

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**PERFIL FITOQUÍMICO Y ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA Y ACTIVIDAD
ANALGÉSICA DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS SECAS DE
LA ESPECIE *Plectranthus neochilus* Schltr (LAMIACEAE).**

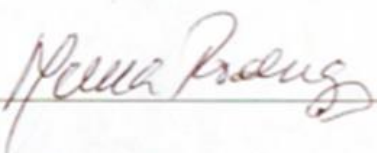
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Jefferson Josetp
Matuzalen A., para optar al título
de Licenciado en Química,
mención Tecnología.

Caracas, Mayo del 2016

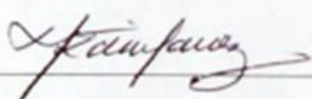
Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: ” **Perfil fitoquímico y estudio de la toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso liofilizado de las hojas secas de la especie *Plectranthus neochilus* (Lamiaceae)**”, presentado por el Br. Jefferson Josetp Matuzalen Almao C.I. 20.827.676, certificamos que este trabajo llevado a cabo en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química mención Tecnología.



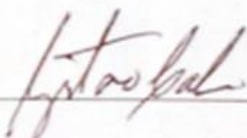
Dra. Díaz Beth
(Tutor Académico)
(Facultad de Farmacia)



Dra. Rodríguez María
(Tutor Administrativo)
(Facultad de Ciencias)



Dra. Katuska Chávez
Jurado
(Facultad de Farmacia)



Dr. Cabrera Gustavo
Jurado
(Facultad de Ciencias)

RESUMEN

Plectranthus neochilus Schltr es una hierba conocida como “boldo rastrero” o “acetaminofén”. El uso de sus hojas en infusiones se popularizó como tratamiento de casos epidemiológicos de fiebre Chikungunya en nuestro país, al atribuirle propiedad analgésica. Existen pocos estudios fitoquímicos y farmacológicos sobre esta especie en Venezuela, hallándose estudios realizados en Brasil y Portugal reportando metabolitos secundarios como: ácido rosmarínico, amirina esterificada, friedelina, sitosterol, estigmasterol y cirsimartina, y adicionalmente, en estudios del aceite esencial han sido encontrados principalmente mono y sesquiterpenoides. Por esta razón, se propuso realizar el estudio fitoquímico de los extractos orgánicos y el estudio de la toxicidad aguda, actividad analgésica, citotóxica y antioxidante del extracto acuoso liofilizado de las hojas secas de la especie *Plectranthus neochilus*.

En el estudio fitoquímico, fue implementada una técnica de extracción sólido-líquido (soxhlet) con diferentes solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol) y técnicas de separación como: cromatografía en columna (sílica gel) y cromatografía en capa fina. Para la identificación de los metabolitos se utilizaron las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) ^1H y ^{13}C de 1D y 2D, y DEPT, además de espectrometría de masas. A partir del extracto de metanol se logró aislar e identificar una mezcla de disacáridos: α y β -laminaribiosa. Del extracto de diclorometano se lograron aislar dos ésteres de α y β -amirina, un triglicérido 1,3-dilinolenil-2-linoleil-glicerol y un diterpeno del tipo espirocoleona 3-acetil-7-etoxi-barbatusina.

Se realizó la decocción de las hojas secas de *P. neochilus*, proceso del cual se obtuvo el extracto acuoso posteriormente liofilizado, con el que se realizaron los distintos estudios farmacológicos. Se realizaron ensayos preclínicos con ratones CD-1 evaluando: la toxicidad aguda, obteniendo una $DT_{50} = 1.87$ g/Kg (1.547 – 2.191) no presentando muertes a la más alta dosis; la actividad analgésica, a través de tres modelos experimentales (método químico, térmico y prueba de formalina) mostrando una actividad antinociceptiva relacionada con mecanismos a nivel del sistema nervioso periférico y central, siendo esta actividad dependiente de la dosis y de mayor significancia a 0.935 g/Kg. Se evaluó la actividad citotóxica sobre células humanas neoplásicas de neuroblastoma SH-SY5Y, mostrando leve citotoxicidad a 10, 50, 100 y 500 μ g/mL del extracto acuoso. La actividad antioxidante fue determinada por métodos de atrapamiento de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, siendo ambos efectos dependientes de la dosis y presentando porcentajes de atrapamiento de $O_2^{\cdot -}$ de 19.67 % y de H_2O_2 de 17.10 % a 400 μ g/mL del extracto acuoso.

Palabras clave: *Plectranthus*, *neochilus*, Lamiaceae, fitoquímica toxicidad aguda, analgesia, citotoxicidad, antioxidante, SH-SY5Y, superóxido, peróxido de hidrógeno.

LISTA DE ABREVIATURAS (ACRONIMOS) Y SIMBOLOS

Abs	Absorbancia
AcCN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de Etilo
ASA	Ácido acetilsalicílico
CC	Cromatografía de columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CCP	Cromatografía de capa preparativa
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CH₂Cl₂	Diclorometano
CHCl₃	Cloroformo
dd	doblete de doblete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización)
DMSO	Dimetilsulfoxido
DMSO-d₆	Dimetilsulfoxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DT₅₀	Dosis tóxica 50
EAL	Extracto acuoso liofilizado
EM	Espectrometría de masas
g	Gramos
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
n-Hx	Hexano
Hz	Hertz

IC₅₀	Inhibición concentración 50 (Concentración de sustancia que provoca 50% de inhibición enzimática)
IR	Espectrometría de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
KET	Ketoprofeno
L	Litro
m	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
µg	Microgramo
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MOR	Morfina
O₂^{•-}	Anión superóxido
ppm	Partes por millón
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
s	Singlete
t	Triplete
TRA	Tramadol
UV	Espectrometría Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico en ppm

Tabla de contenido

CAPÍTULO I	5
I.1 Familia Lamiaceae	7
I.2 Género <i>Plectranthus</i>	10
I.3 Especies del género <i>Plectranthus</i> naturalizadas en Venezuela	12
I.3.1 <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	13
I.3.2 <i>Plectranthus barbatus</i> Andrews.....	14
I.3.3 <i>Plectranthus verticillatus</i> (L.F.) Druce.....	15
I.3.4 <i>Plectranthus madagascariensis</i> (Pers.) Benth.....	16
I.3.5 <i>Plectranthus ornatus</i> Codd	17
I.4 Empleos medicinales y misceláneos de las especies de <i>Plectranthus</i> existentes en Venezuela.	19
CAPITULO II	23
II.1 Componentes mayoritarios presentes en el género <i>Plectranthus</i>	23
II.1.1 Terpenoides	24
II.1.2 Flavonoides	32
II.2 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de las especies de <i>Plectranthus</i> naturalizadas en Venezuela.	35
II.2.1 <i>Plectranthus barbatus</i> Andrews.....	36
II.2.2 <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	40
II.2.3 <i>Plectranthus madagascariensis</i> (Pers) Benth.....	44
II.2.4 <i>Plectranthus ornatus</i> Codd.....	45
II.2.5 <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	47

JUSTIFICACIÓN	53
CAPITULO III	54
III.1 Objetivo general.	54
III.2 Objetivos específicos.....	54
CAPITULO IV	56
IV.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS SECAS DE <i>Plectranthus neochilus</i>	56
IV.1.1. Equipos	56
IV.1.2 Materiales	56
IV.1.2.1 Solventes	56
IV.1.2.2 Solventes para análisis de RMN	57
IV.1.2.3 Materiales para Cromatografía	57
IV.1.2.4 Reveladores.....	57
IV.1.3 Recolección y tratamiento del material vegetal	58
IV.1.4 Preparación de los extractos de <i>Plectranthus neochilus</i>	58
IV.1.4.1 Preparación del extracto acuoso.....	58
IV.1.4.2 Preparación de los extractos orgánicos	60
IV.1.4.2.1 Extracto de metanol.	63
IV.1.4.2.1.2 Purificación de G10.....	70
IV.1.4.2.2 Extracto de diclorometano	74
IV.1.4.2.2.1 Tratamiento de la extracción con n-C ₆ H ₁₄	75
IV.1.4.2.2.2 Tratamiento del extracto de CH ₂ Cl ₂ remanente	77
IV.2 ESTUDIOS PRE-CLINICOS Y ENSAYOS BIOLOGICOS DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS SECAS DE <i>Plectranthus neochilus</i>	81

IV.2.1 Estudios preclínicos.	81
IV.2.1.1 Material vegetal y preparación del extracto acuoso.	81
IV.2.1.2 Animales experimentales.	81
IV.2.1.4 Procedimiento experimental.....	82
IV.2.1.4.1 Evaluación de la toxicidad aguda y determinación de la DT ₅₀	82
IV.2.1.4.1.1 Evaluación de la toxicidad aguda.....	82
IV.2.1.4.1.2 Determinación de la DT ₅₀	83
IV.2.1.4.2 Estudios Anti-nociceptivos.	83
IV.2.1.4.2.1 Método Químico: Contorsión abdominal inducida por ácido acético.	83
IV.2.1.4.2.2 Método térmico: Estimulo calórico de la cola.	84
IV.2.1.4.2.3 Método de la formalina.....	84
IV.2.2 Ensayos biológicos	85
IV.2.2.1 Material vegetal y preparación del extracto acuoso	85
IV.2.2.3 Procedimiento experimental.....	85
IV.2.2.3.1 Ensayo de citotoxicidad	85
IV.2.2.3.2 Actividad atrapadora de anión superóxido	86
IV.2.2.3.3 Actividad atrapadora de peróxido de hidrogeno.....	88
CAPITULO V	89
V.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS SECAS DE <i>Plectranthus neochilus</i>. 89	
V.1.1 Elucidación del compuesto IV y V	89
V.1.2 Elucidación de los compuestos VI Y VII.....	98
V.1.3 Elucidación del compuesto VIII.	114
V.1.4 Elucidación del compuesto XI.	127

V.2 ESTUDIOS PRE-CLINICOS Y ENSAYOS BIOLOGICOS DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS SECAS DE <i>Plectranthus neochilus</i>.	138
V.2.1 Ensayos preclínicos	138
V.2.1.1 Evaluación de la toxicidad aguda y determinación de la DT ₅₀	138
V.2.1.2 Ensayos antinociceptivos.....	140
V.2.1.2.1 Método Químico: Contorsión abdominal inducida por ácido acético.....	141
V.2.1.2.2 Método térmico	144
V.2.1.2.3 Prueba de formalina.....	145
V.2.1 Ensayos biológicos	148
V.2.1.1 Actividad citotóxica.....	148
V.2.1.2.1 Actividad atrapadora del anión superóxido (O ₂ ⁻) y peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).	150
CAPITULO VI	157
Recomendaciones	158
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160

Índice de figuras

Figura 1. <i>Plectranthus scutellarioides</i> (L.) R.Br. (Lamiaceae). (Nativa del Suroeste de Asia y Malasia.	12
Figura 2. <i>P. amboinicus</i> (L) S.	13
Figura 3. <i>P. barbatus</i> A.....	14
Figura 4. <i>P. verticillatus</i> D.....	15
Figura 5. <i>P. madagascariensis</i> (P) B.	16
Figura 6. <i>P. ornatus</i> C.	17
Figura 7. <i>P. neochilus</i> S.....	18
Figura 8. Unidad de isopreno.	24
Figura 9. Biosíntesis de la unidad isoprénica IPP y DMAPP proveniente de la vía del mevalonato	25
Figura 10. Biosíntesis de distintos tipos de terpenoides vía condensación de unidades isoprénicas	26
Figura 11. Esqueletos de estructuras tipo diterpenoide usualmente reportadas para especies de <i>Plectranthus</i>	27
Figura 12. Esqueleto de flavano, las posiciones 3', 4', 5', 5 y 7 son las posiciones oxigenadas	32
Figura 13. Esquema biosintético de flavonoides	33
Figura 14. Reacción de oxidación de xantina catalizada por xantina oxidasa.	87
Figura 15. Reacción de reducción de NBT a formazán.	87
Figura 16. Modelo de la fragmentación de β -amirina.	113
Figura 17. Porcentaje de animales que presentaron el efecto tóxico “piloerección” en función de la dosis y del tiempo de observación.	139
Figura 18. Porcentaje de animales con el efecto tóxico “piloerección” versus el log de la dosis.....	140

Figura 19. Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de las hojas secas de <i>P. neochilus</i> por el método químico. Los datos son expresados como la media $\pm$ el error estándar de la media. **** $p < 0,0001$ (alta significancia); *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,1$	141
Figura 20. Porcentaje de efecto inhibitorio del extracto acuoso de las hojas secas de <i>P. neochilus</i> sobre la noxa inducida en el ensayo nociceptivo por el método químico, en la evaluación de la actividad analgésica.	143
Figura 21. Porcentaje de efecto inhibitorio del extracto acuoso de las hojas secas de <i>P. neochilus</i> sobre la noxa inducida en el ensayo nociceptivo por el método térmico, en la evaluación de la actividad analgésica	144
Figura 22. Ensayo con formaldehído con el registro del tiempo de lamida promedio ($\pm$ SEM), inmediatamente después de la inyección subcutánea de formalina en la región intraplantar de la pata trasera de los ratones. Ejecución realizada en dos fases: Fase neurogénica.....	146
Figura 23. Porcentaje de actividad citotóxica (mostrado como porcentaje de pérdida de viabilidad celular) respecto a la concentración del EAL.	148
Figura 24. Porcentaje de atrapamiento del anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$).	151
Figura 25. Porcentaje de atrapamiento de H_2O_2 para el extracto acuoso a las concentraciones de 400 y 100 ppm.	153
Figura 26. Absorbancia (Abs) en función de la longitud de onda (λ) en el rango UV del EAL de las hojas secas de <i>P. neochilus</i>	154

Índice de tablas

Tabla 1. Usos medicinales de especies de <i>Plectranthus</i> de Venezuela definidos por categorías	20
Tabla 2. Otros usos de las especies de <i>Plectranthus</i> de Venezuela	22
Tabla 3. Flavonoides tipo flavonas aislados del género <i>Plectranthus</i>	34
Tabla 4. Flavonoides tipo flavonol aislados del género <i>Plectranthus</i>	35
Tabla 5. Respuesta de los distintos ensayos de identificación de la composición de los fracciones orgánicas del extracto acuoso liofilizado de <i>P. neochilus</i>	60
Tabla 6. Masas de extractos obtenidos por técnica de extracción con soxhlet.....	61
Tabla 7. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. Extracto MeOH.....	63
Tabla 8. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. Extracto MeOH.	64
Tabla 9. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. G9.....	65
Tabla 10. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. G9.....	66
Tabla 11. Masa de regiones obtenidas en CPP. sG7.	66
Tabla 12. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. sG7.B - sG7.D.....	67
Tabla 13. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. sG7.B - sG7.D.	67
Tabla 14. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. Fracción 3.....	68
Tabla 15. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. f (20-47).....	68
Tabla 16. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. G10.....	70
Tabla 17. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. G10.....	71
Tabla 18. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. sG5.	71
Tabla 19. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. sG5	72
Tabla 20. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y volumen utilizado. Ext n- C_6H_{14}	75
Tabla 21. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. Ext n- C_6H_{14}	76

Tabla 22. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y volumen utilizado.	78
Tabla 23. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. CH ₂ Cl ₂ remanente.	78
Tabla 24. Masa de regiones obtenidas en CPP. G8	79
Tabla 25. Desplazamientos químicos, RMN de ¹ H (DMSO-d ₆) de los compuesto IV y V comparados con los datos de la literatura (Mattias U. Roslund y col. (2007)). R: extraído de la referencia.....	96
Tabla 26. Desplazamientos químicos, RMN de ¹³ C (DMSO-d ₆) de los compuesto IV y V comparados con los datos de la literatura (Mattias U. Roslund y col. (2007))......	96
Tabla 27. Desplazamientos químicos, RMN de ¹ H (CDCl ₃) de los Compuestos VI y VII comparados con datos de literatura. R: señales reportadas. C: compuesto.	109
Tabla 28. Desplazamientos químicos, RMN de ¹³ C (CDCl ₃) de los Compuestos VI y VII comparados con datos de literatura. R: señales reportadas. C: compuesto.	109
Tabla 29. Señales obtenidas por RMN ¹ H, multiplicidad y acoplamiento para el compuesto VIII.	124
Tabla 30. Comparación de las señales de RMN ¹³ C y DEPT 135 para el compuesto VIII	124
Tabla 31. Comparación de las señales de RMN ¹³ C y DEPT 135 para el compuesto XI. . R: referencia.....	136
Tabla 32. Señales obtenidas por RMN ¹ H, multiplicidad y acoplamiento para el compuesto XI	137
Tabla 33. Diferencial de absorbancias para los diferentes ensayos y porcentaje de atrapamiento.	152

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las prácticas etnobotánicas han sido ampliamente utilizadas por la población en diferentes etnias y pueblos tribales desde épocas antiguas. Estas prácticas evolucionaron a través del empirismo humano, considerando aquellos efectos provocados por el ambiente vegetal sobre la cultura, creencias e historia de los pueblos. El uso de raíces, tallos, hojas o inflorescencias de las plantas consideradas medicinales, ha sido de utilidad para prevenir, aliviar o tratar alteraciones en la salud, atacando patologías de diversas enfermedades como gripe, resfriados y tos, asma, problemas gastrointestinales, entre otras ^[1].

Sobre la base de principios etnobotánicos, se han impulsado investigaciones con objetivos fundados en la evaluación de las propiedades medicinales de las plantas, y la identificación de los componentes responsables de estas. La química de los productos naturales expone un enfoque especializado más allá de las interacciones planta – hombre, tratando el aislamiento y caracterización de compuestos presentes en las plantas, denominados metabolitos secundarios. Aunque estos metabolitos no cumplen funciones aparentes en ellas, pueden tener participación en funciones de protección, o funciones de promuevan el ciclo reproductivo de las plantas ^[2].

Junto con el estudio de los metabolitos secundarios, parte la caracterización quimiotaxonómica de las plantas, observando que existen familias de plantas con perfiles fitoquímicos de vasta aplicabilidad en campos como el medicinal; esto se debe a la presencia de ciertos metabolitos que muestran actividades biológicas, como la

antioxidante, por ejemplo. Tal es el caso de algunos miembros de la familia Lamiaceae que poseen esta propiedad, debido a la presencia de compuestos polifenólicos ^[3].

Dentro de la Familia Lamiaceae se encuentra un género naturalizado en el continente americano proveniente de África, denominado *Plectranthus*, cuyas especies suelen ser suculentas y aromáticas. Dicho género es empleado en diversos campos tales como, medicinal, agropecuario, culinario, ornamental, entre otros. En Suramérica, especialmente en Brasil, se encuentra la más grande reserva de este género; mientras que en Venezuela se reconocen actualmente sólo seis especies, a saber: *Plectranthus barbatus* Andrews, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., *Plectranthus verticillatus* (L.f.) Druce, *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br., *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth. y *Plectranthus neochilus* Schltr. Adicionalmente, hay algunos reportes en viveros de *Plectranthus saccatus* Benth. var. *longitubus* Codd y otras menciones de *Plectranthus ornatus* Codd, probablemente como identificación errónea de *P. neochilus*. De las especies mencionadas, *P. amboinicus* (“orégano orejón”) y *P. barbatus*, han sido las especies mayormente estudiadas y empleadas en la medicina tradicional, para elaborar preparados o fitofármacos; *P. verticillatus*, *P. scutellarioides* y *P. madagascariensis*, son básicamente ornamentales y poseen pocos o ningún uso registrado para el tratamiento de enfermedades. La especie *P. neochilus*, no presenta estudios fitoquímicos o farmacológicos en Venezuela; sin embargo, en referencias de origen suramericano se destaca, por ejemplo, que el análisis del aceite esencial resulta rico en terpenoides, y estudios electroforéticos comparativos con otras especies del género *Plectranthus*. *P. neochilus* popularmente ha sido usada en el alivio de los síntomas de resfriados, fiebre, tensión muscular, dolor corporal y el tratamiento de la fiebre Chikungunya ^[4]. Por lo tanto se propone estudiar el extracto acuoso liofilizado de las hojas secas de *P. neochilus*, evaluando toxicidad y actividad analgésica, así como aislar y caracterizar metabolitos secundarios presentes en la misma.

I.1 Familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae, conocida anterior y alternativamente como Labiatae, es una familia de plantas con flores del orden Lamiales. Su nombre proviene de la forma de labios que tienen sus flores y cuenta con unos 250 géneros distribuidos en siete subfamilias: Ajugoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Prostantheroideae, Scutellarioideae, Symphorematoideae y Viticoideae. Se encuentran identificadas alrededor de 7.000 especies taxonómicamente admitidas, y con ello esta familia se considera una de los mayores grupos del actual Reino Plantae ^[5,6].

Se incluyen en esta familia principalmente, arbustos y plantas herbáceas que presentan tallos de sección tetragonal, hojas opuestas o verticiladas, sésiles o pecioladas, sin estípulas; flores hermafroditas, zigomorfas, con un cáliz de 5 sépalos soldados, corola con 5 pétalos, generalmente bilabiada, y distribuidas de forma característica al final de un largo tallo formando verticilastros; crecen normalmente sobre suelos calizos o calizos-dolomíticos ^[7,8].

Las plantas de la familia Lamiaceae se consideran cosmopolitas, es típico encontrarlas en regiones sujetas a climas cálidos estacionales, especialmente en áreas rocosas abiertas, en matorrales y lechos del río, en regiones tropicales y subtropicales, como hábitat montañoso; en regiones templadas son encontradas en bosques, y otras son típicas de áreas semiáridas ^[9]. Es usual encontrarlas en zonas abiertas como por ejemplo la cuenca del Mediterráneo y el suroeste de Asia, siendo estas regiones los lugares con mayor población. Aunque la distribución de esta familia es amplia, existen excepciones para las zonas polares (ártica y austral) y los desiertos severamente

extremos. En América de Sur, su principal representación se encuentra en Brasil. En Argentina existen 25 géneros y 87 especies ^[9]. En Cuba, existen 19 géneros de la familia Lamiaceae, pero existen pocos estudios dedicados a estos, entre los que se encuentran: *Ocimum*, *Mentha*, *Salvia*, *Plectranthus*, *Scutellaria*, *Melissa* y *Origanum* ^[10]. En Venezuela la familia Lamiaceae consta de 26 géneros y alrededor de 120 especies ^[11]. En una visión global, los géneros con mayor número de especies son: *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Plectranthus*, *Hyptis*, *Teucrium*, *Thymus*, *Nepeta*, *Sideritis*, *Leucas*., *Prostanthera* y *Phlomis*., considerando la agrupación entre ellos de alrededor de 3350 especies ^[7].

A la familia Lamiaceae pertenecen la menta, tomillo, albahaca, hierbabuena, poleo, la salvia y el mastranto, se conocen por ser hierbas o arbustos a menudo aromáticos ^[11,12]. Están provistas en todas sus partes de glándulas secretoras por las que exudan una gran cantidad de aceites esenciales volátiles, y su composición resulta diversa dentro de la familia ^[13]. Estos aceites esenciales les otorgan una resistencia notable a la deshidratación.

Algunas de las especies de esta familia han sido usadas en la medicina tradicional y oficial, y son reportadas en diversos trabajos de investigación con basamentos fitoquímicos y evaluaciones de sus propiedades farmacológicas y aplicabilidad terapéutica ^[14]. Sin embargo, son pocas las referencias bibliográficas que tratan las actividades biológicas de muchas de las especies. Entre los aspectos importantes de estas investigaciones, están las referencias que destacan la presencia de metabolitos secundarios como los compuestos polifenólicos, los cuales poseen sustanciales actividades biológicas como la capacidad de captación de radicales libres, es decir, propiedades antioxidantes ^[15,16], comúnmente atribuidas a especies como: el romero, la

salvia, el tomillo, el orégano y la albahaca. Esas propiedades juegan un papel crucial en la quimioprevención de las enfermedades neoplásicas y degenerativas ^[14].

Parte de los estudios fitoquímicos realizados a las Lamiaceae, destacan la presencia de metabolitos secundarios como terpenos. Adicionalmente, en una recopilación general de los tratados fitoquímicos hechos a distintas especies de esta familia, se logran diferenciar metabolitos donde se incluyen además de los terpenoides grupos como: flavonoides, ácidos grasos y componentes en el aceite esencial como taninos y saponinas. En algunos casos, estas sustancias actúan como inhibidores de crecimiento de otras especies, siendo este fenómeno denominado alelopatía ^[17].

Diversas especies de Lamiaceae han sido con frecuencia cultivadas para ser utilizadas en el ámbito medicinal, al poder aprovecharse usos como: antimicrobiano, espasmolítico, carminativo, hepatoprotector, antiviral, sedante, diurético y antiséptico. Como ejemplo, el alcohol de romero (*Rosmarinus officinalis*) es todavía de uso corriente en el Mediterráneo para numerosas afecciones no sangrantes (trastornos circulatorios y contusiones), así como la menta (*Mentha piperita*) para tratamientos antirreumáticos ^[13,16,17]. Además de este campo, dicha familia se abre hacia la industria de la perfumería (como en la extracción de esencia de lavanda en la elaboración de fragancias), culinaria (como condimento) y fines hortícolas (dirigidos en parte a usos ornamentales). También se emplean por ser especies de plantas aromáticas en la fitoterapia, para ahuyentar polillas con hojas y flores secas de algunas especies y llegan a tener también extraños efectos embriagantes en gatos (*Nepeta cataria*) ^[12].

I.2 Género *Plectranthus*

De los géneros que la familia Lamiaceae inviste, algunos se han destacado por su diverso compendio de especies, pero se pretende focalizar el estudio sobre el género *Plectranthus* (*Coleus*). La connotación *Plectranthus* tiene sus raíces de los vocablos griegos, “Plektron” (espolón, espuela) y “Anthos” (flor) ^[18].

El género *Plectranthus* está constituido por plantas perennes. Muchas especies de *Plectranthus* tienen alturas que van de los 15 cm hasta unos 1,2 m, pequeñas inflorescencias de color azul a púrpura, consideradas suculentas. Este género es originario de África, Madagascar, Asia, Australia y las islas del Océano Pacífico. Algunas de las especies de *Plectranthus* nativas africanas fueron probablemente adoptadas en Suramérica al ser insertadas después de los viajes de los descubridores pioneros portugueses en el siglo XVI, siendo algunos utilizados, por ejemplo, en la medicina tradicional Brasileña ^[19]. Hoy en día, las plantas de este género son conocidos en todo el mundo, sus usos hortícolas son popularizados, y por su rápido crecimiento, peculiares aromas y resistencia a la mayoría de las plagas y enfermedades de las plantas, le otorgan carácter ornamental ^[20,21].

Se obtuvo la primera descripción realizada al género *Plectranthus* L. Hé.r. siendo llevada a cabo por el Botánico Francés Charles Louis L. Hé.ritier de Brutelle, quien publicó el estudio en 1784-1785 ^[22]. Se conoce como un género de carácter prolífico perteneciente a la subfamilia Nepetoideae, tribu Ocimeae y subtribu Plectranthinae ^[19]. Es un género ampliamente explotado, y se encuentran muchas veces desarmonías de nomenclatura y sinonimias, que no permiten la recopilación de datos precisos sobre el mismo sin dificultad ^[23].

El género *Plectranthus* presenta aspectos interesantes en ámbitos como: económico, ornamental y medicinal, con una amplia gama de usos etnobotánicos, algunos no comprobados. Diferentes especies del género *Plectranthus* aprovechan culinariamente como saborizantes en alimentos, aditivo fragante en perfumería, algunos otros utilizados como tratamiento de vómitos y náuseas, enfermedades respiratorias, cefaleas, úlceras y quemaduras o como antiséptico, purgante, antimicrobianos y afrodisiacos en algunas culturas ^[24].

Debido a las propiedades conferidas a las plantas del género *Plectranthus*, se produce la apertura a investigaciones de índole fitoquímico y farmacológico trabajando en el aislamiento de metabolitos secundarios, con el fin de acertar con los componentes que presentan actividades biológicas como: antipiréticas, antimicrobianas, antivirales, entre otras, validando los usos populares de dichas especies. Tras investigaciones previas, se identificaron componentes que cumplían función antimicrobiana, referenciados en los estudios de perfiles fitoquímicos practicados sobre distintas especies del género como: *Plectranthus mollis* y *Plectranthus amboinicus* ^[25,26]. La mayoría de los compuestos aislados del género *Plectranthus* son metabolitos con estructuras tipo diterpeno, triterpeno, flavonoides y ácidos grasos. Dichos metabolitos tienen un importante desempeño, siendo participes activos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en la resistencia al estrés ambiental, lo cual es de interés quimiotaxonómico ^[27]. El género *Plectranthus* posee una gran cantidad de especies, de las cuales solo se hará mención de un limitado grupo que ha sido naturalizado en Venezuela.

1.3 Especies del género *Plectranthus* naturalizadas en Venezuela

En Venezuela, existe un conjunto de especies del género *Plectranthus* de las cuales se evidencian pocos estudios fundamentados en la evaluación de las propiedades potenciales en la medicina tradicional. Las especies de *Plectranthus* que han sido reconocidas actualmente en el territorio nacional son: *Plectranthus barbatus* Andrews, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, *Plectranthus verticillatus* Druce, *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br (Figura 1), *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth, *Plectranthus ornatus* Codd y *Plectranthus neochilus* Schl. Se han realizado diversos estudios de interés farmacológico y fitoquímico para la mayoría de las especies mencionadas, obteniendo la validación de algunos los usos tradicionales atribuidos a estas especies; otras especies han sido empleadas deliberadamente en el tratamiento de malestares que aquejan la salud, por ejemplo, el uso más reciente de *Plectranthus neochilus* (“acetaminofén”) en el tratamiento de la fiebre Chikungunya, a pesar de no tenerse estudios farmacológicos que corroboren sus efectos analgésicos; adicionalmente, otras especies se han limitado a ser de uso decorativo en interiores y cubrimientos (ornamentales). Se presentan a continuación algunas de las características de las especies del género *Plectranthus* en Venezuela.



Figura 1. *Plectranthus scutellarioides*. (Nativa del Suroeste de Asia y Malasia.

I.3.1 *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng. (Figura 2), anteriormente conocida como como *Coleus amboinicus* Lour., *Majana amboinica* (Lour.) Kuntze, *Coleus aromaticus* (Roxb.) Benth., etc. Tiene nombres comunes como: Orégano Francés, Orégano Orejón. Es considerada nativa de las regiones tropicales de Asia Oriental y fue introducida en Cuba, otras Antillas y algunos países de América. Es una hierba perenne y decumbente, succulenta, grandemente aromática y de tipo sub-arbusto, llega a alcanzar unos 50 cm de altura; posee hojas anchamente ovaladas de bordes dentados, peciolo gruesos y flores violáceas en espigas terminales con fuerte olor característico a orégano [26]. Es una planta que presenta una gran cantidad de propiedades terapéuticas como: anticonvulsivas, antiepilépticas, antiasmáticas, antiespasmódicas, sedantes, broncodilatadoras y antimicrobianas [27, 28].



Figura 2. *P. amboinicus*.

1.3.2 *Plectranthus barbatus* Andrews.

Plectranthus barbatus Andrews (Figura 3), previamente conocida como como *Coleus barbatus* (Andrews) Benth., *Plectranthus forskohlii* Willd., *Coleus forskohlii* (Willd.) Briq. *Plectranthus comosus* Sims, etc. Es conocida por nombres como: Coleo Indio, Boldo. Es probablemente originaria de África y ampliamente cultivada en todo Brasil, posteriormente naturalizada en otras regiones colindantes, es comúnmente utilizada como planta medicinal por sus propiedades analgésicas y antidiarréicas [27]. *Plectranthus barbatus* es un arbusto perenne, erecto, aromático, semi-suculento, 1-2 m de alto, fibroso, con tallos cuadrangulares, sin base tuberosa; hojas ovadas, borde crenado y ampliamente elípticas, 9-15 x 5,5-10 cm, usualmente pubescentes, inflorescencias dispuestas en racimo, entre 15–30 cm de longitud, carnosas, de color purpura o azul pálido [29,30].



Figura 3. *P. barbatus*.

I.3.3 *Plectranthus verticillatus* (L.f.) Druce.

Plectranthus verticillatus (L.f.) Druce (Figura 4), anteriormente conocida como *Ocimum verticillatum* L.f., *Plectranthus nummularius* Briq., *Plectranthus thunbergii* Benth., etc. Nombres comunes: planta del dinero, planta de dólar, hiedra sueca, millonaria. Es originaria de Sudáfrica, crecen principalmente en las provincias del Cabo, KwaZulu-Natal, Swazilandia, las provincias del norte y el sur de Mozambique. Está naturalizada en El Salvador, Honduras, Islas de Sotavento, Islas de Barlovento, Venezuela, Puerto Rico, Hawaii, así como al sur-este de Queensland y las zonas costeras de Nueva Gales del Sur Australiano ^[31,32]. Esta es una planta perenne de pequeñas dimensiones, su altura no supera los 30 cm, de raíces fibrosas y ramas semi-suculentas, glabras, postradas y ascendentes. Sus hojas son suculentas y ovaladas de 1,6–5 cm x 1,2-5 cm; ápice agudo redondo, margen crenado, carnosa, pilosas al reverso. Poseen inflorescencias de unos 7 mm de largo, color blanco o lila claro ^[27]. También es considerada ornamental.



Figura 4. *P. verticillatus*.

I.3.4 *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth.

Plectranthus madagascariensis (Pers.) Benth. (Figura 5), anteriormente conocido o mal identificado como *Plectranthus coleoides* Benth., *Plectranthus forsteri* Benth., etc.. Tiene por nombre común: incienso. Es una especie ampliamente distribuida a través del oriente hasta el meridional africano, y cultivada luego en Europa como planta ornamental por su aroma ^[33]. Es una hierba aromática perenne, pubescente, de porte colgante. Destaca por su compacto follaje, de hojas ovaladas y carnosas de color verde oscuro o verde grisáceo en su parte central y blanco en sus bordes, y desprende un suave aroma al frotarlas ^[34]. Esta planta muestra actividad antibacterial y efecto insecticida ^[35]. La resina del incienso se obtiene por destilación de arrastre de vapor, y éste es la base para el incienso común, que se mezcla con elementos incinerantes para que se produzca combustión completa ^[36].



Figura 5. *P. madagascariensis*.

I.3.5 *Plectranthus ornatus* Codd

La especie *Plectranthus ornatus* Codd también llamada *Coleus comosus* Hochst (Figura 6). Tiene por nombre común: Boldo Paraguayo. Es una es una hierba perenne, suculenta, con propiedades aromáticas que destacan por su fragancia poco agradable, crece sobre rocas en semi-sombra. Esta especie es originaria de la India occidental y ampliamente distribuida en todo el mundo, mostrándose naturalizada en África Austral y estudiada por el botánico Codd en 1985. La especie *Plectranthus ornatus* ha sido naturalizada e implementada también en la medicina tradicional paraguaya y brasileña. A veces esta especie es confundida con la especie *Plectranthus neochilus* Schld debido a sus similitudes morfológicas, lográndose diferenciar por el tamaño de las inflorescencias, siendo las espigas de la especie *Plectranthus ornatus* Codd más alargadas ^[37]. El uso arbitrario de esta planta en la preparación de infusiones conlleva a intoxicación en las personas que las consuman. La especie *Plectranthus ornatus* Codd ha sido confundida con *P. neochilus* debido a sus similitudes morfológicas, lográndose diferenciar sólo por el tamaño de las inflorescencias y flores. El uso arbitrario de esta planta en la preparación de infusiones conlleva a intoxicación en las personas que las consuman (artículo). Aún no se ha observado esta planta en flor en Venezuela, por lo cual no se puede confirmar su presencia.



Figura 6. *P. ornatus*.

I.3.6 *Plectranthus neochilus* Schltr.

La especie *Plectranthus neochilus* Schltr. (Figura 7), puede recibir sinónimos como *Coleus neochilus* o *Coleus schinzii*. Posee nombres comunes como: “boldo rastrero”, “espanta mascotas”, “acetaminofén”. Se trata de una hierba perenne aromática suculenta, de muy rápido crecimiento, no sobrepasa los 50 cm de altura, se reproduce velozmente generando buenos cubrimientos. Sus hojas son redondeadas, ligeramente onduladas y de color gris verdoso. Producen flores pequeñas en forma de espiga, de color azul púrpura al violeta. Esta especie como muchas otras del género, se distinguen por preferir los ambientes cálidos para su óptimo desarrollo. Manifiesta una gran resistencia a la sequía y a las heladas moderadas. La especie *Plectranthus neochilus* Schltr ha sido utilizada en la medicina popular como tratamiento para diversas enfermedades como por ejemplo afecciones del hígado y dispepsia, al mostrar efectos positivos en la erradicación sintomatológica de estas ^[38]. Entre otros de los usos populares de la *P. neochilus*, se ha tomado como medida para ahuyentar ofidios de los hogares, aprovechando probablemente el aroma penetrante de la planta ^[27].



Figura 7. *P. neochilus*.

I.4 Empleos medicinales y misceláneos de las especies de *Plectranthus* existentes en Venezuela.

Hasta principios del siglo XX y finales de siglo XIX el uso de plantas para la aplicación de tratamientos terapéuticos frente a necesidades de atención primaria de la salud, representó una práctica de más del 80% de la población mundial según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), especialmente en los países en desarrollo donde estas prácticas han sido desarrolladas tanto en comunidades urbanas como rurales ^[39]. El enfoque etnobotánico, entre otras cosas, permite investigar y analizar el uso de plantas con fines terapéuticos de una determinada población, así como entender la historia y la relación del hombre con estas plantas ^[40]. La contribución de la investigación etnobotánica es de importancia en el desarrollo de nuevas formas de explotación de los ecosistemas, generando beneficios debido la promoción del uso de los recursos.

El uso más frecuente para la mayoría las especies del género *Plectranthus* radica en el aprovechamiento de sus propiedades medicinales, tal como se puede observar posteriormente un breve compilado de propiedades para las especies de *Plectranthus* en Venezuela (Tabla 1). Se muestran adicionalmente en la Tabla 2, algunos de los usos para estas especies en áreas como: horticultura, agronomía, ornamental, alimenticia y otras.

Tabla 1. Usos medicinales de especies de *Plectranthus* de Venezuela definidos por categorías [23,40].

Especie	Ubicación geográfica	Categorías Médicas					
		Digestiva	Cutánea	Respiratoria	Infecciones/Fiebre	Génito/Urinario	Dolor
<i>P. amboinicus</i>	Norte, Este y África Central, Asia, Suramérica, Caribe y Pacífico	Tratamiento de la dispepsia, indigestión, diarrea y como carminativo	Tratamiento de quemaduras, heridas, llagas, picaduras de insectos y alergias. Como anti-inflamatorio, cura de sarampión, efectos anti-envejecimiento, inhibición de anafilaxis cutánea	Tratamiento de la tos crónica, el asma, la bronquitis y el dolor de garganta, infecciones catarrales y asma, tiene actividad broncodilatadora y contra tuberculosis	Tratamiento de fiebre, cura de cólera, actividad antimicrobiana, antiviral contra el virus del herpes simple-1, actividad inhibitoria anti-VIH	Tratamiento de enfermedades urinarias, alivia problemas renales, descargas vaginales y se bebe después del parto	Tratamiento de los dolores de cabeza, abdominal y de cuello rígido
<i>P. barbatus</i>	Norte, Este, África Central, Asia, Suramérica	Tratamiento de dolor de estómago y náuseas, gastritis y espasmos intestinales, trastornos de dientes y encías	Tratamiento de quemaduras, heridas, llagas, picaduras de insectos y alergias	Alivia resfriados, tos, neumonía y las dolencias respiratorias generales	Trata infecciones de la garganta y la boca, amigdalitis, infecciones gastrointestinales, genitourinarias, trata la malaria, tiene actividad antibacteriana, antiviral y antifúngico	Tratamiento de la sífilis, emenagogo y abortivo orales o anticonceptivos, uso como afrodisíaco	Tratamiento del dolor gástrico y espasmódico, dolor abdominal, micción dolorosa, dolores musculares y dolor generalizado
<i>P. madagascariensis</i>	Oriente y meridional africano, Europa, Sudamérica		Tratamiento de la sarna y las pequeñas heridas	Tratamiento de resfriados, tos y pecho obstruido			
<i>P. verticillatus</i>	Sudáfrica, centro y Suramérica, Australia		Efecto no específicos	Efectos no específicos			
<i>P. neochilus</i>	Originario de África, naturalizado en Suramérica	Tratamiento de la dispepsia, desorden gastrointestinal. Insuficiencia hepática	Infecciones cutáneas	Tratamiento en infecciones respiratorias	Actividad antibacteriana y antifúngica. Tratamiento para la fiebre		Tratamiento del dolor (no especificado)

Tabla 7. Continuación. Usos medicinales de especies de *Plectranthus* de Venezuela definidos por categorías ^[23.40].

Especie	Ubicación geográfica	Categorías Medicinales					
		Circulación	Sistema nervioso	Sensorial	Antídotos	Inflamación	No-específico
<i>P. amboinicus</i>	Norte, Este y África Central, Asia, Suramérica, Caribe y Pacífico	Falla cardíaca congestiva.	Casos de epilepsia y convulsiones y meningitis.	Tratamiento de otitis aguda edematosa y en el alivio de la conjuntivitis	Actividad citotóxica y antitumoral. Actividad sinérgica sobre tratamientos anticancerosos.	Previene y/o alivia la inflamación.	Usos varios en la medicina del sudeste asiático.
<i>P. barbatus</i>	Norte, Este, África Central, Asia, Suramérica	Tratamiento del corazón, la circulación, la mialgia, angina de pecho, hipertensión.	Tratamiento complementario sobre problemas psiquiátricos. Tratamiento del insomnio y convulsiones.	Fuente reconocida de agentes antiglaucoma.	Actividad citotóxica y anti-tumoral. Actividad sinérgica sobre tratamientos anticancerosos. Estimulante del sistema inmune y es utilizado contra mordeduras de serpiente.	Previene y/o alivia la inflamación.	Usos varios en la medicina del sudeste asiático.
<i>P. madagascariensis</i>	Oriente y Meridional africano, Europa, Sudamérica						Usos varios en la medicina africana.

Tabla 2. Otros usos de las especies de *Plectranthus* de Venezuela ^[23, 40].

Especie	Categorías varias							
	Venenos	Ornamental	Protección del terreno	Fertilizantes	Alimentos y Aditivos	Alimento de animal	Materiales	Otros usos
<i>P. amboinicus</i>	Consumo en dosis altas produce intoxicación	Planta de jardín, decorativo de ambiente urbano.			Hojas en bolas de harina. En rellenos de alimentos, para la condimentación, y enmascarar el olor de los olores fuertes		A menudo se frotan en el cabello y el cuerpo después del baño por el perfume de las hojas	Se ofrece a los espíritus cuando se está construyendo una casa. Se usa como repelentes de insectos
<i>P. barbatus</i>	Sus hojas producen intoxicación en gran cantidad	Indicadores de fertilidad de suelo.	Previene de la erosión del suelo	Fabricación de abono.	Se cocinan como verduras Las hojas.	Alimento de ovejas, cabras y el ganado en general.	Tejido sanitario tanto las hojas y tallos se utilizan para acelerar la maduración de los plátanos	
<i>P. madagascariensis</i>		Indicadores de fertilidad de suelo.	Cobertura del suelo					Se usa como repelentes de insectos
<i>P. verticillatus</i>		Planta de jardín. Indicadores de fertilidad de suelo.	Cobertura del suelo					
<i>P. neochilus</i>		Planta decorativa	Protector de suelos por rápidos cubrimientos.					Repelente de insectos y antifúngico

CAPITULO II

ANTECEDENTES

Los antecedentes relacionados a los estudios fitoquímicos de la especie *Plectranthus neochilus* se muestran escasos, encontrándose casi únicamente investigaciones realizadas sobre el aceite esencial de dicha especie ^[41-44], además de los pocos estudios fitoquímicos realizados a los extractos orgánicos de las hojas de esta planta ^[18]. La mayor parte de las investigaciones han sido realizadas sobre un índole etnofarmacológico, entre las que pueden mencionarse, evaluaciones de las distintas actividades biológicas como: antimicrobianas, antifúngicas o tratamientos para infecciones en su mayoría respiratorias y problemas hepáticos ^[45-47], entre otras. Al no disponer de estudios realizados en Venezuela, y suficientes referencias de investigaciones fitoquímicas en general sobre *P. neochilus*, se utilizan investigaciones previas sobre las distintas especies de *Plectranthus* ubicadas en nuestro país, con el fin de tener un punto de referencia de posibles resultados probablemente similares al compartir el mismo género.

II.1 Componentes mayoritarios presentes en el género *Plectranthus*

A través de múltiples estudios fitoquímicos de especies del género *Plectranthus*, se logra realizar una compilación de los distintos metabolitos encontrados en este género. El género *Plectranthus* cuenta con más de 200 componentes aislados y caracterizados por técnicas espectroscópicas y espectrométricas, reportándose como mayoritarios metabolitos del tipo terpenoide y flavoniode. Han sido identificados cerca de 140 diterpenoides, lo que los convierte en el principal grupo de metabolitos secundarios del género ^[48].

II.1.1 Terpenoides

Son parte de una clase de metabolitos secundarios que presentan una gran variedad estructural, fueron considerados tradicionalmente como derivado de 2-metil-1,3-butadieno (C5: isopreno) (Figura 8). La formación de terpenos se rige por lo conocida *regla del isopreno*, para la cual la secuencia de átomos que estructuran el terpeno es tal que pueden diferenciarse las unidades concatenadas de isopreno. Estudios sobre la biosíntesis de los precursores de terpenos han revelado una ruta que sigue la vía del ácido mevalónico (MVA), logrando esto a través de condensaciones aldólicas de unidades de acetil coenzima A (Acetil CoA) ^[2], Tal como se muestra en la Figura 9.

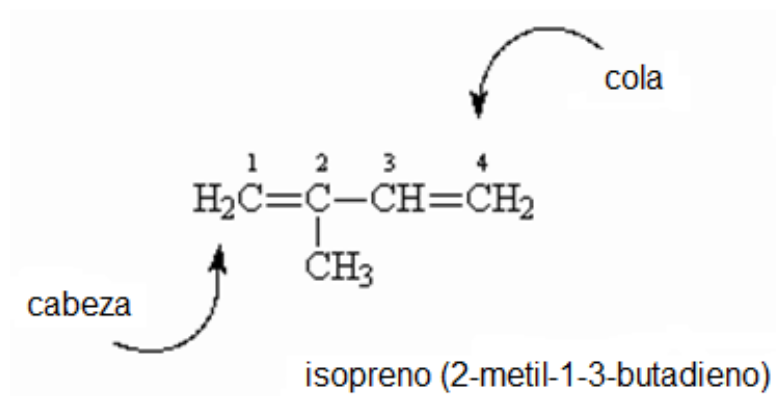


Figura 8. Unidad de isopreno.

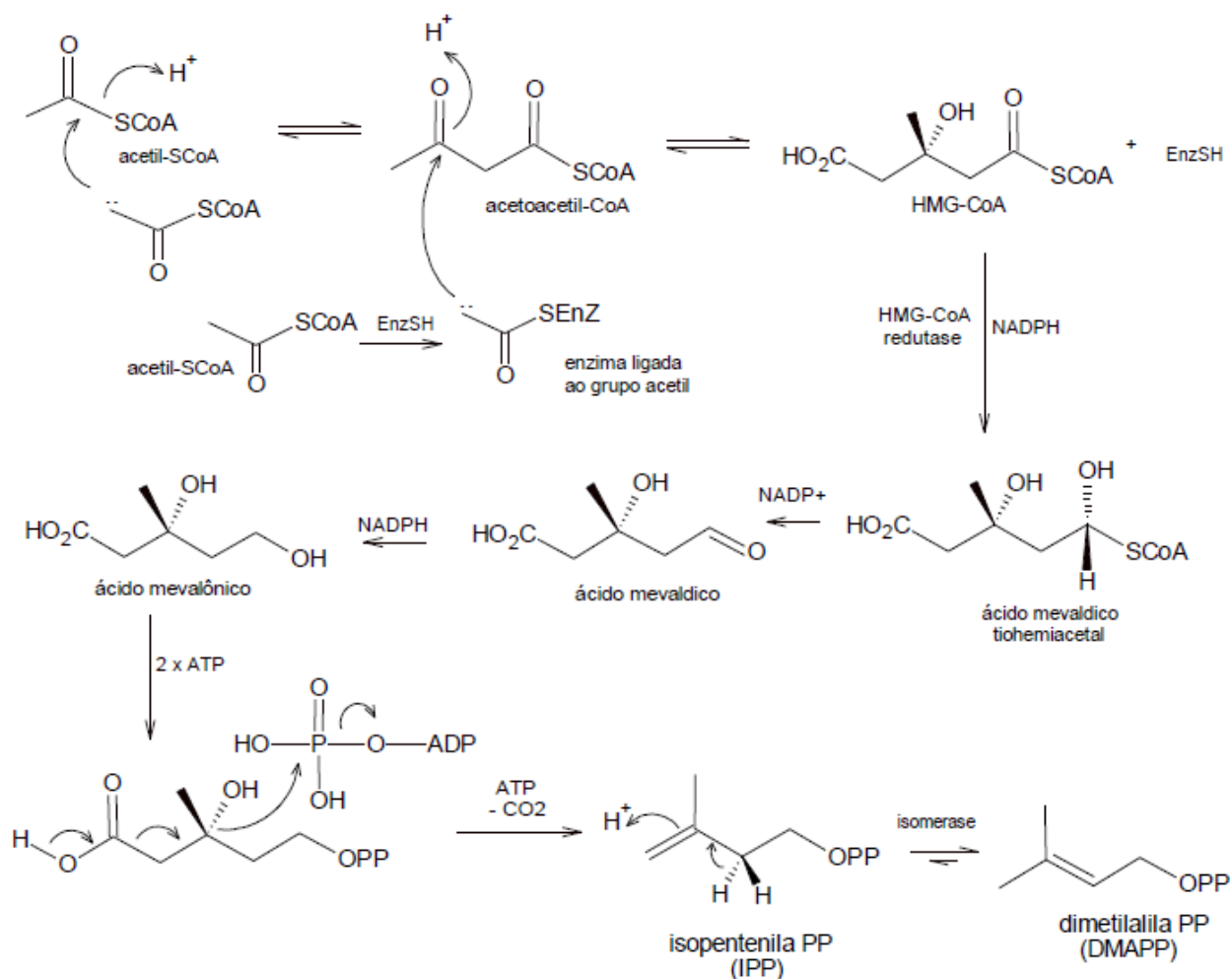


Figura 9. Biosíntesis de la unidad isoprénica IPP y DMAPP proveniente de la vía del mevalonato ^[18]

Se considera entonces los siguientes aspectos: las estructuras terpénicas son el resultado de las sucesivas condensaciones de unidades de isopreno, siendo estas producidas debido al carácter nucleofílico del enlace doble del IPP actuando en las uniones consideradas como “cabeza-cola”; Al principio de la síntesis, la formación de geranilpírofosfato (GPF) responsable de los monoterpenos y el farnesilpírofosfato (FPF)

En la Figura 11 se muestran estructuras de diterpenos encontradas en especies del género *Plectranthus* como: labdano (I) clerodano (II) caurano (III) y abietano (IV).

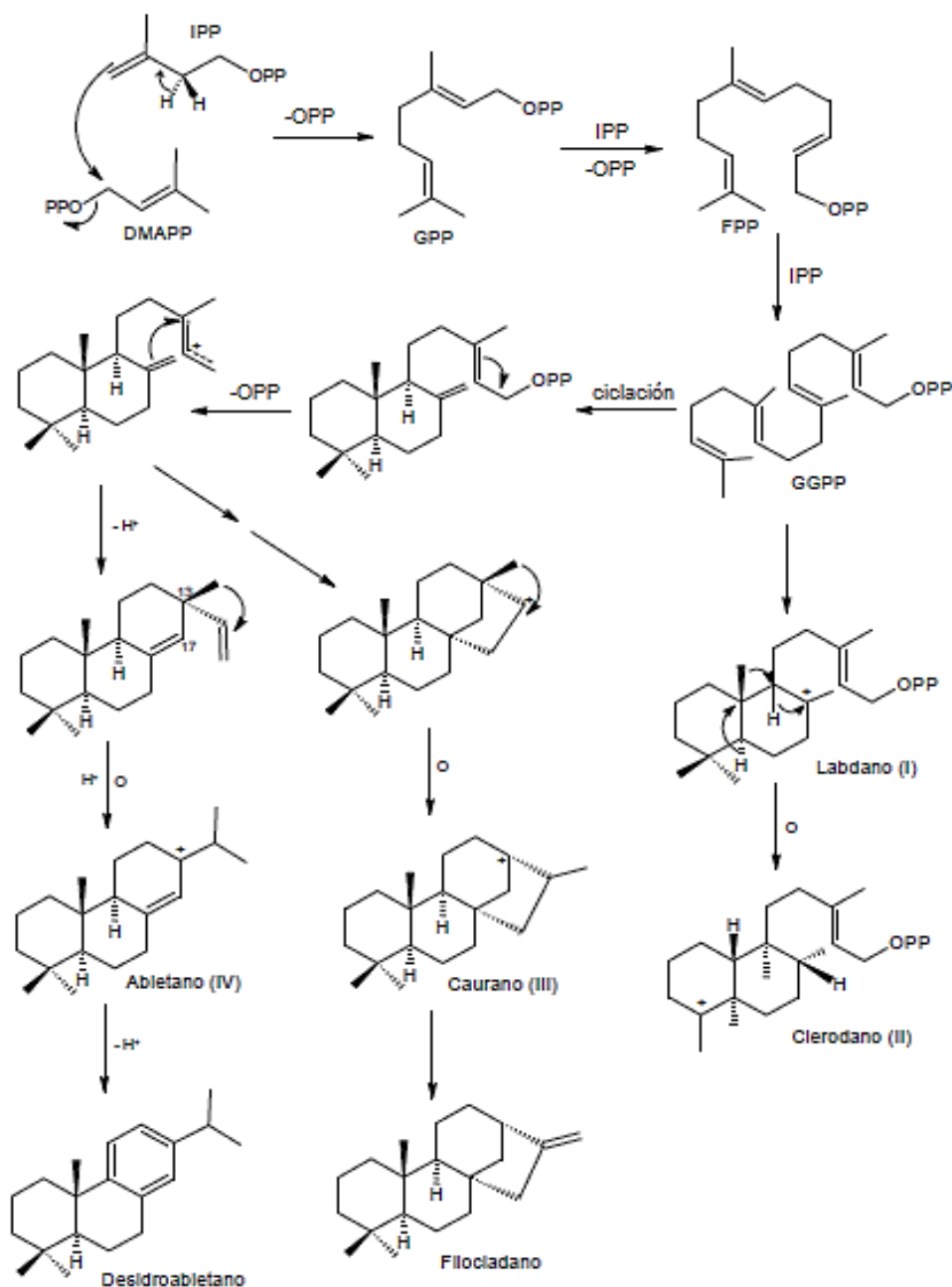
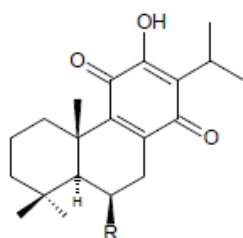


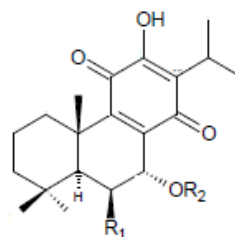
Figura 11. Esqueletos de estructuras tipo diterpenoide usualmente reportadas para especies de *Plectranthus* ^[18].

Algunos de los terpenoides aislados del género *Plectranthus* incluyen diterpenoides tipo roileanonas como roileanona (**1**), 6 β -hidroxiroileanona (**2**), horminona (**3**), 7 α , 6 β -Dihidroxiroileanona (**4**), 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (**5**), 7 α -aciloxi-6 β -hidroxiroileanona (**6**), 3 β -Acetoxi-6 β ,7 α ,12-trihidroxi-17(15 $\rightarrow$ 16;18(4 $\rightarrow$ 3)-bisabeo-abieta-4(19),8,12,16-tetraeno-11,14-diona (**7**), 7 α ,12-Dihidroxi-17(15 $\rightarrow$ 16)-abeo-abieta-8,12,16-trieno-11,14-diona (**8**), 6,7-dehidroroileanona (**9**), 16-Acetoxi-7 α ,12-di-hidroxi-8,12-abietadieno-11,14-diona (**10**)^[18].



(1) R=H6

(2) R=OH

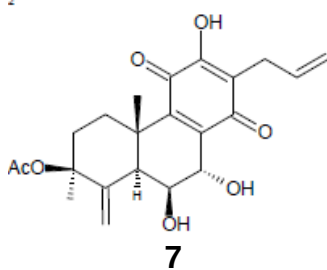


(3) R₁=R₂= H

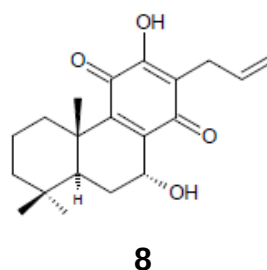
(4) R₁=OH, R₂=H

(5) R₁=OH, R₂=Ac

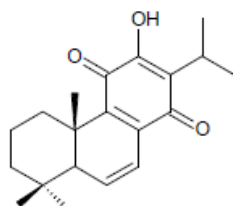
(6) R₁=OH, R₂=acilo



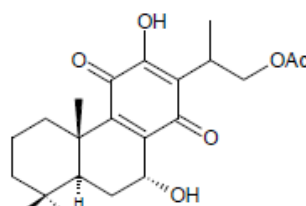
7



8

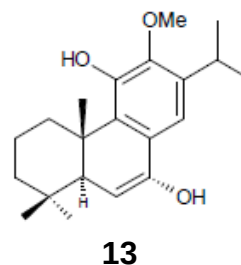
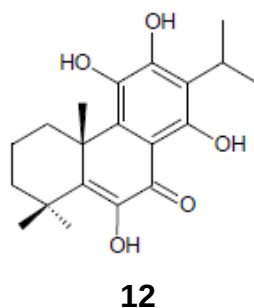
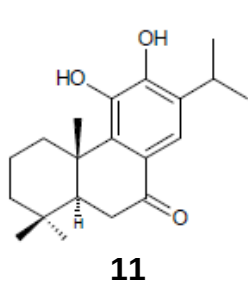


9

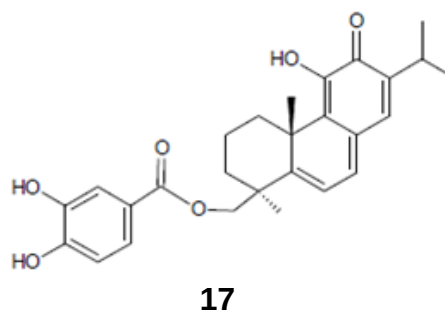
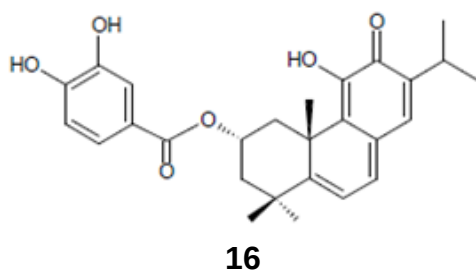
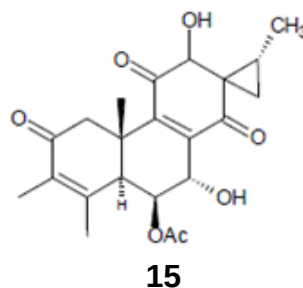
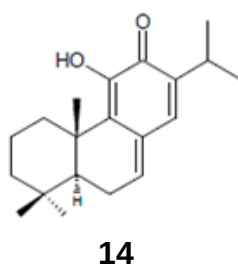


10

Otro tipo de compuestos son los tipo acil-hidroquinonas comprendido por 11,12-diidroxiabieta- 8,11,13-trien-7-ona (**11**), coleon U (**12**), 7 α ,11-Di-hidroxi-12-metoxi-8,11,13-abietatrieno (**13**) ^[18].

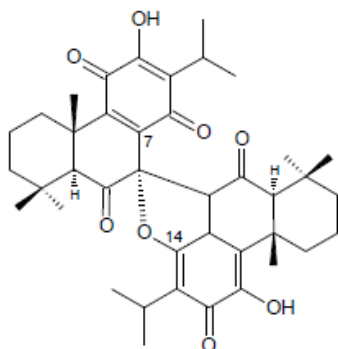


Diterpenoides tipo espirocoleona y quinona metideos como: 11-hidroxi-12-oxo-7,9(11),13-abietatrieno (**14**), Plectrina (**15**), Parviflorona F (**16**), Parviflorona E. (**17**) ^[18].



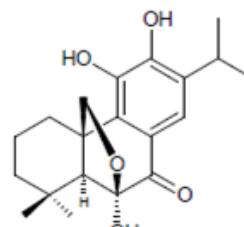
Diterpenoides tipo abietano 6,20-epoxiabietanóide y abietanoide diméricos forman parte de un grupo de compuestos aislados, algunos de ellos son grandidona D, α -C(7)-O-

C(14) **(18)**, 7-epigrandidona D, β -C(7)-O-C(14) **(19)**, camosolon **(20)**, grandidona A **(21)**, grandidona C **(22)** ^[18].

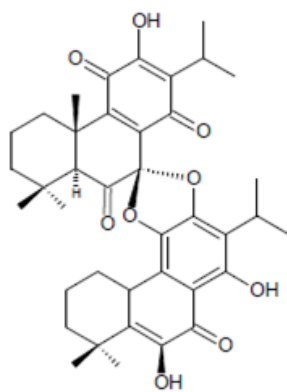


(18) Grandidona D, α -C(7)-O-C(14),

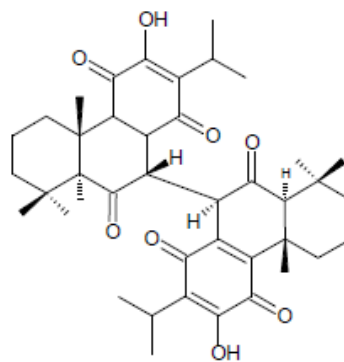
(19) 7-Epigrandidona D, β -C(7)-O-C(14)



20

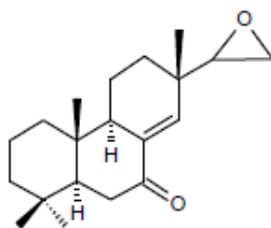


21

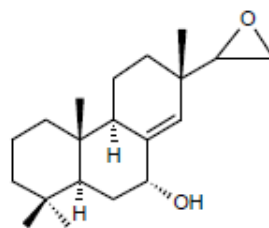


22

Diterpenoides abietanos primaranos, rel-15(Z),16-epoxi-7-oxopimar-8,14-eno **(23)** y 15(Z),16-epoxi- 7 α -hidroxipimar-8,14-eno **(24)** ^[18].

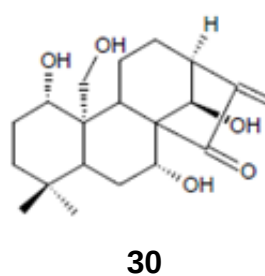
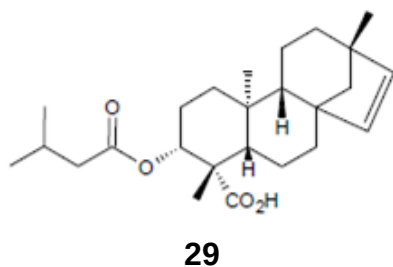
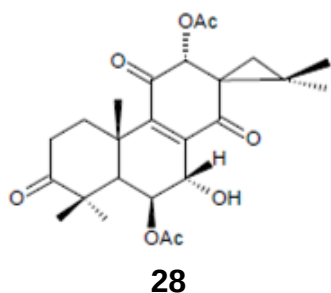
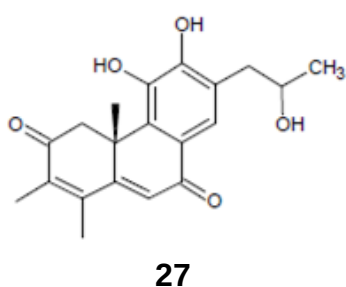
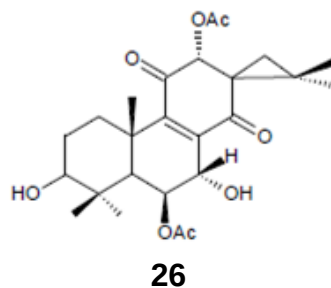
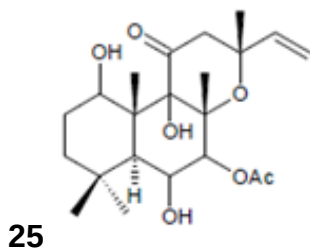


23

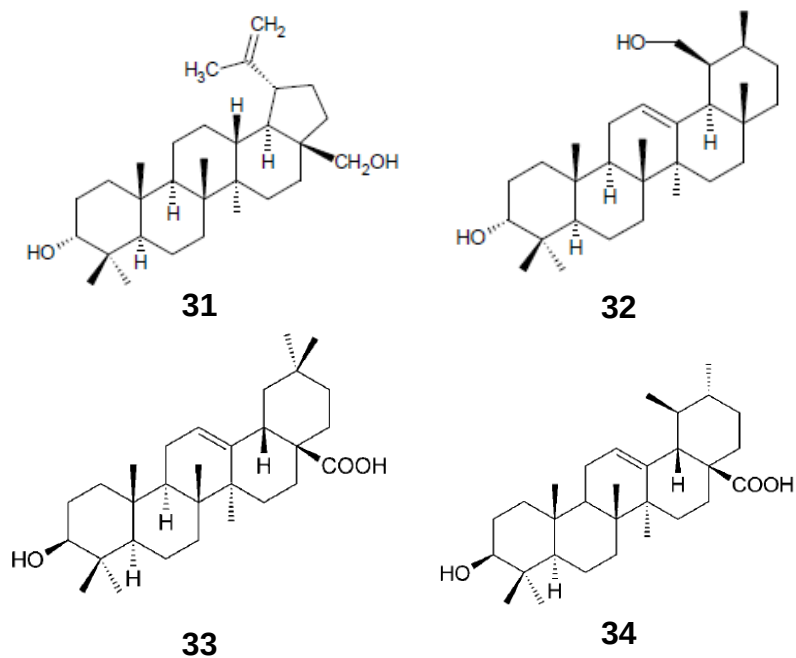


24

Otros metabolitos aislados y caracterizados de especies del género *Plectranthus*, son: forskolina (**25**), 3 β -hidroxi-3-deoxibarbatusina (**26**), plectrinona A (**27**), barbatusina (**28**), ácido ent-3 β -(3-metil-2butenoil) oxi-15-beieren-19-oico (**29**), camebacaurina (**30**)^[18].



Entre otras evidencias de compuestos terpénicos aislados de especies de *Plectranthus* se encuentran los triterpenos betulina (**31**), plectrantadiol (**32**), ácido oleanólico (**33**), ácido ursólico (**34**)^[18,48]



II.1.2 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos que se encuentran en la mayoría de las plantas superiores vasculares, y cumplen funciones antioxidantes, antimicrobianas, protectoras contra la radiación UV, quelantes de ciertos metales y estimulante de receptores de insectos que son atraídos por las plantas que los contienen. La estructura típica es descrita por el esqueleto o núcleo de flavano Figura 12, y se le conoce como unidades de C_{15} : $C_6-C_3-C_6$ ^[2].

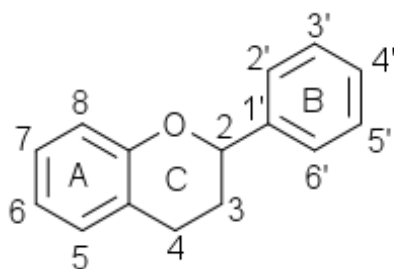


Figura 12. Esqueleto de flavano, las posiciones 3', 4', 5', 5 y 7 son las posiciones oxigenadas ^[2].

La ruta biosintética para la formación de estos metabolitos se describe esquemáticamente en la Figura 13.

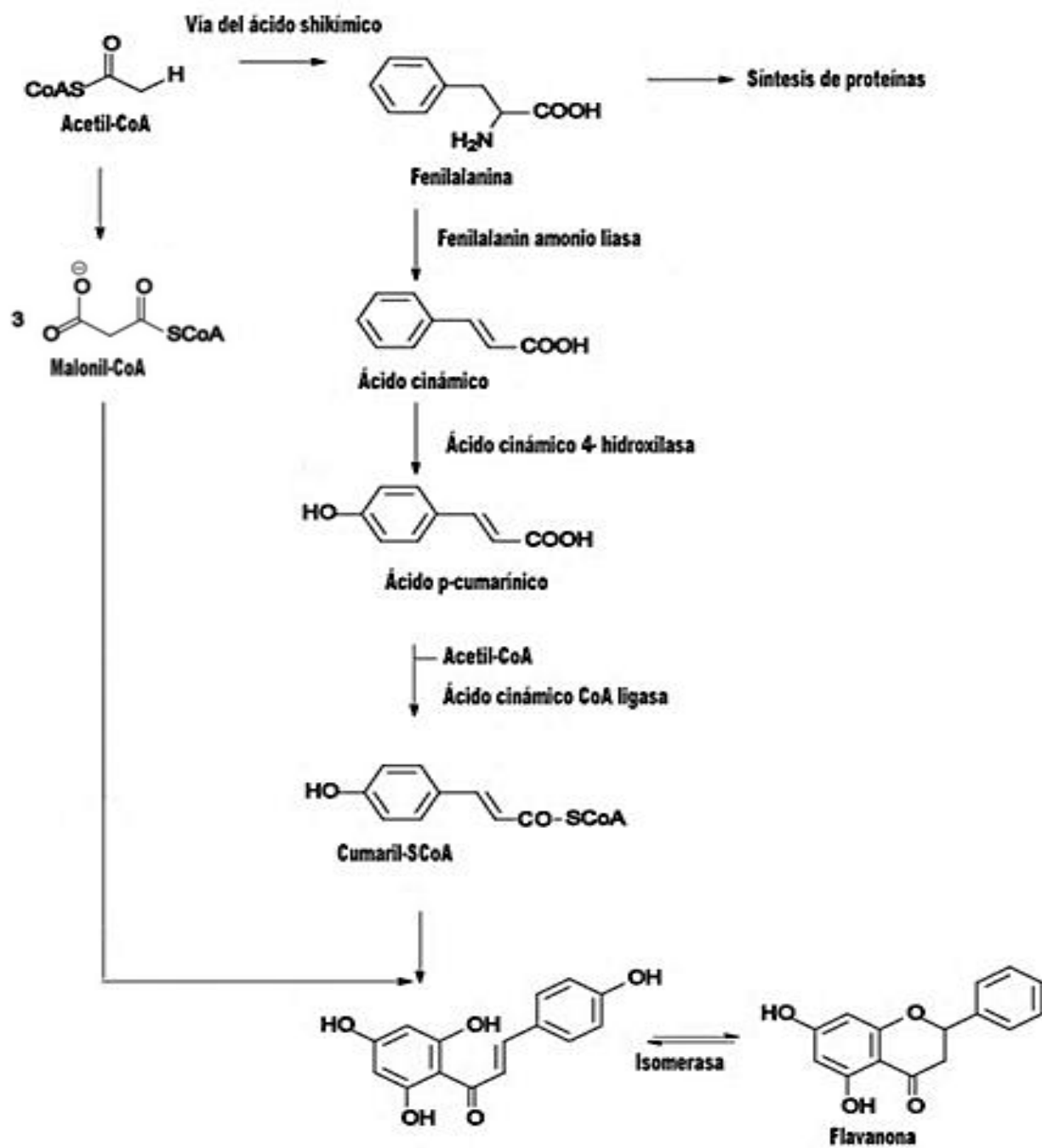
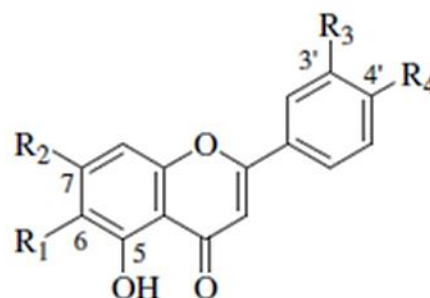


Figura 13. Esquema biosintético de flavonoides ^[49].

Los flavonoides, a pesar de no ser el grupo con mayor preponderancia dentro de los metabolitos aislados de las especies de *Plectranthus*, poseen propiedades importantes como por ejemplo: actividad antioxidante. Algunos de los flavonoides aislados de *Plectranthus* se exponen en las tablas 3 y 4 ^[50].

Tabla 3. Flavonoides tipo flavonas aislados del género *Plectranthus* ^[50].

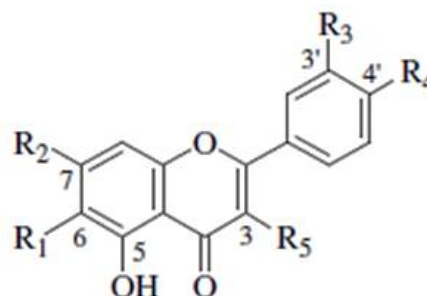
Flavonas
Apigenina (35)
Apigenina 7-metil eter (genkwanin) (36)
Apigenina 4'-metil eter (acacetin) (37)
Apigenina 7,4'-dimetil eter (38)
Scutellareina (6-hidroxiapigenina) (39)
Scutellareina 6,7-dimetil eter (cirsimaritina) (40)
Scutellareina 7,4'-dimetil eter (ladaneina) (41)
Scutellareina 6,7,4'-trimetil eter (salvigenina) (42)
Luteolina 7-metil eter (43)
Luteolina 7,3',4'-trimetil eter (44)
6-Hidroxiluteolina 6,7-dimetil eter (cirsiliol) (45)
6-Hidroxiluteolina 6,7,3'-trimetil eter (cirsilineol) (46a)
6-Hidroxiluteolina 6,7,4'-trimetil eter (eupatorina) (46b)



35	$R_1 = R_3 = H, R_2 = R_4 = OH$
36	$R_1 = R_3 = H, R_2 = OMe, R_4 = OH$
37	$R_1 = R_3 = H, R_2 = OH, R_4 = OMe$
38	$R_1 = R_3 = H, R_2 = R_4 = OMe$
39	$R_1 = R_2 = R_4 = OH, R_3 = H$
40	$R_1 = R_2 = OMe, R_3 = H, R_4 = OH$
41	$R_1 = OH, R_2 = R_4 = OMe, R_3 = H$
42	$R_1 = R_2 = R_4 = OMe, R_3 = H$
43	$R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = R_4 = OH$
44	$R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = OMe$
45	$R_1 = R_2 = OMe, R_3 = R_4 = OH$
46 a	$R_1 = R_2 = R_3 = OMe, R_4 = OH$
46 b	$R_1 = R_2 = R_4 = OMe, R_3 = OH$

Tabla 4. Flavonoides tipo flavonol aislados del género *Plectranthus* ^[50].

Flavonoles
Kaempferol 3-metil éter (47)
Quercetina (48)
Quercetina 3-metil éter (49)
Quercetina 3,7-dimetil éter (50)
Quercetina 3,4'-dimetil éter (51)
Quercetina 3,7,4'-trimetil éter (ayanina) (52)
Quercetagina 3,6,7-trimetil éter (crisosplenol D) (53)
Quercetagina 3,6,7,4'-tetrametil éter (casticina) (54)
Quercetagina 3,6,7,3',4'-pentametil éter (55)



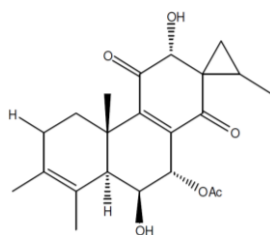
47	$R_1 = R_3 = H, R_2 = R_4 = OH, R_5 = OMe$
48	$R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = OH$
49	$R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = OH, R_5 = OMe$
50	$R_1 = H, R_2 = R_5 = OMe, R_3 = R_4 = OH$
51	$R_1 = H, R_2 = R_3 = OH, R_4 = R_5 = OMe$
52	$R_1 = H, R_2 = R_4 = R_5 = OMe, R_3 = OH$
53	$R_1 = R_2 = R_5 = OH, R_3 = R_4 = OH$
54	$R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = OMe, R_3 = OH$
55	$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = OMe$

II.2 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de las especies de *Plectranthus* naturalizadas en Venezuela.

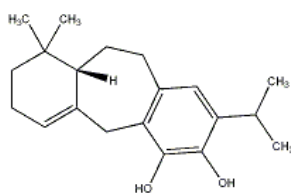
Se presenta a continuación una recopilación de resultados obtenidos en estudios fitoquímicos y farmacológicos, basados en el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios, estudios preclínicos y evaluación de diversas actividades biológicas, realizados a las especies de *Plectranthus* ya mencionadas con anterioridad, como son: *Plectranthus barbatus* Andrews, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, *Plectranthus madagascariensis* (Pers) Benth, *Plectranthus ornatus* Codd y *Plectranthus neochilus* Schltr.

II.2.1 *Plectranthus barbatus* Andrews.

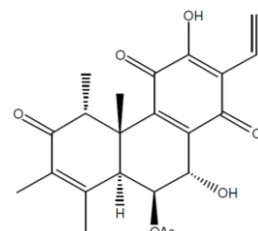
De la especie *Plectranthus barbatus* Andrews se ha logrado aislar una gran cantidad de metabolitos y se han analizado diversas actividades biológicas, algunas de la cuales ya han sido mencionadas (Tabla I.7). El componente mayoritario hallado en dicha planta es la forskolina (**25**), diterpeno descubierto en el año 1974 y referenciado inicialmente como Coleonol. Después de la identificación de otros coleonoles y diterpenoides el nombre fue más tarde cambiado a forskolina ^[51], aunque no hay estudios reportados hasta la década sobre sus actividades. Se muestran a continuación diterpenos aislados de la especie *Plectranthus barbatus* Andrews ^[52].



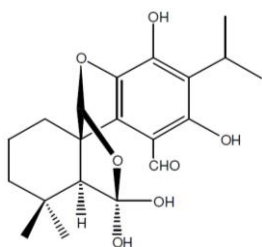
Coleon O (**56**)



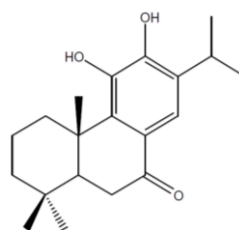
Barbatusol (**57**)



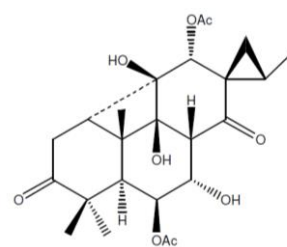
(+)-Allil-roileanona (**58**)



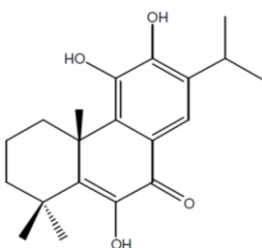
Cariocal (**59**)



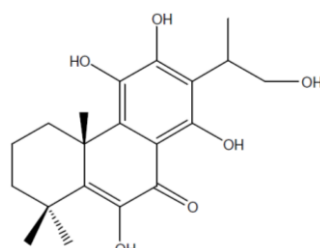
11-Hidroxi-sugiol (**60**)



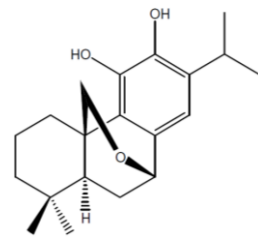
Ciclobutatusina (**61**)



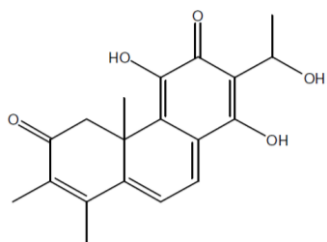
14-Deoxi-coleon (**62**)



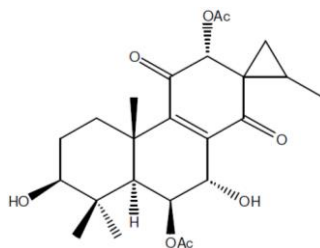
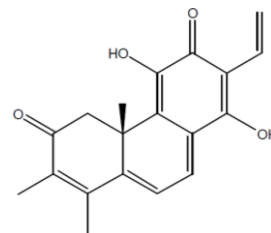
Coleon C (**63**)



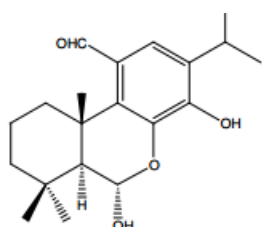
20-Desoxi-carnosol (**64**)



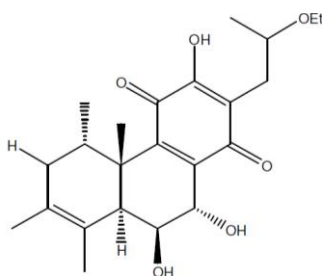
Coleon E (65)

3 β -Hidroxi-3- deoxibarbutusina (66)

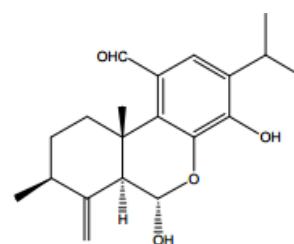
Coleon F (67)



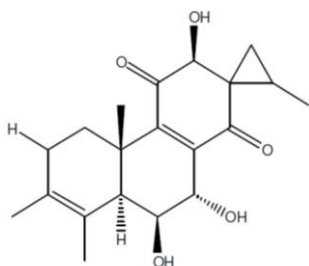
6,7-Secoabietano I (68)



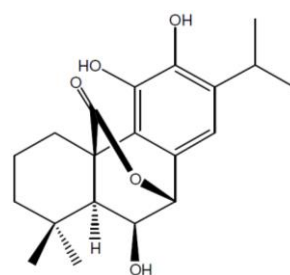
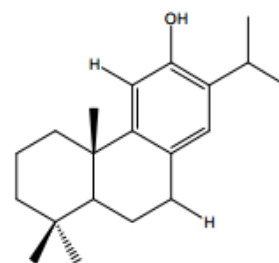
Coleon S (69)



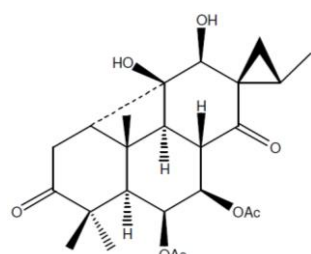
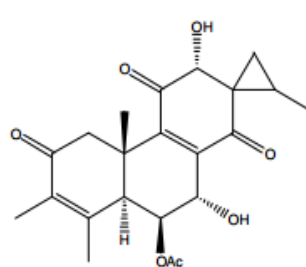
6,7-Secoabietano II (70)



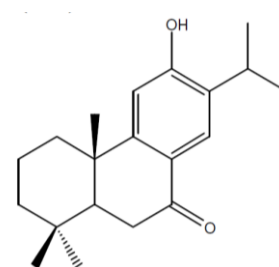
Coleon T (71)

6 β -Hidroxi-carnosol (72)

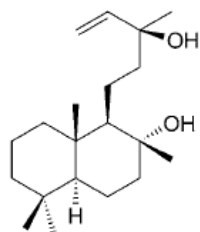
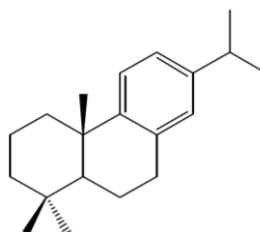
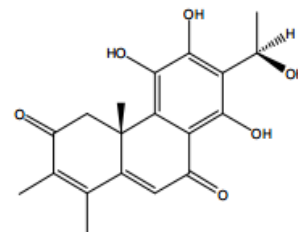
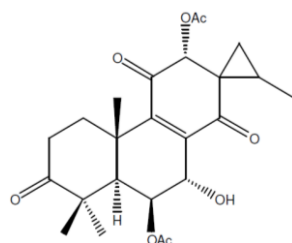
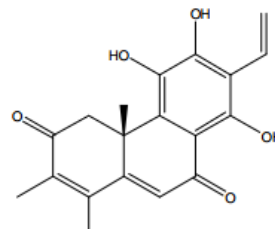
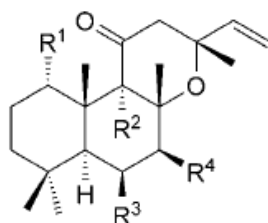
Ferruginol (73)

7 β -Acetil-12-deacetoxiciclobutatusina (74)

Plectrina (15)



Sugiol (75)

5 13-epi-Sclareol (**76**)Abietatrieno (**77**)Plectrinona A (**78**)Barbatusina (**79**)Plectrinona B (**80**)

(**81**), R1=OH, R2=OH, R3=AcO, R4=OH; Isoforskolina

(**82**), R1=H, R2=OH, R3=OH, R4=OH; 3 1-Deoxyforskolina

(**83**), R1=H, R2=H, R3=OH, R4=OH; 4 1,9-Dideoxyforskolina

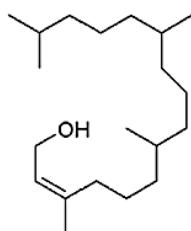
Estudios sobre la especie *P. barbatus* referentes a la evaluación de diversas actividades biológicas, se han realizado para algunos de los metabolitos mostrados, exponiendo ejemplos de estos resultados las siguientes actividades: actividad citotóxica manifestada por la barbatusina (**79**) aislada de la hojas; actividad anti-hipertensiva dada por el barbatusol (**57**) presente en las ramas; coleon C (**63**) extraído de toda la planta entera muestra actividad citotóxica; actividad antialimentaria de insectos mostrada por la plectrina (**15**) aislada de las hojas; actividad gastroprotectora presentada por plectrinona A (**78**) aislada también de las hojas; y coleon E (**65**) del extraído de las hojas, presentando actividad Antiacetilcolinesterásica ^[52].

La forskolina **(25)** fue estudiada con especial interés por G. M. Alagu Lakshmanan y colaboradores (2013), demostrando que activa directamente casi todas las hormonas guanilato ciclasa sensibles en células intactas, mediante el aumento de nivel de AMPc (Adenosín monofosfato cíclico), a su vez, inhibe la degranulación de basófilos y la liberación de histamina, reduce la presión sanguínea, promueve la vasodilatación, broncodilatación, y la secreción de la hormona tiroidea. Llevando a cabo este ensayo se administró forskolina a ratones, entre 30-60 minutos antes de la inyección de una línea celular de melanoma altamente metastásica, observando reducción en la colonización del tumor inducido en los pulmones en un 70%. Se muestra entonces como potente inhibidor de la colonización del tumor en ratones, y teóricamente puede ser utilizada en ensayos humanos para prevenir o inhibir la metástasis tumoral ^[53].

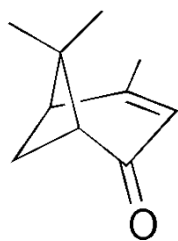
En un estudio elaborado por T. Sasikala y colaboradores (2014), se evaluó la actividad antimicrobiana de diferentes extractos (cloroformo, éter de petróleo, acetona y extracto acuoso), elaborados con las raíces para la especie *P. barbatus*; se efectuó el ensayo evaluando la actividad sobre las tres bacterias a mencionar: *B. cereus*, *E. coli* y *L. bacilo* utilizando el método de difusión en pocillo, obteniendo como resultado una actividad antibacteriana positiva para todos los extractos evaluados y siendo la zona de inhibición dependiente de la concentración y de modo proporcional. La actividad antimicrobiana máxima fue exhibida por el extracto acuoso y el de acetona para la mayoría de las bacterias patógenas ^[54].

Un trabajo en conjunto realizado por Sthéfane G. y colaboradores (2014), identificó compuestos volátiles en el extracto etanólico de *Plectranthus barbatus* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), identificando fitol **(85)** (35,18%), verbenona **(86)** (12,89%) y camfor **(87)** (10,55%). Se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de etanol (realizado a la planta entera), frente a 6

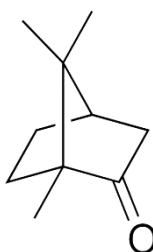
bacterias de interés clínico, las cuales son: *E. Coli*, *E. Faecalis*, *S.Aureus*, *S. Mutans*, *K. Pneumonia* y *P. aeruginosa*, resultando ser más sensibles las bacterias Gram-positivas (CIM de 250 a 1000 $\mu\text{g/mL}$). Adicionalmente, se estudió la interacción de este extracto frente a un antibiótico, estreptomicina comercial, mostrando un efecto sinérgico ^[55].



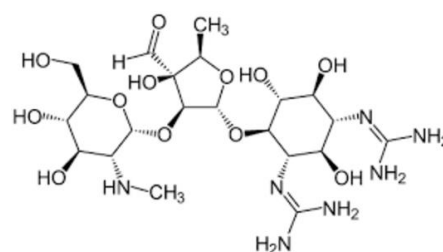
85



86



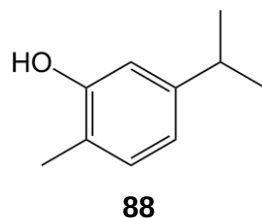
87



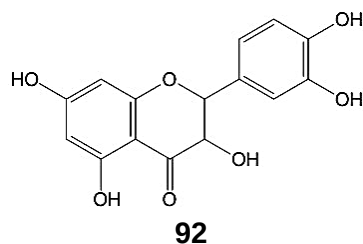
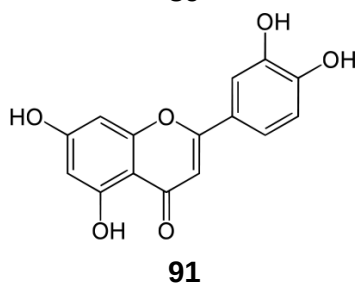
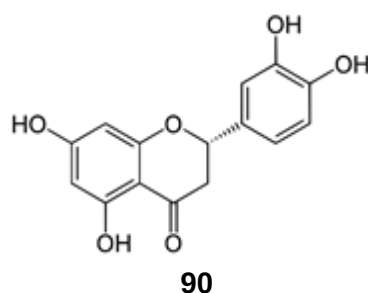
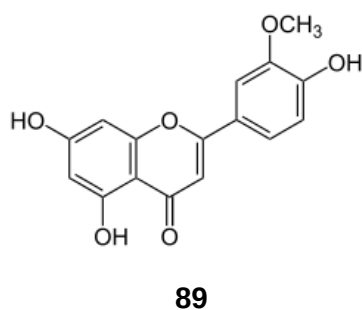
Estreptomicina

II.2.2 *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

En un trabajo de investigación llevado a cabo por Rosa Castillo y Vania González (1999), se analizó el aceite esencial de *P. amboinicus* corroborando la presencia un alto índice de compuestos aromáticos y oxigenados, siendo el carvacrol (**88**) el componente mayoritario (aproximadamente 50,07% en especies cultivadas en cuba) presentando actividad antimicrobiana sobre bacterias gram negativas (Ej: *S. typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*) como bacterias gram positivas (Ej: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*), siendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) 0,02 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ^(56,57).

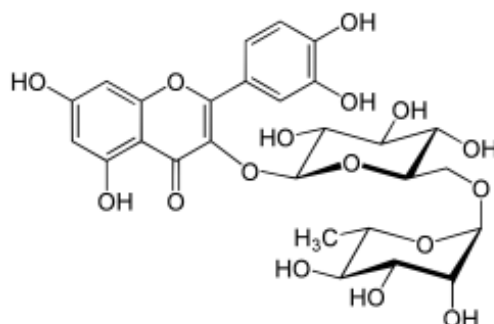


Se referencia adicionalmente la presencia de flavonoides como: la apigenina **(35)**, cirsimarítina **(40)**, salvigenina **(42)**, quercetina **(48)**, crisoeriol **(89)**, criodictiol **(90)**, luteolina **(91)**, taxifolina **(92)** ^[57].



El uso popular de *P. amboinicus* es frecuente con fines medicinales, y la mayoría de las propiedades presentadas por dicha especie se observan al utilizar sus hojas. Es efectiva contra distintas patologías como: enfermedades respiratorias, congestivas, bronquitis y enfermedades digestivas como la disentería, diarrea o colitis. La especie *P. amboinicus* posee propiedades como: antiepiléptica, antitumoral, antimutagénica, radioprotectora, neurofarmacológica, antimicrobiana y antioxidante. Estos efectos

pueden explicarse por la presencia de compuestos fenólicos tales como flavonas: luteolina (**88**) y flavonoles: quercetina (**48**) y rutina (**93**) ^[57].

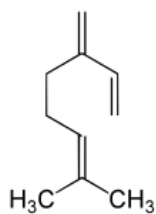
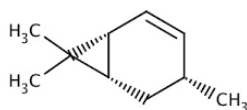
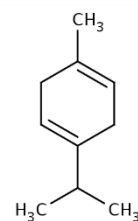
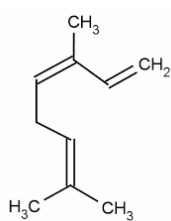
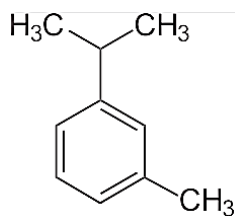
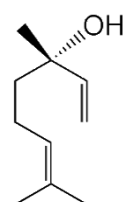
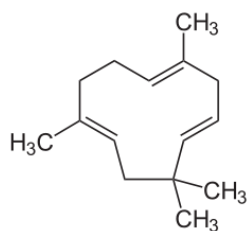
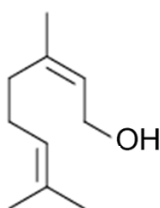
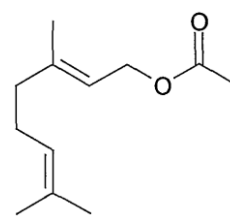
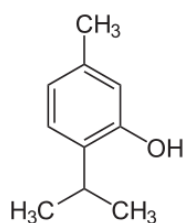
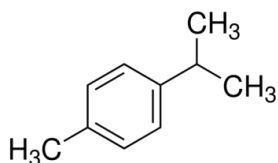
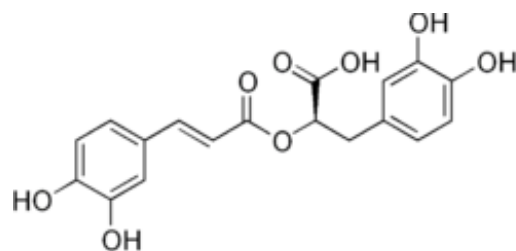


93

El estudio de toxicidad aguda realizado por Preeja G. Pillai y colaboradores (2011) al extracto metanólico de las hojas de *P. amboinicus*, arrojó un resultado de inocuidad con efectos toxicidad mínima al presentar una DT_{50} de 2g / kg de extracto de la planta. Se observaron durante el ensayo alteraciones conductuales, a saber, apatía y ligera supresión del comportamiento locomotor normal, siendo reestablecido luego de las 24 horas ^[58].

Un estudio genotípico de distintas especies del genero *Plectranthus*, *P. grandis*, *P. barbatus*, *P. neochilus* y *P. amboinicus* abordado por Juliana De Magalhães Bandeira (2010), revela que la cantidad de principios activos naturales puede variar en gran medida en los genotipos relacionados, conduciendo al uso inadecuado de estas plantas. A través de técnicas adecuadas se obtuvieron perfiles electroforéticos, demostrando las similitud entre los distintos codes genéticos de las especies, arrojando un 80% de coincidencias en el perfil genético entre las especies *P. neochilus* y *P. amboinicus* ^[59].

Algunos otros metabolitos aislados de extractos realizados a *P. amboinicus* son mirceno (**94**), 4-careno (**95**), γ -terpineno (**96**), (Z)- β -Ocimeno (**97**), cimeno (**98**), linalol (**99**), humuleno (**100**), nerol (**101**), acetato de nerol (**102**), Timol (**103**), p-cimeno (**104**) y ácido rosmarínico (**105**)^[60].

**94****95****96****97****98****99****100****101****102****103****104****105**

Entre las actividades que presenta el extracto acuoso de la especie *P. amboinicus*, se presentan los efectos relacionados al ácido rosmarínico **(105)**. Este metabolito de tipo fenólico carboxílico, tiene propiedades antioxidantes, sirve de estimulante en la producción de prostaglandina E₂ e inhibidor de la producción de leucotrienos B₄ ^[61,62]. Se demuestra en un trabajo de investigación realizado por Pedro L. Falé (2009), demuestra que el ácido rosmarínico a 0.44 mg/ml exhibiendo un 61% de inhibición de la AChE (acetilcolinesterasa) a una concentración de 1 mg/ml ^[63].

II.2.3 *Plectranthus madagascariensis* (Pers) Benth.

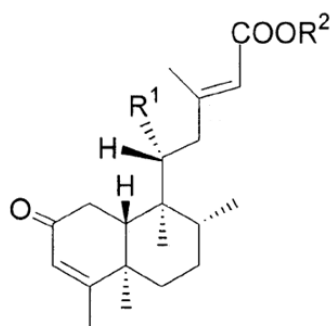
P. madagascariensis no es una especie particularmente suculenta en comparación con otras especies ya mostradas. Renata Kubinova y colaboradores (2014), aíslan cuatro compuestos por cromatografía en columna del extracto metanólico e identificaron por técnica espectral de RMN los metabolitos siguientes: ácido rosmarínico **(105)**, 7 α ,6 β -dihidroxiroileanona **(4)**, 7 β -acetoxi- 6 β -hidroxiroileanona **(5)** y coleon U **(12)**.

Ensayos farmacológicos en la evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *P. madagascariensis* demuestra efectos antibacterianos e insecticidas. El principal componente del aceite esencial extraído de esta especie es el diterpeno 7 α ,6 β –dehidroileanona **(4)**. Entre otras actividades biológicas exhibidas, se encuentran la inhibición bacteriana reproductiva, y actividad inhibitoria AChE, la butirilcolinesterasa (BuChE) y α -glucosidasa, además de actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer en humanos. Se confirma un elevado potencial en el tratamiento de enfermedades como la diabetes mellitus en vista de que tanto 7 α ,6 β –dehidroileanona

(4) como el ácido rosmarínico (105) muestran la actividad inhibitoria enzimática ya mencionada [35].

II.2.4 *Plectranthus ornatus* Codd.

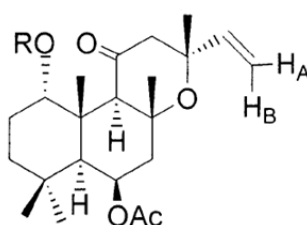
Estudios previos sobre los metabolitos secundarios aislados de *Plectranthus ornatus* Codd muestran diterpenoides de tipo labdano, clerodano y halimano. Al boldo paraguayo como se le conoce en Brasil a la especie Codd, se le atribuyen propiedades antiulcerosas, digestivas y hepatoprotectoras, pero no antipiréticas. Tras un serie de investigaciones realizadas por Patrícia Rijo y colaboradores (2002, 2007 y 2012), se lograron aislar de la planta entera los siguientes metabolitos: plectronatina A (106), ácido 2-oxokolavenico (107), derivado ester metilado (108), plectronatina B (109), plectronatina C (110), ácido rinocerotinoico (111), ácido 11R*-acetoxikolavenico (112), akaterpina (113), halimano [ácido 11R*- acetoxihalima-5,13E-dien-15-oico] (114) [64-66]. Donde (106) y (110) presenten actividad antimicrobiana.



(106), R1= OAc, R2= Me

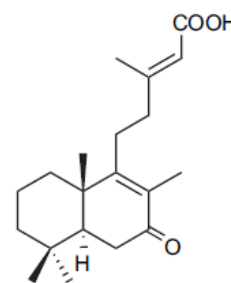
(107), R1= R2= H

(108), R1= H, R2= Me

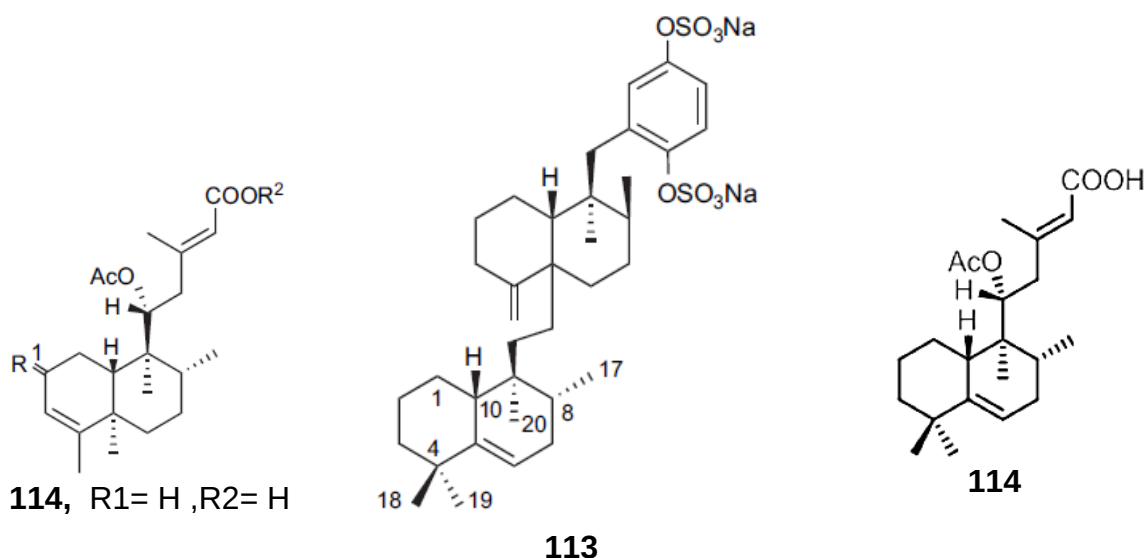


(109), R= H

(110), R= Ac



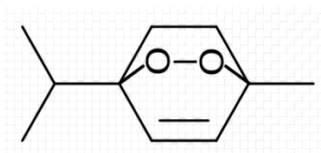
111



Los resultados obtenidos de los estudios preclínicos sobre la especie mencionada (2012), sugieren que el ácido rinocerotinoico (**111**), pero no plectornatina C (**110**) y halimano (**114**), tiene una actividad moderada inhibidora de la COX-1 (ciclooxigenasa), mostrando disminución de la actividad de esta enzima en una forma dependiente de la dosis. Un efecto máximo se observó para la concentración de 4 mM, lo que condujo a una disminución en la actividad de COX-1 en un 57 % respecto del control. También es importante mencionar que el diclofenac utilizado como control positivo a una concentración de 31 mM, utilizado bajo las mismas condiciones experimentales, redujo drásticamente la actividad de COX-1 a un 7 % respecto de valor control ^[66].

En una publicación realizada por José Feliz Oletta L. (Junio, 2015), afirma que las preparaciones o infusiones elaboradas con las hojas de esta plantas (té de boldo), a pesar de presentar efectos beneficiosos al presentar propiedades analgésicas y como tratamiento de resfriados, contiene cantidades significativas de ascaridol (**115**), el cual

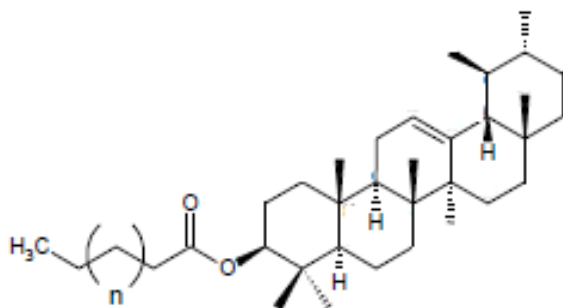
es un compuesto bastante tóxico, que se presenta como compuesto mayoritario del aceite de quenopodio, extraído principalmente de las semillas de *Chenopodium ambrosioides* (Epazote) utilizado hasta 1940 como antihelmíntico para humanos, prohibido luego por sus efectos adversos. El consumir las infusiones de las hojas de *P. ornatus* puede llevar a la sobreexcitación, encalambroso, desorden de reflejos exagerados y convulsiones, de acuerdo con la “Guía Práctica de Medicina Natural” de la Asociación Farmacéutica Americana (American Pharmaceutical Association).



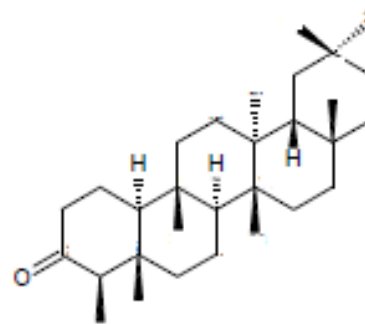
115

II.2.5 *Plectranthus neochilus* Schltr.

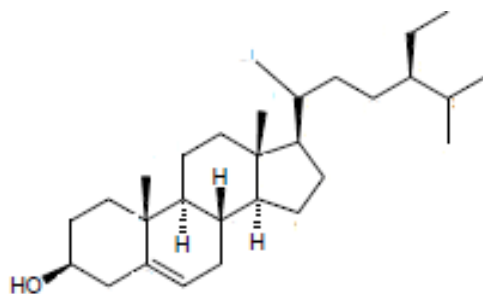
En un estudio realizado sobre las hojas y tallos de la especie *Plectranthus neochilus* Schltr dirigido por Abraão José Silva Viana y colaboradores (2011), expone la presencia de triterpenos como un ester de α -amirina (**116**) y friedelina (**117**), Se Logró la separación de una mezcla de los esteroides siguientes: sitosterol (**118**) y estigmasterol (**119**); en el extracto de hexano. Adicionalmente, fue analizado el extracto de acetato de etilo observando la presencia de una flavona metoxilada en C-6, C-7 de cirsimartina (**120**)^[18].



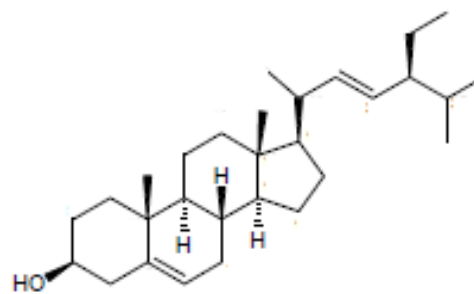
116



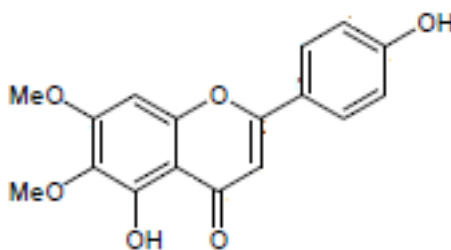
117



118



119

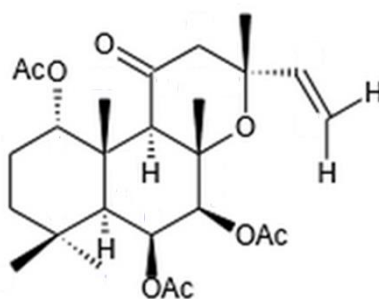


40

El extracto metanólico de las hojas *P. neochilus* mostró actividad antioxidante significativa al realizarse ensayos con DPPH, seguido del extracto de acetato de etilo y el extracto de hexano con actividades menos significativas. Se evaluó la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de los extractos orgánicos ya mencionados

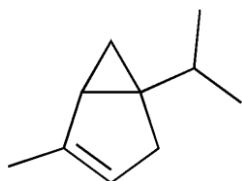
de hojas y tallos de *P. neochilus*, observándose la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa para todos los extractos estudiados ^[18].

Una estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *P. neochilus*, realizado por D. A. Faria; A. y otros (2014), exhibe la presencia de 1 α ,6 β ,7 β -triacetoxi-8 α ,13R-epoxi-14-labden-11-ona (**120**); las analogías estructurales de este compuesto con la forskolina (**25**) pueden ser de utilidad en la validación de los usos medicinales para tratamientos de trastornos digestivos, entre otros ^[67].

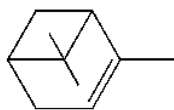


120

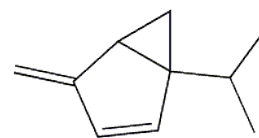
En otro trabajo de investigación realizado por Soraya C. Caixeta y colaboradores (2011), se estudió el aceite esencial de *P. neochilus* en la evaluación de la actividad esquistosomicida sobre gusanos adultos de *Schistosoma mansoni*, observando una disminución del porcentaje de huevos desarrollados de *S. mansoni*, efecto dependiente de la dosis. Es propuesto entonces, la elaboración de agentes esquistosomicidas a partir de estos aceites esenciales. Se presentan a continuación los compuestos que constituyen el aceite esencial obtenido a través de análisis de CG-EM, mostrando el porcentaje de abundancia ^[41].



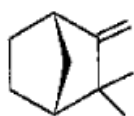
α -tujeno
12,22 %
(121)



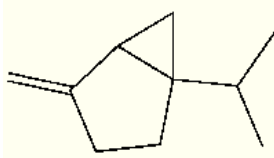
α -pineno
12,63 %
(122)



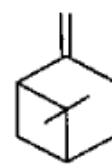
2,4-tujadieno
0,19 %
(123)



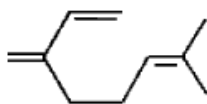
Canfeno
0,13 %
(124)



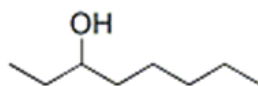
Sabineno
2,70 %
(125)



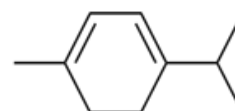
β -pineno
6,19 %
(126)



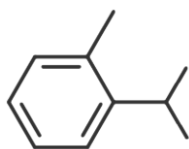
β -mirceno
0,28 %
(127)



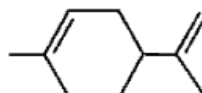
octan-3-ol
0,20 %
(128)



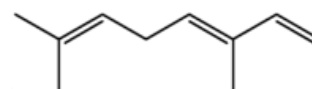
α -terpineno
0,69 %
(129)



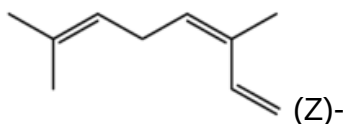
O-cimeno
0,33 %
(130)



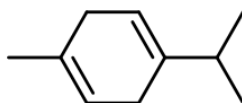
Limoneno
0,32 %
(131)



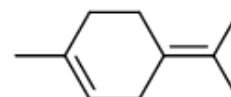
(E)- β -ocimeno
2,66 %
(132)



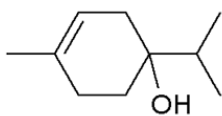
β -ocimeno
0,41 %
(97)



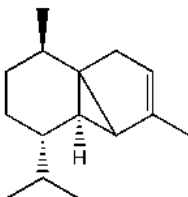
γ -terpineno
1,32 %
(96)



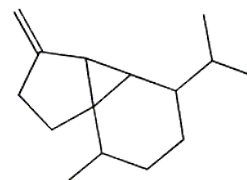
α -terpinoleno
0,28 %
(133)



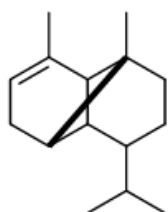
4-terpineol
0,78 %
(134)



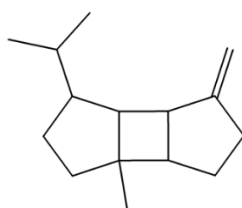
α-cubebene
0,65 %
(135)



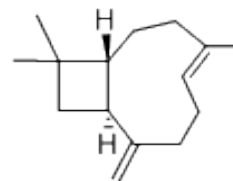
β-cubebene
1,20 %
(136)



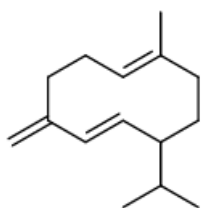
α-copaene
1,32 %
(137)



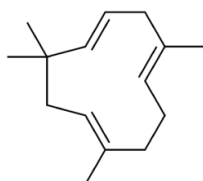
β-bourbonene
0,50 %
(138)



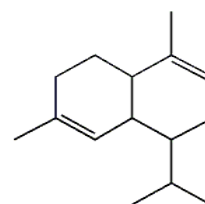
β-cariofilene
28,23 %
(139)



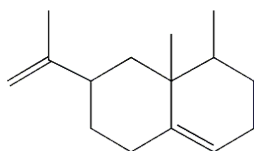
Germacrene D
1,49 %
(140)



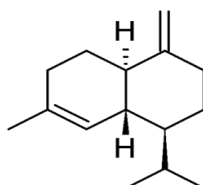
α-humulene
5,36 %
(141)



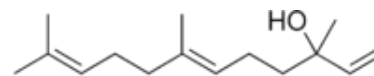
α-amorphene
4,50 %
(142)



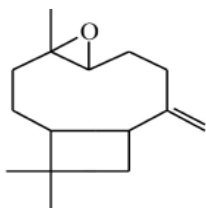
Eremophene
0,37 %
(143)



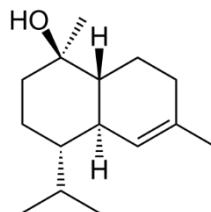
d-cadinene
2,50 %
(144)



(E)-nerolidol
0,59 %
(145)



Oxido de cariofileno
15,37 %
(146)



α-cadinol
2,42 %
(157)

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, las investigaciones en el área de productos naturales han tomado gran importancia, orientándose a la investigación fitoquímica y farmacológica, con el fin de identificar y promover, nuevos y eficaces agentes terapéuticos, alternativas alimenticias y agroquímicos, por mencionar algunos ejemplos, que sean naturales y de uso seguro. Una familia de plantas con una gran contribución a estos fines mencionados es la Familia Lamiaceae, haciendo foco durante esta investigación alrededor de uno de sus géneros como lo es *Plectranthus*. Diversas especies del género *Plectranthus* han sido utilizadas en tratamientos de patologías como: cefaleas, resfriados, tos, desórdenes estomacales, dolores generalizados, cuadros infecciosos y quemaduras, debido a las actividades antimicrobianas, analgésicas, antiinflamatorias, entre otras, corroboradas en múltiples estudios. La especie de interés en esta investigación, *Plectranthus neochilus*, ha sido con frecuencia utilizada como analgésico, atenuante de resfriados y fiebre, popularizándose su uso en ciertas regiones de Venezuela para el alivio de los síntomas de la fiebre Chikungunya, utilizándose en infusiones preparadas con las hojas de esta especie. En contraste, *P. neochilus* posee pocos estudios fitoquímicos y farmacológicos que corroboren los efectos antes mencionados. En consecuencia, debido a sus importantes usos tradicionales se llevó a cabo en los laboratorios de investigación de: Productos Naturales, Neurofarmacología y Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela en conjunto con la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, el estudio fitoquímico y farmacológico de las hojas secas de dicha especie, aislando, identificando y caracterizando los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos orgánicos, y evaluando la toxicidad aguda, actividad analgésica, citotóxica y antioxidante del extracto acuoso, con el fin de corroborar aspectos beneficiosos para el consumo humano.

CAPITULO III

OBJETIVOS

III.1 Objetivo general.

Realizar el estudio fitoquímico de los extractos orgánicos (metanol y diclorometano), y el estudio de la toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso liofilizado de las hojas secas de la especie *Plectranthus neochilus* Schltr (Lamiaceae).

III.2 Objetivos específicos.

- 1- Preparar por extracción sólido-líquido (soxhlet) los extractos orgánicos (hexano, diclorometano y metanol) de las hojas secas de *P. neochilus*.
- 2- Realizar el fraccionamiento de los extractos orgánicos a través de cromatografía de columna de Sílica Gel y evaluar el progreso de la elución por técnicas de cromatografía en capa fina.
- 3- Aislar los componentes mayoritarios de los extractos orgánicos estudiados.
- 4- Caracterizar los metabolitos aislados por métodos espectroscópicos como RMN ^1H , ^{13}C , en 1D y 2D, y DEPT), así como CG-EM.
- 5- Preparar por decocción el extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus*.
- 6- Liofilizar el extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus*.
- 7- Evaluar la toxicidad aguda del extracto acuoso en ratones CD-1 y realizar la estimación de la DT_{50} .

- 8-** Evaluar la actividad analgésica del extracto acuoso liofilizado a través de diversos modelos experimentales en ratones CD-1 (Dolor visceral inducido por ácido acético, retiro de la cola por estímulo térmico y prueba de formalina).
- 9-** Evaluar la citotoxicidad del extracto acuoso frente a una línea celular neoplásica humana de neuroblastoma SH-SY5Y.
- 10-** Evaluar la actividad antioxidante del extracto acuoso a través de los métodos de atrapamiento del ión superóxido y peróxido de hidrógeno.

CAPITULO IV

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

IV.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS SECAS DE *Plectranthus neochilus*.

IV.1.1. Equipos

- Espectrómetro de RMN ECLIPSE-JEOL 270 MHz (Facultad de Farmacia, UCV).
- Cromatografía de gases acoplado a detector de masas, CG-EM (Facultad de Ciencias, UCV)
- Rotaevaporador BUCHI B-480.
- Rotaevaporador Cole-Parmer.
- Lámpara de UV multibanda 254/365 modelo UVGL-25.
- Balanza analítica METTLER PC 2000 con resolución digital de 0,1 mg.
- Balanza analítica OHAUS con resolución digital de 0,1 mg.
- Estufa Memmert.
- Equipos de extracción Soxhlet.

IV.1.2 Materiales

IV.1.2.1 Solventes

- Metanol (CH_3OH) grado p.a Aldrich
- Acetato de etilo (AcOEt) grado técnico.
- Cloroformo (CHCl_3) grado técnico.
- Diclorometano (CH_2Cl_2) grado p.a Aldrich
- n-Hexano ($\text{n-C}_6\text{H}_{14}$)

IV.1.2.2 Solventes para análisis de RMN

- ☉ Metanol deuterado (CD_3OD)
- ☉ Cloroformo deuterado (CDCl_3)
- ☉ Dimetilsulfoxido (DMSO-D_6)

IV.1.2.3 Materiales para Cromatografía

- ☉ Silica gel G60 para cromatografía en columna (CC) 0,06-0-2mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.
- ☉ Placas de sílica gel 60 para cromatografía de capa fina (CCF) Macherey-Nagal ALUGRAM SIL G/UV254 20X20 cm, 0,20mm de espesor.
- ☉ Placas preparativas de sílica gel 60. F254, 20x20 cm, 0,20mm de espesor. MERK.

IV.1.2.4 Reveladores

- ☉ p-Anisaldehído: 5 mL de p-anisaldehído, 90 ml de etanol (EtOH), 5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y 10 mL de ácido acético (CH_3COOH).
- ☉ Naturstoff.
- ☉ Dragendorff.
- ☉ Vainillina/ H_2SO_4 .
- ☉ Tricloruro férrico.
- ☉ DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

IV.1.3 Recolección y tratamiento del material vegetal

La especie *Plectranthus neochilus* recolectada en el jardín medicinal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela fue identificada por la Licenciada Orsini Giovannina. Un ejemplar representativo de la colección de la muestra (código: MYF28987), ha sido depositado en el Herbario "Dr. Víctor Manuel Ovalles" de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Se emplearon las hojas de esta especie, y se sometieron a un proceso de secado llevado a cabo a temperatura ambiente (en el estudio farmacológico) y en una estufa a 50 °C (en el estudio fitoquímico), y finalmente se trituraron finamente.

IV.1.4 Preparación de los extractos de *Plectranthus neochilus*

IV.1.4.1 Preparación del extracto acuoso liofilizado

Se realizó como se indica en el Esquema 1 tomando 42,5506 g de las hojas secas trituradas, y se llevó a cabo un proceso de decocción durante 30 minutos. Posteriormente, el extracto se sometió a un proceso de liofilización ejecutado en un equipo Virtis Advantage Serie 20, con un congelador con una temperatura de -90 °C y presión de vacío de 150-170 mBar. La liofilización se llevó a cabo congelando la muestra a -70 °C durante 1 hora y 30 minutos, y se liofilizó en dos etapas de 48 horas. Se obtuvo un masa total de extracto liofilizado de 7,6088 g, con un rendimiento de 17,88% con respecto al material vegetal seco.

IV.1.4.1.1 Perfil fitoquímico del extracto acuoso

El extracto acuoso liofilizado fue redissuelto en agua para realizar posteriormente una extracción líquido-líquido con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y sec-butanol) arrojando bajos rendimientos, por lo que se consideró aplicar técnicas de extracción más energéticas para llevar a cabo el estudio fitoquímico. Las fracciones orgánicas resultantes se analizaron por medio de cromatografía de capa fina (CCF), empleando placas de sílica gel y diferentes sistemas de fases móviles utilizando disolventes orgánicos o mezclas de éstos, con proporciones definidas. Se llevó a cabo la determinación de los posibles grupos de metabolitos secundarios presentes en las fracciones obtenidas, realizando ensayos bajo observaciones con una lámpara de luz UV a 254 y 366 nm (identificación de compuestos con conjugación extendida), e índice de espuma (tensoactivos), así como distintos reactivos reveladores, entre ellos: p-Anisaldehído/EtOH/H₂SO₄, Naturstoff, Dragendorff, Vainillina/H₂SO₄, Tricloruro férrico, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). En la tabla 5, se muestra de forma general los resultados observados en los ensayos de revelado con las fracciones de hexano, diclorometano, acetato de etilo y sec-butanol, sugiriendo con esto que el extracto acuoso liofilizado de las hojas secas de *P. neochilus* puede contener metabolitos como: tensoactivos (saponinas), compuestos fenólicos (entre ellos ácidos fenólicos), azúcares, compuestos de tipo esteroideo, terpenoides, flavonoides, glicósidos de flavonas y compuestos antioxidantes ^[68-71].

Tabla 5. Respuesta de los distintos ensayos de identificación de la composición de los fracciones orgánicas del extracto acuoso liofilizado de *P. neochilus*.

Revelador	Resultado
p-anisaldehído/H₂SO₄	+
Vainillina/H₂SO₄	+
FeCl₃	+
Dragendorf	-
Naturstoff	+
DPPH	+
Indice de espuma	+

(+) Respuesta positiva, (-) Respuesta negativa.

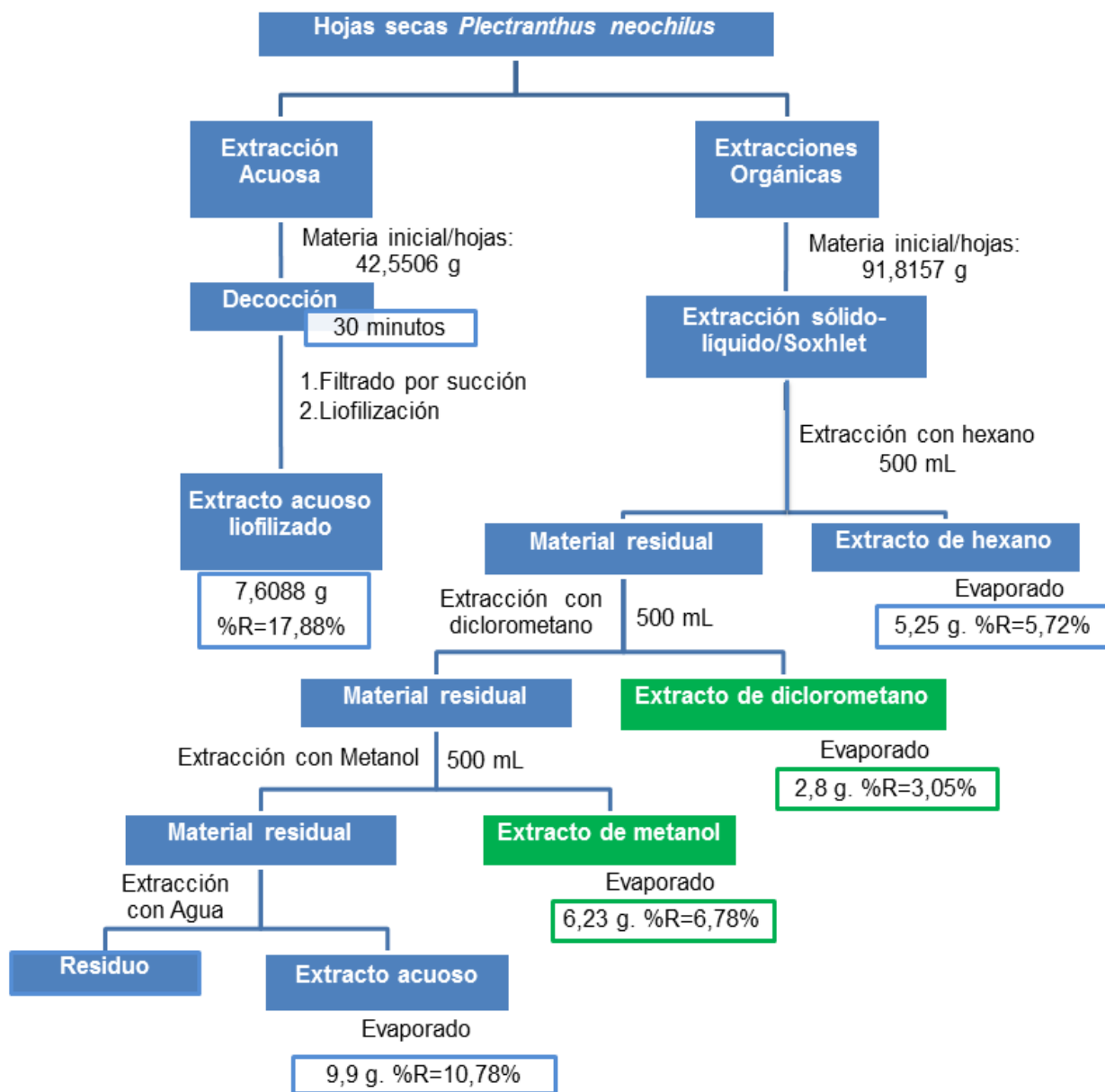
IV.1.4.2 Preparación de los extractos orgánicos

Se realizó a través de extracciones sólido – líquido usando un soxhlet como se indica en el Esquema 1. El proceso inició colocando 91,8157 g de las hojas secas trituradas en la cámara de extracción del soxhlet y se procedió usando solventes de polaridad creciente, realizando cada extracción de manera exhaustiva hasta que no se apreció color en el solvente que se encontraba en el sifón del soxhlet. Las masas de cada extracto resultante y los rendimientos respecto al material seco de partida son mostrados en la Tabla 5.

Tabla 6. Masas de extractos obtenidos por técnica de extracción con soxhlet.

Extracto	Masa de extracto, g	Rendimiento
Hexano	5,25	5,72%
Diclorometano	2,80	3,05%
Metanol	6,23	6,78%
Agua	9,90	10,78%

Luego de obtener los diferentes extractos, se realizó la evaluación de cada uno a través de CCF, observando parcialmente la cantidad y el tipo de metabolitos presentes en estos, haciendo uso de distintos reveladores como: p-Anisaldehído, Naturstoff, Dragendorff, Vainillina, Tricloruro férrico y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).



Esquema 1. Obtención de extractos acuoso y orgánicos de las hojas secas de *Plectranthus neochilus*.

IV.1.4.2.1 Extracto de metanol.

Se trabajó con el extracto de metanol por ser uno de los que poseía mayor masa. Se realizó una cromatografía de columna en sílica-gel (Esquema 2) sembrando 2,8 g del extracto con una relación extracto:sílica de 1:40. Se eluyó con un gradiente de polaridad iniciando con $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$. Se colectaron 181 fracciones agrupadas en 10 grupos por análisis comparativo con CCF revelando con p-anisaldehído. Se muestran en la Tabla 6 las fases móviles utilizadas y el volumen utilizado. Adicionalmente, se muestra en la Tabla 7 la masa de las fracciones una vez unidas junto con el rendimiento obtenido respecto al extracto de metanol.

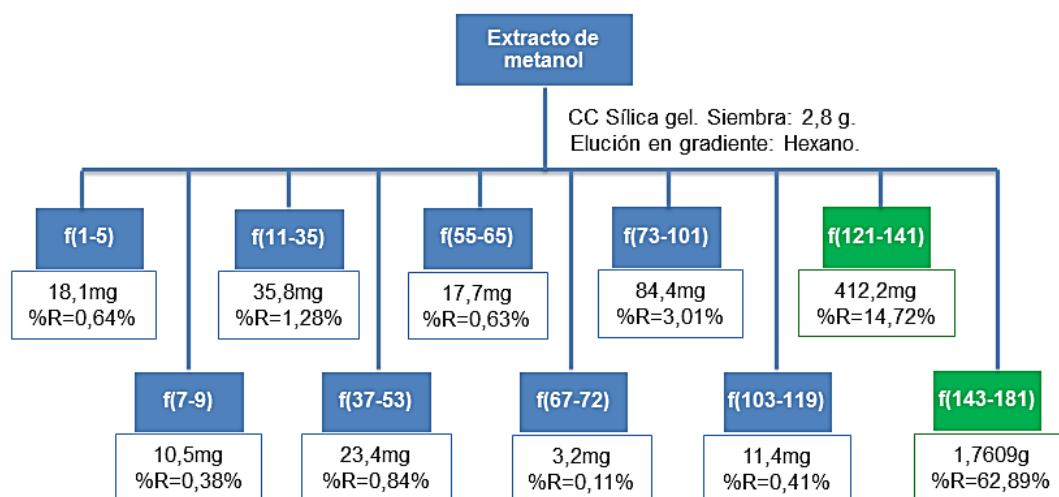
Tabla 7. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. Extracto MeOH.

Sistema de solvente/Relación		Fracciones recolectadas	Gasto volumétrico, mL
$n\text{-C}_6\text{H}_{14}$	100	1-15	100
$n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	90:10	17-21	100
$n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	80:20	23-37	100
$n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	70:30	39-48	100
$n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	50:50	49-50	100
$n\text{-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	30:70	51-74	100
CH_2Cl_2	100	75-99	100
$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcCN}$	95:5	101-115	75
$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcCN}$	90:1	117-130	75
$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcCN}$	80:20	130-143	75
AcCN	100	145-161	75
CH_3OH	100	162-181	75

Tabla 8. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. Extracto MeOH.

Grupo/Fracciones		Masa obtenida, mg	Rendimiento (%)
G1	1-5	18,1	0,65
G2	7-9	10,5	0,38
G3	11-35	35,8	1,28
G4	37-53	23,4	0,84
G5	55-65	7,7	0,28
G6	67-72	3,2	0,11
G7	73-101	84,4	3,01
G8	103-119	11,4	0,41
G9	121-141	412,7	14,74
G10	143-181	1760,9	62,89

Se trabajó con los grupos G9 y G10, debido la masa que se obtuvieron de estas y a los resultados que arrojaron los análisis por cromatografía de capa fina (CCF) usando la lámpara UV y p-anisaldehído como reveladores.

**Esquema 2.** Fraccionamiento del extracto metanólico por CC.

IV.1.4.2.1.1. Purificación de G9.

Se realizó la purificación a través de cromatografía de columna en sílica-gel (Esquema 3), sembrando 400 mg de G9 en una columna que fue empacada con 16 g de sílica. La elución se realizó con aumento gradual de la polaridad. Se colectaron 149 fracciones, agrupadas en 8 subgrupos. Se muestran en la Tabla 8 las fases móviles utilizadas y el volumen utilizado. En la Tabla 9 se muestra la masa de los 8 subgrupos junto con el rendimiento obtenido respecto al extracto de metanol.

Tabla 9. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. G9.

Sistema de solvente/Relación		Fracciones recolectadas	Gasto volumétrico, mL
CH ₂ Cl ₂	100	1-9	120
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt	90-10	10-23	200
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt	70-30	24-40	100
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt	60-40	41-50	100
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt	50-50	51-63	100
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt	30-70	64-75	100
CH ₂ Cl ₂ : AcOEt	10-90	76-89	100
AcOEt	100	90-98	100
AcOEt: CH ₃ OH	90-10	99-108	100
AcOEt: CH ₃ OH	85-15	109-116	100
AcOEt: CH ₃ OH	50-50	117-127	100
CH ₃ OH	100	128-149	150

Tabla 10. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. G9.

Subgrupo/Fracciones		Masa obtenida, mg	Rendimiento (%)
sG1	1-13	3,8	0,14
sG2	15-31	7,2	0,26
sG3	33-49	16,0	0,57
sG4	51-71	18,9	0,68
sG5	73-89	38,9	1,39
sG6	90-102	48,4	1,73
sG7	103-109	111,6	3,99
sG8	111-149	88,6	3,16

Se trabajó partir de sG7, la cual mostró manchas aparentemente mayoritarias de color morado y naranja revelando con p-anisaldehído. Se purificó sG7 con cromatografía de placa preparativa de silica-gel, sembrando aproximadamente 100 mg de la muestra. Se desarrolló con AcOEt:CH₃OH (80:20). Se muestran en la Tabla 10 la masa de las regiones extraídas.

Tabla 11. Masa de regiones obtenidas en CPP. sG7.

Región	Masa de región, mg
sG7.A (f(103-109).A)	3,5
sG7.B (f(103-109).B)	12,3
sG7.C (f(103-109).C)	22,1
sG7.D (f(103-109).D)	27,1

Se presentaron compuestos en sG7.A - sG7.B que revelaron de color morado y naranja con p-anisaldehído. Realizando estudios por CCF se juntaron nuevamente sG7.B -

sG7.D, para realizar una posterior purificación. Esta purificación se realizó con una columna cromatográfica sembrando 61 mg de la muestra, con 3,5 g de silica-gel y eluyendo con aumento de polaridad. obtuvieron 87 fracciones agrupadas en 4 fracciones. Se muestran en la Tabla 11 las fases móviles utilizadas para la separación de sG7.B - sG7.D y el volumen utilizado. En la Tabla 12 se muestra la masa de las 4 fracciones junto con el rendimiento obtenido respecto del extracto de metanol.

Tabla 12. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. sG7.B - sG7.D.

Sistema de solvente/Relación		Fracciones recolectadas	Gasto volumétrico, mL
AcOEt:CH ₂ Cl ₂	90:10	1-21	100
AcOEt:CH ₂ Cl ₂	95:5	23-47	100
AcOEt	100	49-69	100
AcOEt:CH ₃ OH	98:2	71-87	100

Tabla 13. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. sG7.B - sG7.D.

Fracciones		Masa obtenida, mg	Rendimiento (%)
1	1-27	1,5	0.05
2	29-33	3,0	0.11
3	59-69	30,0	1.07
4	71-87	11,5	0.41

La fracción 3 presentó dos compuestos con R_f's similares; realizándole luego análisis por RMN (¹H, ¹³C y DEPT), se observó lo que puede ser en parte una estructura de tipo sacárido como compuesto mayoritario. Además, en la fracción 4 se obtuvo un compuesto (Compuesto I) que da color azul grisáceo con p-anisaldehído, que al ser analizado por RMN (¹H, ¹³C y DEPT), no mostró resultados óptimos para su elucidación.

Se realizó la purificación de la fracción 3, con una columna cromatográfica de sílica-gel, sembrando la masa total de la fracción, con una relación muestra:sílica 1:100, eluyendo con AcOEt:CH₂Cl₂ (92:8) utilizando 100 mL de esta mezcla. Se colectaron 56 fracciones, agrupadas en 2 fracciones. Sus masas y rendimiento respecto al extracto de metanol se muestran en la Tabla 13.

Tabla 14. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. Fracción 3.

Fracciones	Masa de fracciones, mg	Rendimiento (%)
20-47	14,5	0.52
48-56	3,5	0.13

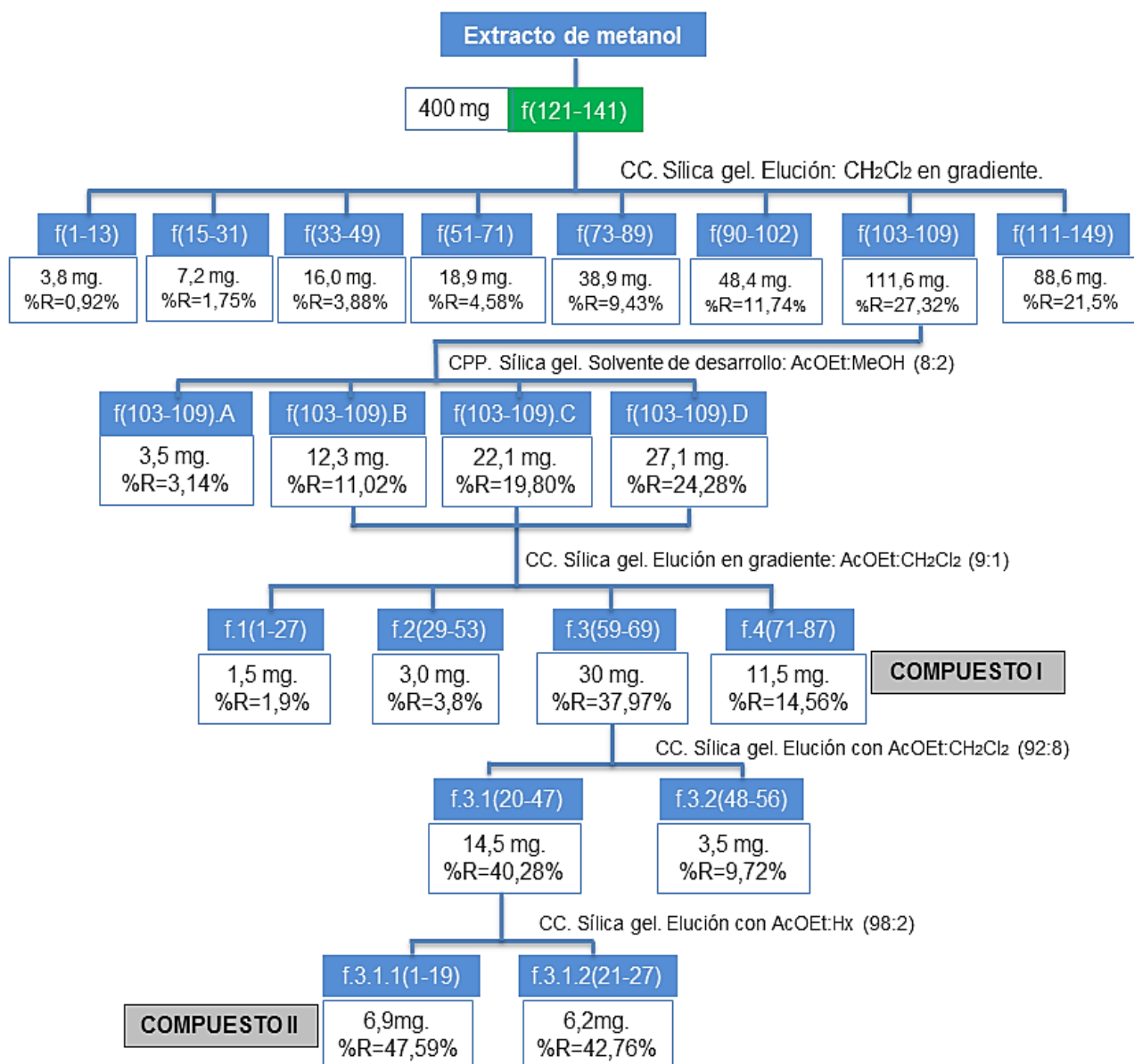
La fracción (20-47) presentó una mezcla de compuestos, y la fracción (48-56) presentó el compuesto con menor R_f de esta mezcla. Luego, Se purificó la fracción (20-47) con cromatografía de columna, sembrando toda su masa, usando una relación muestra:sílica 1:100, eluyendo con AcOEt:n-C₆H₁₄ (98:2). Se colectaron 27 fracciones, unidas en dos fracciones. Se muestran en la Tabla 14 las masas y rendimientos respecto al extracto de metanol.

Tabla 15. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. f (20-47).

Fracciones	Masa de fracciones, mg	Rendimiento (%)
1-19	6,9	0.25
21-29	6,2	0.22

Las fracciones de 1-19, presenta uno de los compuestos de la mezcla con mayor R_f, el cual revela de color morado con p-anisaldehído (Compuesto II). Se realizó análisis por

RMN (^1H , ^{13}C y DEPT), no obteniendo resultados por la cantidad analizada. En las fracciones de 21-29 se obtuvo de nuevo la mezcla de ambos compuestos.



Esquema 3. Purificación del grupo 9 (G9).

IV.1.4.2.1.2 Purificación de G10.

Se realizó cromatografía de columna en Sílica-gel (Esquema 4), sembrando 1,7 g, con una relación muestra:sílica de 1:40, y eluyendo con aumento gradual de polaridad. Se colectaron 79 fracciones agrupadas en 7 subgrupos. Se muestran en la Tabla 21 las fases móviles y el volumen utilizado. Se muestra en la Tabla 22 la masa de los 7 subgrupos junto con el rendimiento obtenido respecto al extracto de metanol.

Tabla 16. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. G10.

Sistema de solvente/Relación		Fracciones recolectadas	Gasto volumétrico, mL
n-C ₆ H ₁₄ : CH ₂ Cl ₂	50:50	1-16	150
n-C ₆ H ₁₄ : CH ₂ Cl ₂	30:70	17-21	100
CH ₂ Cl ₂	100	22-25	100
CH ₂ Cl ₂ :EtOH	95:5	26-47	100
CH ₂ Cl ₂ :EtOH	90:10	48-56	150
CH ₂ Cl ₂ :EtOH	80:20	57-69	100
CH ₃ OH	100	70-79	150

Tabla 17. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. G10.

Subgrupo/Fracciones		Masa obtenida, mg	Rendimiento (%)
sG1	1-9	35,4	1.26
sG2	11-31	62,4	2.23
sG3	33-39	11,1	0.40
sG4	41-49	36,5	1.30
sG5	51-55	106,0	3.79
sG6	57-67	821,4	29.34
sG7	69-79	76,6	2.74

Se trabajó en el aislamiento de sG5 y sG6, debido a la evidencia de pocas manchas al revelar en la luz UV (a 254 y 356nm) y con p-anisaldehído. Se realizó la purificación de sG5 por cromatografía de columna en sílica-gel (Esquema 4), sembrando 84 mg, con una relación muestra:sílica 1:60, y una elución con aumento gradual de la polaridad. Se recogieron 100 fracciones, agrupadas por CCF en 7 fracciones. Se muestra en la Tabla 23 las fases móviles y volumen utilizado. Se muestra en la Tabla 24 la masa de las fracciones junto con el rendimiento obtenido respecto al extracto de metanol.

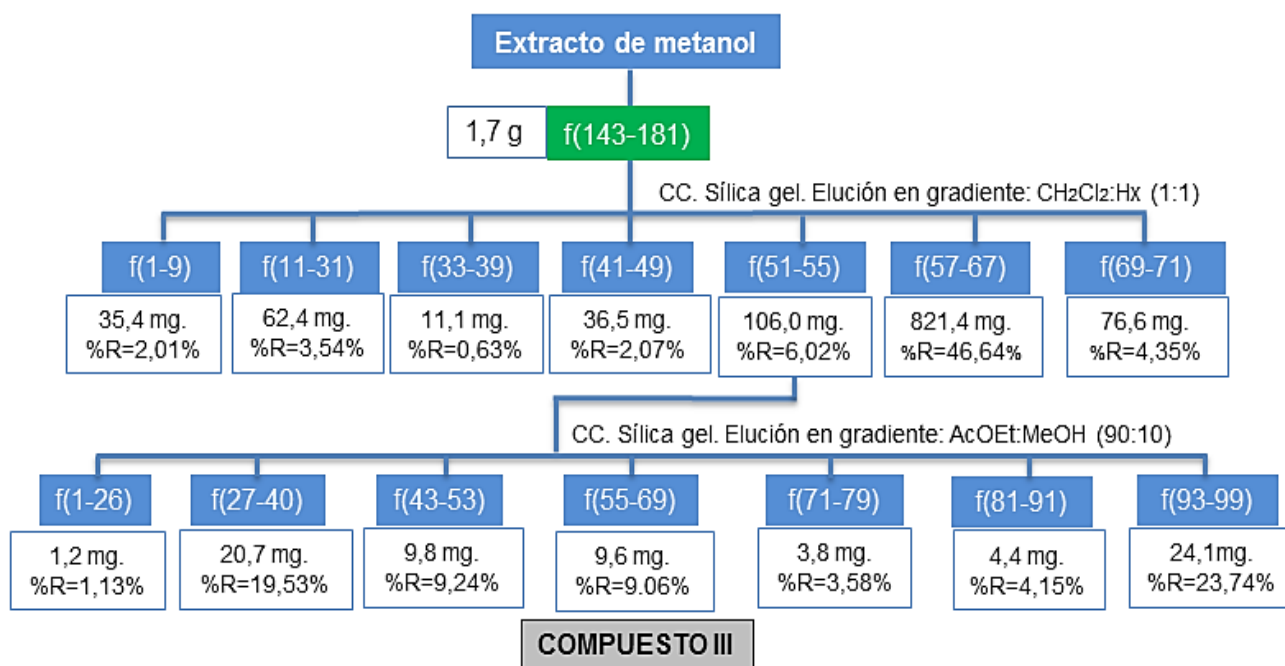
Tabla 18. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y gasto volumétrico. sG5.

Sistema de solvente/Relación		Fracciones recolectadas	Gasto volumétrico, mL
AcOEt: CH ₃ OH	90:10	1-51	100
AcOEt: CH ₃ OH	85:15	53-93	100
CH ₃ OH	100	100	50

Tabla 19. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. sG5

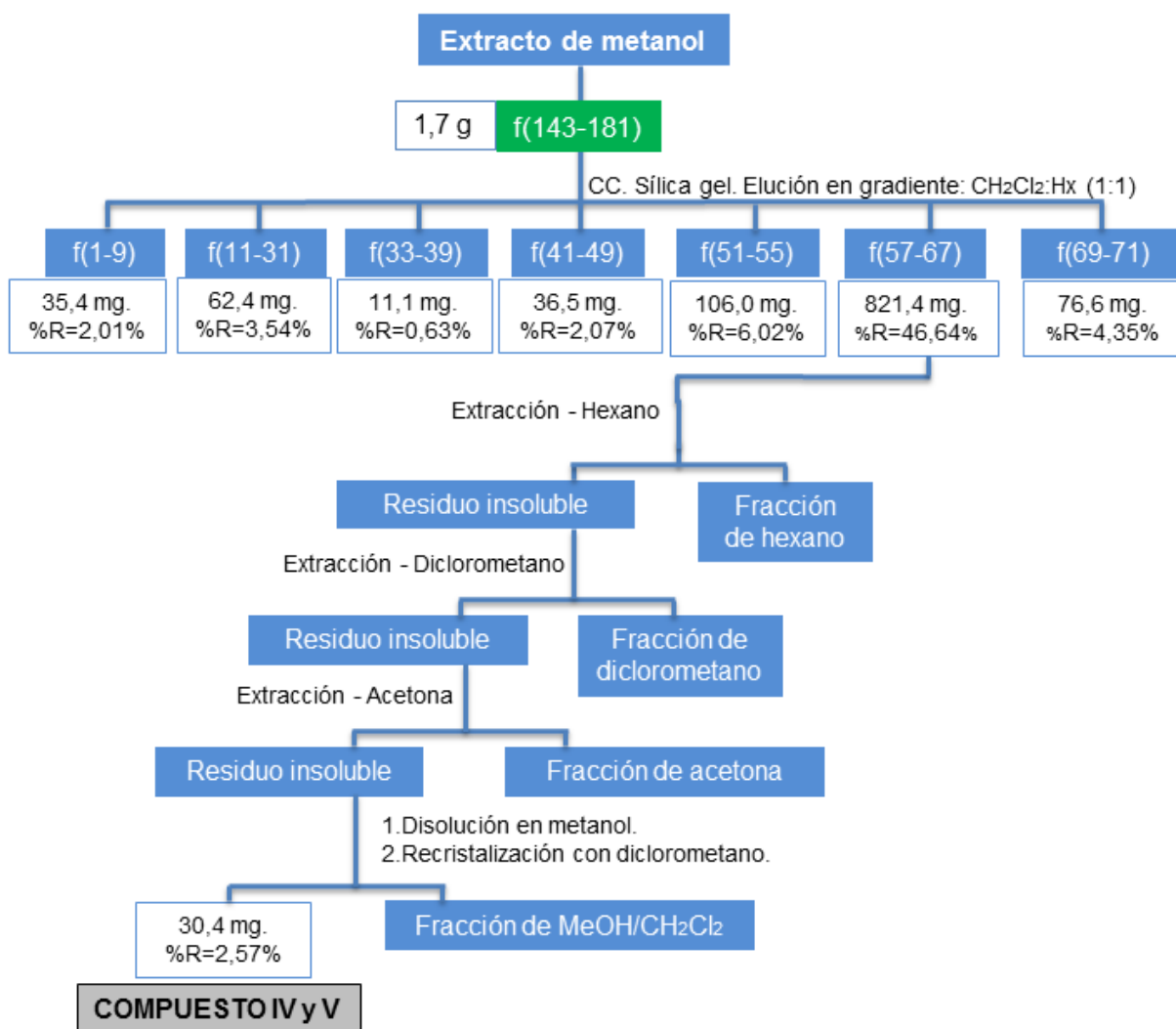
Fracciones		Masa obtenida, mg	Rendimiento (%)
1	1-26	1,2	0.04
2	27-40	20,7	0.74
3	43-53	9,8	0.35
4	55-69	9,6	0.34
5	71-80	3,8	0.14
6	81-91	4,4	0.16
7	92-100	24,1	0.86

Se presenta en la fracción (55-69) un compuesto que revela de color morado con p-anisaldehído (Compuesto III), en espera de análisis de RMN (^1H , ^{13}C Y DEPT). El resto de las fracciones presentaron poca masa y diversos compuestos.



Esquema 4. Purificación del grupo G10, subgrupo sG5.

Se procedió con la purificación de sG6 a través de extracciones por solubilidad usando $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CH_2Cl_2 y acetona (Esquema 5), realizando al análisis con CCF en cada extracción. Se disolvió el residuo insoluble en metanol y se recristalizó añadiendo CH_2Cl_2 . El sólido obtenido se analizó por CCF revelando de color marrón con p-anisaldehído. Se obtuvo una masa de 30,4 mg (Compuesto IV y V), analizado por RMN (^1H , ^{13}C Y DEPT).



Esquema 5. Purificación del grupo G10, subgrupo sG6.

IV.1.4.2.2 Extracto de diclorometano

Se inició realizando una extracción por solubilidad con $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ a 2,8 g del extracto (extracto bruto) (Esquema 6), para extraer los componentes menos polares que hayan

sido extraídos en el CH_2Cl_2 . Se comparó el fraccionamiento con $\text{n-C}_6\text{H}_{14}$ con el residuo del extracto de CH_2Cl_2 por CCF observando la separación de estos compuestos menos polares; se realizó una segunda comparación con el extracto de $\text{n-C}_6\text{H}_{14}$ obtenido con el soxhlet corroborando que los compuestos separados del CH_2Cl_2 están presentes en el extracto de $\text{n-C}_6\text{H}_{14}$.

IV.1.4.2.2.1 Tratamiento de la extracción con $\text{n-C}_6\text{H}_{14}$

Se obtuvo de la extracción con $\text{n-C}_6\text{H}_{14}$ (Esquema 6), una masa de 360 mg, con un rendimiento de 12,86%. Se realizó cromatografía de columna de sílica-gel, sembrando la masa total, utilizando una relación de sílica de 1:60, y una elución con gradiente de polaridad. Se colectaron 66 fracciones agrupadas por CCF en 8 grupos revelando con p- anisaldehído. Se muestra en la Tabla 19 las fases móviles y el volumen utilizado, además de la masa de los distintos grupos junto su rendimiento respecto al fraccionamiento con $\text{n-C}_6\text{H}_{14}$ en la Tabla 20.

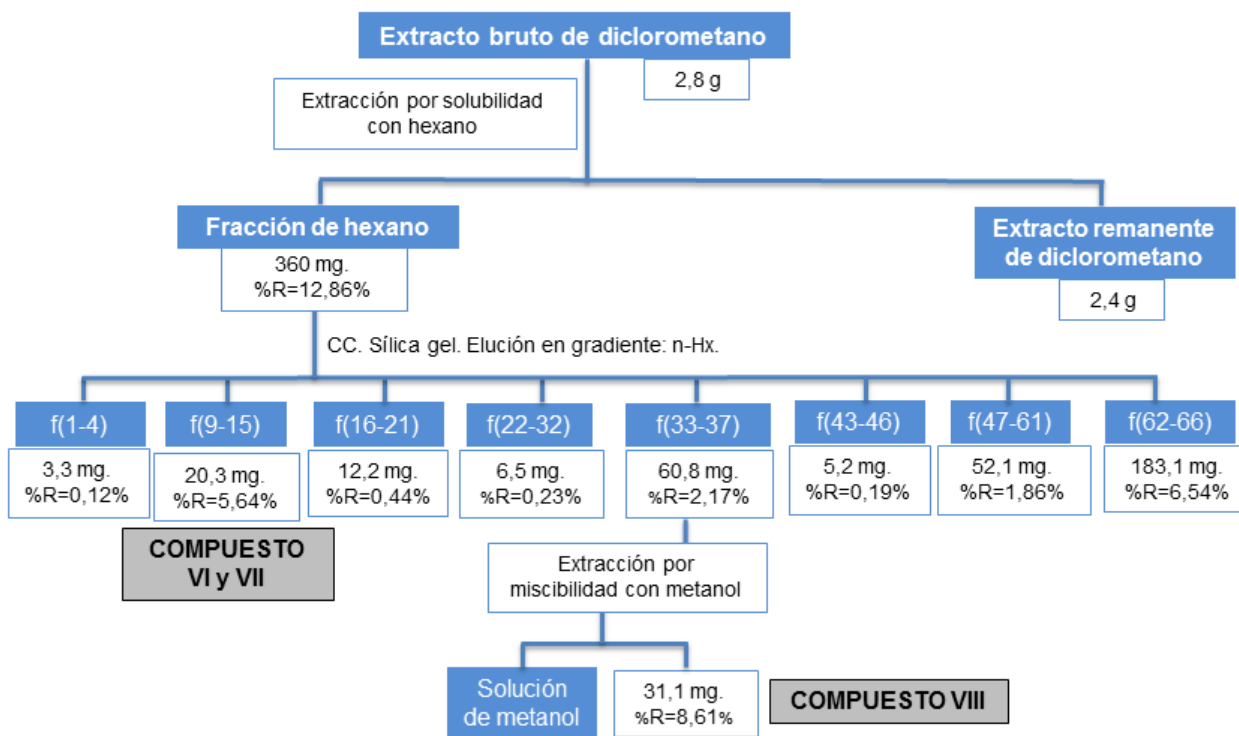
Tabla 20. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y volumen utilizado. Ext $\text{n-C}_6\text{H}_{14}$.

Sistema de solvente/Relación		Fracciones recolectadas	Gasto volumétrico, mL
$\text{n-C}_6\text{H}_{14}$	100	1-10	100
$\text{n-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	80:20	11-21	100
$\text{n-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	70:30	22-37	100
$\text{n-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	50:50	38-56	150
$\text{n-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	40:60	57-60	100
$\text{n-C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	20:80	61-62	50
CH_2Cl_2	100	63-64	50
$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$	98:2	65	60
CH_3OH	100	66	100

Tabla 21. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. Ext $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$.

Grupo/Fracciones		Masa obtenida, mg	Rendimiento (%)
G1	1-4	3,3	0,92
G2	9-15	20,3	5,64
G3	16-21	12,2	3,39
G4	22-32	6,5	1,8
G5	33-37	60,8	16,89
G6	43-46	5,2	1,44
G7	47-61	52,1	14,47
G8	62-66	183,1	50,86

Se obtuvo un compuesto en el grupo G2 que revela de color morado con p-anisaldehído (Compuesto VI y VII), al que se le realizaron análisis con RMN (^1H , ^{13}C Y DEPT). Además, se evaluó el tratamiento de G5 debido a su masa y presencia de 2 componentes, proceso de purificación realizado a través de extracciones por solubilidad con metanol; se obtuvo un compuesto que da color morado con p-anisaldehído, con masa de 30,1 mg y un rendimiento de 8,61 % respecto a la fracción de $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ (Compuesto VIII), y fue analizado por RMN (^1H , ^{13}C y DEPT) y CG-EM.



Esquema 6. Fraccionamiento de la extracción con $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ del extracto de CH_2Cl_2 por CC.

IV.1.4.2.2 Tratamiento del extracto de CH_2Cl_2 remanente

Se realizó cromatografía de columna de sílica-gel (Esquema 7), sembrando 1,3 g de extracto, con una relación de sílica 1:80, y eluyendo con gradiente de polaridad dando inicio con hexano. Se colectaron 111 fracciones, unidas en 9 grupos. Se muestra en la Tabla 21 las fases móviles y el volumen utilizado, además de la masa de los distintos grupos junto su rendimiento respecto a los 1,3 g del extracto en la Tabla 22.

Tabla 22. Fracciones colectadas, sistemas de solventes y volumen utilizado.

Sistema de solvente/Relación		Fracciones recolectadas	Gasto volumétrico, mL
n-C ₆ H ₁₄	100	1-12	100
n-C ₆ H ₁₄ :AcOEt	99:1	13-27	100
n-C ₆ H ₁₄ :AcOEt	98:2	28-43	100
n-C ₆ H ₁₄ :AcOEt	95:5	44-60	100
n-C ₆ H ₁₄ :AcOEt	90:10	61-76	100
n-C ₆ H ₁₄ :AcOEt	85:15	77-89	100
n-C ₆ H ₁₄ :AcOEt	80:20	90-100	100
n-C ₆ H ₁₄ :AcOEt	70:30	100-111	100

Tabla 23. Masa de las fracciones unidas y rendimiento. CH₂Cl₂ remanente.

Grupo/Fracciones		Masa obtenida, mg	Rendimiento (%)
G1	16-22	58,7	4,52
G2	23-27	269,6	20,74
G3	28-37	85,9	6,61
G4	38-81	124,5	9,60
G5	82-88	42,5	3,27
G6	89-99	251,9	19,38
G7	100-104	62,6	4,82
G8	105-110	72,2	5,56
G9	111	35,8	2,75

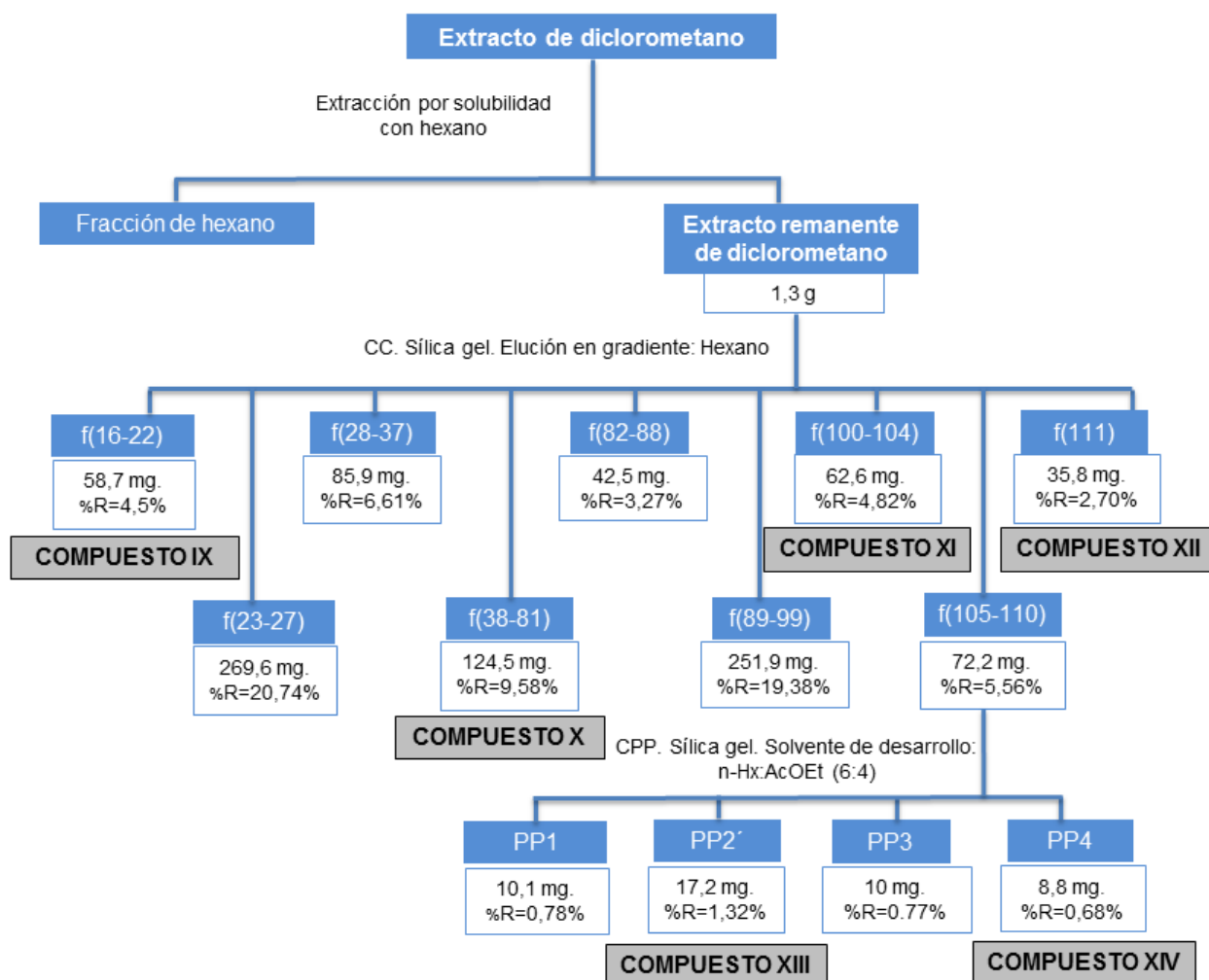
Los grupos G1, G4, G7 y G9 resultaron compuestos aislados evaluados por CCF (Compuestos IX, X, XI y XII, respectivamente), realizando el análisis de G4 y G7 por técnicas de RMN (¹H, ¹³C Y DEPT), mientras que G1 y G9 permanecen en proceso de análisis. El grupo G8 fue purificado a través de una CPP de sílica-gel eluida con 100ml

de AcOEt:n-C₆H₁₄ (6:4). En la Tabla 23 se muestra la masa de las regiones significativas que fueron aisladas con su rendimiento respecto el extracto remanente de CH₂Cl₂.

Tabla 24. Masa de regiones obtenidas en CPP. G8

Región	Masa de región, mg	Rendimiento
sG8.A (f(105-110)).A	10,1	0,78%
sG8.B (f(105-110)).B	17,2	1,32%
sG8.C (f(105-110)).C	10	0.77%
sG8.D (f(105-110)).D	8,8	0,68%

El subgrupo sG8.B (PP2') corresponde a un compuesto puro, que da color morado con p-anisaldehído (Compuesto XIII), y fue sometido a análisis por RMN (¹H, ¹³C y DEPT). sG8.D (PP4) presentó un compuesto puro que también da color morado con p-anisaldehído (Compuesto XIV), pero los ensayos espectrales no fueron considerados por la masa de dicho compuesto.



Esquema 7. Fraccionamiento del extracto remanente de CH_2Cl_2 por CC.

IV.2 ESTUDIOS PRE-CLINICOS Y ENSAYOS BIOLOGICOS DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS SECAS DE *Plectranthus neochilus*.

IV.2.1 Estudios preclínicos.

IV.2.1.1 Material vegetal y preparación del extracto acuoso.

(Se muestra en IV.1.3. y IV.1.4.1 respectivamente)

IV.2.1.2 Animales experimentales.

En la determinación de la toxicidad aguda se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1, con peso corporal de 18 - 22 g. En la realización de los ensayos de analgesia se utilizaron la misma cepa y género de ratones con pesos entre 25 – 30 g. Estos animales fueron obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" del Ministerio del Poder Popular para la Salud. El mantenimiento de los animales experimentales se llevó a cabo bajo condiciones estándar de temperatura, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con libre acceso al agua y comida. Al menos 8 horas antes de que se diera inicio al experimento los animales fueron sometidos a ayuno con libre acceso al agua.

IV.2.1.3 Reactivos y fármacos.

Los reactivos y fármacos que fueron empleados en la realización de los diversos experimentos fueron obtenidos de casa comerciales. Ácido acético y formaldehído de Merck®, ácido acetilsalicílico (ASA) de Bayer®, clorhidrato de tramadol (TRA), ketoprofeno (KET) de Elter®, morfina (MOR) de Laboratorio Sanderson S.A, Santiago, Chile.

IV.2.1.4 Procedimiento experimental

IV.2.1.4.1 Evaluación de la toxicidad aguda y determinación de la DT₅₀.

IV.2.1.4.1.1 Evaluación de la toxicidad aguda

Se determinó la toxicidad aguda del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus* en ratones, utilizando el método descrito por Irwin (1962) ^[72]. Se utilizaron 6 ratones por grupo experimental (extracto acuoso a distintas dosis) y se compararon con el grupo control (agua destilada). Se administró el extracto acuoso por vía oral (v.o), empleando una jeringa de 1 cc acoplada a una cánula orogástrica. Luego de administrar el extracto, se procedió con la observación y evaluación individual de los ratones en correlación a los controles, a los 10, 30, 60, 90 minutos, 24 horas y después de 15 días, registrándose el número de muertes o signos de toxicidad. (OMS, 2000)

IV.2.1.4.1.2 Determinación de la DT₅₀

Posteriormente, se administraron dosis menores 3.5, 2.5, 1.75, 1.25 y 0.625 g/Kg de peso, siguiendo el procedimiento antes descrito. Para el cálculo de la DT₅₀ se realizó mediante la construcción de una curva dosis-efecto tóxico, utilizando el efecto tóxico de tendencia reversible y dependiente de la dosis (Probit, Litchfield y Wilcoxon, 1949) ^[73].

IV.2.1.4.2 Estudios Anti-nociceptivos.

IV.2.1.4.2.1 Método Químico: Contorsión abdominal inducida por ácido acético.

La actividad antinociceptiva del extracto acuoso liofilizado de las hojas secas de *P. neochilus*, se evaluó usando ratones albinos empleando el método químico descrito por Lima y col (2005) ^[74], con ligeras modificaciones. Se administró ácido acético al 0,6% en solución fisiológica (NaCl 0,9%). Se utilizaron 5 ratones por grupos experimentales. La administración de ácido se realizó por vía intraperitoneal (i.p) (0,1 mL/10g de peso corporal). Transcurrido 5 minutos de la inyección del agente irritante, se realizó el registro del número de contorsiones abdominales por un periodo de 30 minutos. Para la evaluación del extracto acuoso, se utilizaron dosis menores a la DT₅₀ (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16). Cada dosis fue administrada por vía oral a una razón de 0,1 mL/10gr de peso, 30 minutos antes de la administración del ácido acético. El grupo de los animales control negativo recibió un volumen igual de vehículo (agua destilada).

Se utilizaron los siguientes fármacos de referencia: el ácido acetilsalicílico evaluado a 100 y 200 mg/kg, v.o, en goma arábica al 3%; ketoprofeno a diferentes dosis (8; 6,5; 5 y 1 mg/Kg, i.p) y el tramadol® 5 mg/Kg, vo, en goma arábica al 3%. Para el caso del TRA

se esperó 10 minutos antes de la inyección del ácido acético, mientras que para ASA Y KET el periodo de latencia fue de 30 minutos.

IV.2.1.4.2.2 Método térmico: Estimulo calórico de la cola.

Se utilizó el procedimiento descrito por Davies y col (1946) ^[75] con ligeras modificaciones. En este método se utilizó un estímulo térmico generado por la aproximación de un cauter sobre la cola del ratón, registrándose el tiempo de reacción. Los animales se distribuyeron en 4 grupos de 5 animales cada uno. Estos grupos fueron tratados de la siguiente manera: I: control negativo (agua destilada, v.o); II: MOR, 5 mg/Kg s.c; III: ASA, 100 mg/Kg, v.o y IV: Extracto acuoso liofilizado, 1/2 DT₅₀, v.o. El tiempo de retiro de la cola (TRC, seg) fue evaluado a los 30, 60 y 90 minutos después de la administración de los diferentes tratamientos, fijando como tiempo máximo de exposición en 15 seg.

IV.2.1.4.2.3 Método de la formalina

La prueba de formalina se ejecutó de acuerdo al procedimiento descrito por Hunskaar y Hole (1987) ^[76]. La solución de formaldehido (2,5% v/v en agua destilada), fue administrada vía subcutánea a razón de 20 µL, en la región plantar de una de las patas posteriores del animal experimental. Posteriormente se procedió al registro del tiempo en que se mantuvo en conductas de mordidas, lamidas y frotamientos de la pata. El periodo de observación fue dividido en dos fases: de 0 - 5 minutos luego de la inyección, denominada fase temprana (fase neurogénica), y la segunda fase estuvo

comprendida de 15 - 30 minutos, fase tardía (fase inflamatoria). Para la elaboración de los controles positivos se utilizaron ácido acetilsalicílico (100 y 200 mg/kg, v.o, en goma arábica al 3%) y morfina (5 mg/Kg, i.p). Para el grupo experimental al cual se le administró MOR, el periodo de latencia fue de 5 minutos, mientras que para ASA fue de 30 minutos previo a la administración de la solución de formaldehído.

IV.2.2 Ensayos biológicos

IV.2.2.1 Material vegetal y preparación del extracto acuoso

(Referencias mostradas en IV.1.3 y IV.1.4.1, respectivamente)

IV.2.2.3 Procedimiento experimental

IV.2.2.3.1 Ensayo de citotoxicidad

Las células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y se cultivaron hasta confluencia en condiciones de 5% de CO₂ a 37 °C en medio completo que contiene: DMEM, 10% de suero fetal de bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. Luego se lavaron 2 veces con PBS (buffer salino-fosfato) y se lisaron con tripsina 0,025 M en EDTA dejando incubar a 37°C por 5 minutos para luego centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm. El sedimento se trató con PBS para formar una suspensión de células, la cual se utilizó para realizar el ensayo de citotoxicidad basado en MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil

tetrazolio) por el método descrito por Mosman (1983) ^[77], el cual consiste en la formación de púrpura de formazán a partir del MTT, en donde esta sal es reducida por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. Para esto, se incubaron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con medio completo (5% CO₂ a 37°C), durante 24 horas. El medio se removió y se reemplazó por medio completo fresco con el siguiente esquema de tratamientos: pozos controles (medio completo), pozos *P. neochilus* (concentraciones crecientes). Bajo estas condiciones las células se cultivaron (5% CO₂ a 37°C) durante 72 horas. Al término de cada tiempo de experimentación, el medio fue reemplazado por 100 µL de una solución de MTT (2,5 mg/mL) en cada pozo de la placa. Las placas se incubaron por 3 horas (5% de CO₂ a 37°C). Posteriormente se eliminó el sobrenadante de cada pozo y la monocapa fue disuelta con la incorporación de 100 µL de DMSO. La placa se dejó reposar por 30 minutos para que se desarrollara el color y luego se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro de placa (BioRad, modelo Berchmark). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad con respecto al control.

IV.2.2.3.2 Actividad atrapadora de anión superóxido

Para la determinación de la capacidad atrapadora de O₂^{•-} del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus* se empleó la metodología descrita por Bielski y colaboradores (1980) ^[78], el cual se basa en la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) formazán por el O₂^{•-} generado por la oxidación de la xantina a ácido úrico a través de la xantina oxidasa, procesos generales mostrados en las Figura 14 y 15.

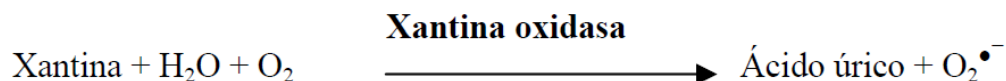


Figura 14. Reacción de oxidación de xantina catalizada por xantina oxidasa.

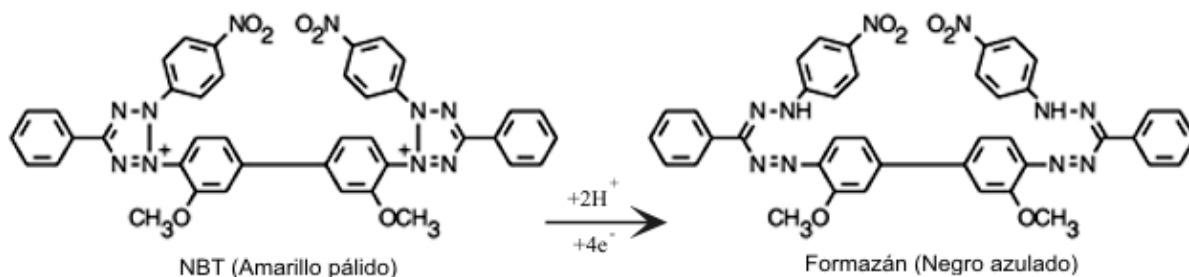


Figura 15. Reacción de reducción de NBT a formazán.

Se preparó una solución de reacción con la siguiente composición: xantina 0,3 mM; NaCO_3 0,4 M y NBT 150 μL en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7,0). El ensayo se comenzó colocando en una celda de cuarzo 782 μL la mezcla de reacción, 170 μL de extracto acuoso (400 y 100 $\mu\text{g/mL}$) y 170 μL de un buffer de fosfatos 50 mM (pH 7,4). Posteriormente se inició la reacción colocando 48 μL de xantina oxidasa (8U) y se obtuvo las lecturas en simultáneo de la absorbancia a 295 nm y a 560 nm cada minuto durante 3 minutos. También se preparó una celda de 100% de reducción que contenía: 170 μL de buffer de fosfatos 50 mM en lugar de muestra. Fue necesario medir la absorbancia a 295 nm (ác. úrico), para asegurar que el extracto no afecta la actividad de la xantina oxidasa (Owen y John, 1999). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de $\text{O}_2^{\bullet-}$ atrapado, mientras que la producción de ácido úrico fue expresada como $\Delta\text{DO}_{295}/\text{minuto}$. El porcentaje de superóxido atrapado se expresó según la fórmula:

$$\% I = \frac{\overline{\Delta A_c} - \overline{\Delta A_m}}{\overline{\Delta A_c}} \times 100$$

Siendo:

$\overline{\Delta A_c}$ = media aritmética del incremento de absorbancia del control

$\overline{\Delta A_m}$ = media aritmética del incremento de absorbancia de la muestra

IV.2.2.3.3 Actividad atrapadora de peróxido de hidrogeno

La capacidad de atrapamiento de peróxido de hidrógeno dada por el EAL se evaluó utilizando el método de Ruch (1989) ^[79]. Se preparó en una celda de 1 mL una solución con 700 μ L de H₂O₂ 40 mM preparado en un buffer de fosfato (pH 7,4), con 300 μ L de EAL en agua destilada a concentraciones de 400 μ g/mL y 100 μ g/mL. Se llevó a cabo la medición de la absorbancia de esta solución espectrofotométricamente a los 0 y 10 minutos de ser preparada. La medida de la absorbancia de la solución fue a 230 nm. La cantidad de peróxido de hidrógeno radical inhibido por el extracto se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad atrapadora de H}_2\text{O}_2 = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \times 100$$

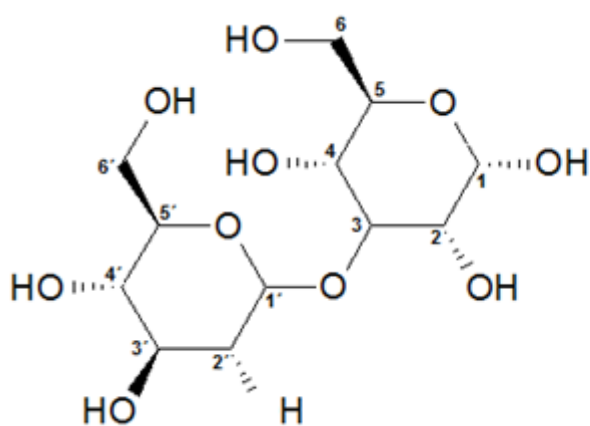
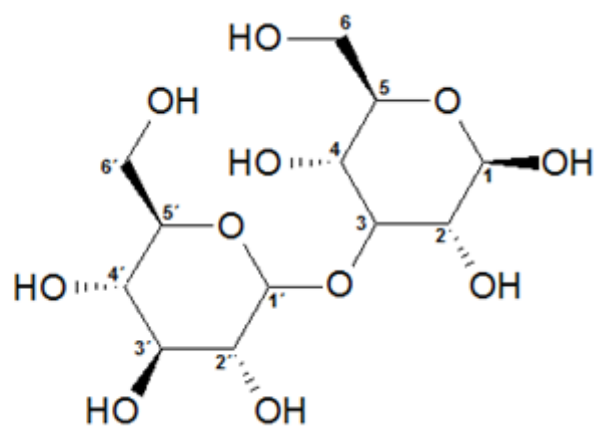
Donde, Abs control es la absorbancia de la solución de H₂O₂ y Abs muestra es la absorbancia del H₂O₂ + el extracto o estándar.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

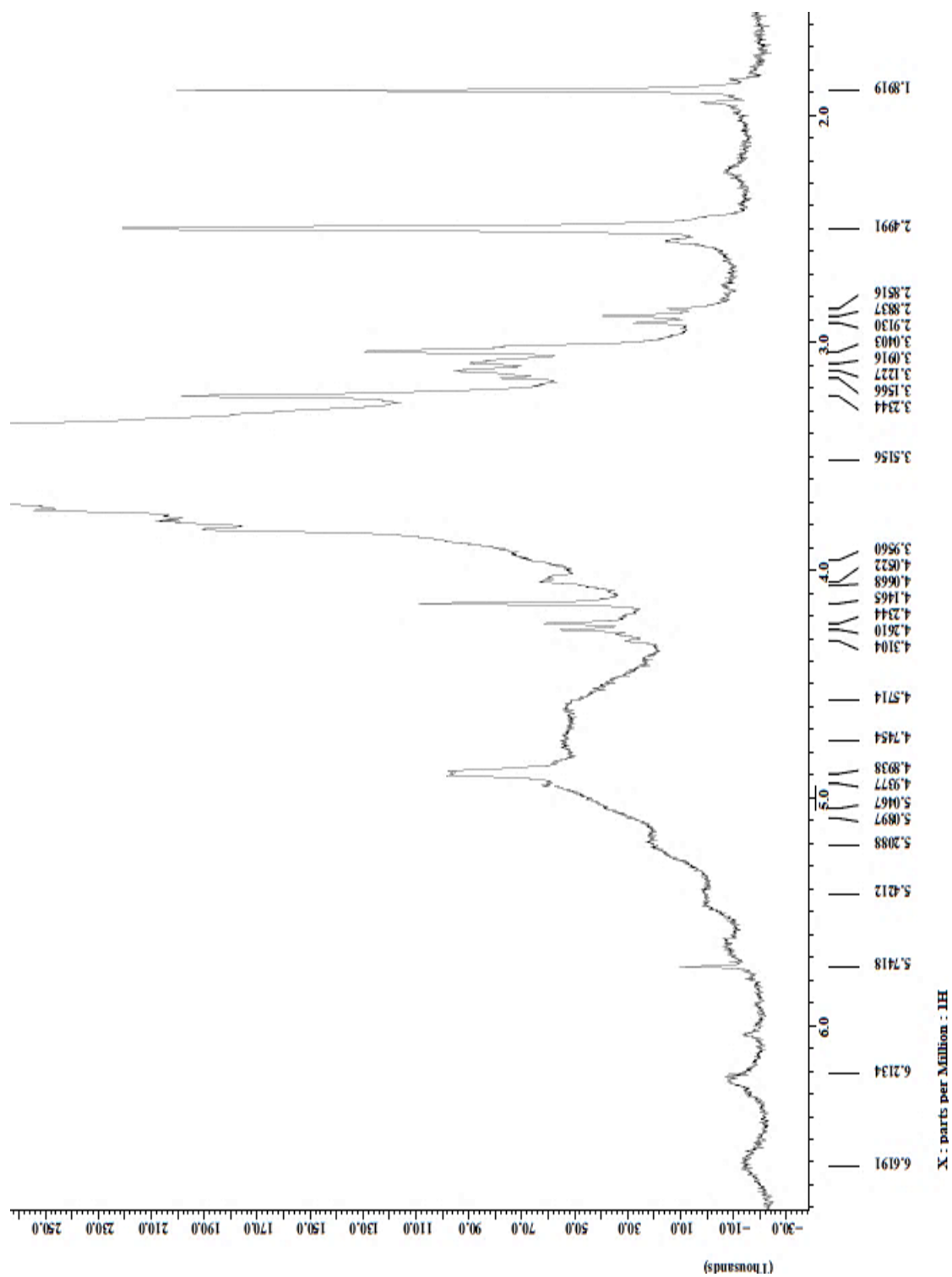
V.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS SECAS DE *Plectranthus neochilus*.

V.1.1 Elucidación del compuesto IV y V

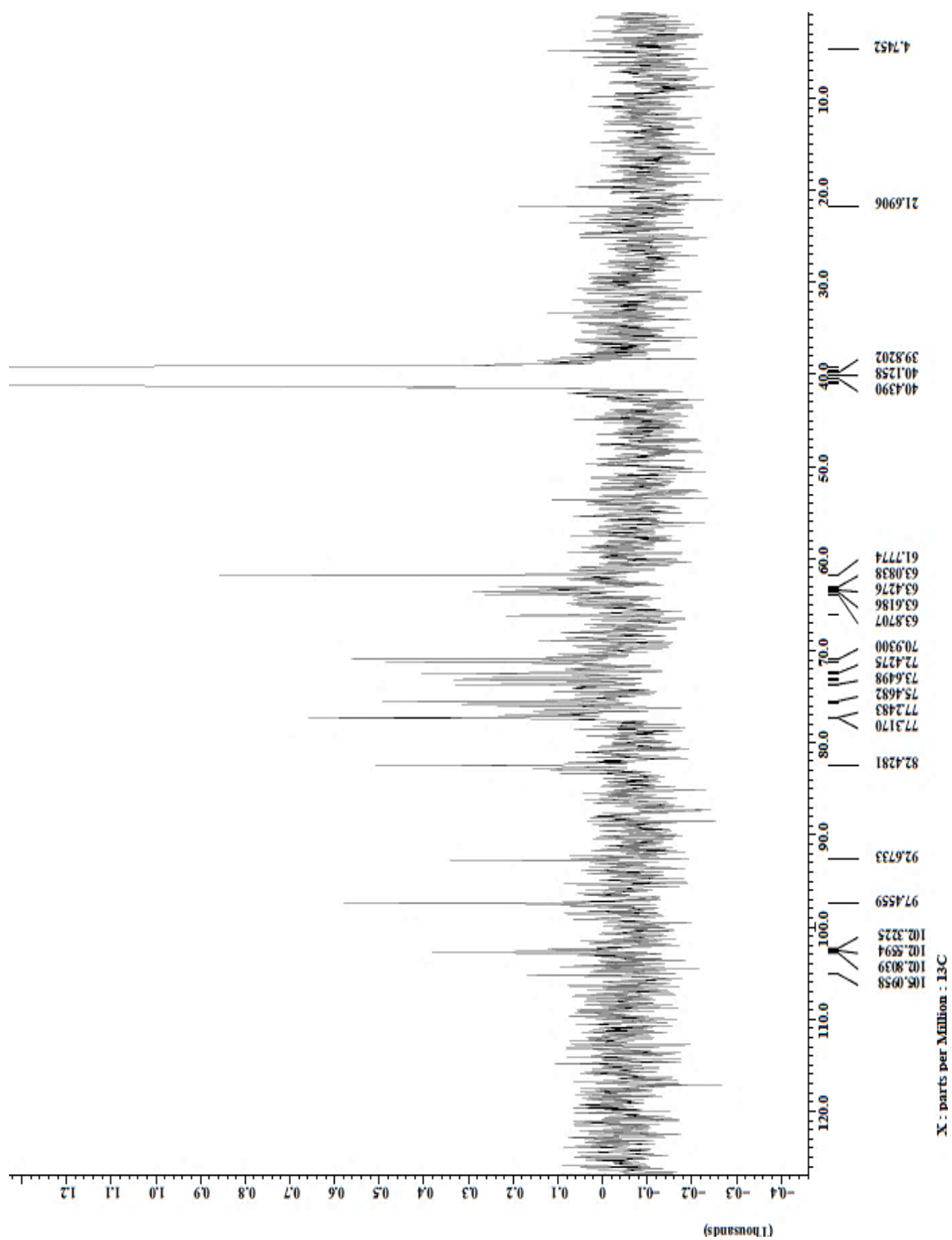
 α - Laminaribiosa β - Laminaribiosa

La mezcla de los compuestos IV y V proveniente del extracto de metanol, es soluble de agua y DMSO, se presentó como un sólido blanco amorfo. Cuya mancha es de color marrón con p – anisaldehído en CCF. Se obtuvo una masa de 30,4 mg, con un rendimiento de 1,09 % respecto al extracto de metanol. Para este compuesto se llevaron a cabo análisis de RMN ^{13}C , ^1H Y DEPT 135.

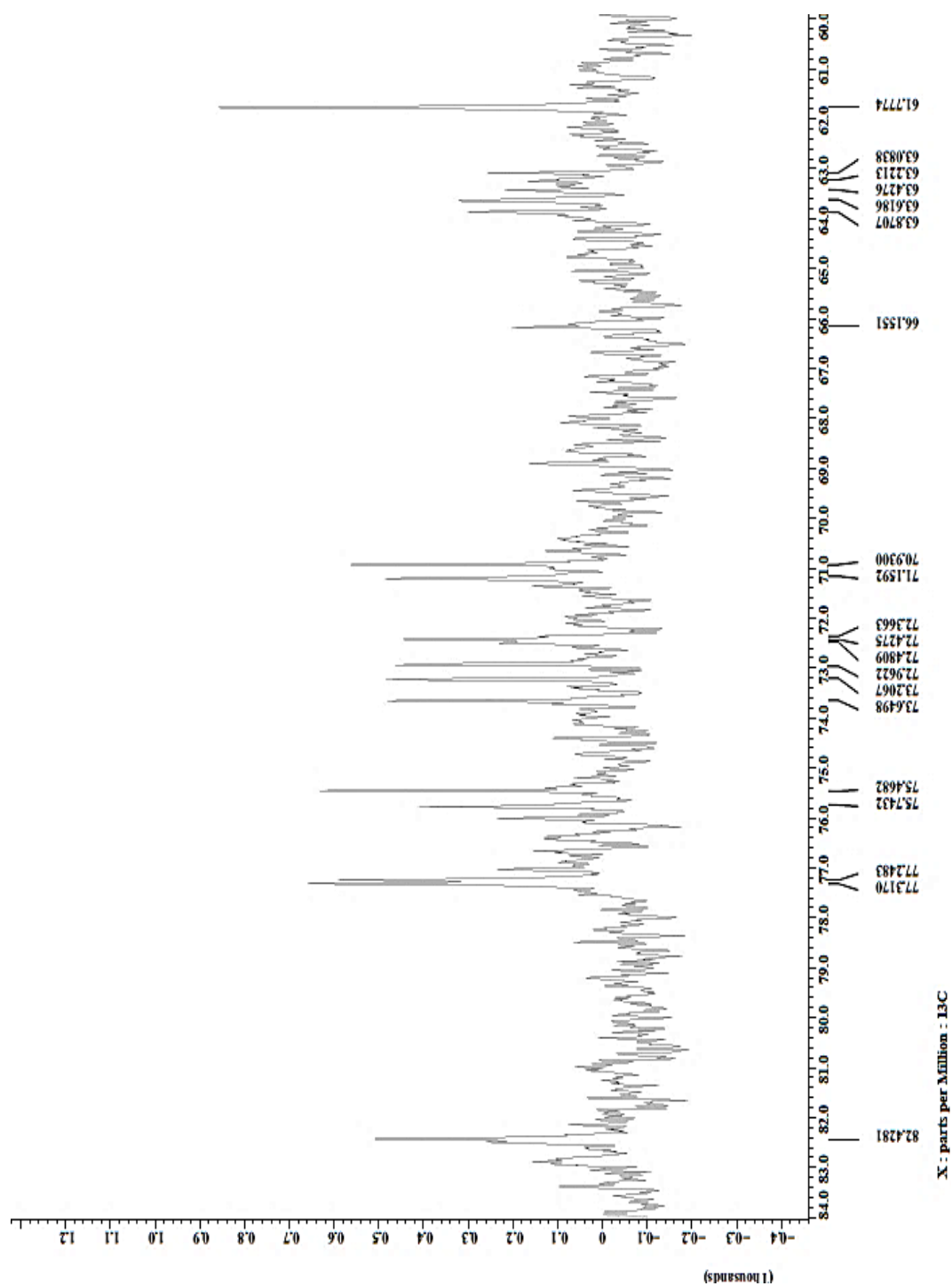
El espectro de RMN ^1H (Espectro 1) presenta señales entre 3.09 y 4.14 ppm que son atribuidos a protones de carbohidratos de tipo sacárido (-CHOH), también en el espectro se observan señales desdobladas de protones anoméricos a 4.93 ppm y 4.24 ppm. En los espectros de RMN ^{13}C y el DEPT 135 (Espectro 2-5) se observan señales en el rango (δ_{C} : 61.7 – 102.7 ppm) características de carbonos metínicos y metilénicos oxigenados para una estructura hidrocarbonada del tipo sacárido. Las señales (δ_{C} : 61.7 – 77.3 ppm) son debidas a carbonos desapantallados unidos a grupos hidroxilo. Los desplazamientos (δ_{C} : 102.7 y 102.5 ppm) son propios de carbonos anoméricos, y las señales (δ_{C} : 97.5 y 92.7 ppm) representan carbonos involucrados en un enlace glicosídico. A través de las observaciones realizadas se propone la presencia de estructuras de tipo disacárido; se llevó a cabo la comparación de los datos reportados en la literatura (RMN de ^1H y ^{13}C) de compuestos del grupo de los D-glucopiranosil-D-glucopiranosidos ^[80] con los datos experimentales, mostrando en las Tablas 24 y 25, la relación entre las señales experimentales y las señales del compuesto de referencia que otorgó mayor correspondencia a estas. Es importante destacar que los espectros de RMN experimentales se tomaron en DMSO- d_6 a 270 MHz y los compuestos de referencia fueron tomados en D_2O a 500 MHz. Con los datos reportados y la comparación realizada, se postulan para esta mezcla como compuestos mayoritarios, α y β – Laminaribiosa.



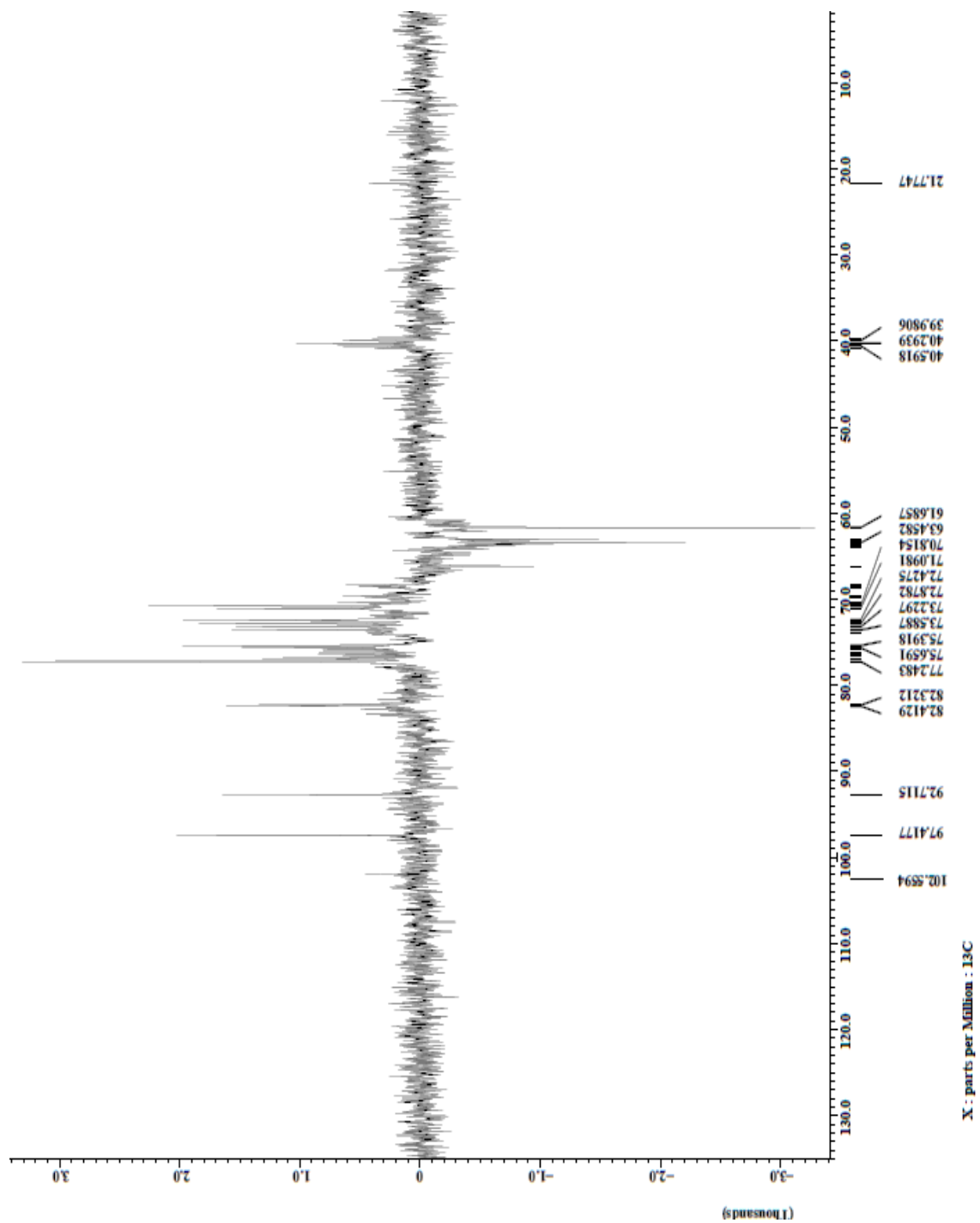
Espectro 1. RMN de ^1H (DMSO-d₆, 270 MHz) compuesto IV y V.



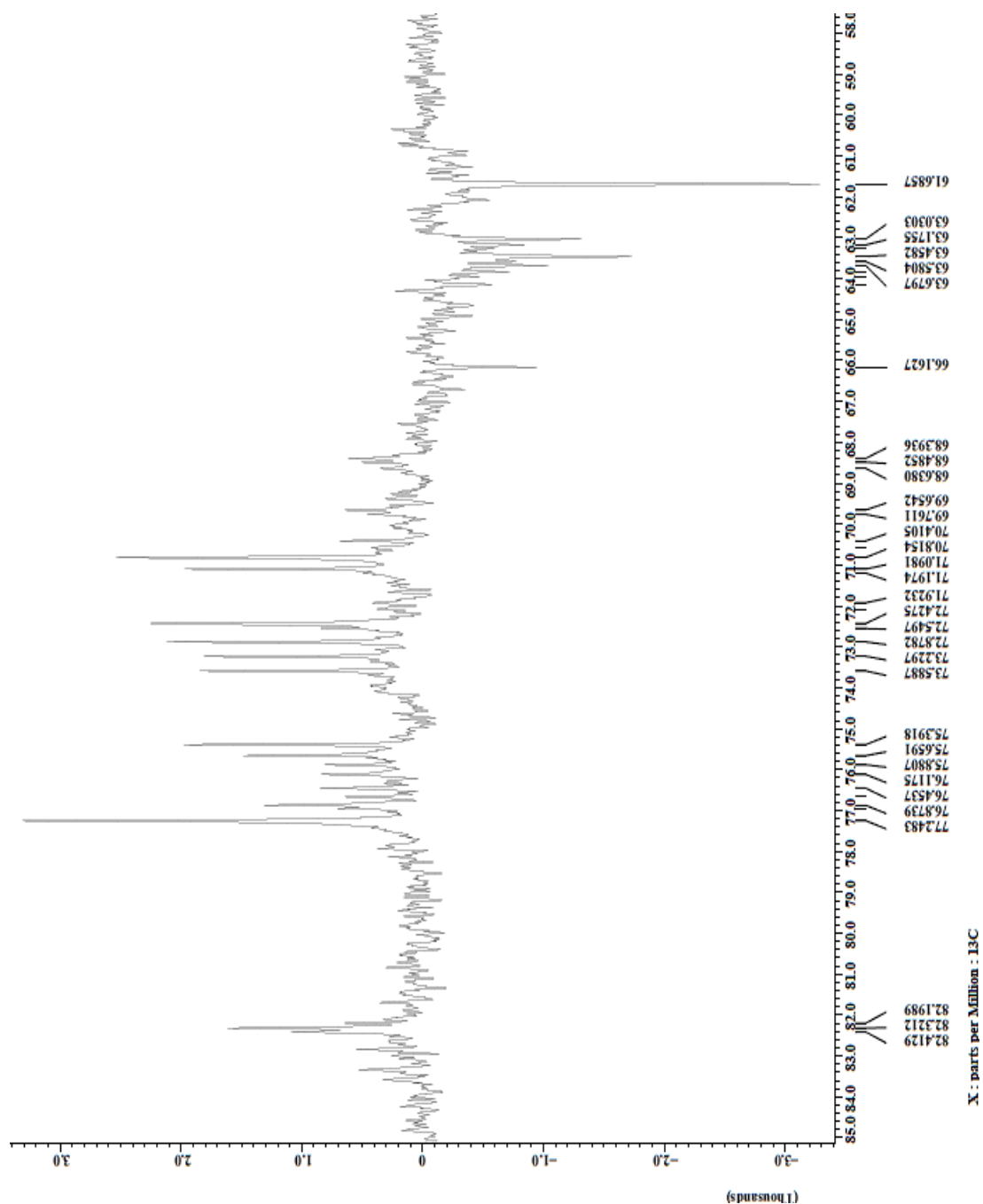
Espectro 2. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 270 MHz) compuesto IV y V.



Espectro 3. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 270 MHz) compuesto IV y V. Ampliación de 82 – 61 ppm.



Espectro 4. DEPT 135 (DMSO-d₆, 270 MHz) compuesto IV y V.



Espectro 5. DEPT 135 (DMSO-d₆, 270 MHz) compuesto IV y V. Ampliación de 82 – 61 ppm.

Tabla 25. Desplazamientos químicos, RMN de ^1H (DMSO- d_6) de los compuesto IV y V comparados con los datos de la literatura (Mattias U. Roslund y col. (2007)). R: extraído de la referencia.

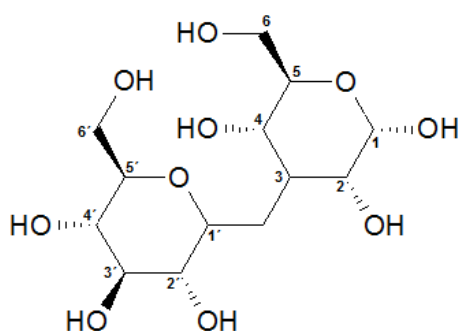
Posición	α -Laminaribiosa. _R (D ₂ O a 500 MHz)	β -Laminaribiosa. _R (D ₂ O a 500 MHz)	Compuesto IV y V. (DMSO- d_6 a 270 MHz)	
			α -Laminaribiosa	β -Laminaribiosa
			δ ^1H ppm	
1	5.221	4.66	4.93	4.24
5	3.85	3.476	3.82	-
6	3.77	3.723	3.81	-
1'	4.70	4.72	4.15	-
2'	3.35	3.348	-	-
3'	3.52	3.509	3.23	-

El resto de las señales de los protones pertenecientes a la β -Laminaribiosa no pudieron ser asignadas puesto que estas se encontraban solapadas.

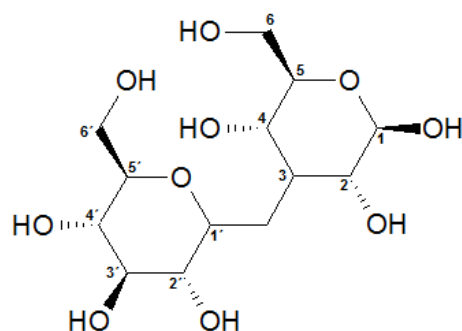
Tabla 26. Desplazamientos químicos, RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) de los compuesto IV y V comparados con los datos de la literatura (Mattias U. Roslund y col. (2007)).

Posición	α -Laminaribiosa. _R (D ₂ O a 500 MHz)	β -Laminaribiosa. _R (D ₂ O a 500 MHz)	Compuesto IV y V. (DMSO- d_6 a 270 MHz)		DEPT 135
			α -Laminaribiosa	β -Laminaribiosa	
			δ ^{13}C , ppm		Asig.
1	92.7	96.4	92.7	97.5	CH
2	71.7	74.5	72.5	73.6	CH
3	83.1	85.4	82.3	82.4	CH
4	68.8	68.8	70.9	70.9	CH

5	71.9	76.2	72.9	75.7	CH
6	61.2	61.4	61.8	61.8	CH ₂
1'	103.6	103.5	102.7	102.5	CH
2'	74.2	74.1	73.2	75.5	CH
3'	76.2	76.3	77.2	77.2	CH
4'	70.3	70.3	71.2	71.2	CH
5'	76.7	76.7	77.3	77.3	CH
6'	61.4	61.4	61.8	61.8	CH ₂

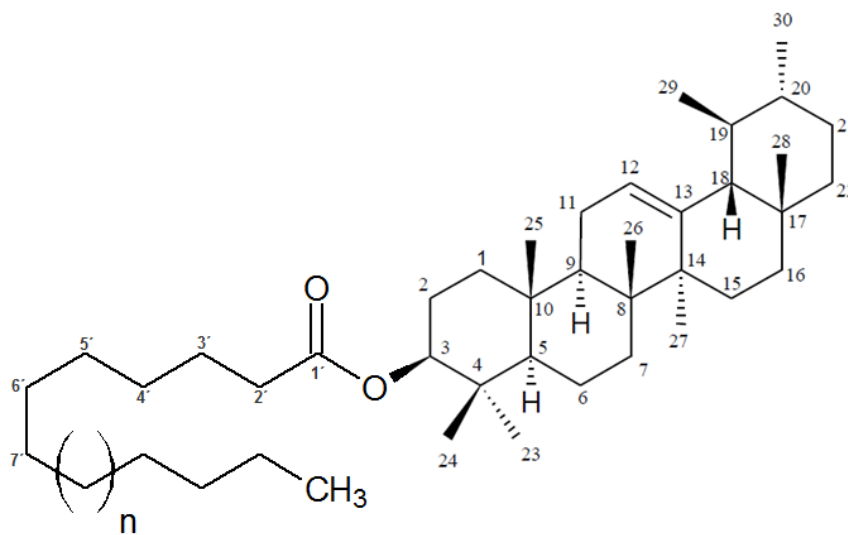


α - Laminaribiosa

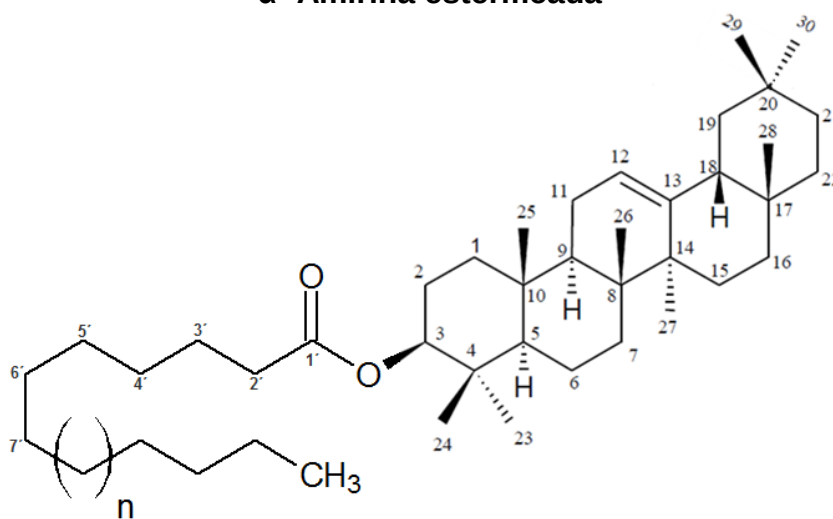


β - Laminaribiosa

V.1.2 Elucidación de los compuestos VI y VII



α -Amirina esterificada



β -Amirina esterificada

La mezcla de los compuestos VI y VII, proveniente de la extracción con hexano realizada al extracto de diclorometano, de las fracciones de la 9-15, soluble de diclorometano, de aspecto aceitoso y color amarillo. Da

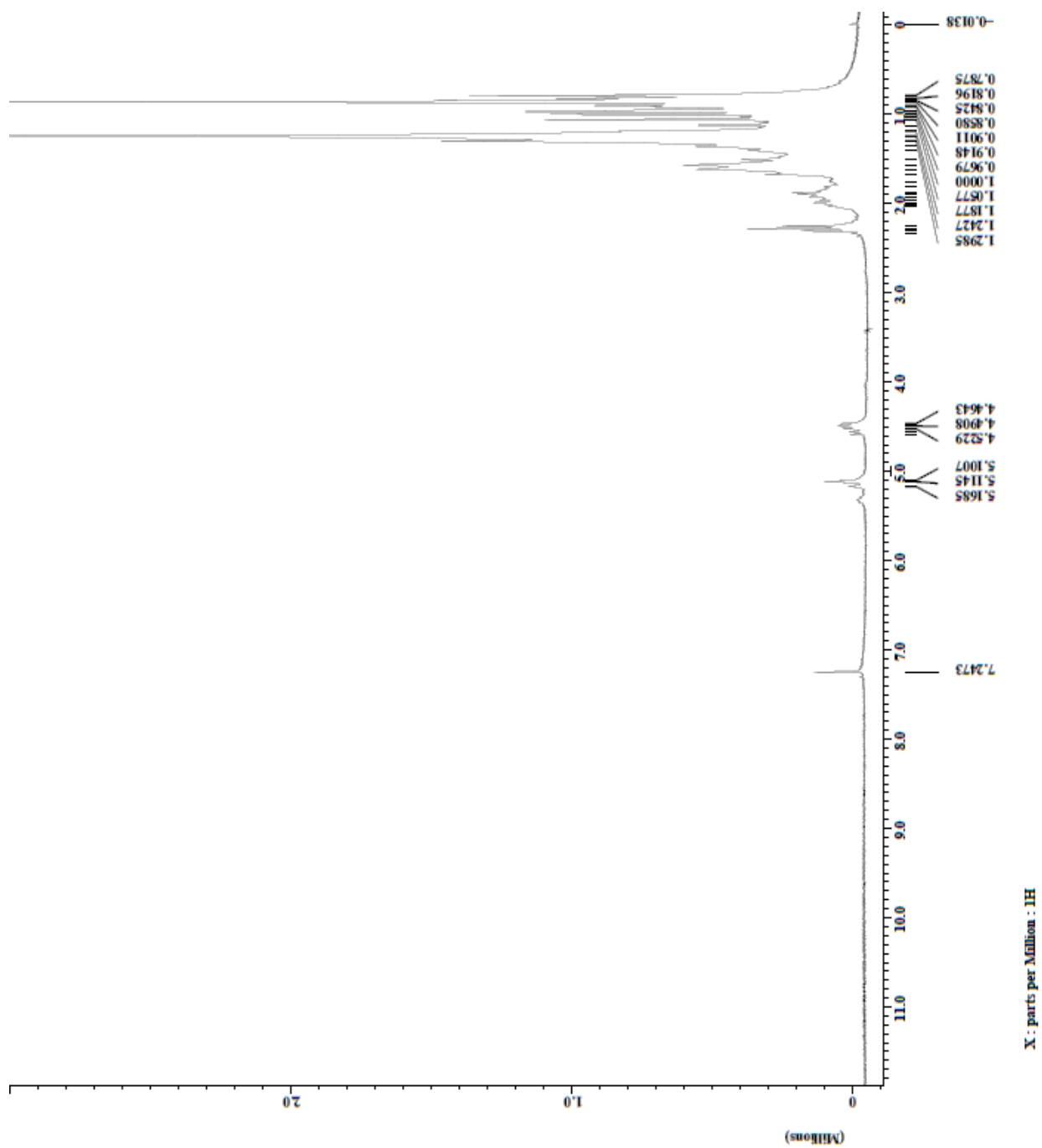
un color morado con p – anisaldehído en CCF. Se obtuvo una masa de 20,3 mg, con un rendimiento de 0,725 % respecto al extracto de diclorometano. Para este compuesto se llevaron a cabo análisis de RMN ^{13}C , ^1H Y DEPT 135 y CG-EM.

En el espectro de ^1H (Espectro 6-8) se observan siete singletes (δ_{H} : 1.06; 1.00; 0.97; 0.90; 0.86; 0.84; 0.82 y 0.79 ppm) correspondientes a protones de carbonos metílicos que se encuentren localizados sobre carbonos cuaternarios. Además, se muestran a campo bajo desplazamientos (δ_{H} : 5.11 ppm) correspondientes a protones de carbonos olefínicos. Se observa una señal (δ_{H} : 4.5 ppm, t, $J = 7.92 \text{ Hz}$) atribuida protones sobre carbonos unidos a heteroátomos como a oxígeno (O-C-H). Asimismo se reconocen señales (δ_{H} : 2.28 ppm, t, $J = 7.22 \text{ Hz}$) característico de protones α al carbono acílico de un grupo éster, y en conjunto con un desplazamiento intenso (δ_{H} : 1.24 ppm, s) indica la presencia de una cadena alifática ligada al éster.

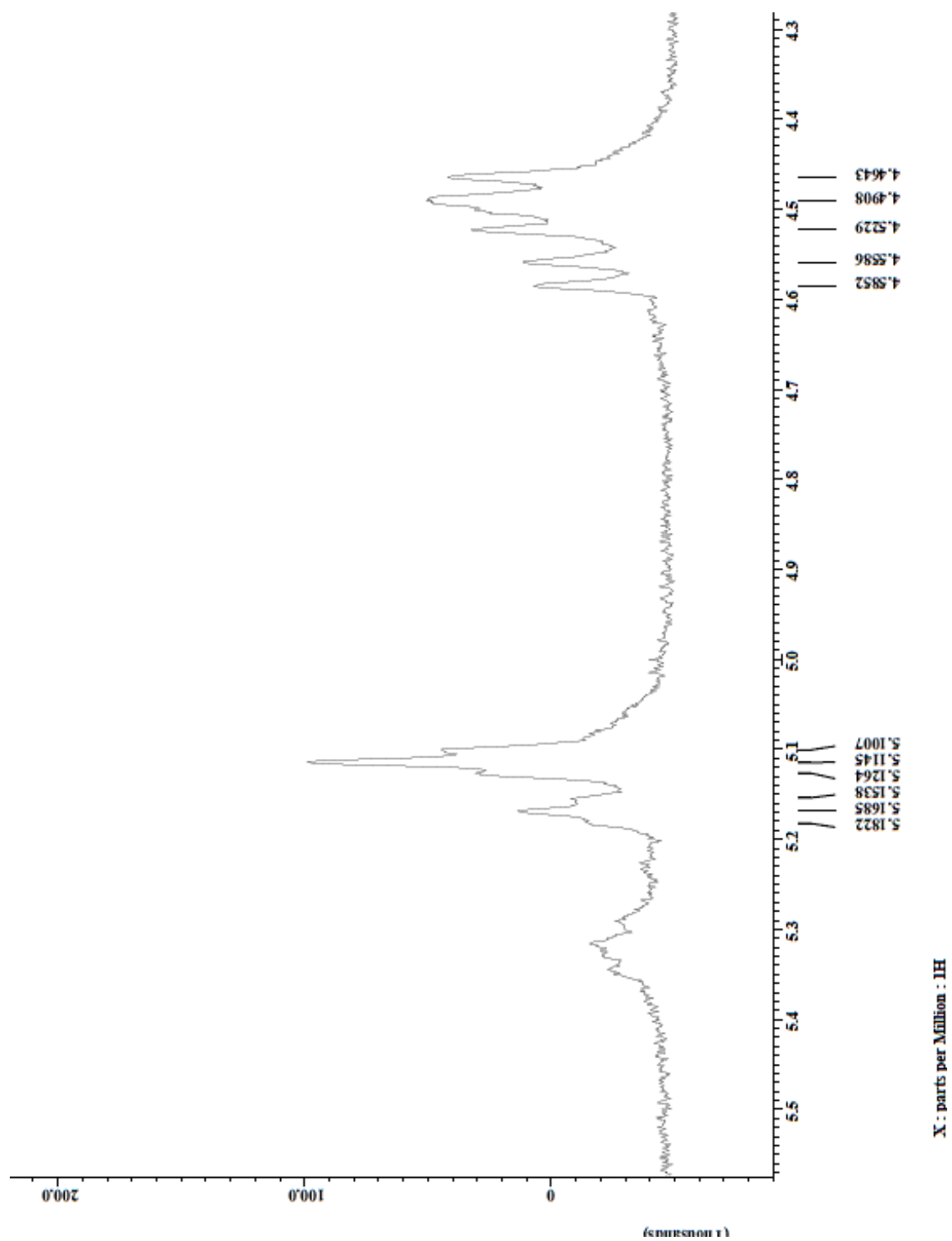
En el espectro de ^{13}C (Espectro 9-13) se observan a campo alto un amplio conjunto de señales indicativas de estructuras hidrocarbonadas. A través del experimento DEPT 135 se logran discriminar a campo alto desplazamientos (δ_{C} : 15.8; 16.9; 16.8; 17.5; 21.4; 23.3; 28.1 y 28.8 ppm), característicos de metilos, señales (δ_{C} : 39.8; 39.7; 47.7; 55.3 y 59.1 ppm) que representan carbonos metínicos, se muestran desplazamientos (δ_{C} : 33.8; 36.9; 37.8; 40.1 y 42.1 ppm) correspondientes a carbonos cuaternarios. Se muestran señales de carbonos olefínicos (δ_{C} : 124.5 y 139.7 ppm) donde la señal (δ_{C} : 139.7 ppm) corresponde a un carbono cuaternario. Las señales observadas permiten caracterizar el esqueleto de la molécula como una estructura triterpénica pentacíclica de tipo oleano. Se observa una señal en 80.7 ppm representativa para carbonos de estructuras cíclicas unidos a grupos oxigenados de la posición 3 del anillo triterpénico, mostrando por último a campo bajo, un desplazamiento (δ_{C} : 173.6 ppm) propio de un carbono carbonílico de tipo éster, en conjunto con la señal (δ_{C} : 34.87 ppm) perteneciente al carbono α al carbonilo, indicando que el grupo éster se encuentra

unido al esqueleto del triterpeno en la posición 3. En el espectro de ^{13}C se observan señales (δ_{C} 25.2; 29.3 - 29.8; 32.0 y 22.8 ppm) de metilenos de cadena abierta y el desplazamiento (δ_{C} 14.2) del metilo terminal. De acuerdo a lo discutido se infiere la presencia de un éster de cadena larga de una estructura triterpénica del tipo ursano como metabolito mayoritario.

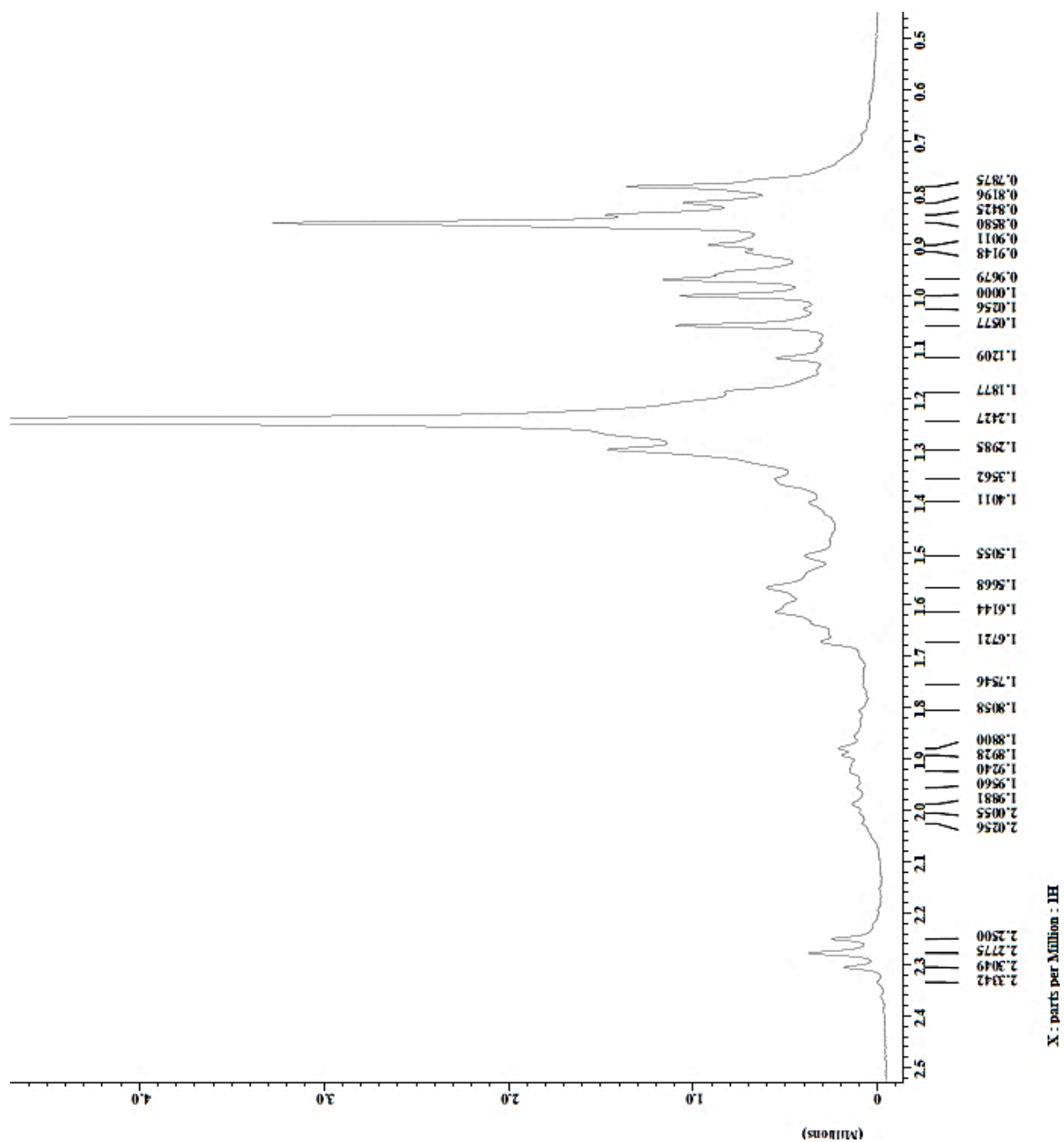
Adicional a las señales asignadas al metabolito mayoritario, éster de α -amirina, son observadas señales con menor intensidad en el espectro de RMN ^{13}C , dentro de las que pueden destacarse a campo bajo desplazamientos (δ_{C} : 121.8 y 145.3 ppm) de carbonos olefínicos, una señal alrededor de (δ_{C} : 173.6 ppm) junto la señal de carbonilo de compuesto mayoritario de un carbonilo de éster; de igual manera a campo alto, señales (δ_{C} : 47,2 ppm) de carbonos metínicos y señales (δ_{C} : 46.9; 34.5; 37.2 ppm) de carbonos metilénicos; además se observa un desplazamiento (δ_{C} : 33.4 ppm) que describen un carbonos metílico y una señal característica en 31.2 ppm correspondiente a un carbono cuaternario. A través de este conjunto de señales menos intensas se logró determinar la presencia de un isómero estructural de éster de α -amirina, caracterizado como un triterpeno éster de tipo oleano. Con estos datos, y al comparar con la literatura ^[81-84] como se muestra en las Tablas 26 y 27, puede inferirse que se trata de una mezcla de esteres de α y β – amirina, siendo el primero mencionado el metabolito mayoritario.



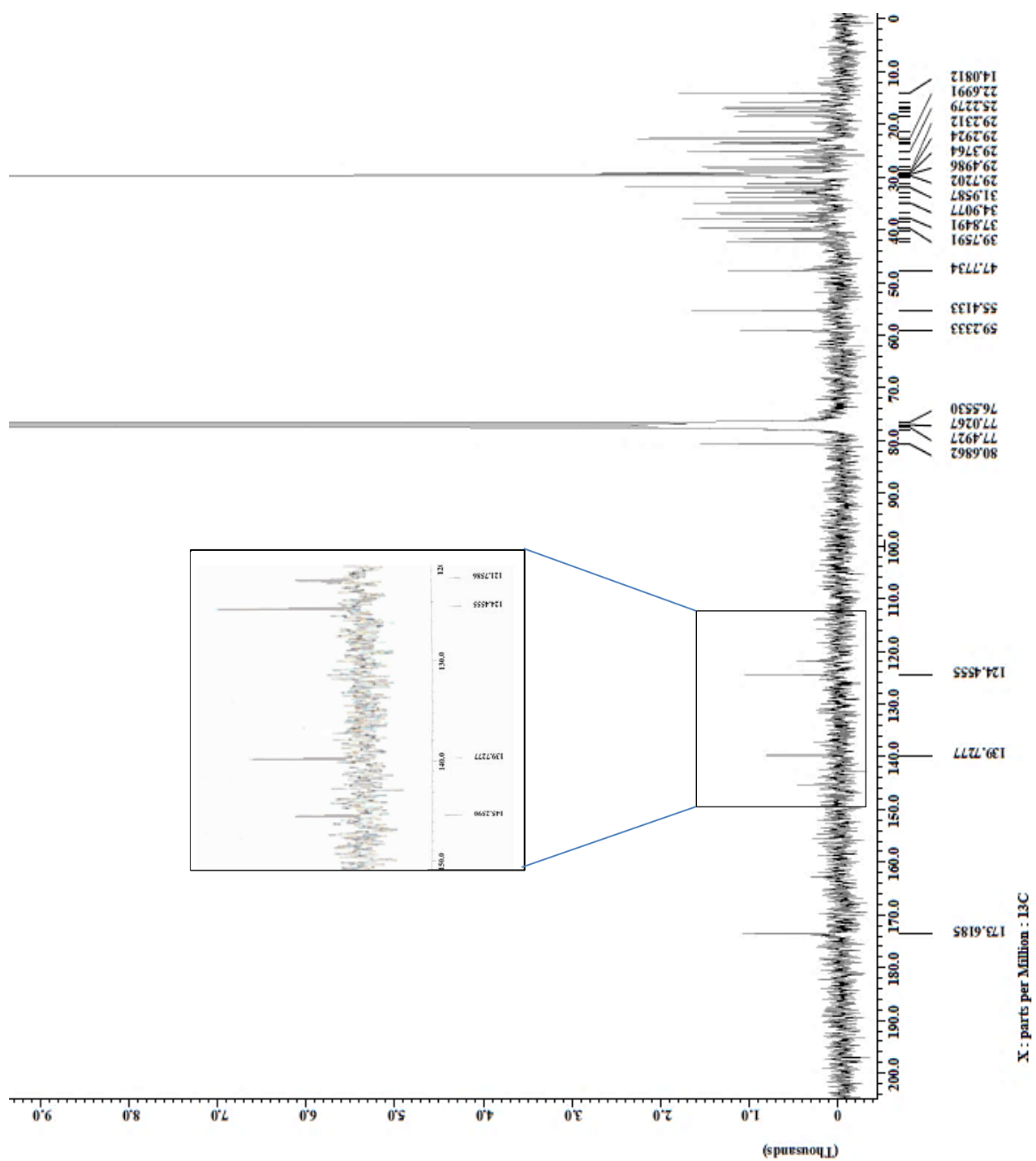
Espectro 6. RMN de ^1H (CDCl₃, 270 MHz).



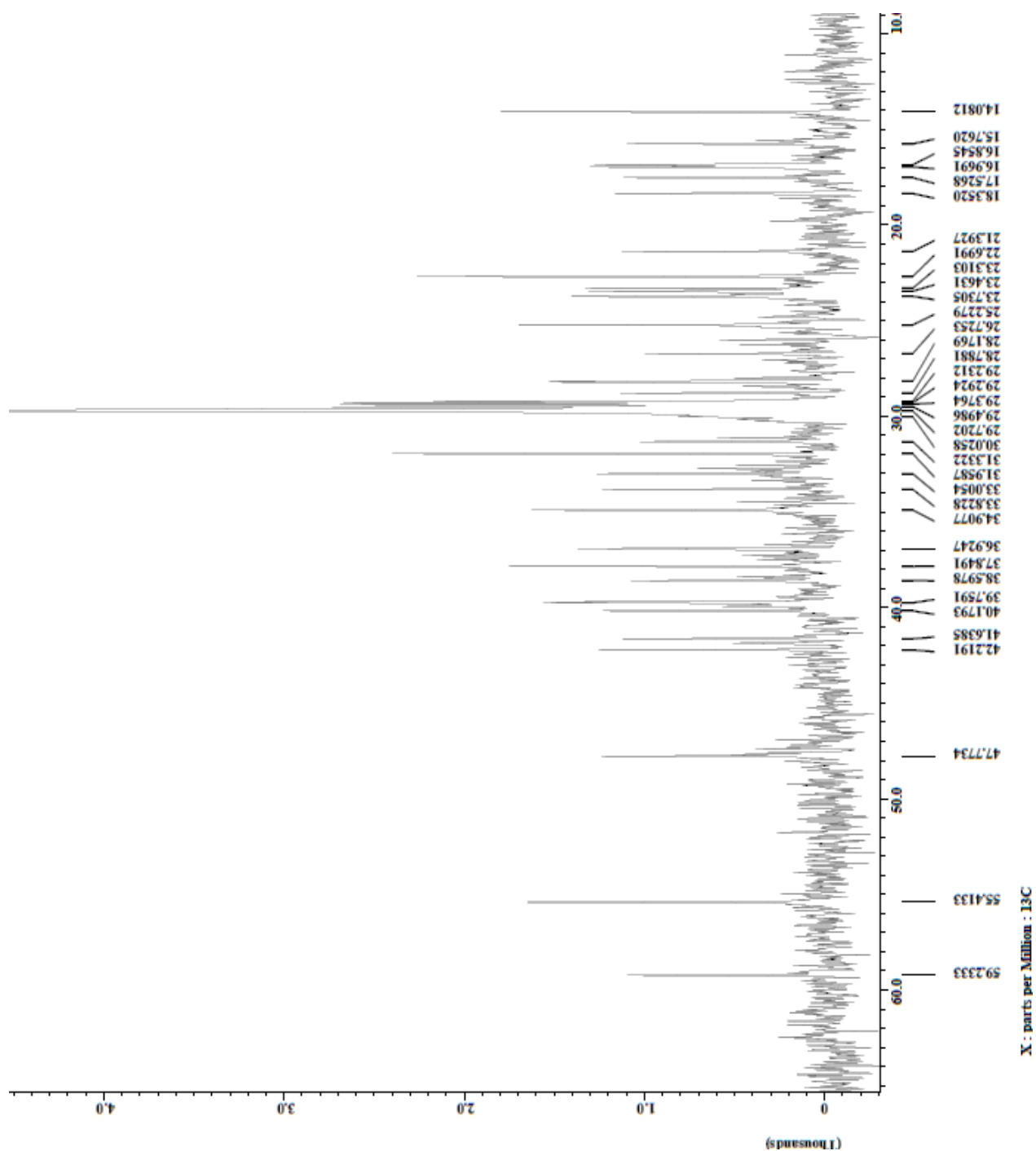
Espectro 7. RMN de ^1H (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación 5.5 – 4.5 ppm.



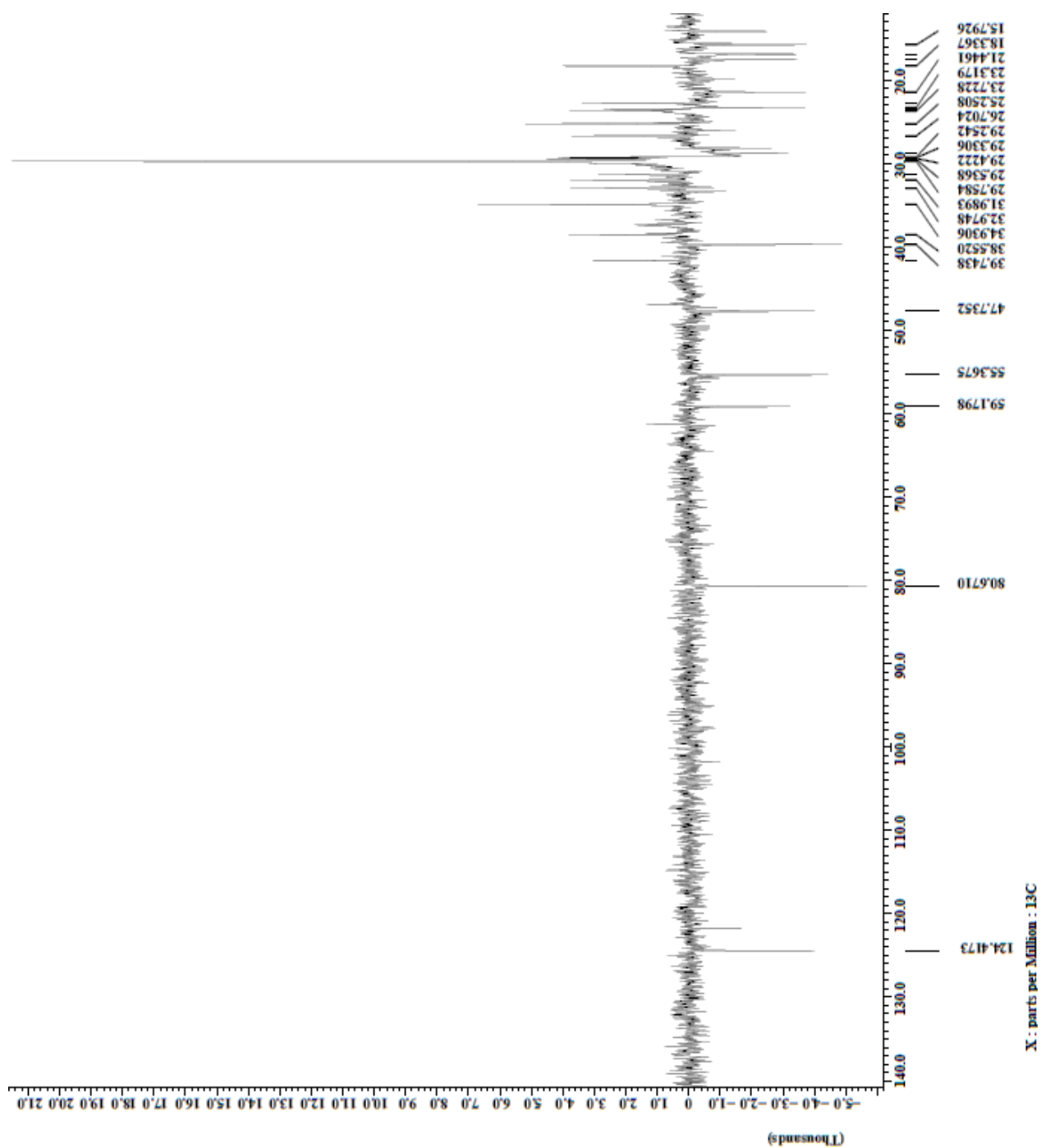
Espectro 8. RMN de ^1H (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación 2.5 – 0.5 ppm.



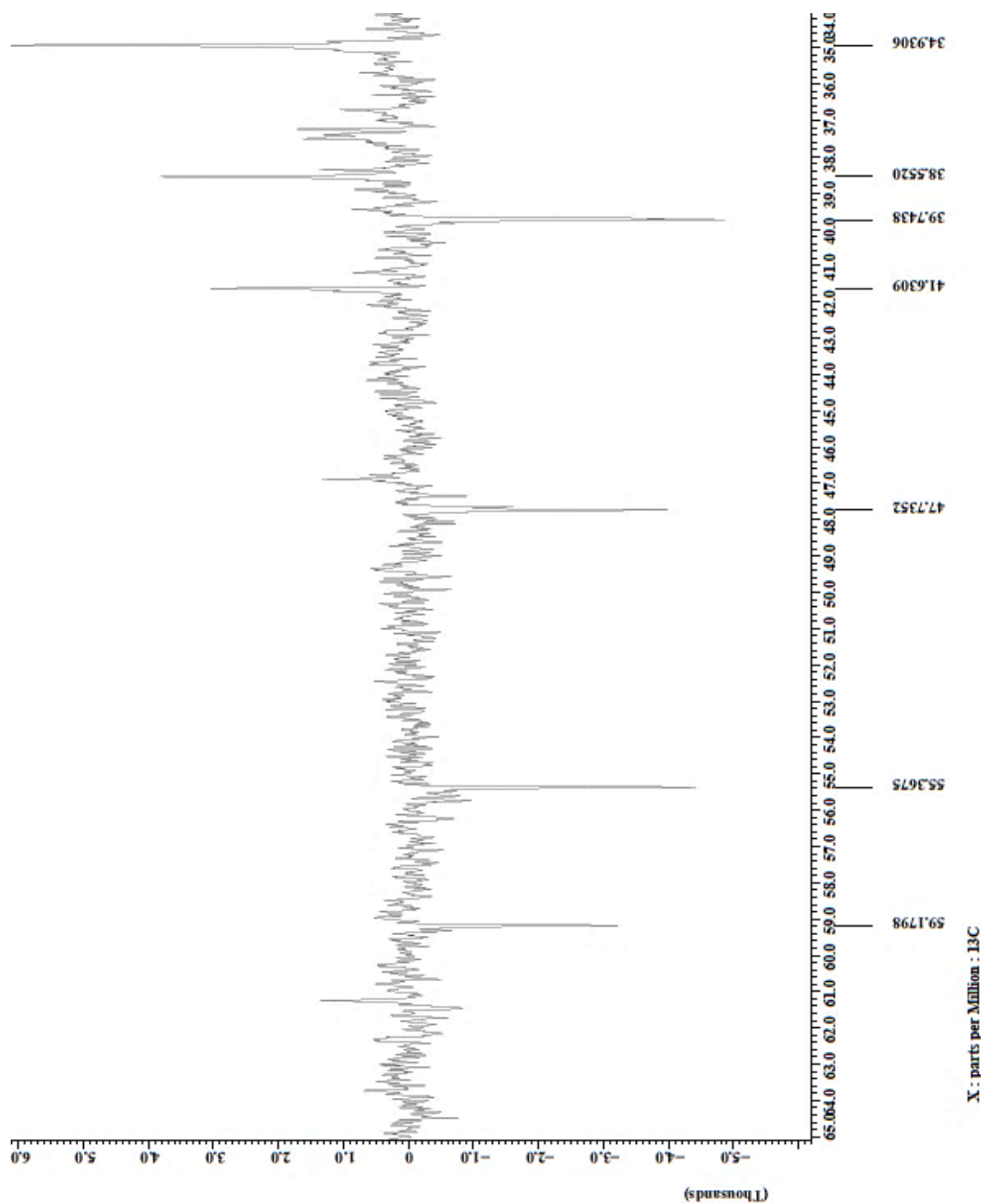
Espectro 9. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 270 MHz).



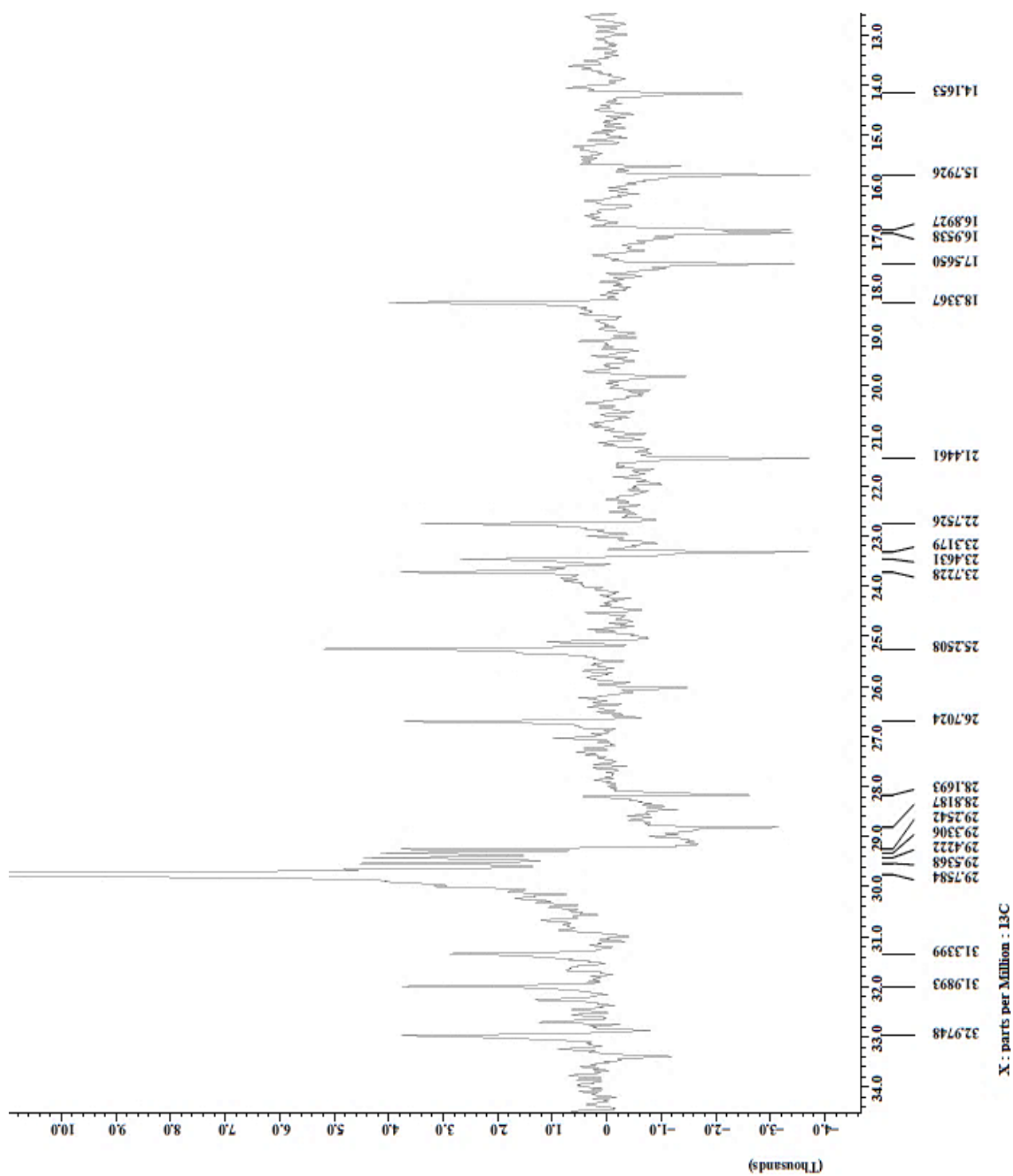
Espectro 10. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 60 – 10 ppm.



Espectro 11. DEPT 135 (CDCl_3 , 270 MHz).



Espectro 12. DEPT 135 (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 65 – 35 ppm.



Espectro 13. DEPT 135 (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 34 – 13 ppm.

Tabla 27. Desplazamientos químicos, RMN de ^1H (CDCl_3) de los Compuestos VI y VII comparados con datos de literatura ^[81,82]. R: señales reportadas. C: compuesto.

Posición	Acetato de α – amirina. R	Acetato β – amirina. R	C VI. Éster de α -amirina	C VII. Éster de β -amirina
	δ ^1H (int, mult., J en Hz)			
2	1.61	1.60-1.88, m	1.61, m	-
3	4.48 dd	4.50, t	4.50, t	
9	1.54	1.58, m	-	1.57
12	5.10 t (3.6)	5.18, t, 3.5	5.12, t	5.17, t
18	1.29	1.93, d, 4.2	1.30	-
19	1.38, m	1.00-1.66, m	1.36	-
23	0.85, s	0.88, s	0.86	-
24	0.84, s	0.96, s	0.84	-
25	0.96, s	0.86, s	0.97	-
27	1.04, s	1.13, s	1.06	1.12
28	0.78, s	0.83, s	0.79	-
H$_{\alpha}$C=O	2.02, t	2.05, t	2.28, t, 7,22	

Las señales restantes para el éster de β - Amirina no pudieron ser asignadas puesto que estas se encontraban solapadas.

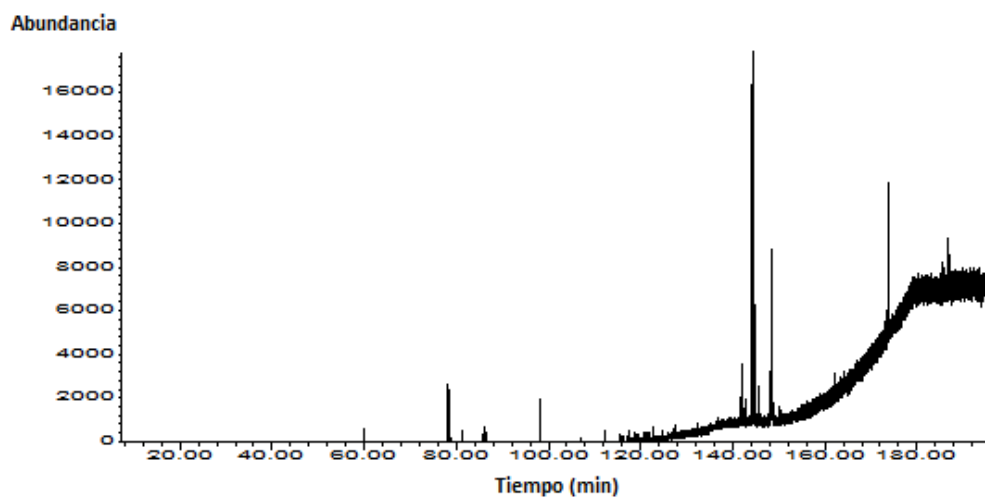
Tabla 28. Desplazamientos químicos, RMN de ^{13}C (CDCl_3) de los Compuestos VI y VII comparados con datos de literatura ^[83,84]. R: señales reportadas. C: compuesto.

Posición	Éster de α - amirina ^[a] . R	Éster de β - amirina ^[b] .R	C VI. Éster de α -amirina (CDCl_3 , 270 MHz)	C VII. Éster de β -amirina (CDCl_3 , 270 MHz)	DEPT 135
	δ ^{13}C , ppm				Asig.
1	38.5	38.3	38.6	38.4	CH ₂
2	23.7	22.3	23.7	22.8	CH ₂
3	80.6	80.6	80.7	80.7	CH

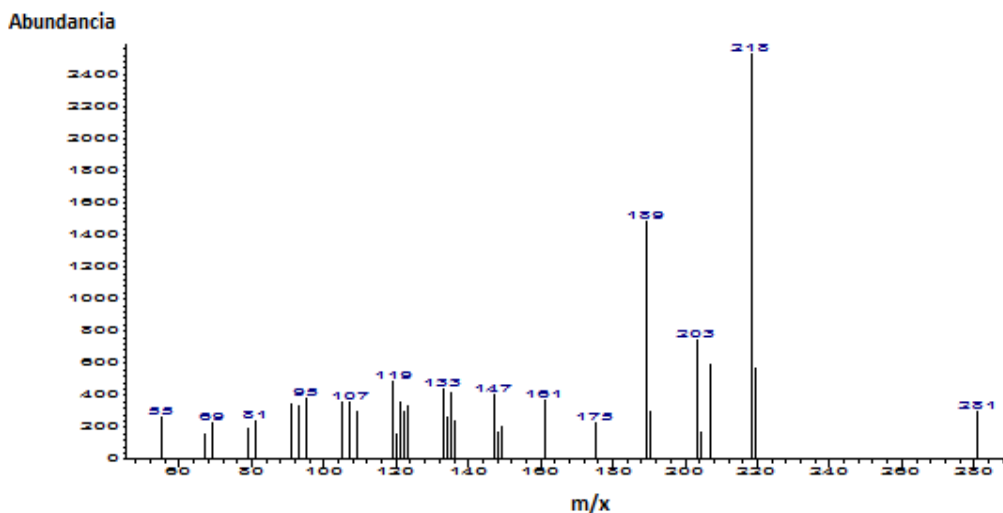
4	37.8	37.2	37.9	37.2	C
5	55.3	55.3	55.4	55.4	CH
6	18.3	18.7	18.3	19.8	CH ₂
7	32.9	32.6	33.0	32.4	CH ₂
8	40.1	39.9	40.2	39.9	C
9	47.7	47.6	47.7	47.7	CH
10	36.9	36.9	36.9	36.9	C
11	23.4	23.5	23.3	23.7	CH ₂
12	124.4	121.7	124.5	121.8	CH
13	139.7	145.2	139.7	145.3	C
14	42.1	41.8	42.2	41.8	C
15	26.7	26.2	26.7	26.0	CH ₂
16	28.1	26.2	28.2	26.1	CH ₂
17	33.8	32.5	33.8	32.2	C
18	59.1	47.2	59.2	-	CH
19	39.7	46.8	39.7	46.9	CH CH ₂
20	39.7	31.0	39.7	31.2	CH C
21	31.3	34.7	31.3	34.5	CH ₂
22	41.6	37.1	41.6	37.2	CH ₂
23	28.1	28.4	28.2	28.4	CH ₃
24	16.8	16.8	16.9	16.9	CH ₃
25	15.8	15.5	15.8	15.6	CH ₃
26	16.9	16.9	17.0	17.0	CH ₃
27	23.3	25.9	23.5	25.9	CH ₃
28	28.8	-	28.8	-	CH ₃
29	17.5	33.3	17.5	33.4	CH ₃
30	21.4	23.7	21.4	-	CH ₃
1'	173.7	173.9	173.6	173.8	C=O
2'	34.9	34.8	34.9	34.6	CH ₂
3'	25.2	25.2	25.2	25.3	CH ₂
4'	29.2	29.2	29.3	-	CH ₂
5'	29.3	29.3	29.4	-	CH ₂
6'	29.4	29.4	29.5	-	CH ₂
7'	29.6	29.6	29.6	-	CH ₂
8'-12'	29.7	29.7	29.8	-	CH ₂
13'	29.5	29.5	29.5	-	CH ₂

14'	32.0	32.0	32.0	32.0	CH ₂
15'	22.7	22.7	22.8	22.8	CH ₂
16'	14.1	14.1	14.2	14.2	CH ₃

El análisis por CG-EM permitió corroborar la estructura de un esqueleto de α - y β -amirina antes sugerido. Los datos cromatográficos y espectrométricos del CG-EM se observan en el Cromatograma 1 y Espectro de masas 1.

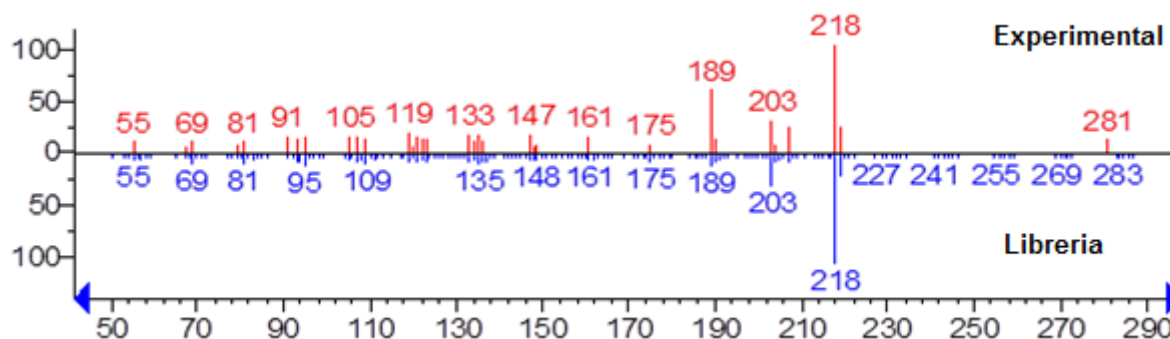


Cromatograma 1. Compuestos VI Y VII. Tiempo de retención para el compuesto mayoritario: 144 minutos.



Espectro de masas 1. Relación masa/ carga vs abundancia para el compuesto VI .

Lo datos experimentales se correlacionaron con espectros de masas de referencia extraídos de la librería NIST (National Institute of Standards and Technology), mostrando coincidencias entre ambos registros de datos espectrales (Espectro de masas 2).



Espectro de masas 2. Correlaciones de datos de fraccionamiento experimentales del compuesto aVI con datos de referencia de la librería NIST.

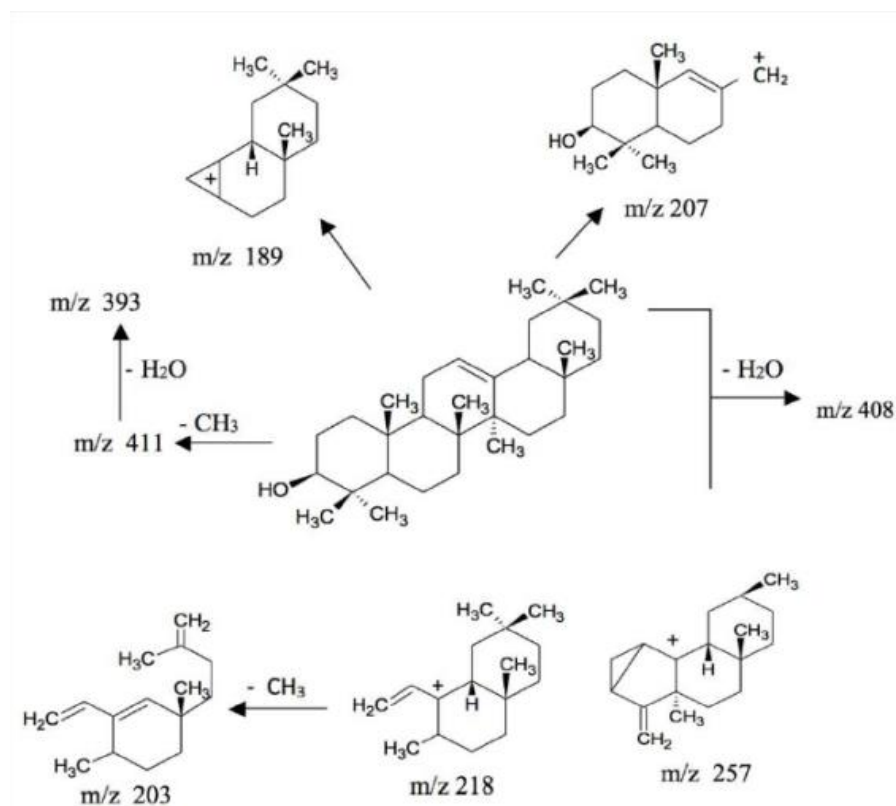
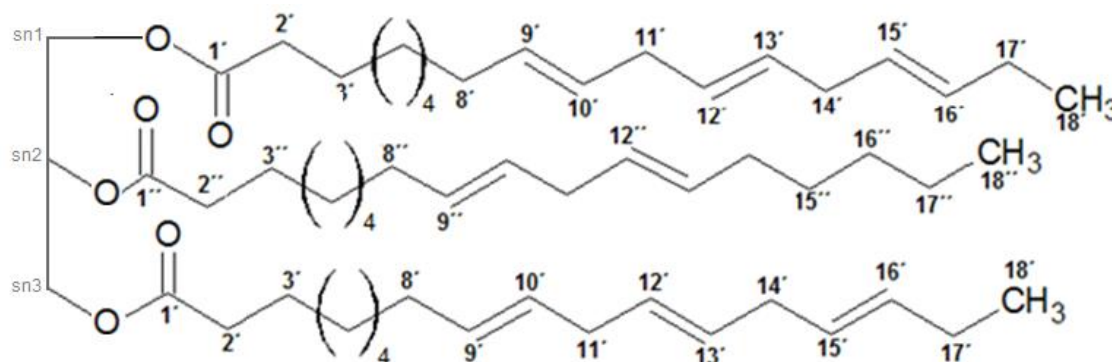


Figura 16. Modelo de la fragmentación de β -amirina.

Se diferencian fragmentos característicos para este tipo de estructuras triterpénicas, como los son: m/z= 218 (pico base), m/z= 203 y m/z=189, siendo algunos mostrados en la Figura 16 tomando por ejemplo la fragmentación de β -amirina. No pudieron ser observadas todas las fragmentaciones del éster de α -amirina, no logrando describir el tamaño de la cadena alifática ^[83,84].

V.1.3 Elucidación del compuesto VIII.



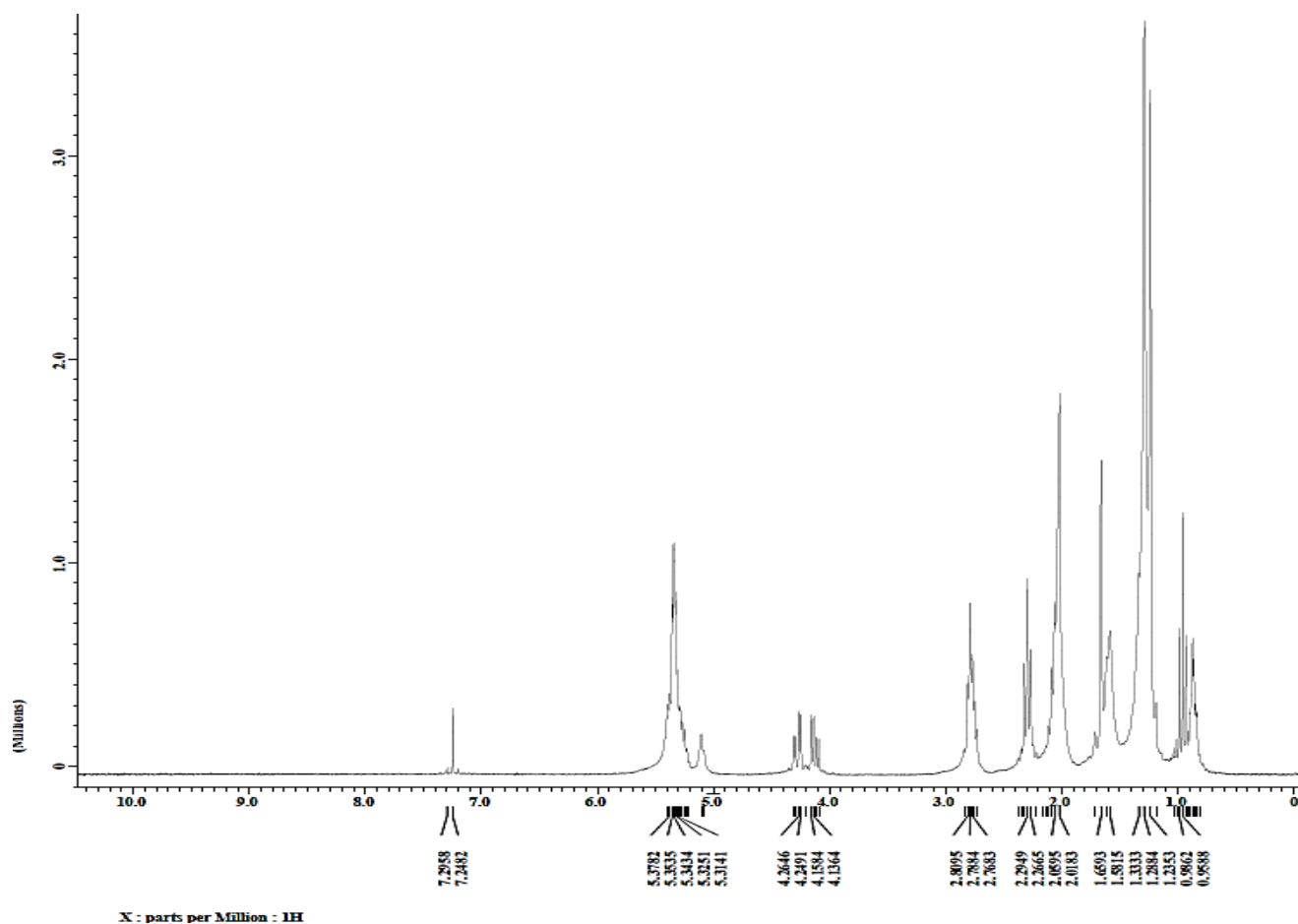
1,3-Dilinolenil-2-linoleil-glicerol

El compuesto VIII proveniente de la extracción con hexano realizada al extracto de diclorometano, de la fracción 33-37, es soluble de diclorometano, de aspecto aceitoso y color naranja. Mancha color morado con p – anisaldehído en CCF. Se obtuvo una masa de 31,1 mg, con un rendimiento de 1,1 % respecto al extracto de diclorometano. Para este compuesto se llevaron a cabo análisis de RMN ^{13}C , ^1H Y DEPT 135 y CG-EM.

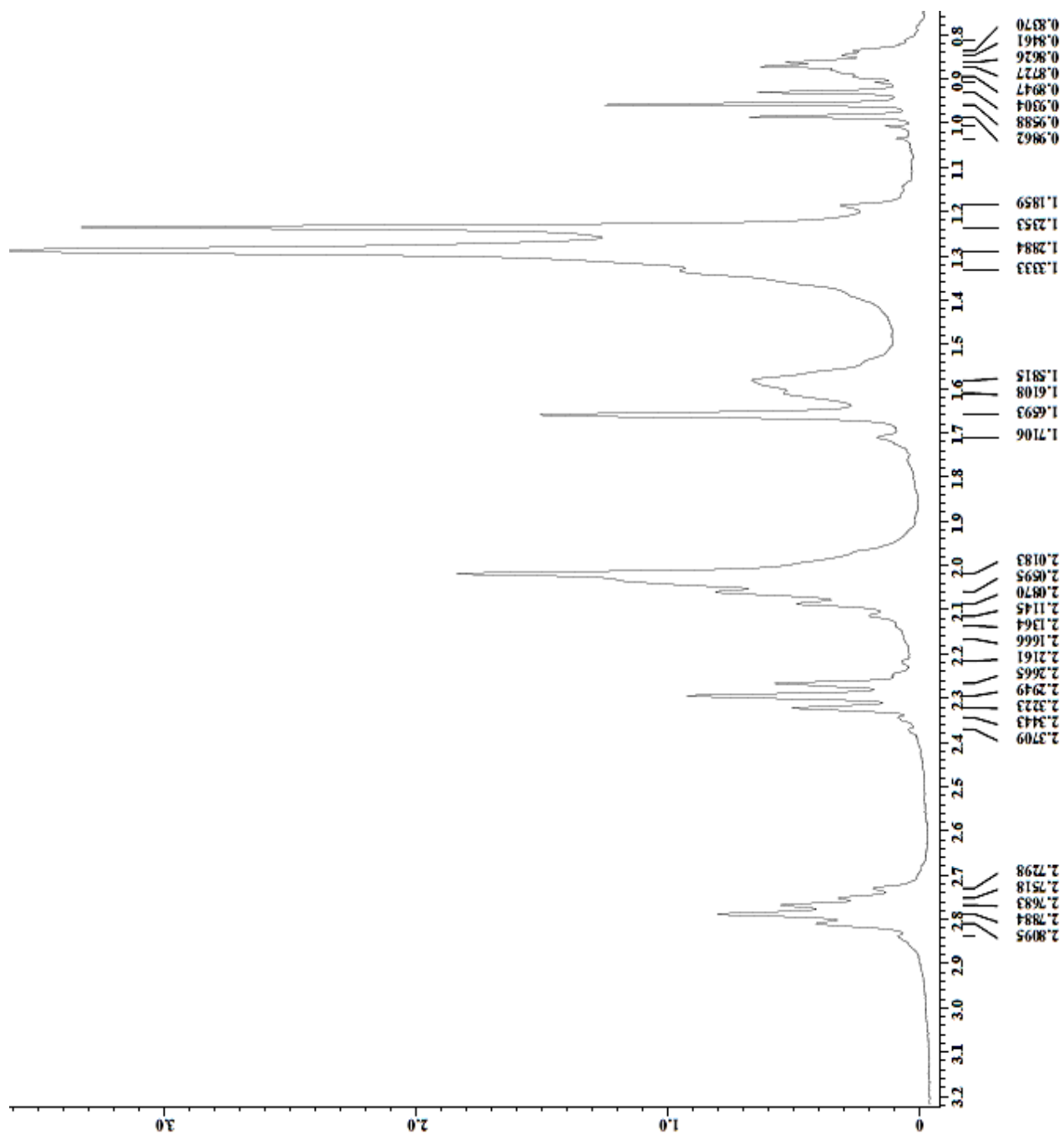
En el espectro de ^1H (Espectro 14-16) se observa a campo alto señales (δ_{H} : 0.87 - 0.85 ppm, m) y (δ_{H} : 0.96 ppm, t, $J=7,54$ Hz), correspondientes a metilos terminales de cadenas alifáticas; se muestran señales (δ_{H} : 1.19 - 1.33 ppm) de metilenos. Se observan señales de protones de metilenos en posiciones α y β a un carbono carbonílico con señales (δ_{H} : 2.30 - 2.27 ppm, t, $J= 7,12$ Hz) y (δ_{H} : 1.58 - 1.71 ppm, m) respectivamente, señales de protones vecinos a carbonos insaturados (δ_{H} : 2.02 - 2.09 ppm, m) y (δ_{H} : 2.73 - 2.81 ppm, m) y señales a campo bajo (δ_{H} : 5.25 – 5.40 ppm, m) características de protones de carbonos olefínicos. A campo medio se observan señales dobletes de dobletes (δ_{H} : 4.28 ppm, dd, $J= 4,21$ Hz, $J= 11,97$) y (δ_{H} : 4.12 ppm,

dd, $J = 5,94$ Hz, $J = 11,86$) que por su desplazamiento indica protones metilénicos que están cercanos a heteroátomos como el oxígeno, así como un acoplamiento de uno de los protones con un protón geminal y con el protón inmediato al carbono metilénico.

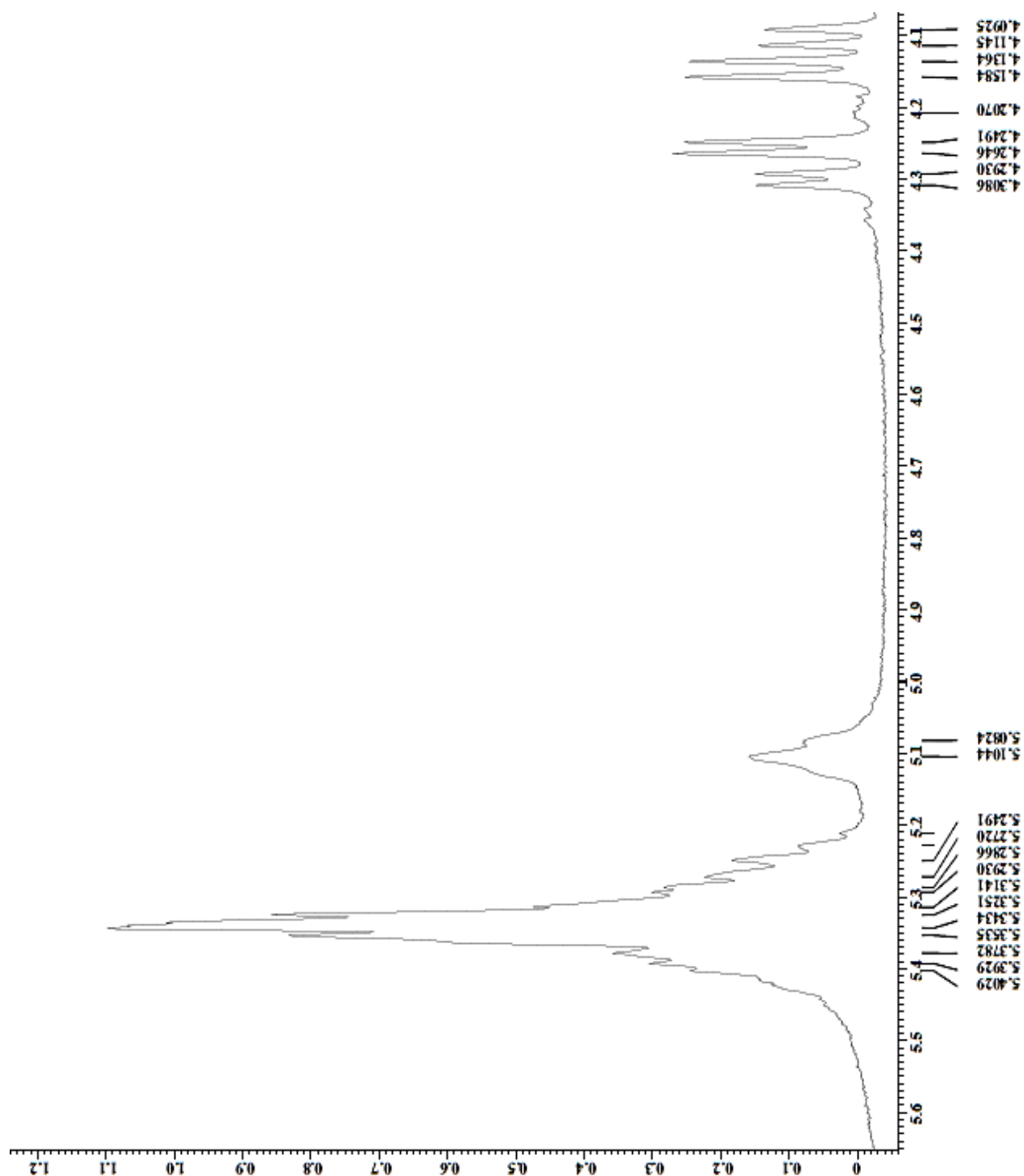
En el espectro de ^{13}C (Espectro 17-21) se observan a campo alto tres señales alrededor de (δ_{C} : 14 ppm) de metilos terminales de cadenas alifáticas, se presentan desplazamientos entre δ_{C} 20,6 y 29,7 ppm, característicos de metilenos de cadena. Se aprecian a campo bajo un grupo de señales representativas para carbonos olefínicos (δ_{C} : 132,0; 130,3; 130,1; 128,4; 128,3; 128,2; 127,9; 127,8 y 127,2 ppm). Se observan desplazamientos (δ_{C} : 69.0 y 62.2 ppm) característicos de carbonos unidos al oxígeno (C-O), propios de estructuras del tipo glicerol, presentando patrones de sustitución sn1/sn3 con iguales estructuras. Se tienen a campo bajo señales indicativas de carbonilo de tipo éster (δ_{C} : 173.2 y 172.8 ppm), así como señales a campo alto (δ_{C} : 34.2 y 34.1 ppm) de metilenos α al acilo. Con los datos obtenidos, y las comparaciones con estructuras en la literatura ^[85,86] mostradas en las Tablas 28 y 29, se logra proponer una estructura del tipo triacilglicerol con cadenas alifáticas poliinsaturadas.



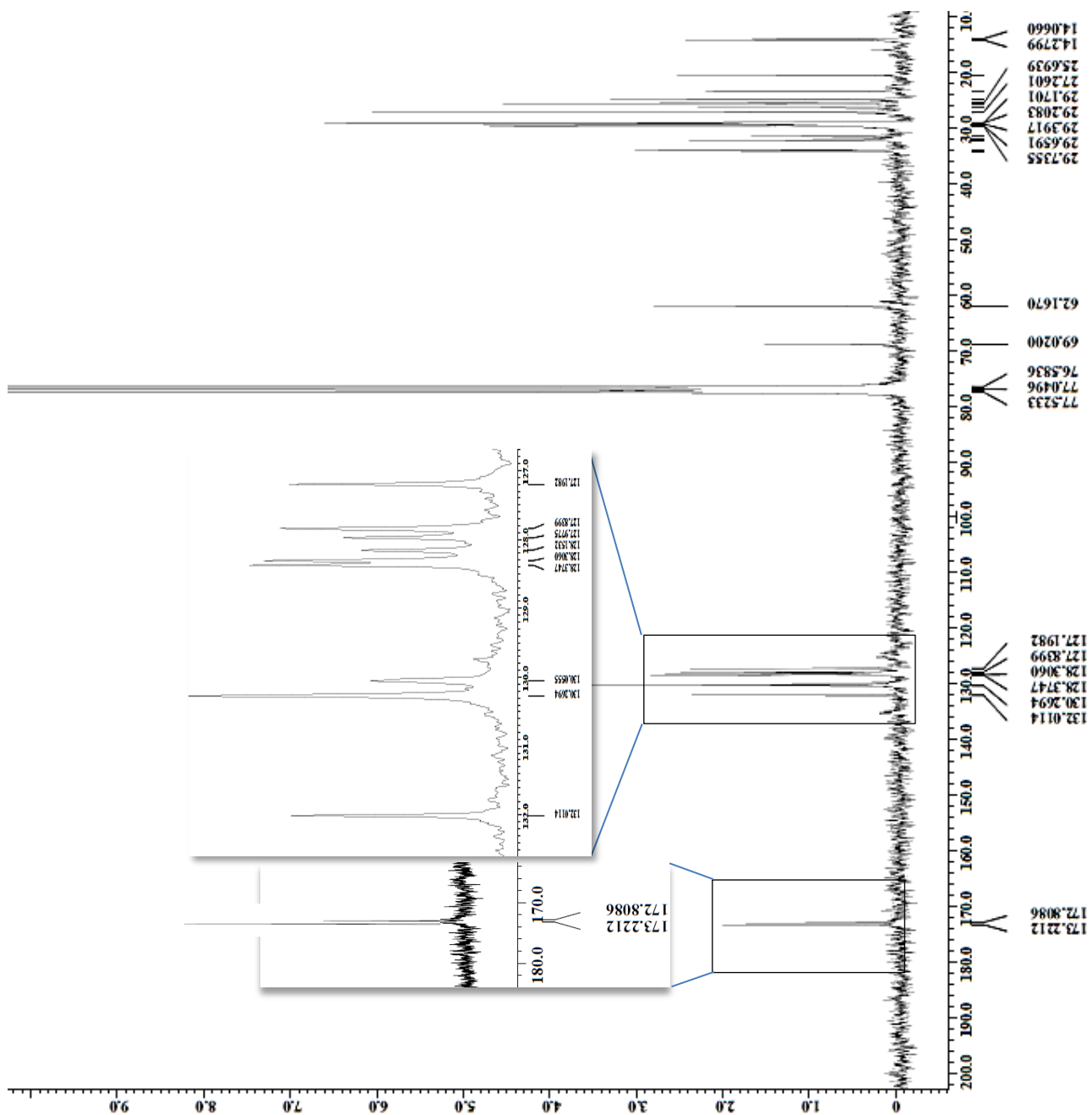
Espectro 14. RMN ^1H (CDCl_3 , 270 MHz).



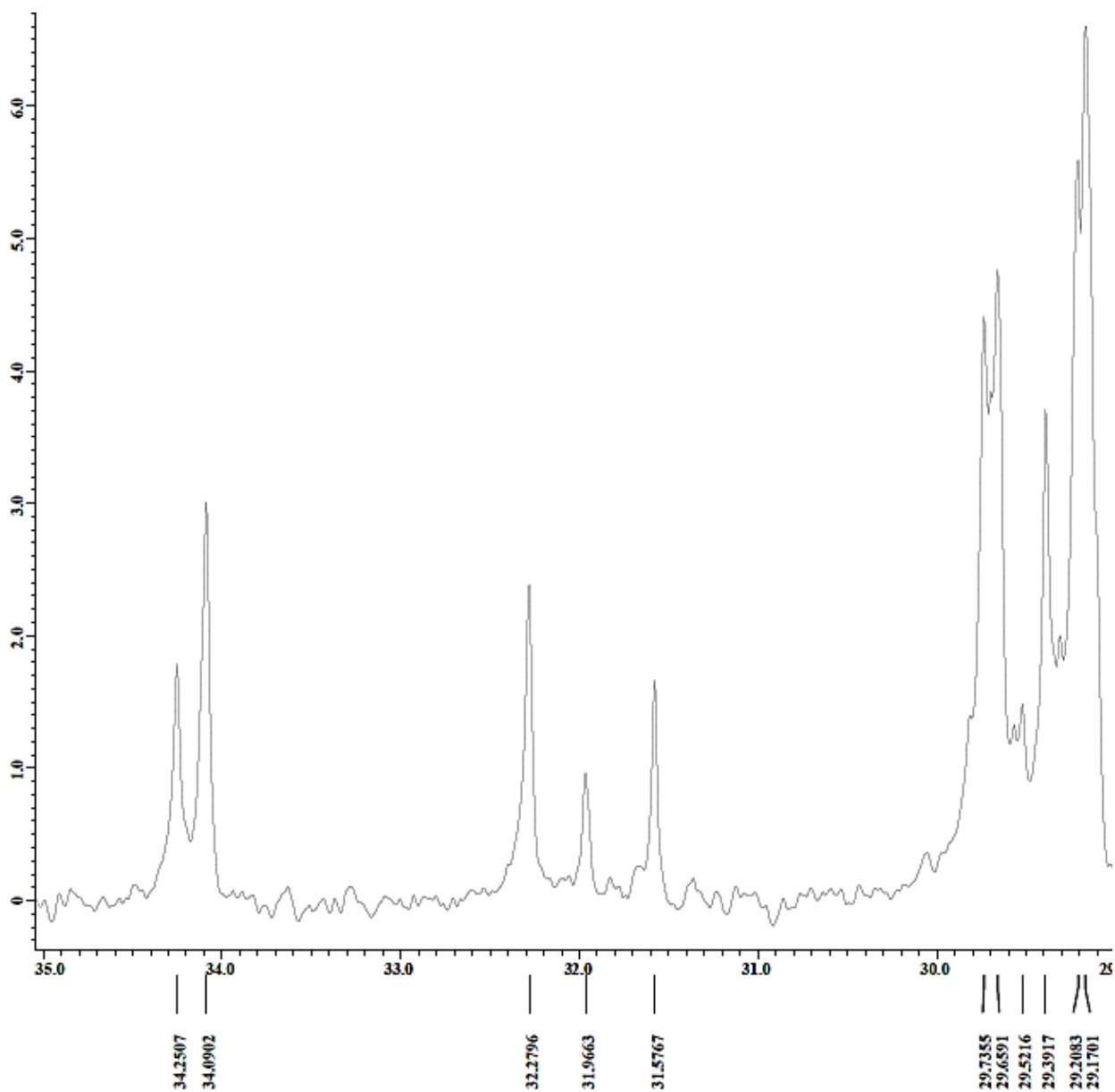
Espectro 15. RMN ^1H (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 0,6 - 3,2 ppm.



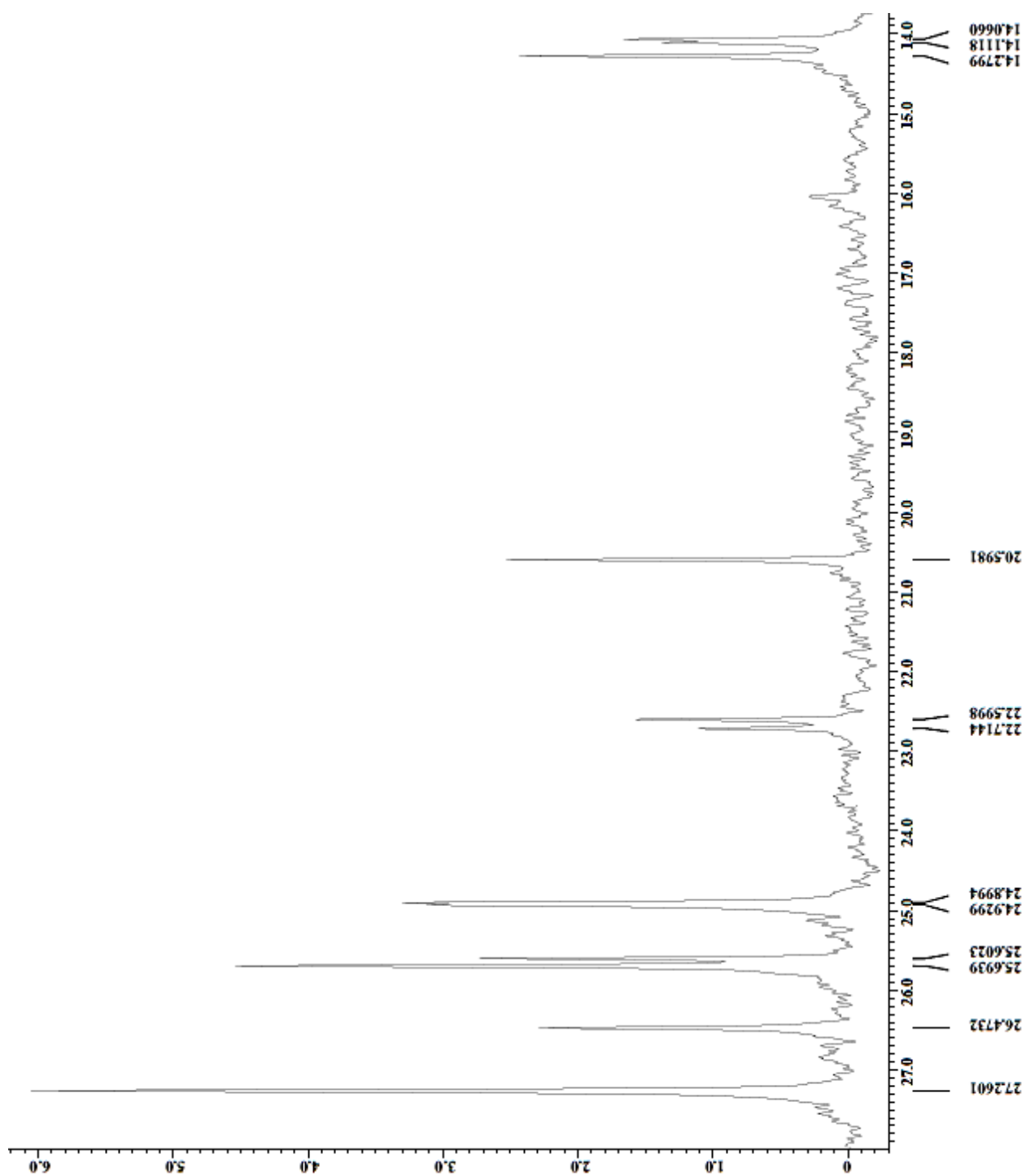
Espectro 16. RMN ^1H (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 4 - 5.6 ppm.



Espectro 17. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 270 MHz) con ampliación a campo alto de la zona de ésteres y olefinas.

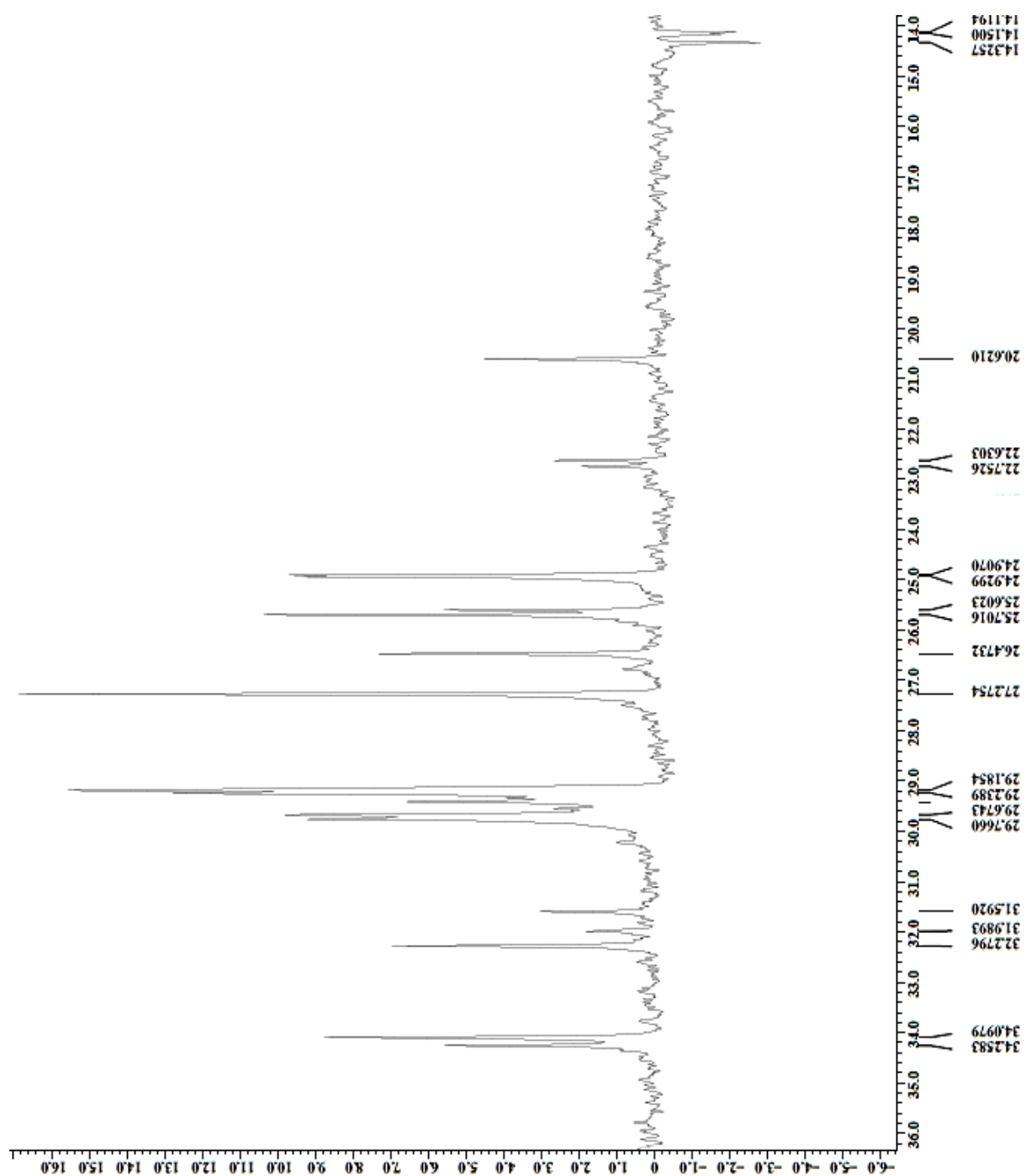


Espectro 18. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 29 a 34 ppm.



Espectro 19. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 14 a 27 ppm.

Espectro 20. DEPT 135 (CDCl₃, 270 MHz) con ampliación de 127 a 132 ppm.



Espectro 21. DEPT 135 (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 35 - 14 ppm.

Tabla 29. Señales obtenidas por RMN ^1H , multiplicidad y acoplamientos para el compuesto VIII [85]

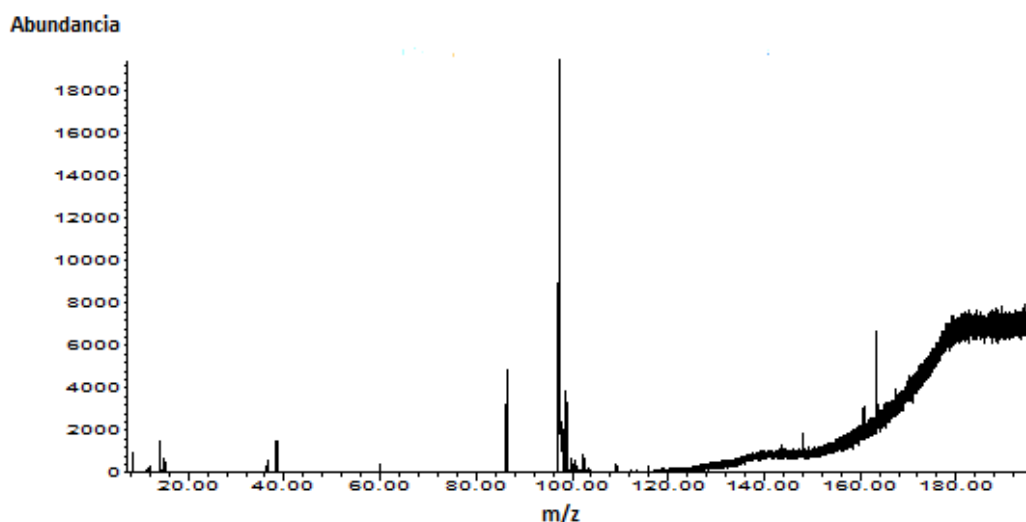
Posición	C.VIII. (CDCl_3 , 270 MHz)	(18:3) sn1/sn3 ($\Delta 9,12,15$)- (18:2) sn2 ($\Delta 9,12$). $_R$
	δ_H ppm, (int, mult., J en Hz)	
18'	0.84 - 0.87, m	0.88, m
18''	0.96, t, 7.40	0.95, t, 7.54
4'-7'	1.19 - 1.33, m	1.40-1.15, m
3'	1.58 - 1.71, m	1.70-1.50, m
8',17'	2.02 - 2.1, m	2.10-1.9, m
2'	2.29, t, 7.12	2.30, t, 7.11
11',14'	2.7 - 2.8, m	2.80-2.70, m
1,3	4.12,dd, (5.94,11.86)	4.1, dd
	4.28, dd, (4.21,11.97)	4.32, dd
2	5.09 - 5.10, m	5.1, m
9',10',12',13',15',16'	5.24 - 5.40, m	5.4, m

Tabla 30. Comparación de las señales de RMN ^{13}C y DEPT 135 para el compuesto VIII. [86]

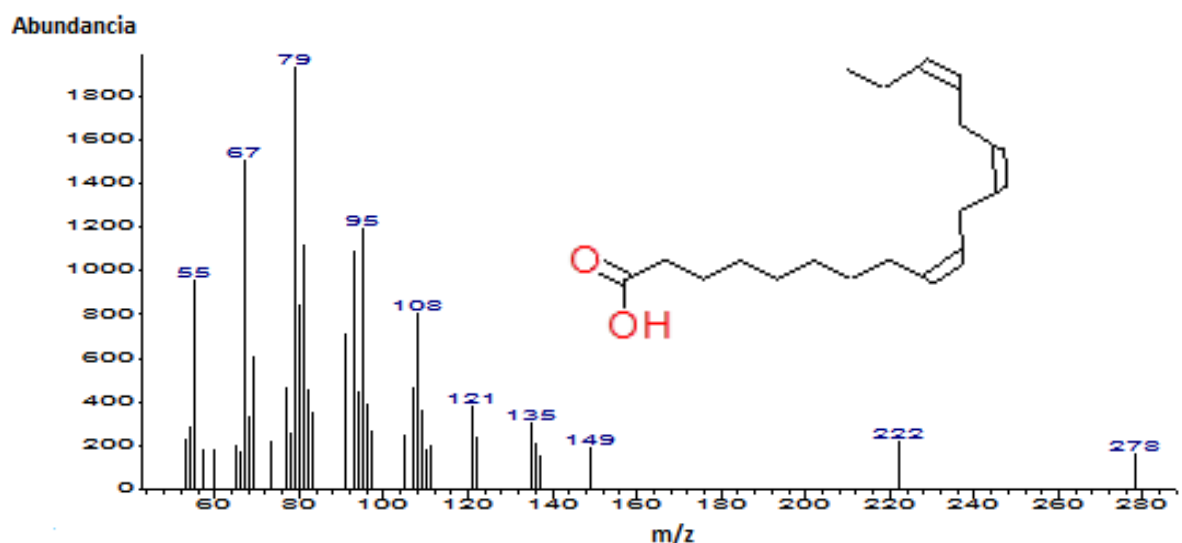
Posición	C. VIII. (CDCl_3 , 270 MHz)		Triacilglicerol sn1/sn3 (18:3) -sn2 (18:2). $_R$		DEPT
	sn1/ns3 (9,12,15)	sn2 (9,12)	sn1/ns3 (9,12,15)	sn2 (9,12)	
	$\delta^{13}\text{C}$, ppm				Asig.
1-3	69.0		69.0		CH_2
2	62.2		62.2		CH
1'	173.2		173.1		C=O
1''	172.8		172.7		C=O
2'-2''	34.1	34.2	34.2	34.5	CH_2
3'-3''	24.9	24.9	24.5	24.5	CH_2
4'-4''	29.7		29.3		CH_2
5'-5''	29.5		29.3		CH_2
6'-6''	29.4		29.3		CH_2
7'-7''	29.2		29.3		CH_2
8'-8''	27.3	27.3	27.0	27.0	CH_2

9'-9''	130.3	-	130.2	130.3	CH
10'-10''	128.4	130.1	130.2	130.2	CH
11'-11''	26.5	25.7	25.4	25.4	CH ₂
12'-12''	128.0	128.2	128.2	128.1	CH
13'-13''	127.8	128.3	128.2	128.5	CH
14'-14''	25.6	27.3	25.4	27.0	CH ₂
15'-15''	127.2	29.2	128.1	29.3	CH/ CH ₂
16'-16''	132.0	32.3	132.0	31.5	CH/ CH ₂
17'-17''	20.6	22.6	20.3	22.5	CH ₂
18'-18''	14.1/14.1	14.2	14.2/14.2	14.2	CH ₃

El análisis por CG-EM muestra el patrón de fraccionamiento uno de los tres fragmentos del triglicérido propuesto, permitiendo observar un ácido graso (18:3) identificado como ácido linolénico, aunque no se identificó ión molecular del compuesto. Los datos cromatográficos y espectrométricos del CG-EM se observan en el Cromatograma 2 y el Espectro de masas 3.

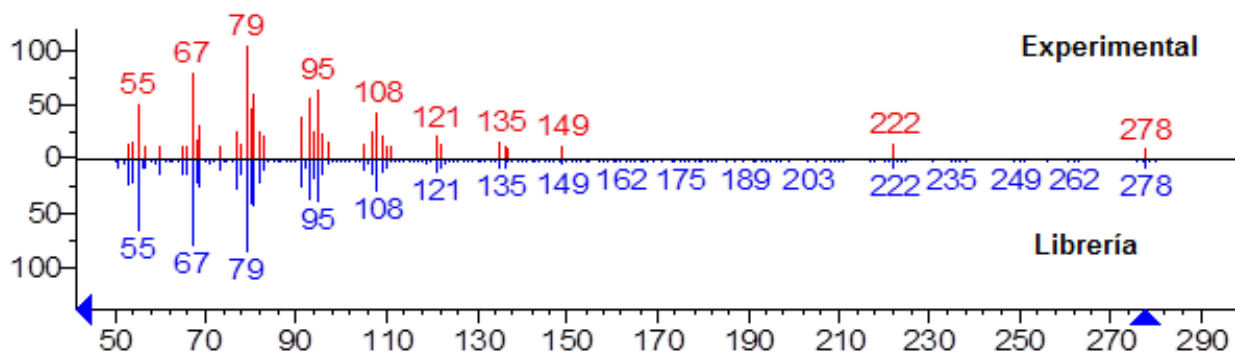


Cromatograma 2. Compuesto VIII. Tiempo de retención para el compuesto mayoritario: 97 minutos.



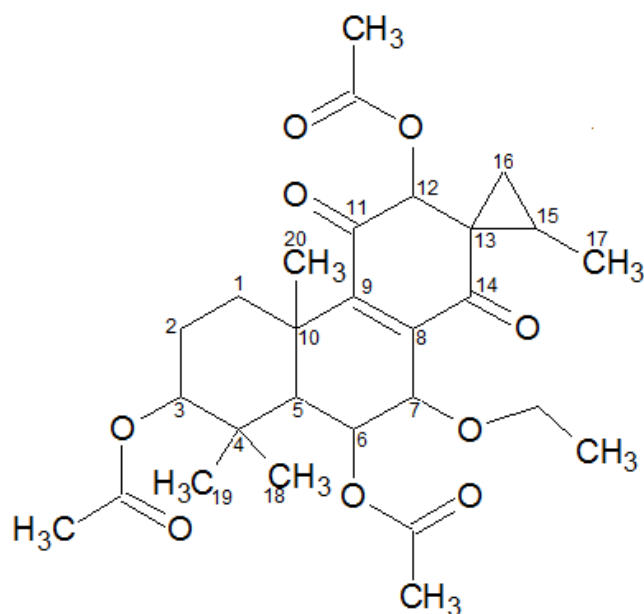
Espectro de masas 3. Relación masa/ carga vs abundancia para el compuesto VIII.

Los datos experimentales se correlacionaron con espectros de masas de referencia extraídos de la librería NIST (National Institute of Standards and Technology), mostrando coincidencias entre ambos registros de datos espectrales (Espectro de masas 4).



Espectro de masas 4. Correlaciones de datos de fraccionamiento experimentales del compuesto IV con datos de referencia de la librería NIST.

V.1.4 Elucidación del compuesto XI.



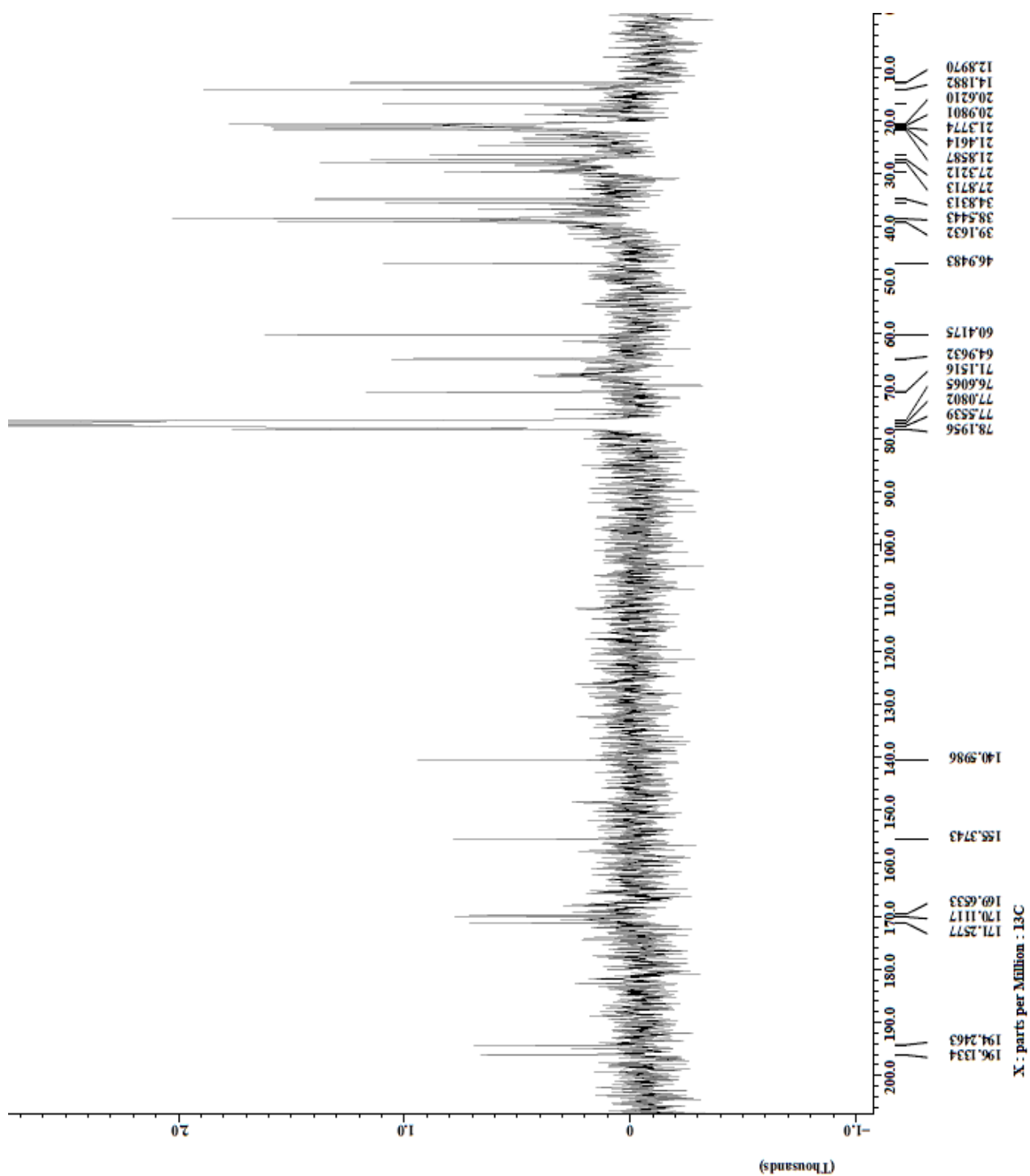
3-Acetil-7-etoxi-barbatusina

El compuesto XI provino del extracto de CH_2Cl_2 , de las fracciones 100-104, soluble en CHCl_3 , se presenta como un sólido amorfo amarillento. Mancha de color morado con p – anisaldehído en CCF. Se obtuvo una masa de 62 mg, con un rendimiento de 4,77 % respecto al extracto de diclorometano. Para este compuesto se llevaron a cabo análisis de RMN en 1D: ^{13}C , ^1H , DEPT 135 y 2D: HETCOR.

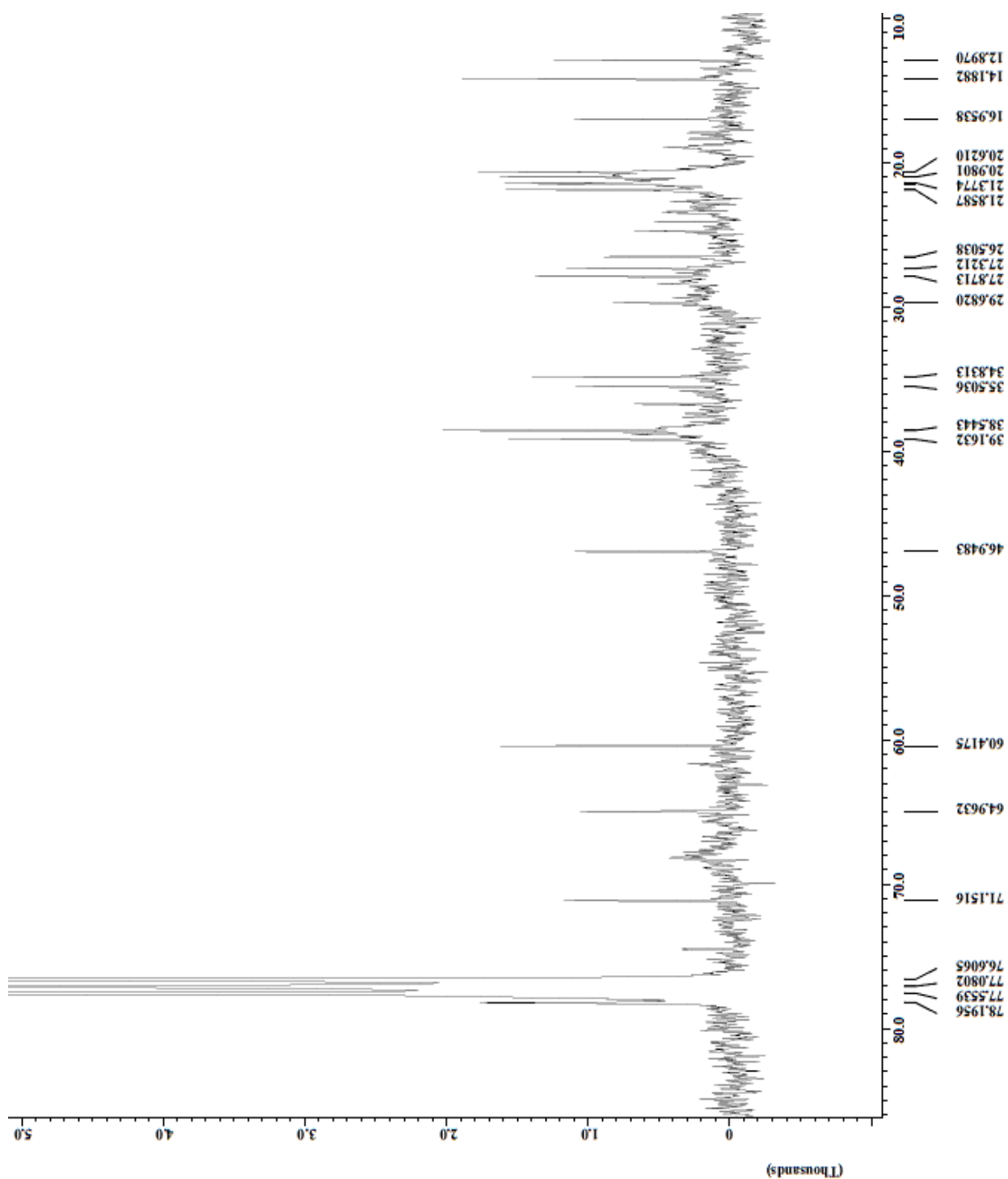
El espectro de RMN ^{13}C (Espectro 22, 23) muestra a campo alto un grupo de señales para un esqueleto de hidrocarburos alicíclicos. Se observan señales (δ_c : 196.0; 194.3 ppm) pertenecientes a carbonilos cetónicos conjugados, así como señales características de carbonilos de éster a 171.2; 170.1 y 169.6 ppm, desplazamientos (δ_c :

155.4 y 140.6 ppm) propios de carbonos olefínicos de tipo cuaternario discriminados por el DEPT 135. Se muestran en el espectro señales (δ_c : 78.2; 71.2; 64.9 y 60.4 ppm) de carbonos metínicos sp^3 oxigenados, señales de carbonos metílicos (δ_c : 27.9; 21.9; 21.4; 20.6; 17.0; 14.2 y 12.9 ppm), carbonos metilénicos (δ_c : 35.5; 27.3 y 26.5 ppm), carbonos metínicos (δ_c : 46.9 y 21.4 ppm) y carbonos cuaternarios (δ_c : 39.2; 38.5 y 34.8 ppm). Las señales expuestas muestran una estructura típica de diterpeno del tipo abietanoide. (Ver señales ^{13}C en la Tabla 30)

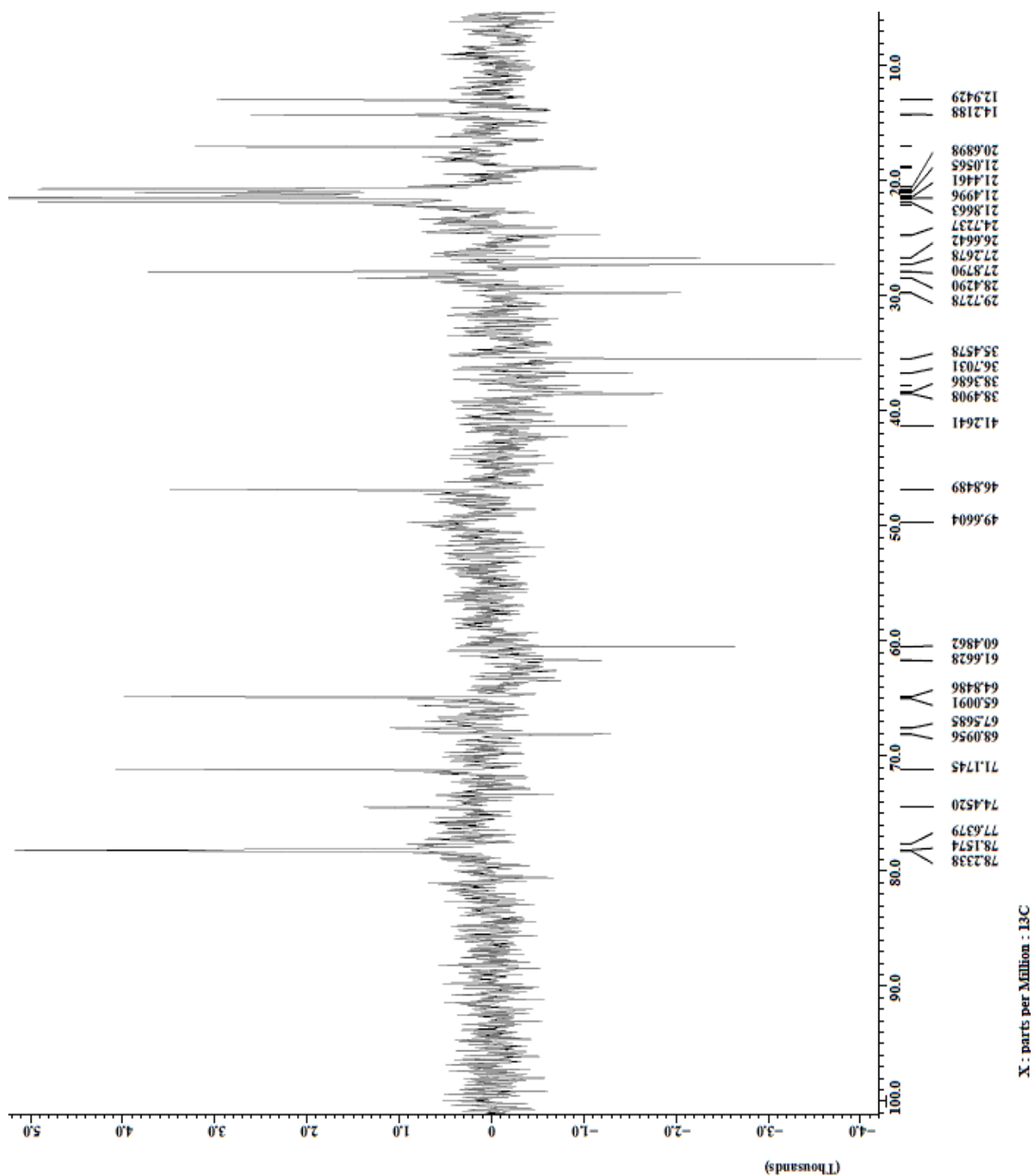
En el espectro de HETCOR (Espectro 24-26) se observa el acoplamiento de protones de la región (δ_H : 0.9–1.3 ppm) con los carbonos con desplazamientos (δ_c : 27.9; 27.3; 17.0; 12.9 y 14.2 ppm); se muestran acoplados los protones (δ_H : 1.64, s y 1.75, s ppm) a (δ_c : 46.9 y 21.9 ppm, respectivamente), y en la región (δ_H : 1.9-2.4 ppm) se observó el acoplamiento a (δ_c : 21.3; 21.5, 20.7 y 35.5 ppm, respectivamente). A campo medio se muestra el acoplamiento con (δ_c : 78.2 y 78.0 ppm) de los protones a (δ_H : 4.85, s y 3.25 ppm, t, $J = 8,29$ Hz, respectivamente), se muestran protones acoplados (δ_H : 4.07, q, $J = 14.32$ y 14.26 Hz; 4.50, s; 5.44, s, ppm) a los carbonos definidos por las señales (δ_c : 65.0; 64.9 y 71.2 ppm, respectivamente). Se llevó a cabo la comparación de los datos experimentales con los datos de referencia de un diterpeno tipo abietano ^[52], mostrándose esta comparación en las Tablas 30 y 31. A través de los datos experimentales y la comparación realizada, se propuso con la ayuda de una herramienta de modelado molecular una estructura de diterpeno del grupo abietanoide con esqueleto de barbatúsina, nombrado como 3-acetil-7etoxi-barbtúsina.



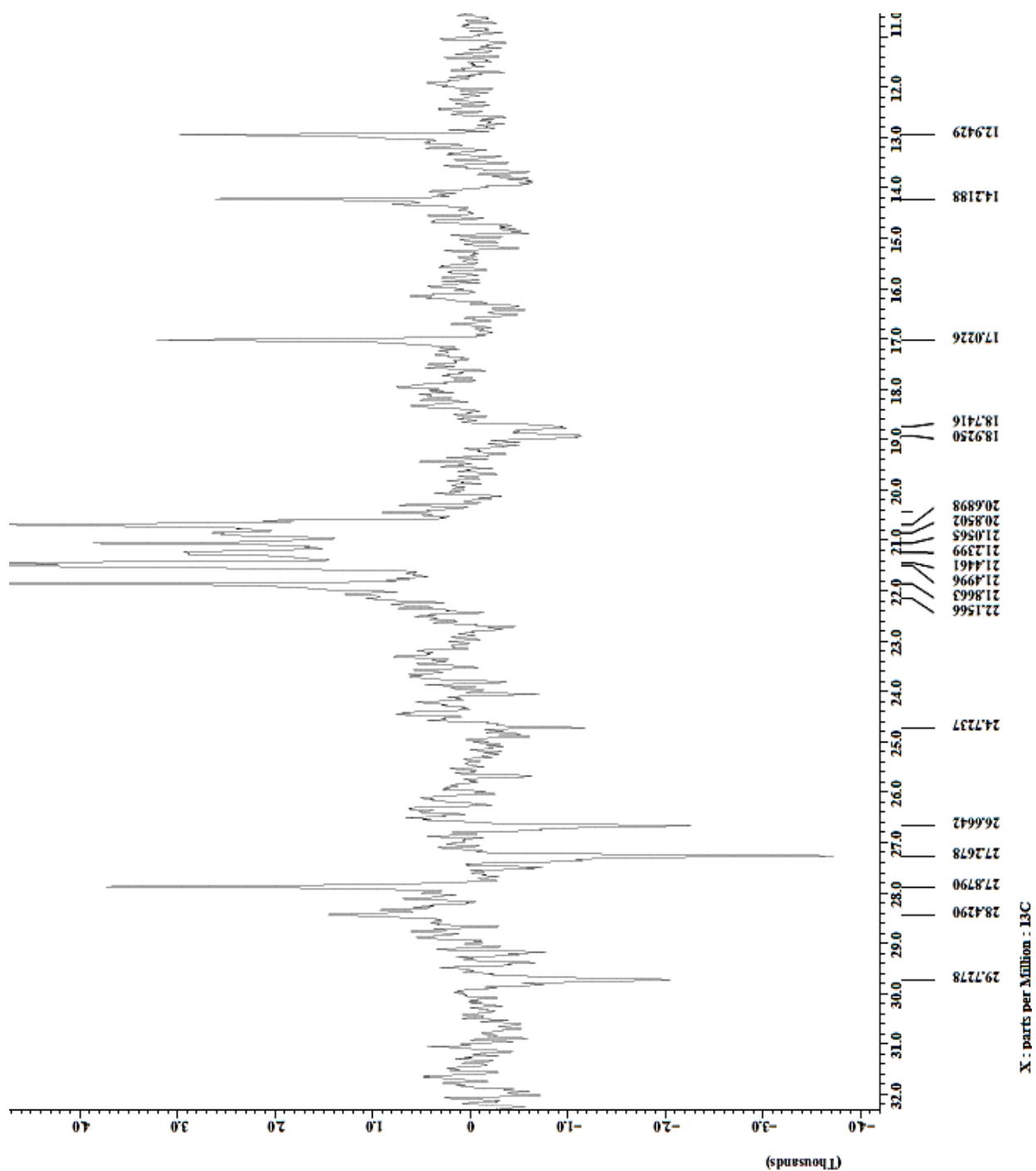
Espectro 22. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 270 MHz).



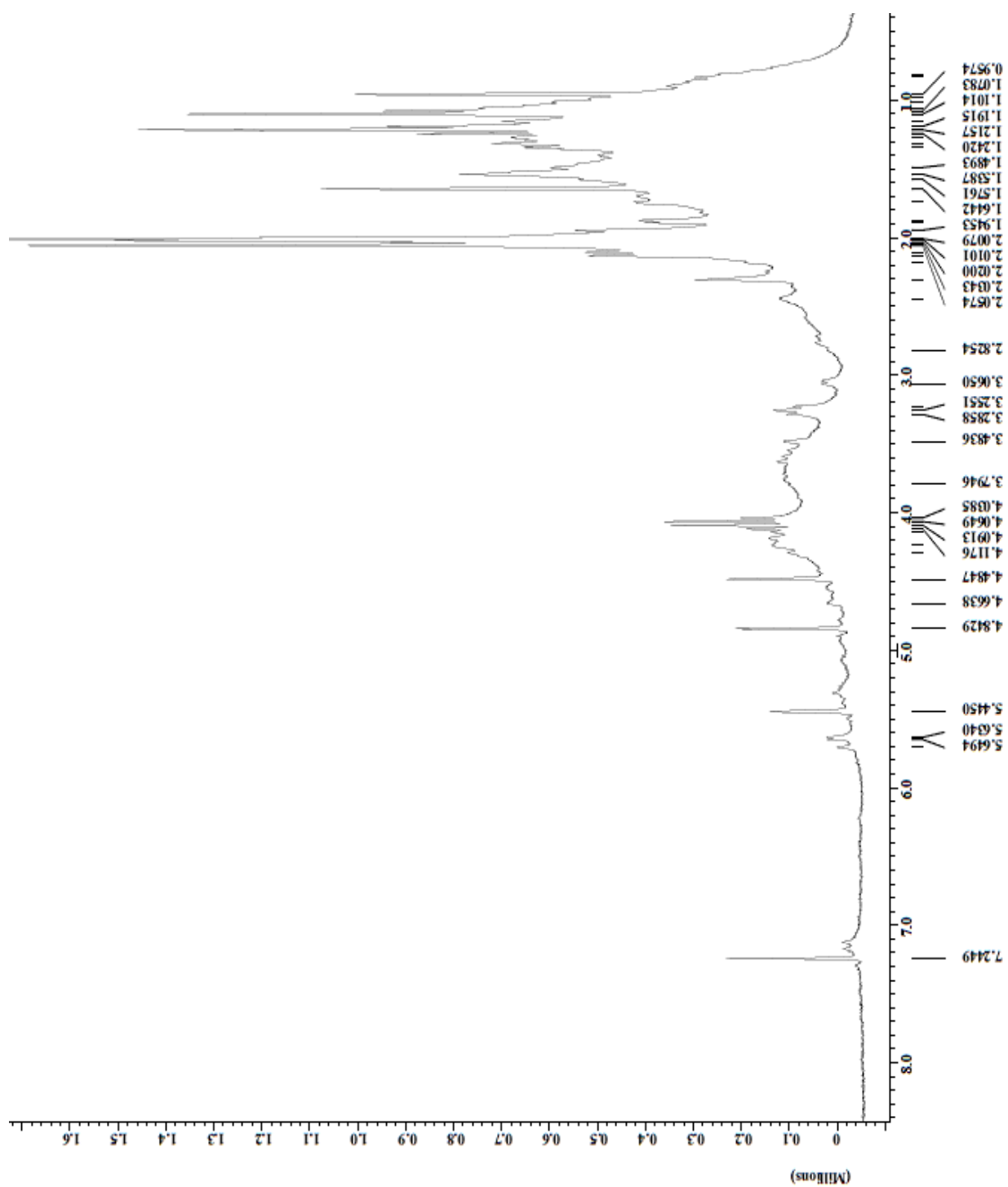
Espectro 23. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 80 - 10 ppm.



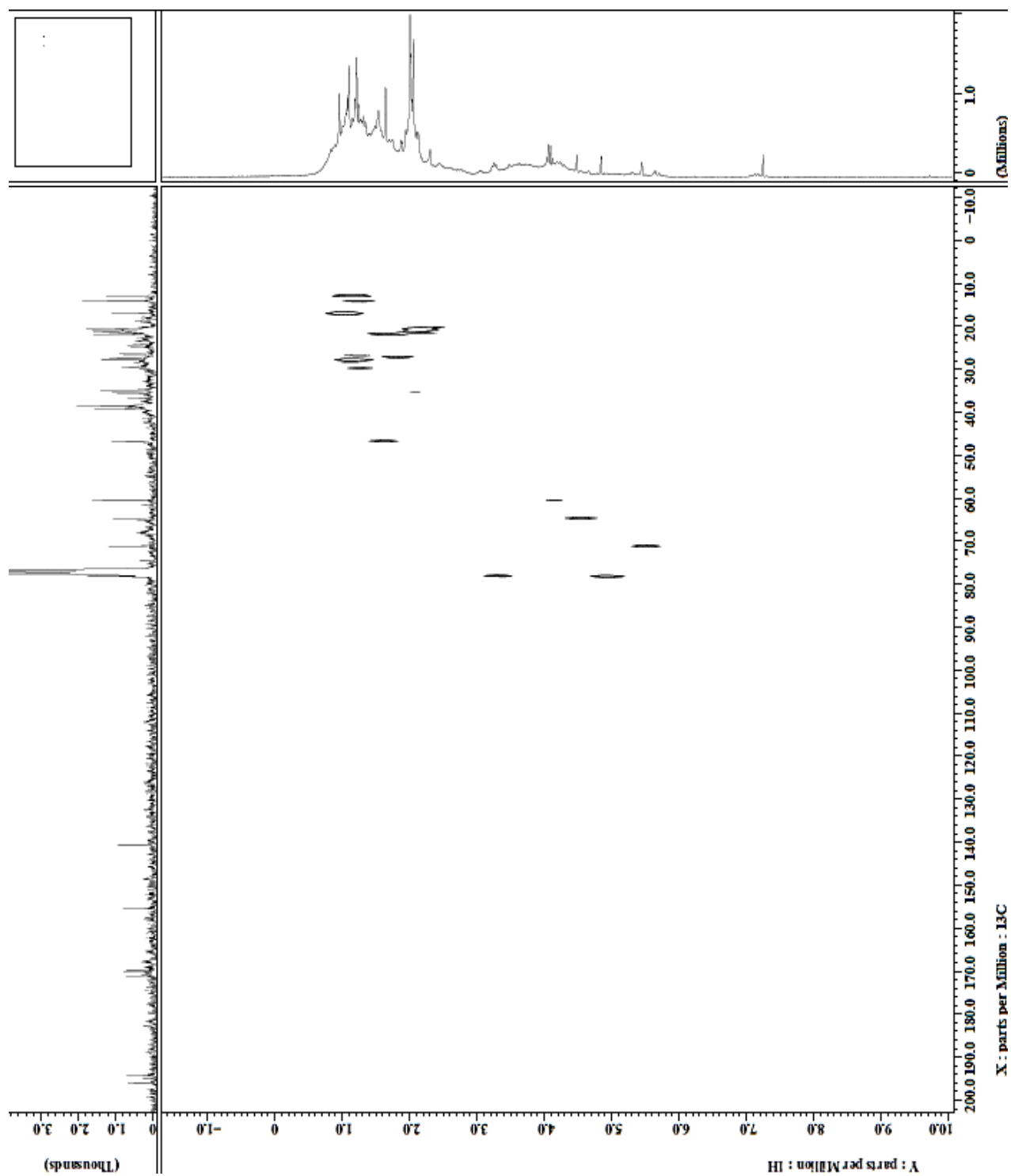
Espectro 24. DEPT 135 (CDCl_3 , 270 MHz)



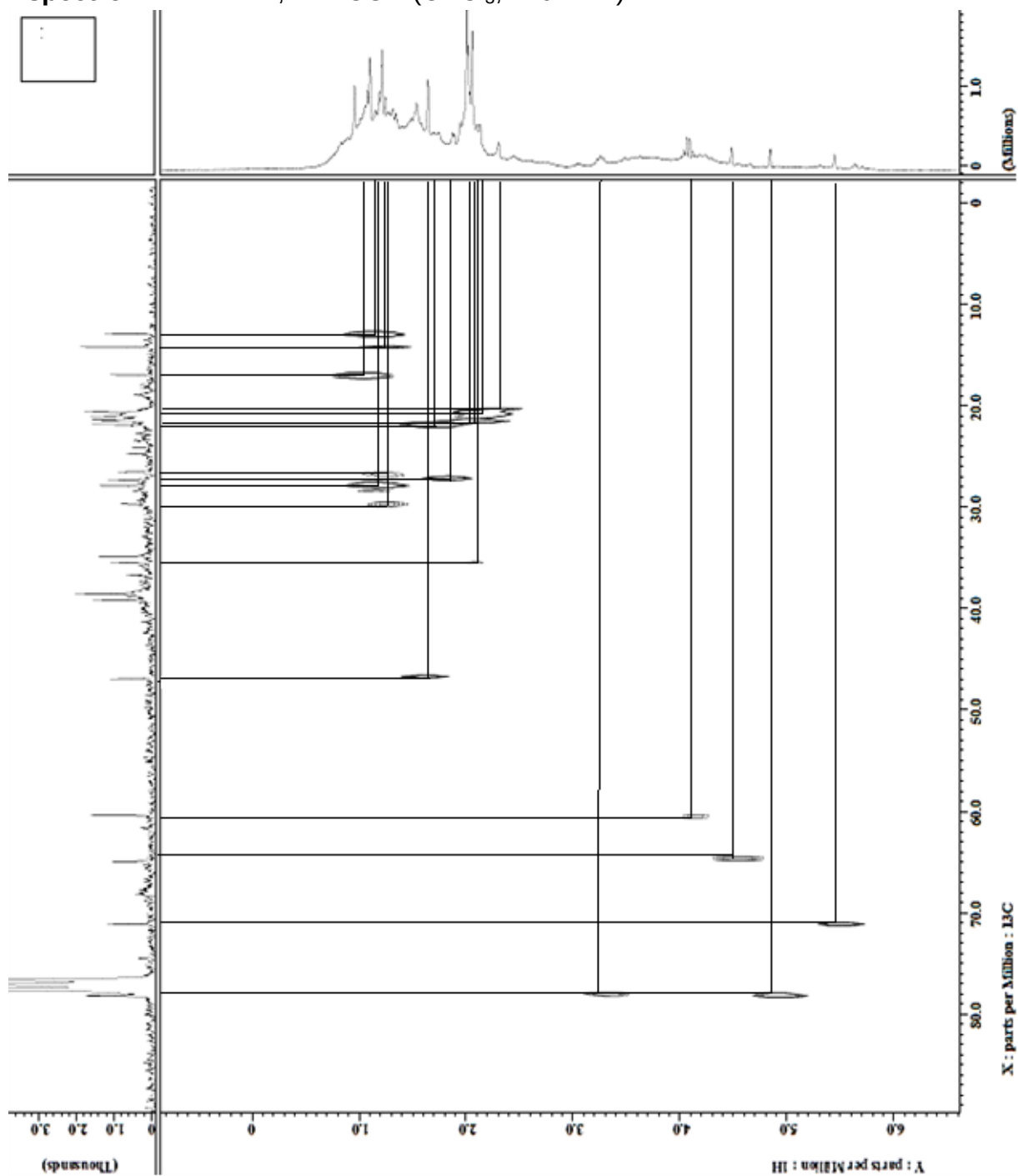
Espectro 25. DEPT 135 (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliación de 32-10 ppm.



Espectro 26. RMN ¹H (CDCl₃, 270 MHz).



Espectro 27. RMN 2D, HETCOR (CDCl_3 , 270 MHz).



Espectro 28. RMN 2D, HETCOR (CDCl_3 , 270 MHz). Ampliado 80-10 ppm y 1-6 ppm.

Tabla 31. Comparación de las señales de RMN ^{13}C y DEPT 135 para el compuesto XI. ^[52,75]. R: referencia.

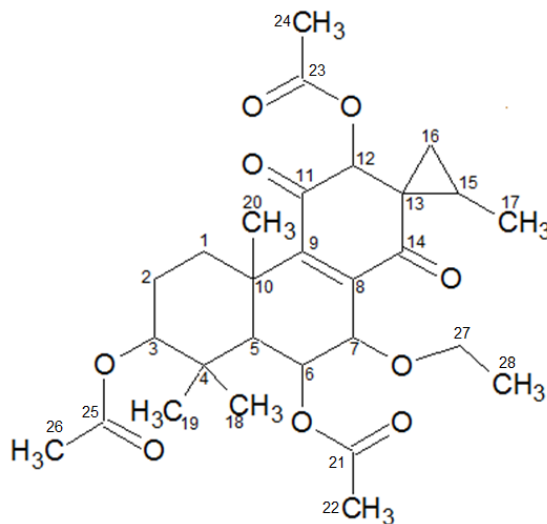
Posición	3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina. R	C. XI. (CDCl ₃ , 270 MHz)	Modelador	DEPT 135
	δ ^{13}C , ppm			Asig.
1	35.6	35.5	36.9	CH ₂
2	27.5	27.3	24.7	CH ₂
3	76.8	78	80.5	CH
4	38.7	38.5	37.8	C
5	47.2	46.9	53.3	CH
6	71.1	71.2	73.6	CH
7	65.4	64.9	71.8	CH
8	140.7	140.6	139.7	C
9	155.6	155.4	147.8	C
10	39.3	39.2	38.6	C
11	194.4	194.3	190.4	C=O
12	78.4	78.2	77.3	CH
13	35	34.8	34.3	C
14	196.4	196	196.1	C=O
15	21.6	21.3	22.3	CH
16	26.7	26.5	25.6	CH ₂
17	13.1	12.9	12.6	CH ₃
18	28	27.9	26.6	CH ₃
19	17.1	17	26.6	CH ₃
20	22	21.9	20.8	CH ₃
21	170.1	171.2	170.2	(AcO-6)
22	20.9	20.7	20.9	CH ₃ (AcO-6)
23	169.8	170.1	169.9	(AcO-12)
24	21.6	21.5	20.9	CH ₃ (AcO-12)
25	-	169.6	169.5	(AcO-3)
26	-	21.4	20.9	CH ₃ (AcO-3)
27	-	60.4	65.2	CH ₂
28	-	14.2	15.2	CH ₃

En el espectro de RMN ^{13}C experimental se observaron señales (δ_{C} : 169.6; 78.0; 60.4 y 14.2 ppm) no observadas en la estructura de referencia, al no encontrar en la literatura

una estructura que compensara en su totalidad las señales experimentales, se propuso una modificación a la 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina sobre las sustituciones en el C-3 y C-7 a través del modelador web: nmrdp.org, logrando obtener relativa correspondencia.

Tabla 32. Señales obtenidas por RMN ^1H , multiplicidad y acoplamientos para el compuesto XI [52].

Posición	3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina	C. XI
	δ ^1H (int, mult., J en Hz)	
6	5.52	5.44, s
12	5.31, s	4.84, s
7	4.53, d, 2.2	4.50, s
15	2.18, m	2.3, s
AcO-12	2.10, s	2.1, m
AcO-6	2.07, s	2.03, s
1	2.03, m	2.02, s
20	1.70, s	1.75, s
5	1.56, s	1.64, s
α-16	1.35, dd, (9.0-3.0)	1.54, m
18	1.17, s	1.19, s
19	1.02, s	1.00, s
27	-	4.06, q, (14.24,14.26)



V.2 ESTUDIOS PRE-CLINICOS Y ENSAYOS BIOLOGICOS DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS SECAS DE *Plectranthus neochilus*.

V.2.1 Ensayos preclínicos

V.2.1.1 Evaluación de la toxicidad aguda y determinación de la DT₅₀.

En la evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus*, se observó distintas manifestaciones semiológicas como: aumento del movimiento peristáltico intestinal (diarrea), disminución de la conducta exploratoria y piloerección, a altas dosis. Se seleccionó el efecto de piloerección como el efecto tóxico representativo, debido a que fue dependiente de la dosis y reversible en el tiempo. En la Figura 17, se muestra el porcentaje de ratones que presentaron el efecto tóxico “piloerección” a las diferentes dosis y tiempos de observación. Se obtuvo una mayor expresión de toxicidad para la mayoría de los grupos experimentales, alcanzando los 30 ó 60 minutos. El tiempo de efecto pico, considerado el tiempo requerido para alcanzar la respuesta máxima (piloerección), fue de 10 minutos. Para la mínima dosis (0,625 g/Kg), no se provocaron cambios conductuales, neurológicos y fisiológicos en los animales de experimentación. De acuerdo a los resultados expuestos, la piloerección presenta un comportamiento dependiente y proporcional a la dosis, y con tendencia de reversibilidad.

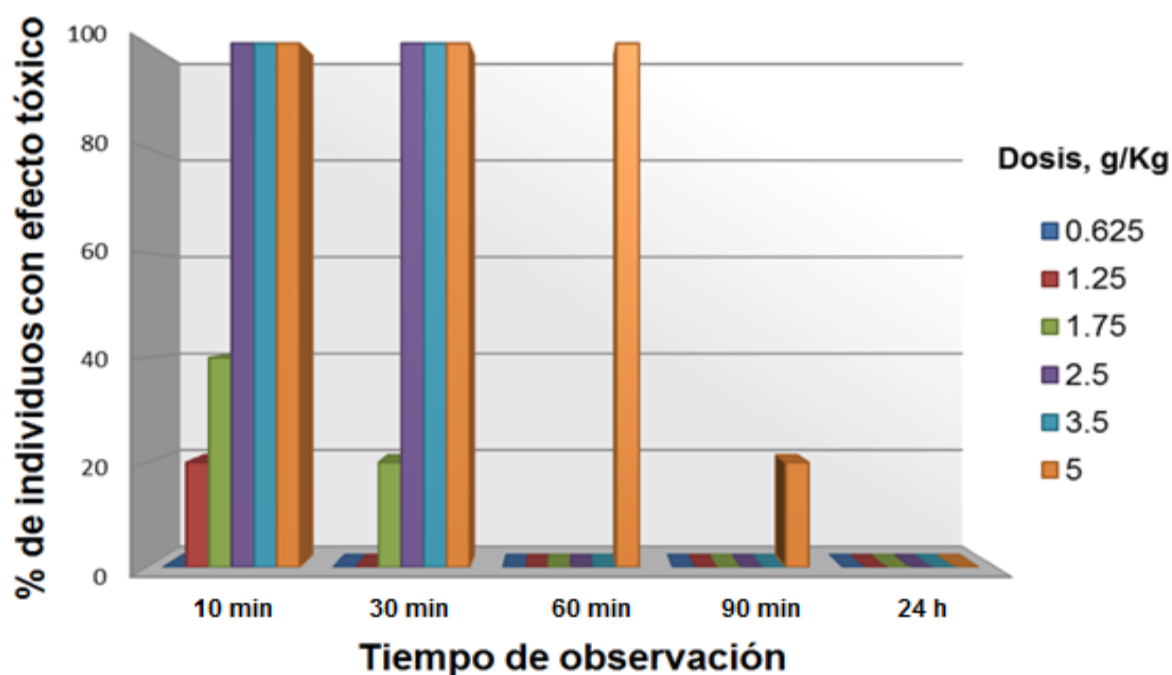


Figura 17. Porcentaje de animales que presentaron el efecto tóxico “piloerección” en función de la dosis y del tiempo de observación.

La determinación de la DT_{50} fue realizada utilizando el método de Litchfield y Wilcoxon (1949), a través de la construcción de una curva de porcentaje de efecto tóxico versus el logaritmo de la dosis (Figura 18). La DT_{50} fue de 1,87 g/kg con intervalos de confianza de 1,547 a 2,191 g/kg. No se observó letalidad en ninguna de las dosis evaluadas, lo que indica que el extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus* es de uso seguro a las dosis evaluadas.

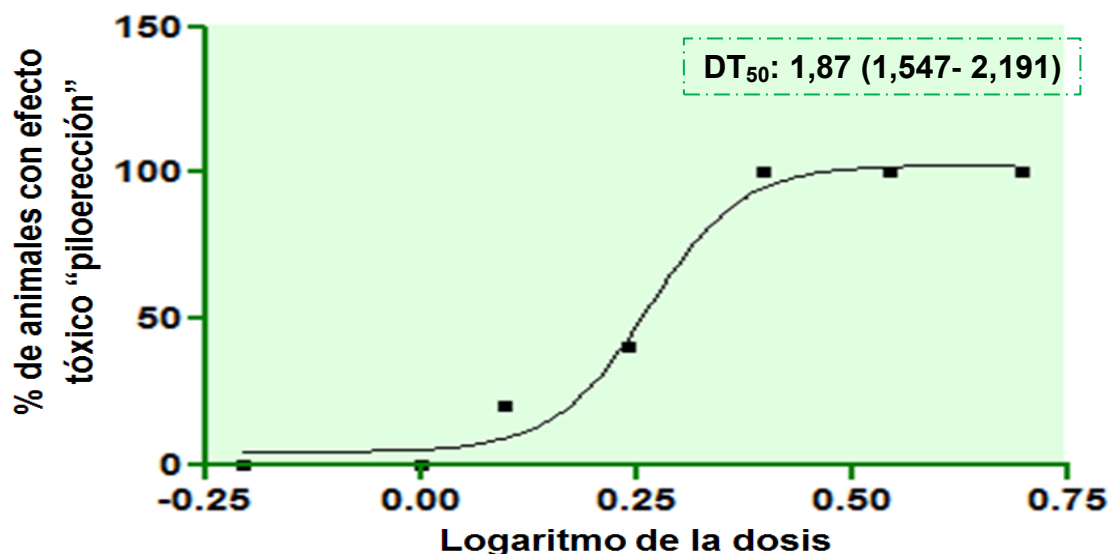


Figura 18. Porcentaje de animales con el efecto tóxico "piloerección" versus el log de la dosis. Graphpad prisma 6.

V.2.1.2 Ensayos antinociceptivos

Los análisis de la actividad antinociceptiva del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus*, fueron realizados con el fin de comprobar el efecto analgésico establecido por la población. No existen suficientes investigaciones sobre las propiedades farmacológicas de esta especie que validen los usos conferidos a través de bases etnobotánicas. Se evaluó la actividad antinociceptiva por medio de tres modelos experimentales distintos: método químico, método térmico y prueba de formalina. Estos métodos han sido utilizados en diversas investigaciones ^[87,88] debido a que son modelos efectivos para demostrar si la actividad analgésica ocurre a nivel del sistema nervioso periférico, SNP (modelo químico) y/o a nivel del sistema nervioso central, SNC (modelo térmico). La prueba de la formalina es un modelo que permite establecer el posible mecanismo de acción del agente evaluado.

V.2.1.2.1 Método Químico: Contorsión abdominal inducida por ácido acético.

La administración de ácido acético en los animales experimentales, provoca irritación moderada del recubrimiento del peritoneo y de los tejidos circundantes en él. El dolor percibido por los ratones se manifiesta a través de signos resaltantes como: contorsiones abdominales y extensión de las patas posteriores. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad analgésica del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus* a través de este ensayo. Se observó una reducción del número de contorsiones abdominales inducidas en correlación con el grupo control negativo.

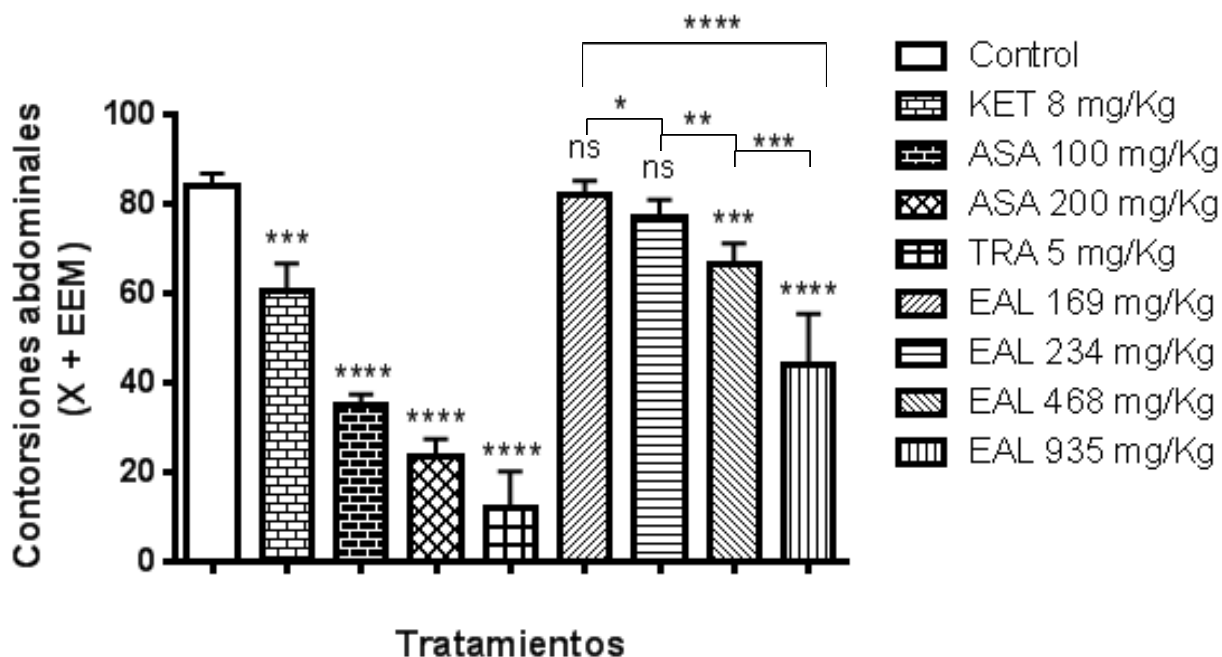


Figura 19. Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus* por el método químico. Los datos son expresados como la media $\pm$ el error estándar de la media. **** $p < 0,0001$ (alta significancia); *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,1$. Graphpad prism 6.

La mitigación del dolor durante este método es un indicador de sustancias con potencial analgésico por vías aferentes periféricas. Se comprobó que el modelo químico aplicado

permite establecer la actividad antinociceptiva de productos naturales, demostrando la efectividad de agentes terapéuticos utilizados como fármacos de referencia (controles positivos) en la disminución del número de contorsiones abdominales ^[89].

El ketoprofeno es un agente antiinflamatorio no esteroideo que actúa inhibiendo de forma no selectiva la enzima ciclooxigenasa con posterior inhibición periférica de la síntesis de prostaglandinas, inhibe también la lipoxigenasa y la actividad de la bradiquinina ^[90]; Respecto a la ejecución del ensayo antinociceptivo es importante mencionar que la especie de ratón CD-1 se evaluó con dosis menores de KET a la usualmente utilizada (10 mg/Kg), debido a que se ocasionaba la muerte de los animales experimentales, proponiendo trabajar con una dosis de 8 mg/Kg i.p, la que resultó inocua, mostrando un porcentaje de inhibición de 27 % ($p < 0,001$). En cuanto a la aspirina, es también un antiinflamatorio no esteroideo (AINEs) que opera de forma similar al ketoprofeno, interfiriendo con la síntesis de las prostaglandinas inhibiendo en este caso de forma irreversible la ciclooxigenasa ^[91]; Al evaluar la aspirina a las dosis de 100 y 200 mg/Kg, produjo una disminución de las contorsiones mostrando un porcentaje de actividad antinociceptiva mayor a KET de 59 % y 71 % ($p < 0,0001$ para ambas concentraciones), respectivamente. En el caso del tramadol, es descrito como analgésico de acción central, agonista no selectivo de los receptores opioides μ , δ y κ , con mayor afinidad por los receptores μ , su efectividad es de 1/10-1/6 de la de morfina; este fármaco arrojó un porcentaje de actividad antinociceptiva de 87 % ($p < 0.0001$) siendo el fármaco de referencia más efectivo ^[92].

En la evaluación del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus* se obtuvo una disminución de contorsiones en función de la dosis, siendo mayor esta reducción a la dosis de 935 mg/Kg (48.19 %) y 468 mg/Kg (20.48 %), significativamente diferentes al control ($p < 0.0001$ y 0.001 , respectivamente) (Figura 20). Se destaca la similitud entre la

actividad antinociceptiva del extracto acuoso a 935 mg/Kg, el ketoprofeno a 8 mg/Kg y la aspirina a 100 mg/Kg, lo que puede ser indicativo de un mecanismo de acción comparable con el de estos fármacos de referencia.

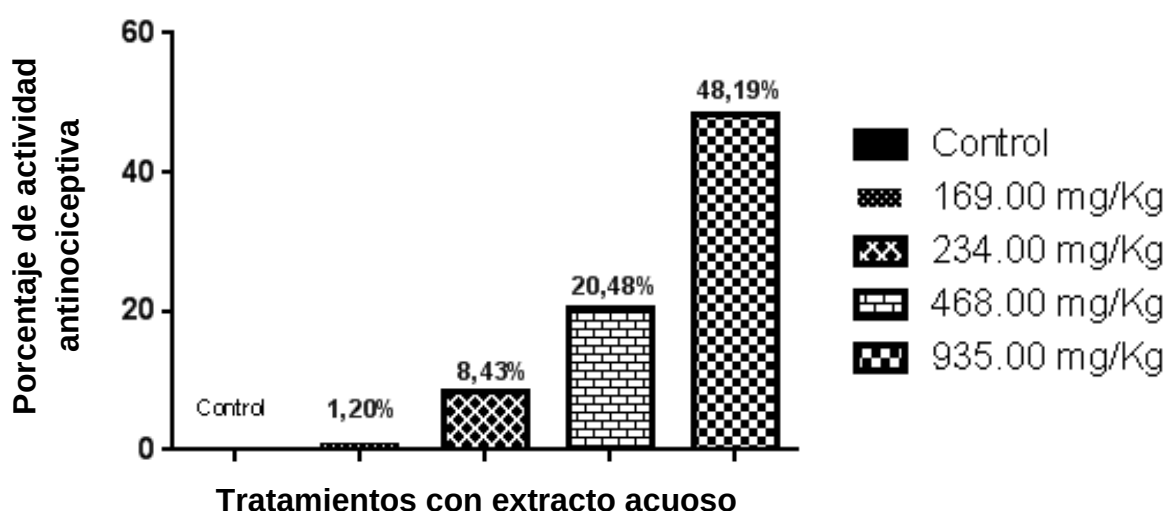


Figura 20. Porcentaje de efecto inhibitorio del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus* sobre la noxa inducida en el ensayo nociceptivo por el método químico, en la evaluación de la actividad analgésica. *Graphpad prism* 6.

Los resultados obtenidos a través de este modelo experimental, se hallan relacionados a los receptores peritoneales locales. Al administrar ácido acético por vía intraperitoneal, se induce un efecto doloroso como consecuencia de la liberación de mediadores endógenos, tales como: PGI_2 (prostaglandinas prostaciclina I_2), PGE_2 (prostaglandina E2) y productos lipooxigenasa, encargados de generar estímulos en las neuronas nociceptivas sensibles a los AINEs ^[91]. Por consiguiente, la manifestación de un efecto antinociceptivo, evidenciado por la disminución de las contorsiones inducidas por ácido acético, indica que el mecanismo acción del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus*, puede estar relacionado a la inhibición de la lipooxigenasa y/o la ciclooxigenasa en los tejidos periféricos, reduciendo de ese modo la biosíntesis de PGE_2 , e interfiriendo con el mecanismo de la transducción en los nociceptores aferentes primarios ^[90].

V.2.1.2.2 Método térmico

Los resultados antinociceptivos del EAL de *P. neochilus* evaluados con el método térmico se presentan en la Figura 21. Se observó que EAL produjo un incremento significativo en el Tiempo de retiro de la cola a los 30 y 60 min comparado con el grupo control ($p<0,001$, $p<0,05$, respectivamente). Los fármacos utilizados como control positivo, ambos incrementaron el tiempo de retiro de la cola siendo significativo solo para la MOR ($p<0,001$). Este ensayo permite evaluar la participación del sistema nervioso central en la actividad antinociceptiva del extracto acuoso, en vista de que incrementa el umbral del dolor ^[93]. Los tiempos cortos de retirada muestran la relación de esta respuesta con reflejos a nivel espinal, generándose la transmisión directa al SNC, al hacer incidir calor sobre la cola del ratón que funciona como un elemento termorregulador ^[94].

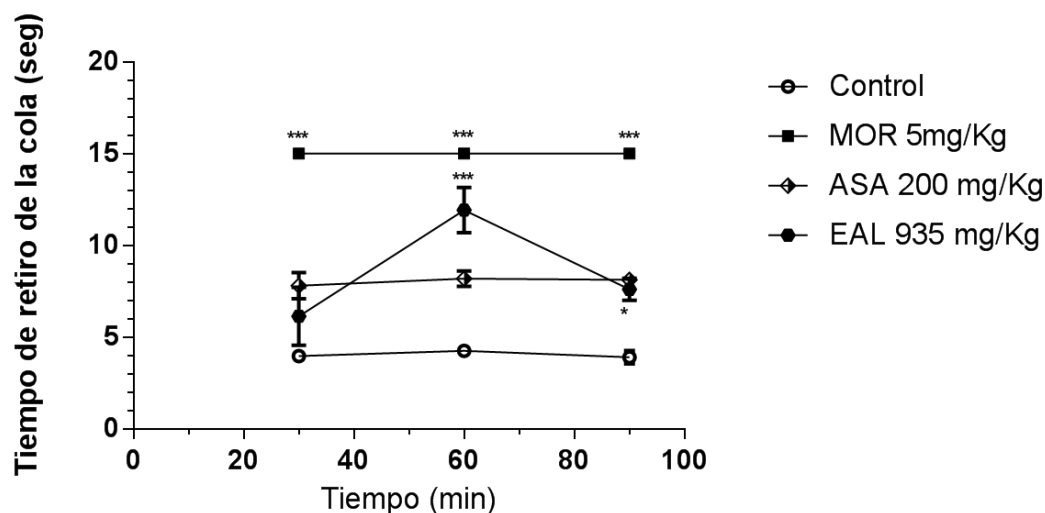


Figura 21. Efecto inhibitorio del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus* sobre la noxa inducida en el ensayo nociceptivo por el método térmico, en la evaluación de la actividad analgésica. *Graphpad prisma 6*.

El efecto antinociceptivo observado disminuye con el tiempo de observación, y esto podría deberse a que EAL es de alguna manera metabolizado y excretado, los cuales son parámetros que deben evaluarse en estudios farmacocinéticos.

La estimulación térmica dolorosa, afecta principalmente a los nociceptores sensibles al calor localizados en la piel, sin producir la liberación de mediadores endógenos que generen una respuesta inflamatoria. La inhibición de la nocicepción implica en gran medida la regulación central del dolor a través del sistema opioide endógeno, así como la acción de fármacos analgésicos opiáceos (como la morfina). Adicional a esto, se ha observado que algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), también participan a este nivel ^[95].

V.2.1.2.3 Prueba de formalina

La evaluación del efecto antinociceptivo del EAL de las hojas secas evaluado mediante la prueba de formalina, mostró una disminución del tiempo de latencia en ambas fases, de forma dependiente de la dosis y significativamente diferente del control a 468 mg/kg y 935 mg/kg del EAL (Figura 22). El mayor efecto analgésico a las dosis de $1/2 DT_{50}$ y $1/4 DT_{50}$ fue manifestado durante la fase II, con un porcentaje de inhibición de 72,0 % ($p < 0,0001$) y 43,8 % ($p > 0,001$), respectivamente; mientras que, en la fase I se obtuvo a las mismas concentraciones de $1/2 DT_{50}$ y $1/4 DT_{50}$ un 50,9 % ($p > 0,001$) y 25,4 % ($p > 0,01$) de actividad.

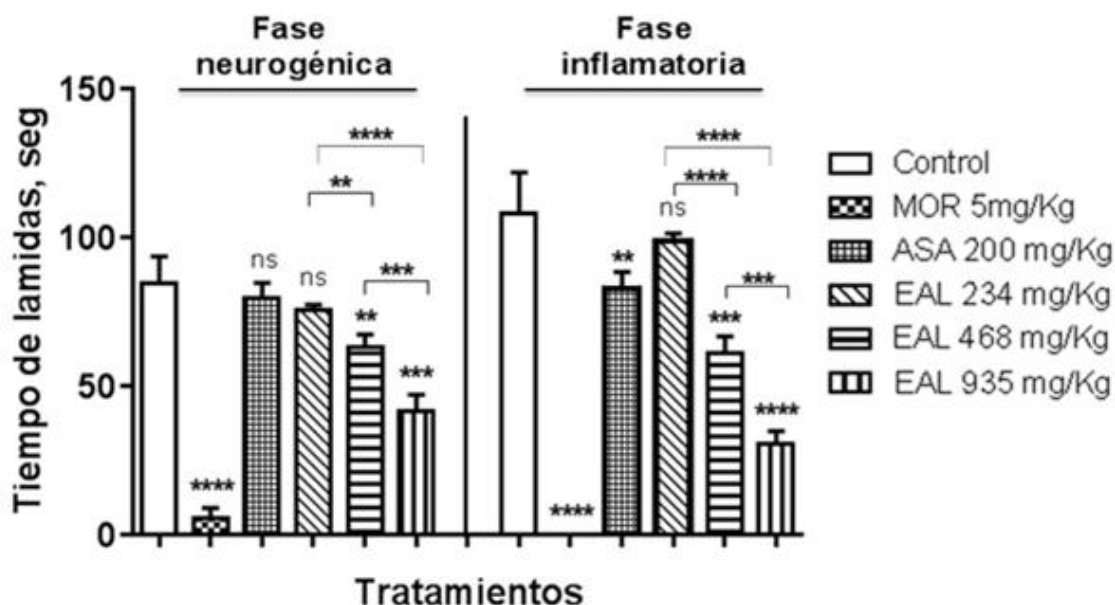


Figura 22. Ensayo con formaldehído con el registro del tiempo de lamida promedio ($\pm$ SEM), inmediatamente después de la inyección subcutánea de formalina en la región intraplantar de la pata trasera de los ratones. Ejecución realizada en dos fases: Fase neurogénica. *Graphpad prism* 6.

Respecto a los fármacos de referencia, se observó como resultado para la ASA una disminución del tiempo de latencia únicamente en la fase II (Fase inflamatoria) siendo moderadamente diferente del control, mostrando un porcentaje de actividad de 28,3 % ($p > 0,01$), no siendo significativo durante la fase I (Fase neurogénica). La aspirina, como se mencionó en el método químico, es un AINEs que actúa a bajas concentraciones inhibiendo selectivamente la actividad de la COX-1, mientras que a altas concentraciones de ASA inhibe de forma no selectiva la COX-2, siendo estas responsables de la síntesis de mediadores como las prostaglandinas (PG) relacionadas a procesos inflamatorios, entre otros mediadores periféricos como bradiquinina y leucotrienos, todos estos mediadores se acoplan a nociceptores periféricos en las

terminales de vías aferentes nerviosas ^[96]. Este fármaco no resultó efectivo en la fase I, pudiendo inferir que el mismo no modula la respuesta dolorosa a través de receptores opioides. En el caso de la MOR como fármaco de referencia, se observó un efecto antinociceptivo que superó el 90 % de actividad en ambas fases. Los narcóticos opiáceos como la MOR producen efectos sobre receptores situados en las membranas de células neuronales. Los tres tipos principales de receptores opioides que se conocen son μ , δ y κ . Actualmente se ha demostrado la existencia de genes que codifican la aparición de receptores opioides en localizaciones periféricas: ganglio de la raíz dorsal, células endocrinas y en el sistema inmune; los opioides en la periferia actúan en la fase inicial de la inflamación, lo que permite justificar el efecto antinociceptivo de la morfina se extienda hasta la fase II ^[97].

La prueba de formalina es un modelo de dolor tónico que resultó coherente con los otros dos modelos antinociceptivos aplicados (modelo químico y modelo térmico); se encuentra validado por múltiples estudios relacionados con la inflamación, y se considera adecuado para el estudio del dolor clínico como el dolor postraumático o postquirúrgico, además de permitir proponer el posible mecanismo de acción de las sustancias que se evalúan ^[98]. Los resultados obtenidos para el EAL de las hojas secas de *P. neochilus*, sugiere que existen componentes que tienen la capacidad de antagonizar los receptos nociceptivos involucrados en la modulación del dolor, debido a que posee actividad antinociceptiva tanto a nivel central como periférico, siendo la vía aferente periférica la que otorgó un mayor efecto modulador. Se requieren estudios adicionales que dilucidan a través de que receptores se produce la analgesia, como el uso de antagonistas selectivos de los nociceptores involucrados en el dolor (Ej. La naloxona que antagoniza los receptores opioides) ^[92].

V.2.1 Ensayos biológicos

V.2.1.1 Actividad citotóxica

El extracto acuoso liofilizado de las hojas secas de *P. neochilus* (EAL) mostró como resultado preliminar un bajo efecto citotóxico sobre células neoplásicas de neuroblastoma humano SH-SY5Y incubadas durante 72 horas, observándose una disminución de la viabilidad de las células dependiente de la concentración del extracto y significativamente diferente del control ($p > 0.0001$), alcanzando un valor máximo de citotoxicidad de 30,18 % a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, tal como se observa en la Figura 23. Actualmente, se están llevando a cabo la evaluación sobre líneas celulares, incluyendo las no neoplásicas.

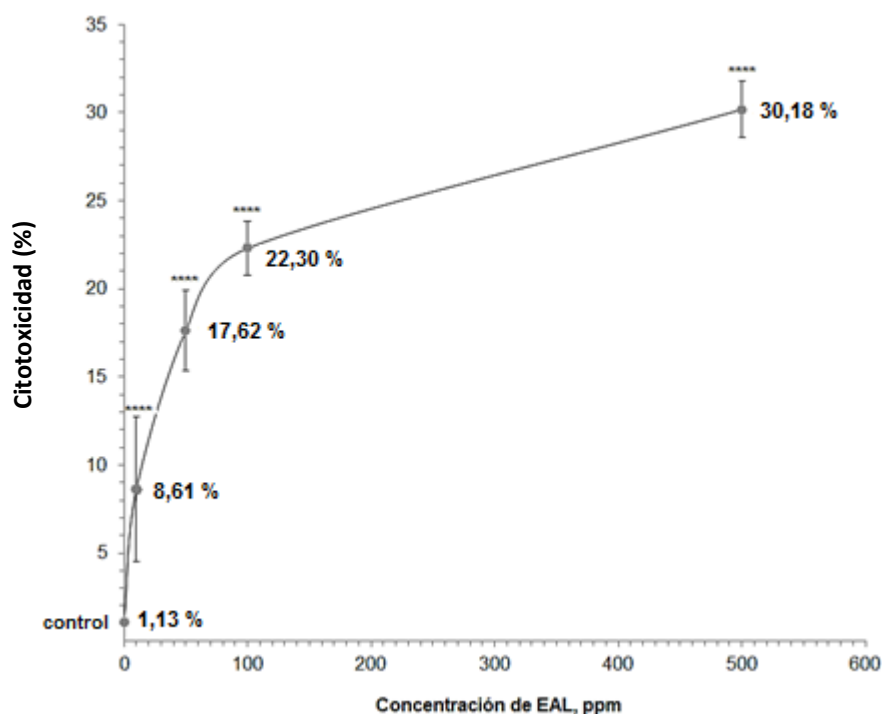
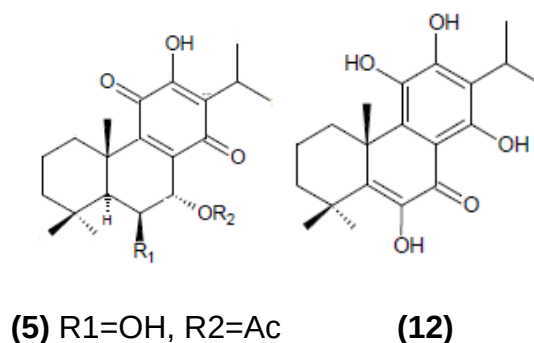


Figura 23. Porcentaje de actividad citotóxica (mostrado como porcentaje de pérdida de viabilidad celular) respecto a la concentración del EAL.

Estos resultados son comparables con los ensayos de citotoxicidad realizados a diferentes extractos de *P. neochilus* en un estudio realizado por Alvares G (Marzo, 2016), donde fue evaluado el extracto acuoso de sus hojas a una concentración de 500 µg/mL sobre células de carcinoma de hipofaringe (Fadu) y lengua (SCC-25), además de células sanas como keratinocitos humanos (HaCaT) y una línea celular de fibroblastos (L929), donde se obtuvo un efecto de reducción de la viabilidad celular no mayor a 30 % en todas las líneas celulares estudiadas ^[87].

De manera similar a la especie *P. neochilus*, un estudio realizado por Praveena y colaboradores (2013), demostró que la especie *P. amboinicus* produce un efecto antiproliferativo sobre células neoplásicas de adenocarcinoma de colon humano (HCT-15) y adenocarcinoma de glándula mamaria humana (MCF-7) con la inhibición de la viabilidad de 73,58 % y 55,17 %, respectivamente, a concentraciones de 1000 ppm del extracto hidroalcohólico de esta especie ^[88]. Estos estudios y nuestros resultados sustentan la idea de que las especies del género *Plectranthus* presentan de baja a moderada citotoxicidad.

En un estudio biodirigido de la especie *P. madagascariensis* realizado por Pereira F y colaboradores (2014) determinó la citotoxicidad ($IC_{50} \approx 64$ ppm) del extracto de acetona (extracto bioactivo) sobre células de cáncer de mama (MDA-MB-231). A través de técnicas cromatográficas y espectroscópicas se aislaron e identificaron 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroilenona (**5**) y coleon U (**12**), que resultaron ser diterpenos abietanoides antiproliferativos ^[100].



Debido a las similitudes quimiotaxonómicas entre las especies del género *Plectranthus*, se postula que el efecto citotóxico resultante durante la evaluación del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus*, puede deberse en parte a la presencia de diterpenos tipo abietano como los mencionados en la investigación de Pereira F y col (2014). Cabe destacar que a pesar de que no hemos aislado este tipo de compuestos del EAL, los análisis fitoquímicos preliminares demuestran la presencia de terpenos, lo que no descarta que formen parte de los constituyentes de este extracto.

V.2.1.2.1 Actividad atrapadora del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Los resultados del ensayo de actividad antioxidante del EAL de las hojas secas de *P. neochilus* evaluados por el método de atrapamiento del $O_2^{\cdot-}$ se muestran en la Figura 24. Se observó un efecto de captación del $O_2^{\cdot-}$ dependiente de la concentración, presentando un porcentaje de actividad de 19,67 % a la concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$, y de 8,35 % a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ del EAL, siendo significativamente

diferentes las actividades entre ambas concentraciones ($p>0,001$). El antioxidante de referencia, ácido gálico, produjo un atrapamiento de 55.56 %.

El anión $O_2^{\cdot-}$ es una especie altamente reactiva capaz de provocar oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, por lo que está involucrada en la fisiopatología de diversas enfermedades, tales como, hipertensión, diabetes, cáncer y enfermedad de Alzheimer. Las fuentes más importantes de este anión se encuentran en la mitocondria, y en menor orden reacciones enzimáticas catalizadas por la xantina oxidasa, flavina oxidasa y NADPH oxidasa. Esta especie reactiva de oxígeno es metabolizada por la superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la conversión de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , siendo esta especie también altamente reactiva, relacionada con todas las alteraciones oxidativas ^[101].

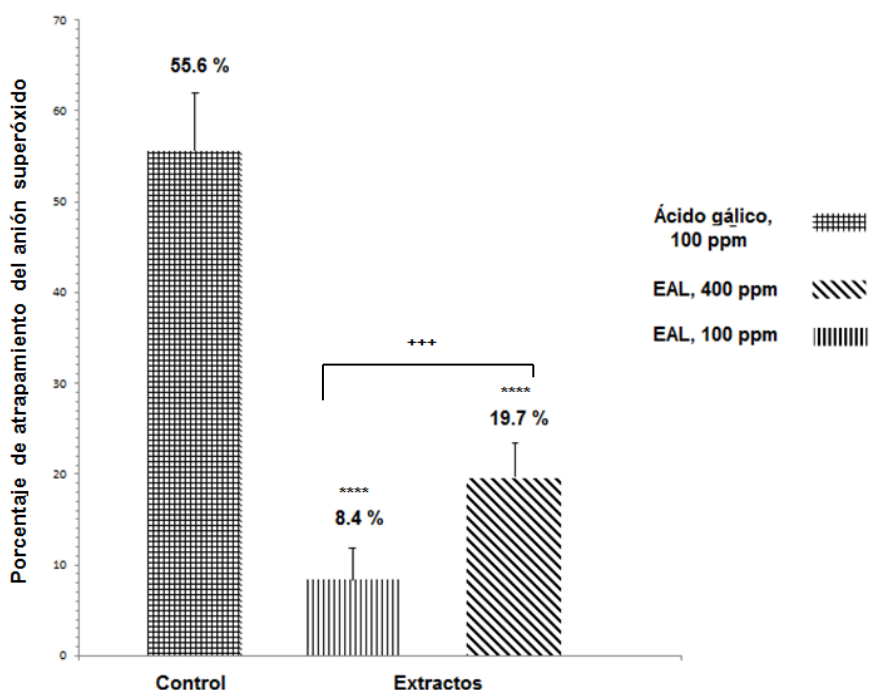


Figura 24. Porcentaje de atrapamiento del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

La evaluación de captación del H_2O_2 mostró el decremento de la absorbancia del H_2O_2 en presencia del EAL, estos resultados son reflejados en la Tabla 32. Se muestra en la Figura 25, el porcentaje de atrapamiento del H_2O_2 generado por el EAL, observándose un efecto dependiente de la concentración, presentando porcentajes de 17.10 % y 2.16 % para las concentraciones de 400 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El H_2O_2 es una especie de oxígeno reactivo no radicalario producto de la SOD, y es un intermediario durante el metabolismo oxidativo endógeno que media la formación de radicales de oxígeno tales como $\cdot\text{OH}$ y $\text{O}_2\cdot^-$. El H_2O_2 es utilizado para predecir la capacidad de eliminación de antioxidantes en sistemas biológicos ^[102].

Tabla 33. Diferencial de absorbancias para los diferentes ensayos y porcentaje de atrapamiento.

Ensayo	Tiempo Inicial	Tiempo final (10 minutos)	Δ Abs.	% Atrapamiento
H_2O_2 , 40 mM	0.266	0.262	0.004	-
	0.144	0.141	0.003	-
EAL, 400 ppm	1.854	1.766	0.088	33.08
	1.867	1.831	0.036	13.53
	1.331	1.302	0.029	10.90
	1.666	1.617	0.049	18.42
EAL, 100 ppm	1.684	1.677	0.007	2.63
	1.965	1.96	0.005	1.88
	1.875	1.869	0.006	2.26
	2.067	2.062	0.005	1.88

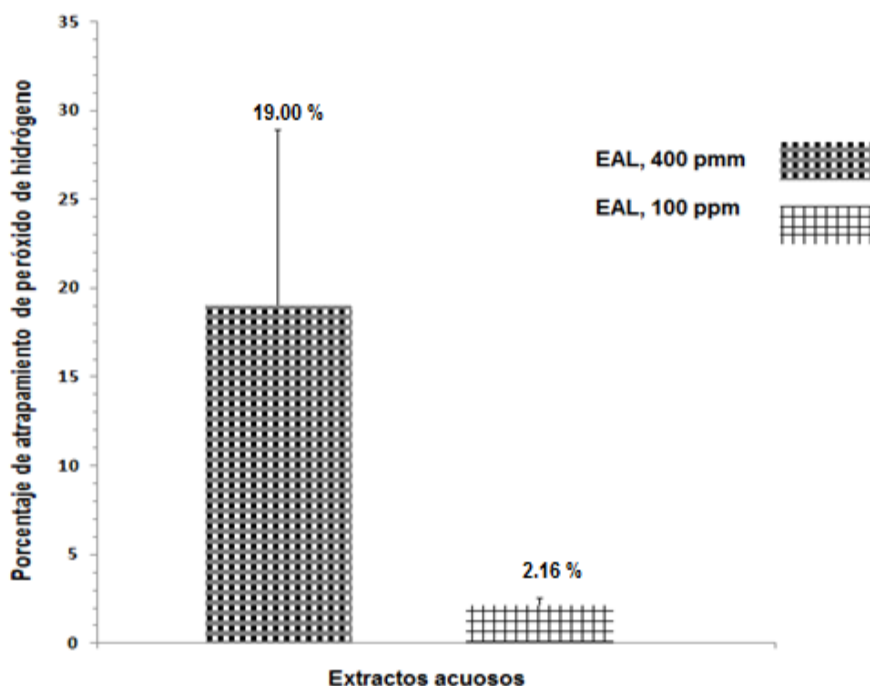
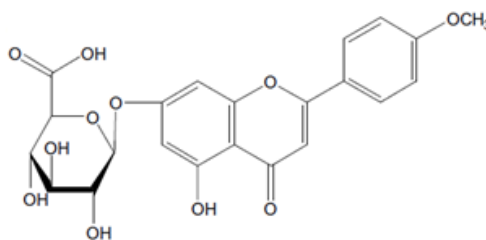


Figura 25. Porcentaje de atrapamiento de H_2O_2 para el extracto acuoso a las concentraciones de 400 y 100 ppm.

Estudios de la actividad antioxidante realizados a diferentes especies del género *Plectranthus* han mostrado una importante actividad atrapamiento de especies radicales libres de oxígeno, tales como: el radical hidroxilo y el anión superóxido ^[103,99], así como de peróxido de hidrógeno ^[104], y de óxido nítrico, siendo este último una especie reactiva de nitrógeno ^[104]. En el trabajo de Praveena y colaboradores (2013) se evaluó la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *P. amboinicus*, mostrando un efecto atrapador de radicales DPPH, resultando en un 96 % de actividad para la concentración de 180 ppm de extracto, asimismo, en el ensayo de atrapamiento de O_2^- se observó un 61 % de actividad a 250 ppm del extracto. Estos reportes guardan consistencia con los resultados del EAL, demostrando que la actividad antioxidante es común entre las especies del género. De la especie *P. amboinicus* se identificó el ácido rosmarínico y ácido cafeico a partir del extracto acuoso de sus hojas, adicionalmente,

se aisló del extracto crudo de los tallos otros metabolitos bioactivos, tales como, el ácido gálico, quercetina, rutina, y ácido p-cumárico, todos ellos conocidos por sus propiedades antioxidantes en un gran número de modelos experimentales ^[99].

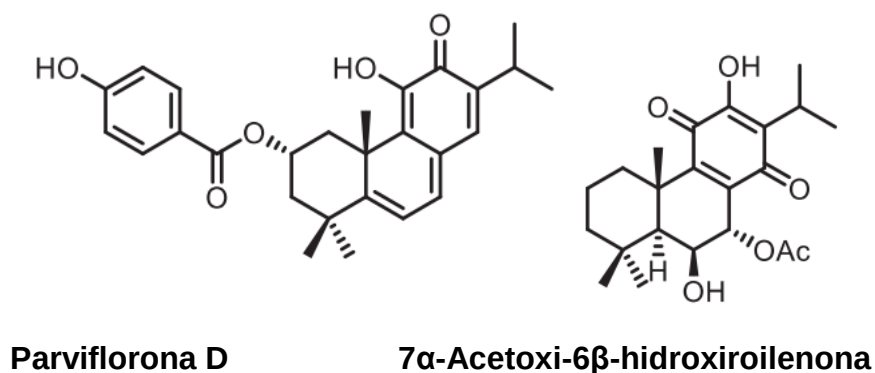
Como parte de una investigación de Pedro L. Falé y col (2009), se identificaron en el extracto acuoso de *Plectranthus barbatus* escutelareina 4'- metil éter 7-O-glucurónido, (16S)-coleon E y ácido rosmarínico. El ácido rosmarínico es un marcador quimiotaxonómico en los extractos polares de muchas plantas de la familia Lamiaceae, el cual ha sido encontrado en la mayoría de los extractos acuosos de las especies de *Plectranthus*. Posteriormente fue evaluada la actividad antioxidante del ácido rosmarínico a través de la reducción del DPPH, obteniendo para el ácido rosmarínico un $IC_{50} = 1,68 \mu\text{g/mL}$ ^[63]. Además de esto, tiene la capacidad de inhibir la fosfolipasa A₂ del veneno de serpiente (Ticli y col, 2005), e interviene en las vías de señalización relacionadas con la prevención del cáncer (Lee, Kim y Park, 2007; Lin y col, 2007).



escutelareina 4'- metil éter 7-O-glucurónido

En un estudio realizado por Rosa S y col (2015) fueron evaluados los diterpenos parviflorona D y 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroilenona, aislados de las especies de *Plectranthus ecklonii* y *Plectranthus grandidentatus* respectivamente, a través de los métodos de atrapamiento de DPPH y de H₂O₂, mostrando ambos compuestos capacidad antioxidante, siendo más muy baja para la 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroilenona por

DPPH, mientras que parviflorona D tiene una actividad significativa por este método pero menor a 5 % de actividad en el ensayo con peróxido de hidrógeno ^[99].



De acuerdo con los ensayos de estrés oxidativo realizados al EAL de las hojas secas de *P. neochilus*, se determinó la actividad antioxidante como un efecto de poder moderado a bajo, sugiriendo la participación de mecanismos que incluyen la captación de especies radicales libres de oxígeno y peróxidos; este resultado es sustentado por un ensayo preliminar con CCF usando como revelador DPPH, observando una ligera decoloración del reactivo mostrando manchas oscuras, lo cual es indicativo de compuestos con funcionalidades polifenólicas. Respecto a las referencias bibliográficas de los estudios de actividades antioxidantes en especies del género *Plectranthus*, se ha podido observar que dichas propiedades son provocadas en gran parte por la acción de metabolitos secundarios de tipo flavonoide como quercetina y rutina, y terpenoides con funcionalidades hidroxílicas, polifenólicas o quinónicas, como (16S)-coleon E y carvacrol ^[105].

En un análisis preliminar a través de espectroscopia de UV realizado al EAL de *P. neochilus*, se llevó a cabo un barrido de longitudes de onda (λ) de 200 nm a 800 nm, mostrando como resultado máximos de absorción a $\lambda_{\text{max}} \approx 266, 316$ nm (Figura 26).

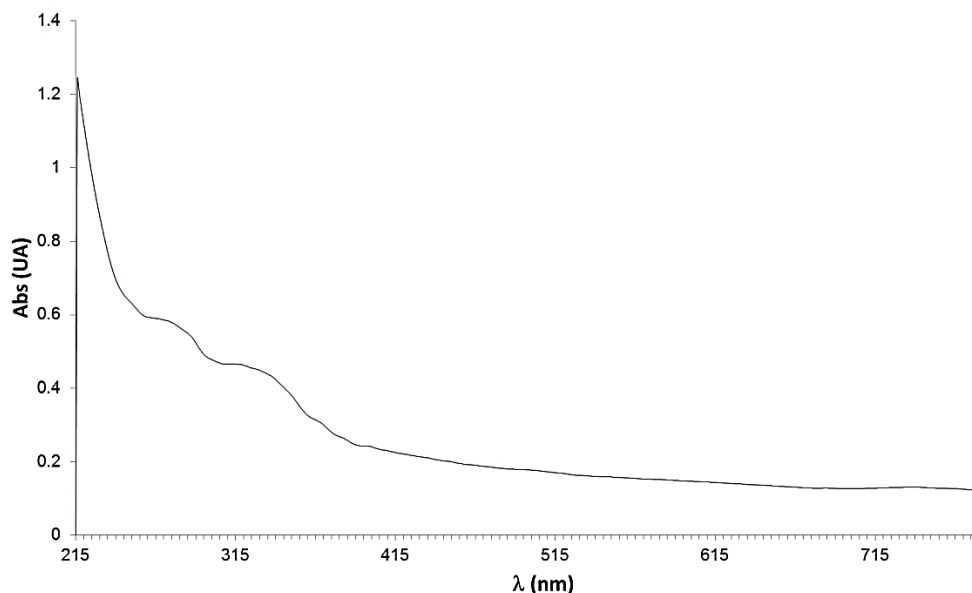


Figura 26. Absorbancia (Abs) en función de la longitud de onda (λ) en el rango UV del EAL de las hojas secas de *P. neochilus*.

De acuerdo a las referencias bibliográficas sobre estudios de terpenoides y flavonoides a través de técnicas espectroscópicas UV, se logró determinar que este tipo de compuestos poseen bandas de absorción a λ_{max} similares a las obtenidas experimentalmente, mostrando por ejemplo que los flavonoides pueden presentar dos bandas entre 300-380 nm y 240-280 nm ^[106], diterpenos del tipo abietanoide expresan absorbancias entre 240-280 nm ^[107], mientras que algunos mono y sesquiterpenos poseen λ_{max} próximos a 260 nm ^[108], pudiendo variar todas estas señales de acuerdo a la ubicación y grado de sustitución. Con los resultados obtenidos y las referencias bibliográficas sobre estudios farmacológicos de especies del género *Plectranthus*, puede inferirse que la actividad antioxidante mostrada por el EAL de *P. neochilus* se encuentra mediada parcialmente por la presencia de metabolitos del tipo diterpeno y flavonoide ya mencionados, o bien la presencia de ácido rosmarínico presentado como marcador quimiotaxonómico del género.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- Se aisló y caracterizó del extracto metanólico de las hojas secas de *P. neochilus* una mezcla de α y β - laminaribiosa.
- Se aislaron y caracterizaron del extracto de diclorometano de las hojas de *P. neochilus* dos ésteres de α y β -amirina, 1,3-dilinolenil-2-linoleil-glicerol y 3-acil-7-etoxi-barbatusina.
- La administración de altas dosis del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus* (5 g/Kg) no produjo muerte en los animales experimentales, por lo cual se puede considerar de uso seguro.
- Los efectos tóxicos observados fueron dependientes de la dosis y reversibles, obteniendo además una DT_{50} de 1.87 g/Kg (1.547 ± 2.191).
- Se determinó que el extracto acuoso de *P. neochilus* posee actividad antinociceptiva tanto a nivel central como periférico, demostrada por:
 - Método químico: con un 48.2 % ($p > 0.0001$) y 20.5 % ($p > 0.001$) de actividad antinociceptiva a las 1/2 y 1/4 DT_{50} , respectivamente.
 - Método térmico: con un incremento significativo del umbral del dolor ($p > 0.001$) a los 60 minutos.
 - Prueba de formalina: corroboró mecanismos periférico y central, con mayor efecto en la fase inflamatoria a las dosis 1/2 y 1/4 DT_{50} (72.0 % y 43.7 %, respectivamente).

- Se demostró leve citotoxicidad sobre una línea celular humana neoplásica de neuroblastoma SH-SY5Y, evaluando a altas concentraciones (400 ppm) del extracto acuoso de las hojas secas de *P. neochilus*.
- Se determinó el porcentaje de atrapamiento de anión superóxido y peróxido de hidrógeno del extracto acuoso a través ensayos de estrés oxidativo, obteniendo un porcentaje de atrapamiento de 19,67 y 17,10%, respectivamente.

Recomendaciones

- Continuar con el estudio fitoquímico de la especie *P. neochilus*, aislando y caracterizando metabolitos secundarios en contribución a las pocas investigaciones realizadas en Venezuela.
- Llevar a cabo los ensayos de toxicidad subcrónica y actividad antiinflamatoria a través de modelos experimentales.
- Realizar estudios biodirigidos de metabolitos aislados de esta especie, con el fin de identificar el o los compuestos que presenten las propiedades farmacológicas expuestas en este trabajo.
- Debido a los casos de intoxicación en infantes por el uso de infusiones preparadas con las hojas de *P. ornatus*, especie que presenta una gran similitud morfológica con *Plectranthus neochilus* conocida como “Acetaminofen”, se propone realizar el análisis por CG-EM soportado por índices de Kovats del extracto acuoso de las hojas de *P. neochilus*, con el fin de determinar la posible presencia de ascaridol.
- Realizar ensayos de citotoxicidad haciendo uso de un mayor número de líneas celulares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Rodríguez E y John J. “Uso y manejo tradicional de plantas medicinales y mágicas en el valle de sibundoy, alto putumayo, y su relación con procesos locales de construcción ambiental”. Revista – Academia Colombiana de Ciencias exactas. 2010; 34, p 310-311.
- [2] Marcano D. y Hasegawa M. “Fitoquímica Orgánica”. Universidad Central de Venezuela. Colección Estudios. 2002. 2da edición. (30-32, 137-139, 237-245).
- [3] Mohammad B, Dilip K, Nigel P, Martin D y Barry C. “Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010; 58 (19), p 10576–10581. España.
- [4] Irene Carolina Fedón y Carmen Alicia Chacón-Díaz. <http://botanicaenvenezuela.blogspot.com/2015/03/plantas-muy-utiles-para-nosotros.html>. Fecha de Consulta: 19/06/2015.
- [5] Araújo S, Alves L, Oliveira G, Siqueira E, Ribeiro R, Ferreira J, Lima L. “Volatile compounds of Lamiaceae exhibit a synergistic antibacterial activity with streptomycin”. Journal Microbiology. 2014; 45 (4), p 1341-1342. Brazil.
- [6] R, Ramasubramania Raja. “Medicinally Potencial Plants of Labiatae (Lamiaceae) Family : An Overview”. Journal of Medicinal Plant. 2012: 6, p 203-213. India.
- [7] Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). “Guía de Consultas Botánica II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura”. ASTERIDAE-Gentianales-Loganiaceae. (547)

- [8] Àrea De Botànica, Departament De Biologia, Universitat De Les Illes Balears. Herbario Virtual Del Mediterrani Occidental. <http://herbarivirtual.uib.es/cat-med/estatic/quees.html>. Fecha de consulta: 11/05/2015
- [9] Mauricio B, Andrés R, Mercedes S. Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares. Facultad de Ciencias integra el Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales (IECA). 2015.
- [10] Pérez R, Canavaciolo V, Delange D y Rodríguez E. "Lamiaceae: una revisión sobre sus efectos neurofarmacológicos y su presencia en Cuba". Revista CENIC, Ciencias Biológicas. 2013; 44. p 1123-1135. La Habana.
- [11] Velasquez D, Arrijoja De E, Tillett S. "Usos populares de Lamiaceae en Venezuela". Acta Botánica de Venezuela. Universidad Simón Bolívar y Universidad Central de Venezuela. 1995. p 2-5. Venezuela.
- [12] Asha.D, Mathew L y Rishad K. "Evaluation of HPTLC Fingerprints of Flavonoids and Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants of Lamiaceae Family". International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 2015; 7(2), p 240-245. India.
- [13] Fernández J y Díaz O. "Las labiadas (familia Labiatae)". Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia. 2006. p 388-391. Bogotá.
- [14] Dellar J, Cole T M y Waterman P. "Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*". Phytochemistry. 1995; 41(3):735-800. p 735. U.K.
- [15] Matkowski A y Piotrowska M. "Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae". Fitoterapia. 2006 Jul; 77(5), p 346-53. Polonia.

- [16] Maffei M. “Discriminant Analysis of Leaf Wax Alkanes in the Lamiaceae and Four Other Plant Families”. *Biochem. Syst. Ecol.* 1994; 22, p 711–728. Italia.
- [17] Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N y Anackov G. “Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils”. *J Agric Food Chem.* 2006 Mar 8;54(5), p 1822-1827. Serbia.
- [18] Silva Viana J. “Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae)”. [Tesis de Maestría]. Brasil, Rio de Janeiro. Universidade Federal Dos Vales Do Jequitinhonha E Mucuri. Química. 2011.
- [19] Rice L., Brits G, Potgieter C, Van Staden J. “*Plectranthus*: A plant for the future?”. University of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg”. *South African Journal of Botanic.* 2011. 77, p 947– 959. South Africa.
- [20] Rijo P, Faustino C y Simões F. “Antimicrobial natural products from *Plectranthus* plants”. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* 2013. p 922-926. Portugal.
- [21] “Plantas de jardín – *Plectranthus*”. <http://www.elicriso.it/es/privacidad/> Fecha de consulta: 04/06/2015.
- [22] Shobha W, Bipin C, Uma P y Mukesh J. “The Genus *Plectranthus* in India and Its Chemistry”. *Chemistry & Biodiversity.* 2011; 8 (2). p 245-252. India y South Africa.
- [23] Lukhoba C, Simmonds M, Paton A. “*Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses”. *South African Journal of Botany.* 2011. 77; p 947–959. UK.

- [24] Simoes M, Rijo P Duarte, A, Barbosa D, Delgado J y Rodriguez B. "Two new diterpenoids from *Plectranthus* species". Universidade de Lisboa. 222. Portugal.
- [25] Rajesh K Chemical. "Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus mollis* (Lamiaceae) from Western Ghats region, Karnataka, India". Rev. biol. Trop. 2014; 62 (2).
- [26] Correia R, Azevedo R, Oliveira Souza L. "Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.)". Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2014; 35 (1). p 113-118.
- [27] Padalia R y Verma R. "Comparative study of volatile oil compositions of two *Plectranthus* species from northern India". Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants (CIMAP). Pharmacology. 2010. 45 (8). p 1728-1729. India.
- [28] Nuñez Y, Capó J, Domínguez C, Castillo R y León R. "Efecto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. tabletas sobre la anafilaxia pasiva cutánea, transmisión histaminérgica y adrenérgica". Rev Cubana Plant Med 2006;11 (3-4). Cuba
- [29] Staples G y Kristiansen M. "Ethnic Culinary Herbs: A Guide to Identification and Cultivation in Hawai'i". University of Hawaii Press: Honolulu, HI, USA, p 88. 1999.
- [30] Costa, M.C.C.D. "Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003". Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu. 2006; 8 (2). p.81-88. Brasil.

- [31] Urs Eggli (2002). Illustrated Handbook of Succulent Plants: Dicotyledons. Springer. 1era edición. 2da impresión. p (291,293, 298, 299)
- [32] Jaime López Cruz (2013). *Plectranthus verticillatus* (L.F.) Druce (Planta del dinero). http://www.botanical-online.com/plantadeldinero_cuidados.htm. Consulta: 11/05/2016.
- [33] Ascensao L, Figueiredo C y Schripsema J. “*Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity”. International Journal of Plant Sciences. 1998; 159 (1). p 31-38.
- [34] Rojas L., Cordero De R., Carmona Y, Usubillaga J. “Componentes volátiles de *Plectranthus coleoides* Benth. (Lamiaceae)”. Rev Fac Farm. 2012; 54 (1). p 17-20. Venezuela.
- [35] Kubínova R, Porízková R, Navrátilová A, Hanáková Z, Cízek A y Valentová M. “Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth”. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2014; 29 (5). p 749-752.
- [36] Resumen sobre “incienso”. 2006: http://plantas.facilisimo.com/foros/sala-de-estar/resumen-sobre-el-incienso_256652.html. Fecha de consulta: 20/06/2015.
- [37] Ascensao L., Mota L. y Castro M. “Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, Distribution and Histochemistry”. Annals of Botany. 1999; 84. p 437–447. Lisboa.
- [38] Barbosa M, Arruda R. “Propagation of *Plectranthus neochilus* schlechter. Journal of Global Biosciences. 2014; 3 (2). p 494-498.

- [39] Bermúdez A, Oliveira M, Velázquez D. “La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales”. INCI. 2005; 30 (8). Caracas.
- [40] Albuquerque U. P. “Introducción a la etnobotánica”. Rio de Janeiro: Interciencia, 2005. 2. Pag 93.
- [41] Caixeta S, Magalhanes L, Melo N y Wakabayashi K. “Chemical Composition and in vitro Schistosomicidal Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* Grown in Southeast Brazil”. Chemistry & Biodiversity. 2011; 8 (11). p 2150-2151.
- [42] Mota L, Figueiredo C, Barroso J, Graca M, Faleiro L y Ascensao L. “Volatile-Oils Composition, and Bioactivity of the Essential Oils of *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus*, and *P. ornatus* Grown in Portugal”. Chemistry & Biodiversity. 2014; 11 (5). p 719-732.
- [43] O. A. Lawal, A. H. Hutchings, O. Oyedepi. “Chemical Composition of the Leaf Oil of *Plectranthus neochilus* Schltr”. Journal of Essential Oil Research. 2011; 22 (6). p 547. Suráfrica.
- [44] Rosa Ferreira L. “Produção de biomassa, óleo essencial e características fisiológicas e anatômicas foliares de *Plectranthus neochilus* Schlechter em função da adubação orgânica, malhas coloridas e idade das plantas”. [Tesis Doctoral]. Brasil, Minas Gerais. Universidade Federal de Lavras, agronomia. 2008.

- [45] Conde B, Salazar I. "Ethnopharmacology in the Vicinity of the Botanical Garden of the Federal University of Juiz de Fora, Brazil". *Ethnobotany Research & Applications*. 2014; 12. p 091-111.
- [46] York T, Vuuren van SF. "Plants used for treating respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa". *J Ethnopharmacol*. 2011; 135 (3). p 696-710.
- [47] Crevelin E, Caixeta S. "Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* against Cariogenic Bacteria". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 2015 (6).
- [48] Abdel-Mogib M, Albar H.A y Batterjee S.M. "Chemistry of the Genus *Plectranthus*". *Molecules*. 2002; 7, p 271-301.
- [49] García A, Pérez-Urria E. "Metabolismo secundario de plantas". *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2009; 2 (3). p 119-145. Madrid.
- [50] Grayer R, Eckert M, Lever A, Veitch N, Kite G, Paton. "Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*". *Biochemical Systematics and Ecology*. 2010; 38 (3)., p 335–341.
- [51] Mislankar G, Valdes L. "*Coleus barbatus* (*C. forskohlii*) (Lamiaceae) and the Potential New Drug Forskolin (Coleonol)". *Economic Botany*. October 1987; 41. p 474-483.
- [52] Bezerra De Lima L . "Contribuição para a Padronização Química de Espécies do Gênero *Plectranthus*: Derivatização e Validação de Métodos Analíticos para a

Quantificação de Marcadores Químicos”. [Tesis doctoral]. Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. 2013.

[53] Lakshmanan A, Manikandan S y Panneerselvam R. "*Plectranthus forskohlii* (Wild) Briq. (Syn:*Coleus forskohlii*) – A Compendium on its Botany and Medicinal uses". International Journal of Research in Plant Science. 2013; 3 (4). p 72-80.

[54] Sasikala T, Prabakaran R y Sathiyapriya S. "Evaluation of antimicrobial activities on *Plectranthus Barbatus* L. tuber". International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine. 2014; 4 (5). p 1596-1601.

[55] Araújo S, Alves L, Pinto M., Oliveira G, Siqueira E, Ribeiro R, Ferreira J, Lima L. "Volatile compounds of Lamiaceae exhibit a synergistic antibacterial activity with streptomycin". Brazilian Journal of Microbiology. 2014; 45 (4). p 1341–1347.

[56] Menéndez R, Pavón V. "*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng". Rev Cubana Plant Med.1999; 3(3). p 110-115.

[57] Schwarz H.D. "Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum minutiflorum* O". J. Sc Food and Agric. 2007; 87. p 255-259.

[58] Preeja G, Pillai P, Gayatri A, Gaurav D, Vidhi B. "Pharmacognostical standardization and toxicity profile of the methanolic leaf extract of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng". Journal of Applied Pharmaceutical Science; 2011. 01 (02). p 75-81.

[59] Roshan P, Naveen M, Manjul P, Gulzar A, Anita S, Sudarshan S." *Plectranthus Amboinicus* (Lour) Spreng: An Overview". The Pharma Research. 2010; 4. p 01-15.

[60] De Magalhães Bandeira J. “Análise da diversidade genética entre genótipos do gênero *Plectranthus*”. [Tesis de Maestría]. Universidade Federal de Pelotas. Brasil. 2007.

[61] Asiimwe S, Borg- Karlsson A, Muhammad A, Kamatenesi M, Namutebi A. “Chemical composition and Toxicological evaluation of the aqueous leaf extracts of *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng”. International Journal of Pharmaceutical Science Invention. 2014; 3 (2). p 19-27.

[62] Evaluación del comportamiento del ácido rosmarínico, encapsulado en liposomas y caracterizado para optimizar su uso típico en la industria cosmética. 2013. <http://es.slideshare.net/nasoalto/anteproyecto-quinto-intento> Fecha de consulta 11/05/2016.

[63] Falé P, Borges C, Madeira P, Ascensão L, Araújo M, Florêncio M, Serralheiro M. “Rosmarinic acid, scutellarein 4-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”)”. Food Chemistry. 2009; 114 (3) 798–805.

[64] Rijo P, Marques C, M. Simoes F, Duarte A, Rodriguez B. “Neoclerodane and Labdane Diterpenoids from *Plectranthus ornatus*”. Journal Natural. 2002; 65 (10). p 1387–1390.

[65] Rijo P, Marques C, Simoes F, Maria L, Rodriguez B. “Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*”. Biochemical Systematics and Ecology. 2007; 35 (4). p 215-221.

- [66] Rijo P, Fernandes A , Simões F, Pinheiro L. "Evaluation of diterpenoids from *P. ornatus* as potential COX-1 inhibitors". Biomedical and Biopharmaceutical Research. 2012; 1 (9). p 111-118.
- [67] Faria D, Barros A, Alves N, Miranda G; Viana A, Silva R, Oliveira P. "Isolamento do diterpeno 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforscolina das partes aéreas de *Plectranthus neochilus*". XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. (2-3). 2014.
- [68] Hinojosa J, Gutiérrez M y col. Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. Biotecnia. 2013; 15 (2). p 53-60.
- [69] Thin Layer Chromatography, 2nd edition, E. Stahl, ed, Springer-Verlag, NY, 1969
- [70] TLC Reagents & Detection Methods Physical & Chemical Detection Methods: Fundamentals, Vol 1a, H. Jork, W. Funk, W. Fishcer, & H. Wimmer, Wiley, NY, 1990
- [71] Practice of Thin Layer Chromatography, 3rd edition, J.C. Touchstone, Wiley-Interscience, NY, 1992
- [72] Irwin, S. Drug screening and evaluative procedures. Science. 1962;136. p 123-128.

[73] Lichtfield J y Wilcoxon J. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 1949; 96. p 99-113.

[74] Lima G, Quintans J, Thomazzi S, Almeida E, Melo M, Serafi M, Cavalcanti S, Gelain D, Santos J, Blank A y col. Evaluation of Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Activities of a Heterofucan from *Dictyota menstrualis*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2012; 22. p 443–450.

[75] Davies O, Raventos J, Walpole L. Toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de hojas de *Vismia baccifera* L. var. *dealbata* (Guttiferae) en animales de experimentación. *Brit. J. Pharmacol.* 1946; 1. p 255.

[76] Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 1987. 30. p 103-114.

[77] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65. p 55-63.

[78] Long C, Bielski B. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species Superoxide anion and hypochlorous acid. *J. Phys. Chem.* 1980; 84. p 555-557.

- [79] Ruch R, Cheng S, Klaunig J. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 198; 10. p 1003-1008.
- [80] Roslund M, Tahtinen P, Niemitz M, Sjöholm R. "Complete assignments of the ^1H and ^{13}C chemical shifts and JH,H coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides". *Carbohydrate Research*. 2008; 343. p 101–112.
- [81] Okoye N, Lotanna D, Nnaemeka H, Sylvester C, Basden F. "β-Amyrin and α-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity". *Pharm Biol*, Early Online: 2014; 1–9.
- [82] Nasution R, Nur H. "β-Amyrin acetate of ethyl acetate extract of the bark plant *artocarpus camansi* and its antidiabetic activity". *Der Pharma Chemica*. 2015; 7(6). p 71-78.
- [83] Rasoanaivo L, Wadouachi A, Andriamampianina T, Andriamalala S, Razafindrakoto E, Raharisololalao A, Randimbivololona F. "Triterpenes and steroids from the stem bark of *Gambeya boiviniana* Pierre". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014; 3 (1). p 68-72.
- [84] Miranda R, Silva G, Duarte I, Vieira F. "Triterpene Esters Isolated from Leaves of *Maytenus salicifolia* Reissek". *Helvetica Chimica Acta*,. Apr. 2007; 90 (4). p 652-658.
- [85] Carneiro P, Reda S, Carneiro E. " ^1H NMR Characterization of Seed Oils from Rangpur Lime (*Citrus limonia*) and "Sicilian" Lemon (*Citrus limon*)". *Ann. Magn. Reson*. 2005; 4 (3). p 64-68.
- [85] Marshall G, Lander J. "The characterisation of alkyd paint binders using ^{13}C -NMR spectroscopy". *Eur. Polym. J*. 1985; 21 (11). p 949-958.

- [86] Banfi, D.; Patiny, L. www.nmrdb.org: Resurrecting and processing NMR spectra online *Chimia*, 2008, 62(4), 280-281.
- [87] Muñoz C, Nadezdha E, Aragón D, Ospina L. "Efecto antinociceptivo de *Critoniella acuminata*, *Physalis peruviana* y *Salvia rubescens*". *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2009; 38 (1). p 31-41.
- [88] Farías M. "Determinación de los mecanismos involucrados en la actividad analgésica de las hojas de *Aristolelia chilensis* en un modelo de dolor térmico agudo". [tesis]. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2009
- [89] Hernández A, Barreiro M, Rodríguez Z. "Validación preclínica de actividad analgésica periférica y central de la decocción de hojas frescas de *Persea americana* Mill. (aguacate) y *Musa paradisiaca* L. (plátano)". *Rev Cubana Plant Med.* 2014; 19 (3). Ciudad de la Habana.
- [90] Álamo C. "Guía farmacológica de analgésicos, guías clínicas de la sociedad española del dolor". Ediciones Aran. 1era edición. España. 2005.
- [91] Pedro F. "Farmacología básica y clínica". Editorial medica panamericana. 2008. 18va edición.
- [92] Tripathi K.D.. "Farmacología en odontología, fundamentos". Editorial medica panamericana. Nueva Delhi, India. 2008.
- [93] Toro V. "Evaluación de la actividad analgésica aguda y crónica de *Phytolacca dioica*". [Tesis]. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2009.
- [94] González-Dard J. "Modelos animales de dolor y aspectos éticos de la experimentación animal". *Rev. Soc. Esp. Dolor.* 2000; 7. p 313-318.

- [95] Clemente M, Llorca D. "Fisiología y fisiopatología del dolor (neuroanatomía, neurofisiología)". Master en el tratamiento del dolor. Módulo 2. Universidad de Salamanca. España. 2012.
- [96] Mendoza N. "Farmacología médica". Editorial médica panamericana. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina. 2008.
- [97] Arias J. "Fisiopatología quirúrgica; traumatismos, infecciones, tumores". Tébar. Madrid. 1999.
- [98] Borges G , Simeoni L, Silveira D. "Cytotoxic effect of *Plectranthus neochilus* extracts in HNSCC cell lines". African journal of Pharmacy and Pharmacology. March 2016; 10 (10). p 157-163. Brazil.
- [99] Bhatt P, Stanley G, Singh P, Chakravarthy M. "Chemical Composition and Nutraceutical Potential of Indian Borage (*Plectranthus amboinicus*) Stem Extract". Journal of Chemistry. 2013; 2013 (7).
- [100] Matias D, Pereira F, Nicolai M, Roberto A, Saraiva N, Fernandes A, Simões M, Lanza A, Reis C, Rijo P. "Abietane diterpenes from *Plectranthus madagascariensis*: A cytotoxicity screening". Planta Med. 2014; 80.152.
- [101] Vargas F, Rivas C, Nursamaa A, Zoltan T. "Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento". Avances en Química. 2007; 2 (2). p 3-15.
- [102] Ramu G, Dhanabal S. "Antioxidant Studies on Ethanol Extracts from Two Selected Genera of Indian Lamiaceae". Indian J Pharm Sci. 2015; 77 (6). p 780–782.

- [103] Ganapathy R, Mohan S, Kameshwaran S, Dhanapal C. “*In vitro* anticancer and *in vitro* antioxidant potency of roots of hydro alcoholic extract of *Plectranthus vettiveroide*”. International Journal of Phytopharmacology. 2015; 6 (4). p 246-254.
- [104] Prasenjit B, Hullatti K, Kumar V. “Anthelmintic and antioxidant activity of alcoholic extracts of different parts of *Coleus Amboinicus* Lour”. IJRAP. 2011; 2 (1). p 181-185.
- [105] Kurt Hostettmann. “Current organic chemistry, natural product chemistry”. Bentham science publisher. 1 (4) 1997.
- [106] Sing de Ugaz O. “Colorantes naturales”. Potificia Universidad Católica del Perú. 1era edición. 1997
- [107] Kersten P, Kopper B, Raffa K, Illman B. “Rapid Analysis of Abietanes in Conifers”. J Chem Ecol. 2006; 32. p 2679–2685.
- [108] Varo P, Heinz D. “Volatile Components of Cumin Seed Oil”. J. Agr. Food Chem. 1970; 18 (2). p 234-238.