

Artículo original

REVISTA PERUANA DE MEDICINA INTEGRATIVA

ISSN: 2415 - 2692

Identificación de metabolitos secundarios y efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de hojas de *Chromolaena leptoccephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra”

Fernández Rebaza Gustavo Adolfo¹, Cruzado Leyva Maikol¹, Bonilla Rivera Pablo Enrique¹, Ramírez Cruz Francisco Javier María², Toche Tuesta Analucía¹, Curay Carhuamaca Vianella Lizet¹

Información del artículo

Historia del artículo

Recibido: 29/08/2017

Aprobado: 10/09/2017

Autor corresponsal

Gustavo Adolfo Fernández Rebaza
gustav.unmsm@gmail.com
511991895544

Conflicto de interés

Ninguno

Financiamiento

Autofinanciado

Citar como

Fernández Rebaza GA, Cruzado LM, Bonilla Rivera PE, Ramírez Cruz FJM, Toche Tuesta A, Curay Carhuamaca VL. Identificación de metabolitos secundarios y efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de hojas de *Chromolaena leptoccephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra”. Rev Peru Med Integrativa.2017;2(3):779-84.

Resumen

Objetivos. Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de hojas de *Chromolaena leptoccephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra” e identificar los metabolitos secundarios presentes. **Materiales y métodos.** Se realizó una identificación de sus metabolitos secundarios mediante un tamizaje fitoquímico y se evaluó el efecto antiinflamatorio del extracto mediante el modelo de edema subplantar en ratas a la dosis suministrada (diclofenaco 50 mg/kg, *C. leptoccephala* 100 mg/kg y 400 mg/kg). **Resultados.** Dentro de los metabolitos secundarios se encontraron flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, entre otros. Con respecto al efecto antiinflamatorio del extracto de la planta, se encontró efecto en la concentración de 100 y 400 mg/kg. **Conclusión.** El extracto etanólico de hojas de *Chromolaena leptoccephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra” presentó flavonoides, compuestos fenólicos y alcaloides, que ejercerían efecto antiinflamatorio en la concentración de 100 y 400 mg/kg.

Palabras clave: Antiinflamatorios; flavonoides; compuestos fenólicos. (Fuente: DeCS)

Identification of secondary metabolites and anti-inflammatory effect of the ethanolic extract of leaves of *Chromolaena leptoccephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra”

Abstract

Objectives. To evaluate the anti-inflammatory effect of the ethanolic leaf extract of *Chromolaena leptoccephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra” and identify the secondary metabolites present. **Materials and methods.** An identification of its secondary metabolites was made by phytochemical screening and the anti-inflammatory effect of the extract was evaluated by means of the model of subplantar edema in rats at the dose provided (diclofenac 50 mg/kg, *C. leptoccephala* 100 mg/kg and 400 mg/kg). **Results.** Among the secondary metabolites were flavonoids, phenolic compounds, alkaloids, among others. With respect to the anti-inflammatory effect of the extract of the plant, the effect was found in the concentration of 100 and 400 mg/kg. **Conclusion.** The ethanolic leaf extract of *Chromolaena leptoccephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra” presented flavonoids, phenolic compounds and alkaloids, which would exert anti-inflammatory effect in the concentration of 100 and 400 mg/kg.

Keywords: Anti-inflammatory agents, flavonoids, phenolic compounds (Source: MeSH)

¹ Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

² Departamento de Farmacología, Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Introducción

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son uno de los grupos de medicamentos más utilizados, con diversos usos terapéuticos como antipiréticos, analgésicos, antiinflamatorios, entre otros ^(1,2). En relación a este último, una de las principales aplicaciones clínicas de los AINE se encuentra reflejada en el tratamiento de los trastornos musculoesqueléticos, como artritis reumatoide y artrosis, haciéndolos medicamentos de uso crónico, por ende, generan un gasto importante a los sistemas de salud ⁽³⁾.

Además, los AINE tienen la desventaja de tener diversos efectos secundarios relacionados al uso de estos fármacos, la mayoría de naturaleza digestiva, como por ejemplo: anorexia, náuseas, dispepsia, dolor abdominal y diarrea ⁽⁴⁾. A veces, estos efectos secundarios guardan relación con el desencadenamiento de úlceras gástricas o intestinales, las cuales, se estima, ocurren en 15 a 30% de las personas que usan estos medicamentos con regularidad ⁽⁵⁾. La ulceración puede fluctuar desde pequeñas erosiones superficiales hasta la perforación de la mucosa, las cuales pueden complicarse con la aparición de hemorragias, perforaciones u obstrucciones ^(6,7).

En este contexto, el uso de plantas medicinales como un reemplazo terapéutico natural a los AINE ha sido siempre considerado una alternativa razonable a ser estudiada ⁽⁸⁾, debido a las evidencias de metabolitos secundarios, como los flavonoides, que han demostrado efectos antiinflamatorios similares a los expuestos por los fármacos ⁽⁹⁾.

Una de estas especies, tradicionalmente usada en nuestro país, es la *Chromolaena leptocephala* (DC) R.M. King & H. Rob., popularmente llamada “chilca negra”, la cual crece en Bolivia, Ecuador y la selva central de Perú ⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Estudios previos en extractos de otras especies de la misma familia han mostrado un buen potencial como agente antiparasitario ⁽¹³⁾, antiinflamatorio ⁽¹⁴⁾, analgésico y antipirético ^(15,16). Sin embargo, no se encontraron estudios que hayan evaluado los posibles efectos de *Chromolaena leptocephala*. Por ello, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de hojas de *Chromolaena leptocephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra” en un modelo murino.

Materiales y métodos

Material vegetal

Muestras de la especie denominada “chilca negra” procedente del caserío La Libertad-Udima-Catache (Santa Cruz, departamento de Cajamarca-Perú), se identificaron en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el nombre científico *Chromolaena leptocephala* (DC) R.M. King & H. Rob. (Constancia 334-USM-2014). La recolección de las muestras se realizó en septiembre del año 2014.

Preparación del extracto

Las hojas de *Chromolaena leptocephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra”, fueron secadas a 40 °C en una estufa Memmert B214.3783, luego se molió y se procedió a realizar la maceración etanólica por 7 días con agitación periódica. Luego se filtró y se concentró el extracto para obtener un extracto seco ⁽¹⁷⁾. Este proceso se realizó en el Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM (Figura 1).

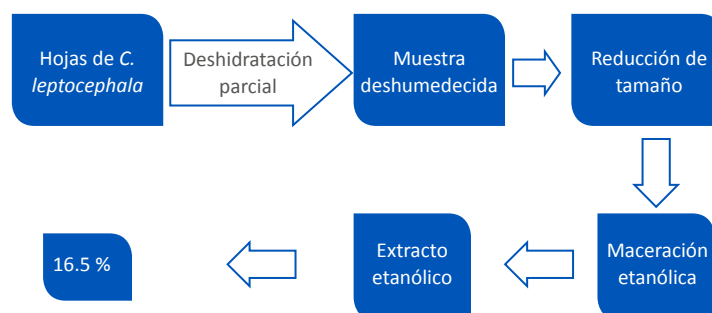


Figura 1. Método operativo para obtención del extracto seco.

Tamizaje fitoquímico

Se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, de acuerdo al método descrito por Olga Lock ⁽¹⁷⁾ por ofrecer mayor reproducibilidad y ser de fácil ejecución. Según este método se realizó la marcha del extracto etanólico, utilizando los reactivos de Molisch, FeCl₃, gelatina 1%, Rx. de Shinoda, H₂SO₄cc, Rx. de Dragendorff, Rx. de Mayer, entre otros.

Efecto antiinflamatorio *in vivo* según el modelo de edema subplantar

Se utilizaron 24 ratas albinas Holtzman machos, con pesos de 200 ± 20 g, las cuales fueron aclimatadas durante 5 días, luego sometidas a ayuno con libre acceso de agua por 12 h previo al inicio del ensayo. Posteriormente, fueron divididas en cuatro grupos de seis ratas, de forma similar al estudio de Baula *et al.* ⁽¹⁸⁾ y tratadas vía oral de la siguiente manera: A) Control negativo: suero fisiológico 0,9 %; B) Control positivo: diclofenaco 5 mg/kg y, C) Grupos de extracto: 100 y 400 mg/kg.

El efecto antiinflamatorio se verificó empleando el modelo de edema subplantar en ratas, inducido por carragenina al 1% en agua destilada aplicada por vía subcutánea dentro de la superficie de la aponeurosis de la pata derecha de acuerdo a lo descrito por Winter *et al.* ⁽¹⁹⁾ para producir una inflamación aguda.

La medición de la inflamación del edema subplantar fue mediante el pletismómetro digital LE7500 [®], cuyos resultados fueron expresados como la variación del volumen de la extremidad del roedor a los 30, 60, 120, 180, 240, 360 y 510 min después de inducir la inflamación con carragenina al 1% y aplicar los tratamientos (medición basal).

Posteriormente, se procedió al cálculo de la actividad inhibitoria usando la formula siguiente:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(C_t - C_0)\text{control} - (C_t - C_0)\text{experimental}}{(C_t - C_0)\text{control}} \times 100$$

Donde C_t es la medición del edema en el tiempo “t” y C₀ representa la medición basal antes de la inyección de carragenina ⁽²⁰⁾.

El manejo de los animales de laboratorio se hizo cumpliendo los tópicos para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de acuerdo al Institute for Laboratory Animal Research ⁽²¹⁾ y la declaración de la Asociación Médica Mundial sobre el uso de animales de experimentación ⁽²²⁾.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como medias y desviaciones estándar. Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el uso de análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo (ANOVA) en el programa estadístico STATA v 13 [®]. Se consideró estadísticamente significativo un valor p < 0,05.

Resultados

Con respecto al análisis fitoquímico del extracto *Chromolaena leptoccephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra” se encontraron compuestos como fenoles, terpenoides, flavonoides, entre otros (Tabla 1).

Al iniciar el procedimiento de edema plantar con carragenina, se consideró que no fue exitoso en dos animales de experimentación, uno del grupo blanco y otro del grupo

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas de *Chromolaena leptoccephala* (DC) R.M. King & H. Rob. “chilca negra”

Metabolito	Reacción	Resultado
Carbohidratos	Molish	+++
	Benedict	+++
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	+++
Taninos	Gelatina	++
Triterpenoides y esteroides	Lieberman-Burchard	+++
Flavonoides	Shinoda	+++
Naftaquinonas, antraquinonas y antranas	Borntrager	+++
Aminoácidos libres y grupos amino.	Ninhidrina	+++
Alcaloides	Dragendorff	++
	Mayer	++

+++ : Abundante; ++ : bastante; + : regular; - : ausencia

diclofenaco, por lo que estos fueron excluidos del análisis estadístico. Al realizar la medición basal del edema plantar en los ratones por grupos, se corroboró que no hubo diferencias significativas ($p=0,064$), por lo que se procedió a continuar con las mediciones durante el tiempo de estudio (Tabla 2).

Asimismo, al realizar las mediciones del porcentaje de edema subplantar también se comprobó que existieron diferencias

significativas de dichos porcentajes en la comparación por grupos y por tiempo de estudio ($p<0,001$) (Tabla 3).

Finalmente, se realizó el análisis del desempeño de los grupos a los que se les administró los extractos etanólicos de *C. leptcephala* a diferentes dosis en comparación con el grupo que solo recibió diclofenaco, observándose un desempeño irregular en la dosis de 400 mg/kg (Figura 2).

Tabla 2. Medición del edema plantar inducido por carragenina durante el tiempo de estudio

Grupo	Basal	30'	60'	120'	180'	240'	360'	Valor p
Blanco	1,34±0,05	1,65±0,15	1,77±0,14	1,73±0,10	2,13±0,23	2,19±0,08	2,24±0,14	<0,001*
<i>C leptcephala</i> 100 mg/kg	1,53±0,13	1,73±0,12	1,85±0,21	1,99±0,18	2,23±0,10	2,27±0,11	2,33±0,06	
<i>C leptcephala</i> 400 mg/kg	1,38±0,11	1,60±0,06	1,63±0,09	2,13±0,21	2,28±0,08	2,29±0,14	1,53±0,20	
Diclofenaco	1,39±0,08	1,54±0,09	1,51±0,11	1,41±0,17	1,57±0,14	1,78±0,14	1,73±0,14	

*ANOVA de dos factores con medidas repetidas.

Tabla 3. Porcentajes de edema subplantar de la extremidad inducida por grupos de experimentación durante el tiempo de estudio

Grupo	30'	60'	120'	180'	240'	360'	510'
Blanco	22,73±10,13	31,86±12,73	30,12±12,10	58,28±12,51	62,89±2,22	66,57±11,22	49,85±7,10
<i>C leptcephala</i> 100 mg/kg	14,03±10,11	21,41±10,32	30,53±9,26	47,51±21,38	49,81±20,51	53,61±18,31	33,06±15,91
<i>C leptcephala</i> 400 mg/kg	17,0±11,89	18,72±12,01	65,88±11,62	66,81±18,34	66,81±18,34	56,35±15,62	42,03±14,43
Diclofenaco	10,75±5,80	8,72±6,66	1,33±11,9	12,55±6,05	28,07±5,91	24,61±8,22	17,17±8,49

Discusión

En el presente estudio se evidenció que el extracto etanólico de hojas de *Chromolaena leptcephala* (DC) R.M. King & H. Rob "chilca negra" presentó alcaloides, taninos, aminoácidos, carbohidratos y un alto porcentaje de compuestos fenólicos, entre ellos flavonoides. Si bien no se encontraron estudios previos que hayan estudiado la marcha fitoquímica de esta especie, lo encontrado es similar a estudios de otras especies del género *Chromolaena* como: *C. odorata* o *C. perglabra*, donde se han determinado compuestos de tipo triterpenos, flavonoides, alcaloides pirrolidínicos, prostaglandinas provenientes de ácidos grasos libres, entre otros (23,24).

Dentro de los compuestos encontrados, genera especial interés el hallazgo de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, ya que estudios previos en extractos alcohólicos de *C. odorata* postulan a estos componentes como unos de los principales responsables de los efectos terapéuticos, especialmente el efecto antiinflamatorio, encontrados en esta

especie (18,24). Además, estudios recientes también resaltan la importancia de la cuantificación de ácidos grasos como agentes antiinflamatorios en extractos de este género (25). Estas conclusiones, si bien no pueden extrapolarse al presente estudio, permiten sugerir que futuras investigaciones deben abordar una mejor caracterización de estos compuestos en *Chromolaena leptcephala* (DC) R.M. King & H. Rob para evaluar posibles similitudes que permitan explicar lo encontrado en este estudio.

El modelo elegido en esta oportunidad, para estimar la inflamación en fase aguda es el modelo de edema subplantar (SP) ya que permite cuantificar, de una manera fácil y reproducible, dos de los parámetros más característicos de la inflamación como son el edema y la extravasación de plasma al inducir una inflamación aguda localizada en la pata del animal tras administración de carragenina(27); es así que en el caso del extracto etanólico de hojas de *Chromolaena leptcephala* (DC) R.M. King & H. Rob "chilca negra" se encontró un mayor efecto antiinflamatorio a una dosis de 400 mg/kg con un pico a los 120 min después de la administración del extracto; sin embargo, la actividad no fue sostenida. Postulamos que esto se debió

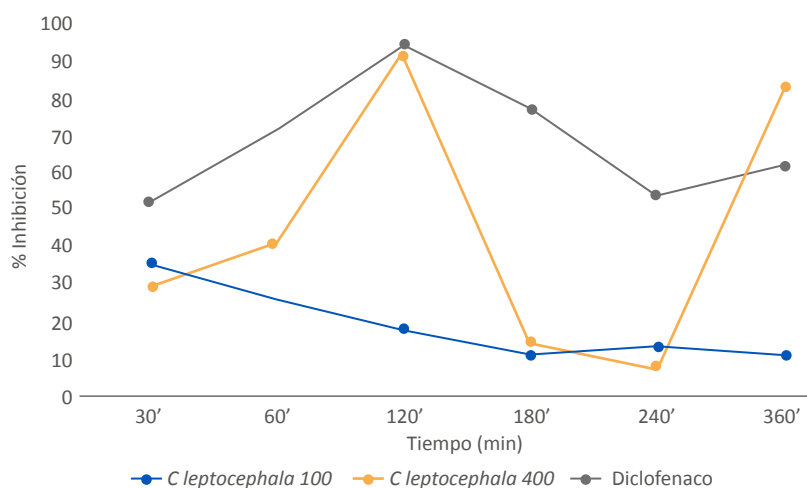


Figura 2. Desempeño de los extractos etanólicos de *C. leptocephala* R.M. King & H. Rob. a diferentes dosis en comparación con diclofenaco (control positivo).

a la presencia de sobresaturación y posibilidad de toxicidad subclínica en los animales de experimentación, por lo que no se expresó adecuadamente la actividad antiinflamatoria en este grupo. Asimismo, el extracto con dosis de 100 mg/kg también presentó una actividad antiinflamatoria, sin embargo, los porcentajes de inhibición fueron disminuyendo en el tiempo, además de que nunca fueron superiores a los presentados en el grupo que recibió diclofenaco como droga patrón. Cabe destacar que el comportamiento encontrado en este grupo corresponde con la farmacocinética y farmacodinamia de este fármaco, el cual presenta su pico plasmático de concentración entre la primera y la tercera hora luego de su administración⁽²⁶⁾.

Baula *et al.*, descubrieron resultados similares al evaluar extractos etanólicos de hojas de *C. odorata* a dosis de 80 mg/kg peso, siempre mostrando desempeños por debajo del control positivo, en este caso ibuprofeno, con porcentajes de inhibición por debajo del 60%, a las seis horas de administración⁽¹⁸⁾. Asimismo, Owoyele *et al.*, encontraron fracciones de inhibición de hasta 80% (aproximadamente a los 4 días) usando extracto acuoso de hojas de *C. odorata* en dosis de 200 mg/kg de

peso comparados con indometacina, mostrando siempre desempeños por debajo del control⁽¹⁴⁾. Finalmente, Itou *et al.*, en el presente año, también encontraron que el extracto acuoso de *C. odorata* (800 mg/kg) presentó porcentajes de inhibición cercanos al 80% a las 24 h de administración⁽¹⁵⁾. Por ende, podemos considerar que existen dos posibles factores que influyen en la actividad antiinflamatoria de los extractos de las hojas del género *Chromolaena*, la dosis y el tipo de extracto; futuros estudios deberían reestudiar las dosis mostradas en esta investigación y agregar algunas dosis mayores, previos estudios de toxicidad, con el objetivo de caracterizar mejor la actividad antiinflamatoria que se ha podido observar preliminarmente en este estudio.

En conclusión, el extracto etanólico de hojas de *Chromolaena leptocephala* (DC) R.M. King & H. Rob. "chilca negra" presentó flavonoides, compuestos fenólicos y alcaloides en su composición y mostró efecto antiinflamatorio en la concentración de 100 y 400 mg/kg sin superar al control positivo (diclofenaco) en ratas Holtzman macho.

Referencias bibliográficas

1. Fanelli A, Ghisi D, Fanelli G. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) in clinical practice: managing gastric and cardiovascular risks. *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 1 de septiembre de 2013;84(2):98–101.
2. Day RO, Graham GG. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *BMJ.* 27 de junio de 2013;346:f3195.
3. Ussai S, Miceli L, Pisa FE, Bednarova R, Giordano A, Rocca GD, et al. Impact of potential inappropriate NSAIDs use in chronic pain. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9(1):2073–7.
4. Thomas J, Straus WL, Bloom BS. Over-the-counter nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of

- gastrointestinal symptoms. *Am J Gastroenterol*. septiembre de 2002;97(9):2215–9.
5. Biskupiak JE, Brixner DI, Howard K, Oderda GM. Gastrointestinal complications of over-the-counter nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Pain Palliat Care Pharmacother*. 2006;20(3):7–14.
 6. Scheiman JM. Prevention of NSAID-Induced Ulcers. *Curr Treat Options Gastroenterol*. abril de 2008;11(2):125–34.
 7. Melcarne L, García-Iglesias P, Calvet X. Management of NSAID-associated peptic ulcer disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2 de junio de 2016;10(6):723–33.
 8. Recio MC, Andujar I, Rios JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Curr Med Chem*. 2012;19(14):2088–103.
 9. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:162750.
 10. Missouri Botanical Garden. *Chromolaena leptoccephala* (DC.) R.M. King & H. Rob. [Internet]. 2017 [citado 27 de noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/2713032>
 11. Beltran H, Salinas I. Flora vascular y vegetación de los Bosques Montanos Húmedos de Carpiash (Huánuco -Perú). *Arnaldoa*. 2010;17(1):107–30.
 12. Montesinos D. Diversidad florística asociada a los restos arqueológicos de la cultura Yarowilca en los departamentos de Huánuco y Ancash, Perú. *Arnaldoa*. 2016;23(2):475–516.
 13. Taleb-Contini SH, Salvador MJ, Balanco JMF, Albuquerque S, de Oliveira DCR. Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (asteraceae). *Phytother Res PTR*. marzo de 2004;18(3):250–4.
 14. Owoyele VB, Adediji JO, Soladoye AO. Anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of *Chromolaena odorata*. *InflammoPharmacology*. 1 de octubre de 2005;13(5–6):479–84.
 15. Itou E, G RD, Ossibi E, W A, C E, Ntandou N, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of leaves of *Chromolaena odorata* L. (King and Robinson). *Afr J Pharm Pharmacol*. 8 de mayo de 2017;11(17):217–23.
 16. Owoyele BV, Oguntoye SO, Dare K, Ogunbiyi BA, Aruboula EA, Soladoye AO. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities from flavonoid fractions of *Chromolaena odorata*. *J Med Plants Res*. 28 de septiembre de 2013;2(9):219–25.
 17. Lock O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2.a ed. Lima: Fondo Editorial PUCP; 1994. 98-102 p.
 18. Baula FM, Juan MECS, Bermudez LML, Cabadonga JL, Camon JJI, Faller NC, et al. Spectrometric Validation of Flavonoid Content and Anti-inflammatory Activity of *Chromolaena Odorata* Leaf Extract. *Root Gatherers*. 2013;5(1):15–38.
 19. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. diciembre de 1962;111:544–7.
 20. Owoyele VB, Wuraola CO, Soladoye AO, Olaleye SB. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. *J Ethnopharmacol*. febrero de 2004;90(2–3):317–21.
 21. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. [Internet]. 8.a ed. Washington DC: The National Academies Press; 2011. 248 p. Disponible en: <http://nap.edu/12910>
 22. The World Medical Association. Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica [Internet]. 2016 [citado 2 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/polices-post/declaracion-de-la-amm-sobre-el-uso-de-animales-en-la-investigacion-biomedica/>
 23. A OER, G RDT. Química y actividad biológica de *Chromolaena perglabra*. *Sci Tech*. 2007;XIII(33):267–70.
 24. Omokhua AG, McGaw LJ, Finnie JF, Van Staden J. *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae) in sub-Saharan Africa: A synthesis and review of its medicinal potential. *J Ethnopharmacol*. 13 de mayo de 2016;183(Supplement C):112–22.
 25. Hanh TTH, Hang DTT, Van Minh C, Dat NT. Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from *Chromolaena odorata*. *Asian Pac J Trop Med*. 1 de octubre de 2011;4(10):760–3.
 26. Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin*. julio de 2010;26(7):1715–31.
 27. Leal MA. Evaluación del efecto antiinflamatorio de un concentrado de frutos de *Aristolelia chilensis* en un modelo de inflamación aguda subplantar inducida por carragenina en ratas [TESIS]. Valdivia: Universidad austral de Chile; 2009. 42 p.