



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis de la Maestría en Plantas Medicinales

“Estudio etnofarmacológico y morfoanatómico
de *Fuchsia magellanica* Lam.”

Tesista: Ing. Ana María Bernal Ochoa

Directora: Prof. Dra. Alicia E. Consolini

Co-directora: MSc. Ing. Marta N. Colares

Año 2017

DEDICO ESTA TESIS...

A mi mamá, su fuerza e inteligencia son las que me han guiado toda la vida y sin las cuales esta tesis no hubiera sido posible.

A mis abuelos que con disciplina y amor me criaron como a otra hija y me hicieron quien soy hoy.

A mi papá por su apoyo incondicional a todas mis locas ideas, sin importar la distancia siempre está en mi corazón.

A Julio, su compañía constante y paciencia infinita me ayudaron a iniciar y completar esta aventura.

A mis hermanos Gustavo, Jorge Andrés y Daniel Felipe, es por ellos que lucho para ser mejor todos los días.

AGRADECIMIENTOS

A las Facultades de Ciencias Exactas y Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA por permitirme realizar esta Tesis de Maestría en Plantas Medicinales.

A mi Directora, la Dra. Alicia Consolini, por su guía durante estos años, en los que me regaló su paciencia, cariño y conocimientos.

A mi Co-directora, la Msc. Marta N. Colares, por acompañarme no solo en la ejecución de esta tesis, sino también en las necesidades cotidianas, brindándome su amistad.

A la Dra. Rosana Filip y a la Dra. Maria A. Rosella por la ayuda y enseñanza prestadas para llevar a cabo los estudios cromatograficos de esta tesis.

A María Inés Ragone, Germán Colareda, Soledad Matera por su continua compañía, apoyo incondicional y especialmente por los lindos lazos de amistad creados.

A Maria Elena Del Valle, Carlos Valle y a todos los miembros del Laboratorio de Farmacognosía (UNLP) quienes me ayudaron a llevar adelante los experimentos en su laboratorio.

A todos los profesores que hacen parte de la Maestría en Plantas Medicinales por su predisposición para dar las materias y transmitir sus conocimientos.

A la profesora Tatiana Lobo, con sus enseñanzas me reveló el valor de las plantas y con su guía aprendí a conocerlas.

A toda mi familia, a pesar de la distancia siempre me llegaron sus voces de aliento.

A la familia de Julio, no solo me hicieron parte de su familia, también me han acompañado con cariño a través de la distancia.

A Juan Camilo Morales, Juliana Soler y Lina Gomez que siempre estuvieron presentes.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Uso de plantas medicinales a través de la historia	2
1.2. Uso de Plantas Nativas en la República Argentina	5
1.3. Fuchsia magellanica	6
1.4. Farmacognosia	6
1.4.1. Estudio macroscópico de la planta	7
1.4.2. Estudio microscópico de la planta	7
1.4.3. Análisis fitoquímico	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Pueblos originarios de la Patagonia chilena y argentina	11
2.2. El pueblo mapuche	13
2.2.1. El pueblo Mapuche y el uso de plantas medicinales	14
2.3. Fuchsia magellanica como planta medicinal	18
2.4. Antecedentes botánicos	19
2.5. Antecedentes fitoquímicos	19
2.5.1. Polifenoles y Terpenoides	20
2.6. Estudio de la actividad relajante del músculo liso	21
2.6.1. Funciones y mecanismos contráctiles del músculo liso	22
2.6.2. Músculo liso intestinal	24
2.6.3. Músculo liso uterino	28
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
3.1. Hipótesis	34
3.2. Objetivos de esta tesis	34
3.2.1. Objetivo general	34
3.2.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1. Material Vegetal	37
4.1.1. Procedencia	37
4.1.2. Recolección del material vegetal	37
4.1.3. Determinación taxonómica	37
4.1.4. Acondicionamiento del material vegetal y preparación de los extractos	37
4.2. Análisis botánico	39
4.2.1. Caracteres anatómicos	39
4.2.2. Determinación de valores numéricos o magnitudes proporcionales	41
4.2.3. Pruebas histoquímicas	42
4.3. Estudios fitoquímicos	43
4.3.1. Reacciones de caracterización	43
4.3.2. Cromatografía en capa delgada (TLC) inicial	45
4.3.3. Cromatografía en capa delgada (TLC) enfocada en flavonoides	48
4.3.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	50
4.4. Actividad farmacológica ex vivo	51
4.4.1. Animales y preparados utilizados	51
4.4.2. Soluciones y drogas utilizadas	52
4.4.3. Protocolos	54
4.4.4. Mediciones, cálculos de parámetros y estadística	57
4.5. Actividad Farmacológica in vivo	58
4.5.1. Animales utilizados	58
4.5.2. Soluciones y drogas utilizadas	58

4.5.3. Protocolos de las pruebas in vivo.....	59
4.5.4 Tratamiento estadístico de los datos	62
5. RESULTADOS.....	64
5.1. Análisis botánico.....	65
5.1.1. Arquitectura foliar	66
5.1.2. Epidermis vista en superficie (VS)	66
5.1.3. Lámina en corte transversal (CT).....	68
5.1.4. Pecíolo en corte transversal (CT)	69
5.1.5. Tallo en corte transversal (CT).....	70
5.1.6. Pruebas histoquímicas.....	71
5.2. Ensayos fitoquímicos	72
5.2.1. Reacciones de caracterización	72
5.2.2. Análisis cromatográfico inicial.....	74
5.2.3. Cromatografía en capa delgada (TLC) enfocada en flavonoides.....	77
5.2.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	79
5.3. Actividad Farmacológica	82
5.3.1. Actividad antiespasmódica visceral in vitro.....	82
5.3.2. Evaluación in vivo de las tinturas en el tránsito intestinal (TI).....	101
5.3.3. Efectos de las tinturas en pruebas de comportamiento.....	103
6. DISCUSIÓN	107
6.1. Análisis Botánico	108
6.1.1. Caracteres anatómicos	108
6.1.2. Análisis histoquímico.....	110
6.2. Ensayos Fitoquímicos	110
6.2.1. Pruebas químicas orientativas.....	110
6.2.2. Análisis cromatográfico inicial	111
6.3. Actividad Farmacológica	114
6.3.1. Actividad gastrointestinal.....	115
6.3.2. Actividad uterina.....	119
6.3.3. Actividad ansiolítica o sedante	122
6.4. Correlación de la actividad biológica con los compuestos químicos.....	123
6.5. Alcances y limitaciones del estudio.....	128
7. CONCLUSIONES	129
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	131

RESUMEN

Esta tesis tiene el objetivo de realizar un estudio farmacológico para validar científicamente el uso etnobotánico que los pueblos originarios mapuches dan a la *Fuchsia magellanica* como tocolítica y antiespasmódica intestinal. Se compararon los efectos de las hojas y flores de la especie nativa patagónica (F.m-Sur) con los de la especie naturalizada a nuestra región (F.m BA). Como especie promisoría fitoterapéutica, se hicieron los estudios botánicos morfo-anatómicos de gran importancia en la identificación de drogas vegetales y la caracterización de los posibles principios activos para ahondar en el estudio de los mecanismos de acción. El objetivo farmacológico fue estudiar las propiedades mediante experimentos “ex vivo” en intestino y útero aislados de rata, y su actividad en modelos “in vivo” de tránsito intestinal y conducta. Se realizaron curvas concentración-respuesta contráctil (CCR) en intestino con el agonista colinérgico carbacol (Cbl), y en útero con Cbl y serotonina (5HT), en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de las tinturas de las F.m. de ambos orígenes (Sur y BA). Se realizaron diversos protocolos para determinar los mecanismos de acción “ex vivo”, y se compararon los estudios “in vivo” con controles negativos de vehículo y positivos de principios activos conocidos. Como resultados se obtuvo que las tinturas de hojas y flores de F.m-Sur y F.m-BA se comportaron como antiespasmódicas intestinales y tocolíticas, inhibiendo en modo no competitivo a las CCR de los diversos agonistas, con ciertas diferencias de potencia entre las 4 preparaciones. También las tinturas de hojas inhibieron en modo no competitivo la CCR de Ca^{2+} en intestino, sugiriendo que interfieren con el influjo de Ca^{2+} al músculo liso como principal mecanismo celular, y el efecto antiespasmódico se manifestó “in vivo” en el test de tránsito intestinal en ratones a las dosis de 73.5 mg/kg para F.m-Sur y menos activa a 62.5 mg/kg para F.m-BA. Además, las tinturas de hojas exhibieron un leve efecto sedante en el test de campo abierto en ratones, pero no mostraron actividad ansiolítica en el laberinto en cruz elevado. En su composición fue detectada la presencia de flavonoides como vitexina, quercetina, isoquercitrina y canferol en la F.m-Sur y de quercitrina e hiperósido en la F.m-BA, algunos de los cuales

se han descrito como antiespasmódicos. En conclusión, esta tesis demuestra la actividad antiespasmódica y tocolítica de las hojas y flores de *Fuchsia magellanica*, y caracteriza su perfil botánico y fitoquímico, nunca antes reportado en bibliografía científica, contribuyendo a validar su uso fitoterapéutico.

Palabras clave: *Fuchsia magellanica*, tocolítico, antiespasmódico, bloqueante de calcio, intestino, útero, micrografía, flavonoides, hiperosido, quercitrina.

Abreviaturas:

Ach (acetilcolina), AMPc (adenosin monofosfato cíclico), BA (Buenos Aires), Ca (calcio), Cbl (Carbacol), CCR (Curva concentración respuesta), DAG (diacilglicerol), DMAPP (dimetilalil pirofosfato), F.m. (*Fuchsia magellanica*), 5-HT (serotonina), HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia), ICC (células intersticiales de Cajal), IP3 (inositol-trifosfato), IPP (isopentenil pirofosfato), MKCL (miosinaquinasa de cadena liviana), NO (óxido nítrico), PDE (enzima fosfodiesterasa), PG (prostaglandinas), PIP (fosfoinositoles de membrana), PKC (proteínquinasa C), RS (retículo sarcoplásmico), TEA (tetraetilamonio), TLC (cromatografía de capa delgada), TTX (tetrodotoxina).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Uso de plantas medicinales a través de la historia

El uso de las plantas medicinales comienza con la historia del hombre. Casi todas las culturas de la antigüedad hasta la actualidad han utilizado las plantas como fuente de medicinas y jugando un importante papel en la curación empírica (Deshpande & Bhalsing, 2013). Con la búsqueda de curar sus enfermedades y dolencias y con la relación que siempre el hombre tuvo con la naturaleza, ha ido observando, probando y mejorando los procesos de obtención hasta el punto de llegar a las formas farmacéuticas que encontramos hoy en día.



Figura 1. Fragmento del Ebers Papyrus (Fuente: New World Encyclopedia, 2011)

Se han encontrado evidencias del uso de plantas medicinales, documentos escritos, monumentos preservados e incluso fitomedicinas originales, desde hace aproximadamente 5000 años. En una loza de arcilla sumeria de Nagpur, civilización antigua ubicada en lo que es hoy territorio iraquí, se pueden ver 12 recetas para la preparación de drogas de más de 250 plantas diferentes, algunos de ellos de alcaloides hoy ampliamente conocidos como la amapola (*Papaver somniferum*), el beleño negro (*Hyoscyamus niger*) y la mandrágora (*Mandragora autumnalis*) (Bauer, 2012). La farmacopea egipcia de 1550 A.C. dejó registro con el *Ebers papyrus* (Fig. 1) de un amplio conocimiento médico y del cuerpo humano, así como del uso de más de 700 sustancias usadas para curar enfermedades, la mayoría de ellas provenientes de plantas (New World Encyclopedia, 2011). Así, las plantas fueron el origen de las medicinas milenarias y tradicionales de todo el mundo, fuente de los primeros fármacos aislados y purificados, como la morfina, la dextrocurarina, la atropina, la hiosciamina, la pilocarpina, entre otros.

En la Edad Media la demanda por los compuestos farmacéuticos hizo que de las formas farmacéuticas primarias usadas hasta ese momento (infusión, decocción y maceración) se pasara a otras formas con sólidos, como las suspensiones y los sellos, antecesoros de los comprimidos. Se buscaron entonces nuevos principios activos para formular. El siglo XIX fue un momento crucial para el desarrollo de los fitofármacos ya que se dio inicio al aislamiento y purificación de compuestos provenientes de plantas como la amapola (1806), ipecacuana (1817), quinina (1820), granada (1878), entre otras (Bauer, 2012).

Con los años se evolucionó al aislamiento de glicósidos, lo cual dio inicio a la farmacéutica química, que fue perfeccionando los métodos al punto que hoy se aíslan de plantas taninos, saponinas, aceites, vitaminas, flavonoides, alcaloides, fitohormonas, etc (Bauer, 2012). Al día de hoy se han aislado al menos 12.000 compuestos de diferentes plantas, lo que se estima que representaría alrededor de un 10% de los compuestos presentes en plantas (Tapsell *et al.* 2006). De estos compuestos aislados han nacido muchas drogas que hoy se comercializan alrededor

de todo el mundo tales como aspirina, taxol, digoxina, quinina, salicilatos y morfina, entre otros.

Aun coexistiendo con los fármacos de síntesis, las propiedades medicinales de las especies de plantas han hecho una contribución destacada en el origen y la evolución de muchas terapias tradicionales a base de hierbas, abriéndose camino como una rama de la medicina comúnmente llamada medicina herbal, o Fitoterapia (Deshpande & Bhalsing, 2013). La medicina herbal es aquella que usa la planta entera, sus partes de manera cruda, o sus principios activos en preparaciones magistrales o como productos refinados para el tratamiento de las enfermedades (OMS, 2013).

Hoy en día, a pesar del avance de la química farmacéutica sintética, las plantas medicinales siguen siendo importantes para la economía mundial, ya que aproximadamente el 85% de los preparados de medicina tradicional implica el uso de plantas o extractos de plantas. Alrededor del 80% de la población mundial usa la fitoterapia para suplir las necesidades diarias en enfermedades de bajo riesgo, basándose en la medicina popular o ancestral, debido a la escasez, lejanía y altos costos de la medicina ortodoxa (Fabricant & Farnsworth, 2001; Deshpande & Bhalsing, 2013).

En los últimos años las plantas medicinales han recuperado un amplio reconocimiento con una creciente confianza en la medicina herbal, debido a los menores efectos secundarios en comparación con la medicina alopática. Recientemente, las sustancias derivadas de las plantas han adquirido gran interés debido a sus aplicaciones versátiles, por lo cual se realizan estudios sobre la efectividad de las plantas medicinales, sus compuestos activos y los posibles efectos secundarios. Consecuentemente, en la actualidad la mayoría de las farmacopeas describen las drogas vegetales, incluso algunos países tienen farmacopeas herbales por separado (Bauer, 2012; Capasso *et al.* 2003).

Por lo anterior nace la importancia del estudio riguroso y dedicado de las

plantas medicinales empleadas de manera tradicional, que permite verificar y validar los usos ancestrales, a la vez que clarifica sus posibles actividades y enriquece el conocimiento farmacéutico al vislumbrar nuevos compuestos activos o incluso nuevas indicaciones para compuestos ya aprobados.

1.2. Uso de Plantas Nativas en la República Argentina

El estudio de las plantas nativas empleadas como plantas medicinales tradicionales, ha recobrado interés durante los últimos años, no solo con el objetivo de comprender y rescatar el conocimiento de los pueblos originarios, sino también como parte del interés que han despertado en las sociedades de todo el mundo los productos naturales. Se debe tener en cuenta que el proceso de exploración y adquisición del conocimiento etnobotánico medicinal no es un suceso fortuito o al azar, sino el resultado de complejas lógicas que integran lo ambiental, con lo empírico y lo cultural (Messer, 1991; Molares & Ladio, 2008).

Argentina ha estado poblada por gran cantidad de etnias indígenas, que a través de los años han intercambiado territorios, conocimientos e incluso han establecido redes comerciales. Algunos de estos pueblos son: Atacama, Ava Guaraní, Aymara, Chané, Charrúa, Chorote, Chulupi, Comechingón, Diaguita-Calchaquí, Guaraní, Huarpe, Kolla, Lule, Maimará, Mapuche, Mbyá Guaraní, Mocoví, Omaguaca, Ona, Pampa, Pilagá, Quechua, Rankulche, Sanavirón, Tapiete, Tehuelche, Toba, Tonocote, Tupí Guaraní, Vilela, Wichí (INDEC, 2010). Todos ellos han tenido una rica tradición de uso de plantas nativas como medicinales. La etnia Mapuche es la más numerosa de la Patagonia Argentino-Chilena, al ser una fusión cultural de las poblaciones indígenas a las que han absorbido, como la Tehuelche, creando subgrupos ubicados a lo largo y ancho de La Patagonia (Ladio, 2006; Molares & Ladio, 2009). El pueblo mapuche tiene un gran conocimiento del uso de plantas de las regiones que habitó, abarcando desde aquellas que crecen en su región originaria de selva húmeda patagónica hasta las típicas de la meseta seca ubicada al Este, que ocuparon con posterioridad en tiempos en que criaban ovejas (Molares & Ladio, 2009). Este pueblo se extiende en una amplia

zona y ha sufrido cambios socio-culturales importantes a través del tiempo, por lo que ha sido objeto de interesantes estudios etnobotánicos (Molares & Ladio, 2009). Se abordará este tema en la sección 2.2.

1.3. *Fuchsia magellanica*

Fuchsia magellanica Lam. pertenece a la familia *Onagraceae* y al género *Fuchsia*, siendo autóctona de Chile y Argentina donde crece endémicamente en la región andino-patagónica, pero ha sido naturalizada en la mayor parte del país. Se la conoce con el nombre vulgar de chilco, aljaba, fucsia, o Chillcoagu para los Mapuches (Berry, 1989; Massardo & Rozzi, 1996; Villagran, 1998). *F. magellanica* es una planta a la cual no se le ha dado mucha importancia científica, sin embargo está presente en diferentes trabajos etnobotánicos que resaltan su uso medicinal.

Como planta medicinal de los pueblos originarios *F. magellanica* es predominantemente empleada contra las dolencias gineco-obstétricas. Siendo una planta silvestre, se encuentra en un área de recolección menor a los 1000 m dentro del bosque andino patagónico, y es la planta medicinal más reportada para este uso por los pueblos originarios (Estomba *et al.* 2006). Esto la hace una planta de interés farmacológico y resulta relevante su estudio experimental de manera que se pueda validar el uso tradicional que se le ha dado y que se puedan determinar las características morfo-anatómicas y químicas que permitan su identificación posterior. Se abordará este tema en la sección 2.3.

1.4. *Farmacognosia*

La mayoría de las plantas contienen una variedad de productos fitofarmacéuticos, que han encontrado aplicaciones muy importantes en los campos de la agricultura, la medicina humana y veterinaria. Los metabolitos secundarios de las plantas medicinales son también recursos empleados como componentes de los medicamentos de la medicina tradicional, de los nutraceuticos, suplementos

alimenticios, productos intermedios farmacéuticos o entidades químicas para las drogas sintéticas. Las plantas medicinales han proporcionado a la medicina moderna numerosos agentes terapéuticos. Los productos naturales desempeñan un papel dominante en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento y la prevención de enfermedades. Estimándose que más del 25% de los medicamentos modernos se derivan directa o indirectamente de las plantas (Deshpande & Bhalsing, 2013).

La rama que se encarga de estudiar estos medicamentos derivados de fuentes naturales es la Farmacognosia, cuyo trabajo es principalmente el de estandarización, autenticación y estudio de drogas naturales. La mayor parte de la investigación en Farmacognosia se ha hecho en la identificación de especies polémicas de plantas, la autenticación de las plantas medicinales tradicionales de uso común a través de análisis morfológico, fitoquímico y físico-químico. El estudio farmacognóstico incluye parámetros que ayudan a identificar la droga en forma de polvo seco, para detectar posibles adulteraciones, asegurando la identidad de la planta. Este paso es necesario para lograr la eficacia de la droga y los productos naturales, y su seguridad, es decir que no aparezca toxicidad o efectos adversos provenientes de un adulterante. Según Choze (2004) y Chanda (2014) los parámetros de normalización farmacognóstica incluyen a las siguientes determinaciones:

1.4.1. Estudio macroscópico de la planta

La descripción morfológica de las partes de la planta que se ven a simple vista o con la ayuda de una lente de aumento, este estudio es de relevancia únicamente en los casos donde se tienen las partes enteras de la planta.

1.4.2. Estudio microscópico de la planta

El estudio anatómico se realiza tomando la sección apropiada de las partes de la planta bajo estudio y haciendo un análisis microscópico de sus características, se puede anotar cada carácter distintivo, algunos de los cuales se conservan también en

el estudio de la droga en polvo. Para este estudio se hace uso de algunos productos químicos que se utilizan para la obtención de secciones claras e identificación de algunas macromoléculas (floroglucinol, hidrato de cloral, safranina, naranja de metilo, lugol, yodo, entre otros).

1.4.3. Análisis fitoquímico

El polvo en bruto o los extractos vegetales en diferentes disolventes se someten a pruebas para diversos fitoconstituyentes presentes en ellos mediante procedimientos estándar. Por lo general se comprueba la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, fenoles, glucósidos cardíacos, triterpenos, esteroides y saponinas. Este análisis hace uso de diferentes técnicas cromatográficas como son la cromatografía en columna, cromatografía en capa delgada (TLC) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

El proceso de estandarización puede conseguirse mediante estudios farmacognósticos escalonados como se ha indicado anteriormente. Estos estudios ayudan en la identificación y autenticación del material vegetal. Dicha información puede actuar como referencia para la correcta identificación de una planta particular y también será útil para hacer una monografía de la planta para su difusión en farmacopeas fitoterapéuticas. Este conocimiento contribuye a la estandarización del fitoterápico y actúa como una herramienta para detectar adulterantes y sustituyentes, y mantener la calidad, reproducibilidad y eficacia de los fármacos naturales. La parte terapéutica de la planta puede ser cualquier parte de la planta; la hoja, la semilla, el tallo, la corteza del tallo, la raíz, la corteza de la raíz, la flor, el rizoma, la cáscara de la fruta o la fruta, el tubérculo, etc. (Chanda, 2014) y se ajusta su análisis de acuerdo a la parte que se esté estudiando.

La importancia de la Farmacognosia radica en que es aplicable a la industria farmacéutica, la cual puede emplear los metabolitos secundarios de las plantas medicinales como materia prima o en el descubrimiento de moléculas nuevas. Por otra

parte, sólo un número limitado de plantas medicinales han recibido un escrutinio científico detallado, lo que llevó a la Organización Mundial de la Salud a recomendar que esta área sea exhaustivamente investigada (Deshpande & Bhalsing, 2013). Finalmente, se requiere de la Fitofarmacología para estudiar científicamente la acción farmacológica de la planta medicinal o los productos aislados, y conocer su mecanismo de acción. Esta disciplina adapta las metodologías clásicas en diversos sistemas (*in vivo*, *ex vivo* e *in Vitro*) al estudio de los diversos extractos de plantas medicinales o sus principios activos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Pueblos originarios de la Patagonia chilena y argentina

Patagonia es la región a la cual llegó la expedición de Hernando de Magallanes en 1520, momento en el que por primera vez hicieron contacto con los indígenas, a quienes denominaron Patagones (Musters, 1964). En la cultura tradicional, desde la publicación de Antonio Pigafetta “La primera vuelta al mundo” de 1520, se dice que el nombre Patagones se debió a que Magallanes observó los grandes pies de los indígenas que eran debido a que los cubrían con grandes pieles, y los llamó *pata gau*, que quiere decir *pata grande*, en Portugués. Así, se derivó el nombre a la región habitada por los Patagones como Patagonia.



Figura 2. Mapa esquemático de la Patagonia argentino-chilena y distribución de las principales comunidades mapuches (Fuente: Molares & Ladio. 2012)

Actualmente la región de la Patagonia está delimitada por el norte en la desembocadura del río Calle-Calle al Océano Pacífico, a la altura de Valdivia, República de Chile, siguiendo en dirección noreste hacia la cordillera de Los Andes y cruzando al territorio de la República Argentina, donde es llamada Patagonia Oriental, y es limitada al norte por el Río Colorado. Al sur la región Patagónica limita con el Océano Pacífico por el oeste y con el Océano Atlántico por el este, hasta que estos dos Océanos se encuentran en las zonas de Magallanes y Cabo de Hornos, e incluye la isla Grande de Tierra del Fuego y la isla de los Estados al este (Said, 2012). Geográficamente está formada por mesetas que culminan en la costa Este atlántica en forma de altos acantilados que sufren grandes altibajos de las mareas. Es cruzada de oeste a este por algunos ríos que nacen en la cordillera de los Andes y se unen como afluentes a grandes ríos, que desembocan en el Océano Atlántico, de los cuales se destaca el Río Negro. La región patagónica abarca desde bosques lluviosos en el oeste hasta estepas semi-desérticas hacia el este, y conserva una alta proporción de áreas naturales poco habitadas que coexisten con otras más alteradas y sometidas mayormente al pastoreo de ganado doméstico (Ladio, 2006).

La región patagónica ha estado ocupada por gran cantidad de etnias indígenas, dentro de las cuales resaltan los mapuches provenientes del oeste de la cordillera de los Andes, los tehuelches que estaban afincados en el este de los Andes hasta la actual provincia de Buenos Aires y fueron llamados también patagones, y en el extremo sur y las islas estaban los onas o selknam, los yaganes y los alacalufes. Sin embargo, con los años los pueblos más pacíficos como los tehuelches fueron invadidos y absorbidos por las tribus más aguerridas que eran los mapuches del oeste. Por otra parte, los onas y otras etnias de la Tierra del Fuego e islas del sur sobrevivieron hasta fines del siglo XIX, llegando a ser estudiados por Darwin, pero se extinguieron por las enfermedades provenientes de los europeos, como la viruela. Las etnias patagónicas sobrevivientes, especialmente mapuches, continúan con sus prácticas de exploración, recolección y uso de los ambientes ecológicos para la búsqueda de alimentos y plantas medicinales (Ladio & Lozada, 2004). Un ejemplo importante es el subgrupo de los pehuenches que

son el grupo recolector más importante de la etnia Mapuche, conocidos por el uso de los piñones del pehuén como parte fundamental de sus dietas (Ladio, 2006). También mantienen conocimientos importantes sobre la flora local, a pesar del avance de la urbanización (Estomba *et al.*, 2006). Sin embargo se ha encontrado que las generaciones más jóvenes han ido perdiendo significativamente el conocimiento respecto a las diferentes plantas medicinales y esto ha conllevado a la disminución en su uso (Molares & Ladio, 2009). La pérdida de interés en los conocimientos tradicionales y el aumentado interés por ser parte del mundo desarrollado se ha relacionado principalmente con la unión de las tribus con el mundo occidental, perdiendo la conexión con sus tradiciones y costumbres, además del desarraigo de sus tierras nativas (Estomba *et al.*, 2006). Eso los llevó a abandonar las prácticas agrícolas que están fuertemente ligadas con el uso de las plantas medicinales (Molares & Ladio, 2009). Trabajos etnobotánicos, y en parte también esta tesis, tratan de rescatar estos conocimientos ancestrales y darles valor frente a la comunidad científica de manera que sus usos sean validados y aplicados.

2.2. El pueblo mapuche



Figura 3. Campamento del pueblo patagón (fuente: NOAA photo library).

El pueblo Mapuche, cuya etimología significa "*hombre de la tierra*", habita la franja territorial comprendida desde el sur del desierto de Atacama en territorio chileno, hasta la zona entre el norte de Neuquén y el noroeste de Río Negro, incluyendo el oeste de Chubut, en la Patagonia argentina (Alonso, 2004). La Figura 2 muestra que habitan las tierras que se extienden desde los 37° hacia el sur, y son el resultado de la fusión cultural de distintas comunidades que habitaron originalmente la región de los bosques templado-fríos del sur de los Andes (De Mösbach, 1992, Molares & Ladio, 2012).

Son cazadores, horticultores y recolectores de los bosques patagónicos, pero desde la conquista española han sufrido grandes cambios, dentro de los cuales se convirtieron en pastores montados, que viven lejos de sus tierras ancestrales. Sin embargo y a pesar de la pérdida de conocimientos ancestrales, el uso de plantas silvestres comestibles y medicinales siguen siendo una característica esencial de su tradición cultural (Molares & Ladio, 2009; Eyssartier *et al*, 2008).

2.2.1. El pueblo Mapuche y el uso de plantas medicinales

Al igual que en los diferentes pueblos originarios de la Patagonia, el chamanismo ha sido el principal protagonista entre las creencias mágico-religiosas de este pueblo, siendo las plantas una parte esencial de los distintos rituales. Estos rituales son ejecutados por la "*machi*" o "*yerbatera*" quien tiene una fuerte presencia en todos los actos sociales, resultando ser un intermediario entre los dioses (*huenu mapu*) y los indígenas. Tiene también el rol de médico y es consultado cuando los problemas de salud se consideran relacionados con enfermedades del alma o los factores sobrenaturales (Alonso, 2004; Ladio *et al*, 2007).

El conocimiento tradicional sobre plantas es aprendido y transmitido socialmente entre los integrantes de la tribu, principalmente de padres a hijos, aunque también surge de la experiencia personal que resulta de la interacción con su contexto

ambiental (Ladio, 2006). Una técnica para mantener estos conocimientos es la de llevar los niños al campo, colaborando en las tareas de recolección de plantas y al mismo tiempo aprendiendo modos de reconocerlas, extraerlas y transportarlas hasta el hogar (Richeri *et al*, 2013). Son los padres quienes juegan un papel fundamental en la transmisión de estos conocimientos en las primeras etapas de la vida. Sin embargo, el uso de plantas silvestres es parte de la actividad socio-cultural a lo largo de toda la vida, donde los maestros juegan un importante papel en el mantenimiento y preservación de las tradiciones, utilizando la apreciación dada por la comunidad como criterio para la importancia de las plantas silvestres. Sin embargo, la fusión de la cultura mapuche con la cultura occidental, el uso de medicinas alternativas por otras comunidades (como la nuestra) y la importancia socio-económica dada a una planta en específico a nivel mundial, moldean la importancia y preservación de los conocimientos tradicionales de las plantas silvestres (Ladio & Molares, 2013).

Hoy en día la herbolaria mapuche no sólo está formada por el conocimiento tradicional, sino que ha ido introduciendo conocimiento no tradicional, tal que entre las especies nativas y exóticas de plantas ha llegado a estar compuesta por más de 500 especies (Molares & Ladio, 2009). Se ha comprobado entonces que la introducción de estas plantas exóticas naturalizadas complementa la oferta de plantas medicinales nativas construyendo una herbolaria mucho más versátil y rica (Richeri *et al*, 2013).

Aunque la población mapuche es amplia y está compuesta por diferentes comunidades separadas entre sí, el uso de las plantas medicinales y comestibles es similar entre esas comunidades. Se han determinado patrones similares en las formas de cultivo, usos y partes de la planta usadas. Se ha encontrado también que la variedad de plantas empleadas con fines medicinales es mayor que la aplicada a fines comestibles, en base al uso de plantas silvestres en ambientes ecológicos cercanos y aun cuando hay plantas que tienen ambas funciones (Ladio *et al*, 2007). Los ambientes de recolección se dividen según sus características ambientales y su lejanía a la comunidad. Las plantas medicinales también pueden ser conseguidas al comerciar con

otras comunidades cuyos ambientes de recolección van a ser diferentes, dando acceso a especies distintas (Ladio, 2006). Para las pequeñas comunidades localizadas en zonas áridas y de climas hostiles la recolección de plantas para todo el espectro de dolencias requiere de un gran esfuerzo. Es por esto que las especies empleadas en estos casos son seleccionadas en función de costos y beneficios (Estomba *et al.*, 2006; Ladio, 2006). La recolección y el cultivo de plantas medicinales les dan autosuficiencia a las comunidades, implicando el uso de conocimientos que han sido perfeccionados con los años y que ahora hacen parte fundamental de su subsistencia de una manera independiente. Además aquellas plantas que tienen una mayor dificultad de ser obtenidas del ambiente en que crecen, o cuya disponibilidad depende de los ciclos estacionarios, son secadas y almacenadas (Richeri *et al.*, 2013).

Las especies nativas que utilizan las comunidades mapuches están asociadas a largas distancias de recolección, puesto que no han sido naturalizadas y se mantiene su crecimiento en los nichos ecológicos naturales. Por el contrario, las plantas exóticas suelen recolectarse en sitios cercanos a los asentamientos, como producto de su naturalización o su cultivo (Ladio *et al.*, 2007; Richeri *et al.*, 2013). Al implicar largos recorridos, la recolección de plantas silvestres suele estar asociada con otras actividades, de manera que los gastos energéticos de búsqueda se comparten con otras tareas como el pastoreo y la trashumancia (Richeri *et al.*, 2013).

Es importante tener en cuenta que el valor dado por las comunidades a las plantas es principalmente utilitario, y consideran que solo merecen nombre las plantas que le son útiles (o aquellas que les molestan). En algunas ocasiones puede pasar que le dan el mismo nombre a plantas diferentes pero que tienen la misma aplicación. Las plantas que les son prescindibles no tienen nombres propios sino que se les asignan nombres genéricos según su apariencia (De Mösbach, 1992).

Las principales familias de aquellas plantas útiles coinciden con las principales familias que dominan la región fitogeográfica, de las que se resaltan las familias

Fabaceae, *Asteraceae*, *Zygophyllaceae* y *Anacardaceae* (Ladio & Lozada, 2009). Sin embargo, la región patagónica es muy rica en plantas medicinales, por lo que emplean plantas de algunas otras familias. En los huertos mapuches se destacan el romero, la ruda, el laurel o la melisa, el canelo “voigue” (*Drimys winteri*) es sagrado e interviene en la mayoría de los ritos ceremoniales (Alonso, 2004).

Otras especies muy empleadas por los mapuches son manzanilla (*Anthemis cotula*), pehuén (*Araucaria araucana*), chilca (*Baccharis salicifolia*), calafate (*Berberis darwinii*), pañil (*Buddleja globosa*), té de burro (*Criptantha albida*), caña colihue (*Chusquea culeou*), ciruelillo (*Embothrium coccinea*), pincopinco (*Ephedra frustillata*), cola de caballo (*Equisetum bogotense*), pichoga (*Euphorbia collina*), frutilla (*Fragaria chiloensis*), chilco (*Fuchsia magellanica*), maiten (*Maytenus boaria*), lenga (*Nothofagus pumilio*), pillo-pillo (*Ovidia andina*), llantén (*Plantago lanceolata*), zarzaparrilla (*Ribes magellanicum*), laura (*Schinus patagonicus*), cerraña (*Sonchus oleraceus*), barba capuchino (*Usnea barbata*), valeriana (*Valeriana lapatifolia*) (Alonso, 2004), ala de loro (*Monttea aphylla*), chañar (*Geoffroea decorticans*). Todas estas son usadas en la medicina primaria familiar o con propósitos ceremoniales, ambos casos conectados fuertemente con un contexto espiritual (Ladio & Lozada, 2009).

Estas familias y especies no han sido elegidos por casualidad, sino por un razonamiento que va de lo simbólico a lo empírico, llevando a conocimientos elementales de botánica y química, resultando en una amplia biblioteca de plantas medicinales cuidadosamente seleccionadas, mantenida por transmisión cultural (Molares & Ladio, 2009). Dentro de esta herbolaria predominan las plantas usadas para afecciones gastrointestinales, respiratorias, procesos dolorosos o inflamatorios y plantas con usos digestivos, antifebriles, hepáticos, urinarios y antitusígenos, ya que son afecciones fácilmente tratables en las casas, utilizándose principalmente en infusiones calientes o agregadas al mate (Ladio, 2006; Richeri *et al*, 2013).

2.3. *Fuchsia magellanica* como planta medicinal

Fuchsia magellanica Lam. pertenece a la familia *Onagraceae* y es conocida principalmente con los nombres vulgares de fucsia, chilco y aljaba. Los integrantes del pueblo Mapuche la conocen con el nombre de chilko, que significa acuoso o aguachento. El origen del nombre ha sido debatido ya que en algunos casos se dice que es debido a que crece cerca del agua, pero en otros se le interpreta como una cualidad del fruto (De Mösbach, 1992)

Es una planta autóctona de la región andino-patagónica, encontrándose más abundante en el sur. Crece en las riberas de ríos, lagos y quebradas, y en general en sitios en los que la humedad es muy alta (Aukanaw, 2010; De Mösbach, 1992). En los bosques suburbanos de *Austrocedrus chilensis* (ciprés de la cordillera) autóctono de la Patagonia argentina, como en Bariloche, los frutos de *F. magellanica* son usados como alimento, siendo la única especie de la familia *Onagraceae* reportada como alimenticia (Rapoport & Ladio, 1999). También es una planta de importancia medicinal para las diferentes comunidades mapuche (Ladio *et al*, 2007).

Las hojas se usan como diurético, para lo cual se toma la decocción cuando aún está caliente. Como emenagogo y para los partos difíciles se machucan las hojas tiernas y se toma su jugo mezclado con agua tibia, tanto durante el parto como poco después del mismo, tal que la mujer mapuche solo bebe este zumo. Para el uso como diaforético se hace una mezcla de las hojas machacadas de chilko, palki (*Cestrum parqui*) y koyamlawen (*Pilea elegans*), con esta mezcla se prepara una infusión y se bebe. Las flores son usadas como febrífugas, diuréticas y purgantes al beberse en infusión, y para las quemaduras se aplican compresas embebidas en esta infusión de flores. Para usar como emenagogo se hierve una pequeña cantidad de hojas y flores en vino y se toma por copitas. Los mapuches recomiendan moderación en el uso de esta planta para los partos difíciles, porque se le atribuyen propiedades emenagogas en dosis pequeñas y abortivas en dosis mayores (Rodríguez *et al.*, 1994; Dominguez, 2010; Aukanaw 2010).

Además de las comunidades patagónicas se ha encontrado el uso de *F. magellanica* por comunidades ecuatorianas, quienes emplean las hojas en infusión y la beben como diurético o para problemas renales; siendo también aplicada tópicamente en heridas como desinfectante (Tene *et al*, 2007). En el norte de Argentina la corteza se toma en infusión como purgante y ha sido reportada en el uso contra el “empacho” que es definido como una indigestión (Campos-Navarra & Scarpa, 2013).

2.4. *Antecedentes botánicos*

F. magellanica pertenece a la familia *Onagraceae* y al género *Fuchsia*, es autóctona de Chile y Argentina donde crece endémicamente en la región andino-patagónica, pero ha sido naturalizada en la mayor parte del país.

Es un arbusto erguido de 3 a 5 m de alto, con ramas marrones a rojizas, con hojas opuestas membranosas, elíptico-ovaladas, con flores solitarias, pedúnculos filiformes, colgantes, con sépalos generalmente carmesí o raramente de color rosa pálido, y pétalos púrpuras o rosa pálido (Berry, 1989).

Crece en matorrales húmedos y márgenes o en los claros de bosques, generalmente cerca del agua. Se encuentra distribuida a lo largo de los Andes del sur de Chile y Argentina en la región de la selva fría valdiviana, que es una de las dos regiones de mayor incidencia de lluvias de Argentina, así como en la costa del Pacífico desde Valparaíso hasta el sur de Tierra del Fuego. En altitud, crece desde el nivel del mar hasta los 1750 m.s.n.m. Florece principalmente de diciembre a marzo, de vez en cuando a principios de octubre y todavía en abril. Es ampliamente cultivada en todo el mundo y naturalizada como ornamental en partes de América del Sur, este de África, Nueva Zelanda, Irlanda y Hawai (Berry, 1989).

2.5. *Antecedentes fitoquímicos*

Los análisis químicos de *F. magellanica* se iniciaron en la década de 1970,

aislándose heterósidos como el 3,5-diglucósido de pelargonidina, peonidina, malvidina, delfinidina, petunidina, cianidina y antocianos acilados. Se concluyó que las corolas y sépalos de la planta contienen flavonoles y flavonas, pero las hojas presentan glucósidos de quercetina, apigenina, luteolina y canferol (Crowden *et al.* 1977, Goto & Kondo, 1991).

La propiedad de facilitar la menstruación (emenagogo) puede deberse a su contenido de flavonoides y antocianos, ya que estos compuestos tienen la capacidad de mejorar los síntomas de fragilidad y permeabilidad capilar, reforzando la pared endometrial y facilitando el desprendimiento del tejido vascular menorrágico. Se sostiene, además, que la actividad de estos glucósidos está asociada a que incrementan la participación del colágeno de la pared vascular en el control de la permeabilidad (Muñoz *et al.* 2004). Esto puede deberse al efecto de inhibición de la degradación proteolítica por las enzimas elastasa y colagenasa (Bruneton, 1995).

2.5.1. Polifenoles y Terpenoides

Los polifenoles son metabolitos secundarios derivados de la ruta del ácido shikímico. Su importancia reside en su acción antioxidante, que parece ser la responsable de su capacidad para reducir el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer (Arts & Hollman, 2005). Presentan efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). También hay evidencia de los efectos antiinflamatorios, y estos compuestos son a su vez capaces de modular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular (Quiñones & Aleixandre, 2012). Por estas razones no es de extrañarse que los polifenoles estén entre los productos de origen natural con aplicaciones valiosas en la medicina tradicional (Hernández & Prieto, 1999).

Los terpenoides o isoprenoides se derivan de la fusión de unidades isopreno (C₅) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. En

plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato que se lleva a cabo en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta deoxi-xilulosa-fosfato (DXP) (Sepúlveda-Jimenez et al., 2004). Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimaláricas, antimicrobianas, entre otros (Ávalos & Perez, 2009).

En este trabajo se caracterizó la presencia en *F. magellanica* de los triterpenos (C30); entre los cuales se encuentran algunos esteroides en forma de glicósidos (cardenolidos y saponinas), con importantes funciones en medicina y en la industria. Las saponinas son triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura, la adición del grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes que las caracterizan. También se pueden presentar como agliconas, en cuyo caso se denominan sapogeninas (Ávalos & Perez, 2009). Las saponinas han mostrado tener diversas actividades biológicas entre las que cabe destacar la acción tipo detergente en las membranas celulares, que puede cambiar la permeabilidad o incluso conducir a su lisis o destrucción (actividades hemolítica, molusquicida e ictiotóxica). También se han reportado actividades hipocolesterolémicas e hipoglucemiantes, por la formación de complejos con saponinas en el intestino, evitando su absorción. Y tradicionalmente se han usado como expectorantes por su acción tensioactiva mucolítica e irritante de las mucosas, y también como diuréticas (Vieira, 2011).

2.6. Estudio de la actividad relajante del músculo liso

El tejido muscular es un tejido especializado para la contractilidad. Los músculos están compuestos por fibras que, gracias a la presencia de miofilamentos de actina y miosina, durante la estimulación se acortan en uno de sus ejes, generando

tensión en las inserciones de sus extremos o en una cavidad, y posteriormente se relaja. El cuerpo humano tiene tres clases de tejido muscular que se diferencian entre sí por su estructura microscópica, distribución, inervación y función, el cardíaco, el esquelético y el liso (Ham, 1975). Los músculos esquelético y cardíaco se consideran de tipo estriado debido a la regularidad de sus miofibrillas. En cambio, el músculo liso es no estriado, debido a que sus miofibrillas forman agrupamientos irregulares.

2.6.1. Funciones y mecanismos contráctiles del músculo liso

El músculo liso funciona de manera involuntaria y forma parte de órganos como el útero, vejiga, bronquios, así como también del tracto gastrointestinal y de los vasos sanguíneos, entre otros. Su función principal es controlar el calibre de las cavidades a las cuales rodean, influyendo en el movimiento del material interno (Ham, 1975). Las fibras del músculo liso están dominadas por el sistema nervioso autónomo, con acciones generalmente opuestas de las ramas simpática y parasimpática. A diferencia del músculo liso de los vasos en los cuales el tono es aumentado por el simpático, en las vísceras la estimulación simpática induce relajación, mientras la contracción depende del sistema parasimpático. Estas acciones son reproducidas en los preparados aislados por agentes químicos como la acetilcolina y la adrenalina (Silverthorn, 2008). A pesar de cumplir diferentes funciones en el organismo, el mecanismo contráctil del músculo liso es el mismo en los diferentes órganos (Figura 4).

En el músculo liso, el Ca^{2+} ingresado a través de canales se une a una proteína citosólica llamada calmodulina formando un complejo Ca^{2+} -calmodulina. Este complejo estimula la actividad enzimática de la miosinaquinasa de cadena liviana (MKCL) que fosforila a la cadena liviana de la miosina, lo cual provoca la interacción con la actina, desarrollando el proceso contráctil. Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desciende a $0.01 \mu\text{M}$, el complejo Ca^{2+} -calmodulina se disocia, la miosina quinasa pasa a su forma inactiva, y por acción de una fosfatasa se desfosforila la cadena liviana de la miosina produciéndose la relajación. El descenso de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es debido al predominio de los

mecanismos de remoción de Ca^{2+} citosólico por sobre los mecanismos de influjo o liberación de Ca^{2+} .

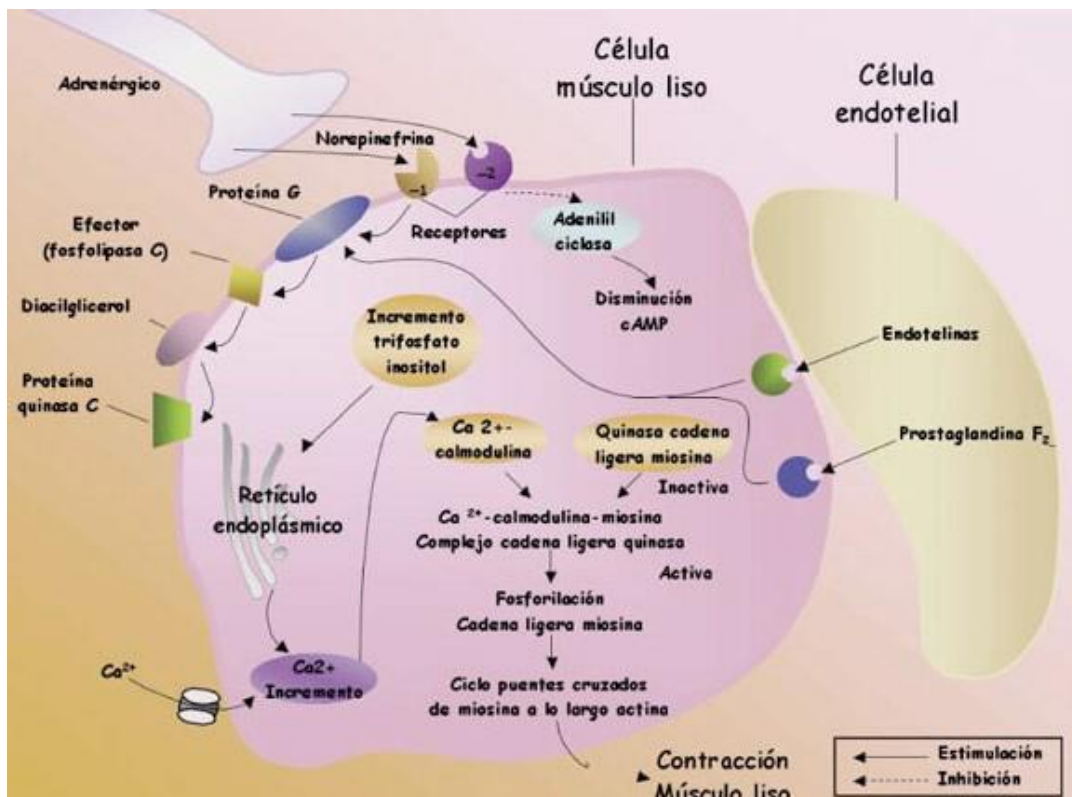


Figura 4. Mecanismo general de la contracción del músculo liso, en este caso

correspondiente a una arteria, en la cual la contracción es iniciada por la afinidad de noradrenalina en receptores alfa-1 y alfa-2 (Martínez-Salamanca *et al.* 2010)

Por otra parte, las proteínas contráctiles del ML son reguladas por los niveles de los nucleótidos cíclicos, los cuales fomentan relajación. Un aumento del AMPc activa a una proteína quinasa (PKA), que estimula la fosforilación de la miosina-quinasa (MKCL). La MKCL-P tiene baja afinidad por el complejo Ca^{2+} -calmodulina, por lo que se encuentra favorecida la relajación por predominio de la actividad de la fosfatasa (este se encarga de desfosforilar la miosina). Este efecto puede ser desencadenado por la activación del receptor β 2-adrenérgico por catecolaminas, o por la inhibición de la actividad de la enzima fosfodiesterasa (PDE) (por metilxantinas) que degrada al AMPc.

Aunque en reposo las membranas celulares son poco permeables al Ca^{2+} , el ión difunde pasivamente a través de canales de reposo ("leak"). El ingreso de Ca^{2+} por esta vía no genera contracción, debido a que los mecanismos de extrusión de Ca^{2+} del citoplasma son más rápidos que el "leak" de ingreso, excepto en los músculos en que hay alguna actividad espontánea tipo marcapaso. Ante la llegada del estímulo, ya sea producido por la acción de transmisores químicos o por estiramiento de la fibra, se activan canales de Ca^{2+} en la membrana que permiten el ingreso de Ca^{2+} al citoplasma impulsado por el gradiente electroquímico. El influjo es mayor que la remoción del Ca^{2+} por mecanismo de eflujo, por lo que se eleva la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta $10 \mu\text{M}$. Esto genera una contracción mantenida mientras dure el estímulo (si es prolongado se produce contractura). La enorme variabilidad que existe entre diferentes células de músculo liso hace difícil generalizar los mecanismos que disparan el influjo de Ca^{2+} . Básicamente la contracción se desencadena por el influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} de tipo L voltaje-dependientes. Estos se activan por distintos mecanismos como cambios en el potencial de membrana (en los músculos que tienen cierta actividad marcapaso basal, como los músculos lisos víscerales) o acción de agonistas (en todos los músculos, provenientes del control autónomo). En el músculo liso la entrada de Ca^{2+} extracelular representa la mayor parte del Ca^{2+} activador de la contracción, y muchos músculos lisos carecen de almacenes intracelulares (retículo endoplásmico) o está muy minimizado (Ej. duodeno de rata). Por otra parte, cuando cesa el estímulo, los canales L se cierran permaneciendo en estado de reposo, y predominan los mecanismos de eflujo (intercambiador Na/Ca y Ca-ATPasas) por lo cual la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se reduce y el músculo se relaja.

2.6.2. Músculo liso intestinal

El músculo liso intestinal está inervado tanto por las ramas simpáticas como por las ramas parasimpáticas del sistema nervioso autónomo. Las fibras parasimpáticas hacen sinapsis en dos sitios ganglionares, en el plexo mientérico (Auerbach) y en el plexo submucoso (Meissner), y finalmente estimula receptores muscarínicos en el músculo liso. El plexo mientérico se encuentra en contacto con una

capa muscular circular y una longitudinal; las fibras longitudinales están presentes en la superficie externa del intestino. En la mayoría de los experimentos que utilizan este preparado aislado se evalúa la acción de drogas sobre la fuerza de contracción de la capa muscular longitudinal. Las fibras simpáticas también inervan el intestino, pero reducen el tono colinérgico actuando presinápticamente en la fibra colinérgica.

Los movimientos peristálticos son miogénicos y principalmente accionados por reflejos locales. El movimiento pendular es el único que perdura en el intestino aislado, y se debe a una actividad eléctrica marcapaso con localización oscilante en el músculo, que genera pulsos de despolarización. Estas ondas, comúnmente conocidas como espigas, activan canales de Ca tipo L, que desencadenan un tono basal y contracciones pendulares. Esto se comprueba porque la eliminación del Ca^{2+} del medio extracelular disminuye el tono y el movimiento pendular.

La estimulación parasimpática aumenta la actividad peristáltica, mientras que la estimulación de los nervios simpáticos inhibe los movimientos peristálticos. La acción del sistema nervioso parasimpático es mediada por receptores muscarínicos de tipo M1 y M3 principalmente que activan una proteína Gq cuya cascada de transducción involucra la activación de la proteína quinasa C (PKC) que fosforila canales L y dispara el influjo de Ca^{2+} . In vivo, la estimulación parasimpática aumenta el peristaltismo con otros movimientos (segmentarios, de avance, de mezcla, etc.) producidos por acción de la acetilcolina (ACh) en los receptores muscarínicos (M1 y M3). En cambio, los efectos inhibitorios ejercidos por el sistema nervioso simpático son mediados por los receptores α y β adrenérgicos. Los receptores β son de tipo β_2 , se localizan en las fibras musculares lisas y son estimulados por la adrenalina circulante con activación de una proteína Gs y la adenilato-ciclasa, que aumenta niveles de AMPc y activan a la proteína-quinasa A (PKA), generando relajación como se explicó en el punto anterior. En cambio, los receptores α_2 están localizados presinápticamente en los ganglios parasimpáticos de los plexos mientéricos y son estimulados por la noradrenalina (NA) liberada por las terminaciones simpáticas, con

lo cual activan una proteína G_i que conduce a la hiperpolarización de la terminal axónica y a la reducción de la exocitosis de Ach (Goodman & Gilman, 2011).

La contracción del músculo liso intestinal está desencadenada por dos tipos de estímulos: despolarización que activa canales de Ca^{2+} tipo L activables por voltaje (VOC), y acción de la Ach sobre su receptor M3 que activa a la proteína G_q y a la enzima efectora fosfolipasa C (PLC). Ésta cataliza la formación de IP3 y DAG, el último de los cuales activa a la PKC que fosforila canales de Ca^{2+} aumentando su frecuencia de activación. Además, la Ach activa directamente a los canales de Ca^{2+} tipo L. Debido a que el músculo liso intestinal carece de retículo sarcoplásmico (RS) importante, no es significativo el mecanismo de liberación de Ca^{2+} vía IP3. El registro contráctil experimental posee una respuesta transitoria fásica y una estable tónica, pero en el intestino ambas son totalmente dependientes del influjo de Ca^{2+} extracelular por canales L, debiéndose aparentemente las diferencias a dos depósitos de Ca^{2+} externo con diferente accesibilidad al canal (Karakı *et al.* 1997). La Figura 5 muestra el mecanismo general de los músculos lisos viscerales, como el intestino, el útero y la vejiga.

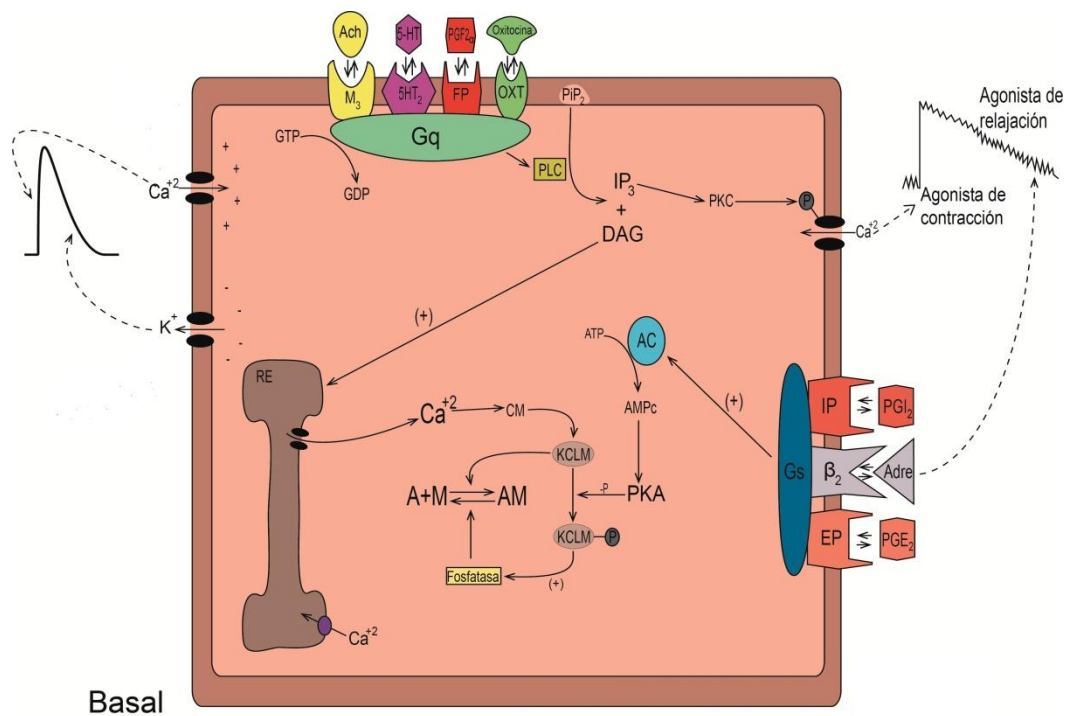


Figura 5. Mecanismo contráctil general de los músculos lisos viscerales, como el intestino, el útero y la vejiga. Se observan los potenciales espiga generadores de las contracciones, y los receptores y las vías intracelulares que conducen a contracción y relajación. De los diversos receptores los colinérgicos y adrenérgicos están presentes en intestino y útero, mientras los receptores de prostaglandinas y oxitocina están presentes sólo en útero.

La actividad eléctrica rítmica es una característica de la mayoría de los músculos lisos, pero las consecuencias mecánicas pueden variar desde las contracciones fásicas rápidas y regulares a la contractura sostenida. Por muchos años fue pensado que la actividad eléctrica espontánea se originaba en las células del músculo liso, pero recientemente se encontró que hay células marcapaso especializadas en muchos órganos que son morfológica y funcionalmente distintos del músculo liso y son la fuente de la actividad eléctrica espontánea. Tal función marcapaso está bien documentada para las ICC (células intersticiales de Cajal) del tracto gastrointestinal, pero hay evidencias de células tipo ICC que juegan un rol similar en otros tipos de músculo liso (como uretra, vejiga y útero). En intestino están adheridas por debajo de la capa del músculo liso longitudinal. Recientes resultados sugieren que las oscilaciones de $[Ca^{2+}]$ en células intersticiales uretrales de conejo

aislado son iniciadas por liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares sensibles a ryanodina, que la frecuencia de oscilación es muy sensible a la concentración externa de Ca^{2+} , y que la conversión de la oscilación primaria a las ondas de Ca^{2+} propagadas dependen de la liberación de calcio inducida por IP3 (Mc Hale *et al.* 2006).

2.6.3. *Músculo liso uterino*

El útero está inervado por nervios simpáticos, y además por algunos nervios parasimpáticos. Por ello, tiene receptores tanto adrenérgicos como muscarínicos. Es un tejido atípico dentro de los músculos lisos y la respuesta varía entre especies. En la rata el útero tiene forma de dos cuernos unidos en la región de la cerviz o cuello.

El tejido tiene una actividad eléctrica marcapaso que origina contracciones fásicas seguidas por relajaciones hasta el tono basal (Fig. 6). Esta actividad espontánea se reduce bajando la temperatura desde 37 a 32°C, usando un medio extracelular con baja $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (solución de Jalon) e induciendo el estado de estro del animal por administración subcutánea de un estrógeno 24 horas antes del experimento (Kitchen, 1984). Luego de la adición de un agonista hay un período latente hasta que se inicia la contracción, la respuesta es todo o nada, y la contractura (o respuesta tónica) no se mantiene aun cuando permanezca el agonista en el medio (a diferencia de otros músculos lisos como aorta y duodeno).

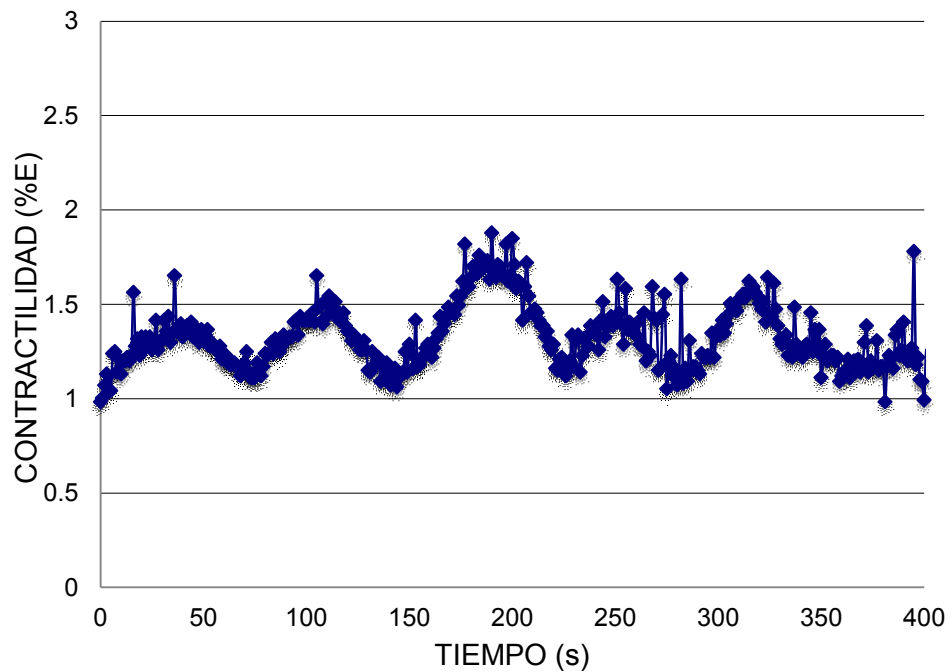


Figura 6. Contracciones fásicas del útero en el tono basal

2.6.3.1. Origen de la actividad fásica del útero

Las ondas fásicas espontáneas se asocian a despolarizaciones, las cuales se reducen durante el período de embarazo. La despolarización es provocada por la activación de canales de calcio tipo L, mientras la relajación fásica es provocada por la inactivación de dichos canales y por la activación de varias clases de canales de potasio, lo cual provoca repolarización o hiperpolarización. Entre dichos canales de K^+ se han encontrado en el útero los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de gran conductancia o "big K^+ channels" (BK), los canales de K^+ sensibles a ATP (KATP), y al menos un canal de K^+ rectificador hacia el interior (Smith *et al.* 2007).

Los BK son los responsables de la repolarización del potencial de acción uterino provocado por agonista o estímulo eléctrico en humanos, pero no en ratas. En efecto, el uso de bloqueantes selectivos de los BK como iberiotoxina (1-100 nM) no alteró la actividad rítmica basal en úteros de ratas normales ni gestantes (Aaronson *et al.* 2006). Pero en las ondas fásicas basales o espontáneas del útero tanto en condición normal

como de embarazo se encontró que participan los canales de K^+ activados por voltaje (Kv), tanto en rata (Aaronson *et al.* 2006) como en ratón (Smith *et al.* 2007). Estos canales limitan y revierten la despolarización provocada por la actividad marcapaso. El miometrio es el único entre los músculos lisos capaz de activar una corriente hacia el exterior (tipo A) que tiene un umbral de activación igual o más negativo que el potencial de membrana en reposo (-55 mV). Esta corriente tipo A es conducida por los canales Kv, que son sensibles a los bloqueantes 4-aminopiridina (4-AP) y tetraetilamonio TEA (5-10 mM) (Aaronson *et al.* 2006). Esta corriente desaparece en el miometrio gestante humano y de ratones pero no en el de ratas. La reducción de esta corriente genera potencial de reposo menos negativo (despolarización) y mayor tono contráctil de reposo, lo cual prepara al miometrio para el trabajo de parto (Smith *et al.* 2007).

El útero es rico en receptores muscarínicos de tipo M3, para la estimulación parasimpática in vivo. Los agonistas que provocan contracción en el útero aislado, actuando sobre receptores M3, son acetilcolina (ACh), carbacol (cbl), metacolina y otros agonistas colinérgicos. Por otra parte, el útero responde a otros agonistas como oxitocina, serotonina (5-HT) y prostaglandinas ($PGF2\alpha$). Darios y col. (2012) compararon la respuesta del útero de rata a estos agonistas, encontrando que todos alcanzaban la contracción máxima en una curva concentración-respuesta (CCR) pero el orden de potencia entre ellos (comparando las pCE_{50}) era: oxitocina (8,81) > serotonina (7,09) > $PGF2\alpha$ (6,73) > carbacol (5,62). Respecto a los mecanismos de dichos agonistas, todos los receptores activan las corrientes de Ca^{2+} tipo L, siendo la oxitocina y la prostaglandina $PGF2\alpha$ los agentes oxitócicos naturales encargados de desencadenar el parto, mientras ACh y 5HT ejercen un rol modulador menor en condiciones no gestantes. Todos estos agonistas activan receptores propios que se acoplan a proteína Gq y aumentan el influjo de Ca^{2+} a la célula, originando la contracción (Figura 5).

En esta tesis se ha empleado como agonista al carbacol, que al igual que la

acetilcolina (Ach) actúa en receptores muscarínicos M3, contribuyendo al tono del miometrio gestante y no gestante. También se empleó el agonista serotonina, que actúa en receptores 5-HT2. Ambos tipos de receptores se acoplan a Gq, y ésta activa a la enzima efectora fosfolipasa C (PLC), dando como resultado la catálisis de la conversión de fosfoinosítoles de membrana (PIP2) a inositol-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Este último activa a la proteínquinasa C (PKC) la cual fosforila a los canales de calcio voltaje-dependientes tipo L, con lo cual se incrementa su frecuencia de apertura y consecuentemente el influjo de Ca^{2+} al citosol. Esto origina que se aumente la frecuencia y amplitud de las contracciones rítmicas uterinas, y en ciertas concentraciones altas del agonista se genere una contracción tónica, aunque poco estable.

En cuanto a la estimulación adrenérgica, están presentes los receptores β_2 inductores de relajación, y hay una acción 100 veces más potente de la adrenalina circulante y 1000 veces del isoproterenol (pCE_{50} 9,5) que de la noradrenalina proveniente de las terminaciones del sistema nervioso simpático (pCE_{50} 6,5). Este efecto se mantiene en el útero grávido. El mecanismo del receptor β_2 es el acoplamiento a una proteína Gs, que activa a la adenilato-ciclasa, a su vez encargada de catalizar la conversión del ATP en AMPc. Este segundo mensajero activa a la PKA, la cual fosforila a la quinasa de la cadena liviana de miosina, efecto que reduce la sensibilidad de esta enzima por el complejo Ca^{2+} -calmodulina, y así resulta relajante para útero y cuello o cérvix. En cambio, los receptores α -adrenérgicos pueden producir estimulación y contracción del cérvix durante el embarazo por activar la vía Gq/PLC, pero están poco activos en el útero no gestante (Darios *et al.* 2012). Los niveles de AMPc también pueden aumentarse por inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa (PDE), enzima que cataliza su degradación a 5'-AMP. Este mecanismo es típico de algunos compuestos derivados de plantas como la papaverina, la cafeína y la teofilina, y trae como resultado la relajación del músculo liso uterino.

El útero también puede responder al óxido nítrico (NO), puesto que la adición

de nitroprusiato de sodio (NPS) que libera NO en el endotelio causó modesta relajación (un 10-20%) (Darios *et al.* 2012). También pueden liberarse prostaglandinas que producen relajación en el útero y cérvix, las cuales son: PGE2, PGI2 y 6-ceto-PGF1 α , actuando en ciertos receptores de prostanoïdes que incrementan la producción de AMPc celular vía Gs, algunos de los cuales pueden inducirse ante un estímulo inflamatorio.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La hipótesis de trabajo está basada en los conocimientos y usos ancestrales de la *Fuchsia magellanica*, en particular el uso como emenagogo y para trastornos gastrointestinales como el “empacho” o espasmo. Por lo tanto, se hipotetizó que esta planta podría tener actividad directa en el tracto gastrointestinal como antiespasmódico, y regulador del ritmo y la contractilidad uterina. La reportada presencia de flavonoides podría ser causa de efectos relajantes en ambos tejidos.

De encontrar científicamente la actividad farmacológica de esta planta, no sólo avalaría su incorporación al uso medicinal de la droga herbácea en otros sectores de la población, sino que también la haría potencialmente útil para la elaboración de medicamentos fitoterápicos.

3.2. Objetivos de esta tesis

3.2.1. Objetivo general

El propósito general del trabajo fue el de realizar estudios botánicos y etnofarmacológicos de *Fuchsia magellanica* para validar su uso etnomedicinal.

La validación implica establecer su actividad farmacológica, definir características macro y micromorfológicas que permitan su segura identificación, y perfiles cromatográficos para el reconocimiento de su calidad basada en la caracterización de sus principios activos.

Consecuentemente, esta tesis contribuye con la revalorización de la flora autóctona de comunidades indígenas del sur de Argentina y Chile, y con la transferencia de sus conocimientos ancestrales para el aprovechamiento medicinal de las partes aéreas de *Fuchsia magellanica*.

3.2.2. *Objetivos específicos*

- Efectuar estudios morfológicos y anatómicos de los tallos, hojas y flores de *Fuchsia magellanica*.

- Estudiar la actividad farmacológica de esta planta considerando su uso tradicional, a nivel de los tejidos intestinal y uterino.

- Determinar los mecanismos de acción implicados en la actividad biológica.

- Evaluar la presencia de los diversos grupos químicos en los diferentes tipos de extractos de hojas y flores de *F. magellanica* con el fin de correlacionarlos con la actividad farmacológica.

- Evaluar las diferencias en las actividades biológicas de las diversas partes de la planta de *F. magellanica* (hojas y flores) a fin de establecer su potencial como preparaciones oficinales (infusión, tintura, u otra).

- Comparar la actividad y presencia de grupos químicos entre plantas cultivadas (en La Plata), y las plantas autóctonas de la Patagonia.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

4.1.1. Procedencia

Las plantas cultivadas de *F. magellanica* fueron recolectadas en el mes de octubre de 2013 en el Jardín Botánico C. Spegazzini, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, ciudad de La Plata, Provincia de Buenos Aires. Las plantas autóctonas de *F. magellanica* fueron recolectadas en el mes de enero de 2014 en Villa La Angostura, Provincia de Neuquén.

4.1.2. Recolección del material vegetal

Para el desarrollo del trabajo se partió de material fresco consistente en tallos tiernos con hojas, y de flores. Ejemplares de la especie fueron herborizados y depositados en el Herbario (LPAG) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, bajo el registro NDBAYON 1644 (Holmgren et al., 1990).

4.1.3. Determinación taxonómica

El material vegetal recolectado fue identificado en el Área de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, bajo la supervisión de la Ing. Agr. Marta Colares.

4.1.4. Acondicionamiento del material vegetal y preparación de los extractos

Para el estudio anatómico, el material fresco se fijó en FAA (solución de formalina: ácido acético glacial: alcohol etílico 50%, 5:5:90) en el Área de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Para el resto de los estudios, el material vegetal de ambas plantas fue secado en estufa a temperatura continua de 40°C. Posteriormente fue molido hasta polvo fino (droga seca) con el uso de un molinillo eléctrico de alta velocidad en el laboratorio de la cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Para las reacciones de caracterización y el análisis cromatográfico inicial se hicieron dos extractivos:

- *Flavonoides*: Se pesaron 10g de la droga vegetal (hojas y flores) en un erlenmeyer y se les adicionó etanol de 70° hasta cubrir por completo la muestra, se agitó y se puso a calentar suavemente (25-30°C) por 50 minutos, a reflujo con tubo pararrayos. Los extractivos se filtraron con papel filtro y los filtrados obtenidos se pusieron en una ampolla de decantación donde se les adicionó 10 mL de hexano, se agitaron y se procedió a separar la fase hexánica que quedo en la parte inferior de la ampolla de decantación, y este procedimiento se repitió con otros 5 mL del solvente. Se procedió de igual forma con acetato de etilo, obteniéndose tres fracciones de la muestra rotuladas como “fracción hexánica”, “fracción de acetato de etilo” y “fracción acuosa”.
- *Terpenos*: Se pesaron 2g de la droga vegetal (hojas y flores separadamente), se transfirieron a un tubo de ensayo, donde se les agregó 10 mL de cloruro de metileno y se dejaron en maceración durante media hora, calentando al baño María (37°C) para favorecer la extracción. Pasado este tiempo se filtró y se obtuvo la “fracción diclorometanólica” de hojas y de flores. Por otro lado, se hizo un cocimiento en erlenmeyer de 2g de la droga vegetal (hojas y flores separadamente) con 20 mL de agua destilada por 20 minutos. Se filtró y se llevó el volumen nuevamente a 20 mL con agua destilada, obteniendo la “fracción acuosa”. De esta fracción acuosa se separaron 6 mL que se extrajeron con 3 mL de acetato de etilo, la fracción de acetato de etilo se separó y secó con sulfato de sodio anhidro para obtener así la “fracción de acetato de etilo”.

4.1.5. Preparación de extractos etanólicos para evaluación farmacológica

En el caso de los estudios farmacológicos y el análisis cromatográfico detallado, la droga seca de hojas y de flores de ambas plantas se dejó en maceración con etanol de 70° al 10%, agitando y revolviendo periódicamente por una semana. Pasado este tiempo se procedió a filtrar la solución, obteniéndose tinturas (extractos etanólicos) al 10% que fueron rotuladas como “Tintura Hojas BA”, “Tintura Hojas Sur”, “Tintura Flores BA” y “Tintura Flores Sur” respectivamente para los especímenes recolectados en La Plata (BA) y en la Patagonia (Sur), esto se hizo en el laboratorio de la cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Para calcular las dosis y concentraciones de extracto usadas, se pesaron los residuos de las tinturas, obteniendo un peso equivalente de 37.5 mg residuo/mL (hojas de Fucsia BA), 29.4 mg residuo/mL (hojas de Fucsia de Sur), 19.6 mg residuo/mL (flores de Fucsia BA) y 16.6 mg residuo/mL (flores de Fucsia de Sur). Todas las concentraciones se expresaron en mg residuo/mL de solución, y las dosis en mg residuo/kg. A partir de estos datos se calculó el rendimiento como %p/p de residuo/hojas, el cual resultó de 19.6%, 29.4%, 37.5% y 16.6% respectivamente.

4.2. Análisis botánico

4.2.1. Caracteres anatómicos

Se emplearon hojas en completo estado de desarrollo para una adecuada caracterización. La exomorfología foliar fue examinada con un microscopio estereoscópico Wild M8, que permitió una observación detallada para la descripción de las hojas. Los estudios epidérmicos fueron hechos sobre ambas caras de la lámina, en la parte media del semilimbo y sobre ambos lados de la vena media, empleando las hojas transparentes obtenidas aplicando la técnica de diafanización de Dizzeo de Stritmatter (1973) de acuerdo al siguiente protocolo:

- El material previamente fijado en FAA, se colocó en un vaso de precipitado con alcohol 96° y se llevó a ebullición 10 minutos.
- Transcurrido ese tiempo se pasó a una solución de alcohol 96° y NaOH al 5% en partes iguales. Se llevó a ebullición durante un minuto.
- Se efectuaron varios lavados hasta que el agua quedó totalmente limpia.
- Se pasó el material lavado a agua destilada y se efectuaron dos cambios de agua para eliminar los solventes.
- El material se introdujo en una solución de NaClO al 50% y se dejó hasta tornarse transparente.
- Se pasó a agua destilada y se efectuaron 5 cambios de agua, cada uno con duración de 3 minutos.
- El material se colocó en Hidrato de Cloral (5 gr en 100 mL de agua destilada) el tiempo necesario hasta quitarle opacidad.
- El material transparente de hoja fue lavado, coloreado con solución alcohólica de safranina O al 80% y montado con gelatina glicerina.
- Estos preparados se observaron en el microscopio óptico CETI y permitieron analizar la distribución de estomas y tricomas en la parte media y sobre ambas caras de la lámina y establecer sus dimensiones.
- Los recuentos de células epidérmicas, estomas y células en empalizada permitieron establecer los valores numéricos proporcionales correspondientes a los índices de estomas (Salisbury, 1927) y de empalizada (Zorning & Weiss, 1925).

4.2.2. Determinación de valores numéricos o magnitudes proporcionales

4.2.2.1. Determinación del índice de estomas

Salisbury (1927) definió al índice de estomas como la relación existente entre el número de estomas y el número total de células por unidad de superficie.

$$\text{Índice de estomas} = \frac{\text{Nº de estomas}}{\text{Nº de estomas} + \text{Nº de células epidérmicas}} \times 100$$

Se trabajó sobre 8 muestras de hojas diafanizadas en completo estado de desarrollo de *F. magellanica*, en 8 campos distintos y seleccionados sobre el envés, en la parte media del semilimbo y sobre ambos lados de la vena media. Los campos observados fueron dibujados mediante el tubo de dibujo. En el recuento de las células epidérmicas y estomas, aquellos ubicados en el borde del área de observación y con menos de la mitad dentro del área, no fueron considerados.

4.2.2.2. Determinación del índice de empalizada

Esta magnitud representa el promedio de células en empalizada que aparecen por debajo de cada célula epidérmica. Se obtiene contando el número de células en empalizada que se encuentran debajo de cuatro células epidérmicas y dividiendo por cuatro.

$$\text{Índice de empalizada} = \frac{\text{Nº de células de empalizada}}{4 \text{ células epidérmicas}} \times 100$$

Se efectuaron observaciones microscópicas sobre la cara adaxial de la hoja, de 4 campos tomados en la mitad del limbo y a ambos lados de la vena media de 10 hojas diafanizadas de cada especie. De esta manera, las células en empalizada aparecen como pequeños círculos por debajo de las células epidérmicas. Todos los valores obtenidos de cada parámetro se expresaron en, promedio, moda y desviación estándar(s).

Para el estudio de las estructuras de tallo, lámina y pecíolo, se efectuaron cortes transversales y longitudinales a mano alzada. En este caso, las secciones logradas fueron decoloradas con hipoclorito de sodio al 50% y lavadas para seguir dos caminos: Una parte de las secciones decoloradas se montaron en gelatina-glicerina incolora. Otra parte de las secciones se colorearon con safranina en solución alcohólica al 80% para luego montarlas en gelatina-glicerina.

4.2.3. Pruebas histoquímicas

Las pruebas histoquímicas se llevaron a cabo en cortes frescos a mano alzada de las hojas sin fijar y observadas posteriormente en microscopio. A continuación se presentan las pruebas que se realizaron:

- Almidón: Los cortes se pusieron sobre el portaobjetos y se agregó una gota de solución de Lugol y se observó al microscopio. La presencia de granos de almidón se considera positiva con una coloración azul oscura.
- Taninos: Los cortes se pusieron sobre el portaobjetos y se agregó una gota de cloruro férrico y se dejó actuar de 2-3 minutos. Posteriormente se lavó con agua destilada. La presencia de taninos se considera positiva con una coloración azul-verdosa.
- Lípidos: Los cortes se pusieron sobre el portaobjetos y se agregó una gota del reactivo Sudán III. Se dejó actuar durante 10 minutos y posteriormente se lavó con alcohol 70°. La presencia de lípidos se considera positiva al teñirse de rojo. Es de esperarse que la cutina y suberina se observen rosas con esta tinción.
- Mucilagos: Los cortes se pusieron sobre el portaobjetos y se agregó una gota de solución de azul brillante de cresilo y se observó al microscopio. La presencia de mucílagos se considera positiva con una coloración azul celeste.

4.3. Estudios fitoquímicos

Los estudios fitoquímicos iniciales se llevaron a cabo en el laboratorio de la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, con colaboración de la Dra. María A. Rosella, quien proporcionó los solventes usados en este trabajo que fueron de calidad analítica y en el caso que fue necesario se procedió a su purificación, según las técnicas descritas en la Farmacopea Argentina.

Los estudios enfocados en flavonoides (tanto de TLC como de HPLC) se llevaron a cabo en la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, bajo la supervisión de la Dra. Rosana Filip, quien proporcionó el material y los solventes, de calidad analítica, usados en el estudio.

4.3.1. Reacciones de caracterización

4.3.1.1. Flavonoides

- **Shinoda:** En un tubo de ensayo que contiene magnesio, en limaduras, se agrega aproximadamente 0.5 mL del extracto y gota a gota ácido clorhídrico concentrado hasta que termina el desprendimiento de hidrógeno, una vez ha enfriado se le agregan 0.2 mL de alcohol amílico y 2 mL de agua destilada. Se agita, y se registra el cambio de color. La formación de una coloración rosada, roja, violeta o roja anaranjada es prueba positiva para la presencia de flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonoides, y xantonas).
- **Rosenheim:** Se colocan 0.5 mL del extractivo en un tubo de ensayo, se agregan 0.2 mL de ácido clorhídrico concentrado, 0.2 mL de alcohol amílico y 2 mL de agua destilada. Se agita y deja reposar. Si se obtiene una coloración roja, la prueba es positiva para leucoantocianidinas y si da una coloración café- amarillento es prueba positiva para catequinas (Lock de Ugaz, O.

1994).

- Marcha de reactivos: Sobre papel se hacen 5 siembras de los extractivos y sobre estas se ponen gotas de diferentes reactivos, dejando una de las siembras como blanco. Una vez se han secado los reactivos se observa la marcha bajo luz UV de 366 y 254 nm.
 - Hidróxido de sodio: la reacción con hidróxido de sodio da la formación de estructuras resonantes, por lo que, en presencia de flavonas, flavanones e isoflavonas se observa amarillo, en presencia de flavononas y flavanoles pasa de amarillo a naranja, en presencia de chalconas se torna de naranja a rojizo, si tienen 2 hidroxilos adyacentes es estable con alcalis y en caso de que tenga 3 hidroxilos adyacentes da coloración de rojo a amarillo.
 - Ácido bórico: la presencia del color amarillo con fluorescencia verde indica la presencia de flavonas y flavonoles. El ácido bórico en medio alcalino forma quelatos con hidroxilos fenólicos en posición relativa en orto. También es positivo para flavonoides con grupo carbonilo en 4 y en posición 5 un hidroxilo.
 - Cloruro férrico: esta reacción es inespecífica, pero da el color según el número y ubicación de los hidroxilos al ocurrir la formación de un complejo con el hierro (un hidroxilo da amarillo, dos hidroxilos da verde y tres hidroxilos da color azul o negro).
 - Cloruro de aluminio: debido a la formación de complejos con O-hidroxilos o con hidroxil-cetonas vecinos de los flavonoides se observa una intensa fluorescencia verde amarillenta en luz UV.

4.3.1.2. Terpenos

- Reacción de Liebermann Bouchard: Se hace sobre los extractivos en DCM y Acetato de Etilo. Se toman 2 mL del extractivo y se ponen a evaporar sobre un vidrio de reloj, se retoma con cloroformo y agregan 1.8 mL de anhídrido acético y 0.2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se observa la coloración al

minuto y a los treinta minutos de agregado el reactivo. Es importante trabajar siempre en medio anhidro. Una coloración verde-azulada indica la presencia de algún grupo esteroide y un color rosa-violáceo indica la presencia de grupos triterpenicos.

- Reacciones de caracterización de saponinas: Estas reacciones se realizan sobre el extractivo acuoso.
 - Capacidad Afrógena (CA): se colocan 2 mL del extractivo acuoso en un tubo de ensayo y se agita enérgicamente durante 30 segundos. Esta prueba es positiva cuando hay aparición de espuma persistente.
 - Poder emulgente (PE): a 2 mL del extractivo acuoso se le agrega, gota a gota y agitando enérgicamente, 1 mL de aceite vegetal. Es positiva si hay formación de una emulsión inestable.
 - Reacciones de precipitación (RP): en ambos casos la reacción es positiva si aparece precipitado. RP1; a 2 mL del extractivo acuoso se le añaden unas gotas de solución de hidróxido de calcio. RP2; a 2 mL del extractivo acuoso se le añaden unas gotas de solución de subacetato de plomo.
 - Reacción de Fehling indirecta (FI): a 5 mL del extractivo acuoso se le agregan 2 mL de ácido clorhídrico concentrado, esta solución se lleva a ebullición durante 3 minutos, pasado este tiempo se deja enfriar y se filtra. Al filtrado se le agrega hidróxido de sodio hasta obtener un pH alcalino, se le añada una cantidad igual de volumen del reactivo de Fehling y se calienta nuevamente a ebullición.

4.3.2. Cromatografía en capa delgada (TLC) inicial

4.3.2.1. Flavonoides

La TLC se hizo una semana después de haber hecho los extractivos, por lo que se re- suspendieron en sus respectivos solventes, y el extractivo hexánico de flores mostró un precipitado que se separó y suspendió en metanol, a esta fracción se le

llamó “fracción metanólica de flores”

Se realizó en placas de silica gel, usando como fases móviles para la determinación de flavonoides las mezclas de Acetato de etilo (EtOAc) : Ácido fórmico (HCOOH) : Ácido acético glacial (HOAc) : Agua Destilada (H₂O) (100:11:11:26) y de Acetato de etilo (EtOAc) : Metanol (MeOH) : Agua destilada (H₂O) (100:13,5:10). Se realizó el sembrado, en punto para testigos y en banda para los extractivos. Se colocó dentro de la cámara cromatográfica que está saturada del eluyente respectivo. Una vez observada la migración del metabolito, se reveló con revelador para productos naturales AEDB, se observó en UV 366nm y se determinaron los Rf.

➤ Sistema 1

Fase estacionaria (FE): silicagel F254, 60 Merck de 0.25mm de espesor. Fase móvil (FM): EtOAc: HCOOH : HOAc : H₂O (100: 11: 11: 26).

Siembra: extractos de acetato de etilo (AE) y acuosos (W) de hojas y flores.

Testigos: soluciones metanólicas 1% de apigenina (A), isoquercetina (I), vitexina (V), ácido clorogénico (ACI) y ácido cafeico (AC).

Longitud de corrida: 6cm

Revelador: AEDB y observación en UV 366 nm

➤ Sistema 2

Fase estacionaria (FE): silicagel F254, 60 Merck de 0.25mm de espesor. Fase móvil (FM): EtOAc: MeOH : H₂O (100:13,5:10)

Siembra: extractos hexánicos (H), de acetato de etilo (AE) y acuosos (W) de hojas y flores, y la fracción metanólica (M) de flores.

Testigos: soluciones metanólicas 1% de isoquercetina (I), vitexina (V), apigenina (A) y ácido clorogénico (AC).

Longitud de corrida: 8.5cm

Revelador: AEDB y observación en UV 366 nm

4.3.2.2. Terpenos

Se realizó en placas de silica gel, usando como fases móviles para la determinación de triterpenos (agliconas) la mezcla de Tolueno (Tol) : Acetato de etilo (EtOAc) (80:20) y Diclorometano (DCM):Metanol (MeOH) (95:5) y como fase móvil para saponinas (glicósidos), la mezcla de Acetato de etilo (EtOAc) : Agua destilada (H₂O) : Butanol (BuOH) (25:50:100). Se realizó el sembrado, en punto para testigos y en banda para los extractivos. Se coloca dentro de la cámara cromatográfica que está saturada del eluente respectivo. Una vez se observa la migración del metabolito se saca de la cámara cromatográfica, se revela con ácido sulfúrico, se pone en plancha caliente durante 5 minutos, se observa en luz visible y se obtienen los R_f.

Para la fase móvil de saponinas, mencionada previamente también se sembró las fracciones de acetato de etilo de hojas y flores y la fracción metanólica de flores que se habían obtenido para los flavonoides.

➤ Sistema 1

Fase estacionaria (FE): silicagel F254, 60 Merck de 0.25mm de espesor.

Fase móvil (FM): Tol : EtOAc (80:20).

Siembra: extractos diclorometánico de hojas (H) y flores (F).

Testigos: soluciones metanólicas al 1% de ácido ursólico (AU) y ácido oleanólico (AO).

Longitud de corrida: 6cm

Revelador: ácido sulfúrico y observación en Luz Visible

➤ Sistema 2

Fase estacionaria (FE): silicagel F254, 60 Merck de 0.25mm de espesor. Fase

móvil (FM): DCM : MeOH (95:5)

Siembra: extractos diclorometánicos de hojas (H) y flores (F).

Testigos: soluciones metanólicas al 1% de ácido ursólico (AU) y ácido oleanólico (AO).

Longitud de corrida: 6 cm

Revelador: ácido sulfúrico y observación en Luz Visible

➤ Sistema 3

Fase estacionaria (FE): silicagel F254, 60 Merck de 0.25mm de espesor. Fase móvil (FM): EtOAc : H₂O : BuOH (25:50:100)

Siembra: extractos acuosos (W) y de acetato de etilo (AE) de hojas y flores, fracción metanólica (M) de flores.

Testigos: soluciones metanólicas al 1% de escina (E), escina β (Eβ) y saponinas (S). Longitud de corrida: 7.5 cm

Revelador: ácido sulfúrico y observación en Luz Visible

4.3.3. Cromatografía en capa delgada (TLC) enfocada en flavonoides

Se utilizaron cromatofolios de silica gel 60 F254 0.2 mm en soporte de aluminio marca Merck y EMD y cromatofolios de celulosa F254, con soporte de plástico marca SIGMA. La técnica utilizada fue la de corrida ascendente. Y se usaron diferentes mezclas con acetato de etilo (EtOAc), ácido fórmico (HCOOH), ácido acético glacial (HOAc), agua destilada (H₂O), metiletilcetona (MEK), cloroformo (CHCl₃) y acetona (AK) para las fases móviles

Los sistemas cromatográficos fueron los siguientes:

➤ Sistema 1

Fase estacionaria (FE): silica gel 60 F254, 0.2 mm

Fase móvil (FM): EtOAc : HCOOH : HOAc : H₂O (100: 11: 11: 26).

Testigos: soluciones metanólicas 1% de isoquercitrina (I), hiperósido (H), cinerina (C), ácido cafeico (ACf), vitexina (V) y ácido clorogénico (AC).

Longitud de corrida: 6.25cm

Revelador: Difenilboriloxietilamina al 1% en metanol posterior y observación al UV a 366 nm

➤ Sistema 2

FE: celulosa 254, 0.2 mm FM: ácido acético al 15%

Testigos: soluciones metanólicas 1% de vitexina (V), hiperósido (H), cinarina (C), ácido cafeico (ACf), quercitrina (q), rutina (R) y ácido clorogénico (AC).

Longitud de corrida: 6 cm

Revelador: Difenilboriloxietilamina al 1% en metanol posterior y observación al UV a 366 nm

➤ Sistema 3

FE: celulosa 254, 0.2 mm

FM: ácido acético al 40%

Testigos: soluciones metanólicas 1% de apigenina (A), quercetina (Q) y canferol (Ca) Longitud de corrida: 7cm

Revelador: Difenilboriloxietilamina al 1% en metanol posterior y observación al UV a 366 nm

➤ Sistema 4

FE: silica gel 60 F254, 0.2 mm

FM: EtOAc : MEK : HOAc : H₂O (5:3:1:1)

Testigos: soluciones metanólicas 1% de vitexina (V), hiperósido (H), cinarina (C), ácido cafeico (ACf), quercitrina (q), ácido clorogénico (AC), isoquercitrina (I) y canferol-3-triglucosido (Ca3).

Longitud de corrida: 6.5 cm

Revelador: Difenilboriloxietilamina al 1% en metanol posterior y observación al UV a 366 nm

➤ Sistema 5

FE: silica gel 60 F254, 0.2 mm

FM: EtOAc : HCOOH : MEK : HOAc : H₂O (5:7:3:30:10)

Testigos: soluciones metanólicas 1% de vitexina (V), hiperósido (H), cinarina (C), ácido cafeico (ACf), quercitrina (q), ácido clorogénico (AC), isoquercitrina (I) y canferol-3-triglucosido (Ca3).

Longitud de corrida: 6 cm

Revelador: Difenilboriloxietilamina al 1% en metanol posterior y observación al UV a 366 nm

➤ Sistema 6

FE: silica gel 60 F254, 0.2 mm

FM: CHCl₃ : AK : HCOOH (7.5:1.65:0.85)

Testigos: soluciones metanólicas 1% de quercetina (Q) y canferol (Ca)

Longitud de corrida: 6.25 cm

Revelador: Difenilboriloxietilamina al 1% en metanol posterior y observación al UV a 366 nm

4.3.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo líquido marca Varian 9012 con un detector UV Varian 9050 y un detector UV arreglo de fotodiodos Varian 9065. Se utilizó una válvula de inyección de volumen fijo Rheodyne de 20 µl. La columna utilizada fue de acero inoxidable de 4.6 mm de diámetro interno por 250 mm de largo, rellena por una fase estacionaria de C18 con 2.5 µm de diámetro de partícula (Phenomenex). Cantidades conocidas de cada uno de los testigos ácido clorogénico, isoquercitrina, quercitrina, hiperósido, canferol, rutina y quercetina se solubilizaron cuantitativamente en fase móvil A : fase móvil B (50:50).

Para la fase móvil se usó un gradiente de solventes compuesto por:

- Fase móvil A: Agua: Ácido acético glacial (98:2)
- Fase móvil B: Metanol: Ácido acético glacial (98:2)

- Gradiente: 85% fase móvil A de 0 a 30 min, 60% fase móvil A de 30 a 40 min, 25% fase móvil A de 40 a 45 min y 15% fase móvil A de 45 a 60 min.

La longitud de onda de detección fue de 258 nm, con barrido de 230 nm a visible. El flujo utilizado fue de 1.2 mL/min.

La identificación de los compuestos en las tinturas analizadas se realizó por comparación del tiempo de retención y del espectro UV con las sustancias patrón, haciendo la cuantificación por el método del estándar externo. En el análisis cromatográfico se usaron como testigos (sustancias patrón) las siguientes sustancias: rutina, quercetina, canferol, canferol-3-triglucosido, quercitrina, hiperósido, isoquercitrina, cinarina, ácido clorogénico, ácido cafeico, vitexina, apigenina, apigenina-7-O-glucosido.

4.4. Actividad farmacológica ex vivo

4.4.1. Animales y preparados utilizados

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 200-250 g. mantenidas en el bioterio de la cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, de conformidad con los principios internacionalmente aceptados para el uso y cuidado de animales de laboratorio que fue establecido por las directrices internacionales (NIH publicación #85-23 1985, 2010) y nacionales (CICUAE-Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del INTA).

Previo al experimento las ratas se mantuvieron con ciclos de 12 hs de luz y 12 hs sombra y 12-18 horas de ayuno y agua *ad libitum*. Las ratas se anestesiaron y sacrificaron con sobredosis de pentobarbital vía intraperitoneal (40 mg/Kg). Se aislaron los tejidos (duodeno e íleon, y/o los 2 cuernos uterinos), los cuales se colocaron rápidamente en solución Tyrode (intestinos) o de Jalon (úteros) con burbujeo de aire. Los tejidos fueron cortados en trozos de 2 a 3 cm de longitud, que se montaron

individualmente en cubas de doble camisa termostatzadas a 37°C (intestino) o 34 °C (úteros), que contenían 20 mL de la solución a burbujeo constante de aire, alcanzando un pH de 8,2. Las porciones de intestino se sujetaron longitudinalmente, manteniendo el tubo abierto para la circulación y oxigenación adecuada, por el extremo inferior a un soporte fijo y por el extremo superior mediante hilo verticalmente a un transductor de fuerza isométrico. De la misma forma se sujetaron longitudinalmente los cuernos uterinos.

Se registró la tensión desarrollada por los trozos de duodeno, íleon o úteros mediante los transductores de fuerza isométricos acoplados a un amplificador en dos sistemas, uno de 4 transductores WPI con amplificador TBM-4M de WPI (USA), y otro de 2 transductores PanLab con amplificador PowerLab, AD Instruments, (Australia). Se efectuó la detección analógica-digital y registro mediante tarjeta μ DAQ-lite y programa Eagle, USA a partir del amplificador WPI; o con el sistema PowerLab AD Instruments, respectivamente para cada sistema.

Los preparados fueron sometidos a una precarga de 1 g y estabilizados durante al menos 30 minutos con cambios periódicos del medio, para mantener la viabilidad del tejido, antes de realizar los protocolos.

4.4.2. Soluciones y drogas utilizadas

- Solución Tyrode (Livingstone, 1970; Kitchen, 1984): NaCl 150 mM (8 g/L), KCl 2.7 mM (0.2 g/L), MgSO₄·7H₂O 2 mM (2.6 mL de solución 10%), NaH₂PO₄·2H₂O 0.4 mM (1.3 mL de solución 5%/L), glucosa 5.5 mM (1g/L), NaHCO₃ 12 mM (1g/L), CaCl₂ 1.8 mM (1.8 mL de solución 1 M/L).
- Solución Tyrode 0Ca-40 mmol/L K⁺: por eliminación del CaCl₂ en la solución Tyrode y adición de 0,6 mL KCl 10% a las cubas con 20 mL de Tyrode 0Ca.
- Solución De Jalon (Kitchen, 1984): NaCl 154 mM (9 g/L), KCl 5.4 mM (0.4

g/L), NaHCO₃ 6 mM (0.5 g/L), CaCl₂ 0.1 mM (0.1 mL de solución 1 M/L)., glucosa 2.8 mM (0.5 g/L).

- Carbacol (Sigma, USA) fue preparado en solución acuosa en una escala de concentraciones de 1, 2, 7, 20, 70, 200, 700, 1000 y 2000 µg/mL de solución acuosa para agregar secuencialmente a las cubas (0.2 mL cada una, logrando una dilución de 1:100) en las CCR acumulativas.
- Cloruro de calcio anhidro (Mallinckrodt, USA-Canadá) fue preparado en una escala de concentraciones de 0.882, 1.764, 5.3, 18.5, 53.0, 185.22 y 530 mg Ca/mL de solución acuosa para agregar secuencialmente a las cubas (0.2 mL cada una, logrando una dilución de 1:100) en las CCR acumulativas.
- Serotonina (5-HT, Sigma, USA) fue preparada en una escala de concentraciones de 1, 2, 7, 20, 70, 200, 700, 1000 y 2000 µg/mL de solución acuosa para agregar secuencialmente a las cubas (0.2 mL cada una, logrando una dilución de 1:100) en las CCR acumulativas.
- Clorhidrato del éster metílico de nitro-L-arginina (L-NAME, Sigma, USA) fue preparado en solución acuosa a concentración de 3 mmol/L, para que en la cuba resulte una concentración de 30 µmol/L.
- Tetraetilamonio (TEA, Sigma, USA) fue preparado en solución acuosa a una concentración de 50 mg/mL (1 M) y se usó en una concentración de 10 mM en la cuba.
- Beta-Estradiol (Sigma, USA) fue administrado a una dosis de 5 mg/kg por vía subcutánea 24 horas antes del experimento.
- Indometacina (Sigma, USA) fue preparada en solución acuosa a una dosis de 25 mg/mL (10 mM) y se usó en una concentración de 0.1 µmol/mL en la cuba.

- Etanol de 70° como control del vehículo
- Extracto etanólico madre de hojas y flores: obtenido al 10% por maceración durante al menos una semana a temperatura ambiente.

4.4.3. Protocolos

4.4.3.1. Actividad en intestino aislado

Para validar la actividad fitofarmacológica sobre intestinos se empleó el método previamente empleado en el laboratorio (Ragone *et al.* 2007; Consolini *et al.* 2011; Matera *et al.* 2012; Blanco *et al.* 2013; Colares *et al.* 2013; Matera *et al.* 2016).

Se realizó el siguiente protocolo para evidenciar la actividad espasmolítica en músculo liso intestinal:

Curvas concentración-respuesta de carbacol: en cada cuba con 20 mL de la solución Tyrode, después de estabilizados los intestinos, se agregaron secuencialmente 0.2 mL de cada concentración sucesiva de la escala de carbacol, de manera acumulativa, hasta obtener el efecto máximo (Emax). En cada preparado se realizaron 2 CCR control (sin adición del extracto), seguidas de 4 sucesivas CCR en presencia de una concentración única del extracto, en orden creciente y correspondiente a diluciones al 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 % P/V de la droga seca en la cuba (obtenidas a partir del extracto etanólico al 10% preparado por maceración). Antes de realizar las sucesivas CCR en presencia del extracto, en cada preparado se hicieron CCR en presencia de etanol de 70° 1:10 y 1:3 como control de los extractos al 0.1 y 0.3% (controles negativos del vehículo). Tanto el extracto como el vehículo se adicionaron 5 minutos antes de hacer la CCR de carbacol.

Una vez validada la actividad fitofarmacológica se realizaron los siguientes protocolos para ayudar a dilucidar el mecanismo de acción de las tinturas:

Curvas concentración-respuesta de calcio (Ca^{2+}): se reemplazó el Tyrode de las cubas por 20 mL de Tyrode-0 Ca^{2+} , y después de estabilizados los intestinos, se agregó 0.6 mL de la solución de KCl 10% para obtener un medio de Tyrode-0 Ca^{2+} -40 mM K^+ . Inmediatamente se realizó la CCR de Ca^{2+} agregando secuencialmente 0.2 mL de cada concentración sucesiva de la escala de Ca^{2+} hasta obtener el efecto máximo (E_{max}). En cada preparado se realizaron 2 CCR control, seguidas de 3 sucesivas CCR en presencia de una concentración única del extracto, en orden creciente (0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 % P/V de la droga seca en la cuba). Antes de realizar las sucesivas CCR en presencia del extracto, en cada preparado se hicieron también las CCR en presencia de etanol 1:10 y 1:3 como control de los extractos al 0.1 y 0.3%, respectivamente como controles negativos del vehículo. Tanto el extracto como el vehículo se adicionaron 5 minutos antes de hacer la CCR de carbacol.

Curvas concentración-respuesta de carbacol en presencia de L-NAME: después de estabilizados los intestinos en solución Tyrode, se realizaron 2 sucesivas CCR control de carbacol, como se explicó antes, de las cuales se obtuvo el efecto máximo (E_{max}). Luego, en cada preparado se realizó una CCR control en presencia de L-NAME (30 $\mu\text{mol/L}$ cuba), seguida de los controles negativos de vehículo (CCR de carbacol en presencia de la misma concentración de L-NAME y etanol 1:10 y 1:3 como control de los extractos al 0.1 y al 0.3%), y de 4 sucesivas CCR de carbacol en presencia de L-NAME y de una única concentración del extracto en orden creciente (0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 % P/V de la droga seca en la cuba). Los sucesivos agregados de L-NAME, el extracto (o el vehículo) y la CCR de carbacol se hicieron a intervalos de 5 minutos.

4.4.3.2. Actividad en útero aislado

Para validar la actividad fitofarmacológica sobre úteros se siguieron los métodos publicados (Livingstone, 1970; Kitchen, 1984; Aaronson *et al.* 2006; Smith *et al.* 2007; Darios *et al.* 2012). La contractilidad del útero es particularmente difícil de medir, dada la gran amplitud de las contracciones fásicas periódicas (ver Figs. 30 y 35). Por lo tanto se intentaron dos formas: medir los cambios a partir de los picos máximos

estables, o medir la diferencia entre los máximos y mínimos del pico (amplitud). Como se obtenían resultados análogos en las CCR se eligió el criterio de medir la diferencia entre los máximos y mínimos del pico (amplitud), de manera que en el caso de que se mueva la línea de base por las contracciones la medición no se vea afectada.

Se realizaron los siguientes protocolos para evidenciar la actividad espasmolítica en músculo liso uterino, y luego para ayudar a dilucidar el mecanismo de acción de las tinturas:

Curvas concentración-respuesta de carbacol: después de estabilizados los úteros, se agregaron secuencialmente a los 20 mL de la solución Tyrode, 0.2 mL de cada concentración sucesiva de la escala de carbacol, de manera acumulativa, hasta obtener el efecto máximo (Emax). En cada preparado se realizaron 2 CCR control de carbacol, seguido de 2 CCR controles negativos de vehículo (en presencia de etanol 1:10 y 1:3 como control de los extractos al 0.1 y al 0.3%), y de 4 sucesivas CCR cada una en presencia de una concentración única del extracto, en orden creciente (0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 % P/V de la droga seca en la cuba). En todos los casos, los tratamientos se adicionaron 5 minutos antes de hacer la CCR de carbacol.

Curvas concentración-respuesta de carbacol en presencia de indometacina: después de estabilizados los úteros, se realizaron 2 CCR control de carbacol para obtener el efecto máximo (Emax). Luego, en cada preparado se realizó una CCR control con indometacina (0.1 $\mu\text{mol/L}$ en la cuba), seguido de 2 CCR en presencia de indometacina y etanol 1:10 y 1:3 como control de los extractos al 0.1 y al 0.3% (controles negativos del vehículo), y de 4 sucesivas CCR en presencia de indometacina seguido de una única concentración del extracto en orden creciente (0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 % P/V de la droga seca en la cuba). En todos los casos, los tratamientos se adicionaron a intervalos de 5 minutos previos a la CCR de carbacol.

Curvas concentración-respuesta de carbacol en presencia de TEA en ratas tratadas previamente con β -Estradiol: Este estudio se hizo en úteros aislados de ratas tratadas 24 horas previo al experimento con 5 mg/kg de β -Estradiol. En cada preparado se realizaron 2 CCR control de carbacol, 2 CCR con 10 mM tetraetilamonio (TEA) y vehículo (etanol vehiculo del extracto al 0.1 y 0.3%), y 4 sucesivas CCR en presencia de TEA seguido de una única concentración de extracto en orden creciente (0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 % P/V de la droga seca en la cuba). En cada protocolo los tratamientos se adicionaron a intervalos de 5 minutos previos a la realización de la CCR de carbacol.

Curvas concentración-respuesta de serotonina en ratas tratadas previamente con β -Estradiol: en úteros aislados de ratas tratadas, 24 horas previo al experimento, con 5 mg/kg de β -Estradiol, se hicieron secuencialmente CCR acumulativas de serotonina. El orden de las sucesivas CCR fue: 2 controles de los que se obtuvo el efecto máximo (Emax), 2 controles de vehículo en presencia de etanol al 0.1 y 0.3%, y 4 sucesivas CCR con adición del extracto en únicas y crecientes concentraciones (0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 % de la droga seca en la cuba). En cada protocolo los tratamientos se adicionaron a intervalos de 5 minutos previos a la realización de la CCR de serotonina.

4.4.4. Mediciones, cálculos de parámetros y estadística

Las CCR en ausencia (control) y presencia de extracto u otro antagonista se compararon por el método de comparaciones múltiples de ANOVA de 2 vías (tratamiento y log [agonista]), seguido del test de Bonferroni "*a posteriori*" para comparar cada tratamiento con el control en cada valor de log [agonista]. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Los gráficos y estadísticas se realizaron en el programa Prisma v.4.0. Los datos se expresaron como media \pm ESM a partir de los n datos obtenidos en cada grupo.

De cada CCR control del agonista se extrapoló la concentración efectiva al 50%

del Emax (CE_{50}) y se calculó su $pD_2 = pCE_{50} = -\log CE_{50}$ (Kenakin, 1984; Kenakin 2014).

Las curvas de inhibición se obtuvieron a partir de los efectos obtenidos a la concentración de agonista que produjo el Emax, y se graficaron esos efectos en función de la concentración de antagonista (extracto). De ellas se extrapolaó la concentración inhibitoria al 50% (CI_{50}) del extracto.

4.5. Actividad Farmacológica in vivo

4.5.1. Animales utilizados

Para los estudios in vivo se utilizaron ratones albinos de alrededor de alrededor de 30 g de peso, mantenidos en el bioterio de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, de conformidad con los principios internacionalmente aceptados para el uso y cuidado de animales de laboratorio que fue establecido por las directrices internacionales (NIH publicación #85-23 1985, 2010).

En el caso de los estudios de comportamiento, los ratones se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*. Para tránsito intestinal se mantuvieron en ayunas por 12 horas y agua *ad libitum*.

4.5.2. Soluciones y drogas utilizadas

Para los estudios de comportamiento se empleó como control positivo:

- diazepam, a una dosis de 0.5 mg/kg vía intraperitoneal (IP) en solución fisiológica.

Para los estudios de tránsito intestinal se empleó como control positivo:

- Atropina, administrada intraperitonealmente (IP) a una dosis de 3 mg/kg, a partir de ampollas de atropina al 1/1000 (Duncan, Argentina).

- Homatropina, administrada intraperitonealmente (IP) a una dosis de 12 mg/kg, a partir de la droga en polvo, diluida con agua destilada al 5% (Sigma, USA).

4.5.3. Protocolos de las pruebas in vivo

4.5.3.1. Tránsito intestinal

Las tinturas de hojas de *Fuchsia magellanica* Sur y BA (en dilución 1:3 con solución fisiológica, dosis de 41.7 y 32.7 mg/kg respectivamente), el vehículo (etanol de 70° diluido 1:3 con solución fisiológica) y la droga testigo atropina 3 mg/kg fueron administradas a razón de 0.1 mL/30 g a los ratones por inyección intraperitoneal. Transcurridos 30 minutos del tratamiento se administró por vía oral 0.1 mL de una mezcla de carboximetilcelulosa (1%) y carbón activado (10%) en agua destilada. Pasados 30 minutos de la administración del carbón activado los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo el intestino delgado y se midió la distancia recorrida por el carbón desde el píloro hasta la porción más distal (unión con el ciego), expresada como porcentaje de la longitud total del intestino delgado (Gorzalczany *et al.* 2001; Sanches *et al.*, 2010; Salinas *et al.*, 2011; Sarin *et al.* 2013; Sahoo *et al.* 2016).

En otro test se intentó acelerar el tránsito intestinal con el laxante osmótico, polietilenglicol (PEG) al 6% en agua destilada (Cottart *et al.* 2007) para administrarlo oralmente en un volumen de 0.2 mL/ratón (dosis de 400 mg/kg). Para este test, se administraron los siguientes tratamientos en los respectivos 4 grupos de ratones:

- 0.1mL tintura de hojas F. m-BA en dilución 1:2 (al 5%) en SF vía oral (62.5 mg/kg).
- 0.1 mL tintura de hojas Fm-Sur en dilución 1: 1.3 (al 7.5%) en SF vía oral (73.5 mg/kg).
- Vehículo de etanol de 70° diluido 1: 1.3 con solución fisiológica vía oral
- Atropina 5 mg/kg vía IP.

A los 30 minutos de administrado el extracto o vehículo se les administró 0.2 mL/ratón de solución acuosa de PEG 6% vía oral. A los siguientes 30 minutos se les administró 0.1 mL/ratón de la solución de CMC-carbón activado. Pasados 30 minutos de la administración del carbón activado los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo el intestino y se midió la distancia recorrida por el carbón desde el píloro hasta la porción más distal, expresada como porcentaje de la longitud total del intestino delgado (Salako *et al.* 2015; Cottart *et al.* 2007).

4.5.3.2. Laberinto en cruz elevado (LCE)

El LCE consistió en un laberinto negro compuesto de 4 brazos en forma de cruz elevados a una altura de 50 cm. Cada brazo media 5x30 cm y la zona central 5x5 cm. Dos brazos, uno frente al otro, estaban cerrados con paredes de madera de 15 cm de altura (sin techo), y dos brazos abiertos (sin paredes). Se ubicó el ratón en la zona central, permitiendo la libre exploración durante 5 min. La entrada a cada brazo se consideró cuando las 4 patas estaban dentro de éste. Se calculó el número de veces que el ratón entraba a los brazos abiertos y a los cerrados, y el tiempo total de permanencia en cada brazo (Almeira *et al.* 2009; Wasowski & Marder, 2010). Para disminuir influencias odoríficas dejadas por los ratones, los dispositivos fueron limpiados con alcohol y algodones secos entre ratones.

Las tinturas de hojas y flores de *Fuchsia* de la Patagonia (Fm-Sur) y de La Plata (Fm-BA) fueron administradas en volumen de 0.1 mL/30 g ratón por inyección intraperitoneal, 30 minutos antes de realizar la primera observación, en las siguientes dosis:

- Partiendo de la dilución 1:3 con solución fisiológica resultaron las dosis de: Hojas Fm-BA=41.7 mg/kg, Hojas Fm-Sur=32.7 mg/kg, Flores Fm-BA=21.8 mg/kg y Flores Fm-Sur= 18.4 mg/kg)
- Partiendo de la dilución 1:10 con solución fisiológica resultaron las dosis de Hojas Fm-BA: 12.5 mg/kg; Hojas Fm-Sur: 9.8 mg/kg, Flores Fm-BA: 6.5 mg/kg; Flores Fm-Sur: 5.5 mg/kg)

- Vehículo (etanol de 70° diluido 1:3 con solución fisiológica)
- Control positivo o droga testigo (diazepam 5 mg/kg)

Las mediciones se realizaron 5 minutos antes de administrar la droga y se repitieron cada 30 minutos hasta totalizar 2 horas.



FIGURA 7. Foto obtenida durante un experimento en el Laberinto en Cruz

4.5.3.3. Prueba del Campo abierto (“open field”)

El campo abierto consistió en una caja, con medidas de 50 * 30 * 30 cm, cuyo interior es completamente blanco y el suelo está dividido en 15 cuadrados de 10*10 cm, delineados en negro. En cada prueba se ubicó el ratón en un ángulo cerca de las paredes del campo abierto, permitiendo la libre exploración durante 5 min. Se contó el número de líneas cruzadas (considerado cuando las 2 patas delanteras cruzaban una línea) como estimación de la movilidad espontánea, y el número de veces que se ponía de pie para explorar (enderezamientos exploratorios o “*rearings*”) (Consolini *et al.* 2006; Ragone *et al.* 2010; Matera *et al.* 2012; Matera *et al.* 2016). Para disminuir influencias odoríficas dejadas por los ratones, los dispositivos fueron limpiados con

alcohol y algodones secos entre ratones.

Las tinturas de hojas de *Fuchsia* de la Patagonia (F.-Sur) y de La Plata (F.m.-BA) (en dilución 1:3 con solución fisiológica, a dosis de 41.7 y 32.7 mg/kg, respectivamente), el vehículo (etanol de 70° diluido 1:3 con solución fisiológica) y la droga testigo (diazepam 5 mg/kg) fueron administradas a razón de 0.1 mL/ 30 g a los ratones por inyección intraperitoneal, Las mediciones se realizaron 5 minutos antes de la administración de la droga o extracto, y y luego se repitieron cada 30 minutos hasta totalizar 2 horas.



FIGURA 8. Foto obtenida en un experimento de Campo Abierto

4.5.4 Tratamiento estadístico de los datos

En las pruebas “*in vivo*” de comportamiento se aplicó el ANOVA de dos vías (variables: tratamiento y tiempo) seguido de comparaciones pareadas a posteriori por el test de Bonferroni entre los efectos obtenidos a cada tiempo, en presencia y ausencia (control) de la respectiva concentración del extracto.

En la prueba “*in vivo*” de propulsión intestinal se aplicó el ANOVA de una vía para comparar los efectos del tratamiento, seguido de comparaciones pareadas a

posteriori por el test de Bonferroni entre los efectos obtenidos a cada tiempo en los diversos tratamientos y el grupo control. En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis botánico

Fuchsia magellanica crece en arbusto de 1 a 4 m de altura. Hojas opuestas o en grupos de 3, simples, oval-lanceoladas, agudas, con lamina de tamaño 50 x 20 mm y de superficie dentada. Flores solitarias, de 70 mm de longitud, colgantes con 5 pétalos obtusos violetas de 20 x 7 mm de tamaño y sépalos ovados-lanceolados rojos con un tamaño de 20 x 8 mm. Pedunculos rojos de 50 mm. El fruto es una baya comestible con semillas numerosas.



FIGURA 9. Flores de *Fuchsia magellanica* del Jardín Botánico C. Spegazzini

A continuación, se muestran los resultados del análisis microscópico de los caracteres anatómicos y morfológicos de las hojas de *F. magellanica*.

5.1.1. Arquitectura foliar

La venación es pinnada, con una vena primaria única (vena media) que sirve de origen a la venación de orden más alto, tiene un recorrido recto, sin ramificaciones y tiene un ancho de vena de aproximadamente el 2.5% del ancho de hoja. La venación secundaria es de tipo camptódroma con un ángulo de divergencia agudo moderado (entre 45° y 60°) casi uniforme, de grosor moderado, con un recorrido curvado, doblándose en arco uniformemente, donde las venas secundarias no terminan en el margen. La venación terciaria es broquidódroma, reticulada, mostrando una serie de arcos prominentes y la cuaternaria está orientada al azar. La venación marginal es ojalada y la areolación está bien desarrollada (Fig. 10).



Figura 10. Hoja de *Fuchsia magellanica* del Jardín Botánico C. Spegazzini

5.1.2. Epidermis vista en superficie (VS)

La epidermis presenta células con paredes anticlinales sinuosas tanto en haz como envés y estomas de tipo anomocítico, en el envés, con engrosamientos polares en forma de "T" (Fig. 11 A y B). Pubescencia en ambas caras formada por tricomas eglandulares uniseriados de cutícula lisa (Fig. 11 A y B). Gran cantidad de rafidios se observan en el mesofilo (Fig. 12).

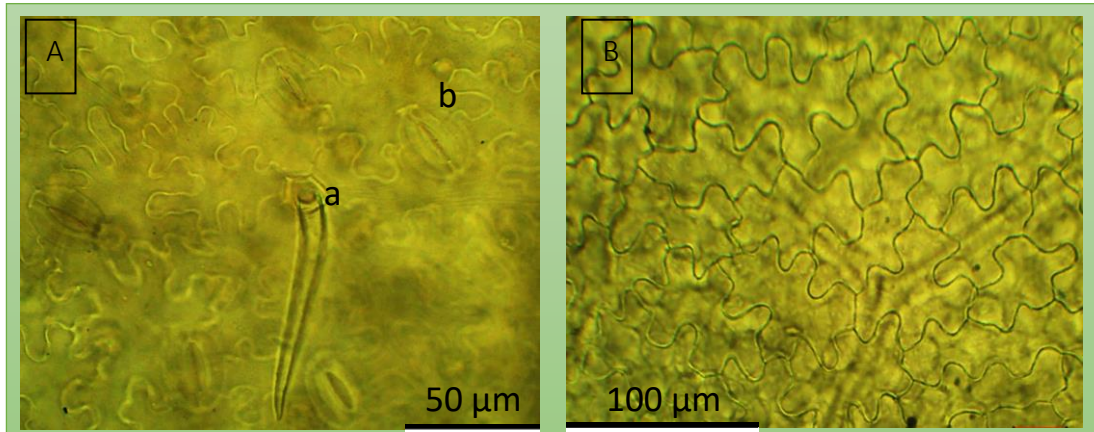


Figura 11 A. Epidermis abaxial: a. Tricoma eglandular; b. Estoma anomocítico. 400X
 B. Epidermis adaxial. 400X

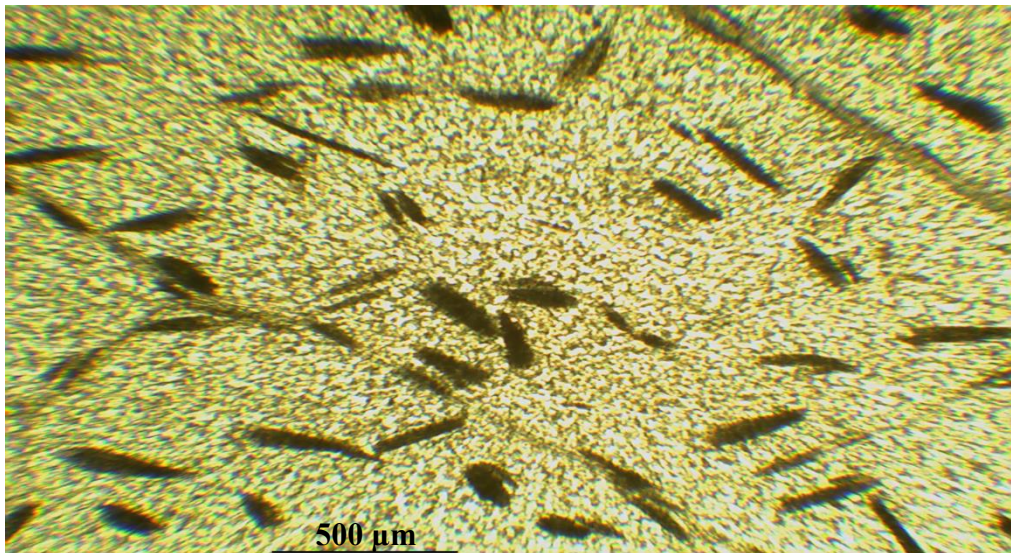


Figura 12 Mesofilo vista superficial; se observan rafidios. 40X

Las hojas tienen un haz glabrascente con un promedio de 3 tricomas por mm^2 , mientras que el envés es pubescente con un promedio de 27 tricomas por mm^2 .

Los índices calculados (estomático y empalizada) se pueden observar en la Tabla 1:

Tabla 1. Índices (magnitudes cuantitativas).

	PROMEDIO \pm S	MODA
Índice estomático	18,719 \pm 2,904	18,27
Índice de empalizada	4,289 \pm 0,857	4,75

5.1.3. Lámina en corte transversal (CT)

Presenta una epidermis unistratificada de células rectangulares con una epidermis adaxial más gruesa. El mesófilo es de tipo dorsiventral constituido por 1 sola capa de parénquima en empalizada de células largas, que ocupa una tercera parte del mesófilo, y de 4 a 6 capas de parénquima esponjoso. En el mesófilo se encuentran abundantes glóbulos lipídicos y sacos o cavidades mucilaginosas con rafidios en su interior orientados al azar (Fig. 13).



Figura 13. Mesófilo: A. Tricoma eglándular; B. Saco con rafidios; C. Globulos lipídicos. 400X

La vena media es plano-convexa. El sistema vascular está formado por un haz

vascular, con xilema hacia la cara adaxial y floema hacia la abaxial, el cual está entre 2-3 capas de colénquima hacia la cara adaxial y 1-2 capas de colénquima hacia la cara abaxial. Se observan pequeños haces adaxiales invertidos (Fig. 14).

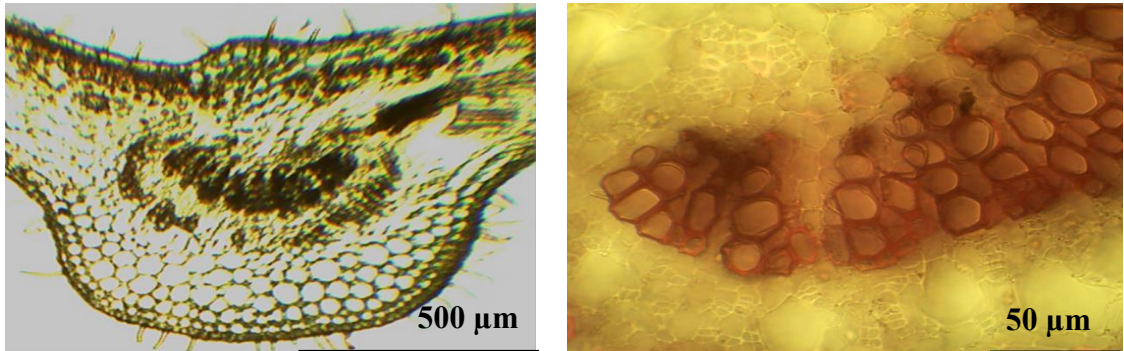


Figura 14. Lamina: A. Vena Media (40x). B. Haces vena media (400x).

5.1.4. Pecíolo en corte transversal (CT)

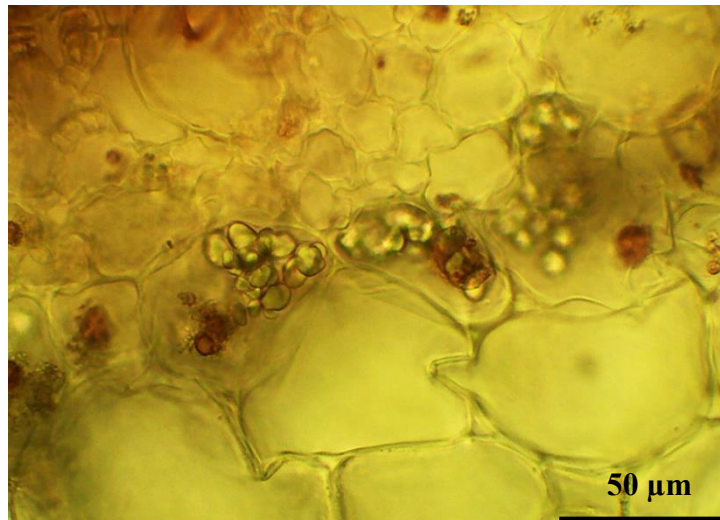


Figura 15. Capa amilifera abaxial del haz vascular. 400X

En la sección transversal el contorno es redondeado con la cara abaxial convexa y la adaxial cóncava. La epidermis es unistrata y está formada por células cuadrangulares con cutícula delgada y pubescente. La corteza está formada por 2 a 3 capas de parénquima colenquimatoso discontinuo y 5 a 7 capas de parénquima interno, en la corteza se visualizan rafidios y una vaina amilífera rodeando al tejido

vascular. Este se encuentra formando un arco de xilema adaxial y floema abaxial (Fig 15).

5.1.5. Tallo en corte transversal (CT)

Se hizo un corte transversal por la zona media de tres entrenudos jóvenes (primer, segundo y tercer entrenudo) de aproximadamente 1 mm de diámetro, mostrando la siguiente organización interna (Fig. 16): Epidermis unistrata, con células rectangulares de paredes anticlinales delgadas, cutícula lisa, delgada y pubescente con tricomas eglandulares, similares a los de las hojas. Continúa con 1 a 3 capas de colénquima lagunar. El cilindro vascular corresponde a una eustela, con haces vasculares biclaterales, ya que presenta floema intraxilemático. El xilema forma un anillo por la presencia de fibras interxilemáticas. La médula central es parenquimática con presencia de rafidios.

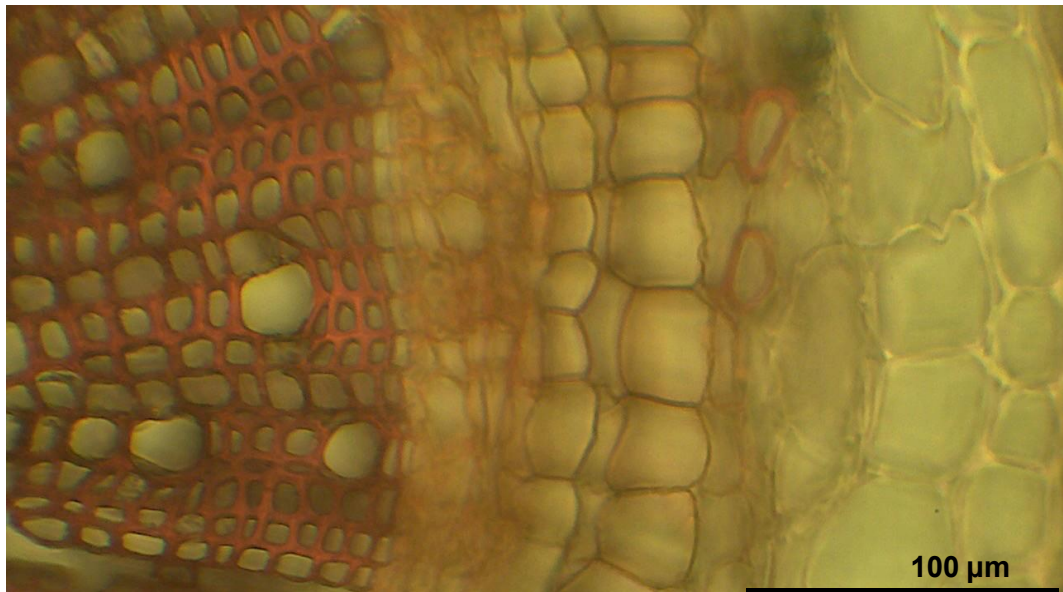


Figura 16. Tallo (VT): Xilema – Parenquima. 250X

Las características observadas en cada entrenudo son las siguientes:

- Primer entrenudo: Presencia de vaina amilífera. Cilindro vascular con floema externo e interno.
- Segundo entrenudo: La vaina amilífera desaparece y el parénquima

cortical comienza a dar origen a un cambium suberógeno. Persiste el cilindro vascular con floema externo e interno.

- Tercer entrenudo: Se observa súber de origen interno, desplazando a la corteza primaria. Presenta fibras corticales aisladas. Persiste el cilindro vascular con floema externo e interno. Se observa médula parenquimática con contenido de mucilagos.

5.1.6. Pruebas histoquímicas

En la tabla 2 se muestran los resultados de las pruebas histoquímicas hechas con las cuales se pudieron determinar la presencia o ausencia de las moléculas características para su identificación.

Tabla 2. Resultados de las pruebas histoquímicas.

	Compuesto	Coloración	Reacción en las hojas
Almidón	Solución de Lugol	Azul–Negro	Hojas (-) Tallo (+)
Taninos	FeCl ₃ (10%) y Na ₂ CO ₃ (2%)	Azul–Verde	Hojas (-) Tallo (-)
Sustancias Lipofílicas	Súdan III	Rojo-Rosa	Hojas (+) Tallo (+)
Mucilagos	Azul brillante de cresilo	Azul celeste	Hojas (+) Tallo (+)

Se confirmó que los glóbulos presentes en el mesofilo y en el tallo reaccionan positivamente al tratamiento con Sudán III, tiñéndose de color rojizo. Este resultado evidencia la presencia de grasas - aceites en hojas y tallos.

Se descartó la presencia de almidón en hojas con solución de Lugol, ya que no hubo tinción de color azul oscuro. Sin embargo, si se observó la tinción en el tallo,

confirmando la presencia de almidón en este.

La prueba con cloruro férrico - carbonato de sodio descartó la presencia de taninos, tanto en hojas como en el tallo, ya que no dio la coloración azul-verdosa relacionada con estos.

Se confirmó la presencia de mucilagos en las células que contienen rafidios, de hojas y tallos, al observarse de azul celeste con el tratamiento de azul brillante de cresilo.

5.2. Ensayos fitoquímicos

5.2.1. Reacciones de caracterización

5.2.1.1. Flavonoides

Como se muestra en la Tabla 3 el extracto hexánico de las flores dio negativo para todas las reacciones de caracterización y el de hojas solo dio positivo para el hidróxido de sodio con lo que se puede sospechar la presencia de otros compuestos fenólicos diferentes de los flavonoides.

Los extractos de acetato de etilo y acuoso de hojas y flores dan positivo para todas las reacciones. Por Shinoda y Rosenheim se puede confirmar la presencia de flavonoides y leucoantocianidinas.

También, por la reacción positiva del resto de reacciones se puede sospechar, en hojas y flores, la presencia de flavonas, flavanones, isoflavonas y/o flavonoles, posiblemente con tres hidroxilos adyacentes.

Tabla 3. Cambios de color en las reacciones de caracterización de las flores y hojas de *F. magellanica*.

	FLORES			HOJAS		
	Hexano	Acetato de Etilo	Agua	Hexano	Acetato de Etilo	Agua
SHINODA	No hubo cambio de color	Rojo en la fase orgánica	Rojo intenso en la fase orgánica	No hubo cambio de color	Ligeramente rojo en la fase orgánica	Rojo en la fase orgánica
ROSENHEIM						
Na OH		Amarillo		Punto amarillo	Naranja	Marrón
BO ₃ H ₃		Verde fluorescente		No hubo cambio de color	Verde fluorescente	Celeste fluorescente
Cl ₃ Fe		Negro			Negro, hubo cambio de color al secarse	Negro intenso
Cl ₃ Al		Amarillo fluorescente			Amarillo fluorescente	Verde fluorescente

5.2.1.2. Terpenos

Como se observa en la Tabla 4 los extractivos diclorometanolicos, dieron positivo la reacción de Lieberman-Bouchard para la presencia de núcleos esteroideos, con mayor presencia en hojas y no parece haber presencia de ningún núcleo triterpenico en los extractivos de acetato de etilo, en hojas ni en flores.

Ambos extractos acuosos de hojas y de flores dieron positivo las reacciones para saponinas (Tabla 5).

Tabla 4. Caracterización Del Núcleo Terpénico: Reacción de Lieberman-Bouchard

	Flores	Hojas
DCM	(+) Verde claro	(+++) Verde oscuro
Acetato De Etilo	(-) Transparente	(-) Transparente

Tabla 5. Caracterización de saponinas

	Flores	Hojas
Capacidad Afrogena	+++	+
Poder Emulgente	+++	++
Precipitación con Ca(OH) ₂	+	+++
Precipitación Subacetato de Plomo	++	+++
Fehling Indirecta	+++	++

5.2.2. Análisis cromatográfico inicial

5.2.2.1. Flavonoides

El análisis superficial por TLC permitió observar el perfil cromatográfico de los seis extractivos en fases móviles usadas para flavonoides, ayudando a dilucidar la presencia de isoquercetina y vitexina y la ausencia de ácido cafeico y apigenina en hojas y flores. Es importante destacar que para el ácido clorogénico no da un resultado concluyente.

Sistema 1: Se observó una banda mayoritaria naranja con mayor presencia en las hojas correspondiente a la isoquercetina (Rf: 0.75), hay otras bandas de menor intensidad que hacen sospechar presencia de ácido clorogénico (Rf: 0.95), de color celeste fluorescente, y de vitexina (Rf: 0.65) de color naranja fluorescente, ambas con mayor presencia en hojas. También se puede determinar la ausencia del ácido cafeico (Rf: 0.95) en las cuatro fracciones (Fig. 17 A).

Sistema 2: Se observó la presencia de vitexina (Rf: 0.58) en las fracciones acuosas y de acetato de etilo de hojas y flores y parece estar en la fracción hexánica de flores. Se sospecha la presencia del ácido clorogénico (Rf: 0.12) en las fracciones acuosas y de acetato de etilo en flores. Se destaca la presencia de la isoquercetina (Rf: 0.56) como compuesto principal en esta fase móvil en las fracciones acuosa y de acetato de etilo, tanto de flores como de hojas. Se determinó la ausencia de la apigenina en todas las fracciones (Fig. 17 B).

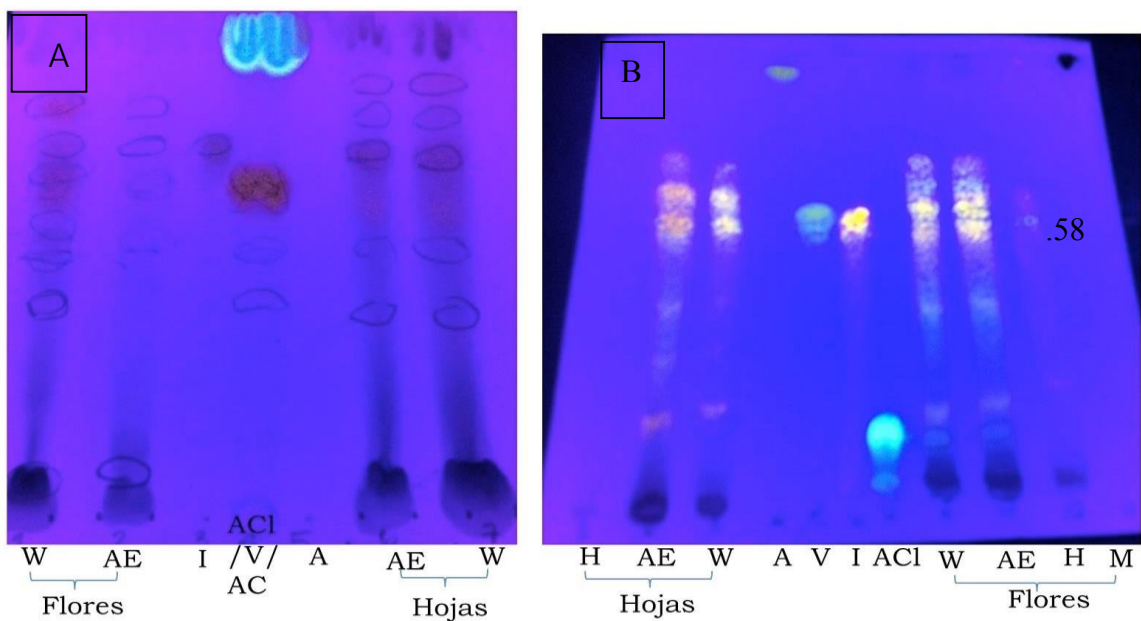


Figura 17. TLCs para flavonoides en la FMI (A) y la FMII (B). W: extracto acuoso. AE: extracto de acetato de etilo. H: extracto hexánico. M: extracto metanólico. I: isoquercetina. ACI: ácido clorogénico. V: vitexina. AC: ácido cafeico. A: apigenina.

5.2.2.2. Terpenos

El análisis inicial por TLC permitió observar el perfil cromatográfico de los diferentes extractivos en fases móviles usadas para triterpenos, ayudando a dilucidar la presencia de ácido oleanólico en hojas y flores y de saponinas en flores y a descartar la presencia de escina y escina β .

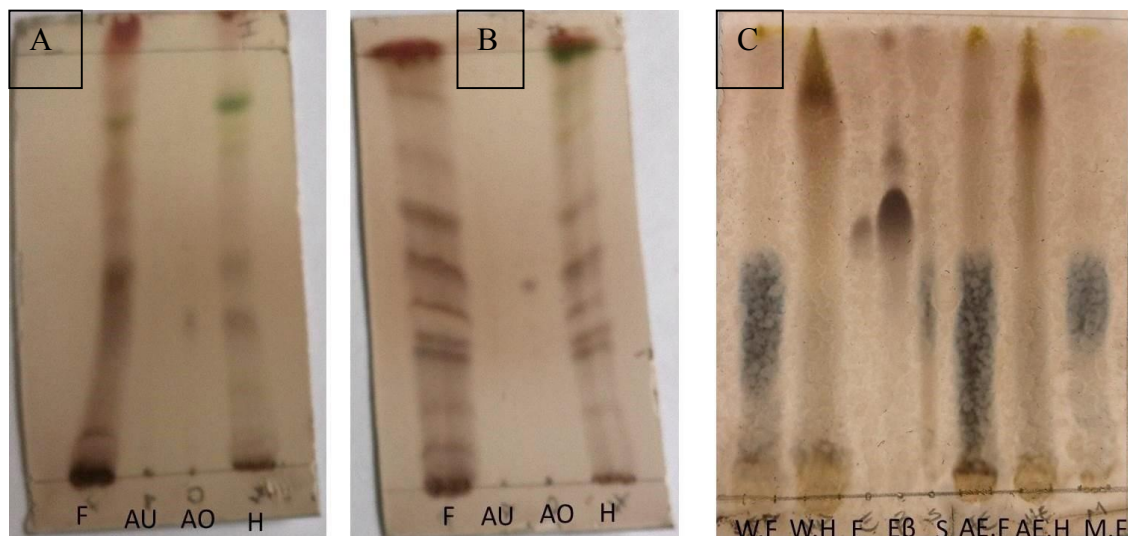


Figura 18. Cromatografías de capa fina para terpenos en FM I (A), FM II (B) y FM III (C). F: Flores. AU: ácido ursólico. AO: ácido oleanólico WF: extracto acuoso flores. WH: extracto acuoso hojas. AE.F: extracto en acetato de etilo de flores. AE.H: extracto en acetato de etilo de hojas. MF: extracto metanólico de hojas. E: escina. E β : escina β . S: saponinas

Sistema 1: Muestra una banda verde (Rf: 0.8) con presencia en flores y hojas, en hojas hay otras bandas de menor intensidad de color negro (Rf: 0.75, 0.70 y 0.35), y para hojas y flores hay una banda negra (Rf: 0.44) que coincide con el ácido oleanólico (Fig. 18 A).

Sistema 2: Se confirmó la presencia de ácido oleanólico (Rf: 0.45) en hojas y flores. En hojas también se vio una banda verde oscuro (Rf: 0.96), dos de un verde más claro (Rf: 0.87 y 0.76) y cuatro bandas negras (Rf: 0.60, 0.36, 0.33 y 0.27). En flores se observaron ocho bandas negras (Rf: 0.85, 0.71, 0.58, 0.36, 0.31, 0.27, 0.18 y 0.09) además de la banda correspondiente al ácido oleanólico (Fig. 18B).

Sistema 3: En esta fase móvil se observó la presencia de saponinas (Rf: 0.40) en las tres fracciones (Acetato de etilo, metanol y agua) de flores. Además, en la fracción acuosa de flores se ve una banda amarilla opaca (Rf: 0.09) y en la de acetato de etilo una de igual color (Rf: 0.05). En hojas se descarta la presencia de saponinas, pero se ve

una banda marrón (Rf: 0.91) en la fracción de acetato de etilo y en la fracción acuosa se ven dos; una marrón (Rf: 0.87) y una amarilla opaca (Rf: 0.09). Para flores y hojas se descarta la presencia de escina y escina β en cualquiera de las fracciones obtenidas (Fig. 18C).

5.2.3. Cromatografía en capa delgada (TLC) enfocada en flavonoides

Un análisis cromatográfico por TLC más profundo permitió determinar el perfil de polifenoles, especialmente flavonoides presentes en ambas tinturas, ayudando a aclarar algunos de los perfiles cromatográficos previos y a encontrar nuevos perfiles en las hojas de ambas muestras.

En el sistema 1 (Fig. 19A) se observó en el perfil cromatográfico de las muestras de hojas Fm-BA (HBA) y Fm-Sur (HS) bandas coincidentes en Rf y color con los testigos de isoquercitrina, hiperósido, ambos compuestos con el mismo Rf (0.62) debido a su similitud química, y se observa una banda clara coincidente en Rf (0.5) y color con el testigo de ácido clorogénico.

En el sistema 2 (Fig. 19B) se observó en el perfil cromatográfico de las muestras HBA y HS bandas coincidentes en Rf y color con los testigos de quercitrina (0.54) e hiperósido (0.35).

En el sistema 3 (Fig. 19C) se observó en el perfil cromatográfico de la muestra HS bandas coincidentes en Rf y color con los testigos de quercetina (0.31) y canferol (0.35). Se hizo un co-cromatograma de ambos testigos con la muestra HS para confirmar la presencia de estos en la tintura, obteniendo coincidencia.

En los sistemas 4 y 5 (Fig. 19D y 19E) se observó en el perfil cromatográfico de las muestras HBA y HS bandas coincidentes en Rf y color con los testigos de quercitrina (Rf 0.76 y Rf 0.75 respectivamente), isoquercitrina e hiperósido (Rf 0.52 y Rf 0.5 respectivamente).

En el sistema 6 (Fig. 19F) se observó en el perfil cromatográfico de la muestra HS bandas coincidentes en Rf y color con los testigos de quercetina (Rf 0.48) y canferol (Rf 0.69).

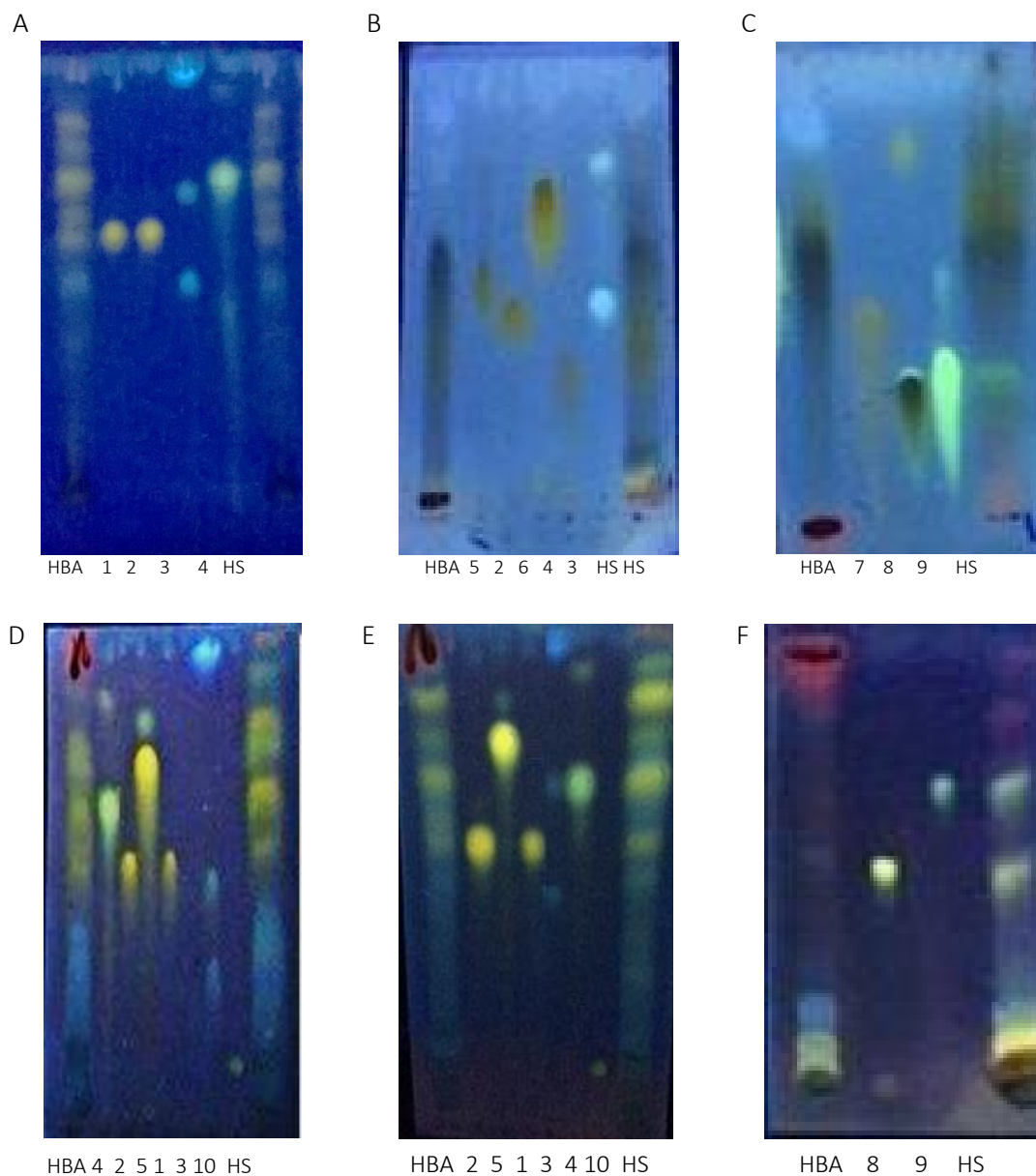


Figura 19. Perfiles cromatográficos de las tinturas de hojas Fm-BA (HBA) y Fm-Sur (HS). 1: Isoquercitrina, 2: Hiperósido, 3: Ácido clorogénico, cinarina y ácido cafeico, 4: Vitexina, 5: Quercitrina, 6: Rutina, 7: Apigenina, 8: Quercetina, 9: Canferol, 10: Canferol-3-triglucósido.

En la tabla 6 se muestra el resumen de los flavonoides presentes en ambas tinturas y en los sistemas cromatográficos en los que se pueden observar.

Tabla 6. Presencia de los flavonoides en los diferentes sistemas cromatográficos.

Sistema de solventes	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Hojas de Fucsia de
Quercetina			-			-	La Plata
			+			+	Sur
Canferol			-			-	La Plata
			+			+	Sur
Quercitrina	+	+		+	+		La Plata
	++	++		++	++		Sur
Isoquercitrina	+	+		+	+		La Plata
	++	++		++	++		Sur
Hiperósido	+	+		+	+		La Plata
	++	++		++	++		Sur

Se descarta la presencia de vitexina, canferol-3-triglicósido, cinarina, ácido cafeico y apigenina, por no encontrar coincidencia con los respectivos testigos. Además queda pendiente por determinar la presencia de ácido clorogénico en ambas tinturas por HPLC, ya que solo se observó la banda coincidente en el sistema cromatográfico 1.

5.2.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El análisis por HPLC permitió detectar y cuantificar los flavonoides presentes en ambas tinturas. En la especie colectada en La Plata se detectó y cuantificó quercitrina e hiperósido y en la especie colectada en Villa La Angostura se detectó y cuantificó quercetina, canferol, quercitrina e hiperósido. El método utilizado fue por comparación de los tiempos de retención y del espectro ultravioleta obtenido a través del detector de arreglo de diodos con las sustancias patrón.

Los tiempos de retención fueron aproximadamente los siguientes:

- Quercitrina: 36.1 min
- Quercetina: 38.2 min
- Hiperósido: 36.7 min
- Canferol: 40.3 min

En la tabla 7 se muestra el resumen de los flavonoides que se corrieron en HPLC y los observados en las tinturas por HPLC, con sus respectivas cuantificaciones.

Tabla 7. Rendimientos de los flavonoides presentes en las tinturas. Los resultados se expresan como P/P respecto a 100g de droga seca (mg%).

Compuesto	<i>F. magellanica</i> "BA" (mg %) $\bar{X} \pm SD$	<i>F. magellanica</i> "Sur" (mg %) $\bar{X} \pm SD$
Rutina	ND	ND
Isoquercitrina	ND	ND
Quercitrina	473,1±23,6	597,4 ± 19,1
Hiperósido	87,9± 5,0	201,8 ± 0,2
Canferol	ND	Trazas
Quercetina	ND	18,8 ± 0,6

$\bar{X} \pm SD$: Valor promedio ± desviación estándar

ND: No se detectó

Trazas: Contenido inferior al límite de cuantificación (1 ppm)

En la Fig. 20 se observa que la tintura de HBA presenta un pico a Rt 36.441 y otro a Rt 37.227 min, correspondientes a la quercitrina y al hiperosido respectivamente (Picos 3 y 5). Y en la Fig. 21 se observa que la tintura de hojas Fm-Sur presenta picos a Rt 36.021, Rt 30.728, Rt 38.180 y a Rt 40.302 min, correspondientes a la quercitrina, el hiperosido, la quercetina y el canferol, respectivamente (Picos 2, 4, 7 y 9).

Se puede apreciar que F-Sur tiene mayor contenido de flavonoides y aunque en pequeñas cantidades se puede observar la presencia de quercetina, que probablemente se ha hidrolizado de la quercitrina y el hiperosido, y de canferol, flavonoides que no se observan en Fm-BA. Esto puede deberse a la diferencia de condiciones en las que crece en Patagonia, teniendo en cuenta que estos flavonoides se caracterizan por ser antioxidantes y por el hecho de que el frío invernal se ha relacionado con estrés oxidativo es probable que la diferencia en la cantidad de

flavonoides se deba a una respuesta natural de la planta frente al clima más frío de la Patagonia (Ma *et al*, 2014; Watanabe & Ayugase, 2015).

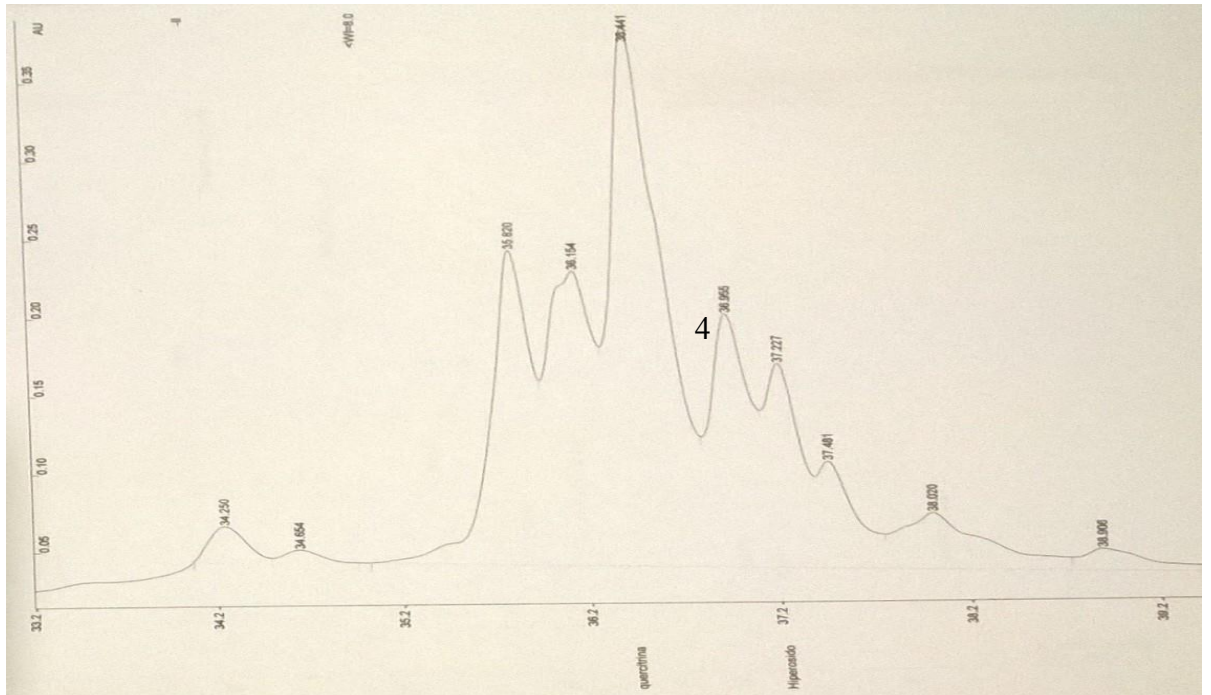


Figura 20. Cromatograma obtenido por HPLC de la tintura de hojas de Fm-BA.

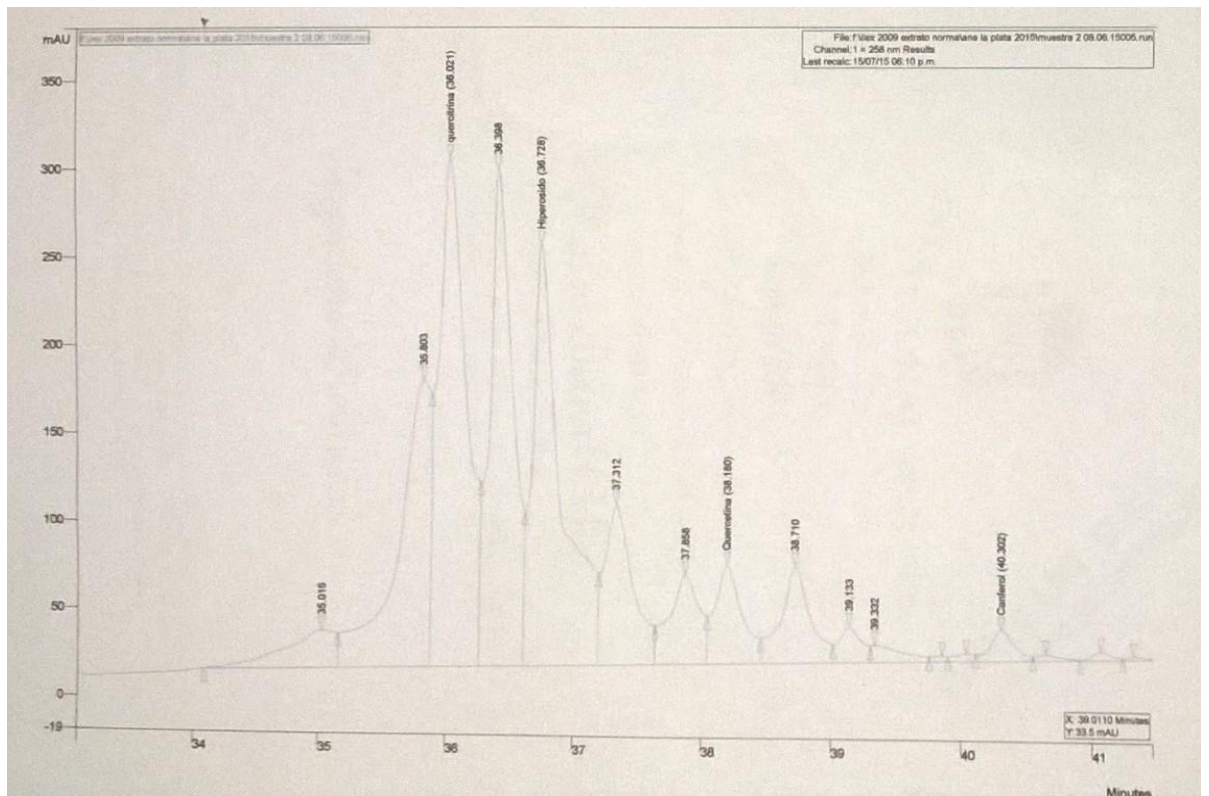


Figura 21. Cromatograma obtenido por HPLC de la tintura de hojas de Fm-Sur.

5.3. Actividad Farmacológica

5.3.1. Actividad antiespasmódica visceral *in vitro*

5.3.1.1. Actividad en intestinos aislados de rata

5.3.1.1.1. Efectos de F.m. en CCR de carbacol

La tintura de las *hojas de Fm-BA* inhibió de forma no-competitiva (con reducción de los efectos y el Emax, dependiente de la concentración) la CCR del agonista muscarínico carbacol a las concentraciones de 0.1 y 0.3% de extracto en la cuba (equivalente a 37.5 y 112.5 µg residuo seco/mL respectivamente), siendo no significativa (NS) la inhibición a las menores concentraciones de 0.01 y 0.03% extracto (3.75 y 11.25 µg residuo seco/mL respectivamente). Una vez obtenidas las curvas de inhibición, y aplicando los rendimientos descritos en el punto 4.1.5, la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) fue equivalente a 256.36 ± 37.51 µg residuo seco/mL (n=6) (Fig. 22).

La tintura de las *hojas Fm-Sur* también inhibió de forma no-competitiva la CCR de carbacol a las concentraciones de 0.03, 0.1 y 0.3% extracto (equivalente a 8.82, 29.4 y 88.2 µg residuo seco/mL respectivamente), siendo NS a la menor concentración de 0.01% extracto (2.94 µg residuo seco/mL). La concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) fue de 272.85 ± 64.3 µg residuo seco/mL (n=8) (Fig. 23).

La tintura de las *flores Fm-BA* inhibió de forma no-competitiva la CCR de carbacol a las concentraciones de 0.03, 0.1 y 0.3% extracto (5.88, 19.6 y 58.8 µg residuo seco/mL respectivamente), siendo NS a la menor concentración de 0.01% extracto (1.96 µg residuo seco/mL). La concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) fue de 373.57 ± 113.74 µg residuo seco/mL (n=7) (Fig. 24).

La tintura de las *Flores Fm-Sur* inhibió de forma no-competitiva la CCR de carbacol a la concentración de 0.1% extracto (16.6 µg residuo seco/mL) de tintura en la cuba, siendo NS a las menores concentraciones de 0.01 y 0.03% extracto (1.66 y

4.98 μg residuo seco/mL respectivamente). La concentración inhibitoria al 75% del E_{max} (CI_{75}) fue de 90.07 ± 24.98 μg residuo seco/mL ($n=9$, Fig. 25).

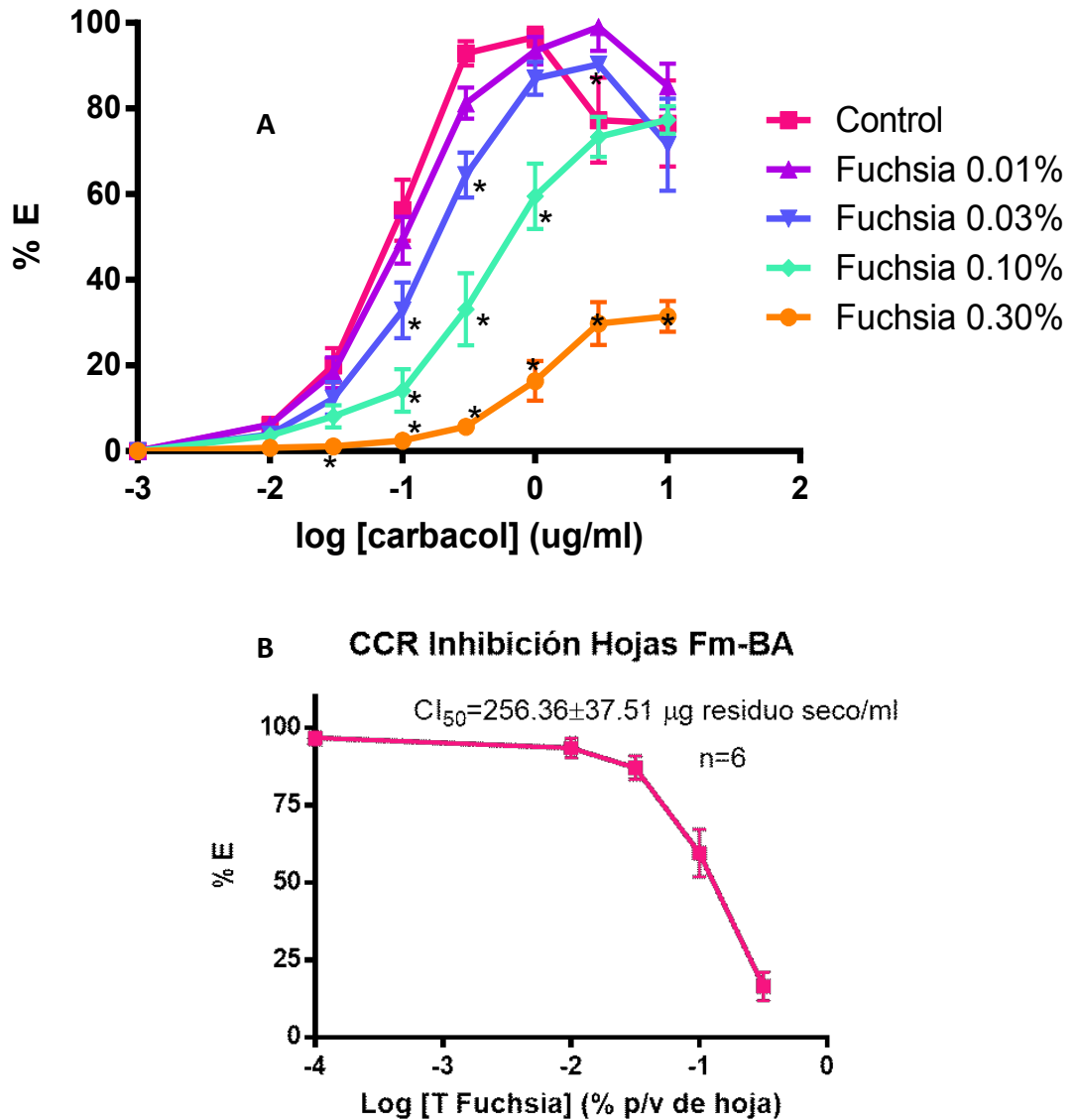


Figura 22. (A) Curva concentración-respuesta de Carbacol en ausencia y presencia de sucesivas concentraciones de tintura de hojas Fm-BA (expresadas en % P/V de hojas secas en el volumen de la cuba). (B) Curva de inhibición de la contracción obtenida a 1 $\mu\text{g/ml}$ carbacol, para intrapolar la CI_{50} ($n=6$) que equivale a 256.36 ± 37.51 μg residuo seco/mL. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=116$, $p<0.0001$, por log [Cb]: $F=222.5$ $p<0.0001$. Post-tests: $*p<0.05$ vs control.

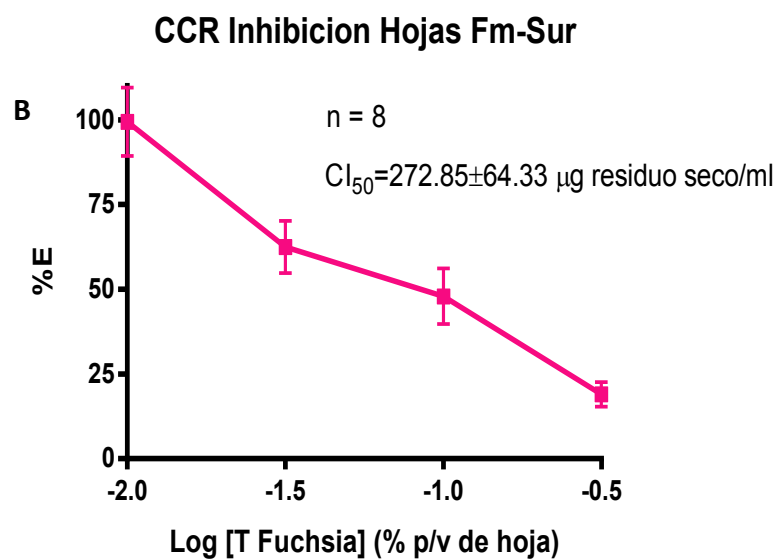
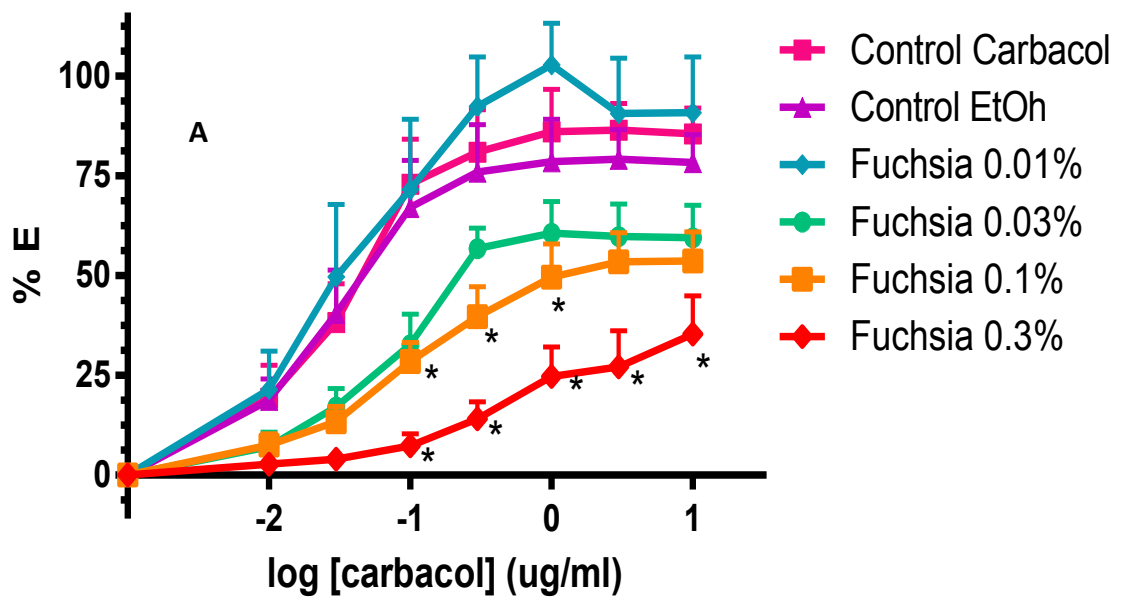


Figura 23. (A) Curva concentración-respuesta de Carbacol en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de hojas Fm-Sur (expresado en % P/V de droga seca sobre el volumen en la cuba). (B) Curva de inhibición de la contracción obtenida a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ carbacol, para intrapolar la CI_{50} ($n=8$) de $272.85 \pm 64.33 \mu\text{g residuo seco}/\text{mL}$. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=36.15$, $p<0.0001$, por $\log [Cbl]$: $F=55.54$ $p<0.0001$. Post-tests: $*p<0.05$ vs control.

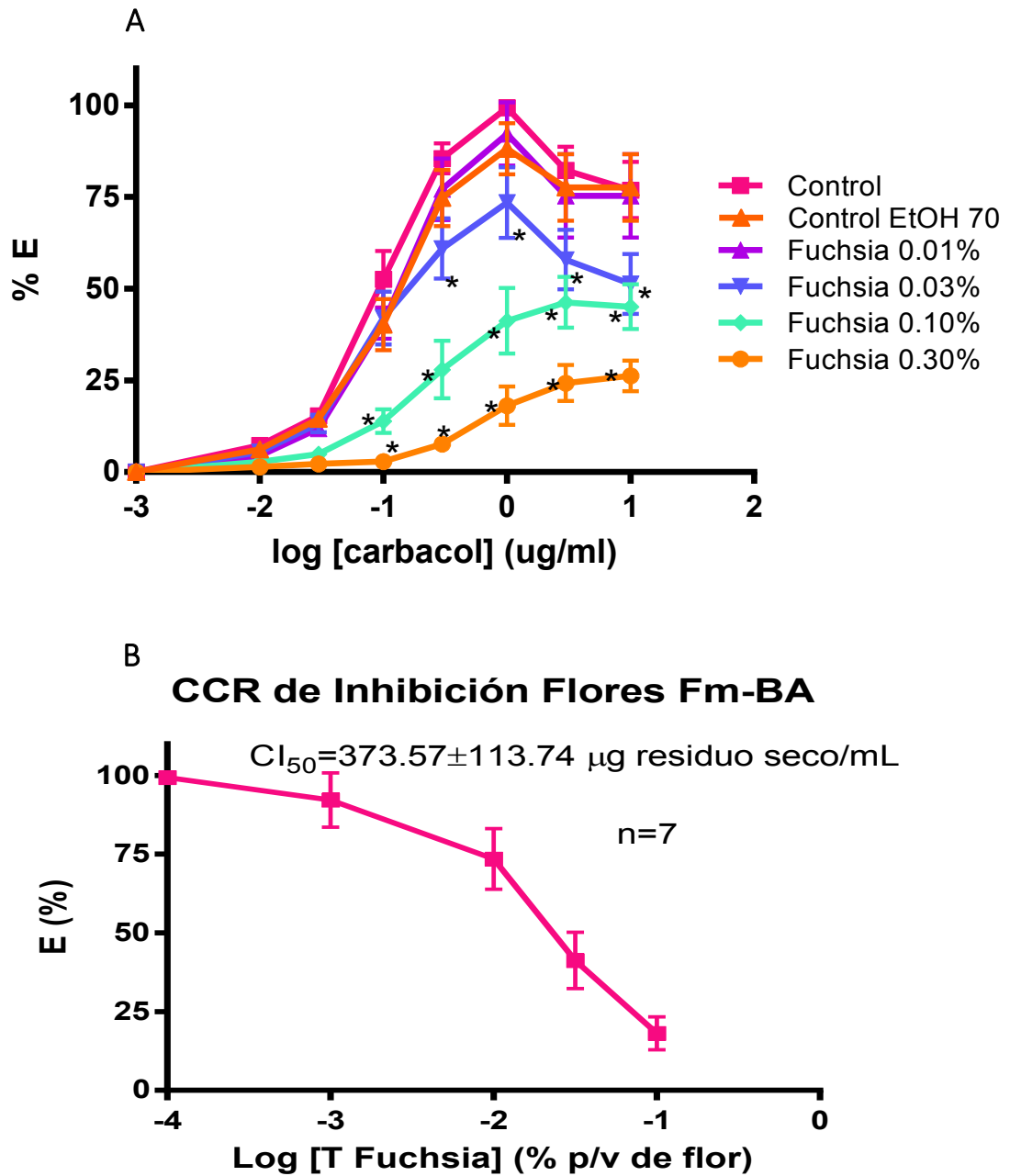


Figura 24. (A) Curva concentración-respuesta de Carbacol en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de flores Fm-BA (expresada en % P/V de droga seca sobre el volumen en la cuba). (B) Curva de inhibición de la contracción obtenida a $1 \mu\text{g/mL}$ carbacol, para intrapolar la CI_{50} (n=7) de $373.57 \pm 113.74 \mu\text{g}$ residuo seco/mL. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=67.65$, $p<0.0001$, por log [Cbl]: $F=137.0$ $p<0.0001$. Post-tests: $*p<0.05$ vs control.

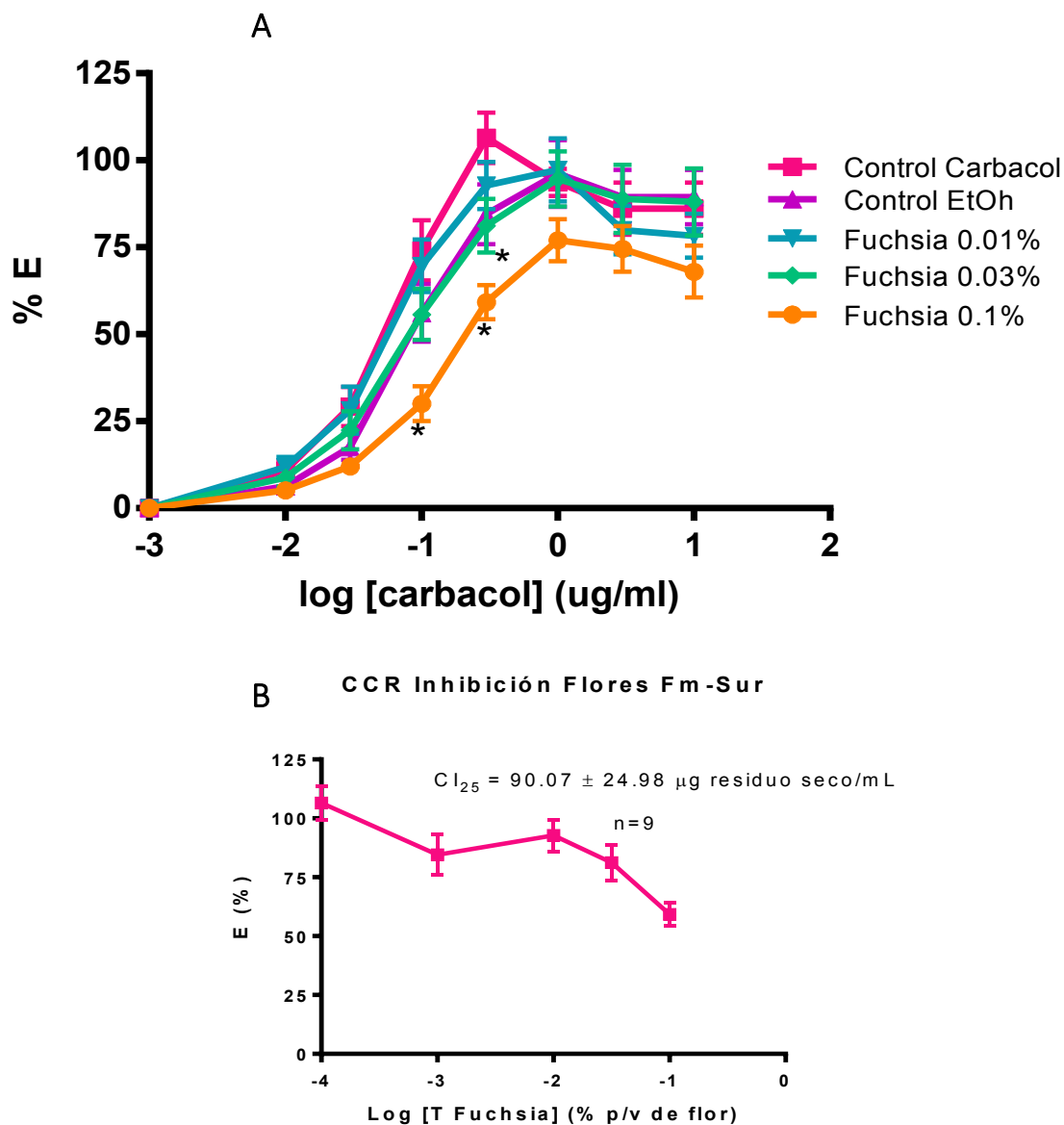


Figura 25. (A) Curva concentración-respuesta de Carbacol en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de flores Fm-Sur (en % P/V de droga seca sobre el volumen en la cuba). **(B)** Cálculo de la CI_{25} ($n=9$) de $90.07 \pm 24.98 \mu\text{g residuo seco/mL}$. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=11.79$, $p<0.0001$, por $\log [Cbl]$: $F=181.5$ $p<0.0001$. Post-tests: $*p<0.05$ vs control.

Debido a que las tinturas de las flores tuvieron menor inhibición de la respuesta espasmódica que la obtenida por las tinturas de las hojas, los estudios de los mecanismos de acción se continuaron sobre las tinturas de las hojas.

5.3.1.1.2. Efectos de *F.m.* en las CCR de calcio (Ca^{2+})

Para dilucidar si el efecto antiespasmódico de *F. magellanica*, que se manifestó como un antagonista no-competitivo de la contracción muscarínica, se debe a la inhibición del influjo de Ca^{2+} a la célula muscular lisa intestinal, se realizaron las CCR de Ca^{2+} en un medio despolarizante con alta concentración de K^+ (40 mM) y sin Ca^{2+} .

Las Figuras 26 y 27 muestran que tanto las *hojas de Fm-BA* como las de *Fm-Sur* inhibieron no competitivamente la CCR de Ca^{2+} . Las hojas de Fm-BA con un CI_{50} de $138.42 \pm 48.60 \mu\text{g}$ de residuo seco/mL (n= 13) y las hojas de Fm-Sur con un CI_{50} de $125.92 \pm 29.14 \mu\text{g}$ de residuo seco/mL (n= 6).

Con éstas graficas podemos observar que las CI_{50} parecen disminuir en ambos casos (Hojas Fm-BA y Hojas Fm-Sur) con respecto a las respectivas CI_{50} de las CCR de carbacol (Figs. 22 y 23) pero no hay una diferencia significativa entre ellas ($p=0.4336$ y $p=0.6598$ por test de Student, respectivamente).

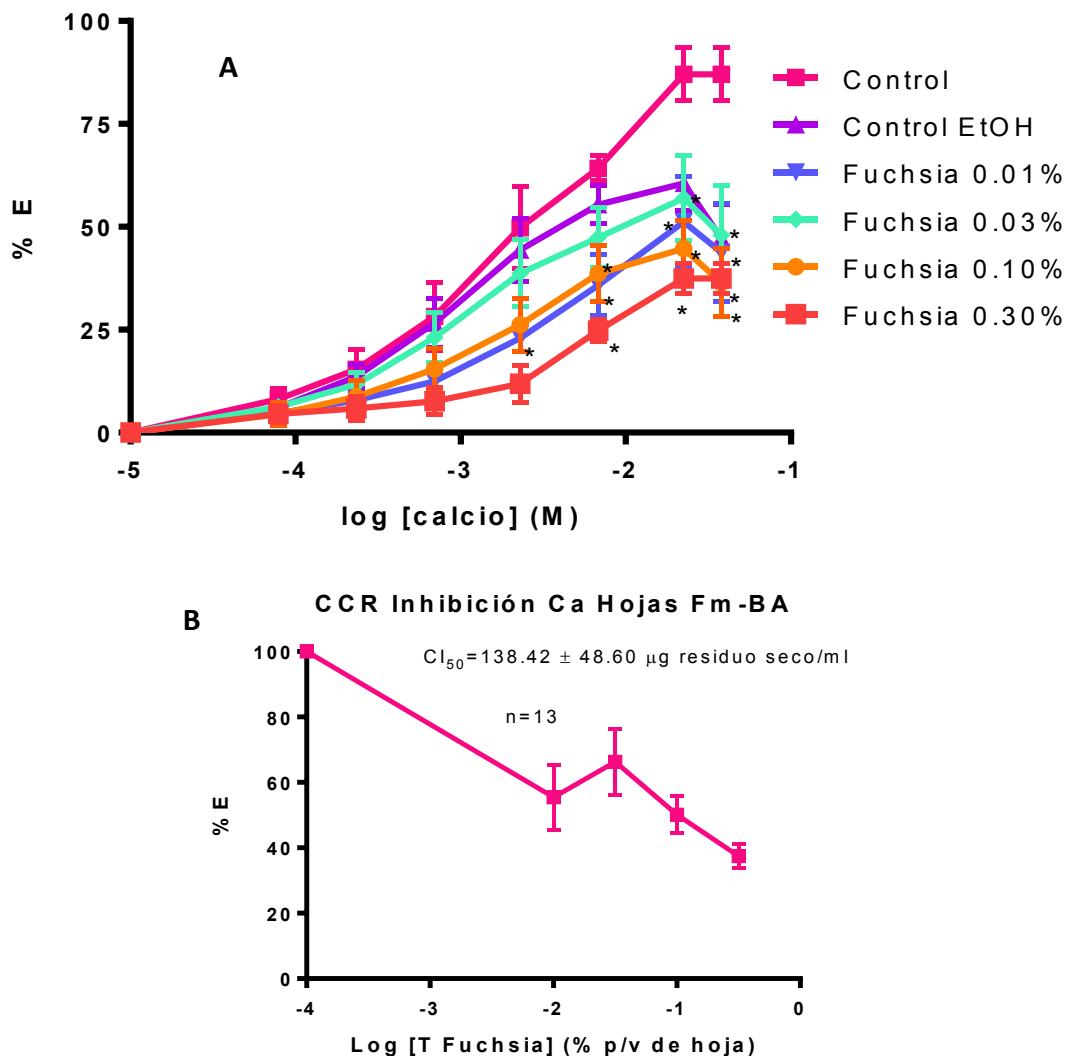


Figura 26. (A) Curva concentración-respuesta de Calcio en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de hojas Fm-BA (expresadas en % P/V de droga seca sobre el volumen en la cuba). **(B)** Cálculo de la CI₅₀ (n=13) de 138.42 ± 48.60 µg res. seco/mL. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: F=13.85, p<0.0001, por log [Ca]: F=47.81 p<0.0001. Post-tests: *p<0.05 vs control.

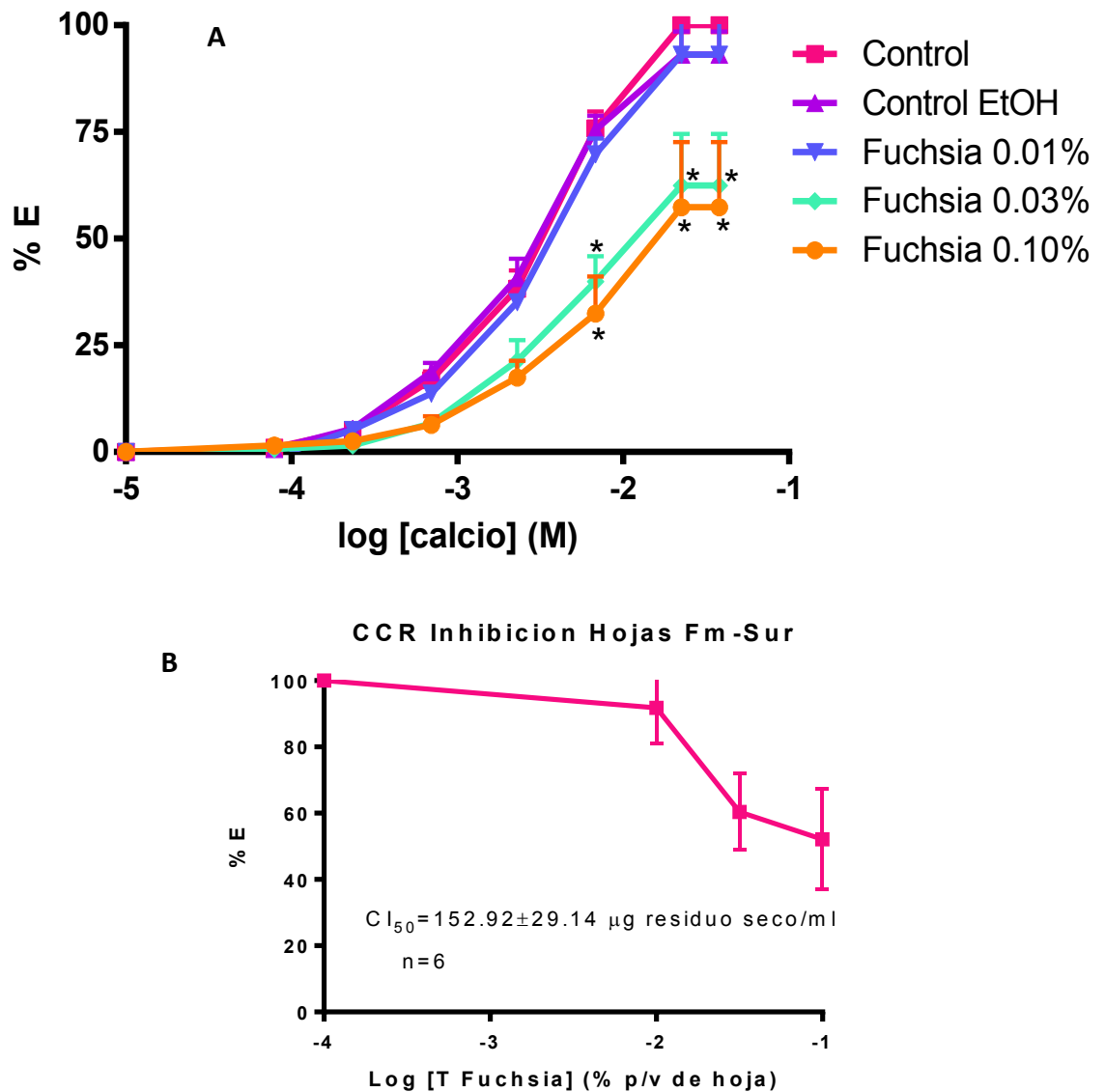
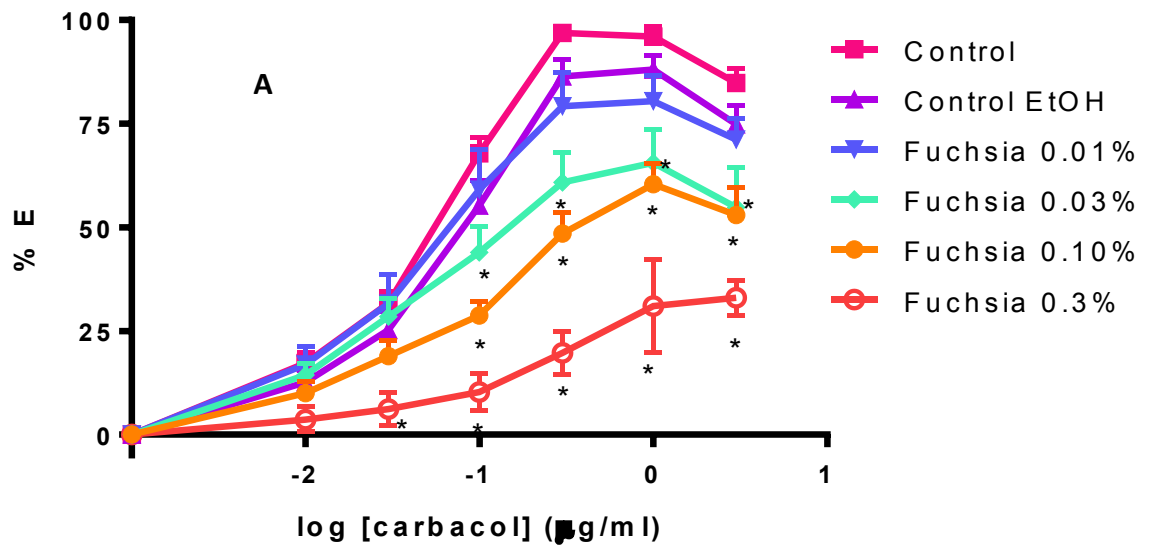


Figura 27. (A) Curva dosis-respuesta de Calcio en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de hoja Fm-Sur (expresado en % P/V droga seca sobre el volumen en la cuba) **(B)** Cálculo de la CI_{50} ($n=6$) de $152.92 \pm 29.14 \mu\text{g residuo seco/mL}$ obtenida de los efectos a la máxima concentración de calcio. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=22.8$, $p<0.0001$, por log [Ca]: $F=190.4$ $p<0.0001$. Post-tests: $*p<0.05$ vs control.

5.3.1.1.3. Efectos de *F.m.* en las CCR de carbacol con L-NAME

Se hipotetizó que el efecto inhibitorio no competitivo de las tinturas de *Fuchsia* tanto frente a la contracción colinérgica como a la disparada por influjo de Ca^{2+} en medio despolarizante podría estar mediada por la vía del óxido nítrico. Para evaluar esta hipótesis, se realizaron las CCR de carbacol en presencia de 30 $\mu\text{mol/L}$ L-NAME (inhibidor de la NO-sintasa), previa a la adición del extracto o vehículo y de la curva acumulativa del carbacol.

Las Figuras 28 y 29 muestran que el L-NAME no modificó el bloqueo no competitivo ni las Cl_{50} tanto de la tintura de las hojas de Fm-BA como de las hojas de Fm-Sur sobre las CCRs de Carbacol (Figs. 22 y 23). Las hojas Fm-BA exhibieron un Cl_{50} de 149.15 ± 36.20 μg de residuo seco/mL ($n= 6$) y las hojas Fm-Sur un Cl_{50} de 312.76 ± 39.59 μg de residuo seco/mL ($n= 8$), valores que no difieren significativamente de los obtenidos respectivamente en las CCRs en ausencia de L-NAME ($p = 0.1443$ y $p = 0.9880$ por test de Student).



CCR Inhibición LName Hojas Fm-BA

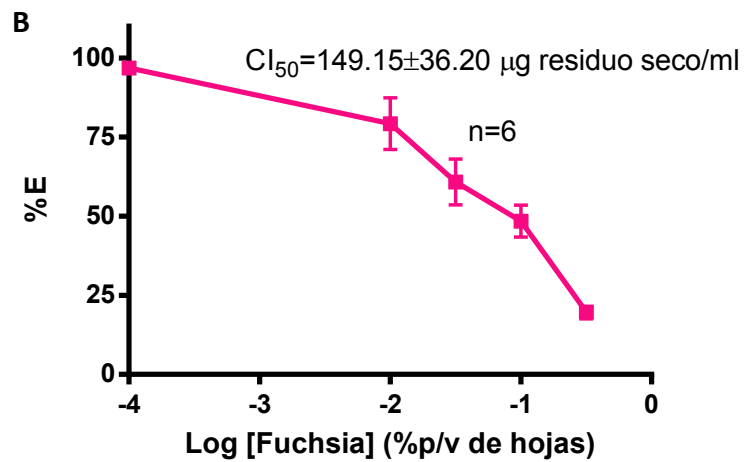


Figura 28. (A) Curva concentración-respuesta de carbacol, con adición de 30 µmol/L L-NAME, en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de hojas Fm-BA (expresado en % P/V hojas secas sobre el volumen en la cuba). **(B)** Cálculo de la CI_{50} ($n=6$) de 149.15 ± 36.20 µg residuo seco/mL a partir de los efectos obtenidos con carbacol 0.3 µg/mL. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=73.82$, $p<0.0001$, por log [Cb]: $F=218.8$ $p<0.0001$. Post-tests: $*p<0.05$ vs control.

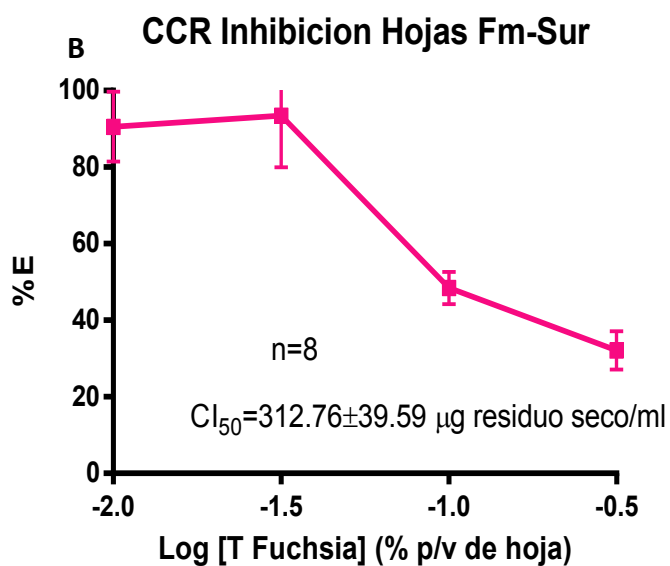
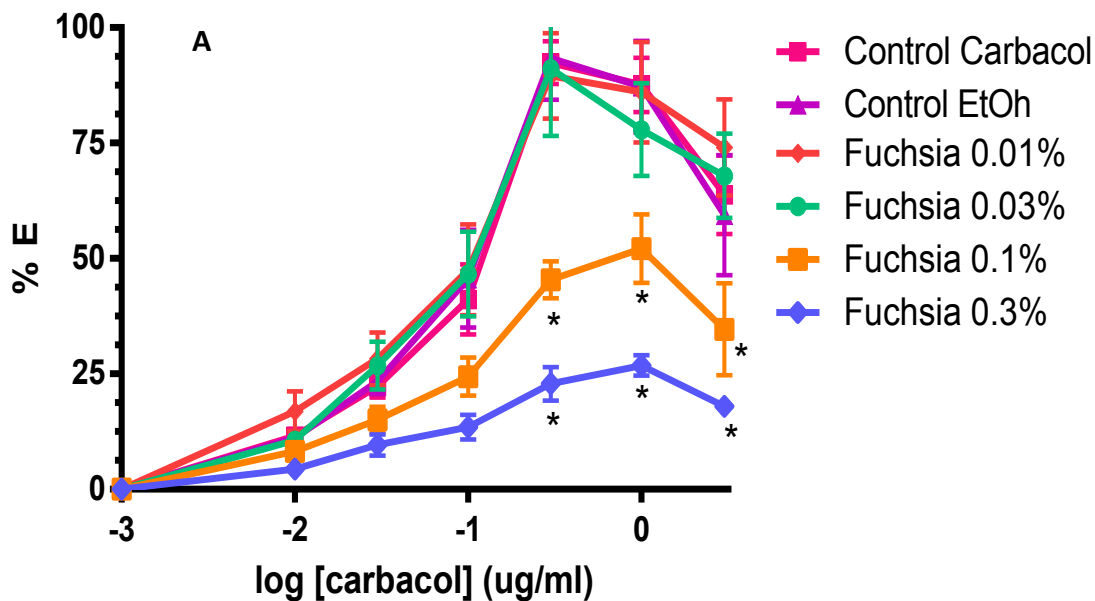


Figura 29. (A) Curva concentración -respuesta de carbacol, con adición de L-NAME, en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de hojas Fm-Sur (en % P/V de droga seca sobre el volumen en la cuba) (B) Cálculo de la CI_{50} ($n=8$) de $312.76 \pm 39.59 \mu\text{g}$ res seco/mL. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=27.7$, $p<0.0001$, por log [Cbl]: $F=102.5$ $p<0.0001$. Post-tests: $*p<0.05$ vs control.

5.3.1.2. Actividad en úteros aislados de rata

5.3.1.2.1. Actividad espontánea y efectos del vehículo en las CCR de carbacol

En la figura 30 se puede observar el registro experimental de la CCR de carbacol en úteros aislados de rata, evidenciándose la contracción del músculo liso con la adición de las diferentes concentraciones de carbacol (puntos morados). El útero posee una actividad contráctil espontánea basal, la cual se acentúa por el agregado del agonista muscarínico.

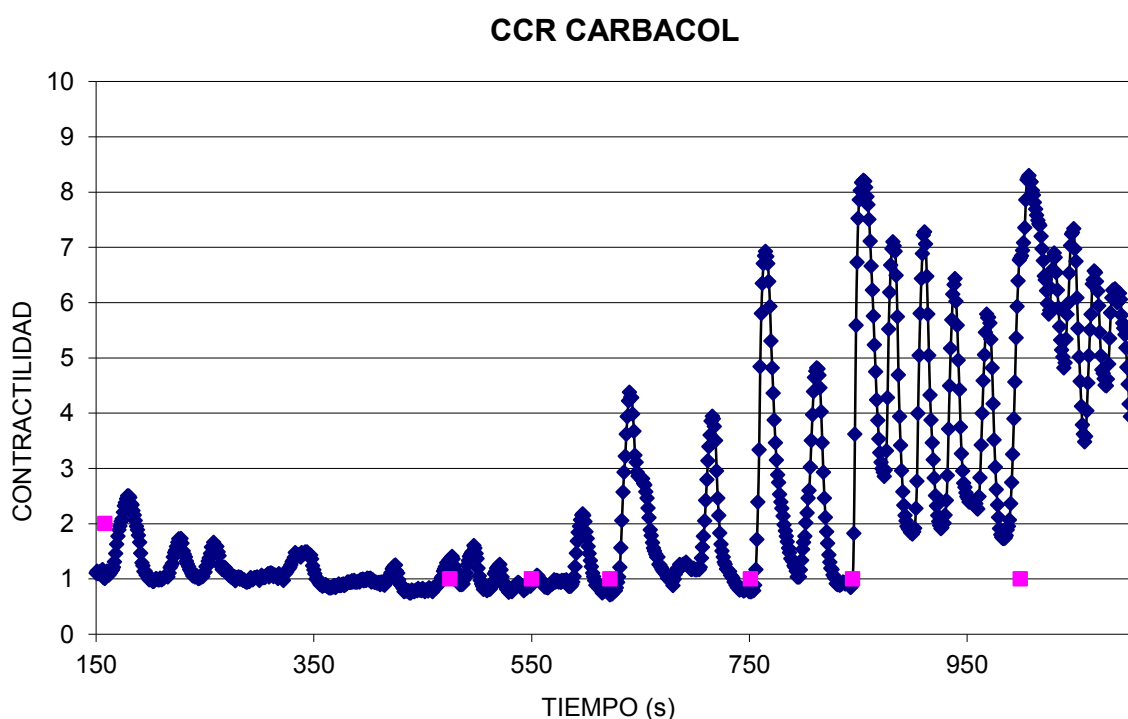


Figura 30. Registro experimental de la curva concentración-respuesta de carbacol en el útero.

Para obtener un mejor análisis de los datos se compararon las CCR de carbacol control (en ausencia de las tinturas) con las CCR de carbacol en presencia de los vehículos (etanol de 70° diluido al 10% y 30%, los cuales resultan en las respectivas concentraciones de 0.1 y 0.3% V/V en la cuba). Se puede observar (Fig. 31) que en útero no hay diferencia significativa entre el control y el vehículo al 0.1%, pero si la hay con el vehículo al 0.3%. Esta curva se tomó como control 100% para analizar las CCR en presencia de la máxima concentración de la tintura (que contenían el mismo vehículo de etanol al 0.3%).

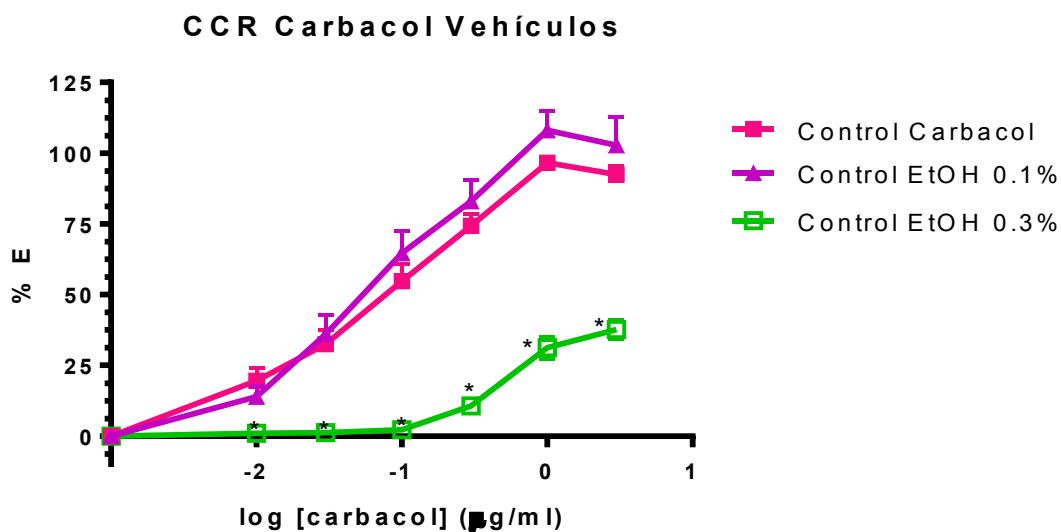
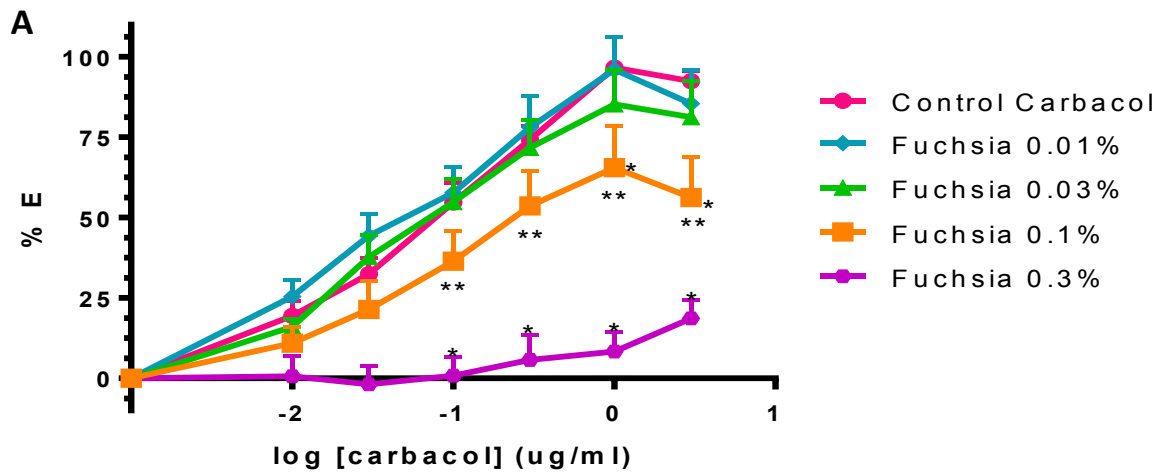


Figura 31. Comparación de las CCR de carbacol en ausencia (control) y en presencia de los vehículos (etanol al 0.1 y 0.3%).

5.3.1.2.2. Efectos de *F. magellanica* sobre las CCR de carbacol

Las *hojas Fm-BA* inhibieron de forma no-competitiva la CCR de carbacol a las concentraciones de 0.1 y 0.3% de tintura en la cuba, siendo NS a las menores concentraciones de 0.01 y 0.03%. La concentración inhibitoria al 50% (CI_{50}) fue de 180.17 ± 41.71 µg residuo seco/mL (n=9) (Fig. 32).

Las *hojas Fm-Sur* también inhibieron de forma no-competitiva la CCR de carbacol en útero a la concentración de 0.3% P/V de hojas secas en la cuba, siendo NS a las menores concentraciones de 0.01, 0.03 y 0.1%. La concentración inhibitoria al 50% (CI_{50}) fue de 470.42 ± 67.76 µg residuo seco/mL (n=13) (Fig. 33).



CCR Inhibición Hojas Fm-BA

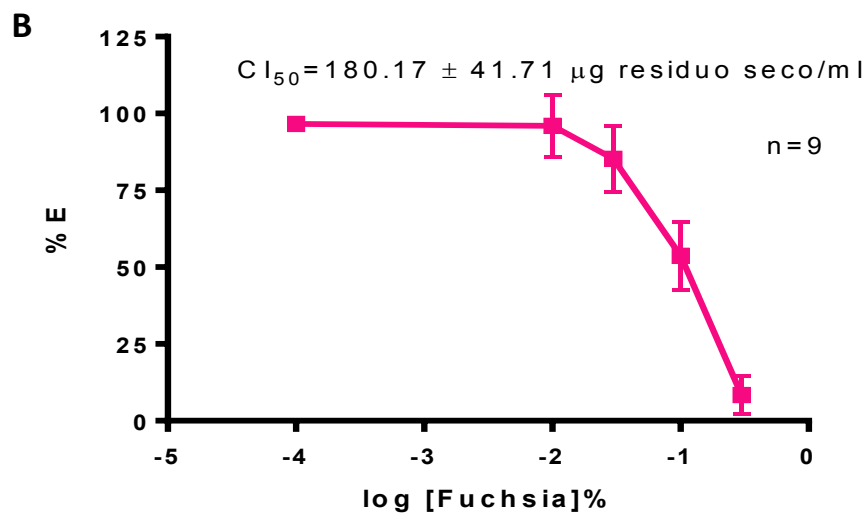


Figura 32. (A) Curva concentración-respuesta de carbacol en útero en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de hojas de Fm-BA (en % P/V de droga seca sobre el volumen en la cuba) **(B)** Cálculo de la CI_{50} (n=9) de $180.17 \pm 41.71 \mu\text{g residuo seco/ml}$. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=58.73$, $p<0.0001$, por log [Cbl]: $F=98.53$ $p<0.0001$. Post-tests: * $p<0.05$ vs control ** $p<0.05$ vs vehículo respectivo a la dosis.

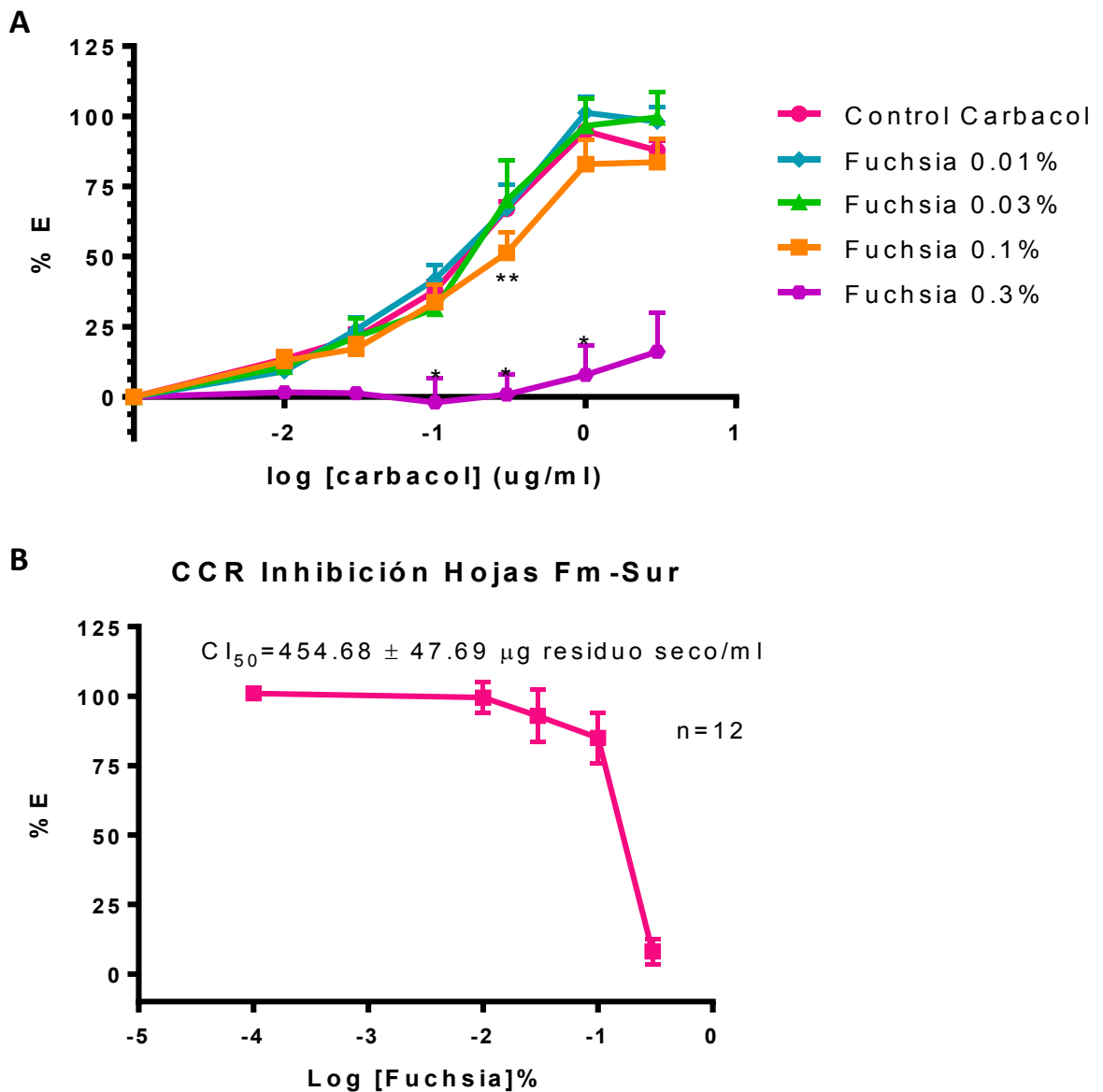


Figura 33. (A) CCR de carbacol en útero en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de hojas Fm-Sur (en % P/V de droga seca sobre el volumen en la cuba) **(B)** Cálculo de la CI_{50} ($n=13$) de $454.68 \pm 47.69 \mu\text{g residuo seco/mL}$ desde los efectos a la máxima [Cbl]. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=70.16$, $p<0.0001$, por log [Cbl]: $F=188$ $p<0.0001$. Post-tests: $*p<0.05$ vs control $**p<0.05$ vs vehículo respectivo a la dosis.

Dado que en útero la tintura de las hojas Fm-Sur tuvo un menor grado de inhibición de la respuesta espasmódica del carbacol y una mayor CI_{50} (menor potencia) que la obtenida por la tintura de las hojas de Fm-BA, los estudios de los mecanismos de acción se continuaron sobre las tinturas de hojas Fm-BA.

5.3.1.2.3. Efectos de Fm-BA en las CCR de carbacol con indometacina

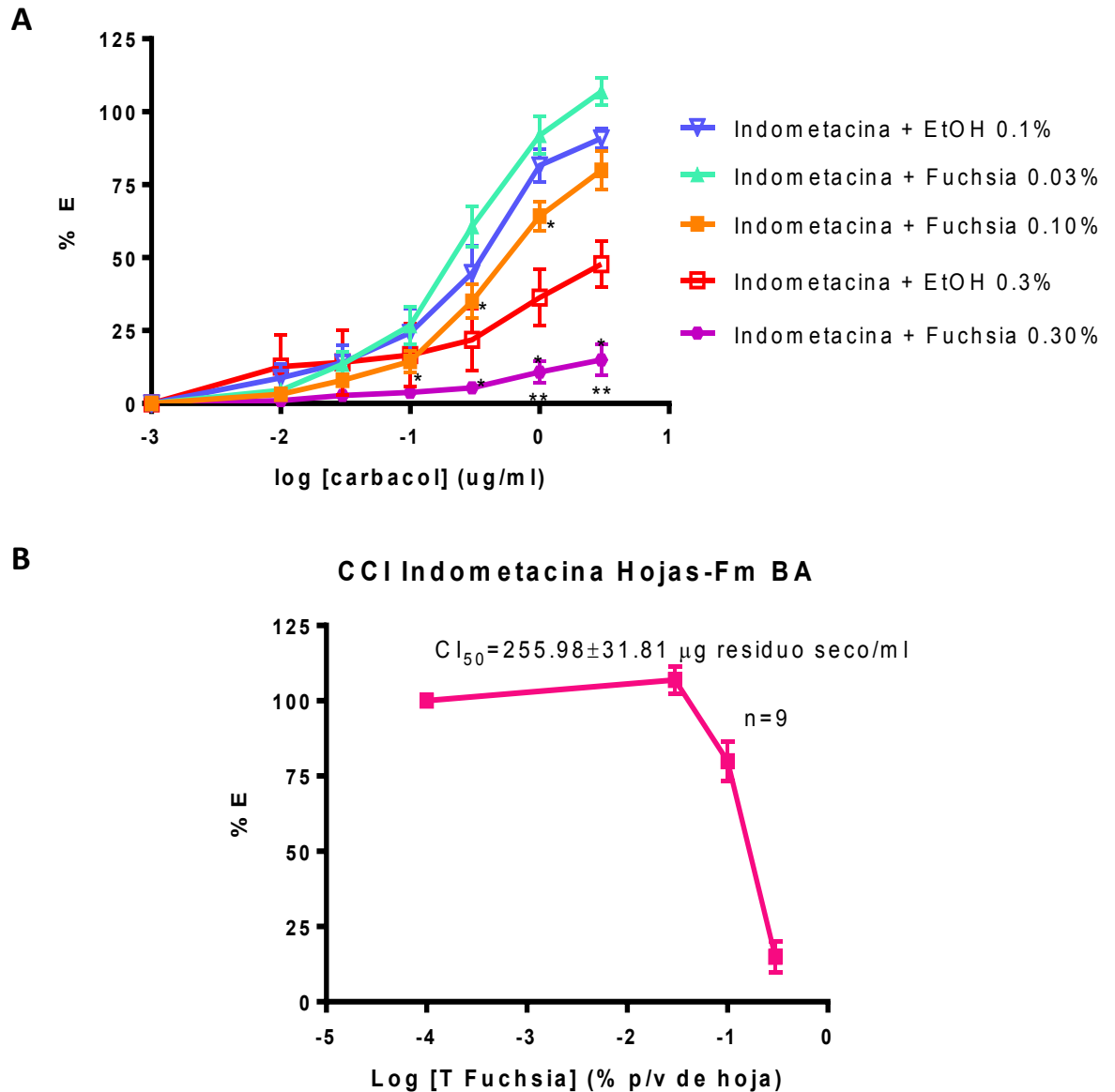


Figura 34. (A) Curvas concentración -respuesta de carbacol, con adición de indometacina (0.1 $\mu\text{mol/mL}$), en ausencia y presencia de varias concentraciones (en % sobre el volumen en la cuba) de tintura de hojas Fm-BA. **(B)** Cálculo de la CI_{50} ($n=9$) de $255.98 \pm 31.81 \mu\text{g residuo seco/mL}$ a partir de los efectos a la máxima [Cb]. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=46.95$, $p<0.0001$, por log [Cb]: $F=113.8$ $p<0.0001$. Post-tests: * $p<0.05$ vs control ** $p<0.05$ vs vehículo respectivo a la dosis.

Para evaluar si el efecto inhibitorio está mediado por liberación de prostaglandinas se hicieron las CCR en presencia del inhibidor de su síntesis por la

ciclooxigenasa (COX1 y COX2), indometacina 0.1 $\mu\text{mol/mL}$. No se modificó la inhibición no competitiva, ni la CI_{50} (Fig. 34).

5.3.1.2.4. *Efectos de F.m-BA en las CCR de carbacol con TEA en ratas tratadas con β -estradiol*

Para evaluar si las tinturas de Fm actúan promoviendo la activación de los canales de K^+ dependientes del voltaje (Kv) se evaluaron sus efectos en presencia del bloqueador de canales de K^+ , tetraetilamonio (TEA) 10 mM, sobre la CCR de carbacol. Previamente se trataron las ratas con β -estradiol para asegurar que los úteros se encuentren en estado de estro.

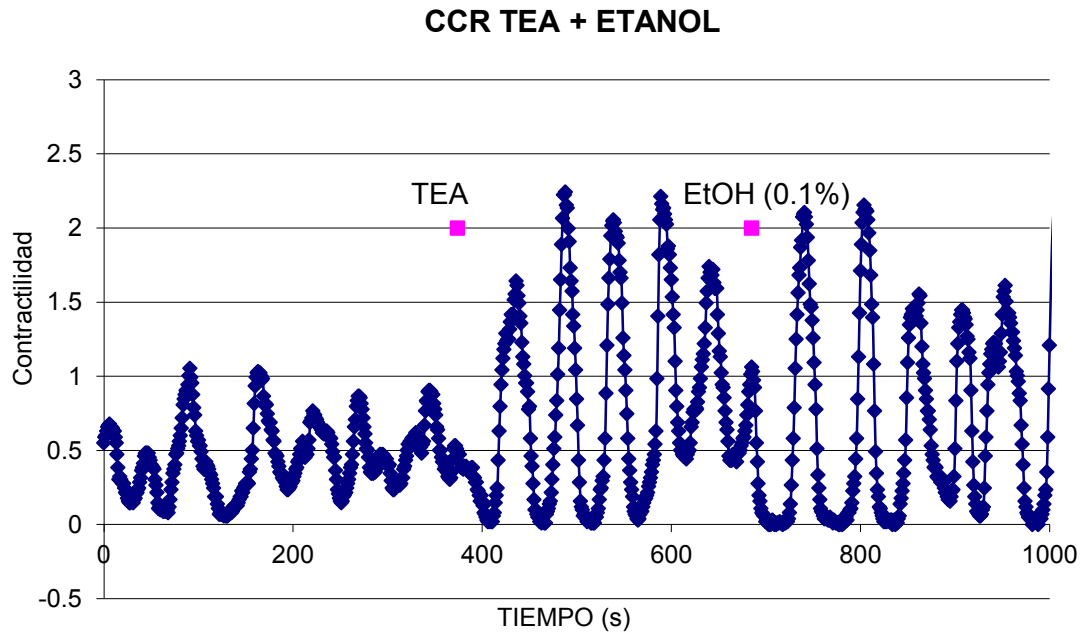


Figura 35. Efectos de TEA en el registro de ondas uterinas, previo al control del vehículo.

Se encontró que TEA provocó un aumento de la amplitud de las ondas contráctiles o fásicas uterinas (Fig. 35). La tintura de F.m-BA redujo el Emax especialmente a altas concentraciones del agonista (antagonismo no competitivo del carbacol) (Fig. 36A), sin embargo, indujo la reducción de la CI_{50} de la tintura de hojas Fm-BA a $28.77 \pm 4.76 \mu\text{g}$ de residuo seco/mL (Fig. 36B).

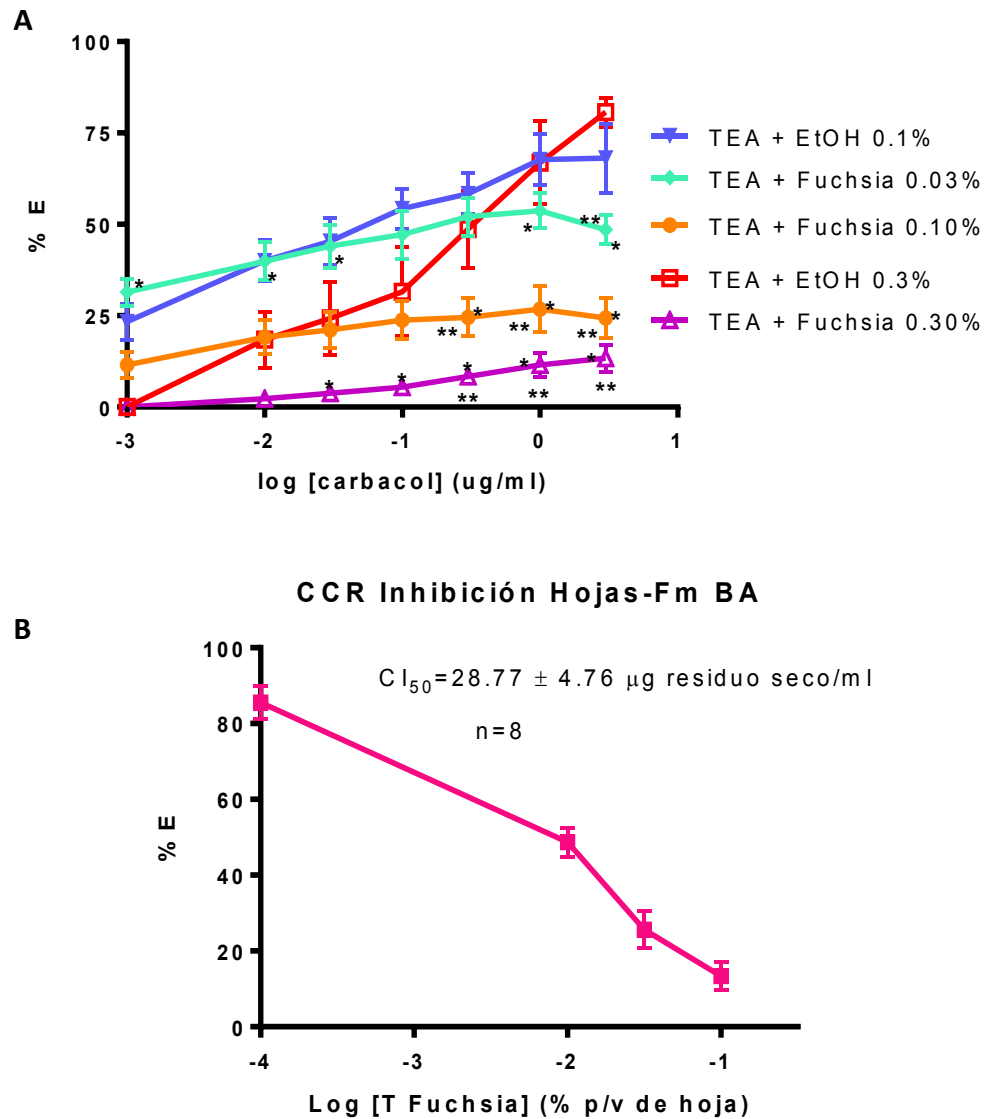


Figura 36. (A) Curva concentración -respuesta de carbacol, con adición de TEA 10 mM, en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de hojas Fm-BA (en % P/V de droga seca sobre el volumen en la cuba). **(B)** Cálculo de la CI_{50} (n=8) de $28.77 \pm 4.76 \mu\text{g}$ residuo seco/mL. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=77.9$, $p<0.0001$, por $\log[\text{Cbl}]$: $F=22.8$ $p<0.0001$. Post- tests: * $p<0.05$ vs control ** $p<0.05$ vs vehículo + TEA respectivo a la dosis.

5.3.1.2.5. Efectos de F.m.-BA en las CCR de serotonina en ratas tratadas con β -estradiol

Para evaluar si las tinturas de F.m. alteran la acción de otro agonista en útero se evaluó el efecto de la tintura de F.m.-BA sobre CCR de serotonina, habiendo tratado previamente a la rata con β -estradiol para asegurar que los úteros se encuentren en estado de estro (Fig. 37 A).

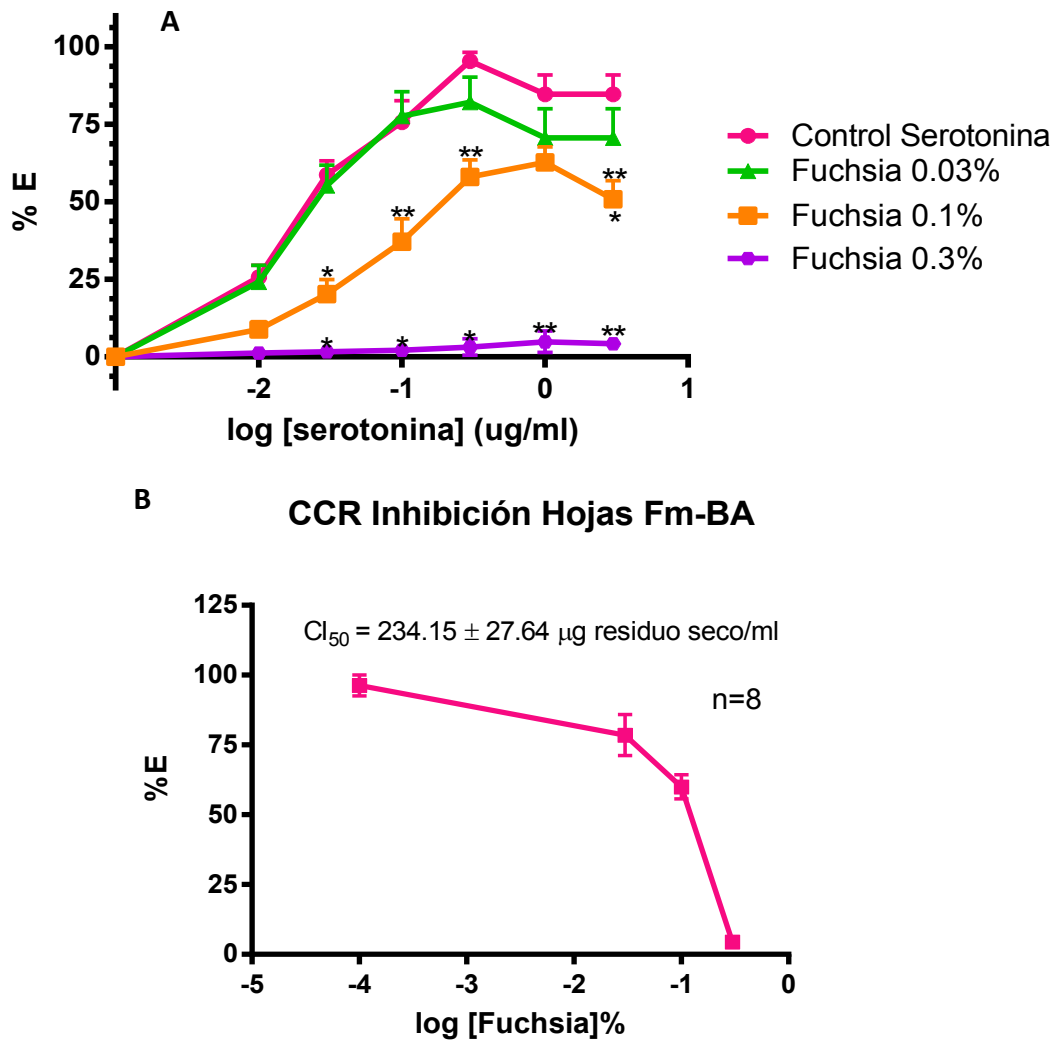


Figura 37. (A) CCR de serotonina, en ausencia y presencia de varias concentraciones de tintura de hojas Fm-BA (en % P/V de droga seca sobre el volumen en la cuba). **(B)** Cálculo de la CI_{50} ($n=8$) de $234.15 \pm 27.64 \mu\text{g residuo seco/mL}$ a partir de los efectos a $0.3 \mu\text{carbacol}$. En A: ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F=80.48$, $p<0.0001$, por log [5-HT]: $F=187.8$ $p<0.0001$. Post-tests: * $p<0.05$ vs control ** $p<0.05$ vs vehículo respectivo a la dosis.

Las Hojas Fm-BA inhibieron de forma no-competitiva la CCR de 5-HT a las concentraciones de 0.1 y 0.3% droga en la cuba, siendo NS a la menor concentración de 0.03%P/V. La concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) fue de 234.15 ± 27.64 µg residuo seco/mL (Fig. 37B).

5.3.2. Evaluación *in vivo* de las tinturas en el tránsito intestinal (TI)

5.3.2.1. Tránsito intestinal normal

Inicialmente se evaluaron los efectos de las tinturas de hojas de Fucsia en el tránsito normal, no estimulado, según el método de Gorzalczany *et al.* (2001). En la figura 38 se presentan los efectos de las tinturas de hojas de Fm sobre el tránsito intestinal. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las tinturas, los vehículos y testigos.

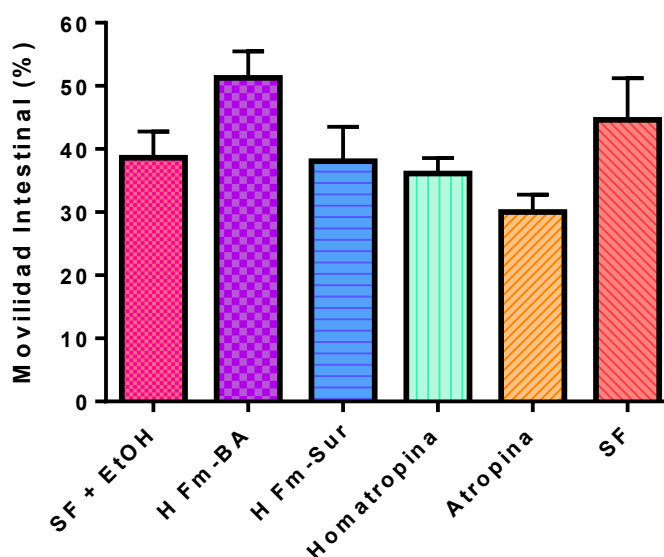


Figura 38. Resultados de los ensayos de tránsito intestinal normal, representados como porcentaje del recorrido intestinal total. SF + EtOH (vehículo): etanol de 70° diluido 1:3 con solución fisiológica (n=8). SF (vehículo): solución fisiológica (n=3). Atropina (testigo): 3 mg/kg (n=8). Homatropina (testigo): 12 mg/kg (n=6). H Fm-BA: dilución 1:3 del extracto etanólico de hojas con solución fisiológica (41.7 mg/kg) (n=8). H Fm-Sur: dilución 1:3 del extracto etanólico de hojas con solución fisiológica (32.7 mg/kg) n=8. ANOVA de 1 vía: p=0.1035, NS.

5.3.2.2. Tránsito intestinal estimulado

Cuando se realizó un modelo de estimulación del tránsito intestinal con el laxante osmótico polietilenglicol 3350, y se empleó como testigo una dosis mayor de atropina (5 mg/kg) según otro método (Cottart *et al.* 2007), se obtuvo significativa inhibición por este control positivo, lo cual validó al modelo.

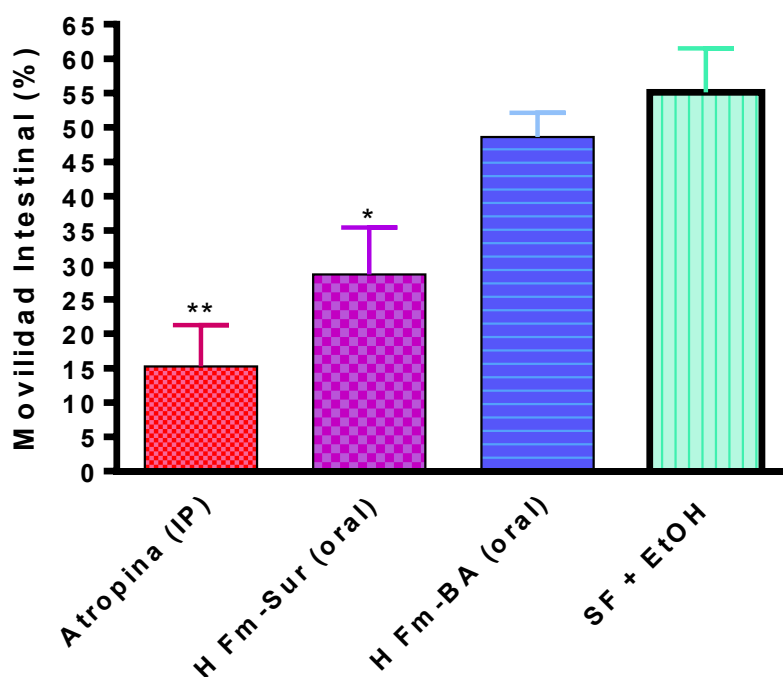


Figura 39. Resultados de los ensayos de tránsito intestinal estimulado, representados en el porcentaje de la movilidad intestinal. SF + EtOH (vehículo): etanol de 70° diluido al 75% con solución fisiológica n=6. Atropina (testigo): 5 mg/kg (n=8). H Fm-BA: dilución al 50% del extracto de hojas etanólico con solución fisiológica (62.5 mg residuo/kg) (n=7). H Fm-Sur: dilución al 75% del extracto etanólico de hojas con solución fisiológica (73.5 mg residuo/kg) (n=8). ANOVA de 1 vía: $F = 9.389$, $p = 0.0002$, Post-tests: $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ vs vehículo.

La Fig. 39 muestra estos resultados, y que la tintura de FM-Sur a la dosis de 73.5 mg/kg redujo significativamente el tránsito intestinal, similarmente a la dada por el testigo atropina. La tintura de Fm-BA no dio diferencias significativas frente al vehículo, al menos en dosis de 62.5 mg/kg.

5.3.3. Efectos de las tinturas en pruebas de comportamiento

Para explorar los posibles efectos ansiolíticos de la planta se realizaron las pruebas de laberinto en cruz elevado y de campo abierto en ratones.

5.3.3.1. Efectos de F.m. en el Laberinto en cruz elevado (LCE)

En la figura 40 se presentan los efectos en el ensayo de LCE de las diferentes tinturas de F.m. y su respectivo vehículo de etanol de 70° diluido 1:3 con solución fisiológica. Los extractos diluidos 1:3 se administraron en dosis de: Hojas Fm-BA: 41.7 mg/kg; Hojas Fm-Sur: 32.7 mg/kg; Flores Fm-BA: 21.8 mg/kg y Flores Fm-Sur: 18.4 mg/kg.). También se evaluaron las mismas tinturas en dilución 1:10 (que equivalen respectivamente a dosis de: 12.5; 9.8; 6.5 y 5.5 mg/kg). Para todos los tratamientos prevalece la preferencia de los ratones por estar en las ramas cerradas, por lo cual el cociente de tiempo entre ramas abiertas / cerradas da menor que 1 en general.

Puesto que los efectos parecen más acentuados a los 60 minutos de tratamiento, en principio se compararon los efectos de todos los tratamientos a este tiempo (Fig. 40). Se encontró diferencia significativa entre los grupos tratados con vehículo de solución fisiológica y con diazepam en las relaciones de permanencia en las ramas, pero no en el número de entradas en las ramas

Además, se evaluó la evolución temporal de las respuestas entre 30 y 150 minutos, analizando la posible correlación lineal entre el cociente de tiempo de permanencia en ramas abiertas/cerradas y el tiempo del ensayo. Esta correlación no fue significativa en general. Por lo tanto, los valores obtenidos en las sucesivas mediciones entre 30 y 150 minutos fueron promediados para cada grupo. La comparación múltiple de estos valores promedio arrojó diferencias significativas por ANOVA, pudiéndose apreciar que las tinturas (1:10) de hojas de ambas F.m. y la tintura de flores de Fm-Sur son las que más reducen la permanencia en ramas abiertas (Fig. 41). Esto podría sugerir ansiogénesis, o deberse a una acción sedante, lo cual se

exploró en el método del campo abierto.

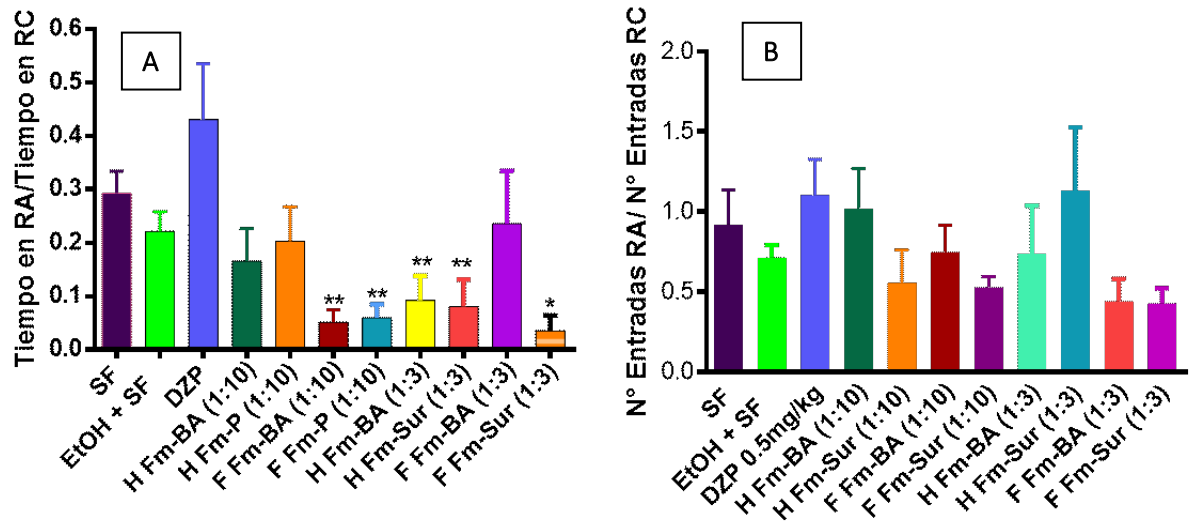


Figura 40. Parámetros conductuales establecidos en el LCE a los 60 minutos de haber sido inyectados vía intraperitoneal con las tinturas de flores y hojas de Fm-BA y de Fm-Sur. SF (control negativo): Solución fisiológica (n=11): EtOH+SF (vehículo): etanol de 70° diluido 1:3 en SF (n=9). DZP (testigo): Diazepam 0.5 mg/kg en SF (n=9). H Fm-BA (1:10): dilución 1:10 del extracto etanólico de hojas Fm-BA en SF (12.5 mg/kg, n=9). H Fm-Sur (1:10): dilución 1:10 del extracto etanólico de hojas Fm-Sur con solución fisiológica (9.8 mg/kg, n=9). F Fm-BA (1:10): dilución 1:10 del extracto etanólico de flores de Fm-BA con solución fisiológica (6.5 mg/kg, n=6). F Fm-Sur (1:10): dilución 1:10 del extracto etanólico de flores Fm-Sur con solución fisiológica (5.5 mg/kg, n=6). H Fm-BA (1:3): dilución 1:3 del extracto de hojas Fm-BA (41.7 mg/kg, n=9). H Fm-Sur (1:3): dilución 1:3 del extracto de hojas Fm-Sur (32.7 mg/kg, n=9). F Fm-BA (1:3): dilución 1:3 del extracto de flores Fm-BA (21.8 mg/kg, n=6). F Fm-Sur (1:3): dilución 1:3 del extracto de flores Fm-Sur (18.4 mg/kg, n=6). **(A)** Relación del tiempo en que los ratones estuvieron en las ramas abiertas (RA) con respecto al que estuvieron en las ramas cerradas (RC). ANOVA 1 vía; tratamiento: F= 4.593, p<0.0001, post-tests: *p<0.05 vs SF Y DZP **p<0.05 vs DZP. **(B)** Relación del número de entradas a las RA con respecto al número de entradas a las RC. ANOVA 1 vía; tratamiento: F= 1.328, p<0.2325, post-tests: NS.

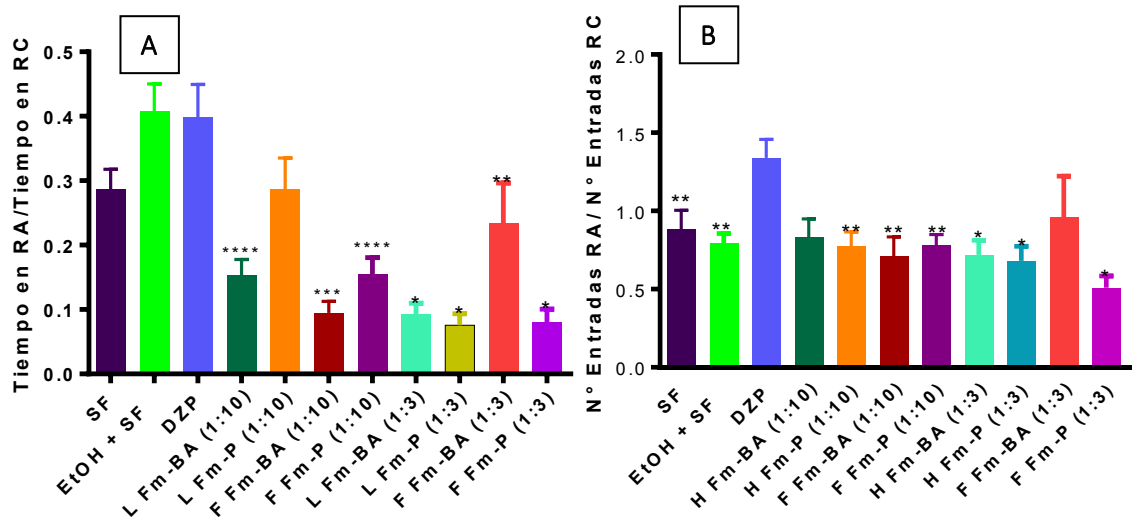


Figura 41. Parámetros conductuales establecidos en el LCE, como promedio de los valores obtenidos entre los 30 y 150 minutos posteriores a ser inyectados por vía intraperitoneal con las tinturas de flores y hojas de Fm-BA y de Fm-Sur. SF (control negativo): Solución fisiológica (n=11): EtOH+SF (vehículo): etanol de 70° diluido 1:3 en SF (n=9). DZP (testigo): Diazepam 0.5 mg/kg en SF (n=9). H Fm-BA (1:10): dilución 1:10 del extracto etanólico de hojas Fm-BA en SF (12.5 mg/kg, n=9). H Fm-Sur (1:10): dilución 1:10 del extracto etanólico de hojas Fm-Sur con solución fisiológica (9.8 mg/kg, n=9). F Fm-BA (1:10): dilución 1:10 del extracto etanólico de flores de Fm-BA con solución fisiológica (6.5 mg/kg, n=6). F Fm-Sur (1:10): dilución 1:10 del extracto etanólico de flores Fm-Sur con solución fisiológica (5.5 mg/kg, n=6). H Fm-BA (1:3): dilución 1:3 del extracto de hojas Fm-BA (41.7 mg/kg, n=9). H Fm-Sur (1:3): dilución 1:3 del extracto de hojas Fm-Sur (32.7 mg/kg, n=9). F Fm-BA (1:3): dilución 1:3 del extracto de flores Fm-BA (21.8 mg/kg, n=6). F Fm-Sur (1:3): dilución 1:3 del extracto de flores Fm-Sur (18.4 mg/kg, n=6). **(A)** Relación del tiempo en que los ratones estuvieron en las ramas abiertas (RA) con respecto al que estuvieron en las ramas cerradas (RC). ANOVA 1 vía; tratamiento: F= 11.57, p<0.0001, post-tests: *P<0.01 vs DZP, P<0.01 vs EtOH and P<0.05 vs SF, ** P<0.05 vs EtOH, ***P<0.01 vs DZP and EtOH, P<0.05 vs SF, ****P<0.01 vs EtOH, P<0.05 vs DZP. **(B)** Relación del número de entradas a las RA con respecto al número de entradas a las RC. ANOVA 1 vía; tratamiento: F= 3.882, p<0.0002. Post-tests: *P<0.01 vs DZP **P<0.05 vs DZP.

5.3.3.2. Efectos de F.m. en la prueba del Campo Abierto (CA)

Este ensayo permite evaluar los efectos en la actividad espontánea de los ratones, locomoción y exploración. En la figura 41 se presentan los efectos de las tinturas de hojas de F.m. a una dilución 1:3, y de su respectivo vehículo de etanol de 70° diluido 1:3, ambos con solución fisiológica. Las dosis evaluadas fueron las siguientes: Hojas Fm-BA: 41.7 mg/kg; Hojas Fm-Sur: 32.7 mg/kg, con solución fisiológica como vehículo, en el ensayo de CA. Todos los grupos presentaron una disminución en la locomoción y la exploración espontánea a medida que transcurre el tiempo, lo cual corresponde al mayor interés del animal al ingresar al campo. El grupo tratado con el vehículo etanólico y el de DZP aumentaron la locomoción y la exploración espontáneas al inicio del test respecto al grupo de SF, demostrando la actividad estimulante del etanol y ansiolítica del DZP a 0.5 mg/kg. Las tinturas de las hojas de Fm-BA y Fm-Sur redujeron las actividades espontáneas respecto del grupo control negativo tratado con el vehículo etanólico, en los primeros 30 a 60 minutos de la prueba.

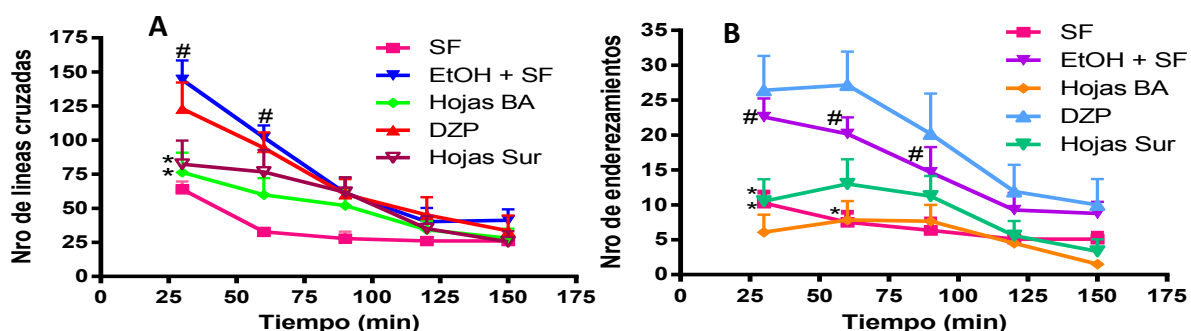


Figura 42. Resultados en el campo abierto de ratones inyectados vía ip con las tinturas de hojas de Fm-BA y de Fm-Sur. SF (control negativo): Solución fisiológica. EtOH + SF (vehículo): etanol de 70° diluido 1:3 con SF. DZP (testigo): Diazepam 0.5mg/kg. H Fm-BA: dilución 1:3 del extracto etanólico de hojas de Fm-BA (41.7 mg/kg). H Fm-Sur: dilución 1:3 del extracto etanólico de hojas de Fm-Sur (32.7 mg/kg) (todos con n=12). **(A)** Locomoción medida como número de líneas cruzadas en 5 minutos. ANOVA 2 vías; tratamiento: $F= 12.08$, $p<0.0001$. **(B)** Exploración medida como número de enderezamientos en 5 minutos. ANOVA 2 vías; tratamiento: $F= 19.93$, $p<0.0001$. Post-tests: * $p<0.05$ vs SF. # $p<0.05$ vs EtOH + SF.

6. DISCUSIÓN

6.1. Análisis Botánico

6.1.1. Caracteres anatómicos

En este trabajo se presenta por primera vez la descripción anatómica de la lámina, peciolo y tallo tierno de *Fuchsia magellanica*, al igual que sus magnitudes proporcionales (índice estomático e índice de empalizada).

6.1.1.1. Arquitectura foliar

El sistema vascular descrito siguiendo la terminología de Hickey (1974) se corresponde con el descrito por Keating (1982) para otras especies del género *Fuchsia*, que también es característico de otras especies de la familia Onagraceae (Keating, 1982).

6.1.1.2. Epidermis

Se encontraron estomas de tipo anomocítico en el envés, como es característico del género *Fuchsia*, el cual junto con *Hauya*, son los únicos dos géneros de la familia *Onagraceae* que no tienen estomas en ambas caras de la epidermis (Keating, 1982). Los estomas se hallan a nivel superficial o ligeramente cubiertos.

6.1.1.3. Tricomas

La presencia y descripción de los tricomas es una característica de valor taxonómico (Metcalf, 1979), a lo que Oliveira *et al.* (1993) añade dándole importancia en el diagnóstico de las drogas vegetales, para permitir su identificación especialmente cuando éstas se presentan fragmentadas o pulverizadas. En este trabajo se han encontrado tricomas simples eglandulares en el peciolo y el tallo. Estos tricomas unicelulares con base expandida son típicos de la familia Onagraceae (Keating, 1982).

Se observaron tricomas tanto en el haz, como en el envés de la lámina, resultando en un haz glabrescente, mientras que el envés es pubescente.

6.1.1.4. Mesófilo

Se ha encontrado un mesófilo dorsiventral claramente diferenciado, característico del género *Fuchsia*, que también coincide con lo reportado para otros géneros de esta familia. La forma plano-convexa de la vena media y la disposición del sistema vascular ha sido mencionada por Keating (1982) para otras especies del género. Al igual que la presencia de rafidios y glóbulos lipídicos coinciden con los reportados para otras especies del género (Keating, 1982). Es de resaltar que estas observaciones también son consideradas como caracteres de identificación importantes en la preparación de productos fitoterapéuticos.

6.1.1.5. Cristales

Se observó en la lámina, el peciolo y el tallo una gran cantidad de rafidios envueltos en sacos mucilaginosos, orientados al azar. Éstos parecen ser una característica del género, y de otros géneros de la familia (Keating, 1982).

6.1.1.6. Índices

Los índices observados constituyen una herramienta que complementa el estudio de los parámetros cualitativos y pueden ser de utilidad para el control de calidad de materia prima para elaboración de productos fitoterápicos (Albretch et al., 2005). Además han mostrado ser caracteres estables, en especial el índice de empalizada y los resultados muestran que éste es un carácter diagnóstico de interés, concordando con las observaciones de Zorning & Weiss (1925) y más recientemente Spegazzini (1999), Gatelli (2005) y Colares & Arambarri (2008).

6.1.1.7. Pecíolo

En esta especie se destaca la presencia de rafidios en la corteza y de una vaina amilífera que rodea el tejido vascular.

6.1.1.8. Tallo

El tallo de *F. magellanica* muestra en su etapa más tierna una vaina amilífera que desaparece en el momento en que se empieza a originar el cambium suberógeno, dando paso a un súber de origen interno que desplaza la corteza primaria. El cilindro vascular con floema externo e interno estuvo presente en todas las etapas observadas.

6.1.2. Análisis histoquímico

Gracias al análisis histoquímico realizado se confirmó la naturaleza mucilaginoso de las células contenedoras de los rafidios y se confirmó la presencia de la vaina amilífera en el peciolo y tallo. Además, permitió la identificación de la naturaleza de los glóbulos presentes en las hojas como lipídica.

6.2. Ensayos Fitoquímicos

Los ensayos fitoquímicos son de gran importancia ya que permiten conocer los compuestos presentes en la planta, y acorde a esto visualizar cuales son los compuestos que pueden estar involucrados en las actividades farmacológicas encontradas. Estos ensayos se iniciaron con pruebas químicas que orientan hacia los grupos de compuestos presentes en las hojas y flores de la planta. Luego se continuó con análisis cromatográficos enfocados en estos grupos, lo cual permite conocer los compuestos mayoritarios presentes.

6.2.1. Pruebas químicas orientativas

Las pruebas químicas orientativas se centran en los principales grupos de compuestos, flavonoides, terpenoides y alcaloides. *F. magellanica* fue reportada por Adersen *et al* (2012) como negativa para alcaloides y cumarinas, por lo que este trabajo se enfocó en la búsqueda de flavonoides y terpenoides.

Las reacciones de caracterización con reactivos de Shinoda y soluciones

alcohólicas al 2% de NaOH, BO_3H_3 , Cl_3Fe y Cl_3Al hace pensar que existe la presencia de flavonoides, de baja solubilidad en hexano y solubles en acetato de etilo y agua. El hecho de que esta serie de ensayos fuera positivo en los extractos de acetato de etilo y acuoso, estaría indicando que los compuestos de naturaleza flavonoide se hallan predominantemente bajo la forma de heterósidos por su naturaleza hidrofílica. La coloración al visible y la fluorescencia al UV366, se corresponden con lo esperado para compuestos del grupo fitoquímico flavonoides (Shinoda) y leucoantocianidinas (Rosenheim), con al menos tres $-\text{OH}$ fenólicos adyacentes (reacciones con Cl_3Al , Cl_3Fe , NaOH).

La reacción de Lieberman-Bouchard mostró la presencia de núcleos esteroideos en los extractos diclorometanólicos tanto de flores como de hojas, pero descartaron la presencia de éstos en el extracto de acetato de etilo. Dentro de estos núcleos terpénicos se encuentran las saponinas, que dieron positivo en las diferentes reacciones de caracterización tanto en flores como en hojas.

6.2.2. Análisis cromatográfico inicial

Las TLC realizadas, reveladas con el reactivo de productos naturales, permite obtener un perfil cromatográfico donde se aprecia la presencia de posibles derivados flavónicos y terpénicos en concordancia con lo observado en las pruebas químicas orientativas.

6.2.2.1. Flavonoides

Aunque en las reacciones de caracterización no se encontró presencia de flavonoides en los extractos hexánicos de hojas y flores, en la segunda fase móvil ensayada para flavonoides se observa una banda que podría corresponder con vitexina en la fracción hexánica de flores. La vitexina ha sido descrita como antiespasmódica intestinal que interfiere con el influjo de Ca^{2+} al músculo liso (Ragone *et al.* 2007).

En los extractos de acetato de etilo y acuosos de hojas y flores se encontraron

flavonoides y leucoantocianidinas. Las antocianinas deben estar en mayor concentración en las flores ya que son las responsables de los colores de las flores y los frutos (Sepúlveda *et al.*, 2004).

La presencia de vitexina en la fracción hexánica y la presencia de ácido clorogénico en las fracciones de acetato de etilo y acuosa de flores requieren estudios posteriores para ser confirmadas. El ácido clorogénico podría darle efecto diurético, hipotensor, estimulante, expectorante, y colerético a la droga vegetal (Del Valle, 2008).

6.2.2.2. *Triterpenos*

La presencia de ácido oleanólico en flores y hojas de *F. magellanica* puede darle actividad cardiotónica a los extractos (Martinez *et al.*, 2008), apoyado en la capacidad de las saponinas, presentes en las flores. Estas también aportan la capacidad de inhibir la absorción de colesterol y de glucosa (Vieira, 2011) lo cual convierte a esta planta en un potencial fitoterápico en enfermedades metabólicas. Es importante resaltar también que se han descrito para el ácido oleanólico varias actividades biológicas como anti-inflamatorio al ser inhibidor de la liberación de histamina, supresión de ciclooxigenasa y lipooxigenasa (Liu, 1995); como cicatrizante en un estudio hecho sobre lesiones gástricas crónicas en ratas (Rodríguez *et al.* 2003); como antitumoral por inducción a la apoptosis (Zhang *et al.* 2007); como hepatoprotector con inhibición de la expresión y actividad del citocromo P450 2E1 (Jeong, 1999); como anti-VIH al inhibir la replicación del virus (Kashiwada *et al.* 1998); como anticariogénico por inhibir la glucosiltransferasa (Liu. 1995); como anti-hipertensivo en un estudio en ratas sensibilizadas al sodio (Somova *et al.* 2003.); y como inmunomodulador por el incremento en el número de células de la médula ósea y leucocitos y el aumento en la producción de anticuerpos, entre otras (Raphael & Kuttan, 2003; Ortiz, 2011).

6.2.2.3. Cromatografía en capa delgada (TLC) enfocada en flavonoides

Los flavonoides son de gran importancia en los estudios fitoquímicos de plantas con uso medicinal debido al amplio rango de actividades biológicas en el hombre. Con este análisis cromatográfico enfocado en este grupo de compuestos se buscaron los componentes mayoritarios de la planta, de manera de correlacionar la composición con el uso etnofarmacológico.

De manera general, se puede decir que los flavonoides presentan dos bandas de absorción al UV: Banda I a λ 300-380 nm que refleja las características del anillo B; y Banda II a 240-280 nm, que refleja las características del anillo A (Fig. 41).

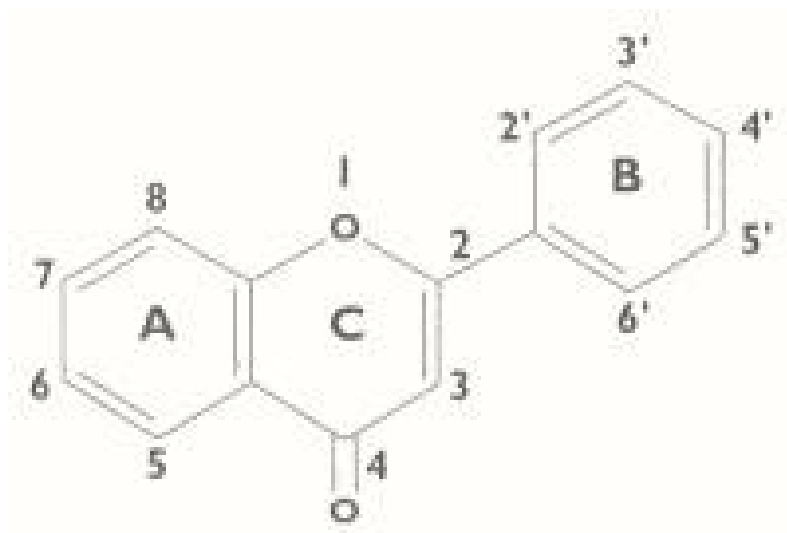


Figura 43. Esquema general de los flavonoides

Dentro de estas regiones, cada subgrupo presenta una zona de absorción particular, dependiendo de su estructura general, patrón de oxigenación y la presencia de distintos sustituyentes. Basados en estas características químicas se pudo determinar cuáles son los compuestos presentes, y de éstos cuáles son los mayoritarios en las hojas de Fm-BA y de Fm-Sur.

El estudio fitoquímico permitió conocer los compuestos mayoritarios presentes en las hojas de la planta estudiada y determinar su contenido, así como permitió

comparar los perfiles cromatográficos de la planta silvestre con la planta naturalizada en La Plata.

Por cromatografía de capa fina, frente a los testigos usados se pudo sospechar la presencia de quercetina, isoquercitrina, quercitrina y canferol. Debido a la baja resolución de los sistemas cromatográficos, para confirmar la presencia de hiperósido e isoquercitrina fue necesario el uso de HPLC.

Los sistemas usados en este estudio de TLC son específicos para flavonoides, permitiendo resolver las diferentes agliconas y sus glucósidos. Se observó quercetina y canferol en la tintura de las hojas provenientes de la Patagonia, pero no se los encontró en las hojas provenientes de La Plata.

6.2.2.4. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC confirman la presencia de quercitrina e hiperósido en la tintura de la planta naturalizada y de quercitrina, hiperósido, quercetina y canferol en la tintura de la planta silvestre. También se observa que las cantidades de estos flavonoides son mayores en la tintura de la planta silvestre.

Se usó un gradiente de solventes que permitió un desarrollo adecuado de la corrida para una buena valoración cuantitativa. Por la columna de fase reversa el orden de elución de los compuestos fue el esperado, donde el canferol y la quercetina por ser aglicones poco polares salieron en tiempos mayores que la quercitrina y el hiperósido, ambos glucósidos de la quercetina.

6.3. Actividad Farmacológica

Los estudios de la actividad farmacológica se hicieron sobre las tinturas etanólicas obtenidas al 10% por maceración, ya que son las empleadas frecuentemente como preparación farmacéutica oficial de plantas medicinales,

pensando en acercarnos al potencial uso de la planta como un fitoterapéutico.

6.3.1. *Actividad gastrointestinal*

6.3.1.1. *Estudios ex vivo*

Las tinturas de hojas y de flores de *F. magellanica* presentaron un efecto antiespasmódico, evidenciado por un antagonismo no-competitivo de la curva concentración-repuesta de carbacol, puesto que redujo el efecto máximo de los agonistas, en modo dependiente de la concentración (Kenakin, 2014). De las tinturas obtenidas inicialmente se observó que la potencia de inhibición de las CCR de carbacol es similar para las hojas y las flores de F.m.-BA, ya que la concentración inhibitoria al 50% de su Emax (CI₅₀) respectivamente fue 256 ± 37.5 µg de residuo seco/mL para la tintura de las hojas y de 373.57 ± 113.54 µg residuo seco/mL para la tintura de las flores. Un comportamiento similar se obtuvo para las hojas de F.m.-Sur (CI₅₀ de 272.85 ± 64.33 µg residuo seco/mL). Sin embargo, la tintura de flores de Fm-Sur saturó la inhibición de la CCR de carbacol en menor grado, por lo que se calculó la concentración inhibitoria de un 25% del efecto máximo, en CI₂₅ = 90.07 ± 24.98 µg residuo seco/mL, no comparable con las anteriores. En conclusión, las tinturas de hojas de Fm-Sur y de Fm-BA resultaron igualmente potentes y efectivas.

Recordemos que la potencia es relativa y se estima comparando las concentraciones de dos fármacos que producen igual efecto, o sea comparando las CI₅₀, por ejemplo. En cambio, la eficacia se estima mediante el máximo grado de efecto (Emax o máxima inhibición), según la droga sea agonista o antagonista (Kenakin, 2014).

El antagonismo no competitivo demuestra que las tinturas no bloquean el receptor muscarínico M1 o M3 al que se une el agonista (en este caso, el extracto no compite con el carbacol, ni éste puede ser desplazado a mayores concentraciones). En cambio, actúa en algún otro punto de la cascada intracelular que se desencadena por la activación del receptor (Kenakin, 1984). Conociendo esto se realizaron otros

protocolos que nos permitieran deducir los posibles sitios de acción.

El antagonismo no-competitivo sugiere un efecto directo del extracto sobre alguno de los mecanismos contráctiles del músculo liso (Goodman & Gilman, 2005), pudiendo actuar en la inhibición del influjo de Ca^{2+} a la célula muscular, o interfiriendo en la activación que éste ejerce sobre el mecanismo de acoplamiento contráctil (ver punto 2.6.2 de la sección Introducción). La evaluación de los efectos de concentraciones crecientes del extracto sobre las curvas concentración- respuesta de Ca^{2+} realizadas en medio despolarizante de alta $[\text{K}^+]_e$ demuestran también un antagonismo no-competitivo sobre el influjo de calcio. Este comportamiento sugiere que el extracto de *Fuchsia magellanica* actuó en un sitio diferente al sitio extracelular de la unión del Ca^{2+} en el canal. Comparando la concentración inhibitoria de las tinturas de ambas plantas frente a las CCR de Ca^{2+} con la exhibida frente a carbacol, no hay una diferencia significativa entre ellas, lo cual indica que el efecto sobre el influjo de Ca^{2+} activado por la despolarización es el mecanismo causante de la inhibición de la contracción del agonista muscarínico carbacol.

Un patrón similar de bloqueo no-competitivo en las CCR de Ca^{2+} fue manifestado por el clásico bloqueante de los canales de Ca^{2+} verapamilo en intestino aislado (Blanco *et al.* 2013). Este comportamiento se explica porque el verapamilo es un bloqueante de los canales de Ca^{2+} en el estado inactivado (Goodman y Gilman, 2011). Verapamilo ingresa a la célula pasivamente a través de la membrana plasmática y bloquea al canal desde el interior celular, por lo cual interacciona con un sitio diferente del sitio externo de unión del Ca^{2+} . Por ello no puede ser desplazado competitivamente por el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ como serían desplazadas las dihidropiridinas, que son bloqueantes que se unen al mismo sitio externo de unión del Ca^{2+} (Spedding 1985; Ishii *et al.* 1985). Estos resultados sugieren que los principios activos antiespasmódicos de las hojas de *Fuchsia magellanica* podrían actuar como antagonistas no-competitivos del canal de Ca^{2+} , similarmente a verapamilo.

Considerando que en las hojas de *Fuchsia magellanica* se encontró la presencia

de flavonoides, y en particular quercetina, es posible pensar que estos compuestos sean en parte responsables de la actividad, ya que se describió que exhiben una actividad bloqueante del influjo de Ca^{2+} al músculo liso (Hammad & Abdalla, 1997; Di Carlo *et al.* 1999; Ko *et al.* 2002).

Sin embargo, también podría participar otro mecanismo que interfiriera con la contracción dependiente del agonista en un sitio diferente al receptor del mismo, ya que manifestaría también un comportamiento no competitivo. Un posible mecanismo podría ser la activación de canales de K^+ , lo cual conduciría a hiperpolarización y reducción del número de canales de Ca^{2+} activados, y por lo tanto del influjo de Ca^{2+} para la contracción. Sin embargo, el hecho de que las tinturas también inhibieron en modo no-competitivo a las CCR de Ca^{2+} que se realizan en medio despolarizante de 40 mM K^+ permite descartar esta hipótesis, ya que en ese medio con reducido gradiente no ocurre el eflujo de K^+ , aun cuando se activen los canales (Quast, 1993).

Otro posible mecanismo causante del antagonismo no-competitivo frente a carbacol que se evaluó en las tinturas fue la estimulación de la producción de óxido nítrico. El NO contribuye a relajar al músculo liso por estimular a la guanilato-ciclasa a producir GMP_c , y éste activa a la PKG, la cual actúa sobre varios transportadores celulares para incrementar el eflujo de Ca^{2+} (Kamanyi *et al.* 2003). Con la adición del bloqueante de la NO-sintasa (L-NAME) se evaluó si en el efecto antiespasmódico está involucrada la vía del óxido nítrico. Las CCR de carbacol mostraron que 30 $\mu\text{mol/L}$ L-NAME no modificaba el antagonismo no competitivo de las tinturas, y se mantenía una CI_{50} ligeramente menor que en su ausencia en el caso de las hojas de Fm-BA ($149 \pm 36 \mu\text{g residuo seco/mL}$), y NS diferente del obtenido en su ausencia para las hojas de Fm-Sur ($313 \pm 39 \mu\text{g residuo seco/mL}$). Dado que si participa el NO en la inhibición no-competitiva L-NAME hubiera debido aumentar la CI_{50} , estos resultados permiten descartar a la producción del óxido nítrico como mecanismo de acción inhibitorio de las tinturas.

6.3.1.2. Estudios *in vivo* en el tránsito intestinal

Para evaluar si los efectos antiespasmódicos intestinales encontrados en métodos *ex vivo* se manifiestan *in vivo* se estudiaron las tinturas en el método de medición del tránsito intestinal en ratones. Inicialmente, se evaluaron los efectos en el tránsito normal, empleando como testigo o control positivo a la atropina en dosis de 3 mg/kg, según describieron otros autores (Gorzalczany *et al.* 2001; Berardi, 2012). Sin embargo, en este test no se observó una diferencia significativa entre las tinturas y los controles de vehículo, aunque tampoco se encontró la reducción esperada en el tránsito intestinal por controles positivos como atropina u homatropina, probablemente debido a que la dispersión en los datos enmascararía un bajo efecto. Fue necesario entonces modificar las dosis y las condiciones del tránsito intestinal, realizándose una estimulación del mismo por la administración de un laxante osmótico, el polietilenglicol 3350, el cual había sido empleado al 6% para estimular el tránsito intestinal en ratones bajo un modelo de fibrosis quística (Cottart *et al.* 2007). Esta intervención laxante logró incrementar la distancia recorrida por el marcador de carbón en ratones desde el 40% al 55% de la longitud total intestinal. A su vez permitió evidenciar la inhibición del tránsito intestinal desde alrededor del 55% a un 15% de la longitud total intestinal por el control positivo empleado, el antagonista muscarínico atropina a la dosis de 5 mg/kg (Fig. 39).

Con este modelo sensible a los efectos inhibitorios se logró demostrar que la tintura de las hojas de Fm-Sur a la dosis de 73.5 mg residuo/Kg inhibió en forma significativa el tránsito del marcador desde el 55% a alrededor de un 30% de la longitud intestinal. Por otra parte, la tintura de hojas de Fm-BA a la dosis de 62.5 mg residuo/Kg se manifestó menos inhibitoria, no resultando significativamente reducido el grado de avance del contenido intestinal. Puesto que en las pruebas *ex vivo* ambas tinturas resultaron antiespasmódicas equipolentes, es posible suponer que el menor efecto *in vivo* de la tintura de hojas de Fm-BA se debería a la menor dosis ensayada.

6.3.2. Actividad uterina

La principal actividad etnobotánica reportada para *F. magellanica* es a nivel gineco-obstétrico en la comunidad mapuche argentino-chilena (Estomba *et al.* 2006). Por ello, en esta Tesis se evaluó la efectividad de las tinturas en útero aislado de rata. Este preparado posee una actividad espontánea de alta amplitud contráctil, la cual se reduce con el medio de Jalon que posee baja $[Ca^{2+}]$ y nada de Mg^{2+} , y por el pretratamiento de las ratas con estradiol a fin de generar el estro (Kasapović *et al.* 2001). En cuanto a los efectos de agonistas, la oxitocina y la prostaglandina $PGF2\alpha$ son los agentes oxitócicos naturales encargados de desencadenar el parto, mientras acetilcolina (Ach) y serotonina (5-HT) ejercen un rol modulador menor en condiciones no gestantes (Darios *et al.* 2012). Por esto, en el útero aislado no gestante de rata se evaluaron las CCR del agonista muscarínico carbacol y de 5-HT, los cuales activan respectivamente receptores M1 y M3 (para Ach), y 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} (para 5-HT). Todos estos receptores están acoplados a proteína Gq cuya cascada de señalización activa canales de Ca^{2+} tipo L, con lo cual se dispara la contracción (ver punto 2.6.2 y Fig. 5 de Introducción).

En este preparado, las CCR de carbacol obtenidas en presencia de las tinturas de hojas de F.m-BA y de F.m-Sur validan este uso etnobotánico como antiespasmódico uterino, puesto que las tinturas se comportaron como antagonistas no-competitivos. Aunque las dos tinturas disminuyeron el E_{max} hasta alrededor del 25%, la tintura de las hojas de F.m-BA fue significativamente más potente, puesto que tuvo un CI_{50} de 175 μg residuo seco/mL, mientras las hojas Fm-Sur produjeron un CI_{50} de 470 μg residuo seco/mL. Con estos resultados se hicieron algunos protocolos para dilucidar el mecanismo de acción de la tintura de las hojas F.m-BA.

Por el antagonismo no-competitivo frente al agonista carbacol, se pensó que podría estimular la liberación de algunas prostaglandinas, autacoides que se generan fácilmente en el útero. En este tejido algunas prostaglandinas como la $PGF2\alpha$ son disparadores de la contracción uterina por activar las corrientes de Ca^{2+} tipo L en útero

gestante. En cambio, otras son inhibidoras de la contractilidad (PGE₂, PGI₂ y 6-ceto-PGF_{1α}) porque estimulan los receptores relajantes de prostanoideos denominados EP₂ y EP₄ (para PGE₂) e IP (para PGI₂), todos los cuales incrementan la producción de AMPc celular vía proteína Gs, conduciendo a la relajación del músculo liso (ver punto 2.6.1 de la Introducción de esta Tesis). Para evaluar esta hipótesis se añadió indometacina a la cuba (inhibidor de la enzima ciclo-oxigenasa o COX, que cataliza la síntesis de prostaglandinas) previo a la CCR de carbacol en ausencia y presencia de la tintura. La adición de indometacina inhibió el Emax de la curva control en alrededor de un 20%, lo cual sugiere que carbacol podría liberar una pequeña cantidad de PGF_{2α} que contribuye a la contracción. Por otra parte, indometacina no modificó la inhibición no competitiva de la tintura de las hojas de Fm-BA, pero aumentó la CI₅₀ desde un promedio de 175 a 342 µg residuo seco/mL. Esta reducción a la mitad en la potencia de la tintura de las hojas F.m-BA sugiere que el efecto inhibitorio de la misma podría estar en parte desencadenado por una estimulación de la síntesis de prostaglandinas relajantes por la COX. Cabe aclarar que el mecanismo contráctil del carbacol es común a intestino y útero, por lo cual el efecto inhibitorio sobre el influjo de Ca²⁺ encontrado en intestino se debe manifestar también en útero, explicando una parte importante de la acción antiespasmódica de las tinturas.

También se evaluó si la inhibición no-competitiva de las tinturas sobre la CCR de carbacol en útero está dada por la activación de canales de K⁺ dependientes del voltaje (Kv). Para esto, se realizaron las CCR de carbacol en ausencia y presencia de TEA 10 mM (bloqueador no selectivo de Kv y KCa). Se eligió esta concentración de TEA porque sólo potencia las contracciones fásicas en este preparado, evitando la contractura tónica propia de la concentración de 40 mM TEA en intestino (Consolini *et al.* 2011). Como se explicó en la Introducción (punto 2.6.3), la actividad rítmica del útero implica la activación secuencial de canales para el influjo de Ca²⁺ (fase contráctil) y canales de K⁺ (fase de relajación) (Aaronson *et al.* 2006). La inhibición de varios tipos de canales de K⁺ con TEA 40 mM origina un aumento del tono basal, mientras que la inhibición más selectiva de los canales Kv a 10 mM aumentó la amplitud contráctil rítmica (Fig. 35). Esto demuestra que estos canales Kv tienen mayor participación en la

fase de relajación que en el tono basal. Por otra parte, en las CCR de carbacol el bloqueo de los canales Kv por TEA 10 mM no redujo la inhibición no-competitiva de la tintura de hojas de F.m.-BA. Por el contrario, TEA synergizó la tocólisis a altas concentraciones de carbacol (Fig. 36A). Este synergismo se evidencia en la reducción de la CI_{50} de la tintura de hojas de Fm-BA desde 191.6 a 90.48 μg de residuo seco/mL (Fig. 36B). Si bien TEA potenció la amplitud de las ondas a bajas concentraciones de carbacol, simulando un dualismo entre ellos, esta fue inhibida por las tinturas.

La potenciación de las ondas contráctiles rítmicas por TEA facilitó la inhibición típica de la tintura de hojas de F.m.-BA ya observada en intestino y, según lo ya discutido, relacionada a la inhibición del influjo de Ca^{2+} . Es lógico pensar que cuando se bloquean los canales Kv ocurre una despolarización que activa mayor número de canales de Ca^{2+} . En consecuencia, será más notorio el bloqueo no competitivo de los mismos, por lo que se synergiza la inhibición a altas concentraciones de carbacol y se reduce la CI_{50} de la tintura de hojas de F.m.-BA. Efectos inhibitorios del influjo de Ca^{2+} han sido encontrados en varias plantas ricas en flavonoides (Wang *et al.* 2014; Owolabi *et al.* 2014; Mendel *et al.* 2016).

Ichida *et al.* (1983) determinaron que la administración de estradiol aumenta los sitios de unión específicos de 5-HT en el útero, por lo que se evaluaron los efectos de las tinturas en las CCR de este agonista en ratas previamente tratadas con estradiol. Las hojas de F.m-BA produjeron una inhibición no competitiva de las CCR de 5-HT, inhibiendo completamente la CCR para la concentración de 0.3% p/v. La CI_{50} fue de $234 \pm 28 \mu\text{g}$ residuo seco/mL, la cual es NS diferente de la producida en útero frente al agonista carbacol ($175 \pm 38 \mu\text{g}$ residuo seco/mL). Esta similitud de los efectos sobre 5-HT con los producidos en útero frente al carbacol sugiere que el mecanismo inhibitorio de la tintura de F.m. es el mismo frente a ambos agonistas. Considerando los mecanismos detectados previamente en el intestino aislado, los efectos producidos en útero por la tintura de F.m-BA son compatibles con la inhibición no-competitiva del

influjo de Ca^{2+} , ya que ambos agonistas carbacol y 5-HT activan a los canales de Ca^{2+} tipo L para generar contracción. Esto es compatible con los mecanismos en músculo liso reportados para algunos de los compuestos hallados en esta Tesis para F.m. como los flavonoides quercetina y canferol (Revuelta *et al.*, 1997; Hammad & Abdalla, 1997; Di Carlo *et al.* 1999; Benabdallah & Gharzouli, 2015).

6.3.3. Actividad ansiolítica o sedante

IncurSIONando en una posible actividad biológica sobre el sistema nervioso de las tinturas de *F. magellanica*, se hicieron las pruebas de campo abierto y de laberinto en cruz a fin de establecer su potencial como ansiolítico o como sedante, que pudieran ser responsables de su efectividad o su seguridad como producto fitoterapéutico. La presencia de flavonoides ha sido relacionado con estos efectos en varias plantas medicinales como *Apocynum venetum* Linn, *Rhazya stricta*, *Gingko biloba* y *Siphocampylus verticillatus* (Dovich & Lajolo, 2011; Gautam *et al.* 2013) entre otras.

Para medir la actividad ansiolítica de las tinturas de hojas de F.m-BA y F.m-Sur se hicieron los ensayos de campo abierto y de laberinto en cruz elevado. Estos métodos fueron respectivamente validados mediante patrones conocidos para medir la actividad espontánea y la ansiedad de los ratones en espacios controlados (Bailey & Crawley, 2008; Rejón-Orantes *et al.*, 2011).

En la prueba del laberinto en cruz elevado, se aprecia que todos los grupos prefirieron las ramas cerradas por sobre las abiertas, pero el grupo tratado con diazepam 0.5 mg/kg y el grupo de etanol fueron los que permanecieron más tiempo en ramas abiertas, demostrando una tendencia al efecto ansiolítico. Las tinturas de hojas de F.m-Sur y F.m-BA y la tintura de flores de F.m-Sur son las que más redujeron la relación de permanencia, o sea que aumentaron su tiempo en ramas cerradas desde el inicio del test (Figs. 40 y 41). Esto podría sugerir una acción ansiogénica, pero considerando que las tinturas redujeron el número de entradas a ramas abiertas con

respecto al vehículo etanólico se sugiere que el efecto sería debido a una acción sedante.

En el test de campo abierto, se comprobó que las tinturas de ambas F.m. son ligeramente sedantes a los 30-60 minutos de su administración, puesto que redujeron la locomoción y exploración espontáneas de los ratones respecto a los grupos tratados con vehículo etanólico y con diazepam 0.5 mg/kg, que es la dosis ansiolítica. Estos resultados explican la reducción de la relación de tiempos transcurridos en las ramas abiertas/ cerradas del LCE, mencionada en el párrafo anterior. Los resultados permiten inferir que la actividad sedante de las tinturas los mantuvo más tiempo en las ramas cerradas, por ser el sitio en el que se encuentran más protegidos. En conclusión, de la comparación de ambas pruebas surge que las hojas de F.m. de las dos regiones producen una leve y transitoria actividad sedante, al igual que las flores de la Fm-Sur, mientras las flores de Fm- BA carecen de dicha actividad. Este efecto sedante puede contribuir al tratamiento de los espasmos, tanto intestinales como uterinos.

6.4. Correlación de la actividad biológica con los compuestos químicos

Después de una detallada revisión de la bibliografía disponible (Science Direct, Base de datos NAPRALERT, PUBMED, entre otras), podemos decir que hasta el momento no se han comunicado resultados de trabajos referentes a las actividades biológicas estudiadas en esta tesis en las tinturas de *Fuchsia magellanica*. Se encontraron reportes de estudios fitoquímicos preliminares, estudios sobre actividad cardiovascular antihipertensiva (Hansen *et al*, 1995; Maulik & Banerjee, 2015) y de actividad antidiabética (Marles & Farnsworth, 1995).

Los efectos antagonistas no-competitivos de carbacol y el antagonismo no competitivo en las CCR de Ca^{2+} de las tinturas son propios de la presencia de flavonoides, habiendo gran variedad de reportes que apoyan esta actividad

antagonista de estos compuestos en otras plantas medicinales (Martino, 2000; Ghayur *et al.* 2006; Bukhari *et al.* 2007; Hammad & Abdalla, 1997; Ragone *et al.* 2007).

Se pueden relacionar los flavonoides con los compuestos responsables de la actividad antiespasmódica y tocolítica analizando la correspondencia entre los compuestos hallados en estas muestras de *Fuchsia magellanica* y los reportes bibliográficos de su actividad antiespasmódica. Si pensamos en los flavonoides, la presencia de **quercetina** en la tintura de las hojas provenientes de la F.m. de Patagonia es compatible con los trabajos que reportaron un efecto relajante en el íleon de cobayo (Di Carlo *et al.* 1999) y en el íleon y duodeno de rata (Ragone *et al.* 2007). Quercetina resultó antagonista no-competitivo de acetilcolina en músculo liso del duodeno e íleon, lo cual parece relacionado a su actividad inhibidora de la fosfodiesterasa de cAMP/cGMP (Beretz *et al.* 1978; Consolini *et al.* 2011). Revuelta *et al.* (1997) encontraron que los efectos relajantes de **quercetina y canferol** en la contracción inducida por KCl (60 mM) en el útero de rata involucran al cAMP y que además ambos flavonoides inhibieron el influjo de calcio, por un mecanismo diferente al de los bloqueantes tipo dihidropiridina. Sin embargo, no hay reportes de la actividad relajante del músculo liso de los otros flavonoides encontrados, a excepción de la quercetina, el canferol y la **vitexina**. Esta última demostró ser un antagonista no competitivo de la CCR de acetilcolina y de calcio en el intestino aislado (Ragone *et al.* 2007).

Respecto a la actividad en el sistema nervioso central, los flavonoides penetran la barrera hematoencefálica (BHE) a través de varios canales, la mayoría de los cuales están todavía bajo investigación, y alcanzan prácticamente todos los núcleos cerebrales, como es el caso de la naringenina y la quercetina (Estrada *et al.* 2012). La capacidad de los flavonoides de permear la BHE no sólo depende de su lipofilidad sino también de su capacidad de conjugación; metabolitos conjugados por metilación en el intestino delgado y en el hígado, al ser más lipofílicos, pueden permear la BHE con mayor facilidad que sus agliconas de origen. Existen también investigaciones que sugieren que los metabolitos más polares de esta clase de glicósidos atraviesan la BHE

cuando se unen a transportadores específicos dependientes de ATP como la glicoproteína P (P-gp) expresada. Estos compuestos son capaces de aumentar la capacidad antioxidante del cerebro, mejorar su perfusión sanguínea, interactuar con genes neuronales y modular la actividad de receptores neuronales. La acción de moléculas como, por ejemplo, la hispidulina, que es capaz de alcanzar el receptor GABA-A, ha demostrado un importante papel en la regulación de la ansiedad y epilepsia, mientras que otros flavonoides son útiles en condiciones de neurodegeneración (Dovich & Lajolo, 2011; Estrada *et al.* 2012).

Los flavonoides son de gran importancia en los estudios fitoquímicos de plantas con uso medicinal debido al amplio rango de actividades biológicas en el hombre. Si hacemos énfasis en la **quercitrina** y el **hiperósido**, ambos glicosidos de la quercetina, que fueron los compuestos mayoritarios encontrados en la *Fuchsia magellanica* silvestre (de la Patagonia) y la naturalizada (de La Plata), encontramos los siguientes reportes bibliográficos:

a) Respecto de la Quercitrina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona-3-O-Ramnosido)

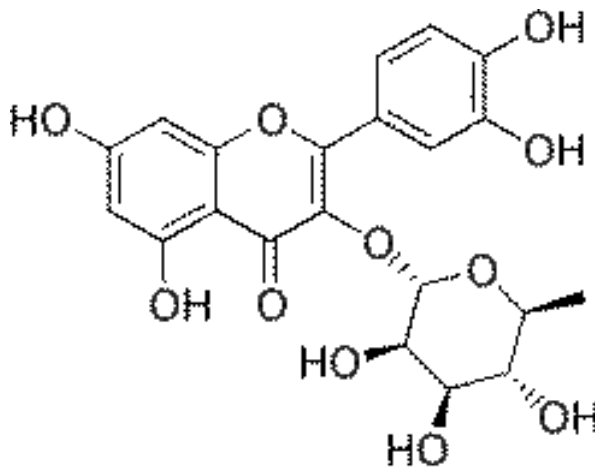


Figura 44. Diagrama de la molécula de quercitrina

Galsanov *et al.* (1976) observó la actividad antiinflamatoria de la **quercitrina** en un modelo de inflamación intestinal de tipo alérgico en ratas, a partir del cual se han

hecho diferentes estudios en colitis experimental encontrando efectividad, aunque no principalmente relacionada a efectos en la contractilidad, reportando un alto impacto en el estrés oxidativo, actividad del óxido nítrico, inhibiendo la NO sintasa y la regulación de la fosfatasa alcalina (Sánchez de Medina *et al.* 1996; Sánchez de Medina *et al.*, 2002). Nuevos estudios han valorado la actividad de los flavonoides en varios modelos bien establecidos de inflamación intestinal en rata, mostrando su actividad preventiva del daño colónico agudo cuando se administran antes del agente lesivo (ácido acético o TNBS), y facilitan la recuperación del tejido colónico dañado en la fase semicrónica del proceso inflamatorio cuando se administran una vez inducido el daño. Es de resaltar que en estos estudios de todos los flavonoides ensayados hasta el momento, la **quercitrina** resultó ser la más potente, al ejercer su actividad ‘preventiva’ o ‘curativa’ a las dosis de 1 y 5 mg/kg, mientras que el resto de los flavonoides ejercieron su actividad antiinflamatoria intestinal en un rango de dosis entre 10 y 25 mg/kg, cuando se trata de los heterósidos, y entre 10 y 200 mg/kg cuando se estudiaron las geninas (Ballester *et al.* 2006), mostrando su capacidad como gastroprotector (Abreu *et al.*, 2015) y como antioxidante protector de lesiones por rayos UVB (Yin *et al.*, 2013).

La **quercitrina** se encuentra en plantas que han sido usadas como sedantes o antidepresivos en la medicina tradicional oriental, tal como *Albizzia julibrissin* y *Hypericum perforatum* (Butterweck, 2003; Crupi *et al.* 2013). Junto con ella fue aislada la **isoquercitrina**, y se observó que incrementó el tiempo de sueño inducido por pentobarbital de una manera dependiente de la dosis en ratones (Edewor, 2013). Otro estudio confirma el efecto sedante sobre el sistema nervioso central de los glicósidos de quercitrina e isoquercetina en ratones y determina que el posible mecanismo de acción ansiolítico podría deberse a la unión de estos compuestos al complejo GABA A-BZD, ya que se ha encontrado que los flavonoides se unen con el sitio BZD de alta afinidad por las benzodiazepinas en el receptor GABA-A (Gupta, *et al.* 2016). Por otro lado, Krishtal *et al.* (2001) detectaron que la quercitrina actúa como una potente inhibidora de la conductancia inducida por adenosina trifosfato (ATP) en experimentos

hecho sobre neuronas aisladas del ganglio de la raíz dorsal de ratas Wistar. Todos estos reportes concuerdan con el hecho de que las tinturas de F.m. que contienen los flavonoides quercetina e isoquercitrina den efectos en el comportamiento, como los obtenidos en esta Tesis.

b) Respecto del Hiperósido (Quercetin 3-D-galactosido)

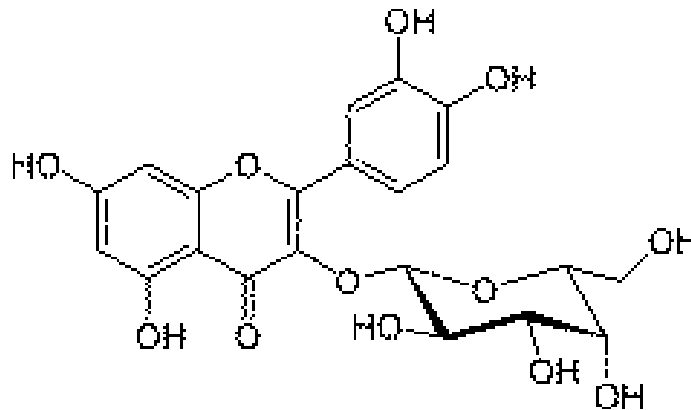


Figura 45. Diagrama de la molécula de hiperósido

El **hiperósido** ha sido poco estudiado para la actividad gastrointestinal, pero se ha reportado como preventivo para el cáncer de pulmón al inducir la apoptosis celular (Liu *et al*, 2016), como flavonoide benéfico para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II (Eidenberg *et al*, 2013).

Crupi *et al*. (2013) observaron que el hiperósido fue significativamente activo en el test de natación forzada (que detecta acción antidepresiva) y se ha informado que junto con otros flavonoides disminuyó los niveles de ACTH y corticosterona en plasma. Otra investigación determinó que el tratamiento con hiperósido (10 y 20 mg/kg, i.p.) en ratones y 1.8 mg / kg (p.o.) en ratas, produjo efectos de tipo antidepresivo en el test de natación forzada, demostrando que este efecto está mediado por la activación del receptor D2 para la dopamina (Haas *et al*. 2011). Al igual que la quercitrina, el hiperósido está presente en *Hypericum perforatum*, planta reconocida como antidepresiva. Allí actúa bloqueando las corrientes activadas por ATP y α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propionato (AMPA) que es un agonista

glutamatérgico, tal que en estos estudios los autores clasifican la biapigenina, el hiperósido y la quercitrina como potencialmente neuroactivas (Butterweck, 2003). Queda pendiente evaluar la actividad antidepresiva en los extractos de F.m.

De todas formas, es importante aclarar que aun cuando algunos de los compuestos mayoritarios en *Fuchsia magellanica* tengan *per se* la actividad antiespasmódica, antidiarreica o alguna actividad en comportamiento, suele existir un sinergismo entre varios principios activos que hace que el extracto complejo tenga una actividad mayor a la de sus compuestos individuales (Ryabushkina, 2005; Waliwitiya *et al.* 2012). Viceversa, es posible también pensar que algunas de las actividades individuales puedan ser enmascaradas por las de otros compuestos en un extracto complejo.

6.5. Alcances y limitaciones del estudio

Esta tesis tiene un enfoque principalmente etnofarmacológico con el fin de cumplir el objetivo principal que fue validar el uso etnobotánico de *Fuchsia magellanica* como tocolítica y antiespasmódica intestinal y buscar algunos de los mecanismos responsables. Como especie promisoría, se hicieron los estudios botánicos morfo-anatómicos de gran importancia en la identificación de drogas vegetales y la caracterización de los posibles principios activos principales, y se ahondó en el estudio de los mecanismos de acción farmacológicos. Sin embargo, para lograr una más detallada correlación de la composición de la planta con la actividad farmacológica se requerirían metodologías más sensibles y eficaces con sus respectivas validaciones, enfoque que supera el objetivo general de esta tesis de Magister en Plantas Medicinales.

7. CONCLUSIONES

Por medio de estudios farmacológicos y fitoquímicos esta tesis valida el uso tradicional etno-botánico de *Fuchsia magellanica*.

- Se definieron caracteres morfo-anatómicos específicos que permiten la correcta identificación de la especie para su uso en la herbolaria medicinal, evitando así la presencia de adulterantes.
- En los estudios fitoquímicos se observó la presencia de quercitrina, canferol, quercetina e hiperósido, compuestos fenólicos glicosilados, que poseen diversas propiedades biológicas y farmacológicas antes descritas.
- Los resultados farmacológicos sugieren que la tintura de *Fuchsia magellanica* tiene efecto antiespasmódico tanto a nivel intestinal como uterino frente al estímulo colinérgico muscarínico.
- El efecto antiespasmódico intestinal frente al estímulo vagal, estaría asociado a una inhibición no-competitiva del influjo de calcio al músculo liso, demostrando también que el óxido nítrico (NO) no forma parte del mecanismo inhibitorio.
- El efecto tocolítico ocurrió por inhibición no-competitiva de la contracción colinérgica y de la mediada por serotonina. Además de deberse a la inhibición del influjo de calcio, se sensibiliza por bloqueo de canales de potasio.
- *Fuchsia magellanica* mostró inhibición del tránsito intestinal en las pruebas *in vivo*, en concordancia con lo observado en las pruebas *ex vivo*.
- Las pruebas de conducta en ratones mostraron actividad levemente sedante, pero descartaron cualquier actividad ansiolítica.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aaronson P. I., Sarwar U., Gin S., Rockenbauch U., Connolly M., Tillet A., Watson S., Liu B., Tribe R. M. 2006. "A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats". *British Journal of Pharmacology* 147, 815–824.

Abreu M.M., Lemos M., Alves C.K., Rodenburg D., D McChesney J., Radwan M.M., Furtado N.A., Kenupp B.J. 2015. "Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and isolated compounds from the leaves of *Solanum cernuum* Vell". *Journal of Ethnopharmacology* 172, 421-429

Administración Nacional Oceánica y Atmosférica, NOAA. Consultada el 23 de marzo de 2016 en <http://www.photolib.noaa.gov/people/cgswho11.html>

Adersen A., Guzman A., Mølgaard P., Simonsen H. T. 2013. "Tea Toxicity and Cholinesterase Inhibition of Huilliche Herbal Medicine". *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 10 (1), 123-127.

Almeira F., Zunino P., Ponce A., Zygaldo J., Baiardi, G. 2009. "Bioactividad del aceite de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold.: efectos sobre el comportamiento de ansiedad". Primera jornada de Jóvenes Investigadores en Neurociencias de Córdoba. 3 de abril 2009.

Alonso J. 2004. "Plantas Medicinales empleadas por los Mapuches". *Revista Medicina Holística* 76.

Aukanaw. "La ciencia secreta de los Mapuche". Capítulo 14. Consultado el 25 de mayo de 2016 en <http://www.geocities.ws/aukanawel/obras/cienciasecreta/plantas/chilko.html>

Arts I.C. & Hollman, P.C. 2005. "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies". *American Journal Clinical Nutrition*. 81(1), 317-325.

Ávalos, A. Pérez-Urria, E. 2009. "Metabolismo secundario de plantas". *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.

Bailey K.R. & Crawley J.N. 2008. "Anxiety-related behaviors in mice". *Methods of*

Behavior Analysis in Neuroscience Edited by Jerry J. Buccafusco, CRC Press, 2nd Edition, chapter 5.

Ballester I., Camuesco D., Gálvez J., Sánchez De Medina F., Zarzuelo A. 2006. "Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal". *Ars Pharmaceutica* 47 (1), 5-21.

Bauer B. 2012. "Historical Review of medicinal plants usage". *Pharmacognosy Reviews* 6, 1-5.

Benabdallah H. & Gharzouli K. 2015. "Effects of flavone on the contractile activity of the circular smooth muscle of the rabbit middle colon *in vitro*". *European Journal of Pharmacology* 760, 20-26.

Berardi A. 2012. "Etnofarmacología gastrointestinal de plantas medicinales argentinas del género *Aloysia*, familia verbenaceae: mecanismos de acción y relación con los principios activos". Tesis de Maestría en Plantas Medicinales. Universidad Nacional de La Plata.

Beretz, A., Anton, R., Stoclet, J.C., 1978. "Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase". *Experientia* 34, 1054-1055.

Berry P. 1989. "A Systematic Revision of *Fuchsia* Sect. *Quelusia* (*Onagraceae*)". *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76 (2), 532-584.

Blanco M., G.A. Colareda, C. van Baren, A. Bandoni, J. Ringuelet, A.E. Consolini. 2013. "Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two chemotypes of *Lippia alba*". *Journal of Ethnopharmacology* 149, 803-809.

Bruneton J. 1995. "Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants", English Translation by Hatton, C. K., Lavoisier Publishing, Paris, 265.

Brunton L. L., Lazo J. S., Parker K. 2005. "Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics". McGraw-Hill 10th Edition.

Brunton L. L., Chabner B., Knollmann B. C. 2011. "Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics". McGraw-Hill 12th Edition.

Bukhari I.A., Khan R.A., Gilani A.U., Shah A.J., Hussain J., Ahmad V.U. 2007. "The analgesic, anti-inflammatory and calcium antagonist potential of *Tanacetum artemisiodes*". Archives of Pharmacal Research 30, 303-312

Butterweck V. 2003. "Mechanism of Action of St John's Wort in Depression What is Known?" CNS Drugs 17 (8), 539-562.

Capasso F., Gaginella T., Grandolini G., Izzo A. 2003 "Phytotherapy: A quick reference to herbal medicine". Springer-Verlag Berlín Heidelberg

Campos-Navarro R. & Scarpa GF. 2013. "The cultural-bound disease "empacho" in Argentina. A comprehensive botanico-historical and ethnopharmacological review". Journal of Ethnopharmacology 148, 349–360.

Chanda S. 2014. "Importance of pharmacognostic study of medicinal plants: An overview". Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2 (5), 69-73

Choze R. 2004. "Técnicas de Separação e Identificação Empregadas na Análise de Produtos Naturais de Plantas". Trabalho de conclusão no Curso de Química do Centro de Ciências Física e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Colares M. N. & Arambarri A. M. 2008. "*Ziziphus mistol* (Rhamnaceae): morfo-anatomía y arquitectura foliar". Latin American Journal of Pharmacology 27, 568-577.

Colares M., Muguerza A., Rosella M. A., Consolini A. E. 2013. "Antispasmodic effects of *Mikania micrantha* Kunth and dual gastrointestinal effect of *Mikania cordifolia* (L.F.) Willd (asteraceae) on isolated rat thin intestine". Pharmacology Online Archives (2), 1-11.

Consolini A. E., Ragone M. I., Migliori G. N., Conforti P., Volonté M. G. 2006. "Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice." Journal of Ethnopharmacology 106, 90-96.

Consolini A. E., Berardi A., Rosella M. A., Volonté M. G. 2011. "Antispasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due to non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acetylcholine and calcium". *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21 (5), 889-900.

Costa M., Dodds K. N., Wiklendt L., Spencer N. J., Brookes S. J. H., Dinning P. G. 2013. "Neurogenic and myogenic motor activity in the colon of the guinea pig, mouse, rabbit, and rat". *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 305: G749–G759.

Cottart C.H., Bonvin E., Rey C., Wendum D., Bernaudin J.F. O., Dumont S., Lasnier E., Debray D., Clément A., Housset C., Bonora M. 2007. "Impact of Nutrition on Phenotype in CFTR-deficient Mice". *Pediatric Research* 62(5), 528-532.

Crowden RK, Wright J, Harborne J. 1977. "Anthocyanins of *Fuchsia* (Onagraceae)". *Phytochemistr.* 16(3), 400-402.

Crupi R., Abusamra Y. A. K., Spina E., Calapai G. 2013. "Preclinical Data Supporting/Refuting the Use of *Hypericum perforatum* in the Treatment of Depression". *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 12 (4), 474-486.

Darios E. S., Seitz B., Watts S. W. (2012). "Smooth muscle pharmacology in the isolated virgin and pregnant rat uterus and cervix". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341, 587-596.

De Mösbach E. W. 1992. "Botánica indígena de Chile". Editorial Andrés Bello. Museo Chileno de Arte Precolombino. Fundación Andes.

Del Valle M. E. 2008. "Aislamiento y determinación de estructura química de principios activos presentes en *Eugenia uniflora*, centrado en los compuestos solubles en metanol". Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Deshpande H. A. & Bhalsing. S. R. 2013. "Recent Advances in the Phytochemistry of

Some Medicinally Important Cassia Species: A Review". *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences* 2 (3), 60-78.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso, F., 1999. "Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs". *Life Sciences* 65, 337-535.

Dizeo de Stritmatter C. 1973. "Nueva técnica de diafanización". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 15, 126-129.

Dominguez Díaz E. 2010. "Flora de interés etnobotánico usada por los pueblos originarios: Aónikenk, Selk'nam, Kawésqar, Yagan y Haush en la Patagonia Austral". *Dominguezia* 26 (2), 19-29.

Dovich S. S., Lajolo, F. M. 2011. "Flavonoides e sua relação com doenças do Sistema Nervoso Central". *Nutrire: Revista Da Sociedade Brasileira De Alimentação E Nutrição = Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition* 36 (2), 123-135.

Edewor-Kuponyi T. I. 2013. "Plant-Derived Compounds with Potential Sedative and Anxiolytic Activities". *International Journal of Basic and Applied Science* 02 (1), 63-78.

Eidenberger T., Selg M., Krennhuber K. 2013. "Inhibition of dipeptidyl peptidase activity by flavonol glycosides of guava (*Psidium guajava* L.): A key to the beneficial effects of guava in type II diabetes mellitus". *Fitoterapia* 84, 74-79.

Estomba D., Ladio A., Lozada M. 2006. "Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-Western Patagonia". *Journal of Ethnopharmacology* 103, 109–119.

Estrada R., Ubaldo D., Araujo A. G. 2012. "Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central". *Salud Mental* 35, 375-384.

Eyssartier C, Ladio A, Lozada M. 2008. "Cultural Transmission of Traditional Knowledge in two populations of North-western Patagonia". *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 4,

25-32.

Fabricant D. S. & Farnsworth N. R. 2001. "The Value of Plants Used in Tradicional Mecine for Drug Discovery". *Journal of Environmental Health Perspective* 109 (1), 69–75.

Gautam R. K., Dixit P. K., Mittal S. 2013. "Herbal Sources of Antidepressant Potential: A Review". *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 18 (1:13), 86-91.

Ghayur M.N., Gilani A.H., Khan A., Amor E.C., Villaseñor I.M., Choudhary M.I. 2006. "Presence of calcium antagonist activity explains the use of *Syzygium samareangense* in diarrhoea". *Phytotherapy Research* 20(1), 49-52

Gorzalczany S., Filip R., Alonso M. del R., Miñoa J., Ferraro G. E., Acevedo C. 2001. "Choleretic effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants". *Journal of Ethnopharmacology* 75, 291–294.

Goto J. & Kondo T. 1991. "Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins—Flower Color Variation". *Angewandte Chemie International* 30(1), 17-33.

Gupta V., Bansal P., Niazi J., Kohli K., Ghaiye P. 2016. "Anti-anxiety Activity of *Citrus paradisi* var. Duncan Extracts in Swiss Albino Mice - A Preclinical Study". *Journal of Herbal Medicine Research* 1 (1), 1-6.

Haas J. S., Stolz E. D., Betti A. H., Stein A. C., Schripsema, J., Poser G. L., Rates S. M. 2011. "The anti-immobility effect of hyperoside of the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation". *Planta Medica* 77(3), 34-339.

Ham A. W. 1975. *Tratado de Histología. Séptima Edición. Nueva Editorial Interamericana.*

Hammad H. M., Abdalla S. S. 1997. "Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship". *General Pharmacology* 28 (5), 767-771.

Hansen K., Nyman U., Wagner Smitt U., Adsersen A., Gudiksen L., Rajasekharan S., Pushpangadan P. 1995. "In vitro screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE)". *Journal of Ethnopharmacology* 48(1), 43-51.

Hernández, M. & Prieto, E. 1999. "Plantas que contienen polifenoles antioxidantes dentro del estilo de vida". *Revista Cubana de Investigación Biomedica* 18(1), 12-14.

Hickey L. J. 1974. "Clasificación de la arquitectura de las hojas de las Dicotiledóneas". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 16, 1-26.

Holmgren PK, Holmgren NH, Barnett LC. 1990. "Index Herbariorum. The herbaria of the world". 8th edition. New York Botanical Gardens: Bronx, New York.

Ichida S., Tokunaga H., Oda Y., Fujita N., Hirata A., Hata T. 1983. "Increase of serotonin receptors in rat uterus induced by estradiol". *Journal of Biological Chemistry* 258(2), 13438-13443.

Instituto Nacional de Estadística y Censos, INDEC. 2010. "Pueblos Originarios: Región Patagonia. Censo del Bicentenario". Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010 Serie D Nº 2.

Ishii K., Taira N., Yanagisawa T. 1985. "Differential antagonismo by Bay K8644, a dihydropyridine calcium agonist, of the negative inotropic effects of nifedipine, verapamil, diltiazem and manganese ions in canine ventricular muscle". *British Journal of Pharmacology* 84, 577-584.

Jeong H. G. 1999. "Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride- induced hepatic injury". *Toxicology Letters* 105, 215-222.

Kamanyi A., Dongmo A.B., Salah, M.A., Jatsa H., Wagner H., Vierling, W., Bopelet M.

2003. "Endothelium Mediated Aortic Relaxation and Blood Pressure Lowering Effect of a Procyanidin Rich Fraction of the Stem Bark Extracts of *Erythrophleum suaveolens*". *Pharmaceutical Biology* 41(1), 62-67.

Karaki H., Ozakz H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano K-I., Harada K-I., Miyamoto S., Nakazawa H., Won K-J., Sato K. 1997. "Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle". *Pharmacological Reviews* 49(2), 157-230.

Kasapović J., Pajović S. B., Pejić S., Martinović J. V. 2001. "Effects of Estradiol Benzoate and Progesterone on Superoxide Dismutase Activity in the Thymus of Rats". *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 50, 97-103.

Kashiwada Y., Wang H. K., Nagao T., Kitanaka S., Yasuda I., Fujioka T., Yamagishi T., Consentino M., Kozuka M., Okabe H., Ikeshiro Y., Hu C.Q., Yeh E., Lee K.H. 1998. "AntiAIDS Agents: 30. Anti-VIH activity of oleanolic acid, Pomolic acid, and structurally related triterpenoids". *Journal of Natural Products* 61, 1090-1095.

Kenakin T. P. 1984. "The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues". *Pharmacological Reviews* 36, 165–222.

Kenakin T.P. 2014. "A Pharmacology Primer". 4th Edition. Elsevier, Academic Press, 361-363.

Krishtal O., Lozovaya N., Fisunov A., Tsintsadze T., Pankratov Y., Kopanitsa M., Chatterjee S. S. 2001. "Modulation of Ion Channels in Rat Neurons by the Constituents of *Hypericum perforatum*". *Pharmacopsychiatry* 34(1), 74-82.

Kitchen, I. 1984. "Textbook of in vitro practical pharmacology". Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Ko W-C., Wang H-L., Lei C-B., Shih C-H., Chung M-I., Lin C-N. 2002. "Mechanisms of Relaxant Action of 3-O-Methylquercetin in Isolated Guinea-Pig Trachea". *Planta medica* 68, 30-35.

Ladio, A. & Lozada, M., 2004. "Patterns of use and knowledge of wild edible plants from distinct ecological environments: a case study of a Mapuche community from NW Patagonia". *Biodiversity and Conservation* 13 (6), 1153–1173

Ladio, A. H. 2006. "Etnobotánica en la Patagonia: Conocimiento local e importancia actual de los recursos vegetales en las comunidades rurales". *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas* 18, 13-29

Ladio A, Lozada M, Weigandt M. 2007. "Comparison of traditional wild plant knowledge between aboriginal communities inhabiting arid and forest environments in Patagonia, Argentina". *Journal of Arid Environments* 69, 695–715

Ladio A. H. & Lozada M. 2009. "Human ecology, ethnobotany and traditional practices in rural populations inhabiting the Monte region: Resilience and ecological knowledge". *Journal of Arid Environments* 73: 222–227

Ladio A. H., Molares S. 2013. "Evaluating traditional wild edible plant knowledge among teachers of Patagonia: Patterns and prospects". *Learning and Individual Differences* 27: 241-249

Liu J. 1995. "Pharmacology of oleanolic acid and ursolic". *Journal of Ethnopharmacology* 49, 57-68.

Liu Y.H., Liu G.H., Mei J.J., Wang J. 2016. "The preventive effects of hyperoside on lung cancer in vitro by inducing apoptosis and inhibiting proliferation through Caspase-3 and P53 signaling pathway". *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83, 381-391.

Livingstone E. & Livingstone S. 1970. "Pharmacological experiments on isolated preparations". Edited by the staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Edinburgh, 2nd. Edition.

Lock de Ugaz, O. 1994. "Investigación Fitoquímica: Métodos de Estudios de Productos Naturales". Fondo Editorial, PUCP.

Marles R. & Farnsworth N. R. 1995. "Antidiabetic plants and their active constituents". *Phytomedicine* 2(2), 137-189

Martínez-González J., Rodríguez-Rodríguez R., González-Díez M., Rodríguez C., Herrera M., Ruiz-Gutierrez V., Badimon L. 2008. "Oleanolic Acid Induces Prostacyclin Release in Human Vascular Smooth Muscle Cells through a Cyclooxygenase-2-Dependent Mechanism". *Journal of Nutrition* 138(3), 443-448.

Martínez-Salamanca J.I., Martínez-Ballesteros C., Portillo L., Gabancho S., Moncada I., Carballido J. 2010. "Fisiología de la erección". *Archivos Españoles de Urología* 63(8), 581-588.

Martino V. 2000. "Los Flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 19(4), 303-308.

Massardo F. & Rozzi R. 1996. "Valoración de la biodiversidad: Usos medicinales de la flora nativa chilena". *Ambiente y Desarrollo* XII (3), 76 - 81

Matera S., Piersante M. V., Ragone M. I., Consolini A. E. 2012. "Sedative and antispasmodic effects of *Stevia rebaudiana* and noncompetitive inhibition of intestinal contractility by stevioside". *Pharmacology Online Special Issue* (1), 1-8

Matera S., Bruno F., Bayley M., Pérez V., Querini C., Ragone M.I., Consolini A.E. 2016. "Intestinal Antispasmodic Effects Of Three Argentinian Plants: *Hypericum connatum*, *Berberis ruscifolia* and *Cecropia pachystachya*: Mechanisms of action and comparison with the effects of *Brugmansia arborea*". *Pharmacology Online Archives* (2), 91-99.

Maulik S.K. & Banerjee S.K. 2015. "Uses of herbals in cardiac diseases: Priority of evidence over belief". *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*, Edited by: Pulok K. Mukherjee, Chapter 24, 515-529

McHale N., Hollywood M., Sergeant G., Thornbury K. (2006). Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. *Journal of Physiology* 570, 23-28.

Meira M. R., Manganotti S. A., Martins E. R. 2010. "Plantas Medicinais, Produção e Cultivo Da Melissa Officinalis No Brasil". Enciclopédia Biosfera, Universidade Federal de Minas Gerais. Sumário da EDIÇÃO Nº10 – 2010.

Mendel M., Chłopecka M., Dziekan N., Karlik W. 2016. "Antispasmodic effect of selected *Citrus flavonoids* on rat isolated jejunum specimens". European Journal of Pharmacology 791, 640–646

Messer E., 1991. "Systematic and medicinal reasoning in Mitla folk botany". Journal of Ethnopharmacology 33, 107–128.

Metcalfe C. R. & Chalk L. 1950. "Anatomy of the Dicotyledons". Clarendon Press, Oxford, Vol. 1.

Molares S., Ladio A. 2008. "Plantas medicinales en una comunidad Mapuche del NO de la Patagonia Argentina: clasificación y percepciones organolépticas relacionadas con su valoración". Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 7 (3), 149 – 155.

Molares S., Ladio A. 2009. "Ethnobotanical review of the Mapuche medicinal flora: Use patterns on a regional scale". Journal of Ethnopharmacology 122, 251–260.

Molares S., Ladio A. H. 2012. "Plantas aromáticas con órganos subterráneos de importancia cultural en la patagonia argentina: una aproximación a sus usos desde la etnobotánica, la percepción sensorial y la anatomía". Darwiniana 50 (1), 7-24.

Montes M., Wilkomirsky, T. 1987. "Medicina Tradicional Chilena". Editorial de la Universidad de Concepción. Chile.

Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky, T. 2004. "Plantas Medicinales de Uso en Chile". Química y Farmacología. Ed. Universitaria S. A. Santiago de Chile.

Musters G. C. 1964. "Vida entre los Patagones. Un año de excursiones por tierras no

frecuentadas desde el estrecho de Magallanes hasta el Río Negro”. Editorial Solar, Buenos Aires.

New World Encyclopedia. 2011. Consultado el 15 de mayo de 2017 en http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Ebers_Papyrus

Organización Mundial de la Salud, OMS. 2013. Consultado el 12 de febrero de 2016 en http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/

Ortiz J. P. 2011. “Evaluación de la Producción de Ácido Oleanólico y Otros Metabolitos Secundarios a Partir de Cultivos Elicitados de Células en Suspensión De *Calendula officinalis*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Owolabi O.J., Anaka O.N., Egboh A.J. 2014. “Effect of Aqueous Extract of *Persea Americana* Mill (Lauraceae) Seeds on Non-Pregnant Rat Uterus”. *Journal of Science and Practice of Pharmacy* 1(1), 1-6

Parodi L. R. 1978. “Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería”. 3ra Edición. ACME. Buenos Aires.

Politi F. A. S., Salgado H. R. N., Moreira R. R. D., Pietro R. C. L R. 2010. “Pruebas preliminares de motilidad intestinal y de toxicidad oral aguda con extracto de corteza en polvo de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) en ratones”. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1(1), 187-189.

Quast U. 1993. “Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels?” *Trends in Pharmacological Sciences* 14, 332–337.

Quiñones, M. & Alexandre, A. 2012. “Revisión: Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular”. *Nutrición Hospitalaria* 27(1), 76-89.

Ragone M.I., Sella M., Conforti P., Volonté M.G., Consolini A.E. 2007. “The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not

isovitexin on rat duodenum". *Journal of Ethnopharmacology* 113, 258-266.

Ragone M. I., Sella M., Pastore A., Consolini A. E. 2010. "Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora*, Palau on mice and rats". *Latin American Journal of Pharmacy* 29(1): 79-86.

Raphael T. J. & Kuttan G. 2003. "Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system". *Phytomedicine* 10, 483-489.

Rapoport E. H. & Ladio A. H. 1999. "Los bosques andino-patagónicos como fuentes de alimento". *Bosque* 20 (2), 55-64.

Rejon-Orantes J. C., Placer D., Roldán G. 2011. "Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas". *Universitas Médica* 52(1), 87-89

Revuelta M.P., Cantabrana B., Hidalgo A. 1997. "Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl_2 ". *General Pharmacology: The Vascular System* 29(5), 847-857.

Richeri M., Ladio A. H., Beeskow A. M. 2013. "Conocimiento tradicional y autosuficiencia: la herbolaria rural en la Meseta Central del Chubut (Argentina)". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12 (1), 44 – 58.

Rodrigues M. M., Manganotti S. A., Martins E. R. 2010. "Plantas Mediciniais, Produção e Cultivo da *Melissa Officinalis* no Brasil". *Enciclopédia Biosfera. Universidade Federal de Minas Gerais. Sumário da edição Nº 10.*

Rodriguez J., Pacheco P., Razmilic I., Loyola J.I., Schmedahirschmann G., Theoduloz C. 1994. "Hypotensive and diuretic effect of *Equisetum bogotense* and *Fuchsia magellanica* and micropropagation of *Equisetum bogotense*". *Phytotherapy Research* 8, 157–160.

Rodriguez J., Astudillo L., Schemeda G. 2003. "Oleanolic acid promotes healing of acetic acid- induced chronic gastric lesions in rats". *Pharmacological Research* 48, 291-294.

Ryabushkina N. A. 2005. "Synergism of Metabolite Action in Plant Responses to Stresses". *Russian Journal of Plant Physiology* 52, 547.

Said J. 2012. "Patagonia". Penguin Random House. Grupo Editorial Chile.

Salinas D. I., Araujo J. C., Cisneros C. B., Villena C. A., Senosain D. A., Huarcaya C. V., Arroyo J. L. 2011. "Inhibición del tránsito intestinal por el extracto metanólico de las hojas de *Annona muricata* L (guanábana) en ratones". *Ciencia e Investigación* 14(1), 9-13.

Salako, Akindele A. J., Shitta O. M., Elegunde O. O., Adeyemin O. O. 2015. "Antidiarrhoeal activity of aqueous leaf extract of *Caladium bicolor* (Araceae) and its possible mechanisms of action". *Journal of Ethnopharmacology* 176, 225–231.

Salisbury E. 1927. "On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora". *Philosophical Transactions Royal Society of London* 216, 1-65.

Sánchez de Medina F., Galvez J., Romero J.A., Zarzuelo A. 1996. "Effects of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat". *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics* 278, 771-79.

Sánchez de Medina F., Vera B., Gálvez J., Zarzuelo A. 2002. "Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat". *Life Sciences* 70, 3097 – 3108.

Sarin R. V., Narwal S., Bafna P.A. 2013. "Anti-diarrhoeal activity of aqueous extract of *Ocimum kilimandscharicum*". *Journal of Ethnopharmacology* 148, 223-228.

Sepúlveda-Jiménez, G. Porta-Ducoing, H. Rocha-Sosa, M. 2004. "La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas". *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3), 355-363.

Silverthorn D. (2008). *Fisiología humana*. Editorial Panamericana. Sexta edición. ISBN 9789500619820.

Smith R. C., McClure M. C., Smith M. A., Abel P. W., Bradley M.E. 2007. "The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility". *Reproductive Biology and Endocrinology* 5, 41 -52.

Somova L.I., Shode F.O., Ramnanan P., Nadar A., 2003. "Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africa* leaves". *Journal of Ethnopharmacology* 84, 299-305.

Spedding M. 1985. "Competitive interactions between Bay K8644 and nifedipine in K⁺ depolarized smooth muscle: a passive role for Ca²⁺?" *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 328, 464–466.

Tapsell L.C., Hemphil I., Cobiac L., Patch C.S., Sullivan D.R., Fenech M., Roodenrys S., Keogh J.B., Clifton P. M., Williams P.G., Fazio V.A., Inge K.E. 2006. "Health benefits of herbs and spices *The Medical Journal of Australia* 21 (185), 4-24.

Tene V, Malagón O, Finzi P. V, Vidari G, Armijos C, Zaragoza T. 2007. "An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchiipe, Ecuador". *Journal of Ethnopharmacology* 111, 63–81.

Villagran C. 1998. "Etnobotánica indígena de los bosques de Chile: sistema de clasificación de un recurso de uso múltiple". *Revista Chilena de Historia Natural* 71, 245-268.

Waliwitiya R., Nicholson R. A., Kennedy C. J., Lowenberger C. A. 2012. "The Synergistic Effects of Insecticidal Essential Oils and Piperonyl Butoxide on Biotransformational Enzyme Activities in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)". *Journal of Medical Entomology* 49 (3), 614-623.

Wang HP., Lu JF., Zhang GL., Li XY., Peng HY., Lu Y., Zhao L., Ye ZG., Bruce L.C, Xia Q., Qianb LB. 2014. "Endothelium-dependent and -independent vasorelaxant actions and

mechanisms induced by total flavonoids of *Elsholtzia splendens* in rat aortas". *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38 (2), 453-459.

Wasowski C. & Marder M. 2011. "Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*". *Phytomedicine* 18, 393-401.

Watanabe M. & Ayugase. 2015. "Effect of low temperature on flavonoids, oxygen radical absorbance capacity values and major components of winter sweet spinach (*Spinacia oleracea* L.)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(10), 2095-2104

Yin Y., Li W., Son Y.O., Sun L., Lu J., Kim D., Wang X., Yao H., Wang L., Pratheeshkumar P., Hitron A.J., Luo J., Gao N., Shi X., Zhang Z. 2013. "Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage". *Toxicology Applied Pharmacology* 269(2), 89-99.

Zhang P., Li H., Chen D., Ni J., Kang Y., Wang S. 2007. "Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cell through caspase activation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage". *Acta biochimica et biophysica sinica* 39(10), 803-809.

Zorning H. & Weiss G. 1925. "Beiträge zur Anatomie des Laubblattes officineller und pharmazeutisch gebräuchlicher Compositen-Drogen". *Archiv für Pharmakologie* 263, 451-470.