UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUIMICAS

"Hemisíntesis del compuesto mayoritario de la S*atureja boliviana* (Khoa) y evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria."

TESIS DE LICENCIATURA

POSTULANTE:

BENIGNO MAMANI CUENCA

DIRECTORES DE LA TESIS:

JOSE LUIS VILA CASTRO PhD.
EDUARDO GONZALES DAVALOS PhD.

La Paz-Bolivia
2011

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES

FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES

CARRERA DE CIENCIAS QUIMICAS

“Hemisintesis del compuesto mayoritario de la S*atureja boliviana* (Khoa) y evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria.”

TESIS DE LICENCIATURA

POSTULANTE:

BENIGNO MAMANI CUENCA

DIRECTORES DE LA TESIS:

JOSE LUIS VILA CASTRO PhD.
EDUARDO GONZALES DAVALOS PhD.

TRIBUNALES:

PATRICIA MOLLINEDO PORTUGAL PhD.
JOSE ANTONIO BRAVO PhD.

La Paz-Bolivia

2011

DEDICADO.-

A MIS PADRES:

COMO TESTIMONIO DE MI AMOR Y UN PROFUNDO AGRADECIMIENTO POR DARME LA OPORTUNIDAD DE NACER, SER Y REALIZAR ESTE LOGRO PROFESIONAL.

AGRADECIMIENTOS

Deseo mostrar mi agradecimiento y admiración a mi director, Dr. José Luís Vila, ya que sin su tutela y guía estas páginas habrían resultado vacías. Gracias por sus sabios consejos, por su amistad, por su entrega, por su dedicación y comprensión, por enseñar cosas que no aparecen en ningún libro que nunca se haya escrito.

A l Dr. Eduardo Gonzales, porque con su ayuda desinteresada despertó en mí la voluntad de querer aprender siempre un poquito más, superarme y convertirme en mejor persona.

A la Dra. Patricia Mollinedo, que con su amabilidad y su capacidad de enseñar me han ilusionado con la posibilidad de que en un futuro pueda ser un gran profesional.

A la Dra. Grace Ruiz, por brindarme su apoyo, colaboración y amistad durante el periodo del presente trabajo.

Al Dr. Juan Luis Arias y al Dr. Juan Antonio Ávila, por guiarme en los momentos más cruciales de este trabajo por el cual me siento muy agradecido.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo "AECID", Dentro del proyecto: Plantas Medicinales Como Recurso Terapéutico en Bolivia, a la Dra. Paulina Bermejo "Universidad Complutense de Madrid" que con gran sabiduría ha sabido guiarme hacia otros horizontes científicos en estos años de preparación profesional de lo que me siento eternamente agradecido

Y por supuesto a mis compañeras y compañeros de laboratorio, Fidel, Tito, Martín, Rolando, Patricia, Daly, Brenda, Carlos, mi querida Rossio, Pilar, Giovanna y Ana Paula por enseñarme sus palabras y consejos dentro y fuera del laboratorio y sobre todo, por enorgullecerme de poder llamarles amigos.

Yo, Benigno Mamani Cuenca, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenecen a la CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS, DE LA FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES “UMSA”

Benigno Mamani Cuenca

RESUMEN

El presente trabajo, fue desarrollado en el Instituto de Investigaciones en Productos Naturales (IIPN) y el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

Se realizo el estudio fitoquímico de la *Satureja boliviana* (khoa), aislando de esta especie el ácido ursólico, compuesto mayoritario con un rendimiento del 2,4%. Compuesto que es catalogada como BM-1 en el presente trabajo, logrando obtener derivados hemisintéticos a partir de este compuesto: la oxidación y la acetilación. Ambos con rendimientos del 82 % y 71 % respectivamente.

Los compuestos hemisintéticos del ácido ursólico BM-1a y BM-1b, fueron analizados por espectroscopía de resonancia magnética nuclear demostrándose en la elucidación la identificación de las derivatizaciones correspondientes.

Estos compuestos han sido sometidos a estudio de: actividad citotóxica en eritrocitos de sangre periférica humana, además de la evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria *in vivo*, realizada bajo el modelo de edema plantar inducido por carragenina en ratones albinos Swiss.

En cuanto a la actividad biológica se ha podido ver la moderada citotoxicidad en el modelo "citotoxicidad en eritrocitos de sangre periférica humana" de los compuestos; ácido ursólico y sus dos derivados respectivamente. Por otro, lado la actividad antiinflamatoria de los tres compuestos han mostrado resultados altamente activos, revelando porcentajes de inhibición de la inflamación mayores al 40%, en cada caso.

Los derivados, BM-1a y BM-1b que han sido objeto de estudio llegan a tener una mayor actividad antiinflamatoria con respecto al ácido ursólico como compuestos de partida, mejorando por medio de la hemisíntesis la actividad de los derivados hemisintéticos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN. 1

2. JUSTIFICACIÓN. 2

3. ANTECEDENTES. 4

3.1. *Satureja boliviana* (Briq), *Clinopodium bolivianum* (kuntze). 4

3.1.1. Botánica. 4

3.1.2. Distribución geográfica. 6

3.1.3. Uso popular. 6

3.2. Composición química. 8

3.2.1. Partes aéreas. 8

3.2.2. Aceites esenciales. 8

3.3. Propiedades farmacológicas de la *Satureja boliviana*. 10

3.4. Ácido ursólico y sus derivados. 11

3.5. Citotoxicidad. 14

3.6. Inflamación. 15

3.6.1. Signos clínicos de la inflamación. 16

3.6.2. Clasificación de la inflamación. 17

3.6.2.1. Inflamación aguda. 18

3.6.2.2. Migración leucocitaria. 18

3.6.2.3. Tratamiento. 20

3.6.2.4. Antiinflamatorios no esteroideos. 21

3.6.2.5. Antiinflamatorios esteroideos 21

3.7. Mecanismo de acción de la indometacina. 22

3.7.1. Propiedades farmacodinámicas. 22

3.7.2. Propiedades farmacocinéticas. 23

3.7.3. Efectos adversos. 23

4. OBJETIVOS. 24

4.1. Objetivo general. 24

4.2. Objetivos específicos. 25

5. MATERIAL Y MÉTODOS. 25
5.1. Fitoquímica. 25
5.1.1. Muestreo, recolección, desecación, molturación y conservación 25
5.1.2. Extracción de aceites esenciales. 25
5.1.3. Extracción de metabólitos secundarios. 27
5.2. Elucidación estructural. 28
5.2.1. Resonancia magnética nuclear. 29
5.3. Hemisíntesis del compuesto mayoritario BM-1. 30
5.3.1. Derivado hemisintético BM-1a. 30
5.3.2. Derivado hemisintético BM-1b. 33
5.4. Actividad biológica. 36
5.4.1. Modelo de citotoxicidad. 36
5.4.2. Modelo de inflamación. 36
5.4.2.1. Edema plantar inducido por carragenina. 36
5.5. Análisis de datos. 40
6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS. 40
6.1. Extracción y aislamiento del ácido ursólico de la *Satureja boliviana.* 40
6.2. Caracterización del compuesto BM-1 (ácido ursólico). 41
6.2.1. Características generales del compuesto BM-1. 41
6.2.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. 41
6.3. Caracterización del compuesto BM-1a. 49
6.3.1. Características generales del compuesto BM-1a. 49
6.3.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. 50
6.4. Caracterización del compuesto BM-1b. 58
6.4.1. Características generales del compuesto BM-1b. 58
6.4.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. 59
6.5. Citotoxicidad. 68
6.6. Inflamación. 69
6.6.1. Estudio de la inflamación de la carragenina frente al la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b. 70

6.6.2. Estudio del porcentaje de inhibición del la acción antiinflamatoria de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b. 75

7. CONCLUSIÓN. 80

8. SUGERENCIAS. 81

9. BIBLIOGRAFÍA. 83

10. ANEXOS. 94

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura del ácido oleanólico, ácido maslinico y ácido ursólico. 11
FIGURA 2. Estructura del ácido ursólico y sus derivados. 13
FIGURA 3. Resumen esquemático del proceso inflamatorio. 17
FIGURA 4. Cascada de migración leucocitaria. 19
FIGURA 5. Mecanismo de acción de antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. 22
FIGURA 6. Equipo de extracción del aceite esencial de la *Satureja boliviana.* 26
FIGURA 7. Metodología de extracción del ácido ursólico. 26
FIGURA 8. Procedimiento de la separación del ácido ursólico. 27
FIGURA 9. Identificación del ácido ursólico en CCF. 28
FIGURA 10. Reacción de la oxidación del compuesto BM-1. 31
FIGURA 11. Secado y purificación. 31
FIGURA 12. Mecanismo de reacción de la oxidación del compuesto BM-1. 32
FIGURA 13. Reacción resumida de la oxidación del compuesto BM-1. 32
FIGURA 14. Eliminación da la piridina con etanol del compuesto BM-1b. 34
FIGURA 15. Mecanismo de reacción de la acetilación del compuesto BM-1. 35
FIGURA 16. Reacción resumida de la acetilación del compuesto BM-1. 35
FIGURA 17. Medida del peso corporal de ratones albinos raza Swiss. 38
FIGURA 18. Estudio de la actividad antiinflamatoria preliminar *in vivo.* 38
FIGURA 19. Acoplamiento a larga distancia HMBC del protón δ=0,95 y δ=0,74 del compuesto BM-1. 47
FIGURA 20. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=0,77 y δ=1,06 del compuesto BM-1. 48
FIGURA 21. Estructura química del compuesto BM-1 con asignaciones correspondientes de RMN-^{13}C. 49
FIGURA 22. Estructura química del compuesto BM-1. 49
FIGURA 23. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=0,79 y δ=1,04 del compuesto BM-1a. 57

FIGURA 24. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=2,5 y δ=2,1 del compuesto BM-1a. 57
FIGURA 25. Estructura química del compuesto BM-1a. con asignaciones correspondientes de RMN-^{13}C. 58
FIGURA 26. Estructura química del compuesto BM-1a. 58
FIGURA 27. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=0,86 y δ=0,84 del compuesto BM-1b. 65
FIGURA 28. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=0,77 y δ=1,65 del compuesto BM-1b. 65
FIGURA 29. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=2,19 y δ=1,65 del compuesto BM-1b. 66
FIGURA 30. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=0,95 y δ=0,98 del compuesto BM-1b. 66
FIGURA 31. Estructura química del compuesto BM-1b con asignaciones correspondientes de RMN-^{13}C. 67
FIGURA 32. Estructura del compuesto BM-1b. 67
FIGURA 33. Diferencia del desplazamiento químico en la hemisíntesis del ácido ursólico. 68

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA Nº 1. Análisis cuantitativo de los aceites esenciales de la *Satureja boliviana.* 9
TABLA Nº 2. Ácido ursólico y sus derivados. 13
TABLA Nº 3. Ejemplo de enfermedades inflamatorias. 16
TABLA Nº 4. Características del ácido ursólico. 41
TABLA Nº 5. Datos de RMN-^{1}H, del ácido ursólico. 41
TABLA Nº 6. Datos espectroscópicos del experimento HMQC del ácido ursólico. 44
TABLA Nº 7. Datos espectroscópicos del experimento DEPT-135 del ácido ursólico. 46
TABLA Nº 8. Características del compuesto BM-1a. 49
TABLA Nº 9. Datos RMN-^{1}H del compuesto BM-1a. 50
TABLA Nº 10. Datos espectroscópicos del experimento HMQC del compuesto BM-1a. 53
TABLA Nº 11. Datos espectroscópicos del experimento DEPT-135 del compuesto BM-1a. 55
TABLA Nº 12. Características del compuesto BM-1b. 58
TABLA Nº 13. Datos de RMN-^{1}H del compuesto BM-1b. 59
TABLA Nº 14. Datos espectroscópicos del experimento HMBC del compuesto BM-1b. 61
TABLA Nº 15. Datos espectroscópicos del experimento DEPT-135 del compuesto BM-1b. 63
TABLA Nº 16. Datos de la evaluación citotóxica. 69
TABLA Nº 17. Resultado de la diferencia de edema a diferentes horas. 74
TABLA Nº 18. Porcentaje de inhibición de los compuestos BM-1, BM-1a, BM-1b. 79
TABLA Nº 19. Asignación cualitativa de los datos del porcentaje de inhibición. 79
TABLA N° 20. Momentos dipolares teórico-computacional (Hyperchem) 80

ÍNDICE DE ESPECTROS

ESPECTRO Nº 1. RMN- ^{1}H del compuesto BM-1. 42

ESPECTRO Nº 2. RMN- ^{13}C del compuesto BM-1. 43

ESPECTRO Nº 3. Experimento HMQC del compuesto BM-1. 43

ESPECTRO Nº 4. RMN- ^{13}C y el experimento HMBC del compuesto BM-1. 45

ESPECTRO Nº 5. Experimento HMBC del compuesto BM-1. 47

ESPECTRO Nº 6. RMN- ^{1}H del compuesto BM-1a. 51

ESPECTRO Nº 7. RMN- ^{13}C del compuesto BM-1a. 51

ESPECTRO Nº 8. Experimento HMQC del compuesto BM-1a. 52

ESPECTRO Nº 9. RMN- ^{13}C y el experimento HMBC del compuesto BM-1a. 54

ESPECTRO Nº 10. Experimento HMBC del compuesto BM-1a. 56

ESPECTRO Nº 11. RMN- ^{1}H del compuesto BM-1b. 60

ESPECTRO Nº 12. RMN- ^{13}C del compuesto BM-1b. 60

ESPECTRO Nº 13. Experimento HMQC del compuesto BM-1b. 61

ESPECTRO Nº 14. RMN- 13C y el experimento HMBC del compuesto BM-1b. 62

ESPECTRO Nº 15. Experimento HMBC del compuesto BM-1b. 64

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRAFICA Nº 1. Evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b. 69

GRAFICA Nº 2. Diferencia de inflamación de la carragenina frente al fármaco indometacina y el porcentaje de inflamación. 70

GRAFICA Nº 3. Diferencia del edema de la carragenina frente a la indometacina y al compuesto BM-1 evaluado en las primeras 5 horas. 72

GRAFICA Nº 4. Diferencia del edema de la carragenina frente a la indometacina y al compuesto BM-1a evaluado en las primeras 5 horas. 72

GRAFICA Nº 5. Diferencia del edema de la carragenina frente a la indometacina y al compuesto BM-1b evaluado en las primeras 5 horas. 73

GRAFICA Nº 6. Diferencia de edema de la carragenina frente al fármaco indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b. 75

GRAFICA Nº 7. Porcentaje de inhibición de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b a la 1ra hora de evaluación. 76

GRAFICA Nº 8. Porcentaje de inhibición de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b a la 2da hora de evaluación. 76

GRAFICA Nº 9. Porcentaje de inhibición de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b a la 3ra hora de evaluación. 77

GRAFICA Nº 10. Porcentaje de inhibición de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b a la 4ta hora de evaluación. 77

GRAFICA Nº 11. Porcentaje de inhibición de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b a la 5ta hora de evaluación. 78

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AE	Aceites Esenciales
AIE	Antiinflamatorios esteroideos
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AU	Ácido ursólico
BM.1A	Acido ursólico oxidado derivado
BM-1	Acido ursolico
BM-1B	Acido ursolico acetilado
BSTFA	N,o-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
BXP5	Polisilfenilenesiloxan
CC50	Concentración media
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
FDA	asociación de drogas y alimentos
GC	Cromatografía de gases
GL	Grados Gay Lussac
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSV-1	Virus Herpes Simple, tipo 1
IIFB	Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
IIPN	Instituto de Investigaciones en Productos Naturales
MTT	3(4,5 dimetil-2tiazoil)-2,5difeniltetrazoilo
NO	Oxido nitroso
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGI	Prostaglandina tipo I
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
VSV	Virus de la Estomatitis Vesicular

1. INTRODUCCIÓN.

La presente “Tesis de Licenciatura” continúa el estudio previo realizado por el grupo de investigación de Química (IIPN) en la hemisíntesis de nuevos compuestos naturales a partir de plantas medicinales y el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), sobre la actividad antiinflamatoria y toxicidad de especies vegetales empleadas en la medicina popular.

Parte del trabajo se centró en el estudio de especies vegetales que crecen por encima de 3000 m.s.n.m. que son usadas en la medicina tradicional Boliviana y avaladas por el uso en patologías relacionadas con procesos inflamatorios.

La especie *Satureja boliviana* ó *Clinopodium bolivianum* (khoa) es un arbusto originario de la región andina de Sudamérica, presenta dos características fundamentales; el empleo continuo en la población como medicamento tradicional ante dolores estomacales, antiinflamatorios y artríticos una segunda, por su alto contenido de monoterpenoides presentes en sus partes aéreas.

El plan de trabajo establecido consiste en la obtención previa del material vegetal mediante las técnicas adecuadas, posteriormente realizar el proceso de extracción y fraccionamiento correspondiente para obtener producto mayoritario que será objeto de estudio, y posterior modificación estructural del compuesto mayoritario, utilizando técnicas espectroscópicas para su identificación. Como parte final de la tesis se plantea el estudio preliminar del efecto farmacológico antiinflamatorio de los principios activos, del compuesto mayoritario y sus dos derivados correspondientes.

Como método experimental *in vivo* se ha seleccionado el clásico modelo de inflamación aguda plantar en ratón inducido por carragenina. [72]

El compuesto mayoritario aislado y sus respectivas derivatizaciones son evaluadas bajo el modelo de citotoxicidad, método *in vitro* en eritrocitos de sangre periférica humana, mostrándose así la toxicidad celular (citotoxicidad) de dichos compuestos.
Con estos estudios se pretende potenciar los aspectos científicos de la especie *Satureja boliviana* (khoa) en la medicina tradicional, evaluar el efecto citotóxico del compuesto aislado de sus derivados hemisintéticos y la actividad antiinflamatoria.

2. JUSTIFICACIÓN.

El hombre ha utilizado las plantas con fines terapéuticos desde el propio surgimiento de la humanidad, muchas veces sin conocer los metabolitos responsables de las acciones farmacológicas que se les atribuye. [1]

La organización mundial de la salud (OMS), al hacer referencia a la medicina tradicional que incluye el empleo de las especies vegetales, materiales elaborados y preparados a base de los mismos, debido a que estos contienen múltiples componentes químicos que se pueden clasificar como sustancias activas porque provocan efectos o respuestas en el organismo.[2]
En nuestro país la población como las instituciones sanitarias en los últimos años ha rescatado el uso de la medicina natural, con el objetivo de complementar los tratamientos comunes de las numerosas patologías. [3]

Una fuente importante de productos con interés farmacológico lo constituyen los productos a base de plantas medicinales y en tal sentido la búsqueda de principios activos con posible acción antiinflamatoria, también ha estado dentro de las prioridades de quienes investigan en este ámbito.[4]

El presente trabajo estudia a la especie *Satureja boliviana* ó *clinopodium bolivianum* en busca de nuevos fármacos de origen natural, este trabajo se enfoca en la purificación,

elucidación y la derivatización del compuesto mayoritario del extracto etanólico de la especie vegetal popularmente llamada (Khoa), para su posterior evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria.

La importancia de este estudio es la optimización del método de extracción en cuanto al rendimiento y la modificación estructural con el único fin de disminuir la toxicidad y aumentar la actividad, para ello se recurre a la hemisíntesis química. Estos estudios son de vital importancia en la medicina y la farmacología sin dejar de lado la importancia de la medicina tradicional.

La necesidad de palear la diferentes patologías humanas, se ve preciso recurrir a los recursos naturales, por tal motivo se extrae diferentes metabolitos secundarios mayoritarios de especies vegetales y consecuentemente realizar sus derivados correspondientes por medio de la hemisíntesis, que posean actividad antiinflamatoria y además presenten poca o mínima toxicidad. La necesidad de internarse en este campo, los estudios van destinados implícitamente a la revalorización de especies medicinales y la aplicación de estos productos como fuente primordial en el uso terapéutico en el alivio de algunas patologías como complemento.

Por otro lado, incrementar e incentivar la producción de las plantas medicinales, apoyar el desarrollo de la medicina tradicional, promover el estudio de productos naturales con fines terapéuticos para el desarrollo de la industria farmacéutica y el avance de la ciencia de la química en particular en la hemisíntesis en productos naturales.

La *Satureja boliviana* (khoa), especie que se encuentra distribuida por el altiplano boliviano, La Paz, Oruro, y valles entre ellas Cochabamba, comercializadas ampliamente en las ciudades capitales, hace necesario estudiar ampliamente a esta planta, por los escasos reportes científicos que involucran a esta especie y porque solo hacen referencia a sus aceites esenciales.

Muchos de los avances científicos relacionadas en el campo de la hemisíntesis, lo hacen en la búsqueda de fármacos capaces de inhibir el crecimiento de células cancerosas, tumorales, entre otros.

Una gran mayoría de las patologías están relacionadas con procesos inflamatorios, por esa razón se busca inicialmente estudiar y evaluar compuestos que tengan particularmente esa propiedad, la especie *Satureja boliviana* descrita en bibliografía popular kallawaya, menciona muchas de las propiedades medicinales de esta especie, una de ellas la propiedad antiinflamatoria.

Muchas de las plantas medicinales poseen cierta toxicidad y que muchas de esas plantas no han sido evaluadas toxicológicamente, esta es una de las falencias que impiden la comercialización racional en nuestra población.

3. ANTECEDENTES.

3.1. *Satureja boliviana (Benth) Briq "Clinopodium bolivianum (Benth). Kuntze".*

3.1.1. Botánica.

George Bentham (1800-1884) botánico ingles y John Isaac Briquet (1870-1931) botánico suizo, catalogaron a la especie como *Satureja boliviana*, paralelamente el botánico Alemán Carl Ernest Otto Kuntze (1843-1907), lo catalogó como *Clinopodium bolivianum*.

Debido a las publicaciones y estudios realizados por Darwin, la especie está catalogada antiguamente y oficialmente como *Clinopodium bolivianum* [5]

Sinónimos. *Clinopodium bolivianum (Benth)*. Kuntze, *Micromeria boliviana* (Bentham), *Micromeria boliviana* (Bentham) *var. Ungustifolia Weddel, Satureia Kuntzeana* (Briquet), *Xenopoma bolivianum* (Grisebach). [8]

Nombre común:

En Bolivia, es comúnmente llamando: khoa, yurac muña, muña blanca, martin muña, té del indio, té de los incas. [6, 7, 8]

Descripción Botánica. [5]

Arbusto erecto de aproximadamente 60 cm de alto, aromático.

Tallos cuadrangulares glabros.

Hojas compuestas, opuestas.

Flores solitarias, perfectas, completas y zigomorfas; cáliz gamosépalo 5 lobulado; corola gamopétala blanca 5 lobulada, 1 pétalo grande, dos pequeños y uno dividido en 2, tubo de la corola muy pubescente; androceo con 4 estambres didínamos, adnatos al tubo corolino, anteras ditésicas con tecas moradas; gineceo con ovario súpero, estilo y estigma simples.

Fruto cápsula.

La ubicación taxonómica, de la especie según el sistema de clasificación bibliográfica es la siguiente [9]:

REYNO: *Plantae*

DIVISION: *Magnoliophyta*

CLASE: *Magnoliopsida*

Sub-CLASE: *Asteridae*

ORDEN: *Lamiales*

FAMILIA: *Lamiaceae*

GENERO: *Satureja*

ESPECIE: *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze ,

Satureja boliviana (Benth) Briq.

3.1.2. Distribución geográfica.

La *Satureja boliviana*, se distribuye en Bolivia: La Paz, en las regiones de Larecaja, Sorata, Achacachi y Unduavi entre 2100 y 4000 m.s.n.m. se menciona la presencia de esta especie en Tucumán, Jujuy, Salta y San Luis de la República de Argentina a 2500 y 2700 m.s.n.m.[10]

3.1.3. Uso popular.

Partes usadas: Toda la planta [11]

Usos:

Abortivo: La infusión de esta especie no es recomendable para mujeres en periodo de gestación produciendo en muchos casos el aborto, pero si es recomendado en el momento del parto ya que facilita el proceso expulsión del feto.

Alimenticio: Utilizado como condimento, y dar sabor a las comidas especialmente sopas.

Biocida: El cocimiento de esta especie (50g/L aproximadamente), es roseado en las primeras ramas salientes de los cultivos, para evitar el ingreso de plagas, principalmente el gorgojo de los andes en cultivos de *Solanum tuberosum* = papa, las ramas frescas también son usadas en el almacenamientos de los cultivos con el mismo fin.

Combustible: Para lo cual se hace secar por un periodo de 3 días a una semana.

Cultural: Toda la planta es usada en el ritual del pago a la pachamama.

Forraje: Las hojas son usadas como forraje para el ganado vacuno y ovino principalmente.

Medicinal: La infusión y cocimiento de toda la planta (20g/L aproximadamente) se utilizan para aliviar cólicos, diarreas, dolores estomacales (carminativo).

Es usado también contra los resfríos, tos (antitusígeno), fiebres (febrífugos), dolores de cabeza (analgésicos), en estos últimos casos se puede frotar directamente la frente con las hojas o inhalarlas presionándolas ligeramente y lograr un alivio más rápido.
La infusión es usada como antiinflamatorio en problemas de prostatitis, se toma por las noches, hasta que cese el malestar y para aliviar afecciones hepáticas.

En casos de reumatismo, se calienta las hojas en aceite (15g. aproximadamente) y con este preparado se impregna en las zonas afectadas, se toma la infusión por las noches y se colocan con toallas calientes sobre la zona afectada de preferencia por las noches.

Cuando se producen inflamaciones en el oído, se recomienda reposar (20g/L aproximadamente), para que el vapor ingrese por el oído, de este modo se logra aliviar el dolor.

El cocimiento de esta planta (15g/L aproximadamente), es usada en infecciones o fiebres puerperales (sobreparto) y para regular la menstruación (emenagogo), se debe tomar 3 veces al día hasta que el malestar cese. En enfermedades como la varicela, se frota todo el cuerpo con las hojas pasadas en agua caliente (15g/L aproximadamente), para aliviar el prurito producido por esta enfermedad.

Veterinario: Cuando se presentan problemas digestivos en el ganado (vacuno), se realiza un preparado de las hojas, combinado con *Chenopodium ambrosioides* = paico, mezclado con azúcar de caña, esta preparación se hace tomar a los animales delicados, hasta que se alivien.

3.2.Composición química.

3.2.1. Partes aéreas.

En los análisis de las partes aéreas, la determinación de los compuestos fenólicos como: kaempferol 3-*O*-glucósido, kaempferol 3-*O*-xilosil glucósido, kaempferol 7-*O*-ramnósido y quercetina 3-*O*-soforósido. [12]

3.2.2. Aceites esenciales.

En la revisión bibliográfica se evidencio que la mayoría de los estudios se realiza a los monoterpenos comúnmente denominado aceites esenciales. [13]

Las partes aéreas de la *Satureja boliviana* (*Clinopodium bolivianum*) Briq. y *S. brevicalix* Epl. (*Lamiaceae*) presenta una composición en aceites esenciales como se muestra en la tabla número uno, donde se relaciona ambas especies. [14] Estas muestras fueron analizadas por GC-MS y GC. [15, 16]

Hay variaciones en la composición química según la época del año (las rotación óptica de los aceites esenciales de abril son O°, en tanto los de material en época de floración son levógiros) [17]

Tabla Nº 1. Análisis cuantitativo de los aceites esenciales del *Clinopodium bolivianum* (*Satureja boliviana*) y la *S. brevicalis***.** [14]

Components	Kováts Indices (DB-5, 30 m)	*S. boliviana* oil[a] (%)	*S. brevicalix* oil[a] (%)	Identification[b]
α-Thujene	905	0.3	0.1	RI, MS
α-Pinene	910	0.3	0.1	RI, MS, Co–GC
1-Tetradecyne	954	0.1	0.1	RI
Oct-1-en-3-ol	958	trace	0.1	RI, MS, Co–GC
Sabinene	964	0.6	0.3	RI, MS, Co–GC
Octan-3-ol	969	trace	trace	RI, MS, Co–GC
Myrcene	986	0.4	0.4	RI, MS, Co–GC
α-Phellandrene	998	0.1	–	RI, MS, Co–GC
α-Terpinene	1012	0.1	–	RI, MS, Co–GC
p-Cymene	1017	3.4	2.3	RI, MS, Co–GC
1,8-Cineole	1020	4.0	2.8	RI, MS, Co–GC
cis-β-Ocimene	1034	0.1	0.1	RI, MS, Co–GC
trans-β-Ocimene	1045	0.1	0.1	RI, MS, Co–GC
γ-Terpinene	1054	0.8	0.1	RI, MS, Co–GC
cis–*p*-Menth-2-en-1-ol	1058	0.1	0.1	RI, MS
cis-Linalol oxide	1066	–	trace	RI, MS
Terpinolene	1079	0.1	0.1	RI, MS, Co–GC
trans-*p*-Menth-2-en-1-ol	1083	trace	trace	RI, MS
Linalol	1090	3.1	3.6	RI, MS, Co–GC
Isoamyl isovalerate	1094	trace	trace	RI, MS
cis-Verbenol	1095	trace	–	RI, MS
Octan-3-yl acetate	1102	0.3	0.4	RI
Menthone	1125	24.2	37.5	RI, MS, Co–GC
cis-Cinnamaldehyde	1131	0.4	0.4	RI, MS
Isomenthone	1133	29.7	25.2	RI, MS, Co–GC
α-Terpineol	1134	trace	trace	RI, MS, Co–GC
cis-Dihydrocarvone	1141	6.3	5.0	RI, MS
iso-Dihydrocarveol	1150	0.3	trace	RI, MS
trans-Carveol	1166	0.1	0.4	RI, MS
Pulegone	1176	10.7	8.4	RI, MS, Co–GC
Piperitone	1184	2.1	2.4	RI, MS
Perilla aldehyde	1195	0.1	0.3	RI, MS
trans-Anethole	1203	0.1	–	RI, MS
Thymol	1209	4.5	2.3	RI, MS, Co–GC
Carvacrol	1212	0.1	0.2	RI, MS, Co–GC
Cumin alcohol	1225	0.6	1.0	RI, MS
Linalyl acetate	1248	0.1	0.4	RI, MS, Co–GC
α-Cubebene	1305	trace	0.1	RI, MS
β-Bourbonene	1346	0.1	0.1	RI, MS
Thymol acetate	1350	trace	0.4	RI, MS, Co–GC
β-Cubebene	1360	trace	trace	RI, MS
β-Elemene	1362	0.1	trace	RI, MS
Longifolene	1380	trace	trace	RI, MS
α-Gurjunene	1382	trace	trace	RI, MS
β-Caryophyllene	1389	1.6	1.0	RI, MS
Aromadendrene	1419	0.1	0.1	RI, MS
α-Guaiene	1428	trace	trace	RI, MS
α-Cadinene	1429	trace	–	RI, MS
α-Humulene	1430	0.1	0.1	RI, MS
allo-Aromadendrene	1442	0.1	0.1	RI, MS
γ-Gurjunene	1444	trace	–	RI, MS
γ-Muurolene	1462	0.2	0.1	RI, MS
β-Selinene	1474	trace	–	RI, MS
Viridiflorene	1476	trace	trace	RI, MS
α-Selinene	1478	trace	–	RI, MS
γ-Elemene	1482	1.3	–	RI, MS
α-Muurolene	1493	0.2	0.1	RI, MS
γ-Cadinene	1501	0.3	0.2	RI, MS
δ-Cadinene	1514	0.7	0.2	RI, MS
Elemol	1529	0.1	trace	RI, MS
trans-Nerolidol	1561	–	trace	RI, MS
Spathulenol	1564	1.3	1.2	RI, MS
β-Caryophyllene oxide	1567	trace	0.7	RI, MS
Globulol	1579	–	0.1	RI, MS
Viridiflorol	1581	–	trace	RI, MS
Guaiol	1591	0.1	0.1	RI, MS
γ-Eudesmol	1594	–	0.1	RI, MS

[a] Trace < 0.05%; – = absent.
[b] RI = retention index identical to bibliography; Co–GC = retention time identical to authentic compounds; MS = identification based on comparison of mass spectra.

3.3. Propiedades farmacológicas.

Los monoterpenos de la especie *Satureja boliviana* (Khoa) presenta actividad antibacteriana y antimicótica, frente a la *Salmonella enteriditis* y a la *Neurospora crassa* respectivamente. [18]

Se realizó estudios sobre la *Triatoma infestans*, la actividad insecticida, ovicida y larvicida probando tres métodos de los cuales la impregnación en papel recomendado por la OMS nos muestra resultados de actividad muy favorable.[19]

Los extractos etanólico y acuoso de siete especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional de Bolivia entre ellas el *Satureja boliviana* (Khoa), han sido probados para su actividad contra el herpes simple tipo I (HSV-1), virus de la estomatitis vesicular (VSV), y la polio virus de tipo 1.

El extracto acuoso de estas especies investigadas tiene actividad antiviral. Dos de estas plantas, es decir, *Satureja boliviana* y *Baccharis genistelloides* son activos en contra de dos diferentes virus, el HSV-1 y VSV.[20]

La *Satureja boliviana, Phoradendron crassifolium* y *Franseria artemisioides*, entre otros se evaluó la actividad citoprotectora, bajo el modelo de ulcera inducida por etanol en ratas.

Los resultados preliminares muestran que la mayoría de las plantas examinadas poseen actividad significativa, siendo los extractos acuosos de *Phoradendron crassifolium* y *Franseria artemisioides* los más activos, actuando de forma similar a la atropina. [21]

El análisis de los componentes químicos de los extractos estudiados se observó la presencia de taninos, saponinas, flavonoides y cumarinas. [21]

La actividad insecticida de los aceites esenciales de la *Satureja boliviana* y otras especies de Bolivia, han sido evaluados en las larvas de *Aedes aegypti*.
Los componentes activos de los aceites esenciales de la *Satureja boliviana* muestra un efecto larvicida entre ellos los monoterpenos: anetol y nerolidol, se encontró que estos principios activos de los aceites esenciales son los más tóxicos.[22, 23]

3.4. Ácido ursólico y sus derivados.

los ácidos oleanólico y ursólico son triterpenos muy similares, que han sido ampliamente estudiados; [24] estos triterpenos presentes en alimentos, plantas medicinales y otros vegetales. Estos ácidos son los mayores componentes de algunas hierbas de la medicina tradicional y de la medicina oriental, encontrandose ampliamente distribuidas por todo el mundo (Figura N°1).

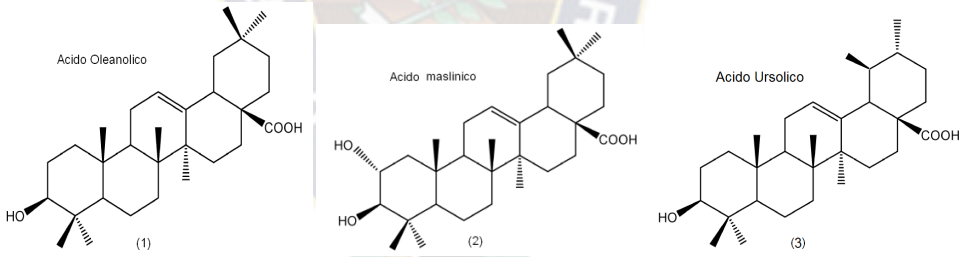


Figura Nº 1. Estructura química: (1) Ácido oleanólico, (2) Ácido maslínico, (3) Ácido ursólico.

Estos triterpenos (Figura N°1) son efectivos frente a lesiones hepaticas inducidas en animales de laboratorio. Se han utilizado desde la antigüedad en Asia como fármacos orales contra desordenes hepáticos.

Los mecanismos de hepatoprotección de estos dos compuestos (ácido oleanólico y ácido ursólico) involucran la inhibición de la actividad toxica de xenobióticos y la activación

del sistema inmune del organismo. Los ácidos oleanólico y ursólico son ademas ampliamente reconocidos como antiinflamatorios y antihiperlipidemicos. [24,25]

Algunas de las actividades que presentan el ácido oleanólico y el ácido ursólico, ademas de las mencionadas, son: antiulcerica, cardiovascular, gastroprotectiva, anti-HIV, antiarteroesclerosa e inmuno-reguladora. Aunque son interesantes por sus actividades antitumorales y quimiopreventivas.

Ambos compuestos actuan en varios estados en el desallorro tumoral, incluyendo inhibición de tumor, inhibición de la promoción tumoral y la metastasis. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual actúa no se ha determinado de forma clara.

Los ácidos ursólico y oleanólico son relativamente no tóxicos pudiendo ser utilizados clinicamente como agentes quimiopreventivos.[26] Como la mayoria de los triterpenos pentacíclicos de origen natural muestran ser relativamente no toxicos.[24,25]

El uso de los ácidos ursólico y oleanólico han sido recomendados en terapias contra el cancer de piel.[27] Preparaciones cosmeticas que contienen ursólico y oleanólico han sido patentadas en Japón para la prevención del cancer de piel por uso topico. Preparaciones farmaceuticas que contienen ácido oleanólico estan patentadas para el tratamiento de leucemia no linfática [28]

Hay un gran interés creciente en la determinacion del papel biológico de ambos compuestos triterpenicos, suscitando un gran interés en la comunidad cientifica por los efectos farmacológicos que presentan combinados con su baja toxicidad. Muchos de los efectos terapeuticos que muestran han sido confirmados por las investigaciones científicas que actualmente se están llevando a cabo.[29]

La biodisponibilidad de los triterpenos es limitada gracias a la solubilidad que presentan estos compuestos, varios estudios pretende aumentar la solubilidad mediante la derivatización hemisintética.[30]

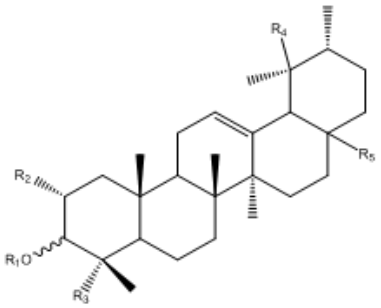


Figura Nº 2. Estructura del ácido ursólico y sus derivados.

Tabla Nº 2. Ácido ursólico y sus derivados.

	R1	R2	R3	R4	R5
Ácido ursólico	α-OH	H	H	H	CO_2H
Ácido pomólico	β-OH	H	H	OH	CO_2H
Ácido 19α-hidroxi-ursólico	α-OH	H	H	OH	CO_2H
Ácido 19α-24β-dihidroxi-ursólico .	α-OH	H	OH	OH	CO_2H
Uvanol	β-OH	H	H	H	CH_2OH
Ácido asiático	β-OH	OH	OH	H	CO_2H

El ácido ursólico (ácido 3β-hidroxiurs-12-en-28-oico) y sus derivados (Figura N°2, Tabla N°2) han mostrado efectos antitumorgenicos inhibiendo la promoción tumoral [31,32,33] y suprimiendo la angiogenesis.[34]

Es capaz de inducir la apoptosis de una gran variedad de lineas celulares cancerigenas incluyendo el cancer de mama, melanoma, hepatoma, carcinoma de prostata, y leucemia mieloide aguda.[35, 36, 37, 38]

Estos procesos tienen lugar por medio de la replicación del DNA,[39] inhibición de la tirosin quinasas,[40] e inducción de la liberación de calcio.[41, 42]

En cuanto a la citotoxicidad del ácido ursólico se llegaron a evaluar sobre distintas lineas cancerigenas *in vitro*, [43] probaron la actividad citotóxica del ácido ursólico contra las lineas celulares L1210 de roedor y las lineas humanas A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498 y HCT15.

Por otra parte el ácido ursólico posee una elevada actividad contra lineas celulares de leucemia y linfoma, siendo marcadamente efectivo contra una línea de linfoma IC50 (P3HR1) = 2,5 μg/mL, y las celulas de leucemia mielogena cronica IC50 (K562) = 17,79 μg/mL.[44]

3.5. Citotoxicidad.

Varios estudios realizados en toxicidad y actividad biológica de diversas moléculas que se llegan a aislar de productos naturales, se proceden con estudios de toxicidad, si estas moléculas sufrían procesos de modificación estructural estas moléculas mostraban una disminución o aumento en la toxicidad o actividad.

A mediados de los 90 se ha realizado varias pruebas con este fin y estudios específicos contra el VIH, tumorales, insecticida, bactericida entre otros. [45]

La mayoría de los reportes científicos sugieren utilizar métodos *in vitro* en las evaluaciones y estudios de toxicidad [46, 47]

En la actualidad, la toxicología ha alcanzado enorme trascendencia social debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental.

Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos es el caso de la llamada “toxicología reguladora”, rama dentro de la toxicología que se dedica a la legalización y armonización de todos los protocolos e informes de sustancias tóxicas a partir de normativas legales, disposiciones ministeriales por propia iniciativa o como cumplimiento de recomendaciones o directrices de organismos internacionales los cuales producen un extenso cuerpo legal de raíz toxicológica, ampliamente conocidas.[48]

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se

encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones.

Estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular. [49] La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. [50]

A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado numerosas pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. De los ensayos más conocidos y validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4, 5-dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).[51]

El objetivo de este trabajo es dar una visión panorámica del efecto citotóxico del ácido ursólico y sus dos derivados hemisintéticos, y realizar algunas consideraciones para cada uno de los compuestos analizados y su utilidad.

Se tuvieron en cuenta para los ensayos a realizar en la evaluación de la citotoxicidad, que están muy regulados, por lo que han sido unificados por la FDA en los Estados Unidos y en Europa siguiendo la norma ISO 10993.5 [52]

3.6. Inflamación.

De las muchas enfermedades que se manifiestan en la humanidad, las que están asociadas a los procesos inflamatorios, representan un importante grupo.

La mayoría de las infecciones involucran procesos inflamatorios como respuesta natural ante traumas físicos y alergias, en muchos casos incapacitan a quienes la padecen, en

determinadas enfermedades infecciosas importantes, la respuesta inflamatoria puede causar más daño que el agente agresor. En la tabla N^{o} 3, mencionamos algunos ejemplos de enfermedades inflamatorias [53]

Tabla Nº 3. Ejemplos de enfermedades inflamatorias. [53]

Enfermedades en las que la inflamación juega una papel patogénico importante	
Anafilaxis	Gota
Artritis reumatoide	Lupus eritematoso
Asma	Osteoartritis
Aterosclerosis	Pénfigo
Colitis ulcerosa	Psoriasis
Dermatitis atópica	Rechazo xenoinjerto
Enfermedad de Alzheimer	Sarcoidosis
Enfermedad de Crohn (enteritis regional)	Síndrome Isquemia - reperfusión
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica(EPOC)	Síndrome Fiebre periódica
Esclerosis múltiple	Tiroiditis de Hashimoto
Espondilitis anquilosante	Vasculitis

Como consecuencia, existe una gran necesidad de descubrir y desarrollar nuevos agentes antiinflamatorios más seguros y eficaces. [54]

En principio la inflamación es la respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es liberar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias de la misma.

Si no existiera el proceso de inflamación, las infecciones se propagarían de forma incontrolada, las heridas no sanarían nunca y los órganos lesionados presentarían lesiones supurativas de forma permanente [55]

3.6.1. Signos clínicos de la inflamación.

En el siglo I después de Cristo, el escritor Romano Celsus, fue el primero quién descubrió los cuatro signos cardinales de la inflamación: rubor (enrojecimiento), tumor, calor y dolor. Posteriormente se añadió el quinto signo clínico: perdida de la función. El dolor es producido por muchos estímulos, que se clasifican en mecanismos térmicos y

químicos, los cuales son captados por terminaciones nerviosas libres. El tumor es debido a la exudación en el foco inflamatorio y acumulo de elementos uniformes, proceso que tiene como base un aumento en la permeabilidad capilar. El rubor y el calor son debido a la hiperemia. La alteración funcional, se da como consecuencia de la tumoración y del dolor (Figura N^{o} 3). [52]

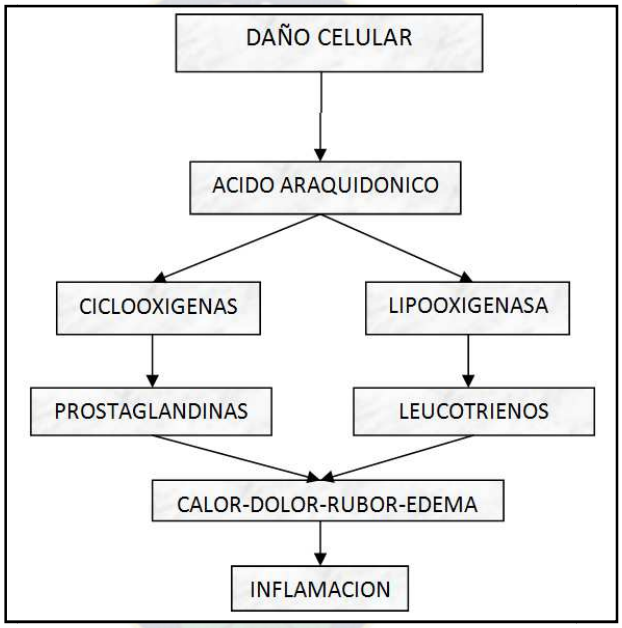


Figura Nº 3. Resumen esquemático del proceso inflamatorio. [52]

3.6.2. Clasificación de la inflamación.

Por lo general la inflamación se clasifica en aguda y crónica. La inflamación aguda tiene una duración relativamente corta, desde varios minutos, horas o algunos días. La crónica en cambio aparece si la causa de la inflamación continua o bien como una respuesta prolongada de bajo grado sin episodio agudo anterior.

Las células implicadas en cada uno de los casos son distintas, de tal forma que la inflamación aguda se caracteriza por infiltración de neutrófilos, mientras que la inflamación crónica las células infiltradas son principalmente los linfocitos. En ambos casos también se produce extravasación de monocitos. [57]

3.6.2.1. Inflamación aguda.

La inflamación aguda se inicia en el momento que el agente patogénico (microorganismos, sustancias químicas alérgicas, entre otros) evade o destruye las barreras defensivas primarias (piel y mucosas).

El daño en el tejido desencadena la activación de determinadas rutas de señalización que llevan a la producción de mediadores pro-inflamatorios. Dichos mediadores causan los cambios fisiológicos característicos del proceso inflamatorio. Estos cambios se manifiestan en el incremento del riego sanguíneo al tejido dañado y la extravasación de células y proteínas hacia el foco inflamatorio. [53] Los cambios que se producen tras la lesión tisular se deben a: un aumento en el flujo y calibre vascular; cambios estructurales en los vasos sanguíneos que aumentan la permeabilidad vascular e inducen la formación de exudado inflamatorio (paso de leucocitos del espacio vascular al extravascular para alcanzar el foco de las lesiones que a de fagocitar).

El resultado de todo ello es el acumulo de fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos. [55]A medida que el daño se elimina, la liberación de mediadores antiinflamatorios aumenta y de este modo se reduce significativamente la inflamación y el tejido se regenera. [53]

3.6.2.2. Migración leucocitaria.

Inicialmente, en la inflamación aguda se acumulan predominantemente los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares y en las fases tardías, los monocitos y macrófagos. Hay tres fases para el reclutamiento de las células en la región dañada, es decir, la extravasación de las células desde la luz del vaso al espacio intersticial. [55]

Normalmente las células ocupan la parte central del torrente sanguíneo teniendo muy poco contacto con el endotelio.

Al aumentar la permeabilidad vascular, el flujo sanguíneo disminuye, lo que permite a los leucocitos acercarse al endotelio vascular. Este proceso se denomina marginación y se debe a los cambios hemodinámicos producidos en la inflamación (Figura N°4).

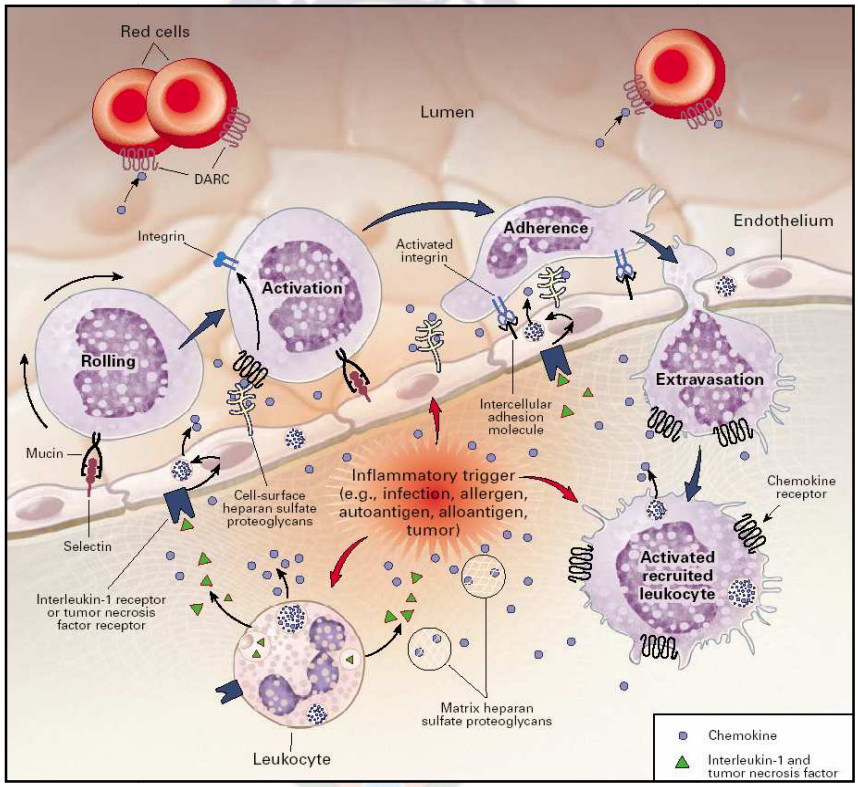


Figura Nº 4. Cascada de migración leucocitaria. [55]

Los leucocitos escapan del torrente circulatorio mediante un movimiento ameboideo activo, cuando los leucocitos entran en contacto con la célula endotelial, proyectan pseudópodos y migran por la superficie hasta que detectan una unión celular Inter-endotelial.

El paso desde la luz vascular al tejido extravascular, el leucocito rompe las uniones inter-endoteliales y la membrana basal probablemente a través de la secreción de colagenasa. [58]

El tipo de leucocito que migra depende mucho del tiempo que dura la inflamación y el tipo de estimulo. En la mayoría de los casos, en la inflamación aguda los neutrófilos son las células predominantes durante las primeras 24 horas.

Estas células empiezan a acumularse en los primeros minutos tras la lesión, mientras que los monocitos y los macrófagos se acumulan más tarde, tras 24 horas.

Después de la extravasación, los leucocitos migran en los tejidos a los lugares donde se ha producido la lesión mediante el proceso de quimiotaxis. No obstante, los procesos de inflamación y reparación pueden ser perjudiciales. Es decir las reacciones inflamatorias constituyen el mecanismo básico de las reacciones de hipersensibilidad potencialmente mortales secundarias al efecto de picaduras e insectos, fármacos o sustancias toxicas, y también lo son de algunas de las enfermedades crónicas más frecuentes de la actualidad como la artritis reumatoide, la aterosclerosis y la fibrosis pulmonar. [58]

3.6.2.3. Tratamiento.

En el tratamiento de los procesos inflamatorios, no solo tiene importancia conseguir una buena analgesia, sino poder controlar otros aspectos derivados de este proceso; formación de edema, la extravasación plasmática y la migración leucocitaria que caracteriza la zona inflamada. Hasta el momento se ha utilizado de manera común aunque muy controvertida, los antiinflamatorios esteroideos y los antiinflamatorios no esteroideos, que inhiben los efectos vasculares (vasodilatación, formación de edema y la migración leucocitaria), aunque los efectos colaterales son frecuentes. [59]

3.6.2.4. Antiinflamatorios no esteroideos.

Los antiinflamatorios no esteroidales (AINES) constituyen el grupo de fármacos los cuales inhiben la actividad de la ciclooxigenasa que está compuesta por las dos isoenzimas: la COX 1 y la COX 2 o prostaglandin sintetasa, las mismas que participan en el metabolismo del acido araquidonico hasta prostaglandinas y tromboxanos (figura 5). [60, 61]

La COX 2, que se expresa a los procesos inflamatorios (inducida) y otros mediadores y estimula la síntesis de prostaglandinas que producirán fiebre, dolor o inflamación [62]
Los AINES, además de ser un grupo de medicamentos más consumido en el mundo, son los causantes de la mayoría de los efectos adversos de acuerdo con los reportes elaborados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos. Los efectos adversos indeseables más comunes son los daños gastrointestinales y renales que con frecuencia son peligrosos.

3.6.2.5. Antiinflamatorios esteroideos.

Los antiinflamatorios esteroidales (AIE) disminuyen la inflamación en un tiempo relativamente breve, por estimular la síntesis de lipocortina y esta a su vez inhibe la actividad de la fosfolipasa A2 y la inducción de diversas citocinas pro-inflamatorias.

Estos fármacos impiden la liberación del ácido araquidonico de los fosfolipidos de las membranas celulares que sirve de sustrato para los diferentes sistemas enzimáticos que dan lugar a los mediadores pro-inflamatorios lipidicos, conocidos como eicosanoides (Figura N°5) a pesar de la potente acción antiinflamatoria que le es atribuida, estos fármacos presentan numerosos efectos adversos. [63]

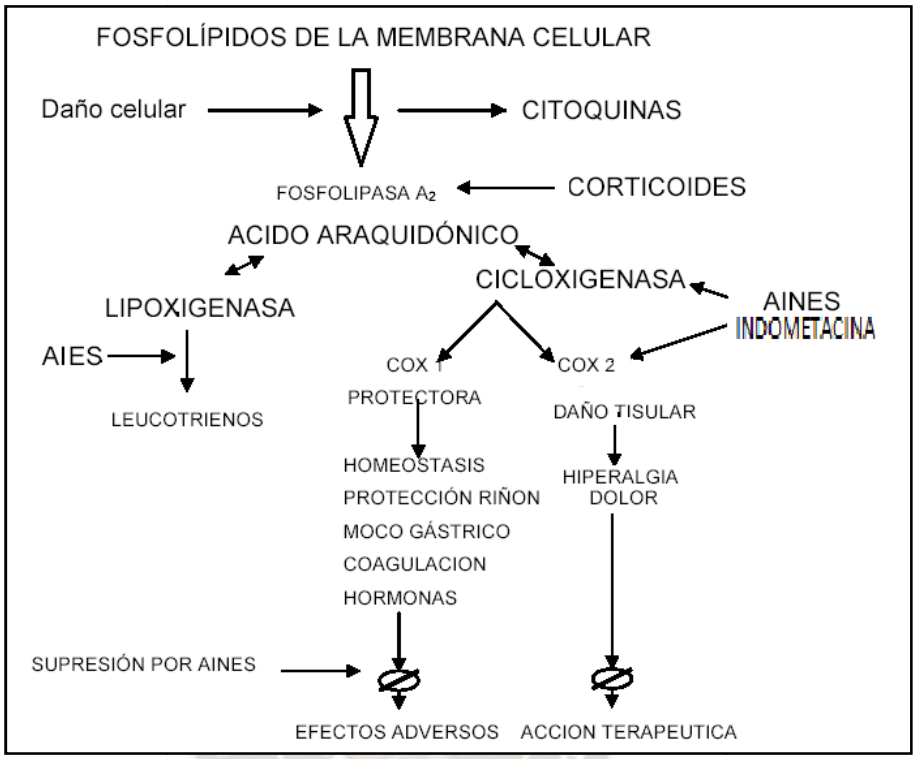


Figura Nº 5. Mecanismo de acción de los antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. [63]

3.7. Mecanismo de acción de la indometacina.

La indometacina es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas y de la migración de leucocitos a áreas inflamadas. Además inhibe la fosfodiesterasa interfiriendo con la producción de anticuerpos. [64] Como otros AINES reduce el dolor a nivel periférico, al disminuir la sensibilización de los receptores del dolor. Acción antipirética por inhibición de prostaglandinas hipotalámicas.

3.7.1. Propiedades farmacodinámicas.

Los antiinflamatorios no esteroidales inhiben las prostaglandinas, por su efecto bloqueador de la enzima COX. La ciclooxigenasa tiene dos isoenzimas denominadas COX1 y COX2, que son codificadas por distintos genes.

La COX1 interviene en la formación de PGI, la cual tiene un efecto antitrombogénico y protector de la mucosa gástrica.

La COX2 es una enzima que se encuentra únicamente en los tejidos inflamados, los niveles de esta enzima, aumentan por influencia de fibroblastos, citoquinas, etc. Además, los AINE impiden la agregación plaquetaria al inhibir la formación de TXA_2. [64]

3.7.2. Propiedades farmacocinéticas.

La indometacina por vía oral se absorbe fácil y rápidamente. El fármaco alcanza concentraciones plasmáticas a las dos horas en un sujeto en ayunas y se une en un 90 % a las proteínas. La indometacina se distribuye ampliamente en todos los tejidos y alcanza concentraciones iguales a las del plasma en el líquido sinovial, mientras que la concentración en el LCR es pequeña. El fármaco es metabolizado en el hígado donde se forman metabolitos inactivos por O-desmetilación, conjugación con ácido glucurónico y por N-desacetilación. Los metabolitos inactivos son eliminados por la bilis, heces y orina (10% sin cambios). Debido a que el fármaco sufre recirculación entero hepática la vida media plasmática es variable.[65]

3.7.3. Efectos adversos.

Los AINE, tienen en común, varios efectos colaterales que se deben a que inhiben la enzima COX estas se pueden clasificar en dos grupos:[66, 67]

Relacionados con la inhibición de las prostaglandinas.

- Reacciones de hipersensibilidad: urticaria, angioedema, síndrome asmatiforme (causados por los leucotrienos); reacciones de fotosensibilidad que se presentan con los peroxicanos.

- Efectos gastrointestinales: anorexia, náusea, vómito, dispepsia, diarrea y úlcera gástrica.
- Efectos renales: toxicidad renal, que se presenta, sobre todo, en pacientes con insuficiencia renal previa, puede aparecer en forma de síndrome nefrótico o nefrítico intersticial.

No relacionados con las prostaglandinas.

- Efectos hepáticos: aumento de las transaminasas, toxicidad hepática en pacientes con hepatopatías y en tratamientos prolongados; necrosis hepática mortal, solo se ha reportado con el uso de pirazolonas.
- Efectos neurológicos: hipersomnia, cefalea, vértigo, irritabilidad, depresión, alucinaciones, meningitis aséptica.
- Efectos sobre los órganos de los sentidos: tinitus, disminución de la audición.
- Efectos hematológicos: trombocitopenia, agranulocitosis y anemia aplásica, que se ha reportado, principalmente, con el uso de la fenilbutazona y del metamizol, por lo que su administración se ha suspendido. Otro de los efectos hematológicos adversos, es la prolongación del tiempo de hemorragia, por su acción sobre el TXA_2.
- Efecto sobre el útero grávido: prolongación del trabajo de parto.
- Otros efectos: síndrome de Stevens-Johnson, pseudoporfiria, miopatía hipocalémica.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

Estudio químico y biológico del compuesto mayoritario “ácido ursólico” de la *Satureja boliviana* y de dos derivados hemisintéticos del ácido ursólico

4.2. Objetivos específicos.

- Establecer un método de extracción de los metabolitos secundarios mayoritarios de la especie vegetal *Satureja boliviana* (Benth) Briquet.
- Aislamiento e identificación del compuesto mayoritario de la especie *Satureja boliviana* (Benth) Briquet.
- Obtención de dos derivados hemisinteticos del ácido ursólico.
- Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria (*in vivo*) del ácido ursólico y sus dos derivados hemisinteticos respectivamente.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1. Fitoquímica.

5.1.1. Muestreo, recolección, desecado, molturación y conservación.

La especie vegetal *Satureja boliviana* (khoa) se recolectó en la localidad de Desaguadero, Provincia Omasuyos a 3800 m.s.n.m. orillas del lago Títicaca, la recolección se la realizó en el mes de Febrero (primavera) cuya zona de recolección presenta poca perturbación antropogénica. La recolección se realizó con el uso de guantes de piel (cuero), tijeras, overol, y bolsas de tucuyo, las cuales fueron inmediatamente llevadas a un recinto y extendidas, secadas bajo sombra sin la exposición de la luz solar, durante 14 días. Inmediatamente se procedió a la separación de las hojas de los tallos evitando el contacto con la piel. Posteriormente se procedió a la molturación de las hojas y tallos. Finalmente su almacenamiento y conservación.

5.1.2. Extracción de aceites esenciales.

La extracción de los aceites esenciales se lo realizó de 1200 g. de las hojas de la planta por medio de la técnica de arrastre de vapor, en un equipo que se observa en la figura N^{o}6 (IIFB, IIPN).[68, 69]

Figura Nº 6. Equipo de extracción de aceites esenciales de la *Satureja boliviana.*

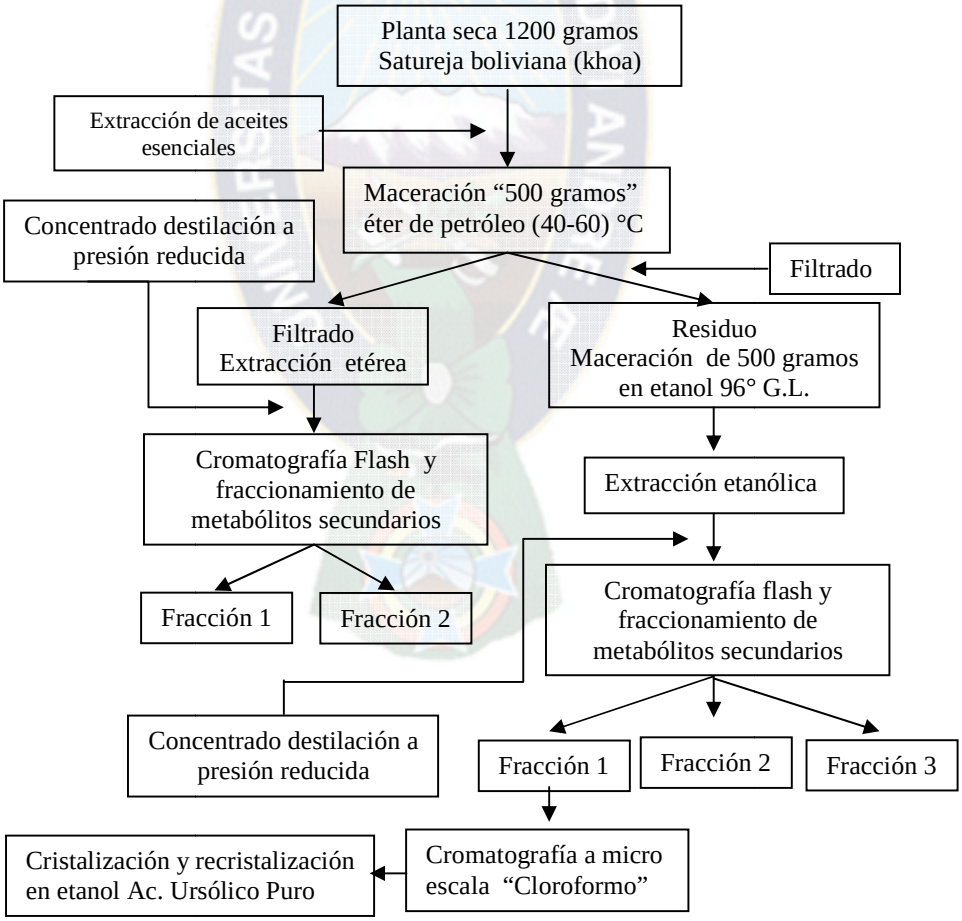


Figura Nº 7. Metodología de extracción del ácido ursólico a partir de la *Satureja boliviana.*

5.1.3. Extracción de los metabolitos secundarios.

La extracción de los metabolitos se la realizó luego de extraer los aceites esenciales. 500 gramos de las hojas ya procesadas, fueron secadas a temperatura ambiente bajo el flujo continuo de aire para luego iniciar la maceración (técnica de extracción sólido/líquido) en éter de petróleo (40-60) °C y una extracción final en Etanol 96º GL (Figura Nº7). Posteriormente se realizó una percolación en columna separando el metabolito mayoritario presente.

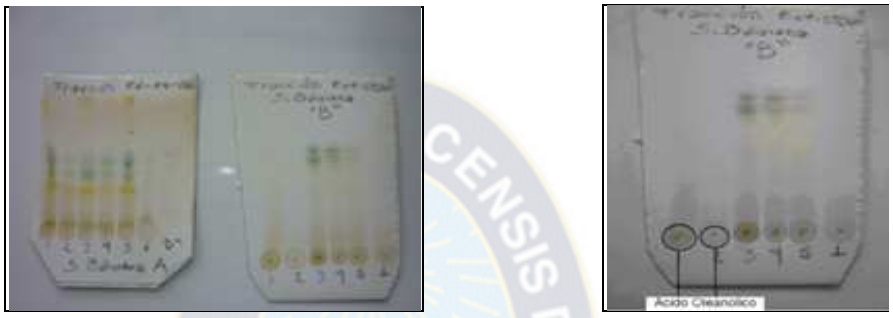
El aislamiento y purificación se realizó en una columna cromatográfica (Figura 8a) se utilizó como eluyente cloroformo, diclorometano y metanol.

El compuesto mayoritario muy soluble en cloroformo y cloroformo metanol (9:1) es la que recorre inicialmente por toda la columna separando así el compuesto mayoritario, a continuación se utilizó los solventes diclorometano y metanol aislando otros metabolitos (Figura 8b) sin embargo estas poseen un escaso rendimiento, el compuesto mayoritario presente en las dos primeras fracciones como único compuesto fueron recristalizados en etanol.

(a) (b)

Figura Nº 8. Procedimiento de separación del ácido ursólico. (a) Columna cromatografíca con sílice, (b) fracciones resultantes del fraccionamiento

El método utilizado es la cromatografía en capa fina unidimensional, en la figura N^{o} 9 se observa la corrida de las fracciones, las cuales muestran que el compuesto mayoritario se encuentra en las dos primeras fracciones (Figura N^{o} 9b).



(a) (b)

Figura Nº 9. Identificación del ácido ursólico en CCF (silicagel 254), fase móvil diclorometano; metanol (9,5; 0,5) de fracciones resultante de la cromatografía en columna. (a) CCF del extracto etéreo y el extracto alcohólico. (b) CCF extracto etanólico.

En la figura N^{o} 9a. se puede observar claramente que el ácido ursólico se encuentra en el extracto alcohólico y de manera poco significativa en el extracto etéreo.

La Técnica sigue la modalidad unidimensional ascendente de simple recorrido, una vez que se llega a evaporar el eluyente de las placas desarrolladas, se observan a la luz ultra violeta a longitudes de onda corta y larga. Posteriormente se la revela, con ácido sulfúrico al 30 % (revelador general). [70]

5.2. Elucidación estructural.

La identificación estructural de los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b se las realizó por medio de la espectroscopía RMN.

5.2.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), es una de las principales técnicas utilizadas en la elucidación de estructuras moleculares, ya que proporciona una detallada información del esqueleto de una molécula orgánica.

Al someter una molécula bajo un campo magnético de elevada energía, los núcleos como el ^{1}H, ^{13}C ó ^{15}N, paramagnéticos y movimiento de giros, el spin nuclear son orientados en dos direcciones posibles siendo la más estable aquella en que el movimiento magnético nuclear está orientado en la misma dirección que el campo magnético. Cuando estos núcleos se someten a la irradiación con radiación electromagnética llamada radiofrecuencia, de energía correspondiente a la diferencia entre ambas alineaciones se produce una transición de un estado a otro que constituye la señal de resonancia.

La resonancia magnética nuclear cuantifica la energía necesaria para orientar en contra del campo de dichos núcleos, energías que se registra en valores de desplazamiento químico δ (delta), partes por millón (ppm).

La cantidad de energía requerida para producir la alineación de un núcleo partícula depende de varios factores: intensidad del campo, configuración electrónica que rodea al núcleo, tipo de molécula e interacciones moleculares.

En la mayoría de los casos, los espectros de RMN se describen en términos de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento. El desplazamiento químico dependerá del la distribución electrónica que rodea al núcleo, produciéndose un ligero apantallamiento con respecto al campo aplicado.

Los núcleos pueden interactuar entre sí, produciendo desplazamientos mutuos de las líneas de resonancia formando multipletes, denominados acoplamiento spin-spin (*J*). La intensidad del acoplamiento se determina por el espaciamiento de los multipletes y se expresa en hertzios. Los acoplamientos protón-protón en compuestos alifáticos

generalmente se transmiten a lo largo de dos a tres enlaces, sin embargo cuando incluyen sistemas insaturados se intensifican los acoplamientos entre protones a gran distancia. Los disolventes que se utilizan para estas determinaciones son deuterados, donde se sustituyen los átomos de hidrogeno por deuterio para evitar interferencias.

En resumen, podemos decir que la técnica permite determinar el número, la naturaleza y el ambiente que rodea a los hidrógenos y a los carbonos de una molécula

Se pesan 15 mg del compuesto mayoritario aislado (ácido ursólico), soluble en cloroformo y se analiza por espectroscopia de resonancia magnética nuclear la que nos proporciona los espectros de RMN-^{1}H, RMN-^{13}C y DEPT-135, adicionalmente los espectros del experimento HMBC y HMQC. Se utilizó un espectrómetro Brucker Advanced 2, de 300 MHz para el ^{1}H y 75 MHz para el ^{13}C usando como disolventes $CDCl_3$, y como referencia el mismo solvente Cloroformo con (*J*=7,28)

5.3. Hemisíntesis del compuesto mayoritario BM-1.

5.3.1. Derivado hemisintético compuesto BM-1a.

Se ha disuelto 1,46 g. de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en 5 mL de ácido acético, durante 20 minutos hasta que todo el dicromato de potasio termine de disolverse, posteriormente se agrega 1,0 g. de ácido ursólico durante media hora hasta su disolución completa.

La reacción entre el dicromato de potasio y el ácido ursólico no se produce de manera inmediata, por lo tanto se procede a calentar levemente hasta llegar a una temperatura de 50 grados Celsius donde se observó que la solución presentó un aspecto turbio, luego de una hora a esa temperatura la solución presentó una coloración verde con precipitado de color blanco. Se observa que con la ayuda del calor y no sobrepasar a la temperatura de 50 °C, la reacción es acelerada de manera significativa (Figura N^{o} 10).

Figura Nº 10. Reacción de oxidación del ácido ursólico a 50ºC.

Posteriormente se filtra y se lava con agua destilada varias veces hasta la eliminación del Cr^{3+} (color verde), luego el producto es secado a 45 ºC durante 24 horas.

(a) (b)

Figura Nº 11. Secado y purificación del compuesto BM-1a (a) Secado del compuesto BM.1a. (b) El purificado del compuesto BM-1a.

El compuesto que se llega a obtener es de un color blanco (Figura N°11a), este producto se seca y se procede a la identificación en CCF la cual muestra dos componentes muy definidos (BM-1 y BM-1a) y se procede a la purificación por percolación a microescala usando como solvente el cloroformo (Figura N° 11b). Finalmente el compuesto es recristalizado en etanol y se almacena para su posterior identificación en el análisis instrumental de resonancia magnética nuclear donde se obtuvieron los espectros: NMR-^{13}C, NMR-^{1}H, HMQC, COSY H-H, HMBC y Dept-135.

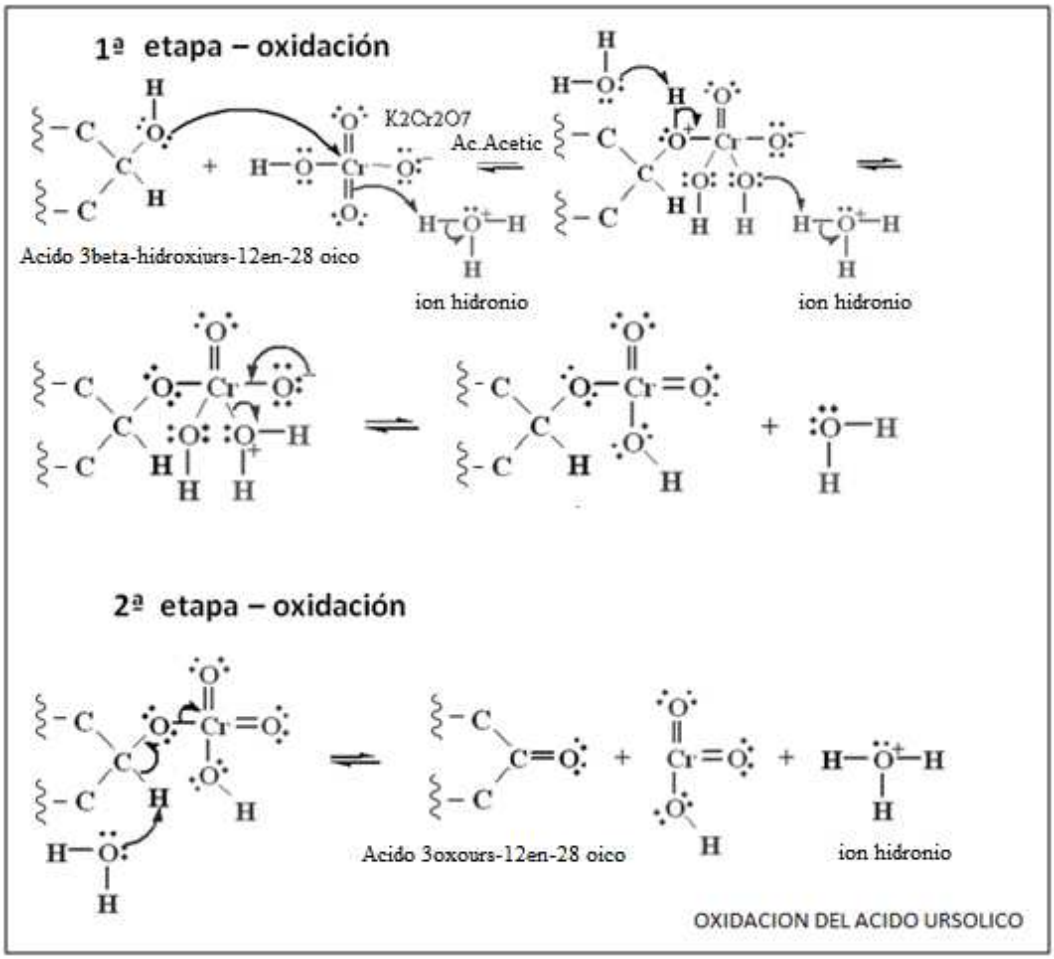


Figura Nº 12. Mecanismo de reacción de la oxidación del ácido ursólico (Compuesto BM-1a).

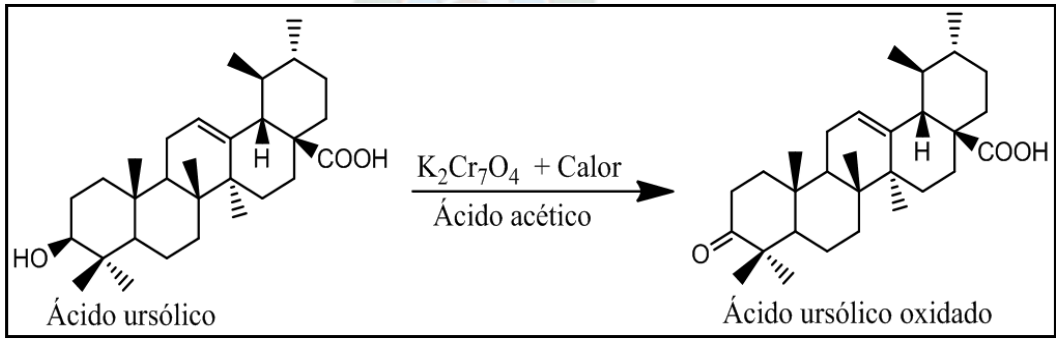


Figura Nº 13. Reacción resumida de la oxidación del ácido ursólico (Compuesto BM-1a).

El mecanismos de la reacción en la primera etapa sigue el mecanismo SN2 en un solo paso, posteriormente para la segunda etapa sigue el mecanismo E2. Que se aprecia en la Figura N°12. Corroborándose con los datos que se obtienen en la elucidación estructural posterior.

5.3.2. Derivado hemisintético del compuesto BM-1b.

Para la reacción de acetilación del ácido ursólico se empleo anhídrido acético en medio básico, método muy común para realizar procesos de síntesis y de análisis del índice de oxidrilos.

Para este método en particular se han disuelto 1,0 gramos de ácido ursólico en 10 mL de anhídrido acético durante 30 minutos hasta la disolución completa del producto (ácido ursólico) a constante agitación y elevando la temperatura del medio a 40 °C, posteriormente se agregó de manera suave y lenta (gota a gota) 0,1 mL de piridina.

La solución de la reacción presentó inicialmente un color amarillo, la reacción ocurrió por el lapso de 18 horas, en el transcurso de ese tiempo se observó que la solución cambio de aspecto, paso de color amarillo a la formación de un precipitado de color blanco/gris. Finalmente luego de las 18 horas, se filtro el precipitado formado, se lavo con agua destilada fría muy lentamente hasta eliminar el ácido acético producido.

Figura Nº 14. Eliminación de la piridina con etanol del compuesto (BM-1b) acetilado del ácido ursólico en un rota-evaporador Heidolph.

Para remediar el inconveniente de la presencia de la piridina en el precipitado, se procedió a disolver el producto en etanol 96 G.L. y se concentró a sequedad (Figura N^{o} 14) en un rota evaporador (destilación a presión reducida). Este proceso se llego repetir varias veces hasta eliminar la piridina.

El producto que se obtuvo fue analizado en CCF, donde se observó la existencia de dos productos (BM-1 y BM-1b), estos compuestos fueron separados a través de una columna cromatografica (micro escala) donde utilizó como eluyente cloroformo.

Esta técnica separó de manera eficiente ambos compuestos mostrando como producto mayoritario la acetilación del ácido ursólico. Finalmente el precipitado se recristalizó en etanol 96 G.L. El producto fué llevado al análisis instrumental de resonancia magnética nuclear obteniéndose los espectros de: NMR-^{13}C, NMR-^{1}H, HMQC, COSY H-H, HMBC y Dept-135.

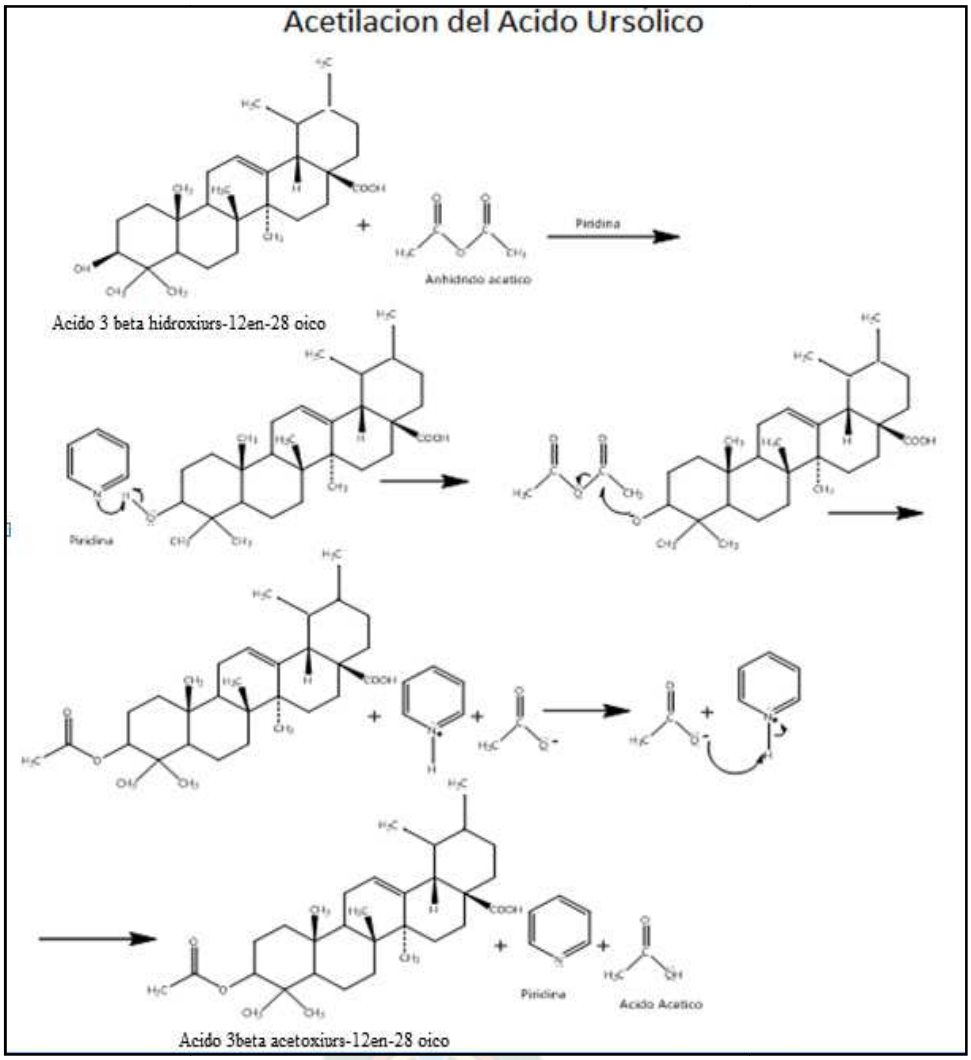


Figura Nº 15. Mecanismo de reacción de acetilación del ácido ursólico (Compuesto BM-1b)

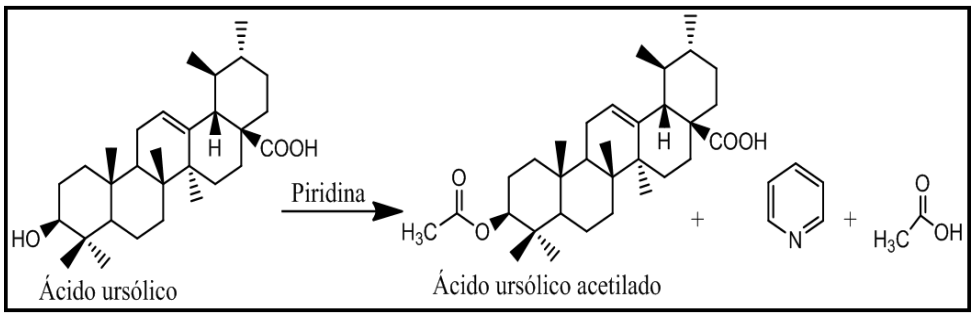


Figura Nº 16. Reacción resumida de la acetilación del ácido ursólico (Compuesto BM-1b).

En la figura N^{o} 15, muestra el mecanismo de reacción para la acetilación del ácido ursólico, reacción que sigue el mecanismo de sustitución nucleofilica SN1 en dos pasos (compuesto BM-1b).

5.4. Actividad biológica.

5.4.1. Modelo de citotoxicidad (*in Vitro*).

El modelo de citotoxicidad que se llevó a cabo en este trabajo, determinó de manera preliminar la toxicidad de los compuestos estudiados en eritrocitos de sangre periférica humana, dado que este modelo preliminar es muy sensible y práctico.

5.4.2. Modelo de inflamación (*in Vivo*).

Con la finalidad de realizar el estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria del ácido ursólico y sus dos derivados hemisinteticos, se eligió el modelo inicialmente descrito, anteriormente para rata, [71] posteriormente modificado para ratón, [72] es así que se eligió el modelo en ratón porque se utilizan menores cantidades de muestra, y por ser más económico.

5.4.2.1. Edema plantar inducido por carragenina.

Este modelo consiste en la administración subcutánea de una disolución de la carragenina (mucopolisacarido sulfatado extraída de la alga marina *Chondrus crispus*) a nivel de la aponeurosis plantar del ratón, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por la liberación de diversos autacoides (histamina, serotonina, bradicina, prostaglandinas, etc.); además, diversos factores que están implicados en la amplificación de la respuesta pre inflamatoria.

Una hora después de la administración de la carragenina, la histamina y serotonina tiene un papel fundamental como mediadores de la inflamación.

Pasada la hora y media, intervienen las cininas como mediadores, principalmente la bradicina que juega el papel de mantener el edema durante la fase intermedia. La última fase esta mediada por las prostaglandinas, fundamentalmente PGE y PGF.

La respuesta vascular ocurre aproximadamente a las 24 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 edematogeno.

Resulta que el modelo describe tres fases diferentes en el edema:

- Fase Primaria (1 hora).- Debida principalmente al efecto traumático de la inyección y la liberación simultanea de histamina y serotonina que ejercen su mayor efecto.

- Fase Secundaria (1 a 2,5 horas).- se debe en gran parte a la liberación de cininas.

- Fase Tardía (2,5 a 6 horas).- se caracteriza principalmente por la liberación de prostaglandinas, NO, radicales superóxido, posiblemente neuropeptidos y la máxima migración leucocitaria, compuestas por PMM (70%) y mononucleares (30%). [73]

Se ha seguido la técnica anteriormente descrita, [72] usando como patrón Indometacina, un AINE con alta actividad antiinflamatoria.

Se emplearon ratones albinos cepa Swiss adultos machos exocriados convencionales con un peso corporal promedio entre (25-30) gramos (Figura N^{o} 17).

Figura Nº 17. Medida del peso corporal de los ratones albinos Swiss.

Los animales se mantuvieron bajo un ciclo alterno de luz y oscuridad cada 12 horas, a temperatura de (20 – 25) ºC, con una dieta equilibrada en concentrados (pellets) y agua (ad libitum). Después del periodo de adaptación de 48 horas sin perturbación acústica los animales se separan en diferentes grupos: control positivo, control negativo, BM-1 (ácido ursólico), BM-1a (derivado 1) y BM-1b (derivado 2). Se separó en 5 grupos mencionados anteriormente, cada grupo con 5 ratones, a los cuales se marcaron en la cola de cada ratón especificando el número de ratón y su correspondiente peso. Inmediatamente se procedió a medir el diámetro plantar inicial de la pata derecha con un vernier digital (Figura N^{o} 18).

(a) (b) (c)

Figura Nº 18. Estudio de evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria *in vivo*. (a) Ratones separados en jaulas por grupos. (b) Vernier digital. (c) Edema producido en la región plantar.

Se administró solución fisiológica isotónica al grupo control negativo, al control positivo se administro 0,3 mL de una solución de indometacina a una dosis de 10mg/Kg de peso corporal una hora antes de producir el edema.

A los grupos restantes se administró 0,3 mL de las soluciones de los compuestos BM-1 (ácido ursólico), BM-1a (Derivado 1) y BM-1b (derivado 2) respectivamente.

Luego de haber transcurrido una hora se administro a los 5 grupos 0.05 mL de carragenina al 1,5 % disuelto en solución fisiológica isotónica en la aponeurosis de la pata derecha, donde se realizó la medición del diámetro plantar. Posteriormente se midió durante las primeras 5 horas.

Con los resultados hallados se determinó el porcentaje de inhibición de la reacción inflamatoria de la carragenina [72] El porcentaje de inhibición (Ec. 1) de la reacción inflamatoria de la carragenina se calcula en la fase aguda a la 1ra, 2da, 3ra, 4ta y 5ta hora de la inyección de la misma.

$$\%_0 \, Inhibición\ fase\ aguda = \frac{X_{\text{control}} - X_{problema}}{X_{control}} x^{100} \qquad \text{(Ec. 1)}$$

X control= diferencia del diámetro de la pata inflamada y la inicial a un tiempo determinado.
X problema= diferencia del diámetro de la pata con el fármaco o problema con la inicial

El porcentaje de inflamación (Ec. 2) se halló tomando en cuenta la máxima diferencia de inflamación de la pata administrada con carragenina como el cien por ciento de inflamación y la diferencia de la inflamación de la pata que contiene el fármaco o problema.

$$^{0}/_{0}\, Inflamación = \frac{x_i' - x_0}{X_i - x_0} x^{100} \quad \text{(Ec. 2)}$$

X_i' = Medida de la máxima inflamación

X_i = Medida de inflamación del fármaco o problema

X_o = Medida de la mínima inflamación

5.5. Análisis de datos.

Los resultados se expresan como la media aritmética y la media del error estándar de cada grupo y el análisis estadístico se realiza con la prueba t-student. Con niveles de probabilidad menores al 5% ($p<0.05$) fueron considerados como estadísticamente significativos.

El análisis estadístico realizado para las evaluaciones de la actividad antiinflamatoria se utilizó el software InfoStat v. 2.1 y SSPS v. 11,5

6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

6.1. Extracción y aislamiento del ácido Ursólico de la *Satureja boliviana* (khoa).

De la especie *Satureja boliviana*, se obtuvo los aceites esenciales de color amarillento cristalino mostrando el compuesto mayoritario, de acuerdo a la interpretación del espectro de IR (ANEXO C) cuyo rendimiento es 1.4 % (13,6 ml.) que corresponde a la Pulegona.

Se llegaron a obtener 12 gramos de ácido ursólico a partir de 500 gramos de la planta *Satureja boliviana*, con un 2,4 % de rendimiento.

6.2. Caracterización del compuesto BM-1 (ácido ursólico).

6.2.1. Características generales.

En la tabla N° 4, se resume las características y propiedades del compuesto BM-1 (ácido ursólico), la solubilidad de este compuesto es medianamente polar, poco soluble en agua.

Tabla Nº 4. Características del ácido ursólico (compuesto BM-1)

Propiedades	Compuesto BM-1 (ácido ursólico)
Aspecto	Cristales, blancos ligeramente amarillentos
Solubilidad	$CHCl_3$. CH_2Cl_2
Cristalización	Etanol

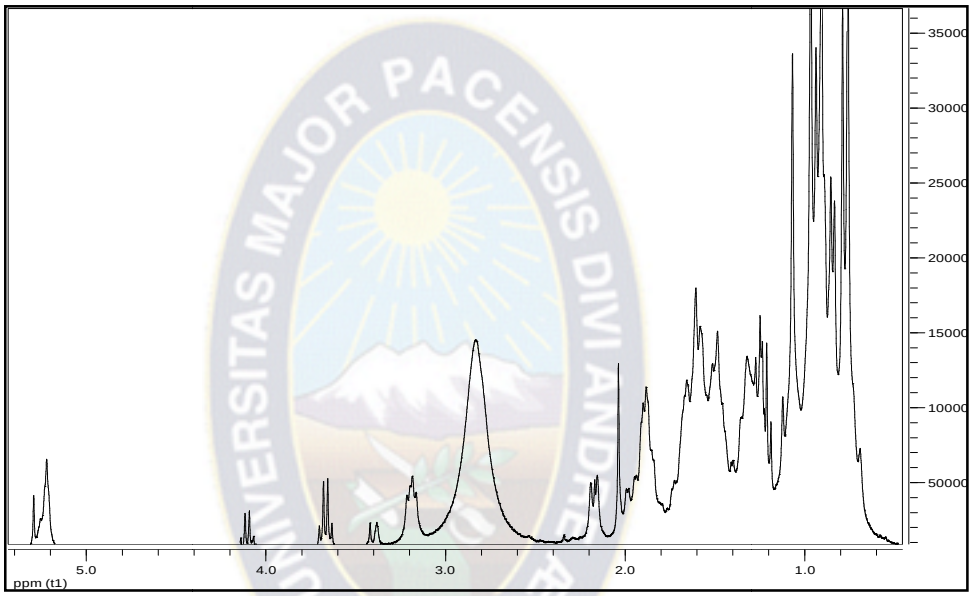
6.2.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.

La tabla N° 5, muestra los datos obtenidos en el espectro de RMN-^{1}H (Espectro 1) y las asignaciones respectivas.

Tabla Nº 5. Datos espectroscópicos de RMN-^{1}H del compuesto BM-1

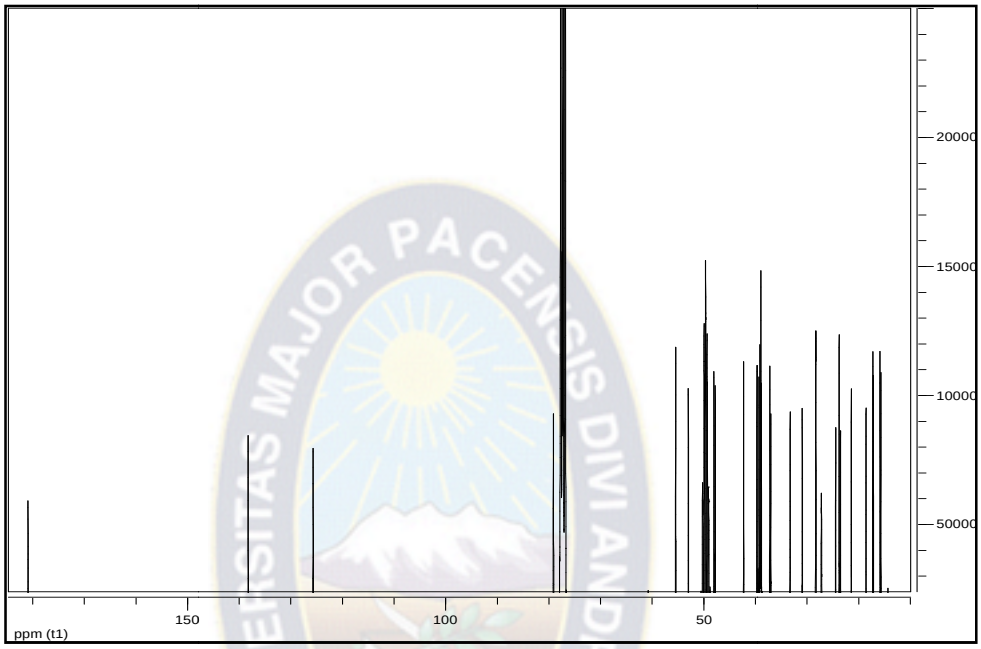
Señal δ_H(ppm)	Multiplicidad	Asignación
5,29	Triplete	CH
2,18	Triplete	CH
1,60	Singulete	CH_3
0,95	Singulete	CH_3
0,92	Doblete	CH_3
0,88	Singulete	CH_3
0,86	Doblete	CH_3
0,77	Singulete	CH_3
0,74	Singulete	CH_3

De acuerdo con el espectro de RMN-^{1}H (Espectro N^{o} 1) el compuesto BM-1 presenta 7 señales intensas cinco singuletes y dos dobletes cuyos desplazamientos químicos están entre δ_H=0,75-1,06 ppm que corresponden a los grupos metilo, en el rango de δ_H=1.1-5,29 ppm se encuentran las señales correspondientes a los grupos CH y CH_2.

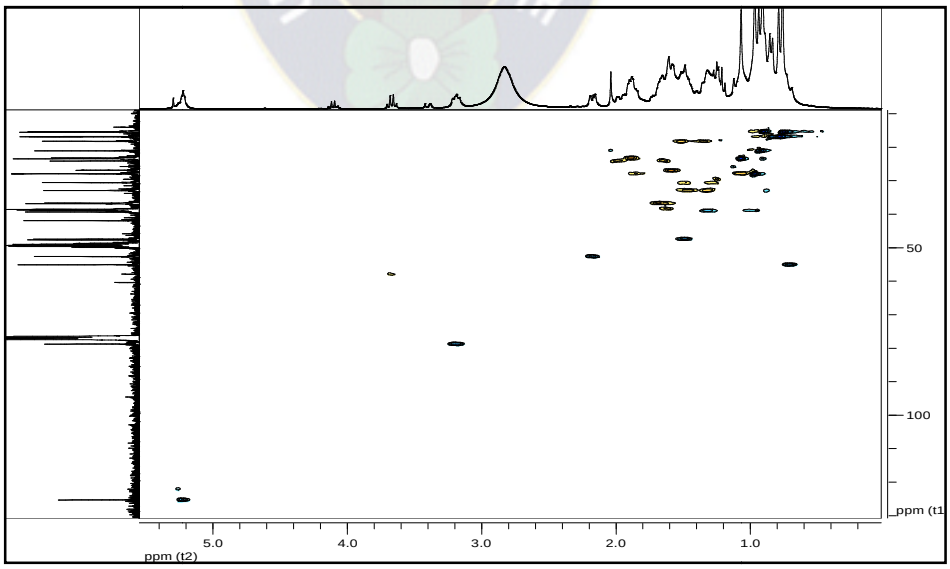


Espectro Nº 1. RMN- ^{1}H del compuesto BM-1, Solvente $CDCl_3$, 300 MHz, ref: $CDCl_3$ (*J*=7,28).

En el espectro de RMN-^{13}C (Espectro N^{o} 2) se muestra la presencia de 30 átomos de carbono.



Espectro Nº 2. RMN-^{13}C del compuesto BM-1, Solvente $CDCl_3$, 75 MHz, ref: $CDCl_3$ (*J*=77,1).



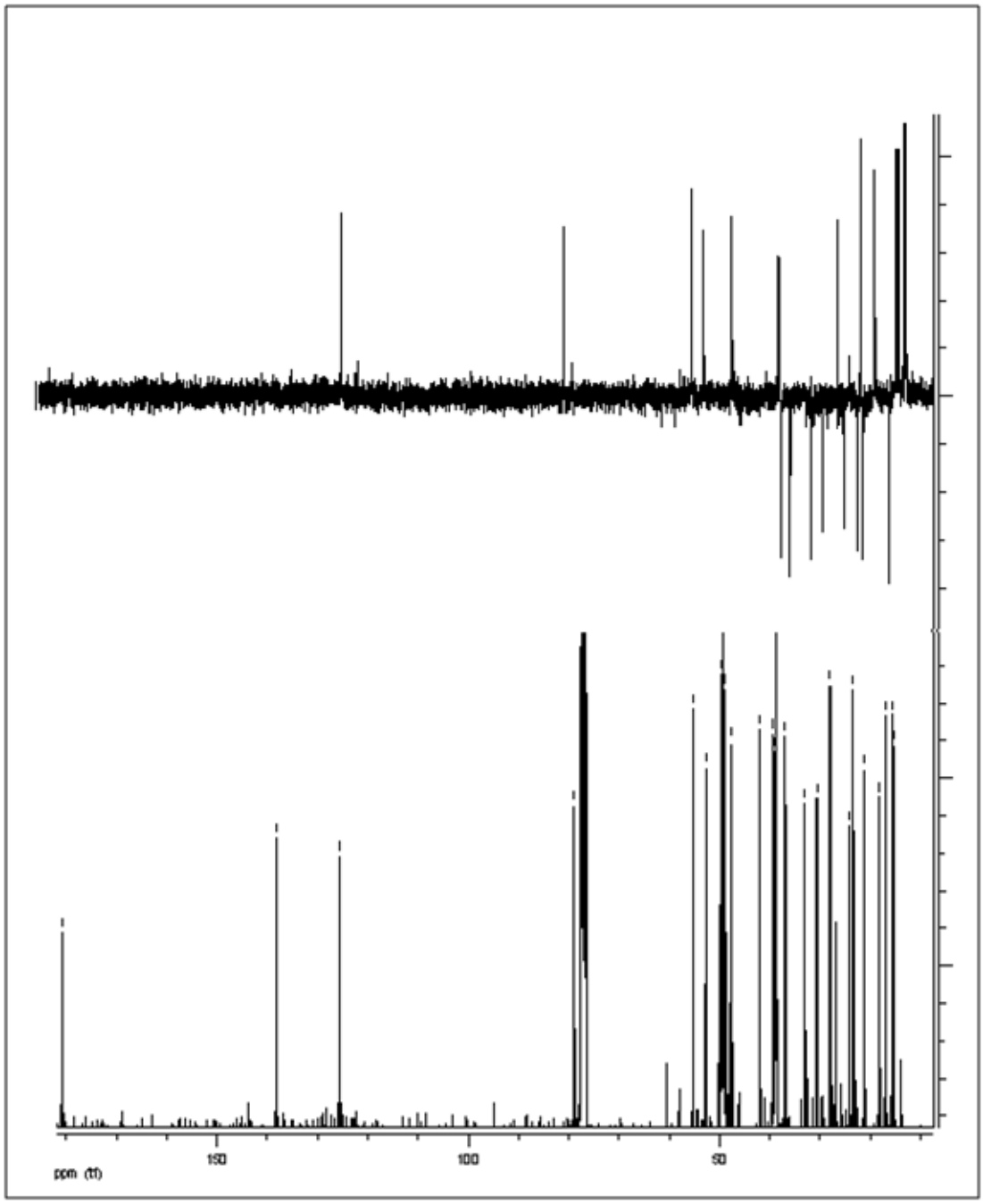
Espectro Nº 3. Experimento HMQC de correlación directa heteronuclear del compuesto BM-1, Solvente $CDCl_3$, 300 MHz para ^{1}H y 75 MHz para ^{13}C. ref: $CDCl_3$ (*J*=7,28 y J=77,1) para el ^{1}H y ^{13}C respectivamente.

En el espectro N° 3, (HMQC) podemos observar los picos de correlación de los átomos de carbono que están directamente acoplados a los protones (tabla N° 6).

Tabla Nº 6. Correlaciones heteronucleares directas dadas por el experimento HMQC para el compuesto BM-1

Señal δc = ppm	Señal δ_H = ppm
125,6	5,19
78,9	3,18
55,2	0,68
52,9	2,14
47,5	1,45
39,0	1,31
38,6	1,61
36,7	1,67
33,0	1,46
30,6	1,48
28,1	1,05
26,9	1,58
24,1	1,98
23,2	1,88
18,3	1,51
16,8	0,86
15,6	0,74
15,4	0,88
23,6	1,60
16,9	0,77
28,2	0,95

En el experimento DEPT -135 (Espectro N° 4) se observa que el compuesto presenta 7 carbonos cuaternarios **C**, 9 metilenos (**CH_2**), 7 grupos metilo (**CH_3**) y 7 grupos metino (**CH**) todos ellos resumidos con las asignaciones respectivas en la tabla N° 7, además de la comparación bibliográfica de las señales de ^{13}C. [74]

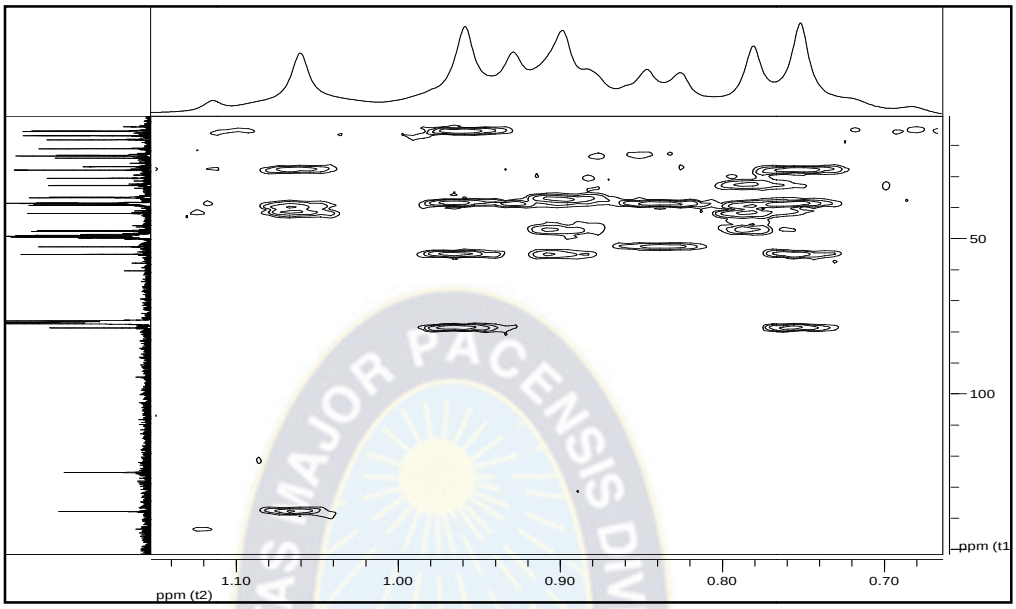


Espectro Nº 4. RMN-^{13}C y Experimento DEPT-135, del compuesto BM-1, Solvente $CDCl_3$, 75 MHz, ref: $CDCl_3$ (*J*=77,1).

Tabla Nº 7. Datos espectroscópicos del experimento DEPT-135, para el compuesto BM-1.

N°	Señal (BM-1) δc = ppm	Tipo	Señal (Ac. Ursólico) δc = ppm*
1	38,6	CH_2	38,26
2	26,9	CH_2	27,00
3	78,9	CH	76,90
4	38,7	C	38,40
5	55,2	CH	54,80
6	18,3	CH_2	18,02
7	33.0	CH_2	32,73
8	39,3	C	36,60
9	47,5	CH	46,84
10	36,9	C	36,62
11	23,2	CH_2	22,87
12	125,6	CH	124,60
13	138,2	C	138,20
14	42,1	C	41,66
15	28,1	CH_2	27,56
16	24,1	CH_2	23,83
17	47,8	C	47,04
18	52,9	CH	52,40
19	39	CH	38,52
20	38,8	CH	38,47
21	30,6	CH_2	30,21
22	36,7	CH_2	36,34
23	28,2	CH_3	28,28
24	15,6	CH_3	15,24
25	15,4	CH_3	16,10
26	16,8	CH_3	16,93
27	23,6	CH_3	23,29
28	180,7	C	178,3
29	16,9	CH_3	17,03
30	21,2	CH_3	21,10

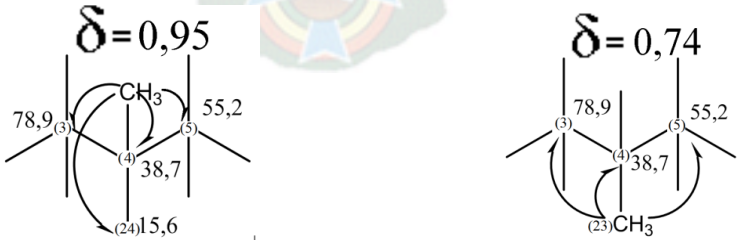
*Señales ^{13}C “Ciangherotti C., Buitrago D. y Morales A. 2004”



Espectro Nº 5. Experimento HMBC del compuesto BM-1, Solvente $CDCl_3$, 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C. ref: $CDCl_3$ (*J*=7,28 y J=77,1) Para el ^1H y ^{13}C respectivamente.

Las señales en el (HMBC) denotan claramente el acoplamiento a larga distancia de dos a tres átomos (Espectro N^o 5), con las siguientes correlaciones:

Los protones del grupo metilo de δ_H= 0,95 se acoplan con cuatro átomos de carbono CH_3, CH y C, δc=15,6; δc=55,2; δc=78,9 y δc=38,7 respectivamente ver figura N^o 19a. En la figura 19b, observamos que el protón del grupo metilo CH_3 δc= 0,74 acopla con los grupos CH y C. con δc= 55,2; δc=78,9 y δc=38,7 respectivamente.



(a) (b)

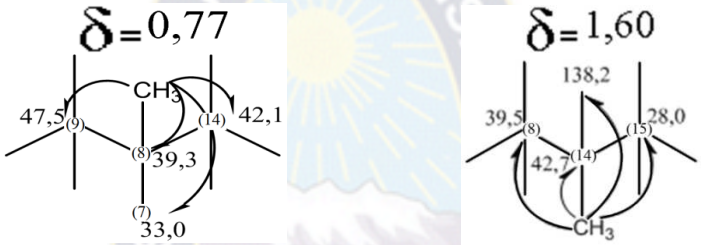
Figura Nº 19. Acoplamiento a larga distancia HMBC del protón de δ=0,95 y δ=0,74

(a) El protón del carbono CH_3 que acopla con los grupos (CH_3), (CH) y (C).

(b) El protón del grupo metilo que acopla con los grupos (CH) y (C).

Los protones del grupo metilo de δ_H=0,77 se acoplan con cuatro átomos de carbono CH_2, CH y C. con δc=33,0; δc=47,5; δc=39,3 y δc=42,1 respectivamente (Figura N° 20a).

En la figura N° 20b, observamos que el protón del grupo metilo CH δc= 1,60 acopla con cuatro átomos de carbono CH_2 y C. con δc= 28,0; δc=39,5; δc=42,7 y δc=138,2 respectivamente.



(a) (b)

Figura Nº 20. Acoplamiento a larga distancia HMBC del protón δ=0,77 y δ=1,06 (a) El protón del carbono CH_3 que acopla con los grupos (CH_3), (CH) y (C). (b) El protón del grupo metilo que acopla con los grupos (CH_2) y (C).

Las correlaciones, que proporciona el experimento HMBC, HMQC Y DEPT-135, además de los espectros RMN-^{1}H y RMN-^{13}C, construimos la estructura (Figura N° 21), que posteriormente la comprobamos con los datos bibliográficos.

Molécula que anteriormente esta descrita en publicaciones nacionales e internacionales. La figura N° 22 nos muestra la estructura química minimizada en el programa Hyperchem 7.0.

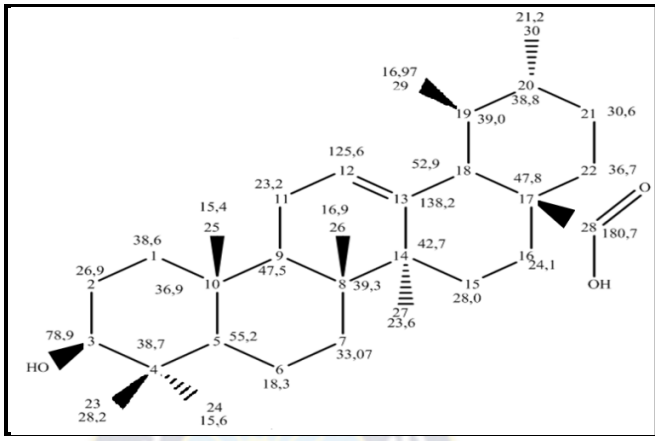


Figura Nº 21. Estructura del compuesto BM-1, con las asignaciones correspondientes de RMN-^{13}C

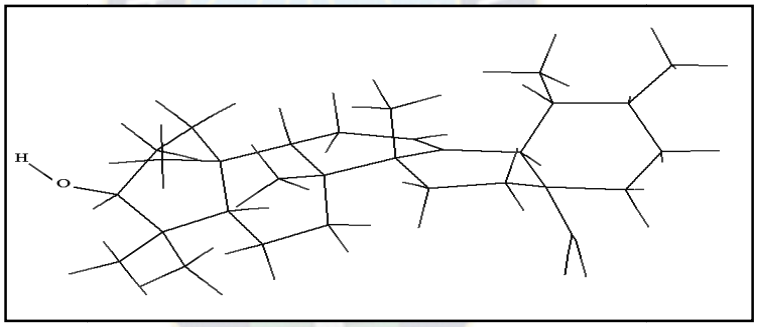


Figura Nº 22. Estructura del compuesto BM-1 (ácido ursólico).

6.3. Caracterización del compuesto BM-1a (oxidación del ácido ursólico).

6.3.1. Características generales.

En la tabla N^{o} 8, se resume las características y propiedades del compuesto BM – 1a.

Tabla Nº 8. Características del compuesto BM-1a (compuesto BM-1a).

Propiedades	**Compuesto BM-1a (oxidación del ácido ursólico)**
Aspecto	Cristales, blancos
Solubilidad	$CHCl_3$, CH_2Cl_2
Cristalización	Etanol

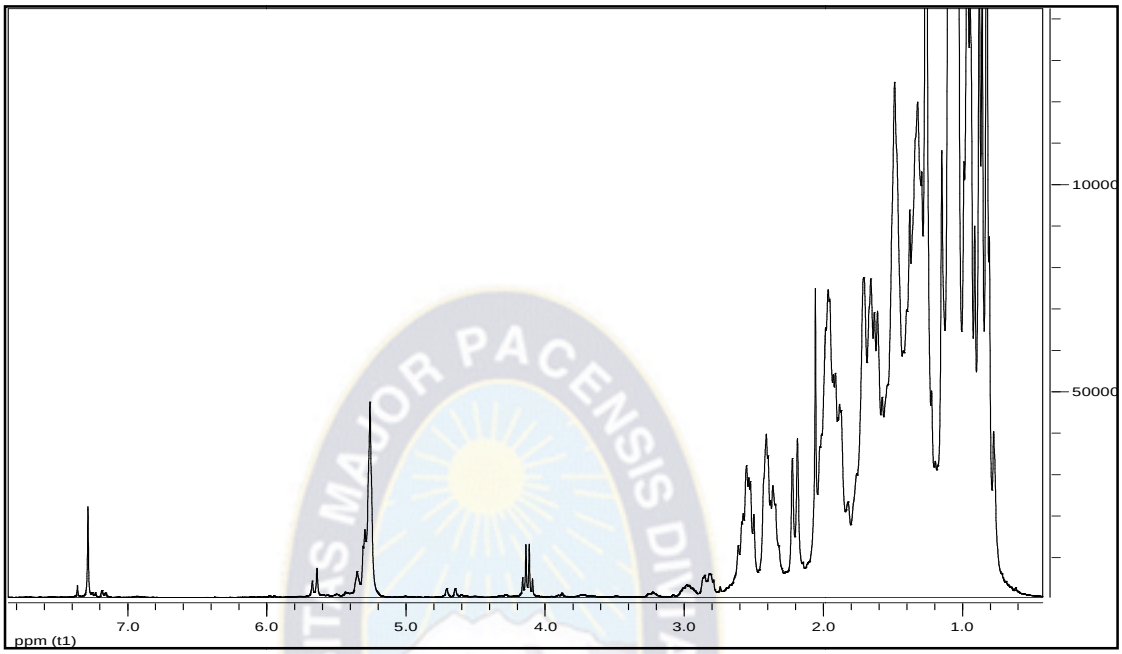
El rendimiento de la derivatización hemisintética del compuesto BM-1a es del 82 % aproximadamente, se llegó a obtener en una cantidad de 816 mg del compuesto oxidado, el cual fue sometido a la evaluación citotóxica y antiinflamatoria.

6.3.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.

Tabla Nº 9. Datos espectroscópicos de RMN-^{1}H del compuesto BM-1a.

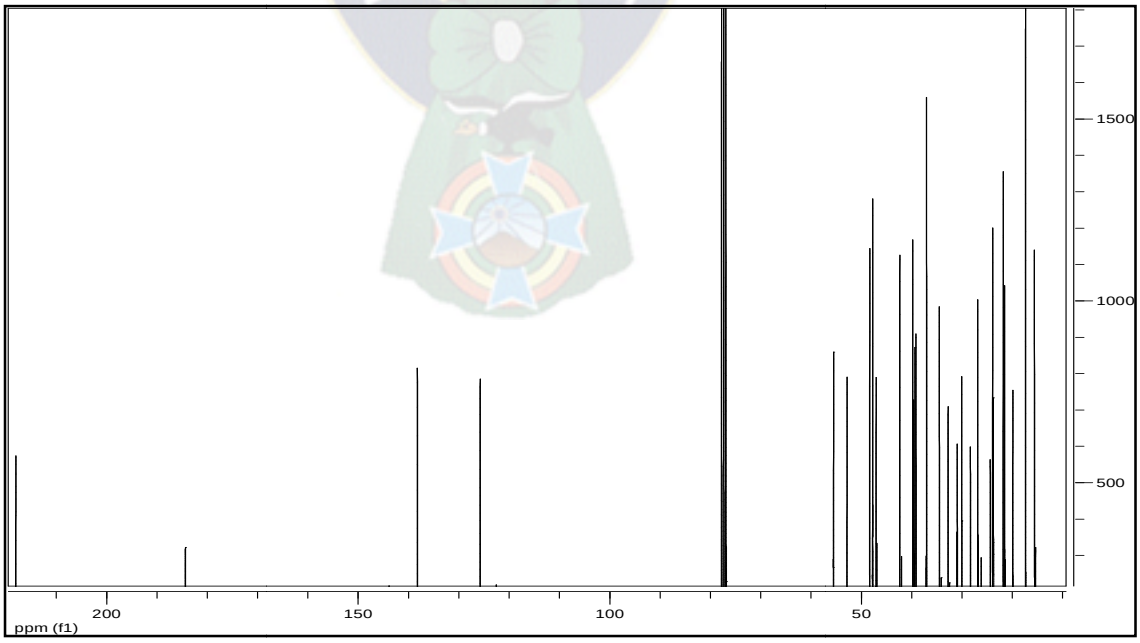
Señal δ_H(ppm)	Multiplicidad	Asignación
5,25	Triplete	CH
1,40	Triplete	CH_2
1,51	Multiplete	CH_2
1,08	Multiplete	CH_2
1,47	Singulete	CH_3
1,07	Doblete	CH_3
1,22	Singulete	CH_3
1,24	Singulete	CH_3
2,04	Doblete	CH_3
0,79	Singulete	CH_3
1,045	Singulete	CH_3

De acuerdo con el espectro de RMN-^{1}H (Espectro N^o 6) el compuesto BM-1a presenta 7 señales intensas cinco singuletes y dos dobletes cuyos desplazamientos químicos están entre δ_H= 0,79-2,04 ppm los cuales corresponden a los grupos metilo, en el rango de δ_H=0,95-5,65 ppm (Tabla N^o 9) se encuentran las señales correspondientes a los grupos CH y CH_2.

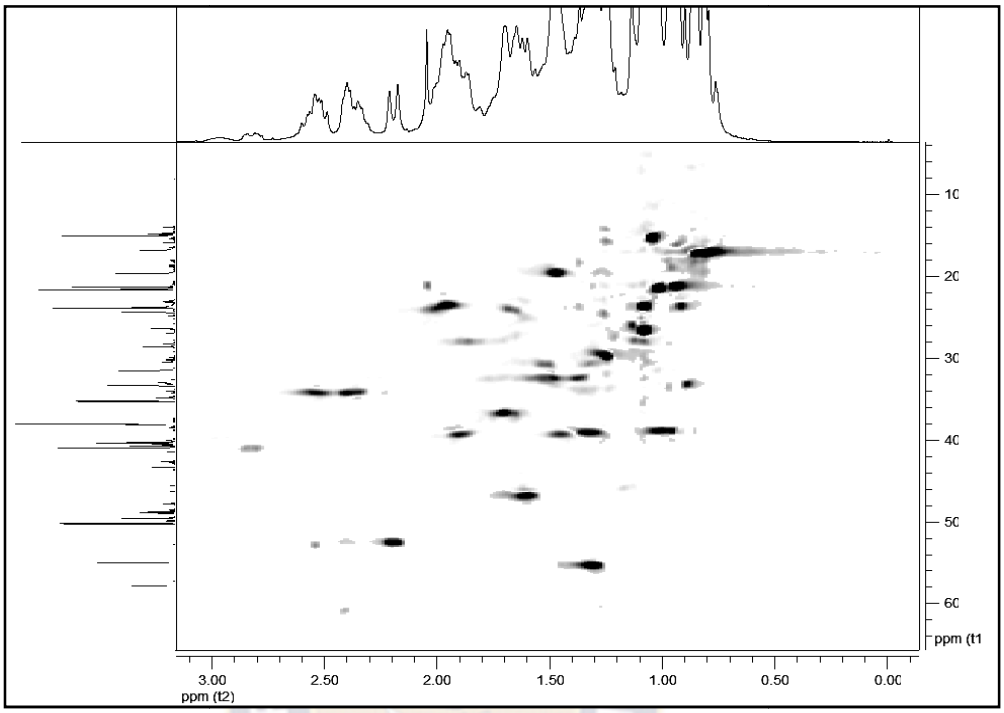


Espectro Nº 6. RMN- ^{1}H del compuesto BM-1a, Solvente $CDCl_3$, 300 MHz, ref: $CDCl_3$ (J=7,28).

Del espectro de RMN-^{13}C (Espectro N^{o} 7) se determinó la presencia de 30 átomos de carbono



Espectro Nº 7. RMN-^{13}C del compuesto BM-1a, Solvente $CDCl_3$, 75 MHz, ref: $CDCl_3$ (J=77,1).



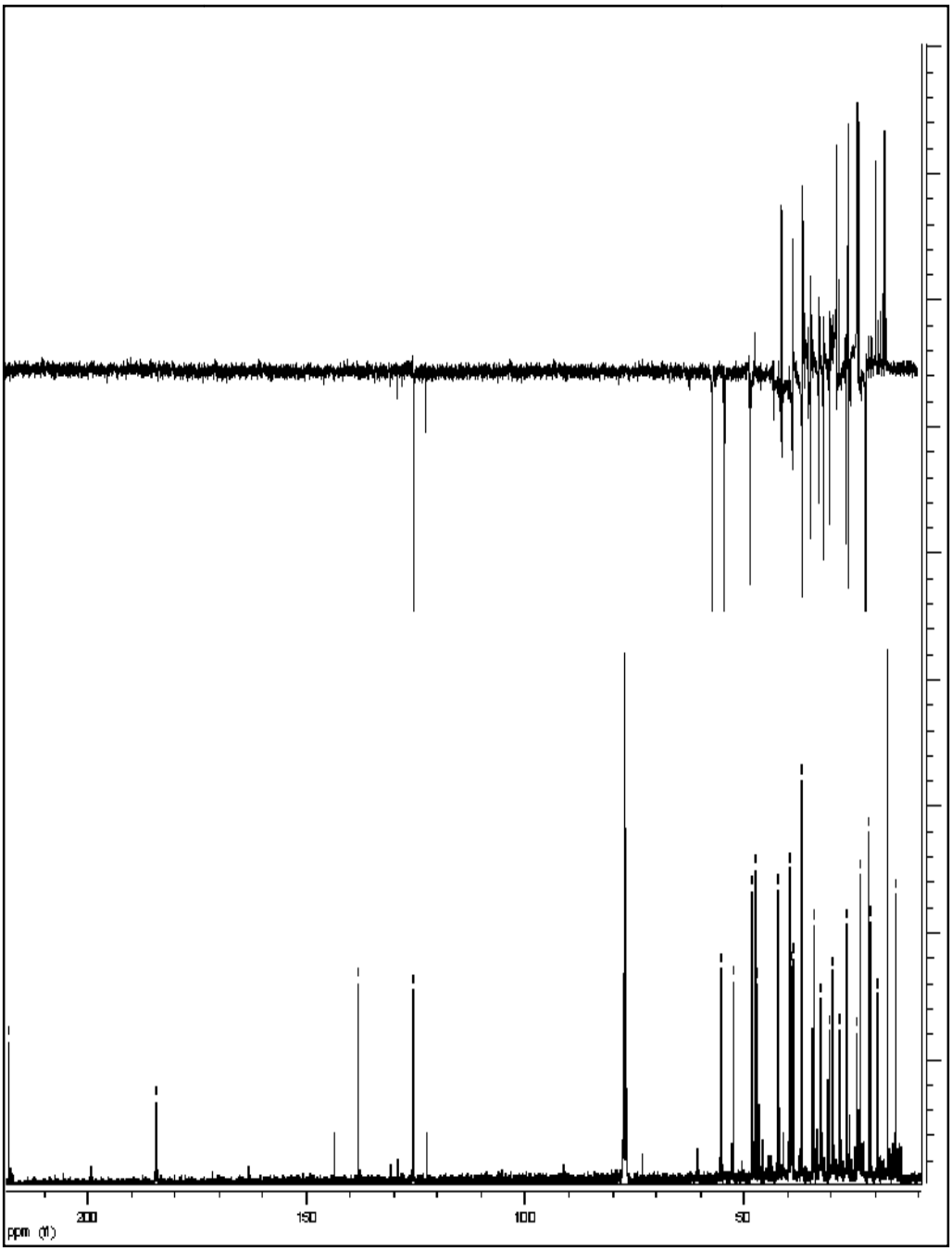
Espectro Nº 8. Experimento HMQC de correlación directa heteronuclear del compuesto BM-1a, Solvente $CDCl_3$, 300 MHz para ^{1}H y 75 MHz para ^{13}C. ref: $CDCl_3$ (*J*=7,28 y J=77,1) para el ^{1}H y ^{13}C respectivamente.

En el Espectro N^{o} 8, experimento (HMQC) podemos observar las señales directas de los átomos de carbono que acoplan a los protones, esto se detalla en la tabla N^{o} 10.

Tabla Nº 10. Correlaciones heteronucleares directas dadas por el experimento HMQC para el compuesto BM-1a.

Señal δc = ppm	Señal δ_H = ppm
125,7	5,25
55,2	1,33
52,6	2,16
28,01	1,07
24,01	1,62
19,54	1,47
23,4	1,07
29,7	1,65
34,16	2,50
15,6	1,24
21,18	2,04
16,9	0,79
16,01	1,04

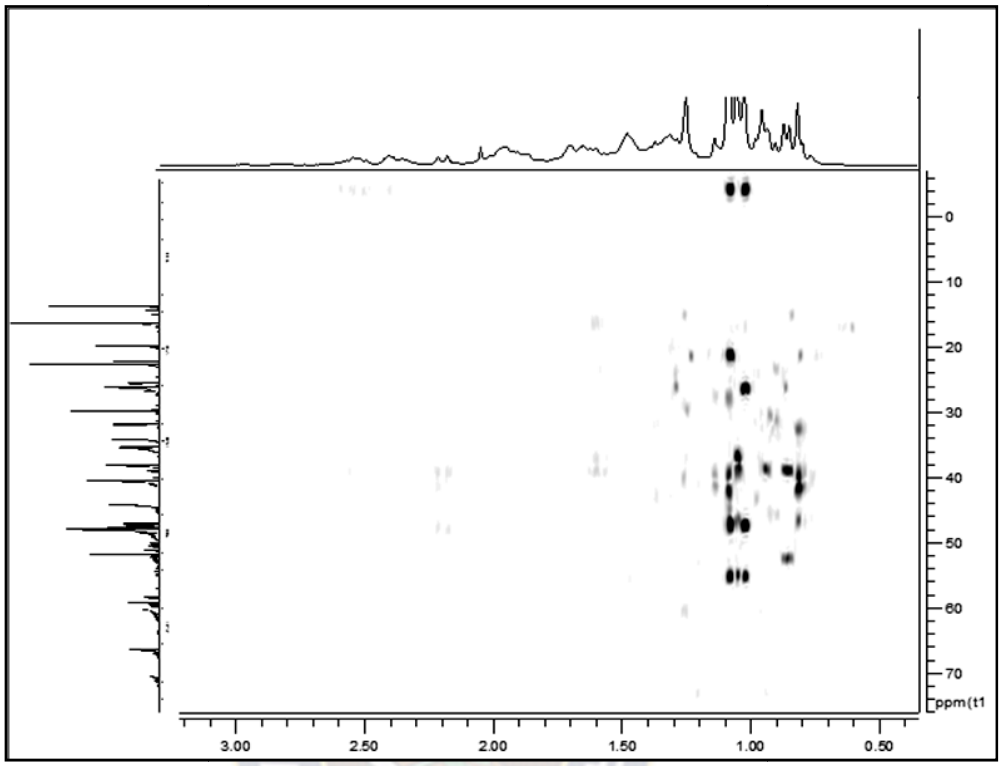
En el experimento DEPT-135 (Espectro N^o 9) se observa que el compuesto presenta carbonos cuaternarios (C), metilenos (CH_2), grupos metilo (CH_3) y grupos metino (CH) todos ellos resumidos con las asignaciones respectivas en la tabla N^o 11.



Espectro Nº 9. RMN-^{13}C y Experimento DEPT-135, del compuesto BM-1a, Solvente $CDCl_3$, 75 MHz, ref: $CDCl_3$ (J=77,1).

Tabla Nº 11. Datos espectroscópicos del experimento DEPT-135, para el compuesto BM-1a.

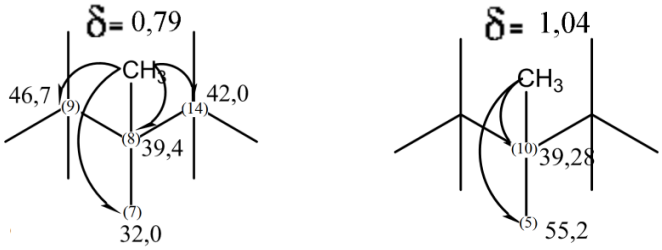
N°	Señal δc = ppm	Tipo
1	38,9	CH_2
2	34,16	CH_2
3	217,9	C
4	47,35	C
5	55,2	CH
6	19,54	CH_2
7	32,04	CH_2
8	39,4	C
9	46,7	CH
10	39,28	C
11	23,5	CH_2
12	125,7	CH
13	137,9	C
14	42,01	C
15	28,01	CH_2
16	24,01	CH_2
17	48,1	C
18	52,6	CH
19	39	CH
20	38,8	CH
21	30,6	CH_2
22	36,7	CH_2
23	29,7	CH_3
24	15,6	CH_3
25	15,01	CH_3
26	16,9	CH_3
27	23,4	CH_3
28	184,3	C
29	16,01	CH_3
30	21,18	CH_3



Espectro Nº 10. Experimento HMBC de correlación indirecta o inversa heteronuclear del compuesto BM-1a, Solvente $CDCl_3$, 300 MHz para ^{1}H y 75 MHz para ^{13}C. ref: $CDCl_3$ (*J*=7,28 y J=77,1) para el ^{1}H y ^{13}C respectivamente.

Las señales que observamos en el (HMBC) se notan claramente el acoplamiento a larga distancia de dos a tres átomos (Espectro N^{o} 10), de donde obtuvimos las siguientes correlaciones (Figura N^{o}23)

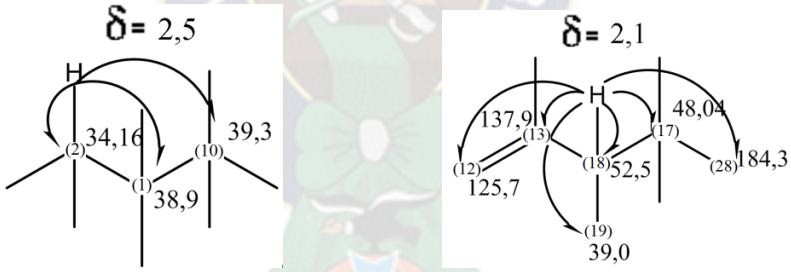
Los protones del grupo metilo de δ_H= 0,79 acoplan con cuatro átomos de carbono CH_2, CH y C. con δc=32,0; δc=46,7; δc=39,4 y δc=42,0 respectivamente figura 23a. En la figura 23b, observamos que el protón del grupo metilo CH_3 δ_H= 1,04 acoplan con los grupos CH y C. con δc= 55,2 y δc=39,3 respectivamente.



(a) (b)

Figura Nº 23. Acoplamiento a larga distancia HMBC protón δ=0,79 y δ=1,04 (a) El protón del carbono CH_3 que acopla con los grupos (CH_2), (CH) y (C). (b) El protón del grupo metilo que acopla con los grupos (CH) y (C).

Los protones del grupo CH_2 de δ_H=2,5 se acoplan con tres átomos de carbono CH_2 y C. con δc=34,16; δc=38,9 y δc=39,3 respectivamente figura 24a. En la figura 24b, observamos que el protón del grupo metino CH δ_H=2,1 acopla con los grupos CH y C. con δc=52,5; δc=39,0; δc=125,6; δc=137,9; δc=48,0 y δc=184,3 respectivamente.



(a) (b)

Figura Nº 24. Acoplamiento a larga distancia HMBC protón δ=2,5 y δ=2,1 (a) El protón del carbono CH2 que acopla con los grupos (CH_2) y (C). (b) El protón del grupo metino CH que acopla con los grupos (CH) y (C).

El resto de las correlaciones, que proporciona el experimento HMBC (Espectro 10), que correlacionan a los carbonos CH_2 y CH_3, nos ayuda a determinar la estructura final que se muestran en las figuras N° 25 y N° 26.

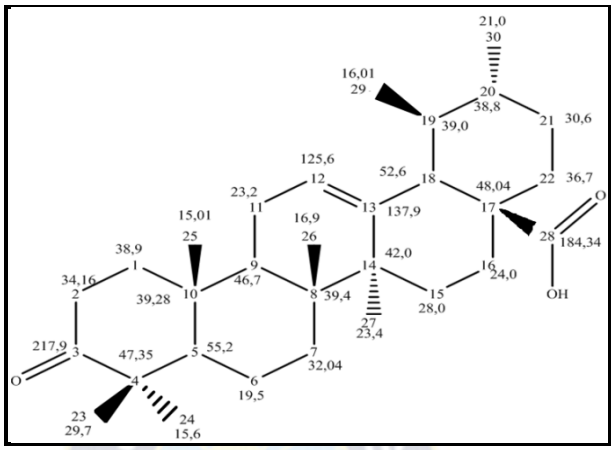


Figura Nº 25. Estructura del compuesto BM-1a, con las asignaciones correspondientes de RMN-^{13}C.

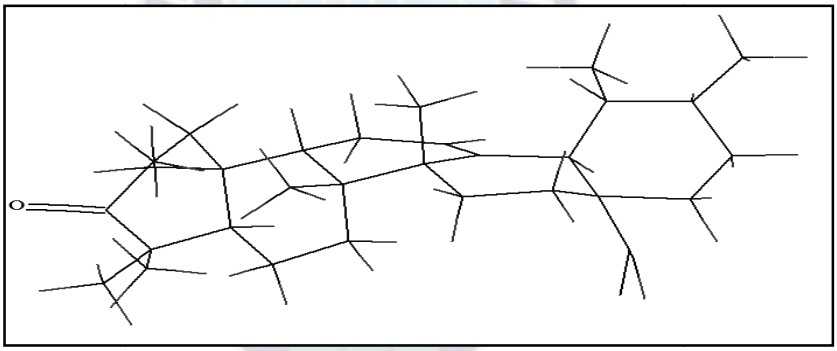


Figura Nº 26. Estructura del compuesto BM-1a, (oxidación del ácido ursólico).

6.4. Caracterización del compuesto BM-1b (acetilación del ácido ursólico).

6.4.1. Características generales.

En la tabla N^{o} 12, se resume las características y propiedades del compuesto BM-1b (acetilado del ácido ursólico)

Tabla Nº 12. Características del compuesto BM-1b.

Propiedades	Compuesto BM-1b (acetilación del ácido ursólico)
Aspecto	Cristales, blancos
Solubilidad	$CHCl_3$, CH_2Cl_2
Cristalización	Etanol

El compuesto, BM-1b derivatizado a partir del compuesto BM-1, tiene un rendimiento cerca del 71%, se llegó a obtener 705 mg de compuesto acetilado, sustancia que fue llevado a evaluaciones biológicas posteriores.

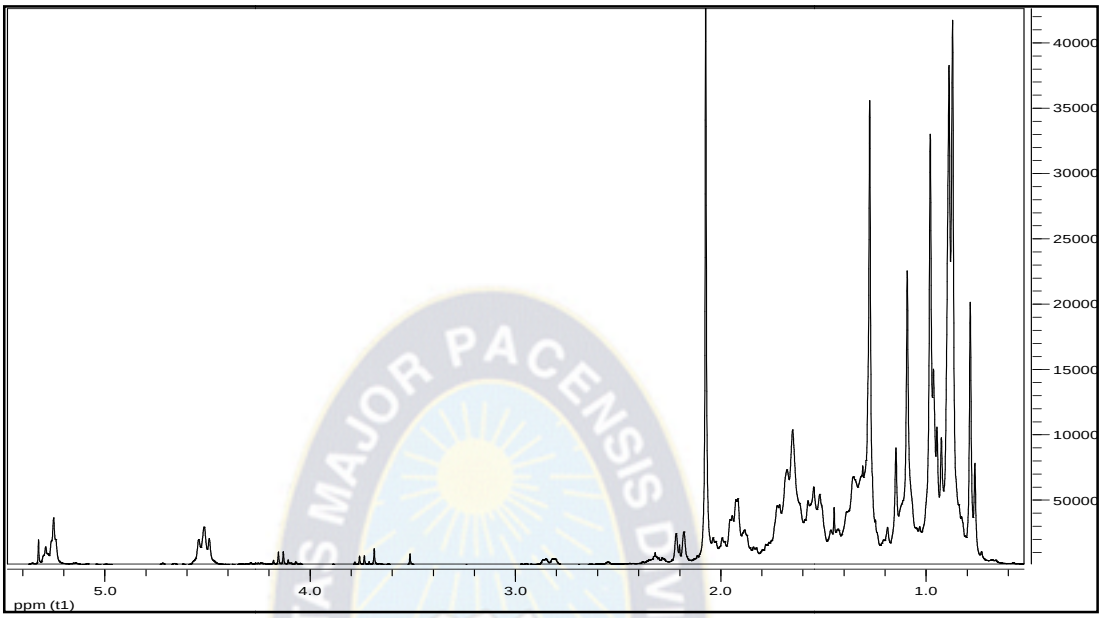
6.4.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.

La tabla N° 13, muestra los datos obtenidos del espectro de RMN – ^{1}H (Espectro N° 11) y las asignaciones respectivas.

Tabla Nº 13. Datos espectroscópicos de RMN-^{1}H del compuesto BM-1b.

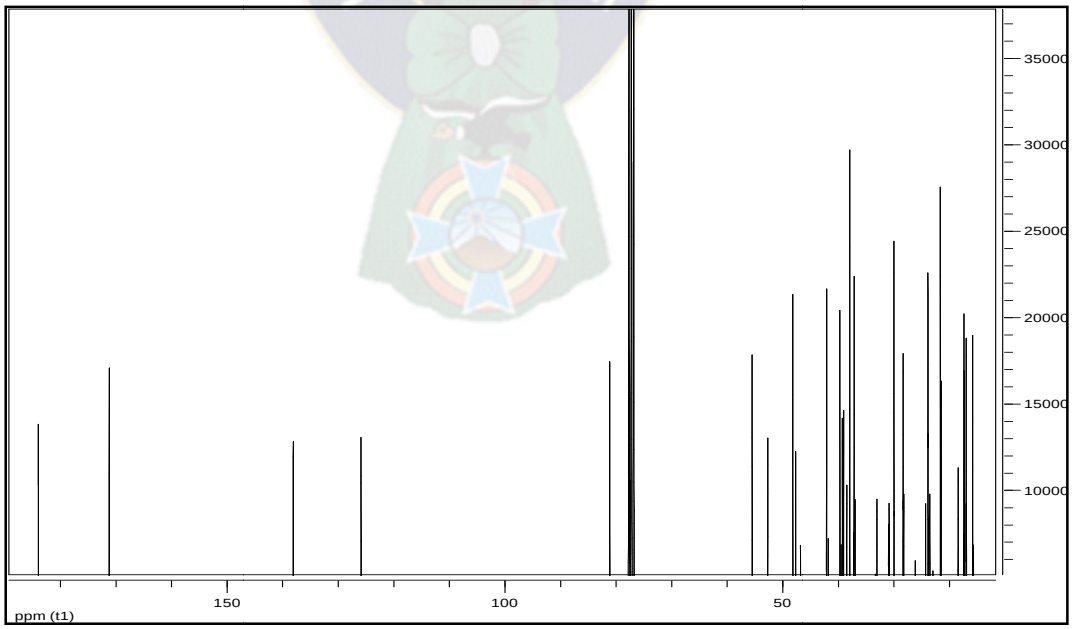
Señal δ_H(ppm)	Multiplicidad	Asignación
5,25	Triplete	CH
4,52	Triplete	CH
2,62	Singulete	CH_3
1,65	Singulete	CH_3
0,94	Doblete	CH_3
0,92	Doblete	CH_3
0,90	Singulete	CH_3
0,86	Singulete	CH_3
0,84	Singulete	CH_3
0,77	Singulete	CH_3

De acuerdo con el espectro de RMN-^{1}H (Espectro N° 11) el compuesto BM-1b presenta 8 señales intensas cinco singuletes y dos dobletes cuyos desplazamientos químicos están entre δ_H=0,78-2,62 ppm los cuales corresponden a los grupos metilo, en el rango de δ_H=0,95-2,10 ppm (Tabla N° 13) se encuentran las señales correspondientes a los grupos CH y CH_2.

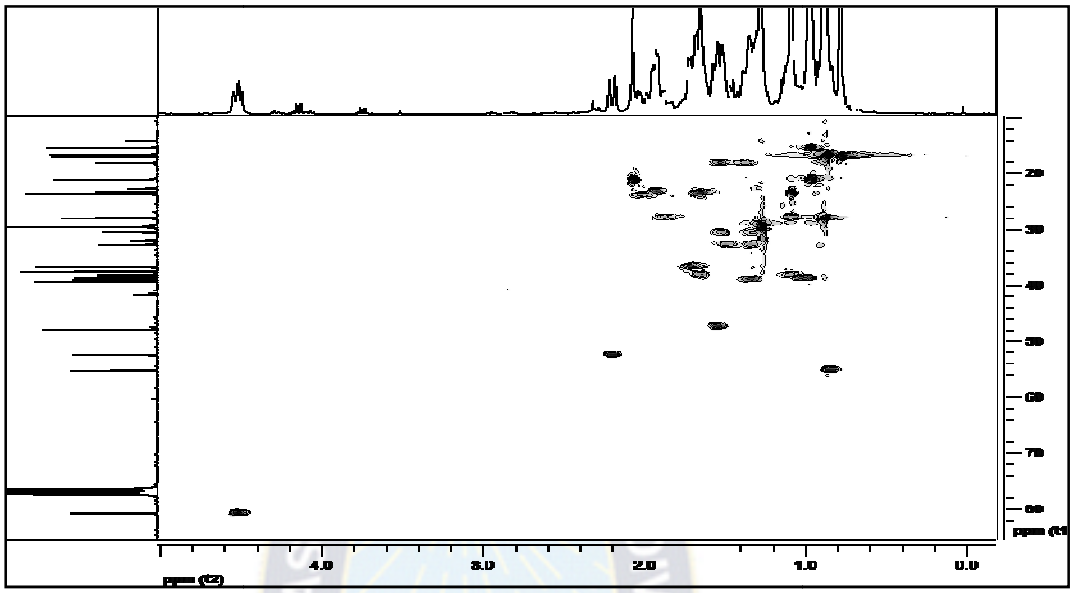


Espectro Nº 11. RMN- ^{1}H del compuesto BM-1b (acetilación del ácido ursólico), Solvente $CDCl_3$, 300 MHz, ref: $CDCl_3$ (J=7,28).

En el espectro de RMN-^{13}C (Espectro Nº 12) se muestra la presencia de 32 átomos de carbono.



Espectro Nº 12. RMN-^{13}C del compuesto BM-1b, Solvente $CDCl_3$, 75 MHz, ref: $CDCl_3$ (J=77,1).



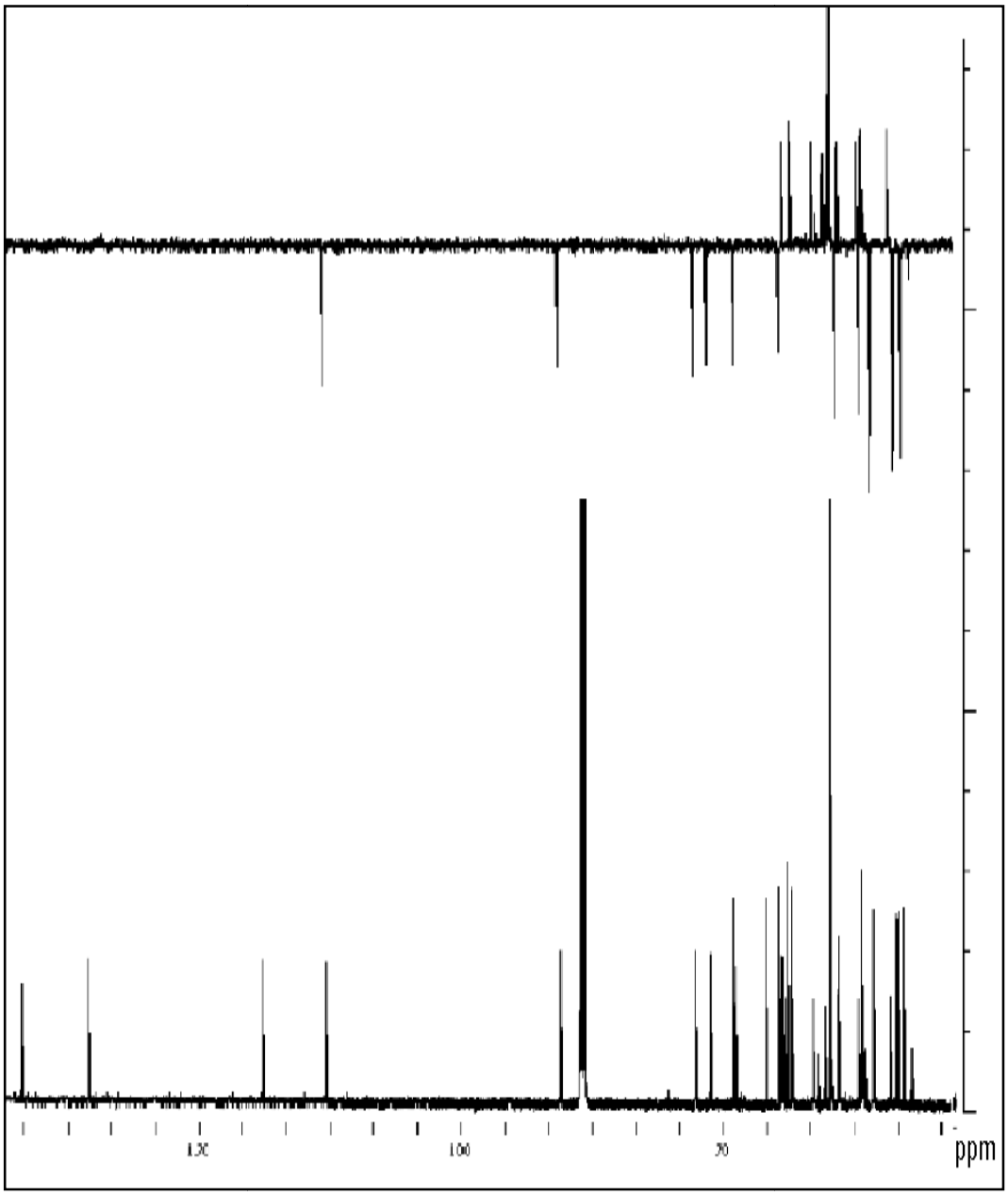
Espectro Nº 13. Experimento HMQC de correlación directa heteronuclear del compuesto BM-1b, Solvente $CDCl_3$, 300 MHz para ^{1}H y 75 MHz para ^{13}C. ref: $CDCl_3$ (*J*=7,28 y J=77,1) para el ^{1}H y ^{13}C respectivamente.

En el espectro N^{o} 13, (HMQC) podemos observar las señales directas de los átomos de carbono que acoplan al desplazamiento químico de protones (tabla N^{o} 14).

Tabla Nº 14. Correlaciones heteronucleares directas dadas por el experimento HMQC para el compuesto BM-1b.

Señal δc = ppm	**Señal δ_H = ppm**
125,73	5,23
80,90	4,5
55,30	0,85
52,50	2,19
28,10	0,86
23,30	1,92
21,3	2,62
18,14	1,54
17,11	0,77
17,01	0,84
16,7	0,92
15,53	0,90

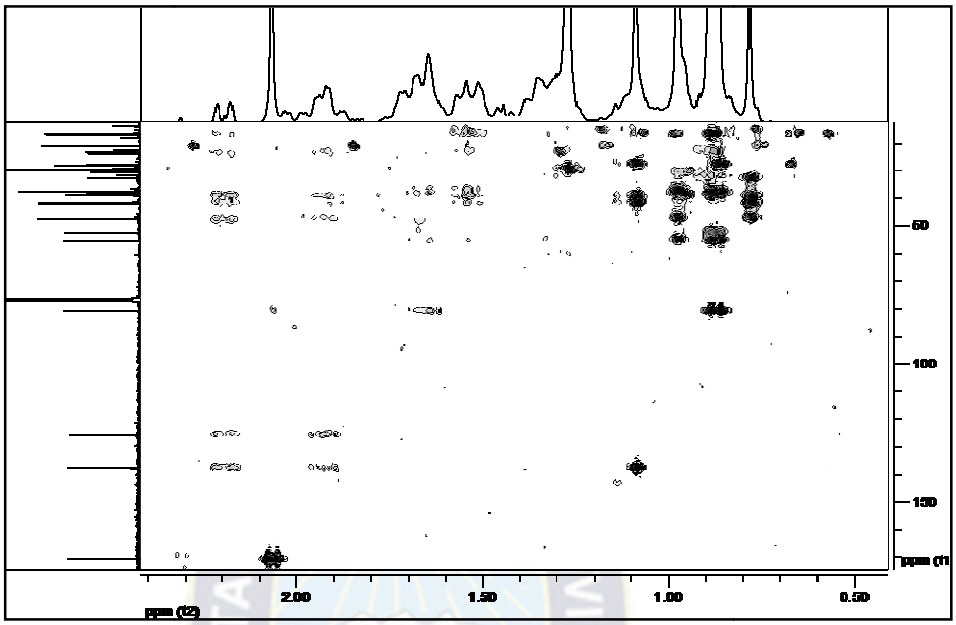
En el experimento DEPT -135 (Espectro N° 14) se observa que el compuesto presenta 8 carbonos cuaternarios (C), 9 metilenos (CH_2), 8 grupos metilo (CH_3) y 7 grupos metino (CH) todos ellos resumidos con las asignaciones respectivas en la tabla N° 15.



Espectro Nº 14. RMN-^{13}C y Experimento DEPT-135, del compuesto BM-1b, Solvente $CDCl_3$, 75 MHz, ref: $CDCl_3$ (*J*=77,1).

Tabla Nº 15. Datos espectroscópicos del experimento DEPT-135, para el compuesto BM-1b.

N°	Señal δc = ppm	Tipo
1	38,3	CH_2
2	24,01	CH_2
3	80,4	CH
4	37,8	C
5	55,8	CH
6	18,14	CH_2
7	32,8	CH_2
8	39,5	C
9	47,4	CH
10	36,9	C
11	23,3	CH_2
12	125,73	CH
13	137,94	C
14	41,8	C
15	27,9	CH_2
16	23,5	CH_2
17	47,9	C
18	52,5	CH
19	39	CH
20	38,8	CH
21	30,6	CH_2
22	36,7	CH_2
23	28,1	CH_3
24	17	CH_3
25	15,5	CH_3
26	17,1	CH_3
27	23,6	CH_3
28	183,69	C
29	16,7	CH_3
30	21,2	CH_3
31	171,025	C
32	21,3	CH_3



Espectro Nº 15. Experimento HMBC correlación heteronuclear indirecto a larga distancia del compuesto BM-1b, Solvente $CDCl_3$, 300 MHz para ^{1}H y 75 MHz para ^{13}C. ref: $CDCl_3$ (*J*=7,28 y J=77,1) para el ^{1}H y ^{13}C respectivamente.

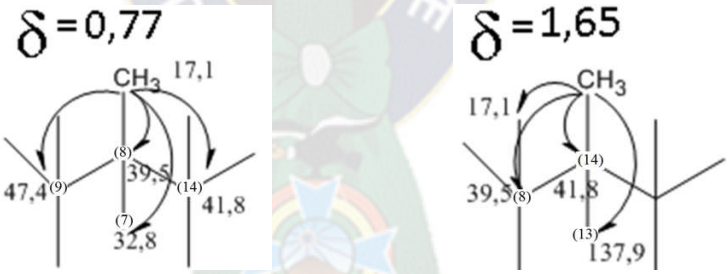
Las señales que observamos en el espectro N° 15, experimento (HMBC) se notan claramente el acoplamiento a larga distancia de dos a tres átomos, donde se puede observar las siguientes correlaciones:

Los Protones del grupo metilo δ_H= 0,86 se acoplan con tres átomos de carbono CH y C. con δc=55,8; δc=80,4; δc=37,8; δc=38,8 respectivamente figura N° 27a. En la figura N° 27b, observamos que el protón del grupo metilo CH δ_H= 0,84 acopla con los grupos CH y C. con δc= 55,8; δc=80,4; δc=37,8 respectivamente.

(a) (b)

Figura Nº 27. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=0,86 y δ=0,84 (a) El protón del carbono CH_3 que acopla con el grupo metino (CH) y del grupo del carbono cuaternario C. (b) El protón que acopla con los grupos CH y C.

Los protones del grupo metilo δ_H= 0,77, se acopla con cuatro átomos de carbono, CH_2, CH y C. con δc= 32,8; δc=41,8; δc= 47,4 y δc= 39,5 respectivamente figura N° 28a. En la figura N° 28b. Observamos que el protón del grupo metilo con δ_H= 1,65, se acopla con cuatro átomos de carbono, CH_3 y el carbono cuaternario (C), con δc=17,1; δc=39,5; δc=41,8 y δc=137,9, respectivamente.

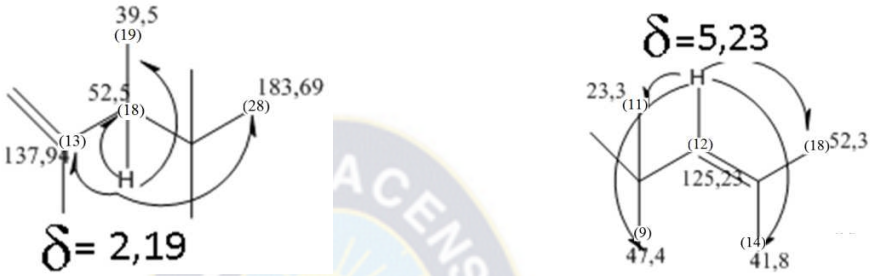


(a) (b)

Figura Nº 28. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=0,77 y δ=1,65 (a) El protón del carbono CH_3 que acopla con el grupo metino (CH), (CH_2) y con el carbono cuaternario (C). (b) El protón que acopla con los grupos CH_3 y con el carbono cuaternario (C).

En la figura N° 29a, podemos observar como el protón del carbono metino de desplazamiento δ_H= 2,19 se acopla con los grupos CH y C, con δc=39,5; δc=183,69; δc=137,9 respectivamente, en la figura N° 27b, el protón del carbono metino con

desplazamiento δ_H=5,23 acopla con los átomos de carbono CH_3, CH y C de δc=23,3; δc=47,4; δc=41,8 y δc=52,3 respectivamente.



(a) (b)

Figura Nº 29. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=2,19 y δ=1,65 (a) El protón del carbono CH que acopla con el grupo metino (CH) y con el carbono cuaternario (C). (b) El protón que acopla con los grupos CH_3, CH y con el carbono cuaternario (C).

En la figura N^o 30a, se observa que el protón del metilo CH_3, acopla con los átomos de carbono CH_2 y con el carbono cuaternario de δc= 30,6 y δc= 38,8 respectivamente, en la figura N^o 30b, observamos que el protón del metino (CH), acopla con los átomos de los grupos CH_2 y CH con desplazamientos δc=30,6 y δc=52,3 respectivamente.

(a) (b)

Figura Nº 30. Acoplamiento a larga distancia HMBC, protón δ=0,94 y δ=0,98 (a) El protón del átomo de carbono CH3, que acopla con el grupo meteno (CH_2) y con el carbono cuaternario (C). (b) El protón del carbono CH que acopla con los grupos CH.

La evidencia que genera los experimentos HMBC como se muestra en el espectro N° 15, nos dan las suficientes pistas para poder elucidar de manera efectiva la estructura preliminar del compuesto BM-1b. De ahí hallamos las diferentes asignaciones de los desplazamientos δc y δ_H hallando la estructura final como se muestra a continuación en las figuras N° 31 y N° 32.

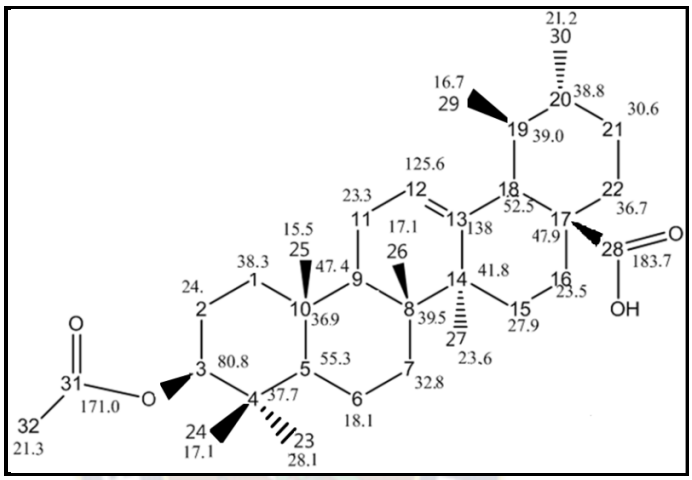


Figura Nº 31. Estructura del compuesto BM-1b, con las asignaciones correspondientes de RMN-^{13}C.

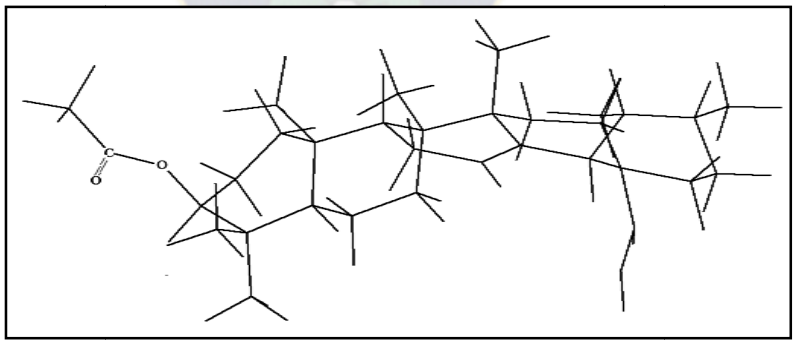


Figura Nº 32. Estructura del compuesto BM-1b (ácido ursólico acetilado).

Por lo tanto el desplazamiento químico del ácido ursólico en la posición del C-3 es de δc = 79,1 ppm en la oxidación el mismo carbono (C-3) posee un desplazamiento químico δc = 217,9 ppm, que corresponde al grupo (C=O), de manera similar en la acetilación se observan desplazamientos que corresponden al grupo metilo (CH_3),

carbonilo (C=O). El metilo con desplazamiento químico δc = 21,3 ppm y el grupo carbonilo (C=O) con δc = 171,0 ppm, y el carbono (C-3) del ácido ursólico con desplazamiento δc = 80,9 ppm como se muestra en la figura N° 33.

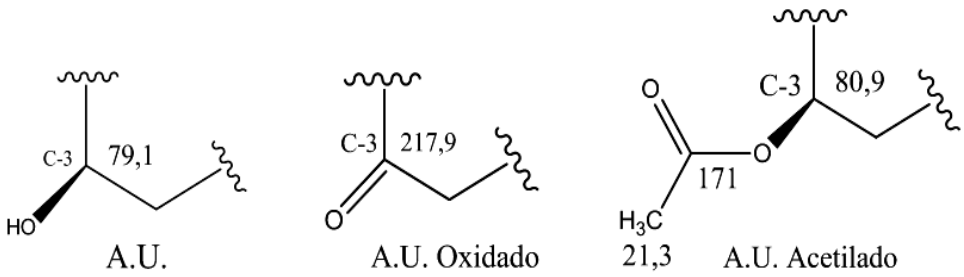


Figura N° 33. Diferencias del desplazamiento químico, en la hemisíntesis del ácido ursólico (A.U.)

6.5. Citotoxicidad.

Los resultados que se obtienen de la citotoxicidad en eritrocitos (glóbulos rojos) de los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b se detallan en la tabla N° 16. Los datos hallados, en esta evaluación sugieren que los compuestos estudiados son medianamente tóxicos, comparados con la anfotericina B.

Interpretación de resultados (CC_{50}): Criterios definidos por el Programa de Estudio de Enfermedades Tropicales PECET

<10 µg/mL: Muy tóxico
>10<100 µg/mL: Tóxico
>100 y < 1000 µg/mL: Medianamente tóxico
> 1000 µg/mL: Potencialmente no tóxico

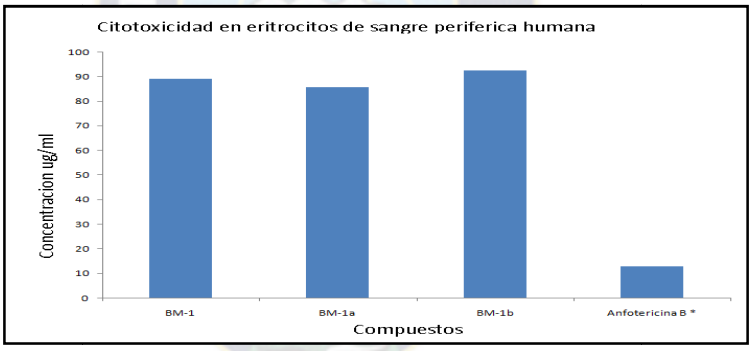
Tabla Nº 16. Evaluación de la actividad citotóxica en eritrocitos de sangre periférica humana.

Compuesto	CC_{50} (µg/mL)
BM-1	89,04
BM-1a	85,57
BM-1b	92,34
Anfotericina B *	12,74

* control positivo de toxicidad

CC_{50} - Concentración Citotóxica al 50%

En la grafica N° 1, podemos observar la toxicidad con respecto a la Anfotericina B. donde los compuestos analizados son menos toxico que el fármaco de referencia.



Grafica Nº 1. Evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b, en eritrocitos de sangre periférica humana.

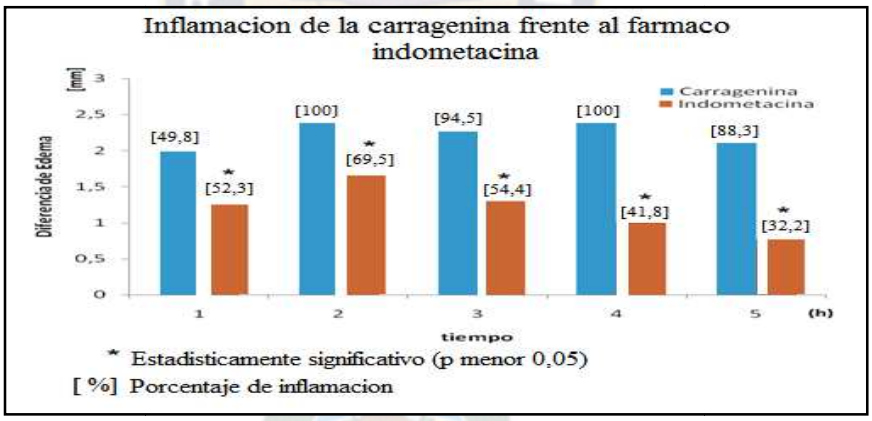
6.6. Inflamación.

En el estudio de la actividad antiinflamatoria de los compuestos: indometacina como el control positivo y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-b como los estudiados o problemas, el compuestos BM-1, avaluadas a dosis de (5 y 10) mg/Kg, y los compuestos BM-1a y BM-1b a las dosis de (10, 20 y 30) mg/Kg respectivamente, bajo condiciones ambientales descritas anteriormente en un periodo total de 5 horas, tiempo en el cual se describe la inflamación aguda y la eficacia del fármaco dentro de ese tiempo.

6.6.1. Estudio de inflamación de la carragenina frente al fármaco indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b.

En el análisis estadístico, de la evaluación antiinflamatoria del edema producido por el agente inflamatorio carragenina (control negativo), frente al fármaco indometacina (control positivo) es estadísticamente significativo con ($p<0,05$).

Estos datos se representa gráficamente, datos que muestran la diferencia del edema al tiempo inicial t=0 y del edema producido a tiempo t= 1,2,..,5 horas.
El edema producido en las diferentes horas, son reportadas en milímetros [mm], que se representa en el eje vertical y el comportamiento del edema a diferentes horas en el eje horizontal en unidades de tiempo t= 1h, 2h,..5h. (grafica N^{o} 2).



Grafica N° 2. Diferencia de inflamación de la carragenina frente al fármaco indometacina junto a los porcentajes de inflamación respectivamente

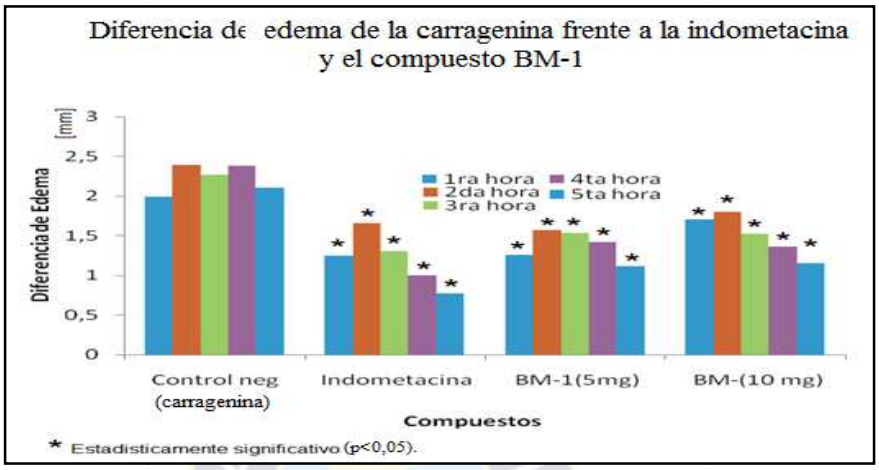
En el campo de la farmacología, es posible representar los datos en forma de: porcentaje de inflamación, diferencia de inflamación y en porcentaje de inhibición.
Los porcentajes de inflamación se hallan según la ecuación N° 2, descrito anteriormente, de los resultados hallados, la carragenina presenta su mayor efecto a las dos horas, en cambio la indometacina ejerce su máxima acción a la primera hora (el cual aumenta de manera visible el efecto hasta la culminación del proceso de evaluación).

La grafica N^{o} 2, nos muestra claramente el efecto de la carragenina como agente inflamatorio, la diferencia máxima de inflamación es tomada como el cien por ciento de inflamación, consecuentemente los datos de la acción antiinflamatoria están reportados bajo ese concepto.

Por otro lado, la indometacina, que presenta un pKa igual a 4,15 con un punto equivalente ácido, similar al que posee el ambiente inflamatorio, por lo que hace posible que la indometacina llegue al sitio de acción con mayor eficacia y por defecto la preferencia en el uso de este fármaco en la evaluación de este modelo “edema plantar inducido por carragenina”.

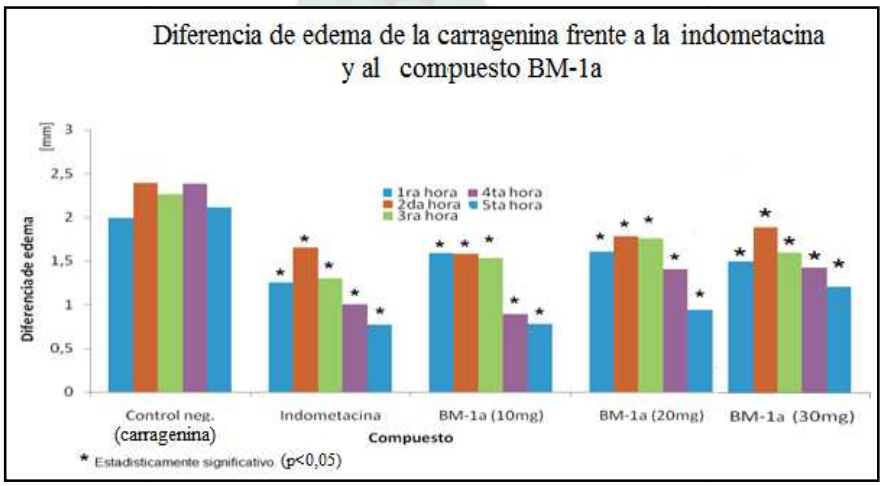
Los datos analizados en la determinación de la actividad antiinflamatoria, de los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b son estadísticamente significativos, con un ($p<0,05$). De los resultados encontrados, se observa el mismo comportamiento en el efecto antiinflamatorio de la indometacina y del compuesto BM-1, estos datos nos revela que el compuesto BM-1 tiene actividad antiinflamatoria, a las dosis probada de 5mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal respectivamente.

El compuesto BM-1 que tiene un pKa de 3,15 de propiedades ácidas al igual que la indometacina, particularmente similares en el comportamiento a lo largo del experimento, en la grafica N^{o} 3, se observa que a dosis mayores de 5 mg/kg, la actividad antiinflamatoria disminuye, por otro lado a las dosis probada este compuesto posee actividad antiinflamatoria, por lo que este producto es estadísticamente significativo con ($p<0,05$).



Grafica N° 3. Diferencia de edema de la carragenina frente a la indometacina y al compuesto BM-1, evaluado en las primeras 5 horas.

Los resultados en la evaluación antiinflamatoria para el compuesto BM-1a (Grafica N^{o} 4), refleja una disminución en la inflamación a la dosis de 20 mg/kg de peso corporal, a mayores dosis (30 mg/kg) se observa una disminución en el proceso antiinflamatorio, al igual que a dosis menores (10 mg/Kg), estos datos con un ($p<0,05$) son estadísticamente significativos. El análisis nos lleva a la conclusión que el compuesto BM-1a posee actividad antiinflamatoria a las dosis evaluadas con respecto al fármaco indometacina.

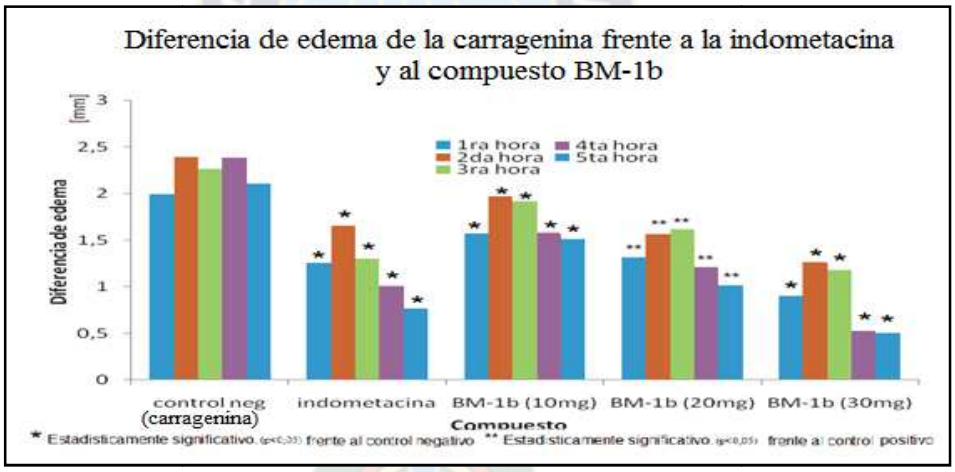


Grafica N° 4. Diferencia de edema de la carragenina frente al fármaco indometacina y al compuesto BM-1a, evaluado a las primeras 5 horas.

En la grafica N^{o} 5, analizamos los resultados hallados para la evaluación antiinflamatoria del compuesto BM-1b, el cual revela que a las dosis probada de: 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 30 mg/Kg de peso corporal, donde indica que estos compuestos poseen actividad antiinflamatoria estadísticamente significativos con ($p<0,05$).

Por otro lado esta grafica también nos muestra un descenso de la inflamación a dosis mayores, pero con mayor error.

El análisis a los datos experimentales entre los grupos problema y los controles señalan que el compuesto BM-1b a dosis de 20 mg/Kg posee una acción antiinflamatoria superior a la indometacina



Grafica N° 5. Diferencia de edema de la carragenina frente al fármaco indometacina y al compuesto BM-1b, evaluadas en las primeras 5 horas.

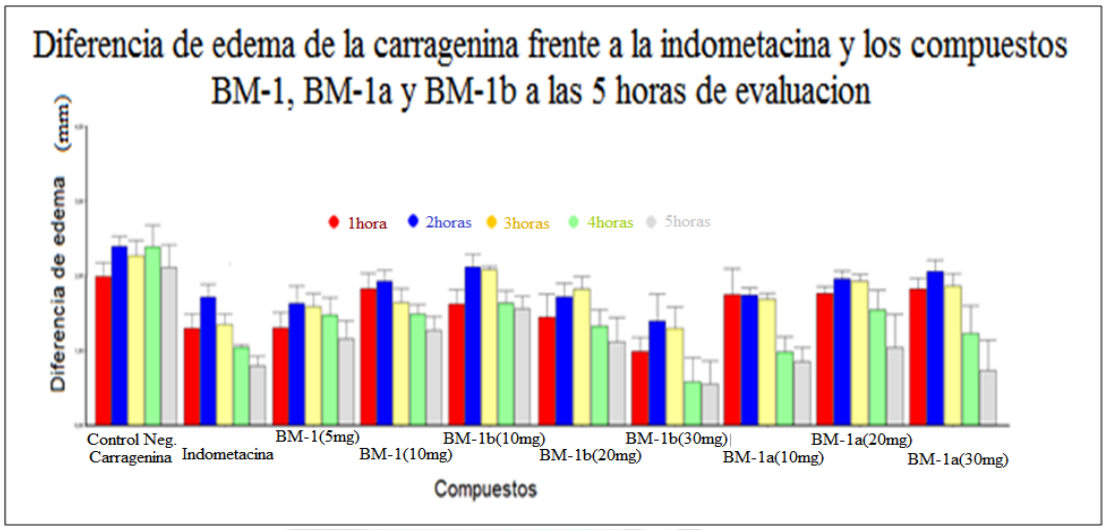
En la tabla N^{o} 17 se expresa de manera resumida los resultados de las diferencias de edema del agente inflamatorio carragenina con respecto a la acción antiinflamatoria del fármaco indometacina y los compuestos problema BM-1, BM-1a y BM-1b.

Tabla Nº 17. Diferencias del diámetro de edema a diferentes horas.

	(Diferencia de edema ± E.S.M.)				
	1ra hora	**2da hora**	**3ra hora**	**4ta hora**	**5ta hora**
Control -	(1,19±0,18)	(2,39±0,13)*	(2,26±0,21)*	(2,39±0,29)*	(2,11±0,30)*
Indometacina	(1,25±0,19)*	(1,66±0,17)*	(1,30±0,14)*	(1,00±0.04)*	(0,77±0,12)*
BM-1 (5mg)	(1,26±0,20)*	(1,58±0,22)*	(1,53±0,17)*	(1,42±0,22)*	(1,11±0,23)*
BM-1 (10mg)	(1,71±0,20)*	(1,80±0,15)*	(1,52±0,18)*	(1,37±0,13)*	(1,15±0,18)*
BM-1b(10 mg)	(1,57±0,18)*	(2,05±0,16)*	(2,01±0,04)*	(1,58±0,16)*	(1,51±0,16)*
BM-1b(20 mg)	(1,31±0,18)**	(1,55±0,16)**	(1,65±0,15)**	(1,21±0,19)**	(1,01±0,29)**
BM-1b(30 mg)	(0,90±0,16)*	(1,26±0,33)*	(1,18±0,26)*	(0,53±0,29)*	(0.54±0,25)*
BM-1a(10 mg)	(1,59±0,14)*	(1,58±0,08)*	(1,53±0,07)*	(0,89±0,18)*	(0,78±0,17)*
BM-1a(20 mg)	(1,60±0,07)*	(1,78±0,09)*	(1,75±0,08)*	(1,41±0,24)*	(0,94±0,41)*
BM-1a(30 mg)	(1,66±0,13)*	(1,87±0,14)*	(1,69±0,14)*	(1,12±0,33)*	(0,66±0,37)*

* Significativo frente al control negativo, ** significativo frente a la Indometacina
Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas IIFB-UMSA

De manera general y resumida la grafica Nº 6, nos muestra las diferencias del edema correspondientes al control negativo con respecto a los compuestos evaluados a diferentes dosis, sin dejar de lado al control positivo, que prácticamente poseen actividad antiinflamatoria significativa.

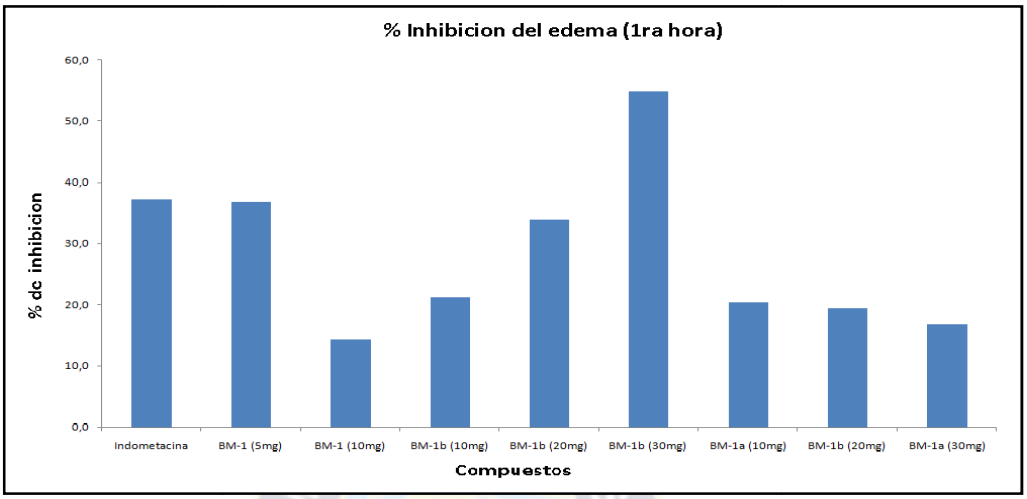


Grafica Nº 6. Diferencias de edema de la carragenina frente al fármaco indometacina y los compuestos estudiados BM-1, BM-1a y BM-1b a las 5 horas de evaluación.

6.6.2. Análisis del porcentaje de inhibición del efecto antiinflamatorio de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b a las 5 horas de evaluación.

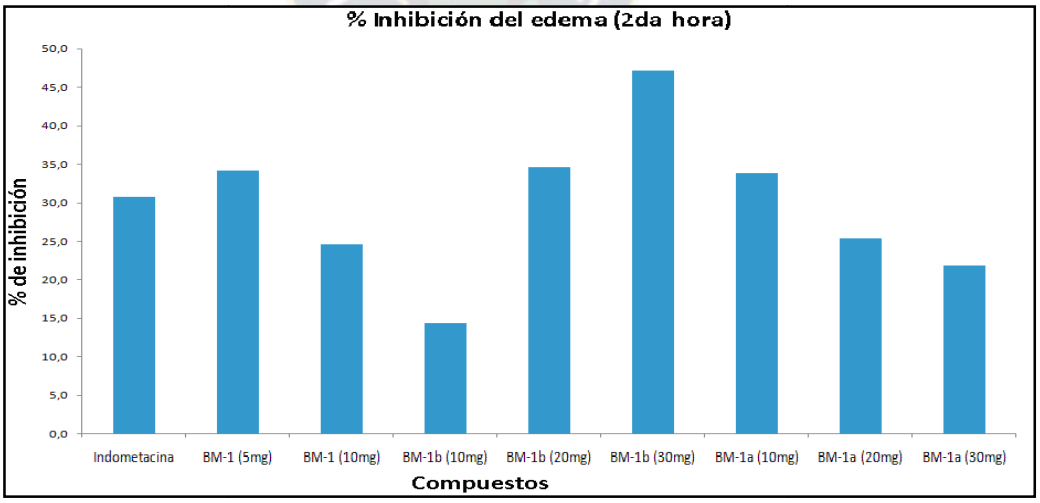
Los porcentajes de inhibición se hallan según la ecuación 1, estos resultados son analizados gráficamente y poder describir el comportamiento del la acción antiinflamatoria del fármaco indometacina y de los compuestos problema BM-1, BM-1a y BM-1b a diferentes dosis.

La grafica N^{o} 7, describe el comportamiento del porcentaje de inhibición de los compuestos analizados a la primera hora de evaluación, con respecto al fármaco indometacina, los resultados encontrados señalan que el mayor porcentaje de inhibición la tiene el compuesto BM-1b a una dosis de 30 mg/ Kg de peso corporal, sin embargo estos datos poseen el error media estándar muy grande. Se observa que el compuesto (BM-1b) a dosis de 20 mg/kg de peso corporal posee un porcentaje de inhibición muy prometedora porque posee un error media estándar relativamente pequeño.

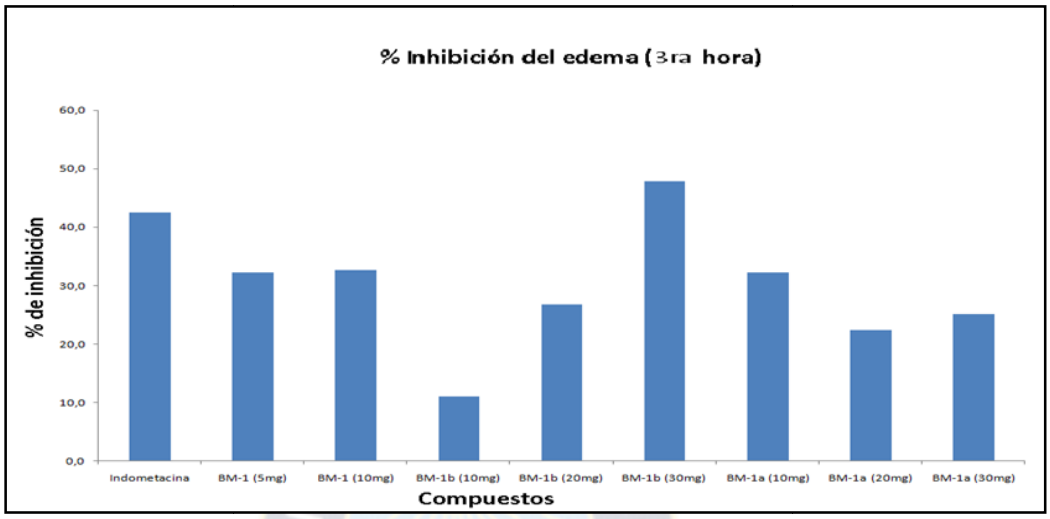


Grafica Nº 7. Porcentaje de inhibición de la Indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a, BM-1b a la primera hora de evaluación.

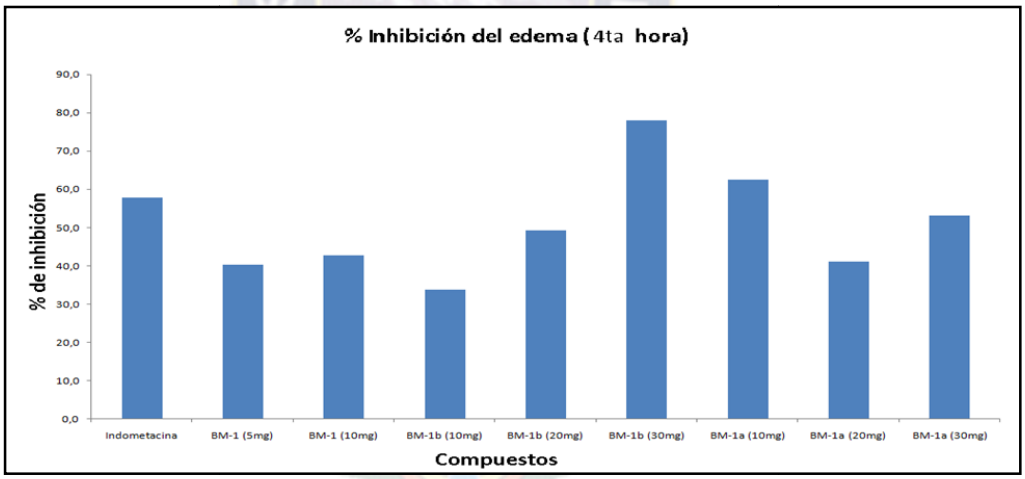
La graficas N°8, N°9, N°10 y N°11, describe el comportamiento del porcentaje de inhibición de los compuestos analizados a las 2 horas, 3 horas, 4 horas y 5 horas, la evaluación de los compuestos, con respecto al fármaco indometacina



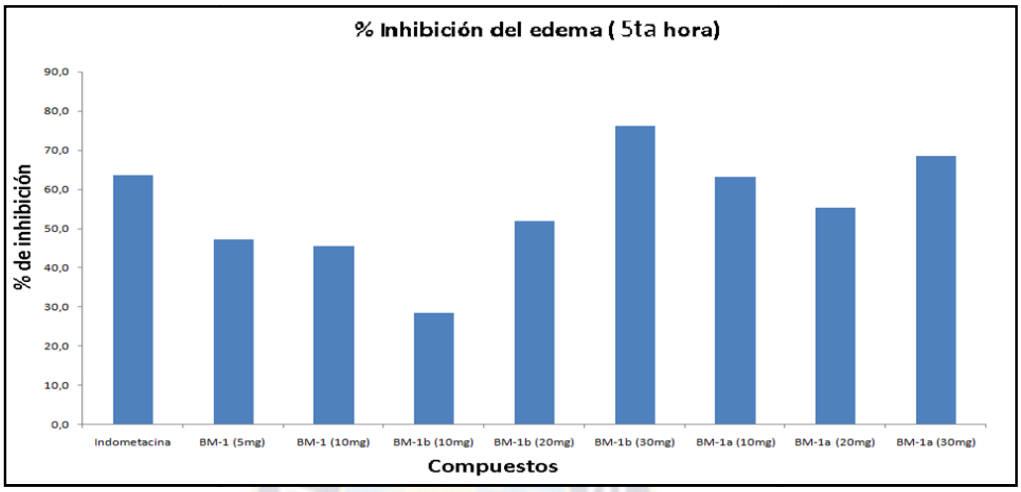
Grafica Nº 8. Porcentaje de inhibición de la Indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a, BM-1b a la segunda hora de evaluación.



Grafica Nº 9. Porcentaje de inhibición de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a, BM-1b a la tercera hora de evaluación.



Grafica Nº 10. Porcentaje de inhibición de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a, BM-1b a la cuarta hora de evaluación.



Grafica Nº 11. Porcentaje de inhibición de la indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b a la quinta hora de evaluación.

El comportamiento de BM-1, posee un porcentaje de inhibición promedio cerca del 40 % durante el periodo de evaluación, mostrándose estable en ese tiempo. A las dosis probada de 5 mg/Kg y 10 mg/ kg de peso corporal estos presentan el mismo comportamiento, la relación entre ambas dosis no llega a ser significativo. Lo que refleja que a mayores dosis no se obtiene mejores resultados, ni mortalidad o comportamiento ansiolítico.

En cuanto al compuesto BM-1a, los resultados analizados durante el periodo de evaluación denotan inestabilidad, el comportamiento de la acción antiinflamatoria es abrupto e impredecible lo que refleja el estudio estadístico, lo que deja de lado tomar en cuenta a este compuesto.

Uno de los compuestos que mayor estabilidad ha presentados es el compuesto BM-1b, que durante todo el proceso de evaluación posee una gran actividad antiinflamatoria, sin embargo el análisis estadístico muestra que el compuesto BM-1b a la dosis de 20 mg/Kg, es estadísticamente significativo con ($P<0,05$) con respecto al control positivo, estos datos se reflejan en la tabla 18, donde se observa el porcentaje de inhibición durante las 5 horas de evaluación.

Tabla Nº 18. Porcentaje de inhibición del fármaco indometacina y los compuestos BM-1, BM-1a y BM-1b a diferentes dosis en función del tiempo

% Porcentaje de inhibición									
Hrs.	**Indometacina**	**BM-1 (5mg)***	**BM-1 (10mg)***	**BM-1b (10mg)***	**BM-1b (20mg)***	**BM-1b (30mg)***	**BM-1a (10mg)***	**BM-1b (20mg)***	**BM-1a (30mg)***
1	37,1	36,7	14,3	21,2	33,8	54,8	20,3	19,4	16,8
2	30,8	34,1	24,6	14,4	34,6	47,2	33,8	25,4	21,9
3	42,5	32,2	32,6	15,1	36,9	47,8	32,2	22,5	25,1
4	57,9	40,4	42,7	33,8	49,4	77,9	62,6	41,1	53,2
5	63,6	47,1	45,4	38,4	52,0	76,3	63,2	55,3	68,5

( )* Dosis de evaluación en mg/Kg de peso corporal.

Basándonos en los datos experimentales (control negativo, patrón y problemas) que se muestran en la tabla 18, se estableció una escala para clasificar la actividad en: muy baja (5-15) %, baja (16-25) %, moderada (26-35) %, buena (36-45) % y elevada (46 o más), según los porcentajes de inhibición obtenido [73].

Tabla Nº 19. Asignación cualitativa de los datos del porcentaje de inhibición de los Compuestos: Indometacina, BM-1, BM-1a y BM-1b, a diferentes dosis respectivamente.

Compuesto	**1ra hora**	**2da hora**	**3ra hora**	**4ta hora**	**5ta hora**
Indometacina	B	M	B	E	E
BM-1 (5mg)	B	M	M	B	E
BM-1 (10mg)	Mp	P	M	B	B
BM-1a (10mg)	P	M	M	E	E
BM-1a (20mg)	P	P	P	p	E
BM-1a (30mg)	P	P	P	E	E
BM-1b (10mg)	P	mp	Mp	M	M
BM-1b (20mg)	M	M	M	E	E
BM-1b (30mg)	E	E	E	E	E

muy baja (mp), baja (P),Moderada (M), Buena (B) y Elevada (E)

La tabla 19, describe el comportamiento de la inflamación, una de las características importantes que presentan estos compuestos incluyendo a la indometacina.por otro lado

se describe en la constante de acides y el momento dipolar la característica de cada compuesto, los datos de este último parámetro se hallan gracias al análisis computacional, que ofrecen algunos programas en nuestro caso el Hyperchem 7.0 donde se obtienen los siguientes resultados:

Tabla N° 20. Momentos dipolares teórico-computacionales (HYPERCHEM-CNDO)

Compuesto	Momento dipolar (D)
BM-1 (ácido ursólico)	6,078
BM-1a	8,825
BM-1b	4,795
Indometacina	5,801

Software: Hyperchem 7.0

7. CONCLUSIONES.

Se llegó a aislar e identificar el ácido ursólico (Ácido 3*β*-hidroxiurs-12-en-28 oico) denominado BM-1 cerca del 2,4 % obteniéndose 12 gramos de compuesto a partir del material vegetal, el ácido ursólico es el producto mayoritario de la especie *Satureja boliviana*, dato que no se reporta en la bibliografía para esta especie. Los espectros de resonancia magnética nuclear unidimensional y bidimensional han sido suficientes herramientas para la identificación del producto mayoritario, también de los derivados hemisintéticos.

Se obtuvieron dos derivados hemisintéticos del ácido ursólico, denominados BM-1a y BM-1b respectivamente. El primer derivado se obtiene oxidando el ácido ursólico (Ácido 3oxours-12-en-28 oico) bajo condiciones controladas obteniéndose de este producto el 82 % de rendimiento, posteriormente se obtiene el segundo derivado BM-1b del ácido ursólico (Ácido 3*β*-acetours-12-en-28 oico) que es la acetilación bajo condiciones especificas y controladas obteniéndose de este compuestos el 71 % de rendimiento.

Citotoxicidad.

En la evaluación de la actividad citotóxica en eritrocitos de sangre periférica humana revela que el ácido ursólico es medianamente tóxico por encima de la concentración evaluada, al igual que los derivados BM-a y BM-1b, comparados con la anfotericina B (grafica 1).

Inflamación.

El ácido ursólico y los dos derivados hemisinteticos presentan actividad antiinflamatoria estadísticamente significativa ($p<0,05$). El compuesto BM-1 (ácido ursólico) no muestra diferencias apreciables a dosis mayores que 5 mg/Kg, finalmente el compuesto BM-1b a dosis de 20 mg/Kg presenta mayor actividad que cualquiera de los compuestos analizados.

Las dos modificaciones hemisinteticas aumentan la actividad antiinflamatoria BM-1a y BM-1b respectivamente. El compuesto BM-1b, se considera estadísticamente significativo, frente a la indometacina a la dosis de 20 mg/Kg.

Los resultados que genera el software HYPERCHEM se obtiene el momento dipolar teórico computacional para cada compuesto en una estructura de configuración silla, en el análisis molecular CNDO estos datos relacionados en función a la actividad, se ve que el compuesto BM-1b se acerca a los datos que expresa la indometacina.

8. SUGERENCIAS.

Se aconseja, realizar estudios profundos en el ámbito toxicológico *in vitro* e *in vivo* capaces de mostrar el adecuado consumo de: compuestos aislados, compuestos modificados y formulaciones que provengan de productos naturales.

Una de las falencias, a nivel investigación que se tropiezan es fundamentalmente la falta de capacitación en el desarrollo de técnicas capaces de describir el mecanismo de acción de compuestos aislados con actividad farmacológica, bajo ese concepto se sugiere, internarse en ese campo, mejorando el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

Se aconseja incrementar el estudio en el campo de la hemisíntesis a partir de productos naturales, que en la actualidad está tomando gran interés social y económico, es por eso que nos vemos inclinados a desarrollar nuevas técnicas de desarrollo de los medicamentos, gracias a la gran biodiversidad que tiene Bolivia.

9. BIBLIOGRAFIA.

[1] García L., Rojo M., García V., Hernández M. Plantas con propiedades antiinflamatorias" Centro de investigaciones biomédicas Victoria de Giron. Rev. Cubana Invest. Biomed. Vol. 21 Nº 3 pp 214-216, 2002.

[2] OMS., Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional (2002-2005) WHO/EDM/TRM/2002.1

[3] Saenz D. "Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales" escuela de medicina UCR. Grupo estudio de utilización de medicamentos. Vol. 16º Nº 1 y 2: pp. 13-20. 2003.

[4] Bremner P., Heindrich M. "Natural products as modulators of the NF – kB-pathway". Journal Pharm Phamacol Vol. 54 pp 453-472. 2002.

[5] Kuntze, C. E. O. Revisio Generum Plantarum Rare Book QK96.K85, Leipzig, 3 v., 1891, 3 v., 1891-1898; v. 1, 5 Nov 1891; v. 2, 5 Nov 1891; v. 3(1), 5 Aug 1893; 3(2), 28 Sep 1898; 3(3), 28 Sep 1898 Mosses in volume 2, 1891, and 3(2), 1898

[6] Girault L. Kallawaya- curanderos itinerantes de los andes. Ed. UNICEF-OPS-OMS Quipus. La Paz, 1987.

[7] Oblitas P. Plantas medicinales de Bolivia Ed. Los amigos del libro. La Paz, 1992.

[8] Correa J.E., Henry Q.L., Bernal Y. Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andres Bello Tomo, X Ed. Guadalupe, p 157-184. Bogota, 1994.

[9] Cronquist A. An Integrated System of Classification of Flowering Plant. Colombia University Press, p 90-95. New York 1981.

[10] Franquemont Ch., Franquemont E., *Satureja boliviana* In: The ethnobotany of Chinchero an Andean Community in Southem Peru. Fiekdiana Botany, 24: 79, 1990.

[11] De Lucca D., Zalles A.J. *Satureja Boliviana* In: Flora medicinal Boliviana. Ed. Los amigos del libro p. 335. La Paz, 1992.

[12] Emilio Lizagarra y Lidia R. Abdala. Compuestos Fenólicos Mayoritarios en *Satureja boliviana* (Benth.) Briq. (Lamiaceae), Cátedra de Elementos de Química Orgánica y Biológica, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205/51 T4000JFE. San Miguel de Tucumán. Argentina, Acta Farm. Bonaerense 23 (2): pp. 98-200. 2004.

[13] Vila R., Melo B. Chemical composition of two samples of essential oil of *Satureja boliviana* (Benth) Briq. From Peru and Bolivia. J Essent. Oil Res., 8: 307-309, 1996.

[14] Molina, A.; Virruto, C.I.; Campos, E., Estudio de Volátiles de *Satureja sp* por Micro Extracción en fase solida. Facultad de ingeniería. Universidad Nacional de Jujuy Gorriti 237. Jujuy. Argentina. 2001.

[15] Felice Senatore, Emma Urrunaga Soria, Rosa Urrunaga Soria, Giovanna Della Porta y Vincenzo De Feo, Essential Oils from Two Peruvian Satureja Species, Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Universita `Federico II', via D. Montesano, 49, 1-80131. 2001.

[16] Carmen I. Viturro, Ana Molina, Isabelle Guy, Brigitte Charles, Helene Guinaudeau y Alain Fournet, Essential oils of *Satureja boliviana* and *S. parvifolia* growing in the region of Jujuy, Argentina, Facultad de Ingeneria, Universidad Nacional de Jujuy, Gorriti 237 (4600), San Salvador de Jujuy, Argentina. France *Accepted* 06 *May* 1999.

[17] Viturro C.I., Molina A.C., Saavedra O.N., Campos E., Molina S., Aceites esenciales no tradicionales a partir de algunas especies aromáticas silvestres. Universidad nacional de Jujuy Anales de Saipa - sociedad argentina para la investigación de productos aromáticos viii congreso nacional de recursos naturales aromáticos y medicinales volumen xv - pág 41 a 57. 1994.

[18] Figueroa Soliz Nelson, Esteves Martini Tito, Giménez Turba Alberto. Propiedades Antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas nativas. Instituto de investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas Universidad Mayor de San Andrés. Diciembre 1995.

[19] Dominique Laurent, L. Antonio Vilaseca, Jean-Marie Chantraine, Carolt Ballivian, Gloria Saavedra and Rubén Ibañez. Insecticidal Activity of Essential Oils on *Triatoma infestans* ORSTOM, cp 2352, Cochabamba, Bolivia Programa Agroquímico, Universidad Mayor de San Simón, cp 992, Cochabamba, Bolivia, PHYTOTHERAPY RESEARCH, VOL. 11, pp 285–290. 1997.

[20] María José Abad, Paulina Bermejo, Eduardo Gonzales, Irene Iglesias, Alicia Irurzun' and Luis Carrasco' Antiviral activity of Bolivian plant extracts, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), Universidad Autónoma, Canto Blanco, Madrid, Spain Received 8 April 1998, accepted 7 July 1998.Available online 26 April 1999.

[21] Gonzales Eduardo, Iglesias Irene, Carretero Emilia and Villar Angel. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquimícas, Facultad de Farmacia, Universidad Mayor de San Andres, 3239 La Paz, Bolivia Departamento de Farmacologia, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain Received 20 November 1998 revised 6 July 1999, accepted 21 October 1999. Available online 31 May 2000.

[22] Elkin Galeano J., Elkin Higuita D., Alejandro Martínez M. Tri-acetato de Halistanol, un derivado del metabolito activo de la esponja marina colombiana *Topsentia ophiraphidites* Vitae, Revista de la facultad de Farmacia y Bioquimica Volumen 13 número 2, Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia. págs. 83-87. 2006.

[23] Jean-Marie Chantraine, Dominique Laurent, Carolt Ballivian, Gloria Saavedra, Ruben Ibañez y L. Antonio Vilaseca. Insecticida Activity of Essential Oils on *Aedes aegypti* Larvae1ORSTOM, Programa Agroquımico, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia PHYTOTHERAPY RESEARCH, VOL. 12,. 350–354. 1998

[24] Liu J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology.. 49, pp 57-68. 1995

[25] Lui J. Oleanolic and ursolic acid: Research perspectives. Journal of Ethnopharmacology. 100, pp 92-94. 2005.

[26] Ovesna Z., Kozics K., Slamenova D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. Mutat. Res. 600, pp 131-137. 2006.

[27] Muto Y., Ninomiya M., y Fujiki H. Present status research on cancer chemoprevention in Japan. Japanese Journal of Clinical Oncology. pp 219-224. 1990.

[28] Ishida M., Okubo T., Koshimizu K., Daito H., Tokuda H., Kin T., Yamamoto T., y Yamazaki N. Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. Chemical Abstract. 113, pp 12173. 1990.

[29] Ovesna Z., Vachalkova A., Horvathova K., Tothova D. Pentacyclic triterpenoic acis:new chemoprotective compounds. Neoplasma. 51, pp 327-333. 2004.

[30] Chen Y., Liu J., Yang X., Zhao X., y Xu H. Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, *in vitro* characterization and anhaced hepatoprotective effect. Journal of Pharmacy and Pharmacology.. 57, pp 259-264. 2005

[31] Tokuda H., Ohigashi H., Koshimizu K., y Ito Y. Inhibitory effect of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotions by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Lett.. 33, pp179-285. 1986.

[32] Ohigashi H., Takamura H., Koshimizu K., Tokuda H., y Ito Y. Search for possible antitumor prometers by inhibicion of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetateinduced epstein-Barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from an anti.inflamatory Chinese medicinal plant, Glechoma hederaceae. Cancer Lett. 30, pp 143-151. 1986.

[33] Nishino H., Tokuda H., Li T., Takemra M., Kuchide M., Kanazawa M., Mou X.Y., Bu P., Takayasu J., Onozuka M., Masuda M., Satomi Y., Konoshima T., Kishi N., Baba M., Okada Y., y Okuyama T. Cancer chemopreventions by ginseng in mouse liver and other organs. J. Korean Med. Sci.. 16, S66-9. 2001.

[34] Shon K.H., Lee H.Y., Chung H.Y., Young H.S., Yi S.Y., y Kim K.W. Anti-angiogenic activity of triterpene acid. Cancer Lett. 94, pp 213-218. 1995.

[35] Es-Saacle dy D., Simon A., Jayat-Vignoles C., Chulia A.J., y Delage C. MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salt. Anticancer Res.. 16, pp 481-486. 1996

[36] Choi Y.H., Baek J.H., Yoo M.A., Chumg H.Y., Kim N.D., y Kim K.W. Induction of apoptosis by ursolic acid through activations of caspases and down regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. Int. J. Oncol. 17, pp 565-571. 2000.

[37] Hollosy F., Meszaros G., Bokonyi G., Idei M., Seprodi A., Szende B., y Keri G. Activations of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivatives-induced apoptosis. Anticancer Res.. 21, pp 3481-3491. 2001.

[38] Konopleva M., Tsao T., Ruvolo P., Stiouf I., Estrov Z., Leysath C.E., Zhao S., Harris D., Chanh S., Jackson C.E., Munsell M., Suh N., Gribble G., Honda T., May W.S., Sporn M.B., y Andreeff M. Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentation in acute myelogenous leukema. Blood. 99, pp 326-335. 2002.

[39] Kim D.K., Baek J.H., Kang C.M., Yoo M.A., Sung J.W., Chung H.Y., Kim N.D., Choi Y.H., Lee S.H., y Kim K.W. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with yhe inhibition of initiation of DNA replication. Int. J. Cancer. 87, pp 629-636. 2000.

[40] Hollosy F., Meszaros G., Bokonyi G., Idei M., Seprodi A., Szende B., y Keri G. Cytostatic, cytotoxic and protein tyrosine kinase inhibitory activity of ursolic acid in A341 human tumor cells. Anticancer Res. 20, pp 4563-4570. 2000.

[41] Beak J.H., Lee Y.S., Kang C.M., Kim J.A., Kwon K.S., Son H.C., y Kim K.W. Intracellular Ca^{+2} relase mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cell. Int. J. Cancer. 73, pp 725-728. 1997.

[42] Lauthier F., Taillet L., Trouillas P., Delage C., y Simon A. Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human daudi cell. Anticancer Drugs. 11, 737-745. 2000.

[43] Min B.S., Kim Y.H., Lee S.M., Jung H.J., Lee J.S., Lee C.O., Lee J.P., Bae K. Cytotoxic triterpenes from crataegus pinnatifida. Arch. Pharm. Res. 23, 155-158. 2000.

[44] Chiang L.C., Chiang W., Chang M.Y., Lin C.C. Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. Am. J. Chin. Med.. 31, pp 37 46. 2003.

[45] Montes de Oca, I.. Geografía y Recursos Naturales de Bolivia. Ministerio de Relaciones Exteriores y Culto. Editorial Educacional del Ministerio de Educación y Cultura. La Paz, Bolivia, pp 574. 1989.

[46] Halder M, Balls M. Implementation of three Rs alternatives in regulatory testing: Possibilities and obstacles-the view of the validator. Developmental Biology (Basel). 111, pp199-206. 2002.

[47] Huggins J. Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. Alternatives to Animal Experimentation, 20, pp. 3-61. 2003.

[48] Combs R.D. The ECVAM workshops: a critical assessment of their impact on the development, validation and acceptance of alternative methods. Alternatives to Laboratory Animals, 30, pp 151-165. 2002.

[49] Repetto M. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad *in vitro*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición; pp. 303-305. 2002.

[50] Repetto M. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad *in vitro*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición;. pp. 303-305. 2002.

[51] Fentem J. H. The use of human tissues *in vitro* toxicology, Summary of general discussions. Human Experimental Toxicology; 13 (2): pp 445-449. 1994.

[52] Norma española une-en iso 10993-5. Evaluación biológica de productos sanitarios Parte 5: ensayos de citotoxicidad *in vitro*. 1995

[53] Garrido G. Contribución al estudio del mecanismo de acción Anti-inflamatorio del extracto natural de *Magnifera* Centro de química farmacéutica. Laboratorio de farmacología. Tesis de grado científico de doctor en ciencias farmacéuticas. Ciudad de la Habana – Cuba. Passim 2005.

[54] Dias M. Romay C., Rojas E., Gonzales R. "Efecto del aceite de teobroma ozonizado sobre la respuesta inflamatoria inducida en el modelo de edema en la oreja de ratón centro de investigaciones del ozono, centro nacional de investigaciones científicas. La Habana Cuba. RECVET-Rev. Electrónica de Clínica Veterinaria. Vol. 3 Nº 9. 2008.

[55] Contran R., Kumar V., Collins T. "Robbins patología estructural y funcional" Editorial Mc Graw Hill Interamericana. 6ta Edición, España: pp 53-55. 2000.

[56] Uria R. "Evaluación de la actividad de cinco especies vegetales tradicionales sobre la artritis experimentar inducida *Xanthium spinosum, Verbena officinalis, Sambucus peruviana, Urtica urens, Smilax aspera*" Tesis de licenciatura. Carrera de química farmacéutica. Facultad de ciencias farmacéuticas y bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia. 2005

[57] Navarro A. "Principios activos antiinflamatorios de *Sideritis foetens* clem, ex lag." Universidad Complutense. Madrid – España. 1998.

[58] Cascales M., Rodríguez M., de la Fuente M., Garcia P., Gomez E., Muños M., Perez M., Zapata A., "Bioquímica y Fisiopatología del Sistema Inmune" Instituto de Estaña. Realigraf, S.A. – Pedro Tezano, 26 – 28039 Madrid pp 31-61. 2007.

[59] Lafore, E. "Evaluación de una combinación de dexametasona fosfato con dexametasona acetato creativity in veterinary. Agrovet Market S.A. 2005.

[60] Campell B. "Autacoides derivados de lípidos: Eicosanoides y factor activador plaquetario" Bases farmacológicas de la terapéutica. Octava edición. Ediciones Goodman Gillman, A Rall, TW Nies AS Taylor P. Mexico D.F., pp 588-623. 1991.

[61] Martin I., Salgueiro M. Dispensación activa de antiinflamatorios no esteroideos con receta farmacéuticas adjuntas de Oficina de farmacia 2004.

[62] Araoz N., Araoz R., Holzer N., Mandil M. "Gastropatias por antiinflamatorios no esteroideos" Rev. De posgrado de la VI a catedra de medicina Nº 145. 2005.

[63] Marks R. Adverse side effects from the use of topical corticosteroids. Topical corticosteroid. Ediciones Maibach H., Surber Ch. Basel, Karger: pp 170-183. 1992

[64] Insel P. Analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios, y fármacos antigotosos. En: Hardman J, Limbird L, Molinoff R, Ruddon R, Goodman A, eds. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9 ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; pp. 61-91. 1996.

[65] Insel P. Analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios, y fármacos antigotosos. En: Hardman J, Limbird L, Molinoff R, Ruddon R, Goodman A, eds. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9 ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; pp. 103-117. 1996.

[66] Granizo E. Antiinflamatorios no Esteroidales. En: Samaniego E, ed. Fundamentos de Farmacología Médica. 5 ed. Quito: Editorial de la Universidad Central del Ecuador; pp. 465-509. 1999.

[67] Katzung B, Furst D. Antiinflamatorios no esteroidales, antirreumáticos modificadores de enfermedad, analgésicos no opioides, antiurémicos. En: Katzung B, ed. Farmacología Clínica. 7 ed. México DF: Ed. El Manual Moderno; pp. 70-82. 1998.

[68] Brewster R.Q., Vander Werf C.A. y Mc Ewen W.E. Curso Práctico de Química Orgánica, 2da Edición, Alhambra, S.A. Madrid, 1979.

[69] Roberts R.M., Gilbert J.C., Rodewald L.B. and Wingrove A.S. Modern Experimental Organic Chemistry, Third Edition, Holt, Rinehart and Winston, 1978.

[70] Still W.C., Kahn M. Rapid cromatographic tecnique for preparative separation with moderate resolution J. Org. Chem., 43 (14): 2923-2925, 1978.

[71] Winter C.A., Risley E. A., Nuss N.W. Carrageenin induced edema in hind paw of the ratas as an assay for antiinflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111: pp 544-547. 1962.

[72] Sugishita E., Amagaya S., Ogihara Y. Anti-inflammatory testing methods comparative evaluation of mice and rats. J. Pham. Dyn., 4: 565-575, 1981.

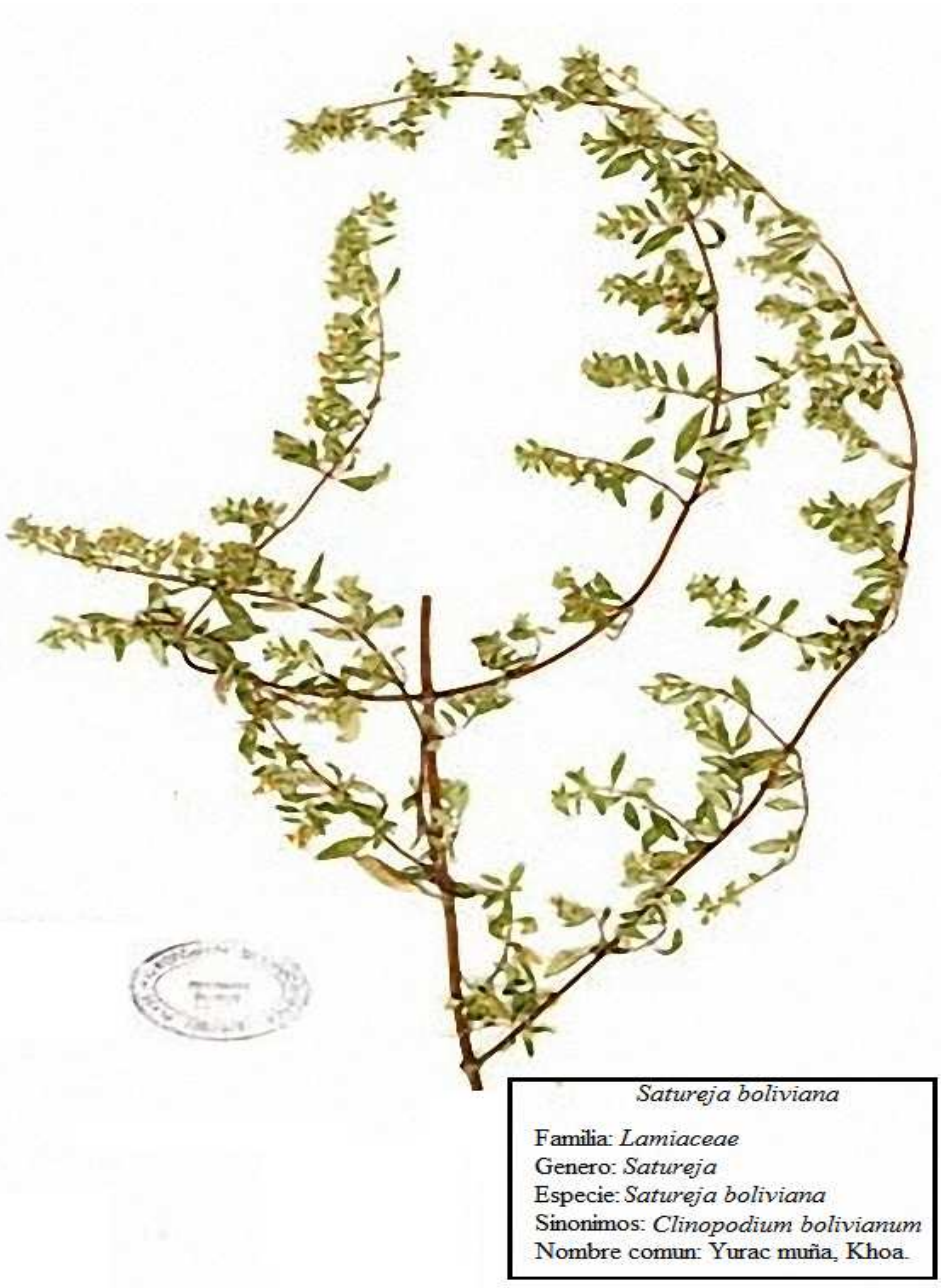
[73] Gonzales E. Especies Antiinflamatorias de la Flora Boliviana. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacología, Mayo 1998.

[74] Ciangherotti, C., Buitrago, D., Morales, A. Estudio de los componentes químicos de las hojas y tallos de *Cestrum buxifolium Kunth*. Mérida-Venezuela. Revista de la facultad de farmacia Vol. 46 (1). 2004.

10. ANEXOS.

ANEXO A

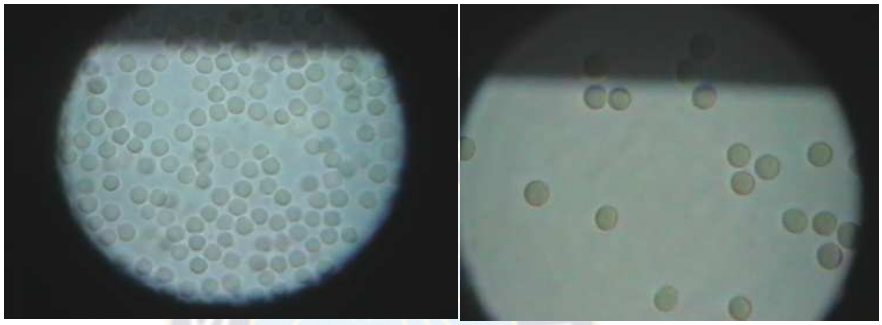
Fotografía de la especie vegetal *Satureja boliviana* "*Clinopodium bolivianum*" (Khoa).



ANEXO B

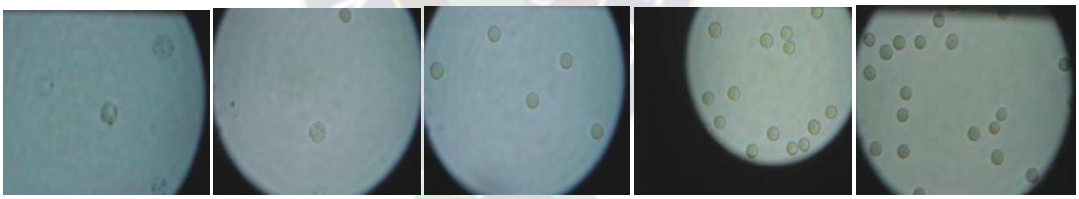
Fotografía de la actividad citotóxica.

Citotoxicidad Eritrocitos de sangre periférica humana



Eritrocitos no tratados **Eritrocitos + Anfotericina B**

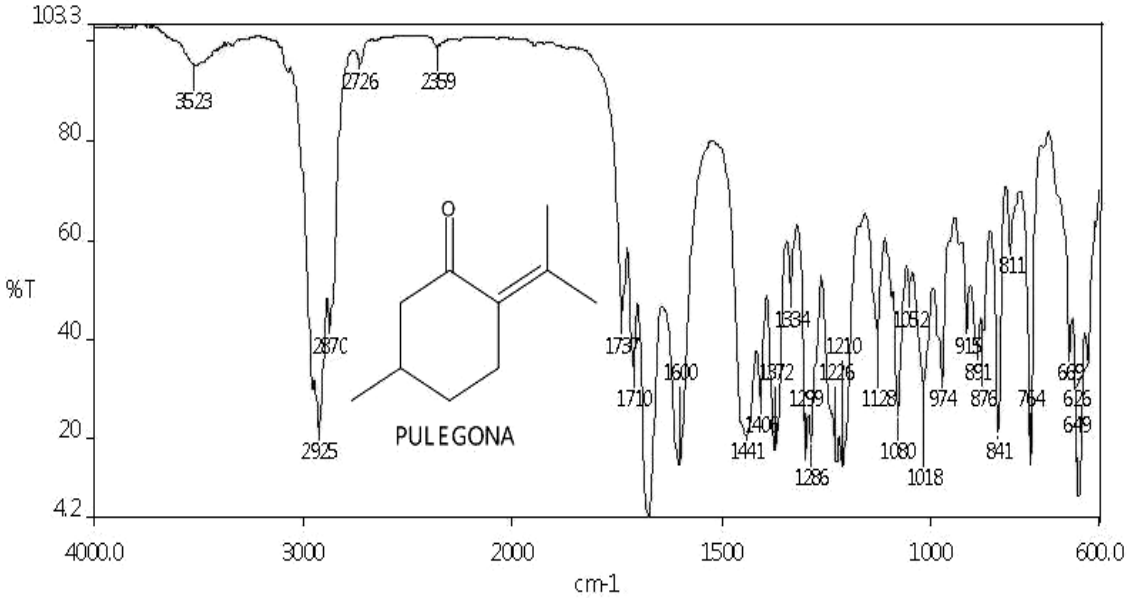
Eritrocitos + Acido ursólico



1000 µg/mL **500 µg/mL** **250µg/mL** **125 µg/mL** **62.5 µg/mL**

ANEXO C

Espectro Infrarrojo (IR) del aceite esencial de la especie *Satureja boliviana* (Khoa).



Fuente: Instituto de Investigaciones en Productos Naturales. UMSA