inflammation. Recent results have demonstrated anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial properties for *A. verrucosa* due to the presence of bioactive metabolites.

Looking forward to study a different species of this genus, preliminary studies of the resinous exudates (64.3 g) of *A. atacamensis* demonstrated its anti-inflammatory and analgesic, properties. The above extract was submitted to a bioguided fractionation in column chromatography, yielding the following fractions: AaResA (2.5 g), AaResB (9 g), AaResC (8 g), AaResD (14.3 g) and AaResE (19.4 g) and its pharmacological properties were evaluated. To determine the topical anti-inflammatory activity the ear oedema method in CF-1 mice, induced by two different inflammatory agents: phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) and araquidonic was used. The oral analgesic activity was evaluated by means of abdominal writhing method induced by acetic acid in mice, and the fractions were administered orally. The free radical scavenger properties were evaluated according to the DPPH method as well as the antioxidant capacity by the inhibition of xanthine oxidase method, finally the antimicrobial activity through a bio-autographic agar overlay and the minimal inhibitory concentration (MIC) for the active samples was determined.

Fractions AaResB, AaResC, AaResD and AaResE displayed an important anti-inflammatory effect when inflammation was induced by TPA (higher than 70%) being fraction E the most active, while a much lower anti-inflammatory effect was observed when inflammation was induced by AA.

Every fraction together with the isolated compounds resulted to be inactive as radical scavenger and only a very low antioxidant activity was observed for fractions AaResD and AaResE, that were assayed as phenolic compounds were observed in its chemical composition.

The fractions AaResB, AaResC and AaResD presented antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* and *Staphylococcus aureus*.

The essential oil (0.72% v/w) was obtained from the fresh aerial part of *A. atacamensis* and its chemical composition was compared by thin layer chromatography and gas-mass chromatography with all the fractions obtained from the resinous exudates, showing similar terpenoids constituents to AaResB, differing the last for the presence of flavonoids compounds. The essential oil resulted to be inactive as anti-inflammatory.

From the active fraction AaResC, two flavonols (AaC1 and AaC2) were isolated by flash column chromatography and identified by NMR of ^1H and ^{13}C as 3-O-methylgalangin and 3-O-methyl-6-methoxykaempferol. Both compounds (AaC1 and AaC2) were active as anti-inflammatory when induced by TPA (81.7% and 73.1% respectively), and only AaC2 showed effect in the ear oedema induced by AA (36.7%). Both compounds showed no radical scavenger activity. Mean while AaC2 presented antimicrobial activity against *B. subtilis* and *S. aureus*, (MIC: 150 and 240 ug/ml respectively) and AaC1 was active only against *B. subtilis* (MIC: 200ug/ml).

The results afforded in this research provide a scientific endorsement to the use of *A. atacamensis*, emphasizing its anti-inflammatory properties. The anti-inflammatory activity found for fraction AaResC would be due in part to the presence, among others, of the flavonols here reported and these results deserves to continue the chemical and pharmacological study of the other active fractions yielded from the resinous exudates.

I. INTRODUCCIÓN

El exudado resinoso producido por las plantas cumple un rol importante en ellas, puesto que actuarían como una barrera protectora mecánica frente al ataque de insectos y como una barrera de protección química por la presencia de metabolitos bioactivos los que le proporcionan propiedades antimicrobianas, antioxidantes y citotóxicas, entre otras. En el Altiplano, las especies deben sobrevivir en ambientes con baja humedad y alta salinidad; además de, resistir a la deshidratación, el exceso de luminosidad y las bajas de temperaturas.

El interés por el estudio químico y farmacológico de la resina de varias especies que crecen en el Altiplano, ha permitido aislar e identificar compuestos derivados de flavonoides y diterpenos, que poseen actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, analgésica y antioxidante. En este sentido, se destacan los trabajos realizados en el laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, demostrando que el exudado resinoso de *Fabiana densa* var *ramulosa*, presenta dos nuevos diterpenos: *ent-beyer-15-en-18-O-oxalato* (FAB-7) y *ent-beyer-15-en-18-O-succinato*(FAB-9), todos ellos con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (+) y Gram (-); además, demostró actividad analgésica y antiinflamatoria tópica, inducida tanto por AA como con TPA (Erazo *et al.*, 2002a).

En el estudio realizado con el exudado resinoso de *Psila boliviensis*, se aisló un nuevo compuesto derivado del fenilpropano, el 3-formil-p-cumarato de metilo con actividad antimicrobiana, no descrito anteriormente en la literatura (Erazo *et al.*, 2002b). Los estudios de los géneros *Azorella*, *Mulinum* y *Laretia*, Apiaceae, han revelado que estas especies son una importante fuente de nuevos esqueletos carbonados llamados mulinano, azorellano y yaretano. Los diterpenoides aislados fueron: ácido mulinólico, ácido mulin-11, 13-dien-20-oico (Loyola *et al.*, 2001), ácido 14-hidroximulinólico y ácido 17-acetoximulínico

(Lolyola *et al.*, 1990), los que presentaron actividades analgésicas y antiinflamatorias (Delporte *et al.*, 2003; Calderón, 2003). En una memoria recientemente finalizada por Pedrasa (2004), se aisló del exudado resinoso de *Lophopappus tarapacanus*, cuatro compuestos, dos de los cuales son flavonoides que presentan actividad antiinflamatoria tópica, antimicrobiana y antioxidante.

Estudios en el exudado resinoso de *Adesmia verrucosa* y *Adesmia atacamensis*, han demostrado para la primera, potenciales actividades analgésica, antiinflamatoria, atrapadoras de radicales libres y antimicrobianas; aislándose cuatro flavonoides responsables de las actividades (Mella, 2004; Backhouse *et al.*, 2004), y para *A. atacamensis*, los estudios preliminares, han demostrado su potencial efecto antiinflamatorio y analgésico (Backhouse *et al.*, 2003)

Es así como en la presente memoria, se seguirá con un estudio químico bioguiado de *A. atacamensis*, con la finalidad de aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios.

II. HIPOTESIS

Adesmia atacamensis presenta diversos metabolitos con actividad antiinflamatoria y analgésica, es por ello que en medicina folclórica se utiliza para el tratamiento de la quebradura de huesos. Basándonos en los antecedentes encontrados para *Adesmia verrucosa*, se postula que *Adesmia atacamensis* presenta además, actividad antioxidante y antimicrobiana debido a la estrecha relación de éstas y los procesos antiinflamatorios.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento científico de la especie *Adesmia atacamensis* y dar un respaldo al uso que la medicina folclórica le atribuye, como posible analgésico y antiinflamatorio, aislando e identificando los metabolitos activos.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar un fraccionamiento bioquímico del extracto AaRes con propiedades antiinflamatorias y analgésicas.
- Evaluar *in vivo* la actividad analgésica vía oral y antiinflamatoria vía tópica de las fracciones obtenidas de AaRes, para determinar la de mayor actividad y proceder a aislar los metabolitos presentes.
- Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas, por medio del ensayo de xantina oxidasa.
- Evaluar la actividad atrapadora de radicales libres, mediante el ensayo de decoloración de DPPH de las fracciones obtenidas de AaRes.
- Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana y antimicótica, mediante el ensayo en siembra radial de las fracciones obtenidas de AaRes.
- Evaluar la actividad antibacteriana y antimicótica de las fracciones obtenidas, a través del bioensayo de bioautografía.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del o los compuestos aislados que sean activos.
- Obtener el aceite esencial de Aa (AaEs).
- Evaluar la actividad antiinflamatoria vía tópica del aceite esencial.
- Aislar e identificar los metabolitos mayoritarios y/o los responsables de las actividades encontradas.

IV. ANTECEDENTES GENERALES

4.1. Clasificación taxonómica.

NOMBRE CIENTÍFICO	:	<i>Adesmia atacamensis</i> Philippi
NOMBRE VULGAR	:	Allaval, jarilla, pasto del guanaco, tambor, tamborcillo y tano-tano.
SINÓNIMO	:	<i>Patagonium atacamense</i> Phil.
FAMILIA	:	Papilionaceae (Fabaceae)
DIVISIÓN	:	Magnoliophyta

4.2. Distribución geográfica.

Se encuentra en Chile en la región del desierto, la que se extiende desde la I región, en la línea de la concordia, hasta el río Elqui, en la IV región, específicamente en la subregión del desierto absoluto, del interior de Taltal (donde las precipitaciones son insignificantes y la vida vegetal esta prácticamente ausente). También se encuentra en la subregión del desierto andino (representa en piso vegetacional superior ubicado en las laderas occidentales de la Cordillera de Los Andes, entre altitudes aproximadas de 1.800 a 3.500 m s.n.m y aún más en ciertos lugares), precisamente en los matorrales desértico con suculentas columnares y en el desierto de aluviones (Gajardo, 1995).

4.3. Descripción botánica.

Planta leñosa, ramosa, hirsuta y sembrada de glándulas sésiles o cortamente pediceladas. Hojas ninguna o muy escasas, de dos parejas de hijuelas trasovadas, glanduloso-almenadas.

Estipulas y brácteas acorazonadas, grandes, medio abrasadoras, glanduloso-almenadas. Flores racimosas hacia el extremo de las ramas. Pedúnculo del largo del cáliz; éste de 5 mm. Con los dientes más o menos del largo del tubo. Corola de 8 mm; el estandarte y las alas estriadas, legumbres de 4 a 5 artículos plumosos” (Reiche, 1896).



FIGURA N° 1: *Adesmia atacamensis* Phil.

4.4. Uso en la medicina popular.

Adesmia atacamensis Phil. se utiliza en el tratamiento de dolores musculares y en las quebraduras de hueso (Villagrán, 1982).

4.5. Estudios anteriores.

4.5.1. Estudios químicos y farmacológicos del género *Adesmia*.

De *Adesmia aconcaguensis* Burk, se han aislado glicósidos triterpénicos del tipo malabaricano (Faini *et al.*, 1995). A *Adesmia aecigeras* se le encontró actividad antimicrobiana y antimicótica contra *Micrococcus luteus* y *Candida albicans* debida a los flavonoides aislados y otros compuestos fenólicos (Agnese *et al.*, 2001). El aceite esencial y fracciones polares de *Adesmia boronoides* Hook, contiene compuestos que inhiben la actividad de la 5-lipoxigenasa en la cascada del ácido araquidónico, lo que podría contribuir a los efectos antiinflamatorios de esta planta (González *et al.*, 2003). La infusión de *Adesmia emarginata* Clos. conocida como “paramela” se emplea para cortar la menstruación (Muñoz *et al.*, 1981).

Un estudio actual con las resinas de las especies de *A. atacamensis* y *A. verrucosa*, han demostrado que ambas especies presentan efecto antiinflamatorio y analgésico, postulando que la inhibición de la cascada del ácido araquidónico sería posiblemente por la vía de la 5-lipooxigenasa (LO) (Backhouse *et al.*, 2003).

Por otra parte, el exudado resinoso de ambas especies, presentaron cierta toxicidad aguda al ser administrado a ratones, manifestándose alteración del hígado, intestino y corazón. Estas alteraciones a dichos órganos fueron más leves al administrar el exudado de *A. atacamensis* (Gálvez, 2003) .

Recientemente, en un estudio químico y bioquímico del exudado resinoso de *A. verrucosa*, se han podido aislar e identificar varios flavonoides, lo que respalda las propiedades farmacológicas encontradas en los ensayos de la actividad analgésica, actividad antiinflamatoria *in vivo*, actividad antimicrobianas y actividad antioxidante (Mella, 2004).

TABLA N°1: Resumen de los ensayos *in vivo* para *Adesmia atacamensis*, *Adesmia verrucosa* y los compuestos aislados de *A.verrucosa*.

Extractos resinosos	dosis mg/Kg	% EAn ± SEM	dosis mg/Kg	% EAI oral ± SEM	dosis mg/20uL	% EAI _T (TPA) ± SEM	dosis mg/20uL	% EAI _T (AA) ± SEM
<i>A. atacamensis</i>	600	34,7±11,1	600	66,8 ± 2,7	3	92,4 ± 6,3	3	60,8 ± 9,2
<i>A. verrucosa</i>	600	30,7 ± 12	600	53,4 ± 3,9	3	91,3 ± 4,2	3	61,3 ± 6,4
AvEM	600	49,3± 5,1		N.E	3	80,4± 7,4	3	0
Mezcla Av1 y Av2		N.E		N.E	0,61	0	1,44	0
Fármacos								
Naproxeno sódico	12,5	70,0±4,3	4	54,6±0,8				
Indometacina					0,5	92,9 ±3,2		
Nimesulida							1	48,8±3,9

%EAn: Efecto analgésico; %EAI oral: efecto antiinflamatorio oral; %EAI_T: efecto antiinflamatorio tópico; SEM: error estándar medio; N.E: no ensayado

AvEM: Extracto metanólico de *A. verrucosa*.

Mezcla de AV1 y Av2: mezcla de 7-O-glucósido de naringenina y 7-O-glucósido de eriodictiol.

TABLA N°2: Resumen de los ensayos *in vitro* para *Adesmia atacamensis* y *Adesmia verrucosa* y los compuestos aislados de *A.verrucosa*.

Extracto resinoso	Conc. (µg/mL)	% Inh. de la enzima X.O.	Conc. (µg/mL)	%Decoloración de DPPH ± SEM
<i>A. atacamensis</i>	50	39,9	200	1,24 ± 2,50
<i>A. verrucosa</i>	50	37,8	200	45,56 ± 3,57
Av1			100	30,59± 0,86
Av2			100	90,58 ± 0,86
Av3			100	1,14 ± 0,66
Av4			100	0,29 ± 2,35
AvEM			200	87,3 ± 0,17
Fármacos de referencia				
Alopurinol	0,035	42,7		
Quercetina			7,5	88,14 ± 1,3 *10 ⁻⁶

% Inh. de la enzima X.O.: porcentaje de inhibición de la enzima xantina oxidasa; Conc.: concentración; SEM: error estándar medio.

Av1: 7-O-glucósido de naringenina

Av2: 7-O-glucósido de eriodictiol

Av3: Cirsimaritina

Av4: Hispidulina

AvEM: extracto metanólico de *A.verrucosa*

Los exudados resinosos de ambas especies *A. verrucosa* y *A. atacamensis* no resultaron activas en la evaluación antimicrobiana en placa, sin embargo, el compuesto Av3 presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus* y el Av4 contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, con un CMI de 100 µg/mL y 80 µg/mL, respectivamente.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1. Análisis químico.

5.1.1. Recolección.

Se recolectaron las partes aéreas de *A. atacamensis*, en el mes de Mayo de 2003 en la localidad de Tignamar, provincia de Parinacota, I Región a 3797 m s.n.m por la profesora e investigadora Eliana Belmonte. Se dejó un testigo: N° SQF 22225, en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5.1.2. Preparación de los extractos.

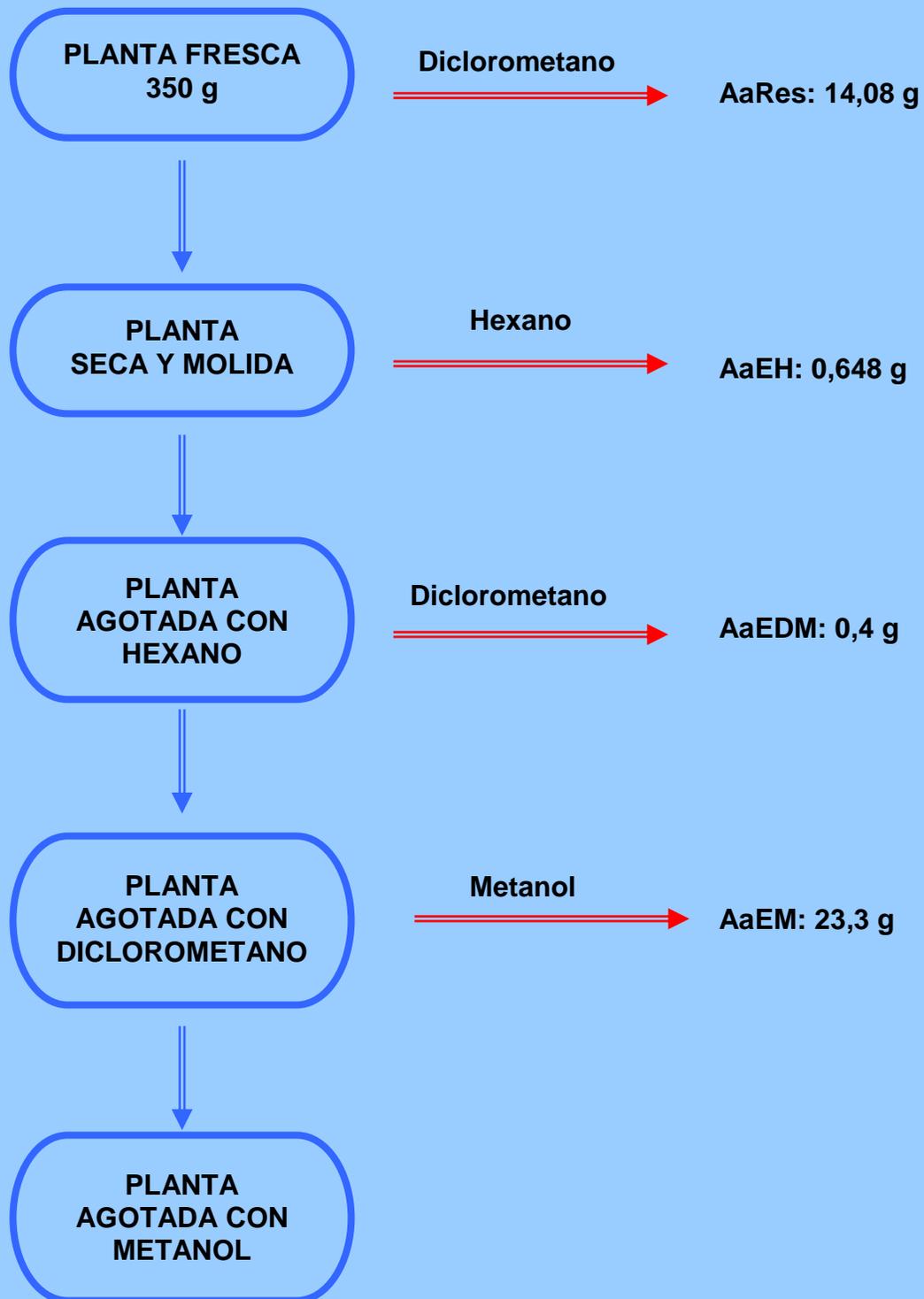
Las partes aéreas frescas de *A. atacamensis* (350 g), fueron sometidas a una extracción exhaustiva con DCM a temperatura ambiente, posteriormente se concentró, obteniéndose 14,08 g de exudado resinoso (AaRes). En seguida, el material vegetal fue secado al aire libre y protegido del sol, para ser triturado en un molino de cuchillo Biber Wien. Con el material seco y triturado, se realizaron extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente, obteniéndose: 0,648 g de extracto hexánico (AaEH); 0,4 g de extracto diclorometano (AaEDM) y 23,3 g de extracto metanólico (AaEM). Cada extracción fue realizada hasta total agotamiento con cada uno de los disolventes, dejando secar la planta a temperatura ambiente antes de adicionar el siguiente disolvente. Cada extracto fue llevado a sequedad en un evaporador rotatorio (FIGURA N°2)

5.1.3. Obtención del aceite esencial.

A partir de las partes aéreas frescas de *A. atacamensis* (150 g) se extrajo el aceite esencial por destilación en corriente de vapor de agua mediante un equipo Clevenger.

Se realizó un estudio químico preliminar comparativo de la esencia y de las fracciones obtenidas de AaRes por ccf usando p-anisaldehído (AS) como revelador, además del análisis por cromatografía gas/masa usando un cromatógrafo GC-MS Fisions modelo MB 800 con una columna Hewlet Packart ultra 2 de 15 m de longitud, espesor 0,25 μm y diámetro de 0,32 mm.

Para visualizar las similitudes, se observaron los distintos tiempos de retención de las señales de cada muestra en estudio. En aquellas similares se procedió a comparar los espectros de masa correspondiente, para confirmar que se tratara del mismo compuesto.

FIGURA N°2: Esquema de extracción de *A. atacamensis*.

5.1.4. Estudio cromatográfico.

Para realizar el estudio de la AaRes y de sus fracciones, se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (ccf), utilizando placas de gel de sílice G-60 como adsorbente y distintos sistemas de disolventes como fase móvil, según la polaridad de las fracciones. Una vez desarrolladas las placas, fueron directamente visualizadas en una lámpara UV a 254 y 366 nm y posteriormente, reveladas con diferentes reactivos de coloración para observar e identificar los distintos grupos químicos.

Los reactivos reveladores utilizados fueron: NP/PEG para detectar la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos; p-anisaldehído sulfúrico (AS) para visualizar terpenos y tricloruro de aluminio (AlCl_3) para flavonoides y cumarinas (Wagner and Blandt, 1996).

5.1.5. Estudio espectroscópico

Los espectros (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , DEPT, HMBC y HMQC) que permitieron identificar las estructuras, se obtuvieron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) Bruker de 300/75 MHz, usando TMS como estándar interno y DMSO- d_6 como disolvente.

5.1.6. Fraccionamiento y aislamiento

5.1.6.1. Fraccionamiento del exudado resinoso de *A. atacamensis* Phil.

El fraccionamiento se realizó a partir de 64,3 g de AaRes obtenido de la maceración de las partes aéreas frescas en DCM, utilizando sucesivas columnas de gel de sílice rápida, usando mezclas de disolventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Del fraccionamiento de AaRes, se obtuvieron 5 fracciones: AaResA (2,5 g), AaResB (9 g), AaResC (7,8 g), AaResD (14 g) y AaResE (19 g) en orden creciente de polaridad. La fracción A sólo contenía grasa.

5.1.6.1. Fraccionamiento de la fracción AaResC.

La fracción C fue seleccionada para continuar con el estudio químico y farmacológico. Ésta fracción fraccionada por repetidas columnas de gel de sílice rápida, usando nuevamente mezclas de disolventes en polaridad creciente, aislándose 2 compuestos (FIGURA N°3 y TABLA N°3).

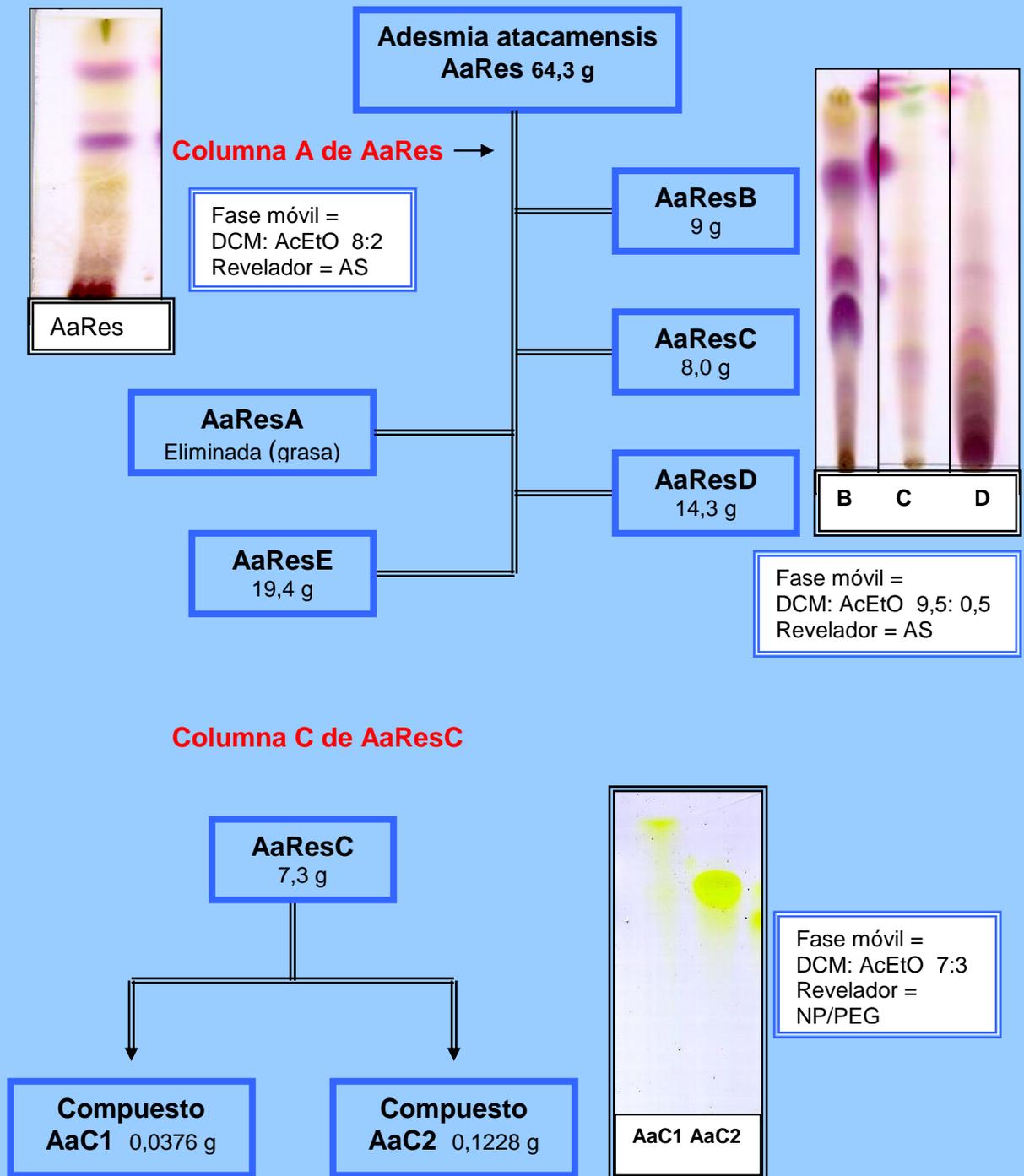
TABLA N°3: Resumen de las fracciones, compuestos aislado y mezcla de los solventes con que se eluyeron las columnas cromatográficas de AaRes.

Fracción y compuestos	Solvente elución y proporción	Nº fracciones	Cantidad (g)
Columna A de AaRes (64,3 g)			
AaResA	Hex 100	1	2,5
AaResB	Hex 100 y Hex:DCM 75:25 – 50:50	2-20	9,0
AaResC	Hex:DCM 30:70 y DCM 100	21-34	8,0
AaResD	DCM:AcEtO 75:25	35-36	14,3
AaResE	DCM:AcEtO 50:50 -AcEtO:MeOH 50:50 y MeOH 100	37-46	19,4
Columna C de AaResC (7,3 g)			
AaC1	DCM:AcetO 80:20	121	0,0376
AaC2	DCM:AcetO 80:20	122	0,1228

Aa C1: 3-O-metilgalangina

Aa C2: 3-O-metil-6-metoxicanferol

FIGURA N°3: Esquema de fraccionamiento de *A. atacamensis*.



5.2. Estudios farmacológicos *in vivo*

5.2.1. Animales de experimentación.

Para todos los ensayos se utilizaron 10 ratones de la cepa CF-1, no consanguíneos, de ambos sexos y de 20-25 g de peso. Los animales se mantuvieron en ayunas por 12 horas, agua *ad libitum* y a una temperatura de 18 a 20 °C, separando 8 para el grupo de muestra y 2 para el grupo de control.

5.2.2. Determinación de la actividad analgésica vía oral.

La actividad analgésica, se evaluó mediante el método de las contorsiones abdominales inducidas por la administración intraperitoneal de 0,5 mL de ácido acético al 0,6% en ratones. Se comenzó administrando al grupo de muestra el extracto en estudio (AaResB, AaResC, AaResD y AaResE), suspendido en una solución salina de goma arábica al 5% por vía oral, mediante una sonda de 4 french en una dosis de 200 mg/kg peso (0,4 mL/25 g), mientras que al grupo control sólo se les administró el vehículo goma arábica salina al 5%. Después de una hora a los 10 animales se les administró por vía intraperitoneal el ácido acético. Enseguida, cada animal fue colocado en un recipiente de vidrio individual y pasado 5 minutos se procedió a contabilizar las contorsiones durante 30 minutos (Delporte *et al.*,2003).

El efecto analgésico fue calculado comparando el número de contorsiones de los animales controles y los animales tratados, para ello, se determinó el porcentaje de dolor (%D) que corresponde a la razón entre la mediana de las contorsiones del grupo que recibió la muestra (Cm) y la del grupo control (Cc).

Por lo tanto, el porcentaje de analgesia (%EAn) está dado por la diferencia entre 100% y el %D, donde 100% corresponde al número de contorsiones del grupo de los animales controles.

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

$$\%EAn = 100 - \%D$$

El fármaco de referencia utilizado en el ensayo correspondió al naproxeno sódico, cuyo efecto es dosis dependiente dando un efecto máximo de 70% a la dosis de 12,5 mg/Kg (Cabezas, 1997; Delporte *et al.*, 2002).

5.2.3. Determinación de la actividad antiinflamatoria vía tópica.

La actividad antiinflamatoria, fue evaluada mediante el método de inducción de edema en oreja de ratón provocada por la aplicación tópica de los agentes inflamatorios AA (ácido araquidónico) y TPA (12-miristatoforbol, 13-acetato) en una dosis de 2 mg/20 μ L/oreja y 5 μ g/20 μ L/oreja, respectivamente. Ambos agentes al ser aplicados, producen una inflamación tópica aumentando la permeabilidad vascular y se diferencian en el tiempo en que producen la inflamación máxima (el AA a la hora, mientras que el TPA a las 4 horas) y en los mediadores químicos liberados (Lloret y Moreno, 1995).

A los animales controles se les aplicó tanto en la cara interna y externa de la oreja izquierda (OI) como en la derecha (OD), 10 μ L del vehículo a utilizar (acetona o etanol). A los ratones restantes, se les aplicó en la OD (10 μ L por cada cara de la oreja) la muestra en estudio, en una dosis de 0,5 mg/10 μ L. Las fracciones AaResB, AaResC, AaResD y AaEs se solubilizaron en acetona, mientras que AaResE y AaC1 en etanol, y AaC2 en acetona: etanol 1:1; en la OI el vehículo utilizado de la misma manera que se aplicó la muestra. La dosis de los compuestos AaC1 y AaC2, fueron equimolares al compuesto galangina (por su semejanza estructural), que presentó un efecto máximo 90,2% a la dosis de 1 mg/oreja (Pedrasa, 2004). Pasados 5 minutos, a los 10 animales se les aplicó en la OD el agente inflamatorio (AA o TPA) y en la OI 20 μ L de acetona.

Se esperó el tiempo necesario indicado anteriormente, para producir la inflamación máxima, luego se procedió al sacrificio de los animales mediante una dislocación cervical (Payá *et al.*, 1993) y a continuación se cortaron trozos de ambas orejas con un sacabocados de 6 mm de diámetro, los cuales se pesaron individualmente.

El efecto antiinflamatorio (EAI_T) se calculó comparando los pesos de los edemas de las orejas de los animales tratados y de los 16 animales controles (Lloret y Moreno, 1995; De Young *et al.*, 1989), mediante la siguiente fórmula:

$$\%EAI_T = \left(\frac{\Delta\langle ODc - OIc \rangle - \Delta\langle ODm - OIm \rangle}{\Delta\langle ODc - OIc \rangle} \right) \times 100$$

Donde:

$\Delta\langle ODc - OIc \rangle$ = Mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales controles.

$\Delta\langle ODm - OIm \rangle$ = Mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales con muestra.

El fármaco de referencia utilizado para el ensayo con AA fue nimesulida, cuyo efecto antiinflamatorio tópico máximo fue de 48,8% a la dosis de 1mg/ 20 μ L. Para el TPA, se utilizó indometacina cuyo efecto máximo fue de 81,8% a la dosis de 0,5 mg/ 20 μ L (Vidal, 2000).

La significancia de los efectos farmacológicos fue calculado por el método de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973) con un $p \leq 0,05$.

Se ensayó el AaEs sólo frente a TPA, debido a que la fracción AaResB presentó un efecto significativo frente a TPA, no así con AA.

5.3. Estudios farmacológicos *in vitro*.

5.3.1. Determinación de la actividad atrapadora del radical DPPH.

En este ensayo la actividad antioxidante se mide en términos de donar hidrógeno o de la capacidad atrapadora de radicales, usando el radical violeta 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH) que absorbe a 517 nm. La reducción y estabilización de este radical por los antioxidantes da lugar a la decoloración de éste, produciendo una disminución de la absorbancia la cual se puede medir a la longitud de onda antes mencionada.

Se utilizaron soluciones metanólicas de DPPH a una concentración de 20 mg/mL y de las muestras a ensayar a concentraciones de 200 a 1 µg/mL (de acuerdo a la actividad encontrada), en una proporción acorde al siguiente protocolo (TABLA N°4).

TABLA N°4: Protocolo ensayo de decoloración de DPPH.

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

Cada muestra fue ensayada en triplicado y una vez mezcladas las soluciones se dejó incubar en la oscuridad a baja temperatura por 5 minutos, para luego efectuar la lectura de la absorbancia (A).

El % de decoloración se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ decoloración} = 1 - \frac{(A \text{ muestra})}{(A \text{ blanco})} \times 100$$

El grado de decoloración indica la eficacia de los compuestos como atrapador de radical libre, por lo tanto, un % decoloración de 100 indica la máxima capacidad atrapadora de radicales libres y un valor cercano a 0 indica

una nula capacidad. Como compuesto de referencia de captador de radicales libres se utilizó la quercetina y catequina a concentraciones entre 1,25 a 7,5 $\mu\text{g/mL}$.

Los valores son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de tres determinaciones (Viturro *et al.*, 1999).

5.3.2. Determinación de la inhibición de la enzima xantina oxidasa.

La xantina oxidasa (XO) es una enzima que cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y ácido úrico, al mismo tiempo se produce la reducción de oxígeno generando los radicales libres. En la fase de reperfusión de un tejido previamente isquémico, esta enzima produce grandes cantidades de anión superóxido capaces de producir la lipoperoxidación de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares, lesionando a éstas.

Para evaluar la actividad de la xantina oxidasa, se midió la absorbancia (A) de su producto, el ácido úrico, en un espectrofotómetro UNICAM, el que presenta una máxima absorbancia a una λ de 290 nm.

Se utilizó una solución de xantina (X) 150 μM (Sigma), disolviendo 11,4 mg de (X) en 500 mL de agua bidestilada. También una solución buffer de fosfato de sodio pH 7,5 y una solución de XO, a una concentración de 0,006 U/mL, utilizando como solvente el buffer. Para finalizar el ensayo se utilizó HCl 1 N (Cos *et al.*, 1998). Los extractos se evaluaron a 100 $\mu\text{g/mL}$ y de acuerdo al siguiente protocolo (TABLA N°5).

TABLA N°5: Protocolo ensayo de xantina oxidasa.

Reactivos	Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubo D
Extracto	-	-	1 mL	1 mL
Agua bidestilada	1 mL	1 mL	-	-
Buffer	2,9 mL	3 mL	2,9 mL	3 mL
XO	0,1 mL	-	0,1 mL	-
X	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
HCl	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

El fármaco de referencia para este ensayo fue el alopurinol y el método estadístico utilizado fue Wilcoxon para datos independiente.

5.3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

5.3.3.1. Actividad antimicrobiana por el bioensayo en siembra radial.

Se realizó esta prueba presuntiva para determinar la actividad de los extractos en estudio (AaResB, AaResC, AaResD y AaResE) frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como también de hongos y levaduras.

Los extractos en estudio fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) e incorporados al medio de cultivo, en este caso agar fundido (TSA), alcanzando concentraciones finales en las placas de 100 y 200 µg/mL. Una vez solidificado el agar, se procedió a sembrar las distintas cepas bacterianas en estudio en posición radial sobre las placas de petri con asa de micrón esterilizada. Las placas controles contenían sólo el agar fundido sobre el cual se sembraron cada uno de las bacterias a ensayar. Posteriormente las placas fueron incubadas por 24 horas a 37°C y en posición invertida, luego se observó si hubo o no desarrollo de bacterias (Erazo *et al.*, 1997).

El estudio microbiológico se realizó con los siguientes microorganismos:

➤ Bacterias gram negativas:

Escherichia coli: ATCC 8739; *Pseudomonas aeruginosa*: ATCC 14207;
Salmonella aviatum: ATCC 12228.

➤ Bacterias gram positivos:

Staphylococcus aureus: ATCC 6538P; *Micrococcus flavus*: ATCC 10290;
Bacillus subtilis: ATCC 14884; *Klebsiella pneumoniae*: Muestra clínica.

➤ Hongos

Candida albicans: Muestra aislada en el Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

➤ Levadura

Saccharomyces cerevisiae : Muestra aislada en el Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

5.3.3.2. Actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía.

Este ensayo se basó en realizar cromatogramas por duplicado en gel de sílice 60 (Merck), en los cuales se sembraron las fracciones o compuestos aislados activos y desarrollados en la fase móvil más apropiada para cada muestra a ensayar (TABLA N°6). Un cromatograma se reveló con el reactivo de coloración y el otro se empleó en la prueba con los microorganismos. Se prepararon cultivos de los microorganismos a ensayar en los medios de cultivo líquido (TSB para bacterias y PDB para hongos). Luego las placas desarrolladas fueron esterilizadas bajo luz UV (254 nm) y puestas en una placa de petri para ser inoculadas con el medio de cultivo sólido fundido que contenía el microorganismo a ensayar (TSA para las bacterias y PDA para hongo y levadura). Después de un tiempo y temperatura de incubación específico para cada microorganismo, las cromatografías fueron reveladas con una sal de tetrazolium (MTT) para visualizar el halo de inhibición del crecimiento bacteriano debido a metabolitos activos presentes, a los cuales se les midió su Rf (Rahalison *et al.*, 1991; Erazo *et al.*, 1997).

TABLA N°6: Fases móviles de las cromatogramas de bioautografías.

Fracción o compuesto	Fase móvil
AaResB y AaResC	DCM : AcEtO (8:2)
AaResD y AaResE	AcEtO 100 %
AaC1 y AaC2	AcEtO : MeOH (9 :1)

5.3.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto aislado activo.

Para aquellos metabolitos que resultaron activos y si se disponía de cantidad, se evaluó la dosis mínima requerida del compuesto aislado para inhibir el crecimiento bacteriano.

El microorganismo a ensayar fue *Bacillus subtilis* inoculado en un set de 26 tubos que contenían concentraciones crecientes del compuesto AaC2 (3-O-metil-6-metoxicanferol) desde 100 a 350 µg/mL y medio de cultivo líquido TSB hasta completar un volumen de 2 mL. También se prepararon 3 tubos controles, uno de los cuales contenía la concentración máxima del compuesto a ensayar, el otro contenía sólo el medio de cultivo TSB y el último, contenía TSB y el inóculo del microorganismo. Después de la incubación, se examinó si hubo o no crecimiento del microorganismo en cada uno de los tubos, determinando la concentración inhibitoria mínima (CMI) para el compuesto aislado (Erazo *et al.*, 2002a).

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Análisis químico.

6.1.1. Fraccionamiento del exudado resinoso de *A. atacamensis* Phil.

Del fraccionamiento de AaRes se obtuvo 5 fracciones denominadas: AaResA (2,5 g), AaResB (9 g), AaResC (7,8 g), AaResD (14 g) y AaResE (19 g) (TABLA N°3 y FIGURA N°3)

La fracción AaResC fue sometida a sucesivas columnas de gel de sílice, aislándose los compuestos AaC1 y AaC2 (FIGURA N°3 y 6) que posteriormente fueron identificados a través de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , mono y bidimensional (HMBC y HMQC).

6.1.2. Obtención del aceite esencial y comparación con las distintas fracciones de AaRes.

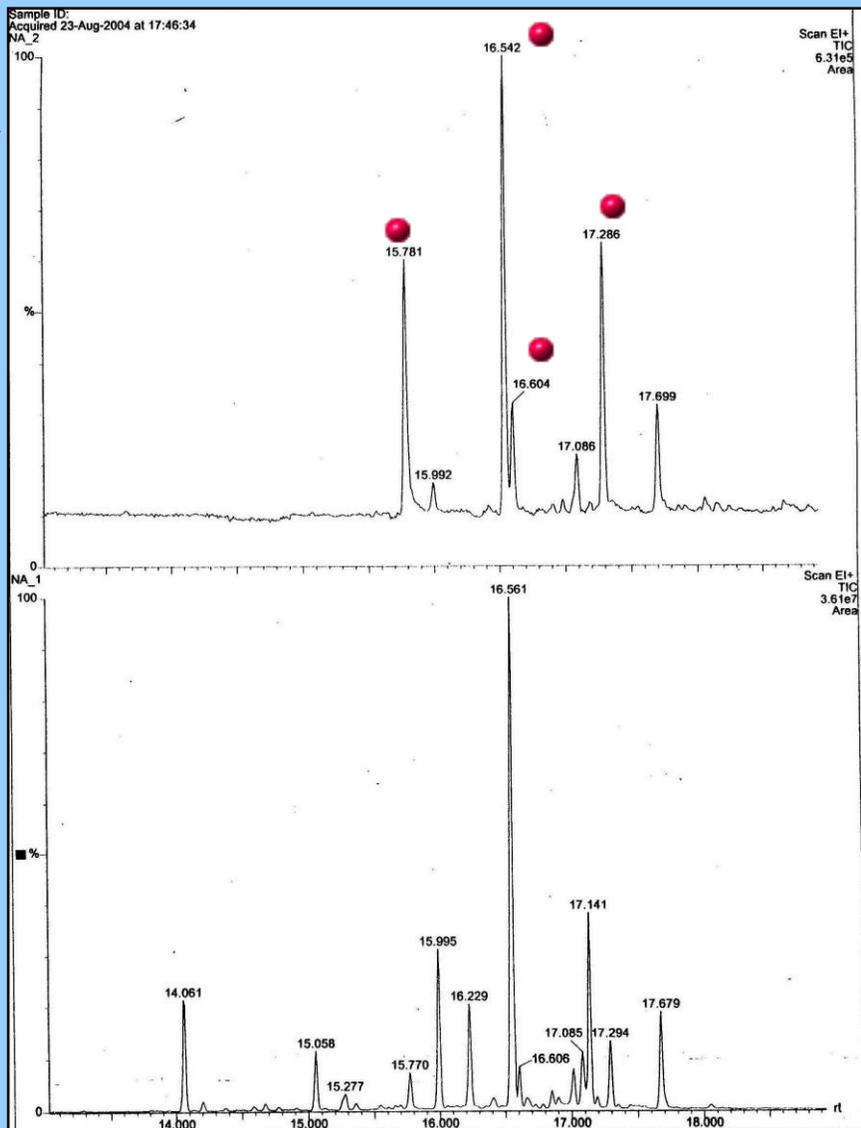
El rendimiento del aceite esencial (AaEs) obtenido a partir de la planta fresca fue de 0,72% v/p. El estudio químico comparativo de AaEs con las fracciones obtenidas de AaRes, permitió concluir la semejanza de éste con AaResB, especialmente en los derivados terpénicos presentes, observándose además la presencia de flavonoides en la fracción AaResB. En la FIGURA N°4, se confirma lo anterior lo que fue corroborado en el estudio comparativo de la cromatografía gaseosa, donde se destacan los compuestos que presenta AaResB que también son constituyentes (aunque en distinta proporción) de la esencia (AaEs) (FIGURA N°5).

FIGURA N°4:
c.c.f. comparativa de
AaResB con AaEs.



Fase móvil =
DCM: AcEtO 9,5:0,5
Revelador= AS

FIGURA N°5:
C. Gaseosa
comparativa de
AaResB (NA_2) y
AaEs (NA_1)



Las señales (tr) de compuestos que se encuentran en ambos extractos, y presentan el mismo espectro de masas, están marcados con un símbolo (●).

6.1.3. Identificación de los compuestos AaC1 y AaC2.

En la TABLA N°7 se muestran los resultados de ^{13}C -RMN y ^1H para AaC1 (3-O-metilgalangina) y en las FIGURAS N°7, 8, 9 y 10 se muestran los espectros. En la TABLA N°8 se observa el análisis espectroscópico para AaC2 (3-O-metil-6-metoxicanferol) y los respectivos espectros en las FIGURA N°11, 12, 13, 14, 15 y 16.

En el ^1H -RMN del compuesto AaC1, se puede apreciar la señal de un multiplete centrado a 7,59 ppm, integrado para tres protones correspondientes a los protones vecinos 3', 4' y 5' del anillo B que no se encuentra sustituido en ninguno de sus carbonos, y una segunda señal centrada a 8,01 ppm, e integrada para dos protones asignados a 2' y 6', protones estructuralmente no equivalentes debido a la presencia de un sustituyente (OCH_3) en el C-3 señal que asemeja a un doble doblete pero con valores de constante de desplazamiento levemente diferentes. Además a 6,23 y 6,47 ppm aparecen dos dobletes integrados para un protón cada uno con una J característica de una sustitución meta (1,42 Hz), asignados a los H-6 y H-8, y un singulete a 3,81 ppm integrado para tres protones del grupo CH_3 esterificando al OH del C-3.

TABLA N°7: Análisis de ^{13}C -RMN y ^1H -RMN del compuesto AaC1 aislado de la fracción AaResC.

N°C	Señales ^{13}C -RMN ppm	Tipo C	Señales ^1H -RMN ppm/ tipo de señal	J (Hz)
C-2	154,6	C		
C-3	138,2	C-OCH ₃		
C-4	177,6	C=O		
C-5	160,7	C-OH		
C-6	98,2	CH	6,233 d, 1H	1,42
C-7	163,8	C-OH		
C-8	93,3	C-H	6,47 d, 1H	1,41
C-9	156,0	C=C		
C-10	103,9	C=C		
C-1'	129,5	C		
C-2'	127,6	C-H	8,01dd, 2 H	6,39 y 2,21
C-3'	128,2	C-H	} 7,59 m, 3 H	
C-4'	130,5	C-H		
C-5'	128,2	C-H		
C-6'	127,6	C-H	8,01dd, 2 H	6,39 y 2,21
OCH ₃ (C-3)	59,5	OCH ₃	3,81 , 3 H	

El espectro de ^{13}C -RMN permite confirmar la insaturación del enlace C-2 y C-3 (154,6 y 138,2 ppm) propio de un derivado de flavonol. La presencia de un metiléter se observa en la señal a 59,47 ppm correspondiente al metilo unido al OH del C-3 y confirmada en el HMQC y HMBC, como también la presencia de C-OH (160,73 y 163,85 ppm). La esterificación del OH en 4', 5 o 7 produce un desplazamiento a más bajo campo (entre 55 y 56 ppm) (Harborne y Mabry, 1982).

Con los espectros de RMN se confirma la identificación de AaC1 como 3-O-metilgalangina.

TABLA N°8: Análisis de ^{13}C -RMN y ^1H -RMN del compuesto AaC2 aislado de la fracción AaResC.

N°C	δ (ppm)	Tipo C	Señales ^1H -RMN ppm/ tipo de señal9 integrac.	J (Hz)	HMBC	Canferol	4'-metileter Canferol	3,4'-dimetil quercetina
C-2	155,1	C			C2', C6'	146,8	146,4	155,3
C-3	136,7	C			OCH ₃ - C6	135,6	135,8	138,2
C-4	177,6	C			C8	175,9	175,8	178,1
C-5	151,8	C			C8	160,7	160,6	161,6
C-6	130,6	C			OH, OCH ₃ -C3	98,2	98,2	98,8
C-7	150,9	C			C8	163,9	163,9	164,5
C-8	93,4	C-H	6,55 s, 1H			93,5	93,4	93,8
C-9	156,7	C			OH, C8	156,2	156,2	156,6
C-10	104,3	C			OH, C8	103,3	103,1	104,5
C-1'	120,0	C			C3', C5'	121,7	123,2	122,6
C-2' y C-6'	129,6	C-H	7,94 d, 2 H	8,81	C6' C2'	129,5	126	115,2 120,5
C-3' y C-5'	115,1	C-H	6,94 d, 2 H	8,82	C4' C3'	115,4	114,4	146,6 111,8
C-4'	159,6	C			C2', C6', C3', C5'	159,2	160,6	
OH (C-7) (C-5) (C-4')			12,78 s? 10,27 s a					
OCH ₃ (C-6)	59,4	OCH ₃	3,76 s					
OCH ₃ (C-3)	59,1	OCH ₃	3,78 s					59,8
OCH ₃ (C-4')							55,3	55,7

En el ^1H -RMN del compuesto AaC2, se puede apreciar la señal característica de una para-sustitución, que corresponde a dos dobletes centrados a 6,94 y 7,94 ppm, con una constante de desplazamiento de 8,82 Hz (acoplamiento orto) e integradas cada una para dos protones correspondientes a 3, 5' y 2', 6' respectivamente. El singulete a 6,55 ppm indica la presencia de un solo protón en el anillo A (H-8), y los singuletes a 3,76 y 3,78 ppm integrados cada uno para 3 protones indican la presencia de dos grupos CH_3 de un metiléter (C-6 y C-3 respectivamente).

Igual que para AaC1 el espectro de ^{13}C -RMN permite confirmar la insaturación del enlace C-2 y 3 (155,1 y 136,7 ppm) propio de un derivado de flavonol. La presencia de dos grupos metiléter se observan en las señales a 59,1 y 59,4 ppm correspondientes al metilo unido al OH del C-3 y al C-6, confirmadas en el HMQC y HMBC, como también la presencia de C-OH (151,8; 150,9 y 159,6 ppm en C-5, 7 y 4' respectivamente (Harborne y Mabry, 1982).

Con los espectros de RMN se confirma la identificación de AaC2 como 3-O-metil-6-metoxicanferol.

FIGURA N°6: Estructuras químicas de los compuestos aislados.

Compuesto	Nombre	Rf/fase móvil	Estructura
Aa C1	3-O-metil-galangina	0,88 y 0,73 DCM:AcEtO (1:1) y (8:2)	
Aa C2	3-O-metil-6-metoxicanferol	0,79 y 0,39 DCM:AcEtO (1:1) y (8:2)	

FIGURA N°7: Espectro ^{13}C -RMN de 3-O-metilgalangina (AaC1)

*Disolvente utilizado: DMSO- d_6

*A 75 MHz

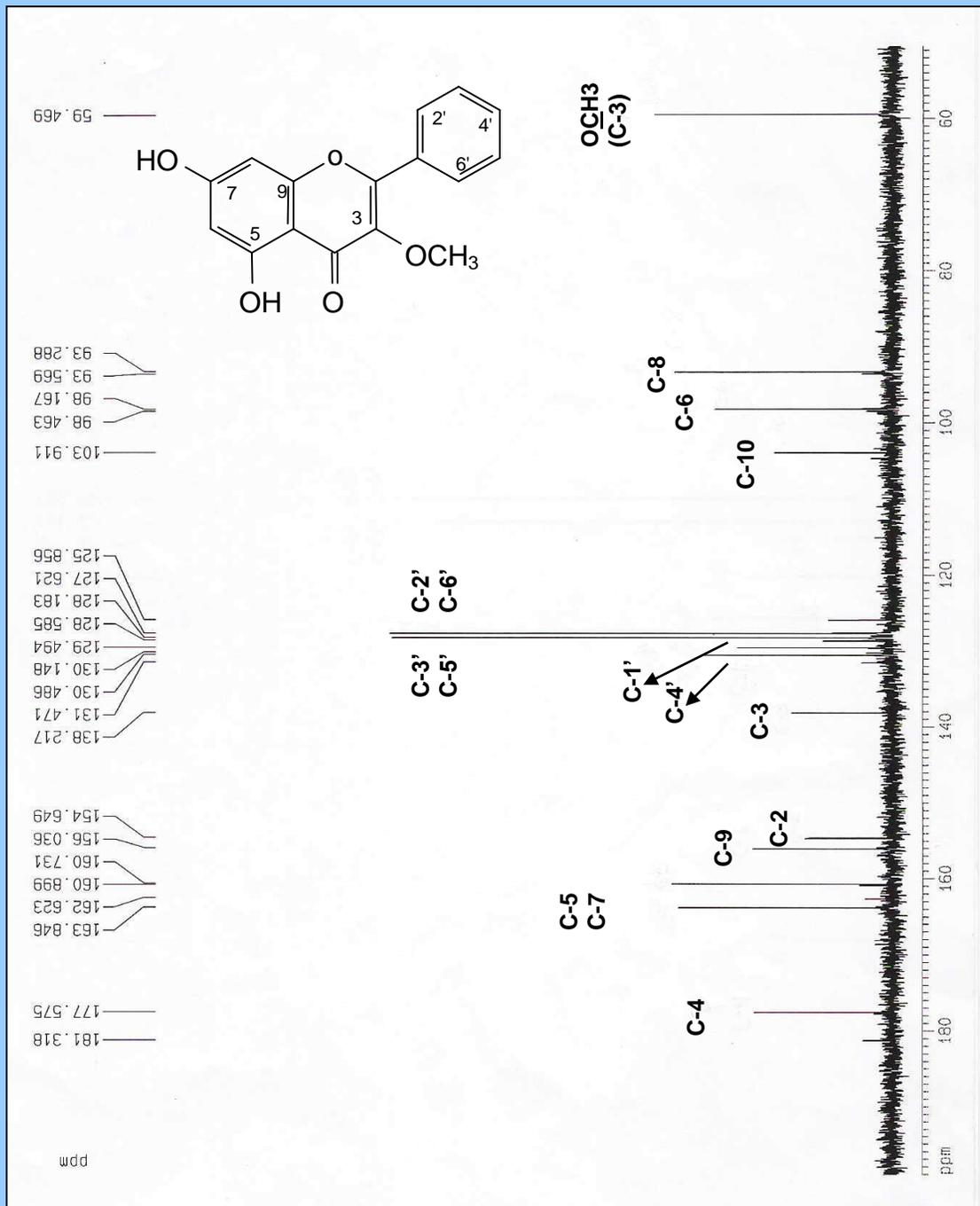


FIGURA N°8: Espectro ^{13}C -RMN de 3-O-metilgalangina (AaC1)

*Disolvente utilizado: DMSO-d_6

*A 75 MHz

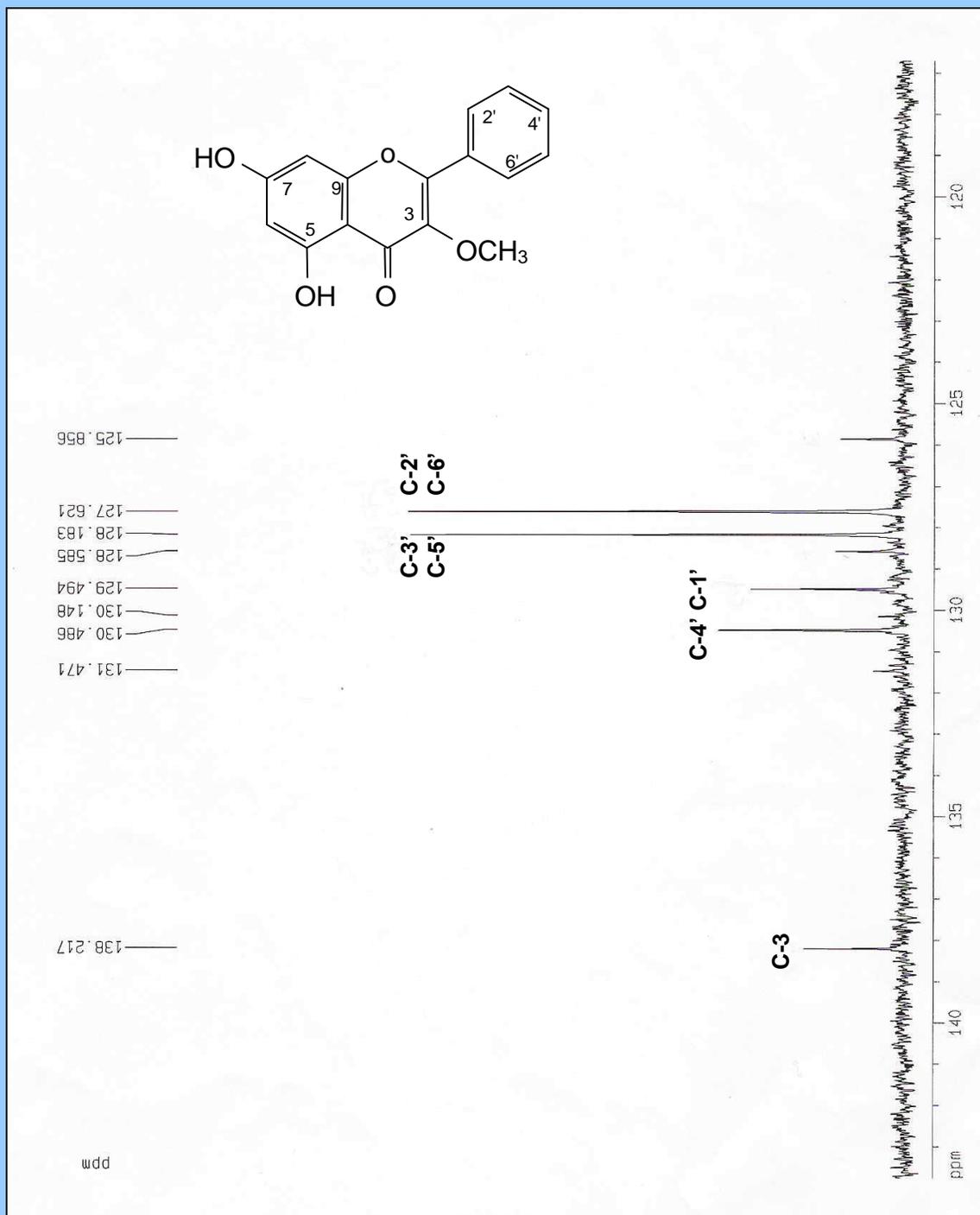


FIGURA N°9: Espectro ¹H-RMN de 3-O-metilgalangina (AaC1)

*Disolvente utilizado: DMSO-d₆

*A 300 MHz

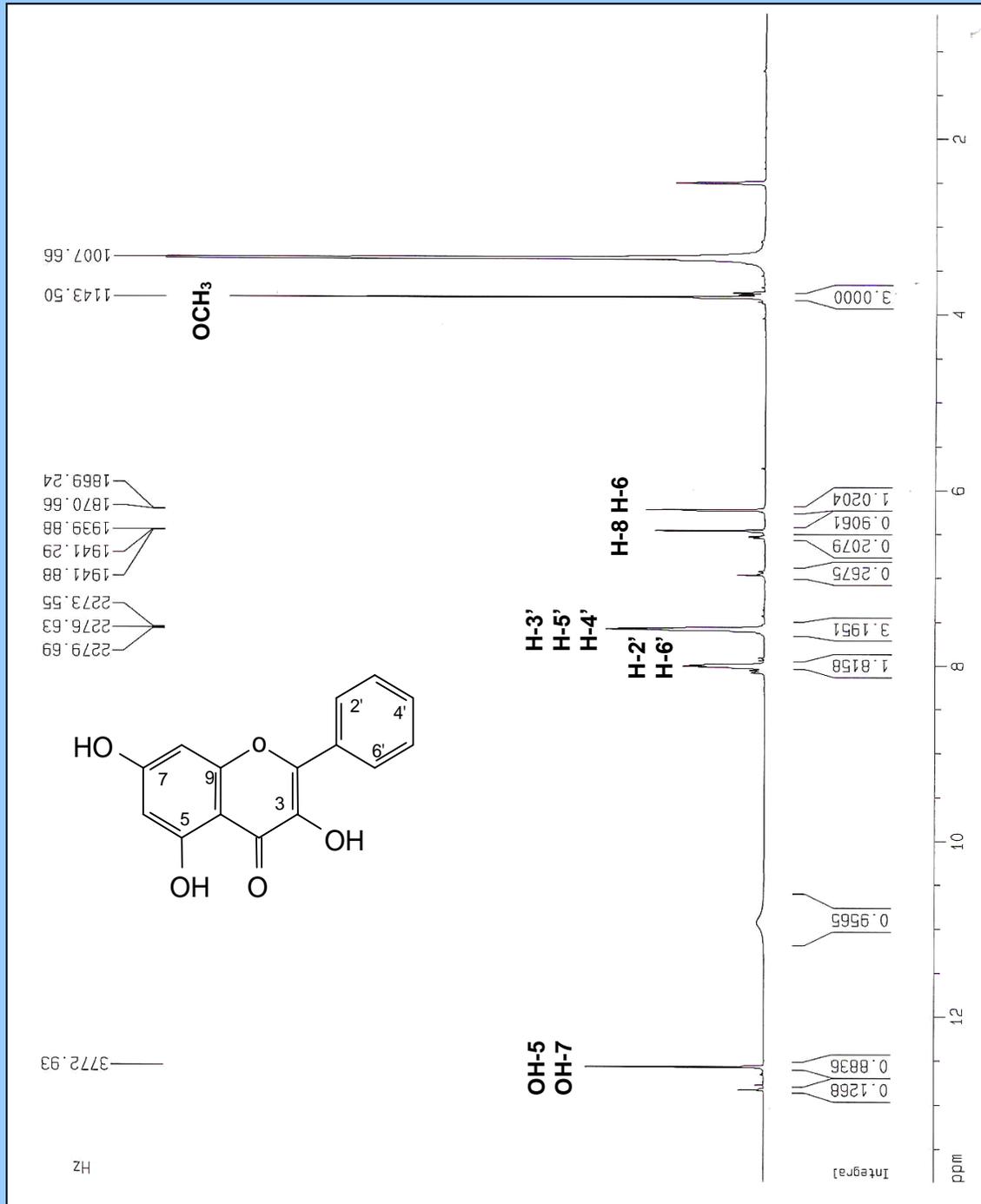


FIGURA N°10: Espectro ¹H-RMN de 3-O-metilgalangina (AaC1)

*Disolvente utilizado: DMSO-d₆

*A 300 MHz

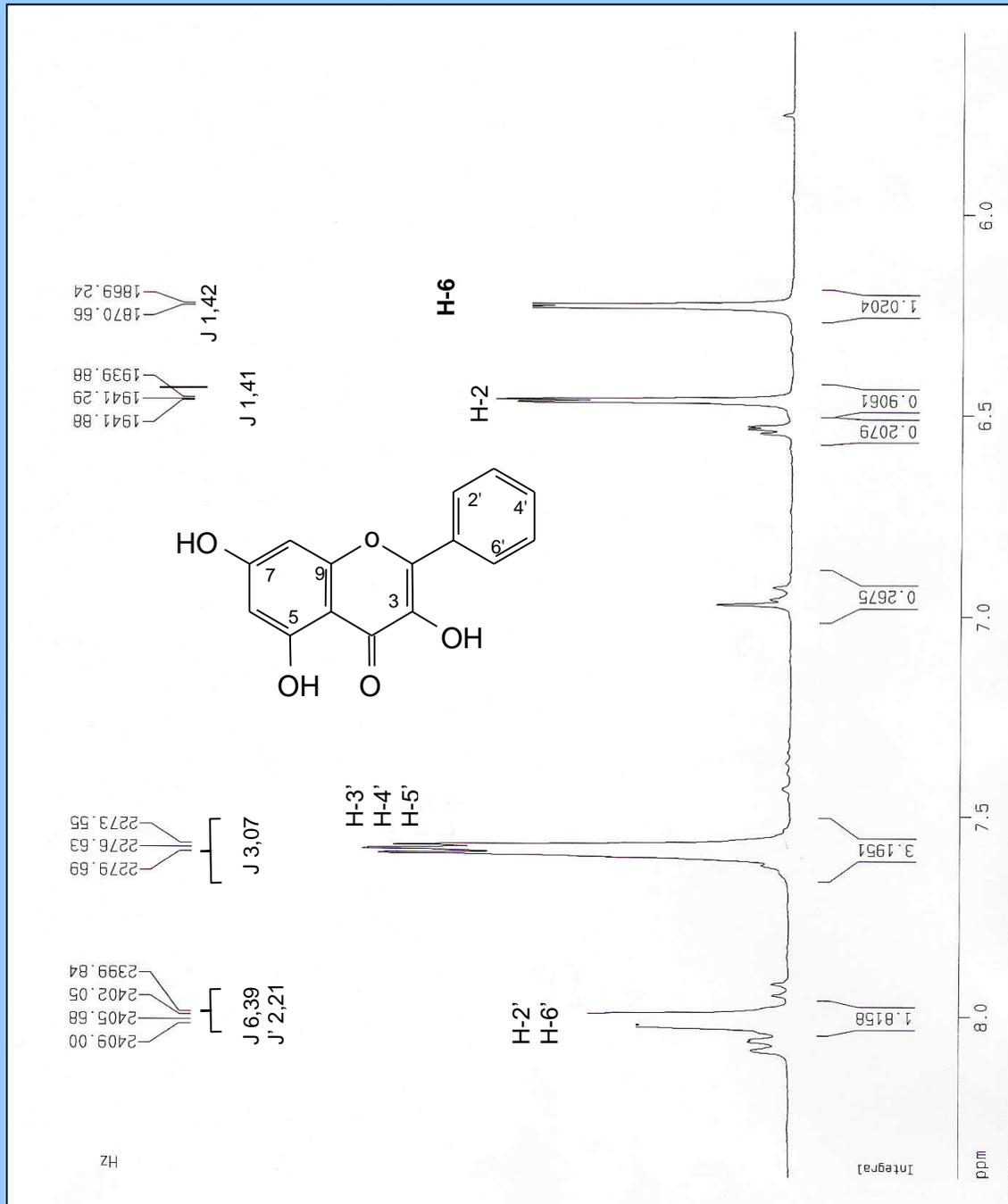


FIGURA N°11: Espectro ^{13}C -RMN de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2)

* Solvente: DMSO

* A 75 MHz

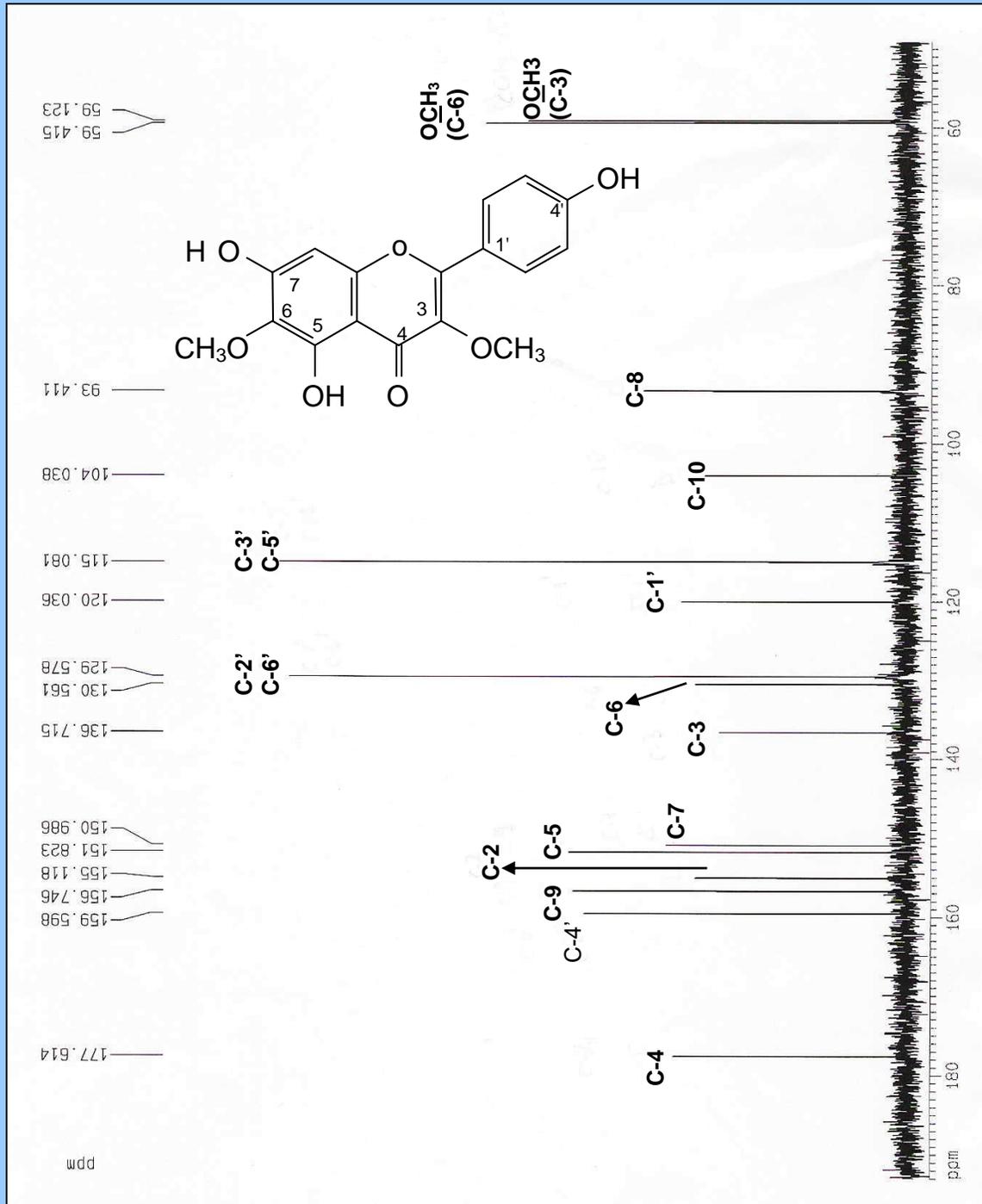


FIGURA N°12: Espectro ^{13}C -RMN de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2)

* Solvente: DMSO

* A 75 MHz

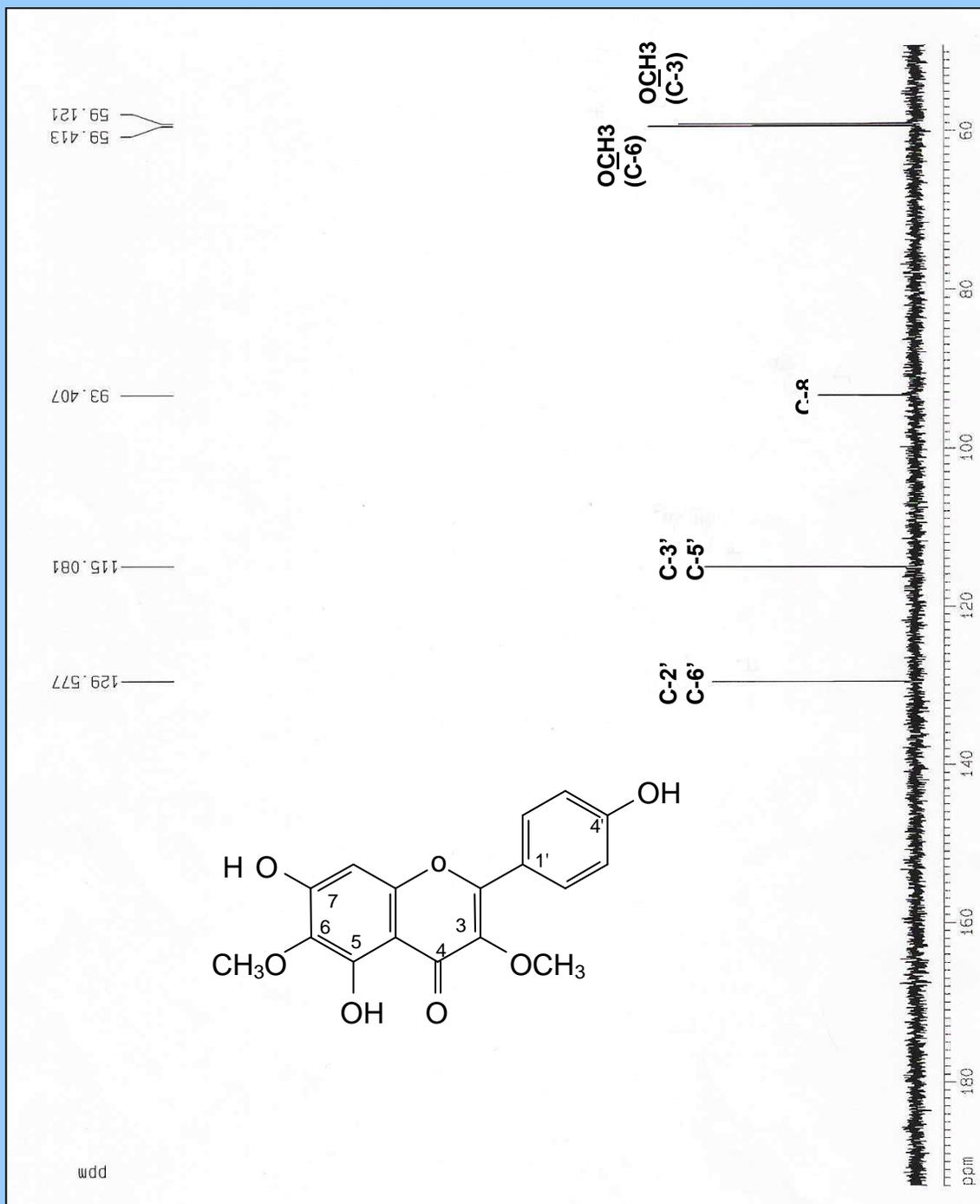


FIGURA N°13: Espectro ¹H-RMN de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2)

* Solvente: DMSO-d₆

* A 300 MHz

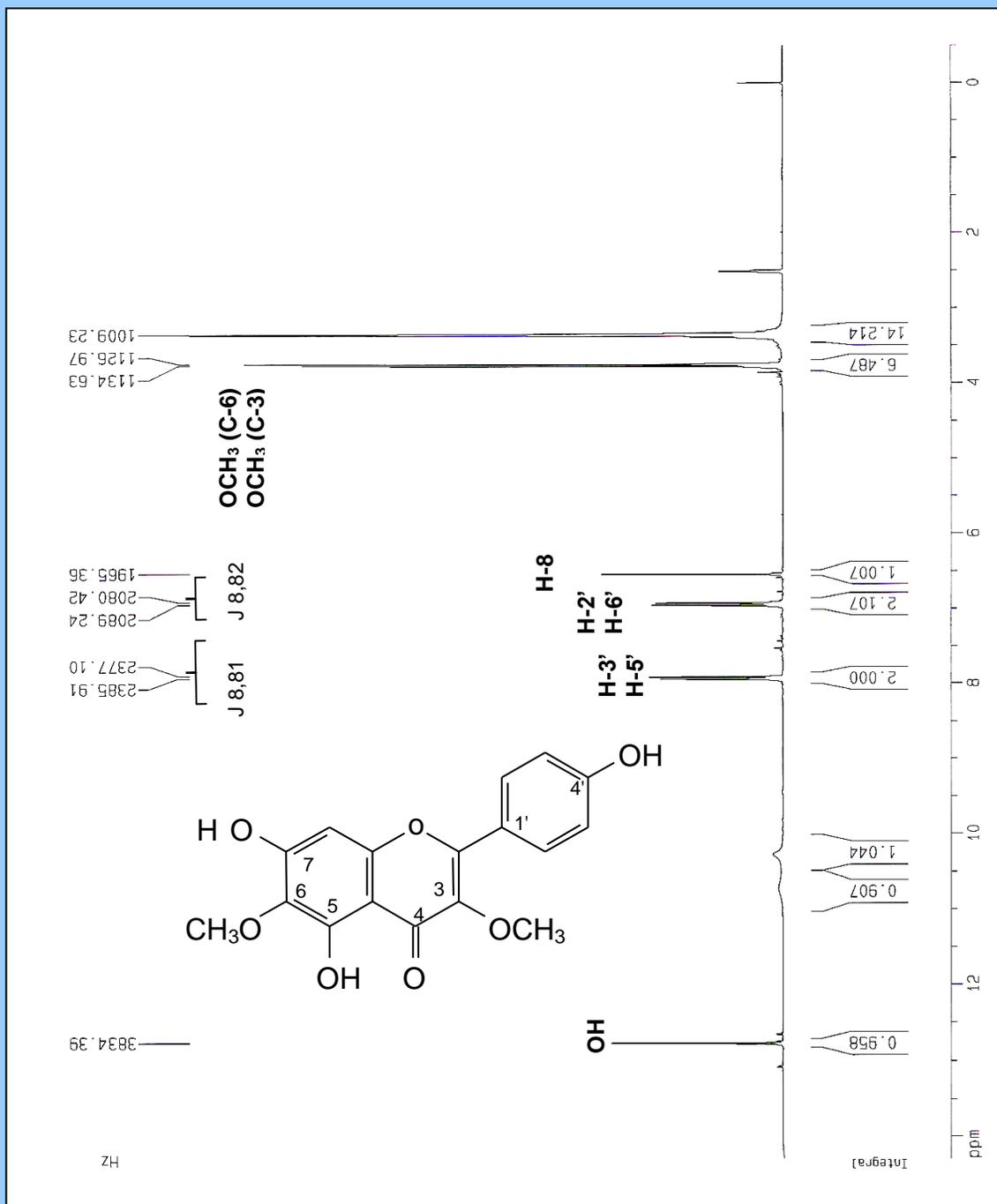


FIGURA N°14: Espectro HMBC de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2)

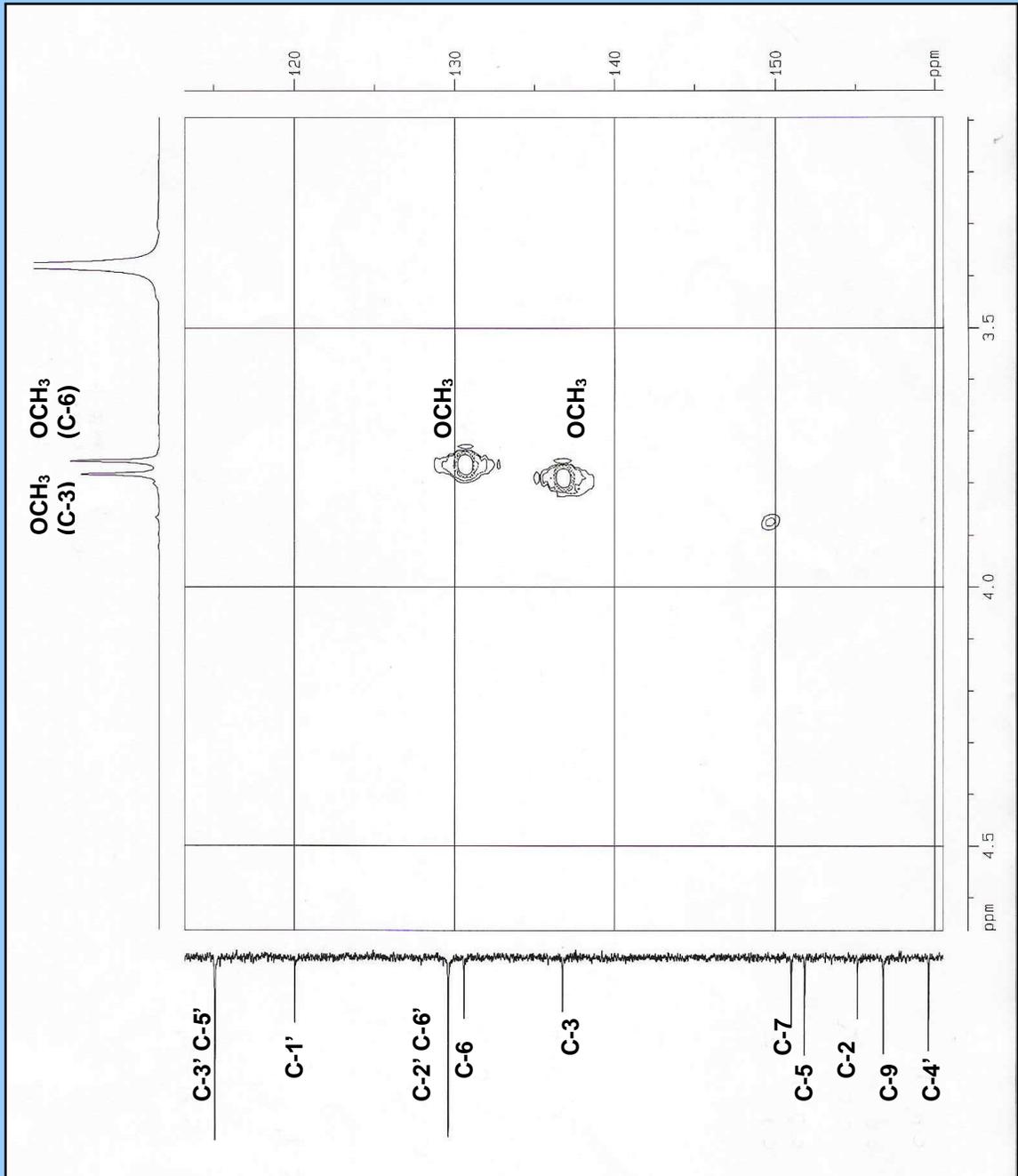


FIGURA N°15: Espectro HMBC de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2)

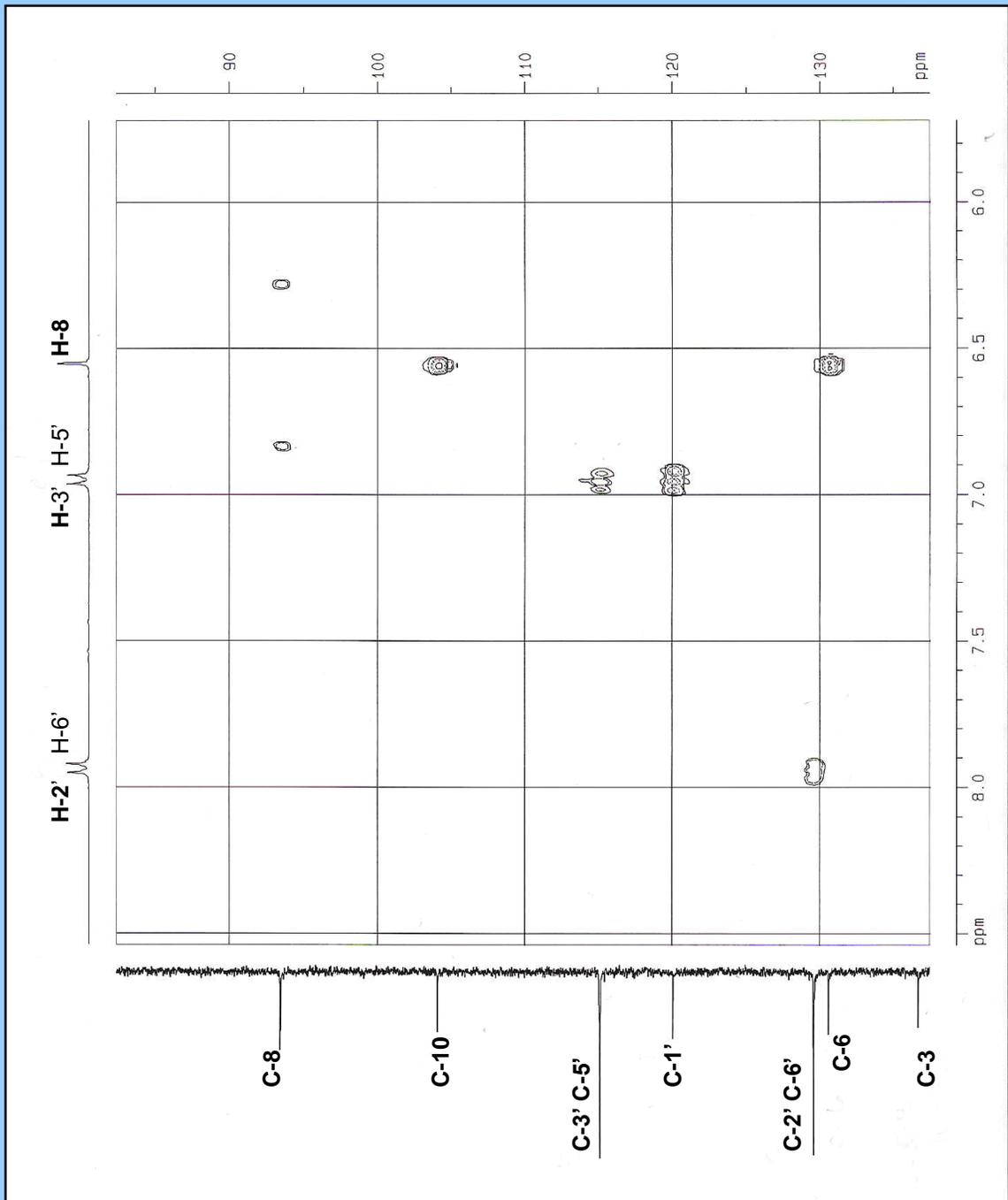
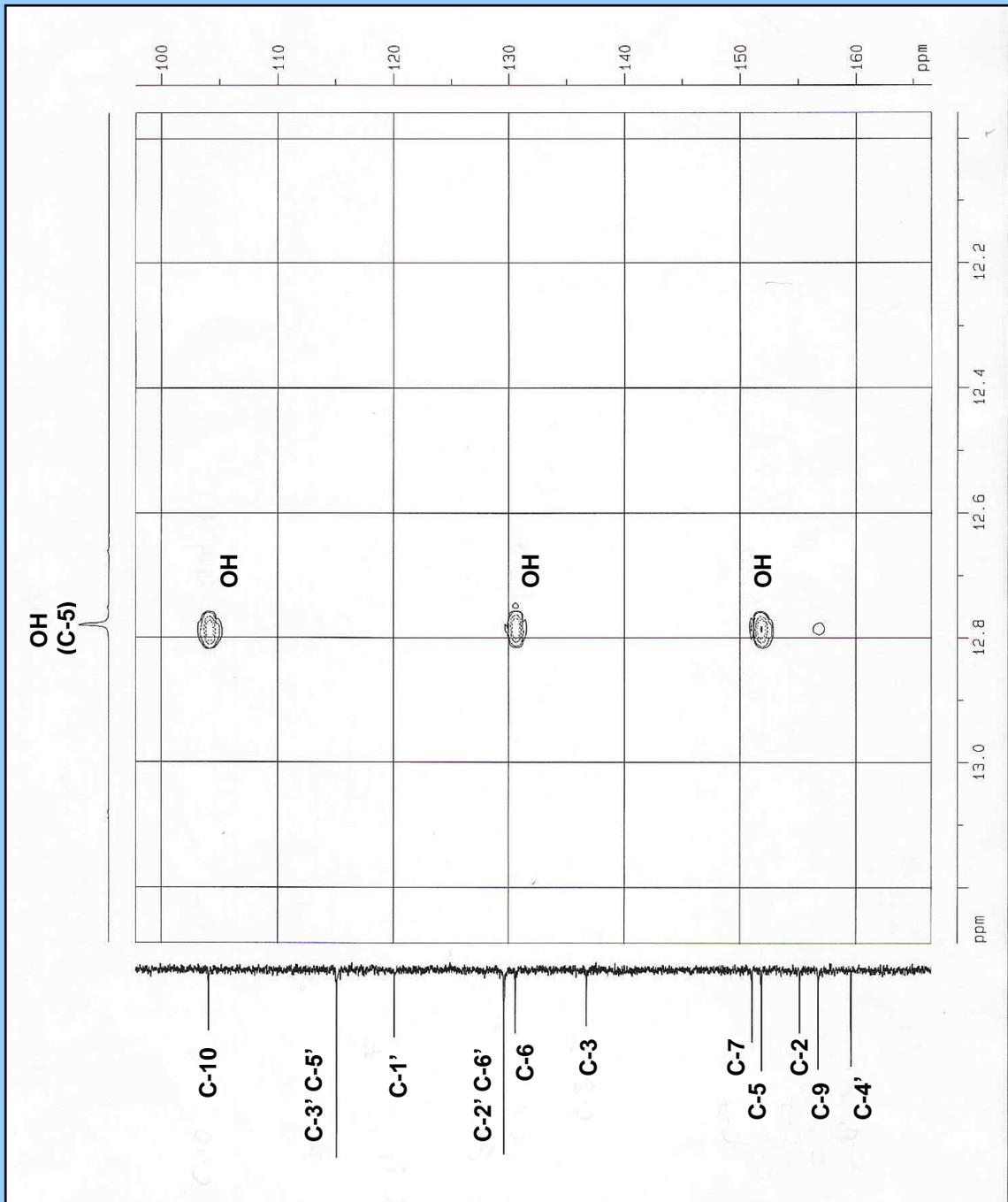


FIGURA N°16: Espectro HMBC de 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2)



6.2. Estudios farmacológicos in vivo.

6.2.1. Actividad analgésica vía oral.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la actividad analgésica de las fracciones de AaRes (TABLA N°9 y FIGURA N°17)

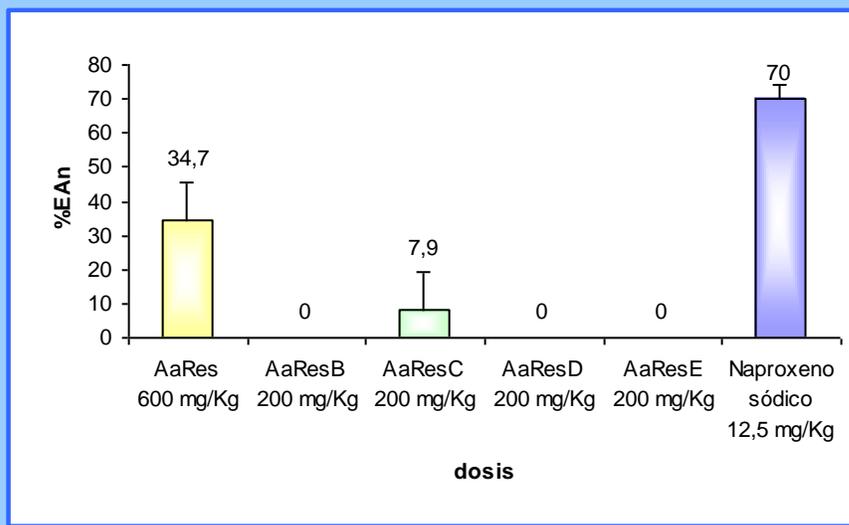
TABLA N°9: Resultados de la actividad analgésica de las fracciones de *A. atacamensis* y naproxeno sódico (NAP).

Muestra	N	dosis mg/Kg	Cm ± SEM	n	Cc ± SEM	%EAn ± SEM	p
AaRes	8	600	24,5± 4,2	16	37,5± 2,0	34,7± 11,1*	0,0183
AaResB	8	200	38,0 ± 5,0	16	38 ± 2,6	0	0,8165
AaresC	8	200	35,0 ± 4,3	16	7,9 ± 11,4	7,9 ± 11,4	0,4601
AaResD	8	200	46,5 ± 5,1	16	0 ± 13,4	0	0,9669
AaResE	8	200	40,0 ± 6,7	16	0 ± 17,6	0	0,6800
NAP	8	12,5	12,6 ± 1,8	16	42 ± 1,4	70,0 ± 4,3*	0,0000

*resultado significativo con un $p \leq 0,05$

Cm: mediana de las contorsiones del grupo muestra; Cc: mediana de las contorsiones del grupo control; SEM: error estándar medio; n: número de ratones utilizados; %EAn: porcentaje de analgesia.

FIGURA N°17: Comparación del efecto analgésico de las fracciones obtenidas de AaRes y naproxeno sódico.



Se puede apreciar que el exudado resinoso exhibió un 34,7 % de efecto, mientras que ninguna de las fracciones presentó un efecto significativo.

No se realizó la evaluación de los comuestos AaC1 y AaC2, debido a que su fracción de origen resultó ser inactiva.

Se pudo observar que la actividad farmacológica disminuyó al ser fraccionada la resina, al contrario de lo esperado, lo que podría deberse a la presencia de un efecto sinérgico de los componentes de las diferentes fracciones.

6.2.2. Actividad antiinflamatoria vía tópica frente a ácido araquidónico (AA).

En la TABLA N°10 y FIGURA N°18 y 19 se muestran los resultados de la actividad antiinflamatoria tópica inducida por AA de las fracciones de AaRes y de los compuestos aislados.

TABLA N°10: Resultados de la actividad antiinflamatoria vía tópica frente a AA de las fracciones obtenidas de AaRes, compuestos aislados desde AaResC y nimesulida (NIM).

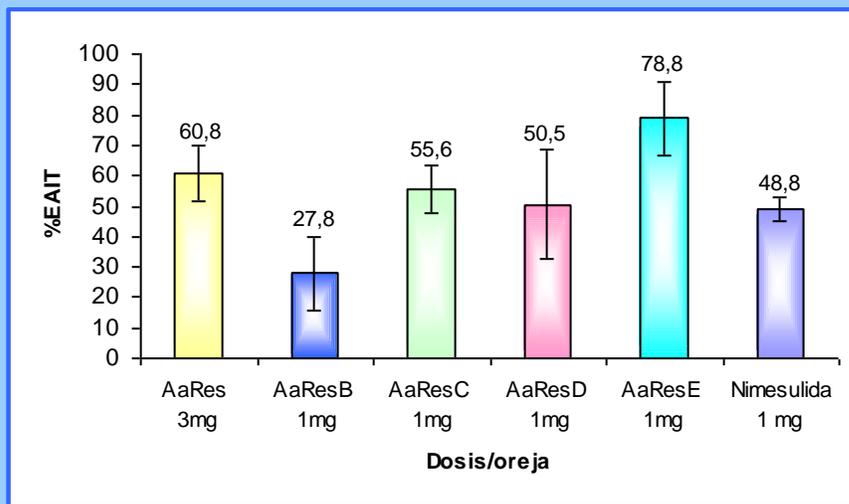
Muestra	n	Dosis mg/20 μ L	(Od-Oi)m \pm SEM	n	(Od-Oi)c \pm SEM	%EAI _T \pm SEM	p
AaRes	8	3	0,0038 \pm 0,0009	16	0,0097 \pm 0,0005	60,8 \pm 9,2*	0,0001
AaResB	8	1	0,0046 \pm 0,0008	16	0,0063 \pm 0,0004	27,8 \pm 12,0*	0,0186
AaResC	8	1	0,0028 \pm 0,0005	16	0,0063 \pm 0,0004	55,6 \pm 7,9*	0,0004
AaResD	8	1	0,0026 \pm 0,0003	16	0,0053 \pm 0,0006	50,5 \pm 18,1*	0,0160
AaResE	8	1	0,0013 \pm 0,0003	16	0,0059 \pm 0,0006	78,8 \pm 12,2*	0,0003
AaC1	8	0,53	0,0036 \pm 0,0009	16	0,0034 \pm 0,0005	0	0,6986
AaC2	8	0,61	0,0025 \pm 0,0005	16	0,0040 \pm 0,0007	36,7 \pm 12,6*	0,0100
NIM	8	1	0,0046 \pm 0,0007	16	0,0086 \pm 0,0005	48,8 \pm 4*	0,0100
Otro compuesto de referencia							
Galangina	8	0,5	0,0030 \pm 0,0006	16	0,0059 \pm 0,0005	49,2 \pm 10*	0,0232

*resultado significativo con un $p \leq 0,05$

(Od-Oi)m: mediana de la diferencia de peso entre oreja derecha (Od) y oreja izquierda (Oi) del grupo de la muestra.

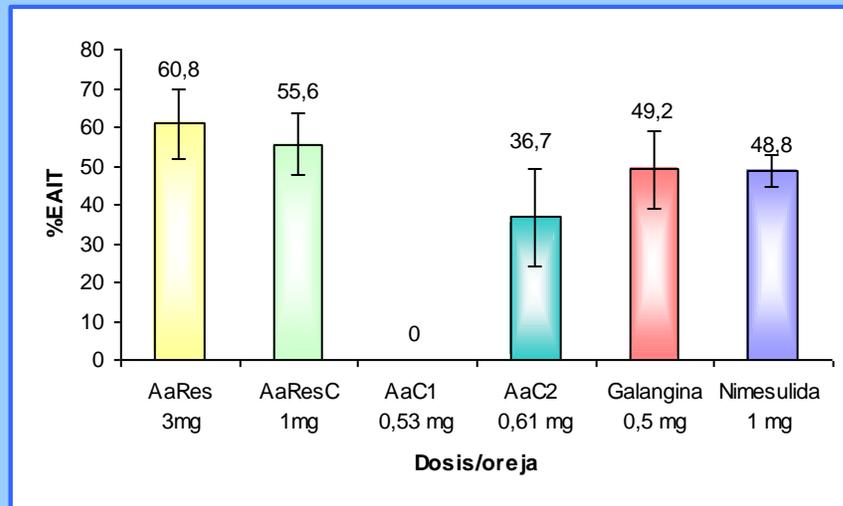
(Od-Oi)c: mediana de la diferencia de peso entre la oreja derecha e izquierda del grupo control; SEM: error estándar medio. n: número de ratones utilizados; %EAI_T: porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico.

FIGURA N°18: Comparación del efecto antiinflamatorio tópico frente a AA (%EAIT) de fracciones obtenidas de AaRes y nimesulida (NIM).



De los resultados anteriormente mostrados, se puede apreciar que la fracción AaResE presentó el mayor efecto antiinflamatorio (78,8%), superando al del extracto (60,8%) y al del fármaco de referencia, nimesulida (48,8%). Las fracciones AaResC (55,6%) y AaResD (50,5%) presentaron efectos similares entre ellos y cercano al de la nimesulida, pero inferior al del exudado resinoso. La fracción AaResB (27,8%) fue menos activa.

FIGURA N°19: Comparación del efecto antiinflamatorio tópico frente a AA (%EAIT) de AaRes, AaResC, compuestos aislados de AaResC, galangina y nimesulida (NIM).



El compuesto 3-O-metilgalangina (AaC1) no mostró actividad, mientras que el compuesto 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2) presentó un 36,7% de efecto, pero éste fue menor al efecto observado tanto para AaRes, AaResC, como también para la galangina (49,2%) y para el fármaco de referencia (48,8%).

6.2.3. Actividad antiinflamatoria tópica frente a 12-miristato 13-acetato forbol (TPA).

En la TABLA N°11 y FIGURA N°20 y 21 se resumen los resultados de la actividad antiinflamatoria inducida por TPA de las fracciones de AaRes, compuestos aislados y el fármaco de referencia indometacina.

TABLA N°11: Resultados de la actividad antiinflamatoria vía tópica frente a TPA de las fracciones obtenidas de AaRes, compuestos aislados desde AaResC, aceite esencial (AaEs) e indometacina (IND).

Muestra	n	Dosis mg/20 μ L	(Od-Oi) _m \pm SEM	n	(Od-Oi) _c \pm SEM	%EAI _T \pm SEM	p
AaRes	8	3	0,0007 \pm 0,0006	16	0,0092 \pm 0,0008	92,4 \pm 6,3*	0,0000
AaResB	8	1	0,0012 \pm 0,0006	16	0,0053 \pm 0,0009	77,4 \pm 11,3*	0,0007
AaResC	8	1	0,0008 \pm 0,0006	16	0,0053 \pm 0,0009	85,8 \pm 11,3*	0,0013
AaResD	8	1	0,0006 \pm 0,0002	16	0,0044 \pm 0,0009	86,4 \pm 3,4*	0,0016
AaResE	8	1	0,0003 \pm 0,0002	16	0,0043 \pm 0,0008	94,1 \pm 5,0*	0,0003
AaC1	8	1,05	0,0015 \pm 0,0005	16	0,0082 \pm 0,0008	81,7 \pm 5,8*	0,0005
AaC2	8	1,22	0,0022 \pm 0,0011	16	0,0080 \pm 0,0008	73,1 \pm 14,2*	0,0066
AaEs	8	1	0,0095 \pm 0,0010	16	0,0049 \pm 0,0008	0	0,9968
IND	8	0,5	0,0007 \pm 0,0003	16	0,0099 \pm 0,0011	92,9 \pm 3,2*	0,0003
Otro compuesto de referencia							
Galangina	8	1	0,0008 \pm 0,0007	16	0,0082 \pm 0,0008	90,2 \pm 8,4*	0,0001

*resultado significativo con un $p \leq 0,05$

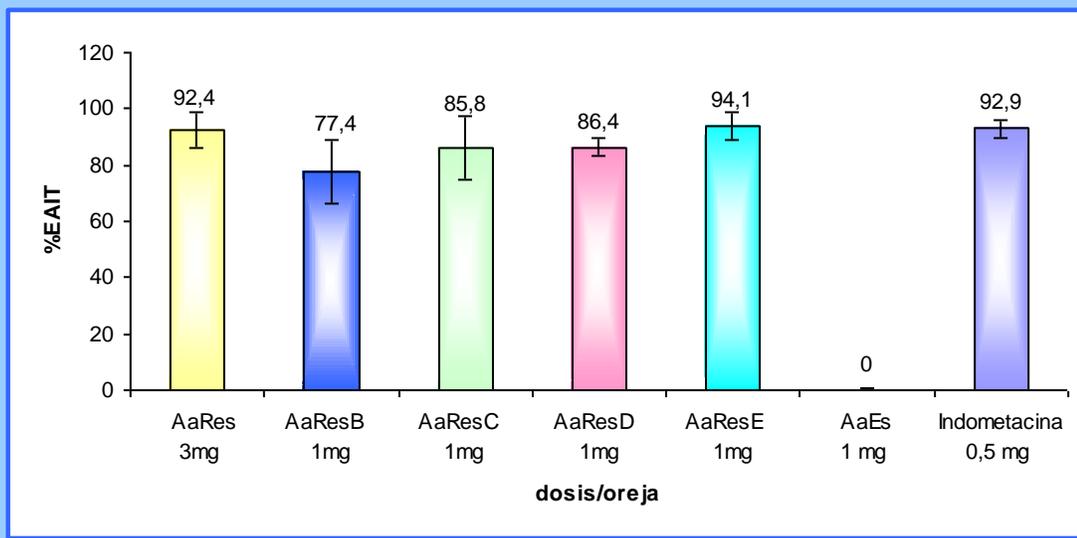
(Od-Oi)_m: mediana de la diferencia de peso entre oreja derecha (Od) y oreja izquierda (Oi) del grupo de la muestra.

(Od-Oi)_c: mediana de la diferencia de peso entre la oreja derecha e izquierda del grupo control; SEM: error estándar medio.

n: número de ratones utilizados; %EAI_T: porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico.

AaC1: 3-O-metilgalangina; AaC2: 3-O-metil-6-metoxicanferol; AaEs: aceite esencial de A. atacamensis

FIGURA N°20: Comparación del efecto antiinflamatorio tópico frente a TPA (%EAIT) de las fracciones obtenidas de AaRes e indometacina (IND).

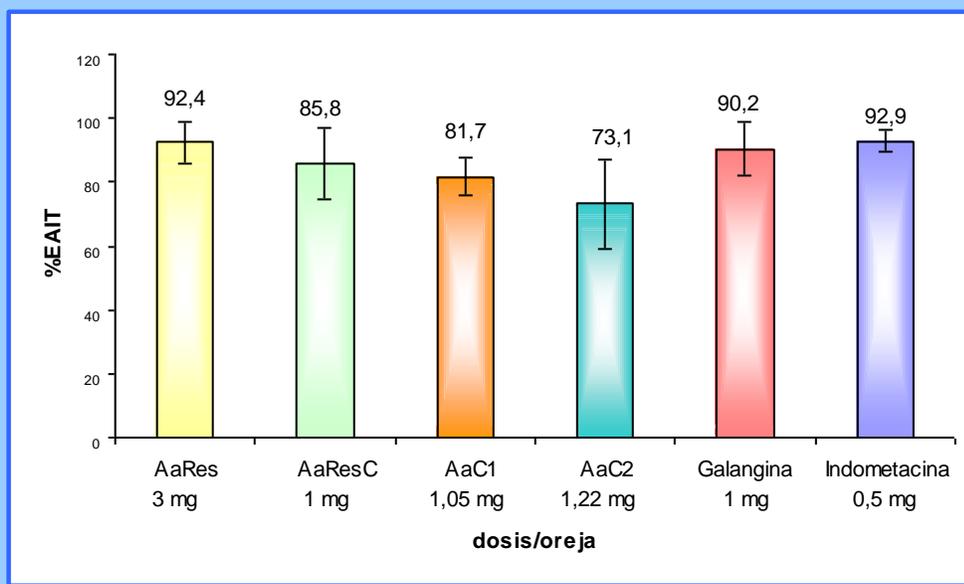


De la tabla y gráfico se desprende que las fracciones AaResB (77,4%), AaResC (85,8%), AaResD (86,4%) y AaResE (94,1%) exhibieron un efecto similar entre ellas, además la fracción AaResE fue la más activa con un efecto cercano al del exudado y superior al del fármaco de referencia.

El aceite esencial (AaEs), no presentó efecto antiinflamatorio. En general los aceites esenciales están constituidos por compuestos terpénicos, los que más bien podrían ser irritantes; a diferencia de la fracción AaResB, que además, de algunos de los terpenos presentes en el aceite esencial, también posee flavonoides; los que fueron visualizados en ccf.

Si bien la fracción AaResE resultó ser la más activa como antiinflamatoria en ambos ensayos, se decidió continuar con el fraccionamiento de AaResC por los efectos encontrados y el tipo de metabolitos observados en ccf.

FIGURA N°21: Comparación del efecto antiinflamatorio tópico frente a TPA (%EAIT) de AaRes, AaResC, los compuestos aislados de AaResC: AaC1 y AaC2, galangina e indometacina (IND).



Ambos compuestos aislados de la fracción AaResC: AaC1 y AaC2 presentaron efecto antiinflamatorio, levemente inferior al del fármaco de referencia, indometacina (92,9%).

En un interés por evaluar las variaciones en las actividades farmacológicas de derivados de flavonoles de estructuras similares, con diferencia en algunos de sus sustituyentes se comparó la actividad de AaC1, AaC2 y galangina a dosis equimolares. Se pudo concluir que la esterificación del OH en el C-3, pudiendo aumentar la lipofilicidad de la molécula y por ende la penetración dérmica, resultó una sustitución desfavorable en la actividad antiinflamatoria cuando ésta fue inducida por AA. Por otra parte, la influencia de un grupo OH en el anillo B, de un grupo metoxilo en el C-6 más la esterificación del OH en 3 resultó aún más desfavorable para la actividad antiinflamatoria de la molécula.

A diferencia de lo anterior, cuando la inflamación fue inducida por TPA, donde la liberación de los mediadores de la inflamación pareciera ocurrir en mayor grado vía LO, además de inducir la activación de la iNOS y del factor nuclear kappa-B (NF κ -B), ambos compuestos aislados de AaResC resultaron ser levemente menos activos que la galangina (90,2%) siendo más activo AaC1 (81,7%) que AaC2 (73,1%). Se podría concluir que en este caso la influencia de los sustituyentes (metoxilo en C-3 y C-6, OH en C-4') es mínima en relación a la pérdida de actividad.

De la bibliografía consultada se ha podido concluir que la actividad antiinflamatoria de un flavonoide disminuye cuando el OH del C-7 se encuentra glicosilado o también cuando el C-6 está metoxilado (Gil *et al.*, 1994), siendo esto último lo que ocurre en AaC2.

Los flavonoides ejercen efectos antiinflamatorios a través de múltiples mecanismos, uno de los cuales es inhibir la generación de eicosanoides derivados de las vías enzimáticas COX o LO. Según lo descrito en literatura existe una relación estructura-actividad antiinflamatoria de los flavonoides donde la presencia del doble enlace en C-2 y 3, además de los OH en las posiciones 5 y 7 en el anillo A y en las posiciones 3' y 4' del anillo B favorecerían la actividad inhibitoria, mientras que la presencia de un sustituyente hidroxilo en meta (anillo B) anularía la actividad (Kim *et al.*, 1999). En ambos compuestos aislados de AaResC de *A. atacamensis*, encontramos un doble enlace y la presencia de los grupos hidroxilo en anillo A, sin embargo, este tipo de sustituyente en el anillo B sólo lo presenta AaC2, el cual además se encuentra metoxilado en el anillo A (C-6), lo que, por los resultados obtenidos, produciría una disminución de su capacidad antiinflamatoria.

La selectividad de un flavonoide para inhibir la 5-LO o COX depende de los sustituyentes presentes en la estructura, es así como la presencia de OH 3'-4' (anillo B) y además sustituyentes hidroxilicos en el resto de la molécula los

hace más potentes y selectivos inhibidores de la 5-LO y, al mismo tiempo la ausencia de estos sustituyentes la hace más activa contra la COX y menos, frente a 5-LO (Moroney et al., 1988). En los flavonoles la relación estructura-actividad para inhibir la 5-LO no está relacionada con el hidroxilo del C-3. La presencia de grupos metoxilos, es compatible con una alta actividad si éstos están en el anillo A, pero no si se modifica el grupo diol del anillo B. Un OH en el C-2' y la glicosilación reducen considerablemente la potencia, independiente de la estructura básica del flavonoide (Moroney *et al.*, 1988).

Si consideramos los estudios realizados por algunos autores que concluyen que en la inducción de la inflamación por AA predominaría la vía de la COX, y en la inducción por TPA predominaría la vía de la 5-LO (Lloret y Moreno, 1995), aunque esta vía también involucra además la activación de la iNOS y del factor nuclear kappa-B (NFκ-B), como ya mencionamos, concordaría con la actividad observada para AaC2: 3-O-metil-6-metoxicanferol que resultó menor a la del compuesto AaC1: 3-O-metilgalangina y mucho menor que la actividad de galangina.

De acuerdo a la literatura, el canferol presenta actividad antiinflamatoria, cuyo mecanismo de acción se especula sea vía fosfolipasa (PLA₂) (Gil *et al.*, 1993). El compuesto AaC2 a diferencia de éste presenta dos grupos metoxilos, C-3 y C-6, por lo que se podría concluir que, de acuerdo a la estructura base, estas sustituciones producen una disminución de su actividad.

6.3. Estudios *in vitro*.

6.3.1. Evaluación de la capacidad antioxidante.

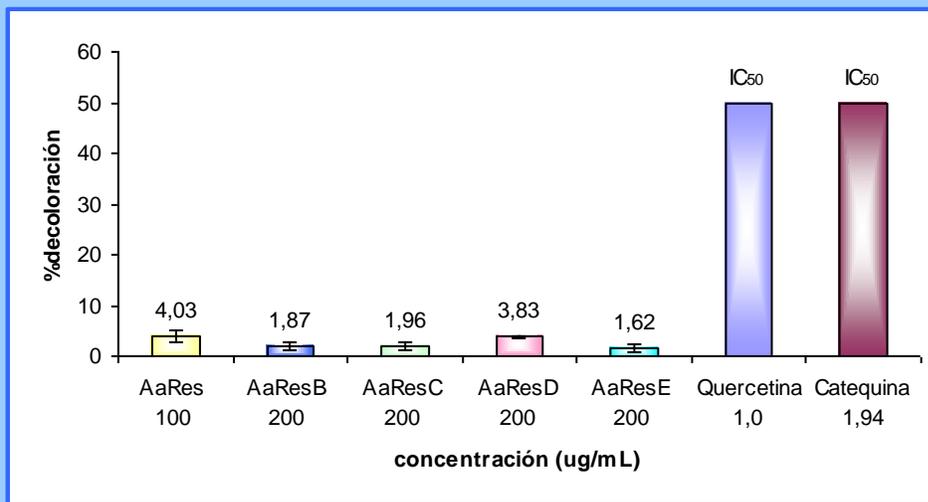
6.3.1.1. Actividad atrapadora del radical DPPH.

En las tablas y gráficos que se observan más adelante (TABLA N°12 y FIGURA N°22 y 23), se presentan los resultados de la actividad capturadora de radicales libres de las fracciones de AaRes, los compuestos aislados y además quercetina y catequina.

TABLA N°12: Resultados de la actividad atrapadora de radicales libres de las fracciones obtenidas desde AaRes y compuestos aislados desde AaResC y quercetina.

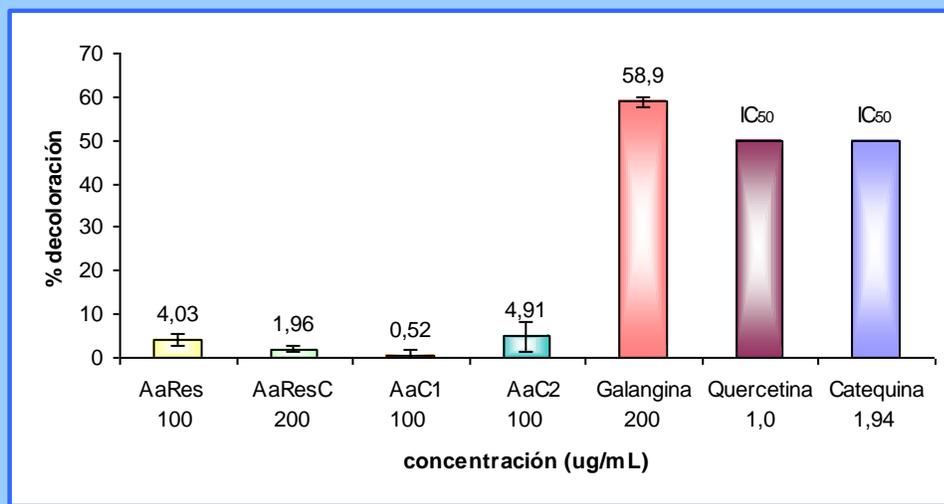
Fracción	Concentración (µg/mL)	Concentración µM		% decoloración	Desviación estándar
		Inicial	final		
AaRes	100	--	--	4,03	1,25
AaResB	200	--	--	1,87	0,78
AaResC	200	--	--	1,96	0,64
AaResD	200	--	--	3,83	0,25
AaResE	200	--	--	1,62	0,82
AaC1	100	368	123	0,52	1,26
AaC2	100	305	102	4,91	3,38
Quercetina	1,0	3,31	1,10	50	0,89
Catequina	1,94	6,68	2,23	50	3,16
Otro compuesto de referencia					
Galangina	200	844	281	58,9	1,11

FIGURA N°22: Comparación de la actividad atrapadora de radicales libres de las fracciones obtenidas de AaRes con quercetina y catequina.



Se observa que tanto el exudado resinoso como las fracciones obtenidas de éste, poseen una escasa actividad capturadora de radicales libres comparado con los patrones de quercetina y catequina que presentaron un IC₅₀ de 1,0 y 1,94 µg/mL respectivamente.

FIGURA N°23: Comparación de la actividad atrapadora de radicales libres de AaRes, AaResC, los compuestos aislados con galangina, quercetina y catequina.



Del gráfico se desprende que los compuestos aislados de la fracción AaResC (AaC1 y AaC2) también presentaron una escasa actividad atrapadora de radicales libres al compararla con catequina (68,8%), quercetina (56,27%) y galangina (58,9 %, Pedrasa, 2004).

Esto se demuestra con los resultados recientemente mencionados donde el compuesto 3-O-metilgalangina (AaC1) no presentó actividad (0,52%) en relación a la galangina (58,9%). Asimismo para el compuesto 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2) con una escasa actividad de 4,91%. Esto era esperado, ya que ambas moléculas poseen metilados los OH del C-3 y además el compuesto AaC2 presenta un metoxilo en el C-6. Los flavonoides han demostrado ser eficientes antioxidantes por una combinación de sus propiedades quelantes de metales (Pérez, 2003) y su capacidad captadora de radicales oxigenados, debido a la rápida donación de un átomo de hidrógeno al radical. Existe una relación entre el número y ubicación de los OH fenólicos en la

eficacia antirradical (Amié *et al.*, 2003). Es así, que los requerimientos estructurales de un flavonoides para ser considerados un efectivo atrapador de radicales son: la presencia de grupos hidroxilos en el anillo B, la cual confiere mayor estabilidad al radical formado y participa en la deslocalización del electrón. También, el doble enlace en el C-2 y 3 en conjugación con el grupo 4-ceto (ambos del anillo C), puesto que deslocaliza los electrones del anillo B y los grupos hidroxilos en C-3 y 5 no sustituidos (Amié *et al.*, 2003; Rice *et al.*, 1998). De la misma manera, se requiere de un grupo catecol en el anillo B, el carbonilo en posición 4 y el hidroxilo en el C-5, la cual pueden contribuir al aumento de la quelación de hierro (Cheng y Breen, 2000). Sin embargo, la presencia del doble enlace en el C-2 y 3 no es relevante cuando en el anillo B no está el grupo catecol o posee un solo hidroxilo, porque el anillo monofenólico no es tan efectivo como dador de hidrógeno, por lo que disminuye la actividad antioxidante, como es en el caso del canferol (Rice *et al.*, 1998).

Una evaluación de la actividad antioxidante ensayada *in vitro* que consiste en la medición de quimioluminiscencia inducida por terbutilhidroperóxido en homogenizados de hígado de rata, mostró que la 3-O-metilgalangina no posee dicha actividad, debido a que presentó un $IC_{50} > 1\text{mM}$ (Fraga *et al.*, 1987).

Con lo expuesto anteriormente, queda demostrada la escasa actividad atrapadora de radicales libres que poseen ambos compuestos aislados.

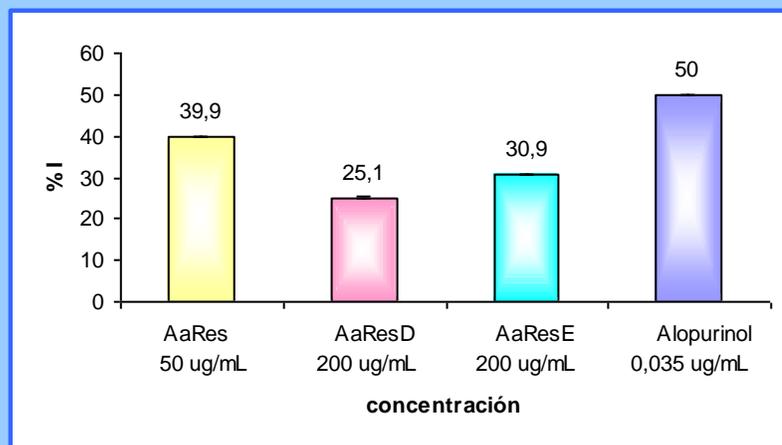
6.3.1.2. Inhibición de la enzima xantina oxidasa.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de la inhibición de la xantina oxidasa (TABLA N°13 y FIGURA N°24).

TABLA N°13: Resultados de la inhibición de la xantina oxidasa de las fracciones obtenidas de AaRes y alopurinol.

Fracción	Concentración (µg/mL)	% inhibición ± SEM	p
AaRes	50	39,9 ± 0,001	0,0010
AaResD	200	25,1 ± 0,18	0,0020
AaResE	200	30,9 ± 0,00	0,0020
Alopurinol	0,035	50	0,0018

FIGURA N°24: Comparación de la inhibición de la xantina oxidasa (%) de las fracciones obtenidas de AaRes y alopurinol.



Los resultados obtenidos muestran que las fracciones AaResD y AaResE (25,1% y 30,9% respectivamente) presentan una actividad menor en relación al fármaco de referencia, alopurinol con un 50% de efecto inhibitorio, pero AaResE fue cercana al del exudado (39,9%). A ambas fracciones no se les determinó su concentración inhibitoria media (IC_{50}) por no mostrar un efecto mayor al 50%.

Se evaluaron sólo las fracciones AaResD y AaResE, puesto que todas habían resultado inactivas frente a DPPH y éstas dos últimas en su composición química tienen mayor cantidad de componentes fenólicos, por lo que se postuló que podrían ser las responsables de la actividad de AaRes.

La inhibición de la enzima XO se traduce en una disminución de la producción de ácido úrico, así como también, de radicales superóxidos. Los flavonoides poseen la capacidad de inhibir dicha enzima mediante el cual ejercen la actividad antioxidante. En la literatura, se describe que para la inhibición de la XO, es importante la existencia de grupos OH en el C-5 y 7 del anillo A, así como también un doble enlace entre el C-2 y C-3, debido a que con éste doble enlace, entran en conjugación los anillos A y B adquiriendo coplanaridad. El efecto inhibitorio disminuye cuando se encuentra como un O-glicosido en C-3 o C-7 (Cos *et al.*, 1998). Si bien ambos compuestos aislados de la fracción C no fueron evaluadas su capacidad de inhibir la XO, se podría postular que no presentarían actividad atrapadora de superóxido, a diferencia de galangina y canferol que poseen escasa actividad.

6.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

6.3.2.1. Actividad antibacteriana por el bioensayo de siembra radial.

A continuación se presentan los resultados del bioensayo de siembra radial en superficie de agar obtenidos de las fracciones de AaRes (TABLA N°14).

TABLA N°14: Resultados del bioensayo de siembra radial de las fracciones AaResB, AaResC, AaResD y AaResE.

Microorganismos	Control	AaResB ($\mu\text{g/mL}$)		AaResC ($\mu\text{g/mL}$)		AaResD ($\mu\text{g/mL}$)		AaResE ($\mu\text{g/mL}$)	
		100	200	100	200	100	200	100	200
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Micrococcus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella aviatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	?

+: crecimiento bacteriano

-: inhibición del crecimiento bacteriano

Estos resultados muestran que todas las fracciones fueron inactivas frente a todas las cepas ensayadas. En vista de esto, se decidió probar todas las fracciones mediante el bioensayo de bioautografía, puesto que permitiría pesquisar cualquier metabolito activo que hubiera quedado enmascarado y además, confirmar la inactividad observada.

6.3.2.2. Actividad antibacteriana por el bioensayo bioautografía.

En la siguiente TABLA N°15 se observa los resultados del ensayo de bioautografía de las fracciones obtenidas de AaRes.

TABLA N°15: Resultados de la evaluación antibacteriana mediante el bioensayo de bioautografía de las fracciones obtenidas de AaRes y compuestos aislados.

Microorganismos	AaResB	AaResC	AaResD	AaResE
<i>Bacillus subtilis</i>	--	+	++	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>Micrococcus flavus</i>	-	-	++	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella aviatum</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	++	-

++ : actividad antimicrobiana clara

+ : actividad antimicrobiana moderada

- : no hay actividad antimicrobiana

Las fracciones AaResB, AaResC y AaResD presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus*, mientras que frente a *Bacillus subtilis* fueron AaResC y AaResD, únicamente la fracción AaResD fue activa frente a *Micrococcus flavus*.

TABLA N°16: Resumen de las bioautografías de los compuestos aislados de AaResC.

Microorganismos	AaC1 (3-O-metilgalangina)	AaC2 (3-O-metil-6-metoxicanferol)
<i>Bacillus subtilis</i>	+	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+

La actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* fue mas notable para el compuesto AaC2 (3-O-metil-6-metoxicanferol), que para el compuesto 3-O-metilgalangina (AaC1). De la misma manera, sólo hubo inhibición para *Staphylococcus aureus* con el compuesto AaC2.

Al evaluar la galangina mediante este ensayo, se observó una leve actividad frente a bacterias Gram (-): *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aviatum*, pero una mayor inhibición de bacterias Gram (+): *M. flavus*, *S. aureus* y *B. subtilis* (Pedrasa, 2004). En contraste, con los resultados de los compuestos AaC1 y AaC2, la estructura de ambos compuestos corresponde a un flavonol, donde el doble enlace que posee entre C-2 y C-3 produce una disminución de la actividad, probablemente debido al aumento de la conjugación en la molécula adquiriendo una mayor rigidez (Modka *et al.*, 2002). Cabe destacar, que el número de hidroxilos en el anillo B también está asociado con la actividad anticribiana (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001).

En la literatura se ha descrito que las flavanonas presentan una mayor inhibición frente a *Escherichia coli*, debido a que su estructura no posee un doble enlace entre C-2 y C-3, pero deben presentar grupos hidroxilo y además un metoxilo, que aumenta la lipofilia del compuesto (Modak *et al.*, 2002).

En un estudio reciente de *A. verrucosa*, se aislaron 5 flavonoides entre los cuales la cirsimaritina (Av3) e hispidulina (Av4), ambas flavonas con grupos metoxilos en el anillo A (C-6 y 7, C-6 respectivamente) sustituyente presente en

el anillo A del compuesto AaC2, presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

6.3.2.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos aislados activos.

De acuerdo a los resultados obtenidos para los compuestos AaC1 y AaC2 en la bioautografía, se realizó la CMI para cada uno de los compuestos y a continuación se muestran los resultados (TABLA N°17).

TABLA N°17: Resultado de la CMI de los compuestos AaC1 y AaC2.

Microorganismo	Compuesto	CMI (µg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i>	AaC1	200
	AaC2	150
<i>Staphylococcus aureus</i>	AaC2	240

La CMI de 3-O-metilgalangina fue de 200 µg/mL frente *Bacillus subtilis* y de 3-O-metil-6-metoxicanferol fue de 150 µg/mL y 240 µg/mL frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* respectivamente. Comparados con el fármaco de referencia, ampicilina, ésta posee una CMI de 10 µg/mL para *S. aureus* y 5 µg/mL para *B. subtilis* (Erazo *et al.*, 2002b).

Si bien la galangina presentó una CMI contra *B. subtilis* de 80 µg/mL, también frente a *S. aureus* de 140 µg/mL y 180 µg/mL frente a *M. flavus* (Pedrasa, 2004), al agregar un sustituyente en el OH del C-3, la actividad disminuye considerablemente, pero al introducir un metoxilo en C-6 aumenta levemente la actividad, como es en el caso del compuesto AaC2 (posiblemente la molécula adquirió lipofilidad).

Cotoras *et al.*, (2001) determinaron la actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* a 10 flavonas (entre ellos se encuentra la 3-O-metilgalangina), en el cual se observó que éste compuesto disminuyó el crecimiento del hongo alrededor de un 9%. Sugieren que para tener actividad antifúngica, se requiere la presencia de 2 grupos hidroxilos en el anillo A y además se demostró que una alta polaridad, debido a los grupos hidroxilos parece reducir la actividad de las flavonas. Así como también Picman *et al.*, (1995) mostraron que los flavonoides no sustituidos fueron mejores inhibidores del crecimiento que los sustituidos por hidroxilación, metilación y glicosilación resultando una baja actividad antifúngica.

6.4. Otros estudios de los compuestos aislados y sus derivados.

Un compuesto derivado del canferol (3,5-dimetil eter-canferol) demostró una notable actividad antitumoral ensayadas en líneas celulares epidérmicas de ratones (Gao *et al.* , 2002).

Un estudio encontró que la 3-O-metilgalangina inhibió la infectividad del virus X de papa (French and Towers, 2001).

VII. CONCLUSIONES

- El extracto seleccionado para continuar con el estudio en esta memoria fue AaRes, por presentar mayor interés farmacológico y químico.
- Del fraccionamiento del exudado resinoso *A. atacamensis* se obtuvieron cinco fracciones: AaResA, AaResB, AaResC, AaResD y AaResE, siendo las cuatro últimas con las que se continuó el estudio químico bioguiado, debido a que la primera contenía sólo grasa.
- Ninguna de las fracciones obtenidas de AaRes tuvo un efecto analgésico significativo en comparación con naproxeno (70%).
- En la actividad antiinflamatoria tópica inducida por AA, las fracciones AaResC, AaResD y AaResE presentaron un efecto \geq al 50% superando al del fármaco de referencia, excepto AaResB y los compuestos aislados AaC1 y AaC2.
- Al evaluar la actividad antiinflamatoria tópica inducida por TPA, las fracciones obtenidas de AaRes y compuestos aislados presentaron efectos superiores al 70%, destacando el efecto de AaResE que sobrepasó al del fármaco de referencia. El AaEs no presentó efecto.
- Todas las fracciones del exudado resinoso presentaron mayor efecto al inducir la inflamación por TPA que por AA.
- La relación estructura-actividad para el efecto antiinflamatorio inducido por AA, la influencia de un grupo OH en el anillo B, además de un grupo metoxilo en el C-6 más la esterificación del OH en 3, resultó desfavorable para la actividad antiinflamatoria de la molécula.
- En relación a la actividad atrapadora de radicales libres por el método de DPPH, no se obtuvieron resultados importantes tanto para las fracciones obtenidas de AaRes como para los compuestos aislados.
- Las fracciones AaResD y AaResE no presentaron resultados significativos para el ensayo de XO (25,1 % y 30,9 % respectivamente).

- De la fracción AaResC se aislaron e identificaron los flavonoides 3-O-metilgalangina (AaC1) y 3-O-metil-6-metoxicanferol (AaC2).
- El compuesto AaC1 presentó actividad antiinflamatoria tópica (81,7%) frente a TPA y resultó inactivo frente a AA.
- El compuesto AaC2 presentó actividad antiinflamatoria tópica en ambos modelos dando mayor efecto en la inducción por TPA que AA (73,1% y 36,7% respectivamente).
- Las fracciones AaResB, AaResC y AaResD presentaron actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* y *Staphylococcus aureus*.
- Los compuestos aislados presentaron una CMI mayor a 100 µg/mL para los microorganismos *B. subtilis* y *S. aureus*.
- El aceite esencial (AaEs) se asemeja a la fracción AaResB en la presencia de derivados terpénicos, pero no posee flavonoides como la fracción B.
- El aceite esencial (AaEs) podría contener en su composición compuestos responsables de la toxicidad aguda encontrada para AaRes, además no posee efecto antiinflamatorio tópico.
- Se podría concluir que la actividad antiinflamatoria tópica de ambos compuestos aislados está dada por la inhibición de la 5-LO.
- Este estudio permitió en parte respaldar las propiedades atribuidas por la medicina folclórica a *Adesmia atacamensis Phil.*

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AGNESE A., Perez C., Cabrera J.L. *Adesmia aegiceras*: antimicrobial activity and chemical study. Phytomedicine, 8(5): 389-394, 2001.
- BACKHOUSE N., Negrete R., Erazo S., Payá M., Muñoz E., Delporte C. Evaluación farmacológica preliminar de la resina de dos especies altiplánicas: *Adesmia verrucosa* y *Adesmia atacamensis*. Congreso Internacional de Químicos farmacéuticos, Santiago, Chile, 6-9 abril, 2003.
- BACKHOUSE N., Negrete R., Erazo S., Mella P., Jullian C., Delporte C. Flavonoides biactivos de *Adesmia verrucosa* Meyen. VIII Simposio Argentino XI Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, Buenos Aires Argentina, agosto 2004.
- CABEZAS Leighton, Victoria. Estudio antipirético, antiinflamatorio y analgésico de extractos de *Cestrum parqui* L'Herit. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Santiago Chile, 1997.
- CALDERON Gaete, Juan Carlos. Estudio farmacológico de diterpenoides obtenidos desde especies vegetales medicinales de la región altoandina. Memoria para optar al título de químico Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2003.
- CHENG IF., Breen K. On the ability of four flavonoids, baicilein, gluteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. Biometals, 1:77-83, 2000.
- COTORAS M, García C., Lagos C, Folch C., Mendoza L. Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenoids isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp. Bol. Soc. Chil. Quím, 46 (4), 2001.

- COS P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Kanyanga C., Poel B.V., Pieters L., Vlietinck A.J., Berghe D.V. Structur-Activity relationship and clasification of flavonoids as inhibitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. J.Nat.Prod., 61: 71-76, 1998.
- DELPORTE C., Muñoz O., Rojas J., Ferrándiz F., Payá M., Erazo S., Negrete R., Maldonado S., San Feliciano A., Backhouse N. Pharmacotoxicological Study of *Kageneckia oblonga* R. et. P., Rosaceae. Z. Naturforsch C., 57: 100-108, 2002.
- DELPORTE C, Backhouse N, Salinas P, San Martín A, Bórquez J, Loyola LA. Pharmacotoxicological study of diterpenoids. Biorganic & Medicinal Chemistry, 11: 1187-1190, 2003.
- DE YOUNG, L. M., Kheifets, J.B. Ballaron, S.J., Young, J. M. Enema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. Agents Actions, 26: 335-341, 1989.
- ERAZO S., González V., Zaldívar M., Negrete R. Antimicrobial activity of *Psoralea glandulosa* L. Int. J. of Pharmacog., 35: 1-3, 1997.
- ERAZO S., Zaldívar M., Backhouse N., Delporte C., Tapia P., Belmonte E., Delle Monache F., Negrete R. Antibacterial diterpenoids from *Fabiana densa* var. *ramulosa*. Planta Médica, 68:1-3, 2002a.
- ERAZO S., Negrete R., Zaldívar M., Backhouse N., Delporte C., Silva I., Belmonte E., López- Pérez J.L., San Feliciano A. Methyl psilalate: a new antimicrobial metabolito from *Psila boliviensis*. Planta Médica, 68:66-67, 2002b.
- FAINI F., Castillo M., Torres R., Delle Monache G., Gacs-Baitz E. Malabaricane triterpene glucosides from *Adesmia aconcaguensis*. Phytochemistry, 40(3): 885-890, 1995.
- FRENCH, J. and Towers, N. Inhibition of infectivity of potato virus X byflavonoids. Phytochemystry, 31(9): 3017-3020, September 1992.

- GAJARDO R. La vegetación natural de Chile. Clasificación y Distribución geográfica. Editorial Universitaria. Santiago Chile. 1995, pp 165.
- GÁLVEZ Marchat, David Orlando. Perfil analgésico y antiinflamatorio de *Adesmia atacamensis* Phil. y *Adesmia verrucosa* Meyen. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2003.
- GAO H., Kuroyanagi M., Wu L., Kawahara N., Yasuno T., Nakamura Y. Antitumor-Promoting constituents from *Dioscorea bulbifera* L. in JB6 mouse epidermal cells. Biol. Pharm. Bull., 25(9): 1241-1243, 2002.
- GIL B., Sanz M. J., Terencio M.C., Ferrándiz M. L., Bustos G., Payá M., Gunasegaran R., Alcaraz J. Effects of flavonoids on *naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A₂ and inflammatory responses in mice,. Pharmacology Letters, 54 (20): 333-338, 1994.
- GONZÁLEZ S.B., Houghton P.J., Houtl R.S. The activity against leucocyte eicosanoid generation of essential oil and polar fractions of *Adesmia boronoides* Hook. F. Phytotherapy Research, 17: 290-293, 2003.
- HARBORNE, J. and Mabry, J. The flavonoids: Advances research. London, New York, Chapman and Hall Ltd., 1982.
- KIM Hee Kee, Cheon Bong Sun., Kim Young Ha, Kim Sung Yong, Kim Hyun Pyo. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. Biochemical Pharmacology, 58: 759-765, 1999.
- LLORET, S. and Moreno, G. Effects of an antiinflammatory peptide (antiinflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol termal application. Biochemical Pharmacology, 50(3): 347-353, 1995.

- LOYOLA L. A., Morales G., De la Torre M. C., Pedreros S., Rodríguez B. 17-acetoxymulinic acid, a rearranged diterpenoid from *Mulinum crassifolium*. Phytochemistry, 29(12): 3950 – 3951, 1990.
- LOYOLA L. A., Bórquez J., Morales G., Araya J., González J., Neira J., Sagua H., San-Martín A. Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. Phytochemistry, 56(2): 177 – 180, 2001.
- MELLA Alegria, Paola del Carmen. Estudio químico y bioguido de *Adesmia verrucosa* Meyen, especie de la región altoandina. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2004.
- MODAK B., Arrieta A., Torres R., Urzua A. Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*: Efecto del tipo de estructura. Bol. Soc. Chil. Quím., 47(1): 19-23, 2002.
- MORONEY M-A, Alcaraz M.J., Forder R.A., Carey F., Hoult J.R.S. Selectivity of neutrophil 5-Lipoxygenase and Cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 40: 787-792, 1988.
- MUÑOZ M., Barrera E., Meza I. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. Publicación Ocasional n°33. Museo Nacional de Historia natural. Santiago, Chile. 1981, 54.
- PEDRASA Pizarro, Macarena Isabel. Estudio fotoquímico, microbiológico y farmacológico de *Lophopappus taracapacanus* (Phil.) Cabr. Astereaceae. Especie vegetal de la región andina. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2004.
- PEREZ Truela, Gilberto. Los flavonoides: antioxidante o prooxidantes. Rev. Cubana Invest Biomed, 22(1):48-57, 2003.

- PICMAN A. K., Schneider E. F., Picman J. Effect of flavonoids on mycelial growth of *Verticillium albo-atrum*. Biochemical Systematic and Ecology, 23(8): 683-693, 1995.
- PUUPPONEN-PIMIÄ R., L. Nohynek, C. Meier, M. Kähkönen, M. Heinonen², A. Hopia, K.-M. Oksman-Caldentey. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. Journal of Applied Microbiology, 90: 494-507, 2001.
- RAHALISON I., Hamburger M., Hostettmann k., Monod M., Frenk E. A bioautographic agar overlay method for detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochemical Analysis, 2:199-203, 1991.
- RAUHA J., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology, 56: 3-12, 2000.
- REICHE C. Estudio Crítico Sobre la Flora de Chile. 1896, 782-783p.
- RICE-EVANS C., Miller N. J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical & Medicine, 20(7):933-956,1996.
- VITURRO C., Molina A., Schmeda-Hirschmann G. Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolens* (Apiaceae). Phytother. Res.,13:422, 1999.
- VILLAGRÁN C., Kalin, M.T., Armesto, J. La vegetación de una transecta altitudinal en los Andes del Norte de Chile (18-19° S) En "El Hombre y los Ecosistemas de Montaña". El Ambiente Natural y las Poblaciones Humanas de Los Andes del Norte Grande de Chile (Arica, Lat. 18° 28' S) Vol. II. Las Poblaciones Humanas del Altiplano Chileno: Aspectos Genéticos, Reproductivos y Socioculturales. Proyecto MAB-6 UNEP-UNESCO-1105-77-01, 1982. 166p.

- WAGNER, H. and Blatt, S. Plant drug analysis. A Thin layer chromatography atlas. 2nd Edición. Editorial Springer- Verlag. Berlin Heidelberg, 1996. 359-362p.