

**DITERPENOS DE *Ageratina vacciniaefolia*, *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens*  
Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTÓXICO**

**JOSÉ MILTON HERNÁNDEZ ARIAS**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE POSGRADOS**

**BOGOTA-COLOMBIA**

**2014**

**DITERPENOS DE *Ageratina vacciniaefolia*, *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens*  
Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTÓXICO**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar el título de Magister en Ciencias  
Biológicas**

**JOSÉ MILTON HERNÁNDEZ ARIAS**

**DIRECTOR    JORGE ROBLES CAMARGO PhD.**

**Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana.**

**Bogotá-Colombia**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE POSGRADOS**

**BOGOTA-COLOMBIA**

**2014**

**DITERPENOS DE *Ageratina vacciniaefolia*, *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens*  
Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTÓXICO**

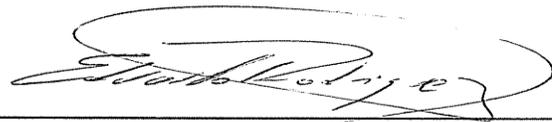
**JOSÉ MILTON HERNÁNDEZ ARIAS**

  
\_\_\_\_\_  
**JORGE ROBLES CAMARGO PhD**

**Tutor**

  
\_\_\_\_\_  
**ALBA NOHEMI TELLEZ. PhD**

**Jurado**

  
\_\_\_\_\_  
**OSCAR RODRIGUEZ. PhD**

**Jurado**

  
\_\_\_\_\_  
**MIGUEL POMBO OSPINA. Msc**

**Jurado**

## **ADVERTENCIA**

**Los criterios expuestos, las opiniones expresadas, y las conclusiones anotadas son de responsabilidad del autor y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana.**

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Dios, por bendecir siempre a mi familia y por brindarme la fuerza, el amor y las condiciones para llevar a cabo este logro.

El doctor Jorge Robles Camargo, por enseñarme y contribuir en este trabajo, por ayudarme a desarrollar mis habilidades y conocimientos y compartirme su experiencia y conocimiento.

Los Doctores Nohemí Téllez y Ricardo Vera por sus aportes en la parte experimental y por brindarme toda su colaboración y experiencia.

El Profesor Álvaro Granados, por su colaboración en la parte experimental, sus excelentes contribuciones de orden académico y sus consejos.

El profesor John Díaz, por su constante apoyo, acompañamiento y asesoría.

A Felipe, Paola, Jaime, Heidy, Lorena y demás estudiantes del laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Javeriana por su constante colaboración, apoyo y motivación.

## CONTENIDO

Contenido	Pag.
Índice de figuras	I
Índice de tablas	II
Resumen	III
<b>INTRODUCCIÓN</b>	IV
<b>OBJETIVOS</b>	1
1. <b>El páramo y su vegetación</b>	3
1.1. <b>Características del páramo</b>	4
1.1.1. <b>Importancia del páramo</b>	4
1.2. <b>Vegetación de los páramos de Sumapaz y Cruz verde</b>	4
1.2.1 <b>Páramo de Cruz Verde</b>	5
1.2.2 <b>Páramo de Sumapaz</b>	5
1.3. <b>Las <i>Asteraceae</i> del páramo</b>	6
1.4. <b>Características botánicas de las especies seleccionadas</b>	7
1.4.1 <b>Características botánicas de la <i>Ageratina vacciniifolia</i></b>	7
1.4.2 <b>Características botánicas de <i>Gnaphalium graveolens</i></b>	9
1.4.3 <b>Características botánicas de la <i>Conyza trihecatactis</i></b>	11
1.5 <b>Terpenos: Diterpenos</b>	13
2. <b>ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>	16
2.1. <b>Actividad Antiinflamatoria</b>	16
2.1.2 <b>Mecanismos de la inflamación</b>	16
2.1.3 <b>Inflamación aguda</b>	17
2.2 <b>Cáncer: Leucemia</b>	19
2.2.1 <b>Citometría De Flujo</b>	20
3. <b>METODOLOGÍA</b>	21
3.1. <b>Estudio biológico</b>	21
3.1.1 <b>Medición de la actividad antiinflamatoria</b>	21
3.1.2 <b>Actividad Citotóxica</b>	24
3.2 <b>Estudio Químico</b>	25
3.2.1 <b>Material vegetal</b>	25
3.2.2 <b>Obtención de extractos</b>	25
3.2.3 <b>Aislamiento de compuestos</b>	26
3.2.5 <b>Identificación y elucidación de compuestos</b>	28
4. <b>EXPERIMENTACIÓN</b>	29
4.1 <b>Recolección del material vegetal</b>	29
4.2 <b>Extracción del material vegetal</b>	29
4.2.1 <b>Extractos en éter de petróleo</b>	29
4.2.2 <b>Extractos en etanol</b>	29
4.3 <b>Aislamiento de los compuestos</b>	30
4.4 <b>Actividad Antiinflamatoria</b>	34
5. <b>RESULTADOS</b>	35
5.1 <b>Identificación de las sustancias aisladas</b>	35
5.1.2 <b>Diterpenos tipo Kaurano</b>	35

5.1.3 <a href="#">Diterpeno tipo labdano</a> .....	44
5.2 <a href="#">Resultados Actividad Antiinflamatorio</a> .....	51
5.3 <a href="#">Estudio Histopatológico</a> .....	54
5.3.1 <a href="#">Análisis Estudio Histopatológico</a> .....	60
5.4 <a href="#">Actividad Citotóxica</a> .....	61
5.4.1 <a href="#">Análisis estadístico</a> .....	61
5.4.2 <a href="#">Análisis Escatergrama</a> .....	62
<a href="#">DISCUSIÓN DE RESULTADOS</a> .....	63
<a href="#">CONCLUSIONES</a> .....	66
<a href="#">BIBLIOGRAFÍA</a> .....	68

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Páramo de Cruz Verde.....	5
Figura 2. Páramo de Sumapaz.....	6
Figura 3. <i>Ageratina vacciniaefolia</i> .....	9
Figura 4. <i>Gnaphalium graveolens</i> .....	11
Figura 5. <i>Conyza trihecatactis</i> .....	13
Figura 6. Formación de precursores de Diterpenos.....	14
Figura 7. Edema plantar inducido en la pata derecha de la rata.....	23
Figura 8. Metodología general para la obtención de extractos Vegetales.....	26
Figura 9. Esquema general procedimiento actividad antiinflamatoria por edema de pata de rata inducido por lambda carragenina.....	34
Figura 10. Estructura general numerada de los kauranos.....	35
Figura 11. Estructura del Ácido kaur-16-en-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.....	36
Figura 12. Estructura del $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-( $\beta$ -xilopiranos)-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.....	38
Figura 13. Estructura del $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-( $\beta$ -xilopiranos)-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro NOESY.....	38
Figura 14. Estructura del Ácido (-)9, 15-dihidroxikaur-16-en-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.....	40
Figura 15. Estructura del $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido (-)9, 15-dihidroxikaur-16-en-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.....	42
Figura 16. Estructura del Ácido Ent- Kaur-9(11), 16-en-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.....	43
Figura 17. Estructura del Ent-(13R)-labdan-14-eno-8,13 – diol y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.....	45
Figura 18. Estructura del Ent-(13R)-8-hidroxilabdan-14-en-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.....	46
Figura 19. Estructura del Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos. y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.....	49
Figura 20. Capacidad inhibitoria, expresada como porcentaje de inflamación de compuestos y fracciones obtenidos a partir de <i>Conyza trihecatactis</i> y <i>Ageratina vacciniaefolia</i> .....	52
Figura 21. Efecto neto antiinflamatorio de compuestos y fracciones obtenidos a partir de <i>Conyza trihecatactis</i> y <i>Ageratina vacciniaefolia</i> . Calculado como el área bajo la curva.	53
Figura 22. % de células OCL-AML3 muertas a diferentes concentraciones (1mg $\mu$ /mL, 5mg $\mu$ /mL, 10mg $\mu$ /mL).....	62
Figura 23. Escatergrama (a) grupo control R <sub>0</sub> células vivas y (b) grupo expuesto al tratamiento R <sub>1</sub> células muertas.....	62

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de vegetales estudiados.....	25
Tabla 2. Porcentajes de rendimientos (g extractos/100g de material vegetal seco) de los extractos en éter de petróleo de las tres especies vegetales.....	30
Tabla 3. Porcentajes de rendimientos (g extractos/100g de material vegetal seco) de los extractos en Etanol de las tres especies vegetales.....	30
Tabla 4. Distribución de los grupos por tratamientos.....	34
Tabla 5. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro RMN $H^1$ y RMN $^{13}C$ del Ácido kaur-16-en-19-oico.....	36
Tabla 6. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN $H^1$ y RMN $^{13}C$ del $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido (-)-17-( $\beta$ -xilopiranos)-19-oico.....	39
Tabla 7. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN $H^1$ y RMN $^{13}C$ del Ácido (-)9, 15-dihidroxikaur-16-en-19-oico.....	40
Tabla 8. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN $H^1$ y RMN $^{13}C$ del $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido (-)9, 15-dihidroxikaur-16-en-19-oico.....	42
Tabla 9. Estructura del Ácido Ent- Kaur-9(11), 16-en-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.....	44
Tabla 10. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN $H^1$ y RMN $^{13}C$ del Ent-(13R)-labdan-14-eno-8,13 – diol.....	46
Tabla 11. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN $H^1$ y RMN $^{13}C$ del Ent-(13R)-8-hidroxilabdan-14-en-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos.....	48
Tabla 12. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN $H^1$ y RMN $^{13}C$ del Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos.....	50
Tabla 13. Medición del delta de desplazamiento o volumen real desplazado por pata en los diferentes tratamientos.....	51
Tabla 14. Actividad antiinflamatoria de los tratamientos, expresada como porcentaje de inhibición de la inflamación.....	52
Tabla 15. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 1.....	54
Tabla 16. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 2.....	55
Tabla 17. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 3.....	56

Tabla 18. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 57  
4.....

Tabla 19. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 5..... 58

Tabla 20. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 59  
6.....

Tabla 21. Medición del número de células (OCI-AML3) por Citometría de Flujo a diferentes concentraciones (1mg $\mu$ /mL, 5mg $\mu$ /mL, 10mg $\mu$ /mL) y los valores de *t* calculados..... 61

## RESUMEN

Se estudiaron plantas autóctonas de páramos colombianos, preconizados por la medicina tradicional como antiinflamatorios y citotóxicas, con el fin de identificar los compuestos responsables de las acciones terapéuticas mencionadas y hacer uso de sus extractos en el control de problemas como el cáncer y la inflamación.

Se investigaron mezclas de hojas y tallos de especímenes de *Ageratina vacciniaefolia*, *Conyza trihecatactis* y *Gnaphalium graveolens*, pertenecientes a la familia Asteraceae, recolectadas en los páramos de Sumapaz y Cruz verde situados al sureste y nororiente de la ciudad de Bogotá (Colombia), en la cordillera oriental de los Andes.

La obtención de los extractos y fracciones de las diferentes especies se realizó utilizando solventes de baja, mediana y alta polaridad. Los compuestos fueron monitoreados mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF) y separados por Cromatografía en Columna (CC). Para su identificación se utilizaron técnicas espectroscópicas como RMN (experimentos <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC). La actividad antiinflamatoria se realizó mediante el modelo experimental del edema en la pata de ratas Wistar, inducido por la inyección plantar de carragenina (Muniappan & Sundarara, 2003) y un estudio histopatológico. Finalmente los ensayos de citotoxicidad frente a la línea celular OCI-AML3 fueron realizados mediante citometría de flujo.

De las fracciones de *Conyza trihecatactis* se aislaron las siguientes sustancias: Ent-(13R)-labdan-14-en-8,13-diol, Ent-(13R)-8-hidroxilabdan-14-en-13-O-β-D-xilopiranososa y el Ent-(13R)-labdan-8(17),14-dien-13-O-β-D-xilopiranososa. De las fracciones de *Ageratina vacciniaefolia* se aislaron: Ácido kaur-16-en-19-oico, Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico, Ácido (+) kaur-16-en-19-oico y el β-D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-(β-xilopiranososa)-kauran-19-oico. De las fracciones de *Gnaphalium graveolens* se aisló el ácido ent-kaur-9(11), 16-dien-19-oico.

La fracción de acetato de etilo, obtenida del extracto en éter de petróleo de *Conyza trihecatactis* mostró un buen resultado en la actividad antiinflamatoria a la quinta y séptima hora del tratamiento a una concentración de 300mg/kg; de igual manera esta fue la fracción más activa en los ensayos de citotoxicidad a una concentración de 10μg/mL.



## INTRODUCCIÓN

Las regiones de páramos en Colombia presentan una gran variedad de especies autóctonas, las cuales requieren de atención rápida para poder aprovechar las riquezas etnobotánicas que ellas ofrecen. Se podría mencionar que en Colombia este trabajo es deficiente. Por tal motivo es necesario enfocar esfuerzos hacia la organización y ejecución de proyectos que permitan hacer uso auto-sostenible de tales recursos. La vegetación de los páramos es una de las más afectadas e intervenidas por el hombre en su afán de obtener tierra para actividades agrícolas y de pastoreo.

En la medicina moderna, la cuarta parte de las sustancias son de origen natural. Si bien es cierto que durante el proceso de la industria sintética, se dejó de utilizar una parte considerable de las sustancias vegetales, en la actualidad, debido a los efectos adversos de una elevada cantidad de fármacos sintéticos, así como por la demanda de medicinas menos nocivas y más naturales.

Actualmente enfermedades como el cáncer y problemas inflamatorios cobran un sin número de vidas por año en todo el mundo a pesar de que las investigaciones en la lucha contra estos problemas ha generado avances significativos. Los tratamientos que se aplican en la actualidad para combatir el cáncer son efectivos siempre y cuando se detecte a tiempo la anomalía, lo que hace necesario generar investigaciones encaminadas a probar sustancias provenientes de especies vegetales que según el conocimiento de la medicina tradicional son de tipo preventivo, pero que a través de las generaciones se han reafirmado sus propiedades curativas.

La amplia gama de la flora existente en los páramos colombianos, que aún no han sido estudiados, crean la necesidad de gestionar recursos y ejecutar proyectos de alto impacto que promuevan la protección de tales ecosistemas y el aprovechamiento racional de este recurso como un potencial reservorio de sustancias químicas de aplicación industrial y terapéutica (Guhl, E. 1981).

Dentro del conocimiento tradicional de la medicina botánica, se han encontrado numerosas especies vegetales de la familia Asteraceae que son utilizadas para diversos fines curativos como es el caso de la *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y *Ageratina vacciniaefolia*, estas especies han sido utilizadas como febrífuga, emenagogas, algunas son aromáticas y diaforéticas; las raíces antisifilíticas y carminativas, para corregir las afecciones intestinales y en el tratamiento del reumatismo y desordenes gastrointestinales (Pedrozo, J. 2001).

La problemática anteriormente mencionada justifica la búsqueda de nuevos compuestos de origen vegetal que permitan la generación de tratamientos alternativos a base de productos naturales, que beneficien a la gente, la auto- sostenibilidad de los ecosistemas del páramo y a la nación. Con tal propósito se emprendió la siguiente investigación que pretende Aislar, purificar e identificar diterpenos presentes en partes aéreas de las especies *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y *Ageratina vacciniaefolia* pertenecientes a la familia Asteraceae, y evaluar la actividad citotóxica y/o antiinflamatoria de fracciones obtenidas con solventes de baja, media y alta polaridad.

#### OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Aislar, purificar e identificar diterpenos presentes en partes aéreas de las especies *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y *Ageratina vacciniaefolia* pertenecientes a la familia Asteraceae, y evaluar la actividad citotóxica y/o antiinflamatoria de fracciones obtenidas con solventes de baja, media y alta polaridad.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ❖ Obtener extractos y fracciones de diferentes polaridades de las partes aéreas de las especies: *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y *Ageratina vacciniaefolia*.
- ❖ Aislar, purificar e identificar diterpenos tipo kaurano y labdano presentes en los extractos y fracciones de las especies seleccionadas.
- ❖ Evaluar los efectos citotóxicos y/o antiinflamatorio de las fracciones y compuestos obtenidos.

## 1. El páramo y su vegetación

Los alcances en las investigaciones relacionadas con el aprovechamiento racional de los recursos naturales están ligados a la historia de la humanidad, este tipo de relaciones interespecíficas cumplen un importante papel en la dinámica evolutiva de las sociedades modernas.

La amplia gama de la flora existente en los páramos colombianos, que aún no han sido estudiados, crean la necesidad de gestionar recursos y ejecutar proyectos de alto impacto que promuevan la protección de tales ecosistemas y el aprovechamiento racional de este recurso como un potencial reservorio de sustancias químicas de aplicación industrial y terapéutica (Guhl, E. 1981).

### 1.1. Características del páramo.

- Son ecosistemas ubicados entre los 3.100 y 4.000 m.s.n.m aproximadamente.
- Son montañas a las que les da el sol todo el año.
- Su ubicación en la zona ecuatorial les permite recibir una cantidad y calidad de luz únicos en el mundo lo que les permite desarrollar su vegetación a diferencia de los Alpes, los Pirineos, el Himalaya.
- Son sitios donde se regula la hidrología, porque las bajas temperaturas disminuyen la evaporación, mientras que otra parte es retenida por su vegetación (Lauer, W. 1979).

#### 1.1.1. Importancia del páramo

Los páramos son ecosistemas de gran importancia económica y, en Colombia se destacan también por ser el lugar donde nacen muchos de nuestros grandes ríos.

Poseen:

- ✓ Una función ecológica, ya que tienen un importante valor ecológico por su flora endémica;

- ✓ una función agropecuaria, ya que en ellos se cultiva papa, habas, entre otras, fuentes nutricionales de gran uso nacional y,
- ✓ una función hidrológica, ya que constituye la fuente de agua potable para la mayoría de las poblaciones de los andes americanos; debido al frío y la alta nubosidad que reina en estas alturas, la evaporación es muy baja por lo que existe un alto rendimiento de agua (precipitación-evaporación). Por otra parte, los suelos húmedos como los del páramo tiene una gran retención de agua (Sturm, H. y Rangel, O. 1985).

## 1.2. Vegetación de los páramos de Sumapaz y Cruz verde.

Es característica de estos dos páramos que su biomasa y su distribución disminuye desde el bosque altoandino (parte más baja) hacia el superpáramo (parte más alta), pasando por el cinturón de *Ericaceae* y los colchones de *Plantago*, *Districhia* y *Oreobulos* ( Cuatrecasas, J. 1958)

### 1.2.1 Páramo de Cruz Verde

Este páramo se encuentra en el Km 10 al sureste de Bogotá (carretera que de ésta conduce al municipio de Choachi, Cundinamarca), a 3.300-3.500 m.s.n.m (4°, 45' latitud N y 74° longitud W). Posee temperatura media de 8,4 °C y una precipitación de 1.200 mm.

Muestra la vegetación típica de las zonas altoandinas y paramunas colombianas, una vegetación con pronunciada alteración. Prosperan: *Calamagrostis effusa*, *Espeletia grandiflora*, *Hypericum mexicanum*, *Valeriana longifolia*, *Baccharis tricuneata*, *Escallonia myrtilloides*, *Pernetya prostrata*.



Figura 1. Páramo de Cruz Verde.

Fuente: el autor

### 1.2.2 Páramo de Sumapaz.

Con una extensión de 178.000 hectáreas es el páramo más grande del mundo. Es una de las fuentes hídricas más importantes del país, pero no ha podido ser explotada como tal debido a que durante algunos años hubo presencia de grupos guerrilleros. Dentro de su ecosistema habitan osos de anteojos, venados, águilas y cóndores, además de otras especies.

Aloja gran cantidad de lagunas todas ellas de origen glacial. Entre ellas destacan: lagunas de Boca Grande, laguna Larga, laguna la Guitarra, laguna la Cajita, lagunas de Chisacá. Adicionalmente, alberga uno de los picos más altos en las cercanías de la capital el Cerro Nevado con una altura de 4650 m.

El macizo del Páramo de Sumapaz corresponde a un nudo orográfico culminante de la cordillera oriental, con una altura media que oscila entre 3500 y 4000 metros sobre el nivel del mar con dirección S.W-N.E, alejándose cada vez más del valle del río Magdalena y desplazándose el cordón horizontal y el eje de altura hacia el oriente. El sector occidental del macizo, con su vertiente sobre el valle del río Magdalena, tanto hacia el norte como hacia el sur, está formado por valles tectónicos que con sus ramales cordilleranos forman ejes secundarios y paralelos al eje principal. La vertiente oriental es mucho más corta y pendiente y está cruzada por profundos valles transversales de erosión, excavadas por los ríos hasta la médula (Ospina, M. 2003).

Existe en ambos páramos, un conjunto arvense en parcelas abandonadas en los límites bosque alto andino-páramo y una vegetación ruderal abundante, a orillas de los caminos con manchas de especies de *Asteraceae*, especialmente de los géneros *Ageratina* y *Pentacalia*.



Figura 2. Páramo de Sumapaz.

Fuente: el autor

### **1.3. Las *Asteraceae* del páramo.**

Las numerosas especies vegetales existentes en el planeta se han agrupado en trece filos o divisiones; las incluidas en la división Magnoliophyta y una vez, son distribuidas en dos clases: Liliopsida( o monocotiledónias) y Magnoliopsida (o Dicotiledónias); a esta última categoría la constituyen las subcalses: Magnoliidae, Hamamelidae, Caryophyllidae, Dilleniidae, Rosidae y Asteridae. El orden Asterales, uno de los 11 órdenes de Asteridae, posee como única familia a las Asteraceae (Bremer, K. 1994)

Las Compositae Giseke o Asteraceae Dum(nombre alternativo) constituyen una familia muy numerosa de plantas cosmopolitas, aunque mejor representadas en las regiones templadas y subtropicales, agrupadas en tres subfamilias, 17 tribus y aproximadamente 1.100 géneros y 20.000 especies. Se caracterizan por ser hierbas o menos a menudo semiarbustos; con hojas alternas, menos a menudo opuestas, rara vez verticiladas, simples y enteras o dentadas; sus inflorescencias poseen de una a muchas cabezuelas con una, varias o numerosas flores sobre un receptáculo común; el cáliz fuertemente modificado, formando un característico vilano en la cima del ovario y fruto, o algunas veces ausente; sus frutos son aquenios coronados por el vilano persistente, o éste es a veces ausente (Pedrozo, J. 2001).

### **1.4. Características botánicas de las especies seleccionadas**

#### **1.4.1 Características botánicas de la *Ageratina vacciniaefolia*.**

Descripción del género:

El género *Ageratina*, segregado de *Eupatorium*, está integrado por hierbas perennes, usualmente erectas, posee hojas opuestas (raramente subopuestas o alternas), elípticas, aserradas o crenadas, trinervadas, pinnadas y con pecíolos cortos. Las inflorescencias son ligeramente corimbosas de involucros con brácteas aproximadamente en un número de 30; corola blanca o lila, con vilanos reducidos y presencia de glándulas únicamente sobre la corola y el aquenio. Las especies del género reciben el nombre de chilco, carrasposa, pulisa, jarilla, salvio amargo, almadruz, etc. Este género está concentrado en México, Centroamérica y Andes de Suramérica con una poca extensión en el Oriente de los Estados Unidos, el Occidente de la India y algunas especies en la zona meridional del Brazil (King, M. and Robinson, H. 1970).

El nombre *Ageratina* es una forma diminuta de *Ageratum* (género de la tribu Asterae), pero este nombre desafortunadamente se aproxima al nombre de la subtribu *Ageratiinae*, creando una posible confusión entre los dos grupos que son totalmente diferentes, ya que este género se incluye en la subtribu *Oxylabinae*. Para este estudio se seleccionó la especie *Ageratina vacciniaefolia*.

- Características botánicas de la *Ageratina* seleccionada para el estudio.

*Ageratina vacciniaefolia*(Benth) King & Robinson. Se caracteriza por ser un arbusto ramificado de 1 m de altura, con ramas cilíndricas. Posee hojas compuestas, ovales, con peciolos cortos y base redondeada. Sus inflorescencias se presentan en corimbos terminales, con capítulos oblongos con 5 a 6 flores, escamas del involucro entre 12 y 15, de folíolos imbrincados, con cabezuelas moradas de olor agradable, corola tubulosa, glabra; ovario cuneado linear, estilo glabro y estigma bipartido. Se caracteriza por presentar vilano piloso y aquenios inmaduros. Crece en la cordillera de los Andes, especialmente en los alrededores de la Sabana de Bogotá.

- Química de la *Ageratina*.

El nuevo género *Ageratina* ha sido estudiado químicamente por Ferdinand Bohlmann en colaboración con Robert King y Harold Robinson, aunque sólo un 20 % de las especies tienen reportes de sustancias algunas de las cuales han mostrado gran interés farmacológico. La química del género es bastante diversa: poliacetilenos, derivados del timol, cromenos, triterpenos, benzofuranos, sesquiterpenos, sesquiterpenlactonas, diterpenos y flavonoides. Los alcaloides del tipo pirrolizidínico son escasos en el género y sólo han sido reportados en *Ageratina altissima*.

- Uso tradicionales de la *Ageratina*.

Muchas de las especies de la tribu se han utilizado por sus propiedades medicinales y por ello han suscitado interés científico, varias especies de *Ageratina* se han utilizado como emolientes, galactagogos en el tratamiento de heridas y cortaduras leves, como antiinfecciosos y coagulantes; recientemente se han comprobado propiedades citotóxicas y antileucémicas en varias sesquiterpenlactonas del género. *A. angustifolia* es usado para el tratamiento de la erisipela y en el lavado de ojos en las oftalmias. La corteza fresca de *A. adenophora* es aplicada in situ para tratar el dolor de las heridas abiertas, la infusión de las hojas de *A. sternerbergina* se administra por vía oral para tratar cólicos y trastornos digestivos.

Se considera todas las especies de *Ageratina* con acción tóxica y febrífuga, de ordinario emenagogas, algunas son aromáticas y diaforéticas; las raíces antisifilíticas y carminativas, para corregir las afecciones intestinales (Pedrozo, J. 2001)

Descripción de la *Ageratina vacciniaefolia*.

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Ageratina*

Nombre Científico: *Ageratina vacciniaefolia*.



Figura 3. *Ageratina vacciniaefolia*.

Fuente: el autor.

### 1.4.2 Características botánicas de *Gnaphalium graveolens*

#### Descripción taxonómica.

Hierbas de cerca de medio metro de altura, con tallos erectos, simples o algo ramificados en la parte superior, laxamente lanosa, hojosos hasta la inflorescencia. Entrenudos de 5-10 mm de largo. Hojas alternas, sésiles, lanceoladas, atenuadas y agudas en el ápice, algo ensanchadas y decurrentes en la base, enteras y frecuentemente algo onduladas en la margen, discolores, glabras o muy tenuemente lanosas en la haz y densamente albo-tomentosas en el envés, de 60-90 mm de longitud por hasta 15 mm de anchura en la base, decurrencia de 5-10 mm de largo. Capítulos numerosos dispuestos en cimas corimbiformes densas en los ápices de las ramitas. Involucro acampanado, de 4 mm de altura por 4 mm de diámetro; filarias hialinas, amarillentas o parduscas, las externas ovaladas, las interiores oblongas, redondeadas en el ápice. Flores femeninas muy numerosas; las hermafroditas 10-20. Aquenios castaños de 0.6 mm de largo, menudamente papilosos. Papus blanco (fide, Cabrera, 1978:285)

#### Química de la planta.

A partir de *Gnaphalium graveolens* Humboldt, Bonpland y Kunth se obtuvieron los siguientes compuestos: una flavona, la 5,7-dihidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona; tres terpenoides, el ácido (+) kaur-9(11), 16 –dien-18-oico, uno de fórmula  $C_{29} H_{50} O$ , correspondiente a un posible epímero del sclareol y otro de fórmula molecular  $C_{20} H_{34} O_2$ , isómero del ácido (+) kaur-9(11), 16 –dien-18-oico; un esteroide, el  $\beta$ -sitosterol y tres flavonoides: la quercetina, uno posiblemente metoxilado y otro con una posible estructura 3, 4 ,5, 7-tatrahidroxiflavonol. (Pedrozo, J. 2001)

#### Usos tradicionales de *Gnaphalium graveolens*.

A los extractos totales de flores y hojas de *Gnaphalium graveolens* Humboldt, Bonpland y Kunth se le demostró actividad bacteriostática (hidrofilicos), antimicótica (lipofílica) y antiinflamatoria.

#### Descripción de *Gnaphalium graveolens*.

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Gnaphalium*

Nombre Científico: *Gnaphalium graveolens*

Nombre común: Vira-vira



Figura 4. *Gnaphalium graveolens*

Fuente: el autor

#### 1.4.3 Características botánicas de la *Conyza trihecatactis*.

Descripción taxonómica.

Hierbas anuales o perennes o sufrutícicas. Hojas alternas, membranáceas, íntegras, dentadas o pinnatífidas. Inflorescencias racemosas o paniculadas, desde muy amplias y abiertas a contraídas y glomeruladas; raras veces capítulos solitarios, capítulos heterógamos, discoides; involucro semigloboso, turbinado o campanulado. Filarias 2-4 seriadas, herbáceas, con margen escarioso conspicuo, lineares o lanceoladas, angostas, generalmente subiguales o a veces las exteriores más cortas. Flores femeninas muy numerosas, multiseriadas; corola angostamente tubulosa, capilar menor o igual que el vilano 2-3 denticulada o lacerada en el ápice o con una diminuta expansión elíptica que no alcanza o no rebasa el vilano; estilo más largo que la corola, con ramas angostamente lineares con margen engrosado, menudamente estigmático-papiloso. Flores hermafroditas en mayor número, corola amarilla o cremosa, tubulosa, 4-5 dentadas, anteras

oblongas, obtusas en la base, con ápice membranáceo oblongo o subulado; ramas del estilo oblongas, comprimidas, con margen engrosado, estigmático-papiloso, excepto en el ápice triangular, exteriormente papilosos-pilósudo. Ovarios uniformes comprimidos, 2-nervado-marginados, elípticos u oblongo-elíptico, obtuso en el ápice, pilosos o glabros. Receptáculo plano, alveolado con márgenes de los alvéolos menudamente dentados (fide, Cuatrecasas, 1969).

#### Química de la planta.

En recientes revisiones quimiotaxonómicas de terpenoides, dentro de las Asteraceae se notó que las Sesquiterpenlactonas son usadas para delimitar tribus, como por ejemplo la Astereae.

Según la presencia de cromenos y benzofuranos se presenta a un grupo de las Asteraceae, conformada por las siguientes tribus: Astereae, Eupatorieae, Heliantheae, Inuleae y Senecioneae, las cuales exhiben en apreciables cantidades estos compuestos con diversidad de estructuras.

De las especies pertenecientes al género *Conyza* se han aislado principalmente terpenos y compuestos fenólicos del tipo de las flavonas (Ramírez M. 1987).

De las investigaciones que se han reportado para el género *conyza* a nivel químico se han obtenido compuestos como: éteres de escopoletina en *Conyza obscura*, diterpenos y derivados del clerodano en *conyza scabrida*, esteroides en *Conyza linifolia*, y en algunas especies como *Conyza bonariensis* se han reportado cumelenos (Ramírez M. 1987).

#### Usos tradicionales de *Conyza*.

Algunas sustancias químicas especialmente sesquiterpenlactonas presentes en varias plantas de la familia de las compuestas al hacer contacto con la piel producen picazón enrojecimiento (dermatitis por contacto). (Ramírez M. 1987).

La especie *Conyza trihecatactis* se usa en el tratamiento del reumatismo y desordenes gastrointestinales. (Ramírez M. 1987).

#### Descripción de la *Conyza trihecatactis*.

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Conyza*

Epíteto Específico: *trihecatactis*

Nombre Científico: *Conyza trihecatactis*.

Nombre común: Venadillo



Figura 5. *Conyza trihecatactis*

Fuente: el autor

### 1.5 Terpenos: Diterpenos

Los terpenos son un amplio grupo de compuestos que se caracterizan por estar formados por la unión de unidades pentacarbonadas ramificadas relacionadas con el 2- metil-1,3-butadieno (isopreno) (Bruneton, 2001b). Según formen parte de su esqueleto hidrocarbonado, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 8 unidades pentacarbonadas (C5), los terpenos se clasifican en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos y tetraterpenos, respectivamente (Bruneton, J. 2001).

Estos compuestos derivan biogénicamente del ácido mevalónico, el cual, mediante una serie de reacciones orgánicas clásicas catalizadas por enzimas, va a dar lugar a los precursores de los principales tipos de terpenos. Ejercen la función de precursores diferentes ésteres pirofosfóricos de alcoholes en (C5)<sub>n</sub>, formados por la adición secuencial de una unidad en C5, el pirofosfato de

isopentenilo (IPP), sobre una molécula iniciadora. El pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), formado a partir del IPP por isomerización, es el primer término de la serie. La condensación mediante unión “cabeza-cola” de estos dos últimos compuestos origina el geranilpirofosfato (GPP), precursor de monoterpénos. El acoplamiento al GPP de nuevas unidades de IPP origina moléculas de mayor peso molecular, incrementándose el número de carbonos de cinco en cinco: sesquiterpenos, diterpenos y así sucesivamente. Como puede observarse en la figura 5, las sucesivas moléculas iniciadora son: el farnesilpirofosfato (FPP), precursor de sesquiterpenos, el geranilgeranilpirofosfato (GGPP), precursor de diterpenos y el geranilfarnesilpirofosfato (GFPP), precursor de sesterterpenos. Los triterpenos y tetraterpenos provienen del escualeno y del fitoeno, quienes a su vez provienen de la unión “cola-cola” de dos moléculas de FPP y dos moléculas de GGPP, respectivamente (Bruneton, J. 1991).

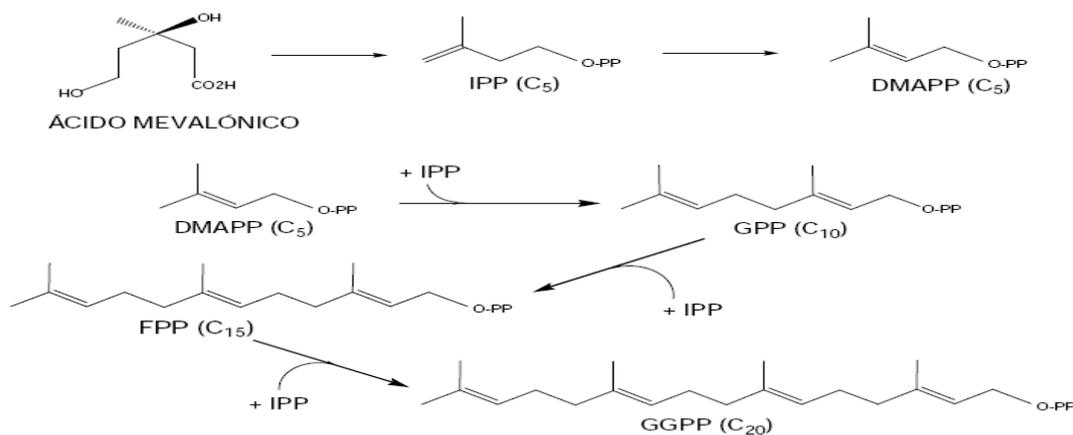


Figura 6. Formación de precursores de Diterpenos.

Los diterpenos son compuestos caracterizados por poseer una estructura básica de 20 carbonos y proceder del precursor 2E, 6E, 10E-geranilgeranilpirofosfato (GGPP), presentando una gran variabilidad estructural. En una primera instancia, los diterpenos pueden dividirse en dos grandes grupos, compuestos acíclicos y compuestos ciclados (Bruneton, 2001b). Los compuestos acíclicos son los menos frecuentes, pudiendo ser lineales o poseer un ciclo lactónico o éter. Por su parte, los diterpenos ciclados son clasificados a su vez en: bicíclicos (labdanos y clerodanos), tricíclicos (pimaranos, isopimaranos, abietanos, casanos y rosanos), tetracíclicos (kauranos, atisiranos, beyeranos y giberelinas) y pentacíclicos (traquilobanos). También se incluyen en este

grupo los diterpenos macrocíclicos como los cembrenos, casbenos o taxanos y los diterpenos miscelaneos briarano y vibsano (De las Heras y cols., 2003).

Actividad farmacológica de los Diterpenos.

El interés farmacológico de los diterpenos está fuera de toda duda, si recordamos que dentro de este grupo se encuentran los diterpenos tricíclicos del género *Taxus* y sus derivados (paclitaxel o Taxol® y docetaxel o Taxotere®), utilizados actualmente en terapéutica en el tratamiento de algunos tipos de cáncer por su acción antimitótica (Bruneton, J. 1991).

Además de estos compuestos, existen otros diterpenos que presentan interesantes actividades farmacológicas que los convierten en potenciales agentes terapéuticos. Así, podemos mencionar las propiedades antihipertensivas del ácido labdan-8(17)-en-15-oico y de la forskolina, la antiagregante plaquetaria del carnosol y de los ácidos pimárico y levopimárico, así como el interés de las quinonas diterpénicas de *Salvia miltiorrhiza* Bunge en el tratamiento de diversas afecciones del miocardio (Bruneton, J. 1991).

También se han encontrado otras propiedades farmacológicas para estos compuestos, entre las que se destacan las propiedades antirretrovirales de la prostratina, antitumorales de la oridonina y la lasiokaurina, antimicrobianas de la salvipimarona, antiparasitarias del ácido kaurenoico frente al *Trypanosoma cruzi*, antiinflamatorias de numerosos diterpenos obtenidos de la familia Lamiaceae (como la tanshinona IIA y el borjatriol aislados de los géneros *Salvia* y *Sideritis*, respectivamente), además de las propiedades analgésicas y gastroprotectivas del ácido centipédico (Ramirez, M. 2008)

## 2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Alrededor del mundo, y particularmente en Colombia, se han emprendido investigaciones con el propósito de buscar en los vegetales, nuevos metabolitos que puedan funcionar como antiinflamatorios o citotóxicos. Para esta investigación en particular se buscan alternativas terapéuticas derivadas de plantas con el fin de tratar algunas enfermedades como la inflamación aguda y el cáncer.

### **2.1 Actividad Antiinflamatoria.**

#### **2.1.2 Mecanismos de la inflamación.**

La inflamación es la respuesta local de los tejidos vivos de los mamíferos al daño causado por cualquier agente externo. Es una reacción de defensa del cuerpo para eliminar o limitar la diseminación de un agente nocivo, seguido de la eliminación de las células y los tejidos necrosados. (Pérez, T. 2007)

Los factores causantes de inflamación pueden ser:

1. Agentes infecciosos, como las bacterias, los virus y sus toxinas, los hongos y los parásitos.
2. Agentes inmunitarios, como las reacciones mediadas por células y antígeno-anticuerpo.
3. Agentes físicos, como el calor, el frío, la radiación y los traumatismos mecánicos.
4. Agentes químicos, como venenos orgánicos e inorgánicos.
5. Materiales inertes, como cuerpos extraños.

Signos de la inflamación.

El escritor romano Celso en el siglo I DC describió los cuatro signos cardinales de la inflamación:

- Rubor-enrojecimiento-,
- Tumor-hinchazón-,
- Calor y
- Dolor.

## Tipos de inflamación

Según la capacidad defensiva del huésped y de la duración de la respuesta, la inflamación puede clasificarse como aguda o crónica (Pérez, T. 2007).

- A. La inflamación aguda es de corta duración- dura menos de dos semanas-y representa la reacción temprana del cuerpo. Se resuelve rápidamente y es seguida de la curación.
- B. La inflamación crónica es de mayor duración y se produce cuando el agente causal de la inflamación aguda persiste un tiempo prolongado, o cuando el estímulo induce una inflamación crónica desde el comienzo.

### **2.1.3. Inflamación aguda.**

La respuesta inflamatoria aguda del huésped a un agente es un proceso continuo, pero para los efectos de esta explicación, podemos dividirlos en dos eventos:

- I. Eventos vasculares.
- II. Eventos celulares

#### I. Eventos vasculares.

La primera respuesta al daño a los tejidos es la alteración de la microvasculatura (arteriolas, capilares y vénulas). Estas alteraciones incluyen: Cambios hemodinámicos y cambios en la permeabilidad vascular (Pérez, T. 2007)

#### Cambios hemodinámicos

La primera manifestación de la respuesta inflamatoria se debe a los cambios en el flujo vascular y el calibre de los pequeños vasos sanguíneos en el tejido dañado. La secuencia de estos cambios es la siguiente:

1. Independiente del tipo de lesión, la respuesta vascular inmediata es una vasoconstricción transitoria de las arteriolas. En una lesión leve, el flujo sanguíneo se restablece entre 3 a 5 segundos.
2. Luego se produce una vasodilatación progresiva persistente que afecta, sobre todo, a las arteriolas y, en menor medida, a otros componentes de la microcirculación. Como vénulas y capilares.

3. La vasodilatación progresiva. A su vez, puede elevar la presión hidrostática local y producir una trasudación de líquido hacia el espacio extracelular. Esto produce hinchazón (edema) en el sitio local de la inflamación aguda.
4. Luego se produce un enlentecimiento o estasis de la microcirculación, con un aumento de la concentración de glóbulos rojos y de la viscosidad de la sangre.
5. La estasis es seguida de una marginación de leucocitos: Un desplazamiento periférico de los leucocitos, en especial de los neutrófilos, a lo largo del endotelio vascular. Los leucocitos se adhieren al endotelio vascular y de allí migra a través de los espacios entre las células endoteliales hacia el espacio extracelular.

#### Alteración de la permeabilidad vascular

Tanto en el tejido inflamado, como alrededor de él, se acumula edema en el compartimiento intersticial, que proviene del plasma sanguíneo por filtración a través de las paredes endoteliales del lecho vascular periférico. En la etapa inicial, la salida de líquido se debe a la vasodilatación y a la consecuente elevación de la presión hidrostática. Esto es un trasudado. Pero luego aparece el edema inflamatorio característico-el exudado-por aumento de la permeabilidad vascular en la microcirculación (Pérez, T. 2007).

#### I. Eventos celulares

La fase celular de la inflamación consiste en dos procesos:

1. Exudado de leucocitos; y
2. Fagocitosis.

#### 1. Exudación de leucocitos.

En la primera etapa de la inflamación, la velocidad del flujo sanguíneo aumenta debido a la vasodilatación. Pero luego se presenta una lentificación o estasis de la corriente sanguínea. Esto produce cambios en el flujo sanguíneo axial normal en la microcirculación. Como consecuencia de esta redistribución, los neutrófilos de la columna central se acercan a la pared de los vasos, esto se conoce como pavimentación. (Pérez, T. 2007)

## 2. Fagocitosis.

Es el proceso por el cual las células llamadas fagocitos envuelven a una partícula sólida. Existen dos tipos principales de células fagocíticas:

- i. Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), que aparecen en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria aguda, llamados también macrófagos.
- ii. Y los monocitos circundantes y fagocitos mononucleares en tejido fijos, llamados macrófagos. (Pérez, T. 2007)

### **2.2 Cáncer: Leucemia.**

Leucemia es el término general que se usa para referirse a algunos tipos distintos de cáncer de la sangre. Existen cuatro tipos principales de leucemia: Leucemia linfoblástica (linfocítica) aguda (ALL, por sus siglas en inglés) Leucemia mieloide (mielógena) aguda (AML, por sus siglas en inglés) Leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés) Leucemia mieloide (mielógena) crónica (CML, por sus siglas en inglés).

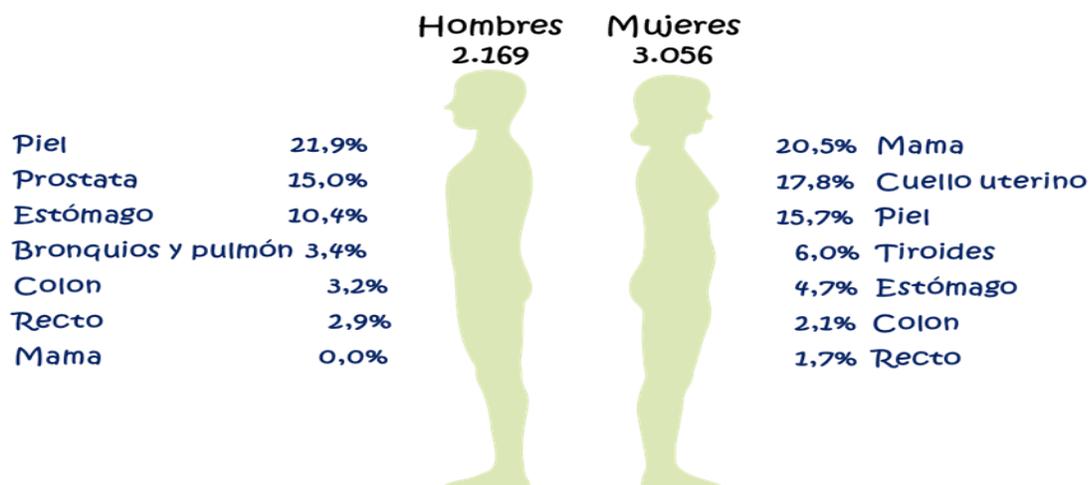
Es importante saber que los pacientes son afectados y tratados de forma diferente para cada tipo de leucemia. Estos cuatro tipos de leucemia tienen una característica en común: comienzan en una célula en la médula ósea. La célula sufre un cambio y se vuelve un tipo de célula de leucemia.

La médula tiene dos funciones principales. La primera función es formar células mieloides. La leucemia mieloide puede comenzar en estas células. La segunda función es formar linfocitos, que forman parte del sistema inmunitario. La leucemia linfocítica puede comenzar en estas células. Si el cambio canceroso tiene lugar en un tipo de célula de la médula que forma linfocitos, es un tipo de leucemia linfocítica o linfoblástica. La leucemia es de forma mielógena o mieloide si el cambio celular tiene lugar en un tipo de célula de la médula que suele formar glóbulos rojos, algunos tipos de glóbulos blancos y plaquetas.

Para cada tipo de leucemia, los pacientes son afectados y tratados de forma diferente. Todas las formas de ALL y AML (leucemias agudas) están compuestas de células jóvenes que se conocen como linfoblastos o mieloblastos. Estas células a veces se llaman blastos. Las formas agudas de leucemia avanzan rápidamente sin tratamiento.

La CLL y la CML tienen pocas o ninguna célula blástica. La CLL y CML a menudo progresan lentamente en comparación con las leucemias agudas, incluso sin tratamiento inmediato.

Estadísticas de cáncer en Colombia.



Fuente: Registro Institucional de Cáncer, INC. Anuario Estadístico 2006

### 2.2.1 Citometría De Flujo

Es un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión.

Esta técnica consiste en hacer pasar partículas en suspensión (por ejemplo células) por un haz luminoso. Las partículas deben estar alineadas y deben pasar de una en una por el haz luminoso. Su interacción con el haz luminoso genera señales debido a una dispersión de la luz (el tamaño de la célula, su núcleo, la membrana nuclear, el material granular del citoplasma, son características celulares que contribuyen a la dispersión de la luz), o a una emisión de la luz por los fluorocromos con los que se han marcado específicamente a las partículas. Estas señales generadas son llevadas a unos detectores que las transforman en impulsos eléctricos, se amplifican y son transformadas en señales digitales. Un ordenador procesa estas señales digitales (Pérez, T. 2007).

### 3. METODOLOGÍA

La presente investigación tomó como ejes: uno biológico y otro químico. Con el estudio biológico se pretendió evaluar la actividad antiinflamatorio de los extractos, fracciones y sustancias aisladas de *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y *Ageratina vacciniaefolia*. Por otra parte la actividad citotóxica de las fracciones, extractos y compuestos aislados de *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y *Ageratina vacciniaefolia* se evaluó utilizando Citometría de Flujo y para evaluar la actividad citotóxica se utilizó la siguiente línea celular: OCI-AML3 (leucemia aguda). Con el estudio químico se pretendió aislar e identificar las sustancias activas y proponer las estructuras de las desconocidas. A continuación se describen los métodos utilizados en el laboratorio de los grupos de investigación en Fitoquímica, el grupo de Bioquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (Actividad citotóxica) y el grupo de investigación en fitofarmacología vegetal de la Fundación Juan N. corpas (Actividad antiinflamatoria).

#### 3.1. Estudio biológico

Se realizó el estudio de las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas de los extractos y sustancias aisladas de *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y *Ageratina vacciniaefolia*.

##### 3.1.1 Medición de la actividad antiinflamatoria.

Edema plantar por carragenina.

El método del edema plantar por carragenina fue descrito por primera vez por Winter et al. Y posteriormente modificado por Sughisita et al. (1981). Consiste en la administración subcutánea de una pseudosolución de  $\lambda$  -carragenina, un mucopolisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondrus crispus*, a nivel de la aponeurosis plantar de la rata o del ratón, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por liberación de diversos autacoides(histamina, serotonina, bradiquinas, prostaglandinas, etc); además, diversos factores de complemento están implicados en la ampliación de la respuesta. El producto a ensayar se puede administrar por diferentes vías: intraperitoneal, oral...

Una hora después de la administración, la histamina y la serotonina tiene un papel principal como mediadores. Aproximadamente de una hora y media dos y media hora después de la inyección de carragenina, interviene las kininas como mediadores. La última fase está mediada por las prostaglandinas, fundamentalmente PGE, PGE2 y PGF2. La respuesta vascular máxima ocurre aproximadamente a las cuatro horas de la administración de carragenina y coincide con la fase mediada por las prostaglandinas. La extravasación de proteínas tiene lugar durante toda la respuesta al agente edematógeno. Respecto a la migración celular, fundamentalmente de leucocitos polimorfonucleares, comienza a las dos horas de haber inyectado el agente.

Hay que estandarizar el ensayo: hora temperatura, etc. Se prefiere la carragenina ante otros irritantes porque el edema que se produce está menos modificado por factores ajenos a los propiamente característicos de la inflamación y además, porque la actividad antiinflamatoria de este test guarda una buena correlación con la actividad antiinflamatoria en clínica (CYTED, 1985).

Protocolo Experimental en rata.

Animales de experimentación

Se hacen grupos de 6 ratas Wistar suizas albinas, hembras de aproximadamente 150-180 g de peso correctamente alimentados.

Descripción de la técnica.

Una hora después de la administración del extracto o principio puro, se administran 0.05 mL de una disolución al 3% de carragenina en solución salina fisiológica en la aponeurosis plantar derecha de la rata. Los extractos se administran a dosis entre 100-200 mg/kg Kilogramos de peso de la rata, mientras que para los principios activos es conveniente no sobrepasar los 100 mg/kg. Por vía oral, se emplean jeringuillas de 1mL con aguja especial, administrando 0.5 de la disolución que contiene el problema. El vehículo utilizado para preparar las soluciones fue una mezclas de tween 80-EtOH-Agua (2:2:20). El grupo control recibe solamente el vehículo (grupo 1) y otro grupo recibe diclofenaco como agente antiinflamatorio (7 mg/kg) (grupo 2).

El volumen de la pata inyectada es medido antes y después de la inyección de carragenina, en pletismómetro de agua marca Ugo Basile, modelo 7140.

El porcentaje de inhibición de la reacción inflamatoria de la carragenina, se calcula en la fase aguda, a las 1, 2, 3, 5 y 7 horas de la inyección de la misma.



Figura 7. Edema plantar inducido en la pata derecha de la rata.

El porcentaje de inflamación fue calculado con la siguiente formula:

$$\% \text{ de inflamación} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Siendo,

$V_t$  : Volumen de la pata inflamada a un tiempo determinado.

$V_0$  : Volumen normal de la pata en el tiempo inicial.

El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{X_{control} - X_{grupo}}{X_{control}} \times 100$$

Donde,  $X_{\text{control}}$  es el porcentaje de inflamación promedio del grupo control negativo a un tiempo determinado y  $X_{\text{grupo}}$  es el porcentaje de inflamación promedio de un grupo sometido a tratamiento con un extracto específico a un tiempo determinado. Adicionalmente, el porcentaje neto de inhibición se calculó obteniendo el área bajo la curva de inflamación vs. Tiempo (CYTED, 1995).

### Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  SEM (Error estándar de la media). Para determinar las diferencias entre los diferentes tratamiento se realizó un análisis de varianza a dos vías y la prueba de Bonferroni. Una  $p < 0,05$  fue considerada como significativa. Para el análisis se empleó el programa GraphPad Prism 5.0

### **3.1.2 Estudio histopatológico.**

A nivel histológico, se evaluaron los siguientes parámetros asociados a la respuesta inflamatoria normal: Enrojecimiento local, edema (hinchazón del tejido), respuesta vascular (vaso dilatación) e infiltrado inflamatorio (Tipo y Cantidad de células inflamatorias presentes en los tejidos). Este estudio se realizó en la Fundación Juan N. Corpas en colaboración con el grupo de investigación en fitofarmacología vegetal.

El proceso histopatológico se realizó en las siguientes etapas: 1. Fijación del tejido con formol al 10%, 2. Deshidratación de los tejidos, 3. Impregnación en parafina, corte, coloración (Hematoxilina y Eosina) y montaje, 4. Observación del material al microscopio (40,100 y 400 aumentos) (Lester, S. 2006)

### **3.1.2 Actividad Citotóxica.**

Cultivo celular.

Línea celular OCL-AML3(ATCC).

1. Se mantienen las células congeladas a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  en medio de congelamiento que tiene suero fetal bovino y 10% DMSO con un % de viabilidad igual o superior a 90%.

2. Para la recuperación de las células, los crioviales fueron colocados al baño maría a 37°C. Una vez descongeladas las células se pasan a una caja T25 con 5 mL de medio L-15, SFB y antibiótico y se dejaron incubando por cerca de 5 horas a 37°C.
4. Luego se monta en una caja de 48 pozos con un volumen de 300 microlitros cada pozo a una concentración de 100.000 células / mL. El recuento se realizó con un colorante de viabilidad llamado azul tripán.
5. Posteriormente se agrega el volumen de extracto necesario para obtener la concentración final. Concentraciones bajas 5, 10 y 15 µg / mL y concentraciones altas 30, 60 y 90 µg/mL.
6. Se incuba a una temperatura de 37°C.
7. Se realiza un seguimiento mediante la observación al microscopio para identificar la actividad del extracto sobre las células con un tiempo límite de 96 horas.
8. Si el extracto presenta actividad durante este tiempo se corre el experimento por citometría.

### 3.2 Estudio Químico

Sólo se estudiaron los extractos y fracciones activos, tanto antiinflamatorios como citotóxicos.

#### 3.2.1 Material vegetal

Se investigaron tres especies *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y *Ageratina vacciniaefolia*, de dos páramos cercanos a Bogotá: Cruz Verde y Sumapaz. Especímenes de cada una de las especies fueron debidamente registradas en el Herbario Nacional de Colombia. ( ver tabla 1)

#### 3.2.2 Obtención de extractos

Tabla 1. Lista de vegetales estudiados.

Especies Vegetales	N° de registro	Órganos recolectados
<i>Conyza trihecatactis</i>	COL2766158	Hojas, inflorescencias, tallos
<i>Gnaphalium graveolens</i>	COL000014328	Hojas, inflorescencias, tallos
<i>Ageratina vacciniaefolia</i>	COL422104	Hojas, inflorescencias, tallos

Los materiales vegetales recolectados (Hojas, inflorescencias, tallos) fueron secados al ambiente, y posteriormente se trituró en un molino de aspas. Se extrajo el material en un soxhlet con éter de petróleo para desengrasarlo obteniéndose un extracto de éter de petróleo y un marco I, que se dejó secar al aire libre y luego se trató con etanol al 95% en soxhlet obteniéndose el respectivo extracto etanólico y un marco II. Posteriormente los extractos se concentraron en un rotaevaporador. Los extractos en etanol fueron fraccionados exhaustivamente líquido/líquido con cloroformo, éter etílico y acetato de etilo, en su orden según la figura 8.

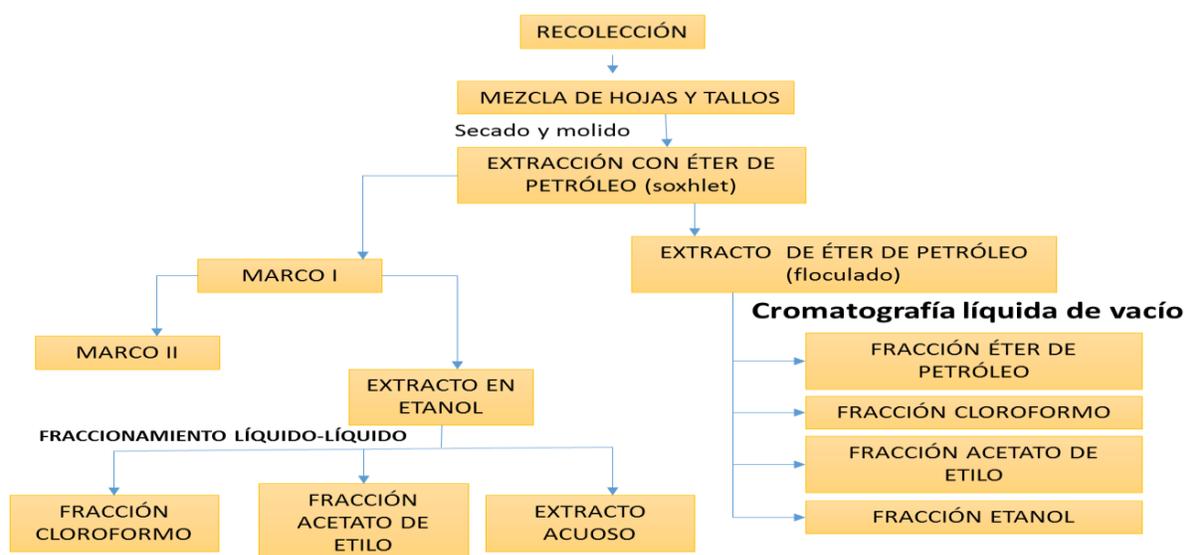


Figura 8. Metodología general para la obtención de extractos Vegetales.

### 3.2.3 Aislamiento de compuestos.

En el aislamiento y purificación de los compuestos tipo diterpeno presentes en los extractos y fracciones se utilizaron procedimientos físicos (lavados de sólidos y cristalizaciones fraccionadas) y una variedad de técnicas cromatográficas.

Entre las muchas técnicas, la cromatografía de columna (CC) y de capa delgada (CCD) fueron usadas constantemente. Las técnicas cromatográficas usadas serán explicadas a continuación:

- Cromatografía en capa delgada (CCD)-Platos de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> fueron usados para un monitoreo preliminar de los extractos crudos y de las fracciones obtenidas de las columnas; permitieron, además, ir revisando la pureza de los compuestos aislados y confirmar la identidad de las sustancias (Martínez, M. 2008).

Las mezclas de solventes utilizadas para el monitoreo de los extractos y fracciones fueron:

Éter de petróleo/Acetato de etilo 9:1 y 7:3

Éter de petróleo/Acetona 9:1 y 6:4

Cloroformo 100%

Cloroformo/Metanol 9:1, 8:2, 7:3, 8.5:1.5

Acetato de etilo/Metanol/Agua 8:1:1

- Cromatografía líquida de vacío (CLV) Esta técnica fue usada para el fraccionamiento rápido inicial de extractos crudos. La CLV es una técnica constituida por una columna cromatográfica, donde la elución es ayudada por vacío.  
Una columna de vidrio de 5 a 30 cm de altura aproximadamente, con un diámetro de 3 a 5 cm fue empacada en seco con sílica (Kieselgel 60H) bajo succión. La sílica fue previamente saturada con éter de petróleo para facilitar un mayor empaquetamiento. La mezcla a separar fue absorbida primero en una pequeña cantidad de sílica, se dejó secar y se aplicó en la parte superior de la columna. La elución fue llevada a cabo con solventes en orden creciente de polaridad. Se recolectaron fracciones de 200 a 300 mililitros, las cuales fueron monitoreadas por CCD.
- Cromatografía en columna (CC) –Se utilizaron para separar compuestos de las fracciones obtenidas por CLV. Se suspendieron y homogenizaron muestras pesadas de sílica gel (Kieselgel 60G) en un solvente apropiado (éter de petróleo o cloroformo), y se empaquetaron en columnas de vidrio de 30 cm de altura y 2cm de diámetro. Las muestras a separar fueron disueltas en una pequeña cantidad de solvente y luego introducidas en la columna. La elución se realizó acorde con la fase móvil identificada previamente por CCD.
- Agentes de detección y visualización de compuestos- Se utilizó luz ultravioleta de 254 nm (onda corta) y 336 nm (onda larga), que permitió la detección de puntos o bandas de algunos compuestos fluorescentes o que apagan la fluorescencia en lo platos de CCD o CCDP con sílica 60 GF<sub>254</sub>. Además se utilizaron reveladores universales como: vainillina al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado que permitió la detección de muchos metabolitos; las placas cromatográficas fueron impregnados con el reactivo y luego calentado por 2 minutos para visualizar los puntos o bandas ((Martínez, M. 2008).

### 3.2.4 Instrumentos de medición.

Para la presente investigación se utilizaron los siguientes equipos.

- Rotaevaporador.- Se utilizó un aparato buchi RE 111.
- Aparato para medir los punto de fusión.-Los puntos de fusión determinados en un fusiómetro MEL-TEMP, Laboratory Divices. Mass 02139. Las temperaturas medidas fueron expresadas en °C.
- Aparato para medir la actividad óptica.-Los valores de  $[\alpha]_D^{20}$  fueron obtenidos en un polarímetro Polartronic.
- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).-Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ( $^1\text{H}$  RMN) y para el isótopo de carbono de masa 13 ( $^{13}\text{C}$  RMN), en una dimensión, fueron corridos en un instrumento Bruker Avance-300 (de 300MHz); lo mismo que los espectros en 2D-RMN(en dos dimensiones) tales como:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY, HSQC y HMBC. Los espectros fueron obtenidos en solución usando diferentes solventes deuterados, como  $\text{CDCl}_3$ , MeOD, dependiendo de la solubilidad de la sustancia.

### 3.2.5 Identificación y elucidación de compuestos

Para el presente estudio, la identificación y la asignación estructural se utilizaron datos aportados por la espectroscopia de masas y de RMN.

- Experimentos DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer)- Estos espectros permiten diferenciar entre  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  por sus señales en fase positivas o negativas.
- Espectroscopia de correlación. El desarrollo de los espectros de correlación ha simplificado la interpretación de los espectros complejos. Con el fin de obtener espectros de correlación, secuencias de pulso indicados convenientemente son aplicados a la muestra a diferentes intervalos de tiempo. De entre los varios experimentos 2D, se utilizaron los homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Correlated Spectroscopy) y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) y los heteronucleares HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence ) HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) (Pasto, D. 1974).

## 4. EXPERIMENTACIÓN

Las plantas se obtuvieron de los páramos de Cruz Verde y Sumapaz, las hojas y tallos de cada una de las especies recolectadas fueron secadas al ambiente y luego molidas; 1Kg de cada una de ellas fueron extraídas en aparatos tipo Soxhlet con éter de petróleo, durante 72 horas. Los extractos fueron concentrados y secados, para luego ser evaluados en su acción como antiinflamatorios y citotóxicos.

### 4.1 Recolección del material vegetal

Se recolectaron las especies seleccionadas para el estudio, entre los meses de Enero-Marzo y Agosto-Septiembre, cuando se encontraban en pleno periodo de floración. Especímenes de cada una de las especies, y de cada levantamiento, fueron clasificados taxonómicamente y registrados en el Herbario Nacional de Colombia.

### 4.2 Extracción del material vegetal

Para cada una de las tres especies investigadas se obtuvieron los siguientes extractos:

#### 4.2.1 Extractos en éter de petróleo

La mezcla de hojas y tallos del material vegetal fueron secados al ambiente y luego molidos; 1Kg de cada uno de ellos fue extraído en un aparato tipo soxhlet con éter de petróleo durante 72 horas, al cabo de las cuales fueron concentradas al vacío. El extracto fue tratado con una mezcla de Hexano/acetona en proporción 1:2 y se dejó reposar por 24 horas; se filtró y el filtrado se concentró al vacío, finalmente el extracto se secó al ambiente. (Ver tabla 2)

#### 4.2.2 Extractos en etanol

Los materiales desengrasados (Marco I), se extrajeron seguidamente, utilizando un aparato tipo soxhlet con Etanol del 95%. La extracción duró 72 horas. Los extractos en Etanol resultantes fueron tratados con agua destilada y dejados en reposo por 24 horas (floculación); después de este tiempo se filtró el extracto y el filtrado fue fraccionado mediante extracciones continuas

líquido/líquido con solventes en orden creciente de polaridad. Estas fracciones fueron concentradas al vacío en un rotaevaporador y secadas al ambiente. (Ver tabla 3)

Tabla 2. Porcentajes de rendimientos (g extractos/100g de material vegetal seco) de los extractos en éter de petróleo de las tres especies vegetales.

Especies vegetales	% de rendimiento(g extractos/100g de material vegetal seco)
<i>Conyza trihecatactis</i>	3
<i>Gnaphalium graveolens</i>	2.8
<i>Ageratina vacciniaefolia</i>	2.5

Tabla 3. Porcentajes de rendimientos (g extractos/100g de material vegetal seco) de los extractos en Etanol de las tres especies vegetales.

Especies vegetales	% de rendimiento(g extractos/100g de material vegetal seco)
<i>Conyza trihecatactis</i>	4.5
<i>Gnaphalium graveolens</i>	3.8
<i>Ageratina vacciniaefolia</i>	6.5

#### 4.3 Aislamiento de los compuestos.

En algunos casos los compuestos cristalizaron directamente al concentrar los extractos y las fracciones. La mayoría de ellos tuvieron que ser aislados y purificados de los extractos y fracciones usando una variedad de técnicas cromatográficas.

Los compuestos obtenidos fueron purificados mediante recrystalizaciones o mediante CCDP, su pureza fue monitoreada mediante CCD. Estas sustancias fueron marcadas siguiendo un orden estricto de elución; se utilizaron las iniciales del nombre científico de las plantas seguido de un número que indica la secuencia de aparición. Así, de cada especie se aislaron: de *Conyza trihecatactis*, Ct-01, Ct-02, Ct-03, de *Gnaphalium graveolens* Gg-01 y, de *Ageratina vacciniaefolia* Av-01, Av-02, Av-03, Av-04, Av-05.

#### Aislamiento de compuestos *Conyza trihecatactis*,

Del extracto obtenido de éter de petróleo se pesaron 15 g de extracto y se pasaron por una CLV; empacada con 250 g de sílica (Kieselgel 60H) al vacío en una columna de vidrio y, se colocó la muestra adsorbida en una pequeña cantidad de sílica. La elución se realizó con solventes en orden creciente de polaridad (Éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y etanol), se recolectaron fracciones de 200 a 250 mL estas fracciones fueron agrupadas de acuerdo al monitoreo con CCD, mezcladas y concentradas a presión reducida en un rotaevaporador.

Posteriormente se montó una columna empacada con sílica gel 60 G y se introdujeron 4 g de la fracción de Acetato de etilo. La columna fue eluída con una mezcla de solventes desde Hexano-Acetona 9:1, Cloroformo-Metanol 9:1 y finalmente con Metanol. Se recogieron 100 fracciones de 50 mL cada una.

A las fracciones 1-3 extraídas de la fracción de acetato de etilo, que se eluyeron con la mezcla de Hexano-Acetona 9:1 se les realizó CCD en placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, que fueron corridas con Cloroformo-Metanol 9:1. Las fracciones monitoreadas mostraron la presencia de un compuesto cristalino de color blanco denominado Ct-01(300mg). Las fracciones de la 45-48 que se eluyeron con la mezcla Cloroformo-Metanol 9:1 se les realizó CCD en placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, que fueron corridas con Diclorometano: Metanol 8:2. Las fracciones monitoreadas mostraron la presencia de un compuesto de color amarillo denominado Ct-02(80mg). Las fracciones de la 61-65 que se eluyeron con la mezcla Cloroformo-Metanol 9:1 se les realizó CCD en placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, que fueron corridas con Cloroformo-Metanol 8:2. Las fracciones monitoreadas mostraron la presencia de un sólido cristalino de color blanco denominado Ct-03(70mg). Los compuestos aislados fueron purificados mediante procesos de recristalización.

#### Aislamiento de compuestos *Gnaphalium graveolens*

Del extracto obtenido de éter de petróleo se pesaron 10 g de extracto y se pasaron por una CLV; empacada con 250 g de sílica (Kieselgel 60H) bajo succión en una columna de vidrio y, se colocó la muestra adsorbida en una pequeña cantidad de sílica. La elución se realizó con solventes en orden creciente de polaridad (Éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y etanol), se

recolectaron 22 fracciones de 200 mL; estas fracciones fueron agrupadas de acuerdo al monitoreo con CCD, mezcladas y concentradas a presión reducida en un rotaevaporador.

A las fracciones 3-5 extraídas del extracto de éter de petróleo, que se eluyeron con la mezcla Diclorometano-Acetato de etilo 9:1 se les realizó CCD en placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, que fueron corridas con Diclorometano-Acetato de etilo 8:2. Las fracciones monitoreadas mostraron la presencia de un compuesto cristalino de color blanco denominado Gg-01(150mg).

#### Aislamiento de compuestos *Ageratina vacciniaefolia*,

Del extracto obtenido de éter de petróleo se pesaron 15 g de extracto y se pasaron por una CLV; empacada con 250 g de sílica (Kieselgel 60H) bajo succión en una columna de vidrio y, se colocó la muestra adsorbida en una pequeña cantidad de sílica. La elución se realizó con solventes en orden creciente de polaridad (Éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y etanol), se recolectaron 15 fracciones de 200 a 250 ml; estas fracciones fueron agrupadas de acuerdo al monitoreo con CCD, mezcladas y concentradas a presión reducida en un rotaevaporador.

En la fracción 4 se observó la precipitación de un sólido cristalino, eluida en una mezcla de Diclorometano-Acetato de etilo se le realizó CCD en placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, que fue corrida con Diclorometano-Acetato de etilo 8:2. La fracción monitoreada mostró la presencia de un compuesto denominado Av-01(150mg).

A partir de 380g del Extracto en etanol se obtuvo un sólido por precipitación espontánea, que fue recristalizado con una mezcla de Acetona y Acetato de etilo 1:1. Al sólido obtenido de esta manera se le realizó una CCD en placas de sílica gel C<sub>18</sub>, que fue corrida con: AcOEt –MeOH-H<sub>2</sub>O (7.5:1.5:1). El compuesto de color amarillo se denominó Av-02(5.0g).

Partiendo de 3g de la fracción de cloroformo, obtenida del fraccionamiento líquido-líquido del extracto en etanol y mediante CLV; empacada con 250 g de sílica (Kieselgel 60H) bajo succión en una columna de vidrio y, se colocó la muestra adsorbida en una pequeña cantidad de sílica. La elución se realizó con solventes en orden creciente de polaridad (Éter de petróleo, cloroformo,

acetato de etilo y etanol), se recolectaron 11 fracciones de 200 a 250 mL; estas fracciones fueron agrupadas de acuerdo al monitoreo con CCD, mezcladas y concentradas a presión reducida en un rotaevaporador.

La fracción 3 extraída de la fracción de cloroformo, eluida con la mezcla cloroformo-Acetato de etilo 8:2 se les realizó CCD en placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> que fueron corridas con Cloroformo: Metanol 9:1. La fracción monitoreada mostró la presencia de un compuesto cristalino de color blanco denominado Av-03(130mg).

Las fracciones 1-2 extraídas de la fracción de cloroformo, eluidas con Acetato de Etilo se les realizó CCD en placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, que fueron corridas con Cloroformo: Metanol 8:2. Las anteriores fracciones con una masa de 500 mg fueron pasadas a través de una columna de sílica (Kieselgel 60G), La mezcla fue disuelta en Cloroformo y aplicada en la superficie superior de la columna. La elución se comenzó con Cloroformo y se continuó con mezclas de Cloroformo-Metanol 9:1. Se recolectaron 27 fracciones de 5 mL las cuales se monitorearon con CCD, se agruparon de acuerdo a su perfil cromatográfico y se dejaron secar a temperatura ambiente. En la fracción 23 se observó un sólido de color amarillo, que se purificó por recristalización con una mezcla de Cloroformo-Metanol 8:2. El compuesto se denominó como Av-04(10mg).

#### 4.4 Actividad Antiinflamatoria.

Los grupos se distribuyeron de la siguiente manera (Tabla 4):

Grupo	Tratamiento	Concentración.
1	Control (-) Solución salina	
2	Control (+) Diclofenaco 100mg/Kg	100mg/Kg
3	Extracto Etanolico de <i>Ageratina vacciniaefolia</i> .(T1)	300mg/Kg
4	Fracción de Acetato de etilo obtenida a partir del extracto en éter de petróleo de <i>Conyza trihecatactis</i> .(T2)	300mg/Kg
5	Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico (T3) (Av-03)	70mg/Kg
6	(Ent-(13R)-labdan-14-en-8,13-diol) (T4) (Ct-01)	70mg/Kg
7	Mezcla de (Ent-(13R)-8-hidroxi-labdan-14-en-13-O-β-D-xilopiranos), (Ent-(13R)-labdan-8(17),14-dien-13-O-β-D-xilopiranos). (T5) (Ct-02 y Ct-03)	70mg/Kg
8	β-D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-(β-xilopiranos)-19-oico (T6) (Av-02)	70mg/Kg

**Tabla 4. Distribución de los grupos por tratamientos.**

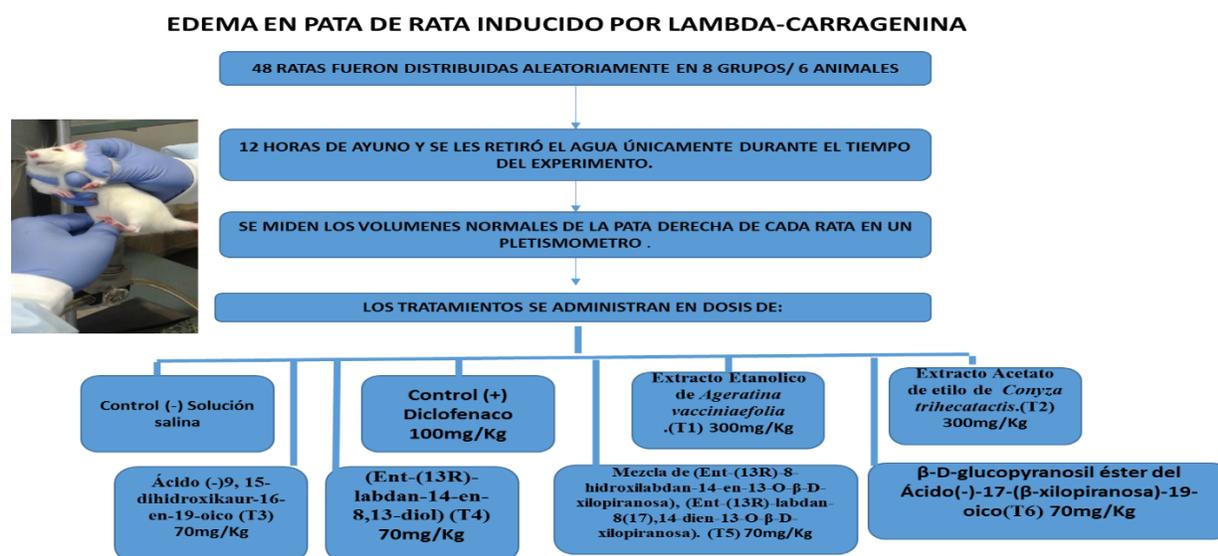


Figura 9. Esquema general procedimiento actividad antiinflamatoria por edema de pata de rata inducido por lambda carragenina.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificación de las sustancias aisladas.

#### 5.1.2 Diterpenos tipo Kaurano.

Los kauranos son diterpenos (C<sub>20</sub>) tetracíclicos que se presentan algunas veces como sólidos cristalinos y otras como sólidos blancos amorfos; dan positivo la prueba de salkowski, revelan de color rosa, rojo o violeta con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La estructura general para estas sustancias se incluye en la figura (8)

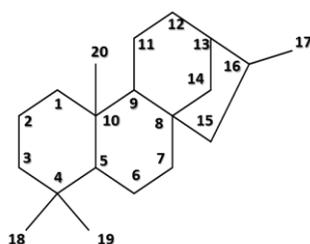


Figura 10. Estructura general numerada de los kauranos.

Entre los derivados kaurénoicos obtenidos en el presente trabajo, están el sólido Av-01 que se identificó como el ácido kaur-16-en-19-oico. En el espectro de RMN H<sup>1</sup> se observaron solo dos señales para grupos metilo ( $\delta$  0.96 y 1.25) ligados a carbonos cuaternarios; además, dos señales a  $\delta$  4.74 y 4.8 características de hidrógenos exometilénico (=CH<sub>2</sub>). Los espectros de RMN<sup>13</sup>C mostraron 20 señales distribuidas en: 2-CH<sub>3</sub>, 9-CH<sub>2</sub>-, 1=CH<sub>2</sub>, 3 -CH, 4-C- y -COOH, lo que da para una fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>. Este análisis permitió concluir que el sólido Av-01 correspondía al ácido kaurenoico. Los espectros HMBC permitieron observar correlaciones importantes:  $\delta$  1,25 (-CH<sub>3</sub>) con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  37.8 (C3), 47.7 (C4), 56.9(C5), 39.9(C10) y 184.4(C19);  $\delta$  0.96 (-CH<sub>3</sub>) con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  39.4(C1), 39.9(C10) y 56.9(C5) y  $\delta$  4,74 y 4,8 (=CH<sub>2</sub>) con 43.85(C13), 48.9(C15), 155.9(C16). Los datos espectroscópicos y propiedades físicas como Pf =175 °C y  $[\alpha]_D^{20}$  (-99,3)(0.005g/mL;CHCl<sub>3</sub>) coincidieron con los reportados en la literatura para el ácido kaur-16-en-19-oico (Pedrozo, J. 2001). Las asignaciones de los diferentes desplazamientos del espectro de RMN H<sup>1</sup> y RMN<sup>13</sup>C se incluyen en la tabla 5.

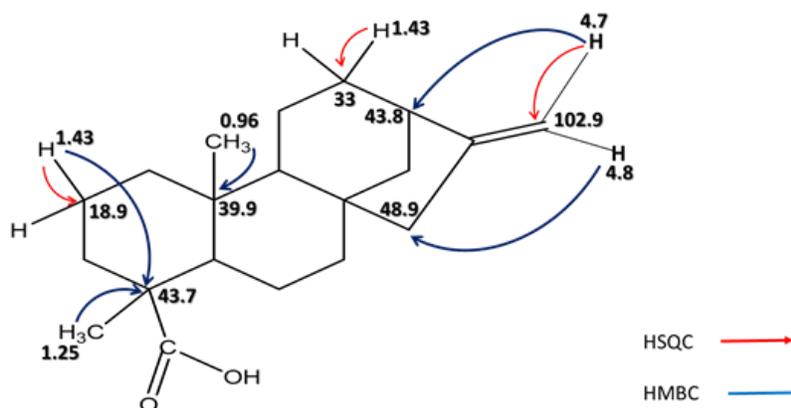


Figura 11. Estructura del Ácido kaur-16-en-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.

Tabla 5. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro RMN  $H^1$  y RMN  $^{13}C$  del Ácido kaur-16-en-19-oico.

TABLA N°5. Datos de RMN $^1H$ y RMN $^{13}C$				
N° Carbono	$\delta c(ppm)$	Tipo de carbono	Correl. $^1J_{CH}$	Correl. $^3J_{CH}$
1	39.4	CH <sub>2</sub>	Ha:1.16 ; Hb:2.02	0,9 6 -1,7-2,19
2	18.9	CH <sub>2</sub>	Ha:1.43 ; Hb:1.92	-----
3	37.8	CH <sub>2</sub>	Ha:2.19 ; Hb:1.02	2,02-1,25-1,08
4	43.7	C	-	1,92-1,82
5	56.9	CH	H:1.08	1,25-1,57
6	21.7	CH <sub>2</sub>	H: 1.82	-----
7	41.3	CH <sub>2</sub>	H: 1.57	2,05-1,08
8	44.23	C	-	2,07-1.82
9	55.1	CH	H:1.07	1,48-0,9
10	39.9	C	-	1,43-1,82
11	18.4	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.43 ; Hb: 21.61	1,07
12	33	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.43; Hb:1,48	1,07-1,92
13	43.85	CH	H: 2.07	4,74-1,43
14	40.5	CH <sub>2</sub>	Ha:0.9 ; Hb:1.92	1,48-2,05

15	48.9	CH	H:2.05	4,8-1,57
16	155.9	C(sp <sub>2</sub> )	-	1,48-1,92
17	102.9	CH <sub>2</sub> (sp <sub>2</sub> )	Ha: 4.74; Hb:4.8	2,05-1,48
18	28.8	CH <sub>3</sub>	H:1.25	2,19-1,08
19	184.4	C(sp <sub>2</sub> )	-	1,25- 2,19
20	15.3	CH <sub>3</sub>	H: 0.96	1,16-1,07

El sólido Av-02 dio positiva la prueba de antrona/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> indicando la presencia de azúcares en la molécula, se propuso para este sólido la estructura de un **β-D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-(β-xilopiranos)-kauran-19-oico**. El RMN <sup>13</sup>C del glicósido mostró 31 señales, 11 de las cuales aparecieron en la región entre 62-105 ppm, señales características de los carbonos de un azúcar; además, las 20 señales restantes indicaron que la aglicona corresponde a un diterpeno de tipo Kaurano. En el espectro RMN<sup>1</sup>H muestra señales a δ 5.24 para el H anomérico y δ 94.1 para el carbono anomérico que indicaron la presencia de un glicósido, mientras que las señales a δ 4.24 de otro H anomérico y su C anomérico a δ 104,6. Los espectros HMBC permitieron observar correlaciones importantes: δ 5.24 correspondiente al H anomérico con los desplazamientos de carbonos δ 176.95 (C19). La señal a 77.38 ppm en el espectro RMN<sup>13</sup>C permitió suponer la presencia de un -CHOH, que por las interacciones observadas en el espectro HMBC, se supone esta correlacionando con el protón δ 5.24 correspondiente al H anomérico. Lo que permite concluir que uno de los azúcares está unido al carbono N°19. El otro azúcar correspondiente a una β-xilopiranososa presenta las siguientes correlaciones en el espectro HMBC, el δ 4.24 correspondiente al H anomérico con los desplazamientos del carbono δ 74.11 (C17) y δ 40.42 (C16). Las correlaciones observadas en NOESY facilitaron la determinación de la estereoquímica de la molécula, las correlaciones observadas son: δ 1.22(H-18)↔ δ 2.21(H-3), δ 0.97(H-20)↔ δ 1.84(H-3), δ 3.32(H-17)↔ δ 2.13(H-13), δ 3.32(H-17)↔ δ 4.24(H-1''), δ 4.24(H-1'')↔ δ 3.69(H-5''), δ 3.38(H-2')↔ δ 3.85(H-6'), por otro lado δ 1.10 (H-5) no correlaciona con δ 0.97 (H-20) lo que demuestra la posición *trans* de estos grupos. Lo anterior permite establecer que la β-xilopiranososa se encuentra unida al carbono N° 17. Las propiedades físicas determinadas son las siguientes Pf =217 °C y [α] D<sup>20</sup> (-72°), (0.005g/mL;CH<sub>3</sub>OH). Este análisis permitió proponer para Av-02 la estructura del **β-D-glucopyranosil éster del Ácido (-)-17-(β-xilopiranos)-kauran-19-oico**, glicósido aún no reportado en la literatura. Las asignaciones de

los diferentes desplazamientos del espectro de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C se incluyen en la tabla 6 (Pedrozo, J. 2001).

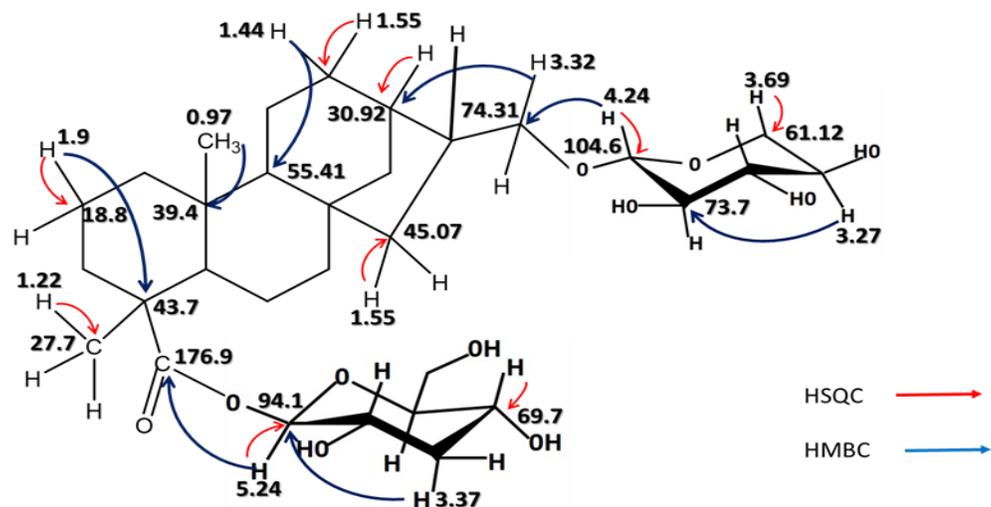


Figura 12. Estructura del  $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-( $\beta$ -xilopiranos)-kauran-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.

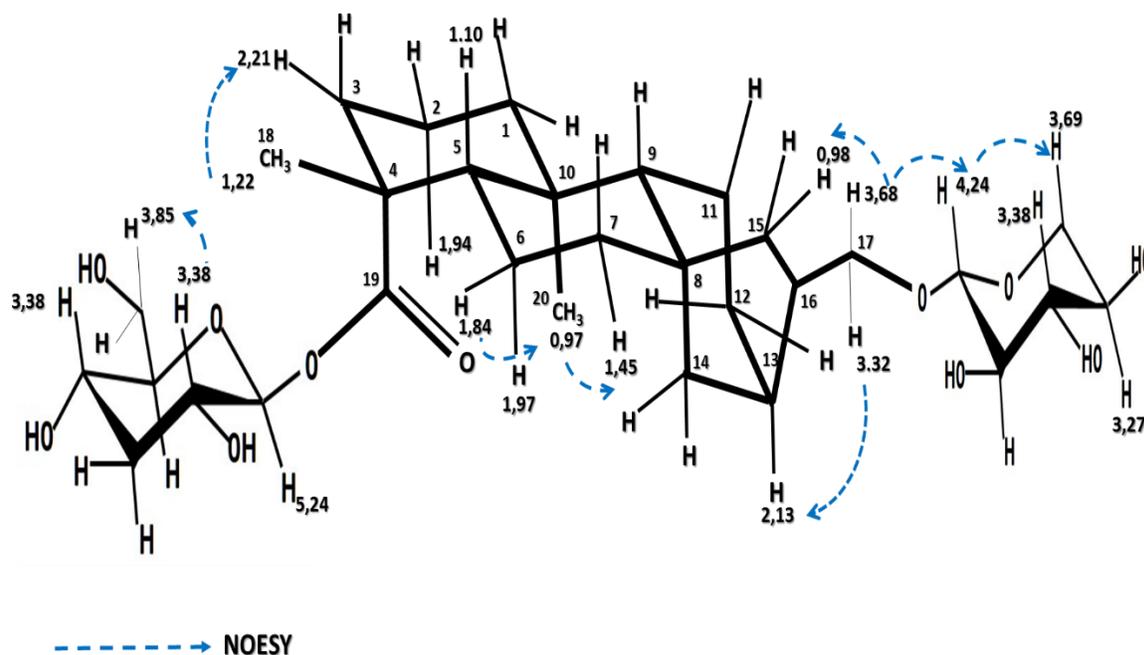
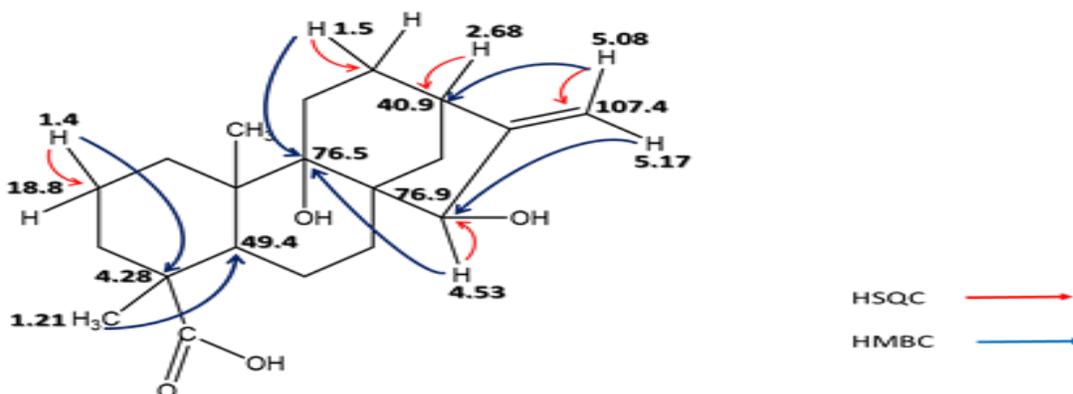


Figura 13. Estructura del  $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-( $\beta$ -xilopiranos)-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro NOESY.

**Tabla 6. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN  $H^1$  y RMN $^{13}C$  del  $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-( $\beta$ -xilopiranos)-19-oico .**

TABLA N°6. Datos de RMN $^1H$ y RMN $^{13}C$				
N° Carbono	$\delta c(ppm)$	Tipo de carbono	Correl. $^1J_{CH}$	Correl. $^3J_{CH}$
1	40.64	CH <sub>2</sub>	Ha:0.84 ; Hb:1.9	0.9 7 -1.0-2.11
2	18.81	CH <sub>2</sub>	Ha:1.9 ; Hb:1.94	-----
3	37.70	CH <sub>2</sub>	Ha:2.21 ; Hb:1.05	1.9-1. 22-1.1
4	43.70	C	-	1,95-1.85
5	57.36	CH	H:1.10	1.45-1.9
6	22.13	CH <sub>2</sub>	Ha:1.85 ; Hb:1.97	-----
7	41.57	CH <sub>2</sub>	H: 1.45	1.55-1.10
8	44.5	C	-	2.13-1.62
9	55.41	CH	1.01	1.55-0.97
10	39.4	C	-	1.95-1.62
11	18.56	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.62 ; Hb: 1.14	2.13
12	30.92	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.5; Hb:1.44	1.01-2.08
13	38.24	CH	H: 2.13	3.32-1.62
14	36.54	CH <sub>2</sub>	Ha:1.47 ; Hb:2.19	2.08-1.01
15	45.07	CH <sub>2</sub>	Ha:1.55 ; Hb:0.98	2.13-1.01
16	40.42	CH	2.08	1.44
17	74.11	CH <sub>2</sub>	Ha: 3.32; Hb:3.68	2.13-4.24
18	27.70	CH <sub>3</sub>	H:1.22	2.21-1.10
19	176.95	C(sp <sub>2</sub> )	-	1.22-1.10
20	15.06	CH <sub>3</sub>	H: 0.97	1.9-1.01
1'	94.1	CH	H: 5.24	3.37
2'	77.38	CH	H: 3.38	3.38
3'	72.6	CH <sub>2</sub>	H: 3.37	5.24-3.38
4'	69.72	CH	H: 3.38	3.38-3.85
5'	76.76	CH	H: 3.38	3.37
6'	61.14	CH <sub>2</sub>	H: 3.85	3.38
1''	104.6	CH	H: 4,24	3.38-3.32
2''	73.7	CH	H: 3.17	3.27
3''	70.26	CH	H: 3.38	4.24-3.69
4''	76.49	CH	H: 3.27	3.17
5''	61,12	CH <sub>2</sub>	H: 3.69	3.38

El sólido Av-03 se identificó como el **Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico**. En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observaron solo dos señales para grupos metilo ( $\delta$  1,12 y 1,22) ligados a carbonos cuaternarios; además, dos señales a  $\delta$  5,06 y 5,21 señales características de un grupo exometilénico ( $=\text{CH}_2$ ) y un singulete a  $\delta$  4,53 ppm para el hidrógeno metínico de un  $-\text{CH}-\text{OH}$ . Los espectros de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  mostraron 20 señales distribuidas en: 2  $-\text{CH}_3$ , 9- $\text{CH}_2$ -, 1= $\text{CH}_2$ , 2  $-\text{CH}$ , 5-C- y  $-\text{COOH}$ , lo que da para una fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$ . Este análisis permitió concluir que el sólido Av-03 correspondía al **Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico**. Los espectros HMBC permitieron observar correlaciones importantes:  $\delta$  1,22 ( $-\text{CH}_3$ ) con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  37,5 (C3), 43,7 (C4), 49,47(C5), 43,41(C10) y 180,67(C19);  $\delta$  1,12 ( $-\text{CH}_3$ ) con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  32,2(C1), 43,4(C10) y 76,5(C9) y  $\delta$  5,08 y 5,17 ( $=\text{CH}_2$ ) con 40,9(C13), 76,9(C15), 159,2(C16). Los datos espectroscópicos y propiedades físicas como  $\text{Pf} = 220^\circ\text{C}$  y  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} (+75^\circ)$ , (0,005g/mL;  $\text{CHCl}_3$ ) coincidieron con los reportados en la literatura para el **Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico** (Pedrozo, J. 2001). Las asignaciones de los diferentes desplazamientos del espectro de  $\text{RMN } ^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  se incluyen en la tabla 7.



**Figura 14.** Estructura del **Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico** y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.

**Tabla 7.** Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de  $\text{RMN } ^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  del **Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico**.

TABLA N°7. Datos de $\text{RMN } ^1\text{H}$ y $\text{RMN}^{13}\text{C}$				
N° Carbono	$\delta\text{c(ppm)}$	Tipo de carbono	Correl. $^1J_{\text{CH}}$	Correl. $^3J_{\text{CH}}$
1	32.2	$\text{CH}_2$	Ha:1.51 ; Hb:1.76	1.1 -1.03-1.68
2	18.8	$\text{CH}_2$	Ha:1.4 ; Hb:1.9	-----

3	37.55	CH <sub>2</sub>	Ha:2.12 ; Hb:1.03	1.76-1.68
4	44.28	C	-	1.9-1.87
5	49.47	CH	H:1.68	1.54-1.22
6	20.9	CH <sub>2</sub>	H: 1.87	-----
7	29.7	CH <sub>2</sub>	Ha:1.7 ; Hb:1.5	4.53-1.68
8	52.7	C	-	1.95-2.68
9	76.57	C	-	1.72-1.12
10	43.41	C	-	1.9-1.95
11	28.01	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.15 ; Hb: 1.9	2.68
12	31.99	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.5; Hb:1,7	1.55
13	40.99	CH	H: 2.68	1.95-5.06
14	36.4	CH <sub>2</sub>	Ha:1.55 ; Hb:2.12	1.49-4.53
15	76.97	CH	H: 4.53	5.06-2.68
16	159.2	C(sp <sub>2</sub> )	-	1.49-1.55
17	107.4	CH <sub>2</sub> (sp <sub>2</sub> )	Ha: 5.08; Hb:5.17	2.68-4.53
18	28.25	CH <sub>3</sub>	H:1.21	2.14-1.68
19	180.67	C(sp <sub>2</sub> )	-	1.68-1.22
20	16.87	CH <sub>3</sub>	H: 1.1	1.76

El sólido Av-04 dio positiva la prueba de antrona/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se identificó como el **β-D-glucopyranosil éster del Ácido (-)9, 15-dihidroxi-16-en-19-oico**. En el espectro de RMN<sup>1</sup>H del glicósido mostro 26 señales, 6 de las cuales aparecieron en la región entre 62 y 99 ppm, señales características de los carbonos de un azúcar; además, las 20 señales restantes indicaron que la aglicona correspondía a un diterpeno de tipo kaurendiol similar al compuesto Av-03. En el espectro de RNM <sup>1</sup>H aparecieron señales a δ 5.43 para el H anomérico y δ 94.18 para el carbono anomérico que indicaron la presencia de un glicósido. Los espectros HMBC permitieron observar correlaciones importantes: δ 5.43 correspondiente al H anomérico con los desplazamientos de carbonos δ 177.35 (C19). La señal a 72 ppm en el RMN<sup>13</sup>C permitió suponer la presencia de un -CHOH, que por las correlaciones observadas en el espectro HMBC, se supone esta correlacionando con el δ 5.43 correspondiente al H anomérico. Lo que permite concluir que el azúcar está unido al carbono N°19. Las propiedades físicas determinadas son las siguientes Pf =218-220 °C y [α]<sub>D</sub>20 (-100), (0.005g/mL;CH<sub>3</sub>OH) (Pedrozo, J. 2001). Las asignaciones de los diferentes desplazamientos del espectro de RMN <sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C se incluyen en la tabla 8.

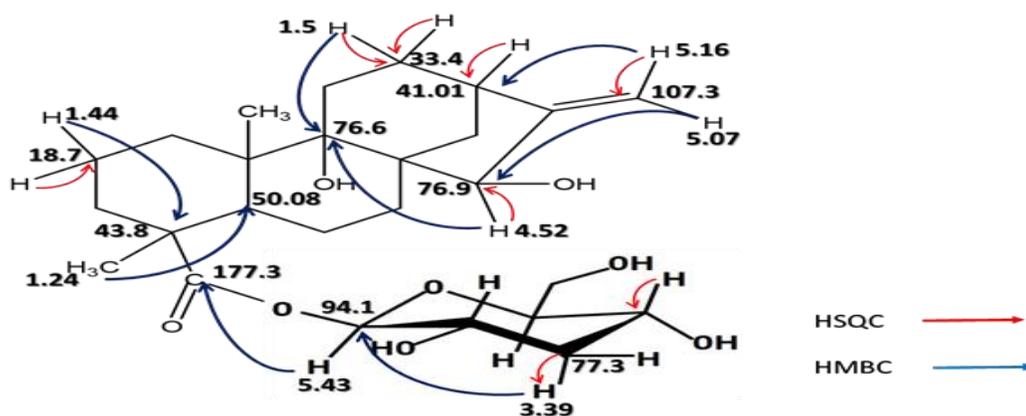


Figura 15. Estructura del  $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido (-)9, 15-dihidroikaur-16-en-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.

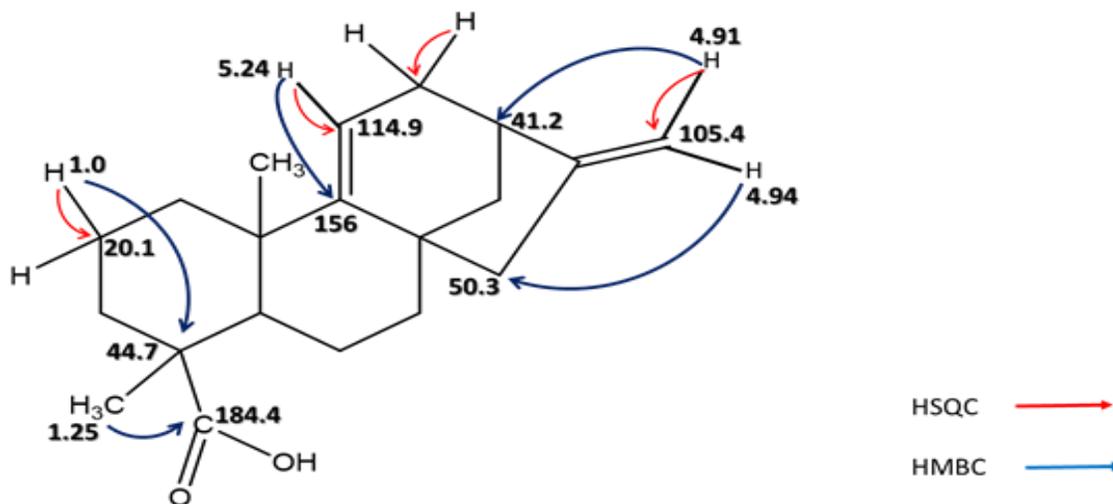
Tabla 8. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN  $H^1$  y RMN  $^{13}C$  del  $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido (-)9, 15-dihidroikaur-16-en-19-oico.

TABLA N°8. Datos de RMN $^1H$ y RMN $^{13}C$				
N° Carbono	$\delta_c$ (ppm)	Tipo de carbono	Correl. $^1J_{CH}$	Correl. $^3J_{CH}$
1	31.90	CH <sub>2</sub>	Ha:1.5 ; Hb:1.7	0,9 6 -1,7-2,19
2	18.71	CH <sub>2</sub>	Ha:1.44 ; Hb:1.94	-----
3	37.43	CH <sub>2</sub>	Ha:2.18 ; Hb:1.06	2,02-1, 25-1,08
4	43.87	C	-	1,92-1,82
5	50.08	CH	H:1.68	1,25-1,57
6	20.72	CH <sub>2</sub>	H: 1.8	-----
7	29.76	CH <sub>2</sub>	H: 1.5	2,05-1,08
8	52.73	C	-	2,07-1.82
9	76.69	C	-	1,48-0,9
10	44.33	C	-	1,43-1,82
11	28.04	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.96 ; Hb: 1.14	1,07
12	33.47	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.5; Hb:1,71	1,07-1,92
13	41.01	CH	H: 2.66	4,74-1,43
14	36.32	CH <sub>2</sub>	Ha:1.47 ; Hb:2.19	1,48-2,05
15	76.94	CH	H:4.52	4,8-1,57
16	159.34	C(sp <sub>2</sub> )	-	1,48-1,92
17	107.35	CH <sub>2</sub> (sp <sub>2</sub> )	Ha: 5.16; Hb:5.07	2,05-1,48

18	27.27	CH <sub>3</sub>	H:1.24	2,19-1,08
19	177.35	C(sp <sub>2</sub> )	-	1,25- 2,19
20	16.9	CH <sub>3</sub>	H: 1.1	1,16-1,07
1'	94.18	CH	H: 5.43	3.39
2'	72	CH	H: 3.38	3.38
3'	77.3	CH <sub>2</sub>	H: 3.39	5.43
4'	69.7	CH	H: 3.38	3.82
5'	77.2	CH	H: 3.39	3.39
6'	61.0	CH <sub>2</sub>	H: 3.82	3.38

El sólido Gg-01 que se identificó como el ácido Ent- Kaur-9(11),16-dien-19-oico. Su espectro de masa mostró un ión molecular a  $m/z$ : 300, el cual corresponde a un ácido diterpenico tetracíclico doblemente insaturado con fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>. El punto de fusión de este sólido blanco fue de 160-161°C.

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H se observaron solo dos señales para grupos metilo ( $\delta$  1.0 y 1.25) ligados a carbonos cuaternarios; además, la presencia de la doble insaturación queda confirmada con el espectro de H<sup>1</sup>RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>CRMN <sup>13</sup>C  $\delta$  158ppm (C-16);  $\delta$  105(C-17)  $\delta$ H:4.96 ppm y  $\delta$ H:4.79;  $\delta$  156ppm (C-9) ;  $\delta$  114,9(C-11)  $\delta$ H:5.24 ppm. Los espectros de <sup>13</sup>CRMN mostraron 20 señales: 2 CH<sub>3</sub>-, 9-CH<sub>2</sub>-, 1=CH<sub>2</sub>, 2CH-, 5-C- y -COOH. Este análisis permitió concluir que el sólido Gg-01 corresponde al ácido Ent- Kaur-9(11),16-dien-19-oico (Téllez. A, 1990). Las asignaciones de los diferentes desplazamientos del espectro de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C se incluyen en la tabla 9.



**Figura 16. Estructura del Ácido Ent- Kaur-9(11), 16-en-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.**

**Tabla 9. Estructura del Ácido Ent- Kaur-9(11), 16-en-19-oico y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.**

TABLA N° 9. Datos de RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C				
Posición	δc(ppm)	Tipo de carbono	Correl. <sup>1</sup> J <sub>CH</sub>	Correl. <sup>3</sup> J <sub>CH</sub>
1	40.8	CH <sub>2</sub>	Ha:1.90 ; Hb:1.26	1.95-1.0
2	20.1	CH <sub>2</sub>	Ha:1.85 ; Hb:1.49	-----
3	38.2	CH <sub>2</sub>	Ha:1.95 ; Hb:1.43	1.26-1.25
4	44.7	C	-	1.85-2.55
5	46.6	CH	H:1.66	1.43-1.25
6	18.3	CH <sub>2</sub>	H: 2.55	-----
7	29.7	CH <sub>2</sub>	H: 1.99	1.66-2.43
8	42.3	C	-	2.55-5.24
9	156	C(sp <sub>2</sub> )	-	2.13-1.0
10	38.2	C	-	5.24-1.85
11	114.9	C(sp <sub>2</sub> )	H: 5.24	2.77
12	37.9	CH <sub>2</sub>	Ha: 2.43; Hb:2.13	1.59
13	41.2	CH	H: 2.77	4.91-2.62
14	45	CH <sub>2</sub>	Ha:1.59 ; Hb:1.48	2.43-2.13
15	50.3	CH	Ha:2.62 ; Hb:2.13	4.94-1.99
16	158.5	C(sp <sub>2</sub> )	-	2.43-1.48
17	105.45	CH <sub>2</sub> (sp <sub>2</sub> )	Ha: 4.91; Hb:4.94	2.77-2.62
18	28.2	CH <sub>3</sub>	H:1.25	1.95-1.66
19	184.4	C(sp <sub>2</sub> )	-	1.66-1.25
20	23.6	CH <sub>3</sub>	H: 1.0	1.9

### 5.1.3 Diterpeno tipo labdano.

Los labdanos son diterpenos (C<sub>20</sub>) bicíclicos que se presentan algunas veces como sólidos cristalinos y otras como sólidos blancos amorfos; dan positivo la prueba de salkowski, revelan de color rosa, rojo o violeta con vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La estructura general para estas sustancias se incluye en la figura (13)

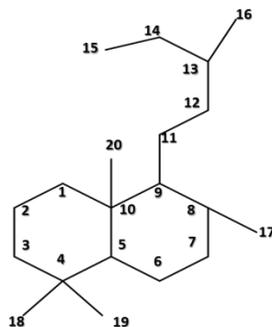


Figura 13. Estructura general numerada de los labdanos.

Entre los derivados tipo labdano se propone el sólido Ct-01 aislado de la fracción de acetato de etilo, obtenida del extracto en éter de petróleo de *Conyza trihecatactis* que se identificó como Ent-(13R)-labdan-14-eno-8,13 – diol. En el espectro de RMN<sup>1</sup>H se observaron cinco señales para grupos metilo ( $\delta$  0.79, 0.8, 0.87, 1.17, 1.29) ligados a carbonos cuaternarios; además, dos señales a  $\delta$  5.25 y 5.05 señales características de hidrógenos exometilénicos (=CH<sub>2</sub>). Los espectros de RMN<sup>13</sup>C mostraron 20 señales distribuidas en: 5 -CH<sub>3</sub>, 7-CH<sub>2</sub>-, 1=CH<sub>2</sub>, 3 -CH y 4-C.

Los espectros HSQC permitieron observar correlaciones importantes:  $\delta$  0.79, 0.87, 1.28 con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  15.15 (C20), 33.28 (C18), 20.3 (C6).

Los espectros HMBC permitieron observar correlaciones importantes:  $\delta$  0.87 (-CH<sub>3</sub>) con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  42.0 (C3), 33.3 (C4), 56.14 (C5);  $\delta$  1.29 (-CH<sub>3</sub>) con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  73.4(C13), 146.1(C14) y  $\delta$  5.25 y 5.05 (=CH<sub>2</sub>) con 73.7(C13) y 146.1(14). Los datos espectroscópicos y propiedades físicas como Pf = 104-105 °C y  $[\alpha]_D^{20}$  (+5°), (0.005g/mL;CHCl<sub>3</sub>) coincidieron con los reportados en la literatura para el Ent-(13R)-labdan-14-eno-8,13 – diol . (Torrenegra, R 1992). Las asignaciones de los diferentes desplazamientos del espectro de **RMN H<sup>1</sup>** y **RMN<sup>13</sup>C** se incluyen en la tabla 10.

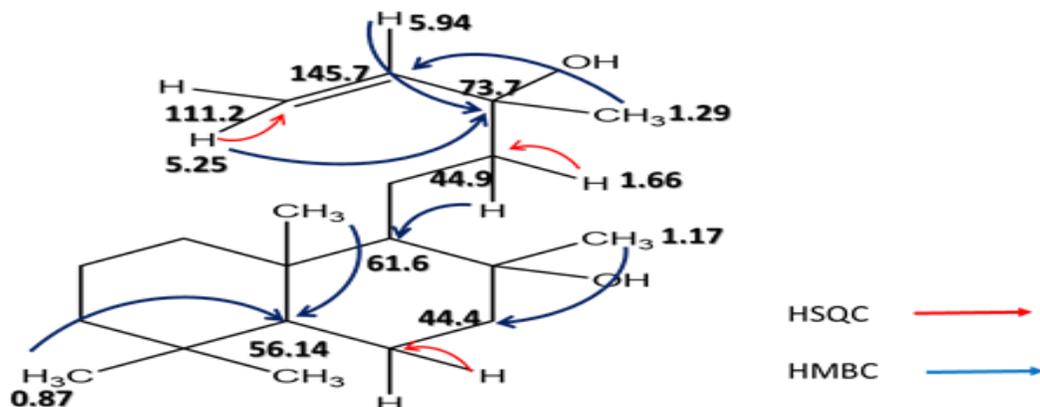


Figura 17. Estructura del Ent-(13R)-labdan-14-eno-8,13 – diol y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.

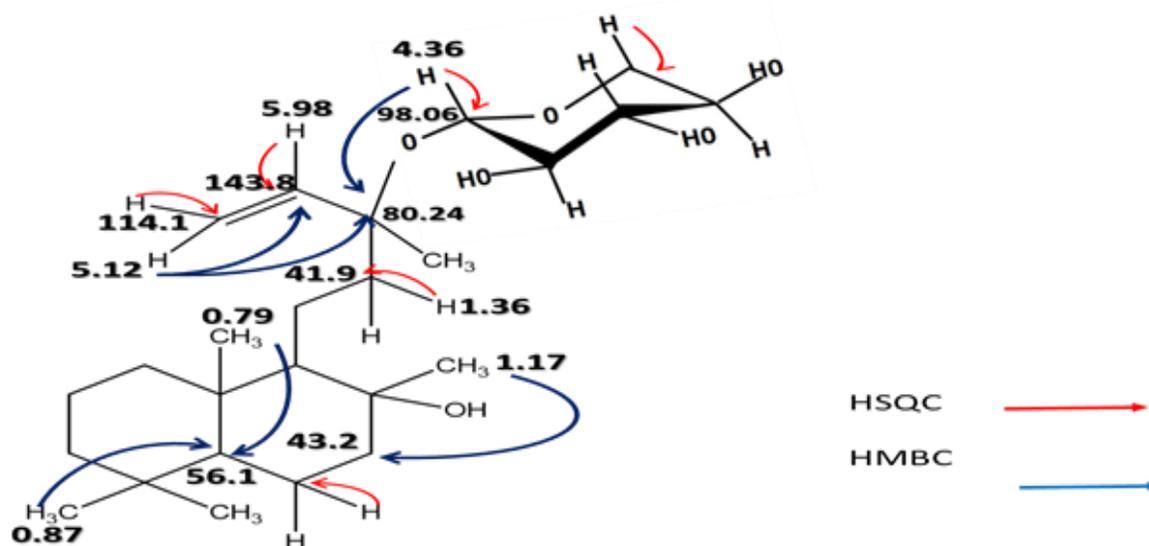
Tabla 10. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN  $H^1$  y RMN  $^{13}C$  del Ent-(13R)-labdan-14-eno-8,13 – diol.

TABLA N° 10. Datos de RMN $^1H$ y RMN $^{13}C$				
N° Carbono	$\delta_c$ (ppm)	Tipo de carbono	Correlación. $^1J_{CH}$	Correlación. $^3J_{CH}$
1	39.8	CH <sub>2</sub>	Ha:1.63 ; Hb:0.95	0,79 -1,38
2	18.5	CH <sub>2</sub>	Ha:1.43 ; Hb:1.6	-----
3	42.0	CH <sub>2</sub>	Ha:1.16 ; Hb:1.38	0,87-1,63
4	33.3	C	-	1,26-1,6
5	56.14	CH	H:0,91	1,85-0,8
6	20.51	CH <sub>2</sub>	H: 1,26	-----
7	44.4	CH <sub>2</sub>	H: 1,85	0,91-1,26
8	74.7	C	-	1,65-1,34
9	61.62	CH	H:1,14	1,66-0,79
10	39.3	C	-	1,43-1,34
11	19.2	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.5 ; Hb: 1.34	-----
12	44.93	CH <sub>2</sub>	H:1,66	1,14-5.94
13	73.7	C	-	5,25-1,34
14	145.7	CH	H:5.94	1,66-1,29
15	111.2	CH <sub>2</sub>	Ha: 5.25; Hb:5.05	-----
16	27.24	CH <sub>3</sub>	H:1,29	5,94-1,66
17	24.1	CH <sub>3</sub>	H:1,17	1,14-1,42
18	33.2	CH <sub>3</sub>	H:0,87	1,38-0,91
19	21.6	CH <sub>3</sub>	H:0,8	1,38-0,91
20	15.5	CH <sub>3</sub>	H: 0.79	1,14-1,63

El sólido Ct-02 que se identificó como **Ent-(13R)-8-hidroxilabdan-14-en-13-O-β-D-xilopiranos**, mostro 25 señales en el espectro de carbono, 5 de las cuales aparecieron en la región entre 62 y 99 ppm, características de los carbonos de un azúcar; además, las 20 señales restantes indicaron que la aglicona correspondía a un diterpeno de tipo labdano similar al compuesto Ct-01. En el espectro de RMN<sup>1</sup>H se observaron cinco señales para grupos metilo ( $\delta$  0.79, 0.78, 0.87, 1.17, 1.32) ligados a carbonos cuaternarios; además, dos señales a  $\delta$  5.12 y 5.05 señales características de un grupo exometilénico (=CH<sub>2</sub>). El espectros de RMN<sup>13</sup>C mostraron 20 señales: 5 CH<sub>3</sub>-, 7-CH<sub>2</sub>-, 1=CH<sub>2</sub>, 3 CH- y 4-C. En el espectro de RNM <sup>1</sup>H aparecieron señales a  $\delta$  4.36 para el H anomérico y  $\delta$  98.06 para el carbono anomérico que indicaron la presencia de un glicósido.

Los espectros HSQC permitieron observar correlaciones importantes:  $\delta$  0.78, 0.87, 1.23 con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  15.64 (C20), 33.38 (C18), 20.3 (C6).

Los espectros HMBC permitieron observar correlaciones entre los  $\delta$  4.36 correspondiente al H anomérico con el carbono  $\delta$  80.24 (C13), lo cual permite concluir que el azúcar se encuentra unida al carbono N° 13. Los datos espectroscópicos y propiedades físicas como Pf = 95-96 °C y  $[\alpha]_D^{20}$  (-17°) coincidieron con los reportados en la literatura para el **Ent-(13R)-8-hidroxilabdan-14-en-13-O-β-D-xilopiranos** (Torrenegra, R 1992). Las asignaciones de los diferentes desplazamientos del espectro de RMN H<sup>1</sup> y RMN<sup>13</sup>C se incluyen en la tabla 11.



**Figura 18. Estructura del Ent-(13R)-8-hidroxilabdan-14-en-13-O-β-D-xilopiranos y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.**

**Tabla 11. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN  $H^1$  y RMN $^{13}C$  del Ent-(13R)-8-hidroxiabdan-14-en-13-O- $\beta$ -D-xilopiranososa.**

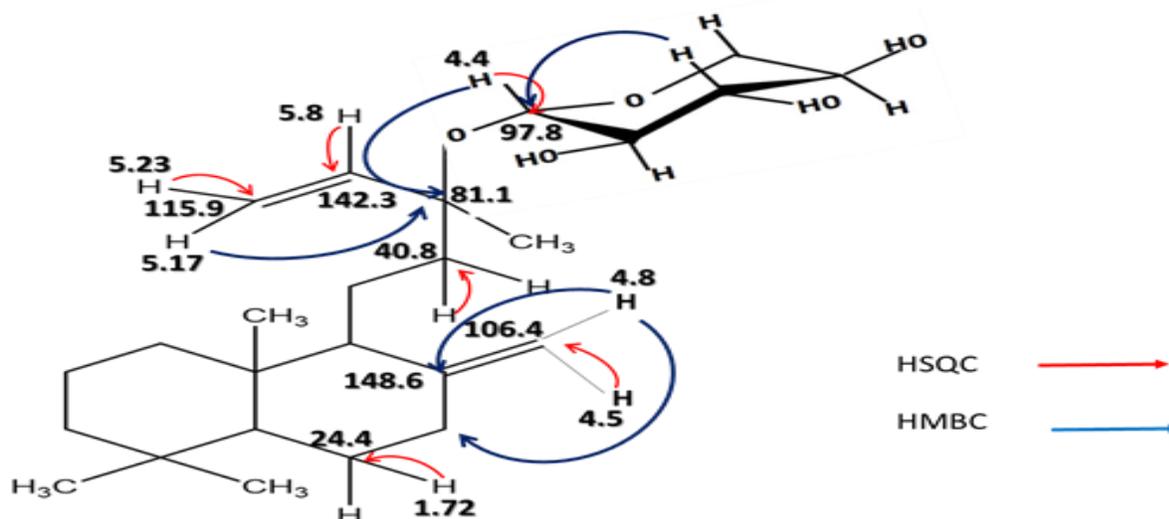
TABLA N° 11. Datos de RMN $^1H$ y RMN $^{13}C$				
N° Carbono	$\delta c(ppm)$	Tipo de carbono	Correlación. $^1J_{CH}$	Correlación. $^3J_{CH}$
1	39.77	CH <sub>2</sub>	Ha:1.5 ; Hb:0.93	1,8-0,78
2	18.12	CH <sub>2</sub>	Ha:1.27 ; Hb:1.6	-----
3	41.78	CH <sub>2</sub>	Ha:1.3; Hb:1.8	1,5-0,87
4	33.29	C	-	1,27-1,64
5	56.11	CH	H:0,94	1,8-1,4
6	20.30	CH <sub>2</sub>	H: 1,64	-----
7	43.22	CH <sub>2</sub>	H: 1,81	0,94-1,17
8	75.03	C	-	1,62-1,23
9	62.19	CH	H:1,08	0,78-0,93
10	39.07	C	-	1,62-1,27
11	18.84	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.4 ; Hb: 1.62	-----
12	41.99	CH <sub>2</sub>	H:1,36	1,08-5,98
13	80.24	C	-	5,12-1,62
14	143.86	CH	H:5.98	1,14-1,32
15	114.12	CH <sub>2</sub>	H: 5.12	-----
16	23.77	CH <sub>3</sub>	H:1,32	1,36-5,98
17	24.23	CH <sub>3</sub>	H:1,17	1,08-1,81
18	33.38	CH <sub>3</sub>	H:0,87	1,8-0,94
19	21.45	CH <sub>3</sub>	H:0,79	1,8-0,94
20	15.64	CH <sub>3</sub>	H: 0.79	1,08-1,5
1'	98.06	CH	H: 4,36	3,41-3,86
2'	73.25	CH	H: 3.34	3,61
3'	76.74	CH	H: 3.41	4,36-3,86
4'	69.7	CH	H: 3.61	3,34
5'	64.7	CH <sub>2</sub>	Ha: 3.86 ; Hb: 3.14	3,41-4,36

El sólido Ct-03 que se identificó como **Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O- $\beta$ -D-xilopiranososa**. En RMN $^{13}C$  del glicósido mostro 25 señales, 5 de las cuales aparecieron en la región entre 62 y 99 ppm, señales características de los carbonos de un azúcar; además, las 20 señales restantes indicaron que la aglicona correspondía a un diterpeno de tipo labdano En el

espectro de RMN<sup>1</sup>H se observaron cuatro señales para grupos metilo ( $\delta$  0.66, 0.79, 0.87, 1.35) ligados a carbonos cuaternarios; además, cuatro señales a  $\delta$  5.25, 5.05, 4.50 y 4.80 señales características de grupos exometilénicos (=CH<sub>2</sub>). El espectros de RMN<sup>13</sup>C mostró 20 señales: 4 CH<sub>3</sub>-, 7-CH<sub>2</sub>-, 2=CH<sub>2</sub>, 3 CH- y 4-C.

Los espectros HSQC permitieron observar correlaciones importantes:  $\delta$  0.66, 0.87, 1.35 con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  14.48 (C20), 33.62 (C18), 22.50 (C16) respectivamente.

Los espectros HMBC permitieron observar correlaciones importantes:  $\delta$  0.87 (-CH<sub>3</sub>) con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  42.18 (C3), 33.56 (C4), 55.5 (C5);  $\delta$  1.29 (-CH<sub>3</sub>) con los desplazamientos de carbonos  $\delta$  81.14 (C13), 142.32 (C14) y  $\delta$  5.23 y 5.17 (=CH<sub>2</sub>) con 81.14 (C13) y 142.32 (14) además los desplazamientos del otro grupo exometilénico con sus respectivas correlaciones:  $\delta$  4.5 y 4.8 (=CH<sub>2</sub>) con 148.67 (C8) y 57.40 (C9). Los espectros HMBC permitieron observar correlaciones entre los  $\delta$  4.40 correspondiente al H anomérico con el carbono  $\delta$  81.14 (C13), lo cual permite concluir que el azúcar se encuentra unida al carbono N° 13. Los datos espectroscópicos y propiedades físicas como Pf = 96-97 °C y  $[\alpha]_D^{20}$  (-37°) coincidieron con los reportados en la literatura para el **Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O- $\beta$ -D-xilopiranososa** (Torrenegra, R, 1991). Las asignaciones de los diferentes desplazamientos del espectro de RMN H<sup>1</sup> y RMN<sup>13</sup>C se incluyen en la tabla 12.



**Figura 19. Estructura del Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O- $\beta$ -D-xilopiranososa. y algunas de las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC.**

**Tabla 12. Asignaciones a los diferentes desplazamientos observados en el espectro de RMN  $H^1$  y RMN $^{13}C$  del Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos.**

TABLA N°12. Datos de RMN $^1H$ y RMN $^{13}C$				
N° Carbono	$\delta c(ppm)$	Tipo de carbono	Correlación. $^1J_{CH}$	Correlación. $^3J_{CH}$
1	38,99	CH <sub>2</sub>	Ha:1.75 ; Hb:1.84	1.17-0.66-1.08
2	19.40	CH <sub>2</sub>	Ha:1.27 ; Hb:1.49	-----
3	42.18	CH <sub>2</sub>	Ha:1.37; Hb:1.17	0.87-0.79
4	33.56	C	-	1.49-1.72
5	55.5	CH	H:1.08	1.17-2.39
6	24.41	CH <sub>2</sub>	H: 1.72	-----
7	38.34	CH <sub>2</sub>	H: 2.39	4.80-1.08
8	148.67	C	-	1.72-1.31
9	57.40	CH	H:1.51	1.75-1.32
10	39.84	C	-	1.31-1.49
11	17.70	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.31 ; Hb: 1.53	-----
12	40.83	CH <sub>2</sub>	Ha: 1.32 ; Hb: 1.78	1.51
13	81.14	C	-	5.23-4.40
14	142.32	CH	H:5.80	1.35-1.78
15	115.99	CH <sub>2</sub>	Ha: 5.23 ; Hb: 5.17	-----
16	22.50	CH <sub>3</sub>	H:1,35	5.80-1.78
17	106.46	CH <sub>2</sub>	Ha: 4.50 ; Hb: 4.80	2.39
18	33.62	CH <sub>3</sub>	H:0,87	1.17-1.08
19	21.72	CH <sub>3</sub>	H:0,79	1.37-1.08
20	14.48	CH <sub>3</sub>	H: 0.66	1.75-1.51
1'	97.89	CH	H: 4,40	3.49
2'	72.93	CH	H: 3.34	3.65
3'	75.5	CH	H: 3.49	3.21
4'	69.7	CH	H: 3.65	3.34
5'	64.62	CH <sub>2</sub>	Ha: 3.92 ; Hb: 3.21	4.40-3.49

## 5.2 Resultados Actividad Antiinflamatoria.

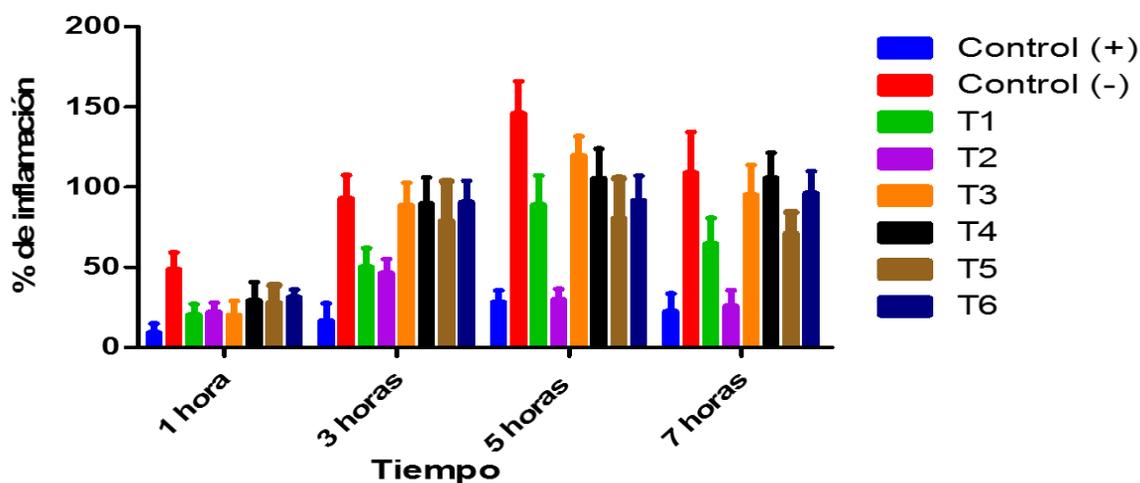
TRATAMIENTO	Medición		1 hora		3 horas		5 horas		7 horas	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Medición	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Control(+) Diclofenaco	1,21	1,23	1,22	1,24	1,18	1,19	1,43	1,47	1,24	1,22
	0,9	1,21	1,3	1,44	1,32	1,27	1,45	1,53	1,84	1,75
	1,21	1,17	1,26	1,3	1,1	1,02	1,21	1,29	1,1	1,3
	1,29	1,34	1,2	1,13	1,34	1,47	1,86	1,4	1,45	1,44
	1,01	0,83	1,03	1,06	1,47	1,54	1,48	1,38	1,27	1,27
Control(-) Solución salina	1,11	1,11	1,25	1,3	1,39	1,31	1,43	1,36	1,33	1,24
	0,96	1,06	1,5	1,56	1,74	1,91	2,53	2,65	1,6	1,68
	1,1	1,07	1,53	1,53	1,67	1,42	2,22	2,21	1,61	1,58
	1,19	1,09	1,42	1,3	2,05	1,97	2,05	1,98	1,7	1,74
	0,77	0,78	1,53	1,52	1,93	1,89	2,23	2,37	2,4	1,99
	1,03	1,09	1,4	1,53	2,06	2,34	3,49	3,02	2,6	2,71
Extracto En Etanol de Ageratina v. (T1)	0,94	0,93	1,37	1,35	2,01	1,91	2,19	2,38	2,21	2,78
	1,3	1,27	1,3	1,28	1,54	1,65	1,49	1,53	1,46	1,42
	1,16	1,18	1,26	1,39	1,7	1,82	2,14	2,21	1,97	1,92
	1,15	0,95	1,58	1,44	1,78	1,65	2,46	2,18	1,65	1,53
	1,09	1,08	1,3	1,26	1,35	1,3	2,12	2,15	1,56	1,62
	1	1	1,33	1,37	1,92	2,07	2,5	2,41	2,22	2,34
Fracción de Acetato de Etilo de <i>Conyza t.</i> (T2)	1,02	1,1	1,22	1,17	1,37	1,63	1,77	1,79	2,02	1,88
	1	1	1,26	1,1	1,3	1,25	1,21	1,12	1,28	1,18
	1,13	1,09	1,27	1,35	1,57	1,54	1,45	1,43	1,16	1,14
	1,01	1,09	1,05	1,09	1,44	1,44	1,39	1,27	1,31	1,29
	1,02	1,16	1,42	1,21	1,74	1,72	1,36	1,24	1,19	1,21
	0,45	0,92	1	0,96	1,26	1,24	1,07	1,13	1,16	1,2
Ácido (-)9, 15-dihidroxi-16-en-19- oico (T3)	0,85	1	1,2	1,24	1,23	1,25	1,23	1,12	1,12	1,15
	1,21	1,2	1,63	1,6	2,85	2,74	2,87	3,07	2,48	2,54
	1,36	1,95	1,8	1,6	2,26	2,23	3,31	2,9	2,78	2,18
	1,09	1,25	1,24	1,11	2,07	2,08	2,28	2,03	1,84	1,75
	1,05	1,51	1,44	1,53	2,36	2,32	2,75	3,07	2,3	2,18
	1,11	1,03	1,74	1,62	2,32	2,31	2,7	2,75	2,88	2,91
Ent-(13R)-labdan-14-eno-8,13 – diol (T4)	1,03	1,04	1,16	1,14	1,94	1,99	2,28	2,24	2,34	2,09
	1,34	1,37	1,61	1,49	1,76	1,76	1,83	1,91	2,12	2,01
	0,97	1,14	1,43	1,43	2,01	1,78	2,05	2,1	2,05	1,94
	1,04	1,08	1,03	1,07	2,07	2,11	2,09	2,1	2,03	2,13
	0,78	0,73	1,37	1,34	1,83	1,78	1,94	2,06	1,91	2,04
	1,2	1,1	1,41	1,28	1,9	1,97	2,2	2,19	2,18	2,35
mezcla labdanos glicosilados: Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O- β-D-xilopiranos y Ent-(13R)-8- hidroxilabdan-14-en-13-O-β-D- xilopiranos. (T5)	1,04	1,01	1,54	1,14	2,34	2,27	2,57	2,47	2,4	2,48
	1,05	1,06	1,11	1,09	1,7	1,88	2,16	2,29	1,82	1,85
	1,02	0,99	1,67	1,61	2,66	2,63	2,61	2,45	2,19	2,13
	0,95	0,91	0,94	0,97	1,47	1,49	1,15	1,3	1,13	1,33
	1,12	1,07	1,27	1,97	1,59	1,35	1,44	1,53	1,67	1,65
	1,03	0,95	1,37	1,41	2,33	2,39	2,34	2,4	1,99	1,99
β-D-glucopyranosil éster del Ácido(-)- 17-(β-xilopiranos)-19-oico (T6)	1,0	1,04	1,11	1,15	1,13	1,14	1,18	1,17	1,58	1,57
	1,06	0,9	1,4	1,41	1,97	1,73	2,28	2,15	2,39	2,2
	0,93	1,03	1,41	1,24	1,21	1,29	1,21	1,16	1,37	1,35
	1,11	1,17	1,49	1,37	2,28	2,33	2,3	2,37	2,17	2,86
	1,12	1,06	1,34	1,3	2,24	2,31	2,16	2,17	2,18	1,98
	1,16	1,3	1,52	1,4	2,55	2,49	2,19	2,35	2,25	2,33
	0,87	0,88	1,24	1,3	1,88	1,84	1,84	1,94	1,77	1,86

Tabla 13. Medición del delta de desplazamiento o volumen real desplazado por pata en los diferentes tratamientos.

En la **tabla 14** se muestran los promedios de los porcentajes de inhibición de la inflamación en 6 grupos tratados en los tiempos: 1, 3, 5 y 7 horas de experimentación. La fracción de Acetato de etilo presento el menor porcentaje de inflamación a la quinta (29,96%) y séptima (25,91%) hora después de comenzar el estudio, mostrando en estos tiempos diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo, \*\*\*\*  $p < 0,0001$  y \*\*  $p < 0,01$  respectivamente.

Tiempo (Horas)	Tratamientos						
	Control (+)%	T1 %	T2%	T3%	T4%	T5%	T6%
1	9,21	20,53	22,25	20,22	29,36	28,21	31,49
3	16,83	50,17	46,66	89,00	89,82	79,32	90,78
5	28,37****	89,09	29,96****	119,77	105,66	80,76	91,82
7	22,58**	64,71	25,91**	95,19	105,72	71,36	96,33

**Tabla 14.** Actividad antiinflamatoria de los tratamientos, expresada como porcentaje de inflamación.



**Figura 20.** Capacidad inhibitoria, expresada como porcentaje de inflamación de compuestos y fracciones obtenidos a partir de *Conyza trihecatactis* y *Ageratina vaccinieafolia*.

El efecto antiinflamatorio neto, calculado como el área bajo la curva de porcentaje de inflamación vs. Tiempo, es de 212 para el grupo tratado con la fracción de Acetato de etilo de *Conyza trihecatactis* y de 126 para el grupo tratado con diclofenaco (grupo control positivo). Figura 21

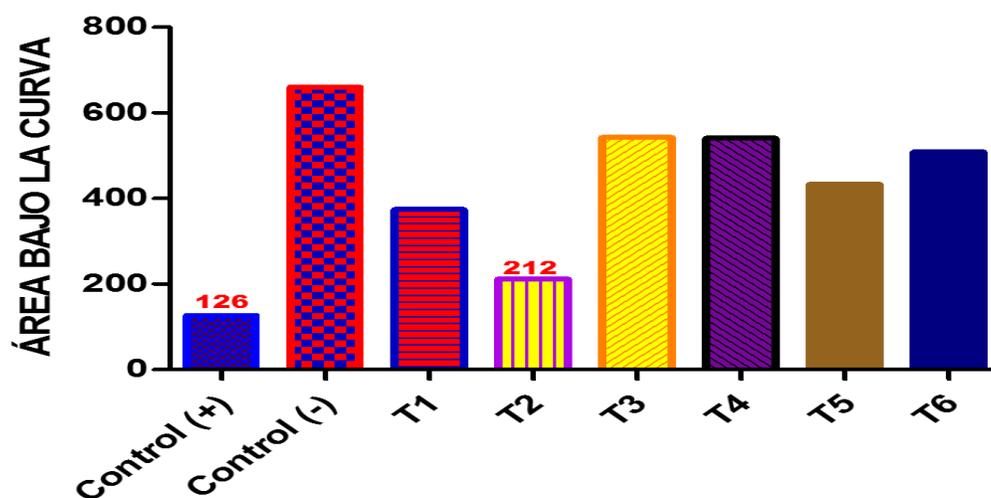
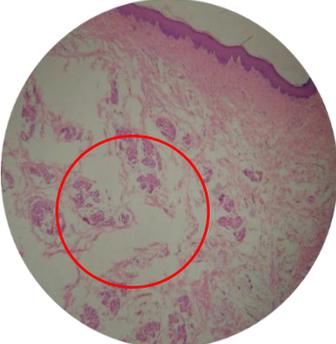
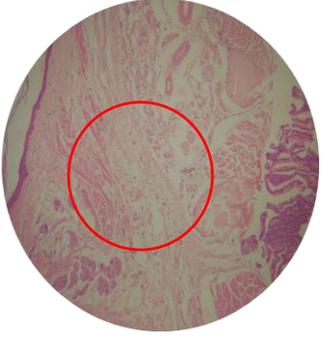
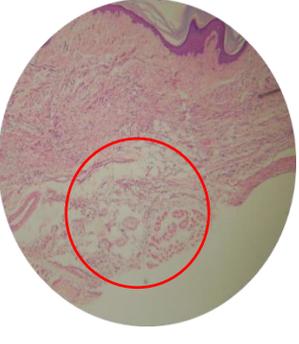
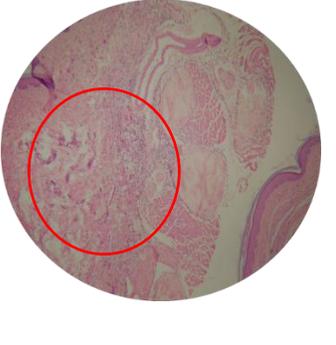
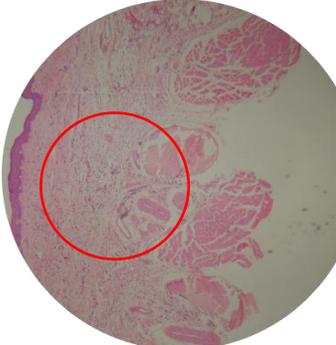
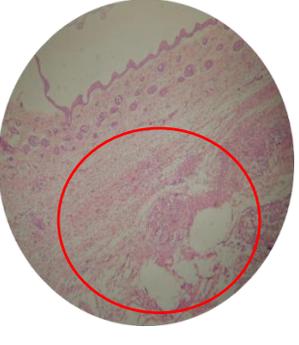
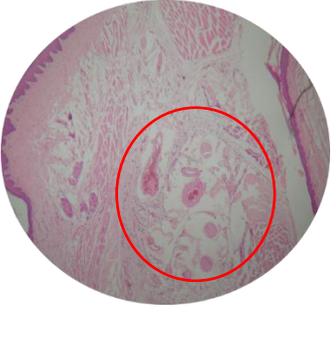
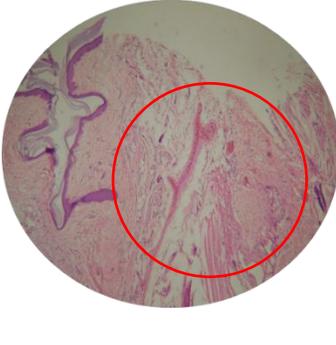
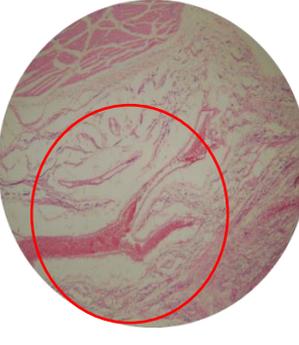


Figura 21. Efecto neto antiinflamatorio de compuestos y fracciones obtenidos a partir de *Conyza trihecatactis* y *Ageratina vacciniaefolia*. Calculado como el área bajo la curva.

### 5.3 Estudio Histopatológico

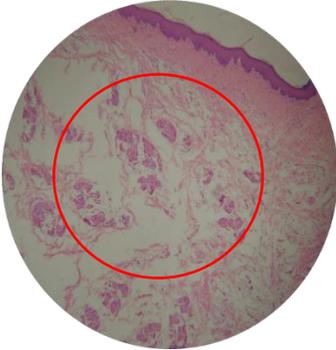
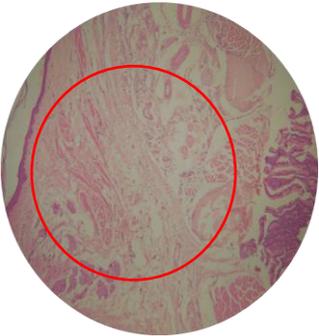
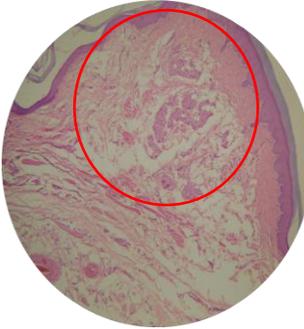
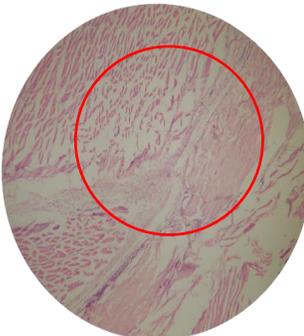
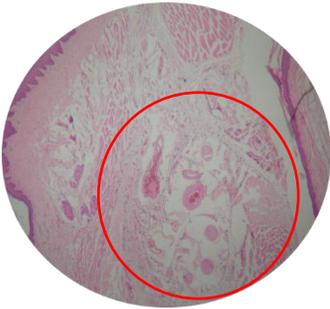
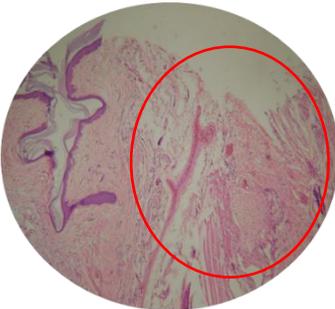
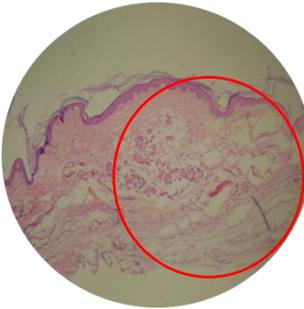
A nivel histológico, se evaluaron los siguientes parámetros asociados a la inflamación: Edema (hinchazón del tejido), congestión vascular (vaso dilatación) e infiltrado inflamatorio (Tipo de células inflamatorias presentes en los tejidos). El estudio se realizó en la Fundación Juan N. Corpas.

Tratamiento 1 (Extracto Etanólico de *Ageratina vacciniaefolia*)

EDEMA	Control (-) 	Control (+) 	T1 
INFILTRADO	Control (-) 	Control (+) 	T1 
CONGESTIÓN VASCULAR	Control (-) 	Control (+) 	T1 

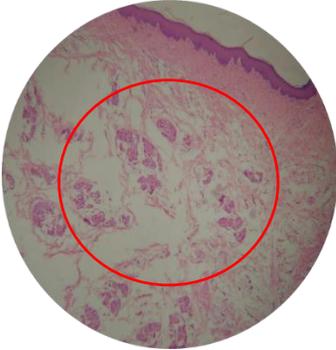
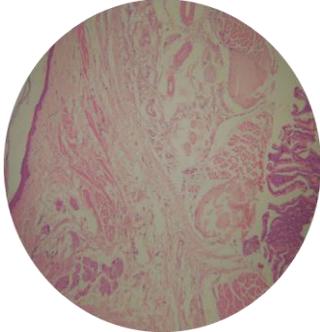
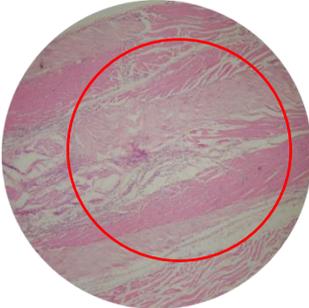
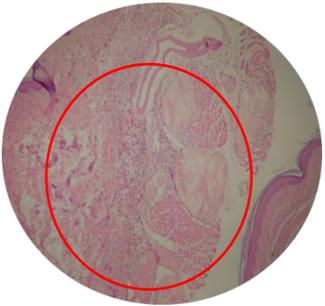
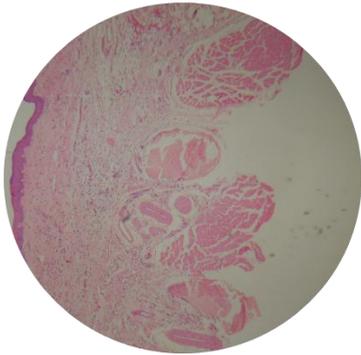
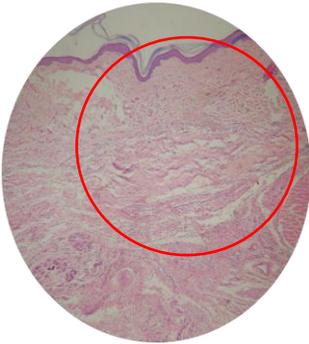
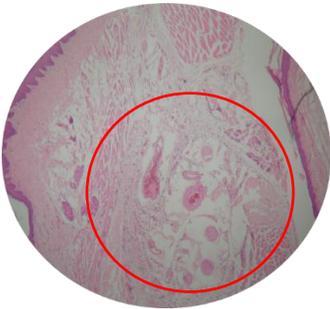
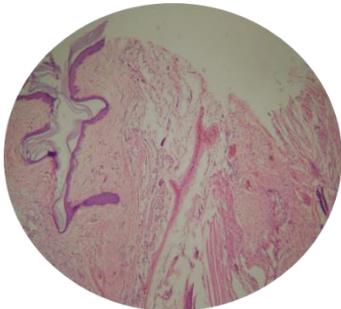
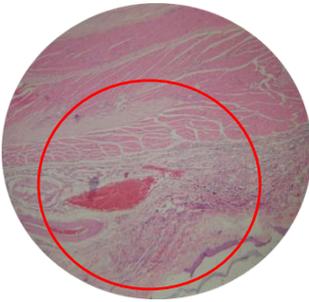
**Tabla 15. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 1.**

Tratamiento 2 (Fracción de Acetato de etilo obtenida a partir del extracto en éter de petróleo de *Conyza trihecatactis*).

EDEMA	Control (-) 	Control (+) 	T2 
INFILTRADO	Control (-) 	Control (+) 	T2 
CONGESTIÓN VASCULAR	Control (-) 	Control (+) 	T2 

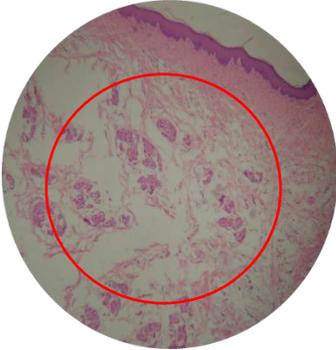
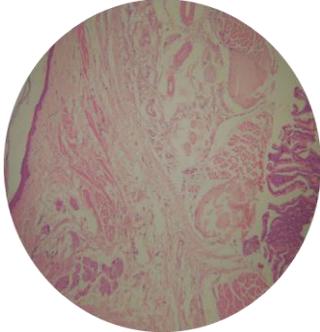
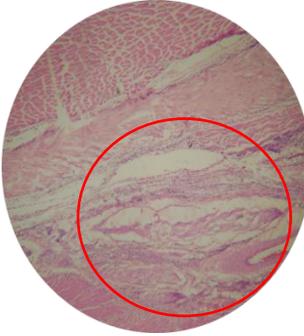
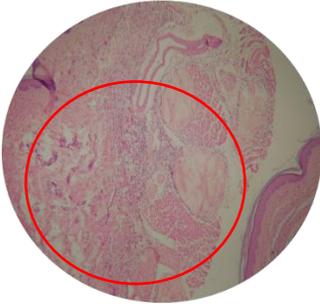
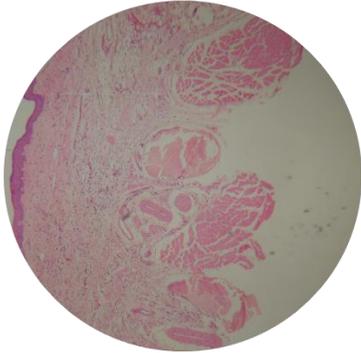
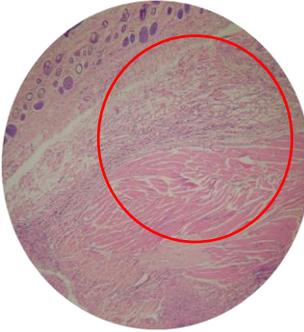
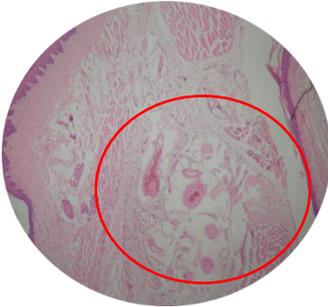
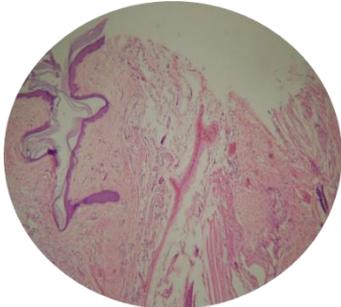
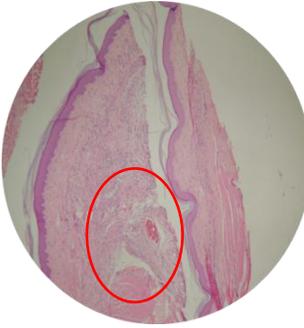
**Tabla 16. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 2.**

Tratamiento 3 (Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico)

EDEMA	Control (-) 	Control (+) 	T3 
INFILTRADO	Control (-) 	Control (+) 	T3 
CONGESTIÓN VASCULAR	Control (-) 	Control (+) 	T3 

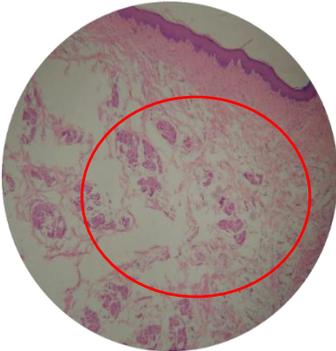
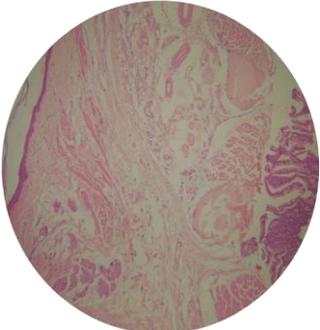
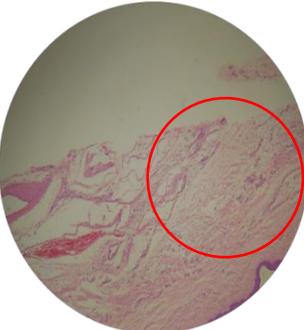
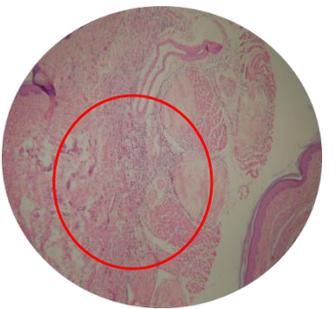
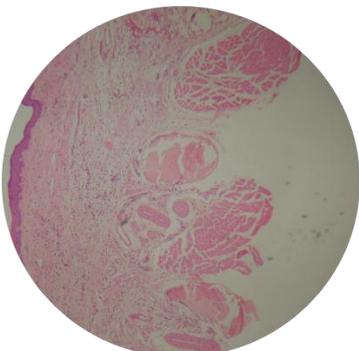
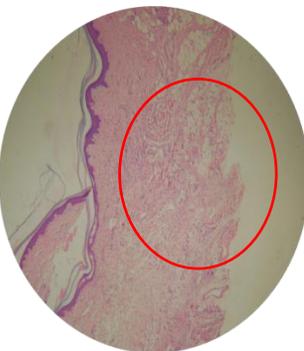
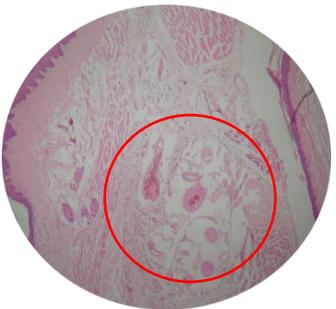
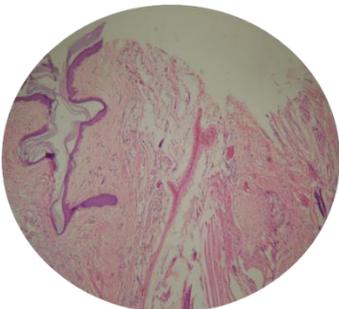
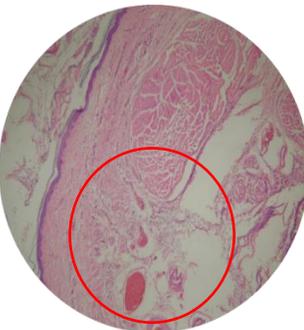
**Tabla 17. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 3.**

Tratamiento 4 (Ent-(13R)-labdan-14-eno-8,13 – diol)

EDEMA	Control (-) 	Control (+) 	T4 
INFILTRADO	Control (-) 	Control (+) 	T4 
CONGESTIÓN VASCULAR	Control (-) 	Control (+) 	T4 

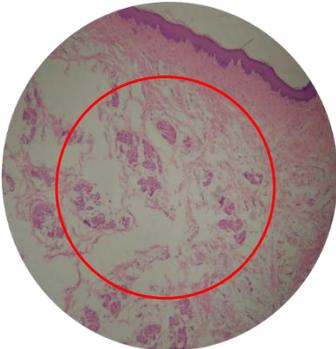
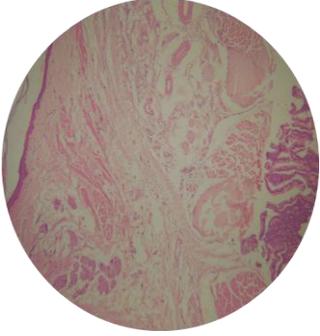
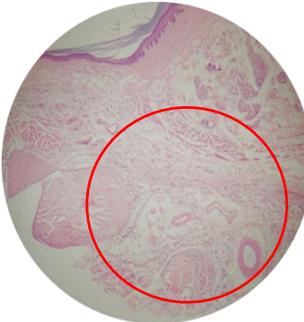
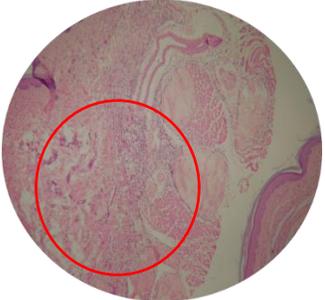
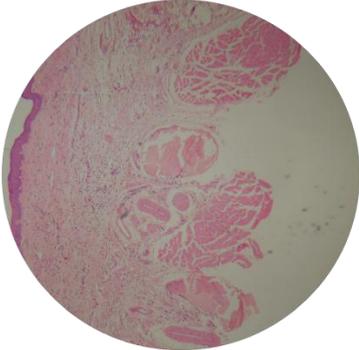
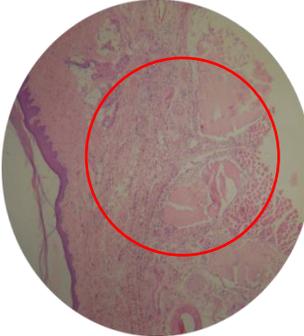
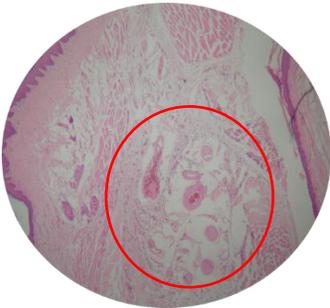
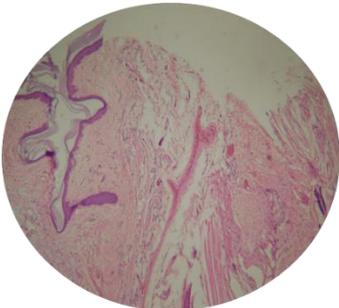
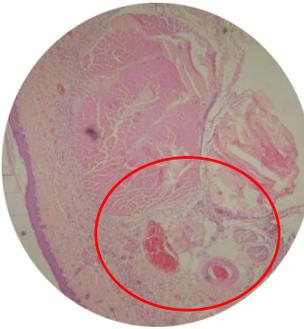
**Tabla 18. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 4.**

Tratamiento T5 (mezcla en proporción 1:1 labdanos glicosilados: Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos y Ent-(13R)-8-hidroxilabdan-14-en-13-O- $\beta$ -D-xilopiranososa).

EDEMA	Control (-) 	Control (+) 	T5 
INFILTRADO	Control (-) 	Control (+) 	T5 
CONGESTIÓN VASCULAR	Control (-) 	Control (+) 	T5 

**Tabla 19. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 5.**

Tratamiento 6 ( $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-( $\beta$ -xilopiranos)-19-oico)

EDEMA	Control (-) 	Control (+) 	T6 
INFILTRADO	Control (-) 	Control (+) 	T6 
CONGESTIÓN VASCULAR	Control (-) 	Control (+) 	T6 

**Tabla 20. Comparación histopatológica de los tejidos de la pata de rata del control negativo, control positivo y el tratamiento 6.**

### 5.3.1 Análisis Estudio Histopatológico.

Lo primero que se observó en los tratamientos 1, 3, 4, 5 y 6 es una vasodilatación progresiva que afecta arteriolas, capilares y vénulas. Esta vasodilatación se acompaña de aumento de la presión hidrostática, que combinada con el aumento de permeabilidad vascular, impulsa los líquidos y proteínas hacia el exterior de los vasos sanguíneos (Edema) este mismo fenómeno se observó en el control negativo; a diferencia de lo observado en el control positivo en donde el tejido presenta una composición similar al tejido sano. Por otro lado se observó la migración de leucocitos polimorfonucleares, debido en parte a la inversión en el flujo circulatorio. Algunos se ponen en contacto con las células endoteliales y se desplazan un poco rodando sobre su superficie hasta que quedan adheridos a la superficie endotelial (Infiltración). Este comportamiento no se observó en el control positivo. Finalmente los eritrocitos que se encuentran en los vasos sanguíneos de pequeño calibre se aglutinan. La reducción del líquido intravascular aumenta en forma desproporcionada la viscosidad de la sangre provoca estasis y finalmente trombosis (congestión vascular). El anterior proceso no se observó en el control positivo.

En el tratamiento 2 que corresponde a la fracción de Acetato de etilo obtenida a partir del extracto en éter de petróleo de *Conyza trihecatactis*, se observó una baja vasodilatación que afecta las arteriolas, capilares y vénulas. Esta vasodilatación no presentó aumento de la presión hidrostática, que combinada con el aumento de permeabilidad vascular, impulsa los líquidos y proteínas hacia el exterior de los vasos sanguíneos (Edema) este mismo fenómeno se observó en el control positivo; a diferencia de lo observado en el control negativo en donde el tejido presenta un aumento de la presión hidrostática, aumento de la permeabilidad y expulsión de líquidos hacia el exterior de los vasos sanguíneos. Por otro lado se observó una baja migración de leucocitos polimorfonucleares, debido en parte a la inversión en el flujo circulatorio. Una baja población de leucocitos polimorfonucleares se ponen en contacto con las células endoteliales y se desplazan un poco rodando sobre su superficie hasta que quedan adheridos a la superficie endotelial (Infiltración). Este comportamiento fue observado en el control negativo. Finalmente los eritrocitos que se encuentran en los vasos sanguíneos de pequeño calibre no se aglutinaron. Por otro lado no se observó reducción del líquido intravascular y la viscosidad de la sangre es normal, no se evidencia estasis, ni la formación de trombos (congestión vascular).

## 5.4 Resultados Actividad Citotóxica.

Pozo	Tratamiento	CELULAS VIABLES. (cells/mL)	CELULAS MUERTAS (Cells/mL)	% Células muertas	Promedio	Valor de P
A01	Unstain	0	1453,88			
A02	Control	111546	3685,12	3,198025	3,236369	
A03	Control	95332	3782,4	3,816169		
A04	Control	109980	3045,95	2,694912		
A05	1 microgramo/mL	90349	3803,15	4,039366	3,996723	0,141838
A06	1 microgramo/mL	68111	3154,4	4,426228		
A07	1 microgramo/mL	101953	3724,69	3,524576		
A08	5 microgramo/mL	87929	4533,21	4,902771	4,501852	0,032647
A09	5 microgramo/mL	77152	3320,15	4,125791		
A10	5 microgramo/mL	82577	3870,26	4,476993		
A11	10 microgramo/mL	34633	15023,4	30,25465	46,854	0,007913
A12	10 microgramo/mL	17577	17445,2	49,81126		
B01	10 microgramo/mL	11139	17058,2	60,49608		

Tabla 21. Medición del número de células (OCI-AML3) por Citometría de Flujo a diferentes concentraciones (1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL) y los valores de  $t$  calculados.

### 5.4.1 Análisis estadístico.

El análisis estadístico entre los valores de control y ensayos fueron interpretados mediante la prueba  $t$  (student), con un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ). Los valores de  $t$  calculados mostraron ser inferiores a los valores de  $t$  de la tabla. La concentración de 10mgµ/mL de la fracción de Acetato de etilo presentó diferencias significativas con un valor de  $t$  (0,007) entre los tratamientos y el control, el efecto citotóxico de la fracción de Acetato de etilo de *Conyza trihecatactis* fue producto de las concentraciones que fueron probadas y no causadas por otros agentes. Lo anterior mostró que la fracción presenta una alta actividad citotóxica sobre las células OCI-AML3 (Leucemia aguda).

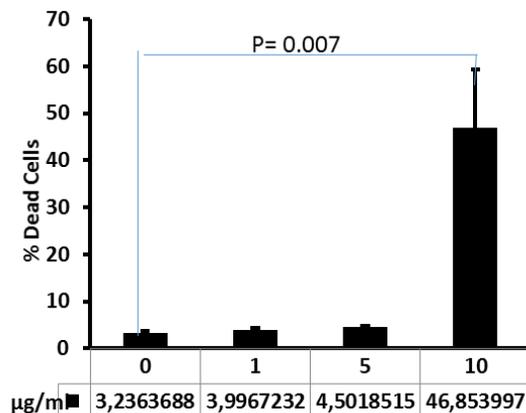
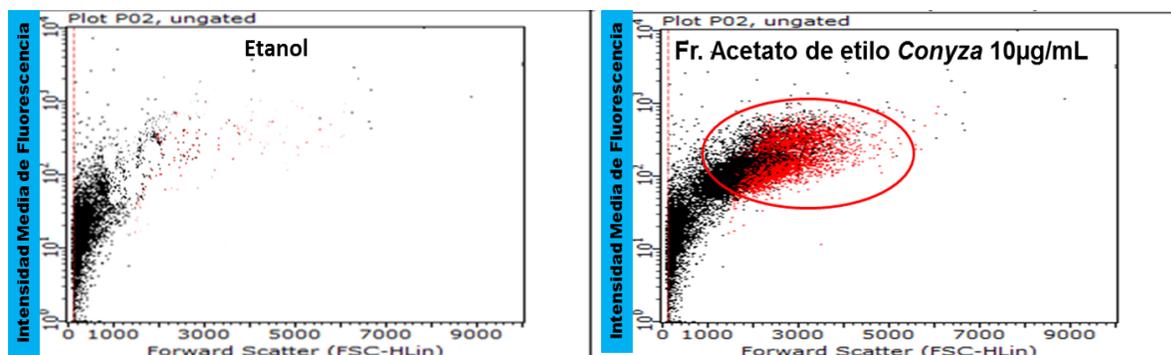


Figura 22. % de células OCL-AML3 muertas a diferentes concentraciones (1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL)

Escatergrama o dot plot. (Gráfico de Densidad (Density Plot))



(a) Grupo Control

(b) Grupo experimental

Figura 23. Escatergrama (a) grupo control células vivas y (b) grupo expuesto al tratamiento.

#### 5.4.2 Análisis Escatergrama.

En el Escatergrama se observó una disminución de células vivas (OCL-AML3) debido a la presencia del aumento de sedimentos señalado como  $R_1$ . Diferente a la densidad poblacional visualizada en el grupo control señalizada como  $R_0$ . Lo anterior nos permite concluir que la fracción de Acetato de etilo presenta un alto efecto citotóxico frente a las células OCL-AML3 (leucemia aguda).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tomando como referencia trabajos previos se eligieron como solventes de extracción y fraccionamiento el hexano, éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo, metanol y Etanol al 95%. Se utilizaron las partes aéreas de *Ageratina vacciniaefolia* y *Conyza trihecatactis* (Mezcla de hojas y tallos) para la actividad antiinflamatoria, y como modelos vivos se usaron ratas Wistar con un peso entre 140-170 Kg y una edad promedio entre 6 y 7 semanas. Gracias a la homogeneidad de las condiciones se establecieron las concentraciones o dosis de estudio. Partiendo entonces del principio de que “todas las sustancias son tóxicas, no hay alguna que no lo sea”, y la dosis exacta es lo que establece la diferencia entre un veneno y un fármaco curativo, se estableció como dosis mínima (70mg/Kg) y como dosis máxima (300mg/Kg)(CYTED, 1995).

Se piensa que la actividad antiinflamatoria presente en las fracciones y compuesto puros aislados de *Ageratina vacciniaefolia* y *Conyza trihecatactis* se debe a la presencia de compuestos tipo diterpeno como el ácido ent-kaur-16-en-19-ocio. Estudios de actividad para esta sustancia aislada también de la especie vegetal *Copaifera langsdorffi* demostró su efecto al disminuir la inflamación causada por colitis inducida por ácido acético, su acción se debe al efecto antioxidante y a la acción anti-lipoperoxidativa(Paiva et al.,2003; Veigan Junior et al.,2007). Un estudio de la actividad biológica del extracto del *Sidertis cadicans*, ha demostrado actividad analgésica y anti-inflamatoria encontrándose que uno de los constituyentes principales del extracto es el ácido ent-kaur-16-en-19-ocio (Pérez et al., 2004). Este ácido ent-kaur-16-en-19-ocio también fue reportado como potente agente anti-inflamatorio en ratas (Sosa et al., 1997). Cuatro estevioletos (diterpenos del tipo ent-kaurano glicosilado), esteviosidos, rebaudiosidos A, C y dulcosido A aislado de *Stevia rebaurdiana* Bertoni, mostraron actividad inhibitoria frente a la inflamación inducida por 12-O-tetradacanoilforbol-13-acetato (TPA), con  $CI_{50}$  de 54,1-291,6  $\mu\text{g/mL}$  (Pérez, A 2008).

Es por la evidencia citada que se podría suponer que son los diterpenos presentes en los extractos y los compuestos puros aislados tipo kaurano y labdano los responsable de la actividad antiinflamatoria evaluada en este estudio.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto Etanólico de *Ageratina vacciniaefolia* y la fracción de Acetato de etilo de *Conyza trihecatactis* a una dosis de 300 mg/Kg, utilizando el método de inducción de edema plantar por inyección de lambda carragenina. Los resultados muestran que la administración por vía intraperitoneal del extracto etanólico de *Ageratina vacciniaefolia* a una dosis de 300 mg/kg a ratas con edema plantar inducido por inyección de lambda carragenina, ejerce un efecto antiinflamatorio bajo comparado con el control positivo, que se evidencia desde la primera hasta la séptima hora de experimentación con un valor de porcentaje de inhibición de 64.71%. El mayor porcentaje de inhibición se observa con la fracción de Acetato de etilo de *Conyza trihecatactis* a la quinta hora y séptima hora de experimentación presentan los siguientes porcentajes de inflamación 29,96% y 25,91% respectivamente. En este estudio se demostró el efecto antiinflamatorio de la fracción de Acetato de Etilo de *Conyza trihecatactis* en modelo de inflamación inducida en pata de rata por lambda carragenina, a dosis de 300 mg/kg, administrados por vía intraperitoneal, sin embargo, es necesario realizar estudios que permitan profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción por los cuales esta fracción modula la respuesta inflamatoria.

Con relación al estudio histopatológico se pudo observar que la fracción de Acetato de Etilo de *Conyza trihecatactis*, es la que mejor previene daños en el tejido como la vasodilatación, el aumento de la presión hidrostática y aumento en la permeabilidad vascular. Por otro lado también se observó una disminución en la migración de neutrófilos y la viscosidad de la sangre a nivel vascular es normal, no se observó congestión, ni formación de trombos a nivel arterial. Los resultados observados en el tejido tratado con diclofenaco (control positivo) es muy similar al observado con la fracción de Acetato de etilo de *Conyza trihecatactis*.

Finalmente en los últimos años se han desarrollado notablemente las investigaciones dirigidas a la cura del cáncer, uno de los avances más significativos fue el descubrimiento del taxol, diterpenoide aislado por primera vez de *Taxus brevifolia* en 1971, esta molécula presenta un amplio abanico de actividad para diferentes tumores, su mecanismo de acción es que actúa como un antimitótico. (Pérez, A 2008).

Varios derivados del ent-kauran como el ácido 11- $\beta$ -hidroxi-15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oico muestra actividad antitumoral *in vitro* frente a varias líneas celulares. Una de las interesantes

propiedades biológicas del ácido ent-kaurénico es su moderada actividad en vitro frente a ciertas líneas celulares cancerígenas, del pulmón (A-549), Sistema Nervioso Central (XF498) y Próstata (22Rv1). Dosis de 1mg/Kg disminuye el crecimiento del tumor primario, reduce el número de metástasis y aumenta la supervivencia de los animales de experimentación (Pérez, A 2008).

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados es muy probable que la actividad de la fracción de Acetato de etilo de *Conyza trihecatactis* deba su actividad a la presencia de diterpenos tipo labdanos dos de los cuales fueron aislados de esta fracción como: Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos y el Ent-(13R)-8-hidroxilabdan-14-en-13-O- $\beta$ -D-xilopiranososa. La fracción fue probada sobre la línea celular OCI-ALM3, un tipo de leucemia aguda, frente a la cual la fracción mostró una alta actividad citotóxica a una concentración de 10 $\mu$ g/mL después de 18 horas de incubación.

## CONCLUSIONES

- Mediante los diferentes procedimientos utilizados en el laboratorio se logró obtener extractos, fracciones y compuestos con solventes de baja, mediana y alta polaridad de las especies vegetales: *Ageratina vacciniaefolia*, *Conyza trihecatactis* y *Gnaphalium graveolens*. La fracción de acetato de etilo, obtenida del extracto en éter de petróleo de *Conyza trihecatactis* fue el que presentó una mayor actividad biológica, en los ensayos realizados como antiinflamatorio mediante el modelo de inflamación inducida en pata de rata por lambda- carragenina y la actividad citotóxica en la línea celular OCI-AML3 (Leucemia aguda) mediante citometría de flujo. El ensayo de la actividad antiinflamatorio fue soportado por un estudio a nivel histopatológico, que permitió evaluar los siguientes parámetros asociados a la inflamación: Edema (hinchazón del tejido), congestión vascular (vaso dilatación) e infiltrado inflamatorio (Tipo de células inflamatorias presentes en los tejidos), la valoración de estos parámetros permitió reforzar los resultados positivos obtenidos en la actividad antiinflamatoria. Finalmente se identificaron mediante técnicas espectroscópicas convencionales como RMN (experimentos 1H y 13C, HSQC, HMBC) diterpenos glicosilados tipo kaurano y labdano.
- La Fracción de acetato de etilo (300mg/kg) obtenida del extracto en éter de petróleo de *Conyza trihecatactis*, administrados por vía intraperitoneal, en modelo de inflamación inducida en pata de rata por lambda- carragenina, mostraron efecto antiinflamatorio. La fracción de acetato de etilo presentó un potencial antiinflamatorio comparable con la del diclofenaco con una concentración de 100mg/kg a la quinta y séptima hora del tratamiento.
- A nivel histopatológico el tratamientos 2 (Fracción de acetato de etilo obtenida del extracto en éter de petróleo de *Conyza trihecatactis*) y el tratamiento 5 (mezcla en proporción 1:1 labdanos glicosilados: Ent-(13R)-labdan-8(17), 14-dien-13-O-β-D-

xilopiranos y Ent-(13R)-8-hidroxiabdan-14-en-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos) muestran resultados muy similares a los obtenidos con el control positivo, evidenciándose en estos tratamientos una baja presión hidrostática y acumulación de líquidos, a nivel de infiltrado celular se observó un baja migración de neutrófilos al tejido lesionado y finalmente el flujo sanguíneo normal y no se evidencia la presencia de trombos ni congestión vascular.

- El análisis estadístico entre los valores de control y ensayos fueron interpretados mediante la prueba *t* (student), con un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ). La concentración de 10 $\mu$ g/mL de la fracción de Acetato de etilo obtenida del extracto en éter de petróleo de *Conyza trihecatactis* presentó una diferencia significativa con un valor de *t* (0,007) entre los tratamientos y el control. Lo anterior mostró que la fracción presenta una actividad citotóxica sobre las células OCI-AML3 (Leucemia aguda) comparadas con el grupo control.
- Del extracto en etanol de las hojas de *Ageratina vacciniaefolia* se aisló un nuevo kaurenoide glicosilado denominado:  $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido(-)-17-( $\beta$ -xilopiranos)-19-oico aún no reportado para la especie. Del fraccionamiento líquido-líquido con cloroformo del extracto en etanol se aisló un kaurendiol glicosilado y su respectiva aglicona denominados:  $\beta$ -D-glucopyranosil éster del Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico y el Ácido (-)9, 15-dihidroxi-kaur-16-en-19-oico.
- De la fracción de acetato de etilo, obtenida del extracto de éter de petróleo de *Conyza trihecatactis*, se identificaron mediante técnicas espectroscópicas convencionales como RMN (experimentos <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC) los siguientes compuestos tipo labdano: (Ent-(13R)-labdan-14-en-8,13-diol), (Ent-(13R)-8-hidroxiabdan-14-en-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos), (Ent-(13R)-labdan-8(17),14-dien-13-O- $\beta$ -D-xilopiranos).
- Del extracto de éter de petróleo de las hojas de *Gnaphalium graveolens* se identificó mediante técnicas espectroscópicas convencionales como RMN el ácido Ent- Kaur-9(11)-6-dien-19-oico.

## BIBLIOGRAFÍA

- BILBAO, M. R. 1997. Análisis fitoquímico preliminar: química de los productos naturales. Universidad del Quindío. Armenia. 181 p
- BREMER, K. 1994. Asteraceae, Cladistic and Classification. Ed. Timber Press, Portland. Oregon. USA. 752 p.
- BRUNETON, J. Farmacognosia. Acribia, S.A. España, 2001; p 629-633.
- BOHLMAN,R., GUPTAR., KING R., ROBINSON H. 1979. Prostaglandin like fatty acid derivate from *Chromolaena morii*. Phytochemistry. Vol 20. No 6. p. 1417-1418.
- BOHLMAN,F., ZIESCH,J. 1979. Phytochemistry. Vol.18. p. 1489
- CANNELL, R., 1998. Natural Products Isolation. Humana Press. 472 p.
- CUATRECASAS, J. 1958. Aspectos de la vegetación natural de Colombia. Bogotá, Colombia. Rev. Acad. Col. Cienc. Ex.Fis. Nat., 10(40):221-264.
- CYTED,. Manual de técnicas de investigación. Proyecto X-1 Búsqueda de Principios bioactivos en plantas de la región. 1995, pp 82-85.
- DEY, P.1991. Methods in plant Biochemistry.Vol. 7. Terpenoids. Acedemic Press.London,UK.
- DIAZ, S., CUATRECASAS, J. 1999. Asteraceas de la flora de Colombia. Santafé de Bogotá D.C.Colombia.387p 63
- GUHL, E. 1981. La Sabana de Bogotá sus alrededores y su vegetación. Edición del Jardín Botánico José Celestino Mutis. Bogotá. Colombia. pg. 67-81.
- KALINOVSKY, A. I., SEREBRYAKOV, E. P., ZOLOTAREV, B. M.,SIMOLIN, A. V., KUCHEROV, V. F., Y CHIZHOV, O. S. 1970. Mass spectra of kaurene derivatives-I. The mass spectra of some (-)-kauran-16-ols. Org. Mass Spect. 3:1393-1400.
- KING, M. AND ROBINSON, H. 1970. *Ageratina*. In: phytology, 19:227

LAUER, W. 1979. La posición de los páramos en la estructura del paisaje de los Andes tropicales. En: El medio ambiente páramo. Salgado, L. Caracas, Venezuela. Pg. 29-45.

LESTER, S. 2006 Manual de Patología Quirúrgica. Elsevier. Churchill, Livingstone. pp. 28-34.

LUTEIN, J. 1992. Páramos en Páramos: an andean ecosystem under human influence.

MARTINEZ, M., VALENCIA P Y OTROS. 2008. Manual de prácticas de laboratorio de farmaconogía y fitoquímica. Universidad de Antioquia.

MORRIS, BRUCE., STHEPEN, FOSTER., GRUGEL, SHARON. 2005. Isolation of the diterpenoids, ent-kauran-16 $\alpha$ -ol and ent-atisan-16 $\alpha$ -ol, from sunflowers, as oviposition stimulants for the banded sunflower moth, *cochyliis hospes*. Journal of chemical ecology. Vol. 31.n 1

OSPINA, M. 2003. El páramo de Sumapaz un ecosistema estratégico para Bogotá. <http://www.sogeocol.edu.co/documentos/Paramos.pdf>

PASTO D., JHONSON C. 1974. Determinación de estructuras orgánicas. Editorial Reverte S. A. España. 544 p. 64

PINTO, A., DO PRADO, S. Y PINCHIN, R. 1981. Two kauranes from *Vellozia caput-ardea*. Phytochemistry, 20: 520-521.

PEDROZO, J. 2001. Química y actividad antimicrobiana de plantas autóctonas Colombianas. Tesis de doctorado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá.

PÉREZ, A. 2008. Contribución al estudio de los ácidos kaurenicos aislados de *Coespeletia morizciana*. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Química. Universidad de los Andes, Mérida.

PÉREZ, T., LÓPEZ, C. 2007. Principios de Patología. Editorial médica panamericana S.A. España. 544. Pg 37-47.

RAMIREZ, M. 2008. Contribución al estudio químico de *Conyza trihecatactis* (Blake) Cuatrecasas (COMPOSITAE-ASTERACEA) y sus posibles efectos farmacológicos. Trabajo de grado para optar al título de Bióloga. Universidad Javeriana, Bogotá.

STURM, H. Y RANGEL, O. 1985. Ecología de los páramos Andinos. Una visión preliminar integrada. Instituto de Ciencias Naturales-Museo de Historia Natural. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. N°. 9.

SKOOG, D. 2007. Fundamentos de química analítica. International Thompson Learning. Octava edición.

TELLEZ, A. 1990. Fitoquímica de la Espeletia killipi, Cuatr, y actividad giberelica de algunos de sus componentes aislados. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana.

TORRENEGRA, R., ROBLES, J., PEDROZO, J. AND PESCADOR, B. 1999. A new diglycoside of diterpene from *Ageratina vacciniaefolia*. *Molecules*, 4, M94.

WALDI D. 1965. Thin layer chromatography a laboratory handbook. Academic Press. Springer Verlac. 553 p.