

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



Estudio fitoquímico de los compuestos mayoritarios de las hojas frescas de la especie *Plectranthus neochilus* Schlechter y evaluación de su toxicidad aguda y actividad analgésica.

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. Caro Ramírez Janetsi Yamilet, para optar al título de Licenciado en Química.

Caracas, Mayo del 2016

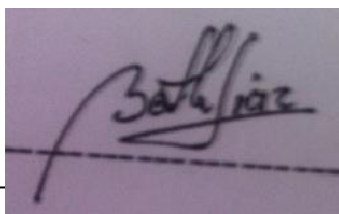
Yo, Profesora Díaz Beth, Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora Rodríguez María, Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

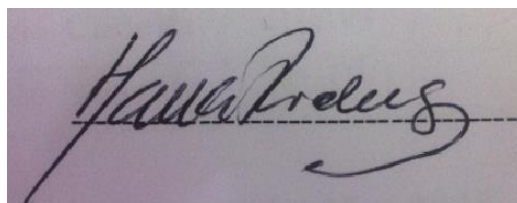
Estudio fitoquímico de los compuestos mayoritarios de las hojas frescas de la especie *Plectranthus neochilus* Schlechter y evaluación de su toxicidad aguda y actividad analgésica.

Que presenta la Br. Janetsi Caro, para aspirar al Título de Licenciado en Química, se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante el año 2015 y 2016, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Mayo de 2016

A handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is cursive and appears to read 'Beth Díaz'.

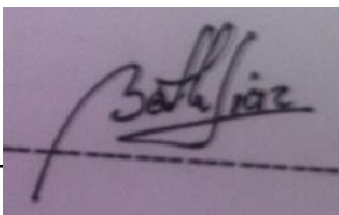
Dra. Díaz Beth

A handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is cursive and appears to read 'María Rodríguez'.

Dra. Rodríguez María

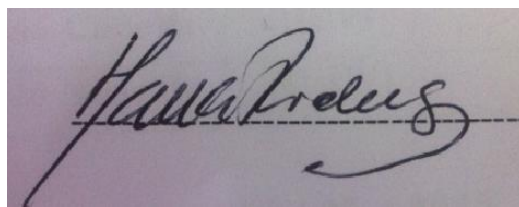
Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo especial de grado titulado: “**Estudio fitoquímico de los compuestos mayoritarios de las hojas frescas de la especie *Plectranthus neochilus* Schlechter y evaluación de su toxicidad aguda y actividad analgésica**”, presentado por Br. Janetsi Yamilet Caro Ramírez, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Caracas, Mayo de 2016.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Beth Díaz', written over a horizontal dashed line.

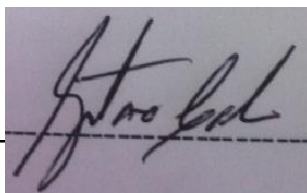
Dra. Beth Díaz

(Tutor)

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'María Rodríguez', written over a horizontal dashed line.

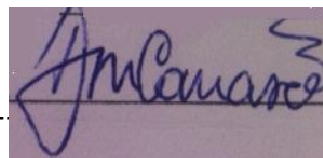
Dra. María Rodríguez

(Tutor)

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Gustavo Cabrera', written over a horizontal dashed line.

Dr. Gustavo Cabrera

(Jurado)

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Diana Carrasco', written over a horizontal dashed line.

Dra. Diana Carrasco

(Jurado)

Dedicado con mucho amor

A mi madre Noris y mis hermanos

A mi compañero de vida Elías

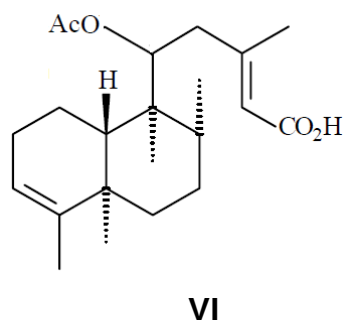
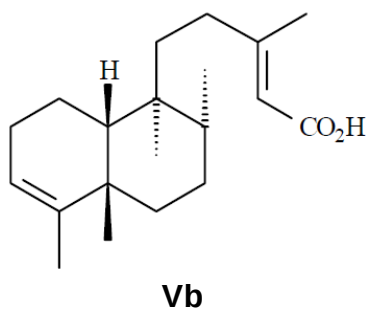
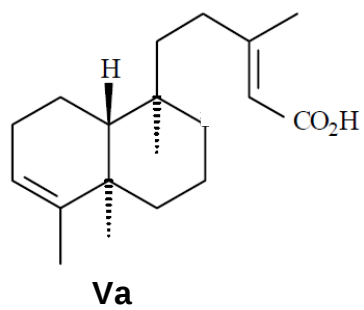
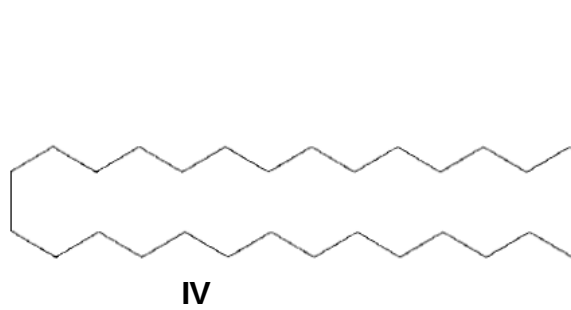
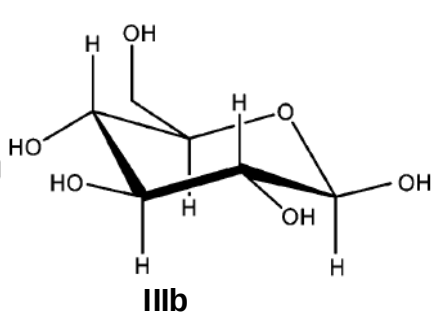
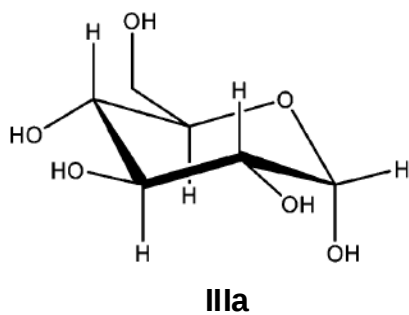
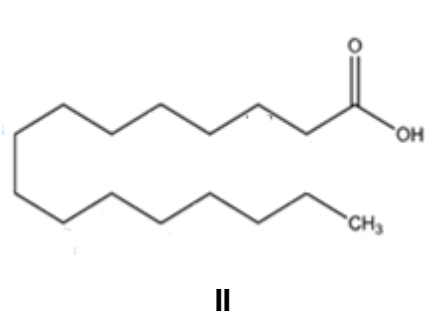
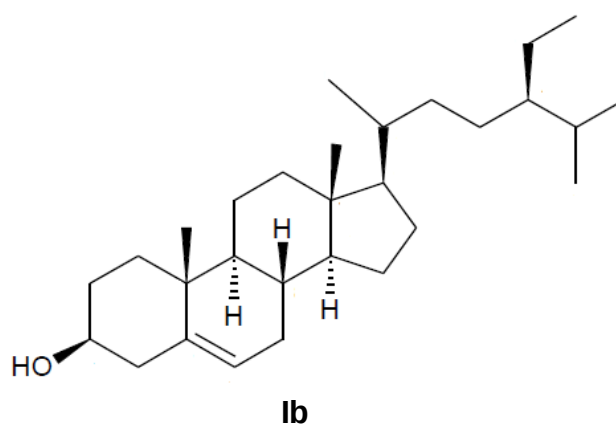
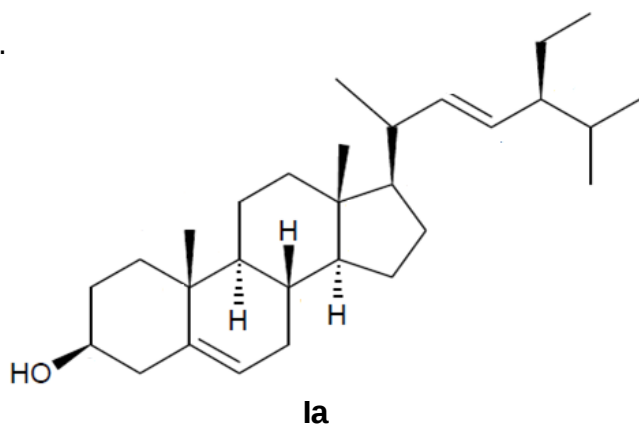
A mi tutora Dra. Beth Díaz

Janetsi

RESUMEN

Se realizó el estudio fitoquímico de los extractos orgánicos de las hojas frescas de la especie *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae), colectada en el jardín medicinal de la Facultad de Farmacia UCV, Caracas - Venezuela. Se obtuvieron los extractos orgánicos de hexano, diclorometano y metanol a partir de una extracción por Soxhlet. Del extracto metanólico fue aislada una mezcla de triterpenos conocidos como estigmasterol (**Ia**) y β -sitosterol (**Ib**), además de ácido hexadecanoico (**II**) y la mezcla de isómeros de la glucosa: α -D-glucosapiranososa (**IIIa**) y β -D-glucosapiranososa (**IIIb**). Del extracto hexanoico se aisló un alcano saturado identificado como nonacosano (**IV**), y los diterpenos de tipo clerodano: ácido 8-nor-(5R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico (**Va**) y ácido (5R,8R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico (**Vb**) y el ácido 11R-acetoxikolavénico (**VI**). Estos compuestos, a excepción de la mezcla estigmasterol y β -sitosterol, se reportan por primera vez para esta especie y sus estructuras fueron caracterizadas por técnicas espectroscópicas de RMN en 1D (^1H , ^{13}C), DEPT, IR y espectrometría de masas.

Se evaluó la toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *P. neochilus* en roedores. No se observó letalidad, el efecto tóxico evaluado fue piloerección con una $\text{DT}_{50} = 2,14 \text{ g/Kg}$ (1,747 - 2,791). La actividad analgésica fue determinada por 3 métodos: método químico, método térmico y método de la formalina, donde se observó una disminución significativa del estímulo doloroso en todos los métodos empleados. Otros estudios realizados al extracto acuoso de *P. neochilus* fueron la evaluación de su poder antioxidante de acuerdo a su actividad atrapadora del ión superóxido y peróxido de hidrógeno, y la evaluación de la citotoxicidad en células neuroblastoma humanas (SH-SY5Y). A una concentración del extracto de 400 ppm, no se encontró actividad antioxidante significativa por ninguno de los métodos y se observó una moderada citotoxicidad del extracto.



INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Familia Lamiaceae.....	3
1.2. Género <i>Plectranthus</i>	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Principales compuestos químicos aislados del género <i>Plectranthus</i>	6
2.1.1. Terpenos.....	6
2.1.1.1. Diterpenos abietanos aislados de especies de <i>Plectranthus</i>	8
a. Diterpenoides abietanos tipo roileanonas.	8
b. Diterpenoides abietanos tipo acil-hidroquinona	9
c. Diterpenoides abietanos tipo espirocoleonas.	10
d. Diterpenoides abietanoides tipo quinonametidos.	11
e. Dímeros abietanoides aislados de especies <i>Plectranthus</i>	11
f. Diterpenoides abietanoides tipo epoxiabietanoides.....	12
2.1.1.2. Diterpenoides de tipo kaurano aislados de <i>Plectranthus</i>	13
2.1.1.3. Diterpenoides de tipo clerodano aislados de <i>Plectranthus</i>	13
2.1.1.4. Diterpenoides de tipo labdano aislados de <i>Plectranthus</i>	14
2.1.2. Flavonoides.....	16
2.1.3. Compuestos fenólicos	17
2.1.4. Aceites esenciales.....	19
2.2. Especies del género <i>Plectranthus</i> encontradas en Venezuela.	20
2.2.1. <i>Plectranthus amboinicus</i> Spreng.....	20
2.2.2. <i>Plectranthus barbatus</i> Andrews	24
2.1.1. <i>Plectranthus ornatus</i> Codd.....	29
2.2.3. <i>Plectranthus madagascariensis</i> Bentham.....	32
2.2.4. <i>Plectranthus verticillatus</i> Druce.....	32
2.2.5. <i>Plectranthus scutellarioides</i> Codd.....	33
2.2. Especie <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.....	34

2.2.1.	Clasificación de la especie <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.....	34
2.2.2.	Compuestos aislados de la especie <i>Plectranthus neochilus</i>	35
3.	JUSTIFICACIÓN	39
4.	OBJETIVOS.....	40
4.1.	Objetivo General	40
4.2.	Objetivos Específicos.....	40
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	42
5.1.	Instrumentos	42
5.2.	Materiales.....	42
5.2.1.	Solventes	42
5.2.2.	Solventes para análisis de RMN	43
5.3.	Material para cromatografía.....	43
5.3.1.	Reveladores.....	43
5.4.	Metodología experimental en el estudio fitoquímico de las hojas frescas de <i>Plectranthus neochilus</i>	43
5.5.	Colecta del material vegetal	44
5.6.	Preparación de la muestra.....	44
5.7.	Obtención del extracto acuoso liofilizado de <i>Plectranthus neochilus</i>	44
5.8.	Obtención de los extractos orgánicos de <i>Plectranthus neochilus</i>	45
5.9.	Fraccionamientos de los extractos de <i>Plectranthus neochilus</i>	47
5.9.1.	Fraccionamiento del extracto metanólico.....	47
5.9.2.	Fraccionamiento del extracto hexanoico.....	55
5.10.	Estudios farmacológicos del extracto acuoso liofilizado de las hojas frescas de <i>Plectranthus neochilus</i>	59
5.10.1.	Determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso.	59
5.10.2.	Determinación de la actividad analgesica del extracto acuoso.	60
5.10.2.1.	Método químico: contorciones abdominales inducida por ácido acético.	60
5.10.2.2.	Método térmico: Modelo del retiro de la cola	61
5.10.2.3.	Prueba de la formalina.....	62

5.10.3.	Actividad citotóxica	62
5.10.4.	Actividad antioxidante	64
5.10.4.1.	Actividad atrapadora de anión superóxido	64
5.10.4.2.	Actividad atrapadora de peróxido de hidrógeno	65
6.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	66
6.1.	Sección Fitoquímica.....	66
6.1.1.	Compuesto I. Mezcla Estigmasterol y β -sitosterol.....	66
6.1.2.	Compuesto II. Ácido hexadecanoico.....	75
6.1.3.	Compuesto III. Mezcla α -glucosapiranososa y β -glucosapiranososa.....	82
6.1.4.	Compuesto IV. Nonacosano	87
6.1.5.	Compuesto V. Mezcla de diterpenos clerodanos ácido 8-nor-(5R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico y ácido (5S,8R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico).....	89
6.1.6.	Compuesto VI. Ácido 11 <i>R</i> *-acetoxi-kolavenico.	97
6.2.	Sección farmacológica.....	105
6.2.1.	Determinación de la dosis letal media	105
6.2.2.	Evaluación de la actividad antinociceptiva.....	108
6.2.2.1.	Método químico: Contracciones abdominales inducidas por ácido acético.....	109
6.2.2.2.	Método térmico: modelo del retiro de la cola	111
6.2.2.3.	Prueba de formalina.....	113
6.2.3.	Actividad citotóxica.	116
6.2.4.	Actividad antioxidante.....	118
6.2.4.1.	Atrapamiento de ión superóxido.	119
6.2.4.2.	Atrapamiento de peróxido de hidrogeno	120
7.	CONCLUSIONES.....	123
8.	RECOMENDACIONES	125
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	126

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Masa y porcentaje de los extractos orgánicos obtenidos a partir de las hojas frescas de la especie <i>P. neochilus</i>	46
Tabla 2. Solventes utilizados en el fraccionamiento del extracto metanólico	48
Tabla 3. Masa y porcentaje de las fracciones agrupadas en el fraccionamiento del extracto de Metanol.	49
Tabla 4. Solventes utilizados en el fraccionamiento del extracto hexanoico.....	56
Tabla 5. Masa y porcentaje de las fracciones agrupadas del extracto de Hexano.	57
Tabla 6. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^1H de los átomos de H presentes en el compuesto I.....	70
Tabla 7. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto I.....	74
Tabla 8. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^1H de los átomos de H presentes en el Compuesto II.	78
Tabla 9. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto II.	79
Tabla 10. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^1H de los átomos de H presentes en el compuesto III.....	84
Tabla 11. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto III.	87

Tabla 12. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto Va	95
Tabla 13. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto Vb	96
Tabla 14. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^1H de los átomos de H presentes en el compuesto VI.	103
Tabla 15. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto VI.	104
Tabla 16. Porcentaje de animales que presentan el efecto piloerección a las diferentes dosis del extracto acuoso de <i>P. neochilus</i> en ratones CD1.	107
Tabla 17. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de las hojas frescas de <i>P. neochilus</i> por el método químico.....	109
Tabla 18. Efecto antinociceptivo del EAL de las hojas frescas de <i>P. neochilus</i> por el método térmico.	112
Tabla 19. Efecto antinociceptivo del EAL de las hojas frescas de <i>P. neochilus</i> en la prueba de la formalina	114
Tabla 20. Porcentaje de efecto citotóxico del extracto acuoso liofilizado.	117
Tabla 21. Porcentaje de atrapamiento del ion superóxido del extracto acuoso liofilizado de <i>P. neochilus</i>	119

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proceso de extracción de los extractos orgánicos de las hojas de <i>Plectranthus neochilus</i>	47
Esquema 2. Fraccionamiento del extracto metanólico.	50
Esquema 3. Obtención del compuesto I.	52
Esquema 4. Obtención del compuesto II.	53
Esquema 5. Obtención del compuesto III.	55
Esquema 6. Fraccionamiento del extracto de hexano	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución mundial de la familia Lamiaceae	4
Figura 2. <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr	34
Figura 3. Rearreglo McLafferty del ácido hexadenoico.	81
Figura 4. Patrón de fraccionamiento del ácido palmítico.....	81
Figura 5. Porcentaje de animales que presentaron el efecto tóxico “piloerección” en función de la dosis administrada del EAL y del tiempo de observación.	105
Figura 6. Porcentaje de animales con el efecto tóxico (piloerección) en función del log de la dosis.	107
Figura 7. Evaluación del efecto antinociceptivo del EAL de las hojas frescas de <i>P. neochilus</i> por el método químico.	110
Figura 8. Efecto analgésico del extracto acuoso de las hojas frescas de <i>P. neochilus</i> por el método térmico.....	112
Figura 9. Evaluación del efecto antinociceptivo del EAL de las hojas frescas de <i>P. neochilus</i> por la prueba de formalina en ratones.	115
Figura 10. Porcentaje de efecto antioxidante del EAL por el método de atrapamiento del ión superóxido.	120

INDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro ^1H RMN a campo bajo del compuesto I	68
Espectro 2. Espectro ^1H RMN a campo alto del compuesto I.....	69
Espectro 3. Espectro ^{13}C RMN a campo bajo del compuesto I.	71
Espectro 4. Espectro ^{13}C RMN a campo alto del compuesto I.	72
Espectro 5. Experimento DEPT-135 a campo alto del compuesto I.	74
Espectro 6. Espectro ^1H RMN del compuesto II.....	77
Espectro 7. Espectro ^{13}C RMN a campo alto del compuesto II.	78
Espectro 8. Experimento DEPT-135 a campo alto del compuesto II	79
Espectro 9. Espectro de masas del compuesto II	80
Espectro 10. Comparación del espectro de masas del compuesto II y el espectro de masa del ácido hexadecanoico.	80
Espectro 11. Espectro IR del compuesto II	82
Espectro 12. Espectro ^1H RMN del compuesto III. Zona (1.60 - 5.00 ppm)	84
Espectro 13. Espectro ^{13}C RMN a campo bajo del compuesto III.....	85
Espectro 14. Experimento DEPT-135 a campo bajo del compuesto III.	86
Espectro 15. Espectro de masas de compuesto IV	88

Espectro 16. Comparación del espectro de masas del compuesto IV y el espectro de masa del nonacosano.	89
Espectro 17. Espectro ^1H RMN del compuesto V	91
Espectro 18. Espectro ^{13}C RMN a campo bajo del compuesto V.	92
Espectro 19. Espectro ^{13}C RMN a campo alto del compuesto V.	93
Espectro 20. Experimento DEPT-135 a campo alto del compuesto V	94
Espectro 21. Espectro ^1H RMN del compuesto VI.....	99
Espectro 22. Espectro ^{13}C RMN de compuesto VI	100
Espectro 23. Espectro ^{13}C RMN a campo bajo del compuesto VI	100
Espectro 24. Espectro DEPT-135 del compuesto VI.	101
Espectro 25. Espectro DEPT-135 del compuesto VI. (Ampliado)	102

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

δ	Desplazamiento químico.
λ	Longitud de onda.
ASA	Aspirina
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado.
CC	Cromatografía en columna.
CCF	Cromatografía de capa fina.
CDCl_3	Cloroformo deuterado.
CHCl_3	Cloroformo.
CH_2Cl_2	Diclorometano.
CH_3COOH	Ácido acético
CH_3NH_2	Acetonitrilo.
cm	Centímetro
CO_2	Dioxido de carbono.
d	Doblete.
dd	Doblete de doblete.

DEPT-135	Distortion less Enhancement by Polarization Transfer.
DMEM	Modificación del medio basal medium Eagle (BME)
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado.
DT ₅₀	Dosis tóxica media.
EAL	Extracto acuoso liofilizado.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
g	Gramo (s).
h	Hora (s).
H ₂ O	Agua.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido sulfurico.
Hx.	Hexano.
Hz	Hertz.
L	Litro
<i>J</i>	Constante de acoplamiento spin-spin (Hz).

μL	Microlitro
μM	Micromolar
m	Multiplete.
MeOH	Metanol.
min.	Minuto (s)
mg	Miligramo.
MHz	Mega hertz.
mL	Mililitro.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
Mult.	Multiplicidad.
NaCO_3	Carbonato de sodio
NBT	Nitroazul de tetrazolio
nm	Nanómetro.
O_2^-	Anión superóxido
p.a.	Para análisis.
PBS	buffer salino-fosfato
ppm	Partes por millón.

RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de protones.
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono.
rpm	Revoluciones por minuto.
s	Singlete.
sa	Singlete ancho.
t	Triplete.
UV	Ultravioleta.
vi	Via intraperitoneal
vo	Vía oral

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado plantas medicinales para curar, tratar y prevenir diversas dolencias referidas a la salud humana, e incluso en la actualidad existen zonas rurales en que las plantas medicinales son el primordial recurso para tratar las enfermedades,^[1] según la Organización Mundial de la Salud el 80% de la población mundial utiliza algún tipo de hierba como producto medicinal.^[2] Popularmente se piensa que los medicamentos a base de hierbas por ser naturales, son seguros y libres de efectos indeseables, al no reconocer que las hierbas se componen de productos químicos bioactivos algunos de los cuales pueden ser tóxicos,^[3] por ejemplo, la especie *Conium maculatum* L. conocida popularmente como “cicuta”, tiene usos medicinales contra enfermedades cancerígenas, neuralgias, ciática y asma, también es usado como sedante y antiespasmódico, pero utilizada en dosis inadecuadas puede ocasionar envenenamiento, provocando la muerte.^[4]

Las plantas están constituidas por metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios, muy abundantes en la naturaleza, son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta ya que presentan una utilidad definida y son comunes a todos los seres vivos, entre ellos se encuentran aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, etc. Mientras que los metabolitos secundarios o productos naturales, son propios de una especie y en la mayoría de los casos no poseen utilidad aparente, estos pueden ser alcaloides, terpenos, flavonoides, esteroides, cumarinas, entre otros.^[5]

Los metabolitos secundarios permiten interacciones ecológicas de la planta con su entorno pero no son esenciales para su supervivencia, estos son los principios activos de las plantas y los responsables de las diversas actividades biológicas, farmacológicas y medicinales que se le atribuyen a las mismas, es por esta razón que hoy en día el 25% de los fármacos existentes se obtienen de extractos vegetales, o bien se han sintetizado a partir de sustancias halladas en la investigación fitoquímica,^[6] lo que ha despertado un gran interés en la química de los productos naturales y diariamente aumentan el número de estudios fitoquímicos y farmacológicos que ilustran la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversas afecciones.^[5]

Uno de los grupos de plantas mas utilizado popularmente por sus propiedades medicinales, es la familia Lamiaceae, de donde se destacan el toronjil (*Melissa officinalis* L.), hierbabuena (*Mentha spicata* L.), orégano orejón (*Plectranthus amboinicus* L.), entre otras especies que son comúnmente utilizadas por sus usos etnomédicos.^[7] Uno de los géneros de la familia mencionada, *Plectranthus*, representa un importante grupo de plantas con actividades biológicas, utilizadas comúnmente en la medicina tradicional en tratamientos de cefaleas, quemaduras, alergias, picaduras, etc. Las plantas de este género son una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos y potenciales medicamentos. Los principales compuestos aislados de las especies de este género han sido terpenoides, flavonoides y compuestos fenólicos.^[8-9] Por esta razón, muchas especies de *Plectranthus* han sido y siguen siendo estudiadas en cuanto a su composición química, determinando así sus principios activos y evaluando su actividad biológica, representando esto un avance importante para la química, la medicina y la industria farmacéutica.^[5]

1.1. Familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae, comprende 236 géneros y alrededor de 7000 especies distribuidas en casi todo el mundo, mientras que en Venezuela se estima la presencia de 20 géneros y más de 90 especies.^[10-11] La familia Lamiaceae está compuesta principalmente por plantas como las menta (*Mentha* spp.), albahaca (*Ocimum* spp.), el romero (*Rosmarinus officinalis*), el tomillo (*Thymus* spp.), entre muchas otras de conocido valor medicinal y culinario. Tradicionalmente, esta familia es conocida por el nombre Labiatae, pero siguiendo las recomendaciones del Código de Nomenclatura Botánica, su nombre ha sido substituido por Lamiaceae. Esta familia cuenta con una gran diversidad de usos etnobotánicos, diversidad morfológica y distribución casi cosmopolita. Se compone de hierbas, arbustos, raramente árboles, frecuentemente aromáticas, las cuales cuentan con las siguientes características morfológicas:

- Tallos: presenta tallos jóvenes frecuentemente cuadrados en sección transversal. Las plantas están frecuentemente cubiertas por pelos simples uniseriados, multicelulares o ramificados, mezclados con pelos glandulares que pueden ser sésiles o pedicelados, la mayoría con numerosos y variados aceites esenciales, volátiles y aromáticos.
- Hojas: presentan hojas simples, muy rara vez pinnadas, opuestas, en general decusadas, ocasionalmente verticiladas o incluso en arreglo espiralado, sésiles o pecioladas, con el limbo entero, dentado, crenado, serrado o irregularmente lobado o partido; sin estípulas.

- Flores: son bisexuales o funcionalmente femeninas en plantas ginodioicas (*Mentha*, *Nepeta* o *Ziziphora*), usualmente con simetría bilateral, rara vez actinomorfas.
- Fruto: Principalmente constituido por cuatro núculas monospermas, mucilaginosas o no, generalmente incluidas en el cáliz persistente; también puede ser una drupa (*Prasium*) con 1-4 lóculos. Las semillas son erectas, basifijas, rara vez transversales (*Scutellaria*), con endosperma escaso o ausente.

Esta familia es de especial abundancia en el Mediterráneo, pero se puede encontrar prácticamente en cualquier parte del mundo, típicamente en regiones sujetas a climas cálidos estacionales, especialmente en áreas rocosas abiertas, matorrales, riveras de río, regiones tropicales y subtropicales (Figura 1).^[12]

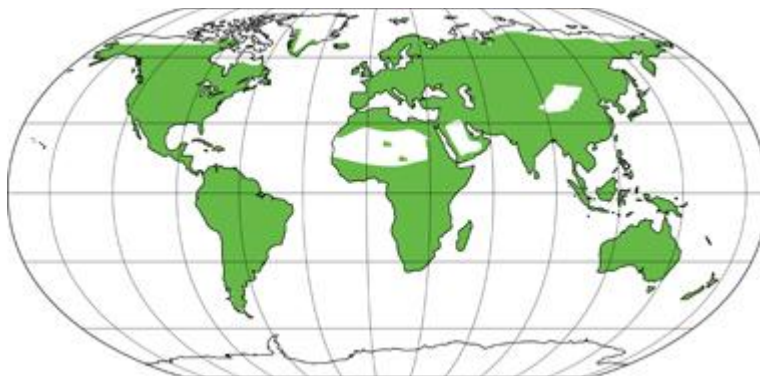


Figura 1. Mapa de distribución mundial de la familia Lamiaceae.

La familia Lamiaceae es económicamente importante, ya que son usadas como plantas medicinales, ornamentales, especias y perfumes. Entre las especies de interés culinario destaca el romero (*Rosmarinus officinalis*), un arbusto típico del matorral mediterráneo cuyas hojas se utilizan como condimento y aromatizante. La salvia (*Salvia officinalis*) es una planta aromática muy utilizada en jardinería. La lavanda (*Lavandula officinalis*) se utiliza para la elaboración de perfumes. Los tubérculos de algunas especies de *Stachys* son comestibles y la teca (*Tectona grandis*) es un importante árbol maderable.^[13] En la medicina tradicional las hojas de muchas especies pertenecientes a la familia Lamiaceae son empleadas contra múltiples afecciones, atribuyéndoseles propiedades: antimicrobianas, antirreumáticas, analgésicas, anticancerígenas, cicatrizantes, tranquilizantes, antihipertensivas, antioxidantes, citotóxicas, entre otras.^[14]

1.2. Género *Plectranthus*

El género *Plectranthus*, anteriormente conocido como *Coleus*, pertenece a la subfamilia Nepetoideae, tribu Ocimeae de la familia Lamiaceae;^[9] con aproximadamente 300 especies distribuidas en África, Madagascar, Asia, Australia y las islas del Océano Pacífico. Es considerado uno de los géneros de la familia Lamiaceae más ricos en aceites esenciales.^[2] Los compuestos aislados principalmente del género *Plectranthus* son los terpenoides, la mayoría de los cuales están altamente modificados en forma de diterpenoides abietanos. El género también incluye plantas ricas en monoterpenoides, sesquiterpenoides, flavonoides y compuestos fenólicos.^[8,15]

Este género es de importante interés económico, ornamental y medicinal, con una amplia gama de usos etnobotánicos. Algunas de sus especies se cultivan por sus

tubérculos comestibles y sus aceites esenciales, y otras son aprovechadas culinariamente como saborizante de alimentos y en perfumería como aditivo fragancias.^[16]

Algunas de las propiedades medicinales que han sido comprobadas para las especies del género *Plectranthus* son: antivirales, antifúngicas, antihipertensivas, antidiarréicas, analgésicas, digestivas y antioxidantes. A pesar de que este género posee numerosas propiedades medicinales, su composición química, es poco conocida.^[9]

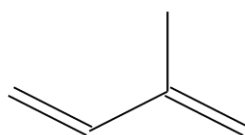
2. ANTECEDENTES

2.1. Principales compuestos químicos aislados del género *Plectranthus*.

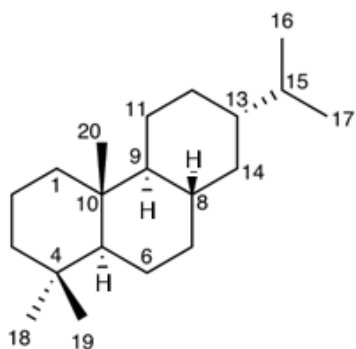
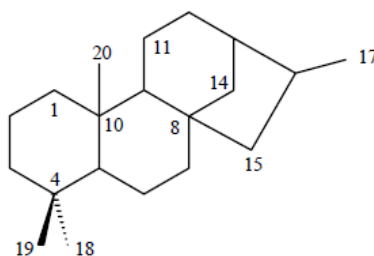
2.1.1. Terpenos

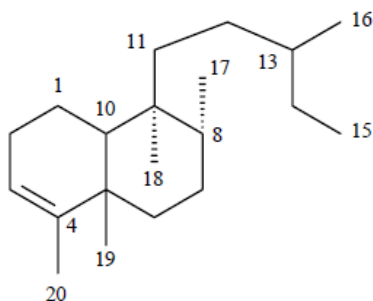
Los terpenos poseen una gran diversidad estructural: triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos y sesterpenos son algunos de ellos, todas estas estructuras químicas se caracterizan ya que poseen una unidad fundamental de cinco átomos de carbono conocida como isopreno **(1)**. Constituyen uno de los grupos más amplios de fitonutrientes y actúan como antioxidantes protegiendo los lípidos, la sangre y demás fluidos corporales del ataque de radicales libres de especies de oxígeno. De manera general, los terpenos obedecen a lo que se conoce como *regla del isopreno*, es decir, la secuencia de los átomos que conforman un terpeno es tal que pueden localizarse varias unidades consecutivas de isopreno. Sin embargo, esto no es siempre cierto por

cuanto el número de átomos de carbono puede no ser un múltiplo de cinco, pues son frecuentes las reacciones de degradación, o bien suceden rearrreglos esqueléticos que conducen a secuencias anormales de la unidad C_5 . El descubrimiento de un gran número de compuestos que presentan diferentes grupos funcionales ha generado el uso del término “*terpenoide*” para designarlos en lugar de “*terpeno*” cuya terminación (-eno) denota más bien hidrocarburos.^[5] En las plantas del género *Plectranthus* los compuestos mayoritarios son los diterpenoides, estos contienen cuatro unidades de isopreno, que poseen 20 átomos de carbono y cuatro son metilos ramificados.^[9]

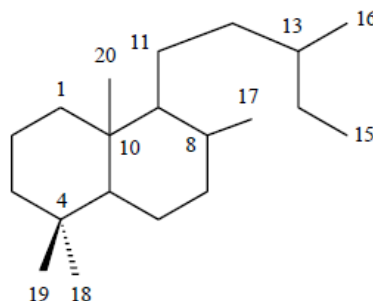
**1**

Los diterpenoides del tipo abietano (**2**) son los más comunes en el género *Plectranthus* y se encuentran altamente modificados, los diterpenoides de tipo kaurano (**3**), clerodano (**4**) y labdano (**5**) han sido también una importante clase de metabolitos secundarios presentes en el género.^[8,15]

**2****3**



4



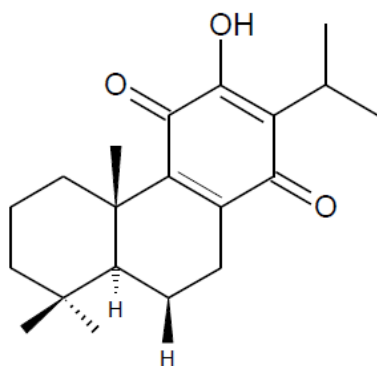
5

2.1.1.1. Diterpenos abietanos aislados de especies de *Plectranthus*.

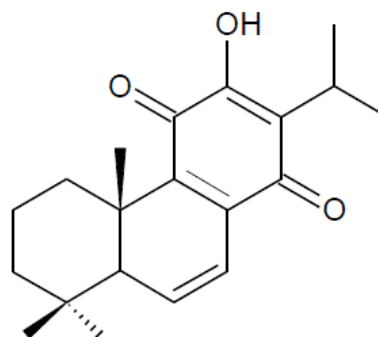
Los diterpenoides abietanos pueden ser sub-clasificados de acuerdo a su variación estructural en roileanonas (**6-8**), acil-hidroquinonas (**9-10**), espirocoleonas (**11**), quinanometidos (**12-13**), abietanoides diméricos (**14-15**) y epoxiabietanoides (**16**), es importante recalcar el hecho de que una gran cantidad de compuestos abietanoides aislados del género *Plectranthus*, han sido de interés farmacológico.^[8]

a. Diterpenoides abietanos tipo roileanonas.

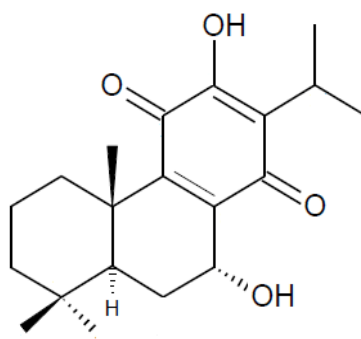
Entre algunos de los diterpenos de tipo roileanona aislados de especies del género *Plectranthus* se encuentran: roileanona (**6**) aislada de *P. Abyssinian*, 6,7-dehidroroileanona (**7**) aislada de *P. myrianthus* y horminona (**8**) aislado de las raíces de *P. hereroensis*. Estos compuestos poseen actividad antimicrobiana. Para el caso de la horminona (**8**), se ha demostrado que posee una fuerte actividad inhibitoria frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*.^[8,15]



6



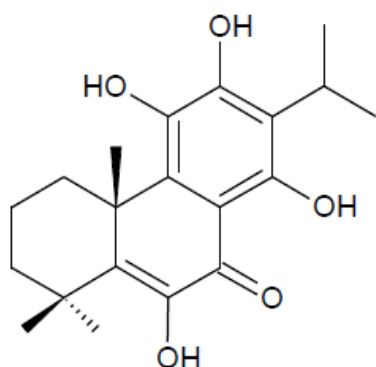
7



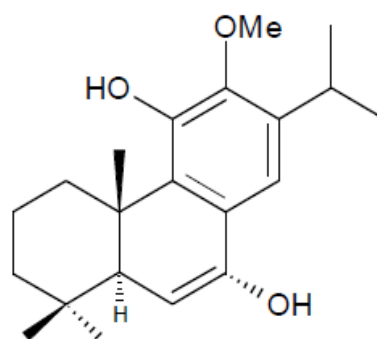
8

b. Diterpenoides abietanos tipo acil-hidroquinona

Entre los diterpenoides de tipo acil-hidroquinona aislados de especies de *Plectranthus*, se encuentran: coleon U (**9**) aislado de *P. grandidentatus*, el cual es un antimicrobiano, que mostró en estudios farmacológicos previos actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* y el compuesto 7 α ,11-di-hidroxi-12-metoxi-8,11,13-abietatrieno (**10**) ha sido extraído de las partes aéreas de *P. elegans*, el cual inhibe la germinación de esporas del hongo *Cladosporium cucumerinum*.^[8]



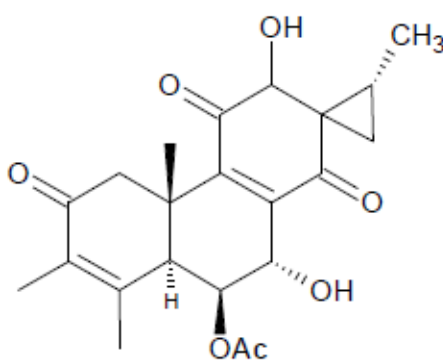
9



10

c. Diterpenoides abietanos tipo espirocoleonas.

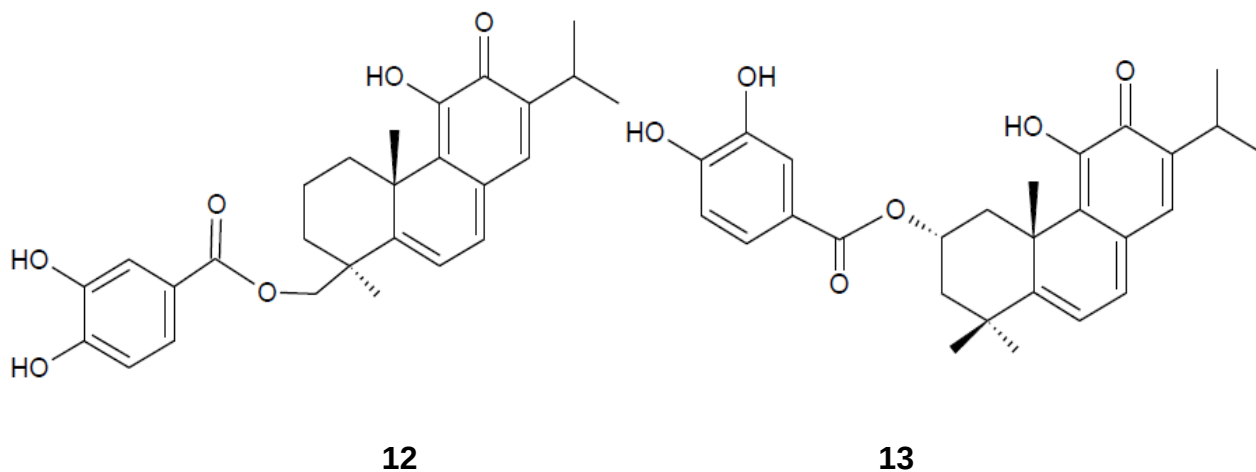
Del extracto metanólico de las hojas de *P. amboinicus* y de *P. glaucocalyx* ha sido aislado el producto natural plectrina (**11**), el cual posee actividad antimicrobiana contra *Schizaphis graminum* y *Pectinophora gossypiella*.^[8,15]



11

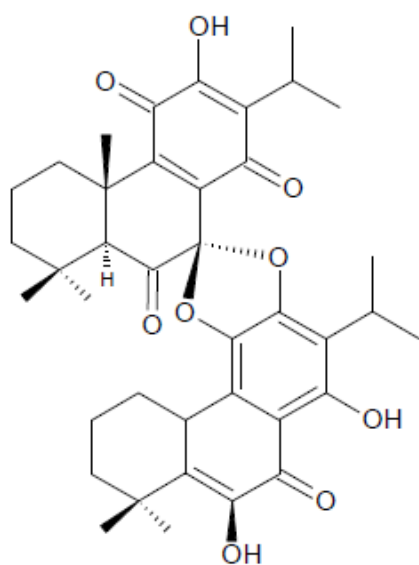
d. Diterpenoides abietanoides tipo quinonametidos.

Entre los diterpenoides de tipo quinonametidos aislados de especies de *Plectranthus* se encuentran: parviflorona E (**12**) y parviflorona F (**13**) los cuales han sido reportados para las especies *P. parviflorus* y *P. strigosus* respectivamente.^[8,15]

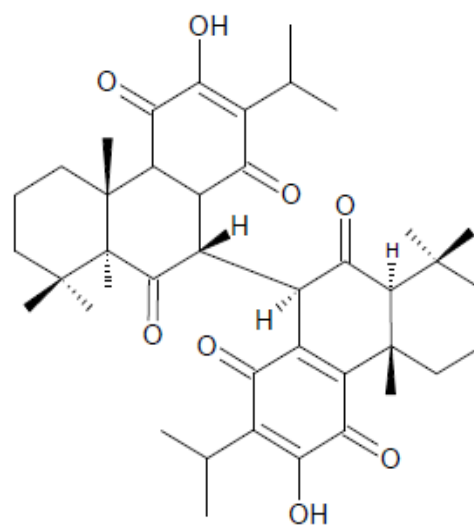


e. Dímeros abietanoides aislados de especies de *Plectranthus*.

Algunos de los dímeros abietanoides aislados de este género han sido: grandidona A (**14**) y grandidona C (**15**), ambos aislados de *P. grandidentatus*, los cuales poseen actividad antimicrobiana. El compuesto Grandidona A inhibe la proliferación de linfócitos humanos.^[8,17]



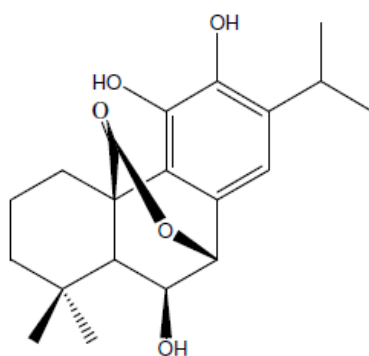
14



15

f. Diterpenoides abietanoides tipo epoxiabietanoides.

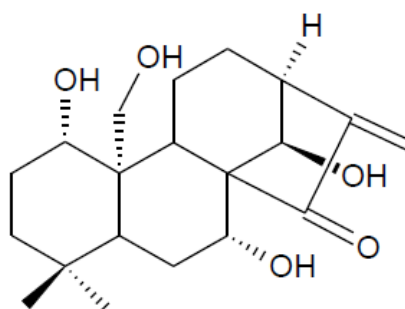
De las ramas de *P. barbatus*, se ha aislado el compuesto 6 β -Hidroxi-carnosol (**16**).^[18]



16

2.1.1.2. Diterpenoides de tipo kaurano aislados de *Plectranthus*.

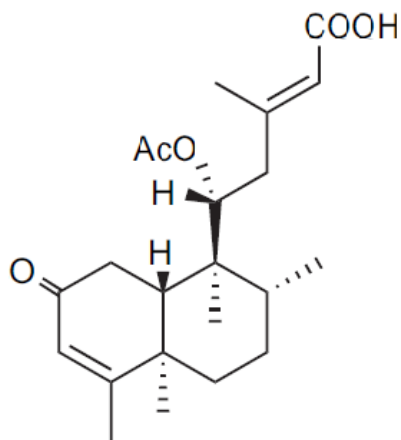
Los diterpenoides de tipo Kaurano han sido aislados de una gran variedad de plantas del género *Plectranthus* con propiedades medicinales, y han sido utilizados en tratamientos de inflamación y cáncer, entre los que se encuentra el producto natural camebacaurina (**17**).^[8]



17

2.1.1.3. Diterpenoides de tipo clerodano aislados de *Plectranthus*

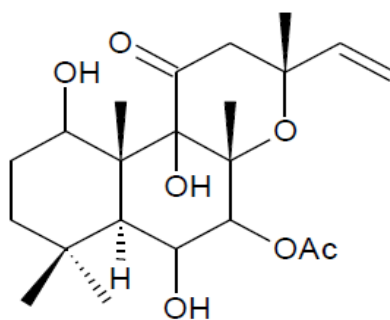
Los diterpenoides de tipo clerodano se caracterizan por poseer una moderada actividad antimicrobiana, del extracto hexanoico de las hojas de *P. ornatus* se ha aislado el compuesto ácido 11*R**-acetoxi-2-oxokolavénico (**18**).^[19-20]



18

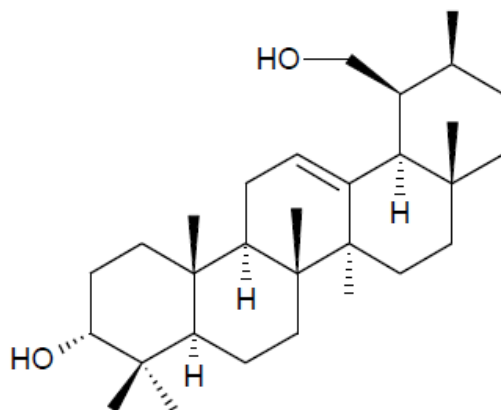
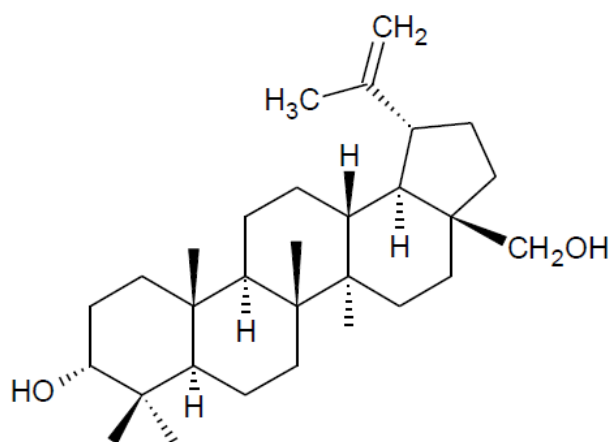
2.1.1.4. Diterpenoides de tipo labdano aislados de *Plectranthus*

Los diterpenoides de tipo labdano son un importante tipo de sustancias bioactivas presentes en el género *Plectranthus*. El compuesto forskolina (**19**), el cual ha sido aislado de *P. barbatus* es uno de los mas importantes diterpenos labdanos del género, ya que posee una gran variedad de propiedades medicinales, siendo un compuesto de utilidad para problemas cardiovasculares, respiratorios, gastrointestinales y antitumorales.^[8]



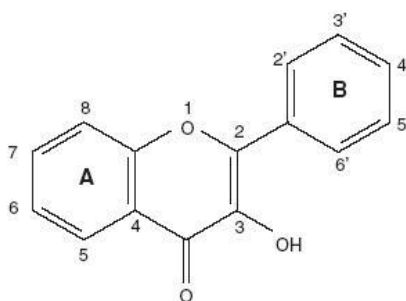
19

De las especies del género *Plectranthus*, también se han aislado gran cantidad de triterpenos, los cuales poseen 30 átomos de carbono. Los más comunes en este género son los triterpenos pentacíclicos, entre los que se destacan: plectrantadiol (**20**) aislado de *P. rugosus* y betulina (**21**) aislado de *P. caninus*.^[8,16]

**20****21**

2.1.2. Flavonoides

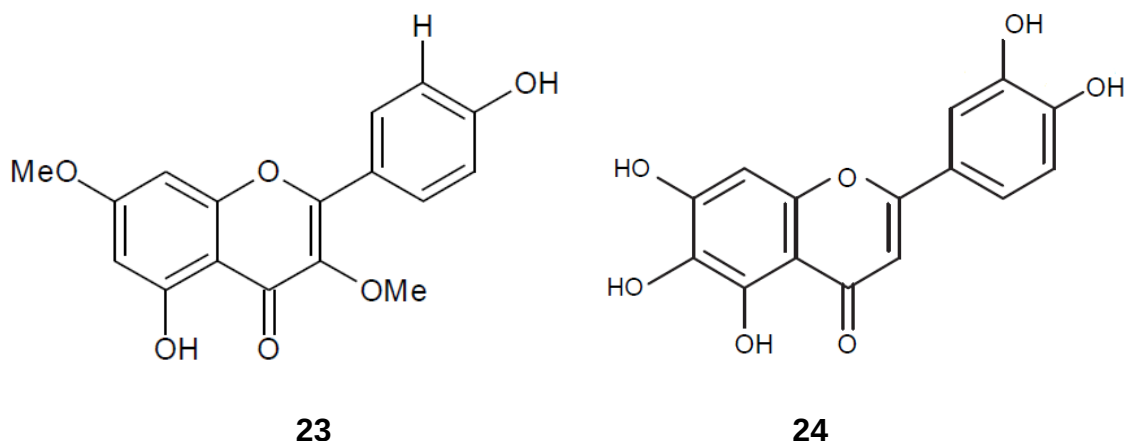
Los flavonoides son pigmentos vegetales no nitrogenados, los cuales sin ser metabolitos primarios se encuentran en casi cualquier vegetal superior. Los flavonoides poseen diversas funciones en la planta, son considerados antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobianos y antinutricionales, foto-receptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, atractores visuales para los insectos, además los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. La estructura química general de los flavonoides comprende un anillo A, un anillo B y tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, correspondiente a la parte alquílica del fenilpropano. Es por esto que se les conoce como unidades C_{15} : $C_6-C_3-C_6$ y el esqueleto recibe el nombre de núcleo de flavano **(22)**. Una gran cantidad de flavonoides poseen actividades biológicas, tales como antiinflamatorias, antialérgicas y antitumorales. Se utilizan regularmente para la prevención del cáncer, la demencia, la aterosclerosis y la enfermedad cardíaca coronaria.^[5,9]



22

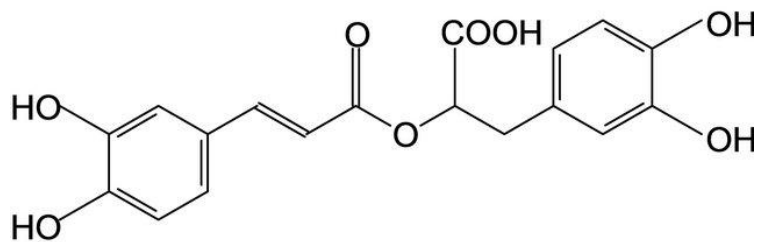
Los flavonoides aunque son metabolitos secundarios que se encuentran también en el género *Plectranthus* no son tan abundantes como los diterpenos. Algunos de los

flavonoides o compuestos análogos que se han aislados de este género han sido 3,7-dimetilquercetina **(23)** el cual es un flavonol aislado de la especie *P. caninus*, reportado por poseer propiedades anticancerígenas y la luteolina **(24)**, aislado de la especie *P. amboinicus*.^[8,21]

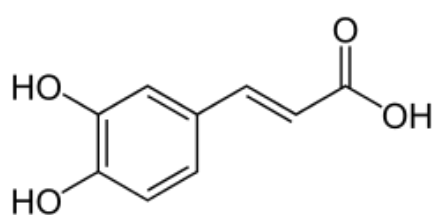


2.1.3. Compuestos fenólicos

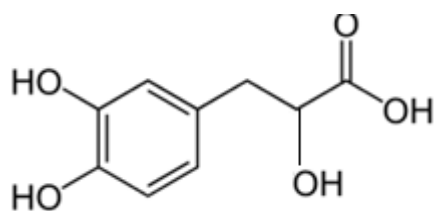
Entre los compuestos fenólicos sencillos pueden contarse derivados de fenoles simples: C_6 , del ácido benzoico: C_6-C_1 , de la acetofenona: C_6-C_2 , y del ácido cinámico (fenilpropano): C_6-C_3 .^[5,9] Uno de los componentes comunes dentro de la subfamilia Nepetoideae de la familia Lamiaceae es el ácido rosmarínico **(25)** el cual es un éster de ácido cafeico **(26)** y ácido láctico 3,4-dihidroxifenil **(27)** que posee propiedades de interés medicinal como propiedades antiviral, antibacteriana y efecto antioxidante, otro compuesto aislado del género *Plectranthus* ha sido nepetoidina A **(28)**.^[9]



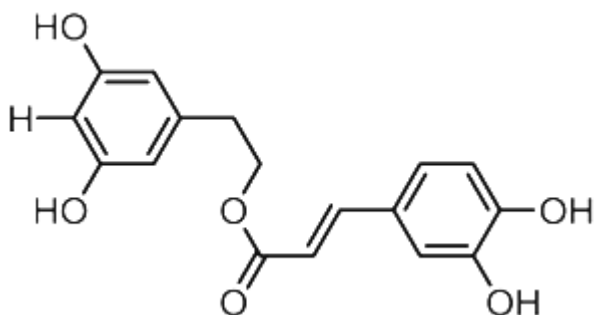
25



26



27

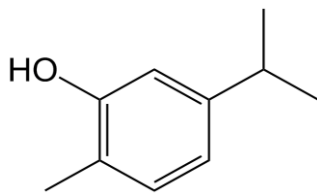
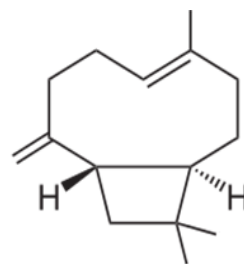


28

El ácido cafeico (**26**) y sus derivados son de ocurrencia generalizada en la familia Lamiaceae y de especial atención como marcadores quimiotaxonómicos. El ácido rosmarínico (**25**), un ácido fenólico, puede ser considerado como un marcador quimiotaxonómico dentro de la subfamilia Nepetoideae.^[15]

2.1.4. Aceites esenciales

Los aceites esenciales o esencias están constituidos por monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, estos son compuestos volátiles, arrastrables por vapor y a ello se debe el aroma de las plantas. Están presentes en glándulas de aceites, pelos glandulares o disueltos en resina.^[5] Los aceites esenciales se aíslan de diferentes partes de la planta y son complejas mezclas volátiles de metabolitos secundarios, son responsables de la fragancia, el sabor, así como la importancia medicinal de la planta. Debido a estas virtudes son utilizados en las industrias de alimentos, bebidas y perfumería, y también en aplicaciones terapéuticas.^[20] El género *Plectranthus* se caracteriza por ser rico en aceites esenciales, sus principales constituyentes son mono- y sesquiterpenos.^[16] El carvacrol (**29**), es un monoterpeno aislado de especies del género mencionado, se ha demostrado en estudios farmacológicos previos que carvacrol (**29**) posee una significativa actividad antiinflamatoria y además se puede utilizar en el plausible desarrollo de fármacos contra el cáncer de mama.^[22] El *trans*-Cariofileno (**30**), también ha sido aislado del género mencionado y consiste en un sesquiterpeno que muestra efectos antiinflamatorios.^[23]

**29****30**

A pesar de las propiedades medicinales encontradas en las especies del género *Plectranthus*, estas son también cultivadas como plantas ornamentales, otras como verduras o tubérculos comestibles.^[18] En Venezuela se encuentran seis de estas especies: *P. neochilus* Schlechter, *P. amboinicus* Sprengel, *P. verticillatus* Druce, *P. barbatus* Andrews, *P. scutellarioides* Codd y *P. madagascariensis* Benthham. Existen reportes aislados de la presencia de *P. ornatus* Codd, pero esta no ha sido visto en flor aún y vegetativamente es muy similar a *P. neochilus*.^[24-25]

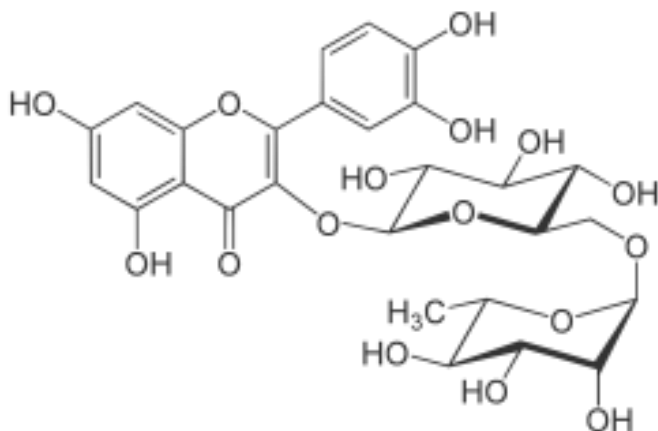
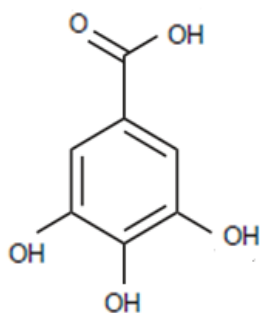
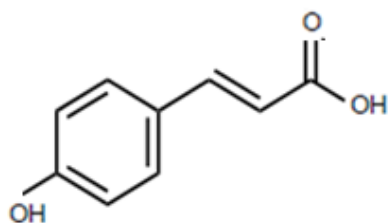
2.2. Especies del género *Plectranthus* encontradas en Venezuela.

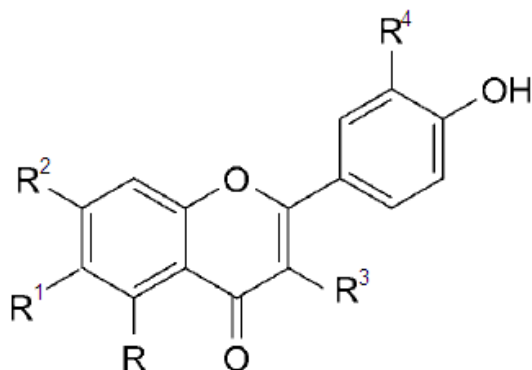
2.2.1. *Plectranthus amboinicus* Spreng

Plectranthus amboinicus Spreng es una hierba nativa de Asia y se encuentra en toda la América tropical,^[22] llamado popularmente “Orégano Orejón”. Se utiliza para diversos fines medicinales, especialmente enfermedades respiratorias (congestión, bronquitis, tos, dolor de garganta, congestión nasal), digestivas (disentería, diarrea, colitis), neurológicas (epilepsia, convulsiones) y una gama de otros problemas tales como el reumatismo, la flatulencia, contra la malaria y como sedante.^[7,22,26-27] La hoja de la especie también es usada para platos de carne debido a su sabor distintivo y a su aromático y refrescante olor.^[27]

Estudios fitoquímicos sobre el extracto acuoso y etanólico al 80% de las hojas de *P. amboinicus* indicaron la presencia de alcaloides, taninos, glucósidos, terpenoides y flavonoides, los cuales son compuestos con alto valor terapéutico.^[28]

Del extracto de acetato de etilo de las hojas de *P. amboinicus*, han sido aislados los compuestos: luteolina (**24**), ácido rosmarínico (**25**), ácido cafeico (**26**), rutina (**31**), ácido gálico (**32**), ácido *p*-cumárico (**33**), eriodictiol (**34**), quertecina (**35**), los cuales fueron identificados por UPLC- MS.^[29-30]

**31****32****33**



34 R=OH, R¹=OCH₃, R²=OCH₃, R³=H, R⁴=H

35 R=OH, R¹=H, R²=OH, R³=OH, R⁴=OH

El ácido rosmarínico (**25**), descrito anteriormente posee actividad antiviral, antibacterial, efecto antioxidante y actividad antiproliferativa,^[9] el ácido gálico (**32**) inhibe activamente la proliferación de células cancerígenas, la quercetina (**35**) es uno de los flavonoides mas comunes en la naturaleza. La quercetina (**35**) y sus análogos son reportados por ser anticancerosos y glucósidos como rutina (**31**) tienen una fuerte agregación antiplaquetaria, anticancerígena y actividad antibacteriana.^[30]

Estudios farmacológicos realizados al extracto acuoso y metanólico de las hojas de *P. amboinicus* a ratones albinos suizos machos han mostrado actividad expectorante, el cual fue efectivo a dosis de 50 mL/Kg, para ambos extractos.^[31] Mientras que el extracto etanólico de las hojas de esta especie presenta actividad antiinflamatoria con dosis efectiva de 100 a 500 mg/L.^[32]

Adicionalmente, la actividad antimicrobiana de *P. amboinicus* ha sido comprobada, el extracto de acetona y acetato de etilo de las hojas de la especie, posee una importante actividad contra una serie de patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus mutans*, *Moniliformis streptobacillus*, *Staphylococcus aureus* y *Aeruginosa pseudomonas*, estos extractos poseen además una significativa actividad antioxidante.^[22,26]

El extracto hidroetanólico al 70% de *P. amboinicus* mostró una inhibición significativa en el crecimiento del tumor Sarcoma 180 en ratas hembras Wistar albinas, la dosis de 350 mg/Kg redujo significativamente el crecimiento del tumor con porcentaje de inhibición de 66%, mientras que las dosis de 100, 150 y 250 mg/Kg lo redujo 44%, 45% y 47% respectivamente.^[33]

En un estudio farmacológico realizado al extracto metanólico de las hojas, tallos y raíces de *P. amboinicus* sobre ratones albinos suizos machos, mostró un porcentaje de protección para la actividad analgésica de 60,08; 19,75 y 34,72% respectivamente.^[29] En otro estudio farmacológico realizado se obtuvieron resultados de una prueba de hematología, que indican que el extracto de la planta se puede utilizar para estimular el sistema inmunológico, que es un componente importante en el cuidado de personas inmunocomprometidas, en particular los pacientes de VIH/SIDA, ya que causó un aumento significativo en los linfocitos, plaquetas, basófilos y neutrófilos, esto es debido a la presencia de saponinas, flavonoides y alcaloides que mejoran las funciones inmunes por estimular la división celular.^[34] Se ha reportado además, que las hojas de *P. amboinicus* poseen entre sus propiedades farmacológicas

más importantes efectos: antimutagénicos, radioprotectores, neurofarmacológicos, antidiuréticos y antimuscarínico.^[26,35-36]

También ha sido realizado un estudio toxicológico de las hojas de la especie, donde se observó que se necesitan más de 10.000 mg/Kg de extracto acuoso para matar el 50% de los animales de prueba, lo que da un amplio margen de seguridad para la dosis letal del extracto de *P. amboinicus*. Sin embargo, observaciones indican que el uso prolongado del extracto de esta planta a dosis altas podría causar lesiones en el hígado, el intestino, el riñón y los pulmones.^[34]

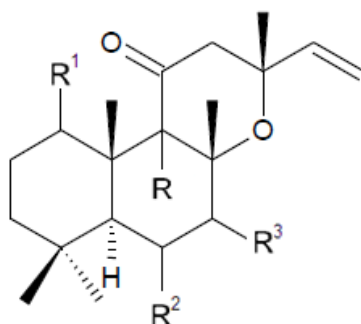
2.2.2. *Plectranthus barbatus* Andrews

La especie más conocida del género *Plectranthus* y estudiada internacionalmente es *Plectranthus barbatus* (*Coleus forskohlii*), probablemente originaria de África, cuyo componente principal es el diterpeno forskolina **(19)**.^[7] Esta especie es tradicionalmente usada para el dolor de cabeza, trastornos intestinales, infecciones, hemorragias, hipertensión, insomnio, convulsiones y problemas psiquiátricos,^[37] además presenta propiedades antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatoria, antioxidante, citotóxica, hipotensiva, espasmolítica y hepatoprotectora.^[38]

El producto natural forskolina **(19)**, ha sido uno de los compuestos más estudiados de la especie por poseer interesantes propiedades medicinales, ha sido aislado principalmente de las raíces de la planta, es un diterpeno inhibidor de la agregación plaquetaria, útil en la clínica para la prevención de la metástasis en cáncer.^[39] Además, se ha comprobado que es útil para problemas cardiovasculares, respiratorios,

gastrointestinales y antitumorales. A pesar de ello, largas y constantes dosis de forskolina (**19**) puede llegar a causar depresión del sistema nervioso central.^[40]

Otros compuestos análogos a la forskolina (**19**) que han sido aislados de esta especie son: isoforskolina (**36**) la cual posee propiedades antidiarreicas, 1-acetilforskolina (**37**) se utiliza para suprimir la hipertensión ocular, 7-diacetilforskolina (**38**) reduce el peso corporal y la grasa y 1,9-dideoxiforskolina (**39**) el cual posee efecto anti-inflamatorio.^[40]



36 R=OH, R¹=OH, R²=OAc, R³=OH.

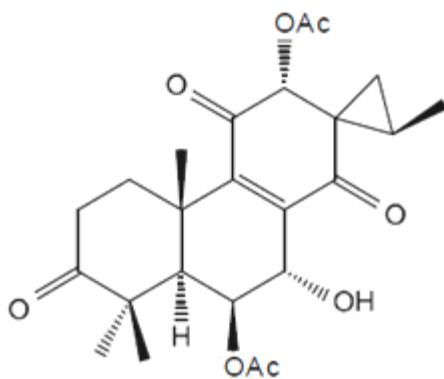
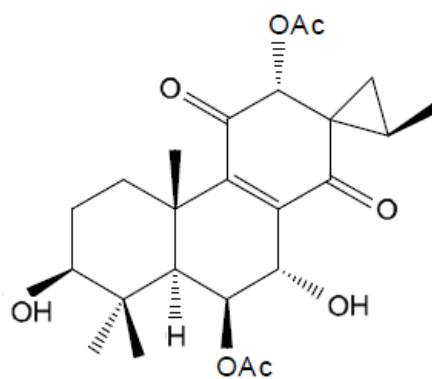
37 R=OH, R¹=OAc, R²=OH, R³=OAc.

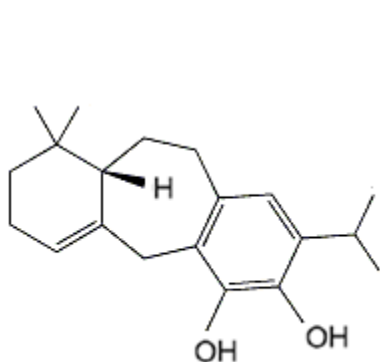
38 R=OH, R¹=OH, R²=OH, R³=OH.

39 R=H, R¹=H, R²=OH, R³=OAc.

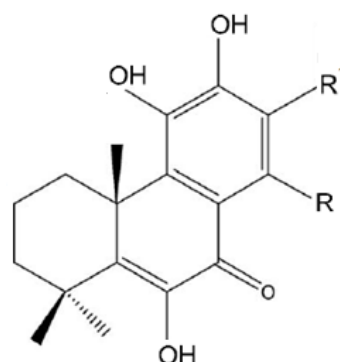
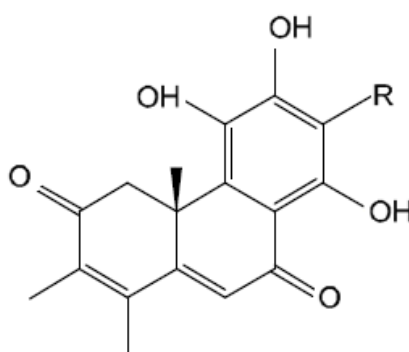
Del extracto acuoso de las hojas de *P. barbatus* se ha aislado el ácido rosmarínico (**25**) cuyas propiedades medicinales fueron nombradas anteriormente,^[41] y del extracto etanólico de las hojas de esta especie se han obtenido los diterpenoides con esqueletos de tipo abietano: barbatusina (**40**), 3 β -hidroxi-3-deoxobarbatusina (**41**), barbatusol (**42**),

coleon C (**43**), 14-deoxicoleon U (**44**), plectrinona A (**45**) y plectrinona B (**46**). El metabolito secundario barbatusina (**40**) posee una efecto inhibidor frente a carcinoma pulmonar de Lewis y leucemia linfocítica P 388 en ratones, además inhibe el crecimiento de las células cancerígenas de MDA-MB435 (mama-humano), HCT-8 (colon-humano) y SF-295 (Glioblastoma-Humano), en un 94.74%, 99.21% y 100.00% respectivamente y actúa como gastroprotector al igual que el 3β -hidroxi-3-deoxobarbatusina (**41**). El barbatusol (**42**) induce una potente disminución de la presión arterial, Coleon C (**43**) inhibe el crecimiento de tumores y la proliferación con una baja toxicidad para las células normales y plectrinona A (**45**) posee actividad antiulcerosa.^[18,37,40]

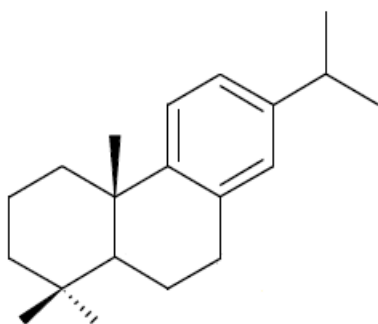
**40****41**



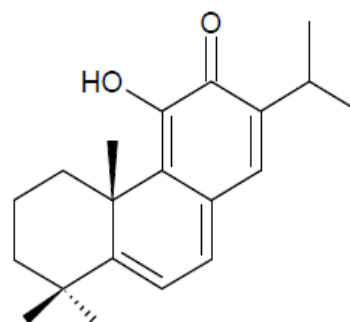
42

43 $R=OH$, $R^1=CH(CH_3)CH_2OH$ 44 $R=H$, $R^1=CH(CH_3)$ 45 $R=CH_2CH=CH_2$ 46 $R=CH_2CH=CH_2$

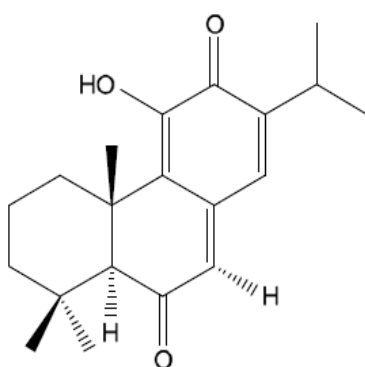
Del extracto de *n*-hexano de las hojas de *P. barbatus*, se han aislado los diterpenos: dehidroabietano (**47**), 5,6-didehidro-7-hidroxitaxodona (**48**), taxodiona (**49**), 20-deoxocarnosol (**50**) y 6,11,12, trihidroxi-7,20-epoxi-8,11,13-abietatrieno (**51**).



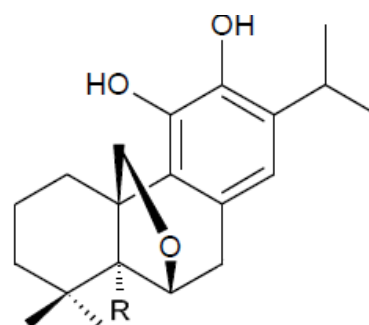
47



48



49



50 R= H

51 R= OH

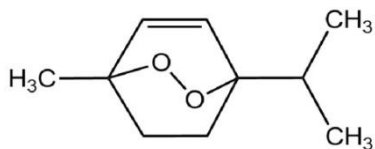
La actividad antiprotozoaria de los compuestos **47-51** ha sido evaluada contra *Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. El compuesto 5,6-didehidro-7-hidroxi-taxodona (**48**) mostró actividad notable con selectividad frente a *P. falciparum* (IC₅₀ 9,2 µm/mL) y *T. brucei* (IC₅₀ 1,9 µm/mL). Los compuestos **49-51** exhibieron actividad antiprotozoaria no específica y el compuesto dehidroabietano (**47**) no mostró potencial antiprotozoario.^[42] En un estudio toxicológico realizado se encontró que el extracto acuoso de las hojas y el extracto metanólico de

las raíces de *P. barbatus* causa afecciones al hígado y a los riñones al ser consumido constantemente.^[43]

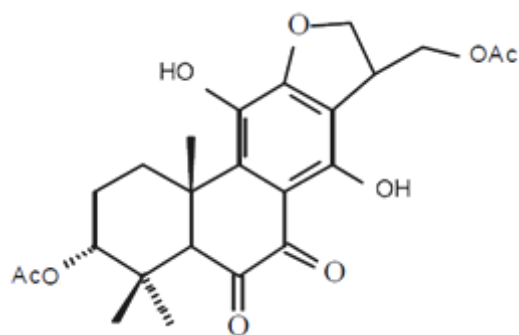
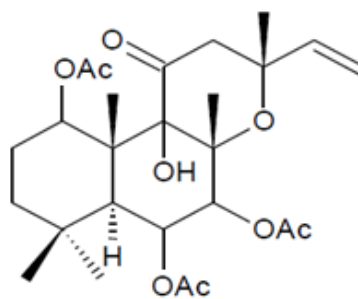
2.1.1. *Plectranthus ornatus* Codd.

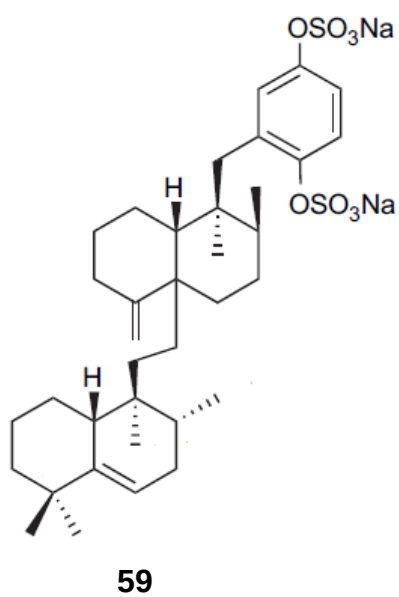
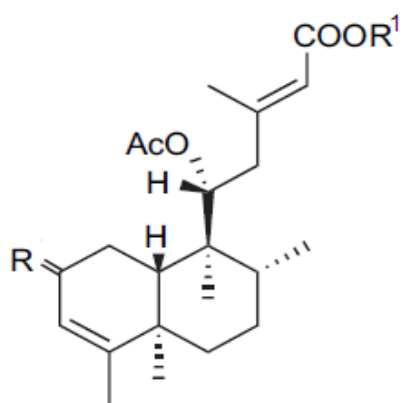
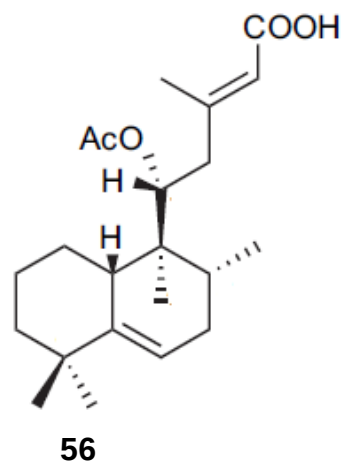
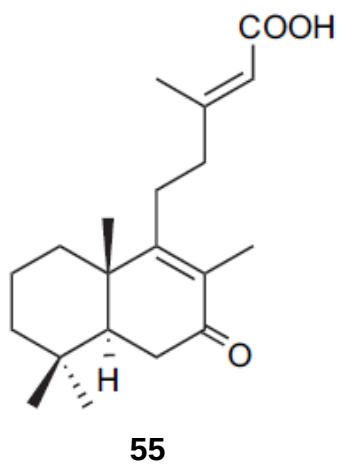
Plectranthus ornatus es una especie originaria del oeste de la India, se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo. Es conocido comúnmente como “falso boldo” o “boldo rastrero”, ha sido ampliamente difundida como planta medicinal en Paraguay y Brasil por su uso popular, se le otorgan propiedades antiulcerosas, digestivas, hepatoprotectoras, contra enfermedades del hígado (hepatitis, cólicos, estreñimiento), fiebre, trastornos estomacales, apatía, insomnio, cálculos biliares, resacas, reumatismo y amebas.^[44] Se encuentran reportes aislados de la presencia de esta especie en el país pero estos no han sido verificados.

La especie *P. ornatus* ha demostrado ser una fuente rica de diterpenos, en particular de las clases abietano. Además, se ha comprobado que esta especie posee ascaridol **(52)** el cual es un compuesto orgánico natural, clasificado como un monoterpeneo bicíclico que tiene un puente inusual peróxido en el grupo funcional. Como otros peróxidos orgánicos de bajo peso molecular, es inestable y susceptible a explosión cuando se calienta o se trata con ácidos orgánicos. El metabolito secundario ascaridol **(52)** ha sido usado como antihelmíntico en el control de nemátodos, produce un efecto paralizante y narcótico sobre los parásitos intestinales, haciendo que se desprendan del tejido intestinal al cual están adheridos. El ascaridol **(52)** extraído directamente de la planta y posteriormente purificado, posee una alta toxicidad, en virtud de lo cual, su uso como fármaco antihelmíntico, fue prohibido en varios países desde hace años.^[44]

**52**

Del extracto etanólico de las hojas de esta especie han sido aislados los compuestos: barbatusina (**40**) y ornantina A (**53**), los cuales fueron separados por sucesivas columnas cromatográficas y caracterizados por el análisis comparativo de espectros RMN ^{13}C y RMN ^1H .^[45] Del extracto hexanoico de las hojas de la especie se aislaron los compuestos 1,6,7-triacetoxi-8,13-epoxi-14-labden-11-ona (**54**), el cual es un diterpenoide labdano que posee un esqueleto similar al de la forskolina (**19**), ácido rinocerotinoico (**55**), ácido 11R-acetoxihalima-5,13-dien-15-oico (**56**), ácido 11R-acetoxi-kolavénico (**57**), plectornatina A (**58**) y el triterpenoide akaterpina (**59**).^[19]

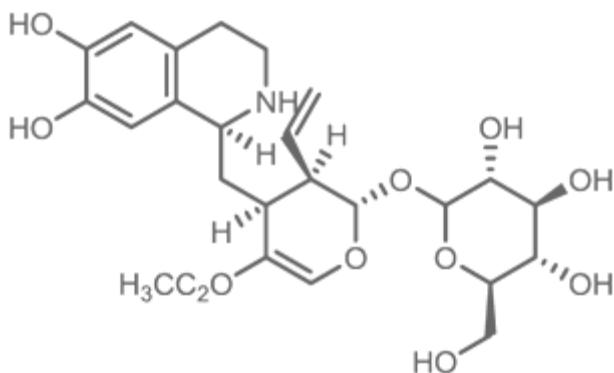
**53****54**



Se ha demostrado en estudios previos que el ácido rinocerotinoico (**55**), el cual es un diterpeno de tipo labdano posee actividad antiinflamatoria.^[19]

2.2.3. *Plectranthus madagascariensis* Benth.

La especie *P. madagascariensis* es una planta nativa de los bosques de Asia tropical y Australia, conocida popularmente como incienso y es utilizada comúnmente como planta ornamental debido a su belleza, en la India se emplea en casos de escalofríos, dolor, alopecia y en heridas.^[46] En un estudio realizado se aislaron del extracto acuoso de las hojas de la planta los compuestos ácido rosmarínico (**25**) y *N*-Diacetilisoipecosido (**60**), estos fueron identificados por cromatografía líquida acoplado a masas, donde el 40% de los componentes del extracto corresponde al ácido rosmarínico.^[9]



60

2.2.4. *Plectranthus verticillatus* Druce.

Plectranthus verticillatus es una especie nativa de África, conocida comúnmente como “planta del dinero” y “millonaria” en Venezuela. La composición química de esta especie ha sido poco estudiada ya que generalmente es utilizada con fines ornamentales, y no se ha reportado ningún uso medicinal.^[47] Un estudio realizado en Portugal a diversas especies de *Plectranthus* mostró que el extracto acuoso de *P. verticillatus* contiene una

gran proporción de ácido rosmarínico **(25)** y *N*-Diacetilisoipecosido **(60)** además de una moderada actividad antioxidante.^[9]

Un estudio fitoquímico realizado mostró que el extracto acetónico obtenido por maceración de las hojas de *P. verticillatus* posee actividad antimicrobiana exclusivamente en bacterias gran-positivas, la actividad fue probada en las bacterias gran positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y gran negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.^[48]

2.2.5. *Plectranthus scutellariodes* Codd

Plectranthus scutellariodes crece ampliamente en diversas regiones del mundo, es originaria de Asia, en Venezuela es usada principalmente como una planta ornamental debido a que posee vistosos colores, en otras partes del mundo como en Indonesia tiene una larga historia de usos terapéuticos tradicionales, para curar diversas enfermedades como la malaria, además es una especie conocida para el tratamiento de las hemorroides, regulador de la menstruación y potenciador de apetito. En un estudio realizado a la planta, se determinó que esta especie contiene taninos, flavonoides, terpenoides, saponinas y esteroides, uno de los compuestos que ha sido identificado por HPLC en el extracto hidrometanólico de las hojas de *Plectranthus scutellariodes* ha sido la quercetina **(35)**, el cual se encontró en la especie en una proporción del 0,05%.^[49-51]

En un estudio farmacológico realizado se examinó la actividad que posee la quercetina en la respuesta inflamatoria inducida por carragenina en ratas, la dosis efectiva fue de 10 mg/Kg, comprobando así que la quercetina posee propiedades antiinflamatorias.^[51]

2.2. Especie *Plectranthus neochilus* Schltr.

2.2.1. Clasificación de la especie *Plectranthus neochilus* Schltr.

- Reino: Plantae
- Subreino: Tracheobionta
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Asteridae
- Orden: Lamiales
- Familia: Lamiaceae
- Subfamilia: Nepetoideae
- Tribu: Ocimeae
- Género: *Plectranthus*
- Especie: *P. neochilus* Schlechter.



Figura 2. *Plectranthus neochilus* Schltr

La especie *Plectranthus neochilus* (Figura 2) pertenece a la familia Lamiaceae, conocida como boldo pequeño, boldo aromático, boldo rastrero o boldo gamba, es una planta ornamental, aromática y medicinal de muy rápido crecimiento, no sobrepasa los 50 cm de altura aunque consigue mediante la autoreproducción un buen tamaño a lo

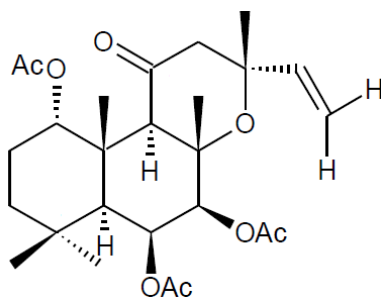
ancho como planta tapizante. Posee una prolongada floración en espiga de color azul púrpura o violeta, llegando a producirla durante muchos meses del año en los climas cálidos; puede encontrarse creciendo de forma natural en parajes agrestes o rocosos, sus hojas son redondeadas y ligeramente onduladas. Manifiesta una gran resistencia a la falta de agua, necesitando sólo riegos ocasionales y además, tolera las heladas moderadas. Es ampliamente cultivada en algunos países y utilizada en la medicina popular como tratamiento para diversas dolencias por su propiedades farmacológicas.^[8]

En Venezuela, es conocida como acetaminofén, atamel o ibuprofeno ya que popularmente se dice que causa los mismos efectos al organismo que el compuesto sintético acetaminofén al ingerir sus hojas en forma de infusión o te.^[3] *P. neochilus* es también se utilizada para el dolor de estómago y problemas de digestión y en países, como Brasil, es empleado para tratar la insuficiencia hepática y la dispepsia.^[52-53] Debido a las similitudes morfológicas esta especie es usualmente confundida con la especie *P. ornatus*.

2.2.2. Compuestos aislados de la especie *Plectranthus neochilus*.

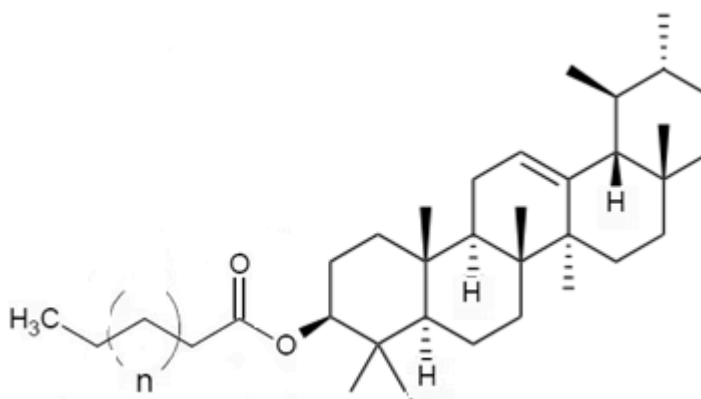
Los estudios fitoquímicos realizados en la especie han mostrado la presencia de diversos compuestos con propiedades medicinales, uno de ellos realizado en Portugal muestra la presencia de ácido rosmarínico **(25)**, el cual posee actividad antiviral, antibacteriana, efecto antioxidante y actividad antiproliferativa. Este compuesto fue aislado del extracto acuoso de las hojas de la planta, el cual sufrió un tratamiento de decocción, y fue separado y caracterizado por cromatografía líquida acoplado a masas.^[9]

Un estudio fitoquímico realizado en Brasil de la fracción de tolueno del extracto etanólico de las hojas y ramas de la especie mostró la presencia de un metabolito secundario conocido como 1,6-di-O-acetil-9-deoxiforskolina (**61**), este fue purificado por cromatografía de columna y caracterizado con espectros de RMN ^1H y ^{13}C en ^1D y ^2D .^[54]

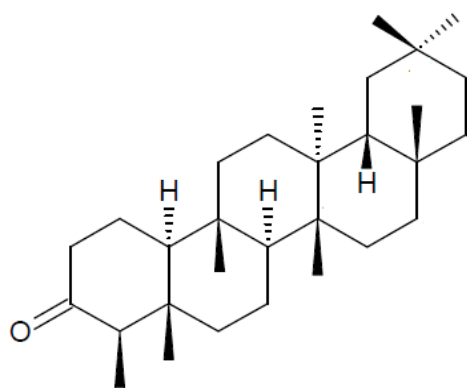


61

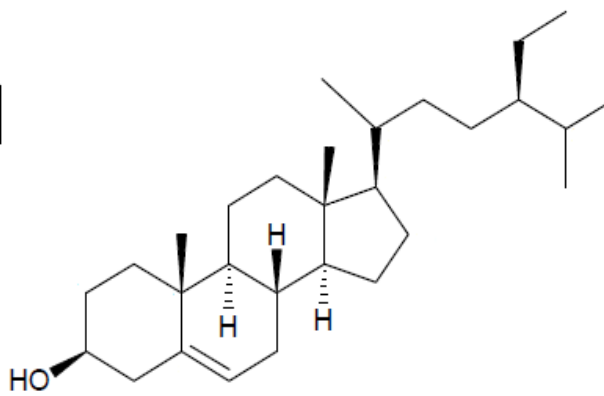
Otro estudio fitoquímico realizado, también en Brasil, mostró que el extracto de hexano de las hojas y tallos de *P. neochilus* contenía dos triterpenos: α -amirina esterificada (**62**) y friedelina (**63**), además de la mezcla de los esteroides β -sitosterol (**64**) y estigmasterol (**65**) y del extracto de acetato de etilo, se aisló una flavona metoxilada en las posiciones C-6 y C-7, conocida como cirsimartina (**66**).^[8]



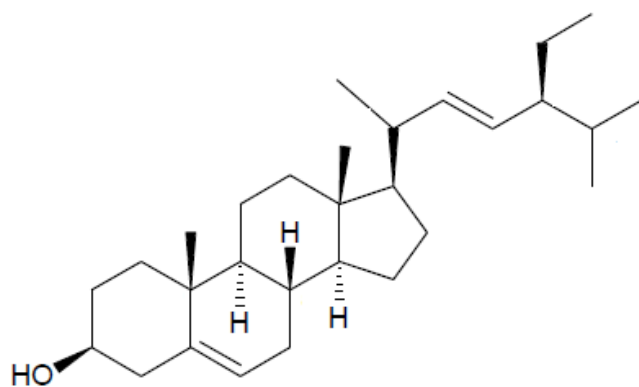
62



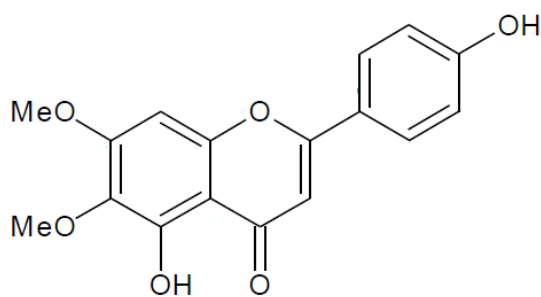
63



64



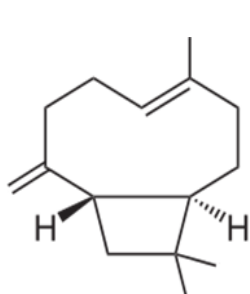
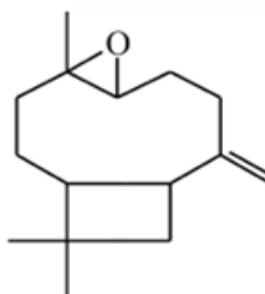
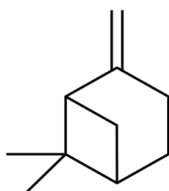
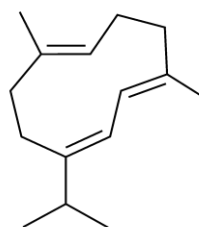
65



66

Algunos de los estudios farmacológicos realizados a *P. neochilus* en Portugal han demostrado que el extracto acuoso de las hojas de la especie posee propiedades antioxidantes, la cual se atribuye principalmente a la presencia del ácido rosmarínico (25).^[9]

Entre los aceites esenciales mayoritarios aislados de *P. neochilus* se encuentran *trans*-cariofileno (**67**), óxido de cariofileno (**68**), α -pineno (**69**), β -pineno (**70**) y germacreno D (**71**).

**67****68****69****70****71**

El aceite esencial de *P. neochilus* muestra prometedora actividad antimicrobiana frente a algunas bacterias cariogénicas, incluyendo *Streptococcus mutans*, que es uno de los principales agentes causantes de caries dentales.^[55]

3. JUSTIFICACIÓN

Plectranthus neochilus, perteneciente a la familia Lamiaceae, es una especie nativa de África, conocida comúnmente en Venezuela como atamel, acetaminofén e ibuprofeno,^[3] el nombre se le atribuye ya que tradicionalmente es usado como analgésico y antipirético, al igual que el compuesto sintético acetaminofén, con relación a *P. neochilus* son escasos los estudios fitoquímicos y farmacológicos reportados en la literatura conforme a su composición química y actividad analgésica. Esta especie nunca ha sido estudiada en Venezuela, por ello, con el objetivo de dejar registro de su composición química, se ha propuesto llevar a cabo el estudio fitoquímico de las hojas frescas de esta planta, además de realizar la evaluación de su toxicidad aguda y actividad analgésica. Por tal motivo, se considera que el estudio de *P. neochilus* puede representar un aporte al campo de los productos naturales, a la comunidad, a la medicina y a la industria farmacéutica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

1. Realizar el estudio fitoquímico de los compuestos mayoritarios de los extractos orgánicos de las hojas frescas de la especie *Plectranthus neochilus* y evaluar la toxicidad aguda y la actividad analgésica del extracto acuoso liofilizado.

4.2. Objetivos Específicos:

1. Preparar el extracto acuoso liofilizado de las hojas frescas de *Plectranthus neochilus*.
2. Preparar los extractos orgánicos de hexano, diclorometano y metanol, haciendo uso de la extracción por Soxhlet.
3. Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas, los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos de hexano y metanol de las hojas frescas de *Plectranthus neochilus*.
4. Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C en 1D, DEPT-135, IR y GC-MS.
5. Evaluar la toxicidad aguda del extracto acuoso liofilizado de *P. neochilus* y obtener la dosis tóxica cincuenta (DT_{50}).

6. Evaluar la actividad analgésica del extracto acuoso liofilizado de *P. neochilus*, por tres métodos diferentes: método químico, método térmico y prueba de formalina.
7. Determinar la citotoxicidad del extracto acuoso liofilizado de *P. neochilus* en células neuroblastoma humanas (SY-SY5Y) a través del método de Mosman.
8. Realizar el estudio de la actividad antioxidante del extracto acuoso liofilizado de *P. neochilus*, por el método de captación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Instrumentos

- ✓ Espectrómetro de RMN ECLIPSE-JEOL 270 MHz (Laboratorio de RMN, Facultad de Farmacia. U.C.V.).
- ✓ Rotavapor BÜCHI modelo B-480.
- ✓ Lámpara de UV en dos longitudes de onda (λ 254 nm y 365 nm) UVP modelo UL3101.
- ✓ Balanza analítica OHAUS.
- ✓ Equipo de IR modelo Jeol 270.
- ✓ Equipo de GC-MS Agilent technology 6890 network.
- ✓ Espectrofotómetro BioRad, modelo Berchmark.
- ✓ Liofilizador Virtis Advantage serie 2.0.

5.2. Materiales

5.2.1. Solventes

- ✓ Acetato de etilo (AcOEt). p.a.
- ✓ Metanol (CH₃OH). p.a
- ✓ Diclorometano (CH₂Cl₂). p.a.
- ✓ Hexano (C₆H₁₄). p.a
- ✓ Acetonitrilo (CH₃CN). p.a

5.2.2. Solventes para análisis de RMN

- ✓ Cloroformo deuterado (CDCl_3).
- ✓ Metanol deuterado (CD_3OD).
- ✓ Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6).

5.3. **Material para cromatografía**

- ✓ Sílica gel G60 para cromatografía de columna (CC), 0,06-0,2 mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.
- ✓ Placas de sílica gel para cromatografía de capa fina (CCF) Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄, 20x20 cm. 0,20 mm de espesor.

5.3.1. Reveladores

- ✓ *p*-anisaldehído: 5 mL de *p*-anisaldehído con 90 mL de EtOH, 5 mL de H_2SO_4 y 1 mL de CH_3COOH glacial.

5.4. **Metodología experimental en el estudio fitoquímico de las hojas frescas de *Plectranthus neochilus*.**

El estudio fitoquímico de las hojas frescas de la planta *P. neochilus* se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia, U.C.V.

5.5. Colecta del material vegetal

Las hojas de la planta *P. neochilus* fueron colectadas el 16 de Marzo del año 2015 en el jardín medicinal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela, e identificada por la Profa. Giovannina Orsini. Un ejemplar representativo de la muestra identificada con el código MYF28987, ha sido depositado en el Herbario "Dr. Víctor Manuel Ovalles" de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

5.6. Preparación de la muestra

La muestra fue dividida en tallos y hojas, el objeto de este trabajo consistió en el estudio de las hojas frescas de la especie, por lo que luego de recolectada, las hojas fueron mecánicamente fragmentadas en trozos del menor tamaño posible.

5.7. Obtención del extracto acuoso liofilizado de *Plectranthus neochilus*

Las hojas frescas de *P. neochilus*, fueron sometidas a una decocción en agua, para ello 540,0 g de las hojas frescas finamente cortadas, se añadieron a un beacker con 1000,0 mL de agua destilada y se colocaron en una plancha de calentamiento, dejándose ebulir durante 30 min, el extracto obtenido se filtró al vacío y posteriormente se liofilizó. Para el proceso de liofilización la muestra fue previamente congelada a -70°C por una hora y media y se liofilizó por 48 h, debido a que la muestra aún poseía hielo, esta se liofilizó nuevamente por 48 h mas, obteniéndose un total de 16,98 g de extracto, con este extracto se realizaron los ensayos de toxicidad aguda y las actividades farmacológicas.

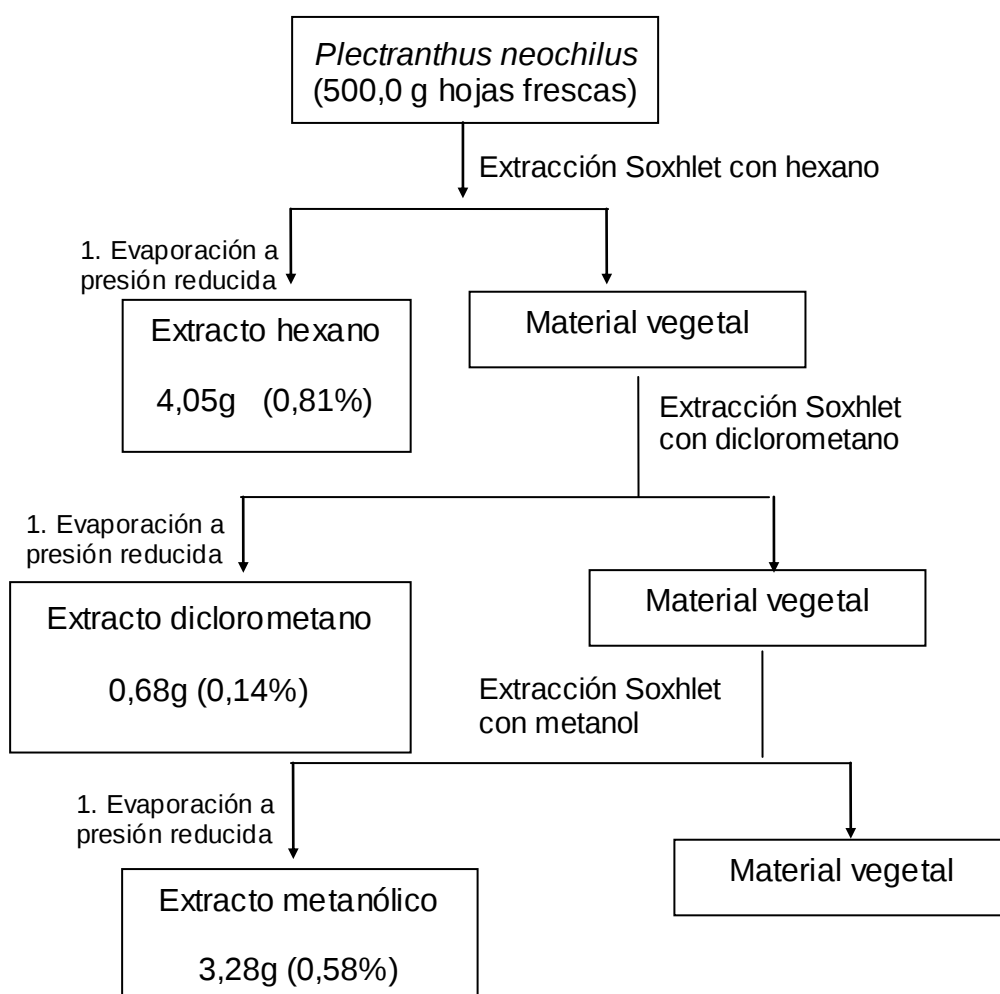
5.8. Obtención de los extractos orgánicos de *Plectranthus neochilus*

Las hojas de *Plectranthus neochilus* fueron sometidas a una extracción por Soxhlet (Esquema 1), obteniendo así los diferentes extractos orgánicos, para ello se utilizaron 500,0 g de las hojas finamente cortadas, y aproximadamente 2000,0 mL de cada solvente. Se utilizaron los solventes de acuerdo a su polaridad, empezando la extracción con *n*-hexano (Hx), continuando con diclorometano (CH₂Cl₂) y finalmente metanol (CH₃OH). El proceso se realizó hasta que el solvente de extracción se observó incoloro. Posteriormente cada extracto se sometió a una destilación a presión reducida, concentrando el extracto y llevándolo a sequedad total (Tabla 1).

Tabla 1. Masa y porcentaje de los extractos orgánicos obtenidos a partir de las hojas frescas de la especie *P. neochilus*.

Solvente	Extracto obtenido [g]	% extracto obtenido respecto al material de partida
Hexano	4,05	0,81
Diclorometano	0,69	0,14
Metanol	2,88	0,58

De acuerdo a la masa obtenida de cada uno de los extractos, se decidió realizar el estudio fitoquímico solo de los extractos metanólico y hexanoico. El estudio se inició con el extracto de metanol, ya que, entre los dos extractos de estudio, el metanólico posee una polaridad cercana a la del agua, esto a fin de encontrar metabolitos secundarios bioactivos que sean responsables de las propiedades medicinales que se le atribuyen al extracto acuoso de las hojas frescas de *P. neochilus*.



Esquema 1. Proceso de extracción de los extractos orgánicos de las hojas de *Plectranthus neochilus*

5.9. Fraccionamientos de los extractos orgánicos de *Plectranthus neochilus*.

5.9.1. Fraccionamiento del extracto metanólico

La fracción de metanol obtenida, una vez concentrada hasta completa sequedad, se analizó a través de CCF para encontrar las condiciones óptimas necesarias para la mejor separación de los compuestos mayoritarios de la especie de estudio. La separación de esta fracción se realizó mediante cromatografía en columna (CC) de fase normal, empleando como fase estacionaria sílica gel en una proporción 1:40 (peso de muestra a peso de sílica) y como fase móvil inicial Hx, posteriormente fueron empleadas mezclas Hx:CH₂Cl₂ (70:10), aumentando progresivamente la polaridad de la fase móvil, pasando por CH₂Cl₂ puro, luego mezclas CH₂Cl₂:CH₃OH (98:2 – 95:5) y finalmente CH₃OH puro, tal como lo indica la Tabla 2.

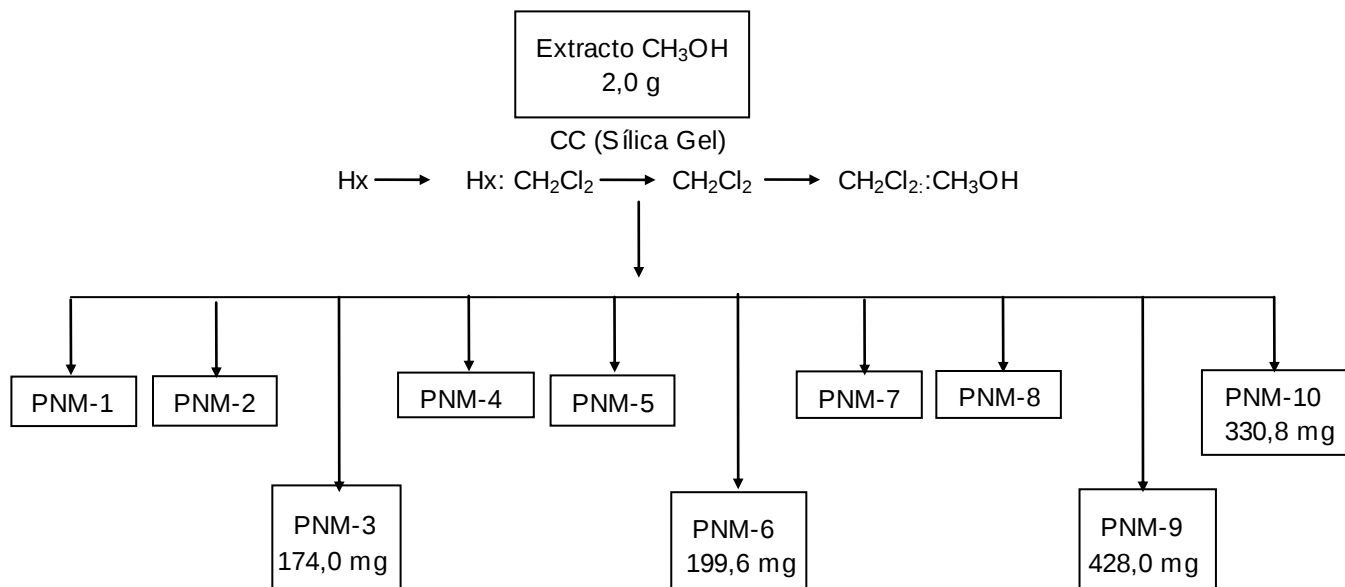
Tabla 2. Solventes utilizados en el fraccionamiento del extracto metanólico.

Fracción	Solvente de elución	Volumen [mL]
1 – 26	Hexano	100,0
27 – 76	Hexano:diclorometano 70:10	250,0
77 – 111	Hexano:diclorometano 50:10	250,0
112 – 118	Hexano:diclorometano 20:10	50,0
119 – 140	Diclorometano	150,0
141 – 158	Diclorometano:metanol 98:2	100,0
159 – 171	Diclorometano:metanol 95:5	50,0
172 – 187	Metanol	100,0

Fueron sembrados aproximadamente 2,0 g del extracto de metanol en la columna cromatográfica, donde se obtuvieron 187 fracciones con un volumen alrededor de 5,0 mL cada una, las cuales fueron monitoreadas mediante cromatografía de capa fina (CCF) empleando como revelador *p*-anisaldehído, en base a los resultados obtenidos se reagruparon en 10 subfracciones: PNM-1; PNM-2; PNM-3; PNM-4; PNM-5; PNM-6; PNM-7; PNM-8, PNM-9 y PNM-10 (Tabla 3) las fracciones estudiadas fueron PNM-3; PNM-6; PNM-9 y PNM-10 (Esquema 2).

Tabla 3. Masa y porcentaje de las fracciones agrupadas en el fraccionamiento del extracto de Metanol.

Grupo de subfracciones	Fracciones combinadas	Masa [mg]	% obtenido con respecto al extracto sembrado
PNM-1	1 – 10	68,4	3,4
PNM-2	11 – 18	55,5	2,8
PNM-3	19 – 46	174,0	8,7
PNM-4	47 – 94	118,9	6,0
PNM-5	95 – 124	130,2	10,0
PNM-6	95 – 136	199,6	6,5
PNM-7	137 – 144	92,6	4,6
PNM-8	145 – 150	95,8	4,8
PNM-9	151 – 179	428,0	21,4
PNM-10	180 - 187	330,8	16,5

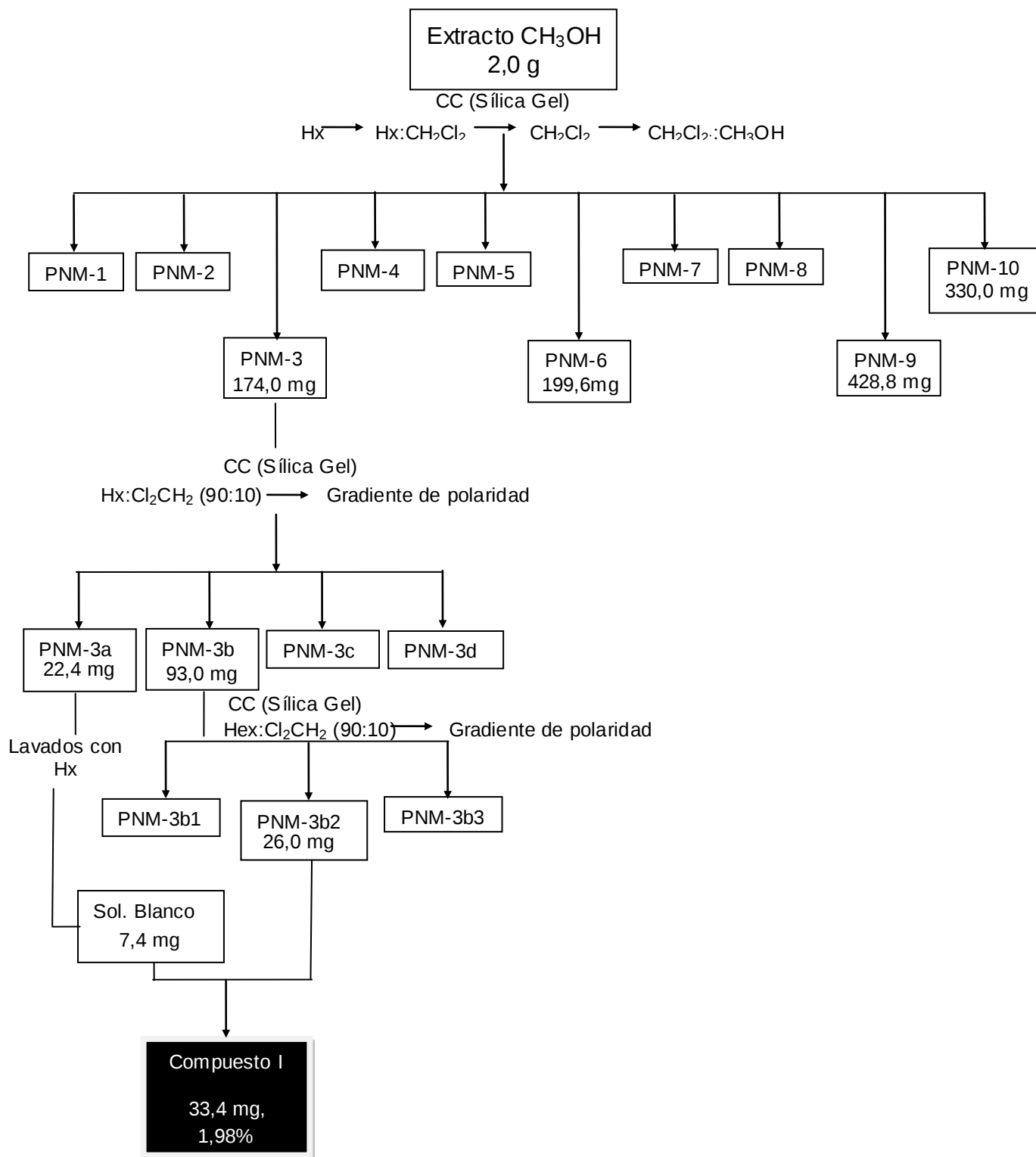


Esquema 2. Fraccionamiento del extracto metanólico.

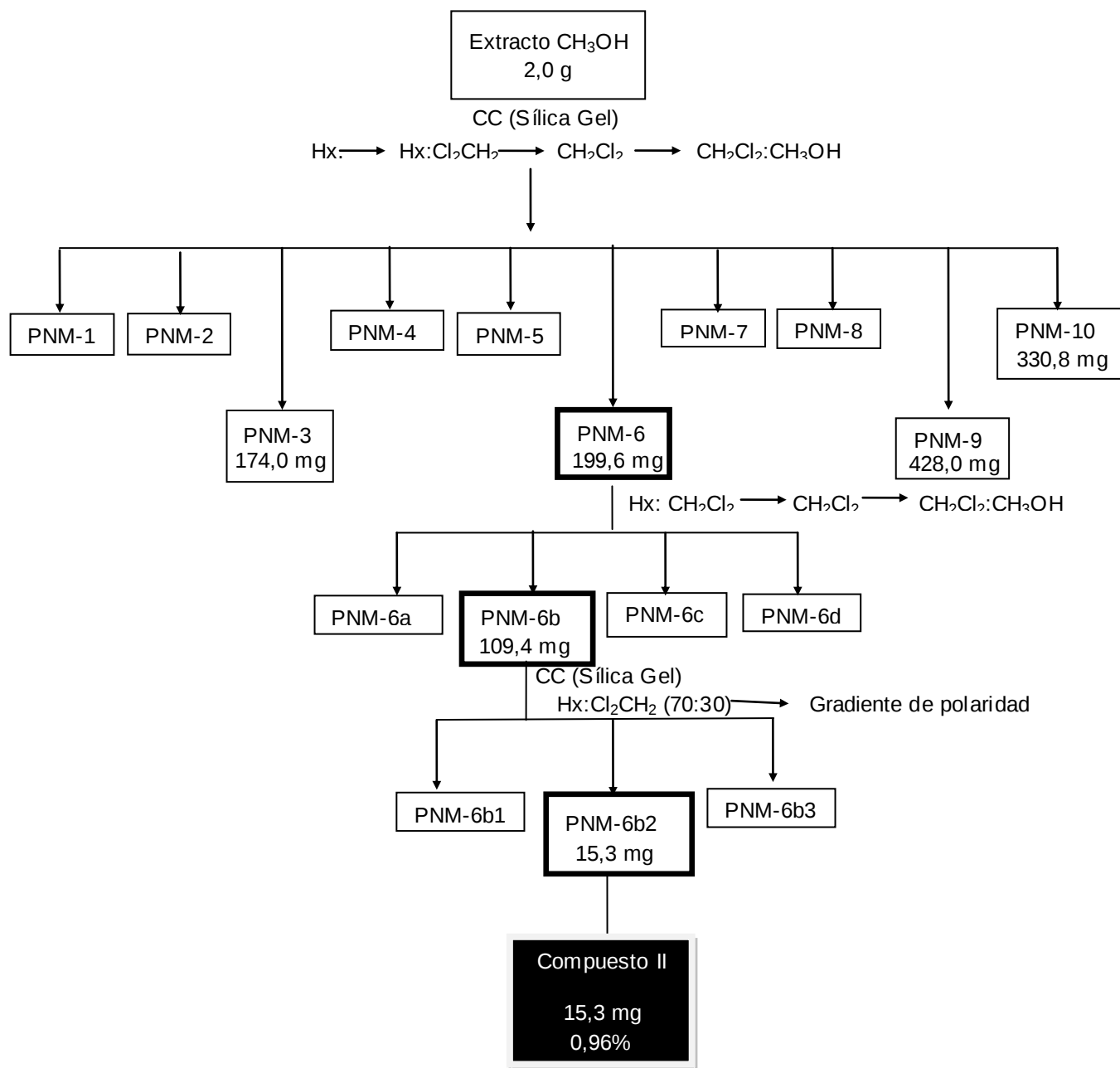
La subfracción PNM-3, fue sometida a una separación mediante cromatografía de columna de fase normal, utilizando sílica gel como fase estacionaria en una proporción 40:1 (sílica gel/muestra), se inició la elución de la columna con una mezcla Hx-CH₂Cl₂ (90:10) y se fue aumentando gradualmente la polaridad hasta CH₂Cl₂ puro. De esta columna se obtuvieron 45 fracciones las cuales fueron agrupadas en cuatro subfracciones: PNM-3a, PNM-3b, PNM-3c y PNM-3d. La subfracción PNM-3a se rotavaporó obteniéndose 22,2 mg de un sólido blanco impuro, al cual se le hicieron continuos lavados con Hx y se obtuvieron finalmente 7,4 mg de un compuesto de interés, el cual se tornaba morado al ser revelado con *p*-anisaldehído (compuesto I). Debido a la poca masa de dicho compuesto, se realizó una columna de purificación con una mezcla Hx-CH₂Cl₂ (90:10), de la subfracción PNM-3b que contenía 93,0 mg obteniéndose 26,0 mg del compuesto de interés, finalmente se aislaron 33,4 mg del

compuesto I, el cual representa un 1,98% con respecto al extracto de metanol sembrado inicialmente en la columna (Esquema 3).

La subfracción PNM-6 se trató con una CC en fase normal empezando con una fase móvil de Hx:CH₂Cl₂ (70:30) y aumentando gradualmente la polaridad hasta finalmente eluir con CH₂Cl₂ puro. De esta columna se obtuvieron 85 fracciones que fueron agrupadas en 6 subfracciones: PNM-6a, PNM-6b, PNM-6c, PNM-6d, PNM-6e y PNM-6f. La subfracción PNM-6b que contenía 109,4 mg fue sometida a una columna de purificación de fase normal usando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla Hx:CH₂Cl₂ (70:30) y gradiente de polaridad como fase móvil, obteniéndose 15,3 g de un compuesto de interés (compuesto II), el cual es un líquido viscoso amarillento soluble en diclorometano que revela violeta con *p*-anisaldehído y representa el 0,96% con respecto al extracto sembrado en la columna (Esquema 4).



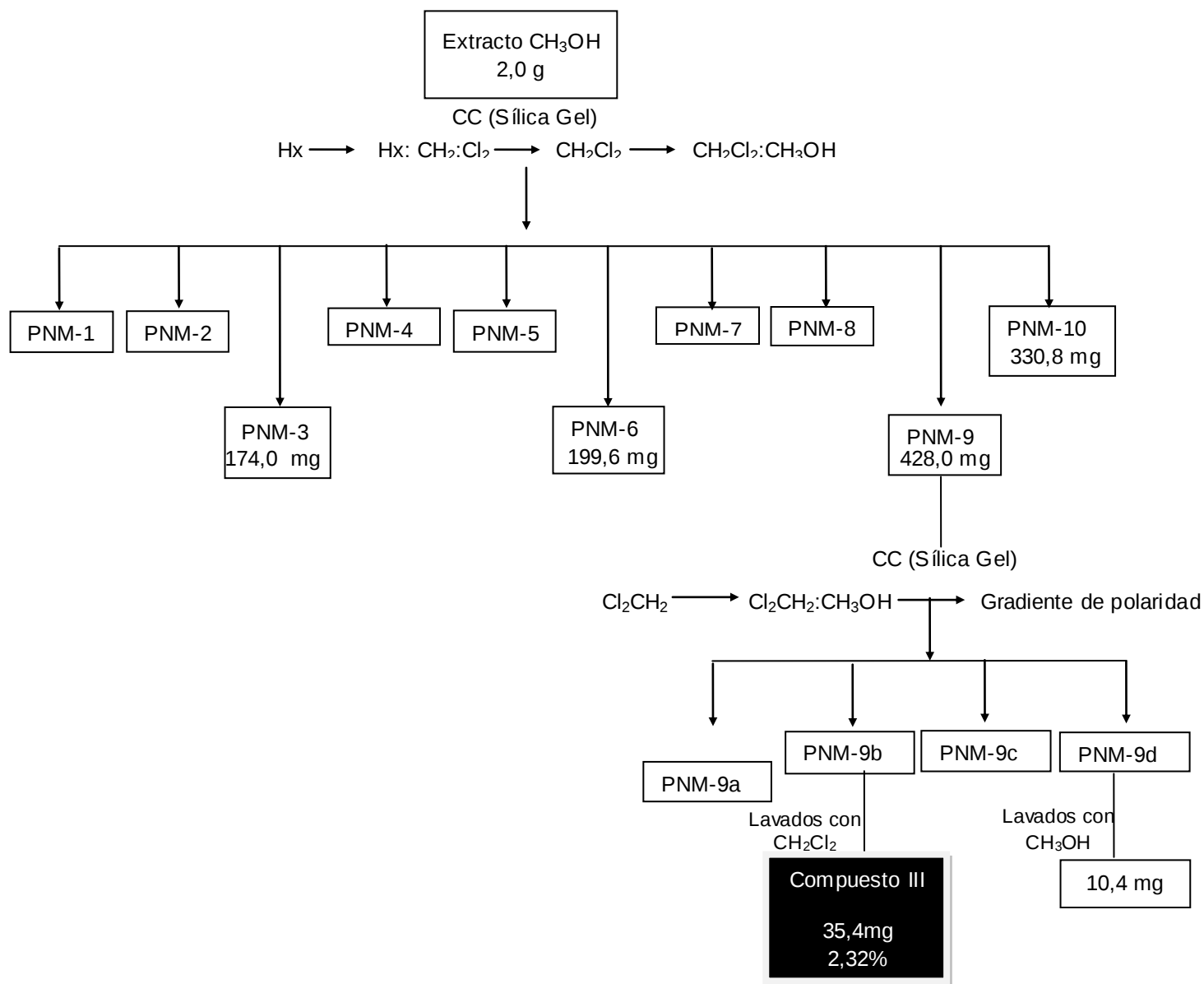
Esquema 3. Obtención del compuesto I.



Esquema 4. Obtención del compuesto II.

La subfracción PNM-9, se sometió a una columna de separación cromatográfica de fase normal, usando como fase estacionaria sílica gel y CH_2Cl_2 como solvente de elución inicial, posteriormente se utilizaron mezclas $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (100:10, 70:10, y 50:10), luego CH_3NH_2 y finalmente CH_3OH , de esta columna se obtuvieron 60 fracciones, las cuales fueron agrupadas en cuatro subfracciones: PNM-9a, PNM-9b, PNM-9c y PNM-9d. La subfracción PNM-9b fue sometida a lavados con CH_2Cl_2 , este era un sólido blanco cristalino soluble en H_2O y parcialmente soluble en CH_3OH (compuesto III), de este compuesto se obtuvieron 35,4 mg. La subfracción PNM-9d fue tratada con lavados con metanol, obteniendo así un compuesto puro soluble en H_2O , del cual se aislaron 10,4 mg, masa insuficiente para ser analizado por RMN ^{13}C (Esquema 5).

La subfracción PNM-10 poseía una masa de 330,8 mg, se pudo observar en esta subfracción que la mayoría de los compuestos eran solubles en agua, y se comportaban como sales inorgánicas, de esta fracción se aislaron 50,3 mg de un sólido blanco cristalino, soluble en agua, el cual no era de interés en este estudio, por tratarse de una sal inorgánica. El resto de las fracciones no fueron objeto de estudio debido a que al ser evaluadas, se observó que tenían poca masa con respecto a la cantidad de compuestos que se visualizaba en dicha fracciones al ser observados por CCF y analizado con luz ultravioleta y el revelador *p*-anisaldehído.



Esquema 5. Obtención del compuesto III.

5.9.2. Fraccionamiento del extracto hexanoico

El extracto de hexano obtenido, una vez concentrado hasta completa sequedad, se analizó a través de CCF para así encontrar las condiciones óptimas necesarias para la mejor separación de los compuestos mayoritarios. La separación de esta fracción se realizó mediante CC de fase normal, empleando como fase estacionaria sílica gel en una proporción 1:40 (peso de muestra a peso de sílica) y como fase móvil inicial Hx posteriormente la CC fue eluída con mezclas Hx:CH₂Cl₂ (70:30), aumentando progresivamente la polaridad de la fase móvil, pasando por CH₂Cl₂ puro, luego mezclas CH₂Cl₂:CH₃OH y finalmente CH₃OH puro (Tabla 4).

Tabla 4. Solventes utilizados en el fraccionamiento del extracto hexanoico.

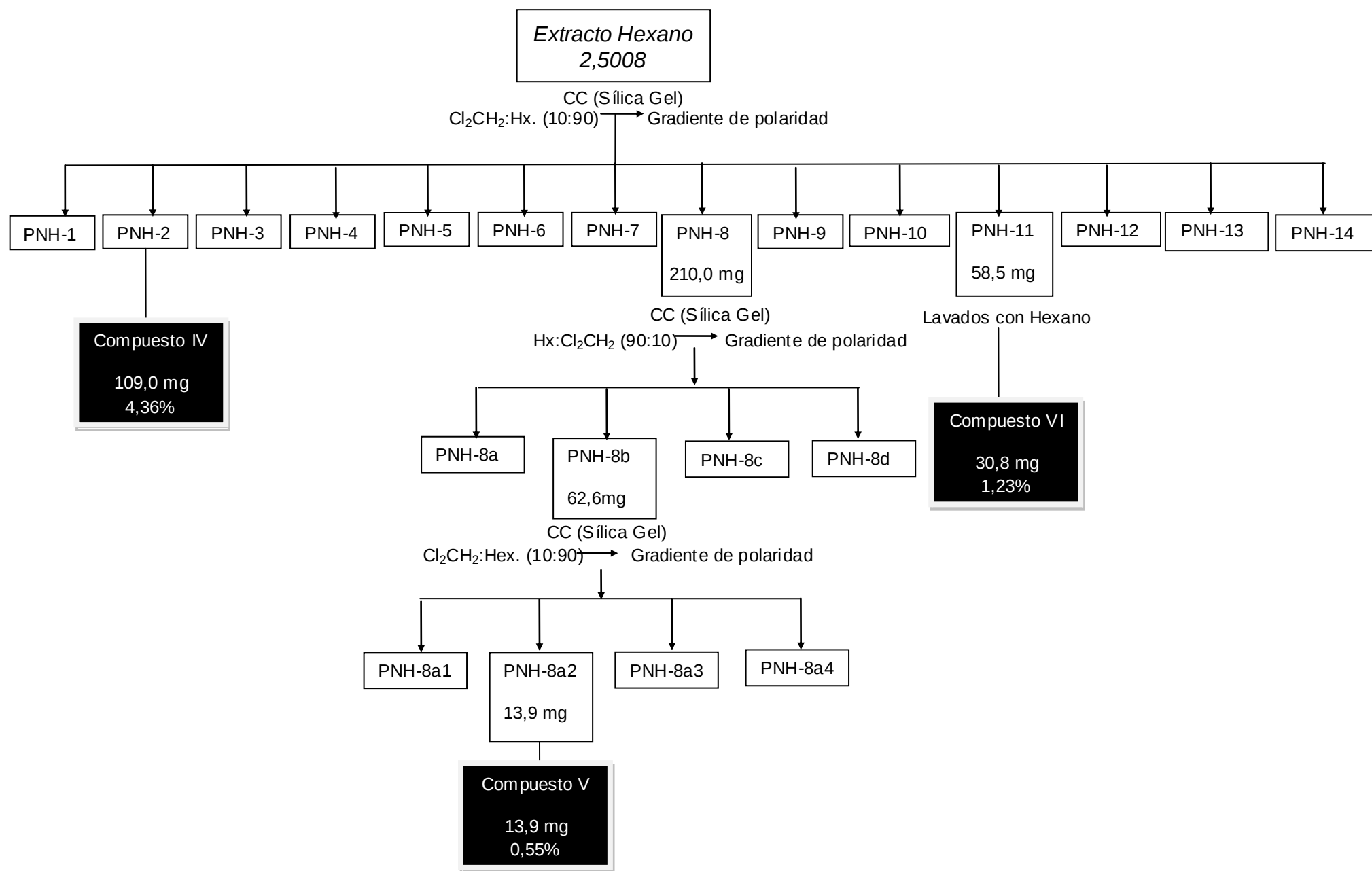
Fracciones	Solvente	Volumen utilizado [mL]
1 – 5	Hexano	100,0
5 – 10	Hexano:Diclorometano 70:30	100,0
11 – 19	Hexano:Diclorometano 50:50	100,0
20 – 26	Hexano:Diclorometano 30:70	100,0
27 – 48	Diclorometano	150,0
49 – 58	Diclorometano:metanol 98:2	50,0
58 – 70	Diclorometano:metanol 96:4	50,0
70 – 84	Diclorometano:metanol 96:6	150,0
85 – 93	Metanol	100,0

Se sembraron alrededor de 2,5 g del extracto de Hx en la columna cromatográfica, de la cual se obtuvieron 93 fracciones que fueron agrupadas en 15 subfracciones de aproximadamente 10,0 mL cada una: PNH-1; PNH-2; PNH-3; PNH-4; PNH-5; PNH-6; PNH-7; PNH-8, PNH-9, PNH-10, PNH-11, PNH-12, PNH-13 y PNH-14 (Tabla 5) de acuerdo al factor de retención (R_f) de las manchas en CCF y su coloración al ser revelado con *p*-anisaldehído.

Tabla 5. Masa y porcentaje de las fracciones agrupadas del extracto de Hexano.

Fracciones combinadas	Grupo de fracciones	Masa [mg]	% obtenido
PNH-1	1-3	72,3	2,9
PNH-2	4	109,0	4,4
PNH-3	5-8	65,6	2,6
PNH-4	9-10	91,7	3,7
PNH-5	11-14	128,6	5,1
PNH-6	15-20	61,3	2,5
PNH-7	21-26	58,5	2,3
PNH-8	27-39	210,0	8,4
PNH-9	40-45	51,3	2,1
PNH-10	46-53	49,6	2,0
PNH-11	54	44,6	1,8
PNH-12	55-56	251,8	10,1
PNH-13	57-67	186,5	7,5
PNH-14	68-75	140,5	5,6
PNH-15	76-93	90,4	3,6

La subfracción PNH-2 la cual es soluble en hexano, se trató de un metabolito secundario, el cual al ser evaluado por CCF y *p*-anisaldehído se mostraba como un compuesto puro (compuesto IV), de esta subfracción se obtuvieron 109,2 mg. La subfracción PNH-8 fue tratada con una columna de separación, utilizando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla Hx:CH₂Cl₂ (90:10) como fase móvil inicial, con gradiente de polaridad pasando por CH₂Cl₂ puro y finalmente CH₂Cl₂:CH₃OH (95:5), donde se obtuvieron 4 subfracciones: PNH-8a, PNH-8b, PNH-8c y PNH-8d. De la subfracción PNH-8b se obtuvieron 62,6 mg posteriormente se sometió a una CC de purificación con sílica gel como fase estacionaria y Hx:CH₂Cl₂ (90:10) como fase móvil obteniéndose 13,9 mg de un compuesto puro, el cual revela morado al ser sometido a *p*-anisaldehído y calor (compuesto V). Finalmente a la fracción PNH-11 se le hicieron lavados con Hx obteniéndose 30,8 mg del compuesto VI. Las fracciones que no fueron estudiadas es debido a que poseían poca masa en relación a la gran cantidad de compuestos que pudieron ser visualizados por CCF (Esquema 6).



Esquema 6. Fraccionamiento del extracto de hexano

5.10. Estudios farmacológicos del extracto acuoso liofilizado de las hojas frescas de *Plectranthus neochilus*

5.10.1. Determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso.

Se emplearon ratones machos albinos de la cepa CD1, procedentes del Bioterio del Instituto de Higiene Rafael Rangel (MPPPS). Después de una semana de aclimatación con libre acceso a comida y agua a voluntad se procedió a realizar el ensayo. Los estudios se realizaron cumpliendo las guías de buenas prácticas para el cuidado y uso de animales de laboratorio (FONACIT).^[56]

Para la determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso liofilizado de *P. neochilus* (EAL), se utilizó el método descrito por Litchfield y Wilcoxon (1949),^[57] con ligeras modificaciones. Para ello se administraron por vía oral con una cánula intragástrica dosis únicas decrecientes de 5,0; 4,0; 2,5; 1,8 y 1,25 g/Kg del extracto acuoso de *P. neochilus*, utilizando un volumen máximo de 0,1 mL por 10 gramos de peso y un total de 5 ratones por grupo. Una vez administrado el extracto, los animales fueron observados a los 10, 30, 60, 90 min y 24 h registrándose cualquier síntoma tóxico y comparando con el grupo control (agua destilada).

Las observaciones clínicas a los animales incluyeron: apreciación del comportamiento y del estado físico general; se evaluó el equilibrio del animal y se prestó especial atención a la posible ocurrencia de signos como temblores, convulsiones, diarrea, sueño, coma y muerte. El valor de DT₅₀ se determinó utilizando el programa estadístico GraphPad Prisma 3.00.

5.10.2. Determinación de la actividad analgésica del extracto acuoso.

Se utilizaron tres métodos para determinar la actividad analgésica del EAL, el método químico, el método térmico y La prueba de la formalina. Se emplearon ratones albinos machos de la cepa CD1, con un peso promedio entre 20,0 y 26,0 g para evaluar la actividad analgésica por el método de químico y la prueba de la formalina. Para el método térmico se utilizaron ratas hembras Sprague Dowley con un peso entre 280,0 - 300,0 g. Después de una semana de aclimatación con libre acceso a comida y agua a voluntad se realizaron los ensayos. Se evaluaron dosis menores a la DT_{50} ($1/2$, $1/4$ y $1/8$ de la DT_{50}). La evaluación de la actividad nociceptiva por el método químico y la prueba de formalina, fue realizada en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia (UCV, Caracas - Venezuela), bajo la tutoría de la Dra. Fátima Torrico. La evaluación de la actividad analgésica por el método térmico fue realizada por el Dr. Hector Zerpa y se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Farmacología Cardiovascular de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UCV, Maracay - Venezuela).

5.10.2.1. Método químico: contorciones abdominales inducidas por ácido acético.

La nocicepción fue inducida por una inyección intraperitoneal de ácido acético al 0,6% siguiendo el método propuesto por Koster y col. (1959)^[58] con ligeras modificaciones, el volumen suministrado de ácido consistió en 0,1 mL por cada 10 g de peso corporal. Se trabajaron con grupos de 5 ratones, los cuales fueron tratados con las distintas dosis del extracto de *P. neochilus* por vía oral, 30 min antes de la inyección del ácido acético. El grupo control no recibió el extracto. Se evaluó como respuesta el número de contorsiones abdominales durante un período de 30 min, después de 5 min de la inyección del ácido acético. Como fármacos de referencia se utilizaron ketoprofeno, aspirina y tramadol. El ketoprofeno (casa comercial) fue administrado a la dosis de 8

mg/Kg, por vía intraperitoneal (v.i.) en solución fisiológica, media hora antes de la inyección de ácido acético. La aspirina (Bayer) fue utilizada en dos dosis: 100 mg/Kg y 200 mg/Kg, utilizando como vehículo goma arábica y fue suministrado por vía oral (v.o). Ambos medicamentos, ketoprofeno y aspirina, fueron administrados media hora antes de la administración de ácido acético. El tramadol (casa comercial) fue empleado en una dosis de 5 mg/Kg (v.o), utilizando como vehículo goma arábica, cinco minutos antes de la inyección de ácido acético. El porcentaje de actividad nociceptiva se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad nociceptiva} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de contracciones abdominales EAL}}{\text{N}^{\circ} \text{ de contracciones abdominales control}} \times 100\%$$

5.10.2.2. Método térmico: modelo del retiro de la cola

Esta prueba consiste en el registro del tiempo en el cual el ratón retira la cola frente a un estímulo calórico. Los animales se dividieron en tres grupos de 5 ratas cada uno, el grupo I representó el grupo control (agua destilada) y los grupos II y III fueron tratados con 1/2 DT₅₀ del extracto acuoso de *P. neochilus* y el fármaco de referencia (ketoprofeno). El EAL fue administrado por vía oral media hora antes del ensayo, al igual que el ketoprofeno (5 mg/Kg) usando como vehículo goma arábica. El ensayo consistió en introducir al animal en una caja para limitar su movimiento sumergiendo el tercio distal de su cola en agua termostatzada a 52,0 °C con total libertad para retirarla tan pronto sintiese el calor. Se hicieron registros 30 minutos y 240 minutos después de la administración del EAL. Se tomó como respuesta el tiempo en segundos que el animal tarda en retirar la cola del agua.^[59]

5.10.2.3. Prueba de la formalina

Esta prueba consiste en inyectar, de forma subcutánea, 20 µL de formalina (solución diluida de formaldehído al 2,5%), en la pata izquierda y trasera del ratón de acuerdo con el método descrito por Hunskaar y Hole (1987)^[60] con ligeras modificaciones. Se evaluó como respuesta el tiempo que el ratón tarda en lamerse, rascarse o morderse la pata entre los primeros 0 – 5 min (fase temprana) y entre los minutos 15 – 30 (fase tardía). Para evaluar la actividad analgésica del extracto acuoso se administraron las diferentes dosis por vía oral, treinta minutos previos a la administración de la formalina. Cada grupo experimental, recibió una dosis única del extracto acuoso de *P. neochilus* y se evaluaron un total de 5 ratones por dosis. El grupo control se le administró agua destilada. Como fármacos de referencia fueron utilizadas la aspirina (Bayer) a la dosis de 200 mg/Kg (goma arábica), administrada por vía oral media hora antes que la formalina y morfina (Bayer) a la dosis de 5 mg/Kg por vía intraperitoneal cinco minutos antes que el agente nociceptivo. El porcentaje de actividad nociceptiva se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad nociceptiva} = \frac{\text{Tiempo de lamida de la pata EAL}}{\text{Tiempo de lamida de la pata control}} \times 100\%$$

5.10.3. Actividad citotóxica

Fueron utilizadas células neuroblastoma humanas de la línea celular SH-SY5Y, las cuales se cultivaron en un medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bobino y 1% de antibiótico conformado por penicilina y estreptomicina, se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de humedad para permitir la adherencia de las células. Posteriormente 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).^[61]

El método de MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el cual es una sal de color amarillo soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es clivado principalmente por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial presentes en las mitocondrias activas (de células vivas) produciendo cristales de formazán de color azul-violeta oscuro, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método es utilizado para medir la supervivencia y proliferación celular, basándose en la cantidad de células metabólicamente activas, lo cual es proporcional a la cantidad de formazán presente. Este método permite cuantificar en forma de densidad óptica las células vivas después de la aplicación del compuesto, lo que indica que a mayor cantidad de células vivas mayor densidad óptica y menor citotoxicidad. 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* (10, 50, 100 y 500 ppm). Bajo estas condiciones las células se cultivaron (5% CO₂ a 37°C) durante 24, 48 y 72 horas. Al término de cada tiempo de experimentación, el medio fue reemplazado por 100,0 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 100,0 µL de DMSO. La placa se dejó reposar por 30 minutos para que se desarrollara el color y luego se leyó a 570,0 nm en el espectrofotómetro. El porcentaje de actividad citotóxica se determinó mediante la ecuación:

$$\% \text{ actividad citotóxica} = \left(100 - \frac{\text{Absorvancia EAL}}{\text{Absorvancia control}} \right) \times 100\%$$

5.10.4. Actividad antioxidante

5.10.4.1. Actividad atrapadora de anión superóxido

Para la determinación de la capacidad del *P. neochilus* para atrapar O_2^- se empleó la metodología descrita por Bielski y colaboradores (1980).^[62] Este método se basa en la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por el O_2^- generado de la oxidación de la xantina a ácido úrico a través de la xantina oxidasa.

Se preparó una solución de reacción con la siguiente composición: xantina 0,3 mM; NaCO_3 0,4 M y NBT 150,0 μL en amortiguador de fosfato 50 mM (pH 7,0). El ensayo se comenzó colocando en una celda de cuarzo 782,0 μL la mezcla de reacción, 170 μL de extracto (100,0 $\mu\text{g/mL}$) y 170,0 μL de amortiguador de fosfato 50,0 mM (pH 7,0). 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: 170,0 μL de amortiguador de fosfato 50 mM (pH 7,0) 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).^[63] Los resultados fueron expresados como el porcentaje de O_2^- atrapado. El porcentaje de actividad antioxidante fue calculado con la ecuación:

$$\% \text{ actividad antioxidante} = \frac{\text{Absorvancia patrón} - \text{Absorvancia EAL}}{\text{Absorvancia patrón}} \times 100\%$$

5.10.4.2. Actividad atrapadora de peróxido de hidrógeno

La habilidad del extracto acuoso liofilizado para atrapar el peróxido de hidrógeno, se determinó de acuerdo con el método de Ruch y col. (1989).^[64] Una solución de peróxido de hidrógeno (4,0 mM) se preparó en buffer de fosfato (pH 7,4). La concentración de peróxido de hidrógeno se midió espectrofotométricamente a partir de la absorción de radiación a 230,0 nm con una absortividad molar de 81,0 mol L⁻¹ cm⁻¹. A 300,0 µL del extracto acuoso (400,0 mM) se adicionaron 700,0 µL de la solución de H₂O₂. La absorbancia del peróxido remanente por los antioxidantes de la muestra se determinó a 230,0 nm, después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. Una solución del buffer de fosfato, sin peróxido de hidrógeno, se utilizó como blanco. El mayor poder de inhibición del peróxido de hidrógeno se revela con lecturas más bajas de absorbancia.^[65] El porcentaje de actividad antioxidante por el método de atrapamiento de peróxido de hidrógeno fue determinado mediante la ecuación:

$$\% \text{ actividad antioxidante} = \frac{\text{Absorvancia H}_2\text{O}_2 - \text{Absorvancia EAL}}{\text{Absorvancia H}_2\text{O}_2} \times 100\%$$

Los estudios de citotoxicidad y actividad antioxidante fueron realizados por el Dr. Carlos Ciangherotti, en la Unidad de Neuropeptidos, de la Facultad de Farmacia (UCV, Caracas-Venezuela).

5.10.5. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos en los ensayos se trataron mediante el sistema de análisis estadístico GraphPad Prism versión 3.00 para Windows.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Sección Fitoquímica

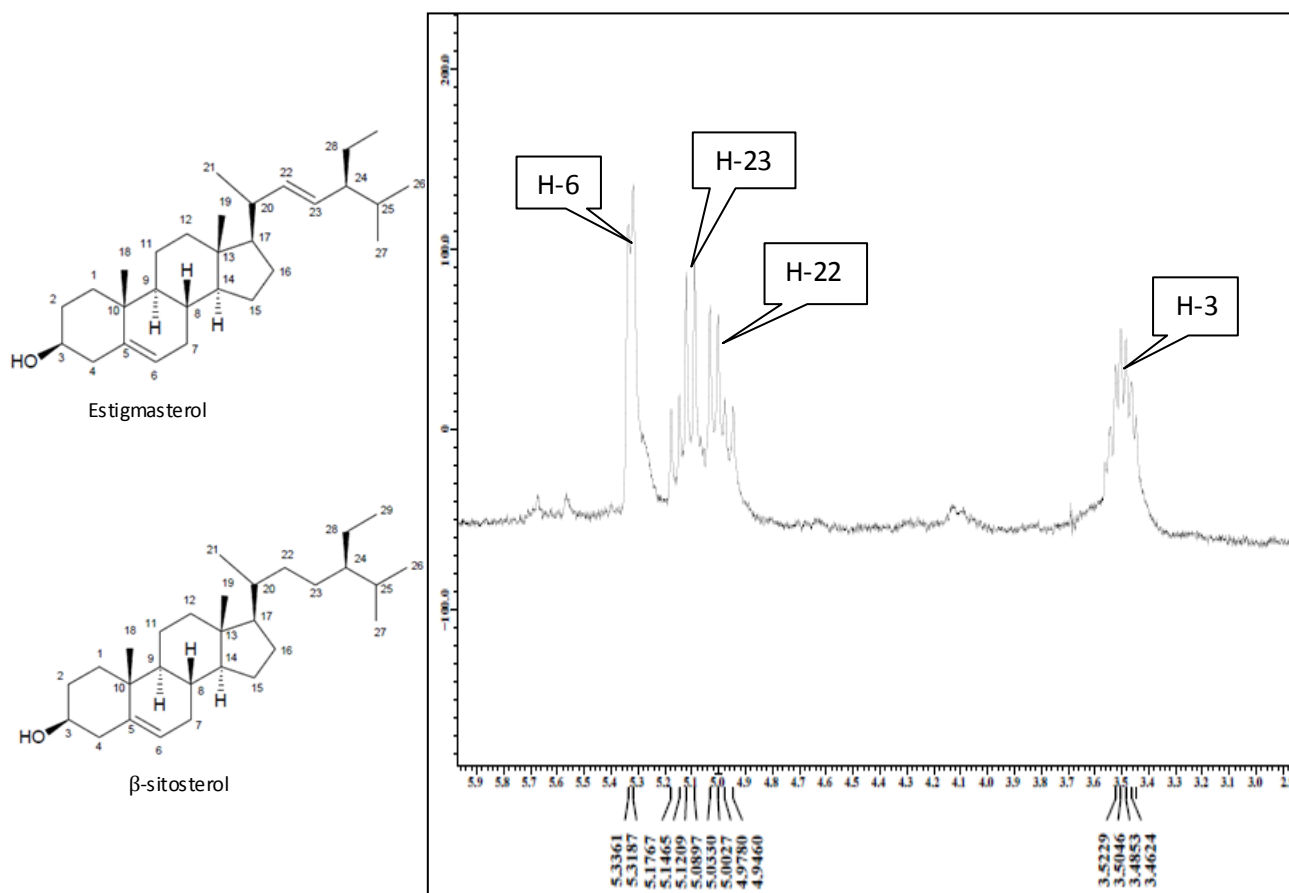
Los compuestos aislados a partir de las hojas frescas de *Plectranthus neochilus*, fueron caracterizados por medio de espectroscopia de RMN (^1H y ^{13}C) en una dimensión, DEPT-135, IR, CG-MS y por comparación con los datos reportados a partir de otros estudios.

6.1.1. Compuesto I. Mezcla Estigmasterol y β -sitosterol

Este compuesto fue aislado de la fracción 19-46 del extracto de metanol, fue eluído de una CC de fase normal con Hx:CH₂Cl₂ 70:10. Se presentó en forma de un sólido amorfo de color blanco y reveló morado al ser sometido a *p*-anisaldehído y calor, lo que indica la presencia de un compuesto con esqueleto terpenoidal. De este compuesto fueron aislados 33,4 mg, el cual representa un 1,98% de la fracción sembrada en la columna cromatográfica y un 0,0068% con respecto al material vegetal inicial.

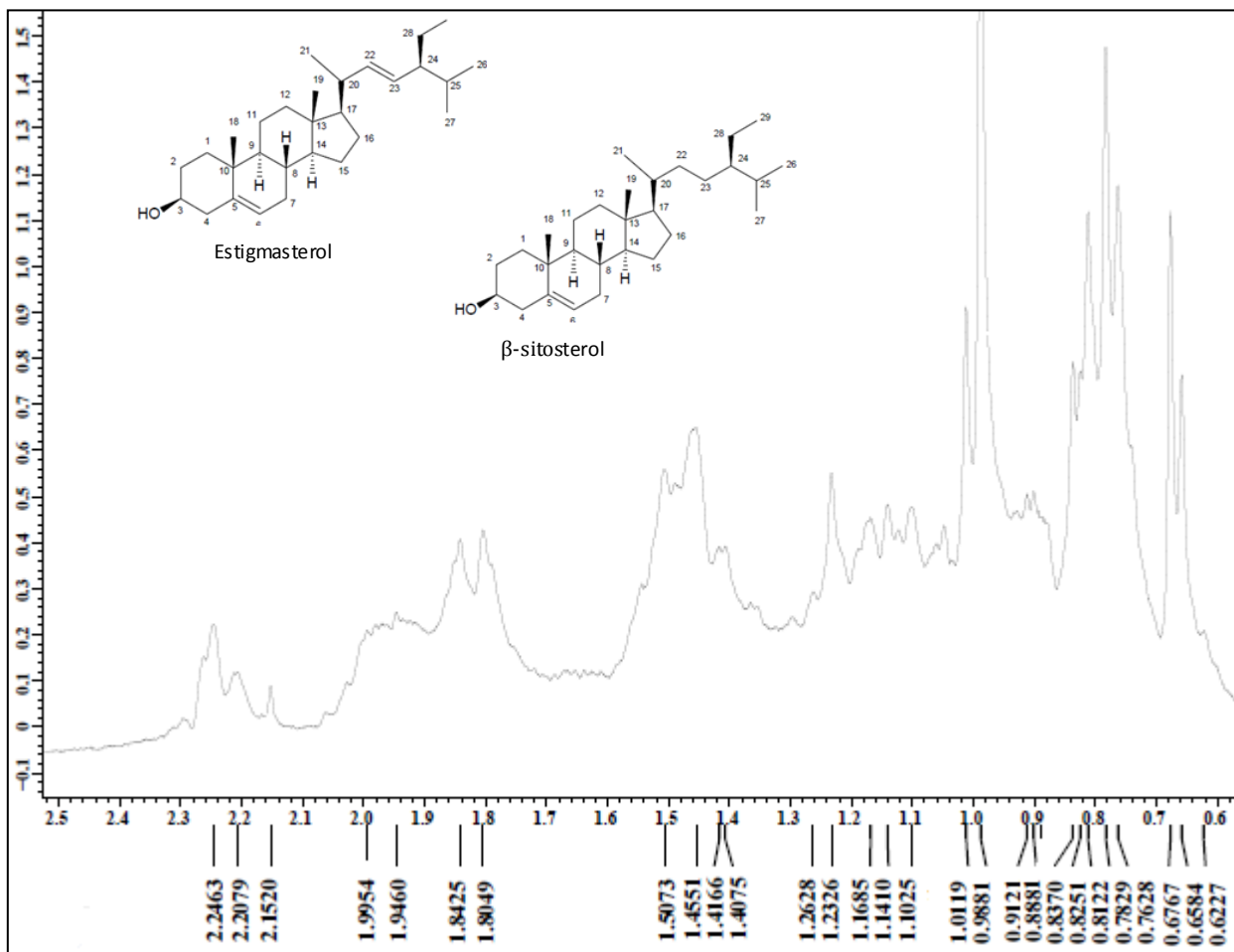
El espectro de RMN ^1H (Espectro 1 y 2), muestra un perfil característico para compuestos terpenoidales, con señales intensas a campo alto. En este campo se observan dos singletes correspondientes a grupos metilos a 0.68 y 0.99 ppm, se observa una señal a 0.90 ppm, el cual es un doblete que se encuentra solapado por otras señales, típico de protones de metilos de un grupo isopropil y un multiplete en 0.80 ppm que corresponde a protones de grupos metilos de una cadena alifática.^[66] A un desplazamiento químico de 3.50 ppm se observa un multiplete correspondiente al átomo de H de un carbono que se encuentra hidroxilado, más específicamente, un protón en posición axial de un ciclohexano (lo que implica que el OH se encuentra en posición ecuatorial). Se visualizan señales en la zona olefínica. A 5.33 ppm se observa un singlete ancho, correspondiente a un protón olefínico; a un desplazamiento químico de 5.13 ppm se observa un doblete de doblete ($J=8.1$ y 15.1 Hz) y otro doblete de doblete a δH 5.01, ($J=8.1$ y 15.3 Hz), con el valor de la constante de acoplamiento, se puede deducir que estas últimas dos señales están acopladas y sus protones olefínicos se encuentran en posición trans,^[67] estas señales son características del triterpeno tetracíclico conocido como estigmasterol (**65**), el cual es un esteroide que ha sido aislado previamente de esta especie por Silva (2011),^[8] en una mezcla β -sitosterol-estigmasterol (**64-65**).

De lo anterior se deduce que el compuesto I posee al menos un grupo hidroxil en posición β , dos dobles enlaces y un grupo isopropil además de estar formado por mínimo 28 carbonos (2 C, 9 CH, 11 CH₂ y 6 CH₃). Los datos experimentales concuerdan con estructuras del tipo esteroide, específicamente derivados del colestano, realizando una revisión bibliográfica se encontró que los datos experimentales del compuesto I se ajustan para los reportados de la mezcla estigmasterol y β -sitosterol.^[8] La comparación de las señales protónicas se reportan en la Tabla 6.



Espectro 1. Espectro ^1H RMN a campo bajo del compuesto I.

En estudios anteriores sobre esteroides extraídos de plantas, se observó que el β -sitosterol y el estigmasterol son isómeros que comúnmente se encuentran en mezcla en la naturaleza y son muy difíciles de separar.^[68]



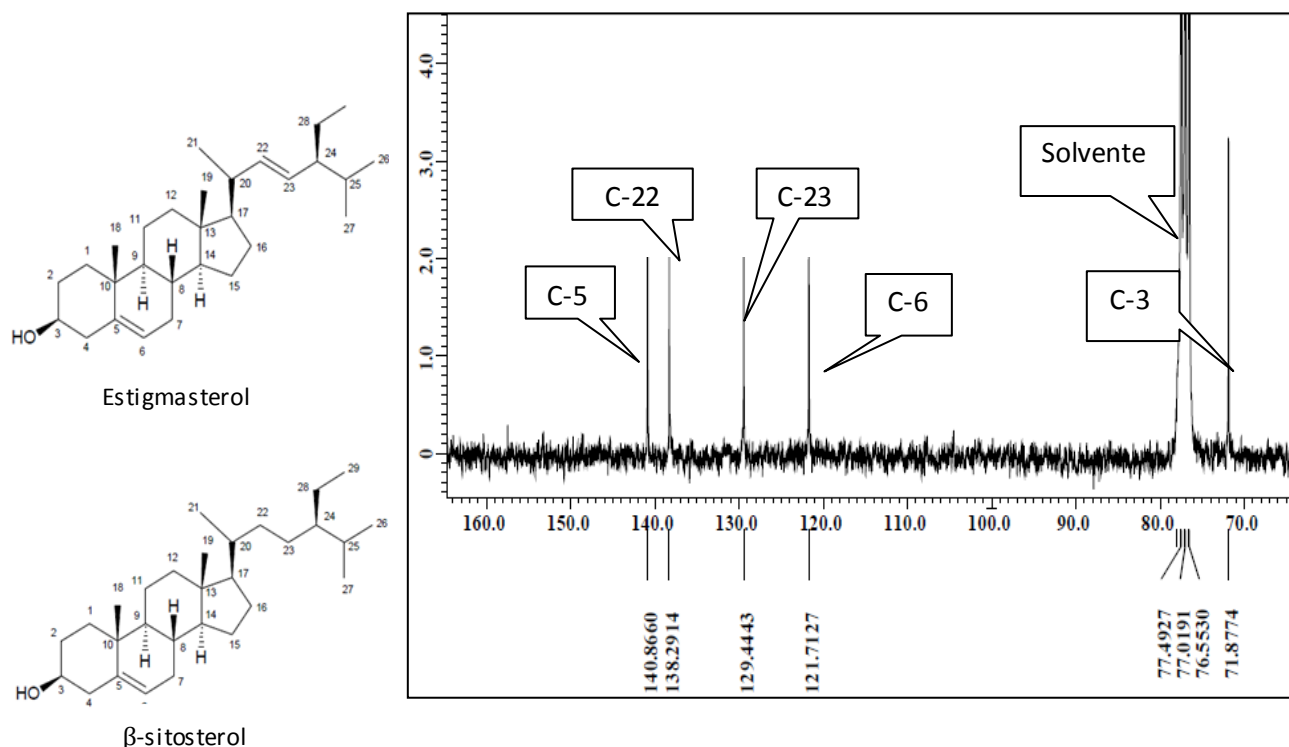
Espectro 2. Espectro ^1H RMN a campo alto del compuesto I.

Tabla 6. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^1H de los átomos de H presentes en el compuesto I.

N° H	Estigmasterol δH teórico, (mult., J(Hz)) ^a	Compuesto Ia δH exp., (mult., J(Hz)) ^b	β -sitosterol δH teórico, (mult., J(Hz)) ^a	Compuesto Ib δH exp., (mult., J(Hz)) ^b
3	3.53 m	3.50 m	3.53 m	3.50 m
6	5.35 (d, 4.7 Hz)	5.33	5.35 (d, 4.7)	5.33
18	0.70 s	0.68 s	0.68 s	0.66 s
19	1.01 s	0.99 s	1.01 s	0.99 s
21	1.02 (d, 7.5)	1.01 sa	0.94 (d, 6.4)	0.90 sa
22	5.15 (dd, 8.4, 15.1)	5.13 (dd, 8.1, 15.1)	-	-
23	5.02 (dd, 8.4, 15.1)	4.99 (dd, 8.1, 15.3)	-	-
26	0.80 (d, 6.4)	0.83 sa	0.82 (d, 6.3)	0.81 sa
27	0.85 (d, 6.1)	0.78 sa	0.83 (d, 6.1)	0.78 sa
29	0.80 (t, 6.0)	0.76 sa	0.85 (t, 6.0)	0.84 sa

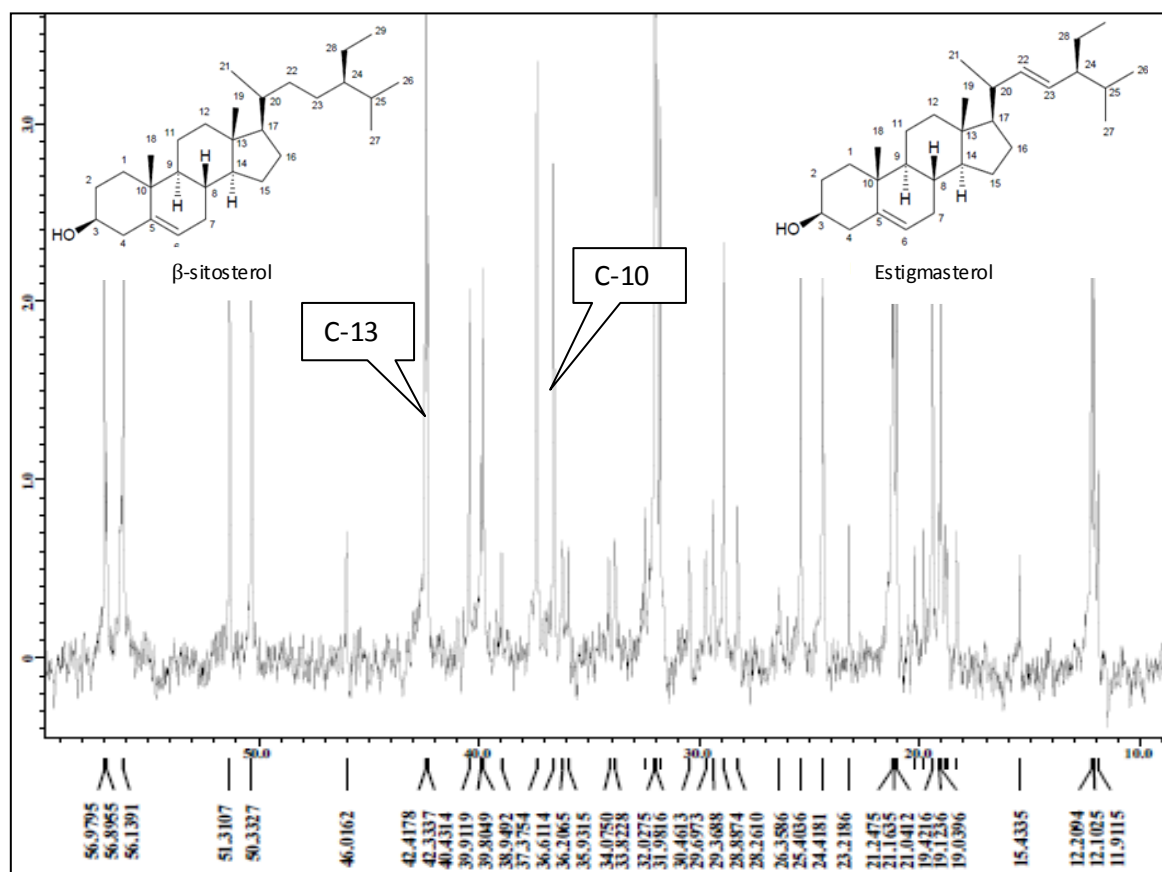
^a tomado en CDCl_3 , 300MHz, ^[69] ^b tomado en CDCl_3 , 270MHz.

El espectro de RMN ^{13}C (Espectro 3-5) mostró 45 señales de carbono de diversas intensidades; lo que permite afirmar la presencia de una mezcla de compuestos. Las señales ubicadas a 140.9 y 121.7 ppm corresponden al doble enlace endocíclico C5-C6 de los triterpenos estigmasterol (**Ia**) y β -sitosterol (**Ib**). Las señales a δC 138.3 y δC 129.3 fueron atribuidos a los átomos de carbono olefínicos C-22 y C-23 del estigmasterol (**Ia**); en la zona propia de desplazamiento de carbonos enlazados a grupos hidroxílicos resuena una señal a 71.9 ppm la cual corresponde al grupo carbinol en la posición C-3 de ambos metabolitos.



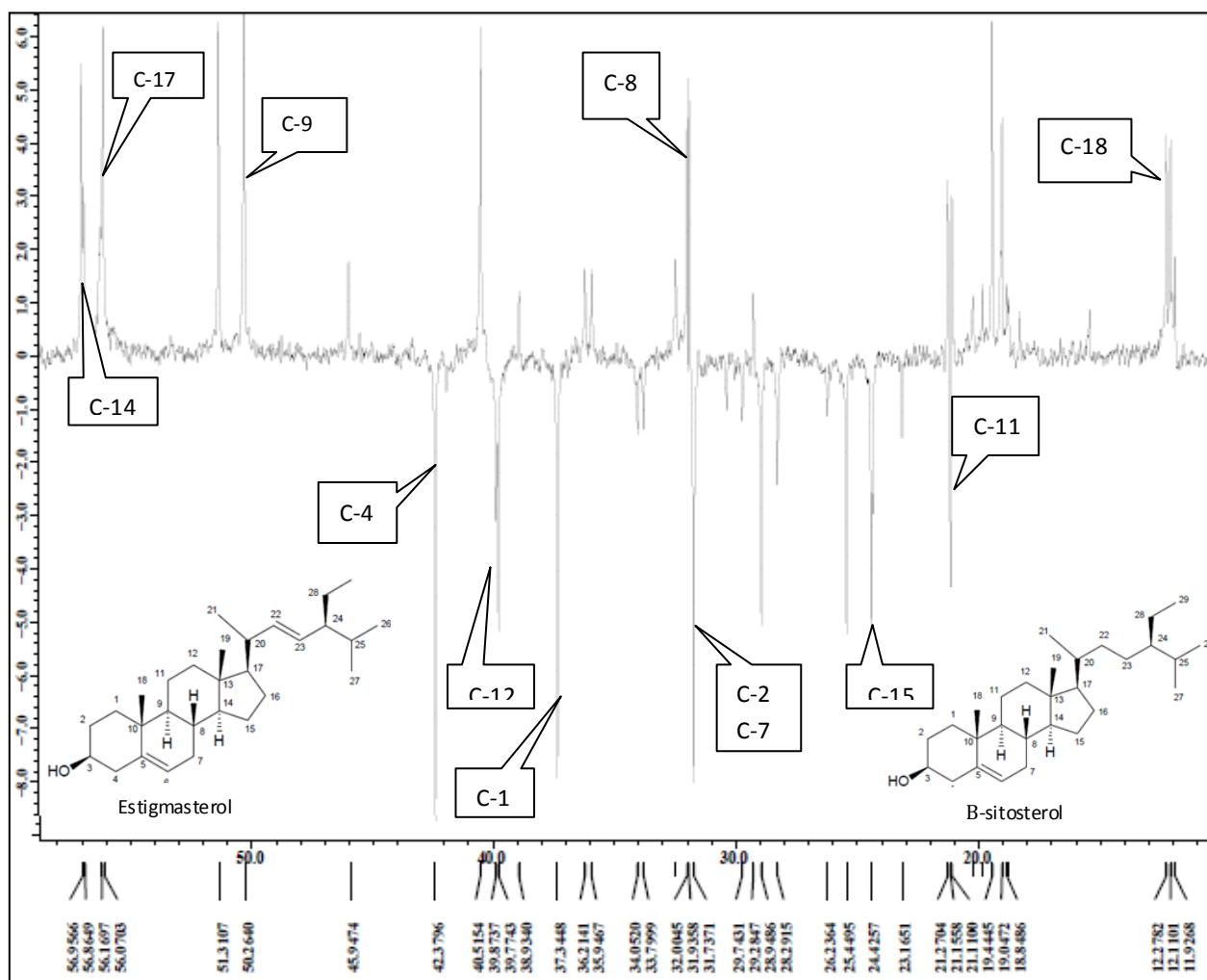
A campo alto se observan una gran cantidad de señales (Espectro 4), las cuales corresponden a los carbonos saturados que conforman el anillo esteroidal. Con soporte del experimento DEPT-135, se pudo constatar la naturaleza de cada uno de esos carbonos, encontrándose que en la zona mencionada se tenían 7 grupos metilos, 11 grupos metilénicos, 20 metinos y 2 carbonos cuaternarios.

Los 2 carbonos cuaternarios presentes en la estructura a campo alto, resuenan a 36.6 y 42.3 ppm, estos fueron asignados a C-10 y C-13 respectivamente, los cuales corresponden a carbonos cuaternarios que se encuentran haciendo puente entre dos anillos, y poseen además un grupo metilo unido a ellos.



Espectro 4. Espectro ^{13}C RMN a campo alto del compuesto I.

Las demás señales corresponden a los grupos metinos, metínicos y metilénicos de las estructuras, estos fueron comparados con la mezcla β -sitosterol - estigmasterol obtenido por Silva (2011)^[8] para la misma especie, los cuales se encuentran reportados en la Tabla 7.

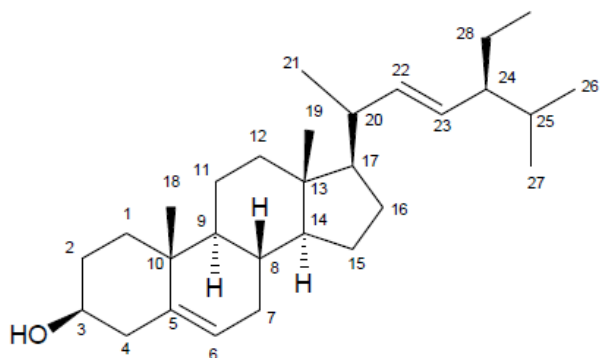


Espectro 5. Experimento DEPT-135 a campo alto del compuesto I.

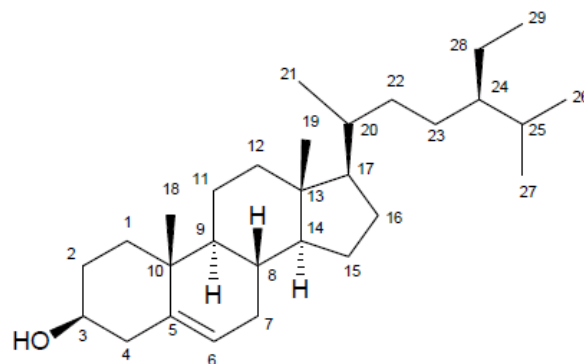
Tabla 7. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto I.

N°C	Estigmasterol (δC) teórico ^a	Compuesto Ia (δC) exp. ^b	DEPT	β -sitosterol (δC) teórico ^a	Compuesto Ib (δC) exp. ^b	DEPT
1	37.2	37.3	CH ₂	37.2	37.3	CH ₂
2	31.6	31.7	CH ₂	31.6	31.7	CH ₂
3	71.8	71.9	CH	71.8	71.9	CH
4	42.3	42.4	CH ₂	42.3	42.4	CH ₂
5	140.7	140.9	C	140.7	140.9	C
6	121.7	121.7	CH	121.7	121.7	CH
7	31.9	31.7	CH ₂	31.9	31.7	CH ₂
8	31.9	31.9	CH	31.9	31.9	CH
9	50.1	50.3	CH	50.1	50.3	CH
10	36.5	36.6	C	36.5	36.6	C
11	21.1	21.2	CH ₂	21.1	21.2	CH ₂
12	39.7	39.8	CH ₂	39.7	39.9	CH ₂
13	42.3	42.3	C	42.3	42.3	C
14	56.8	57.0	CH	56.7	56.9	CH
15	24.4	24.4	CH ₂	24.3	24.4	CH ₂
16	28.9	28.9	CH ₂	28.2	28.3	CH ₂
17	55.9	56.1	CH	56.0	56.2	CH
18	12.0	12.1	CH ₃	12.0	12.1	CH ₃
19	19.4	19.4	CH ₃	19.4	19.4	CH ₃
20	40.5	40.5	CH	36.1	35.9	CH
21	21.1	21.3	CH ₃	18.8	19.0	CH ₃
22	138.3	138.3	CH	33.9	33.8	CH ₂
23	129.2	129.4	CH	26.0	26.2	CH ₂
24	51.2	51.3	CH	45.8	45.9	CH
25	31.9	32.0	CH	29.1	29.3	CH
26	21.2	21.1	CH ₃	19.0	19.0	CH ₃
27	19.0	19.0	CH ₃	19.8	19.8	CH ₃
28	25.4	25.4	CH ₂	23.0	23.1	CH ₂
29	12.3	12.3	CH ₃	11.8	11.9	CH ₃

^a tomado en CDCl_3 , 50MHz. ^[8] ^b tomado en CDCl_3 , 270MHz.



Ia Estigmasterol

Ib β -sitosterol

Los fitoesteroles son metabolitos secundarios comunes en la naturaleza, tanto en el reino vegetal como animal, los cuales se caracterizan por poseer diversas propiedades farmacológicas.^[70] El β -sitosterol posee potente acción inhibidora del edema inducido con TPA en ratones, reduce la producción de anión radical superóxido, peróxido de hidrogeno y óxido nítrico.^[71] El estigmasterol ha sido reportado como un anticancerígeno (en la próstata) y un antiinflamatorio tópico.^[67] Se han comprobado además las propiedades anticonceptivas, antimicobianas y analgésicas de ambos metabolitos.^[8,71-72]

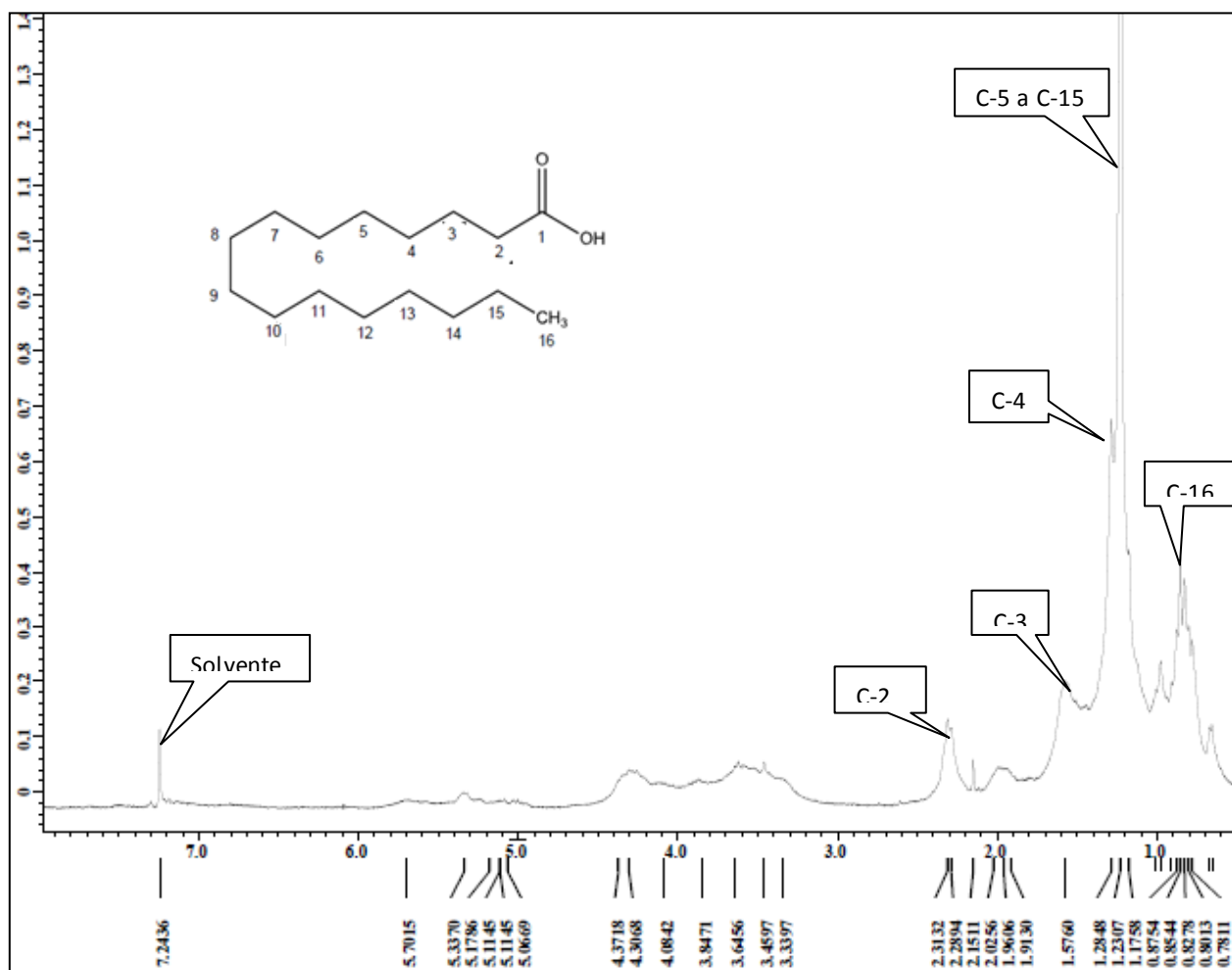
6.1.2. Compuesto II. Ácido hexadecanoico.

El compuesto II se aisló de la fracción 95 - 124 del extracto de metanol, como un líquido viscoso de color amarillo claro, soluble en diclorometano. Fue eluido de la columna cromatográfica con una mezcla Hx:CH₂Cl₂ 50:10. Se obtuvo 15,3 mg del compuesto II lo que representa el 0,96% del extracto de metanol sembrado en la columna cromatográfica y el 0,0031% del material vegetal inicial. En el análisis realizado por

CCF se mostró como una mancha de color violeta oscuro al ser revelado con *p*-anisaldehído.

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 6) puede ser observado un grupo de 5 señales, a 0.86 ppm se visualiza un singlete ancho correspondiente a un grupo metilo, a un desplazamiento químico de 2.30 ppm se encuentra una señal que es característica de protones que se encuentran unidos a un grupo carboxílico,^[68] en 1.63, 1.28 y 1.23 ppm resuenan tres singletes los cuales corresponden a grupos metilénicos (Tabla 8).

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 7), se observan 5 señales en la zona entre 14.0 y 32.0 ppm, grupos de señales que son características para estructuras saturadas y lineales, en el experimento DEPT-135, el cual se encuentra desfasado (Espectro 8) puede ser visualizado solo un metilo en la estructura que resuena a 14.1 ppm y las demás señales corresponden a grupos metilénicos (Tabla 9). La señal que se encuentra a 34.2 ppm es característica de los carbonos adyacentes a grupos carbonilos. En base a estos datos, se propone para el compuesto II la estructura de un ácido graso lineal y saturado. La señal del C-1, correspondiente al grupo carbonilo que generalmente se ubica entre 170 y 180 ppm, no pudo ser observada, debido a la poca masa aislada del compuesto, por lo que la muestra fue analizada mediante las técnicas GC-MS e IR para verificar la presencia del ácido carboxílico (Espectro 9 y 10), lo que permitió deducir que el compuesto mayoritario se trataba del ácido hexadecanoico, también conocido como ácido palmítico (compuesto II).

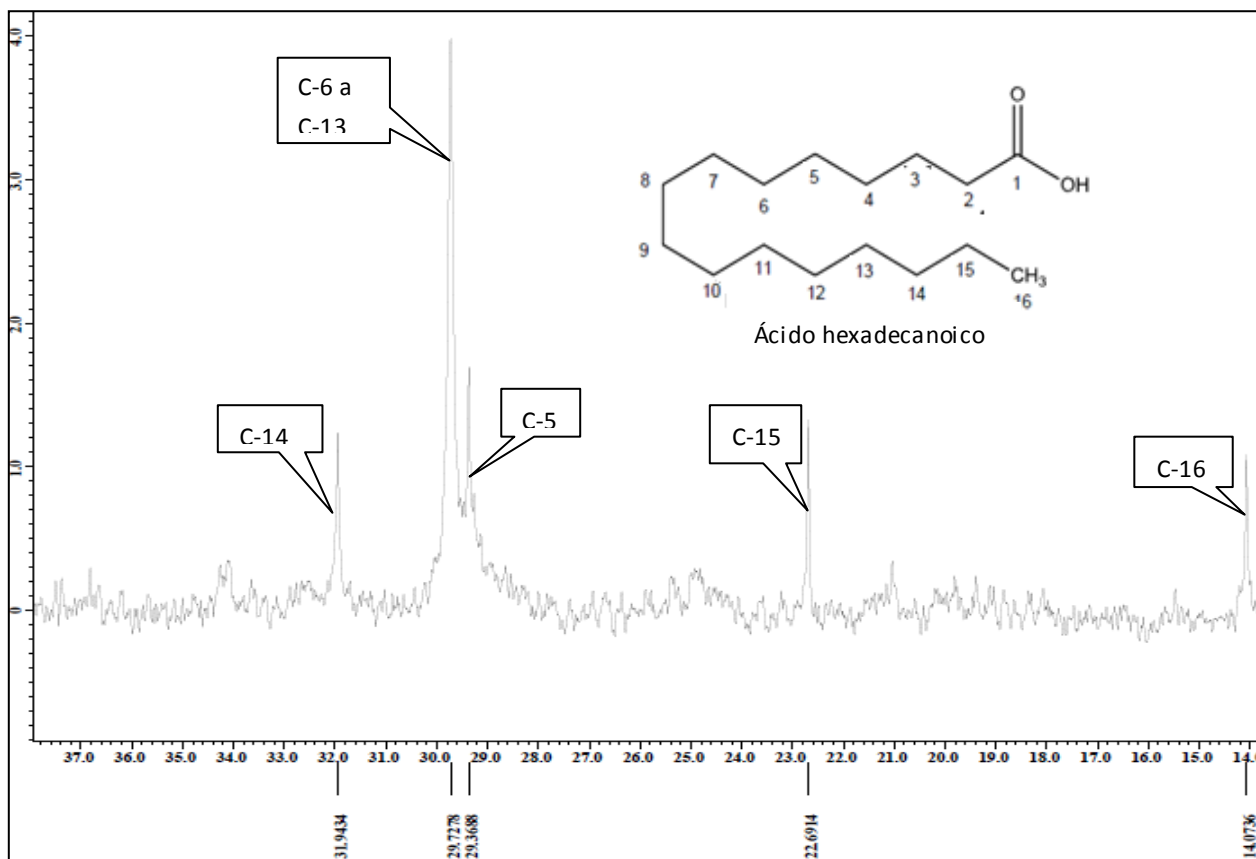


Espectro 6. Espectro ^1H RMN del compuesto II.

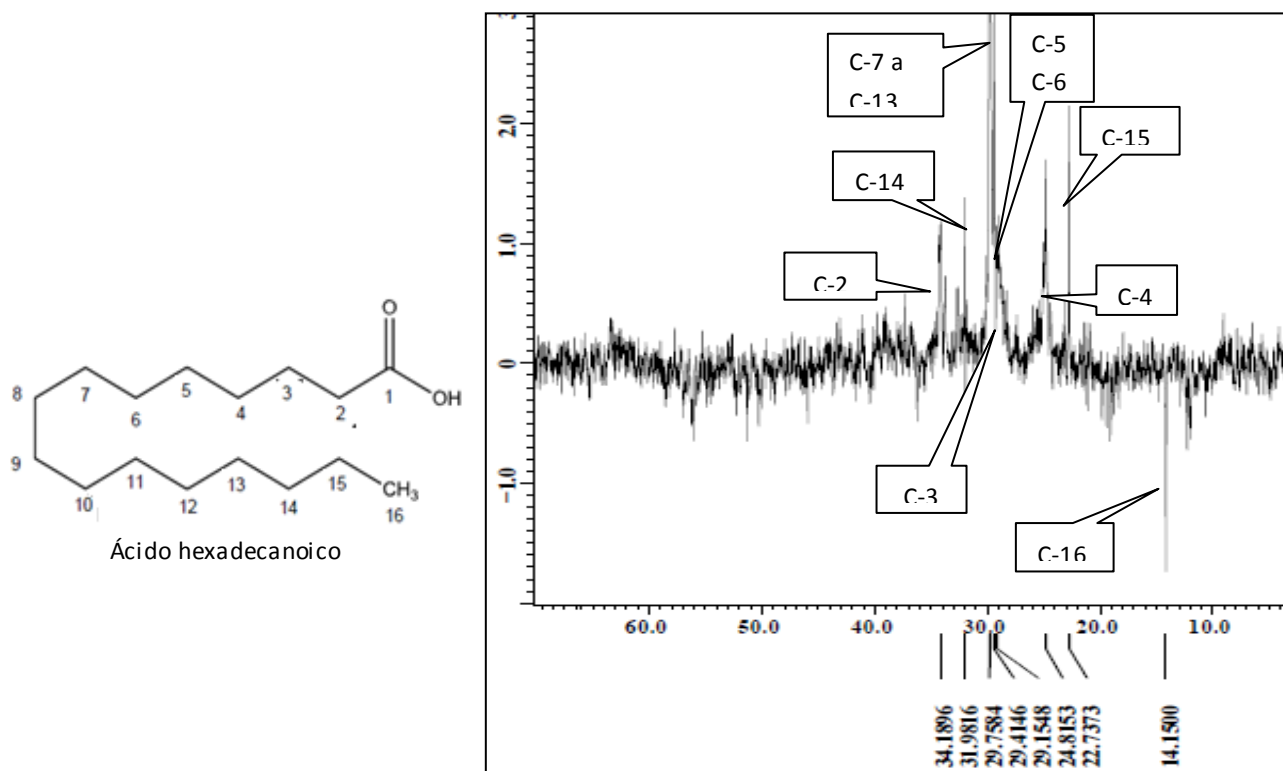
Tabla 8. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^1H de los átomos de H presentes en el Compuesto II.

NºH	Ácido Hexadecanoico (δH) teórico, (mult., J(Hz)) ^a	Compuesto II δH exp., (mult., J(Hz)) ^b
2	2.35 (t)	2.30 (sa)
3	1.63 (m)	1.58 (sa)
4	1.25 (s)	1.28 (sa)
5-15	1.25 (s)	1.23 (sa)
16	0.88 (t)	0.86 (sa)

^a tomado en CDCl_3 a 500MHz. ^[73] ^b tomado en CDCl_3 a 270MHz



Espectro 7. Espectro ^{13}C RMN a campo alto del compuesto II.



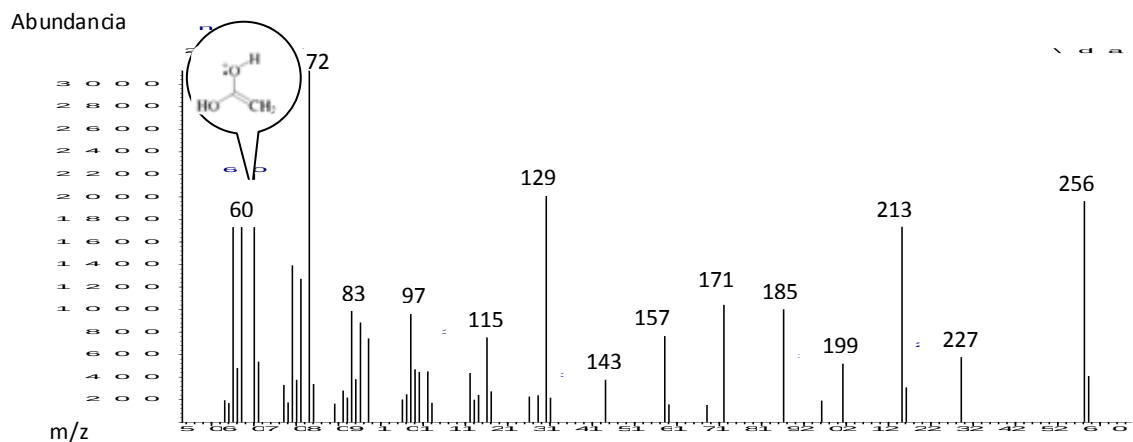
Espectro 8. Experimento DEPT-135 a campo alto del compuesto II.

Tabla 9. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto II.

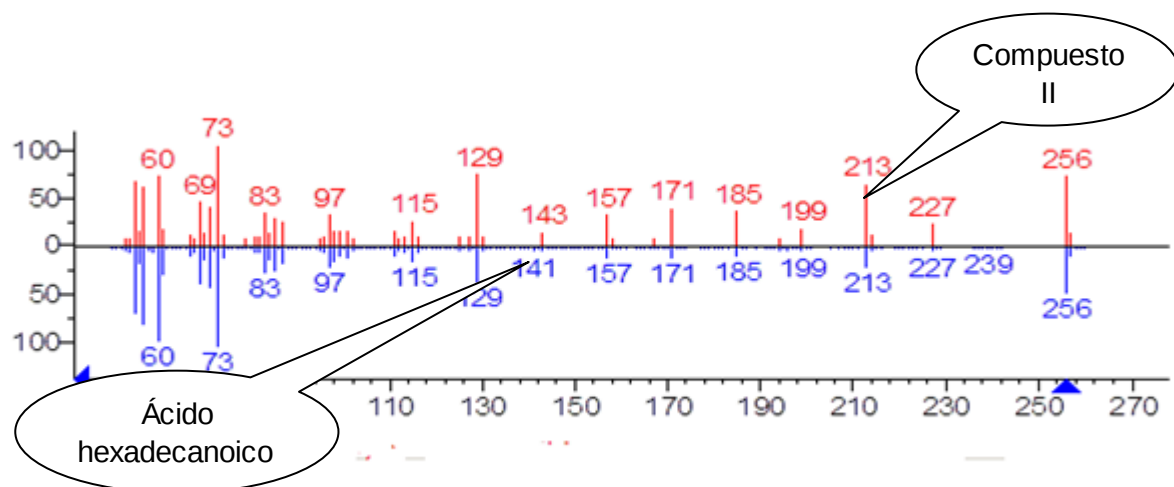
N°C	Acido Hexadecanoico δH teórico ^a	Compuesto II δH exp. ^b	DEPT	N°C	Acido Hexadecanoico δH teórico ^a	Compuesto II δH exp. ^b	DEPT
1	174.6	-	C	6	29.3	29.4	CH_2
2	33.9	34.2	CH_2	7-13	29.3	29.7	CH_2
3	29.2	29.4	CH_2	14	31.8	31.9	CH_2
4	29.3	24.8	CH_2	15	22.5	22.7	CH_2
5	29.3	29.4	CH_2	16	14.0	14.1	CH_3

^a tomado en CDCl_3 a 75 MHz. ^[69] ^b tomado en CDCl_3 a 270 MHz

Se realizó un espectro de CG-MS para determinar el tamaño de la cadena en la estructura y sus principales fraccionamientos, el compuesto mayoritario mostró un compuesto cuyo ión molecular es 256.0 m/z [M^+], el cual corresponde a la fórmula molecular $C_{16}H_{32}O_2$ (Espectro 9).



El compuesto II fue comparado con los datos de la librería Nist, encontrándose que se ajustaba en un 90% con los datos reportados para el ácido hexadecanoico, también conocido como ácido palmítico (Espectro 10).



Espectro 10. Comparación del espectro de masas del compuesto II y el espectro de masas del ácido hexadecanoico.

Entre las señales características del fraccionamiento del ácido palmítico y en general para ácidos grasos saturados se encuentra la señal en 60 m/z, la cual resulta del arreglo McLafferty (Figura 3), las señales del espectro de masas del ácido palmítico muestra la pérdida inicial de 29 unidades, correspondiente al grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ y las sucesivas pérdidas de 14 unidades (grupos $-\text{CH}_2-$) debidas al fraccionamiento de la cadena alquílica (Figura 4).^[74]

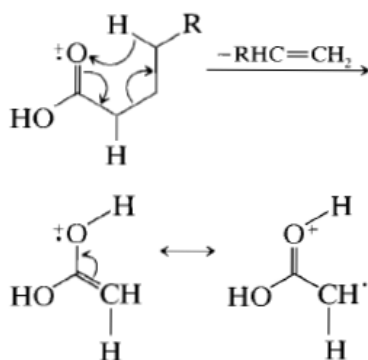


Figura 3. Rearreglo McLafferty del ácido hexadenoico. $\text{R} = \text{C}_{15}\text{H}_{29}$

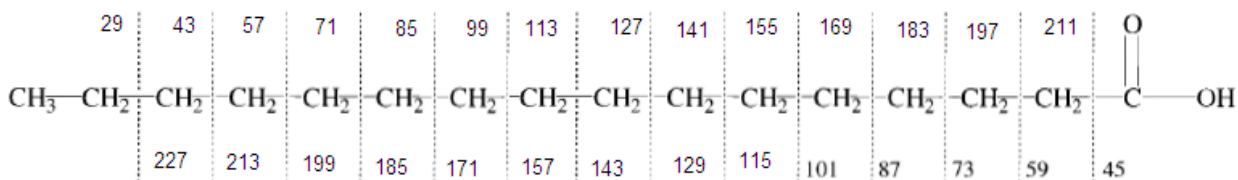
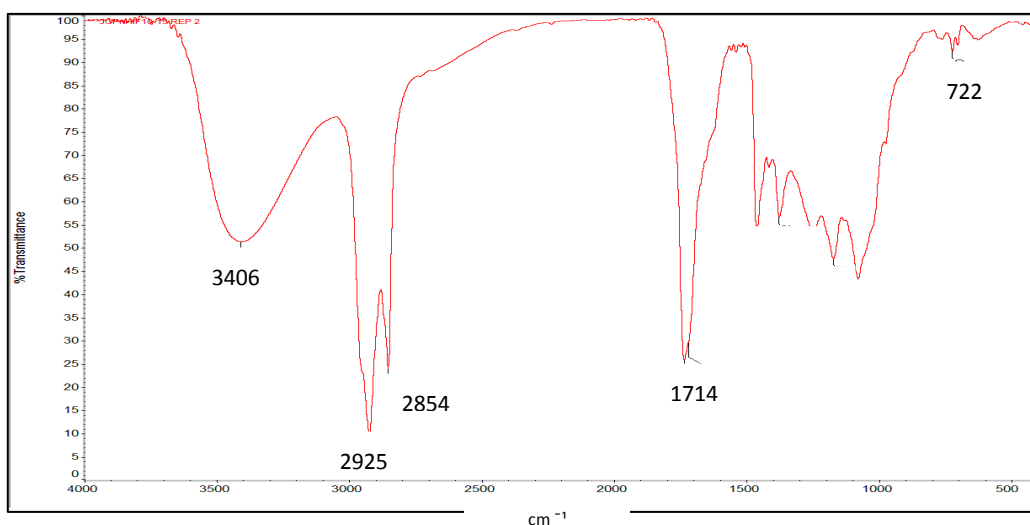


Figura 4. Patrón de fraccionamiento del ácido palmítico.^[74]

En el espectro IR (Espectro 11) se observa a 1714.4 cm^{-1} una señal intensa y aguda correspondiente a la vibración de un enlace $\text{C}=\text{O}$, se destacan además picos intensos

entre 2850.0 y 2950.0 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones simétricas y asimétricas de enlaces C-H, lo que indica la presencia de un compuesto con una larga cadena alifática, señales que concuerdan con lo esperado para el compuesto II. En la zona entre 3000.0 y 3600.0 cm^{-1} se encuentra una banda ancha de mediana intensidad, correspondiente a la vibración del enlace O-H, esta señal puede deberse al grupo –OH del ácido carboxílico y a posible presencia de agua en la muestra.^[74]



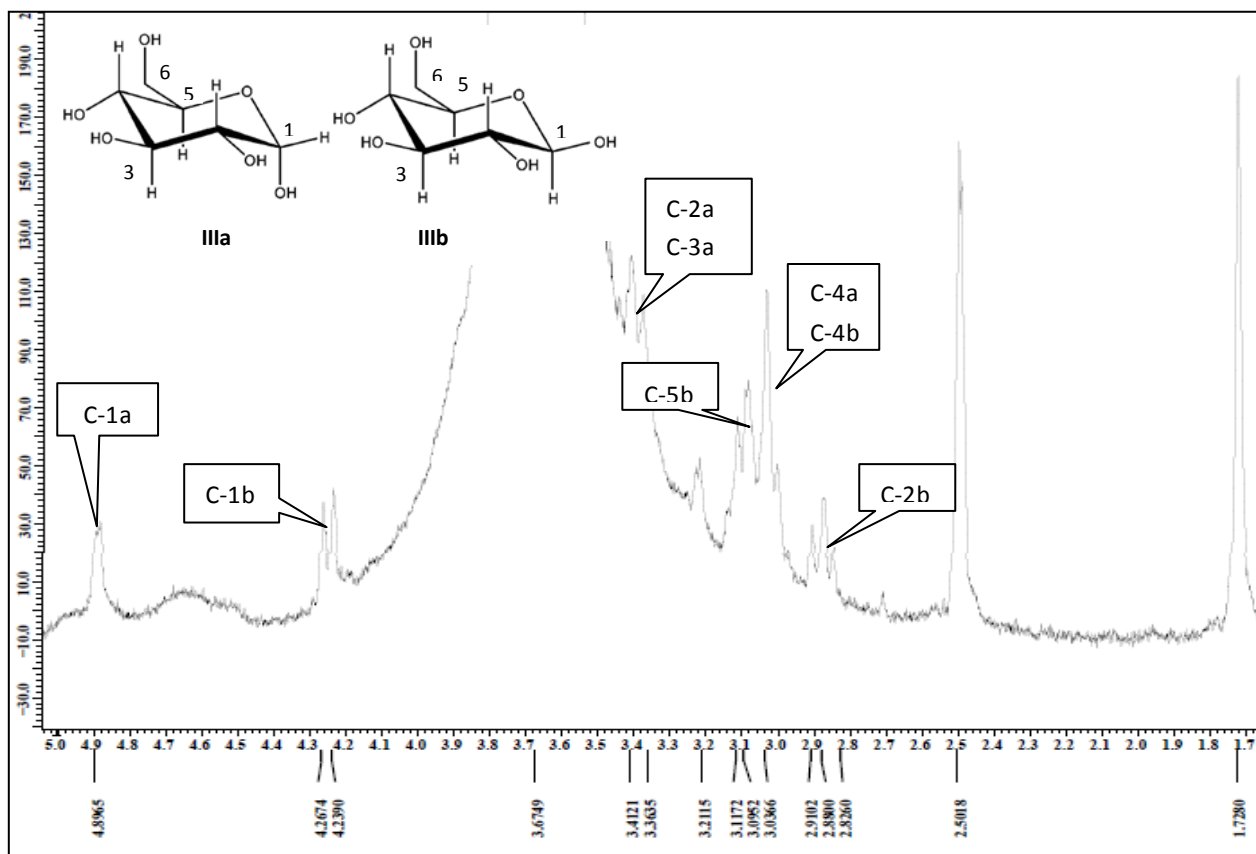
Espectro 11. Espectro IR del compuesto II

6.1.3. Compuesto III. Mezcla α -glucosapiranosa y β -glucosapiranosa.

Este compuesto fue aislado como un sólido blanco cristalino de la fracción 151 - 179 del extracto de metanol, fue eluído de una CC de fase normal con una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5), reveló marrón al ser expuesto a *p*-anisaldehído y calor. Era soluble en agua, DMSO y parcialmente soluble en metanol. De este compuesto fueron aislados 35,4 mg el cual representa 2,32% del extracto sembrado en la columna cromatográfica, y un 0,0071% con respecto al material vegetal de partida.

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 12), se observa un perfil característico para glicósidos, observándose dos protones anoméricos,^[75] un singlete ancho en δH 4.89 y un doblete a δH 4.25 ($J=7.43$ Hz), y otras señales características de azúcares. Las señales entre 4.0 ppm y 3.45 ppm fueron solapadas por el solvente (Tabla 10)

Esto condujo a comparar los datos de la literatura para diferentes sacáridos encontrándose que las señales observadas para el compuesto III se correspondían con la mezcla de dos isómeros configuracionales de la glucosa: α -D-glucosapiranososa (**IIIa**) y β -D-glucosapiranososa (**IIIb**).^[76]



Espectro 12. Espectro ^1H RMN del compuesto III. Zona (1.60 - 5.00 ppm)

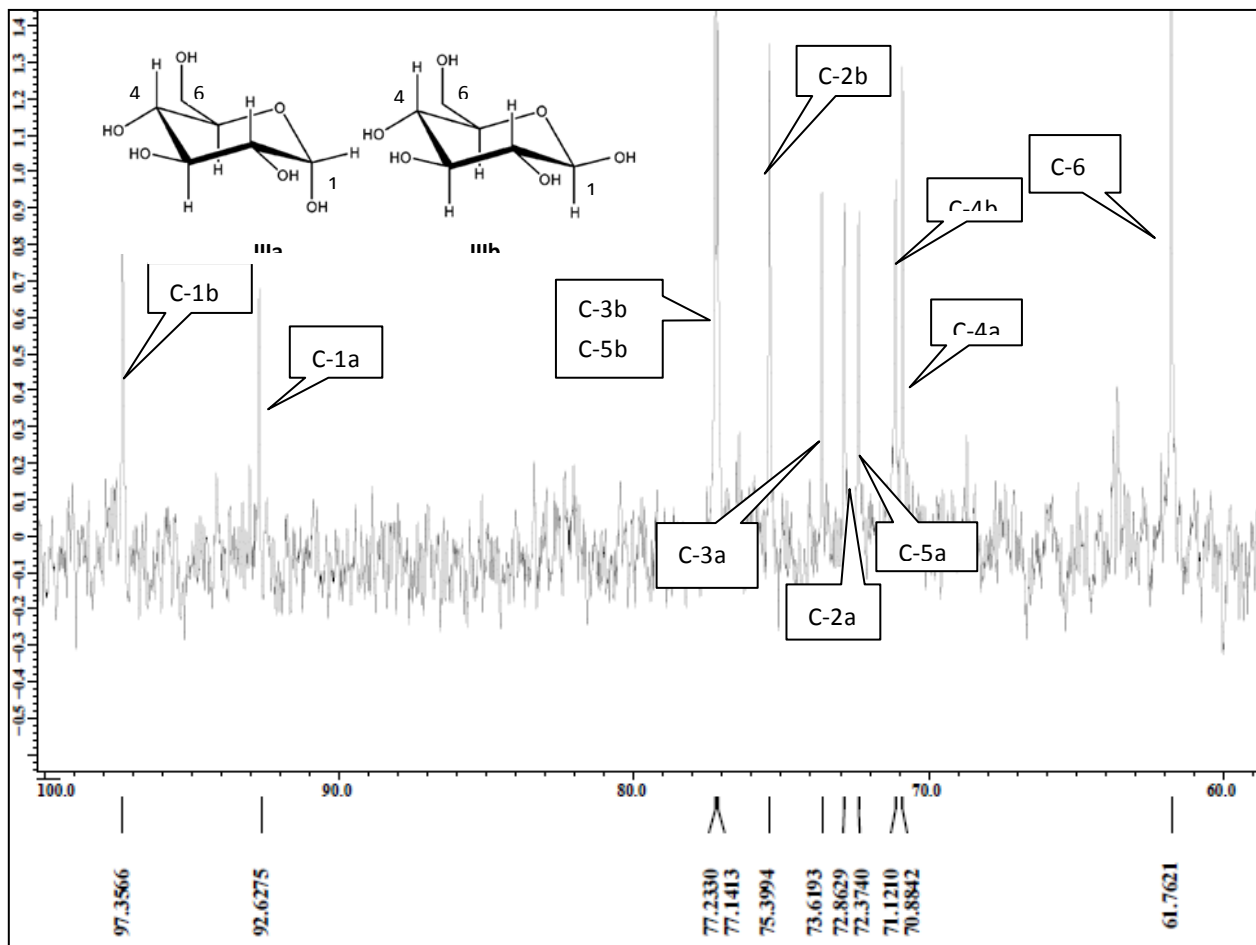
Tabla 10. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^1H de los átomos de H presentes en el compuesto III.

NºH	α -D-glucosapiranosas ^a teórico	Compuesto IIIa ^b experimental	β -D-glucosapiranosas ^a teórico	Compuesto IIIb ^b experimental
1	5.21 (d, J=3.8)	4.89 (sa)	4.62 (d, J=7.9)	4.25 (d, J=7.4)
2	3.51	3.41	3.22	2.88
3	3.69	3.38	3.46	-
4	3.39	3.04	3.38	3.01
5	3.81	-	3.44	3.12
6	3.82 3.74	-	3.87 3.70	-

^a tomado en D₂O a 125,7 MHz.^[76] ^b tomado en DMSO-d₆ a 270MHz

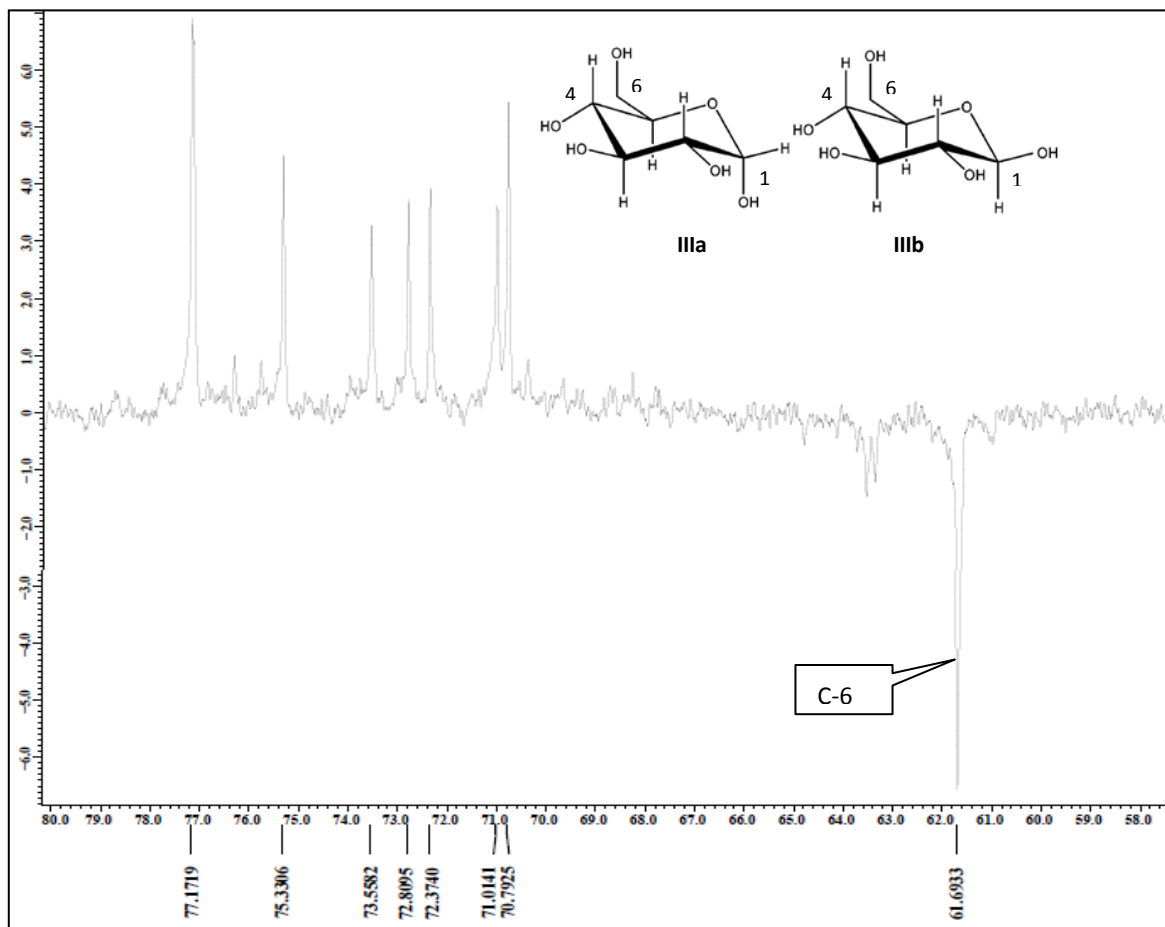
Las variaciones en las señales reportadas y experimentales son debidas a que experimentalmente el espectro de RMN ^1H fue tomado en DMSO-d₆, con una potencia de 270.0 MHz, y los datos teóricos fueron tomados en agua deuterada a 125.7 MHz.

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 13), se observaron once señales de carbono, la mayoría se encontraron entre 70.0 y 77.0 ppm las cuales son señales que corresponden a átomos de carbonos ciclados que están sustituidos por un oxígeno, señales que son particulares de compuestos tipo glicósidos. Se observaron dos señales a un desplazamiento químico de 92.7 y 97.4 ppm, las cuales fueron asignadas al carbono anomérico (C-1) de cada uno de los anómeros de la glucosapiranosas.



Espectro 13. Espectro ^{13}C RMN a campo bajo del compuesto III.

En el experimento DEPT-135 se puede observar que todas las señales corresponden a grupos CH, excepto una señal a un desplazamiento químico de 61.8 ppm la cual es un grupo metilénico, por su desplazamiento se puede notar que es un carbono sustituido por un oxígeno, esta señal fue asignada al C-6 de ambas estructuras (Tabla 14).



Espectro 14. Experimento DEPT-135 a campo bajo del compuesto III.

Las diferencias en los desplazamientos de las señales experimentales con las teóricas reportadas en la Tabla 11, se debe a que el espectro de RMN ^{13}C experimental fue tomado en DMSO-d_6 a 270.0 MHz, mientras que el espectro encontrado en la bibliografía fue tomado en agua deuterada a 125.7 MHz.^[77] La glucosa es el monosacárido más común y es la principal fuente de energía para la mayoría de las células de organismos superiores.^[78]

Tabla 11. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^1H de los átomos de C presentes en el compuesto III.

NC	α -glucosa piranosa (δC) teórico ^a	Compuesto IIIa (δC) exp. ^b	β -glucosa piranosa (δC) teórico ^a	Compuesto IIIb (δC) exp. ^b
1	92.0	92.7	95.8	97.4
2	71.4	72.8	74.0	75.4
3	72.7	73.6	75.7	77.1
4	69.5	71.1	69.5	70.9
5	71.3	72.4	75.9	77.2
6	60.5	61.8	60.6	61.8

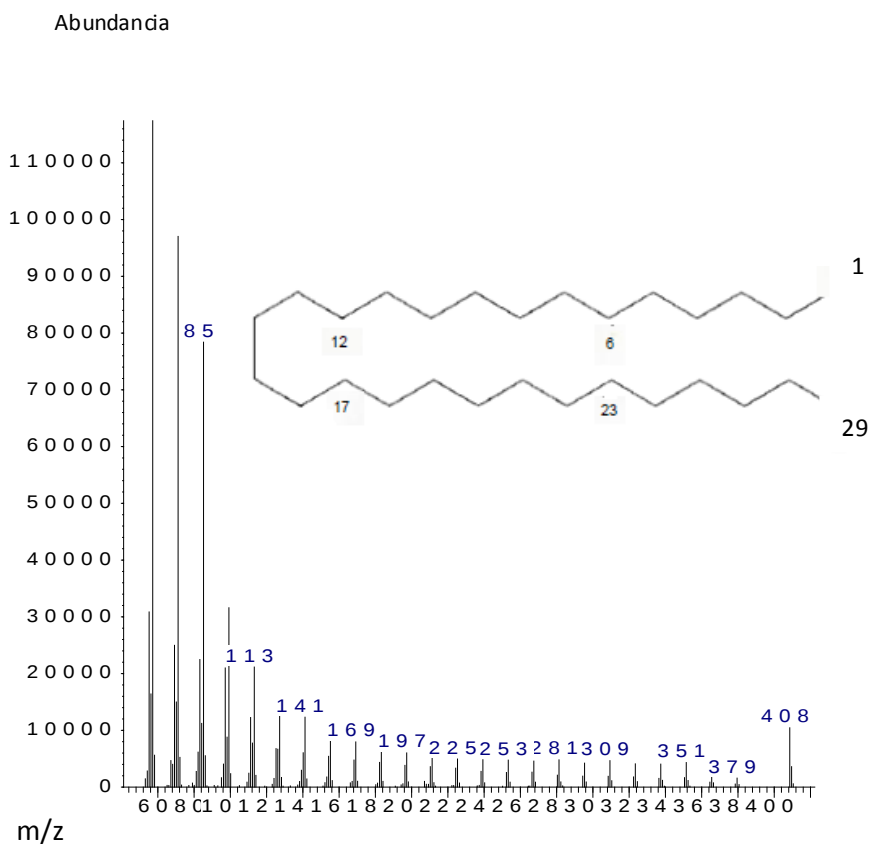
^a tomado en D_2O a 125,7 MHz.^[77] ^b tomado en DMSO-d_6 a 270MHz

6.1.4. Compuesto IV. Nonacosano

El compuesto IV fue aislado de la fracción 4 del extracto de hexano, como un sólido cristalino, fue eluído de una CC de fase normal con hexano, reveló violeta al ser expuesto a *p*-anisaldehído y calor. De este compuesto fueron aislados 109,0 mg el cual representa 4,36% del extracto sembrado en la columna cromatográfica, y un 0,22% con respecto al material vegetal de partida.

Se evaluó la solubilidad del compuesto IV en una serie de solventes con polaridades distintas: agua, metanol, acetonitrilo, acetona, acetato de etilo, diclorometano, piridina, tolueno y hexano, donde se pudo observar que el compuesto solo era totalmente soluble en hexano, por no contar con solventes deuterados tan poco polares como el

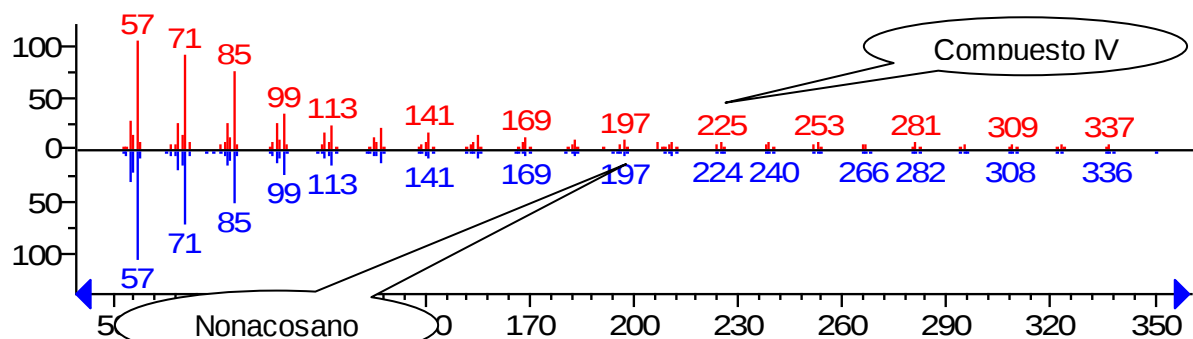
Hx, no se le pudieron tomar espectros de RMN a esta muestra y solo fue realizado un espectro de masas. El espectro de masas del compuesto IV (Espectro 15) muestra un patrón de fraccionamiento característico de alcanos lineales, el cual posee un ión molecular de 408 m/z [M^+], correspondiente con la formula molecular $C_{29}H_{60}$.



Espectro 15. Espectro de masas de compuesto IV.

Al ser comparado con la librería NIST, se encontró que los datos experimentales concuerdan con el nonacosano (Espectro 16). El patrón de fraccionamiento de los hidrocarburos saturados consiste en la pérdida inicial de una unidad de 15 m/z,

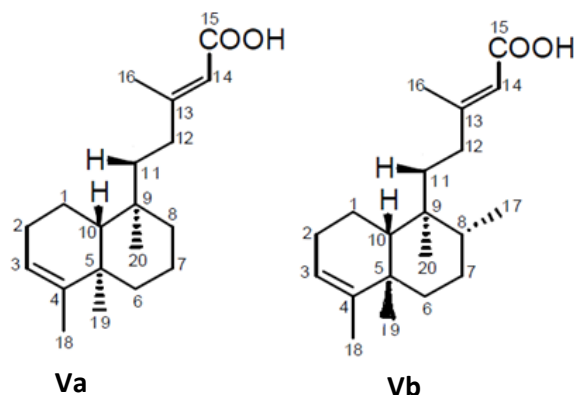
correspondiente a uno de los grupos metilos terminales y a las sucesivas perdidas de una unidad de 14 m/z que corresponde al continuo fraccionamiento de grupos $-\text{CH}_2-$ de la cadena alquílica.^[74]



Espectro 16. Comparación del espectro de masas del compuesto IV y el espectro de masa del nonacosano.

6.1.5. Compuesto V. Mezcla de diterpenos clerodanos ácido 8-nor-(5R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico y ácido (5S,8R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico).

Este compuesto fue aislado de la fracción 27-39 del extracto de hexano, fue eluído de una CC de fase normal con diclorometano. Se presentó en forma de un sólido amorfo de color blanco y reveló morado con *p*-anisaldehído, lo que indica la presencia de un compuesto con esqueleto terpenoidal. De este compuesto fueron aislados 13,6 mg, el cual representa un 0,91% de la fracción sembrada en la columna cromatográfica y un 0,0027% con respecto al material vegetal inicial.



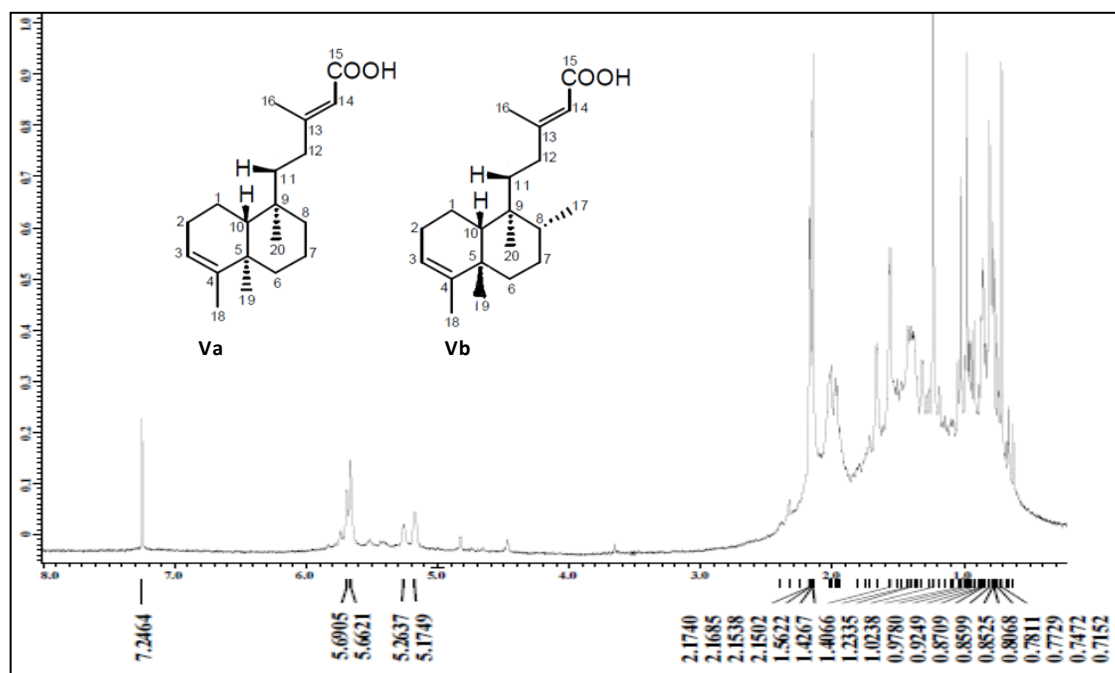
Estructuras del Compuesto V

En los espectros de RMN (Espectros 17 - 20) puede evidenciarse que el compuesto no está puro, tratándose de una posible mezcla de compuestos con esqueletos terpenoidales. El espectro RMN ^1H , muestra un perfil característico de compuestos saturados con señales intensas a campo alto. A campo bajo resuenan dos señales a un desplazamiento químico de 5.68 ppm y 5.22 ppm correspondientes a protones olefínicos (Espectro 17).^[74]

En el espectro de RMN de ^{13}C a campo bajo (Espectro 18), a un desplazamiento químico de 171.5 ppm se observó una señal característica de un grupo carbonilo, el cual por su desplazamiento se corresponde con un ácido carboxílico conjugado. En la zona entre 110.0 ppm y 160.0 ppm se observan cuatro señales olefínicas intensas a un desplazamiento químico de 164.3, 144.5, 120.4 y 114.8 ppm y dos señales menos intensas a 139.8 y 123.2 ppm respectivamente.

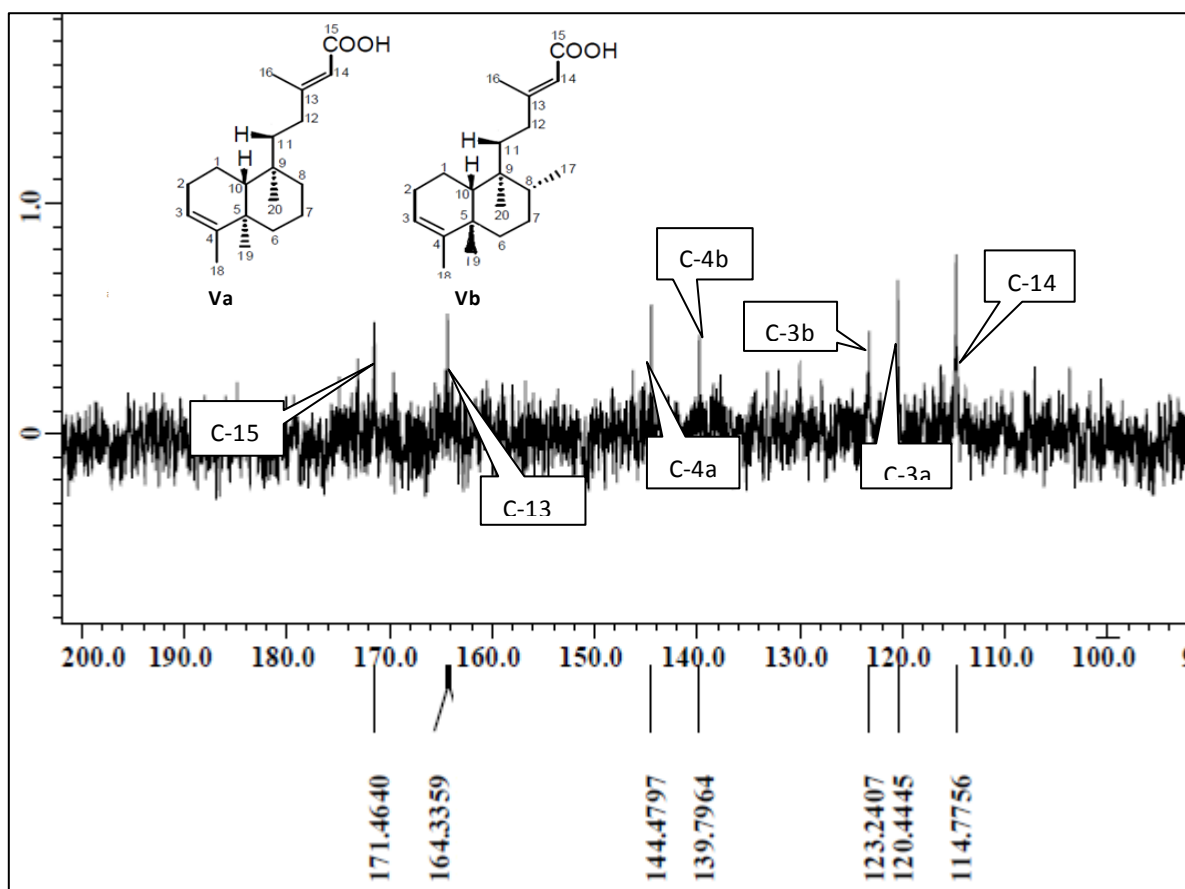
Las señales olefínicas a 120.4 - 144.4 ppm y a 123.2 - 139.8 ppm coinciden con las señales reportadas para el doble enlace endocíclico (C-3 - C-4) en diterpenos de tipo clerodano (**4**).^[79] Se realizó una revisión bibliográfica de diterpenos clerodanos aislados comúnmente en plantas, que tuvieran al menos un doble enlace endocíclico y un ácido carboxílico conjugado, encontrándose que los datos obtenidos experimentalmente se

ajustan con los reportados para el ácido kolavénico o ácido (5R,8R,9S,10R)-ent-clerod-3,13-dien-15-oico,^[79] a excepción de la señal reportada para C-8, el cual es un carbono terciario que se observa en la literatura a 36.4 ppm, señal que no se encuentra en el espectro experimental, pero resuena una señal de gran intensidad correspondiente a un carbono secundario, a 29.8 ppm la cual no está asignada a ningún átomo de C. Esta señal fue asignada al C-8 del compuesto aislado, proponiéndose la perdida del metilo que esta sustituyendo a C-8, tratándose el compuesto **Va** de un diterpeno 8-nor-clerodano. El nombre que se le otorga a la estructura propuesta para el compuesto **Va** es ácido 8-nor-(5R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico. Debido a que se observó que el compuesto no estaba puro, se continuó con la revisión bibliográfica y se encontró que las demás señales experimentales se ajustan con las reportadas para un isómero configuracional del ácido kolavénico: ácido (5S,8R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico (**Vb**).^[79]



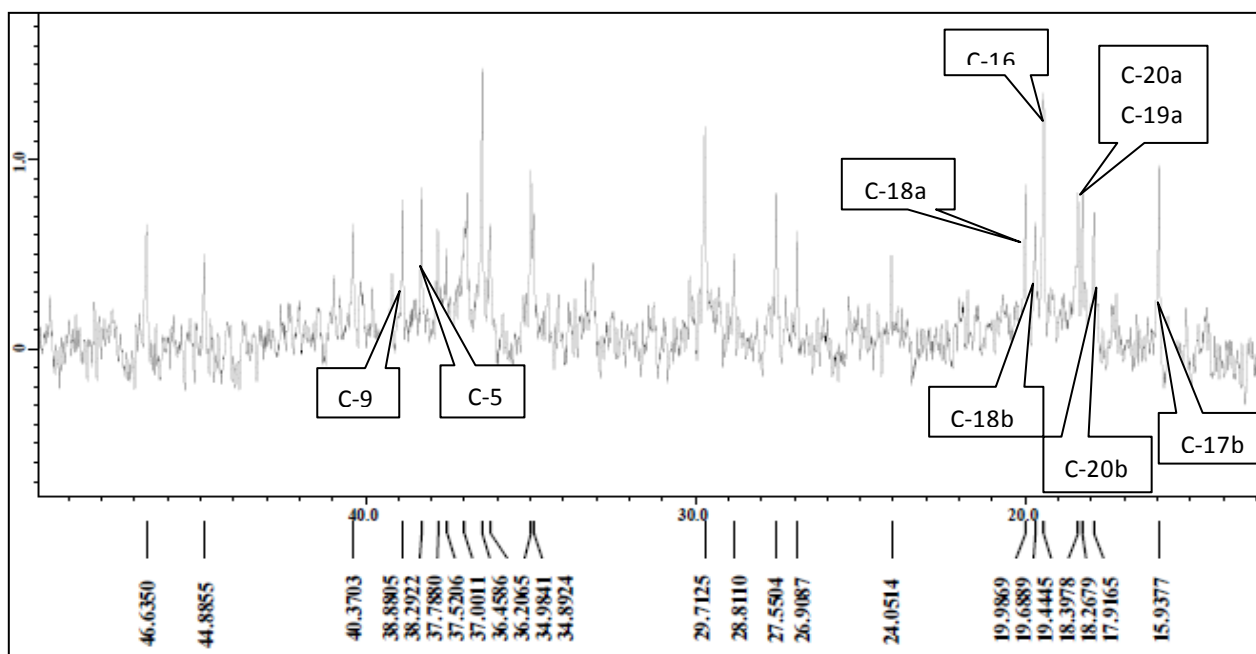
Espectro 17. Espectro ¹H RMN del compuesto V.

Los compuestos **Va** y **Vb** son muy similares, la única diferencia entre ellos es la pérdida del C-17 de **Va**, además de la esteoquímica del C-5. El compuesto **Va** tiene un configuración R en C-5, mientras que el compuesto **Vb** tiene una configuración S, para esa misma posición, lo que origina que los átomos de carbonos adyacentes presenten ligeras diferencias en cuanto a sus desplazamientos químicos.



Espectro 18. Espectro ^{13}C RMN a campo bajo del compuesto V.

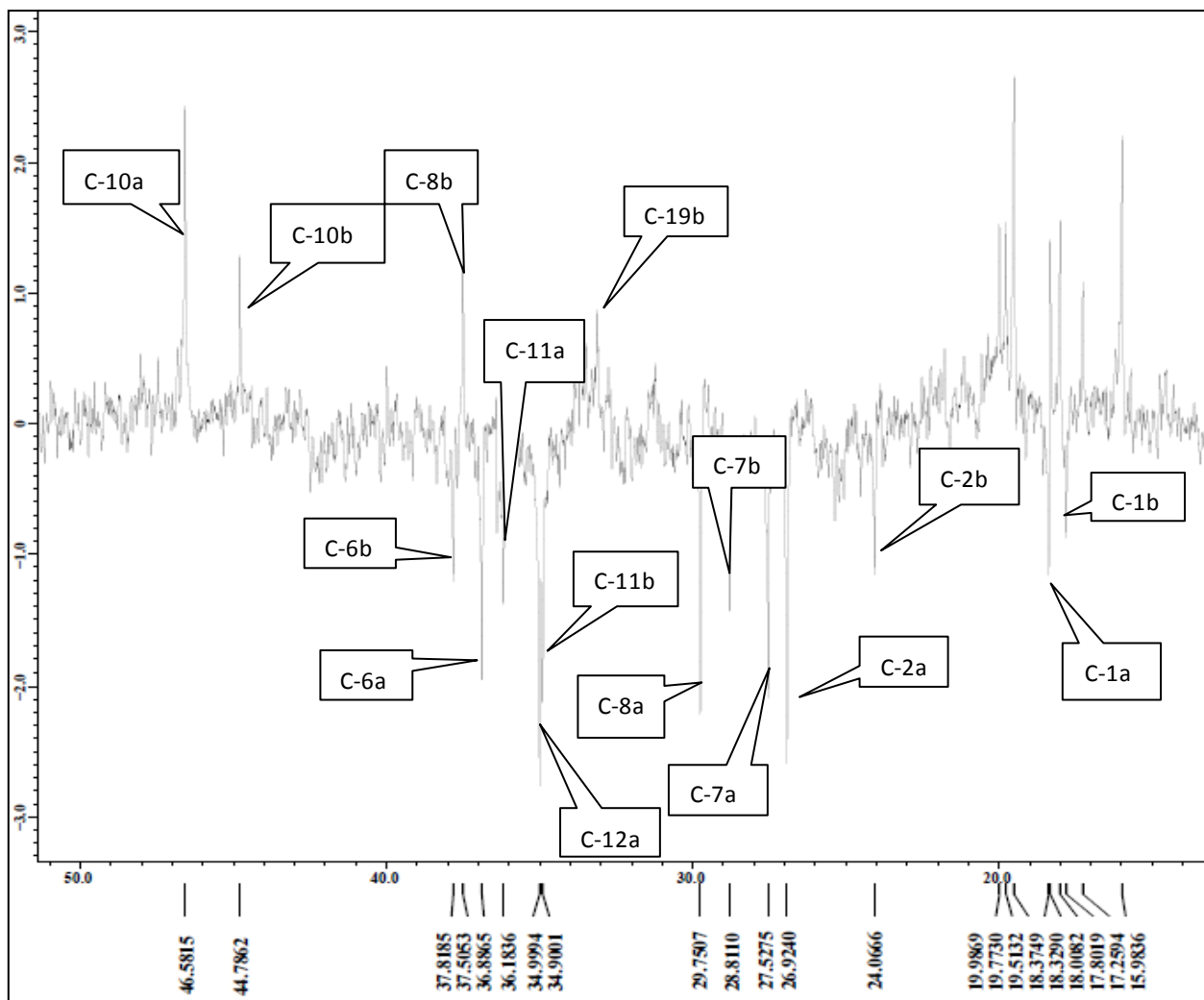
En el Espectro 18 se observan además, las señales olefinicas a 114.8 y 164.3 ppm, estas fueron asignadas a los átomos C-13 y C-14 de ambas estructuras, la cual es una olefina, que se encuentra adyacente al ácido carboxílico (C-15).



Espectro 19. Espectro ^{13}C RMN a campo alto del compuesto V.

A campo alto (Espectro 19) puede visualizarse un gran grupo de señales que corresponden a los carbonos saturados del esqueleto terpenoidal. Con soporte del experimento DEPT-135 (Espectro 20), se observó que en la zona alifática se encontraban 7 metilos, 12 grupos metilénicos, 4 metinos y 2 carbonos cuaternarios. Los carbonos cuaternarios pertenecen a los carbonos C-5 y C-9, los cuales son señales características de carbonos puente entre dos anillos de un núcleo terpenoidal unidos además a un grupo metilo. En la zona entre 15.9 y 20.0 ppm se observan siete señales,

los cuales corresponden a los grupos metilos desde C-16 hasta C-20 de ambos compuestos. El C-5 del compuesto **Vb** posee una configuración S, y esta sustituido por un grupo metilo (C-19), dicho metilo por esa configuración resuena a un desplazamiento químico de 33.0 ppm, mientras que el C-5 del compuesto **Va** posee una configuración R y el C-19 unido a el, es observado a 18.0 ppm.^[79] La comparación de los datos obtenidos con lo reportado en la bibliografía para la mezcla de compuestos se encuentra en las Tablas 12 y 13.

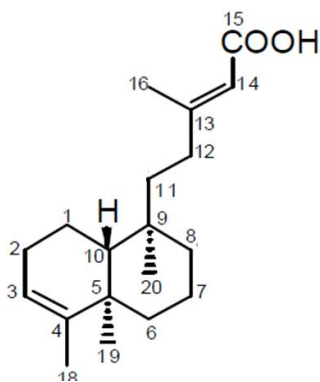


Espectro 20. Experimento DEPT-135 a campo alto del compuesto V.

Tabla 12. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto Va

N°C	Ácido kolavénico ^a	Compuesto Va $\delta\text{C exp. (ppm)}^b$	DEPT
1	18.3	18.4	CH ₂
2	26.9	26.9	CH ₂
3	120.5	120.4	CH
4	144.5	144.3	C
5	38.2	38.3	C
6	36.8	36.9	CH ₂
7	27.5	27.5	CH ₂
8	36.3 (CH)	29.8 (CH ₂)	-
9	38.3	38.8	C
10	46.5	46.6	CH
11	36.3	36.2	CH
12	35.0	35.0	CH ₂
13	164.6	164.3	C
14	114.8	114.8	CH
15	172.1	172.1	C
16	19.5	19.5	CH ₃
17	16.0	-	CH ₃
18	20.0	19.9	CH ₃
19	18.0	18.3	CH ₃
20	18.3	18.4	CH ₃

^a tomado en CDCl_3 a 75 MHz. ^[79] ^b tomado en CDCl_3 a 270 MHz

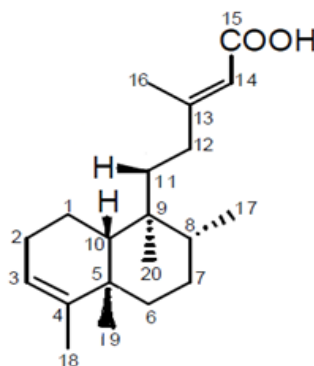


Ácido 8-nor-(5R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico

Tabla 13. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el ácido compuesto Vb

N° C	Acido (5S,8R,9S,10R)-ent-Clerod-3,13-dien-15-oico δC teórico (ppm) ^a	Compuesto Vb δC experimental (ppm) ^b	DEPT
1	18.6	17.8	CH ₂
2	24.1	24.1	CH ₂
3	123.3	123.2	CH
4	139.8	139.8	C
5	37.9	38.3	C
6	37.6	37.8	CH ₂
7	28.9	28.8	CH ₂
8	37.5	37.5	CH
9	38.9	38.8	C
10	44.9	44.8	CH
11	35.0	34.9	CH ₂
12	37.0	36.9	CH ₂
13	164.5	164.3	C
14	115.1	114.8	CH
15	172.4	172.1	C
16	19.6	19.5	CH ₃
17	16.1	16.0	CH ₃
18	20.0	19.8	CH ₃
19	33.2	33.0	CH ₃
20	17.9	17.9	CH ₃

^a tomado en CDCl_3 a 75 MHz^[79] ^b tomado en CDCl_3 a 270 MHz

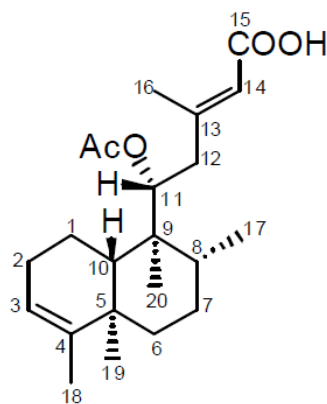


Ácido (5S,8R,9S,10R)-ent-clerod-3,13-dien-15-oico)

No se encontraron propiedades medicinales reportadas para los compuestos aislados. Solo se reportan propiedades farmacológicas para el ácido kolavénico, el cual posee un esqueleto similar al de los metabolitos aislados. Se encontró en la revisión bibliográfica que el ácido kolavénico posee propiedades citotóxicas, antifúngicas e hipotensivas.^[80] El ácido kolavénico ha presentado significativa actividad antibacteriana contra una serie de bacterias tanto gram positivas como gram negativas, entre ellas se encuentran: *Bacillus subtilis*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Shigella boydii*.^[81-82]

6.1.6. Compuesto VI. Ácido 11R*-acetoxi-kolavénico.

Este compuesto fue aislado de la fracción 54 del extracto de hexano, fue eluido de una CC de fase normal con una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 98:2. Se presentó en forma de un sólido amorfo de color blanco y reveló morado con *p*-anisaldehído, lo que indica la presencia de un compuesto con esqueleto terpenoidal. De este compuesto se aisló 44,6 mg, el cual representa un 1,78% de la fracción sembrada en la columna cromatográfica y un 0,0089% con respecto al material vegetal inicial.



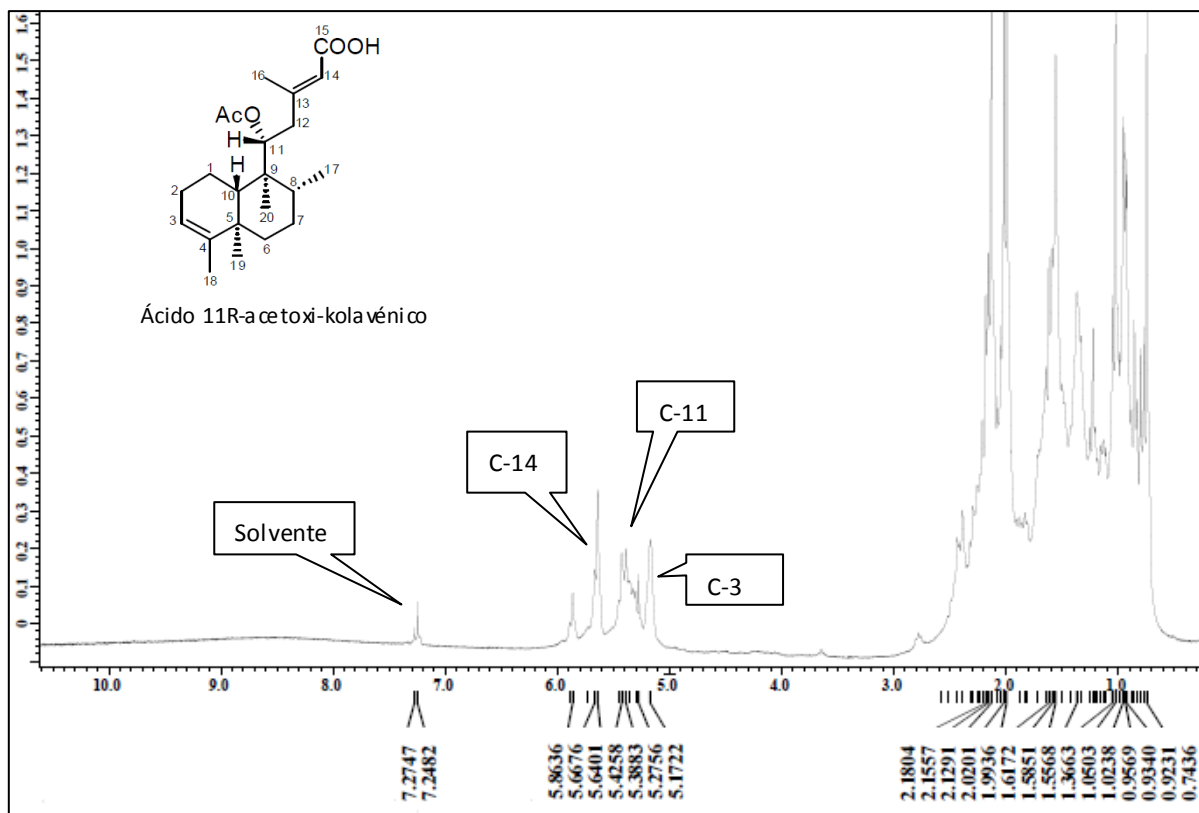
Compuesto VI

El espectro de RMN ^1H (Espectro 21) del compuesto VI es muy similar al espectro de RMN ^1H del compuesto V, se encuentran dos protones olefínicos, uno resuena a 5.66 ppm y otro a 5.17 ppm, se observa además un doblete a δH 5.43 ($J=10.1$) que corresponde al protón adyacente a un grupo éster. Se observan señales características de grupos metilos y metilénicos en la zona 1.40 a 2.50 ppm.

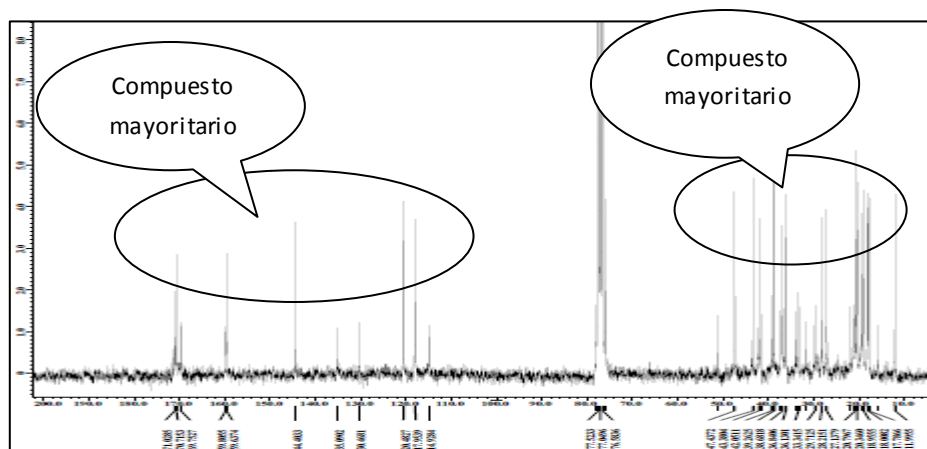
En el espectro RMN ^{13}C (Espectro 22), se visualiza claramente presencia de dos compuestos, ya que la diferencia entre la intensidad de las señales del compuesto mayoritario y minoritario es notable, esto no implica un inconveniente en la elucidación del compuesto mayoritario. En el espectro de ^{13}C RMN del compuesto VI se observan 21 señales, las cuales son características de núcleos terpenoidales y son muy similares al compuesto V, por lo que se puede deducir la presencia de un diterpeno tipo clerodano.

En la zona olefínica del espectro de ^{13}C RMN (Espectro 23) pueden observarse cuatro señales: a 120.5 y 144.4 ppm los cuales corresponden con el doble enlace endocíclico C-3 - C-4 de un diterpeno tipo clerodano y a 158.8 y 117.1 ppm resuenan las señales correspondientes a C-13 y C-14 de la olefina que se encuentra adyacente al grupo carbonílico del ácido carboxílico. La señal del ácido carboxílico (C-15) se observa a δC 171.7. Además de la señal del ácido, a campo bajo, en la zona de señales carbonílicas, se observa a 171.0 ppm una señal, la cual por su desplazamiento químico fue asignada a un grupo éster. A 75.9 ppm resuena una señal correspondiente a un carbono unido a un heteroátomo, específicamente un oxígeno.^[74]

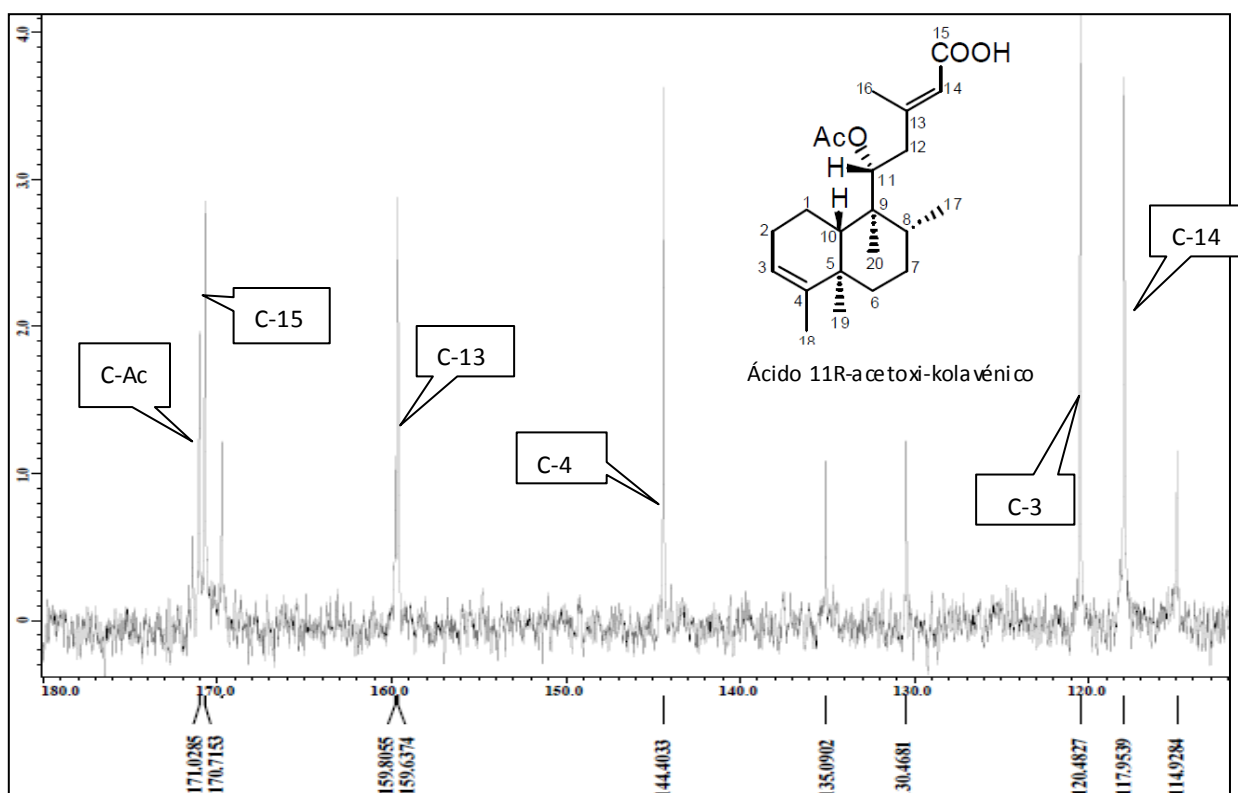
Se realizó una revisión bibliográfica de diterpenos de tipo clerodano con un esqueleto similar al del compuesto V, que tuviese al menos dos olefinas, dos grupos carbonílicos y un enlace carbono – oxígeno, encontrándose que los valores de las señales experimentales se ajustan con las reportadas para el ácido 11R-acetoxi-kolavénico, el cual en estudios previos ha sido aislado de la especie *Plectranthus ornatus*,^[83] donde se pudo observar que la señal a 75.9 ppm se corresponde con un grupo acetoxi unido por el oxígeno al C-11 de la estructura (Espectro 24).



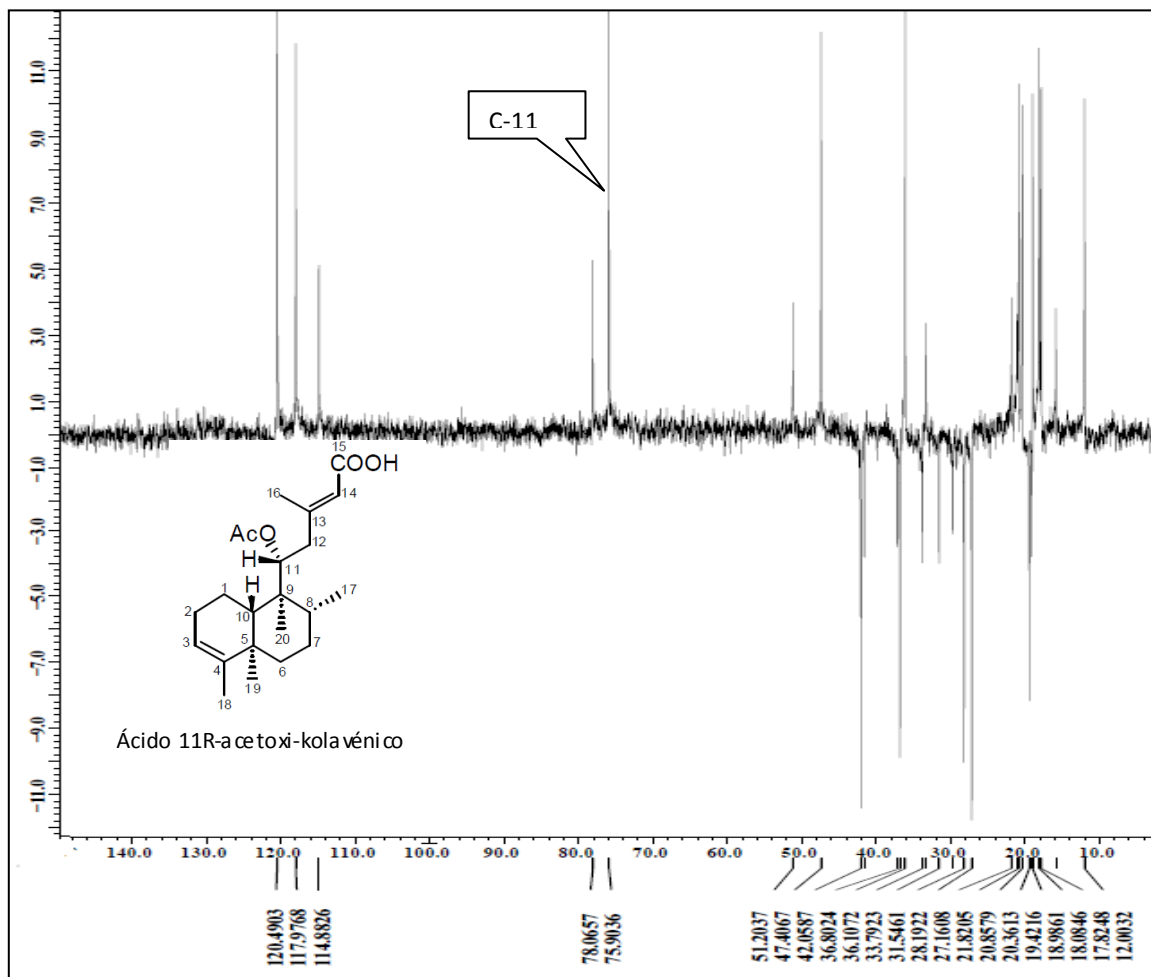
Espectro 21. Espectro ¹H RMN del compuesto VI.



Espectro 22. Espectro ^{13}C RMN de compuesto VI



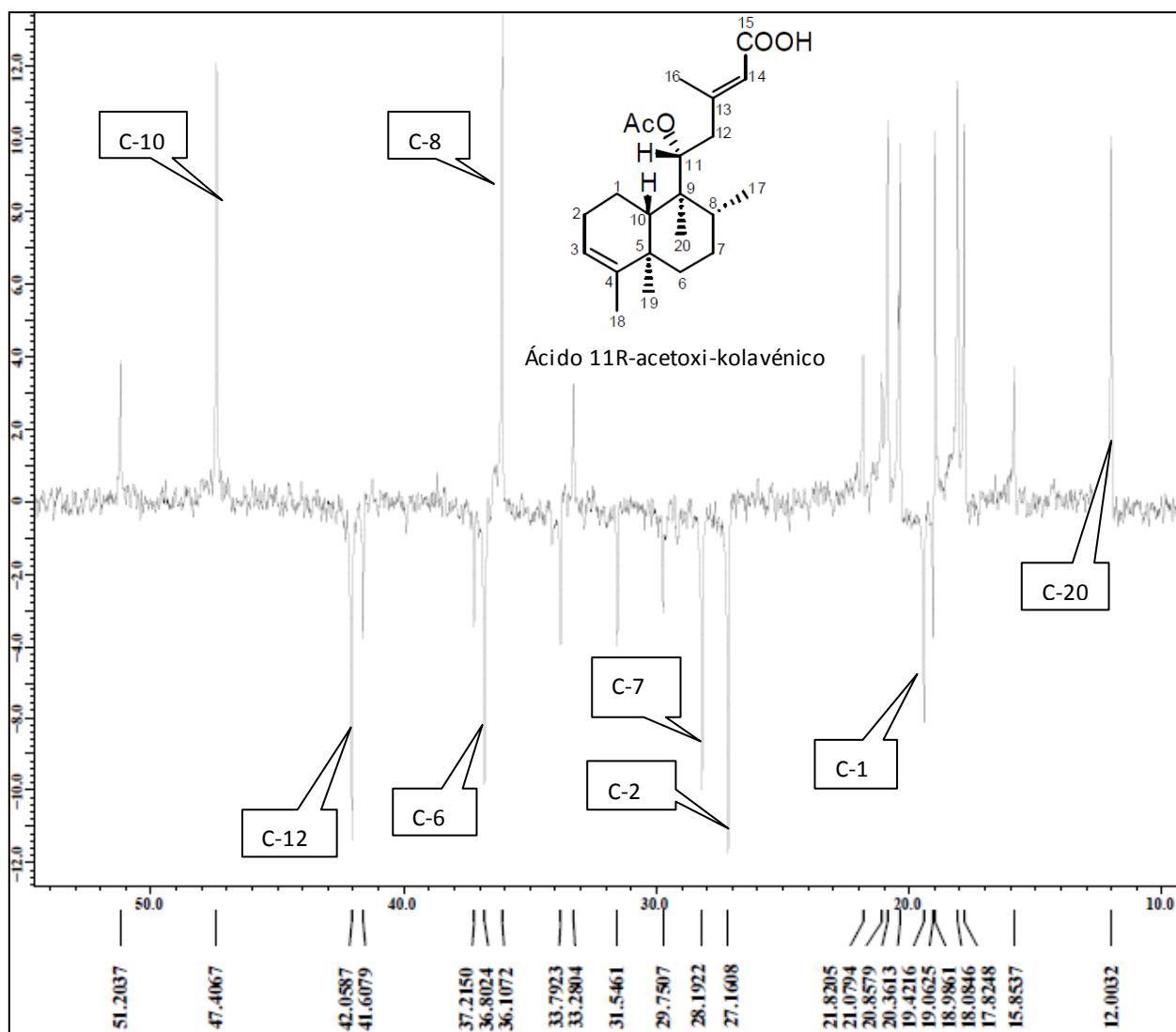
Espectro 23. Espectro ^{13}C RMN a campo bajo del compuesto VI.



Espectro 24. Espectro DEPT-135 del compuesto VI

En el espectro del experimento DEPT-135 ampliado (Espectro 25), se pueden observar a campo alto (zona: 10.0 – 50.0 ppm) 6 carbonos pertenecientes a grupos metilos, 5 a grupos metilenos, 2 a grupos metínicos y 2 carbonos cuaternarios. Los carbonos cuaternarios se ubican a un desplazamiento químico de 38.7 y 43.4 ppm, los cuales corresponden a carbonos tipo puente entre dos anillos unidos además a un grupo metilo (C5 y C9). La comparación de los datos experimentales del compuesto

mayoritario con los reportados en la bibliografía^[83] se encuentran en la Tablas 14 y 15. Mientras que el compuesto minoritario aún se encuentra en elucidación.



Espectro 25. Espectro DEPT-135 del compuesto VI. (Ampliado)

Tabla 14. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^1H de los átomos de H presentes en el compuesto VI.

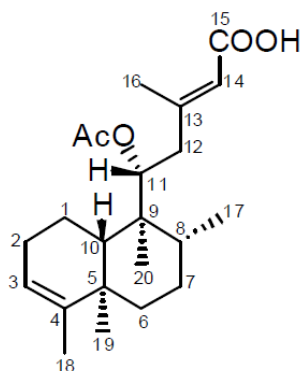
N° H	Compuesto ácido 11R*- acetoxi-kolavénico ^a δH teórico (mult., J(Hz))	Compuesto V ^b δH exp., (mult., J(Hz))
1	β 1.87 m α 1.55 m	- -
2	2.10 m 1.99 m	- -
3	5.19 s	5.17 s
4	-	-
5	-	-
6	β 1,19 dd α 1,73 m	1.13 -
7	1.45 m	-
8	1.55 m	1.58
9	-	-
10	1.40 m	1.37
11	5.44 (dd, 1.3, 9.8)	5.43
12	β 2.44 (d, 13.2) α 2.28 m	2.44 -
13	-	-
14	5.67 s	5.64 s
15	-	-
16	2.16 (d, 1.2)	2.16
17	0.98 (d, 6.4)	0.94 (d, 6.2)
18	1.56 s	1.56 s
19	1.05 s	1.02 s
20	0.77 s	0.74 s
11-OAc	2.02 s	2.02 s

^a tomado en CDCl_3 a 75 MHz.^[83] ^b tomado en CDCl_3 a 270MHz

Tabla 15. Asignaciones de los desplazamientos químicos de las señales de RMN ^{13}C de los átomos de C presentes en el compuesto VI.

N° C	Compuesto ácido 11R*-acetoxi-kolavénico ^a δC teórico	Compuesto V ^b δC exp.	DEPT
1	19.5	19.4	CH ₂
2	27.3	27.1	CH ₂
3	120.6	120.5	CH
4	144.6	144.4	C
5	38.8	38.7	C
6	36.9	36.8	CH ₂
7	28.3	28.2	CH ₂
8	36.2	36.1	CH
9	43.4	43.4	C
10	47.5	47.4	CH
11	76.0	76.6	CH
12	42.2	42.1	CH ₂
13	160.1	159.6	C
14	118.1	118.0	CH
15	171.7	170.7	C
16	19.1	19.0	CH ₃
17	17.9	17.8	CH ₃
18	18.3	18.1	CH ₃
19	20.5	20.4	CH ₃
20	12.1	12.0	CH ₃
11-OAc	21.0	20.9	CH ₃
11-OAc	-	171.0	C

^a tomado en CDCl_3 a 75 MHz.^[83] ^b tomado en CDCl_3 a 70MHz



Compuesto VI. Ácido 11*R**-acetoxi-kolavénico

6.2. Sección farmacológica.

6.2.1. Determinación de la dosis letal media

En la evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso, se observaron una serie de manifestaciones sintomáticas: sedación, piloerección y diarrea efectos que fueron dependientes de la dosis. A la mayor dosis suministrada, 5 g/Kg y en todo el rango de dosificaciones menores a ese valor, se encontró 100% de supervivencia. Se seleccionó como efecto tóxico representativo la piloerección debido a que fue un efecto concurrente en la población, dependiente de la dosis y desaparece en el tiempo (Figura 5). Otro efecto evaluado, fue el equilibrio, a pesar de que los ratones presentaron sedación, el 100% de la población no presentó pérdida de equilibrio, ni descoordinación motora.

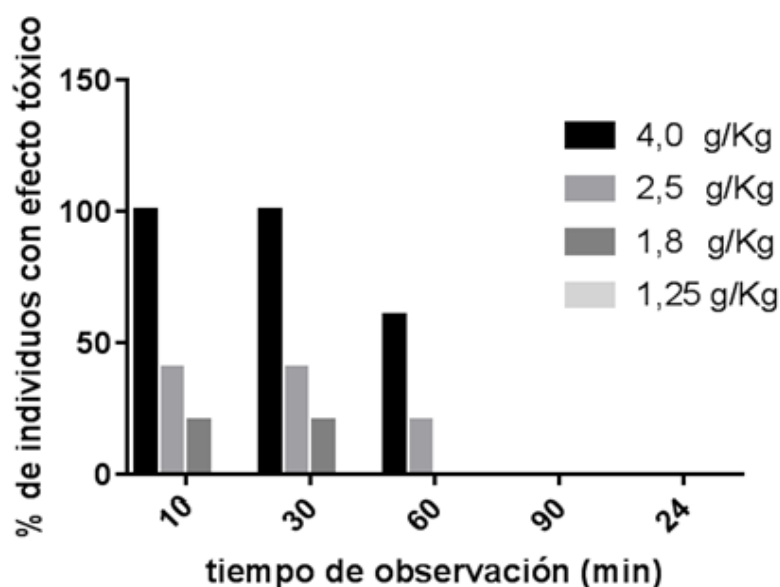


Figura 5. Porcentaje de animales que presentaron el efecto tóxico “piloerección” en función de la dosis administrada del EAL y del tiempo de observación. (Tiempo indicado como 24 tiene unidades de horas).

En la figura 5 se puede observar que el efecto toxico se presenta principalmente entre los primeros 5 – 30 min luego de la administración del extracto, y va disminuyendo con el tiempo, a los 90 min y 24 horas no se encontró el efecto en los animales experimentales, de lo observado puede deducirse que la piloerección es un efecto reversible. La piloerección es un reflejo motor que se evidencia con la erección visible de los pelos de los animales o del ser humano, y que involucra al músculo erector del folículo piloso, el cual conecta la raíz del pelo a la capa interna basal de la epidermis. La erección del folículo piloso se desencadena por la activación de los receptores alfa 1 adrenérgicos (estimulados por la adrenalina) con participación del sistema nervioso autónomo (rama simpática).^[84]

En la Tabla 16 se encuentra el porcentaje de ratones que presentaron el efecto tóxico (piloerección) en función de la dosis administrada. La determinación de la DT_{50} fue realizada por el método de Litchfield y Wilcoxon,^[57] a través de la construcción de una curva de porcentaje de efecto tóxico versus el logaritmo de la dosis (Figura 6). Se obtuvo una DT_{50} de 2,143 g/Kg (1,747 - 2,791).

Tabla 16. Porcentaje de animales que presentan el efecto piloerección a las diferentes dosis del extracto acuoso de *P. neochilus* en ratones CD1.

Dosis (g/Kg)	% de animales con el efecto
5,00	100,0
4,00	100,0
2,50	40,0
1,80	20,0
1,25	0,0

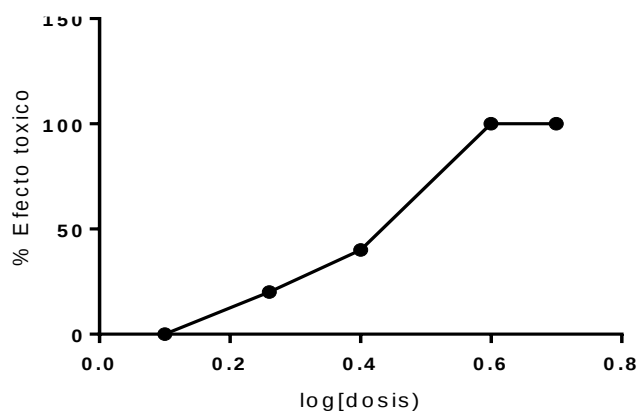


Figura 6. Porcentaje de animales con el efecto tóxico (piloerección) en función del log de la dosis.

6.2.2. Evaluación de la actividad antinociceptiva.

Se utilizaron tres métodos para determinar la actividad analgésica del extracto, el método químico que consiste en el estudio de la analgesia en respuesta nociceptiva inducida por ácido acético,^[58] el método térmico que evalúa la analgesia en respuesta nociceptiva inducida por calor^[59] y el método de la formalina, el cual también es un método químico, pero se divide en dos fases: la fase 1, indicativa de dolor neurogénico (primeros 5 min), y la fase 2, indicativa de dolor inflamatorio (15 a 30 min después de la administración de la formalina).^[60] En el estudio se ocasionó dolor a los individuos y los resultados obtenidos fueron comparados con un grupo control y con fármacos con propiedades analgésicas comprobadas, para tratar de establecer si el extracto acuoso de *P. neochilus* posee actividad antinociceptiva y su posible mecanismo de acción.

En el caso del ser humano, éste puede distinguir y describir una gran cantidad de sensaciones dolorosas, pero los animales muestran sólo respuestas de tipo vegetativo somatomotor. En la valoración de la acción analgésica se suelen medir respuestas somatomotoras, bien de tipo monosináptico, como la retirada de la cola (método térmico) o polisináptico, como la vocalización, el salto y la contractura de la musculatura abdominal (método químico).^[85]

La sensación de dolor se produce como una señal de la destrucción de tejidos por estímulos mecánicos, térmicos o químicos. En este trabajo el dolor será producido químicamente mediante la inyección de ácido acético vía intraperitoneal y la inyección de formalina de forma subcutánea en la parte plantar de la pata trasera y térmicamente mediante inducción de dolor con calor en la cola del individuo. El mensaje nociceptivo que se produce, resulta de la excitación de los receptores de las terminaciones

nerviosas libres del tejido cutáneo, muscular o de la pared de las vísceras. La transmisión de una señal nociceptiva requiere de su transporte desde un receptor periférico o central hasta la medula.^[86] En este punto actúan los receptores de dolor, también llamados nociceptores. Las neuronas que poseen regiones receptoras especializadas de dolor, son llamadas aferentes. De la estimulación de los receptores se produce el proceso de la información aferente que indica la calidad, intensidad y localización del estímulo.^[87]

6.2.2.1. Método químico: Contracciones abdominales inducidas por ácido acético.

La administración ip del ácido acético en los ratones, indujo una irritación peritoneal que produce contorsiones abdominales y extensión de las patas traseras. En los estudios realizados se logró observar la disminución de las contracciones observadas en los animales experimentales al suministrar el EAL a sus diferentes dosis (Tabla 17).

Tabla 17. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de las hojas frescas de *P. neochilus* por el método químico.

Grupo	Dosis (mg/Kg)	Número de contorsiones	Porcentaje de inhibición, %
Control	-	83,4 ± 2,8	-
Ketoprofeno	8,0	60,0 ± 2,0	27,7
Aspirina	100,0	34,3 ± 0,9	59,0
Aspirina	200,0	24,2 ± 1,4	71,1
Tramadol	5,0	10,5 ± 2,6	87,4
Extracto Acuoso L.	268,0	82,9 ± 1,41	0,6
	535,0	75,3 ± 2,0	9,7
	1070,0	62,4 ± 2,6	25,2

A la dosis de 1070 mg/Kg ($\frac{1}{2}$ DT₅₀), se encontró el mejor efecto antinociceptivo entre las dosis del extracto acuoso liofilizado suministradas, el estímulo doloroso disminuyó en un 25,2% al ser comparado con el grupo control, valor de inhibición que tiene una mediana significancia según la estadística y se asemeja a los resultados observados con el ketoprofeno (8 mg/Kg) (Figura 7), a la dosis de 535,0 mg/Kg se obtuvo un efecto analgésico del 9,7% el cual fue poco significativo y finalmente a dosis menores del EAL (268 mg/Kg, $\frac{1}{8}$ DT₅₀) se observó un leve efecto analgésico, pero los resultados no fueron significantes, con los resultados obtenidos se puede afirmar que el efecto es dependiente de la dosis.

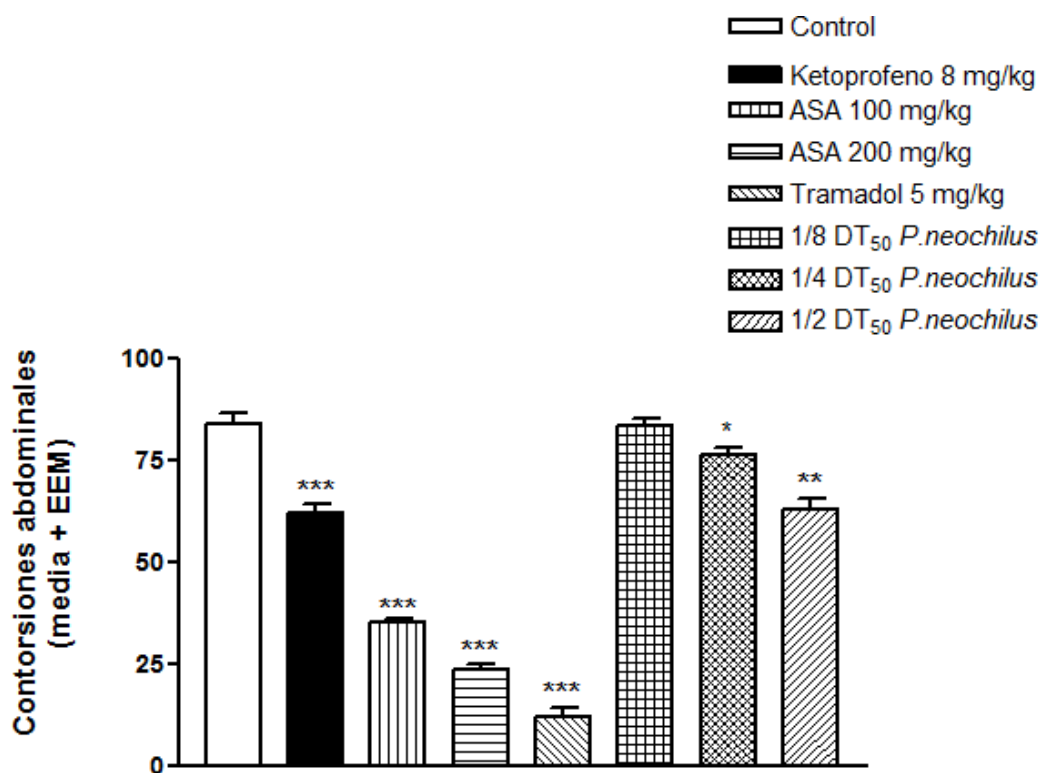


Figura 7. Evaluación del efecto antinociceptivo del EAL de las hojas frescas de *P. neochilus* por el método químico. Los datos son expresados como la media $\pm$ el error estándar de la media. ***p<0,001 (alta significancia); **p<0,01 (significancia media)

*p<0,05 (baja significancia; ns (no significativo)).

El tramadol, es un analgésico central de tipo opioide (similar a la morfina),^[88] al utilizar este fármaco como referencia se logró observar una significativa reducción del estímulo doloroso, inhibiéndolo en un 87,4% ($p < 0,0001$), el tramadol exhibió el mejor efecto antinociceptivo entre los fármacos utilizados, caracterizado por poseer un mecanismo de acción por vía central. La aspirina (ASA), es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE)^[89] y es utilizado generalmente en dosis de 100 y 200 mg/Kg, en el ensayo realizado logró observarse un porcentaje de inhibición del dolor de 59,0 y 71,1% respectivamente, este tipo de fármacos actúa vía periférica. El ketoprofeno fue utilizado a una dosis de 8,0 mg/Kg, obteniéndose un 27,7% de inhibición nociceptiva, al igual que la aspirina el ketoprofeno es un antiinflamatorio no esteroideo.^[89]

Al administrar ácido acético por vía intraperitoneal, se provoca un efecto doloroso como consecuencia de la liberación de neurotransmisores como la serotonina, histamina, prostaglandinas, bradiquininas y sustancia P, encargados de generar estímulos en las neuronas aferentes sensibles a los antiinflamatorios no esteroideos.^[87] Los resultados obtenidos a través de este modelo experimental, muestran que el mecanismo de acción del extracto acuoso liofilizado puede estar mediado por una acción periférica, que podría reducir la síntesis de prostaglandinas o interferir en el mecanismo de transducción de los nociceptores primarios aferentes involucrados.^[85]

6.2.2.2. Método térmico: modelo del retiro de la cola

El método térmico es un ensayo que estima los cambios en el umbral de dolor de los animales experimentales, los cuales se ven manifestados con una respuesta de retiro de la cola. Los resultados obtenidos en la realización de dicho método, se puede observar en la Tabla 18.

Tabla 18. Efecto antinociceptivo del EAL de las hojas frescas de *P. neochilus* por el método térmico.

Grupo	Dosis [mg/Kg]	Tiempo de latencia, [seg]	
		30 min	240 min
Control	-	2,08 ± 0,15	2,11 ± 0,26
ketoprofeno	5,0	2,37 ± 0,35	2,51 ± 0,29
Extracto acuoso liofilizado	1070,0	4,02 ± 0,68	3,56 ± 0,31

Se observó que EAL solo a los 30 minutos incrementó en forma significativa el umbral del dolor en el ensayo. Los resultados obtenidos para el ketoprofeno, utilizado como control positivo fueron similares al control (Figura 8).

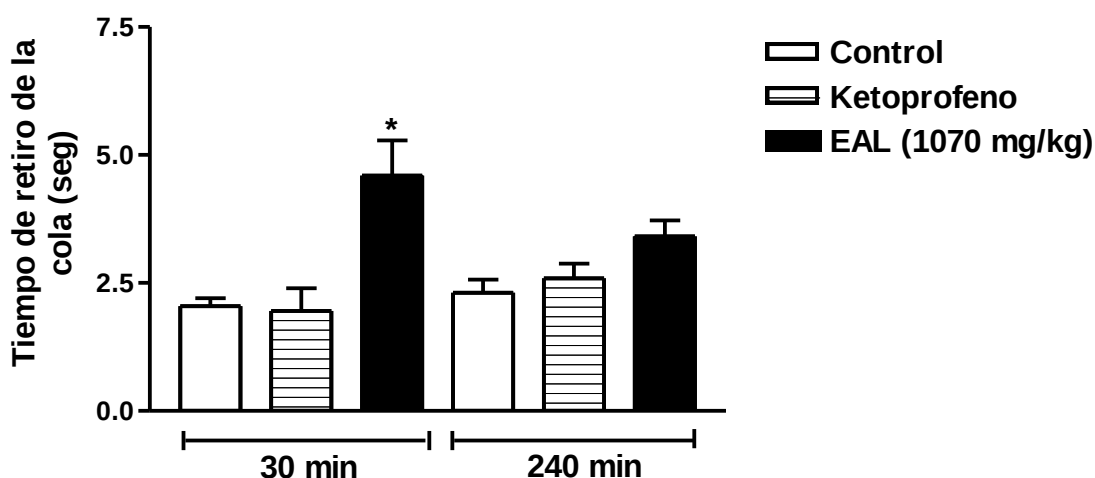


Figura 8. Efecto analgésico del extracto acuoso de las hojas frescas de *P. neochilus* por el método térmico. Los datos son expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0,05 (baja significancia; ns (no significativo)).

Con este ensayo se demuestra que el extracto acuoso posee actividad analgésica interfiriendo con la vía central. Se requieren ensayos posteriores para establecer a través de que receptores el extracto es capaz de inhibir la vía nociceptiva. Uno de esos ensayos es el pretratamiento con naloxona, un antagonista no-selectivo de los receptores opioides, el cual es usado para verificar si el sistema opioide esta involucrado en el mecanismo de acción de un analgésico.^[85]

La estimulación térmica dolorosa a la que fueron expuestos los animales experimentales, 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 del dolor por vía central a través del sistema opioide endógeno.^[90]

6.2.2.3. Modelo de la formalina.

El estímulo nociceptivo inducido por la formalina es un estímulo químico, al igual que el método del ácido acético, pero presenta características diferentes. La administración en la pata de la formalina produce dos fases, claramente diferenciadas, que involucran mecanismos distintos.

La primera fase (0 - 5 min) corresponde a un dolor agudo de tipo neurogénico que es sensible a drogas que interactúan con el sistema opioide, mientras que la segunda fase (15 - 30 min) resulta de la acción de mediadores inflamatorios en los tejidos periféricos, que es inhibido tanto por drogas opioides, como por drogas de tipo AINE. Las sustancias que actúan primariamente como analgésicos centrales inhiben ambas fases,

mientras que las drogas que actúan de manera periférica inhiben solo la segunda fase.^[85] De esta manera, este ensayo puede ser utilizado para postular un posible mecanismo del efecto antinociceptivo de un analgésico propuesto.

El dolor ocasionado por la inyección de la formalina en la pata trasera de los individuos, ocasionó que estos se lamieran, rascaran y mordieran constantemente la pata inyectada. En la Tabla 19, puede encontrarse el tiempo de latencia observado para cada una de las dosis administradas, los fármacos utilizados y el grupo control.

Tabla 19. Efecto antinociceptivo del EAL de las hojas frescas de *P. neochilus* en la prueba de la formalina

Grupo	Dosis [mg/Kg]	Fase neurogénica [seg]	Fase inflamatoria [seg]
Control	-	84,5 ± 9,0	108,0 ± 13,9
Aspirina	200,0	79,7 ± 4,7	52,7 ± 10,9
Morfina	5,0	5,5 ± 3,4	0,3 ± 0,5
Extracto Acuoso L.	268,0	84,0 ± 4,6	98,3 ± 4,0
	535,0	69,3 ± 4,5	76,7 ± 7,1
	1070,0	53,0 ± 2,0	48,0 ± 2,7

En la Figura 9 se observa que el extracto acuoso de *P. neochilus* inhibe ambas fases en la prueba de la formalina, siendo un efecto dependiente de la dosis. El efecto analgésico del EAL fue significativo en ambas fases con respecto al control, aún cuando parece ejercer un efecto más pronunciado en la segunda fase. Se obtuvo que el mejor efecto antinociceptivo se produjo con la morfina, este es un analgésico del tipo opioide

que actúa por vía central y reduce el estímulo doloroso en ambas fases. La aspirina, en cambio solo produjo una inhibición significativa en la segunda fase, lo cual era de esperarse debido a que actúa vía periférica.^[89]

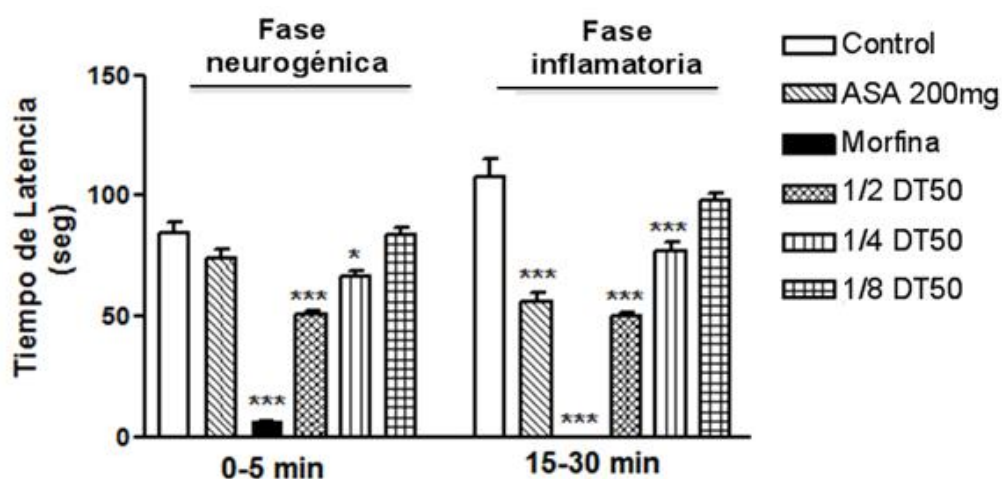


Figura 9. Evaluación del efecto antinociceptivo del EAL de las hojas frescas de *P. neochilus* por la prueba de formalina en ratones. Cada columna representa la media más el error estándar de la media (EEM). *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

La primera fase excitatoria en la prueba de formalina es debida a la acción directa del formaldehído sobre los nociceptores y la liberación inmediata de mediadores, esta se llevan a cabo eventos centrales, por lo que es sensible solo a drogas opioides; la segunda fase excitatoria resulta de la acción de mediadores inflamatorios en los tejidos periféricos, como prostaglandinas, serotonina, histamina, bradiquinina y es inhibido tanto por drogas opioides como por drogas tipo AINE.^[85]

El extracto acuoso liofilizado presentó inhibición nociceptiva por los tres métodos empleados. Por el método químico el extracto acuoso presentó un efecto antinociceptivo significativo lo que permite postular la vía periférica como la vía de acción; en el caso del método térmico, el aumento del umbral del dolor por acción del EAL fue poco significativo, a pesar de ello no se puede descartar la intervención del sistema nervioso central en el mecanismo de acción. Esto se corrobora con lo obtenido con el método de la formalina debido a que se establece una acción periférica y central del extracto acuoso de *P. neochilus* debido a que inhibe ambas fases.

En base a los resultados obtenidos por los tres métodos de estudio antinociceptivos se logró determinar que el principal mecanismo de acción de los principios activos es por vía periférica. Se puede postular que el principal mecanismo de acción de los principios activos del extracto es a través del bloqueo de la producción de prostaglandinas por medio de unión e inhibición de las ciclooxygenasas (COX). El resultado de este efecto es principalmente la reducción de la inflamación y la sensibilización de los nociceptores periféricos, pero igualmente tienen acción analgésica a nivel central, donde posiblemente los receptores opioides tengan alguna participación.^[91] A pesar de esa postulación, se necesitan estudios posteriores para determinar cuáles son los mediadores a través del cual actúa el extracto acuoso de *P. neochilus*.

6.2.3. Actividad citotóxica.

La evaluación de actividad citotóxica *in vitro* en células tumorales humanas, se emplea a fin de detectar moléculas con potencial actividad antitumoral, siendo un componente importante de estudios para la selección y desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

De igual forma es una alternativa para evaluar el daño que le puede hacer un determinado extracto o compuesto a los fibroblastos (línea celular normal).

La determinación de la actividad citotóxica sobre las células neuroblastoma humanas de la línea celular SH-SY5Y del extracto acuoso liofilizado de *Plectranthus neochilus* por el método de MTT,^[61] mostró una leve a moderada citotoxicidad a dosis altas tal como se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Porcentaje de efecto citotóxico del extracto acuoso liofilizado.

% de citotoxicidad		
Concentraciones evaluadas [ppm]	24 horas	48 horas
10,0	1,0 ± 0,74	2,77 ± 1,36
50,0	5,04 ± 1,93	8,86 ± 2,32
100,0	9,39 ± 2,31	16,64 ± 1,36
500,0	22,46 ± 1,20	25,08 ± 2,12
control	0,31 ± 0,01	0,71 ± 0,01

Se puede observar que la citotoxicidad es dependiente de la concentración, a mayor concentración del EAL mayor es el porcentaje de muerte celular. Aunque la variación en el tiempo de la citotoxicidad es leve, también se puede observar que el efecto es dependiente del tiempo de interacción muestra-célula. Con los datos obtenidos no pudo ser determinada el valor de la Cl_{50} , concluyéndose que el extracto posee una citotoxicidad de moderada a baja y su $Cl_{50} > 500 \mu M$,

En estudios previos se ha evaluado el efecto citotóxico de diversos extractos de *P. neochilus* sobre diferentes líneas celulares. En la evaluación del extracto hexanoico se obtuvieron CI_{50} de 540,9; 274,2; 500,0 y 762,1 ppm para las líneas celulares FaDu (cáncer de hipofaringe), SCC-25 (cáncer de lengua), L929 (fibroblastos) y HaCat (queratinocitos) respectivamente. Para el extracto etanólico se obtuvieron a 500 μ M porcentajes de citotoxicidad de aproximadamente un 80% para las líneas celulares estudiadas (FaDu, SCC-25, L929 y HaCat).^[92] No se encontraron estudios realizados de la evaluación de la citotoxicidad del extracto acuoso de *P. neochilus*. Estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos, validando que la especie posee un potencial citotóxico. Los porcentajes de citotoxicidad varían considerablemente de acuerdo al extracto y a la línea celular estudiada.

6.2.4. Actividad antioxidante

El oxígeno es esencial para los organismos vivos. Sin embargo, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico. Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN. No obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ROS. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento.^[93]

Una especie oxidante es aquella capaz de aceptar electrones de modo que va a generar un desequilibrio electrónico en las moléculas vecinas. El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, estando presente a una concentración más baja comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato. Los radicales libres se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas. Para estabilizarse reaccionarán rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de óxido-reducción. El término especies reactivas del oxígeno es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo HClO, HBrO, O₃, ONOO⁻, O₂⁻, o H₂O₂.^[94]

6.2.4.1. Atrapamiento de ión superóxido.

El extracto acuoso de *P. neochilus*, mostró un leve efecto antioxidante mediante el método de atrapamiento del ión superóxido, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21 y Figura 10.

Tabla 21. Porcentaje de atrapamiento del ion superóxido del extracto acuoso liofilizado de *P. neochilus*.

Especie	% Atrapamiento
EAL 400 ppm	7,8± 5,6
EAL 100 ppm	5,1 ± 5,6
Ácido gálico 100 ppm	55,6 ± 6,3

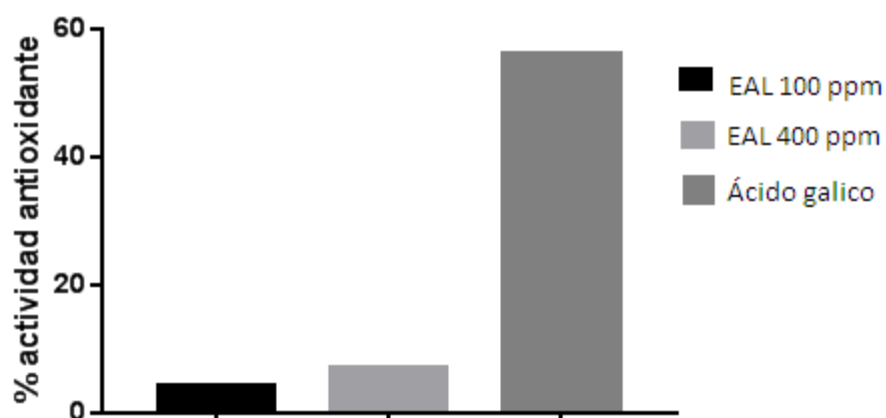


Figura 10. Porcentaje de efecto antioxidante del EAL por el método de atrapamiento del ión superóxido.

Puede observarse que la actividad antioxidante obtenida es un efecto dependiente de la concentración. Solo fueron evaluadas dos concentraciones a 400 ppm y a 100 ppm, obteniéndose en ambos casos un efecto antioxidante menor a un 10% de actividad, los cuales según la estadística no fueron significantes en comparación con el patrón positivo (ácido gálico).

Con esto se puede deducir que el extracto acuoso posee una actividad antioxidante leve, por lo que se deben encontrar metabolitos secundarios capaces de atrapar especies reactivas de oxígeno en dicho extracto.

6.2.4.2. Atrapamiento de peróxido de hidrogeno

El EAL mostró por el método de atrapamiento del peróxido de hidrógeno a una dosis máxima de 400 ppm un efecto antioxidante de $1,9 \pm 0,8$ % valores que concuerdan con la poca actividad obtenida por el método de atrapamiento del ión superóxido. Debido a

que el porcentaje de actividad antioxidante obtenido a la dosis máxima fue muy pequeño, no se realizaron estudios a concentraciones menores.

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por los métodos empleados muestran que el EAL de las hojas frescas de *P. neochilus* posee una actividad antioxidante baja. A pesar de que el EAL no sea un potente antioxidante, estos resultados permiten establecer la presencia de metabolitos con propiedades antioxidantes en el extracto acuoso de *Plectranthus neochilus*.

No se encontraron estudios previos acerca de la determinación de la actividad antioxidante de las hojas frescas de *P. neochilus*. Estudios farmacológicos reportados en la literatura han mostrado que el extracto acuoso (100 mg/L.) de las hojas secas de la especie posee una moderada actividad antioxidante, con un porcentaje de actividad del 12,8% por el método de DPPH, este efecto se le atribuye a la presencia de ácido rosmarínico **(25)** en el extracto, el cual fue identificado por HPLC.^[95] El ácido rosmarínico ha sido aislado en estudios anteriores realizados en Brasil y Portugal de *P. neochilus* y diversas especies del género: *P. verticillatus*, *P. barbatus*, *P. amboinicus*, entre otras.^[9,95] A pesar de que el ácido rosmarínico no fue identificado en este estudio, puede presumirse que el efecto antioxidante observado se debe posiblemente a la presencia de este metabolito en el EAL, esto se presume debido a la ocurrencia generalizada de ácido rosmarínico en los extractos acuosos de las especies del género *Plectranthus* y la subfamilia nepetoidae.^[9]

También han sido reportados estudios de la actividad antioxidante por el método de DPPH de los extractos de hexano y acetato de etilo de las hojas y del extracto metanólico de las flores de *P. neochilus* a concentraciones entre 50 y 400 ppm, donde a concentraciones bajas no se observa efecto y a concentraciones mayores a 200 ppm el porcentaje de actividad antioxidante se encuentra entre 4,0 y 11,0 %.^[18] Estos valores concuerdan con el estudio fitoquímico realizado en este trabajo a la especie, donde pudo observarse que son predominantes los terpenoides en los diferentes extractos. Aunque los terpenoides no son tan buenos atrapadores de ERO como los flavonoides, actúan también como antioxidantes protegiendo los lípidos, la sangre y demás fluidos corporales del ataque de radicales libres de especies de oxígeno,^[5] y posiblemente a algunos de ellos se le deba esa actividad. El β -sitosterol, por ejemplo, el cual es un triterpeno tetracíclico aislado en este estudio del extracto metanólico de *P. neochilus* reduce la producción de anión radical superóxido, peróxido de hidrogeno y óxido nítrico.^[71]

7. CONCLUSIONES

- a. Del extracto metanólico de las hojas frescas de *P. neochilus* fueron aislados los compuestos: estigmasterol (**Ia**), β -sitosterol (**Ib**), ácido hexadecanoico (ácido palmítico) (**II**), α -glucosapiranososa (**IIIa**) y β -glucosapiranososa (**IIIb**).
- b. Del extracto hexanoico de las hojas frescas de *P. neochilus* fueron aislados los compuestos: nonacosano (**IV**), ácido 8-nor-(5R,9S,10R)-ent-clerod-3,13-dien-15-oico (**Va**), ácido (5S,8R,9S,10R) -ent-Clerod-3,13-dien-15-oico (**Vb**) y ácido 11R-acetoxi-kolavénico (**VI**).
- c. Los compuestos **II**, **IIIa**, **IIIb**, **IV**, **Va**, **Vb** y **VI** se reportan en este estudio por primera vez para *P. neochilus*.
- d. El extracto acuoso liofilizado de las hojas frescas de *P. neochilus* no mostró letalidad a dosis altas, por lo que se presume que es de uso seguro, pero si se visualizó toxicidad observándose piloerección, diarrea y sedación como efectos tóxicos, los cuales fueron reversibles y dependientes de la dosis.
- e. El extracto acuoso liofilizado de las hojas frescas de *P. neochilus* mostró una actividad analgésica significativa y dependiente de la dosis por el método químico y la prueba de la formalina. Por el método térmico el efecto fue poco significativo.

- f. Se propone que en la actividad antinociceptiva el principal mecanismo de acción de los principios activos del extracto es por vía periférica, pero también tiene participación a nivel central.
- g. El extracto acuoso liofilizado mostró una actividad antioxidante leve por los métodos de atrapamiento del ión superóxido y del peróxido de hidrógeno.
- h. El extracto acuoso liofilizado posee un $IC_{50} > 500$ ppm, en células neuroblastoma humanas (SH-SY5Y).

8. RECOMENDACIONES

- a. Utilizar una mayor cantidad de material vegetal inicial a fin de estudiar los compuestos minoritarios.
- b. Realizar la evaluación de la toxicidad subcrónica de la especie, para evaluar el efecto de la planta luego de sucesivas administraciones del extracto.
- c. Realizar la histología de los animales de prueba y observar el efecto sobre los órganos internos que pudiera tener el extracto.
- d. Realizar el estudio de la actividad antiinflamatoria del extracto.
- e. Realizar la evaluación de la actividad antinociceptiva por el método térmico a los 60 y 90 minutos luego de la administración del EAL.
- f. Evaluar el efecto citotóxico del extracto sobre fibroblastos (línea celular normal) para poder determinar el índice de selectividad de los mismos y ensayar su actividad sobre otras líneas celulares tumorales.
- g. Evaluar la actividad antimicrobiana y citotóxica de los diterpenos clerodanos aislados.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Basualdo, I. y Soria, N. Plantas medicinales comercializadas en el mercado municipal de la ciudad de pilar, Dpto. Ñeembucu, Paraguay. *Dominguezla*. 2014; 30 (2): 47–53.
2. Bandeira, J., Barbosa, F., Barbosa, L., Rodrigues, I., Bacarin, M., Peters, J. y Braga, E. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*. 2011; 2 (13): 157-164.
3. <http://giovaorsini.v.blogspot.com/2015/06/el-sonado-caso-del-acetaminofen-el.html>. El sonado caso del “acetaminofen”. G. Orsini, consultada 16/06/2015.
4. <http://www.tlahui.com/medic/medic26/cicuta.htm>, Revisión de cuidados y usos medicinales de la cicuta (*conium maculatum* L.). Saldaña, M. y Teja, M. consultada 12/06/2015.
5. Marcano, D. y Hasegawa, M. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico Caracas. 2002. 2da Edición.
6. Beyra, A., León M., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G., Godínez, D., Álvarez, R. 2004. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la Provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 2004; 61(2): 185-204.

7. Sierra, R., González, V., Marrero, D. y Rodríguez, E. Lamiaceae: Una revisión sobre sus efectos neurofarmacológicos y su presencia en Cuba. *CENIC Ciencias Biológicas*. 2013; 44 (1).
8. Silva, A. Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae). [Tesis de Maestria]. Brasil. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2011.
9. Kilner, E. Phenolic compounds and diterpenoids with activity in aqueous extracts of *plectranthus*. [Tesis de Mestria]. Portugal, Lisboa. Universidade de Lisboa, Facultad de Ciencias; 2014.
10. Harley, R., Atkins, S., Budantsev, A., Cantino, P., Conn, B., Grayer, R., Harley, M., De Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A.J., Ryding, O. & Upson, T. Labiatae. IN: The families and genera of vascular plants VII. Flowering plants Dicotyledons: Lamiales, except Acanthaceae including Avicenniaceae. 2004; *Food Chemistry* 87 (20): 167–275.
11. Hokche, O., Berry, P. & Huber, O. Nuevo catálogo de la Flora Vascular de Venezuela. FIBV/FONACIT/NSF. Caracas. 2008.
12. Orsini G. Morfoanatomía del género *Mentha* (Mentheae, Nepetoideae, Lamiaceae) en Venezuela. [Trabajo de ascenso]. Venezuela, Caracas. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia; 2013.

13. http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/lamiaceae.html, Familia Lamiaceae. García, R. Consultada 12/05/2015.
14. Leite, A. Estudo químico e avaliação biológica do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth (Lamiaceae). [Tesis de Maestria]. Brasil. Universidade Regional do Cariri – Urca; 2011.
15. Abdel, M., Albar, H., y Batterjee, S. Chemistry of the Genus *Plectranthus*. *Molecules*. 2002; 7, 271.301.
16. Simoes, M., Rijo, P., Aida Duarte, Barbosa, D., Matias, D., Delgado, J., Cirilo, N. y Rodriguez, B. Two new diterpenoids from *Plectranthus* species. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*. 2010; 6 (5): 222 - 226.
17. Lukhoba, C., Simmonds, M., Paton, A. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;103: 1–24.
18. Bezerr, I. Contribuição para a padronização química de espécies do gênero *Plectranthus*: derivatização e validação de métodos analíticos para a quantificação de marcadores químicos. [Tesis Doctoral]. Brasil. Universidad Federal Do Ceará, Facultad de Ciencias; 2013.
19. Rijo, P., Gaspar, C., Simoes, M., Jimeno, M. y Rodríguez, B. Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007; 35: 21–221.
20. Oliveira, P., Ferreira, A., Silveira, D., Alves, R, Rodrigues, G., Emerenciano, V., y Raslan, D. Diterpenoids from the Aerial Parts of *Plectranthus ornatus*. *J. Nat. Prod*. 2005; 68: 588-591.

21. Waldia, S., Joshi, B., Pathak, U. y Joshi, M. The genus *Plectranthus* in India and its chemistry. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* . 2011; 8: 244-252.
22. Prasanna, G. Antioxidant and antimicrobial metabolites from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) illustrate budding adaptogens inhibiting breast cancer in silico. *Food Research International*. 2010; 27 (1): 80-93.
23. <http://sensiseeds.com/es/blog/las-propiedades-medicinales-de-los-terpenos-y-de-los-terpenoides/>. R. Martínez. Consultada 14/ 06/ 2015.
24. <http://190.170.128.161/especies/ficha/6/9755/>. G. Santillana. Consultada 25/05/2015.
25. <http://www.plantas-medicinales.org/origen/venezuela/>. M. Silva. 26/ 05/ 2015.
26. Praveena, B. y Pradeep S. Antioxidant and Antibacterial Activities in the Leaf Extracts of Indian Borage (*Plectranthus amboinicus*). *Food and Nutrition Sciences*. 2012; 3: 146-152.
27. Chen, Y., Yu, H., Shie, H., Cheng, T., Wub, C., Fang, J. y Huey, C. Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014; 22: 1766–1772.
28. Nataraj, N. 2013. Pharmacognostic profile and phytochemical screening of *plectranthus amboinicus* (lour.). India. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. 2013; 3 (1): 597-606.

29. Seham, S., Elsofany, R., Abdel, A., Ashour, R. y Sleem, A. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.). *Phcog J.* 2012; 4 (32): 45-54.
30. Bhatt, P., Joseph, G., Singh, P. y Varadaraj, M. 2013. Chemical composition and nutraceutical potential of indian borage (*Plectranthus amboinicus*) stem extract. Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry. 2013; 2013: 1-7.
31. Barzaga, P., Tillán, J., Marrero, G., Carrillo, C., Bellma, A. y Montero, C. Actividad expectorante de formulaciones a partir de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (orégano Francés). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2009; 14(2): 1-10.
32. Nirmala, K. y Periyannayagam, K. 2010. In vitro anti inflammatory activity of *Plectranthus amboinicus* (lour) spreng by hrbc membrane stabilization. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research.* 2010; 1 (1): 26-29.
33. Pavla, A., Gurgel, D., Silvaa, J., Grangeiroa, A., Oliveiraa, D., Limaa, C., Silvaa, A., Oliveirab, R. y Souzac, A. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology.* 2009; 125: 361–363.
34. Asiimwe. S., Karlsson, A., Azeem, M., Mugisha, K., Amutebi, A. y Gakunga, N. Chemical composition and toxicological evaluation of the aqueous leaf extracts of *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention.* 2014; 3 (2): 19-27.

35. Llanio, M., Pérez, H., Fernández, M., Garriga, E., Menéndez, R. y Buznego M. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano francés): efecto antimuscarínico y potenciación de la adrenalina. *Rev Cubana Plant Med.* 1999; 1 (4): 29-32.
36. Pérez, M. y Morón, F. Consideraciones farmacológicas sobre principios activos en plantas medicinales con actividad diurética. *Revista Latinoamericana de Hipertensión.* 2011; 6 (2): 36-40.
37. Alasbahi, R. y Melzig, M. *Plectranthus barbatus*: A Review of Phytochemistry, Ethnobotanical Uses and Pharmacology – Part 1. *Planta Med.* 2010; 76: 653–661.
38. Costa, M. Aspectos farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae) atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu.* 2002; 3 (2): 56-63.
39. Kailash, C. Robert E. Parks, R. Forskolin: A Potential Antimetastatic Agent. *Int. J. Cancer:* 1983; 32: 801-804.
40. Alasbahi, R. y Melzig, M. *Plectranthus barbatus*: A Review of Phytochemistry, Ethnobotanical Uses and Pharmacology – Part 2. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu.* 2010; 76: 753-765.
41. Falé, P., Borges, C., Amorim, P., Ascensão, L., Araújo, M., Florêncio y M. Serralheiro, M. Rosmarinic acid, scutellarein 4-O-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; 114 798–805.

42. Mothana, R., Al-Said, M., Al-Musayeib, N., El Gamal, A., Al-Massarani, S., Al-Rehaily, A., Abdulkader, M. y Maes, Lous. In Vitro Antiprotozoal Activity of Abietane Diterpenoids Isolated from *Plectranthus barbatus* Andr. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15: 8360-8371.

43. Costa, M. 2006. 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): 81-88.

44. Oletta, J. La "Planta Acetaminofen" o Boldo Paraguayo, contiene Ascaridol, componente activo de alta toxicidad, no recomendable para el uso humano. *Sociedad Venezolana de Salud Pública*. 2015. 1-5.

45. Albuquerque, R., Lima, L., Machado, M., Silva, M., y Filho, R. Novo Diterpeno Isolado das Folhas de *Plectranthus ornatus*. *Sociedade Brasileira de Química*. 2006; 23: 1-2.

46. Rojas L., Cordero, L., Carmona J. y Usubillaga, A. Componentes volátiles de *Plectranthus coleoides* Benth. (Lamiaceae). *Rev Fac Farm*. 2012; 54 (1): 17-20.

47. Ortiz, D. Plantas Ornamentales De Noguera (Teruel) Angiospermas Dicotiledoneas (II). 2009; 11: 67-83.

48. Rijo, P., Batista, M., Matos, M., Rocha, R., Jesus, S. y Simões, F. Screening of antioxidant and antimicrobial activities on *Plectranthus* spp. extracts. *Biomed Biopharm Res*. 2012; (9) 2: 225-235.

49. Lisdawati, V., Mutiatikum, D., Alegantina, S. y Astuti, Y. Karakterisasi daun miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) Bth.) dan buah sirih (*Piper betle* L.) secara fisiko kimia dari ramuan lokal antimalaria daerah Sulawesi utara. *Media Litbang Kesehatan*. 2008; 8 (4): 213-225.

50. Nugroho, Y. Aktivitas antimalaria (in vivo) kombinasi buah sirih (*Piper betle* L), daun miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.) madu dan kuning telur pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. *Bul. Penelit. Kesehat*. 2011; 39 (3): 129 - 137 .

51. Moektiwardoyo, M., Levita, J., Purnama S., Ahmad, K., Mustarichie, R. y Subarnas, A. The determination of quercetin in *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br. leaves extract and its in silico study on histamine H4 receptor. *Majalah Farmasi Indonesia*, 2001; 22 (3): 191– 196,

52. Duarte, M. y Lopes, J. Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* . 2007; 17 (4): 549-556.

53. Coelho, M., Arruda, R., Pereira, E., Bomfim, A. y Germano, E. Propagation of *Plectranthus neochilus* Schlechter. *Journal of Global Biosciences*. 2014; 3 (2): 494-498.

54. Faria, D., De Barros, A. Alves, J., Miranda, G., Viana, A., Silva, R. y De 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*. 2014.
55. Ferreira, L., Brasil, J., Vilela, S., Brant, R., Santos, E. y Barreto, P. Produção vegetal e de óleo essencial de boldo pequeno em função de fontes de adubos orgânicos. *Rev. Ceres, Viçosa*. 2011; 58 (5): 673 - 679.
56. Orihuela, N., Marcano, L., Villarroel, G., Rodríguez, M. y Lanz, E. Código de Bioética y bioseguridad. Ministerio del Poder Popular para Ciencia y Tecnología y Fondo Nacional De Ciencia, Tecnología E Innovación. 3° Edición. 2008. Caracas – Venezuela.
57. Litchfield J. T. & Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmac.* 1949; 96: 99-113.
58. Koster R., Anderson M., de Beer E. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc.* 1959; 18: 410-412.
59. Hernández, A. y col. Validación preclínica de actividad analgésica periférica y central de la decocción de hojas frescas de *Persea americana* Mill. (aguacate) y *Musa x paradisiaca* L.(plátano). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2014; 19(1): 225-234.
60. Hunskaar S. y Hole K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987; 30: 99-103.

61. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
62. Bielski, B., Shlue, G. y Bajuk, S. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO^{2-} and O^{2-} radicals, *J. Phys. Chem*. 1980; 84: 830-833.
63. Owen PL, Johns T. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J Ethnopharmacol*. 1999; 64 (2):149-60.
64. Ruch R., Chung S., y Klaunig J. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 198-209.
65. Murillo, M., Fernández, K., Viña, A. y Méndez, J. Actividad antioxidante in vitro y antimicrobial de extractos metanólicos de cuatro albahacas cultivadas en Ibagué. *Revista Tumbaga*. 2007; 2: 72-84.
66. Chaturvedula, V. y Prakash, I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2012; 1 (9): 239-242
67. Lacruz E. Estudio fitoquímico de *Simsia pubescens* Triana. [Tesis de Licenciatura en Química]. Venezuela, Mérida. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias; 2008.
68. Puma A. Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae). [Tesis de Licenciatura en Química]. Ecuador, Quito. Universidad de Quito, Facultad de Ciencias Químicas; 2013.

69. Pateh, U., Haruna A., Garba, M., Iliya, I., Sule, I., Abubakar, M. y Ambi A. Isolation of Stigmasterol, B-Sitosterol And 2-Hydroxyhexadecanoic Acid Methyl Ester From The Rhizomes Of *Stylochiton Lancifolius* Pyer And Kotchy (Araceae). *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008; 7 (1): 17-25.
70. Leyva, E., Navarro, G., Loredó, S. y Santos, M. Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. *Bol. Soc. Quím. Méx.* 2011; 5 (2,3): 35-43.
71. Fernandez, U. y Torres, M. Inflamación y Plantas Medicinales. *J Pharm Pharmacol*. 1998; 50 (10): 1183-1186.
72. Mbambo, B., Odhav, B. y Mohanlall, V. Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012; 6 (38): 5135-5141.
73. Ajoku G., Okwute S y Okogun J. Isolation of Hexadecanoic Acid Methyl Ester and 1,12-Ethanedicarboxylic, Acid-1-Hydroxy-1, 1-Dimethyl Ester from the calyx of Green Hibiscus *Sabdariffa* (Linn). *Natural Products Chemistry & Research*. 2015; 3 (2): 1-5.
74. Silverstein, R., Webster, F. y Kiemle, D. Spectrometric identification of organic compounds. Nueva York. John Wiley and sons, Inc; 2005, 7ma edición.
75. Prieto, A. Polisacáridos De *Talaromyces*: Su Aplicación En Quimiotaxonomía. [Tesis en Licenciatura]. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 1992.

76. Zhu, Y., Zajicek, J. y Serianni, A. Acyclic Forms of [1-¹³C]Aldohexoses in Aqueous Solution: Quantitation by ¹³C NMR and Deuterium Isotope Effects on Tautomeric Equilibria. *J. Org. Chem.* 2001; 66: 6244-6251.
77. Huanca, S., Espinal, C. y Mollinedo, P. Quality assessment of glucose syrup produced by Enzymatic hydrolysis of alpha-amylase and Amyloglucosidase from starch of manihot esculenta (yuca). *Revista Boliviana De Química*. 2015; 32 (2): 24-29.
78. Khouzaima, V. Estudio por RMN del reconocimiento molecular carbohidrato-proteína con discriminación diferencial de anómeros en equilibrio. [Tesis doctoral], Universidad Complutense De Madrid, Facultad De Ciencias Biológicas. Madrid-España. 2014.
79. Pacheco, A., Oliveira, P., Veloso, D. y Carvalho, A. ¹³C-NMR Data of Diterpenes Isolated from *Aristolochia* Species. *Molecules*. 2009; 14: 1245-1262.
80. Katkar K., Suthar A. y Chauhan S. The chemistry, pharmacologic, and therapeutic applications of *Polyalthia longifolia*. *Pharmacognosy Reviews*. 2010; 4 (7): 62-67.
81. Rashid, M., Hasan, M. y Reza, M. Antimicrobial Diterpenes from *Polyalthia longgolia* var. *pendulla* (Annonaceae). *Phytotherapy Research*. 1996; 10: 79-81.
82. Islam, A., Saayed, A., Sadik, G y Mohal, A. Antimicrobial activity and cytotoxicity of clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia* seed. 2001; 1 (5): 320-323.

83. Oliveira, P., Alves, R., Silveira, D. y Raslan, D. Novo Diterpeno Neo-Clerodano Isolado das Partes Aéreas de *Plectranthus ornatus*. 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
84. <http://suite101.net/article/escalofrios-emocionales-su-naturaleza-neuropsico-biologica-a2246>. Escalofríos emocionales, su naturaleza neuropsicobiológica. Bedini, S. Consultada: 20-04-2016.
85. Marrassini, C., Gorzalczy, S. y Ferraro, G. Actividad analgésica de dos especies de *Urtica* con usos etnomédicos en la República Argentina. *Dominguezia*. 2010; 26 (1): 21-29.
86. Loezer, J. y Melzack, R. Pain. An overview. *Lancet*. 1996; 353: 1607-1609.
87. García, A., López, M., Morejón, Z., Boucourt, E., Amador, M., Martínez, I., Lérida, H., Doménigo, A. y Brito, G. Validación preclínica de actividad analgésica periférica y central de la decocción de hojas frescas de *Persea americana* Mill. (aguacate) y *Musa x paradisiaca* L.(plátano). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2014;19 (1): 225-234.
88. Palop, E., Santamarina, F. y Gálvez, R. Efecto analgésico de la administración de tramadol por vía subcutánea en dolor agudo. *Rev. Soc. Esp. Dolor*. 1998; 5: 120-124.
89. Ramirez, V. y col. Antiinflamatorios no Esteroidales. Centro Nacional de información de Medicamentos. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica. 2001

90. Farías, M. Determinación de los mecanismos involucrados en la actividad analgésica De las hojas de *aristotelia chilensis* en un modelo de dolor térmico agudo. [Tesis de Licenciatura en Química Farmaceutica]. Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacéuticas. Santiago – Chile. 2009.
91. Apablaza, C. Diseño de la estandarización química y evaluación de la actividad analgésica tópica de un extracto activo de *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae, matico. [Tesis doctoral]. Facultad De Ciencias Químicas Y Farmaceuticas Universidad de Chile. Santiago, Chile. 2006.
92. Borges, G. y col. Cytotoxic effect of *Plectranthus neochilus* extracts in head and neck carcinoma cell lines. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2016; 10 (10): 157-163.
93. Vilches, A. Estrés oxidativo, actividad antioxidante y senescencia celular en fibroblastos con trisomía del cromosoma 21. [Tesis doctoral]. Universidad de Barcelona. Barcelona – España. 2013.
94. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? (2004). *Br J Pharmacol.* 142: 231-255.
95. Rijo, P. Antimicrobial Plant Extracts Encapsulated into Polymeric Beads for Potential Application on the Skin. *Polymers.* 2014; 6: 479-490.