



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y**  
**TOXICOLÓGICA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Diseño de la estandarización química y  
evaluación de la actividad analgésica tópica  
de un extracto activo de *Buddleja globosa*  
Hope, Buddlejaceae, matico.”**

**PROFESOR PATROCINANTE**  
**DRA. CARLA DELPORTE VERGARA**

**DIRECTORES DE MEMORIA**  
**DRA. NADINE BACKHOUSE ERAZO**  
**DR. HUGO MIRANDA GUZMAN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

***CECIA DEL ROSARIO APABLAZA ESCALONA***

**SANTIAGO-CHILE**  
**2006**

*A mis padres y  
hermana.*

## Agradecimientos.

Esta página está dedicada a todas aquellas personas que de un modo u otro hicieron posible la realización de esta tesis.

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres que siempre han depositado todo su amor y confianza en mí, sobre todo en los momentos difíciles a lo largo de mi carrera.

A mi hermana Verónica por su experiencia, consejos y cariño que siempre me ha brindado.

De forma muy especial a la Profesora Dra. Nadine Backhouse por su apoyo, paciencia y dedicación a mi memoria.

A las profesoras Carla Delporte, Silvia Erazo y Rosa Negrete por los conocimientos y apoyo entregado. A ellas mi estimación y gratitud.

Al profesor Hugo Miranda del departamento de farmacología de medicina por la gran disposición entregada para la realización de mi tesis.

De igual manera a Don José y Don Alejandro por la buena voluntad y colaboración en los trabajos realizados en medicina.

A Ester Aravena por su amistad y constante ayuda entregada.

A Raúl por su cariño incondicional entregado siempre.

A todos ustedes muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
SUMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
I. HIPÓTESIS.....	6
II.OBJETIVOS.....	7
2.1 OBJETIVOS GENERALES.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	8
III. ANTECEDENTES de <i>Buddleja globosa</i> .....	9
3.1 Descripción botánica .....	9
3.2 Usos en la medicina popular.....	9
IV. MATERIALES Y METODOS.....	11
4.1 ESTUDIO QUÍMICO.....	11
4.1.1 Material vegetal.....	11
4.1.2Preparación de los extractos.....	11
4.1.3Estudio cromatográfico.....	13
4.1.4 Fraccionamiento de columna por medio de un gel de sílice.....	14
4.1.5 Valoración espectrofotométrica y validación del método.....	15
4.1.5.1 Valoración espectrofotométrica por el método de Glories.....	15
4.1.5.2 Validación del método.....	17
4.1.6 Diseño de un método por HPLC.....	18
4.1.7Técnicas espectroscópicas.....	19
4.2 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO.....	19
4.2.1 Ensayos farmacológicos vía tópica.....	20
4.2.1.1 Evaluación de la actividad analgésica (Test de la formalina).....	20
4.2.1.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica.....	21
4.2.1.3 Ensayo tail flick vía tópica.....	23
4.2.2 Ensayos farmacológicos vía oral.....	24
4.2.2.1 Ensayo tail flick vía oral.....	24
4.2.2.2 Ensayo de las contorsiones abdominales.....	25

4.3 ESTUDIO <i>IN VITRO</i> .....	27
4.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra en superficie de agar.....	27
4.3.2 Ensayo Bioautografía.....	29
4.3.3 Ensayo de la Xantino oxidasa.....	30
4.3.4 Determinación de Actividad Antioxidante mediada por DPPH.....	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
5.1 ESTUDIO QUÍMICO.....	34
5.1.1 Estudios cromatográficos.....	34
5.1.2 Fraccionamiento de columna por medio de un gel de sílice.....	36
5.1.3 Valoración espectrofotométrica y validación del método.....	39
5.1.3.1. Valoración espectrofotométrica por el método de Glories.....	39
5.1.3.2 Validación del método.....	43
5.1.4 Diseño de un método por HPLC.....	44
5.1.5 Identificación de los compuestos aislados.....	48
6.1 ESTUDIO FARMACOLÓGICOS.....	55
Determinación de la Actividad analgésica vía tópica.....	55
6.1.1 Ensayo de la formalina en la cola.....	55
6.1.2 Ensayo del tail flick vía tópica.....	57
6.1.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica.....	59
Ensayos farmacológicos vía oral.....	61
6.1.4 Ensayo tail flick vía oral.....	61
6.1.5 Ensayo de las contorsiones abdominales.....	63
7.1 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	68
7.1.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra radial en superficie de agar.....	68
8.1 Estudios de la actividad antioxidante.....	69
8.1.1 Determinación de la actividad antioxidante mediada por X.O.....	69
8.1.2 Determinación de la Actividad Antioxidante mediada por DPPH.....	69

CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXOS.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº 1: FOTO DE LA PLANTA CON SUS HOJAS Y FLORES.

FIGURA Nº 2: FLORES DE LA PLANTA.

FIGURA Nº 3: ESQUEMA DE EXTRACCIÓN DE B. GLOBOSA.

FIGURA Nº 4: CURVA DE ABSORBANCIA PARA EL ÁCIDO GÁLICO.

FIGURA Nº 5: CURVA DE ABSORBANCIA PARA EL ÁCIDO CAFEICO.

FIGURA Nº 6: CURVA DE ABSORBANCIA PARA LA QUERCETINA.

FIGURA Nº 7: CURVA DE CALIBRACION PARA EL ÁCIDO GÁLICO.

FIGURA Nº 8: CURVA DE CALIBRACION PARA EL ÁCIDO CAFEICO.

FIGURA Nº 9: CURVA DE CALIBRACION PARA LA QUERCETINA.

FIGURA Nº 10 :CCF

-Fracciones: (28-31)+32-49) (eluidas con AcEt 100 hasta AcET: MeOH= 95:5) (53+54) (eluidas con AcEt:MeOH 95:5)

-Fase móvil: AcEt: : Ác. Acét.:,Ac. Fórmico: Agua=10:1,1,:1,1:2,6.

-Reactivo Revelador: NP/PEG

FIGURA Nº 11 : CCF. REVELADA CON NP AL VISIBLE.

FIGURA Nº 12 : CCF Revelada con NP y UV 360nm.

FIGURA Nº 13: EMAT-1( VERANO) EN HPLC.

FIGURA Nº 14: FRACCIÓN 32-49 DE EMAT-1 (VERANO) EN HPLC.

FIGURA Nº 15: FRACCIÓN 53 DE EMAT-1 (VERANO) EN HPLC .

FIGURA Nº 16: ESPECTRO IR DEL PATRÓN GLUCÓSIDO- $\beta$ -SITOSTEROL.

FIGURA Nº 17: ESPECTRO IR DEL COMPUESTO AISLADO DE EMAT-1(VERANO).

FIGURA Nº 18: ESPECTRO RMN-<sup>13</sup>C DEL COMPUESTO RN1 : VERBASCÓSIDO.

FIGURA Nº 19: ESPECTRO RMN-<sup>1</sup>H DEL COMPUESTO RN1 : VERBASCÓSIDO.

FIGURA Nº 20: ESPECTRO RMN-<sup>13</sup>C DEL COMPUESTO RN1' : 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA .

FIGURA Nº 21: ESPECTRO RMN-<sup>1</sup>H DEL COMPUESTO RN1' : 7-O-GLUCÓSIDO DE LUTEOLINA .

FIGURA Nº 22 :ESPECTRO BIDIMENSIONAL HMBC EN DMSO DE RN1 : VERBASCÓSIDO.

FIGURA Nº 23: ESPECTRO BIDIMENSIONAL HMQC EN DMSO DE RN1 : VERBASCÓSIDO.

FIGURA Nº 24 : EFECTO ANALGÉSICO VÍA TÓPICA COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *B. GLOBOSA* E IBUPROFENO EN EL ENSAYO DE FORMALINA EN LA COLA.

FIGURA Nº 25: PORCENTAJE DE MÁXIMO EFECTO POSIBLE (%MPE) ANALGÉSICO COMPARATIVA DE LOS EXTRACTOS EMAT-1(VERANO) Y ETMAT 1(OTOÑO) DE *B.GLOBOSA* EVALUADA MEDIANTE EL ENSAYO TAIL FLICK, VÍA TÓPICA.



FIGURA N° 26 : EFECTO ANTIINFLAMATORIO TÓPICO (%EAT) FRENTE A TPA COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *B. GLOBOSA* E INDOMETACINA.

FIGURA N° 27: PORCENTAJE DE MÁXIMO EFECTO POSIBLE (%MEP) DE ACTIVIDAD ANALGÉSICA COMPARATIVA, DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *B.GLOBOSA* EVALUADA MEDIANTE EL ENSAYO TAIL FLICK, VÍA ORAL.

FIGURA N° 28 :ACTIVIDAD ANALGÉSICA COMPARATIVA DE LOS EXTRACTOS EMAT-1(VERANO) Y ETMAT-1(OTOÑO), EVALUADA MEDIANTE EL ENSAYO DE LAS CONTORSIONES ABDOMINALES, VÍA ORAL DE *B. GLOBOSA*.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Fraccionamiento columna EMAT- 1(verano).

Tabla N° 2: Protocolo para valoración del método espectrofotométrico.

Tabla N° 3 : Microorganismos Utilizados para Todas las Pruebas Microbiológicas.

Tabla N° 4: Fases móviles de cromatogramas para bioautografías.

Tabla N° 5 : Protocolo del Ensayo de Xantino/Xantino a Oxidasa.

Tabla N° 6: Protocolo de ensayo de DPPH.

Tabla N° 5.1.1: Perfil cromatografico de los distintos extracto de *B. globosa*.

Tabla N° 5.1.2: Resumen de las fracciones de EMAT-1 (verano).

Tabla N° 5.3.1.1: EMG (verano) de *B.globosa* a 1mg/ml.

Tabla N° 5.3.1.2 EMAT-1(verano) de *B.globosa* a una concentración.

Tabla N° 5.3.1.3: ETMAT-1(otoño) de *B.globosa* a dos concentraciones distintas.

Tabla N° 5.3.1.4: ETMAT-1(verano) de *B.globosa* a dos concentraciones distintas.

Tabla N° 5.3.1.5 .Resumen de los porcentajes de compuestos presentes en los diferentes extractos de *B.globosa* a la concentración de 1mg/ml.

Tabla N° 5.1.4.1: Patrones utilizados, tiempos de retención (TR) y longitudes máxima absorbancia .

Tabla N° 5.1.4.2 : EMAT-1 (verano) y ETMAT-1 (otoño) de *B.globosa* con el cual se realizó la comparación entre ellas y con los patrones.

Tabla N° 5.1.4.3 : Fracción 32-49 y fracción 53 de *B.globosa* de EMAT-1(verano) con el cual se realizó la comparación entre ellas y con los patrones.

Tabla N° 5.1.5.1: Comparación de los valores en ppm de las señales de RMN-C<sup>13</sup> en DMSO y RMN-H<sup>1</sup> del compuesto RN1 y los datos bibliográficos (Calis et al.,1987 y Gross et al., 1987) asignados al verbascósido.

Tabla N° 5.1.5.2 : Señales de RMN-C<sup>13</sup> y RMN-H<sup>1</sup> del compuesto RN1' y su comparación con los datos bibliográficos (Harbone et al., 1982) para el 7-O-glucósido de luteolina.

Tabla N° 6.1.1 : Actividad analgésica vía tópica de los diferentes extractos de *B. globosa* determinada mediante el ensayo de formalina en la cola.

Tabla N° 6.1.2.1: Actividad analgésica de los diferentes extractos de *B.globosa* evaluada mediante el ensayo tail flick, vía tópica.

Tabla N° 6.1.2.2: Valores de ED<sub>25</sub> en el ensayo de analgesia tail flick, vía tópica para los extractos ETMAT-1(verano) y EMAT-1(verano) frente al fármaco de referencia ibuprofeno.

Tabla N° 6.1.3.1 : Resultados de la actividad antiinflamatoria tópica frente a TPA de los diferentes extractos de *B. globosa* e indometacina (IND).

Tabla N° 6.1.4.1: Actividad analgésica de los diferentes extractos de *B. globosa* evaluada mediante el ensayo tail flick, vía oral.

Tabla N° 6.1.5.1: Efecto analgésico mediante ensayo de las contorsiones abdominales, de los diferentes extractos de *B. globosa*.

Tabla N° 6.1.5.2: Valores de ED<sub>50</sub> para el efecto analgésico del ensayo de las contorsiones abdominales, vía oral de los extractos ETMAT-1 (otoño) y EMG (verano) de *B.globosa*.

Tabla N° 7.1.1: Actividad antibacteriana y antifúngica por siembra radial en placa de Petri de 2 EMAT-1 (verano) y ETMAT-1 (otoño) extractos de *B. globosa*.

Tabla N° 8.1.1 : Porcentaje de inhibición de X.O. de ETMAT-1(otoño).

Tabla N° 8.1.2 : Resultados de la actividad atrapadora de radicales libres de el extracto de ETMAT-1 (otoño) de *B. globosa* y quercetina como patrón.

## ABREVIATURAS

A	:	absorbancia.
AS	:	p-anisaldehído sulfúrico.
CCF	:	cromatografía en capa fina.
COX	:	ciclooxigenasa
DCM	:	diclorometano
DEPT	:	distortionless enchancement by polarization transfer
DMSO	:	dimetilsulfóxido.
DPPH	:	radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado
EAI	:	efecto antiinflamatorio
EDCM	:	extracto diclorometano.
EHEX	:	extracto hexánico
EMAT-1(verano)	:	extracto metanólico de hojas recolectadas en verano
EMG (verano)	:	extracto metanólico global de hojas recolectadas en verano
ETMAT-1(verano)	:	extracto etanólico de hojas recolectadas en verano
ETMAT-1(otoño)	:	extracto etanólico de hojas recolectadas en otoño
HMBC	:	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	:	heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	:	cromatografía líquida de alta resolución
IC <sub>50</sub>	:	concentración inhibitoria cincuenta.
IND	:	indometacina.
IR	:	infrarrojo

KBr	:	bromuro de potasio
LOX	:	lipooxigenasa.
OD	:	oreja derecha.
OI	:	oreja izquierda.
RMN- <sup>1</sup> H	:	resonancia magnética nuclear de protones
RMN- <sup>13</sup> C	:	resonancia magnética nuclear de carbono
TPA	:	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.
TSA	:	triptic soy agar
TSB	:	triptic soy broth
UV	:	ultravioleta.
X.O.	:	xantino oxidasa.

## RESUMEN

Existen diversos antecedentes de las propiedades farmacológicas de *B. globosa* (matico) tanto de su actividad analgésica como antiinflamatoria en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio, como también en publicaciones científicas, esto condujo a continuar con el estudio farmacológico y químico, de esta especie.

El principal objetivo de nuestro trabajo fue la comparación de la eficacia del extracto metanólico de hojas de matico (EMAT-1) y etanólicos (ETMAT-1), con respecto a la época de recolección de las hojas, estaciones de verano y otoño. Los extractos fueron fraccionados con solventes de polaridad creciente. El seguimiento cromatográfico se realizó mediante cromatografía de capa fina en gel de sílice, usando diferentes sistemas de desarrollo y reveladores. La identificación de los compuestos se realizó por medio del estudio espectroscópico de IR y de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , cuando fue necesario. Además, cuando se dispuso del estándar se identificó la presencia de estos en las fracciones del extracto (EMAT-1), por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se realizó una valoración espectrofotométrica para los compuestos fenólicos, presentes en los extractos, mediante la adaptación del método de Glories y la validación posterior del método establecido. Se evaluó las diferencias en el contenido de flavonoides y feniletanoides.

El estudio farmacológico consistió en la evaluación de la actividad analgésica en ratones tanto vía oral como tópica; en la analgesia vía oral se utilizó el método de las contorsiones abdominales, el método de la formalina y el método del tail flick, por vía tópica se utilizó el tail flick.

En cuanto a los estudios de actividad antiinflamatoria por vía tópica se utilizó el método de la inducción de edema en la oreja del ratón provocada por acetato de tetradecanoilforbol (TPA).

En cuanto a las propiedades farmacológicas, se evaluaron cuatro extractos de matico EMAT-1(verano), ETMAT-1(otoño), ETMAT-1(verano) y EMG(verano), apreciándose una diferencia significativa en los extractos recolectados en las diferentes épocas del año, siendo el matico recolectado en el verano más eficaz, respecto a las propiedades tanto analgésicas como antiinflamatorias, evaluadas.

Además, se evaluó la actividad antioxidante mediante el método de la xantino oxidasa y la actividad atrapadora de radicales libres por el método del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) de el extracto ETMAT-1(otoño) el cual no había sido evaluado en estudios anteriores.

También se realizaron, estudios microbiológicos *in vitro* para ver si los extractos eran antibacterianos y/o antifúngicos, mediante el ensayo de bioautografía, con este objetivo los extractos ETMAT-1(otoño) y EMAT-1 (verano), fueron sembrados en cromatolaminas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 (Merck) determinándose la fase móvil más apropiada para cada uno de ellos. Se prepararon caldos de cultivo de las diferentes cepas, utilizando como medio líquido de cultivo TSB (Tryptona soy Broth) para bacterias y PDB (potatoes dextrose broth) para hongos.

Los resultado de esta investigación permitieron demostrar la variación estacional de los principios activos, pudiendose afirmar que la mejor época de recolección es el verano. Se identificaron tres flavonoles (quercetina, apigenina, 7-O-glucósido de luteolina) y un feniletanoide derivado del ácido cafeico: verbascosido, los que serian en parte responsables de las propiedades atribuidas a esta especie.

De los resultados de los ensayos farmacológicos se puede deducir que todos los extractos utilizados tienen propiedades tanto analgésicas como antiinflamatorias, siendo la actividad analgésica mayor que la antiinflamatoria, los extractos de las hojas recolectadas en verano fueron más efectivos que el de otoño, destacándose por sobre los demás el extracto ETMAT-1(verano).

Los resultados microbiológicos mostraron la inactividad de los extractos ensayados EMAT(verano) y ETMAT-1(otoño).

Respecto a la actividad antioxidante, la capacidad inhibitoria de xantino oxidasa resultó nula, no así la capacidad atrapadora de radicales libres en el ensayo de DPPH, actividad que puede deberse a la presencia de los flavonoles.



## SUMMARY

Different antecedents of the pharmacology proprieties of *Buddleja globosa* (matico), respect analgesic and antiinflammation activity in previous experiments made in our laboratory, and also, in scientific publication, and this carried to continue with the pharmacology and chemistry study, of this species.

The principal objective of our experiment it was the comparison of extract fractioned of the species. The experiments was with methanolic extract of matico (ETMAT-1), also to made the comparison of leaves take in different seasons of the year for see some difference in the efficacy of the extract. The gathering matico it was in the autumn and summer. The was fractioned with solvent of increasing polarity. In the experiments we used thin layer chromatography in silica gel, we use different development. The identification of compounds it was across spectroscopy of IR and RMN of  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  for some compounds, also HPLC for compounds with standard. The assay was across espectrophotometric method for the compounds on the extracts, when was necessary we adapted the Glories method and validate. It was evaluated the difference between contented of flavonoles and feniletanoides.

The pharmacology studio evaluated the analgesic activity in oral and topic via, on the analgesic in oral via oral we used the abdominal contortions method, formalin method and tail flick method, in mousse, for via we used the tail flick method.

In the activity antiinflammatory for topic via we used the edema induction method on the mouse ear provoked for tetradecanoilforbol-acetate (TPA) .

In was evaluated 4 extracts of matico in experiments EMAT-1 (methanolic summer extract), ETMAT-1(ethanolic autumn extract), ETMAT-1 (ethanolic summer extract) and EMG (global methanolic extract of summer), it was saw a difference on the extracts gathering analgesic and antiinflammatory proprieties.

Also it was evaluated the antioxidant activity for xantino oxidasa method and the capture free radical activity across 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) method of the extract ETMAT-1(autumn), this don't was evaluated in studies preius.

It was made also microbiologic experiments *in vitro* for see if the extracts was antimicrobial and/o antifungy bioautografy essay, the EMAT-1(summer) and ETMAT-1(autumn) extracts, it was cultivate in silica gel 60 (Merck) and t was established of

movil fase more suitable for each. It was made cultivate medium for bacterium and PDB (potatoes dextrose broth) for fungi.

How chemistry result we can say that the variation of material raw depends of the season of the year that it was collect, and the best season is the summer, also the identification of 3 flavonoles ( quercetina, apigenina, 7-O-glcoside de luteolina) and other fenolic compounds, the cafeic acid (verbascoside), it was the responsible of the proprieties of this specie.

The pharmacology experiments we can say that all extract used have analgesic and antiinflamatory than, and the summer extract most effective than autumn, the ETMAT-1 (summer) is the most important.

The microbiologic and antioxidant result of the extracts studies it was kind of null, it doesn't showed activity in these areas.

## INTRODUCCIÓN

Se han realizado muchos estudios sobre las propiedades de *B.globosa* (matico) los que se pueden encontrar en la literatura, describiendo sus múltiples beneficios en la medicina, se han realizado investigaciones que avalan sus efectos analgésicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, cicatrizantes, y antioxidantes. Esto nos llevó a seguir la investigación en la búsqueda de compuestos que sean los responsables de estas propiedades, su identificación cualitativa y cuantitativa. Estudios anteriores hablan sobre compuestos presentes en esta especie como flavonoles, feniletanoides , sesquiterpenos entre otros.

Los estudios farmacológicos han demostrado actividad cicatrizante *in vitro* con un extracto acuoso a partir de la hojas de la planta (Mensah et al.,1998) y propiedades antimicrobianas sobre todo contra *S. aureus* (Pardo et al., 1993).

A partir de un extracto de la raíz se han aislado cuatro compuestos: buddledinas A, B, C y zerumbona. La buddledina A demostró tener actividad antiinflamatoria *in vitro* ya que inhibía a la ciclooxigenasa ( COX) principal mediador de la inflamación y a la lipooxigenasa (LOX) (Liao et al.,1999).

Estudios realizados en nuestro laboratorio también demostraron efectos farmacológicos como cicatrizantes (Miranda et al., 2005), actividad antiinflamatoria , actividad analgésica y atrapadora de radicales libres de un preparado metanólico (EMAT-1) (Rosales et al., 2003).

Así también se trabajó con los preparados dermatológicos en base a extractos activos de matico demostrando la efectividad de éste, en el tratamiento de los efectos adversos producidos por quimioterapia (eritrodisestesia plantar palmar) (Rubio et al.,2004, Rubio et al., 2005, Araya et al., 2005), lo que puede contribuir a una terapia menos invasiva para los pacientes.

Todos estos antecedentes nos llevaron a la obtención de un extracto purificado para evaluar si el fraccionamiento de éste, conduciría a aumentar la actividad al tener en las fracciones más polares los metabolitos activos y compararlos con un extracto alcohólico global (EMG) que tiene todos los compuestos de las hojas, además de identificar si la época de recolección influiría en la actividad del extracto.

## **I.HIPOTESIS**

Estudios recientes han demostrado las propiedades antiinflamatorias vía oral y tópica de un extracto metanólico seriado (EMAT-1(verano)) de *B. globosa*, además de su actividad cicatrizante. Se espera poder demostrar:

- sus propiedades analgésicas vía oral y tópica debida a la estrecha relación de ésta y la inflamación
- la no variabilidad farmacológica y química al utilizar etanol en la preparación del extracto y
- la influencia estacional en la actividad farmacológica.

## II.OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GENERALES.

Comparar desde el punto de vista químico y farmacológico un extracto metanólico fraccionado (EMAT-1(verano)) de *B. globosa* con un extracto etanólico seriado (ETMAT-1(verano)) a obtener en el estudio, y evaluar sus propiedades analgésicas tópicas. Diseñar la estandarización química como base del control de calidad de un extracto EMAT-1(verano) con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y cicatrizantes ya demostradas, proporcionando un valor agregado al respaldo científico de los estudios realizados y a su aplicación en un preparado dermatológico.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

-Obtener los extractos seriados de matico a partir de una nueva recolección de hojas, para la comparación química y farmacológica de los extractos alcohólicos: EMAT-1 y ETMAT-1, y en diferentes épocas del año (verano y otoño respectivamente).

-Evaluar la actividad analgésica vía tópica del extracto EMAT-1(verano), ETMAT-1 (verano), ETMAT-1 (otoño) y EMG (verano), mediante dos ensayos diferentes que permiten evaluar el efecto a nivel periférico y a nivel central, el Test de la formalina y Tail flick. Este último, utilizando dos vías de administración: oral y tópica.

-Diseñar la estandarización química determinando parámetros cuali y cuantitativos para el extracto activo EMAT-1(verano) y para el ETMAT-1(otoño)

-Validar un método espectrofotométrico que permita la valoración de las distintas familias de compuestos (flavonoides y feniletanoides) presentes en dicho extracto y fijar sus límites.

-Implementar un método por HPLC para la cuantificación de los flavonoides y feniletanoides.

### III ANTECEDENTES

#### 3.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

FAMILIA	: <b>Buddlejaceae</b> .(Puig, 1997)
GENERO	: <i>Buddleja</i>
ESPECIE	: <i>B. globosa</i>
NOMBRE CIENTÍFICO	: <i>Buddleja globosa</i> Hope (Puig, 1997).
NOMBRE VULGAR	: matico, palquil o pañil (Montes, 1985).
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	: Chile, Argentina y Perú. En Chile habita desde Santiago hasta la Patagonia, generalmente en sitios húmedos (Navas, 1979).

*Buddleja globosa* Hope es un arbusto de 1,5 a 3 m de altura, con ramas jóvenes pubescente amarillentas. Las hojas son opuestas, de 3 a 15 cm de ancho, lanceoladas, agudas. La inflorescencia es en mono o bicabezuela, de 1 a 2 cm de diámetro, formando un racimo de 2 a 15 cabezuelas. Sus flores son numerosas, compactas, de color anaranjadas, amarillas y rojas. El fruto es una cápsula subglobosa. Florece desde noviembre a mayo (Navas, 1979)

#### 3.2 USOS EN MEDICINA POPULAR

La medicina folclórica la utiliza por sus múltiples propiedades terapéuticas y destaca el uso de las hojas y corteza en infusión, para ayudar en la cicatrización de

heridas, en el tratamiento de quemaduras y de úlceras externas e internas(Pardo et al., 1993).

El decocto de las hojas es utilizado para lavar heridas y las hojas en polvo para curar úlceras y viejas heridas. El infuso de las hojas, puede ser tomado internamente para tratar disentería crónica, hemorroides, hepatitis y catarro. También se cita el tratamiento de úlceras y verrugas, usando los jugos e infusiones desde las hojas. Por último, también se han usado las hojas como antiséptico urogenital en la forma de una infusión (Houghthon, 1984).

**Figura Nº 1: Foto de la planta con sus hojas y flores**



**Figura Nº 2: Flores de la planta**





## **IV.MATERIALES Y METODOS.**

### **4.1 ESTUDIO QUÍMICO.**

#### **4.1.1 Material vegetal.**

Se recolectaron las hojas de las plantas cultivadas en la región metropolitana procedentes de esquejes obtenidos en Temuco, del cual se obtuvo el EMAT-1(verano) que se empleó en este estudio. La hojas se recolectaron en verano (noviembre) y en otoño (abril) se secaron a temperatura ambiente, protegidas del sol, y se molieron.

Se guardó un testigo de herbario para la recolección en abril (22219) y en verano (22258) en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

#### **4.1.2 Preparación de los extractos**

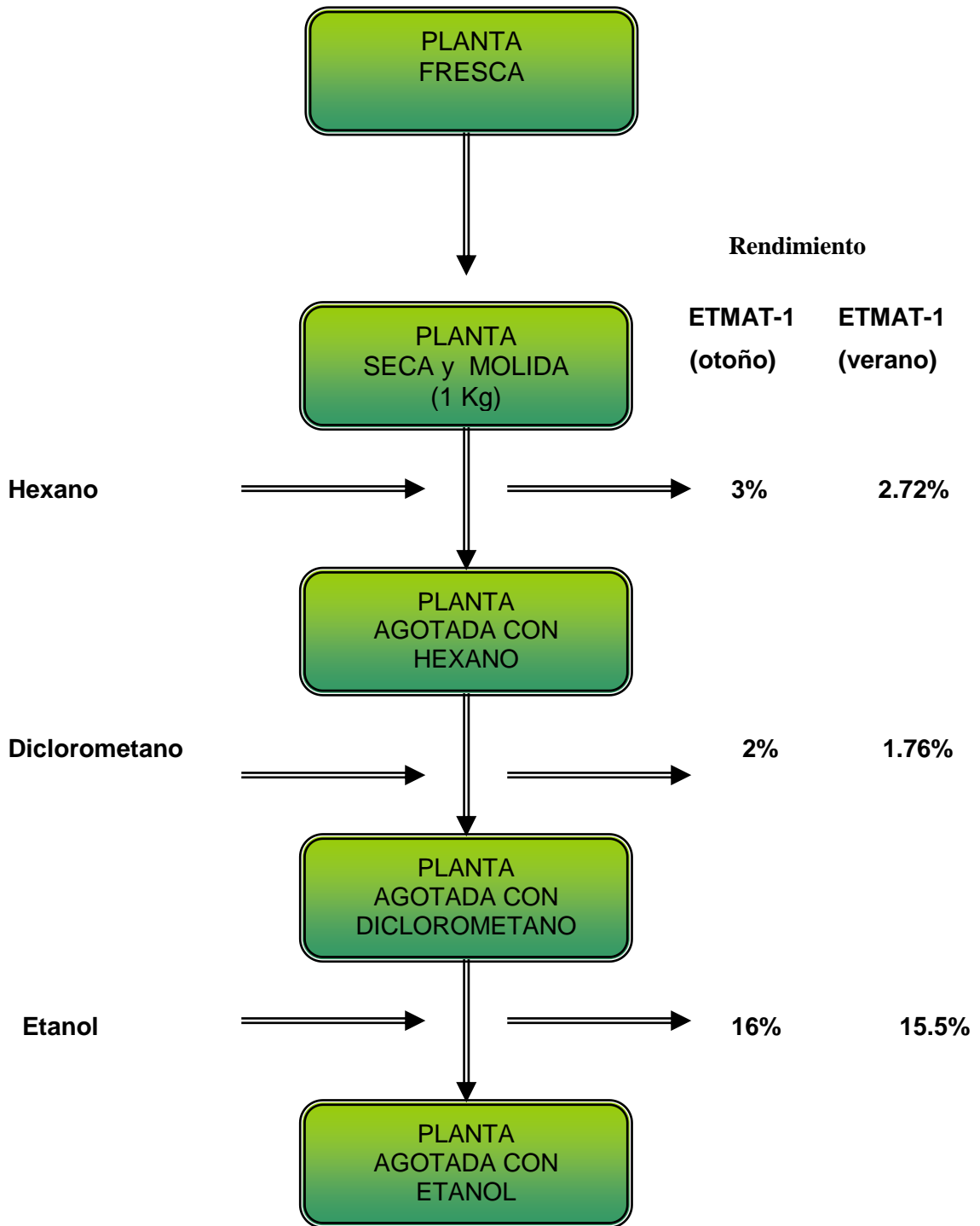
Con el material seco y molido (1Kg) se procedió a realizar sucesivas extracciones con disolventes de polaridad creciente. De las muestras recolectadas en otoño se obtuvieron 29 g de extracto hexano (EHEx), rendimiento equivalente a 3%; 20g de diclorometano (EDCM), rendimiento equivalente a 2% y 160g del extracto etanólico (ETMAT-1(otoño)) con un 16%de rendimiento.

En el caso de la recolección realizada en noviembre se obtuvo un rendimiento de 13.6 g de extracto hexano (EHEx), rendimiento equivalente 2.72 %, 8.8 g de diclorometano con un rendimiento de (EDCM), rendimiento equivalente a un 1.8 % y 165 g del extracto etanólico (ETMAT-1(verano)) con un 15.5%de rendimiento.

Cada extracción se realizó hasta agotamiento del material vegetal a temperatura ambiente, dejando secar la planta entre cada extracción, antes de adicionar un nuevo disolvente.

Todos los extractos obtenidos fueron llevados a sequedad en un evaporador rotatorio hasta total eliminación del solvente, para ser sometidos a las pruebas químicas y farmacológicas. (Figura N° 3)

**FIGURA N°3: ESQUEMA DE EXTRACCIÓN DE *B. GLOBOSA***



#### **4.1.3 Estudio cromatográfico.**

El seguimiento de la composición química del extracto EMAT-1(verano), ETMAT-1(verano), ETMAT-1(otoño), EMG(verano) y de sus fracciones, se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina (ccf) para visualizar las similitudes y diferencias entre ellos así como también de sus fracciones, además para compararlos con patrones de flavonoles, para lo cual se empleó como fase estacionaria gel de sílice G tipo 60 con indicador de fluorescencia de 0,2 mm de espesor y distintos sistemas de disolvente, según la polaridad de los distintos extractos y fracciones. Las ccf fueron observada a la luz UV, a 254 y 366 nm, y reveladas con diferentes reactivos de coloración (Wagner and Bladt, 1996) para visualizar los grupos químicos más abundantes.

Los reactivos reveladores fueron:

- Reactivo de p-anisaldehído sulfúrico (AS). Este reactivo preparado con p-anisaldehído, ácido acético glacial, metanol y ácido sulfúrico concentrado, permite detectar la presencia de terpenos y otras sustancias triterpénicas, por medio de la aparición de coloraciones que varían del azul al violeta.
- Reactivo NP/PEG: este reactivo constituido por difenil-boriloxietilamina seguido de polietilenglicol-4000, permite la detección de flavonoides. Se produce una intensificación de su fluorescencia a una longitud de onda de 366 nm, como también de feniletanoides.

#### 4.1.4 Fraccionamiento de columna por medio de un gel de sílice.

El fraccionamiento se realizó a partir de 29 g de EMAT-1(verano) obtenido de acuerdo al esquema de la figura 1, utilizando sucesivas columnas de gel de sílice rápida, usando mezclas de disolventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. El fraccionamiento, los eluyentes, las fracciones obtenidas junto con la fase móvil usada en el seguimiento cromatográfico, se resumen en la siguiente tabla

**Tabla Nº 1: Fraccionamiento columna EMAT- 1(verano)**

<b>Solvente/ volumen (ml)</b>	<b>Fracción</b>	<b>ccf liquido de desarrollo</b>
<b>DCM :AcEt 60 :40/500</b>	<b>12-13</b>	<b>DCM : AcEt 5:5</b>
<b>DCM :AcEt 50 :50/500</b>	<b>14-18</b>	<b>DCM : AcEt 5:5</b>
<b>DCM :AcEt 40 :60/500</b>	<b>19-22</b>	<b>AcET: MEOH 9:1</b>
<b>DCM :AcEt 30 :70/500</b>	<b>23-27</b>	<b>AcET: MEOH 9 :1</b>
<b>DCM :AcEt 20:80/500</b>	<b>28-31</b>	<b>AcEt: Ác. acet: Àc. For: agua 10 : 1,1 : 1,1 :2,6</b>
<b>AcEt/ 100/500</b>	<b>32-49</b>	<b>AcEt: Ác. acet: Àc. For: agua 10 : 1,1 : 1,1 :2,6</b>
<b>AcEt :MEOH 95 :5/500</b>	<b>50-52</b>	<b>AcEt: Ác. acet: Àc. For: agua 10 : 1,1 : 1,1 :2,6</b>
<b>AcEt :MEOH 95 :5/500</b>	<b>53</b>	<b>AcEt: Ác. acet: Àc. For: agua 10 : 1,1 : 1,1 :2,6</b>
	<b>54</b>	
	<b>55-56</b>	

#### **4.1.5 Valoración espectrofotométrica y validación del método**

##### **4.1.5.1 Valoración espectrofotométrica por el método de Glories**

El método de Glories permite cuantificar tres familias de compuestos de naturaleza fenólica : fenoles totales expresados como ácido gálico a 280 nm, ésteres del ácido cafeico expresados como ácido cafeico a 320nm y flavonoides expresados como quercetina a 360nm.

Se utilizó el método espectrofotométrico de Glories como base y se adaptó para la valoración de distintas familias de compuestos del extracto alcohólico (EMAT-1(verano) y ETMAT-1(otoño)) purificado y bioactivo de *Buddleja globosa*.( matico) (Mazza *et al.* 1999).

Para las mediciones espectrofotométricas se utilizó un espectrómetro UV/Vis Unicam UV3 (numero de serie: 022902).

Para obtener las curvas de calibración se prepararon soluciones madres de los respectivos patrones (ácido gálico, ácido cafeico y quercetina) a concentraciones apropiadas para la obtención de las concentraciones decrecientes que permitieran construir la curva de calibración de cada estándar de modo que las absorbancias sean adecuadas y representativas de la concentración (entre 0.200 y 0.800)

Con respecto a los extractos: el EMAT-1(verano), EMG(verano) se determino trabajar a una sola concentración, el ETMAT-1(otoño) y ETMAT-1(verano) se determinaron trabajar a dos concentraciones distintas

Para la determinación de las absorbancias, y reproducibilidad de los resultados las concentraciones a las que se trabajó en todos nuestros extractos fue de : 0.7mg/ml y 1mg/ ml, por triplicado.

Se prepararon 25 ml para obtener tres soluciones madres de cada una de las concentraciones. Se usó como solvente etanol 10% y antes de enrasar se sonicaron por 2 min a 50° C para facilitar su disolución.

Las muestras se trataron de acuerdo al protocolo siguiente:

**Tabla Nº 2: Protocolo para valoración del método espectrofotométrico.**

<b>Solución</b>	Solución madre	HCl 0.1% en EtOH 95%	HCl 2%	Volumen total
<b>Volumen</b>	0.05 ml	0.05 ml	0.9 ml	1ml
<b>Proporción</b>	1	1	18	

Una vez mezcladas las soluciones, los tubos se dejaron reposar por 15 minutos, y luego se procedió a leer las absorbancias de cada tubo a las tres longitudes de onda 280, 320, 360 nm.

El ácido gálico tiene su máxima absorbancia a la longitud de onda de 280 nm, el ácido cafeico tiene su máxima absorbancia a la longitud de onda de 320nm, pero también presenta absorbancias mínimas a 280 y 360nm interfiriendo así con la señal correspondiente al ácido gálico y a la quercetina; el patrón quercetina posee su máxima absorbancia a los 360 nm y además presenta absorbancias mínimas a las longitudes de onda 280 y 320 nm.

Las siguientes observaciones tuvieron que ser consideradas para los objetivos planteados en nuestro estudio:

Existe una adición de señales a 280nm del cromóforo quercetina, ácido cafeico y ácido gálico, a 320nm interfiere la quercetina con el ácido cafeico y a 360nm presenta su máxima absorción la quercetina y una absorción muy leve el ácido cafeico. Así se llegó a establecer una primera ecuación que da cuenta de la cantidad de flavonoles expresados como quercetina empleando una curva de calibración absorbancia versus concentración de quercetina.

#### 4.1.5.2 Validación del método.

Se llama validación a la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos.

De acuerdo a los criterios internacionales referentes a los trabajos de investigación es preciso entregar una validación completa del método analítico a desarrollar, considerando los parámetros de calidad analítica establecidos. Por lo que fue necesario comprobar al menos la reproductibilidad, precisión, selectividad, robustez, límites de cuantificación y detección del método.

**-Reproducibilidad:** es la capacidad del método de obtener los mismos resultados cambiando las condiciones de trabajo (equipos de trabajos, las personas que realizan los ensayos días, etc.)

**-Precisión :** es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea, es decir, es la distribución de los valores alrededor de su media.

**-Selectividad :** es la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en la misma muestra.

**-Robustez :** el estudio de robustez evalúa los efectos de pequeños cambios en las condiciones operacionales del análisis sobre la fiabilidad del método analítico.

**-Limite de detección :** según la IUPAC , es la menor concentración de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado. Es la concentración o cantidad mínima de analito a partir de la cual es factible realizar el análisis.

**-Limite de cuantificación :** es un parámetro analítico de gran interés en ensayos de limite, análisis de trazas, contaminantes y productos de degradación

#### 4.1.6 Diseño de un método por HPLC.

Se estableció un diseño por HPLC para determinar los mejores parámetros con los cuales trabajar para diferenciar de mejor manera los compuestos que estaban presentes en nuestros extractos, sabiendo que los compuestos mas importantes eran los flavonoides y feniletanoides.

Para esto se hizo una variación en el método de determinación de flavonoles del Ginkgo biloba ( Dubber et.al., 2004) en el cual se determinaron 5 flavonoides presentes en el extracto: rutina, quercetina, canferol, quercitrina e isoramnetina los cuales se compararon con sus respectivos patrones.

Las ventajas de este método es que no se requiere realizar la hidrólisis de los glicósidos.

Fueron utilizados por nosotros los extractos EMAT-1(verano), ETMAT-1( otoño) y ETMAT-1( verano). Además de algunas fracciones que fueron purificadas del extracto EMAT-1(verano) y ETMAT-1(otoño) por una columna de gel de sílice .

Nuestros patrones fueron los siguientes flavonoides: rutina, canferol (flavonoles), apigenina, crisoeriol, hispidulina (flavonas) y otros fenoles como el ácido gálico y ácido cafeico.

Cada una de nuestras muestras fueron disueltas en metanol: agua =50 :50 y se trabajó con diferentes columnas, fases móviles, flujos y longitudes de onda , en la búsqueda de la mejor separación y resolución de las señales.

-Columnas: Genesis C<sub>18</sub> 15 cm, genesis C<sub>18</sub> 25cm, novapack N° 3 C<sub>18</sub> 30 cm, novapack N° 7 C<sub>18</sub> 30 cm.

-Fases móviles: ácido fórmico 0.3%: acetonitrilo = 75:25

ácido fórmico 0.3%: acetonitrilo = 85:15

ácido fórmico 0.3%: acetonitrilo = 70:30

ácido fórmico 0.1%: acetonitrilo = 75:25

-Flujos :0.7 , 1 , 1.5 mL/min

-Longitud de onda : 350 , 365 nm.



#### **4.1.6 Técnicas espectroscópicas**

La elucidación estructural se realizó mediante distintas técnicas espectroscópicas tales como RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C e IR.

Los espectros de RMN se realizaron en un Bruker de 300/75 MHz, usando TMS como estándar interno y disuelto en C<sub>5</sub> D<sub>5</sub> N.

Los espectros IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo 1310, en KBr al 10%.

## **4.2 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO**

### **Aspectos éticos a considerar para el trabajo con animales**

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

Por otra parte, 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.

## **4.2.1 Ensayos farmacológicos vía tópica.**

### **4.2.1.1 Evaluación de la actividad analgésica (Test de la formalina)**

Este ensayo tiene como objetivo evaluar y comparar la analgesia vía tópica de los 4 diferentes extractos de *B. globosa*, para este propósito se utilizaron ratones de la cepa CF-1 de igual sexo, entre 20 a 25 g de peso y de edad de 30 a 35 días de la unidad de mantención de animales del ISP.

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

Para realizar el ensayo, los animales fueron escogidos aleatoriamente. Se tomaron 10 animales, de los cuales 8 fueron tratados con la muestra y 2 como controles, a los que se les aplicó sólo el agente algésico.

Para cada ensayo se tomaron 2 controles hasta formar un “pool” de 16, con el objeto de tener el número adecuado para realizar el tratamiento estadístico.

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

La muestra en estudio se aplicó vía tópica, introduciendo la cola, en un tubo de ensayo que contiene la solución de la muestra en DMSO al 5%, durante 3 minutos. Se sacó la cola, se secó y se le inyectó intradermicamente (i.d.) agente algésico (20 uL de solución de formalina en agua estéril) en el tercio inferior.

La formalina fue ensayada a la concentración de 10 % p/v y posterior a la inyección se procedió a contar el tiempo máximo durante el cual el animal se lame la cola (Kolesnikov et al., 2004), durante los 5 min posterior a la inyección del agente algésico.

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

En el caso del ensayo de la formalina en la cola, para calcular el % de efecto analgésico (% A), se trabajó con las medianas del grupo en estudio y del grupo control (el cual recibe solamente el agente algésico) mediante las siguientes fórmulas:

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

$$\% A = 100 - \% D$$

Donde:

%D: porcentaje dolor.

Med Tlad C mediana tiempo lamidas grupo control.

Med Tlad M: mediana tiempo lamidas animales tratados.

% A: porcentaje analgesia.

### **Tratamiento estadístico**

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

#### **4.2.1.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica**

La actividad antiinflamatoria tópica fue evaluada por el método de la inducción de edema en orejas de ratones con el agente inflamatorio TPA (acetato de sorbol), este agente provoca una inflamación tópica mas lenta estimulando la liberacion de los leucotrienos, entre otros mediadores químicos, que también son inductores del proceso inflamatorio pero se forman más tardíamente (Lloret y Moreno, 1995; Delporte y col., 2002).

Se utilizaron ratones de la cepa CF-1 convencional de ambos sexos no consanguíneos con un peso de 20 a 25 g los que se mantuvieron en ayunas 12 horas antes de cada ensayo y agua ad libitum.

Para cada prueba se utilizaron diez ratones de los cuales a ocho se les aplicó el compuesto a estudiar y dos se dejaron de controles a los que sólo se les aplicó la sustancia inflamatoria (TPA) que fue disuelta en acetona a una concentración de 1,25 µg/10 µL .

Los compuestos a ensayar, solubilizados en acetona o etanol al 80 %, se aplicaron vía tópica, a la concentración de 3mg/20µL en la oreja derecha del ratón (10 µL por cada cara de la oreja) y el vehículo se aplicó en la oreja izquierda de la misma forma que la muestra en estudio, luego de cinco minutos se aplicó nuevamente en la oreja derecha 20 µL del agente inflamatorio (TPA) y en la izquierda el vehículo. Pasado el tiempo necesario para que se produzca la inflamación máxima, que para el TPA es de cuatro horas, se procedió a sacrificar los animales mediante dislocación cervical y a continuación se cortaron trozos de 6 mm de diámetro de ambas orejas, los cuáles fueron pesados para obtener las diferencias de pesos entre los trozos cortados, de cada animal. De esta forma la inflamación se estableció como el aumento de peso (edema) de la porción de oreja derecha que recibió el agente inflamatorio y la muestra con relación al peso de la porción de la oreja izquierda que sólo recibió tópicamente el vehículo (Delporte et al., 2002).

La mediana obtenida de las diferencias de peso de las orejas derecha y orejas izquierdas de los ocho ratones que recibieron la muestra, comparada con la mediana de las diferencias de pesos de las orejas derechas y orejas izquierdas de 16 ratones controles nos permitieron calcular el porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico (%EAIT)

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

$M_{ODC-OIC}$ : Mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales controles.

$M_{ODM-OIM}$ : Mediana de las diferencias de peso de las orejas derecha e izquierda de los animales que recibieron la muestra.

El fármaco de referencia utilizado para el ensayo del TPA fue indometacina .

#### **4.2.1.3 Ensayo tail flick via tópica.**

Para el ensayo del tail flick en cada extracto a estudiar se utilizaron grupos de 6 ratones de la cepa CF-1 de ambos sexos, entre  $28 \pm 2$  g, los cuales son ambientados a las condiciones del laboratorio 2 horas previas al ensayo. Este ensayo identifica principalmente los analgésicos que actúan a nivel central. Se indujo un dolor agudo térmico mediante la aplicación de radiaciones I.R. en la cola del ratón en el punto de su incidencia. Este experimento se realiza mediante el uso de un algesiómetro (Ugo Basile, Italia), el que mide el tiempo que el animal es capaz de soportar el calor (tiempo de latencia), lo que es proporcional al efecto analgésico de la muestra (Miranda et al., 2003). Se determinaron y compararon los valores de los tiempos de latencia de los animales controles y los animales tratados. Una vez administrada la muestra en estudio, la cual consistió en una solución del extracto al 5% p/v en DMSO, se sumergió la cola del animal por un tiempo de 3 minutos y posteriormente, se esperó 5 minutos antes de realizar la algesiometría. Para la evaluación de la actividad antinociceptiva, se construyeron curvas dosis-respuesta de las muestras administradas, las cuales se ensayaron a las dosis 5%p/v, 2.5%p/v, 1.25%p/v y 0.625%p/v en DMSO.

Para el ensayo del tail flick los resultados fueron expresados como la diferencia en el tiempo de latencia (media  $\pm$  S.E.M.) entre la media de las dos lecturas de controles y el delta latencia experimental, datos con los cuales se calculó el % MEP (Maximun Possible Effect) mediante la siguiente fórmula

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

Donde:

Lat 1: tiempo de latencia previo de la administración del extracto.

Lat 2: tiempo latencia posterior a la administración del extracto.

T cut –off: tiempo máximo de exposición de la cola al calor, el cual, es de 8 seg.

### **Tratamiento estadístico**

La significancia estadística entre los grupos fue calculada por el test de student. Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. La dosis que produce un 50 % o un 25 % del efecto máximo, se calculó mediante análisis de regresión lineal de los cuadrados mínimos.

#### **4.2.2 Ensayos farmacológicos vía oral.**

##### **4.2.2.1 Ensayo tail flick vía oral.**

La algesiometría vía oral se realizó utilizando el ensayo del tail flick, usando como vehículo Tween 80 al 2% en agua destilada. Con este ensayo se evaluaron las muestras EMAT-1(verano), ETMAT-1(otoño), ETMAT-1(verano) y EMG(verano) a las dosis de 200mg/Kg, 100mg/Kg, 50mg/Kg y 12,5mg/Kg.

Se utilizaron 6 ratones de la cepa CF1 de  $28 \pm 2$  g de peso para evaluar cada extracto a sus respectivas dosis.

A cada animal se le administró por vía oral mediante una cánula un volumen de 0,4 mL de cada muestra a evaluar. Luego de la administración, se esperó un tiempo de 30 min antes de realizar la algesiometría con el fin de que se absorbiera la muestra en el tracto gastrointestinal.

Para el ensayo del tail flick los resultados fueron expresados como la diferencia en el tiempo de latencia (media  $\pm$  S.E.M.) entre la media de las dos lecturas de controles y el delta latencia experimental, datos con los cuales se calcula el MPE% (Maximun Possible Effect) mediante la siguiente fórmula (Miranda et al., 2004):

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

Posible efecto máximo de analgesia vía oral mediante ensayo del tail flick.

Donde:

T Lat 1: tiempo de latencia antes de la administración del extracto.

T Lat 2: tiempo latencia posterior a la administración del extracto.

T cut –off: tiempo máximo de exposición de la cola al calor el cual es de 8 seg.

### **Tratamiento estadístico**

La significancia estadística entre los grupos fue calculada mediante el test de student. Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

La dosis que produce un 50 % o un 25 % del efecto máximo, se calcularon mediante análisis de regresión lineal de los cuadrados mínimos.

#### **4.2.2.2 Ensayo de las contorsiones abdominales**

Se utilizaron ratones de la cepa CF1, de ambos sexos con un peso de  $28 \pm 2$  g, las muestras a estudiar fueron EMAT-1(verano), ETMAT-1(otoño), ETMAT-1(verano) y EMG(verano). Para los extractos EMAT-1(verano) y ETMAT-1(otoño), se calculó la analgesia a las dosis de 200 mg/kg; 100 mg/kg; 50mg/kg; 25mg/kg, datos con los cuales se realizó la curva dosis/respuesta, y se obtuvieron sus respectivas  $ED_{50}$  y  $ED_{25}$ .

Para cada extracto a sus respectivas dosis, se administro vía oral 0,4 ml de la muestra, a cada animal, utilizando como vehículo Tween 80 al 2% en agua destilada. Transcurridos 30 min de la administración de la muestra, los animales fueron inyectados vía i.p. con 0,1 mL/10 g ratón de ácido acético al 0,6 %. El número de contorsiones fue contabilizado luego de 30 min de la administración del ácido acético y durante un intervalo de 5 min.

Se describe como contorsión, a la contracción de los músculos abdominales, acompañados por una elongación del cuerpo y extensión de las patas traseras.

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  S.E.M del número de contorsiones.

La actividad antinociceptiva fue calculada comparando la media del número de contorsiones de los animales tratados con respecto a la media de los animales controles, los cuales sólo recibieron el vehículo (suero salino).

$$\% \text{ AN} = 100 - (W_{\text{exp}}/W_{\text{c}}) \times 100$$

*Donde:*

%AN: porcentaje antinocicepción.

W exp: media de contorsiones animales tratados

Wc: media de contorsiones animales controles.

#### **Tratamiento estadístico**

La significancia estadística entre los grupos fue calculada mediante el test de student. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.



### **4.3 Estudio *in vitro***

#### **4.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra en superficie de agar.**

Mediante este ensayo se evaluó la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto ETMAT-1(otoño) y EMAT-1(verano). Para llevar a cabo el ensayo, se preparó una solución madre del extracto de una concentración de 100 mg/mL en DMSO, de la cual se toman alícuotas de 20 uL y 40 uL, y se agregaron a dos porciones de 20 mL de una solución de agar fundido TSA (Tryptic soy agar) por separado, obteniéndose de esta manera dos soluciones de cada extracto con concentraciones finales de 100 y 200 ug/mL

La solución de extracto en agar se dejó solidificar en cápsula de petri y una vez frío se procedió a la siembra de las cepas de microorganismos en forma lineal y en superficie, mediante un asa de micrón estéril.

Los microorganismos son incubados a 37 °C por 24 horas para el caso de bacterias y a 28 °C durante 48 horas, para hongos (Erazo et al., 1997).

Para determinar si existe actividad antimicrobiana y/o antifúngica, las cápsulas que contenían los extractos en estudio fueron comparadas con cápsulas controles que contenían sólo agar fundido con las cepas de microorganismos .

Los microorganismos utilizados se encuentran indicados en farmacopea (USP XXII) para la valoración de antibióticos, obtenidos de American type Culture Collections

**Tabla N°3 : Microorganismos Utilizados para Todas las Pruebas Microbiológicas**

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

#### **4.3.2 Ensayo Bioautografía**

Mediante este ensayo se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos y compuestos aislados, los cuales fueron sembrados en placas de gel de sílice 60 (Merck) y se determinó la fase móvil más apropiada para cada uno de ellos (Tabla N° 4).

Se prepararon caldos de cultivo de las diferentes cepas, utilizando como medio líquido de cultivo TSB (Tryptona soy Broth) para bacterias y PDB (potatoes dextrose broth) para hongos. Cada microorganismo en estudio fue resuspendido en duplicado mediante un asa de micrón estéril en 3 mL de su correspondiente medio según sea bacteria u hongo, los cuales fueron obtenidos de una siembra de agar inclinado.

Las bacterias fueron incubadas a 37 °C por 24 horas y los hongos a 28 °C por 48 horas.

Los cromatogramas fueron expuestos a la luz U.V. ( $\lambda$  254 nm), durante 30 min con el fin de esterilizarlos previo a realizar el ensayo.

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

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

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

**Tabla N° 4: Fases móviles de cromatogramas para bioautografías**

Compuesto	Fase Móvil
EMAT-1(verano)	BAW
ETMAT-1(otoño)	BAW

BAW ( n-butanol:ácido acetico:agua = 4:1:5)

### **4.3.3 Ensayo de la Xantino oxidasa**

Este ensayo nos permitió determinar la actividad antioxidante ETMAT-1(otoño), esto es, si el extracto mencionado inhibe la xantino oxidasa (XO), la cual es una enzima que cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y a ácido úrico, al mismo tiempo se produce la reducción de oxígeno generando radicales libres. En la fase de reperusión de un tejido previamente isquémico, XO produce grandes cantidades de anión superóxido capaces de producir la lipoperoxidación de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares conllevando a la lesión de ellas. La actividad se evaluó a través de la medición de ácido úrico, el cual presenta una absorción (A) a una  $\lambda$  de 290 nm en un espectrofotómetro UNICAM (Kalcklar, 1947).

La solución de xantina (X) de (Sigma) se preparó tomando 11,4 mg en 500 mL de agua bidestilada sonicando durante 2 a 3 horas a 60°C. La enzima (Sigma) se utilizó a la concentración de 0,006 U/mL en buffer de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a un pH de 7,5. Para determinar la concentración de enzima a utilizar se ensayó a distintas concentraciones de enzima para obtener el gráfico absorbancia (A) vs concentración. La concentración de enzima que dió la A requerida para trabajar (0,300-0,400) fue de 0,006 U/mL.

Los extractos fueron evaluados a 50 mg/mL (Theoduloz et al., 1991). A las muestras en estudio se les adicionó 3 a 4 gotas de DMSO y a continuación el agua bidestilada y si corresponde, se sonicó. Las muestras fueron evaluadas en duplicado. Para finalizar el ensayo se utilizó HCl 1 N (40,9 mL de ácido concentrado en 500 mL de agua bidestilada). El protocolo del ensayo se detalla en la Tabla N°5.

**Tabla Nº 5 : Protocolo del Ensayo de Xantino/Xantino a Oxidasa.**

TUBOS	a	b	c	d
1. Extracto	—	—	1 mL	1 mL
2. Agua bidestilada	1 mL	1 mL	—	—
3. Buffer	2,9 mL	3 mL	2,9 mL	3 mL
4. Xantina Oxidasa	0,1 mL	—	0,1 mL	—
Pre.incubar a	25 °C por 15 min			
5. Xantina	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Incubar a 25° C	por 30 min			
6. HCl	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Medir A ácido úrico 290 nm	Ac.úrico total	Blanco de a	Ac. Úrico remanente	Blanco de c
VOLUMEN TOTAL	7 mL	7 mL	7 mL	7 mL

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

El porcentaje de inhibición (%I) se calcula según la siguiente fórmula:

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

%I : Porcentaje de inhibición de la XO.

Donde:

A : absorbancia.

Aa: absorbancia del tubo a.

Ab: absorbancia del tubo b.

Ac: absorbancia del tubo c.

Ad: absorbancia del tubo d.

Aa-Ab: absorbancia del ácido úrico total

Ac- Ad: absorbancia del ácido úrico remanente

El fármaco de referencia utilizado fue el alopurinol y para determinar su concentración inhibitoria cincuenta (IC<sub>50</sub>) se ensayaron diferentes concentraciones de este fármaco. Del gráfico %I vs concentración se obtuvo el IC<sub>50</sub> que resultó ser 0,035 mg/mL.

La significancia de los resultados se calculó con el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativos para un  $p \leq 0,05$ .

#### 4.3.4 Determinación de Actividad Antioxidante mediada por DPPH

Para la búsqueda de agentes atrapadores de radicales libres se empleó el bioensayo "in vitro" del DPPH, el cual se fundamenta en que el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) es de color violeta intenso. Al ser capturado su radical libre, el compuesto pierde su color característico, haciendo posible cuantificar la capacidad captadora que poseen distintas sustancias al determinar el grado de decoloración que dichos compuestos provocan a una solución metanólica de DPPH.

Se preparó una solución metanólica fresca de DPPH de 20 mg/L. Se prepararon además soluciones metanólicas de los compuestos a ensayar en un rango de concentraciones desde 1 µg/mL hasta 200 µg/mL de acuerdo a la actividad encontrada. Se mezclan volúmenes de DPPH y soluciones de las muestras, de acuerdo a protocolo indicado en tabla . Se esperó 5 min y luego se procedió a leer en el espectrofotómetro a 517 nm.(Tapia, 2000). El cálculo del % de decoloración (capacidad atrapadora de radicales libres) se determinó empleando la siguiente fórmula:

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

Un valor igual a 100 corresponde a la máxima capacidad atrapadora. El grado de decoloración indica la eficiencia de las sustancias como captadoras de radicales libres. Como sustancia de referencia se utilizó quercetina usando concentraciones entre 1,25 a 7,5 µg/mL. Los valores fueron presentados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres determinaciones. Se determinó además, la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>).

**Tabla N° 6: Protocolo de ensayo de DPPH.**

	Muestra ( $\mu\text{L}$ )	Blanco de muestra( $\mu\text{L}$ )	Control ( $\mu\text{L}$ )
Muestra	375	375	0
DPPH	750	0	750
Metanol	0	750	375
volumen total ( $\mu\text{L}$ )	1.125	1.125	1.125



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Estudio químico.

#### 5.1.1 Estudios cromatográficos.

En nuestro estudio cromatográfico se pudo hacer la comparación de todos los extractos de *B.globosa* con los cuales trabajamos, EMAT-1(verano), ETMAT-1(verano), ETMAT-1(otoño) y EMG(verano) y pudimos constatar que todos los extractos de hojas recolectadas en verano independiente del solvente utilizado etanólico o metanólico al ser cromatografiados y revelados con el reactivo NP/PEG presentaban las mismas manchas y fluorescencia a 364nm, siendo estas mas intensas que en el extracto de hojas recolectadas en otoño, lo que nos indica que los flavonoles, se encuentran en mayor cantidad en los extractos de hojas en el periodo de verano, sin embargo en el extracto ETMAT-1(otoño) se pudo observar una fluorescencias pero más tenues. Terpenos y otras sustancias triterpénicas también existían en todos los extractos. Los resultados de las cromatografías se resumen en la Tabla N° 5.1.1.

**Tabla N° 5.1.1: Perfil cromatografico de los distintos extracto de *B. globosa*.**

EXTRACTO	Sistema Disolvente	NP/PEG	AS
EMAT-1(verano)	BAW*	+	+
ETMAT-1(otoño)	BAW*	+	+
ETMAT-1(verano)	BAW*	+	+
EMG(verano)	BAW*	+	+

BAW\* = ( n-butanol: ácido acético: agua = 4:1:5)

Se entiende por (+) cuando se observa una o mas manchas de coloración intensa al revelar.

Además se realizaron cromatografías comparativas para buscar los flavonoles presentes en los extractos usando patrones de referencia, y se pudo evidenciar la presencia de apigenina y quercetina en los extractos ensayados ya que las coloraciones

y los  $R_f$  coincidían con los estándares , pero como era de esperar los extractos de verano presentaban una mayor concentración.

### 5.1.2 Fraccionamiento en columna por medio de un gel de sílice.

El fraccionamiento de los extractos de *B.globosa* , mediante columnas adquiere una connotación importante, pues si bien no es una etapa imprescindible dentro de los objetivos planteados por nosotros, esta técnica permite el aislamiento, purificación y visualización de metabolitos presentes en diferentes fracciones del extracto mediante ccf y HPLC.

La purificación se realizo con el fin de identificar los compuestos que están en mayor concentración en el extracto a los que se les puede atribuir las propiedades farmacológicas.

De acuerdo a los primeros resultados del fraccionamiento y lo observado por cromatografías, las primeras fracciones contenían sólo clorofila y fueron eliminadas. Las siguientes fracciones contenían compuestos en parte enmascarado por la clorofila, para luego a medida que aumento la polaridad, obtener fracciones enriquecidas en feniletanoides y flavonoides (ver tabla 5.1.2), las cuales fueron identificadas por RMN (resonancia magnética nuclear) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , HPLC (U.V)

Del fraccionamiento de EMAT-1(verano) se obtuvieron los siguientes compuestos que fueron apareciendo mientras aumentaba la polaridad del solvente.

-Glucósido *B* sitosterol: confirmada su presencia por ccf y I.R. en comparación con estándar.

-Quercetina : confirmada su presencia por CCF y HPLC (UV)

-RN1 y RN1' : confirmada su presencia por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$

-Apigenina: confirmada su presencia por CCF y HPLC (UV)

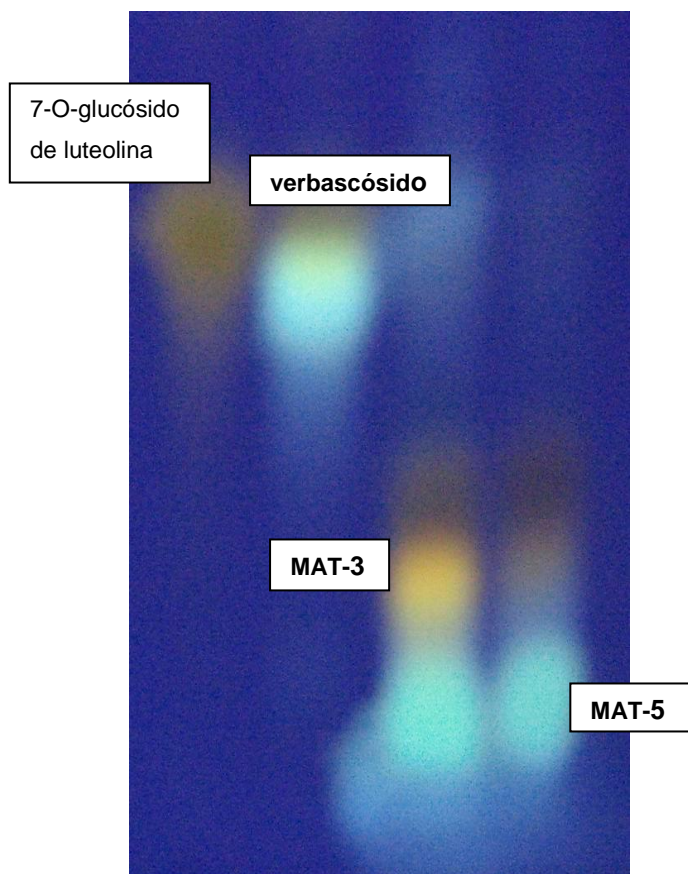
Además de 2 compuestos que le llamamos MAT3 y MAT5 que aparecen en las fracciones de más alta polaridad, pero que no se logro identificar a que compuestos corresponden exactamente, posiblemente sean flavonoles y fenietanoides.

Los compuestos encontrados con sus respectivas fracciones se resumen en la Tabla N° 5.1.2 y estos mismos compuestos revelados en CCF se muestran en las Fig. N° 4,5,6

**Tabla Nº 5.1.2: Resumen de las fracciones de EMAT-1 (verano)**

Solvente/ volumen (ml)	Fracción	CCF SOLVENTE	Compuestos	Rf
Hexano 100/500	1	DCM 100%	clorofila	
Hexano:DCM 75:25/500	2	DCM 100%	clorofila	
Hexano:DCM 50:50/ 500	3	DCM 100%	clorofila	
Hexano:DCM 25:75/500	4	DCM 100%	clorofila	
DCM 100/500	5	DCM : AcEt 9:1	clorofila	1
DCM :AcEt 90:10/500	6-7	DCM : AcEt 9:1	Revelado morado Anisaldehido	0,8
DCM :AcEt 80 :20/500	8-9	DCM : AcEt 7:3	Morado y Amarillo	0,4 – 0,5
DCM :AcEt 70 :30 /500	10-11	DCM : AcEt 7:3	Morado	0,4
DCM :AcEt 60 :40/500	12-13	DCM : AcEt 5:5	Quercetina	0,5
DCM :AcEt 50 :50/500	14-18	DCM : AcEt 5:5	Quercetina + otro flav	0,5 – 0,45
DCM :AcEt 40 :60/500	19-22	AcEt: MEOH 9:1	Flav y Gluc. β-sitosterol	0,4
DCM :AcEt 30 :70/500	23-27	AcEt: MEOH 9 :1	Gluc. β- sitosterol(hasta26) RN1 y RN1'(Verbascósido y 7-O-gluc-luteolina)	0,4- 0,3- 0,4
DCM :AcEt 20:80/500	28-31	AcEt: Ác. acet: Ác. For: agua 10 : 1,1 : 1,1 :2,6	RN1 y RN1'(Verbascósido y 7-O-gluc-luteolina) + apigenina	0,4-0,5 0,6
AcEt/ 100/500	32-49	AcEt: Ác. acet: Ác. For: agua 10 : 1,1 : 1,1 :2,6	RN1 y RN1'(Verbascósido y 7-O-gluc-luteolina)	0,4-0,5
AcEt :MEOH 95 :5/500	50-52	AcEt: Ác. acet: Ác. For: agua 10 : 1,1 : 1,1 :2,6	RN1 y RN1'(Verbascósido y 7-O-gluc-luteolina) + Mat- 3	0,4-0,5 0,3
AcEt :MEOH 95 :5/500	53	AcEt: Ác. acet: Ác. For: agua 10 : 1,1 : 1,1 :2,6	RN1 y RN1'(Verbascósido y 7-O-gluc-luteolina) + Mat-3, Mat-5	0,4-0,5 0,3-0,2
	54		Mat-X Mat-3, Mat-5	0,3-0,2
	55-56		Mat-3, Mat-5	0,3-0,2

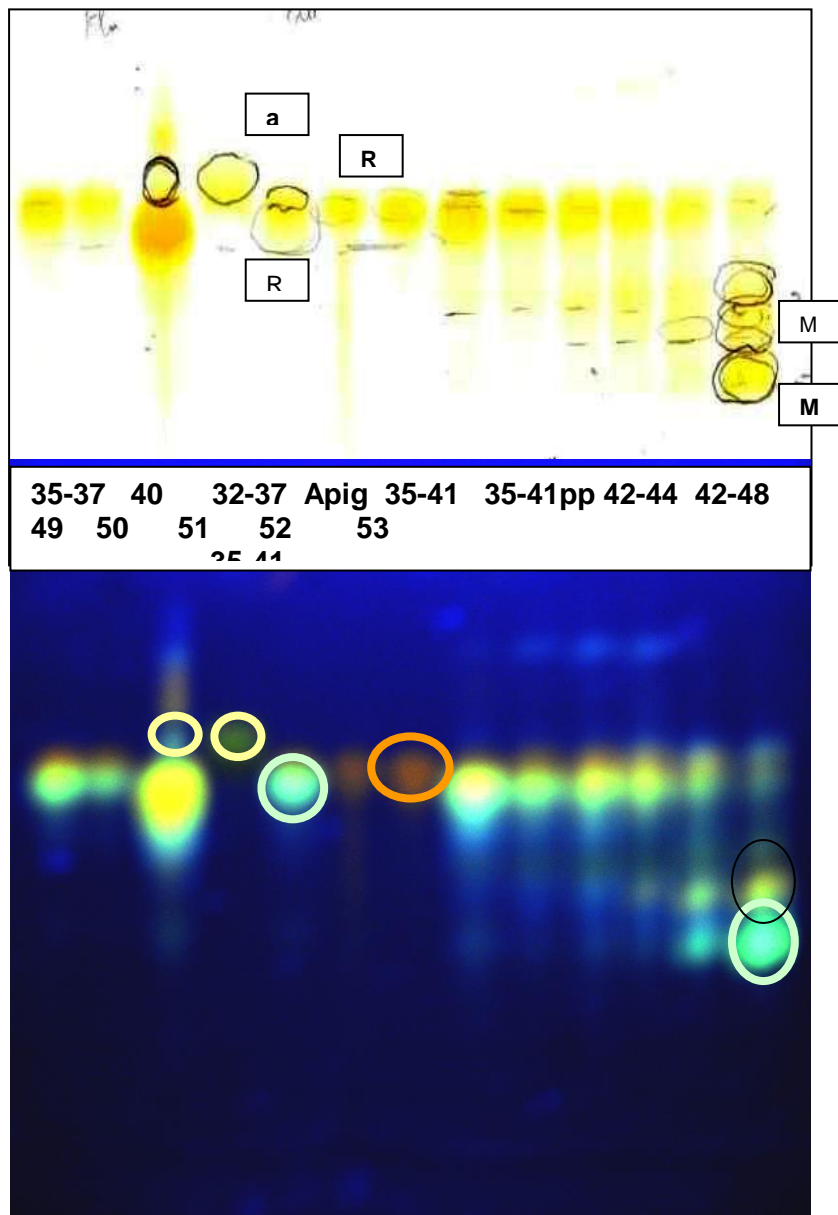
**Fig.10, 11 ,12 :Compuestos identificados por el fraccionamiento presentes en EMAT-1(verano)**



**Fig.10 :CCF**

-Fracciones:  
 (28-31)+32-49) (eluidas con AcEt 100 hasta AcET: MeOH= 95:5)  
 (53+54) (eluidas con AcEt:MeOH 95:5)  
 -Fase móvil: AcEt: : Ác. Acét.:,Ac. Fórmico: Agua=10:1,1,:1,1:2,6.  
 -Reactivo Revelador: NP/PEG

**Fig.11 :CCF. Revelada con NP al visible**



**Fig. 12 : CCF Revelada con NP y UV 360nm**

### 5.1.3 Valoración espectrofotométrica y validación del método

#### 5.1.3.1 Valoración espectrofotométrica por el método de Glories.

Se establecieron las curvas de calibración para cada uno de los patrones (ácido gálico, ácido cafeico y quercetina) a las tres longitudes de onda en estudio: 280, 320 y 360 nm., obteniéndose así las ecuaciones de absorbancias en función de la concentración que fueron empleadas para cumplir los objetivos propuestos.

Se desarrolló a continuación las ecuaciones de las rectas para determinar la concentración de los 3 patrones a las longitudes de onda y poder así corregir las concentraciones reales de derivados fenólicos (280), derivados del ácido cafeico y feniletanoides (320) y derivados de flavonoles (360).

De esta manera se establecieron las siguientes ecuaciones basadas en las curvas de calibración.

#### Curvas de calibración:

##### Para *ácido gálico* :

$$\text{Ec. 1 } A_{\text{gálico}}^{280} = 0.0484 C_{\text{gálico}} - 0.0853 \quad r = 0.9970$$

$$\text{Ec. 2 } A_{\text{gálico}}^{320} = 0.0030 C_{\text{gálico}} - 0.0362 \quad r = 0.9567$$

$$\text{Ec. 3 } A_{\text{gálico}}^{360} = 0.0014 C_{\text{gálico}} - 0.0362 \quad r = 0.8465$$

##### Para *ácido cafeico* :

$$\text{Ec. 4 } A_{\text{caf}}^{280} = 0.0586 C_{\text{caf}} - 0.0199 \quad r = 0.9964$$

$$\text{Ec. 5 } A_{\text{caf}}^{320} = 0.1017 C_{\text{caf}} + 0.0175 \quad r = 0.9978$$

$$\text{Ec. 6 } A_{\text{caf}}^{360} = 0.0154 C_{\text{caf}} + 0.0082 \quad r = 0.9838$$

##### Para *quercetina* :

$$\text{Ec. 7 } A_{\text{quercetina}}^{280} = 0.0189 C_{\text{quercetina}} - 0.0110 \quad r = 0.9987$$

$$\text{Ec. 8 } A_{\text{quercetina}}^{320} = 0.0235 C_{\text{quercetina}} + 0.0191 \quad r = 0.9994$$

$$\text{Ec. 9 } A_{\text{quercetina}}^{360} = 0.0474 C_{\text{quercetina}} + 0.0261 \quad r = 0.9996$$

Así la concentración de estos componentes en la muestra se calculo de acuerdo a:

$A^{360} \text{ muestra} = \text{Ec. 9}$  De esta ecuación se puede obtener la concentración de quercetina, luego

$A^{320} \text{ muestra} = \text{Ec. 8} + \text{Ec. 5}$  como ya conocemos la concentración de quercetina ahora despejamos la concentración de ácido cafeico.

$A^{280} \text{ muestra} = \text{Ec. 7} + \text{Ec. 4} + \text{Ec. 1}$  finalmente de esta ecuación obtenemos la concentración de ácido gálico

Para la reproducibilidad de los resultados se prepararon distintas soluciones madres de matico, y se midieron las absorbancias a las diferentes longitudes de onda, obteniéndose los siguientes resultados.

Los resultados experimentales de cada una de las concentraciones de los diferentes extractos fueron los siguientes:

**Tabla Nº 5.3.1.1: EMG (verano) de *B.globosa* a 1mg/ml.**

		<b>280nm</b>	<b>320nm</b>	<b>360nm</b>
	Media	<b>0.377</b>	<b>0.549</b>	<b>0.204</b>
1mg/ml	SD	0.009	0.008	0.006
	CV (%)	<b>2.380</b>	<b>1.518</b>	<b>2.704</b>

flavonoles: 6.8%

feniletanoides: 8.3%

fenoles totales(taninos): 6.1%

**Tabla N° 5.3.1.2 EMAT-1(verano) de *B.globosa* a una concentración.**

		<b>280nm</b>	<b>320nm</b>	<b>360nm</b>
	Media	<b>0,368</b>	<b>0,538</b>	<b>0,202</b>
1mg/ml	SD	0,004	0,006	0,003
	CV (%)	<b>1,028</b>	<b>1,074</b>	<b>1,594</b>

flavonoles: 7.2 %

feniletanoides: 8.2 %

fenoles totales(taninos): 7.7 %

**Tabla N° 5.3.1.3: ETMAT-1(otoño) de *B.globosa* a dos concentraciones distintas.**

		<b>280nm</b>	<b>320nm</b>	<b>360nm</b>
	Media	<b>0.247</b>	<b>0.293</b>	<b>0.107</b>
0.7mg/ml	SD	0.025	0.027	0.013
	CV (%)	<b>10.1</b>	<b>9.1</b>	<b>11.9</b>

flavonoles: 3.4 %

feniletanoides: 4.3 %

fenoles totales(taninos): 8.5 %

		<b>280nm</b>	<b>320nm</b>	<b>360nm</b>
	Media	<b>0.370</b>	<b>0.428</b>	<b>0.165</b>
1mg/ml	SD	0.013	0.009	0.007
	CV (%)	<b>3.38</b>	<b>2.11</b>	<b>4.24</b>

flavonoles: 5.8 %

feniletanoides: 7.6 %

fenoles totales(taninos): 8.6 %

**Tabla N° 5.3.1.4: ETMAT-1(verano) de *B.globosa* a dos concentraciones distintas.**

		<b>280nm</b>	<b>320nm</b>	<b>360nm</b>
	Media	<b>0.289</b>	<b>0.452</b>	<b>0.167</b>
0.7mg/ml	SD	0.014	0.012	0.008
	CV (%)	<b>4.844</b>	<b>2.655</b>	<b>4.790</b>

flavonoles: 8.4 %

feniletanoides: 8.7 %

fenoles totales(taninos): 7.9 %

		<b>280nm</b>	<b>320nm</b>	<b>360nm</b>
	Media	<b>0.339</b>	<b>0.539</b>	<b>0.189</b>
1mg/ml	SD	0.018	0.024	0.008
	CV (%)	<b>5.310</b>	<b>4.453</b>	<b>4.234</b>

flavonoles: 6.9 %

feniletanoides: 8.3 %

fenoles totales(taninos): 6.4 %

**Tabla N° 5.3.1.5 .Resumen de los porcentajes de compuestos presentes en los diferentes extractos de *B.globosa* a la concentración de 1mg/ml**

<b>% De</b>	<b>EMAT-1(Verano)</b>	<b>ETMAT-1. (Otoño)</b>	<b>ETMAT-1 (Verano)</b>	<b>EMG (verano)</b>
<b>Flavonoles</b>	7.4(+0.1)%	4.8%	6.9(7.2 –6.5)%	6.8(7.0-6.7)%
<b>feniletanoides</b>	8.2(+0.1)%	5.9%	8.3(9.2-7.9)%	8.3(8.4-8.1)%
Fenoles (taninos)	7.2(+0.1)%	9.6%	6.4(7.0-5.8)%	6.1(6.2-6.1)%



En este cuadro resumen en el cual podemos comparar la composición química de todos nuestros extractos a una misma concentración (1mg/ml), se puede apreciar que los flavonoles y feniletanoides se encuentran en mayor concentración en las hojas recolectadas en la época de verano, en cambio los fenoles (taninos) son más abundantes en el extracto de hojas obtenidas en otoño, lo que nos permite concluir que la época de recolección de las hojas influye en la composición química de los extractos y por ende hace variar las propiedades medicinales atribuidas a esta especie.

#### **5.1.3.2 Validación del método.**

Con respecto al objetivo del trabajo, de probar que el método propuesto tiene precisión, selectividad, robustez, y reproducibilidad se pudo concluir que si la tiene, los valores obtenidos están alrededor de una media (precisión), el método es capaz de detectar los compuestos químicos diferentes que están presentes en la muestra (selectividad), los resultados presentan concordancia entre las muestras provenientes de diferentes pesadas (robustez), es reproducibles porque se realizaron los ensayos con distintos operarios dando resultados muy similares. Se diseñó el método, estableciendo los procedimientos mínimos a realizar para obtener buenos resultados.

#### **Protocolo: Método de valoración.**

Esto quedó finalmente establecido de la siguiente manera

- Pesar una cantidad de muestra equivalente a 0,7-1,0 mg/ml.
- Una vez pesadas, las muestras deben disolverse en etanol al 10%
- Sonicar con calentamiento (50° C) por lo menos 10 minutos para asegurar la disolución.
- Las muestras deben filtrarse antes de proceder a la valoración.
- Leer las absorbancias.

Si no se realizan estos procedimientos mínimos, el método no tendrá robustez, ya que como se observó en éste análisis, las materias insolubles interfieren en la medición.

Los límites de detección y cuantificación son aceptables para el método, según los requisitos antes propuestos. El único inconveniente es el hecho de que son tres los grupos de compuestos a medir, y preparar una muestra con una cantidad suficiente de uno de ellos puede provocar que uno de los otros dos se salga del intervalo lineal, por lo que se hace indispensable hacer un estudio de estos rangos antes de pesar, y si es necesario, determinar uno de los compuestos por separado o no determinarlo para que el análisis de los otros sea lineal.

#### **5.1.4 Diseño de un método por HPLC.**

EL trabajo con HPLC permitió visualizar los compuestos presentes en los diferentes extracto de *B.globosa* al ser comparados con sus respectivos patrones.

Cabe destacar que se logró establecer en este estudio las mejores condiciones para el trabajo en HPLC, probando diferentes fases móviles, columnas, flujos y longitudes de onda.

Pudimos constatar que la fase móvil y la columna adquirirían notable importancia, porque al usar inadecuadamente una de éstas no se lograba una buena resolución de los peak, éstos se juntaban y enmascaraban a 2 o mas compuestos; o los tiempos de retención aumentaban demasiado lo que se traducía en un gasto de tiempo, fase móvil y agua que se agotaban rápidamente .

Como conclusión determinamos que las mejores condiciones eran:

- Fase móvil = ácido fórmico 0.1%: acetonitrilo = 75:25
- Columna = genesis C<sub>18</sub> 25cm
- Flujo = 1.5 ml/min
- Longitud de onda = 365 nm.

A continuación se resumen los Tr en orden creciente de las longitudes de onda de máxima absorbancia para distintos patrones, dentro de ellos flavonoides (geninas y heterósidos) y ácido cafeico (Tabla N° 5.1.4.1)

**Tabla N° 5.1.4.1: Patrones utilizados, tiempos de retención (TR) y longitudes máxima absorbancia .**

patrón	Tr	$\lambda$ max
ácido cafeico	5,543	216,5-238,8-323,0
rutina	6,675	255,4-354,1
apigenina	11,605	266,0-336,2
crisoeriol	12,708	250,6-346,9
quercetina	15,907	254,2-368,2
hispidulina	18,626	254,2-368,2
acacetina	22,026	254,2-368,2

Tr = tiempo de retención

UV =ultravioleta

En los extractos inyectados en el HPLC para su análisis se logró visualizar algunos de los patrones mencionados anteriormente, coincidiendo su Tr y su  $\lambda$  máximo en el espectro UV. Además se logro determinar la resolución óptima de los diferentes peaks correspondientes a los distintos constituyentes de las muestras y su espectro característico postulando posible presencia de flavonoides y de feniletanoides, que se resumen en las tablas a continuación ( Tabla 5.1.4.2 y Tabla 5.1.4.3.)

**Tabla Nº 5.1.4.2 : EMAT-1 (verano) y ETMAT-1 (otoño) de *B.globosa* con el cual se realizó la comparación entre ellas y con los patrones.**

EMAT-1(verano)	Tr	$\lambda$ max.	ETMAT-1(otoño)	Tr	$\lambda$ max.
	1.34	271.9		1.41	260.1
	2.04	267.5-325.4		1.95	282,6-348.6
	2.47	245.9-329.0		2.80	282.6-320.7
	2.94	285.0-320.7		3.03	No se lee
	3.17	323.0		3.31	No se lee
	3.44	288.5-319.5		3.58	No se lee
	3.61	323.0		4.30	330.2
	3.74	296.8-324.2		5.16	281.4-343.3
	4.07	319.5		5.60	330.2
	4.42	217.6-330.2		6.40	270.7-342.1
	5.32	281.4-343.3		6.63	251.8-332.6
	5.71	217.6-325.4	verbascósido	7.05	217.6-330.2
	6.12	283.8-327.8	7-O-glucósido de luteolina	8.45	266.0-345.7
	6.76	327.8		9.56	325.4
verbascósido	7.24	217.6-330.2		10.78	242.4-327.8
7-O-glucósido de luteolina	8.69	254.2-345.7		14.78	266.0-333.8
	9.81	326.6		16.15	253.0-340.9
apigenina	10.92	266.0-339.7			
	13.32	216.5-330.2			
	15.16	266.0-339.7			

Al comparar estos 2 extractos podemos concluir que el número de compuestos de EMAT-1 (verano) son mayores que los de ETMAT-1 (otoño), y éstos corresponden posiblemente a flavonoles y feniletanoides, al observar sus espectros.

Se pudo evidenciar la presencia de un derivado del ácido cafeico como lo es el verbascósido y 2 flavonoides: 7-O- glucósido de luteolina y apigenina, los dos previamente identificados por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Se continuó con el estudio por HPLC con las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica de EMAT-1(verano) (Tabla Nº 5.1.2) con la finalidad de visualizar mejor los componentes de éste y determinar sus Tr.

**Tabla Nº 5.1.4.3 : Fracción 32-49 y fracción 53 de *B.globosa* de EMAT-1(verano) con el cual se realizó la comparación entre ellas y con los patrones.**

Fracción 32-49	Tr	$\lambda$ max.	Fracción 53	Tr	$\lambda$ max.
	1.956	359.4		1.417	No se lee
	2.244	No se lee		1.539	No se lee
	2.389	No se lee		1.937	286.2-327.8
	2.727	No se lee		2.380	No se lee
	5.113	267.2-348.9		2.773	287.0-327.8
verbascósido	6.127	216.5-330.2		3.085	298.0
7-O-glucósido de luteolina	7.312	253.0-348.1		3.327	325.4
	8.138	214.1-324.2		3.693	330.2
apigenina	12.513	266.0-336.2		4.176	318.3
				4.470	283.6-336.2
				5.078	270.0-326.6
				5.376	325.4
			verbascósido	5.875	215.9-330.2
			7-O-glucósido de luteolina	7.011	253.0-345.7
				7.628	326.6
				8.841	319.5
				9.812	296.8
				10.412	211.8-327.8
			Apigenina??	11.939	266.0-344.5
				20.236	214.1-234.1-324.2

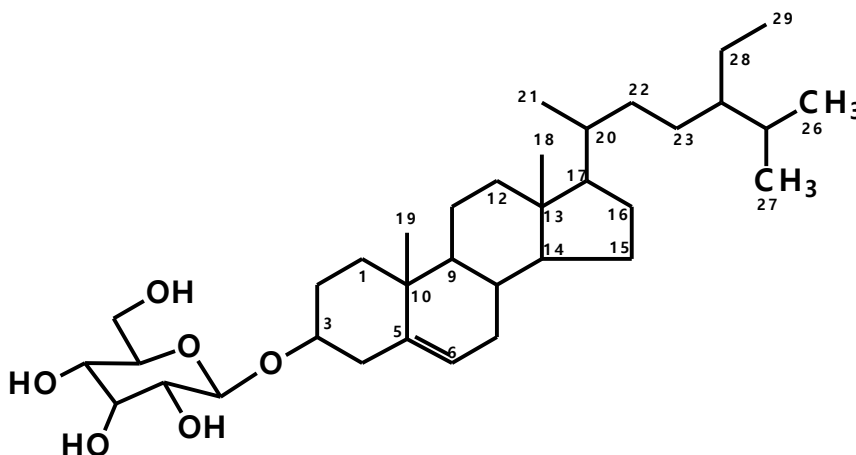
En esta Tabla resumen podemos identificar nuevamente que el verbascósido, 7-O-glucósido de luteolina y apigenina están presente y coincide con los resultados del

fraccionamiento en nuestra columna cromatográfica del extracto EMAT-1( verano) (Tabla N° 5.1.2) donde éstos aparecían siempre. Lo que podemos agregar además es que los Tr no son idénticos, pero esto se puede explicar porque al estar presentes otros compuestos éstos desplazan los Tr de nuestros metabolitos identificados.

Luego podemos proponer para posteriores estudios por HPLC, en donde se pueda realizar una valoración de los compuestos aquí descritos, que los derivados de ácido cafeico se podrían valorar en verbascósido y los flavonoles en 7-O-glucósido de luteolina y así realizar además, la validación del método analítico.

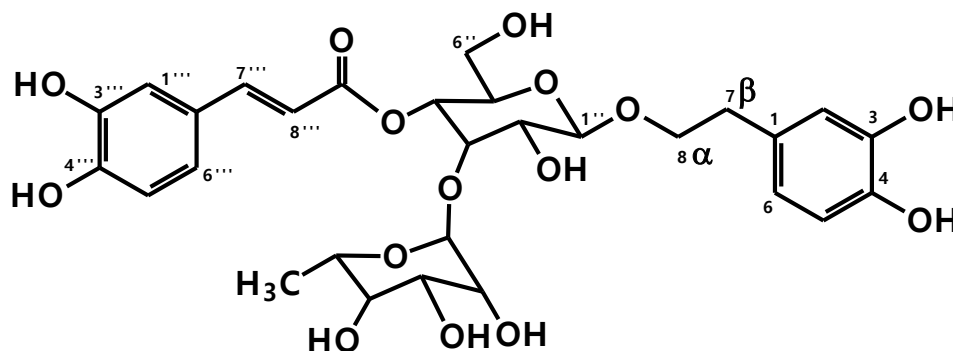
### 5.1.5 Identificación de los compuestos aislados

Glucósido  $\beta$ -sitosterol: Al comparar el espectro IR de glucósido  $\beta$ -sitosterol, obtenido en el laboratorio de productos naturales, con el compuesto aislado de EMAT-1(verano) se observa claramente que son superponibles. En ambos espectros se pudo observar varias bandas de máxima absorción asignables. A  $3300\text{ cm}^{-1}$  una señal intensa y ancha atribuible a vibraciones de tensión de grupos O-H involucrados en formación de enlaces intermoleculares. A  $2900\text{ cm}^{-1}$  se observan bandas de intensidad fuerte, debidas a vibraciones C-H de  $-\text{CH}_3$  y  $-\text{CH}_2-$ . A  $1440$  y  $1360\text{ cm}^{-1}$  se ven bandas de intensidad mediana debidas a vibraciones de deformación de  $-\text{CH}_3-$  y  $-\text{CH}_2-$ . A  $1030\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que corresponde a vibraciones esqueléticas, confirmando la presencia de grupos  $-\text{CH}_3$  geminales. Una banda ancha a  $1010\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones de tensión  $-\text{C-O-C}-$ .



### RN1: Verbascósido

RN1: Fue identificado como verbascósido por RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, y comparación de sus datos con la literatura (Calis et al.,1987, Harbone et al.,1982) permitiendo la asignación de las señales. Además se determinó su Tr en HPLC y su espectro UV presentando dos máximas absorbancias a 216 y 330 nm.



Los resultados de la elucidación estructural, se resumen en la siguiente Tabla N ° 5.1.5.1, indicando en RMN-<sup>13</sup>C las señales tanto de la muestra como las de la bibliografía y el número de carbono correspondiente, y en el espectro RMN-<sup>1</sup>H el tipo de señal, la integración, los desplazamientos, y la constante de acoplamiento (J en Hz) cuando corresponda, tanto de la muestra como la de la bibliografía.

Estos ensayos junto con los HMQC y HMBC permitieron la asignación de los C correspondientes del anillo cafeico, al feniletanoides y a los azúcares glucosa y ramnosa.

Cabe destacar en el <sup>1</sup>H-RMN la presencia a 7,59 y 6,28 ppm, señales correspondientes a los H-8''<sup>α</sup> y H-7''<sup>β</sup> del grupo arilo, con una constante de acoplamiento de 15,85 Hz característica de una sustitución trans. Como también el multiplete a 2,79 ppm integrado para 2H correspondiente a los protones del C7 del grupo etilo, a 4,0 ppm un multiplete correspondiente a uno de los protones H-8 del etilo y centrado a 3,5 ppm, otra señal multiplete, pero enmascarado por las señales de otros protones correspondiente al otro H-8` (HMQC). A 1,10 ppm se observa una señal integrado para 3H correspondiente al grupo CH<sub>3</sub> de la ramnosa. Las señales

correspondiente a los protones aromáticos de los anillos cafeoil y feniletanoide aparecen entre 6,4 y 7,2 ppm. La señal del protón anomérico de la glucosa aparece a 4,3 ppm, confirmado por HMQC.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN Y DEPT se distinguen las señales correspondientes a los carbonos del grupo  $\text{CH}_3$  de la ramnosa a 16,2 ppm y de los grupos  $\text{CH}_2$  del grupo feniletanoide a 34,3 y 70,1 ppm, y al de la glucosa a 60,1 ppm. También se observan las señales de C aromáticos cuaternarios unidos a grupos OH (145,148,147 ppm).

Por otra parte en el espectro HMBC se pudo confirmar la presencia del C característico de un grupo  $\text{C}=\text{O}$  del ácido cafeico a 166 ppm acoplado con H-8''.

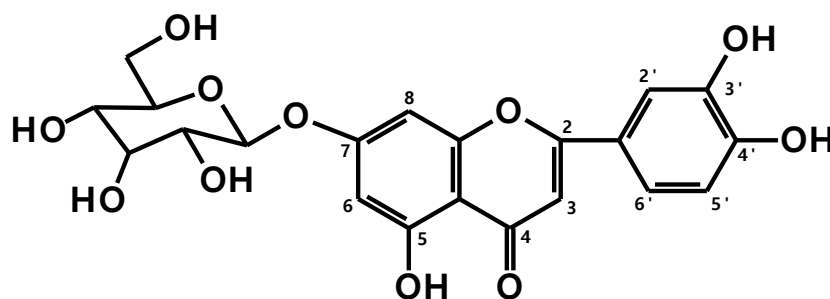


**Tabla Nº 5.1.5.1: Comparación de los valores en ppm de las señales de RMN-C<sup>13</sup> en DMSO y RMN-H<sup>1</sup> del compuesto RN1 y los datos bibliográficos (Calis et al.,1987 y Gross et al., 1987) asignados al verbascósido.**

Nº de Carbono	RMN- <sup>13</sup> C (Calis et al.,1987)	RMN- <sup>13</sup> C (Gross et al.,1987)	RMN- <sup>13</sup> C RN1		RMN- <sup>1</sup> H (Calis et al.,1987)		RMN- <sup>1</sup> H (Gross et al.,1987)		RMN- <sup>1</sup> H RN1	
			tipoC	δ (ppm)	J	δ (ppm)	J	δ (ppm)	J	
Cafeico										
1'''	125.5	127.8	125.5	C	-	-	-	-	-	-
2'''	114.7	115.5	114.1	CH	7.06	1.9 d	7.065	2.2 d	6.777	8.17
3'''	145.5	146.2	145.0	C	-	-	-	-	-	-
4'''	148.5	146.9	148.0	C	-	-	-	-	-	-
5'''	113.3	116.5	119.0	CH	6.78	8.2 d	6.786	8.7 d	6.959	8.18
6'''	121.4	127.2	121.0	CH	7.0	1.9 / 8.2 dd	6.948	2.2/8.7 dd	7.052	-
7'''	145.7	148.3	145.8	CH	6.2	15.9 d	6.28	15.35 d	6.276β	15.85
8'''	115.4	123.6	114.0	CH	7.6	15.9 d	7.6	15.35 d	7.594α	15.85
9'''	166.0	168.4	166.0	C=O	-	-	-	-	-	-
Feniletanoide										
1	131.5	131.7	132.0	C	-	-	-	-	-	-
2	117.1	117.31	119.0	CH	6.72	-	6.71	2.2 d	6.681	5.084
3	146.0	145.9	147.0	C	-	-	-	-	-	-
4	144.6	144.4	145.0	C	-	-	-	-	-	-
5	116.3	116.4	116.0	CH	6.68	8 d	6.69	8.7 d	-	-
6	121.2	121.4	121.9	CH	6.57	2/8 dd	6.56	2.2/8.7dd	-	-
7	36.5	36.4	34.3	CH <sub>2</sub>	2.79	t	2.79	2.87 m	2,79	-
8	72.1	72.2	70.1	CH <sub>2</sub>	3.79 y 3.7	m	3.71 y 2.79	3.6 m	3,5 y 4,0	-
Glucosa										
1'	104.1	104.4	-	CH	4.38	7.9 d	4.26	7.8 d	4.377	7.89
2'	77.7	76.4	-	CH	3.39	7.9/9 dd	3.38	7.8/9 dd	-	-
3'	84.5	80.66	79.4	CH	3.81	9 t	3.78	9 t	-	-
4'	70.0	70.8	70.1	CH	4.98	9.5 t	4.90	-	-	-
5'	75.5	76.1	73.9	CH	3.79	-	3.52	-	-	-
6'	62.6	62.5	60.1	CH <sub>2</sub>	3.6	1.4/11.5 dd	3.54	-	-	-
Ramnosa										
1	102.7	102.1	101.9	CH	5.18	1.3 d	5.39	1.6 d	5.186	-
2	72.2	80.6	71.6	CH	3.92	1.7/3 dd	3.96	1.6/3.3 dd	-	-
3	72.2	72.2	71.5	CH	3.6	-	3.68	3.3/10 dd	-	-
4	73.9	74.4	73.8	CH	3.29	9.5 t	3.29	10 t	-	-
5	70.0	70.8	69.8	CH	3.6	-	3.54	m	-	-
6	17.9	18.8	16.2	CH <sub>3</sub>	1.09	6.2 d	1.07	6.3 d	1.10	-

**RN1': 7-O-glucósido de luteolina .**

Fue identificado por RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C en DMSO y sus señales fueron comparadas con las reportadas por la literatura (Harbone et al., 1982 y Mabry T.J. et al., 1979)



**Luteolin ( 7-O-Glc)**

En la Tabla N° 5.1.5.2 aparecen las señales de RMN-C<sup>13</sup> y RMN-H<sup>1</sup> se resumen los desplazamientos (ppm) en <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H, el tipo de señal y la constante acoplamiento (J en Hz) junto con los datos reportados en la literatura para 7-O-glucósido de luteolina.

Además se pudo determinar su Tr en HPLC y su espectro UV, presentando máximas absorbancias a 254 y 345 nm.

El espectro de <sup>13</sup>C-RMN permite confirmar la instauración del C-2 y C-3 (164,6 y 103,3 ppm respectivamente) propio de un derivado de flavona. Además de la presencia de 4 grupos C-OH (162,9 y 161,1 en meta en anillo A y 149,9 y 145,7 en orto anillo B) donde uno de ellos se encuentra unido a una glucosa ( C de CH<sub>2</sub>OH de glucosa a 60,5 confirmado por el DEPT).

Las señales de un <sup>1</sup>H-RMN confirman la presencia de los H<sup>+</sup> en 6 y 8 que aparecen como singuletes, de los protones en 2', 5' y 6' característica de éste tipo de sustitución orto.

**Tabla N° 5.1.5.2 : Señales de RMN-C<sup>13</sup> y RMN-H<sup>1</sup> del compuesto RN1' y su comparación con los datos bibliográficos (Harbone et al., 1982) para el 7-O-glucósido de luteolina.**

Nº de Carbono	RMN-C <sup>13</sup> RN1' δ ( ppm)	Tipo de Carbono	RMN-H <sup>1</sup> RN1' δ (ppm)	J Hz	7-O-glucósido luteolina δ(ppm)( Harbone et al., 1982)
2	164,461	C			164,6
3	103,15	CH	6,728s		103,3
4	185,477	C			181,8
5	161,119	C			161,1
6	99,513	CH	6,424s		99,8
7	162,932	C			163
8	95,699	CH	6,768s		95
9	156,93	C			156,9
10	105,316	C			105,5
1'	121,32	CH			121,6
2'	113,53	CH	7,41s		113,7
3'	145,777	C			145,7
4'	149,961	C			149,8
5'	115,96	CH	6,894	8,24	116,1
6'	119,208	CH	7,439m		119,1
1''	99,864	C	5,057d	6,96	100,4
2''	73,098	CH			73,3
3'',5''	77,147	CH			77,3
*	76,374	CH	3,672m		76,6
4''	69,519	CH			70
6''	60,592	CH			61

Según los resultados obtenidos en nuestros estudios químicos se puede afirmar que se pudo identificar los siguientes compuestos: glucósido  $\beta$ -sitosterol, quercetina, apigenina, 7-O-glucósido de luteolina, y un derivado del ácido cafeico como lo es el verbascósido, estos están presentes en todos nuestros extractos, pero en diferente cantidad dependiendo de la época de recolección de la planta.

El fraccionamiento permitió aislar y purificar el extracto, además sirvió para identificar mas fácilmente los compuestos por ccf, HPLC, IR y RMN.

La valoración espectrofotométrica de las 2 familias de compuestos, flavonoides y feniletanoides, basado en el método de Glories, nos permitio concluir que éstos están en mayor concentración presentes en la época de verano.

La adaptación del método de Glories (Mazza et al., 1999) dio buenos resultados en el estudio ya que nos permitió valorar feniletanoides derivados del ácido cafeico a 320 nm expresados como ácido cafeico y derivados de flavonoides a 360 nm expresados como quercetina.

Además se pudo validar este método, estableciendo un protocolo de trabajo a seguir, lo que le da seguridad y confianza al método analítico, demostrando la precisión, selectividad, reproducibilidad, y robustez del método (Castro et al., 1989).

En el diseño por HPLC se estableció los mejores parámetros a utilizar para la visualización de los compuestos presentes al ser comparados con sus patrones. En este diseño se usó una fase móvil que permitió una buena resolución de los peak de compuestos fenólicos sin la necesidad de someter a hidrólisis a los glicósidos de flavonoides (Dubber et al., 2004) y feniletanoides (Plaza et al., 2005)

Mediante HPLC pudimos confirmar la presencia de quercetina, apigenina, 7-O-glucósido de luteolina y de verbascósido en varias fracciones.

## 6.1 ESTUDIO FARMACOLÓGICOS

### Determinación de la Actividad analgésica vía tópica

#### 6.1.1 Ensayo de la formalina en la cola.

Los resultados de la evaluación de analgesia tópica mediante el ensayo de la formalina en la cola para los extractos EMAT-1(verano), ETMAT-1(otoño), ETMAT-1(verano) y EMG( verano) se detallan en la Tabla N° 6.1.1 y en la figura N° 24

La mediana del tiempo de lamidas de los controles fue de  $49 \pm 4,2$  seg.

**Tabla N° 6.1.1 : Actividad analgésica vía tópica de los diferentes extractos de *B. globosa* determinada mediante el ensayo de formalina en la cola.**

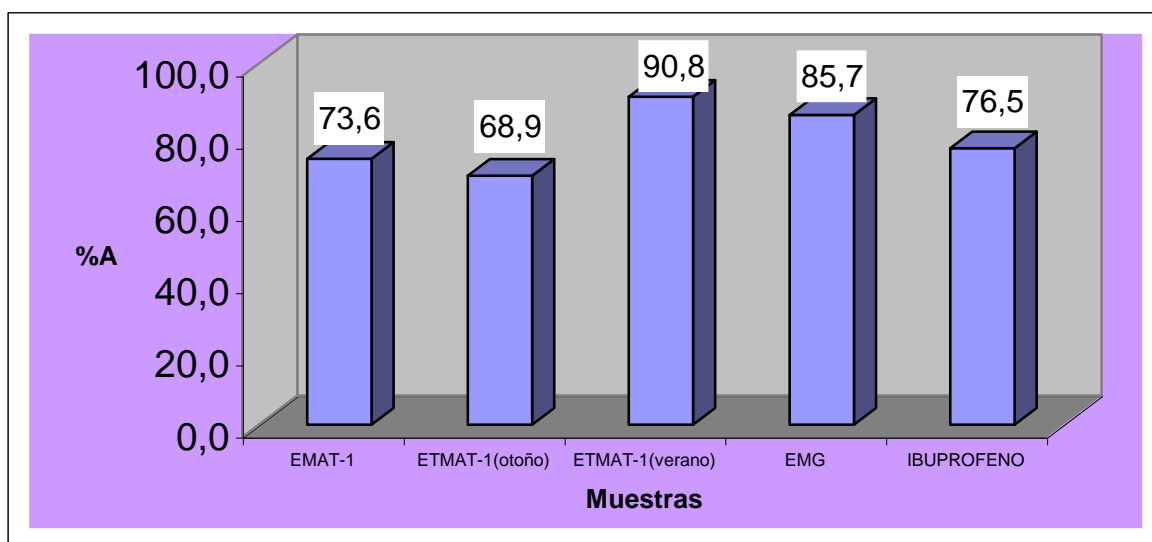
Muestra	% p/v (DMSO)	Med. TI (seg)	% A $\pm$ SEM	p
EMAT-1(verano)	5%	11,5	73.6 $\pm$ 10.9%	1,5E-04
ETMAT-1(otoño)	5%	13,5	68.9 $\pm$ 7.8%	1,2E-04
ETMAT-1(verano)	5%	7,0	90.8 $\pm$ 3.3%	6,6E-07
EMG(verano)	5%	33.5	85.7 $\pm$ 4.2%	6,6E-07
IBUPROFENO	5%	11,5	76,5 $\pm$ 4,8%	4,4E-05

Donde:

- EMAT-1(verano) :extracto metanólico de matico
- ETMAT-1(otoño) :extracto etanólico de matico
- ETMAT-1(verano) : extracto etanólico de matico
- EMG (verano): extracto metanólico global de matico
- %p/v (DMSO): concentración en p/v del extracto en el vehículo que corresponde a dimetilsulfóxido
- Med. TI: mediana del tiempo de lamidas.
- % A  $\pm$  SEM: % analgesia  $\pm$  error estándar de la media.

- p: significancia, resultado significativo si  $p \leq 0,05$ .

**Figura N° 24 : Efecto analgésico vía tópica comparativo de los diferentes extractos de *B. globosa* e ibuprofeno en el ensayo de formalina en la cola.**



De los resultados obtenidos mediante el ensayo de la formalina en la cola tenemos que el mayor efecto analgésico lo presentaron los extractos ETMAT-1 (verano) y EMG(verano) con un 90,0% y 85,7% respectivamente, superando al fármaco de referencia que en este caso es el ibuprofeno (76,5%).

Sin embargo los otros 2 extractos también presentaron poder analgésico en este ensayo, siendo las hojas recolectadas en otoño (ETMAT-1(otoño)) las de menos poder analgésico, lo que indica que la época de recolección es un factor que se debe considerar, al momento de obtener un material vegetal destinado a la fabricación de preparados para uso terapéutico.

Cabe destacar además que el EMG(verano) mostró un marcado poder analgésico lo que hace suponer que este extracto al tener todos los componentes juntos, a diferencia de los demás, pudiese presentar un efecto sinérgico entre ellos.

Todos los resultados fueron significativos.

### 6.1.2 Ensayo del tail-flick vía tópica

Los resultados para la actividad analgésica evaluada mediante el método del tail-flick vía tópica, se detallan en la Tabla N° 6.1.2.1

**Tabla N° 6.1.2.1: Actividad analgésica de los diferentes extractos de *B.globosa* evaluada mediante el ensayo tail flick, vía tópica.**

Muestra	% p/v (DMSO)	T Lat (seg)	% A ± SEM	p
EMAT-1(verano)	5%	2,2	<b>54.02 ± 4.19%</b>	0,000
	2,5%	2,2	40.43 ± 2.73%	0,000
	1,25%	1,6	30.30 ± 2.75%	0,000
	0,625%	0,6	11.56 ± 2.02%	0,000
ETMAT-1(verano)	5%	1,1	<b>51.6 ± 4.66%</b>	0,000
ETMAT-1(otoño)	5%	2,1	<b>40.51 ± 4.46%</b>	0,000
	2,5%	1,3	25.00 ± 4.62%	0,000
	1,25%	0,8	16.75 ± 1.65%	0,000
	0,625%	0,5	8.55 ± 1.68%	0,000
EMG(verano)	5%	2,1	<b>26.8 ± 5.12%</b>	0,000

Donde:

- EMAT-1 (verano):extracto metanólico de matico
- ETMAT-1(otoño) :extracto etanólico de matico
- ETMAT-1(verano) : extracto etanólico de matico
- EMG(verano) : extracto metanólico global de matico
- %p/v (DMSO): concentración en p/v del extracto en el vehículo que corresponde a dimetilsulfóxido.
- TLat: mediana del tiempo de latencia.
- % A ± SEM: % Analgesia ± error estándar de la media.
- p: significancia, resultado significativo si  $p \leq 0,05$ .

En la Tabla N° 6.1.2.1 se puede observar que todos los extractos ensayados presentaron un efecto analgésico dosis-dependiente frente al ensayo realizado, sin embargo los extractos EMAT-1(verano) y ETMAT-1 (verano) fueron los dos extractos

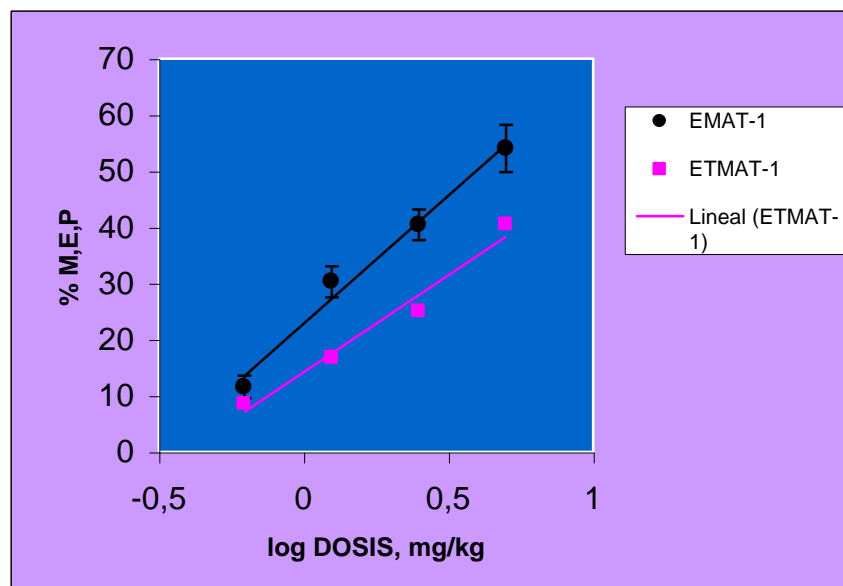
más activos ya que como se puede apreciar éstos presentan un efecto máximo de analgesia de 54.0% y 51.6% respectivamente.

Los otros 2 extractos presentaran un efecto analgésico más débil ETMAT-1(otoño) con 40.5% y EMG(verano) con un 26,8%.

ETMAT-1(verano) y EMG(verano) fueron ensayados a una sola dosis a la máxima empleada con la finalidad de hacerlo comparativo con los otros extractos.

Estos resultado indican que por vía tópica los extractos preparados con hojas recolectadas en la época de verano, tienen más compuestos con actividad analgésicas que el extracto del material vegetal recolectado en otoño .

**Figura Nº 25 : Porcentaje de máximo efecto posible (%MPE) analgésico comparativa de los extractos EMAT-1(verano) y ETMAT-1(otoño) de *B.globosa* evaluada mediante el ensayo tail flick, vía tópica.**





En el gráfico se observan curvas paralelas para ambos, extractos pudiendo indicar un mecanismo de acción común, entre las sustancias activas presentes en ETMAT-1(otoño) y EMAT-1(verano) para el ensayo tail flick vía tópica.

**Tabla Nº 6.1.2.2: Valores de ED<sub>25</sub> en el ensayo de analgesia tail flick, vía tópica para los extractos ETMAT-1(verano) y EMAT-1(verano) frente al fármaco de referencia ibuprofeno.**

Extracto	ED <sub>25</sub> ± S.D.
ETMAT-1(otoño)	2,1 ± 0,197
EMAT-1(verano)	1,1 ± 0,086
Ibu ED <sub>25</sub>	0,8 ± 0,074

Si comparamos los ED<sub>25</sub> de los extractos nos podemos dar cuenta que el extracto EMAT-1 (verano) es más potente que ETMAT-1(otoño), sin embargo ninguno de los dos alcanza la baja dosis del fármaco de referencia ibuprofeno para llegar al ED<sub>25</sub>.

### 6.1.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica

En la Tabla Nº 6.1.3.1 se detallan los resultados obtenidos para la inflamación tópica inducida por TPA de los diferentes extractos de *B. globosa* e indometacina.

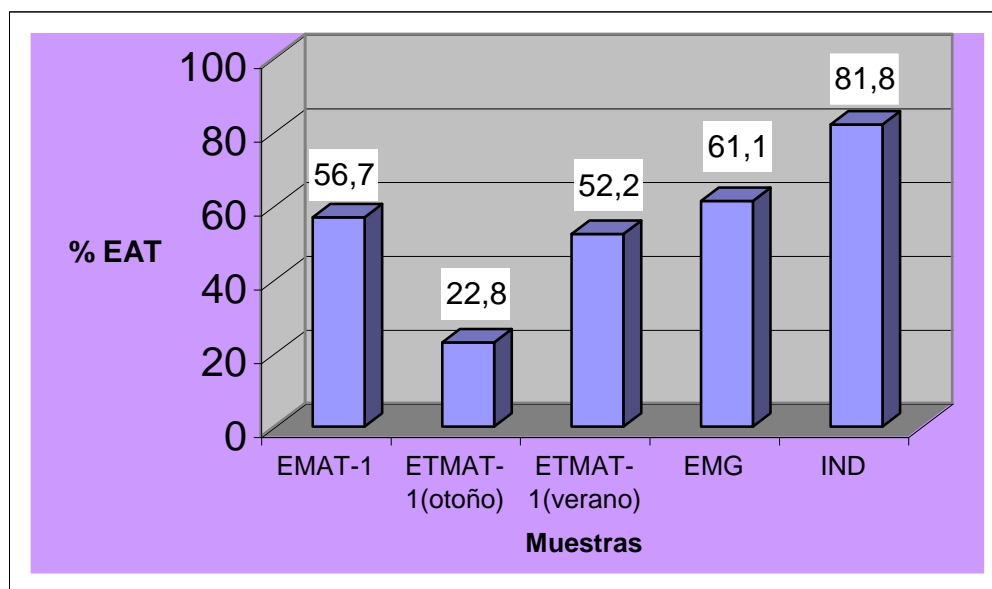
**Tabla Nº 6.1.3.1 : Resultados de la actividad antiinflamatoria tópica frente a TPA de los diferentes extractos de *B. globosa* e indometacina (IND).**

Extracto	Dosis	% EAI <sub>T</sub> ± SEM	p
EMAT-1(verano)	3mg/20ul	56,7 ± 13,5%	0.0360
ETMAT-1(otoño)	3mg/20ul	22,8 ± 5.1%	0.0032
ETMAT-1(verano)	3mg/20ul	52,2 ± 7.0%	0.0039
EMG(verano)	3mg/20ul	61,1 ± 6.6%	0.0004
IND	0,5mg/20ul	81,8 ± 8,0%	0

Donde:

- EMAT-1(verano) :extracto metanólico de matico
- ETMAT-1(otoño) :extracto etanólico de matico
- ETMAT-1(verano) : extracto etanólico de matico
- EMG (verano): extracto metanólico global de matico
- % EAI<sub>T</sub> : porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico
- p: significancia, resultado significativo si  $p \leq 0,05$ .

**Figura Nº 26 : Efecto antiinflamatorio tópico (%EAT) frente a TPA comparativo de los diferentes extractos de *B. globosa* e indometacina**



La evaluación farmacológica de los diferentes extractos nos permitió apreciar que todos éstos tienen actividad antiinflamatoria cuando se les induce un dolor agudo por TPA, el extracto EMG (verano) alcanza un efecto de 61,1% siendo el más activo de los cuatro seguidos por los extractos EMAT-1(verano) y ETMAT-1(verano) con un 56,7% y un 52,2% respectivamente, resultando el menos activo el ETMAT-1(otoño) con un 22,8%.

En este ensayo, el extracto EMG (verano) que posee todos los componentes de las hojas de esta especie, resulta más activo que los otros extractos.

### Ensayos farmacológicos vía oral.

#### 6.1.4 Ensayo tail flick vía oral.

Los resultados para la actividad analgésica evaluada mediante el método del tail-flick vía oral, se detallan en la Tabla N° 6.1.4.1

**Tabla N° 6.1.4.1: Actividad analgésica de los diferentes extractos de *B. globosa* evaluada mediante el ensayo tail flick, vía oral.**

Muestra	% mg/kg (Tween 80)	T Lat (seg)	% A ± SEM	p
EMAT-1(verano)	200	3.06 ± 0.33	<b>56.32 ± 6.02</b>	0,000
	100	2.00 ± 0.305	36.47 ± 5.47	0,000
	50	0.88 ± 0.10	16.03 ± 1.78	0,000
	25	0.45 ± 0.12	8.31 ± 0.15	0,000
ETMAT-1(verano)	200	4.17 ± 0.50	<b>77.16 ± 9.27</b>	0,000
	100	1.54 ± 0.24	29.70 ± 4.68	0,000
	50	0.95 ± 0.26	18.46 ± 5.11	0,000
	25	0.70 ± 0.13	13.42 ± 2.51	0,000
ETMAT-1(otoño)	200	1.76 ± 0.29	<b>32.70 ± 5.43</b>	0,000
	100	0.87 ± 0.175	16.05 ± 3.20	0,000
	50	0.85 ± 0.89	15.74 ± 1.65	0,000
	25	0.31 ± 0.10	5.70 ± 1.79	0,000
EMG(verano)	200	2.47 ± 0.25	<b>46.98 ± 4.70</b>	0,000
	100	1.01 ± 0.23	19.36 ± 4.32	0,000
	50	0.81 ± 0.10	15.82 ± 1.96	0,000
	25	0.30 ± 0.7	5.79 ± 1.41	0,000

Donde:

- EMAT-1 (verano):extracto metanólico de matico
- ETMAT-1(otoño) :extracto etanólico de matico
- ETMAT-1(verano) : extracto etanólico de matico
- EMG (verano): extracto metanólico global de matico
- %mg/kg : porcentaje mg/kg de extracto en tween 80 al 2 % vehículo que se utilizo en el ensayo.
- TLat: mediana del tiempo de latencia.

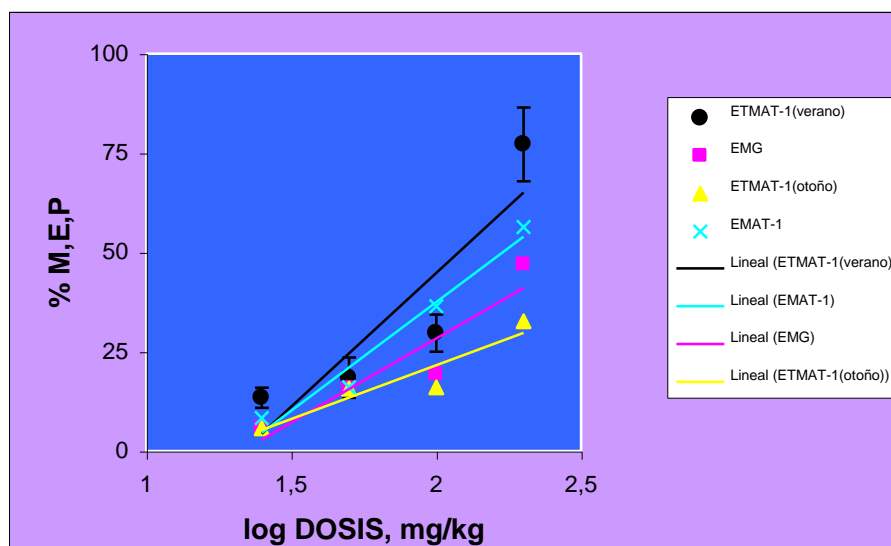
- % A ± SEM: % Analgesia ± error estándar de la media.
- p: significancia. resultado significativo si  $p \leq 0,05$ .

En la Tabla N° 6.1.4.1 podemos apreciar que todos los extractos presentaron curvas dosis-respuesta frente al ensayo tail flick por vía oral. El extracto ETMAT-1(verano) resultó ser el más activo llegando a un efecto de 77,16% en su concentración máxima, seguido por el extracto EMAT-1(verano) con un 56,3%, luego el extracto EMG(verano) con 46,8% y finalmente el extracto ETMAT-1(otoño) con un 32,7%.

Estos datos permiten confirmar una vez más que la época de recolección del material vegetal influye en las propiedades farmacológicas, ya que se ve claramente que las hojas recolectadas en verano poseen propiedades farmacológicas más potentes que las recolectadas en otoño.

Todos los datos fueron significativos en el ensayo.

**Figura N° 27: Porcentaje de máximo efecto posible (%MEP) de actividad analgésica comparativa, de los diferentes extractos de *B.globosa* evaluada mediante el ensayo tail flick, vía oral.**



En el gráfico se puede ver las tendencias de todos los extractos, podemos decir que no todas las curvas son paralelas, pero si las curvas de ETMAT-1(verano), EMAT-1(otoño) y EMG (verano), como también existe paralelismo entre EMAT-1(verano), ETMAT-1(otoño) y EMG. Esto permitiría sugerir un mecanismo de acción similar, lo que podría atribuirse a la presencia de los mismos metabolitos activos en los diferentes extractos.

### 6.1.5 Ensayo de las contorsiones abdominales

Se determinó la analgesia vía oral para EMAT-1(verano), ETMAT-1(otoño), ETMAT-1(verano) y EMG(verano). Para cada ensayo se obtuvo las curvas dosis-respuesta. Los resultados de la actividad analgésica de los extractos observados mediante la aplicación de este ensayo se detallan a continuación en la Tabla N° 6.1.5.1

Tabla N° 6.1.5.1: Efecto analgésico mediante ensayo de las contorsiones abdominales, de los diferentes extractos de *B. globosa*.

Muestra	Dosis (mg/kg)	Prom. Cont ± SEM	% A ± SEM	p
EMAT-1(verano)	200	1,3 ± 0,7	<b>79,77 ± 14,0</b>	0,000
	100	2,2 ± 1,0	57,87 ± 3,9	0,000
	50	2,3 ± 1,2	51,09 ± 8,3	0,000
	25	5,7 ± 1,3	34,24 ± 3,4	0,000
ETMAT-1(verano)	200	7,8 ± 2,1	<b>85,48 ± 4,2</b>	0,000
ETMAT-1(otoño)	200	12,8 ± 1,0	<b>59,53 ± 5,4</b>	0,000
	100	1,3 ± 0,8	36,27 ± 3,9	0,000
	50	2,2 ± 1,4	25,14 ± 4,4	0,000
	25	2,2 ± 0,8	8,95 ± 1,0	0,000
EMG(verano)	200	7 ± 1,7	<b>64,10 ± 3,2</b>	0,000

Donde:

- EMAT-1(verano) :extracto metanólico de matico
- ETMAT-1(otoño) :extracto etanólico de matico recolectado en otoño
- ETMAT-1(verano) : extracto etanólico de matico recolectado en verano
- EMG(verano) : extracto metanólico global de matico
- Prom.Cont.: promedio del N° de contorsiones.
- % A ± SEM: % analgesia ± error estándar de la media.

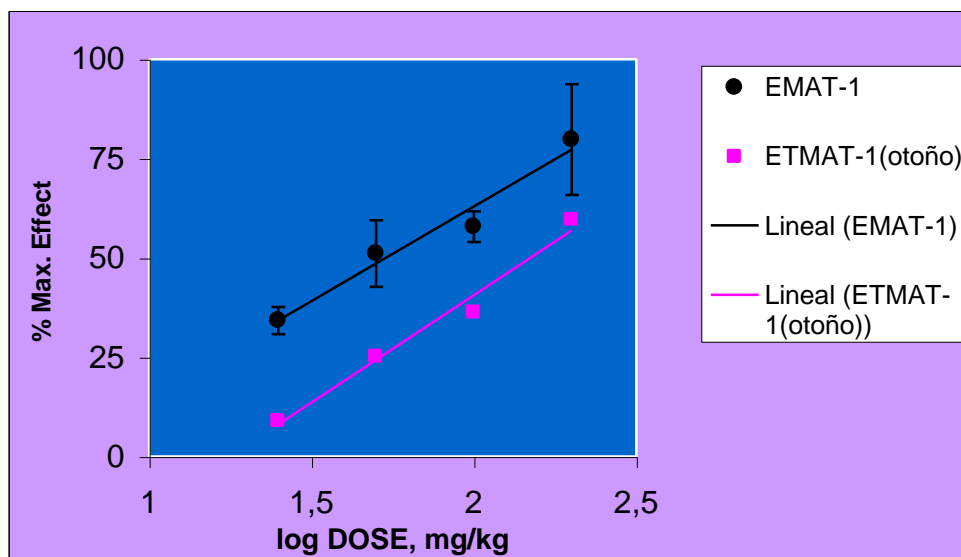
- p: significancia, resultado significativo si  $p \leq 0,05$ .

En la tabla N° 6.1.5.1 podemos apreciar que los extractos EMAT-1(verano) y ETMAT-1(otoño) los que fueron ensayados a cuatro dosis mostraron un efecto dosis-respuesta, los otros 2 fueron evaluados sólo a una dosis. El extracto ETMAT-1 (verano) fue el más activo a la máxima concentración alcanzando un porcentaje de 85,5% , seguido por el extracto EMAT-1(verano) con un 79,7%, luego el extracto EMG(verano) con un 64,1% y más bajo el extracto ETMAT-1( otoño) con un efecto del 59,5%.

Nuevamente el extracto etanólico de las hojas recolectadas en verano, alcanza el máximo efecto analgésico por esta vía, lo que confirma aun más que la época de recolección influye en las propiedades farmacológicas.

Todos los resultados fueron significativos.

**Figura N° 28 :Actividad analgésica comparativa de los extractos EMAT-1(verano) y ETMAT-1(otoño), evaluada mediante el ensayo de las contorsiones abdominales, vía oral de *B. globosa*.**



El gráfico muestra dos curvas paralelas entre sí lo que permite sugerir que el mecanismo de acción de los metabolitos presentes en ambos extractos, es similar.

**Tabla N° 6.1.5.2: Valores de ED<sub>50</sub> para el efecto analgésico del ensayo de las contorsiones abdominales, vía oral de los extractos ETMAT-1 (otoño) y EMG (verano) de *B.globosa***

Extracto	ED <sub>50</sub> ± S.D.
ETMAT-1(otoño)	149,0 ± 16,3
EMAT-1(verano)	53,5 ± 6,0

Al comparar ambos extracto vemos que el EMAT-1(verano) es mas activo que el extracto ETMAT-1(otoño)

Observando los resultados obtenidos en nuestro estudio farmacológico podemos afirmar que todos los extractos tienen propiedades farmacológicas tanto analgésicas como antiinflamatorias, lo que avala estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio ( Backhouse et al.,2000, Backhouse et al., 2002, Rosales et al.,2003) y complementaría otros antecedentes bibliográficos que le atribuyen a esta especie propiedades antiinflamatorias *in vitro* y cicatrizantes (Houston et al., 1996, Houghton y Mensah 1999; Mensah et al., 2001, Houghton et al., 2005), sin embargo ésta es la primera vez que se publican antecedentes sobre las propiedades analgésicas y antiinflamatorias *in vivo* del matico.

Además, de los resultados alcanzados podemos concluir que la época de recolección de las hojas de esta especie influye en la efectividad de los extractos y por eso se debe tener en cuenta que la época de verano es la más adecuada para obtener un preparado con mayor efectividad, para propósitos medicinales. Cabe destacar sin embargo, que la cantidad de principios activos presentes en la época de otoño, son suficientes para alcanzar los efectos farmacológicos descritos.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que existen componentes en el o los extractos responsables de las propiedades encontradas.

Estas dos están muy relacionados, casi siempre los antiinflamatorios son clasificados como analgésicos débiles, y este efecto antiinflamatorio puede deberse a la inhibición de distintas etapas de la síntesis de leucotrienos o de prostaglandinas, inhibición de procesos oxidativos, reducción de la actividad de los macrófagos y del complemento, como también a la inhibición de las proteinasas producidas en esta última etapa. El dolor es consecuencia de la inflamación en la mayoría de los tejidos, donde las prostaglandinas (PGs) sensibilizan terminales nociceptivos a estímulos físicos y químicos ( Florez 2003).

La ciclooxigenasa ocurre como mínimo en dos formas isómeras: La COX1 (constitutiva), que media la formación de las prostaglandinas que cumplen funciones fisiológicas tales como la protección de la mucosa GI, hemostasis y flujo sanguíneo renal, y la COX2 (inducibles), la cual cataliza la producción de prostaglandinas E<sub>2</sub> que actúan como mediadores inflamatorios. En general los antiinflamatorios no esteroideos inhiben ambas enzimas con distinta intensidad y selectividad dependiendo de su estructura química y actúan de esta manera disminuyendo la liberación de prostaglandinas y pudiendo presentar un efecto tanto analgésico como antiinflamatorio ( Florez 2003).

Nuestros ensayos farmacológicos se realizaron por medio de la vía tópica y oral, y evaluamos analgesia de los extractos por medio de cuatro ensayos en los que cabe destacar, que el test de formalina en la cola (vía tópica), que mide efecto analgésico periférico (Kolesnikov et al., 2004), fue el ensayo en que los extractos mostraron más efectividad. Luego, en el ensayo de las contorsiones abdominales, (vía oral) que también mide efectos analgésicos periféricos, los extractos dieron como resultado una alta efectividad, en cambio en los ensayos tail-flick (vía tópica y oral) que miden efectos de analgesia centrales ( Miranda et al., 2002; Pinardi et al., 2003) resultaron menos efectivos aunque igualmente con un grado de analgesia importante al ser comparado con los fármacos de referencia.

En el ensayo antiinflamatorio por TPA (vía tópica) la actividad de los extractos fue menos importante que la analgésica, esto nos hace pensar que *B.globosa* especialmente ETMAT-1(verano) actuaría principalmente como analgésico a nivel periférico. Podemos postular que el principal mecanismo de acción de los principios



activos de nuestro extracto es a través del bloqueo de la producción de prostaglandinas por medio de unión e inhibición de las ciclooxigenasas (COX). El resultado de este efecto es principalmente la reducción de la inflamación y la sensibilización de los nociceptores periféricos, pero igualmente tienen acción analgésica a nivel central, donde posiblemente los receptores opioides tengan alguna participación.

Pudimos además identificar sustancias que estarían relacionadas con las propiedades farmacológicas encontradas, estos son flavonoles y feniletanoides (derivados del ácido cafeico) que se encuentran en mayor abundancia en la época de floración de la planta (verano). Es así como los flavonoles quercetina, apigenina y luteolina encontrados por los estudios químicos en nuestros extractos han sido publicadas como responsables de efectos analgésicos y antiinflamatorios (Alcaraz, 1988; Bendt, 2002, Peltzer et al.,1998; Martinez-Vásquez et.al., 1996,1998). En una reciente publicación se destacó a la luteolina como capaz de inhibir la expresión de la COX-2 manifestando su capacidad antiinflamatoria al suprimir la expresión de prostaglandinas( Harris et al., 2006).

Por otro lado la presencia de derivados del ácido cafeico como lo es el verbascósido puede ser responsable de los efectos farmacológicos antes descritos ya que publicaciones científicas avalan sus beneficios como por ejemplo el efecto protector del verbascósido y luteolina sobre el daño cerebral oxidativo inducido por heroína (Qieusheng et al., 2005), también se ha encontrado que el verbascósido tiene efecto protector en células PC12 a las que se les indujo neurotoxicidad por medio de iones (Sheng,2002).

Además se le ha demostrado la propiedad de inhibir la liberación de oxido nítrico sintetasa (iNOS) inducida por lipopolisacàridos (LPS), tendría también actividad analgésica, antiinflamatoria y un prometedor uso para tratamiento de patologías cardiovasculares. Todos estos antecedentes justificarían nuestros resultados (Lin et al., 2006, Kim et al., 2005, Chiou et al., 2004., Lee et al.,2005)

## 7.1 ESTUDIOS *IN VITRO*

### 7.1.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra radial en superficie de agar.

Este ensayo tuvo por objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de dos extractos de *B. globosa*, EMAT-1 (verano) y ETMAT-1 (otoño) frente a distintas cepas de microorganismos aeróbicos (bacterias), una cepa de hongo y una levadura. Los resultados encontrados para este ensayo se detallan a continuación en la Tabla N° 7.1.1

**Tabla N° 7.1.1: Actividad antibacteriana y antifúngica por siembra radial en placa de Petri de 2 EMAT-1 (verano) y ETMAT-1 (otoño) extractos de *B. globosa*.**

	Cepas	EMAT-1(verano)	ETMAT-1(otoño)
Bacteria gram -	<i>Escherichia coli</i>	+++	+++
Bacteria gram -	<i>Salmonella aviatum</i>	+++	+++
Bacteria gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++
Bacteria gram +	<i>Micrococcus flavus</i>	+++	+++
Bacteria gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++
Hongo	<i>Candida albicans</i>	+++	+++
Hongo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+++	+++

Donde:

- +++ : crecimiento total del microorganismo.
- : inhibición total del crecimiento del microorganismo.
- : inhibición parcial del crecimiento del microorganismo.
- : inhibición escasa del crecimiento del microorganismo.

Se puede observar que los extractos no tienen actividad antimicrobiana ya que en todas las cepas ensayadas tanto bacterias como hongos el crecimiento fue total. Lo que indica una actividad microbiológica negativa.

## 8.1 Estudios de la actividad antioxidante.

### 8.1.1 Determinación de la actividad antioxidante mediada por X.O.

Para este ensayo se evaluó el extracto de *B.globosa* ETMAT-1(otoño), los resultados se resumen a continuación en la Tabla N° 8.1.1

**Tabla N° 8.1.1 : Porcentaje de inhibición de X.O. de ETMAT-1(otoño)**

Compuesto	% I X.O.
ETMAT-1 (otoño)	8,6± 1,5
Alopurinol	50 *

\* resultado estadísticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ).

El extracto ETMAT-1(otoño) no presentó actividad antioxidante evaluada mediante la inhibición de la enzima xantino oxidasa y el resultado no fue estadísticamente significativo.

Hubiese sido una contribución importante encontrar actividad en ETMAT-1 (otoño) de *B. globosa*, puesto que esta enzima tiene un rol fundamental en la formación de metabolitos tóxicos de oxígeno, que participan en la reperusión de algunos tejidos isquémicos.(Das y Maulick, 1994)

### 8.1.2 Determinación de la Actividad Antioxidante mediada por DPPH

En la Tabla N° 8.1.2, se presentan los resultados de la actividad capturadora de radicales libres del diferentes extracto de *B. globosa* ETMAT-1(otoño) y quercetina como sustancia patrón.

**Tabla N° 8.1.2 : Resultados de la actividad atrapadora de radicales libres de el extracto de ETMAT-1 (otoño) de *B. globosa* y quercetina como patrón.**

<b>ETMAT-1 (otoño)</b>		
<b>conc. (ug/mL)</b>	<b>% decoloración</b>	<b>desv std</b>
0	0	0
10	10,22	1,3
25	23,44	1,4
50	41,57	2,8
100	51,55	1,6
200	69,82	0,6

$$EC_{50} = 117,9 \pm 0,2 \text{ ug/mL}$$

<b>quercetina</b>		
<b>conc. (ug/mL)</b>	<b>% decoloración</b>	<b>desv std</b>
0	0	0
1,25	20,79	1,3
2,5	40,45	3,7
3,75	56,27	0,9
5	74,80	1,5
7,5	88,14	0

$$EC_{50} = 1,1 \text{ ug/mL} \pm 0,178$$

Con respecto a la actividad antioxidante el efecto del extracto ETMAT-1(otoño) fue muy bajo, en los dos ensayos realizados, lo que se puede explicar por el menor contenido de flavonoles y fenieltanoides, responsables de esta propiedad. En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, se comprobó la efectividad con hojas recolectadas en noviembre ( Rosales et al.,2003)

## Conclusiones

- Los extractos preparados con hojas de *B.globosa*, recolectadas en verano presentan mayor actividad farmacológica en todos los ensayos realizados en animales de experimentación.
- Puede decirse que los disolventes ocupados (metanol y etanol) en la preparación de los extractos no influye en la comparación química, y por ende tampoco en las propiedades farmacológicas.
- Se identificaron al menos 3 flavonoles : quercetina, apigenina y 7-O-glucósido de luteolina, los que serian responsable, en parte de las actividades farmacológicas encontradas.
- Se comprobó por estudios químicos, la presencia de un verbascósido, los que también son responsables de las actividades farmacológicas encontradas.
- A través de la valoración espectrofotométrica se comprobó que los extractos de verano EMAT-1(verano), ETMAT-1(verano) y EMG (verano) son más ricos en compuestos como flavonoles y feniletanoides (verbascósido), en cambio el material vegetal recolectado en otoño es más rico en taninos.
- El extracto de otoño aunque es más débil farmacológicamente que los de verano igualmente alcanza a tener un efecto analgésico y antiinflamatorio significativo.
- El efecto farmacológico mayor de un extracto alcohólico de *B. globosa* es la analgesia a nivel periférico.
- El mecanismo de acción de su actividad antiinflamatoria y analgésica periférica pareciera estar estrechamente vinculados ejerciendo ambos efectos por la misma vía.
- También posee efecto analgésico a nivel central, donde podrían estar participando los receptores opioides.
- La mejor época de recolección de las hojas de esta planta es en su floración (verano), para obtener el mejor material farmacológicamente activo para fines medicinales.
- Se diseñó y validó un método espectrofotométrico para la valoración de flavonoles y feniletanoides, demostrando su selectividad, robustez y reproducibilidad.
- Se ensayaron distintos métodos por HPLC que permitieron dejar propuestos los parámetros (columnas, flujos y fase móvil) para lograr la separación de flavonoles y feniletanoides y con posterioridad diseñar la metodología de análisis por HPLC.

-Los extractos ensayados en pruebas microbiológicas demostraron no tener actividad sobre la cepas tanto antibacteriano como antifúngico.

-Se pudo observar que nuestros extractos eran débilmente antioxidantes.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALCARAZ M. J., (1988). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Fitoterapia*, 1, 25-27.
- ARAYA P., Mora J., Blemith., Rubio B., Correa O., Costa E., Salgado A., (2005) Evaluación de un gel de matico versus placebo como agente profiláctico de la radioepitelitis en pacientes con cáncer de mama que reciben radioterapia. XIII Congreso latinoamericano de Mastología y VII Congreso Chileno de Mastología, noviembre 2005, Santiago, Chile
- BACKHOUSE N.; Delporte C.; Erazo, S.; Negrete R.; Vargas L.; (2000) Evaluación de la actividad analgésica de *Buddleja globosa* Hope, matico; *Gayana Botánica* 57:9
- BACKHOUSE N., Delporte C., Negrete R., San Feliciano A., López-Pérez J. L. (2002) Bioactive phenolic derivatives from *Acaena splendens* methanol extract.. *Phytotherapy Research*, 16, 562-566.
- BENDT H. (2002) The Biochemistry and Medicinal Significance of Flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 96, 67-202.
- CALIS I., Gross G.A., Sticher O., (1986). Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scopoli*. *Phytochemistry* Vol. 26, No 7, pp 2057-2061
- CASTRO M., Gascón S., Pujol M., Sans J. M., Pla LI.V. (1989). Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Monografía A.E.F.I. Sección Catalana. Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad. Validación de Métodos Analíticos. Editados por Hewlett Packard.
- DAS D. and Maulik N. (1994) Antioxidant Effectiveness in Ischemia- Reperfusion Tissue Injury. *Methods in Enzymology*, 233: 601-60.
- DUBBER M. and Kanfer I.(2004). High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in *Ginkgo biloba* solid oral dosage forms. *J.Pharmaceut Sol* 7(3):303-309.
- ERAZO S., Gonzalez V., Zaldivar M. and Negrete R., (1997) Antimicrobial activity of *Psoralea glandulosa* L. *Int. journal of Pharmacognosy*.35: 1-3
- FLOREZ J., (2003) *Farmacología Humana* 4ª Ed. Masson, España, pp 1400.

- GROSS GA., Lahloub M.F., Anklin C., Schulten H.R., and Sticher O., (1987) Teucroside, A phenylpropanoid glycoside from *Teucrium chamaedrys* . Phytochemistry, Vol.27, No. 5, pp 1459-1463.
- HARRIS GK., Qian Y., Leonard SS., Sbarra DC., Shi X., (2000) Luteolin and crysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cel. J. nutr. 136(6), 1517-21.
- HOLLANDER M., Wolfe D., (1973). Nonparametric Statistical Methods. J. Wiley and sons, New York , p 27-32, 62-70.
- HOUGHTON P.J.; (1984). Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. J. Ethnopharmacol. 11(3), 293-368.
- HOUGHTON P.J.; Mensah, A. (1996) *Buddleja* and Wound Healing. Active Ingredients Conference, Paris, 40-43.
- HOUGHTON P.J.; Woldemariam, T.Z.; Candau, M.; Barnardo, A.; Khen Alafun, O.; Shangxiao, L. (1996) Buddlejone, a diterpene from *Buddleja albiflora*. *Phytochemistry*, 42(2): 485-488.
- HOUGHTON P.J. and Mensah, A.Y. (1999) "Biologically-active compounds from *Buddleja* species". *Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition and Plant Defense. Recent Advances in Phytochemistry*, 33. Ed. J.T. Romeo, Kluwer Academic / Plenum, New York, pp 343-368.
- HOUGHTON P.J., Hylands Mensah, A.Y. Hensel a., Deters A.M. (2005) In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example.J. Ethopharmacol. 100, 100-107.
- KALCKAR H.M. (1947). Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. *J.Biol. Chem.*, 167: 429- 443.
- KIM SS., Son Y.O., Chun J.C., Kim S.E., Cheng G.H., Hwang K.J., Lee J.C., (2005). Antioxidant property of an active component purified from the leaves of paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa*. *Redox Rep.* 10(6), 311-8.



- LEE J.Y., Woo E.R., Kang K.W., (2005) Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. *J Ethnopharmacol.*, 58, 129-35.
- LIAO Y., Houghton P.J., Hout, J.R.S. (1999) Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J.Nat.Prod.* 62(9):1241-5.
- LIN L.C., Wang Y.H., Hou Y.C., Chang S., Liou K.T., Chou Y.C., Wang W.Y., Shen Y.C., (2006) . The inhibitory effect of phenylpropanoid glycosides and iridoid glucosides on free radical production and beta2 integrin expression in human leucocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 129-35.
- MABRY T.J., Markham and M.B. Thomas (1979). *The systematic Identification of flavonoids.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. New York.
- MARTÍNEZ-VÁSQUEZ M., Apan T.O.R., Aguilar H., Bye R., (1996) Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and of the flavone linarin of *buddleja cordata*. *Planta médica* 62, 137-140.
- MAZZA G; Fukumato, L; Delaquis, P; Girad, B; Ewer, B. ( 1999). Anthocyanins, phenolic and color of Cabernet, Franc, Merlot and Pinot noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem* 47:4009-17.
- MENSAH A.Y., Sampson P.J., Houghton P., Hylands P.J., Westbrook J., Dunn M., Hughes M.A., Cherry G.W. (2001) Effects of *buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 77, 219-226.
- MIRANDA D., Delporte C., Fernández M., Backhouse N., (2005) Evaluación de las propiedades cicatrizantes de *Buddleja globosa* Hope. V reunión Latinoamericana de Fotoquímica. I congreso latinoamericano del MERCOSUR , noviembre, 2005, Montevideo, Uruguay.
- MIRANDA H.F., Lemus I., Pinaridi G., (2003) Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Brain Research Bulletin* 61. 417-425

- MIRANDA H.F., Sierralta F., Pinardi G. (2002). Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs. *Br.J.Pharmacol*, 135: 1591-1597.
- MONTES M. y Wilkomirsky T. (1985) *Medicina Tradicional Chilena*. Editorial de la Universidad de Concepción. Concepción, Chile, pág. 58.
- NAVAS L.E. (1979). *Flora de la cuenca de Santiago de Chile*, Tomo III, Ediciones de la Universidad de Chile.
- PELZER L.E., Guardia T., Juárez A.O., Guerreiro.(1998) Acute and chronic antiinflammatory effects of plants flavonoids. *Il Fármaco* 53, 421-424
- PLAZA A., Montoso P., Benavides A., Pozza C., Placente S., (2005). Phenylpropanoid glycosides from *Tynanthus paurensis* : Characterization and LC-MS Quantitative Analysis. *J. Agric. Food Chem.*53, 2853-2858.
- PINARDI G, Sierralta F and Miranda H, (2003). Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharmacol.Biochem. Behav.* 74: 603-608.
- PUIG L., (1997) .Fisiología de la cicatrización cutánea . *Actas dermossifiliogr.* 88, 155-163.
- QIUSHENG Z., Yuntao Z., Rongliang Z., Dean G., Changling L., (2005). Effects of verbascoside and luteolin on oxidative damage in brain of heroin treated mice. *Pharmazie*, 60(7), 539-43.
- RUBIO B., Jara G., Gallardo J., Costa E., Correa O., Bartsch V., Delporte C., Negrete R., Erazo S., Backhouse N., (2004). Evaluación de la eficacia clínica de un preparado de matico en pacientes en tratamientos con fármacos antineoplásicos que presentan eritrodisestesia palmar-plantar. Parte II XV Congreso Chileno de Cancerología, septiembre, Valdivia, Chile. *Revista Chilena de Cancerología y Hematología* 14(3), 105.
- RUBIO B., Gallardo J., Costa E., Correa O., Bartsch V., Delporte C., Negrete R., Erazo S., Backhouse N., (2005) .Evaluación de la eficacia clínica de una crema y un gel de matico en pacientes con tratamiento quimioterápico que presentan eritrodisestesia: XV Congreso Brasileiro de Oncología Clínica. XV CILAC-

Congreso integrado latinoamericano de cancerología. Rio de Janeiro, octubre.  
Revista Oficial Anls do Evento Re. TL 159.

ROSALES L., (2003) “ Estudio químico, evaluación de las actividades analgésicas y antiinflamatorias de un extracto farmacológicamente activo de *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae. Diseño de un preparado dérmico. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Chile.

TAPIA A; Feresin G; Bustos D; Astudillo L.; Theodoluz C; Schmeda- Hirschmann, G; (2000). Biologically active alkaloids and a free radical scavenger from *Prosopis* species. *J. Ethnopharmacology*, 71: 241-246.

WAGNER H.; Blatt S. And Zgainski E.M. (1984). *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokyo.

Figura Nº 3.1: Curva de absorbancia para el ácido gálico

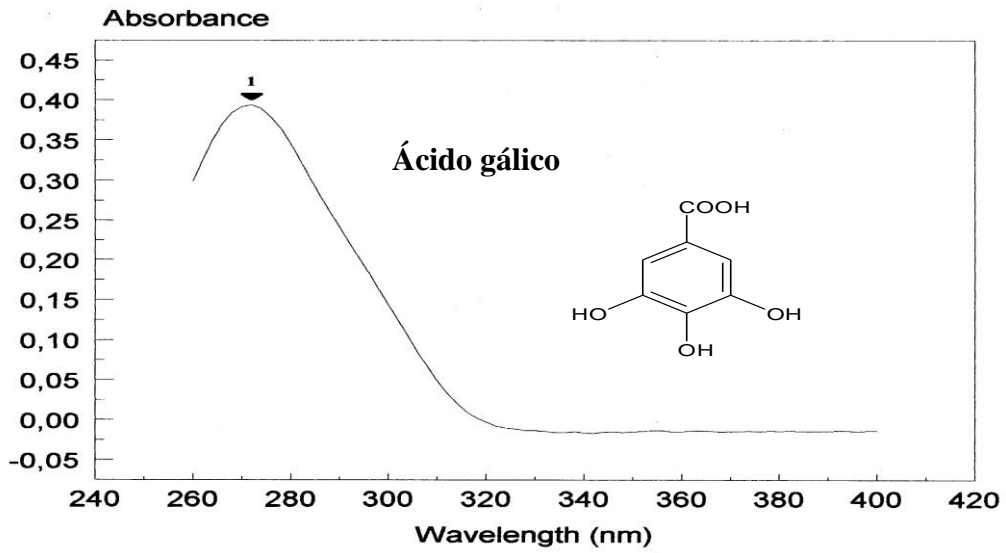


Figura Nº 3.2: Curva de absorbancia para el ácido cafeico

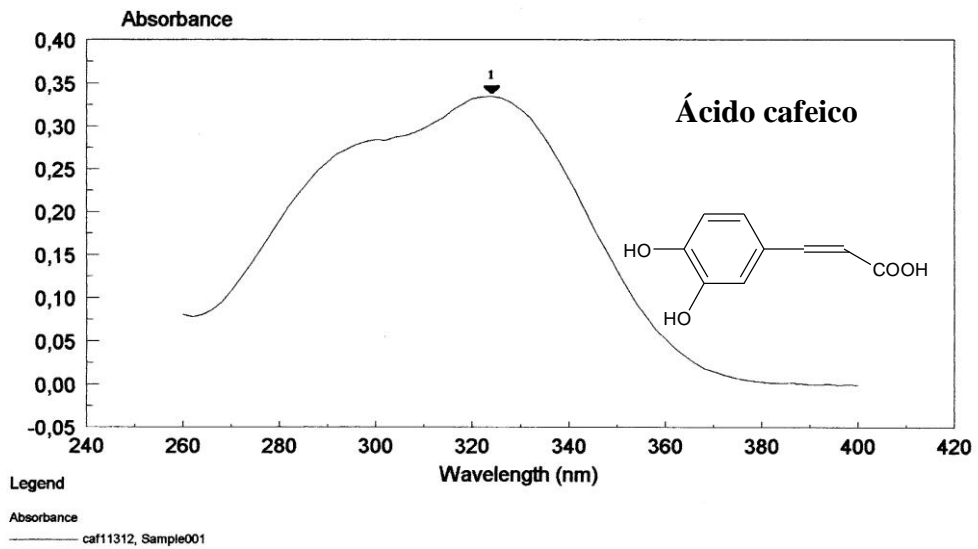
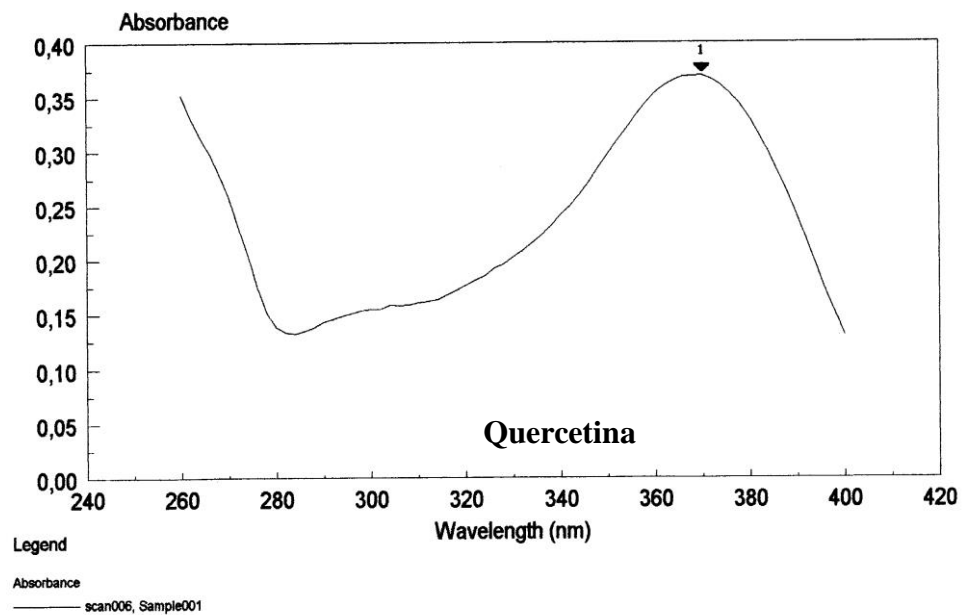
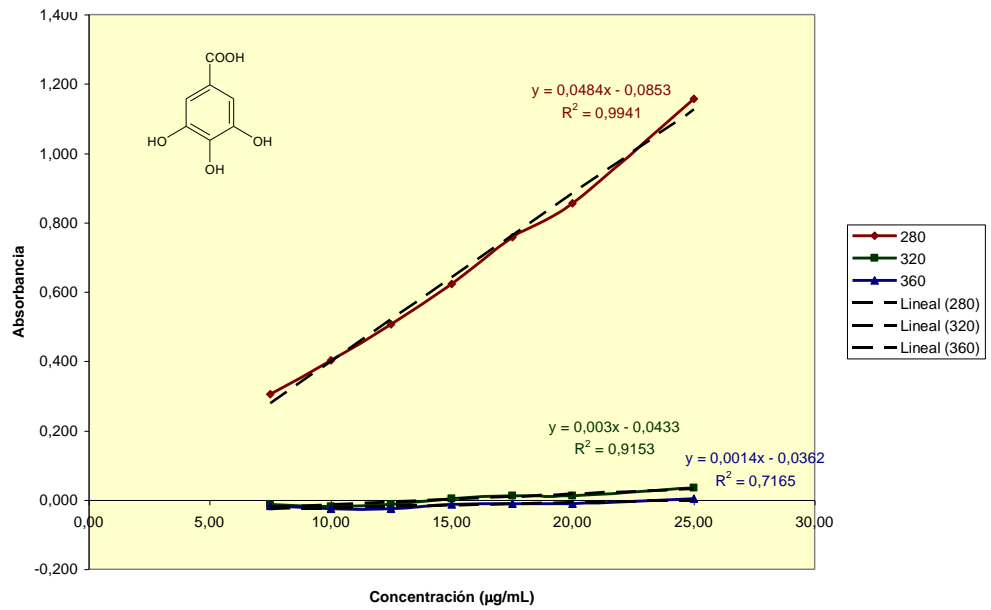


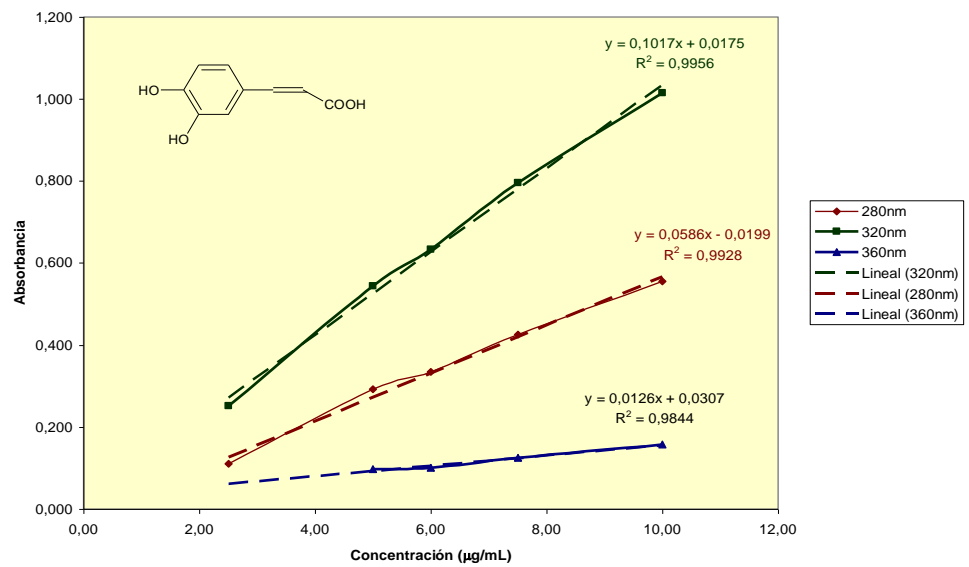
Figura Nº 3.3: Curva de absorbancia para la quercetina



**Figura N° 7: curva de calibracion para el ácido gálico**



**Figura N° 8: curva de calibracion para el ácido cafeico**



**Figura N° 9: curva de calibracion para la quercetina**

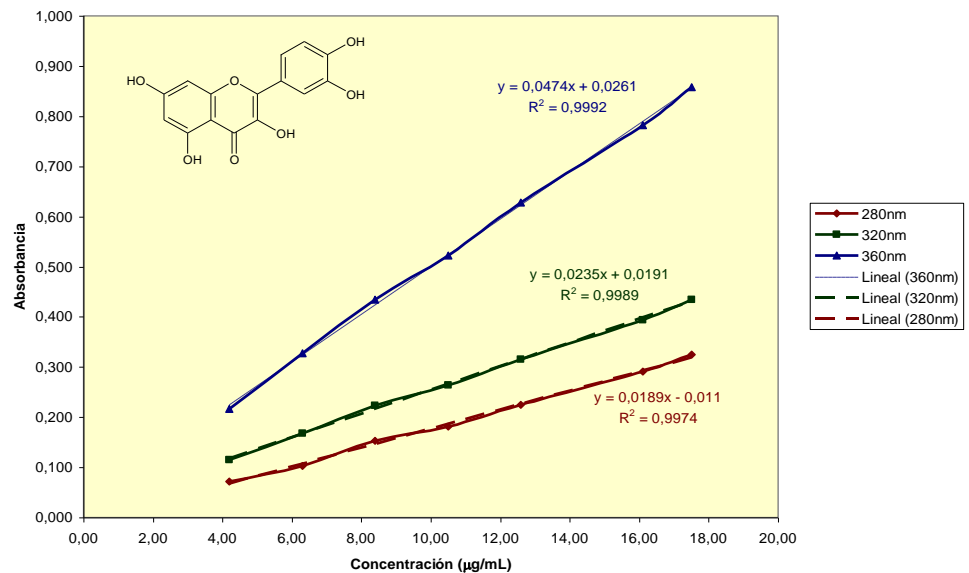


Figura Nº 3.1: Curva de absorbancia para el ácido gálico

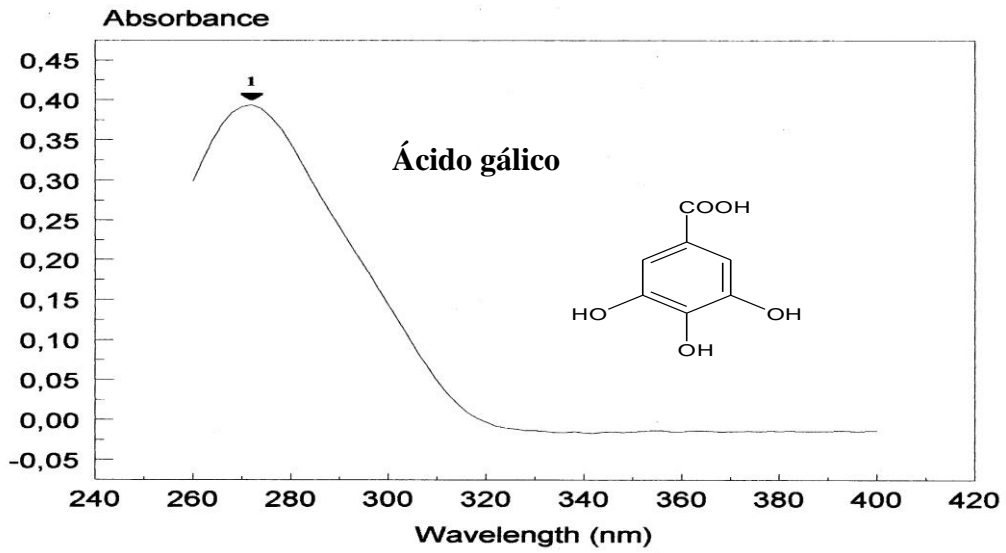


Figura Nº 3.2: Curva de absorbancia para el ácido cafeico

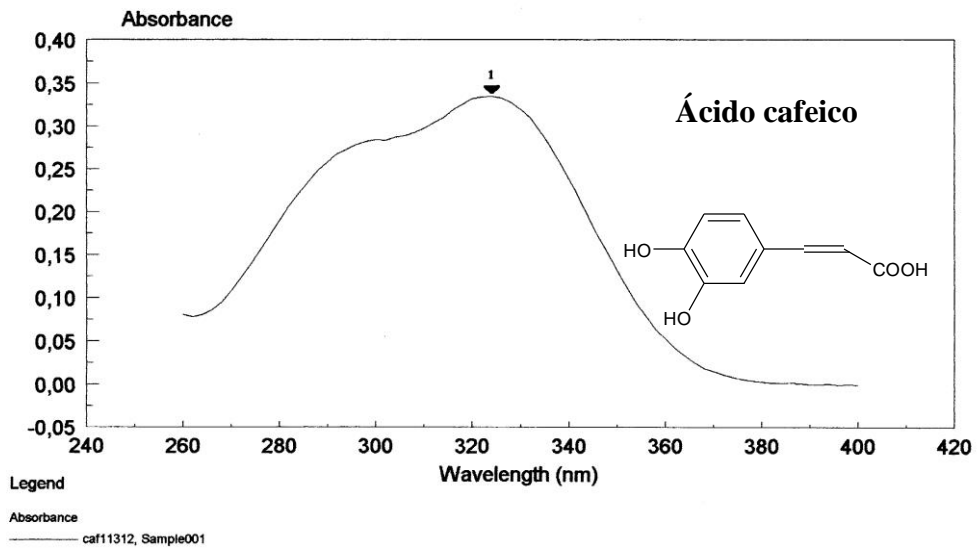


Figura Nº 3.3: Curva de absorbancia para la quercetina

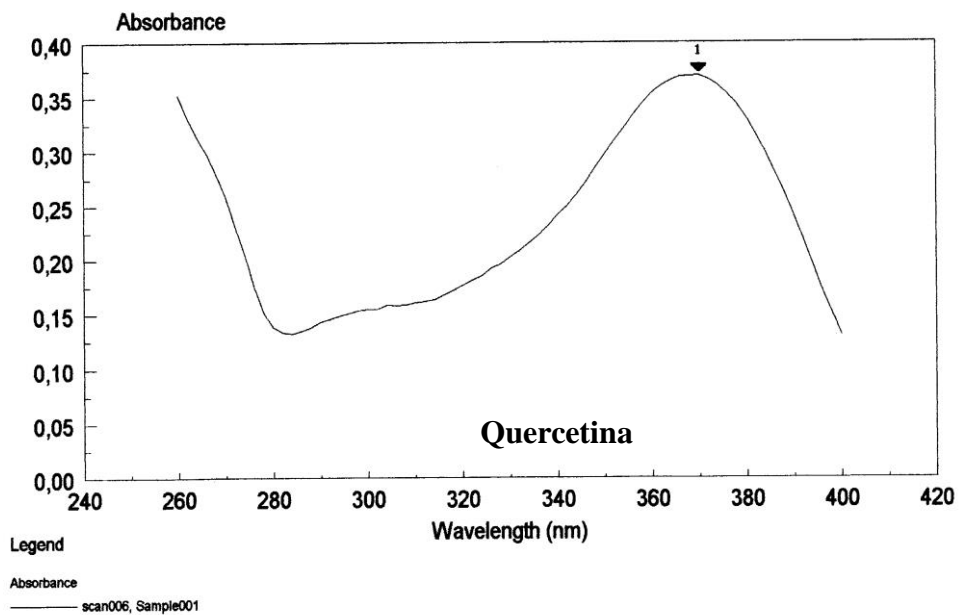


Figura Nº 16: Espectro IR del patrón glucósido- $\beta$ -sitosterol

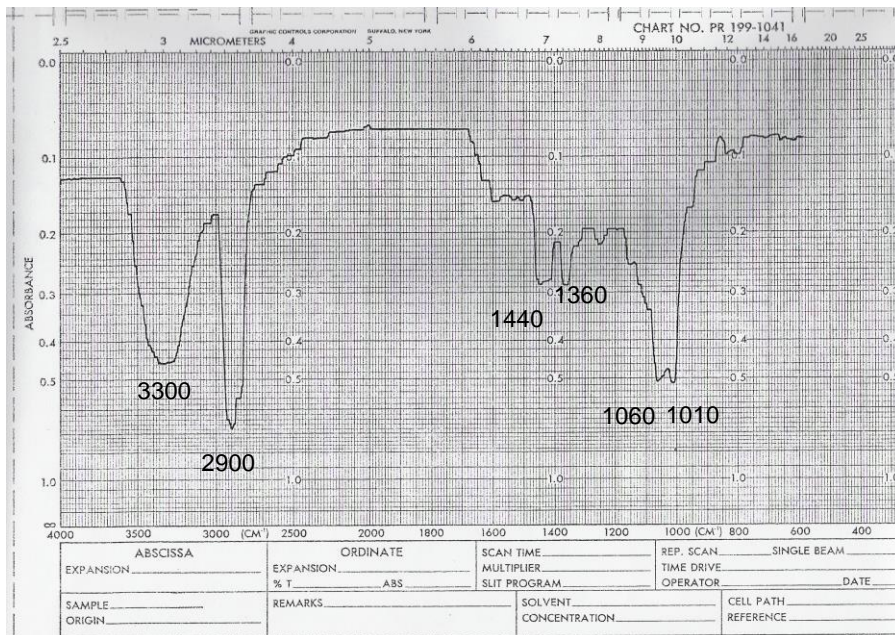


Figura Nº 17: Espectro IR del compuesto aislado de EMAT-1(verano)

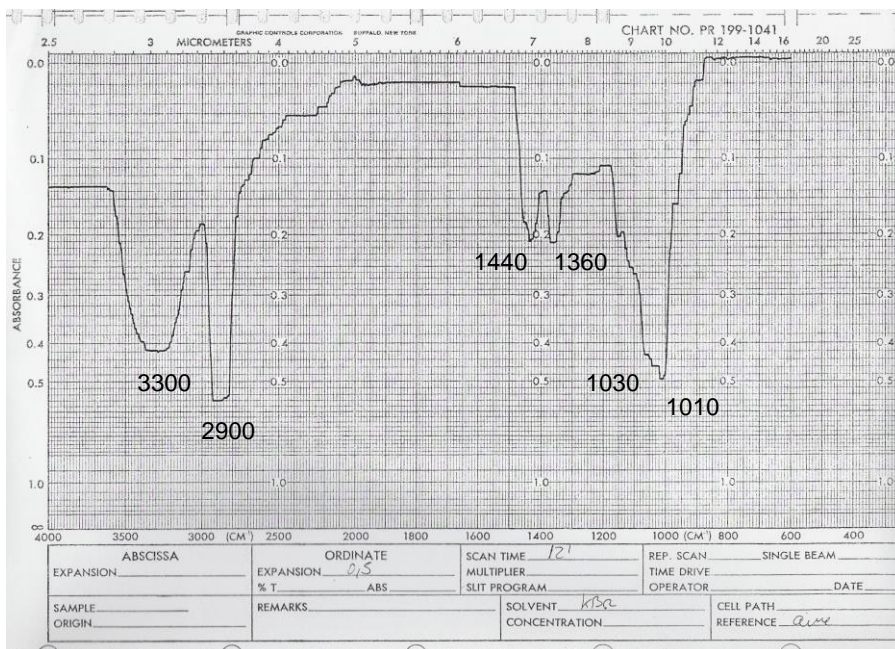


Figura N° 19: Espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto RN1 : Verbascósido

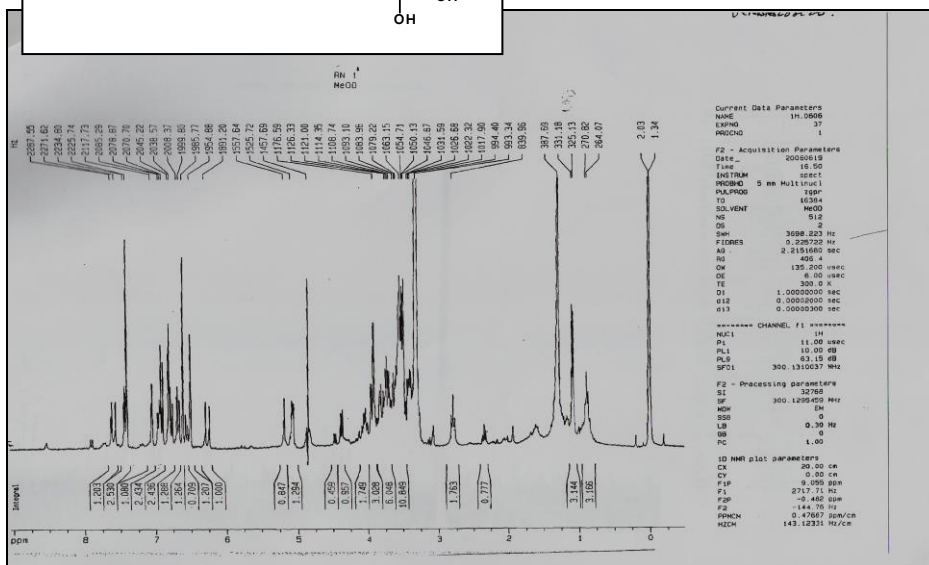
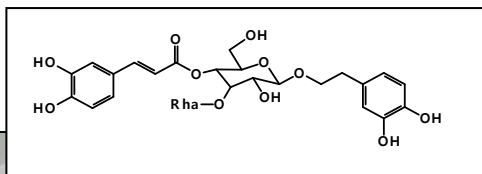
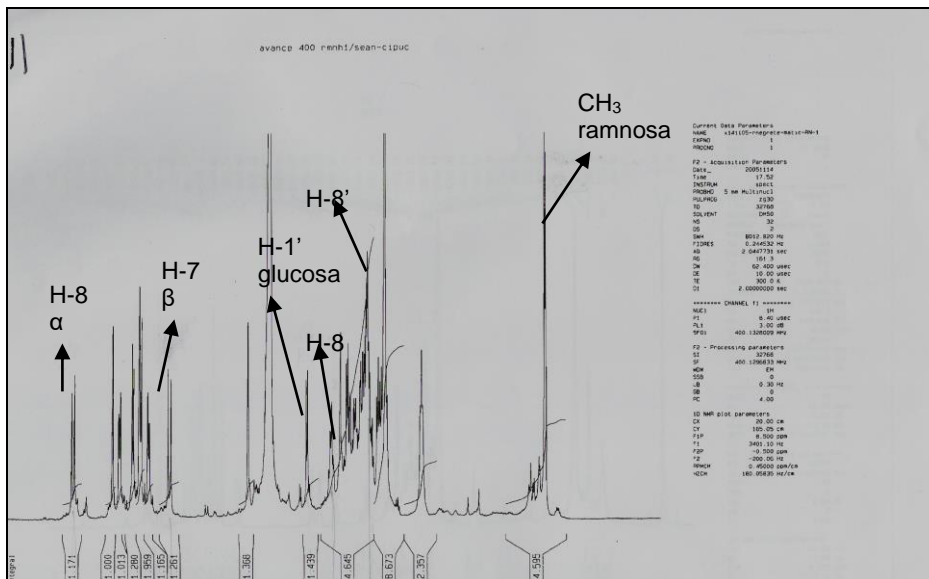




Figura N° 18: Espectro RMN-<sup>13</sup>C del compuesto RN1 : Verbascósido

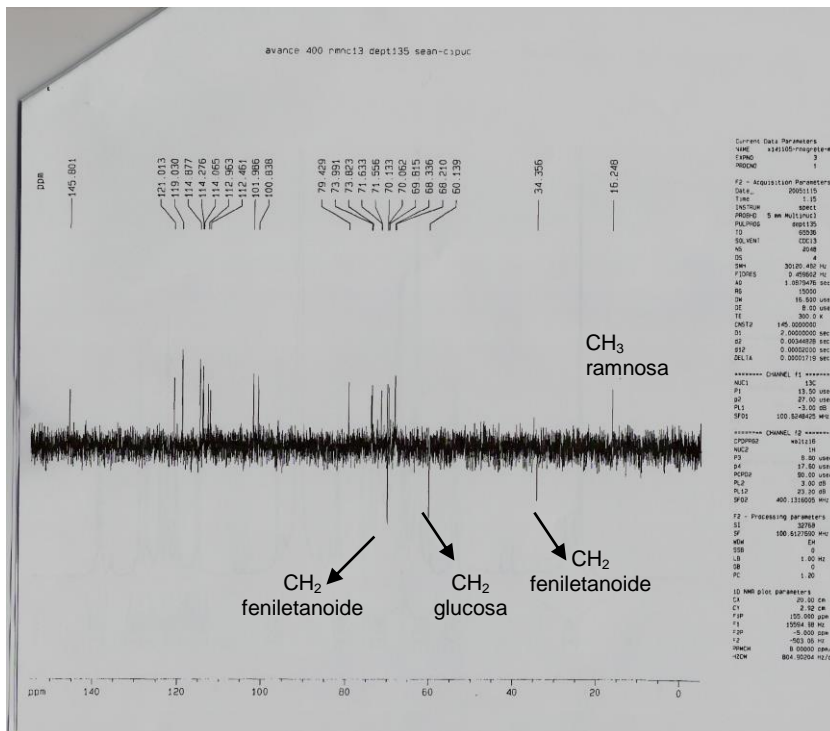
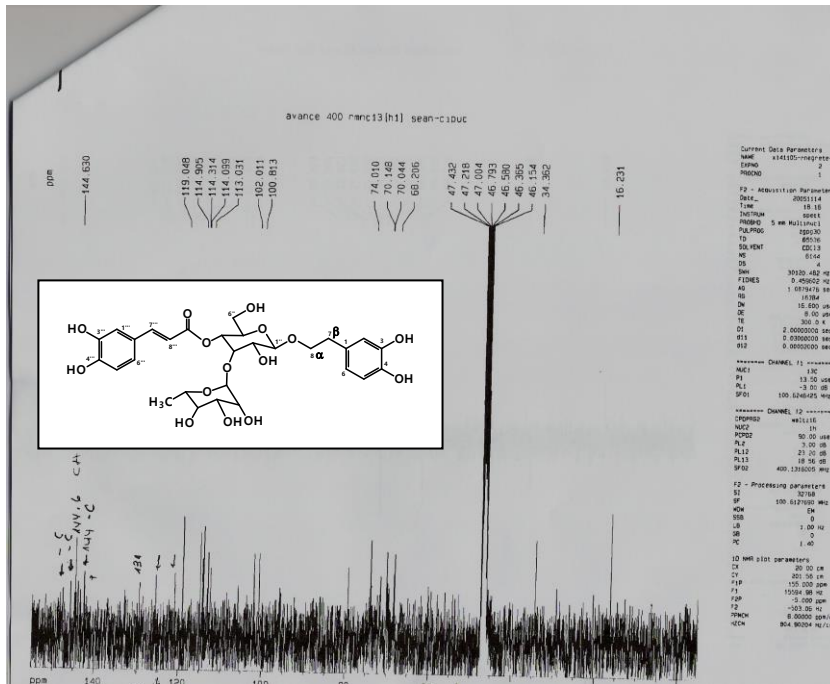


Figura N° 21 : Espectro RMN-1H del compuesto RN1' : 7-O-glucósido de luteolina

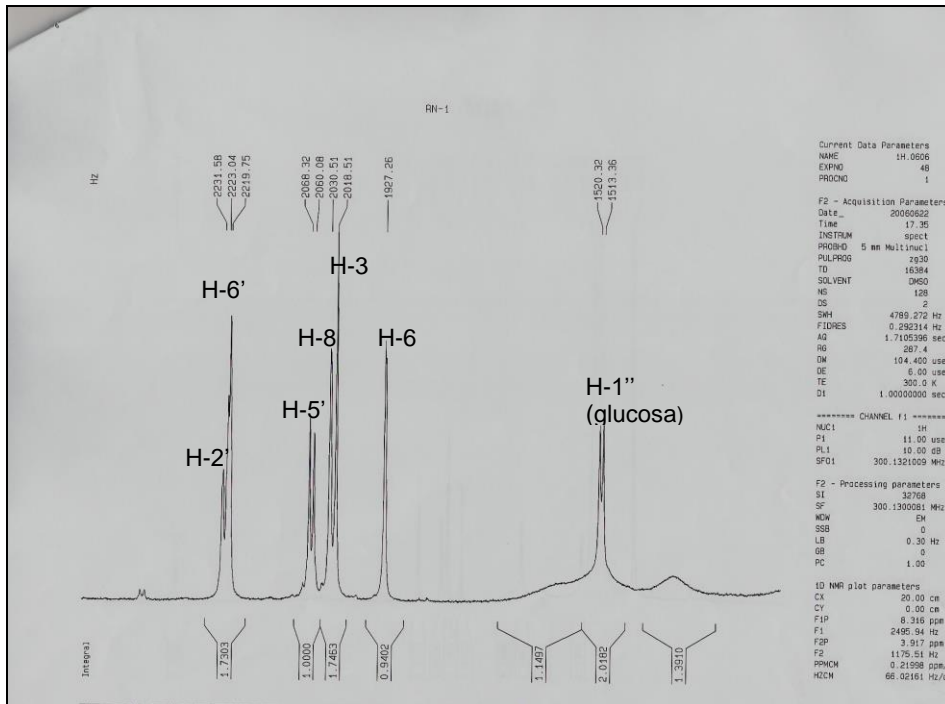
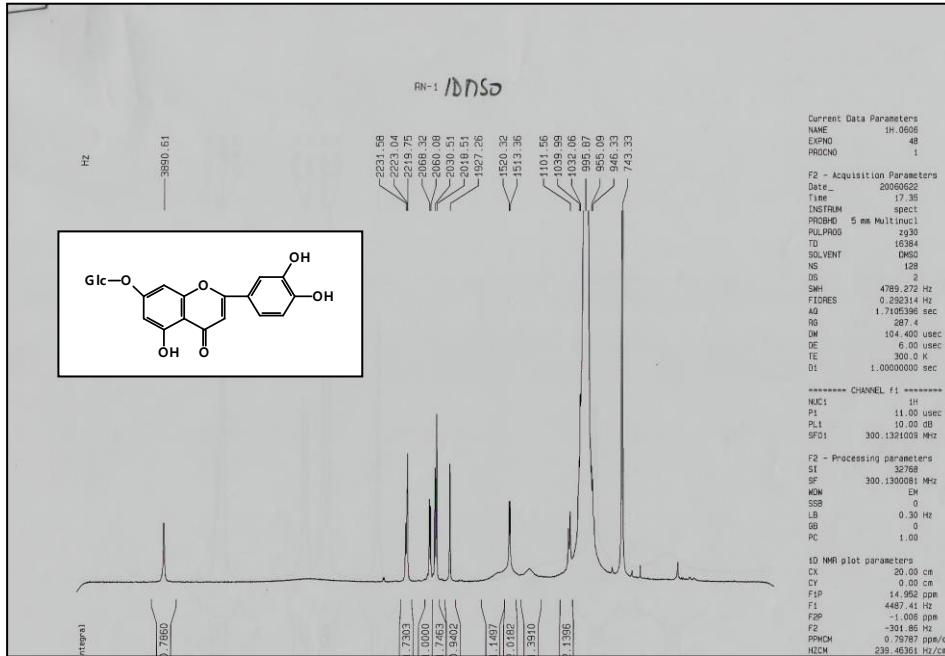


Figura Nº 20: Espectro RMN-<sup>13</sup>C del compuesto RN1' : 7-O-glucósido de luteolina

