

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE HOJAS, FLORES Y FRUTOS DE *Bejaria resinosa*
Mutis ex Linné filius (Ericaceae) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA**

JAVIER ANDRÉS MATULEVICH PELÁEZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2013**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE HOJAS, FLORES Y FRUTOS DE *Bejaria resinosa*
Mutis ex Linné filius (Ericaceae) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA**

JAVIER ANDRÉS MATULEVICH PELÁEZ

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Magister en ciencias biológicas.**

Directora:

ELIZABETH GIL ARCHILA

Química, MSc.

Co-Director:

JULIO ARMANDO PEDROZO PÉREZ

Doctor en Ciencias Biológicas

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

BOGOTÁ D.C.

2013

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE HOJAS, FLORES Y FRUTOS DE *Bejaria resinosa*
Mutis ex Linné filius (Ericaceae) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA**


JAVIER ANDRÉS MATULEVICH PELÁEZ

Aprobado



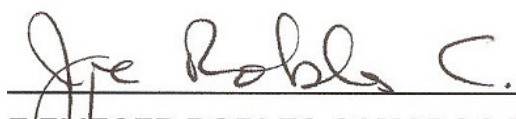
Dr. OSCAR JAVIER PATIÑO LADINO Ph.D.

(Jurado 1)



Dr. JULIO CESAR CALVO MOZO Ph.D.

(Jurado 2)



Dr. JORGE ELIECER ROBLES CAMARGO Ph.D.

(Jurado 3)



Dra. ELIZABETH GIL ARCHILA Ph.D.

(Directora del trabajo)

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE HOJAS, FLORES Y FRUTOS DE *Bejaria resinosa*
Mutis ex Linné filius (Ericaceae) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA**

JAVIER ANDRÉS MATULEVICH PELÁEZ
Aprobado

Dra. Concepción Judith Puerta Bula, Ph.D

Decana
Facultad de Ciencias

Dr. Manuel Antonio Franco Cortes, MD., Ph.D.

Director Posgrado
Facultad de Ciencias



Dra. ELIZABETH GIL ARCHILA Ph.D.

Profesora Investigadora Departamento de Química
Facultad de ciencias
Directora de tesis

“Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y conclusiones anotadas son responsabilidad sólo del autor y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana”

Artículo 9.18 del reglamento de los trabajos de grado y de investigación
Agosto de 1989

A la memoria de mi Padre: Alberto Matulevich Cortes (q.e.p.d)

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos:

A mi Directora la Profesora Elizabeth Gil Archila, quien con su empeño, colaboración, orientación y constante acompañamiento hizo posible el desarrollo satisfactorio y la culminación de la presente investigación.

A los integrantes del Grupo de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ), bajo la dirección del profesor Julio Armando Pedrozo Perez por su valiosa orientación y apoyo incondicional.

Al Profesor Luis Fernando Ospina del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (DFUNC) por la orientación, apoyo y disposición de los laboratorios en los ensayos de actividad antiinflamatoria.

A la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, por el préstamo de instalaciones y equipos robustos empleados en la determinación estructural.

Al Profesor William Fernando Castrillón Cardona de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, por su constante e incondicional apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1. ESTADO DEL ARTE	5
1.1. FAMILIA ERICACEAE	5
1.1.1. Características generales de la familia Ericaceae	5
1.1.2. Características morfológicas de la Familia Ericaceae	5
1.1.3. Distribución de la familia Ericaceae	6
1.1.4. Usos etnobotánicos de la familia Ericaceae	7
1.1.5. Actividades biológicas evaluadas en especies de la Familia Ericaceae	8
1.1.6. Quimiotaxonomía de la familia Ericaceae	9
1.1.6.1. Flavonoides y compuestos fenólicos	10
1.1.6.2. Terpenos	13
1.2. Género <i>Bejaria</i>	15
1.2.1. Características morfológicas del género <i>Bejaria</i>	15
1.2.2. Distribución del género <i>Bejaria</i>	16
1.2.3. Usos etnobotánicos del género <i>Bejaria</i>	17
1.2.4. Actividad biológica de especies del género <i>Bejaria</i>	17
1.2.5. Estudios fitoquímicos del género <i>Bejaria</i>	18
1.3. Especie <i>Bejaria resinosa</i>	20
1.3.1. Características morfológicas de la especie <i>Bejaria resinosa</i>	20
1.3.2. Distribución de la especie <i>Bejaria resinosa</i>	21
1.3.3. Usos etnobotánicos de la especie <i>Bejaria resinosa</i>	22
1.3.4. Actividad biológica de la especie <i>Bejaria resinosa</i>	23
1.3.5. Estudios fitoquímicos de la especie <i>Bejaria resinosa</i>	23

	Página
1.4. Actividad antiinflamatoria	24
1.4.1. Edema Plantar en Rata o Ratón Inducido por Carragenina	24
1.4.2. Edema auricular en ratón inducido por TPA	25
2. METODOLOGÍA	26
2.1. Generalidades	26
2.1.1. Métodos de separación cromatográfica	26
2.1.2. Técnicas para la elucidación estructural y caracterización de los compuestos aislados	27
2.1.2.1. Espectrometría de masas	27
2.1.2.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	28
2.2. Estudio fitoquímico de hojas, flores y frutos de <i>Bejaria resinosa</i>	28
2.2.1. Recolección e identificación del material vegetal	28
2.2.2. Extracción con éter de petróleo y purificación de metabolitos secundarios presentes en hojas, flores y frutos.	28
2.2.2.1. Extracto éter de petróleo de hojas de <i>Bejaria resinosa</i> (E.EDP.BrH)	29
2.2.2.2. Extracto éter de petróleo de flores de <i>Bejaria resinosa</i> (E.EDP.BrFL)	30
2.2.2.3. Extracto éter de petróleo de frutos de <i>Bejaria resinosa</i> (E.EDP.BrFR)	30
2.2.3. Extracción con etanol, fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en hojas, flores y frutos.	31
2.2.3.1. Fracción diclorometano de hojas de <i>Bejaria resinosa</i> (F.CH ₂ Cl ₂ .BrH)	33
2.2.3.2. Fracción acetato de etilo de hojas de <i>Bejaria resinosa</i> (F.AcOEt.BrH)	33
2.2.3.3. Fracción diclorometano de flores de <i>Bejaria resinosa</i> (F.CH ₂ Cl ₂ .BrFL)	34
2.2.3.4. Fracción acetato de etilo de flores de <i>Bejaria</i>	34

	Página
<i>resinosa</i> (F.AcOEt.BrFL)	
2.2.3.5. Fracción diclorometano de frutos de <i>Bejaria resinosa</i> (F.CH ₂ Cl ₂ .BrFR)	34
2.2.3.6. Fracción acetato de etilo de frutos de <i>Bejaria resinosa</i> (F.AcOEt.BrFR)	34
2.2.4. Extracción y caracterización química de los aceites esenciales.	37
2.2.4.1. Cuantificación de los componentes identificados	38
2.2.4.2. Densidad absoluta	38
2.2.4.3. Índice de refracción	39
2.3. Evaluación de la actividad Antiinflamatoria	39
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	41
3.1. Estudio fitoquímico preliminar	41
3.2. Metabolitos secundarios aislados	42
3.2.1. Composición de la mezcla Br1	43
3.2.2. Elucidación estructural del compuesto Br2	48
3.2.3. Elucidación estructural del compuesto Br3	54
3.2.4. Elucidación estructural del compuesto Br4	60
3.2.5. Elucidación estructural del compuesto Br5	63
3.2.6. Elucidación estructural del compuesto Br6	69
3.3. Composición química del aceite esencial de hojas	75
3.3.1. Propiedades físicas del aceite esencial	78
3.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria	78
CONCLUSIONES	82
RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	84

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1-1. Actividades biológicas de algunas especies vegetales de la familia Ericaceae.	8
Tabla 1-2. Clasificación taxonómica de <i>Bejaria resinosa</i> Mutis Ex Line filius.	20
Tabla 3-1. Resultados del ensayo fitoquímico preliminar.	41
Tabla 3-2. Tiempos de retención y resultados de la comparación con la librería NIST 08 para la mezcla Br1.	45
Tabla 3-3. Comparación de los desplazamientos químicos del compuesto Br2 con los del lupeol.	53
Tabla 3-4. Comparación de los desplazamientos químicos del compuesto Br3 con los de la quercetina.	59
Tabla 3-5. Comparación de los desplazamientos químicos RMN ¹ H del compuesto Br5 con los de la 3,5-dihidroxi,-6,7,8-trimetoxiflanova.	68
Tabla 3-6. Comparación de los desplazamientos químicos RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto Br7 con los de la catequina.	74
Tabla 3-7. Composición química relativa del aceite esencial obtenido en la columna RTX-5.	76
Tabla 3-8. Efectos de las fracciones y metabolitos secundarios evaluados de <i>Bejaria resinosa</i> sobre el edema auricular inducido por TPA.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1-1. Características morfológicas de la familia Ericaceae.	6
Figura 1-2. Distribución de la familia Ericaceae.	7
Figura 1-3. Características morfológicas del género <i>Bejaria</i> .	16
Figura 1-4. Distribución del género <i>Bejaria</i> .	17
Figura 1-5. Características morfológicas de la especie <i>Bejaria resinosa</i> A. Hojas. B. Flores. C. Frutos.	21
Figura 1-6. Distribución de la especie <i>Bejaria resinosa</i> en Colombia.	22
Figura 2-1. Esquema de la obtención de los extractos Éter de petróleo.	29
Figura 2-2. Fraccionamiento y purificación del compuesto Br1 .	30
Figura 2-3. Esquema de la obtención de extractos etanólicos y fracciones.	32
Figura 2-4. Aislamiento y purificación de los compuestos Br2 – Br6 .	36
Figura 3-1. Espectro RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la mezcla Br1.	44
Figura 3-2. Esqueleto triterpenico de la α y β amirina.	44
Figura 3-3. Corriente iónica total (TIC) obtenida para la mezcla Br1.	45
Figura 3-4. Estructuras de los posibles compuestos constituyentes de la mezcla Br1.	46
Figura 3-5. Espectro de masas en modo ionización electrónica para el germanicol.	46
Figura 3-6. Espectro de masas en modo ionización electrónica para la β-amirina.	46
Figura 3-7. Espectro de masas en modo ionización electrónica para la α-amirina.	47
Figura 3-8. Ruta de fragmentación propuesta para el germanicol.	47
Figura 3-9. Corriente iónica total (TIC) obtenida para el compuesto Br2.	48
Figura 3-10. Espectro de masas en modo ionización electrónica para	49

	Página
el compuesto Br2.	
Figura 3-11. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto Br2.	50
Figura 3-12. Espectro de RMN ^{13}C J-MOD (75 MHz, CDCl_3) del compuesto Br2.	51
Figura 3-13. Ampliación de espectro HSQC en RMN ^1H δ 1.5 a 5.0 y ^{13}C δ 10 a 120 ppm para el compuesto Br2.	52
Figura 3-14. Asignación de los desplazamientos químicos para el compuesto Br2 RMN ^1H (A) y RMN ^{13}C (B).	52
Figura 3-15. Espectro de masas en modo ionización electrónica para el compuesto Br3.	55
Figura 3-16. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, Acetona d_6) del compuesto Br3.	56
Figura 3-17. Ampliación de espectro HSQC en RMN ^1H δ 5.0 a 8.5 y ^{13}C δ 80 a 140 ppm para el compuesto Br3.	57
Figura 3-18. Ampliación del espectro HMBC RMN ^1H δ 5.5 a 8.5 y ^{13}C δ 90 a 170 ppm para el compuesto Br3.	58
Figura 3-19. Correlaciones HMBC para el compuesto Br3.	58
Figura 3-20. Corriente iónica total (TIC) obtenida para el compuesto Br4.	60
Figura 3-21. Espectro de masas en modo ionización electrónica para el compuesto Br4.	61
Figura 3-22. Vía de fragmentación propuesta para el compuesto Br4.	61
Figura 3-23. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto Br4.	62
Figura 3-24. Desplazamientos químicos RMN ^1H para el compuesto Br4.	62
Figura 3-25. Corriente iónica total (TIC) obtenida para el compuesto Br5.	63
Figura 3-26. Espectro de masas en modo ionización electrónica para	64

	Página
el compuesto Br5.	
Figura 3-27. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, Acetona d_6) del compuesto Br5.	65
Figura 3-28. Ampliación de espectro HSQC en RMN ^1H δ 3.0 a 9.0 y ^{13}C δ 50 a 150 ppm para el compuesto Br5.	66
Figura 3-29. Ampliación del espectro HMBC RMN ^1H δ 5.0 a 13.0 y ^{13}C δ 80 a 180 ppm para el compuesto Br5.	67
Figura 3-30. Correlaciones HMBC para el compuesto Br5.	67
Figura 3-31. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, Acetona d_6) del compuesto Br6.	70
Figura 3-32. Espectro de RMN ^{13}C J-MOD (75 MHz, Acetona d_6) del compuesto Br6.	71
Figura 3-33. Ampliación de espectro HSQC en RMN ^1H δ 1.0 a 8.0 y ^{13}C δ 20 a 145 ppm para el compuesto Br6.	72
Figura 3-34. Ampliación del espectro HMBC RMN ^1H δ 1.5 a 8.0 y ^{13}C δ 60 a 190 ppm para el compuesto Br6.	73
Figura 3-35. Correlaciones HMBC para el compuesto Br6.	73
Figura 3-36. Perfil cromatográfico del aceite esencial analizado por RTX-5.	75
Figura 3-37. Actividad antiinflamatoria de las fracciones y metabolitos secundarios obtenidos de <i>Bejaria resinosa</i> .	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AcOMe	Acetato de metilo
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
BrFL	<i>Bejaria resinosa</i> flores
BrFR	<i>Bejaria resinosa</i> frutos
BrH	<i>Bejaria resinosa</i> hojas
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CF	Cromatografía en columna flash
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
COX	Ciclooxigenasa
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble doblete
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDP	Éter de petróleo
EEt	Éter etílico
EM	Espectrometría de masas
EtOH	Etanol
eV	Electrón voltios
HMBC	¹ H-Detected Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	¹ H-Detected Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IE	Ionización electrónica
IR	Índice de retención
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LOX	Lipoxigenasa

<i>m</i>	Multiplete
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa carga
Me	Metilo
MeOH	Metanol
PGE2	Prostaglandina E2 (Dinoprostona)
PLA	Fosfolipasas
PMA	Acetato de forbol miristato
RDA	Retro Diels-Alder
RMN	Espectroscopia de Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrogeno
<i>s</i>	Singlete
σ	Desplazamientos químicos en RMN
<i>t</i>	Triplete
TIC	Corriente iónica total
TPA	13-acetato de 12-tetradecanoilforbol

RESUMEN

El presente trabajo de investigación describe los resultados del estudio fitoquímico y biológico realizado con los extractos de éter de petróleo y etanólicos de hojas, flores y frutos de la especie vegetal *Bejaria resinosa* (Ericaceae) clasificada en el Herbario Nacional Colombiano bajo el número de colección COL 565500 con el propósito de contribuir a las investigaciones realizadas a la familia Ericaceae ya que esta especie no cuenta con estudios recientes.

La separación de los extractos y fracciones por cromatografías en columna (CC), en capa delgada (CCD) y preparativa (CCDP), permitieron obtener una mezcla de compuestos tipo triterpeno compuesta por germanicol, α -amirina y β -amirina y el aislamiento de lupeol, salicilato de metilo y tres flavonoides; 3,5,7,3',4' pentahidroxiflavona (quercetina), 3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona y 3,5,7,3',4' pentahidroxiflavanol (catequina). La elucidación estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo mediante las técnicas de CG-EM y RMN (experimentos ^1H , ^{13}C , COSY, J-MOD, HSQC y HMBC) y por comparación con los datos reportados en la literatura.

Se obtuvo el aceite esencial por la técnica de hidrodestilación a partir de hojas frescas, su determinación se hizo por CG-EM, comparación de los índices de retención, los espectros de masas y los datos reportados en la literatura, donde se pudo determinar la presencia de noneno (61,91%), como el hidrocarburo alifático con el mayor porcentaje de composición relativa dentro del aceite.

La actividad antiinflamatoria se evaluó a nueve fracciones y la quercetina, utilizando el modelo murino de edema auricular inducido por 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) descrito por De Young (De Young *et al.*, 1989) y modificado por Payá (Payá *et al.*, 1993); siendo la fracción que contiene la mezcla de triterpenos y la quercetina las que presentaron un efecto antiinflamatorio mayor al 65%.

JUSTIFICACIÓN

Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo, debido entre otros factores, a su gran variedad de ecosistemas. Se reportan cerca de 50.000 especies de flora, de las cuales aproximadamente, 6.000 cuentan con algún tipo de característica medicinal y/o terapéutica (Ochoa, 2012), lo que abre campos de estudio en la identificación de usos de las plantas por comunidades locales y la identificación de principios activos responsables de dicha actividad terapéutica.

Por lo anterior, autoridades de salud y centros de investigación de la industria farmacéutica a nivel mundial han centrado su atención en la plantas de uso medicinal, ya que en principio el uso de estas plantas supone su efectividad en los países en vías de desarrollo y de otra parte se han convertido en una popular alternativa en los países desarrollados, tanto para su uso en los tradicionales preparados galénicos, como para su síntesis y comercialización como fármacos.

Diversos medicamentos de tipo antiinflamatorio empleados para tratar condiciones y dolencias como artritis, asma, problemas renales, golpes, alergias, enfermedades cardiacas, cáncer entre otras enfermedades asociadas a dolores agudos o crónicos acompañadas por inflamaciones, presentan una amplia efectividad para aliviar el dolor, sin embargo se reporta que su uso genera efectos secundarios serios; siendo uno de los más frecuentes las úlceras en el estómago (Sharapin, 2000).

Estos efectos secundarios son una de las razones por las cuales nuevos productos antiinflamatorios han despertado en los últimos años un gran interés científico en el área farmacológica, en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios (Gómez, 2011) y que minimicen los efectos secundarios.

El empleo etnofarmacológico de plantas en el manejo de procesos inflamatorios crónicos y la necesidad de su caracterización farmacológica, promueven el estudio químico de este tipo de especies vegetales y la evaluación de su actividad antiinflamatoria en modelos *in vivo*. Debido a lo anterior, se hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas y/o complementarias, dentro de las cuales están los productos derivados de fuentes naturales (González *et al.*, 2011).

Especies de los géneros más representativos de la familia Ericaceae, como *Rhododendron* y *Gaultheria*, han mostrado un elevado potencial antiinflamatorio; identificado específicamente en *R. arboreum*, *R. dauricum*, *R. anthopogon*, *R. aureum*, *R. mucronulatum*, *G. payanensis*, entre otras (Erdemoglu *et al.*, 2003). La actividad antiinflamatoria de estas especies responde a la presencia de metabolitos secundarios tipo triterpeno y flavonoide, considerados marcadores quimiotaxonómicos de esta familia (Harborne y Williams., 1973).

Esta familia se encuentra ampliamente distribuida en Colombia y es conocida también por sus propiedades ornamentales, diuréticas, astringentes, antisépticas de vías urinarias, sedantes, entre otras. De especies de *Bejaria*, uno de los géneros de esta familia, se han realizado pocas investigaciones dentro de las cuales se encuentran estudios preliminares de la especie *Bejaria glutinosa* Mutis ex Linné filius en los que se encontró la presencia de triterpenos y flavonoides (Wilches, 1981), lo que sugiere orientar un estudio fitoquímico de esta especie, donde se contribuya al conocimiento de sus metabolitos secundarios y se evalúe su posible actividad antiinflamatoria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al estudio fitoquímico de las hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa* Mutis ex Linné filius (Ericaceae) y evaluar su actividad antiinflamatoria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener extractos y fracciones de diferentes polaridades provenientes de hojas flores y frutos de la especie *Bejaria resinosa*.

Aislar, purificar y determinar la estructura química de los metabolitos mayoritarios presentes en los extractos o fracciones de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa*.

Determinar la composición química relativa del aceite esencial de hojas de *Bejaria resinosa*.

Evaluar la actividad antiinflamatoria de las fracciones y algunos metabolitos mayoritarios aislados de la especie *Bejaria resinosa*.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. FAMILIA ERICACEAE

1.1.1. Características generales de la familia Ericaceae

La familia Ericaceae es una familia diversa y ampliamente distribuida a nivel mundial, perteneciente al orden de los ericales, el cual está compuesto por más de 4500 especies de plantas organizados en ocho familias: Cyrillaceae, Clethraceae, Grubbiaceae, Empetraceae, Epacridaceae, Pyrolaceae, Monotropaceae y Ericaceae. Aproximadamente el 90% de las especies de este orden son pertenecientes a la familia Ericaceae (Luteyn y Pedraza, 2007).

1.1.2. Características morfológicas de la Familia Ericaceae

Son plantas leñosas que crecen como arbustos, las hojas son simples y sin estípulas y además suelen ser aciculares o coriáceas y generalmente glabras. El pecíolo es desarrollado y suele ser terete, semirollizo, aplanado, alado o acanalado, el ápice es obtuso y acuminado, aunque en algunas especies se encuentra aristado, caudado o cuspidado, la margen es entera y puede ser revoluta o recta. Las flores suelen ser solitarias, pareadas, ternadas o estar agrupadas en inflorescencias; son regulares, actinomorfas, con cuatro o cinco piezas en el cáliz; corola simpétala y urceolada; Los estambres son ocho o diez, no apendiculados en las anteras, obdiplostémonos; carpelos concrecentes en un ovario plurilocular. El fruto es una baya esférica a elipsoide, cuyo color puede ser blanco o morado, carnoso bacciforme y drupáceo (Salinas y Betancur, 2005; García, 1992; Font Quer, 2001). En la figura 1-1 se observan algunas de las características morfológicas descritas anteriormente.



Figura 1-1. Características morfológicas de la familia Ericaceae (Meemelink, s.f.).

1.1.3. Distribución de la familia Ericaceae

Las Ericáceas constituyen una familia diversa con 110 géneros y aproximadamente 4000 especies, presentando variación en las diferentes áreas continentales. Las plantas de esta familia presentan una amplia distribución geográfica; como se puede observar en el mapa de la figura 1-2 están presentes en todos los continentes desde las zonas templadas y frías (excepto en la Antártica) hasta las regiones montañosas neotropicales, donde alcanzan su mayor diversidad (Luteyn, 2007).

Las ericáceas presentes en el neotrópico se concentran en el noreste de Suramérica (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela), especialmente en bosques montanos húmedos y fríos ubicados entre los 1500 y 3000 metros de elevación. En Colombia, se estiman unos 22 géneros y unas 270 especies presentes principalmente en los bosques montañosos de las regiones pacífica (cordillera occidental) y andina (cordilleras central y oriental) con una mayor población de las mismas en alturas entre los 1.000 y 2.000 m de altura (Salinas y Betancour, 2005).

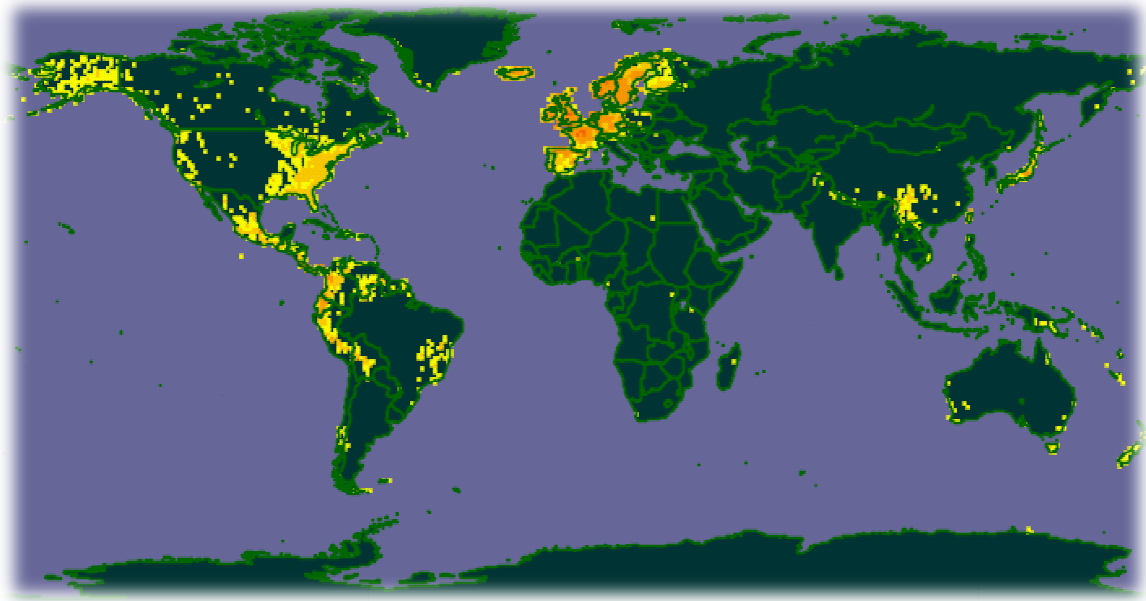


Figura 1-2. Distribución de la familia Ericaceae. (Global Biodiversity Information Facility, s.f.).

*Las zonas de color amarillo corresponden a la distribución de la familia Ericaceae

1.1.4. Usos etnobotánicos de la familia Ericaceae

La amplia distribución y diversidad de las especies de la familia Ericaceae, han logrado satisfacer a lo largo del tiempo muchas de las necesidades de los seres humanos, en especial, tratamientos alternos a los farmacológicos. Por ejemplo, en algunas regiones de Turquía, las ramas y flores de *Calluna vulgaris* son usadas en infusión como diurético y desinfectante urinario. En otras regiones de Europa, esta planta es usada en tratamientos como antirreumático, astringente, antiséptico, diurético, diaforético, expectorante, depurativo, sedante suave y como tratamiento para la gota (Orhan, Küpeli, Terzioğlu y Yesilada, 2007). En algunas regiones del África tropical, la especie *Agauria salicifolia*, es conocida por ser tóxica al ser consumida por humanos y animales, sin embargo, gracias a sus principios activos como diterpenoides y triterpenoides, se utiliza tradicionalmente para tratar heridas ulcerosas, como depurativo e incluso para tratar la sarna (Lhuillier *et al.*, 2007).

1.1.5. Actividades biológicas evaluadas en especies de la Familia Ericaceae

Los estudios de actividades biológicas realizados a especies de la familia Ericaceae son bastante amplios, siendo el género *Rhododendron* el que mayor número de reportes presenta debido a su amplia distribución geográfica y a que es el género más representativo de esta familia. Dentro de las diversas actividades biológicas evaluadas a extractos y compuestos aislados de especies pertenecientes a esta familia se encuentran reportes de actividad antiinflamatoria, analgésica, antimicrobiana, antidiabética, insecticida y citotóxica. En la Tabla 1-1, se ilustran algunos estudios biológicos realizados en especies de la familia Ericaceae.

Tabla 1-1. Actividades biológicas de algunas especies vegetales de la familia Ericaceae.

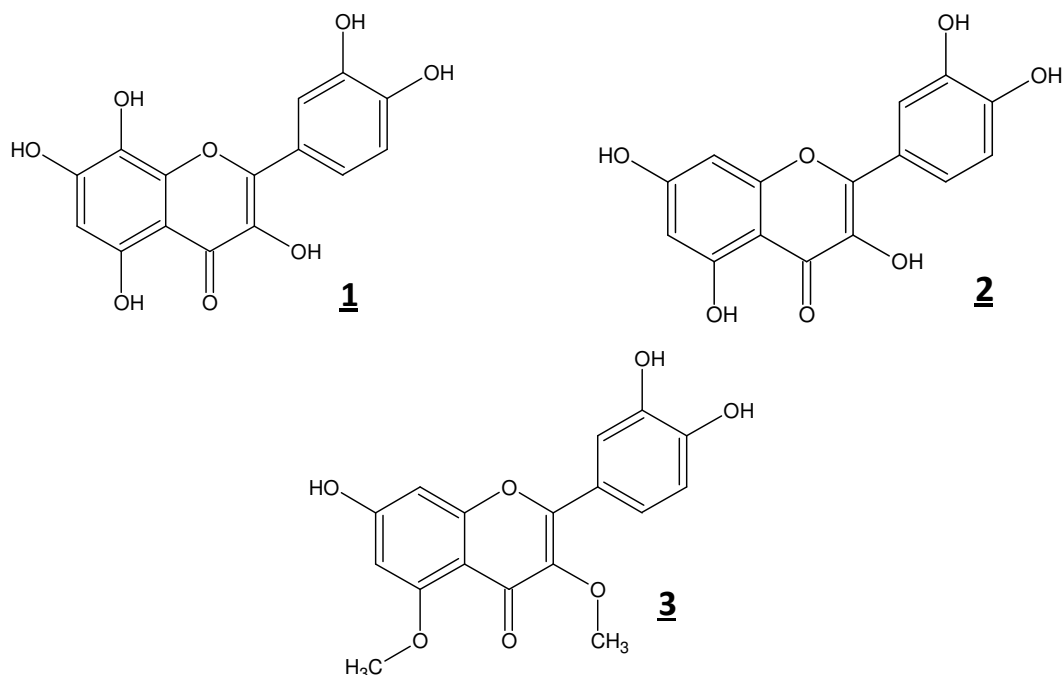
Espece	Órgano de la planta y/o extracto o metabolito evaluado	Actividad Biológica	Referencia
<i>Calluna vulgaris</i> L.	Partes aéreas (kaempferol-3-O- β -D-galactosido)	Actividad antiinflamatoria y anticonceptiva	Orhan <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhododendron arboreum</i>	Flores (Extracto etanólico)	Actividad antiinflamatoria	Agarwal and Kalpana, 1988; Verma <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhododendron ponticum</i>	Hojas (Extracto etanólico, Isoquercitrina)	Actividad antiinflamatoria	Erdemoglu <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhododendron dauricum</i>	Hojas (Azelaína)	Actividad antiinflamatoria	Singh and Rao, 2009
<i>Rhododendron anthopogon</i>	Partes aéreas (Aceite esencial)	Actividad antiinflamatoria	Innocenti <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhododendron aureum</i>	Hojas (Extracto metanólico)	Actividad antiinflamatoria	Kim <i>et al.</i> , 2011

Especie	Órgano de la planta y/o extracto o metabolito evaluado	Actividad Biológica	Referencia
<i>Rhododendron mucronulatum</i>	Raíces (Taxifolina, Quercetina 3-O- α -L-arabinofuranosido)	Actividad antiinflamatoria	Choi <i>et al.</i> , 2011
<i>Erica multiflora</i>	Flores (Extracto acuoso)	Actividad diurética	Chrifa Sadki, 2010
<i>Ledum groenlandicum</i> Retzius	Hojas y tallos (Extracto metanólico)	Actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena	Dufour <i>et al.</i> , 2007
<i>Gaultheria procumbens</i>	Hojas (Extracto etanólico)	Actividad antifúngica	Jones <i>et al.</i> , 2000
<i>Agauria salicifolia</i> Oliv.	Hojas (Extracto metanólico)	Actividad antifúngica	Hamza <i>et al.</i> , 2006
<i>Vaccinium myrtillus</i>	Frutos	Actividad antioxidante y antimicrobiana,	Abreu <i>et al.</i> , 2008
<i>Vaccinium floribundum</i> (Kunth)	Cáscara del fruto.	Actividad antioxidante	Vasco <i>et al.</i> , 2009
<i>Arbutus unedo</i> L.	Frutos	Actividad antioxidante, antiséptica, antidiarréica, astringente, diurética y antidepresiva	Pawlowska <i>et al.</i> , 2006

1.1.6. Quimiotaxonomía de la familia Ericaceae

De los estudios fitoquímicos realizados sobre especies de la familia Ericaceae, flavonoides, compuestos fenólicos y terpenos son los metabolitos comúnmente reportados y que tienen gran importancia quimiotaxonómica para la familia; de estos metabolitos, son los flavonoides la clase de compuestos químicos de mayor relevancia para la familia Ericaceae, pues están presentes en la mayoría de especies y han sido encontrados en diversos órganos vegetales siendo las hojas

en donde son más abundantes; dentro de estos sobresalen gossypetina (**1**), quercetina (**2**), y 3,5-dimetoxi quercetina (**3**) (Harborne y Williams; 1973).

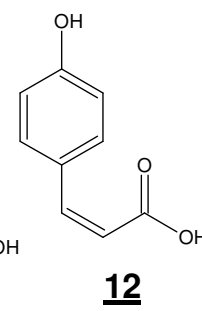
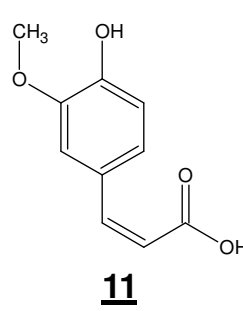
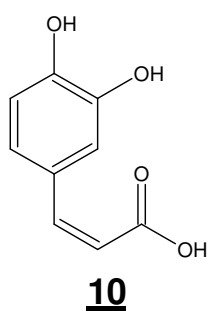
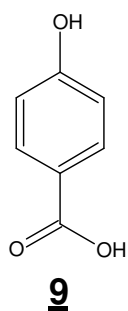
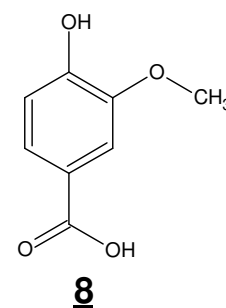
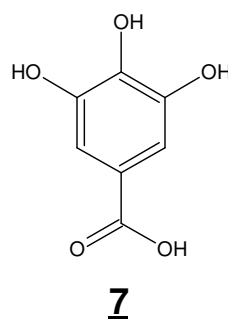
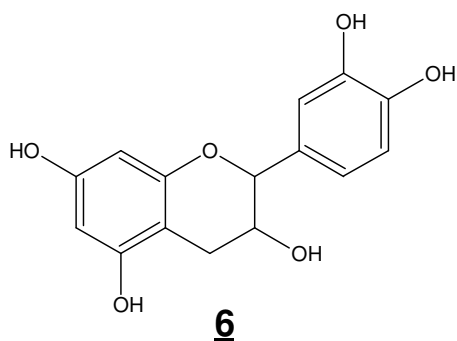
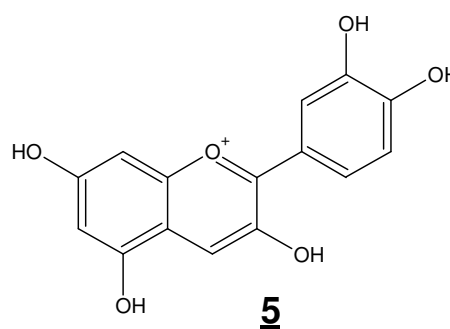
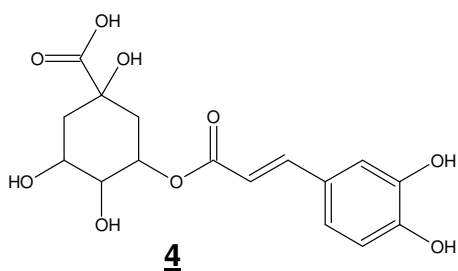


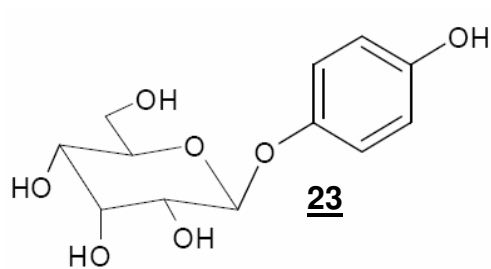
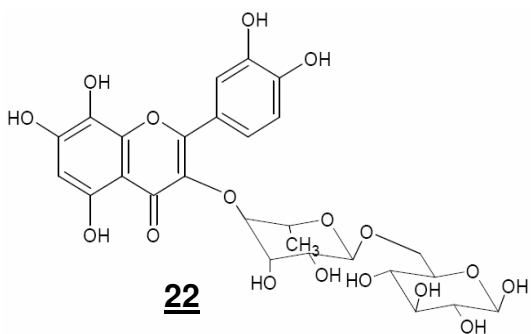
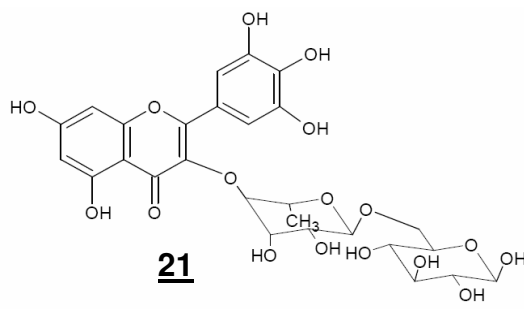
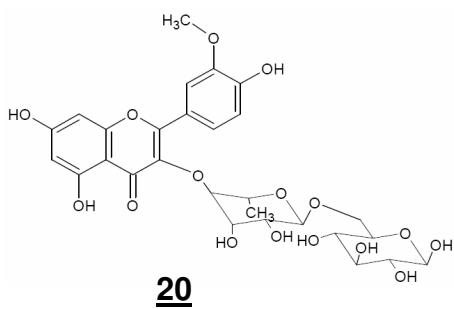
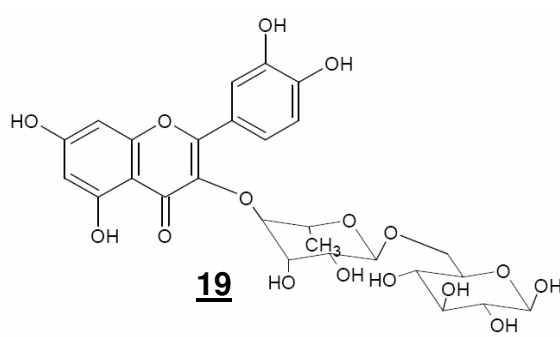
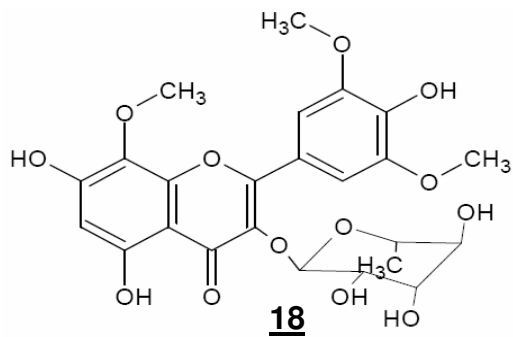
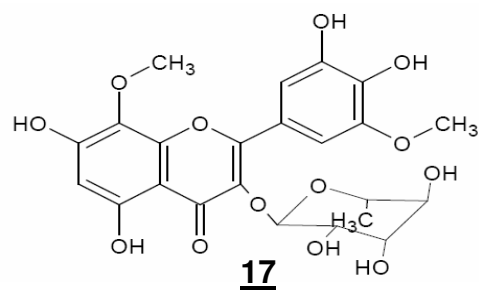
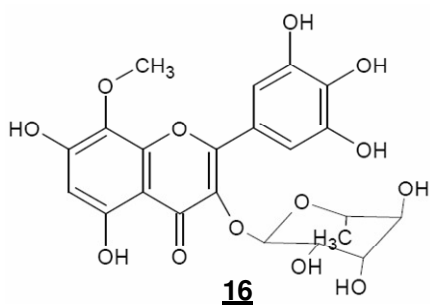
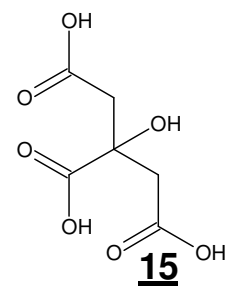
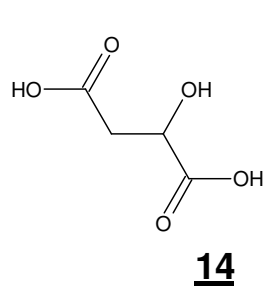
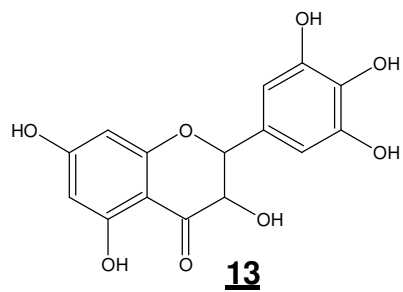
1.1.6.1. Flavonoides y compuestos fenólicos

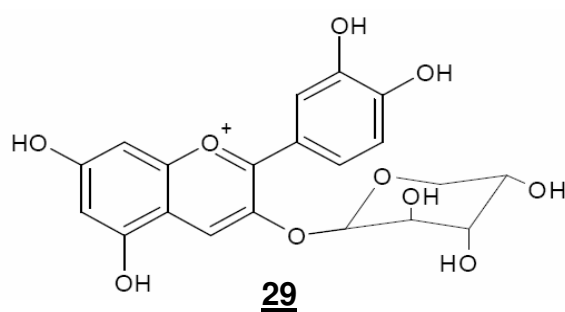
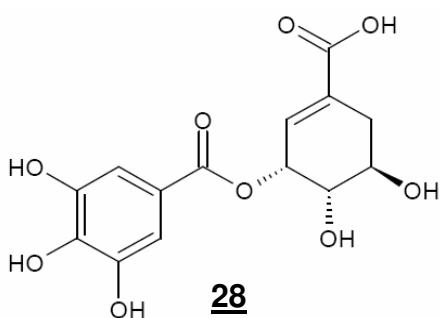
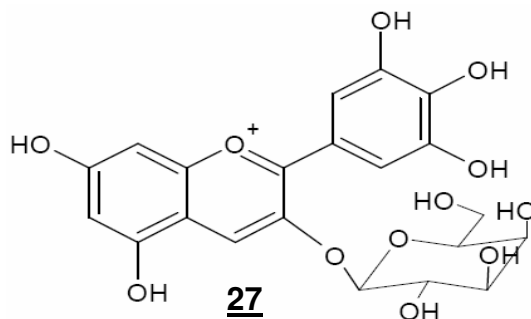
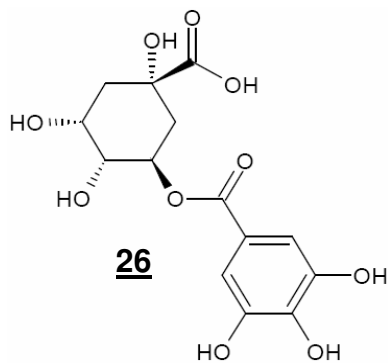
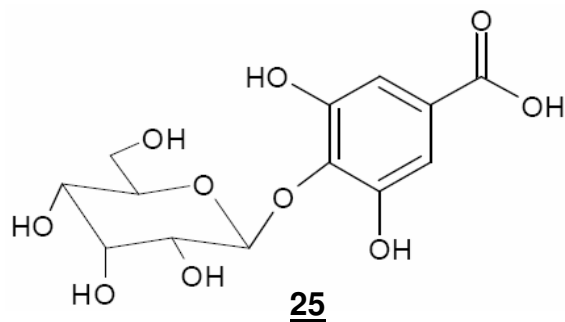
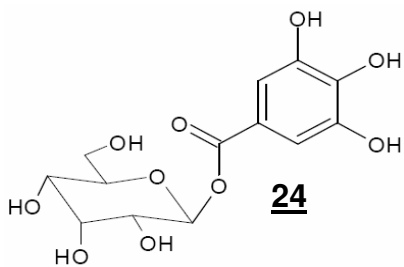
Este grupo de metabolitos es el más representativo, puesto que el aislamiento e identificación de los mismos está ampliamente reportado para diferentes géneros pertenecientes a la familia Ericaceae.

Los compuestos fenólicos, flavonoides y glicósidos de flavonoides han sido aislados generalmente de las hojas, flores y frutos de las plantas; sus reportes se centran principalmente en especies de los géneros *Rhododendron*, *Vaccinium*, *Erica* y *Arbutus*. Algunos ejemplos de compuestos encontrados son: Ácido clorogénico (**4**), cianidina (**5**), catequina (**6**), ácido gálico (**7**), Ácido vanílico (**8**), Ácido p-hidroxibenzóico (**9**), Ácido caféico (**10**), Ácido felúrico (**11**), Ácido p-cumárico (**12**) (Vasco *et al.*, 2009, Häkkinen, 1999, Gournelis, 1995), miricetina (**13**) (Vasco *et al.*, 2009; Häkkinen *et al.*, 1999), Ácido málico (**14**), Ácido cítrico (**15**), (Serçe *et al.*, 2010; Häkkinen *et al.*, 1999), 3,5,7,3',4',5'-Hexahidroxi-8-metoxiflavona-3-O- α -L-ramnopiranosido (**16**), 3,5,7,3',4'-Pentahidroxi-8,5'-

dimetoxiflavona-3-*O*- α -*L*-ramnopiranosido (**17**), 3,5,7,4' Tetrahidroxi-8,3',5' trimetoxiflavona 3-*O*- α -*L*-ramnopiranosido (**18**) (Gournelis, 1995), Quercetina-3-rutinósido (**19**), Isoramnetina-3-rutinósido (**20**), Miricetina-3-rutinósido (**21**), Gosipetina 3-[α -*L*-ramnopiranosil (1 \rightarrow 6) β -*D*-glucopiranosido] (**22**) (Bennini, Chulia, y Kaouadji, 1994), Arbutina (**23**), β -*D*-glucogallina (**24**), Ácido gálico 4-*O*- β -*D*-glucopiranosido (**25**), Ácido 3-*O*-galiolquinico (**26**), Delfinidina 3-*O*-galactosido (**27**), Ácido 3-*O*-galiolshikimico (**28**), Cianidina 3-*O*-arabinosido (**29**) (Pawlowska *et al.*, 2006)

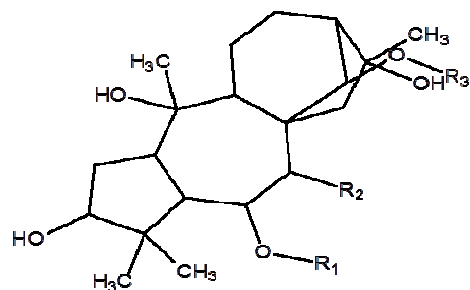






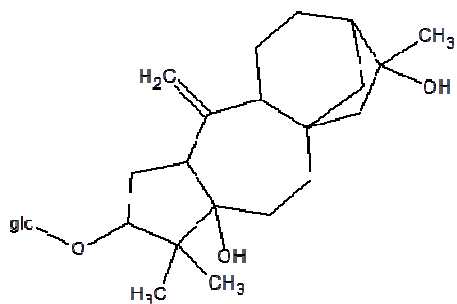
1.1.6.2. Terpenos

En algunas especies de la familia Ericaceae han sido identificados diferentes tipos de terpenos dentro de ellos diterpenos y triterpenos en forma de aglicona y glicosilados. En la fracción de acetato de etilo de las hojas de *Pieris formosa* fueron aislados dos nuevos grayanolidos (diterpenos): pierisformosin B (**30**) y pierisformosin C (**31**) (Bing-Yang Din, 1998).

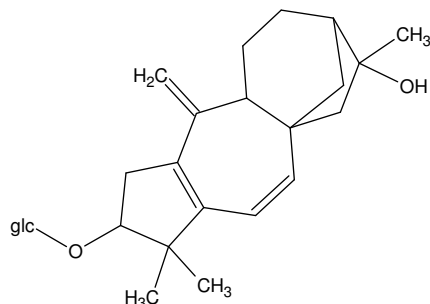


30 R₁= H, R₂= H, R₃= CH₃CH₂CO
31 R₁= H, R₂= OH, R₃= CH₃CH₂CO

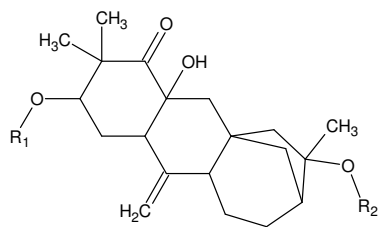
Varios diterpenos glicosilados han sido aislados de esta misma especie como la pierisformosida B (**32**), C (**33**), D (**34**), E (**35**) y F (**36**) (Bing-Yang Din, 1998).



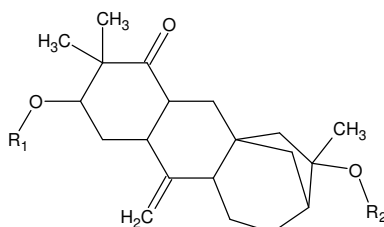
32



33

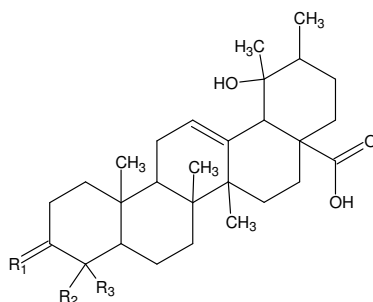


34 R₁= glc, R₂= H
35 R₁= H, R₂= glc



36 R₁= H, R₂= glc

Se han encontrado triterpenos glicosilados como el ácido 19, 24-dihidroxiursano-12-en-3-ona-28-oico (**37**) aislado de las hojas de *Rhododendrom simsii* (Takahashi *et al.*, 2001).



37 $R_1=O$, $R_2=CH_3$, $R_3=CH_2OH$

1.2. Género *Bejaria*

1.2.1. Características morfológicas del género *Bejaria*

En cuanto al género *Bejaria* en particular se puede decir que es neo tropical taxonómicamente complejo de 15 especies frugíferas y arbóreas. Sus flores presentan como característica principal siete pétalos libres, las anteras son no apendiculares y los frutos son capsulares, (Luteyn; 2007).

Las ramas son cilíndricas a obtusas y con vellosidades, las hojas son simples, alternadas, estipuladas y perenes; son verdes cuando maduran, pero algunas pueden ser rojas cuando jóvenes. La mayoría de las flores de *Bejaria* tienen siete pétalos y tienen diagramas florales idénticos; solamente *B. sprucei* tiene de cinco a seis pétalos en las flores. Los frutos son leñosos, café, capsulas deprimidas ovoides o globosas con ápice deprimido. Las semillas son pequeñas, 1,2 – 2.0 mm de longitud y 0,3 – 0,7 mm de ancho, fusiformes y caudadas (Luteyn; 2007).

La mayoría de las especies de *Bejaria* son frugíferas; únicamente *B. aestuans* y *B. sprucei* son arbóreas las cuales presentan troncos bien desarrollados y pueden ser arboles de tamaño moderado cuando crecen en bosques de niebla o bosques de pino y roble bien protegidos (Luteyn; 2007). En la figura 1-3 se pueden observar algunas de las características morfológicas descritas anteriormente.

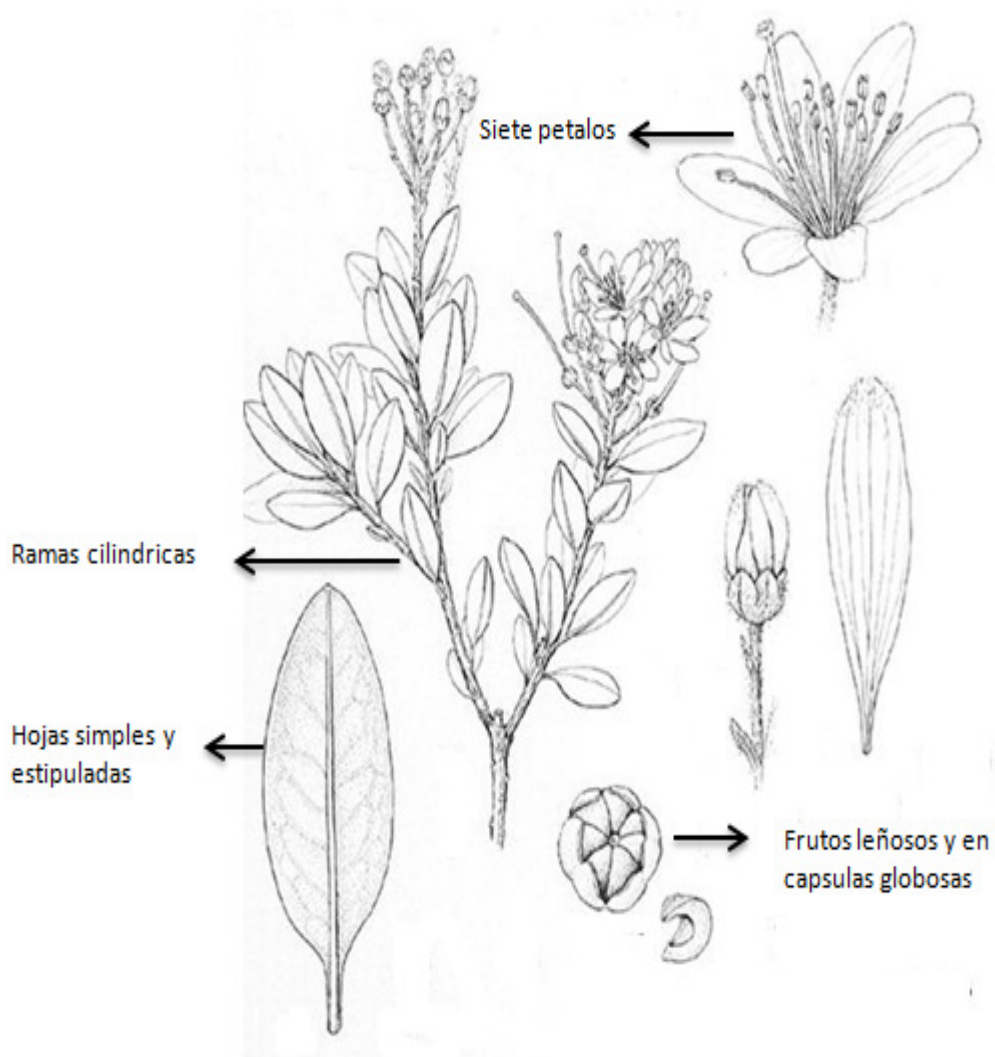


Figura 1-3. Características morfológicas del género *Bejaria* (Shismay, s.f.).

1.2.2. Distribución del género *Bejaria*

Las especies de *Bejaria* se localizan en el sureste de Estados Unidos, oeste de Cuba, centro y sur de México, dispersamente localizada en Centroamérica y en Suramérica se encuentra desde Colombia hasta Bolivia (Figura 1-4). Cuatro especies (*B. aestuans*, *B. resinosa*, *B. sprucei*, *B. mathewsi*) son altamente variables y ampliamente distribuidas, las otras once especies son morfológicamente uniformes y únicamente distribuidas localmente (Luteyn; 2007).



Figura 1-4. Distribución del género *Bejaria*. (tropicos.org, s.f.).

*Las zonas de color amarillo corresponden a la distribución del género *Bejaria*

1.2.3. Usos etnobotánicos del género *Bejaria*

Las plantas del género *Bejaria* son empleadas en ebanistería para la elaboración de gabinetes y gradación de tornería; en la medicina tradicional *Bejaria aestuans* y *Bejaria resinosa* son utilizadas para dolencias cardiacas y pulmonares. En Perú *Bejaria cinnamomea* es empleada como antiséptico y para la regulación de ciclos menstruales (Vincenzo De Feo, 2003) y en Ecuador *Bejaria aestuans* es empleada para aliviar dolencias generadas por la artritis y *Bejaria resinosa* como relajante y calmante del dolor en los riñones (Tene, 2006).

Uno de los más interesantes usos de *Bejaria* es como goma para atrapar insectos gracias a la resina que se encuentra en sus hojas y flores.

1.2.4. Actividad biológica de especies del género *Bejaria*

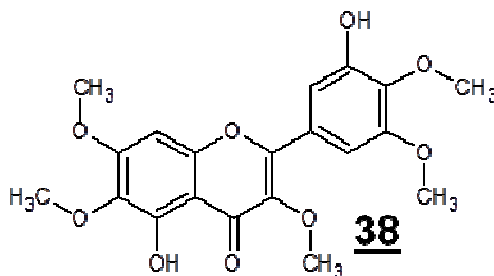
En cuanto a los estudios de actividad biológica, el género *Bejaria* no cuenta con muchos reportes, probablemente por ser un género poco distribuido (Luteyn *et al.*, 2007), sin embargo, a varias de las especies pertenecientes a este género, se les suele atribuir actividad analgésica y antiinflamatoria.

Las investigaciones reportadas en cuanto a actividades biológicas de este género son escasas y se limitan a dos estudios de acuerdo con lo revisado en las bases de datos bibliográficas; uno realizado con el extracto etanólico de *Bejaria aestuans*, al cual le fue evaluada la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* presentando una concentración mínima inhibitoria de 16 mg/mL (Bussmann *et al.*, 2010) y otro en el cual se realizó un estudio toxicológico al extracto etanólico y acuoso de *Bejaria aestuans*, observando que esta especie es altamente toxica reportando valores de LC₅₀ de 17 µg/mL y 3,5 µg/mL respectivamente (Bussmann *et al.*, 2011).

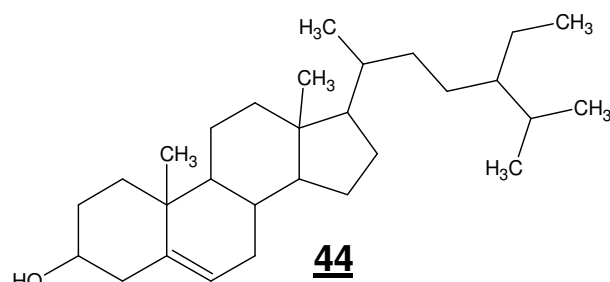
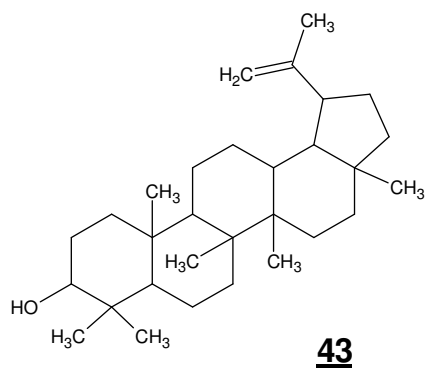
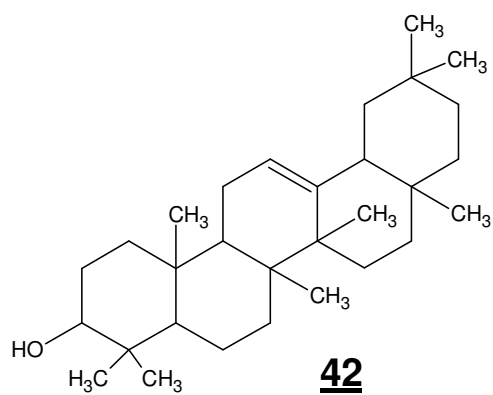
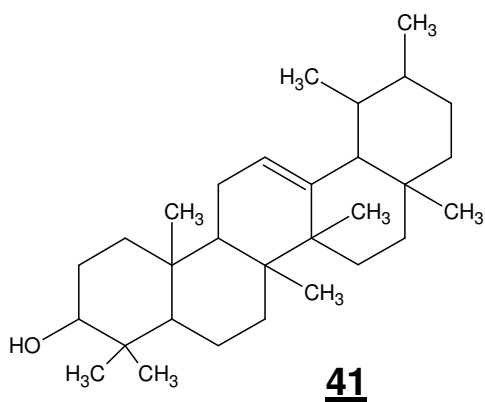
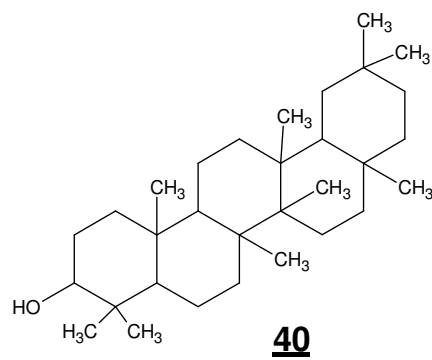
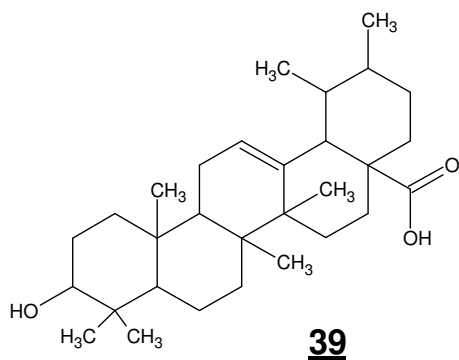
1.2.5. Estudios fitoquímicos del género *Bejaria*

Se han realizado estudios sobre diferentes especies de *Bejaria* con el fin de caracterizar los metabolitos secundarios presentes y determinar su potencial biológico. De la mayoría de las especies se han aislado algunos metabolitos, entre los que sobresalen los triterpenos y flavonoides.

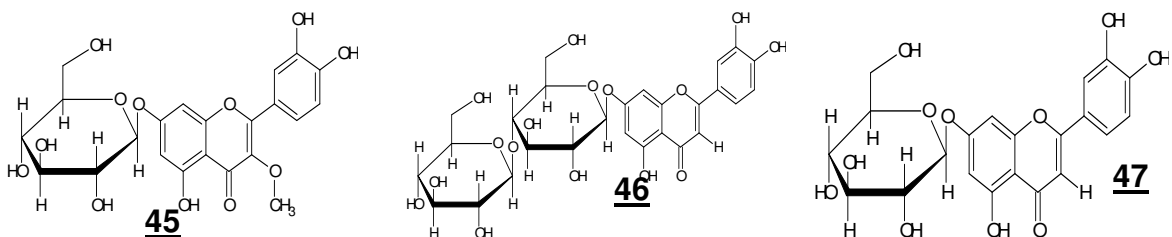
Algunos análisis químicos de flavonoides muestran que la quercetina (**2**) siempre se encuentra presente y que la miricetina (**13**) algunas veces, el 3',5-dihidroxi-3,4',5',6,-7-pentametoxiflavona (**38**) ha sido tentativamente identificado en varias especies de *Bejaria*. No ha sido realizado ningún análisis completo de los flavonoides glicosilados, pero cromatografías preliminares sugieren que los patrones de flavonoides glicosilados son extremadamente variables entre las diferentes especies de *Bejaria* (Clemants, 1991).



Un estudio realizado a las hojas de *Bejaria racemosa* reportó la presencia de ácido ursólico (**39**), taraxerol (**40**), α -amirina (**41**), β -amirina (**42**), lupeol (**43**) y β -sitosterol (**44**) (Ueda., *et al* 1961).



De las partes aéreas de *Bejaria cinnamomea* fueron aislados tres flavonoides glicosilados: Quercetina-3-metoxi-7-*O*- β -*D*-glucósido (**45**), apigenina-7-*O*-gentiobiosido (**46**) y luteolina-7-*O*- β -*D*-glucósido (**47**) (Montoro, 2005).



Análisis fitoquímicos preliminares aplicados sobre la especie *Bejaria aestuans* evidencian la presencia de esteroides, alcaloides, taninos, cardenólidos, antraquinonas y flavonoides (<http://pdrs.org.pe>, s.f.).

1.3. Especie *Bejaria resinosa*

1.3.1. Características morfológicas de la especie *Bejaria resinosa*

La especie *Bejaria resinosa* es un arbusto de flores vistosas de color rojo, cubiertas de una resina la cual le sirve como goma para atrapar insectos. En la tabla 1-2 se presenta la descripción taxonómica de la planta (<http://biovital.unal.edu.co>, s.f.)

Tabla 1-2. Clasificación taxonómica de *Bejaria resinosa* Mutis Ex Line Filius

Reino	Vegetal
División	Angiosperma
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Metachlamydeae
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Subfamilia	Rhododendroideae
Género	<i>Bejaria</i>
Especie	<i>Bejaria resinosa</i>

Esta especie se caracteriza por ser un arbusto de 0,5 a 2 metros de altura el cual crece entre los 2400 y 3600 m.s.n.m; las hojas son coriáceas, planas o revolutas; sus flores son bastante vistosas debido a su color rojo y con anteras apendiculares; los frutos son capsulas globosas con exocarpo color café. En la Figura 1-5. Se muestra un ejemplo de las características morfológicas de la especie *Bejaria resinosa*.



Figura 1-5. Características morfológicas de la especie *Bejaria resinosa* A. Hojas. B. Flores. C. Frutos

(http://concursos.colombiaaprende.edu.co/expediciones_botanica, s.f.)

1.3.2. Distribución de la especie *Bejaria resinosa*

La especie *Bejaria resinosa* es comúnmente un arbusto de páramo o subpáramo localizada desde el Páramo de Tamá (Venezuela) al sur de Colombia, y del Páramo del Castillo (Ecuador) al Cerro de Calla (Perú), a (1750 - 3700 m.s.n.m.). En Colombia se distribuye en los departamentos de Antioquia, Arauca, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Santander y Valle (Figura 1-6). Comúnmente es conocida con el nombre de pegamosco, pegajosa, angucho, carbonero, azalea del monte, pegapega, payama y purunrosa (Luteyn *et al.*, 2007).

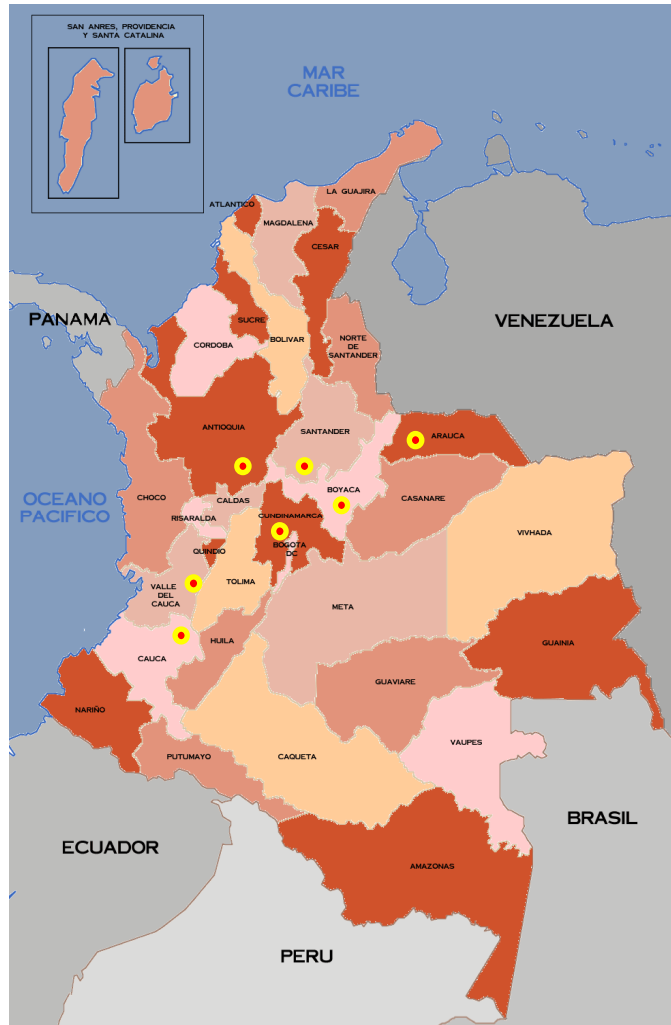


Figura 1-6. Distribución de la especie *Bejaria resinosa* en Colombia.
 *Los puntos amarillos corresponden a la distribución de la especie *Bejaria resinosa* en Colombia (Luteyn; 2007)

1.3.3. Usos etnobotánicos de la especie *Bejaria resinosa*

La especie *Bejaria resinosa* es usada en Colombia (Cundinamarca) como goma para atrapar insectos, de allí los nombres de matamosca y pegamosca. En Ecuador se emplea para tratar heridas y esguinces; también es empleada como purgante y como agente preventivo de ataques al corazón; en Perú es considerada una fuerte medicina para dolencias respiratorias (Luteyn, 1995).

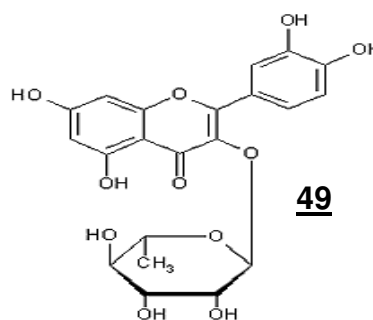
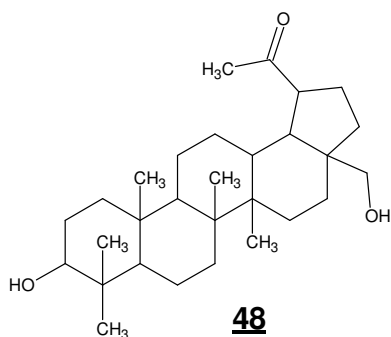
1.3.4. Actividad biológica de la especie *Bejaria resinosa*

A nivel de estudios de actividad biológica, son pocos los reportados en la literatura. Se ha probado la toxicidad de los extractos etanólicos totales de *Bejaria glutinosa* los cuales se utilizaron en varias concentraciones para determinar el poder toxico en ratones y la reacción en la germinación y el crecimiento de *Rhapanus sativa*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*. El extracto total de la planta aplicado vía oral e intraperitoneal en ratones proporcionó resultados negativos para la toxicidad. En cuanto a la evolución de plantas se muestra un mejor desarrollo utilizando extractos en dilución de 10 y 5 mg/L comparado con diluciones de 10 y 50 mg/L (Wilches 1981).

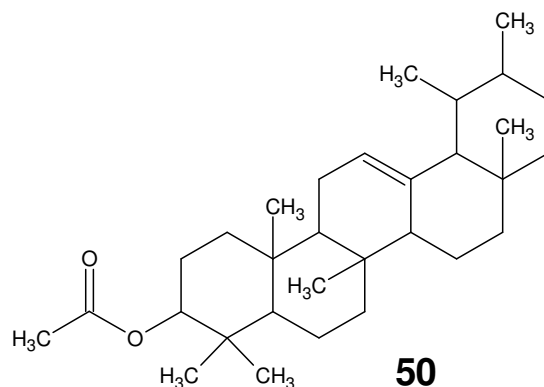
Finalmente; un estudio de toxicidad realizado a los extractos etanólicos de *Bejaria congesta*, *Bejaria aestuans* y *Bejaria resinosa* permitió concluir que estas especies vegetales no son repelentes a moluscos como la babosa ya que existe carencia de toxicidad (Urrego, 1988).

1.3.5. Estudios fitoquímicos de la especie *Bejaria resinosa*

La especie *Bejaria resinosa*, cuenta con muy pocos estudios fitoquímicos; los unicos reportados son los de las partes aéreas de *B. glutinosa* donde fueron aislados los siguientes metabolitos secundarios: quercetina (**2**), taraxerol (**40**), lupeol (**43**), betulín (**48**) y 3-O-ramnosil-quercetina (**49**) (Torrenegra *et al.*, 1985).



En un estudio realizado a las hojas de *Bejaria congesta*, *Bejaria aestuans* y *Bejaria resinosa* se lograron aislar cuatro triterpenos correspondientes a: ácido ursólico (**39**), taraxerol (**40**), una mezcla de α y β amirina (**41**, **42**), un flavonoide glicosilado correspondiente al 3-O-ramnosil-quercetina (**49**) y Acetato de β -amirina (**50**) (Urrego, 1988).



1.4. Actividad antiinflamatoria

Para evaluar la actividad antiinflamatoria se han desarrollado diferentes modelos que se realizan *in vivo* en ratones; entre los más utilizados están el ensayo de edema plantar inducido por carragenina y el ensayo de edema auricular inducido por TPA donde los ésteres de forbol (PMA acetato de forbol miristato y TPA acetato de tetradecanoil forbol) son usados como agentes inflamatorios (CYTED. 1995).

1.4.1. Modelo del edema Plantar en Rata o Ratón Inducido por Carragenina

Consiste en la administración subcutánea de una suspensión de carragenina a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, la cual provoca una reacción de carácter inflamatorio mediada por la liberación de diversas hormonas como serotonina, histamina, bradicinina y prostaglandina. La migración celular, fundamentalmente de los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), comienza dos horas después de haber inyectado el agente irritante. El producto a ensayar se puede administrar por

diferentes vías como la intraperitoneal y la oral (CYTED, 1995; Olajide *et al.*, 1999).

1.4.2. Modelo del edema auricular en ratón inducido por TPA

En este modelo se provoca una rápida respuesta inflamatoria debida a la aplicación tópica de agentes irritantes como ácido araquidónico, aceite de Croton o TPA (acetato de 12-tetradecanoilforbol, uno de los componentes responsables de la acción irritante del aceite de *Croton*), la cual es fácilmente cuantificable por medida del incremento de peso de la oreja edematosa. El incremento máximo se alcanza 4 horas después de la aplicación del agente irritante y desaparece a las 8 horas. En este modelo la migración perivascular de neutrófilos se produce a los 30 minutos, seguida de la infiltración intersticial a los 60 minutos y alcanza niveles máximos a las 4 horas. (CYTED, 1995; Martínez *et al.*, 1997). Es un modelo ampliamente utilizado para evaluar actividades antiinflamatorias de metabolitos secundarios aislados de especies vegetales ya que la cantidad de sustancia requerida es mínima comparada con la empleada en el modelo de edema plantar por carragenina donde las cantidades de sustancias a evaluar oscilan entre los 50 y 500 mg.

2. METODOLOGÍA

Esta investigación se abordó desde dos aspectos, uno químico y otro biológico. El estudio químico se orientó a la extracción, aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios mayoritarios de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa* y la determinación de la composición química del aceite esencial de las hojas; mientras que en el estudio biológico se evaluó la actividad antiinflamatoria de algunas fracciones y un metabolito secundario obtenido.

2.1. Generalidades

Para el estudio fitoquímico se emplearon métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos convencionales utilizados en el aislamiento, purificación y elucidación estructural de metabolitos secundarios.

2.1.1. Métodos de separación cromatográfica

Los extractos y fracciones obtenidos fueron sometidos a separaciones sucesivas empleando para ello cromatografía en columna (CC) bajo gravedad, cromatografía en columna flash (CF) y cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP); cada una de las subfracciones obtenidas fue monitoreada por cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando cromatoplasmas en sílica gel 60G F-254 Merck; para la CC se empleó sílica gel 60 Merck (60- 200 Mesh) y para la CF se utilizó sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh). El criterio de selección de las fracciones que se llevaron a purificación fue la complejidad del perfil cromatográfico en la CCD y la cantidad de fracción. El control de pureza se llevó a cabo por CCD empleando como reveladores luz ultravioleta, vainillina en ácido sulfúrico y vapores de amoníaco. Los solventes empleados para las separaciones cromatográficas fueron grado analítico.

Para la determinación de las mezclas se empleó un cromatógrafo con detector selectivo de masas SHIMADZU QP2010 plus, ubicado en el laboratorio de química de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. La separación se realizó en una columna capilar SHRXi – 5MS de 30 metros de longitud x 0,25 mm x 0,25 µm con una inyección en modo Split (10:1), el gas de arrastre utilizado fue helio (grado 5.0) con flujo constante de 1,2mL/min. La programación de la temperatura del horno fue: de 50 °C (2 min) @ 15°C/min hasta 200°C (2 min) @ 10°C/min hasta 300°C (10min) para un tiempo total de análisis de 34 minutos, la temperatura de la línea de transferencia fue de 275°C y de la cámara de ionización de 230°C.

La determinación de la composición química relativa del aceite esencial se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) empleando una columna capilar de sílice fundida, HP-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm, con fase estacionaria 5%fenilpolimetilsiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 45 °C (5 min) @ 5 °C/min, hasta 60 °C (1 min) @ 30 °C/min, hasta 130°C (0 min) @ 4 °C/min, hasta 190°C (2 min) @ 40 °C/min, hasta 285°C (0 min). Los espectros de masas se obtuvieron por ionización electrónica (IE) de energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 325 °C, respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (grado 5.0), con flujo constante de 1,2 mL/min.

2.1.2. Técnicas para la elucidación estructural y caracterización de los compuestos aislados

2.1.2.1. Espectrometría de masas

Los espectros de masas de las sustancias aisladas, fueron tomados en un equipo SHIMADZU MS QP2010 dotado con sonda de inserción directa y analizador de masas cuadrupolar. El modo de ionización fue por ionización electrónica (IE) a 70eV y la temperatura de la cámara de ionización fue de 230°C.

2.1.2.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, J-MOD, HSQC y HMBC) fueron tomados en un espectrómetro Bruker Avance del laboratorio de RMN de la Pontificia Universidad Javeriana. Los análisis se realizaron a 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C , empleando solventes deuterados (CDCl_3 , Acetona- d_6 y CD_3OD), con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

2.2. Estudio fitoquímico de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa*

A continuación se muestra la metodología empleada en la identificación de la especie vegetal, la obtención de extractos y fracciones, el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios y en la obtención del aceite esencial.

2.2.1. Recolección e identificación del material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el municipio de Guasca, Cundinamarca (Coordenadas geográficas: 4° 52' 0" N, 73° 53' 0" W) en el mes de mayo de 2011. Una muestra testigo fue enviada al Herbario Nacional de Colombia para su determinación taxonómica la cual fue clasificada como *Bejaria resinosa* Mutis ex L. f. bajo el número de colección COL 565500, identificada por el biólogo Adolfo Jara Muñoz. Hojas, flores y frutos por separado, fueron secados a temperatura ambiente y posteriormente molidos para su extracción con éter de petróleo (EDP) y etanol.

2.2.2. Extracción con éter de petróleo y purificación de metabolitos secundarios presentes en hojas, flores y frutos.

Las Hojas (980 g), las flores (370 g) y los frutos (180 g) por separado, una vez secos y triturados en molino, fueron sometidos por separado a una extracción con éter de petróleo (40 – 60°C) por el método de maceración en frío; los extractos

obtenidos (E.EDP) fueron floculados con acetona, filtrados y concentrados a presión reducida a 40°C. Los pesos y porcentajes de rendimiento se discriminan en la figura 2-1.

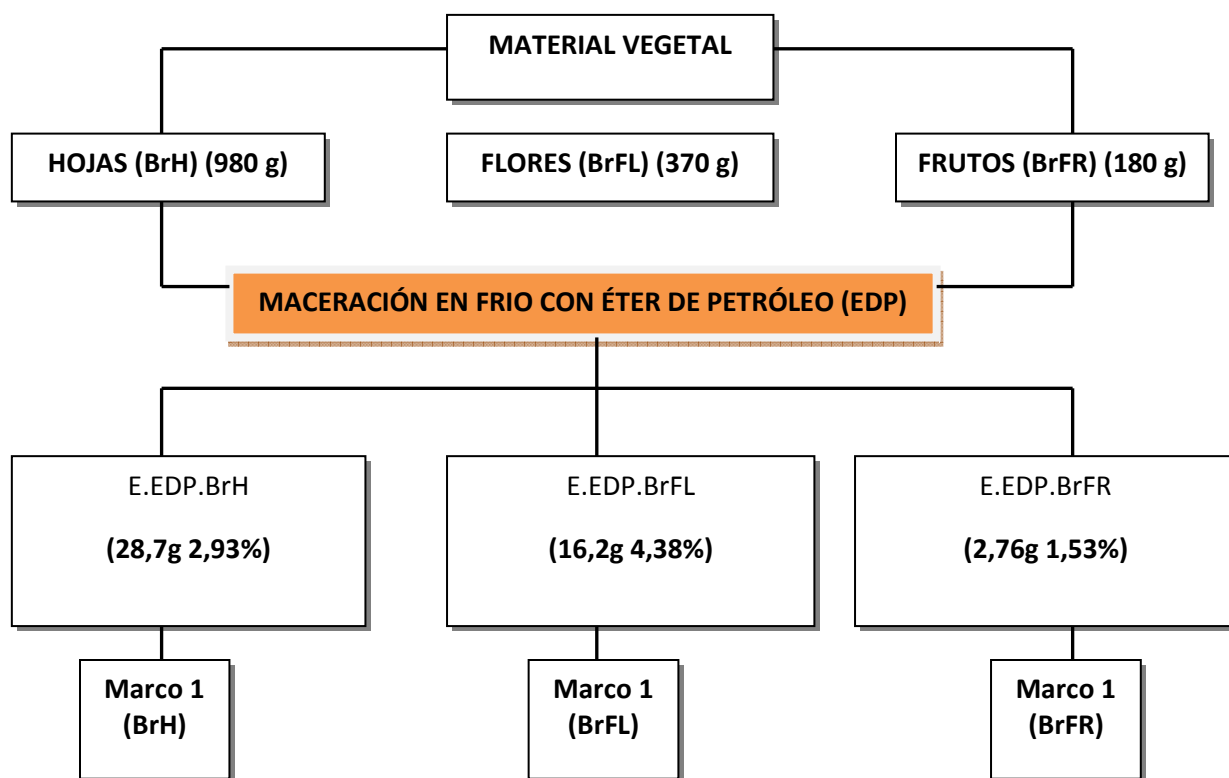


Figura 2-1 Esquema de la obtención de los extractos Éter de petróleo.

2.2.2.1. Extracto éter de petróleo de hojas de *Bejaria resinosa* (E.EDP.BrH)

0,7 g del extracto E.EDP.BrH se fraccionaron por CC utilizando como fase móvil EDP:AcOEt 7:3, obteniendo 7 fracciones. En la fracción número 3 (E.EDP.BrH.F3) se obtuvieron 23.3 mg de un sólido de color blanco denominado mezcla **Br1** (Ver figura 2-2).

2.2.2.2. Extracto éter de petróleo de flores de *Bejaria resinosa* (E.EDP.BrFL)

3,18 g del extracto E.EDP.BrFL se fraccionaron por CF utilizando como fase móvil Hexano:AcOEt 8:2, obteniendo 9 fracciones. En la fracción número 3 (E.EDP.BrFL.F3) se obtuvieron 0,60 g de un sólido el cual por CC sucesivas, empleando mezclas de hexano:acetona 8:2 y 9:1, permitió la obtención de 93 mg de un sólido color blanco el cual fue analizado por CG-EM correspondiendo a la misma mezcla denominada **Br1** (Ver figura 2-2).

2.2.2.3. Extracto éter de petróleo de frutos de *Bejaria resinosa* (E.EDP.BrFR)

730 mg del extracto E.EDP.BrFR se fraccionaron por CF empleando como fase móvil Hexano:AcOMe 8:2, obteniendo 5 fracciones. En la fracción número 2 (EEDP.BrFR.F2) precipitó un sólido de color blanco (25 mg) el cual fue analizado por CG-EM correspondiendo nuevamente a la mezcla **Br1** ya identificada en hojas y flores (Ver figura 2-2).

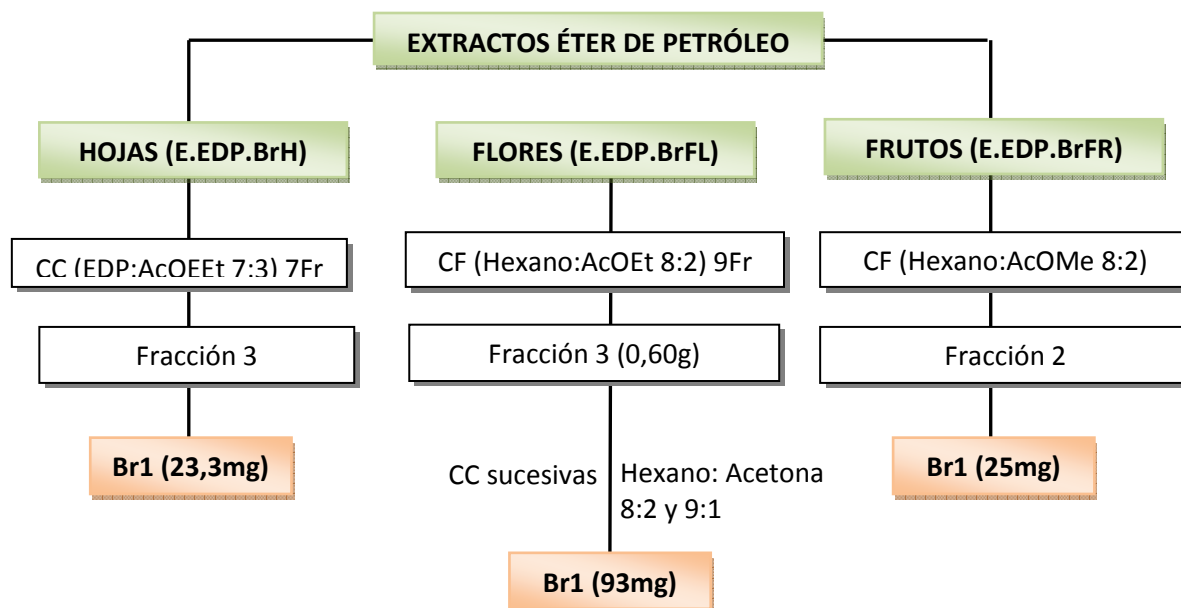


Figura 2-2. Fraccionamiento y purificación del compuesto **Br1**

2.2.3. Extracción con etanol, fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en hojas, flores y frutos.

El residuo de cada uno de los órganos (Marco 1, ver figura 2-1) después de la extracción con éter de petróleo fue extraído con etanol por el método de maceración en frío, obteniendo los extractos totales etanólicos de hojas (E.EtOH.BrH), de flores (E.EtOH.BrFL) y de frutos (E.EtOH.BrFR) los cuales fueron floculados con agua, posteriormente filtrados y concentrados a presión reducida a 40 °C.

A los extractos etanólicos se les realizaron pruebas químicas de precipitación y/o coloración, con el fin de conocer los posibles grupos de metabolitos secundarios presentes en ellos (Bilbao, 1997; Sanabria, 1983).

Para el fraccionamiento de cada uno de los extractos etanólicos se empleó el método de extracción líquido – líquido continuo con solventes de polaridad creciente obteniéndose las fracciones de éter de petróleo (F.EDP), diclorometano (F.CH₂Cl₂), acetato de etilo (F.AcOEt) y el residuo hidroalcohólico de cada uno de los órganos. Los pesos y porcentajes de rendimiento se discriminan en la figura 2-3.

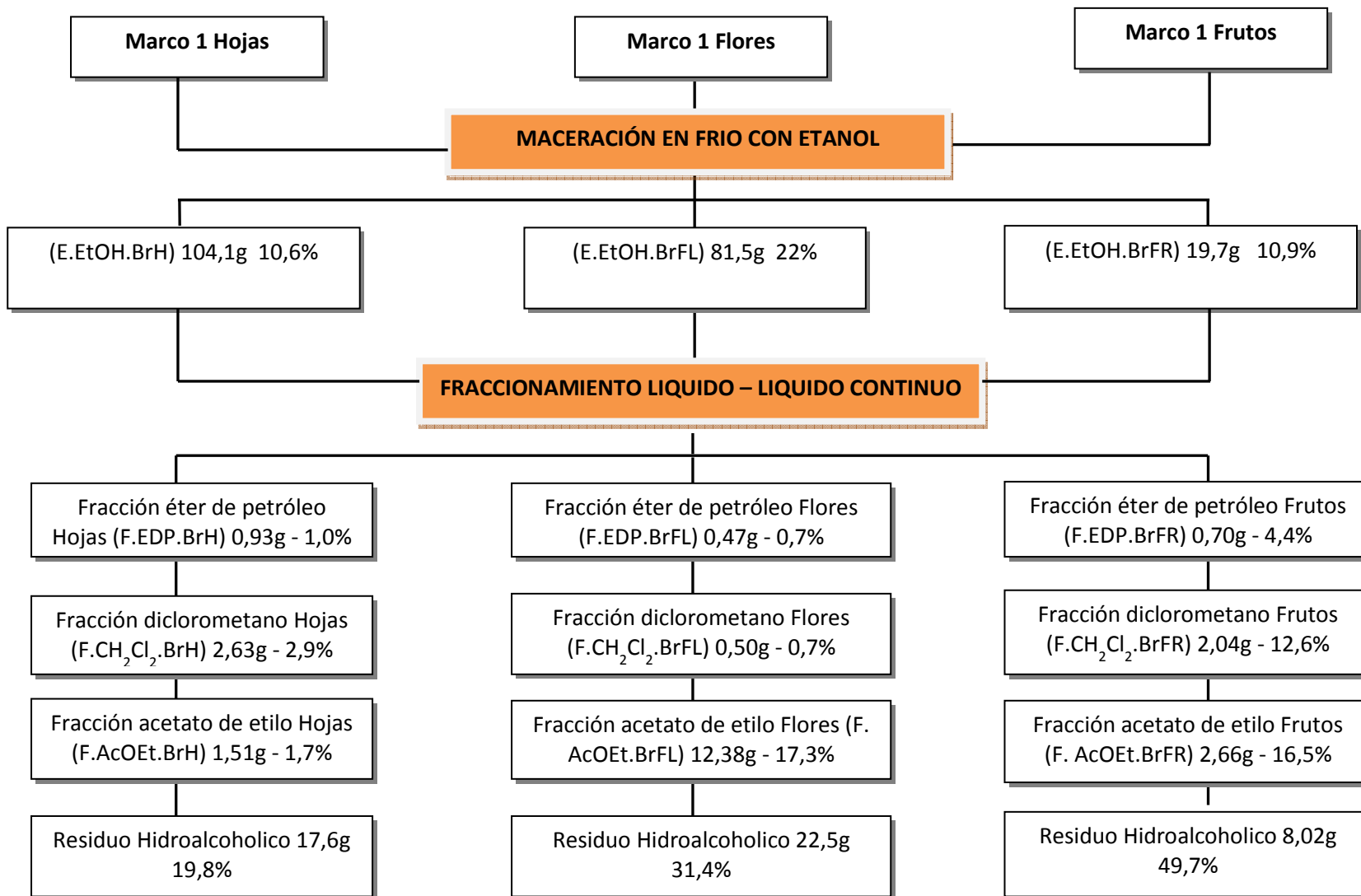


Figura 2-3. Esquema de la obtención de extractos etanólicos y fracciones.

2.2.3.1. Fracción diclorometano de hojas de *Bejaria resinosa* (F.CH₂Cl₂.BrH)

2 g de F.CH₂Cl₂.BrH fueron fraccionados por CF utilizando como fase móvil Hexano:acetona 6:4, obteniendo 6 fracciones. En la fracción número 4 (F.CH₂Cl₂.BrH.F4) precipito un sólido color blanco (25 mg) el cual se volvió a fraccionar por CC empleando como fase móvil Hexano:Acetona 1:1, obteniendo 5 subfracciones. En la fracción número 1 (F.CH₂Cl₂.BrH.F4.1) se obtuvo (10,1 mg) de un sólido color blanco denominado compuesto **Br2**.

2.2.3.2. Fracción acetato de etilo de hojas de *Bejaria resinosa* (F.AcOEt.BrH)

1 g de la fracción F.AcOEt.BrH fue fraccionada por CF empleando como fase móvil AcOEt:Acetona 8:2 obteniendo 10 fracciones de las cuales las fracciones 5 y 6 fueron estudiadas (F.AcOEt.BrH.F5 y F.AcOEt.BrH.F6).

90 mg de F.AcOEt.BrH.F5 fueron fraccionados por CC empleando como fase móvil AcOEt:Acetona 7:3 obteniendo 7 fracciones, de la subfracción 2 (F.AcOEt.BrH.F5.2) se obtuvo 31,2 mg de un sólido de color amarillo denominado compuesto **Br3**.

De otra parte, 74 mg de F.AcOEt.BrH.F6 fueron subfraccionados de la misma manera que la fracción anterior (F.AcOEt.BrH.F5) obteniendo 7 subfracciones. En la subfracción número 4 (F.AcOEt.BrH.F6.4) se obtuvieron 4.4 mg de un aceite color amarillo denominado compuesto **Br4**.

2.2.3.3. Fracción diclorometano de flores de *Bejaria resinosa* (F.CH₂Cl₂.BrFL)

0,4 g de F.CH₂Cl₂.BrFL fueron fraccionados por CF empleando como fase móvil Hexano:Acetona 7:3 obteniendo 4 subfracciones. En la subfracción número 1 (F.CH₂Cl₂.BrFL.F1) se obtuvo 6,2 mg de un sólido color blanco el cual al ser analizado por CG-EM correspondió al mismo compuesto denominado **Br2**.

2.2.3.4. Fracción acetato de etilo de flores de *Bejaria resinosa* (F.AcOEt.BrFL)

3 g de F.AcOEt.BrFL fueron subfraccionados por CF empleando como fase móvil AcOEt:Acetona 8:2 obteniendo 5 fracciones. En la subfracción número 1 (F.AcOEt.BrFL.F1) precipitó un sólido color amarillo (350 mg) el cual se purificó por CC empleando una mezcla de AcOEt:Acetona 9:1 obteniendo 7 mg de un sólido color amarillo denominado compuesto **Br5**.

2.2.3.5. Fracción diclorometano de frutos de *Bejaria resinosa* (F.CH₂Cl₂.BrFR)

1,6 g de la fracción F.CH₂Cl₂.BrFR fue subfraccionada por CF empleando como fase móvil Hexano:Acetona 8:2 obteniendo 11 fracciones. En la subfracción número 2 (F.CH₂Cl₂.BrFR.F2) se obtuvo 3,3 mg de un sólido de color blanco el cual al ser analizado por CG-EM correspondió al mismo compuesto denominado **Br2**.

2.2.3.6. Fracción acetato de etilo de frutos de *Bejaria resinosa* (F.AcOEt.BrFR)

2 g de esta fracción fueron sometidos a extracción sólido – líquido con éter etílico, la fracción soluble en éter etílico (F.EEt.BrFR) se concentró a presión reducida a

40°C, la cual se fraccionó por CC empleando como fase móvil éter etílico obteniendo 6 fracciones. 26 mg de la fracción número 1 (F.EEt.BrFR.F1) fue purificada por CCDP utilizando una mezcla de éter etílico:MeOH 7:3 y como revelador vainillina en ácido sulfúrico obteniendo un sólido de color café rojizo (4,6 mg) denominado compuesto **Br6**.

La metodología empleada para el aislamiento y purificación de los compuestos **Br2 – Br6** obtenidos de las fracciones de hojas, flores y frutos se ilustra en la figura 2-4.

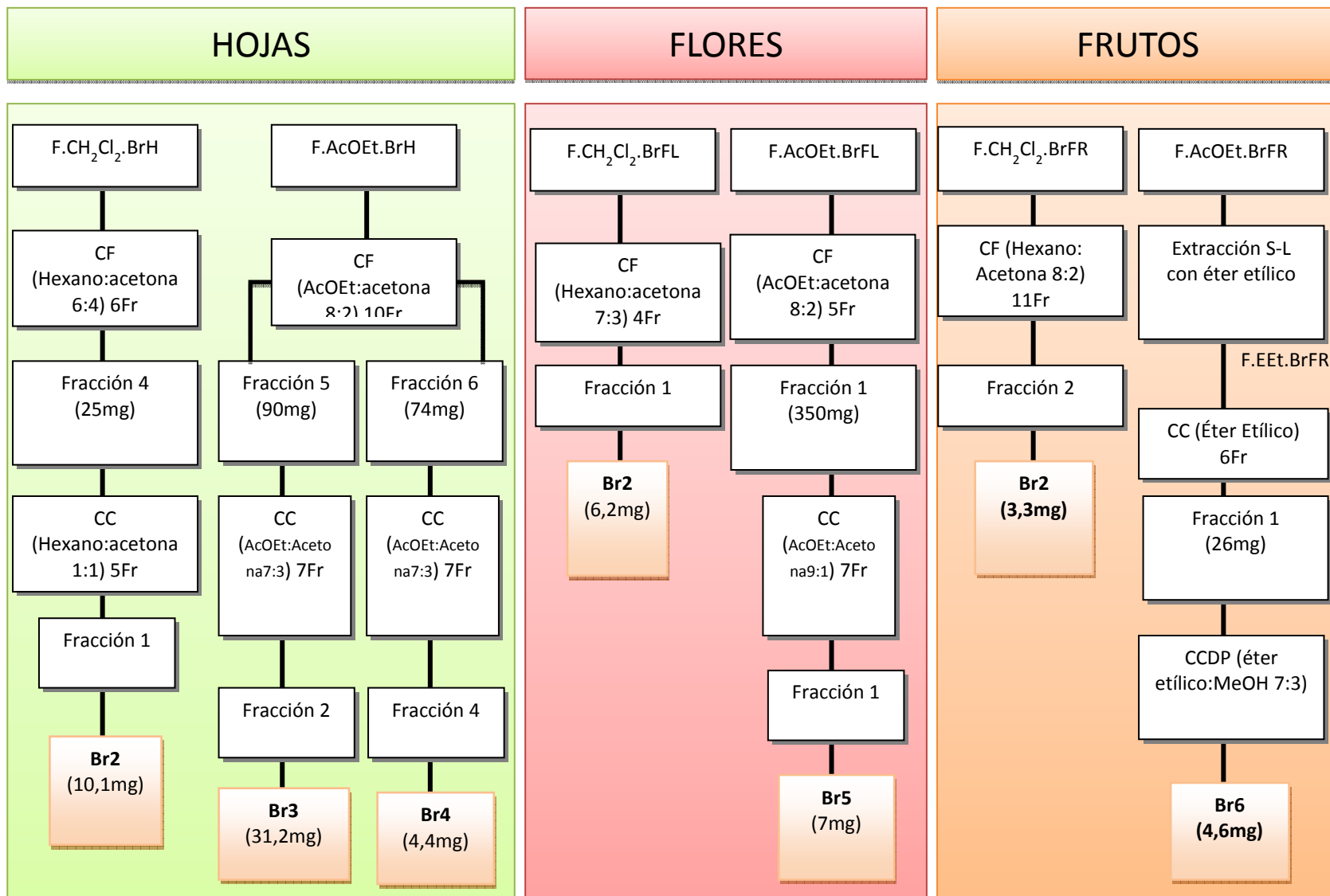


Figura 2-4. Aislamiento y purificación de los compuestos Br2 – Br6

2.2.4. Extracción y caracterización química de los aceites esenciales.

El aceite esencial fue obtenido a partir de hojas frescas (950 g) por hidrodestilación, obteniéndose 0,5 mL de aceite con un 0,031% de rendimiento. La composición química del aceite se determinó por CG-EM y la identificación se realizó a través del cálculo de los índices de retención (IR) y comparación con los espectros de masas almacenados en la librería NIST 08.

Los índices IR se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homologa de patrones de hidrocarburos desde C₇ hasta C₂₄, analizados por CG-EM bajo las mismas condiciones que el aceite esencial.

Los valores fueron calculados aplicando la siguiente fórmula:

$$IR = 100_n + 100 \left[\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right]$$

Dónde:

IR: Índice de retención del compuesto de interés X.

n: Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés X.

N: Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye después del compuesto de interés X.

t_{RX}: Tiempo de retención del compuesto de interés X.

t_{RN}: Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto de interés X.

t_{Rn}: Tiempo de retención del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés X.

Además se realizó una cuantificación de los componentes del aceite esencial obtenido por el método del patrón interno y se determinaron algunas propiedades físicas como densidad e índice de refracción.

2.2.4.1. Cuantificación de los componentes identificados

Los metabolitos secundarios identificados en el aceite esencial se cuantificaron aplicando el método de estandarización interna; para ello se empleó n-tetradecano (Merck). La muestra para análisis se preparó tomando una alícuota de 50 µL del aceite esencial obtenido, se le agregó 1,0 µL de patrón interno (n-tetradecano), y se completó a 1 mL con diclorometano.

Las áreas de los picos cromatográficos de cada uno de los componentes de la muestra se compararon con el área reportada para el estándar interno. Las concentraciones de cada uno de los compuestos se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$C_x = C_A \times \frac{A_x}{A_A}$$

Dónde:

C_x : Concentración del compuesto de interés x (ppm);

C_A : Concentración del estándar interno, n-tetradecano (ppm);

A_x : Área del compuesto de interés x (cuentas);

A_A : Área del estándar interno, n-tetradecano (cuentas).

2.2.4.2. Densidad absoluta

La densidad absoluta del aceite esencial se verificó determinando el peso de 100µL del producto obtenido en un matraz previamente seco y pesado, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad absoluta} = \frac{\text{Masa del aceite (g)}}{\text{Volumen (ml)}}$$

La temperatura de trabajo fue de $18 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2.4.3. Índice de refracción

La determinación del índice de refracción se realizó a una temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$ en un refractómetro Carl Zeiss Jena, el equipo se ajustó con agua destilada verificando su refracción en 1.3330, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3. Evaluación de la actividad Antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se realizó siguiendo el modelo murino de edema auricular inducido por 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) descrito por De Young (De Young *et al.*, 1989) y modificado por Payá (Payá *et al.*, 1993). Se seleccionaron nueve fracciones y un metabolito mayoritario teniendo en cuenta como criterio de selección la cantidad de muestra requerida para el análisis y su solubilidad en acetona. Para el ensayo se emplearon ratones albinos hembras de 32 a 39 g, entre siete a diez semanas de crecimiento ($n = 10$), suministrados por el Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia (DFUNC), mantenidos en condiciones estándar. Se administró 2,5 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ del irritante 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA,) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) junto con 1000 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ de indometacina como patrón (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) o con la sustancia evaluada (fracción o metabolito secundario 1000 $\mu\text{g}/\text{oreja}$) disueltas en acetona (Mallinckrodt Chemicals) vía tópica en la oreja derecha (volumen total: 20 $\mu\text{L}/\text{oreja}$, 10 $\mu\text{L}/\text{cara}$). La oreja izquierda se empleó como control. Transcurridas 4 horas se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se obtuvo una muestra de cada pabellón auricular por sacabocado (7 mm de diámetro). Se calculó la diferencia de peso entre oreja tratada y no tratada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\Delta \text{ peso (mg)} = \text{peso (mg) oreja tratada} - \text{peso (mg) oreja no tratada}$$

Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición del edema calculado con la fórmula:

$$\% \text{ de inhibicion} = \frac{\Delta \text{ peso grupo control} - \Delta \text{ peso tratamiento}}{\Delta \text{ peso grupo control}}$$

Se considera como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35 al 65% y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor de 65% (García *et al.*, 2004).

Finalmente, se realizó un análisis estadístico de los resultados, mediante el software SPSS Statistic 20.0 asumiendo un análisis de varianza univariado seguido de prueba Tukey para comparaciones múltiples.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Dentro de los resultados que se obtuvieron del estudio fitoquímico se encuentra el aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios obtenidos y la evaluación de la actividad antiinflamatoria de algunos de las fracciones y metabolitos secundarios aislados.

3.1. Estudio fitoquímico preliminar

Los resultados de los ensayos químicos preliminares realizados a los extractos etanólicos de hojas (E.EtOH.BrH), flores (E.EtOH.BrFL) y frutos (E.EtOH.BrFR) de la especie *Bejaria resinosa* se encuentran en la tabla 3-1.

Tabla 3-1 Resultados del ensayo fitoquímico preliminar.

Grupo de metabolitos secundarios	Prueba Química	Resultados		
		E.EtOH.BrH	E.EtOH.BrFL	E.EtOH.BrFR
Flavonoides	Shinoda	+	+	+
Leucoantocianidinas	Rosenheim	+	+	-
Taninos	Cloruro férrico	+	-	-
	Acetato de plomo	+	-	-
	Gelatina – Sal	+	-	-
Triterpenos – Esteroides	Liebermann – Burchard	+	+	+
Cardiotónicos	Kedde	-	-	-
Quinonas	Borntranger	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff	+	-	-
	Mayer	+	-	-

Grupo de metabolitos secundarios	Prueba Química	Resultados		
		E.EtOH.BrH	E.EtOH.BrFL	E.EtOH.BrFR
	Valsen	+	-	-
Cumarinas	Hidroxamato férrico	-	-	+

+: Resultado positivo. -: Resultado negativo. E.EtOH.BrH: Extracto etanólico hojas. E.EtOH.BrFL: Extracto etanólico flores. E.EtOH.BrFR: Extracto etanólico frutos.

El análisis fitoquímico preliminar indica la presencia de metabolitos secundarios como terpenos y/o esteroides y flavonoides en la planta lo cual confirma lo encontrado por Harborne y Williams (1973) y Ueda (1961) para especies vegetales pertenecientes a la familia Ericaceae. Cabe resaltar que la familia Ericaceae no se caracteriza por la presencia de alcaloides (Font Quer; 2001) sin embargo las tres pruebas realizadas en este estudio dieron resultados positivos aunque con formación de precipitados en muy baja cantidad.

3.2. Metabolitos secundarios aislados

La purificación por cromatografía en columna y preparativa sobre sílica gel de los extractos de éter de petróleo y las fracciones de diclorometano y acetato de etilo, obtenidas a partir del extracto etanólico de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa* condujo al aislamiento e identificación de un triterpeno (Lupeol **Br2**), tres flavonoides (Quercetina **Br3**, 3,5-dihidroxi,-6,7,8-trimetoxiflavona **Br5** y catequina **Br6**), un compuesto fenólico (salicilato de metilo **Br4**) y una mezcla de compuestos triterpenicos denominada **Br1** (α -amirina, β -amirina y germanicol). Los compuestos Br2 a Br6 fueron elucidados por métodos espectroscópicos y por comparación con los datos descritos en la literatura. La mezcla Br1 fue analizada por CG-EM.

3.2.1. Composición de la mezcla Br1

La mezcla **Br1** (141,3 mg) es un sólido cristalino de color blanco en forma de agujas, con un punto de fusión de 168 – 172 °C el cual presentó una mancha de color violeta en CCD al ser revelada con el reactivo de vainillina/ H₂SO₄.

En el espectro RMN ¹H (Figura 3-1) de la mezcla **Br1** se observan las señales características de compuestos triterpenicos, en donde se pueden apreciar un gran número de señales intensas en la región de δ 0,78–1,89 ppm atribuibles a hidrógenos metilénicos y metílicos característicos del núcleo triterpenico (Bracho *et al.*, 2009).

Se observa también una señal en δ 3,21 (*dd*, $J=10,7, 5,2$ Hz) correspondiente al protón que se encuentra sobre el carbono 3 del esqueleto triterpenico (ver figura 3-2), lo cual indica que el hidroxilo que se encuentra sobre este carbono está en posición beta (β), puesto que al ubicarse en posición alfa (α) se observaría un singlete ancho (Bracho *et al.*, 2009).

Las señales en δ 5.16 (*t*, $J= 3,6$ Hz) y 5.11 (*t*, $J=3.6$ Hz) corresponden cada una de ellas a un protón vinílico ubicado sobre el carbono 12 del esqueleto triterpenico de la β -amirina y α -amirina respectivamente (Bracho *et al.*, 2009). En la figura 3-1 se aprecia el espectro RMN ¹H de la mezcla Br1 y las ampliaciones de las señales de δ 3.21, 5.11 y 5.16 ppm.

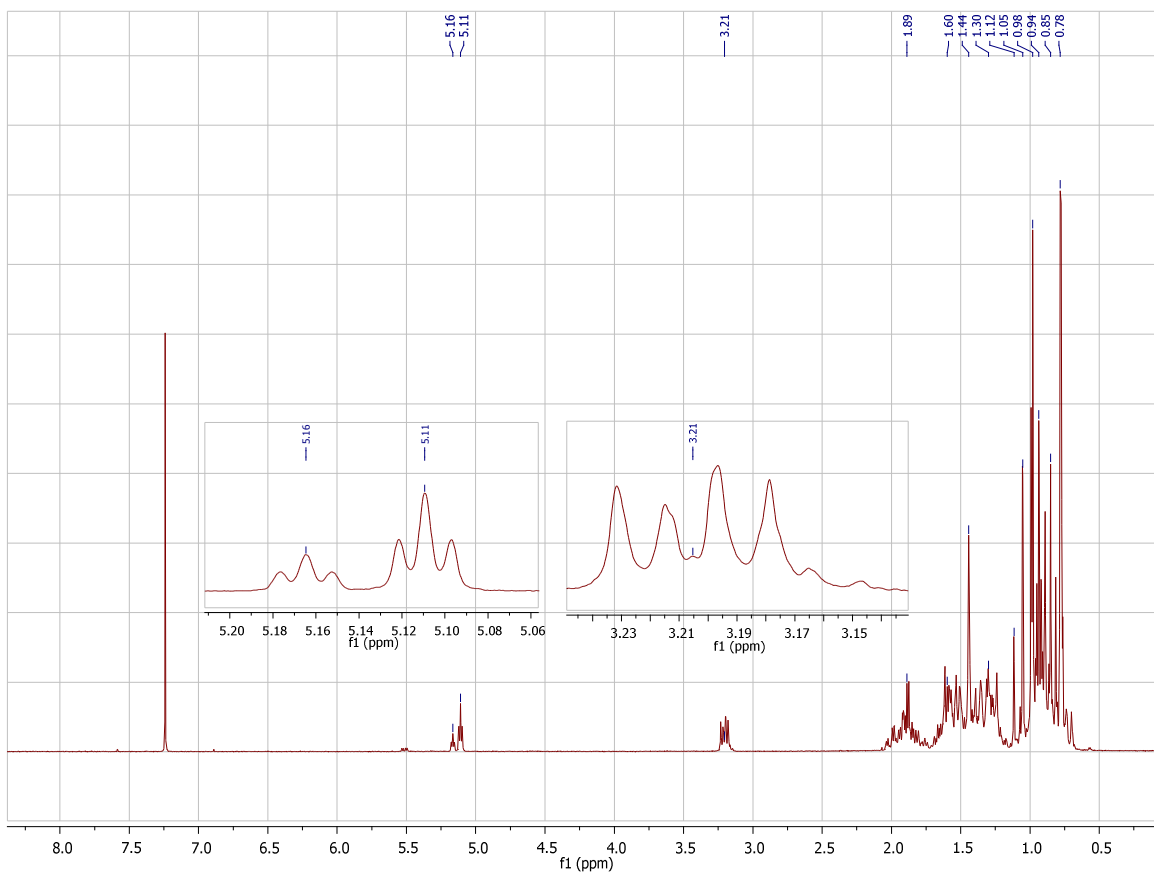


Figura 3-1. Espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de la mezcla Br1.

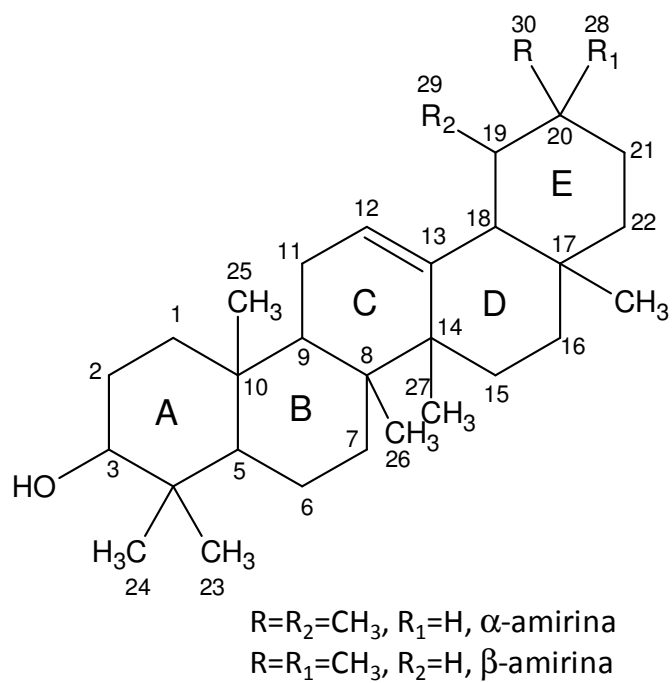


Figura 3-2. Esqueleto triterpenico de la α y β amirina.

En el análisis por CG-EM de la mezcla Br1 se obtuvieron tres señales en la corriente iónica total (TIC). La comparación de los espectros de masas con los de la librería NIST 08 confirman la presencia de α -amirina, β -amirina y germanicol. Para determinar la posible composición de la mezcla se compararon los espectros obtenidos con los de la librería NIST 08. La TIC y los tiempos de retención de los compuestos obtenidos se encuentran consignados en la figura 3-3 y la Tabla 3-2 respectivamente.

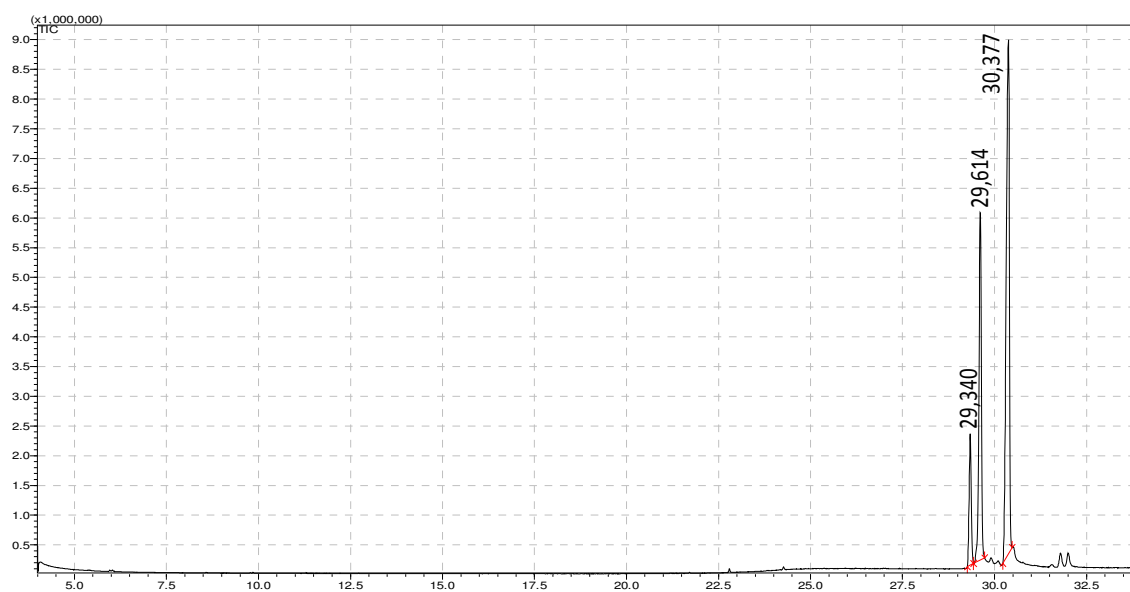


Figura 3-3. Corriente iónica total (TIC) obtenida para la mezcla Br1.

Tabla 3-2. Tiempos de retención y resultados de la comparación con la librería NIST 08 para la mezcla Br1

t_R (min)	% Área	% Coincidencia*	Asignación posible
29,340	8,85	98	Germanicol (<u>51</u>)
29,614	30,13	97	β -amirina (<u>52</u>)
30,377	57,94	97	α -amirina (<u>53</u>)

*Comparado con la librería NIST 08

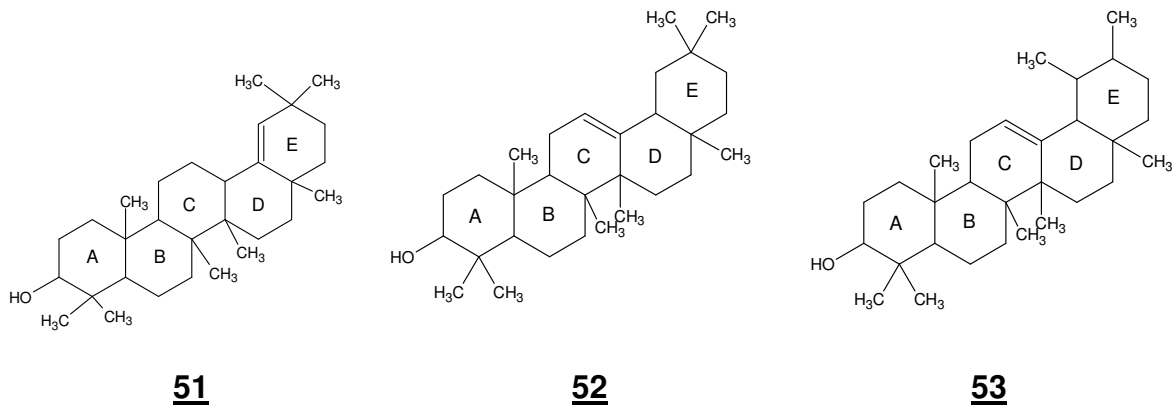


Figura 3-4. Estructuras de los posibles compuestos constituyentes de la mezcla Br1

En los espectros de masas se observan los picos de ion molecular a m/z 426 con muy baja intensidad, correspondientes con la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ del germanicol, β -amirina y α -amirina. Los datos espectrales son característicos de mezclas de triterpenos comúnmente encontradas en especies vegetales ya conocidas en la literatura (González *et al.*, 1972, Bracho *et al.*, 2009, Xiao-feng; 2011). Los espectros de masas se muestran en las figuras 3-5, 3-6 y 3-7.

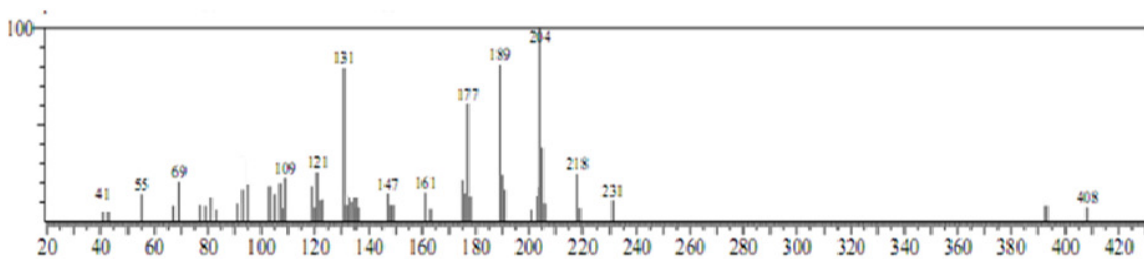


Figura 3-5. Espectro de masas en modo ionización electrónica para el germanicol

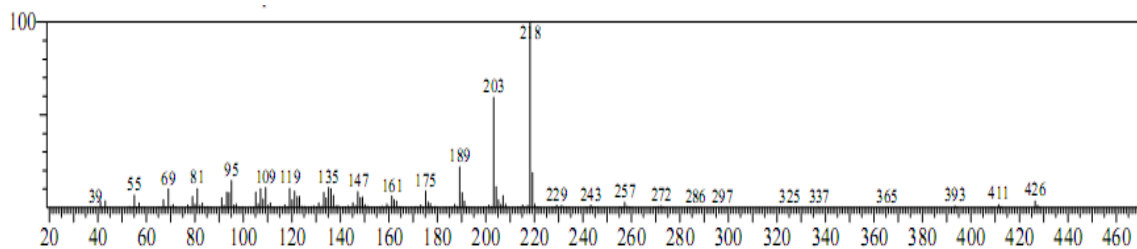


Figura 3-6. Espectro de masas en modo ionización electrónica para la β -amirina

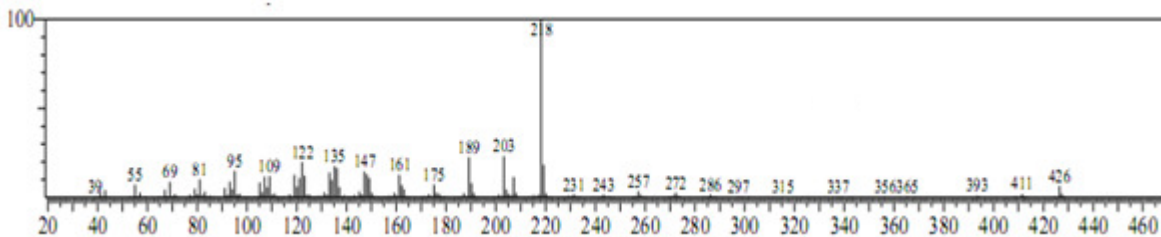


Figura 3-7. Espectro de masas en modo ionización electrónica para la α -amirina

En el caso del germanicol se encuentran los iones: m/z 408 el cual es atribuible a la pérdida de agua ($M-18$) y el pico base m/z 204 que corresponde a la eliminación de parte de la estructura hidrocarbonada debida a un reordenamiento tipo Retro-Diels-Alder sobre los carbonos 18 y 19 (ver figura 3-8).

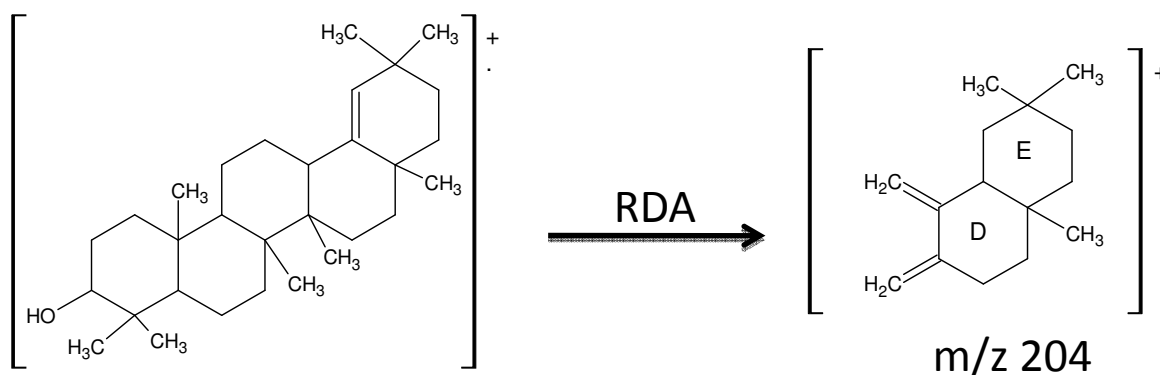


Figura 3-8. Ruta de fragmentación propuesta para el germanicol.

Los espectros de la α -amirina y β -amirina (figuras 3-6 y 3-7) presentan el mismo patrón de fragmentación debido a que poseen el mismo esqueleto triterpenico siendo de tipo Δ^{12} -oleanos observándose los iones m/z 257, 218, 207, 203 y 189 que constituyen los denominados picos diagnósticos para esqueletos tipo amirina con una insaturación en el C-12 (Bracho *et al.*, 2009). El fragmento m/z 218 es el más importante por que corresponde a un reordenamiento Retro-Diels-Alder (RDA), en el anillo que posee el doble enlace, suficiente evidencia de la existencia de esta insaturación (Budzikiewicz *et al.*, 1963).

Estos triterpenos han sido ampliamente aislados de otras familias de especies vegetales como son: Apocinaceae (Talapatra et al., 1975), Euphorbiaceae (Bhattacharyya y Barros., 1985) y en el género *Bejaria* también han sido encontrados en las especies *Bejaria congesta*, *Bejaria aestuans* y *Bejaria resinosa* (Urrego., 1988).

3.2.2. Elucidación estructural del compuesto Br2

El compuesto **Br2** es un sólido color blanco con un punto de fusión de 216-217°C. Este compuesto fue analizado por CG-EM, obteniendo la TIC que se muestra en la Figura 3-9.

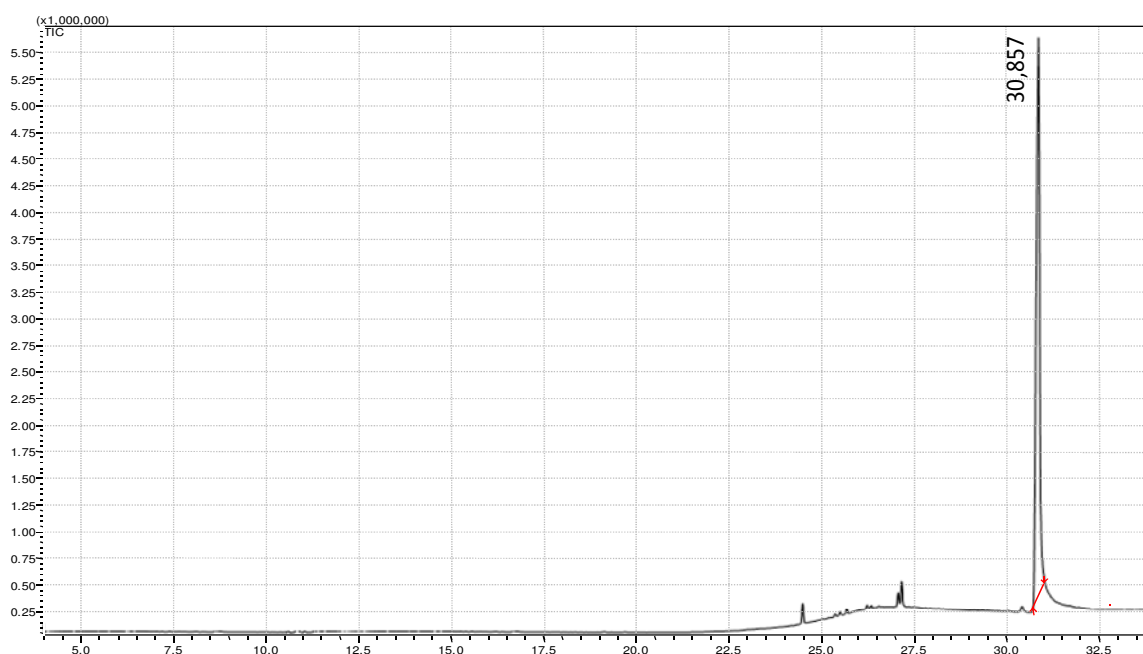


Figura 3-9. Corriente iónica total (TIC) obtenida para el compuesto **Br2**

En la TIC del compuesto Br2 se muestra una señal, con un tiempo de retención de 30.857 minutos y un porcentaje de área relativo de 97.10%. En el espectro de masas (ver Figura 3-10) de esta señal se observa el ión molecular a m/z 426, el pico base a m/z 43 y los característicos en m/z 218 y m/z 189 para compuestos triterpenicos tipo lupano (Argay et al., 1997).

La comparación del espectro de masas con la librería NIST 08 con un porcentaje de coincidencia del 96% y haciendo uso de la literatura (Argay *et al.*, 1997; Bracho *et al.*, 2009) se pudo concluir que el compuesto Br2 corresponde al lupeol.

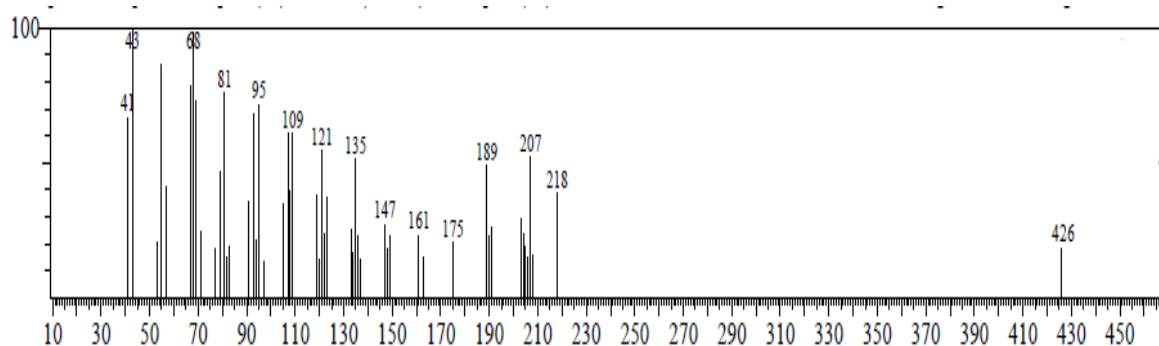


Figura 3-10. Espectro de masas en modo ionización electrónica para el compuesto Br2

El compuesto Br2 también fue analizado por RMN ^1H y ^{13}C para confirmar la estructura del lupeol. El espectro de RMN ^1H (Figura 3-11) del compuesto Br2, muestra siete singletes en δ 0.74, 0.77, 0.81, 0.92, 0.95, 1.01, 1.66 correspondientes a grupos metilos; La señal de δ 2,30 a 2,42 (*m*) corresponde a un protón unido al carbono que soporta el grupo isopropilidénico (Bracho *et al.*, 2009).

Los singletes anchos en δ 4.55 y 4.66 indican la presencia de un grupo exometilénico, correspondientes a dos protones olefínicos. Por otra parte, el doblete a δ 3.16 (*dd*, $J = 5,17$ y $10,85$ Hz, 1H) es causado por un protón unido al carbono 3 el cual soporta el grupo hidroxilo (Bracho *et al.*, 2009).

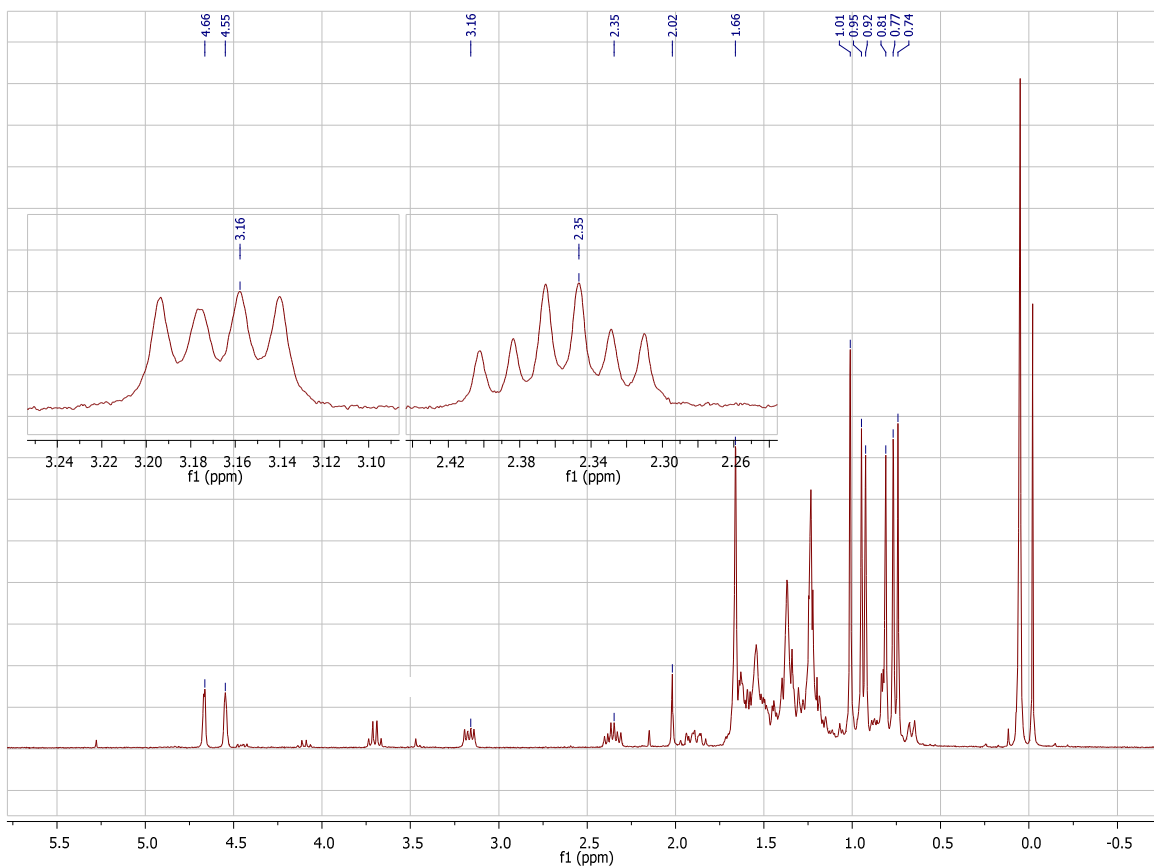


Figura 3-11 Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto Br2

En el experimento J-MOD para el compuesto Br2 (ver Figura 3-12), tomado a 75 MHz en CDCl₃, se pueden observar 30 señales de carbonos, de las cuales, 17 corresponden a carbonos cuaternarios y metilénicos y las 13 restantes a carbonos metílicos y metínicos.

De estas señales se pueden resaltar por su desplazamiento químico, las señales de δ 151,6 y δ 109,9 que corresponden a dos carbonos olefínicos del grupo exometilénico y δ 79,6 de un grupo metino enlazado al grupo hidroxilo (Argay *et al.*, 1997).

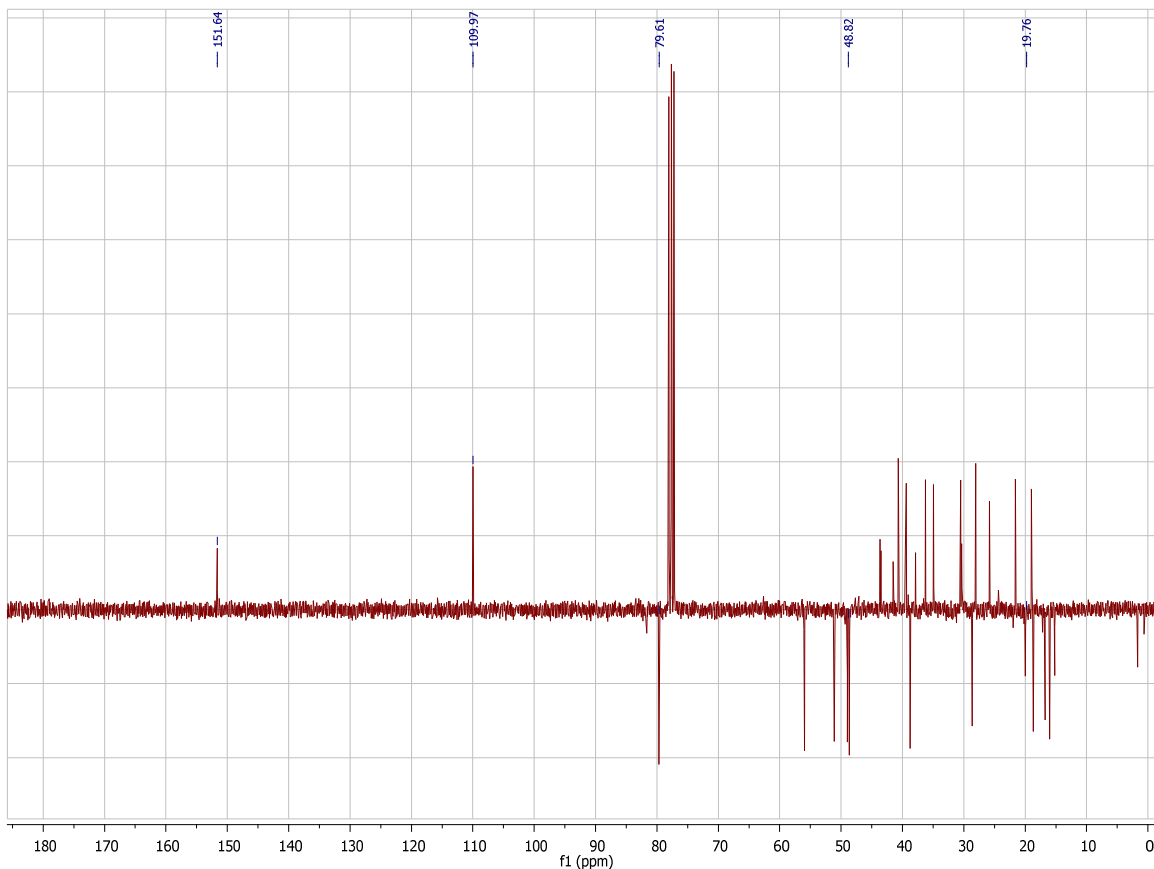


Figura 3-12. Espectro de RMN ^{13}C J-MOD (75 MHz, CDCl_3) del compuesto Br2

La conectividad de cada hidrogeno con el carbono al cual está unido, se realizó mediante el análisis del espectro HSQC (Figura 3-13), en este espectro se muestran conectividades como la de los protones en δ 4,55 (*s*, 1*H*) y 4,66 (*s*, 1*H*) con un solo carbono de tipo sp^2 δ 109,9 corroborando la presencia del grupo exometilénico; el protón del grupo metino δ 3,15 con el carbono δ 79,6 que soporta al grupo hidroxilo y el protón de δ 2,35 con el carbono δ 48,8 que se encuentra unido al grupo isopropilidénico.

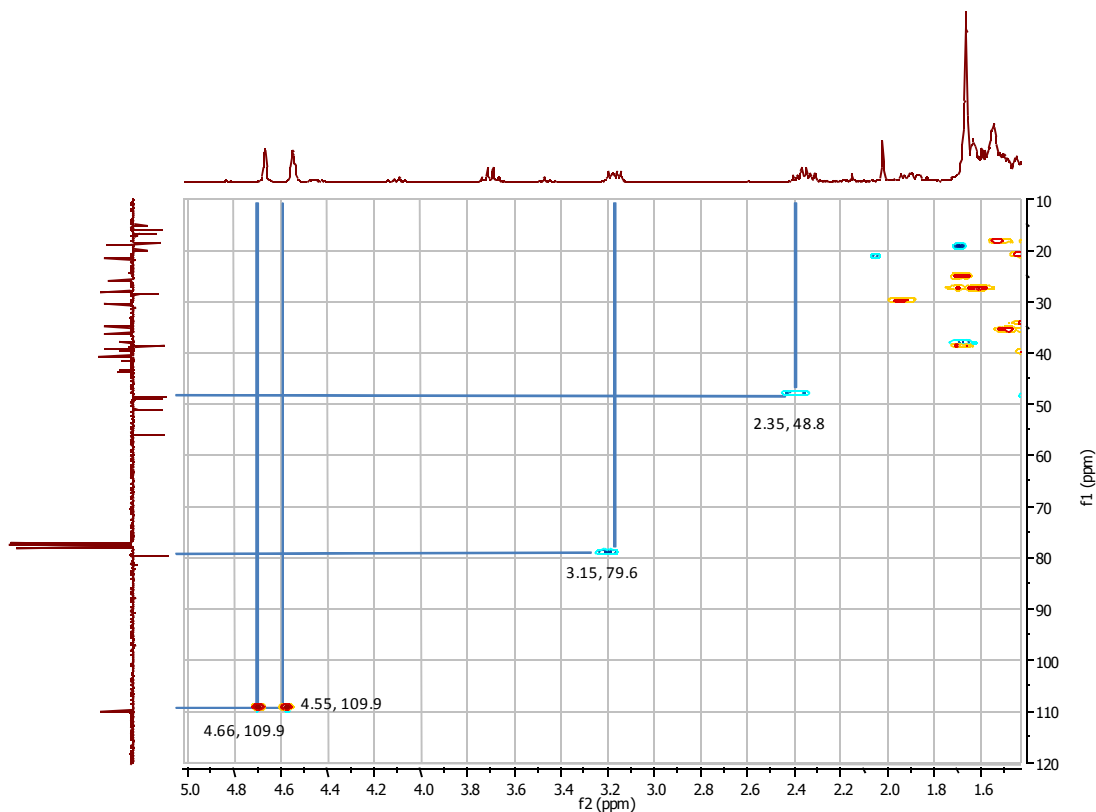


Figura 3-13. Ampliación de espectro HSQC en RMN ^1H δ 1.5 a 5.0 y ^{13}C δ 10 a 120 ppm para el compuesto Br2.

Luego del análisis de los datos de RMN, CG-EM y de la comparación con datos de la literatura, se asignaron los desplazamientos químicos para cada uno de los carbonos e hidrógenos de la molécula (Figura 3-14) la cual se identificó como lupeol.

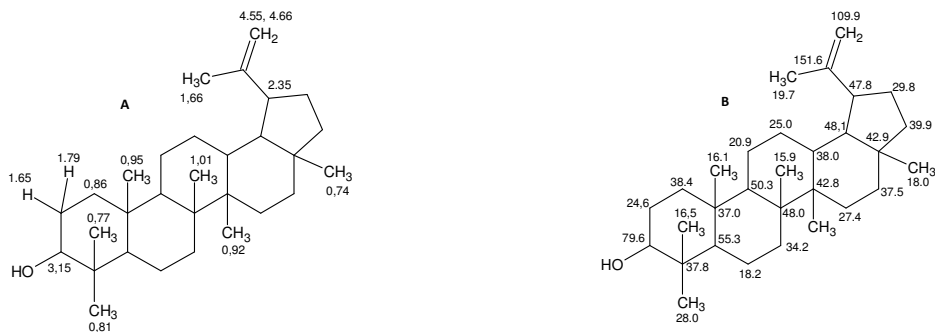


Figura 3-14. Asignación de los desplazamientos químicos para el compuesto Br2 RMN ^1H (A) y RMN ^{13}C (B).

En la Tabla 3-3 se resumen los desplazamientos químicos obtenidos para el compuesto Br2 y los descritos para el lupeol según Bracho et al., 2009. Tomados con el mismo solvente (CDCl₃) pero a diferente frecuencia.

Tabla 3-3. Comparación de los desplazamientos químicos del compuesto Br2 con los del lupeol (Bracho *et al.*, 2009).

Posición	Br2*		Lupéol**	
	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
1	0,74 (a), 0,77 (b)	38,4	-	38,5
2	1,66 (a), 1,69 (b)	24,6	-	23,6
3	3,15 (<i>d</i> 4.2Hz, 1H)	79,6	3,25	81,0
4	-	37,8	-	38,0
5	0,86	55,3	-	55,4
6	1,56 (a), 1,58 (b)	18,2	-	18,2
7	1,36 (a), 1,52 (b)	34,2	-	34,3
8	-	40,8	-	41,0
9	1,38	50,3	-	50,4
10	-	37,0	-	37,2
11	1,60 (a), 1,29 (b)	20,9	-	21,0
12	1,65 (a), 1,18 (b)	25,0	-	24,5
13	2,25	38,0	-	36,7
14	-	42,8	-	43,1
15	1,51 (a), 1,56 (b)	27,4	-	26,5
16	1,38	37,5	-	35,7
17	-	42,9	-	43,2
18	1,02	48,1	-	48,4
19	2,35	48,8	-	48,3
20	-	151,6	-	151,2
21	1,43 (a), 2,13 (b)	29,8	-	30,0
22	1,46 (a), 1,27 (b)	39,9	-	41,2
23	0,85 (<i>s</i> , 3H)	28,0	0,87	27,9
24	0,81 (<i>s</i> , 3H)	16,5	0,85	16,7
25	0,99 (<i>s</i> , 3H)	16,1	1,05	16,3
26	1,05 (<i>s</i> , 3H)	15,9	0,79	16,1
27	0,96 (<i>s</i> , 3H)	14,4	0,77	14,7

Posición	Br2*		Lupeol**	
	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
28	0,78 (s, 3H)	18,0	0,94	18,2
29	4,55 (s, 1H) (a) 4,66 (s, 1H) (b)	109,9	4,52 (a) 4,72 (b)	109,5
30	1,70 (s, 3H)	19,2	1,65	19,4

* Datos obtenidos a 300 MHz para RMN ¹H y 75 MHz en RMN ¹³C (Solvente: CDCl₃)

** Datos obtenidos a 250 MHz para RMN ¹H y 62,8 MHz en RMN ¹³C (Solvente: CDCl₃) (Bracho *et al.*, 2009)

El lupeol es un triterpeno pentacíclico ampliamente extraído de especies de diferentes familias como: las especies *Hieracium plumulsum* (Argay *et al.*, 1997) y *solidago canadensis* (Prakash *et al.*, 2004) de la familia Asteraceae; en la especie *Salvia cyanescens* (Gokdil *et al.*, 1997) de la familia Lamiaceae, en la especie *Plumbago zeylanica* (Nguyen *et al.*, 2004) de la familia Plumbaginaceae, entre otras. En la familia Ericaceae ha sido aislado de *Arbutus menziessi* (Robinson y Martel., 1970) y *Bejaria resinosa* (Urrego., 1988).

3.2.3. Elucidación estructural del compuesto Br3

El compuesto **Br3** (31,2 mg) se obtuvo como un sólido color amarillo con punto de fusión de 315°C, soluble en acetona, en CCD fue revelado con vapores de amoníaco mostrando una mancha de color verde y posteriormente con vainillina/H₂SO₄ y analizado por EM. La comparación del espectro de masas con la librería NIST 08 permitió identificar la quercetina con un 97% de coincidencia. El espectro de masas (ver Figura 3-15) muestra el ión molecular a m/z 302, siendo este mismo el pico base y además señales en m/z 286, 273, 257, 245, 229, 153, 142, 137, 128, 121 y 109 de acuerdo con la literatura (Toso; 2002) corresponde al flavonol quercetina.

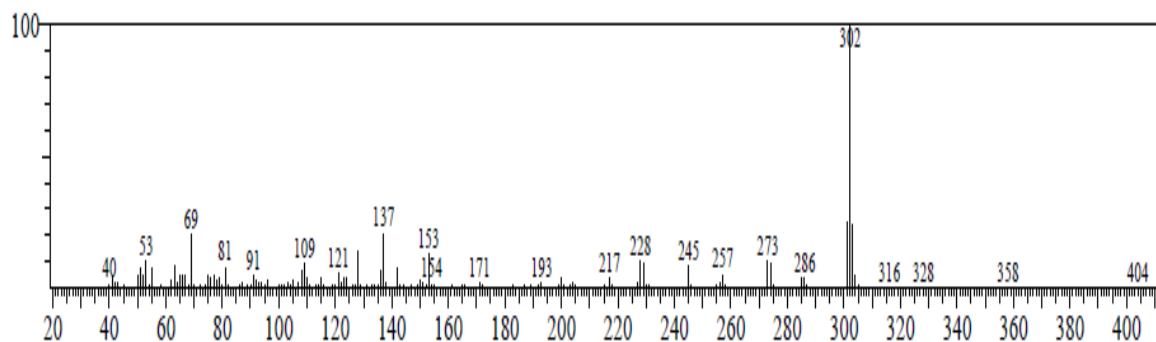


Figura 3-15. Espectro de masas en modo ionización electrónica para el compuesto Br3.

El compuesto Br3 también fue analizado por RMN ^1H para confirmar su estructura. En el espectro de RMN ^1H (Figura 3-16) se observan 5 señales correspondientes a protones aromáticos en la región de 6 a 8 ppm. A campo bajo del espectro se observa una señal a δ 12,20 característica de un grupo OH fenólico que forma puente de hidrógeno con un grupo carbonilo lo cual permite considerar la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-3 o C-5 de un núcleo flavonoide.

Las señales de 6,27 (*d*, $J = 2,06 \text{ Hz}$, 1H) y δ 6.54 (*d*, $J = 2,06 \text{ Hz}$, 1H) se pueden asignar a los hidrógenos en las posiciones C-6 y C-8 respectivamente del anillo A de un flavonoide. La señal de δ 7,70 (*dd*, $J = 8,51 \text{ Hz}$, $2,18 \text{ Hz}$, 1H) puede ser asignada a un protón en la posición H-6'. La señal de δ 7,02 (*d*, $J = 8,51 \text{ Hz}$, 1H) corresponde al protón en posición H-5' y la señal de δ 7,84 (*d*, $J = 2,17 \text{ Hz}$, 1H) al protón en posición H-2'.

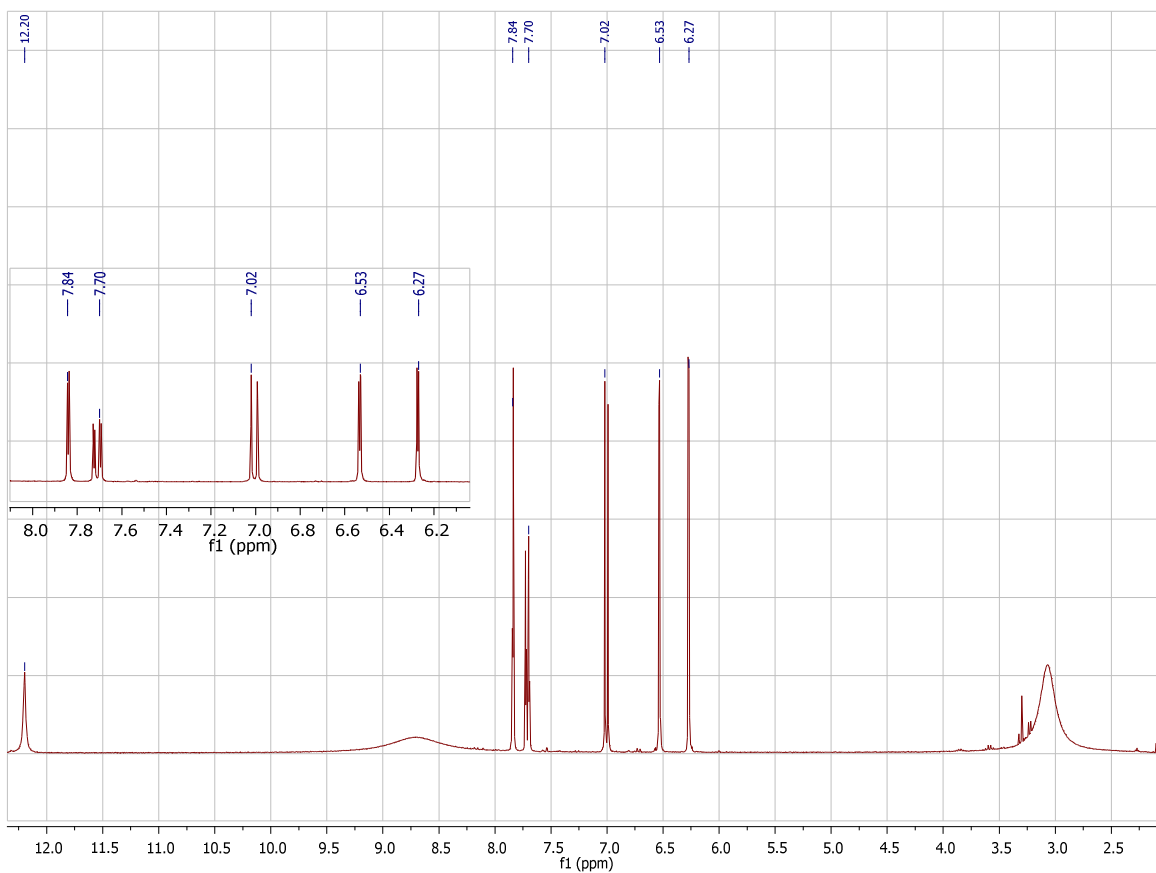


Figura 3-16. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, Acetona d_6) del compuesto Br3.

El espectro HSQC (Figura 3-17) permitió establecer la conectividad de los protones δ 6,27 y δ 6,54 con los carbonos δ 98,7 y δ 93,9 respectivamente. El hidrogeno δ 7,02 con el carbono δ 116,1, el hidrogeno δ 7,70 con el carbono δ 120,6 y el hidrogeno δ 7,84 con el carbono δ 115,6.

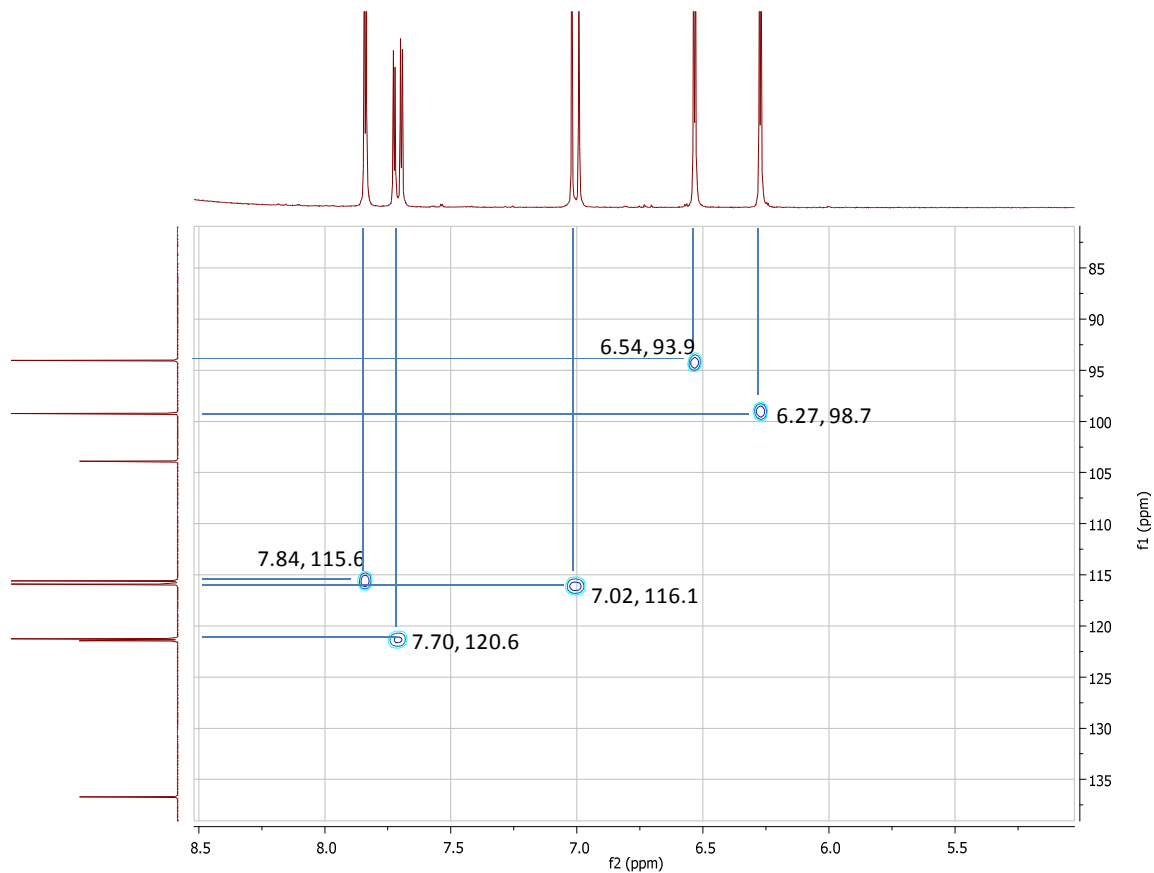


Figura 3-17. Ampliación de espectro HSQC en RMN ^1H δ 5.0 a 8.5 y ^{13}C δ 80 a 140 ppm para el compuesto Br3.

Con el espectro HMBC (Figura 3-18) se realizó la asignación de las demás señales correspondientes al compuesto Br3. En el anillo B, las señales de los carbonos C-1', C-3' y C-4' (δ 122.6, 145.2 y 147.6 respectivamente) presentan correlación con los protones H-2', H-5' y H-6' (δ 7.84, 7.02 y 7,70). En el anillo C, al C-2 se le asignó δ 147.5 por la correlación que presenta los protones H-2' y H-6' (δ 7,84 y 7,70 respectivamente). La señal en δ 103,6 se asignó al C-10 debido a las correlaciones que se observaron con los H-6 y H-8 (δ 6.27 y 6.54) y al C-9 se le asignó la señal en δ 158,2 al presentar la correlación con el H-8 (δ 6,54). Las correlaciones descritas anteriormente se muestran en la figura (3-19).

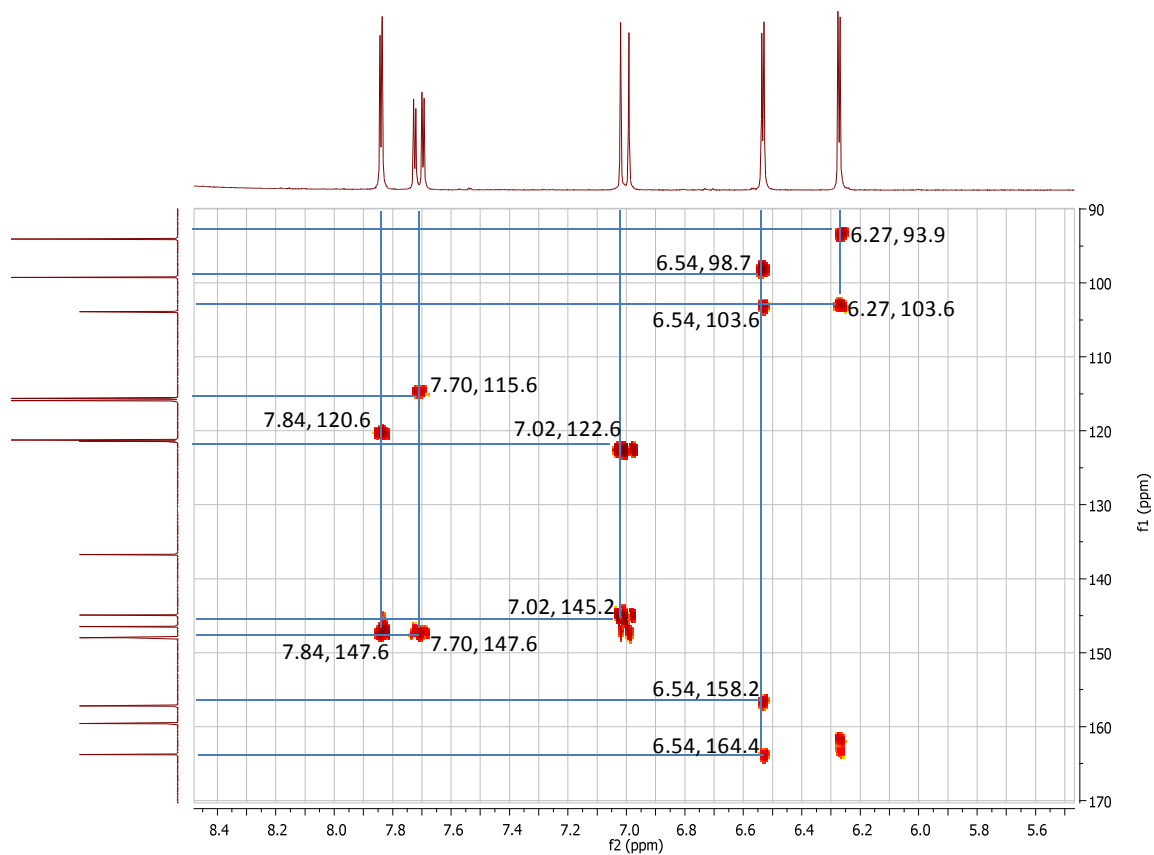


Figura 3-18. Ampliación del espectro HMBC RMN ^1H δ 5.5 a 8.5 y ^{13}C δ 90 a 170 ppm para el compuesto Br3.

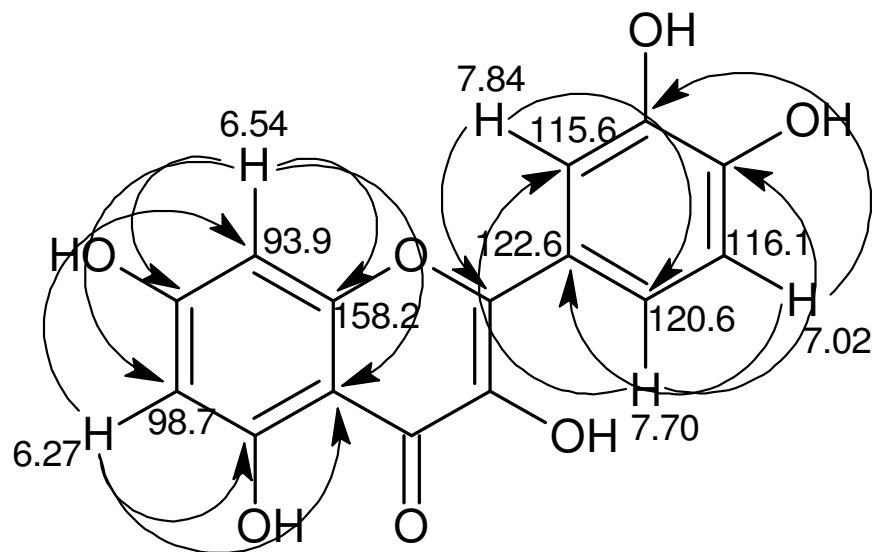


Figura 3-19 Correlaciones HMBC para el compuesto Br3.

Luego del análisis de los datos de RMN, EM y de la comparación con datos de la literatura, se asignaron los desplazamientos químicos para cada uno de los carbonos e hidrógenos de la molécula la cual se identificó como Quercetina. En la Tabla 3-4 se resumen los desplazamientos químicos obtenidos para el compuesto Br3 y los descritos para la quercetina según Fathiazad *et al.*, 2006, tomados a diferente frecuencia, RMN-¹H (200MHz), RMN-¹³C (50MHz) y empleando como disolvente DMSO- *d*₆.

Tabla 3-4. Comparación de los desplazamientos químicos del compuesto Br3 con los de la quercetina (Fathiazad *et al.*, 2006).

Posición	Br3*		Quercetina**	
	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
2	-	147,5	-	147,6
3	-	136,0	-	133,6
4	-	176,2	-	176,7
5	-	159,4	-	157,0
6	6,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H)	98,7	6,20 <i>d</i> 1H (<i>J</i> =2,0Hz)	99,0
7	-	164,4	-	164,7
8	6,54 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H)	93,9	6,42 <i>d</i> 1H (<i>J</i> =2,0Hz)	94,2
9	-	158,2	-	161,6
10	-	103,6	-	103,9
1'	-	122,6	-	122,8
2'	7,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2Hz, 1H)	115,6	7,69 <i>d</i> 1H (<i>J</i> =2,2Hz)	116,5
3'	-	145,2	-	145,9
4'	-	147,6	-	148,6
5'	7,02 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0Hz, 1H)	116,1	6,90 <i>d</i> 1H (<i>J</i> =8,5Hz)	115,9
6'	7,70 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,40Hz, 2,0Hz, 1H)	120,6	7,56 <i>dd</i> 1H (<i>J</i> =8,5; 2,0Hz)	120,8

* Datos obtenidos a 300 MHz para RMN ¹H y 75 MHz en RMN ¹³C (Solvente: Acetona *d*₆)

** Datos obtenidos a 200 MHz para RMN ¹H y 50 MHz en RMN ¹³C (Solvente: DMSO-*d*₆) (Fathiazad *et al.*, 2006)

La quercetina es un metabolito secundario ampliamente distribuido en diferentes familias de especies vegetales así como en la familia Ericaceae donde es considerada un marcador quimiotaxonómico ya que siempre se ha encontrado en diferentes estudios realizados a especies de esta familia (Harborne y Williams., 1973).

3.2.4. Elucidación estructural del compuesto Br4

El compuesto **Br4** (4,4 mg) se obtuvo como un aceite de color amarillo. Su análisis por CG-EM obtuvo la TIC que se muestra en la Figura 3-20.

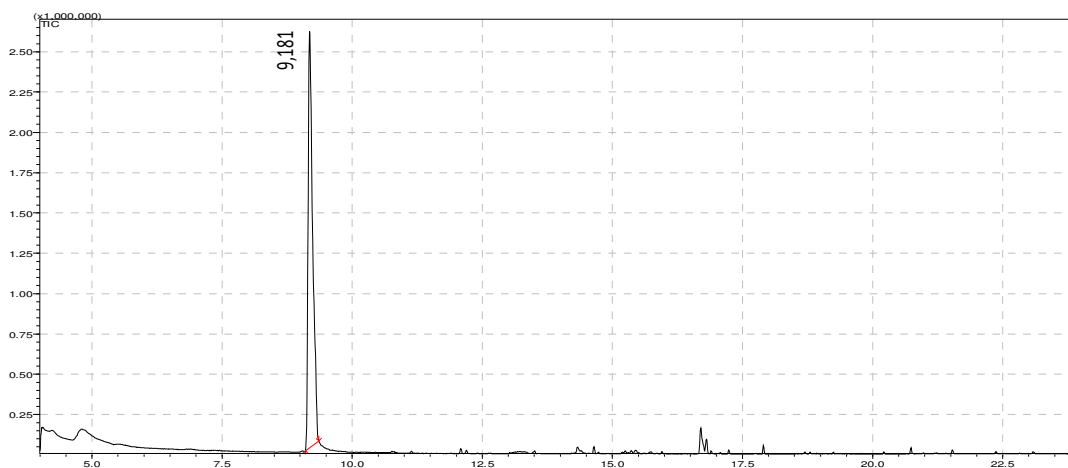


Figura 3-20. Corriente iónica total (TIC) obtenida para el compuesto Br4

En la TIC del compuesto Br4 se muestra una señal, con un tiempo de retención de 9.181 minutos y un porcentaje de área relativo de 98.3%. En el espectro de masas (ver Figura 3-21) de esta señal se observa el ión molecular a m/z 152, el pico base a m/z 120 el cual es atribuible a la pérdida de metanol ($M - CH_3OH$) otra señal en m/z 92 que corresponde a la eliminación de un grupo acilo y la señal en m/z 121 atribuible a la eliminación de un grupo metoxilo ($M - O - CH_3$) seguida de la eliminación de un grupo acilo a m/z 93 (ver figura 3-22).

La comparación del espectro de masas con la librería NIST 08 con un porcentaje de coincidencia del 98% y haciendo uso de la literatura (Zhang Li *et al.*, 2006) se pudo concluir que el compuesto Br4 corresponde al salicilato de metilo.

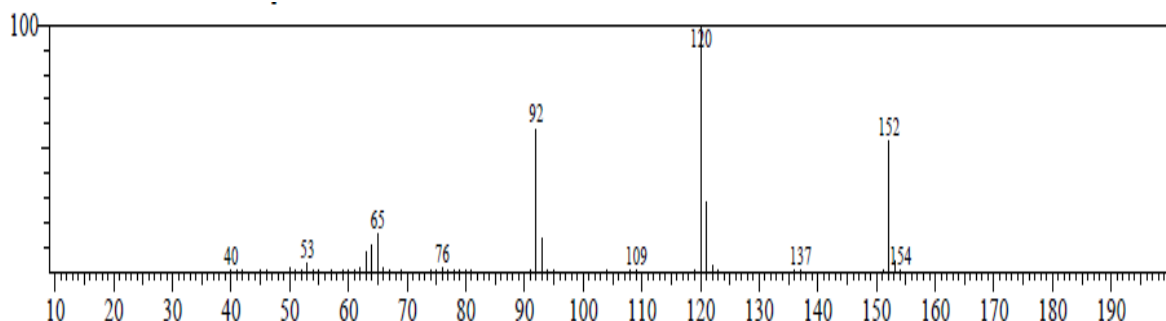


Figura 3-21. Espectro de masas en modo ionización electrónica para el compuesto Br4.

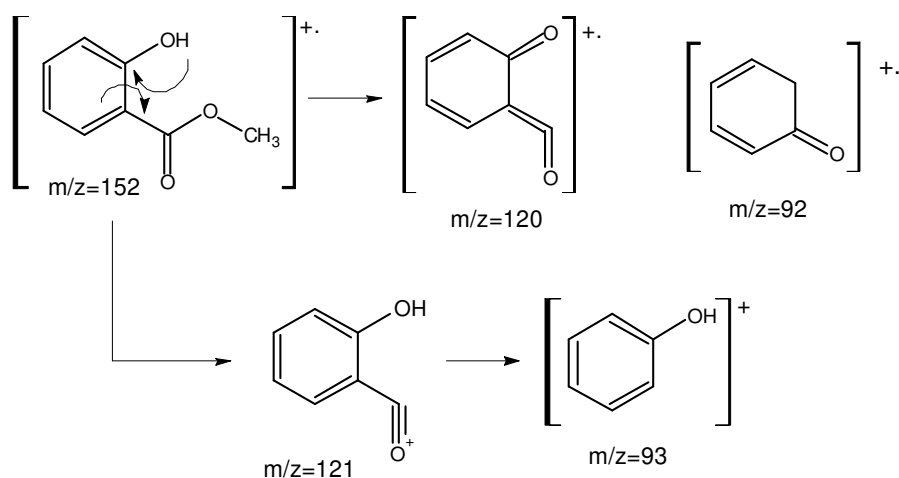


Figura 3-22. Vía de fragmentación propuesta para el compuesto Br4.

El compuesto Br4 también fue analizado por RMN ^1H con el fin de corroborar la estructura del salicilato de metilo. El espectro de RMN ^1H (Figura 3-23) del compuesto Br2, muestra la existencia de un singlete en δ 10,76 correspondiente a al protón de un grupo OH fenólico, en la región aromática del espectro se evidencian cuatro señales δ 7,79 (*ddd*, $1H$), δ 7,46 (*m*, $1H$), δ 6,97 (*m*, $1H$) y δ 6,89 (*m*, $1H$) correspondientes a cuatro protones aromáticos lo cual indica que el anillo de benceno se encuentra disustituido. La señal de δ 3,95 (*s*, $3H$) es indicativa de un grupo metoxilo.

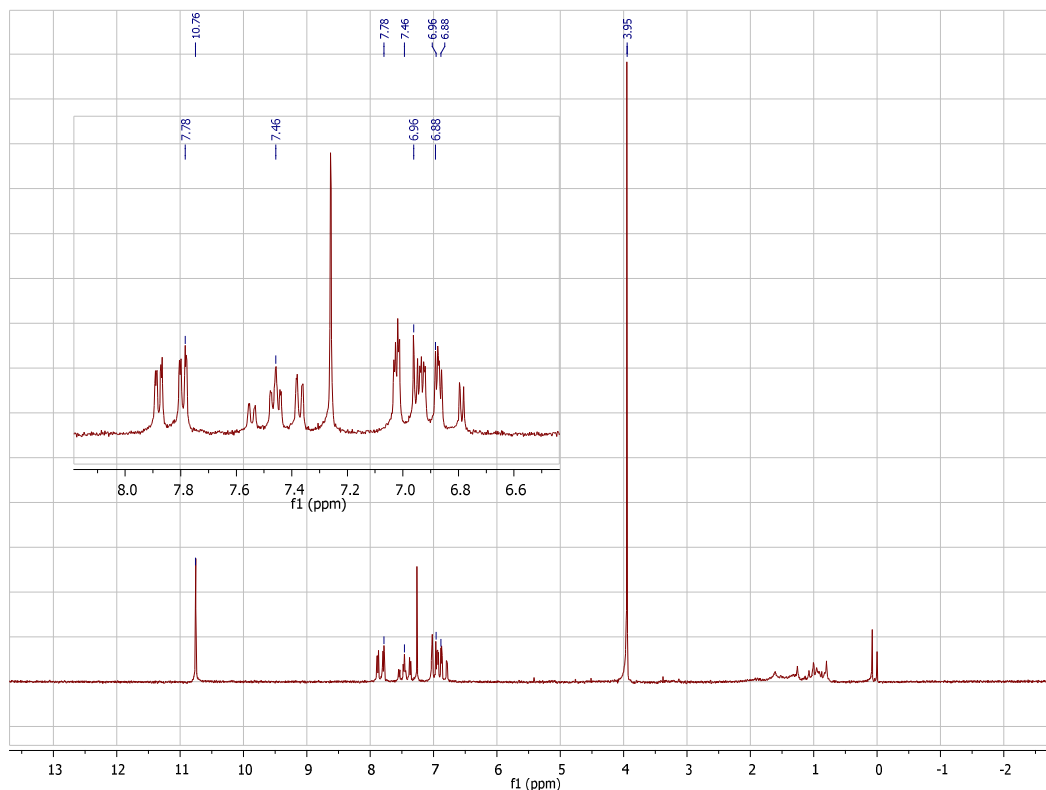


Figura 3-23. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto Br4

Los datos obtenidos con el espectro de RMN ^1H , el análisis del espectro de masas y la comparación con los datos en la literatura (Zhang Li *et al.*, 2006) confirman que el compuesto Br4 es el salicilato de metilo cuya estructura y asignación de desplazamientos químicos se muestra en la Figura 3-24.

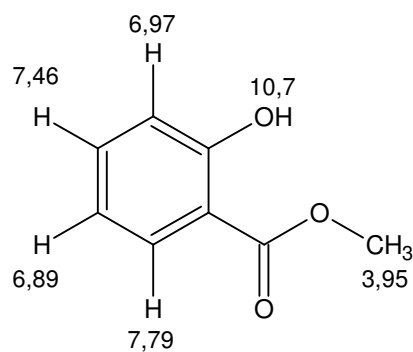


Figura 3-24. Desplazamientos químicos RMN ^1H para el compuesto Br4.

Esta sustancia no ha sido reportada para la especie *Bejaria resinosa*; pero se ha encontrado en algunas especies de la familia Ericaceae como en *Gaultheria yunnanensis* (Zhang Li *et al.*, 2006).

3.2.5. Elucidación estructural del compuesto Br5

El compuesto **Br5** (7 mg) se obtuvo como un sólido de color amarillo soluble en acetona con un punto de fusión de 148-149°C. Este compuesto fue analizado por CG-EM, obteniendo el perfil cromatográfico que se muestra en la Figura 3-25.

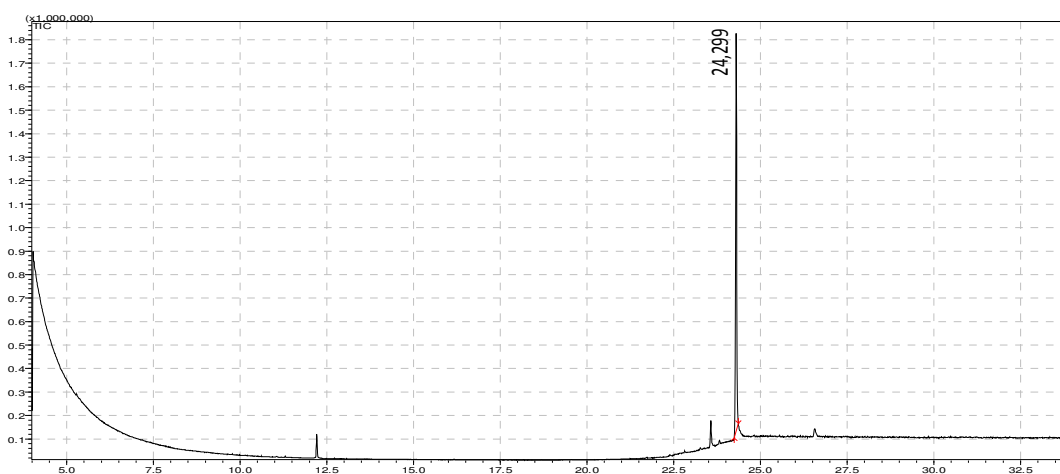


Figura 3-25. Corriente iónica total (TIC) obtenida para el compuesto Br5.

En la TIC del compuesto Br5 se muestra una señal, con un tiempo de retención de 24.299 minutos y un porcentaje de área relativo de 98.8%. En el espectro de masas (ver Figura 3-26) de esta señal se observa el ión molecular a m/z 344 y el pico base a m/z 329; además, exhibe los picos a m/z 301, 286 y 105.

La comparación del espectro de masas con la librería NIST 08 con un porcentaje de coincidencia del 97% y haciendo uso de la literatura (Chidiak *et al.*, 2007; Wollenweber; 2005) se pudo concluir que el compuesto Br5 corresponde al flavonol 3,5-dihidroxi,-6,7,8-trimetoxiflavona.

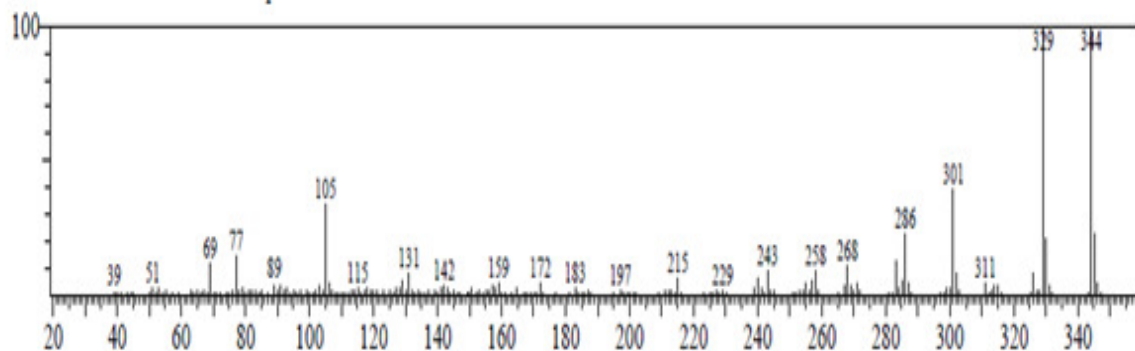


Figura 3-26. Espectro de masas en modo ionización electrónica para el compuesto Br5

El compuesto Br5 también fue analizado por RMN ^1H y ^{13}C para confirmar su estructura. En el espectro de RMN ^1H (Figura 3-27) se observa un total de cinco señales para protones aromáticos en la región de 6 a 8 ppm. A campo bajo del espectro se observa un singlete a δ 11,9 característico de un grupo OH fenólico que forma puente de hidrógeno con un grupo carbonilo lo cual permite considerar la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-3 o C-5 de un núcleo flavonoide.

Las señales de δ 8,31 - 8,33 ppm (*dd*, $J = 1,54 \text{ Hz}$, 2H) y δ 7,51 - 7,62 (*m*, 3H), se pueden asignar a los hidrógenos en las posiciones C-2', C-3', C4', C5' y C-6' del anillo B de un flavonoide. En la zona alifática del espectro se presentaron 3 señales, las cuales corresponden a los protones de tres grupos metoxilo δ 3,88 (*s*, 3H), 3,98 (*s*, 3H) y 4,09 (*s*, 3H) confirmando lo observado en el análisis por CG-EM.

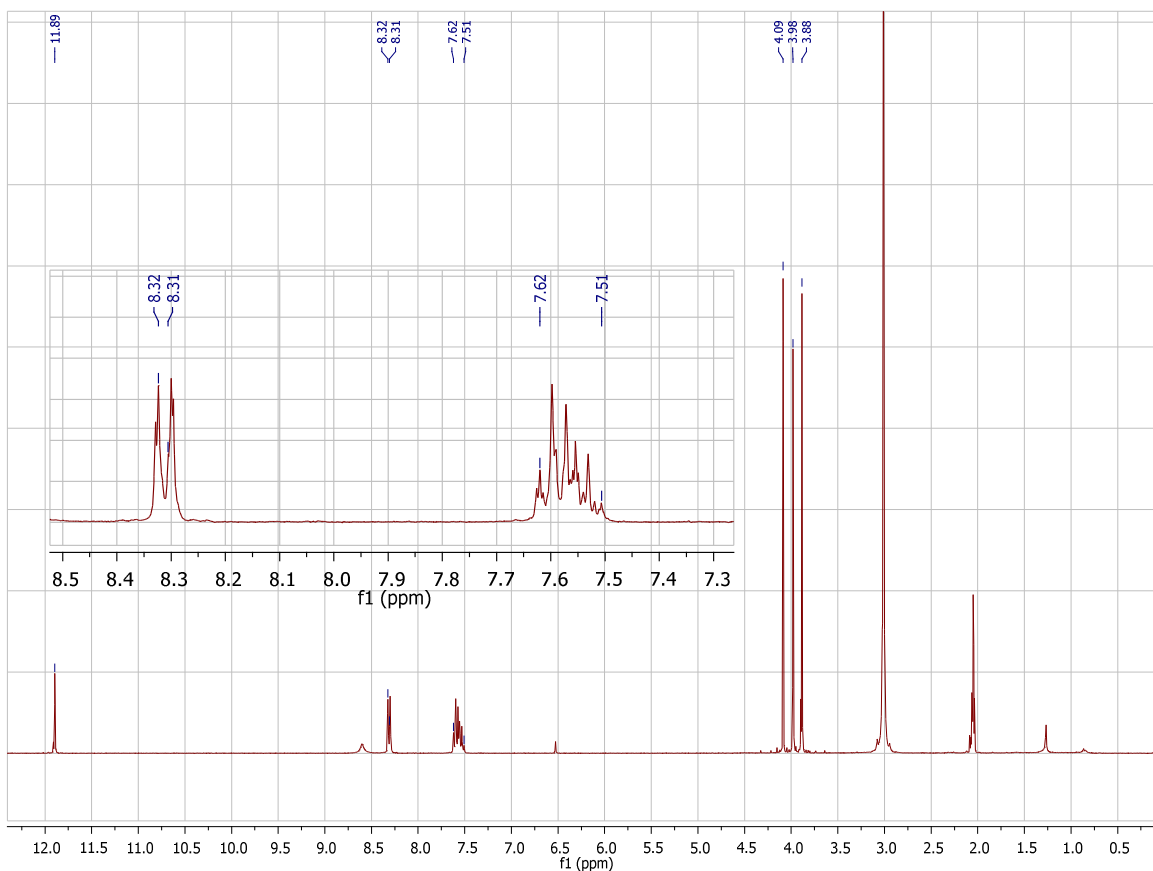


Figura 3-27. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, Acetona d_6) del compuesto Br5.

El espectro HSQC (Figura 3-28) permitió establecer la conectividad de los protones de los metoxilos de la siguiente manera: los protones con desplazamiento químico δ 3,88 con el carbono δ 61,1, los de δ 3,98 con el carbono δ 62,3 y los protones de δ 4,09 con el carbono δ 62,0. Para los protones aromáticos, Las señales de 8,31y δ 8,32 correlacionana una unión respectivamente con dos carbonos del anillo aromático de desplazamiento químico δ 128,4; los protones de δ 7,56 - 7,64 con los carbonos de δ 129,4 y δ 131,1.

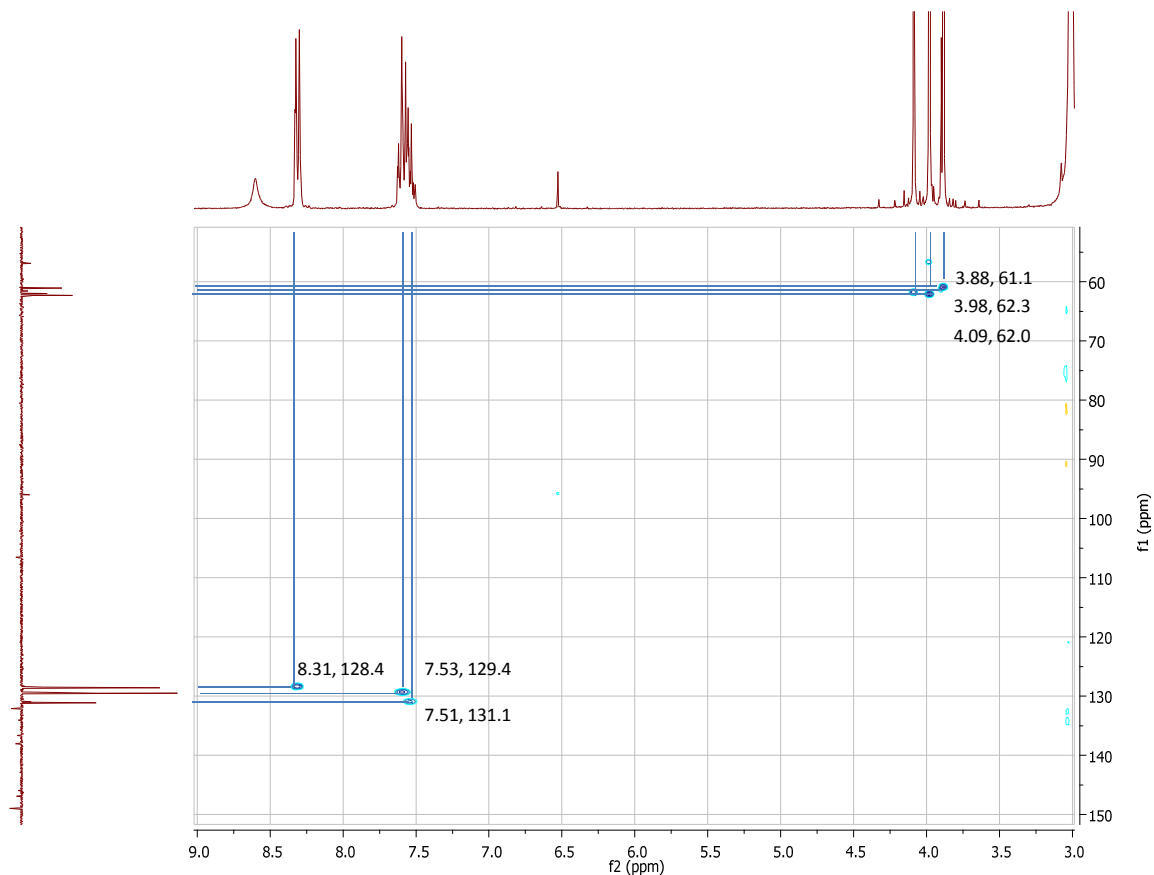


Figura 3-28. Ampliación de espectro HSQC en RMN ^1H δ 3.0 a 9.0 y ^{13}C δ 50 a 150 ppm para el compuesto Br5.

Con el espectro HMBC (Figura 3-29) se realizó la asignación del desplazamiento químico a los demás carbonos de la estructura del compuesto Br5. En el anillo B, la señal del carbono C-3' (δ 129,4) presenta correlación a 3 uniones con el protón H-5' (δ 7,61). En el anillo C, al C-2 se le asignó δ 148,5 por la correlación que presenta con el protón δ 11,9 del grupo hidroxilo en la posición 3. Las señales en δ 134,5 y δ 105,6 se asignaron a los carbonos C-6 y C-10 respectivamente debido a las correlaciones que se observaron con el protón δ 11,9 del grupo hidroxilo en la posición 5; de esta forma se corrobora que el compuesto Br5 es 3,5-dihidroxiado. Al C-2 se le asignó la señal en δ 148,5 por su correlación con el H-1' del anillo B (δ 8,31); este mismo correlaciona también a tres uniones con C-6' (δ 128,4). Las correlaciones descritas anteriormente se muestran en la figura (3-30).

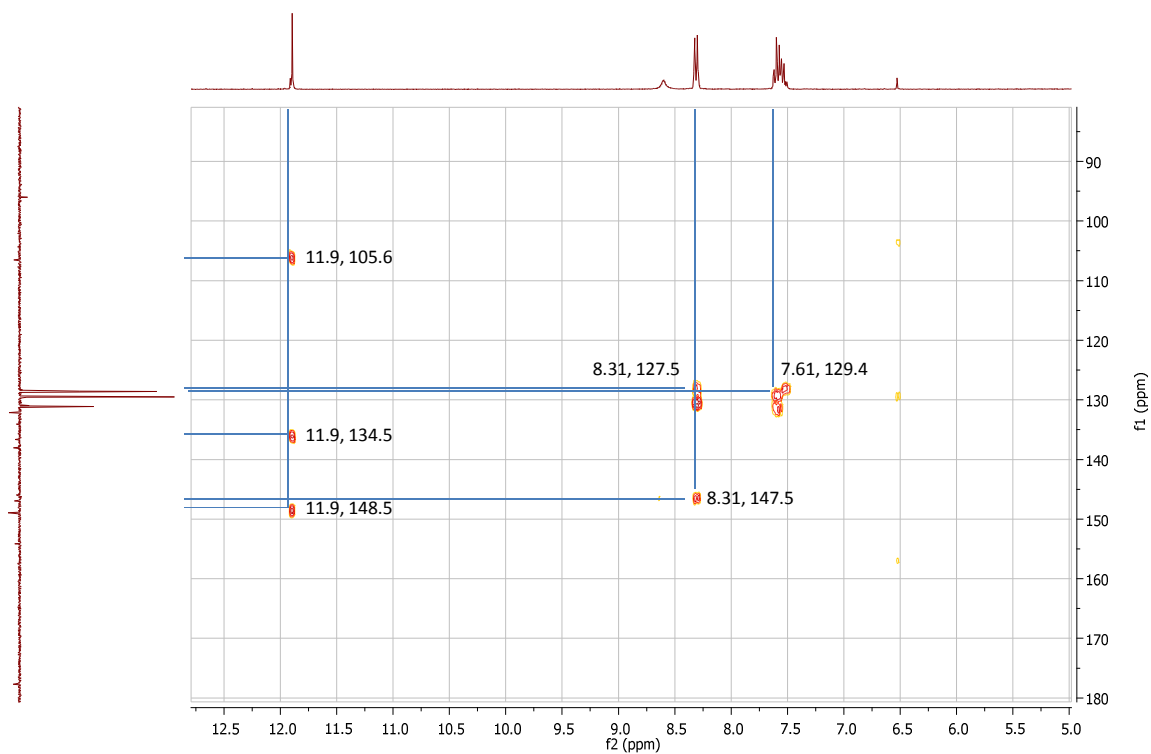


Figura 3-29. Ampliación del espectro HMBC RMN ^1H δ 5.0 a 13.0 y ^{13}C δ 80 a 180 ppm para el compuesto Br5.

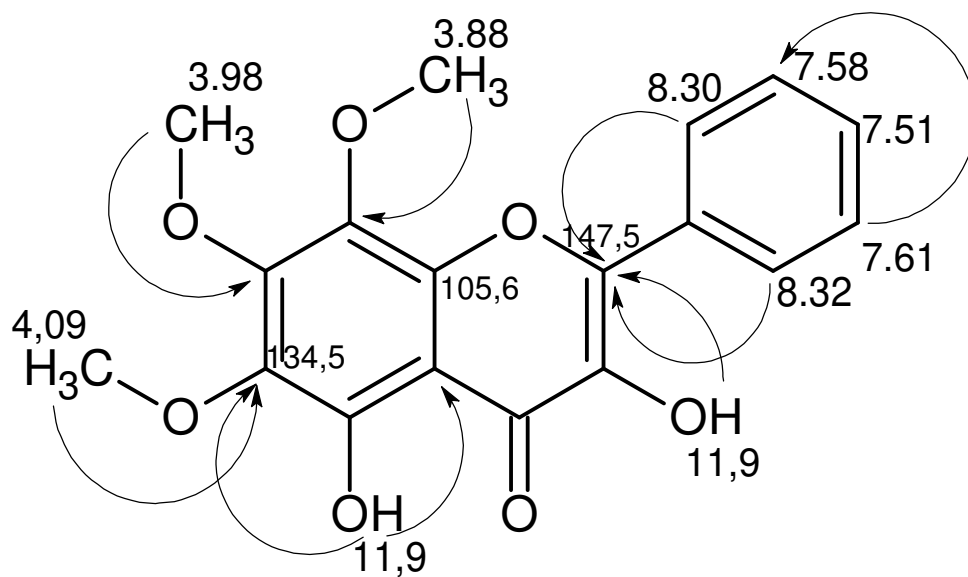


Figura 3-30. Correlaciones HMBC para el compuesto Br5.

Luego del análisis de los datos de RMN, EM y de la comparación con datos de la literatura, se asignaron los desplazamientos químicos para cada uno de los carbonos e hidrógenos de la molécula la cual se identificó como, 5-dihidroxi,-6,7,8-trimetoxiflavona. En la Tabla 3-5 se resumen los desplazamientos químicos obtenidos para el compuesto Br5 y los descritos para este flavonol según Wollenweber; 2005, tomados a diferente frecuencia, RMN-¹H (600MHz) y empleando como disolvente DMSO-*d*₆.

Tabla 3-5. Comparación de los desplazamientos químicos RMN¹H del compuesto Br5 con los de la 3,5-dihidroxi,-6,7,8-trimetoxiflanova (Wollenweber; 2005).

Posición	Br5*	3,5-dihidroxi,-6,7,8-trimetoxiflanova **
2	-	-
3-OH	11,9 (s)	12,1 (s)
4	-	-
5-OH	11,9 (s)	12,1 (s)
6-OMe	4,09 (s, 3H)	4,03 (s)
7-OMe	3,98 (s, 3H)	3,91 (s)
8-OMe	3,88 (s, 3H)	3,83 (s)
9	-	-
10	-	-
1´	-	-
2´	8,30 (d, J= 7,9 Hz, 1H)	8,18 (d, J=7,7Hz)
3´	7,58 (m, 1H)	7.60 – 7.51, (m)
4´	7,56 (m, 1H)	7.60 – 7.51, (m)
5´	7,60 (m, 1H)	7.60 – 7.51, (m)
6´	8,34 (d, J= 7,9 Hz, 1H)	8,18(d, J=7,7Hz)

* Datos obtenidos a 300 MHz para RMN ¹H (Solvente: Acetona *d*₆)

** Datos obtenidos a 600 MHz para RMN ¹H (Solvente: DMSO-*d*₆) (Wollenweber; 2005)

Este metabolito secundario ha sido reportado en otras familias de especies vegetales como: Asteraceae en la especie *Bacharis nítida* (Chidiak *et al.*, 2007) *Achyrocline bogotensis* (Thomas *et al.*, 2012) y en la familia Ericaceae se han encontrado flavonoides trimetoxilados pero en diferentes posiciones como el

3,5,7,4' Tetrahidroxi-8,3',5' trimetoxiflavona 3-*O*- α -*L*-ramnopiranosido (Gournelis., 1995).

3.2.6. Elucidación estructural del compuesto Br6

El compuesto Br6 (4,6 mg) se obtuvo como un sólido color café-rojizo con punto de fusión: 176-178 °C, soluble en acetona, en CCD fue revelado con vapores de amoníaco mostrando una mancha de color verde y posteriormente con vainillina/H₂SO₄ mostrando una sola mancha de color rojizo.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 3-31) se observan cinco señales para protones aromáticos en la región de δ 5,8 a 7.5 ppm. A campo alto del espectro se observa un singlete a δ 3,52 característico de un protón de un grupo OH fenólico; el cual, por su desplazamiento químico, indica la ausencia de un grupo carbonilo en la posición 4 de un núcleo flavonoide, siendo este una estructura tipo flavanol. Las señales de 5,93 (*sa*, 1H) y 5,80 (*sa*, 1H) corresponden a hidrógenos en posición meta de un anillo aromático tetrasustituido las cuales pueden ser asignadas a los protones en las posiciones C-6 y C-8 del anillo A del núcleo flavonoide y las señales de δ 6,90 (*sa*, 1H), δ 6,73 (*sa*, 1H) y δ 6,78 (*d*; $J=1,6$ Hz) son atribuibles a hidrógenos en posiciones orto y meta de un anillo trisustituido, los cuales se encuentran en las posiciones C-2', C5' y C-6' respectivamente del anillo B. En la zona alifática del espectro también se destacan 4 señales; dos de ellas en δ 2,71 (*t*, $J=15,8$ y $8,0$ Hz) y 2,77 (*t*, $J=15,8$ e $5,4$ Hz) correspondientes a dos protones de un grupo metileno ubicado en la posición C-4 (Costa *et al.*, 2009) y las señales de δ 4,77 (*s*, $J=7,4$ Hz) y δ 4,16 (*sa*, 1H) atribuibles a los hidrógenos de dos grupos metino ubicados en las posiciones C-2 y C-3 respectivamente.

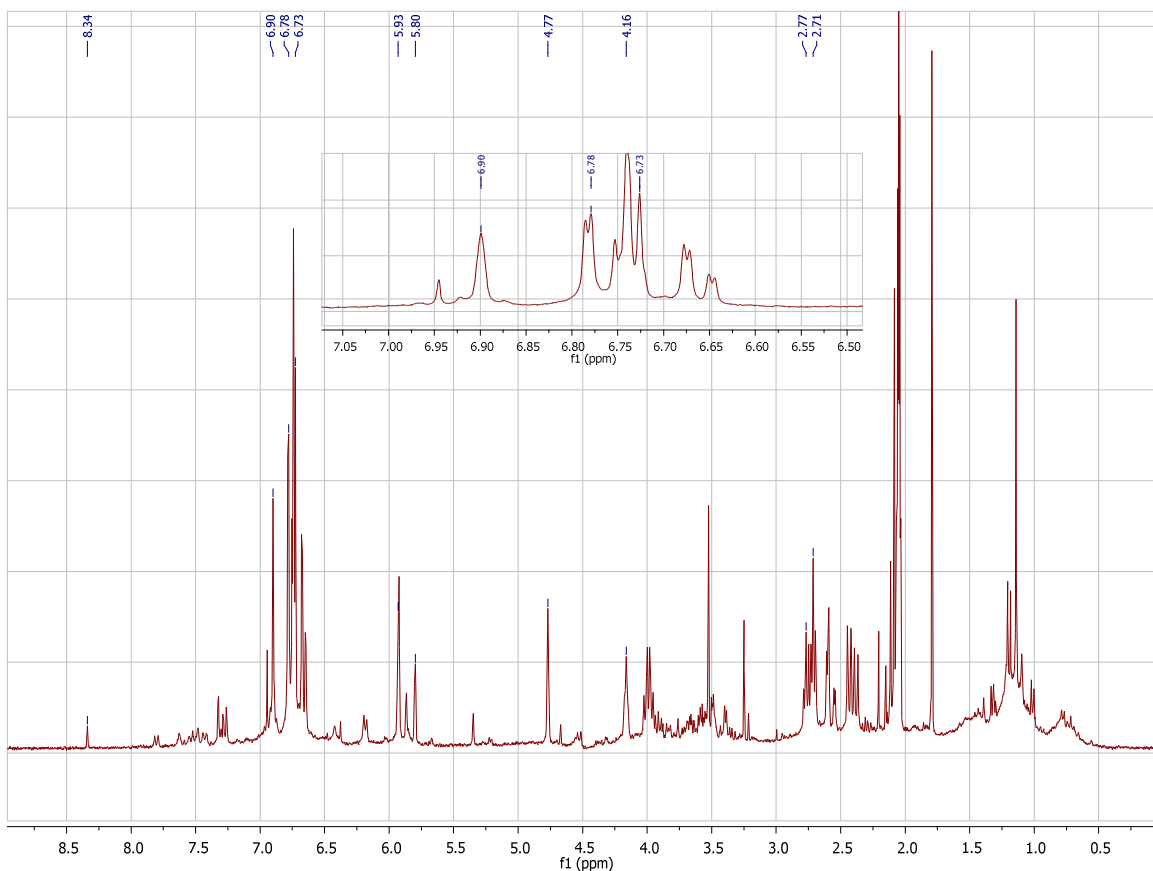


Figura 3-31. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, Acetona d_6) del compuesto Br6.

Con el espectro J-MOD (Figura 3-32), tomado a 75 MHz en Acetona- d_6 , es posible establecer que el compuesto Br6 presenta en total 15 señales de carbonos, de las cuales, 8 corresponden a carbonos cuaternarios y metilénicos y las 7 restantes a carbonos tipo metino. Las señales de δ 116.0, δ 115.0y δ 119.6 son atribuibles a carbonos aromáticos tipo metino ubicados en las posiciones C-2', C-5', y C-6' respectivamente. La señal de δ 67,1 (CH) sugiere la presencia de un grupo hidroxilo enlazado a este carbono y la señal de δ 81,1 (CH) es asignada al carbono en posición C-2 el cual se encuentra unido al anillo B del núcleo flavonoide.

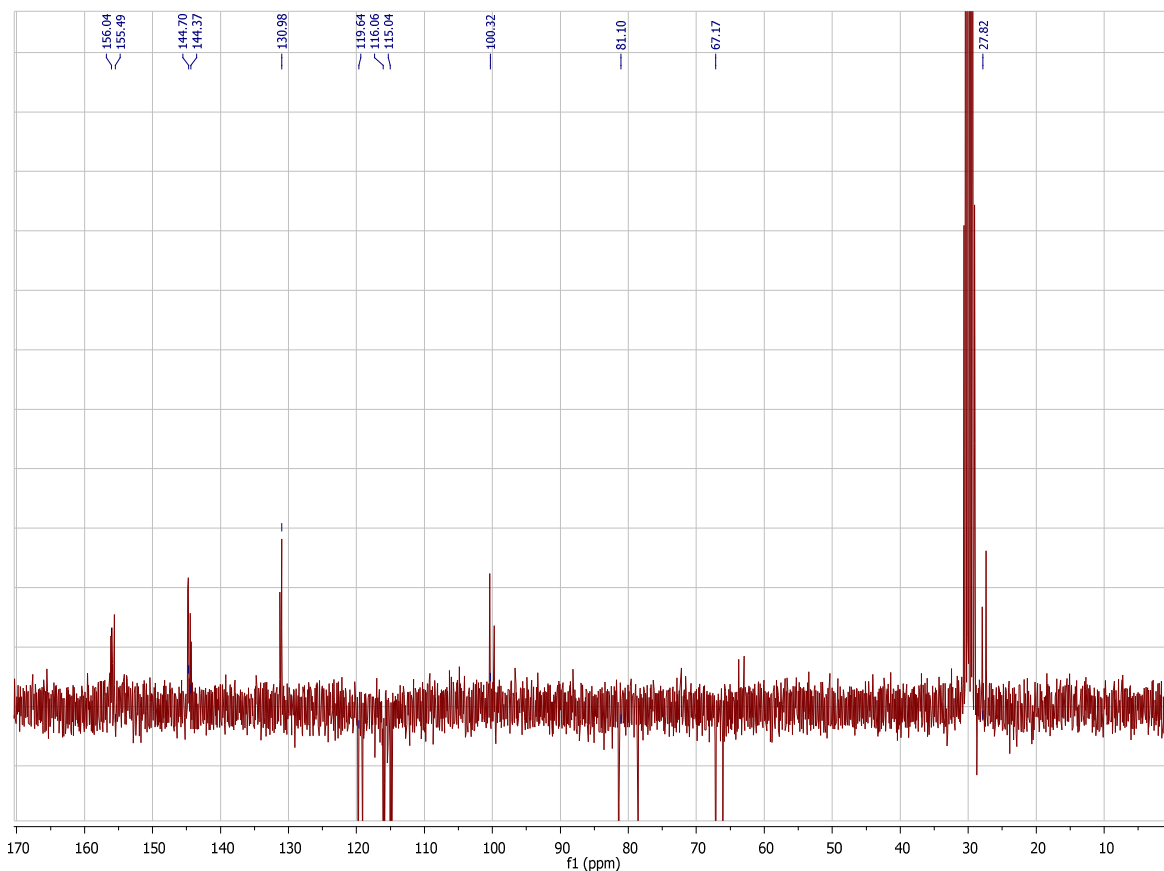


Figura 3-32. Espectro de RMN ^{13}C J-MOD (75 MHz, Acetona d_6) del compuesto Br6.

Las señales de δ 155.4, δ 156.0, δ 144.7 y δ 144.3 corresponden a cuatro carbonos cuaternarios unidos cada uno de ellos a un grupo hidroxilo ubicados en las posiciones C-5, C-7, C-3' y C-4' respectivamente. Las señales de δ 155.4, δ 100.3 y δ 130.9 se atribuyen a tres carbonos aromáticos ubicados en las posiciones C-9, C-10 y C-1' respectivamente. En la región alifática del espectro se observa una señal a δ 27.8 (CH_2) la cual por su desplazamiento químico indica la presencia de un grupo metileno atribuible al carbono en posición C-4.

Con el espectro HSQC (ver figura 3-33), se determinó la conectividad de cada hidrógeno con el correspondiente carbono; en el espectro se destacan las conectividades del protón en δ 4,77 con el carbono en δ 81,1 (CH), del protón en δ 4,16 con el carbono en δ 67,1 (CH); para los protones del grupo metileno 2,71 y

2,77 se observa la correlación con el carbono en δ 27,8 (CH_2). En cuanto a los protones aromáticos se observan las correlaciones de los protones en δ 6,90, 6,73 y 6,78 con los carbonos en 116.0, 115.0 y 119.6 respectivamente. Las correlaciones observadas en el espectro de HSQC se ilustran en la Figura 3-33.

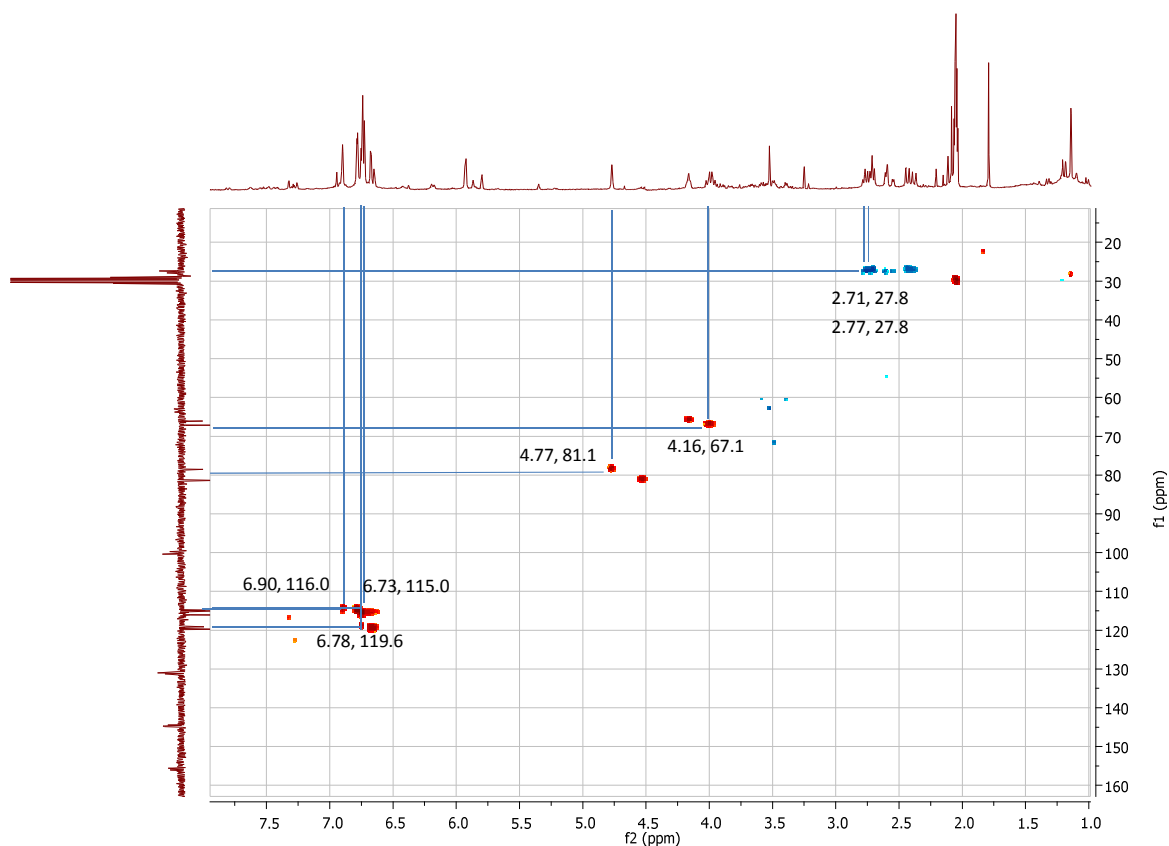


Figura 3-33. Ampliación de espectro HSQC en RMN ^1H δ 1.0 a 8.0 y ^{13}C δ 20 a 145 ppm para el compuesto Br6.

Para corroborar la ubicación de los sustituyentes sobre los anillos aromáticos y la asignación de los carbonos cuaternarios, se empleó el experimento bidimensional HMBC (Figura 3-34) en el cual se observa que las señales de los protones del grupo metileno (δ 2,71 y δ 2,77) correlacionan a tres uniones con los carbonos en δ 81,1 y 155,4 ubicados en las posiciones C-2 y C-9 respectivamente y a dos uniones con el carbono en posición C-10 (δ 100,3). La señal de δ 5,93 (H-6) correlaciona a dos uniones con los carbonos de δ 156,0 y δ 155,4 lo cual indica que el compuesto es dihidroxilado en las posiciones C-5 y C-7. La señal de δ 6,78

(H-6') y δ 6,73 (H-5') presentan correlación a tres uniones con los carbonos de δ 81,1 y δ 130,9 indicando que la unión entre el anillo C y el anillo B del núcleo flavonoide está dada en las posiciones C-2 y C1' respectivamente. Las correlaciones descritas anteriormente se muestran en la figura (3-35).

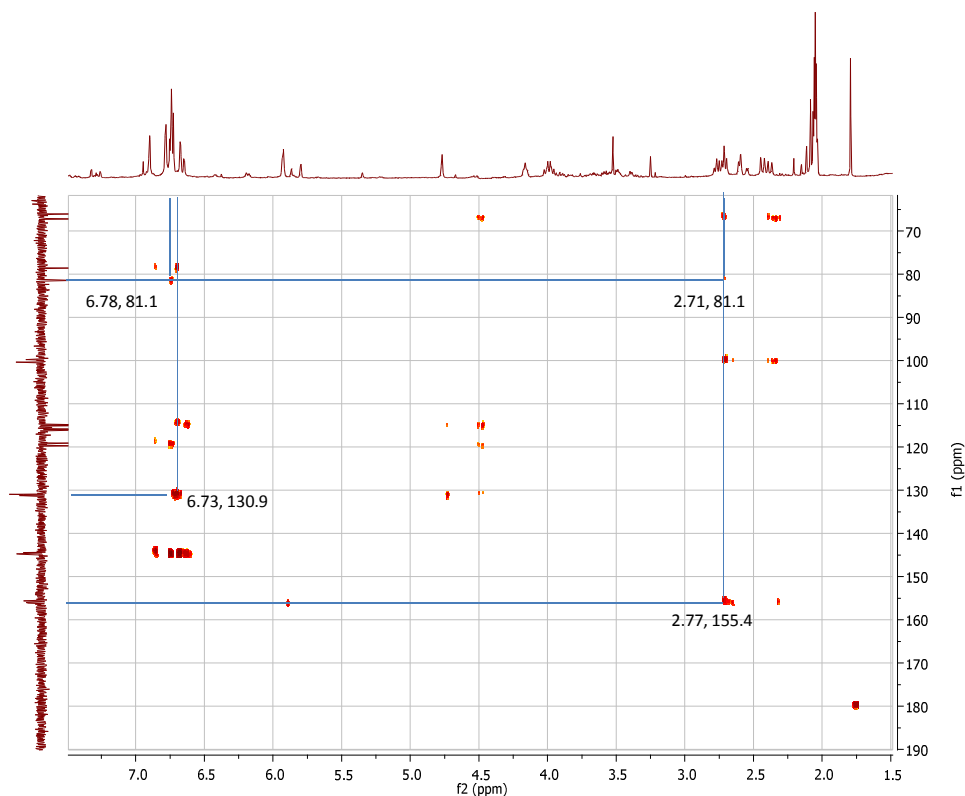


Figura 3-34. Ampliación del espectro HMBC RMN ^1H δ 1.5 a 8.0 y ^{13}C δ 60 a 190 ppm para el compuesto Br6.

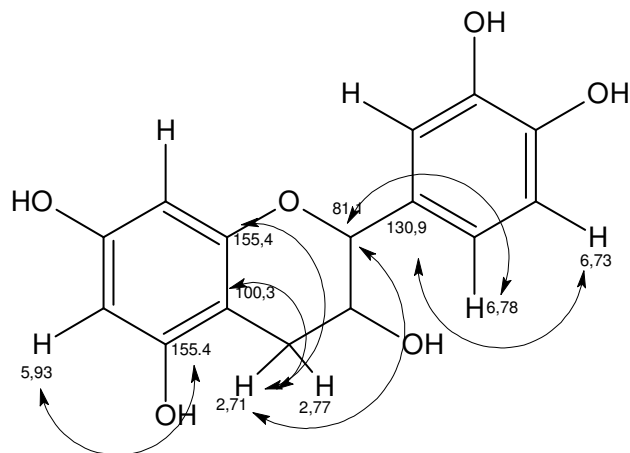


Figura 3-35. Correlaciones HMBC para el compuesto Br6.

Luego del análisis de los datos de RMN y de la comparación con datos de la literatura, se asignaron los desplazamientos químicos para cada uno de los carbonos e hidrógenos de la molécula la cual se identificó como, 3,5,7,3',4'-pentahidroflavanol (catequina). En la Tabla 3-6 se resumen los desplazamientos químicos obtenidos para el compuesto Br6 y los descritos para este flavanol según Costa *et al.*, 2009, tomados a la misma frecuencia pero empleando como disolvente CD₃OD.

Tabla 3-6. Comparación de los desplazamientos químicos RMN ¹H y ¹³C del compuesto Br6 con los de la catequina (Costa *et al.*, 2009).

Posición	Br6*		Catequina**	
	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
2	4,77(d, J=7,4 Hz)	81,1	4,69 (d; J=7,4 Hz)	82,6
3	4,16 (sa, 1H)	67,1	4,01 (sa, J=8,0; 7,4; 5,4 Hz)	66,6
4	2,71 (dd, J=15,8; 8,0 Hz; H-4 _{anti}) 2,77 (dd, J=15,8; 5,4 Hz; H-4 _{sin})	27,8	2,62 (dd; J=16,0; 8,0 Hz; H-4 _{anti}) 2,84 (dd; J=16,0; 5,4 Hz; H-4 _{sin})	28,2
5	-	155,4	-	155,3
6	5,93 (d; J=2,1 Hz)	95,7	5,96 (d; J=2,2 Hz)	96,4
7	-	156,0	-	157,4
8	5,80 (d; J=2,0 Hz)	95,4	5,80 (d; J=2,2 Hz)	95,6
9	-	155,4	-	156,7
10	-	100,3	-	100,9
1'	-	130,9	-	132,0
2'	6,90 (d, 1H),	116,0	6,87 (d, J=1,8 Hz)	115,2
3'	-	144,7	-	146,0
4'	-	144,3	-	146,0
5'	6,73 (d; J=8,1 Hz;)	115,0	6,73 (d; J=8,1 Hz)	116,2
6'	6,78 (dd; J=1,6; 7,9 Hz)	119,6	6,72 (dd; J=1,8; 8,1 Hz)	120,1

* Datos obtenidos a 300 MHz para RMN ¹H y 75 MHz en RMN ¹³C (Solvente: Acetona d₆)

** Datos obtenidos a 300 MHz para RMN ¹H y 75 MHz en RMN ¹³C (Solvente: CD₃OD) (Costa *et al.*, 2009)

Este flavanol ha sido identificado en diferentes familias y especies como *Cucumis melo* (Cucurbitaceae), *Fragaria vesca* y *Malus pumila* (Rosaceae) y *Vitis vinifera* (Vitaceae). En la familia Ericaceae, la catequina ha sido aislada en especies como *Vaccinium floribundum*, *Vaccinium myrtillus* y *Vaccinium mortinia* entre otras (Vasco et al., 2009, Häkkinen, 1999, Gournelis, 1995).

3.3. Composición química del aceite esencial de hojas

El aceite esencial de las hojas de *Bejaria resinosa* se obtuvo con un rendimiento del 0.031%. La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial se realizó comparando los índices de retención y los espectros de masas con los datos reportados en la literatura (Adams, 1995; Goodner, 2007). El perfil cromatográfico se muestra en la Figura 3-36. Se determinó la presencia de 30 compuestos, entre ellos monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarburos alifáticos; estos últimos constituyen cerca del 69% de la composición relativa total del aceite esencial.

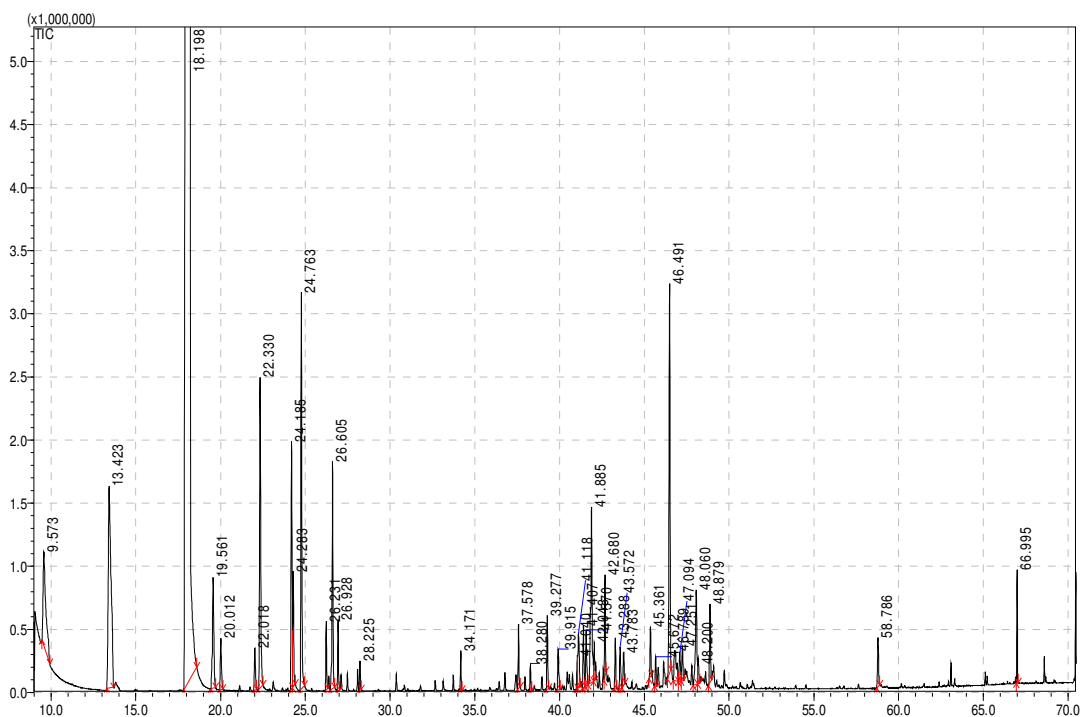


Figura 3-36. Perfil cromatográfico del aceite esencial analizado por RTX-5.

En la tabla 3-7 se presentan los compuestos identificados por comparación con índices de retención y con la librería NIST 08; se reportaron los compuestos que por comparación presentaban más de un 90% de coincidencia con el espectro de la librería, también se presentan las cantidades relativas que corresponden al porcentaje de abundancia de cada componente dentro del aceite esencial y la cuantificación por el método de estandarización interna.

Tabla 3-7. Composición química relativa del aceite esencial obtenido en la columna RTX-5.

No. Pico	trX	IR cal	%	Conc. (µg/mL)	Nombre	*	IR Ref
1	13,367	810	3,40	229,9	Octeno	HA	807
2	18,153	921	61,91	4187,7	Noneno	HA	906
3	19,533	930	0,88	59,5	1,3-nonadieno	HA	914
4	19,987	939	0,36	24,3	α-pineno	M	939
5	22,307	983	1,99	134,6	β-pineno	M	980
6	24,167	1036	1,42	96,0	Limoneno	M	1031
7	24,267	1039	0,64	43,2	β-felandreno	M	1031
8	24,747	1044	2,20	148,8	orto-Cimeno	M	1022
9	26,593	1110	1,22	82,5	Undeceno	HA	1100
10	26,913	1104	0,34	22,9	Linalol	M	1098
11	37,573	1377	0,34	22,9	α-Copaeno	S	1376
12	38,273	1418	0,19	12,8	β-panasinseno	S	1411
13	39,273	1423	0,42	28,4	β-Cariofileno	S	1418
14	39,907	1464	0,27	18,2	β-farneseno	S	1458
15	41,113	1480	0,43	29,0	γ-himachaleno	S	1476
16	41,400	1525	0,40	27,0	β-sesquifelandreno	S	1524
17	41,560	1529	0,40	27,0	Humuleno	S	1454
18	41,880	1538	1,62	109,5	δ-cadineno	S	1538
19	42,040	1543	0,23	15,5	3,7-(11)-dienoselina	S	1542
20	42,667	1560	0,53	35,8	β-Calacoreno	S	1563
21	43,280	1577	0,29	19,6	α-Calacoreno	S	1544
22	43,773	1593	0,24	16,2	Epóxido de humuleno	S	1606
23	45,353	1605	0,27	18,2	Oxido de cariofileno	S	1581
24	46,773	1652	0,44	29,7	Cubenol	S	1642

No. Pico	trX	IR cal	%	Conc. (µg/mL)	Nombre	*	IR Ref
25	47,087	1658	0,22	14,8	β-eudesmol	S	1649
26	48,053	1653	0,80	54,1	α-eudesmol	S	1652
27	62,900	1968	0,58	39,2	Linoleato de metilo	HA	2093
28	63,060	1972	0,58	39,2	Elaidato de metilo	HA	2085
29	63,653	1984	0,20	13,5	Estearato de metilo	HA	2013
30	65,220	2019	0,36	24,3	Hexatriacontano	HA	3600
HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS							69,13%
MONOTERPENOS							6,95%
SESQUITERPENOS							7,09%

trX: Tiempo de retención columna RTX-5

IR cal: Índice de retención calculado

#: Porcentaje relativo en el aceite esencial

Conc (µg/mL): Concentración calculada por estandarización interna

* Monoterpenos (M), Sesquiterpenos (S), Hidrocarburos Alifáticos (HA)

IR Ref: Índice de retención de referencia. Columna DB5

En el aceite esencial fueron identificados 30 compuestos (83%); 6 monoterpenos (M), 16 sesquiterpenos (S), y 8 hidrocarburos alifáticos (HA), entre los que se encuentra el compuesto mayoritario, que en este caso corresponde al noneno (61.91%).

Los sesquiterpenos encontrados representan el 7,09% de la composición del aceite esencial, en los cuales los componentes mayoritarios encontrados fueron: δ-cadineno (1,62%), α-eudesmol (0,80%) y β-Calacoreno (0,53%). En cuanto a los monoterpenos representan tan solo el 6,95% donde el constituyente en mayor porcentaje es el *orto*-Cimeno (2,2%) seguido de β-pineno (1,99%) y limoneno (1,42%).

Teniendo en cuenta que el rendimiento fue inferior al 0,1% se puede considerar a *Bejaria resinosa* como una especie vegetal pobre en aceites esenciales, lo cual está de acuerdo con los componentes volátiles determinados, ya que especies con bajos rendimientos se caracterizan por producir cantidades considerables de compuestos derivados de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos y derivados

carotenoides; a diferencia de especies con alto rendimiento las cuales se caracterizan por producir gran cantidad de monoterpenos y fenilpropanoides (Radulovic *et al*; 2010).

Otros reportes en la literatura (Radulovic *et al*; 2010) muestran los componentes de otras especies pertenecientes a la familia Ericaceae; como es el caso de las especies vegetales *Arctostaphylos uva-ursi* y *Vaccinium vitis-idaea* donde a partir de las hojas fueron extraídos los aceites esenciales encontrando predominancia de terpenos, ácidos grasos, derivados de carotenoides y además α -terpineol y linalol los cuales son considerados taxones químicos de los géneros *Arctostaphylos* y *Vaccinium* (Radulovic *et al*; 2010).

Al realizar la comparación de los componentes identificados en el aceite esencial de *Bejaria resinosa* con los de las especies *Arctostaphylos uva-ursi* y *Vaccinium vitis-idaea* se encuentran como compuestos comunes para las tres especies el linalol, β -Cariofileno, β -farneseno, humuleno, 3,7-(11)-dienoselina y β -eudesmol y además un porcentaje de sesquiterpenos muy cercano entre ellos.

3.3.1. Propiedades físicas del aceite esencial

Al aceite esencial obtenido se le determinó la densidad absoluta y el índice de refracción, de acuerdo con la metodología descrita en el numeral 2.2.4. El valor obtenido para la densidad absoluta fue de 0,742 g/mL y el índice de refracción fue de 1,4265.

3.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Con el propósito de evaluar la posible actividad antiinflamatoria *in vivo* de las fracciones y metabolitos aislados de *Bejaria resinosa*, se administraron vía tópica los tratamientos de prueba en el modelo de edema inducido en oreja de ratón por el agente irritante TPA. La magnitud del edema desarrollado fue medido por

gravimetría ya que la mayor o menor acumulación de exudado inflamatorio en las orejas se refleja en su peso. Las fracciones y metabolitos evaluados fueron: **F.EDP.BrH**, **F.EDP.BrFL**, **FCH₂Cl₂BrH**, **FCH₂Cl₂BrFL**, **FCH₂Cl₂BrFR**, **F.AcOEt.BrH**, **F.AcOEt.BrFL**, **F.AcOEt.BrFR**, la mezcla α y β **Amirina – Germanicol** y la **Quercetina**. Las demás fracciones y metabolitos aislados no fueron evaluados en este modelo por ser insolubles en acetona y por la cantidad de sustancia requerida para el análisis.

La Tabla 3-8 y la Figura 3-37 muestran los resultados del efecto de las fracciones y metabolitos evaluados sobre el edema producido por la aplicación del TPA, encontrándose, que la mezcla de α y β **Amirina – Germanicol** y la **Quercetina** exhibieron la mayor inhibición de la inflamación respecto al control ($p= 0.05$) con un porcentaje de inhibición del edema de 68,8 y 77,5 respectivamente, mientras que la indometacina mostró una inhibición del edema de 79,1 a la misma dosis con lo que se confirma la validez del ensayo y los resultados mostrados por las fracciones y metabolitos evaluados. Las fracciones **F.EDP.BrFL**, **FCH₂Cl₂BrFR** y **F.AcOEt.BrFR** no presentan efecto antiinflamatorio y existe actividad antiinflamatoria moderada en las fracciones **F.EDP.BrH**, **FCH₂Cl₂BrH**, **FCH₂Cl₂BrFL**, **F.AcOEt.BrH** y **F.AcOEt.BrFL**.

Tabla 3-8. Efectos de las fracciones y metabolitos secundarios evaluados de *Bejaria resinosa* sobre el edema auricular inducido por TPA.

TRATAMIENTO	Δ edema (mg) \pm EEM*	% Inhibición
Control	18,68	-
Indometacina	3,91 \pm 1,72	79,1
F.EDP.BrH	12,31 \pm 3,13	34,1
F.EDP.BrFL	13,28 \pm 3,44	28,9
FCH ₂ Cl ₂ BrH	13,33 \pm 2,71	28,7
FCH ₂ Cl ₂ BrFL	11,40 \pm 3,61	39,0
FCH ₂ Cl ₂ BrFR	14,45 \pm 2,89	22,6
F.AcOEt.BrH	14,07 \pm 2,36	24,7
F.AcOEt.BrFL	14,00 \pm 1,46	25,1

TRATAMIENTO	Δ edema (mg) \pm EEM*	% Inhibición
F.AcOEt.BrFR	11,97 \pm 3,47	35,9
α y β Amirina – Germanicol	5,83 \pm 3,48	68,8
Quercetina	4,20 \pm 1,98	77,5

* datos expresados como la media \pm Error Estándar de la Media (E.E.M); n=10 (ANOVA post-test Tukey: p \leq 0,05)

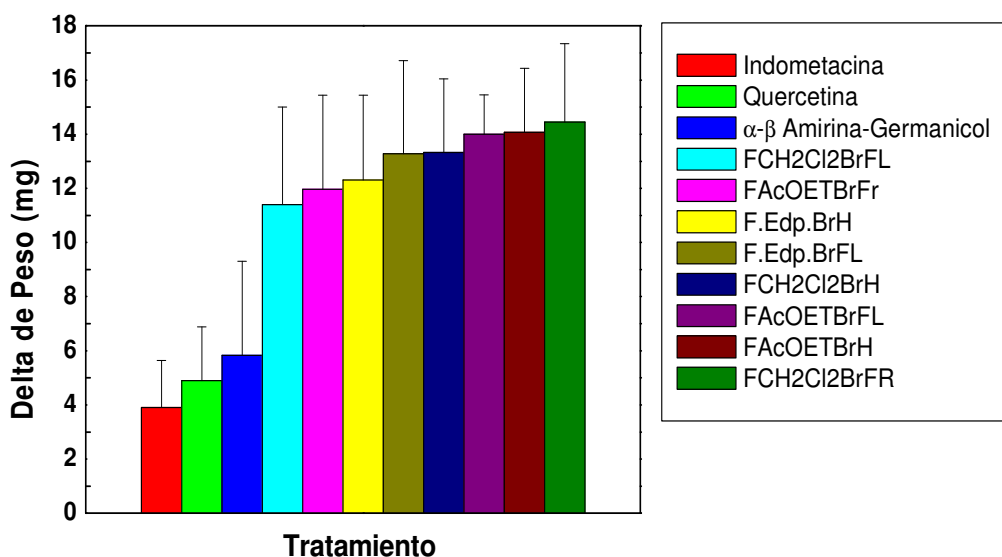


Figura 3-37. Actividad antiinflamatoria de las fracciones y metabolitos secundarios obtenidos de *Bejaria resinosa* (1000 μ g/oreja), Indometacina (1000 μ g /oreja) datos expresados como la media \pm E.E.M; n=10 (ANOVA test Tukey: p \leq 0,05).

El método empleado (edema auricular inducido por TPA) es ampliamente utilizado para evaluar sustancias antiinflamatorias; en el cual el proceso inflamatorio desencadenado por la aplicación tópica del TPA se debe a la activación de la proteína cinasa C (PKC) dérmica y la fosfolipasa A2 así como la producción de prostaglandinas y leucotrienos mediadores que podrían intervenir en el efecto antiinflamatorio (García *et al.*, 2004). Una gran cantidad de agentes antiinflamatorios muestran actividad en este modelo, pero principalmente los encargados de inhibir las enzimas cicloxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LOX) (Jiménez *et al.*; 2006) aunque los inhibidores de la cicloxigenasa parecen ser más

efectivos que los inhibidores de la lipoxigenasa (LOX) para reducir la respuesta edematosa (García *et al.*; 2004).

La actividad antiinflamatoria mostrada por la mezcla de α y β **Amirina** – **Germanicol** y la **quercetina** puede deberse probablemente a que muchos triterpenos y flavonoides pueden modular la síntesis de prostaglandinas, funcionando como inhibidores enzimáticos. Unos pueden inhibir la enzima cicloxigenasa (COX) como es el caso de los triterpenos pentacíclicos, mientras que otros pueden inhibir la enzima lipoxigenasa, como es el caso de la quercetina (Bauman *et al.*, 1992; González *et al.*, 2007). Cabe resaltar que los flavonoides también pueden manifestar propiedades antiinflamatorias a través de su acción antioxidante (capacidad de captar radicales libres) lo cual les permite actuar contra el daño tisular debido a la formación de radicales libres generados como subproductos de las rutas cicloxigenasa y lipoxigenasa, pudiendo citar entre ellos a la rutina (Selloum *et al.*, 2003; Coskun *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

El trabajo fitoquímico desarrollado en hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa* permitió el aislamiento e identificación de una mezcla de triterpenos (Germanicol, α -amirina y β -amirina) lupeol, salicilato de metilo y tres flavonoides: 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona (Quercetina), 3,5-dihidroxi,-6,7,8-trimetoxiflanova y 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavanol (Catequina); de los cuales, dos se reportan por primera vez en la especie.

Se realizó la determinación de los componentes del aceite esencial de las hojas encontrando que el compuesto mayoritario es un hidrocarburo alifático identificado como noneno; también se encontraron sesquiterpenos como el δ -cadineno, α -eudesmol y β -calacoreno y algunos monoterpenos como *orto*-cimeno, β -pineno y limoneno.

El estudio fitoquímico de la especie vegetal *Bejaria resinosa* permitió establecer similitud en cuanto a la composición química de los diferentes órganos ya que se encontraron metabolitos secundarios comunes para hojas flores y frutos como la mezcla de triterpenos, lupeol y quercetina confirmando la quimiotaxonomía del género.

La determinación de la actividad antiinflamatoria en el modelo *in vivo* permitió establecer que la mezcla de triterpenos y la quercetina, son fuertes agentes antiinflamatorios, pues redujeron significativamente el edema causado por el TPA en la oreja del ratón con porcentajes de inhibición cercanos a los presentados por el fármaco de referencia, indometacina.

El presente estudio es un aporte a las investigaciones fitoquímicas de la familia Ericaceae en Colombia y en particular del género *Bejaria*, ya que éste es el primer reporte reciente en cuanto a la constitución de metabolitos fijos y volátiles de un género que cuenta con escasos estudios químicos.

RECOMENDACIONES

Proponer una metodología dirigida hacia la extracción de flavonoides y triterpenos ya que entre estos se encuentran las sustancias que presentaron mayor actividad antiinflamatoria.

Optimizar la metodología de extracción con el fin de obtener mayor cantidad de metabolitos y evaluar su actividad antiinflamatoria. Así mismo proponer un estudio bioguiado con el fin de buscar las fracciones más activas o sustancias antiinflamatorias.

Realizar nuevas investigaciones con otros modelos biológicos que permitan reafirmar la capacidad antiinflamatoria de los compuestos hallados en este estudio.

Realizar estudios fitoquímicos de otras especies pertenecientes al género *Bejaria*, con el fin de contribuir al conocimiento quimiotaxonómico de este género.

BIBLIOGRAFÍA

Abreu, O. A., Cuellar, A., & Prieto, S. (2008). Fitoquímica del género *Vaccinium* (Ericaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13, 0-0.

Adams, R. (1995). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. USA: Allured Publishing Corporation.

Agarwal, R., & Rangari, V. D. (2003). Antiinflammatory and antiarthritic activities of lupeol and 19a-H LUPEOL isoated from *Strobilanthus callosus* and *Strobilanthus ixiocephala* roots. *Indian Journal of Pharmacology Volumen 35* , 384-387.

Agarwal, S., & Kalpana, S. (1988). Anti-inflammatory activity of flowers of *Rhododendron arboreum* (SMITH) in rat's hind paw oedema induced by various phlogistic agents. *Indian Journal of Pharmacology*, 20, 86–89.

Ah Jung, H., Nurul Islam, M., Yong Soo, K., Seong Eun, J., You Kiung, S., Jin Ju, P., y otros. (2011). Extraction and identification of three major aldose reductase inhibitors from *Artemisia montana*. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 376-384.

Al-Rehaily, A. J., El-Tahir, K. E., Mossa, J. S., & Rafatullah, S. (2001). Pharmacological Studies of Various Extracts and the Major Constituent, Lupeol, obtained from Hexane Extract of *Teclea nobilis* in Rodents. *Natural Product Sciences* , 76-82.

Argay, G., Kalman, A., Kapor, A., Ribar, B., Petrovic, S., & Gorunovid, M. (1997). Crystal structure of a mixture of lupeol acetate tautomers isolated from *Hieracium plumulosum* A. Kerner, Asteraceae. *Journal of Molecular Structure*, 435, 169-179.

Bauman, J., Bruchhausen, F. V. and Wurm, G. 1992. Flavonoids and arachidonic acid metabolism. Flavonoids and bioflavonoids. Studies in Organic Chemistry 11. Elsevier. Oxford. 411-419.

Bayoumi, S., Rowan, M., Beeching, J., & Blagbrough, I. (2010). Constituents and secondary metabolite natural products in fresh and deteriorated cassava roots. *Phytochemistry*, 71, 598-604.

Bennini, B., & Chulia, A. J. (1994). Flavonol glycosides from *Erica cinerea*. *Journal of Natural Products*, 57, 178-180.

Bhattacharyya, J., & Barros, C. (1985). Triterpenoids of *Cnidoculus urens*. *Phytochemistry*, 25 (1), 274–276.

Bilbao, M. (1997). *Análisis fitoquímico preliminar*. Armenia: Oficina de publicaciones Universidad del Quindío.

Bilbao, M. (1997). *Análisis Fitoquímico Preliminar*. Armenia: Oficina de publicaciones Universidad del Quindío.

Bing Yang Ding, L., Gang Lin, G., & Fai Chen, K. (1998). Grayanoids from *Pieris formosa*. *Phytochemistry*, 47, 2045-2048.

biovirtual.unal.edu.co. (Enero de 2012). www.biovirtual.unal.edu.co. Obtenido de [http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=QuickSearch&accion=searchByScientific&keyword=Befaria resinosa](http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=QuickSearch&accion=searchByScientific&keyword=Befaria%20resinosa)

Boeris, M., Toso, R., & Skliar, M. (2004). Actividad Antiinflamatoria de *Salpichroa origanifolia*. *Acta Farmaceutica Bonaerense Volumen 23*, 138-141.

Bracho, J., Rodríguez, C., & Llanez, F. (2009). Triterpenos pentacíclicos en propóleo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75, 439-452.

Bruneton, J. (2001). *Plantas Tóxicas, vegetales peligrosos para el hombre y los animales*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

Budzikiewicz, H., Wilson, J., & Djerassi, C. (1963). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *Journal of American Chem. Soc.*, 85, 3688-3699.

Bussmann, R. W., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., y otros. (2011). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 121-140.

Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., y otros. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 101-108.

Chidiak, S., Guada, M., Buitrago, D., & Morales, A. (2007). Flavonoides aislados de la especie *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon Pers). *CIENCIA 15 Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida - Venezuela*, 3, 361-365.

Chin Hoe, T., Hiroshi, M., Osamu, S., & Kit Lam, C. (2010). 2,3-Dehydro-4a-hydroxylongilactone, a novel quassinoid and two known phenyl propanoids from *Eurycoma longifolia* Jack. *Food Chemistry*, 120, 794-798.

Choi, S. E., Park, K. H., Han, B. H., Jeong, M. S., Seo, S. J., Lee, D. I., y otros. (2011). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 expression by phenolic compounds from roots of *Rhododendron mucronulatum*. *Phytotherapy Research*, 25, 1301–1305.

Chrifa, S., Brahim, H., Amrani, S., & Fouad, A. (2010). Acute diuretic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers and *Cynodon dactylon* rhizomes extracts in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 352–356.

Clemants, S. (1991). Two New Species of *Bejaria* (Ericaceae) from South America. *Brittonia*, 43 (3), 171-177.

concursos.colombiaaprende.edu.co. (Enero de 2012).
www.colombiaaprende.edu.co. Obtenido de
http://aplicaciones2.colombiaaprende.edu.co/concursos/expediciones_botanicas/ver_herbarios_p.php?id=365&id_p=1974

Coskun, O., Kanter, M., Armutcu, F., Cetin, K., Kaybolmaz, B., & Yazgan, O. (2004). Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute ethanol-induced. *Eur. J. Med.*, 1, 37-42.

Costa, M., & Chaves, M. (2009). Constituintes Químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Química Nova*, 32, 1509-1512.

CYTED. (1995). *Manual de técnicas de investigación. Proyecto X-I: Búsqueda de principios bioactivos en plantas de la región.*

De Young, L., Kheifets, J., Ballaron, S., & Young, J. (1989). Edema and cell infiltration in the forbol ester treated mouse ear are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and actions*, 26: 335-341.

Dominguez, A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. México D. F.

Dufour, D., Pichette, A., Vakhtang, M., Bradette, M., Serge, L., Longtin, A., y otros. (2007). Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 22-28.

Erdemoglu, N., Akkol, E. K., Yesilada, E., & Calis, I. (2008). Bioassay guided isolation of antiinflammatory and antinociceptive principles from folk remedy *Rhododendron ponticum* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 172–178.

Erdemoglu, N., Kupeli, E., & Yesilada, E. (2003). Antiinflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *89*, 123–129.

Fathiazad, F., Delazar, A., Amiri, R., & Sarker, S. (2006). Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste Tobacco leaves. *Journal of Pharmaceutical Research*, *3*, 222-227.

Font Quer, P. (2001). *Plantas Medicinales, El Dioscórides Renovado*. Barcelona: Ediciones Península.

Franco, L., Matiz, G., Calle, J., Pinzon, R., & Ospina, L. (2007). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de calices de *Physalis peruviana* L. *Biomedica*, *27*, 110-115.

García, H. (1992). *Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica* (Vol. Tomo II). Bogotá: Tercer Mundo Ediciones.

Garcia, M. D., Fernandez, M., Alvarez, A., & Saenz, M. (2004). Antinociceptive and antiinflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *pimenta racemosa* var *ozua* (Mirtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *91*, 69-73.

Global Biodiversity Information, (. (s.f.). Recuperado el 17 de Marzo de 2013, de [http://data.gbif.org/species/15470406/?extent=-120%2B-13%2B40%2B27&zoom=3&minMapLong=120&minMapLat=13&maxMapLong=40&maxMapLat=27&c\[0\].s=20&c\[0\].p=0&c\[0\].o=1547040](http://data.gbif.org/species/15470406/?extent=-120%2B-13%2B40%2B27&zoom=3&minMapLong=120&minMapLat=13&maxMapLong=40&maxMapLat=27&c[0].s=20&c[0].p=0&c[0].o=1547040)

Godkil, G., Topcu, G., Sonmez, U., & Ulubelen, A. (1997). Terpenoids and flavonoids from *Salvia cyanescens*. *Phytochemistry*, *46* (4), 799–800.

Gomez Estrada, H. A., Gonzalez Ruiz, K. N., & Domingo, M. J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas vol. 10*, , 182-217.

Gonzalez, A., Breton, J., & Fraga, B. (1972). Componentes de Labiadas, Estructura del Nivadiol un nuevo triterpeno de la *Salvia broussonetii*. *Real sociedad Española de Física y Química*, *68*, 709-722.

Gonzalez, E., Villca, T., & Loza, R. (2007). Evaluacion de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género *Baccharis*: *B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. salicifolia*, *B. ulcina*, *B. latifolia*, *B. pentlandii*, *B. obtusifolia*, *B. subalata*. *Revista Boliviana de Química*, *24*, 41-44.

Gonzalez, M., & Ospina, L. (2011). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* Y

Physalis peruviana en los modelos edema auricular por TPA, edema plantar por carragenina y artritis inducida por colageno. *Biosalud* , 9-18.

Goodner, K., 2008. Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. *LWT - Food Science and Technology* 41, 951-958.

Gournelis, D. C. (1995). Flavonoids of *Erica verticillata*. *Journal of Natural Products*, 58, 1065-1069.

Hakkinen, S. H., Karenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkanen, H. M., & Torronen, A. R. (1999). Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2274-2279.

Hamza, O., Carolien, J. P., Van den Bout, V., Mecky, I. N., Mainen, J., Franz, H., y otros. (2006). Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 124-132.

Harborne, J., & Williams, C. (1973). A chemotaxonomic survey of flavonoids and simple phenols in leaves of the Ericaceae. *Botanical J. Linn*, 66, 37-54.

Hatanaka, A. (1996). The fresh green odor emitted by plants. *Food Rev. Int*, 12, 303-350.

Hostettman, K., Gupta, M. P., Marston, A., & Ferreira, E. (2008). *Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos*. Bogota: Convenio Andres Bello.

Innocenti, G., Dall'Acqua, S., Scialino, G., Banfi, E., Sosa, S., Gurung, K., y otros. (2010). Chemical composition and biological properties of *Rhododendron anthopogon* essential oil. *Molecules*, 15, 2326–2338.

Jäger, S., Laszczyk, M. N., & Scheffler, A. (2008). A Preliminary Pharmacokinetic Study of Betulin, the Main Pentacyclic Triterpene from Extract of Outer Bark of Birch (*Betulae alba cortex*). *Molecules Journal* , 3224-3235.

Jimenez, M., Chilpa, R., Apan, T., Lledias, F., Hansberg, W., & Arrieta, D. (2006). Antiinflammatory activity of cacalol and cacalona sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 34-38.

Jones, N. P., Arnason, B., Abou-Zaid, M., Akpagana, K., Sanchez, P., & Smith, M. (2000). Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by First Nations Peoples of eastern Canada. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 191–198.

- Kahkonen, M., Hopia, A. I., & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4076-4082.
- Kim, S. J., Nugroho, A., Choi, J., Park, J. H., & Park, H. J. (2011). Rhododendrin an analgesic/anti-inflammatory arylbutanoid glycoside, from the leaves of *Rhododendron aureum*. *Archives of Pharmacal Research*, *34*, 971–978.
- Kindt, T., Goldsby, H., & Osborne, G. (2001). *Kuby Immunology* (5a ed.). Mc Graw Hill.
- Lhuillier, A., Fabre, N., Moyano, F., Martins, N., Claparols, C., Fourasté, I., y otros. (2007). Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, *1160*: 13-20.
- Li, J., Yuan-Yuan, L., Xiao-Jian, S., Cui-Ping, H., & Xue-Wen, L. (2010). A new dilactone from the seeds of *Gaultheria yunnanensis*. *Fitoterapia*, *81*, 35-37.
- Luteyn, J. L. (1995). *Ericaceae*. New York: Organization for Flora Neotropica : New York Botanical Garden.
- Luteyn, J., & Pedraza, P. (2007). *Neotropical blueberries, the plant family Ericaceae*. Obtenido de The New York Boanical Garden: www.nybg.org/bsci/res/lut2
- Margareth C. Gallo, M. J. (2009). Biological activities of lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, *46-62*.
- Marinez, J., Silvan, A., Abad, M., Bermejo, P., & Villar, A. (1997). Isolation of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum* as PMA – induced ear edema inhibitors. *Journal of Natural Products*, *60* (2), 142-144.
- Martinez, A. (2008). *Manual de practicas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Medellin: Universidad de Antioquia.
- Meemelink., (. (s.f.). Recuperado el 22 de Enero de 2013, de www.meemelink.com/prints%20pages/prints.ericaceae%20a-d.htm
- Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., & De Tommasi, N. (2005). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*, *92* (2), 349-355.
- Nguyen, A., Malonne, H., Duez, P., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M., & Fontaine, J. (2004). Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*. *Fitoterapia*, *75* (5), 500–504.

Ochoa, I. F. (2012). Colombia un futuro prometedor en biocomercio. *Artemisa*, 8, 56-59.

Odontuya, G., Hault, J. R., & Houghton, P. J. (2005). Structure-Activity Relationship for Antiinflammatory Effect of Luteolin and its Derived Glycosides. *PHYTOTHERAPY RESEARCH Volumen 19*, 782-786.

Oh, Y., Hartman, T., & Ho, C. (1992). Volatile compounds generated from the Maillard reaction of Pro-Gly, Gly-Pro, and a mixture of glycine and proline with glucose. *J. Agric. Food Chem*, 40, 1878-1880.

Olajide, O., Makinde, J., & Awe, W. (1999). Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 113-117.

Orhan, I., Kupeli, E., Terzioglu, S., & Yesilada, E. (2007). Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O- β -D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 114: 32-37.

Palomo, I., Torres, C., Moore-Carrasco, R., Alarcon, M., & Maragaño, P. (2009). Antiagregantes plaquetarios: mecanismos de acción y riesgos asociados al uso. *Vitae*, 16, 13-143.

Pawlowska, A., De Leo, M., & Braca, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 10234-10238.

Payá, M., Ferrándiz, M. L., Sanz, M. J., Bustos, G., Blasco, R., Rios, J. L., y otros. (1993). Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research*, 7: 159-162.

pdrs. (s.f.). www.pdrs.org.pe. Recuperado el Agosto de 2012, de http://www.pdrs.org.pe/img_upload_pdrs/36c22b17acbae902af95f805cbae1ec5/La_diversidad_biol_gica_en_Cajamarca_Cap.4_final.pdf

Prakash, C., Bing-Nan, Z., Shigie, G., Shannon, J., & Sidney, M. (2004). New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase β . *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12 (23), 6271-6275.

Quan Wanga, L., Nong Chena, S., Fai Chengb, K., Jun Lia, C., & Wei Qin, G. (2000). Diterpene glucosides from *Pieris formosa*. *Phytochemistry*, 54, 847-852.

- Radulović, N., Blagojević, P., & Palić, R. (2010). Comparative Study of the Leaf Volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. and *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae). *Molecules*, *15*, 6168-6185.
- Robbins, S., Cotran, L., & Kumar, V. (1998). *Patología estructural y funcional* (6a ed.). Mc Graw Hill.
- Robinson, F., & Martel, H. (1970). Betulinic acid from *Arbutus menziesii*. *Phytochemistry*, *9* (4), 907–909.
- Roitt, I., & Delves, P. (2001). *Essential Immunology* (10a ed.). Blackwell publishing.
- Salinas, N. R., & Betancur, J. (2005). *Las ericáceas de la vertiente pacífica de Nariño, Colombia*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt : Universidad Nacional de Colombia.
- Sanabria, A. (1983). *Análisis fitoquímico preliminar*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Schimmer, B., & Parker, K. (2001). Adrenocorticotropic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; Inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. *The pharmacological basis of therapeutics*, *10*, 1649-1673.
- Schmitz, M., & Bacher, S. (2005). Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. *Phytochemistry*, *4*, 19-25.
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., & Boudoukha, C. (2003). Antiinflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *URBAN & FISCHER. Exp Toxic Pathol*, *54*, 313-318.
- Serce, S., Ozgen, M., Alkan Torun, A., & Ercisli, S. (2010). Chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* L. (Fam. Ericaceae) (the Greek strawberry tree) fruits from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, *23*, 619-623.
- Sharapin, N., Machado, L., Souza, E., Rocha, E., Valverde, E., Lopez, J., y otros. (2000). *Fundamentos tecnológicos de productos fitoterapéuticos*. Bogota: Azucena Martinez.
- Shismay. (s.f.). *www.shismay.blogspot.com*. Recuperado el Marzo de 2013, de <http://shismay.blogspot.com/2012/06/bejaria-aestuans-ericaceae-shismay.html#/2012/06/bejaria-aestuans-ericaceae-shismay.html>

- Singh, R., & Rao, H. S. (2009). Antiinflammatory activity and effect on gastric acid secretion of azelain isolated from *Rhododendron dauricum* Linn. *Pharmacognosy Magazine*, 5, 111–114.
- Strand, V., Kimberly, R., & Isaacs, J. (2007). Biologic therapies in rheumatology: lessons learned future direction. *Nature Drug Discovery*, 6, 75-92.
- Takahashi, H., Hirata, S., Minami, H., & Fukuyama, Y. (2001). Triterpene and flavanone glycoside from *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry*, 56, 875-879.
- Talapatra, B., Patra, A., & Sunil, T. (1975). Terpenoids and alkaloids of the leaves of *Tabernaemontana coronaria*. *Phytochemistry*, 14 (7), 1652–1653.
- Tene, V., Malagon, O., Vita Finzi, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2006). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 63-81.
- Tsanova, F., Ribarova, F. y Gerova, M. (2005). (+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 691-698.
- Thomas, C., Wood, R., Wyatt, J., Pendleton, M., Torrenegra, R., Rodriguez, O., y otros. (2012). Anti-Neoplastic Activity of Two Flavone Isomers Derived from *Gnaphalium elegans* and *Achyrocline bogotensis*. *Open access journal*, 7.
- Tincani, A., Andreoli, L., Bazzani, C., Bosiso, D., & Sozzani, D. (2007). Inflammatory molecules: a target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun*, 7, 1-7.
- Torrenegra, R. G. (1985). Terpenos y Flavonoides de *Befaria glutinosa*. *Revista Latinoamericana de química*, 102-104.
- Toso, R. E., & Skliar, M. I. (2002). Aislamiento, Identificación y Cuantificación de Compuestos con Actividad Gastroprotectora presentes en *Centaurea solstitialis*. *Ciencia Veterinaria*, 17-27.
- tropicos.org, s. (s.f.). *www.tropicos.org*. Recuperado el 15 de Mayo de 2011, de *www.tropicos.org*: <http://tropicos.org/Name/42000146?tab=maps>
- Ueda, K., Herz, W., & Pachter, I. (1961). The Triterpenes of *Befaria racemosa*. *Department of chemistry, The Florida State University*, 271-272.
- Ukalina, O., & Uchenna, G. (2011). Chemical composition of essential oil of *Ixora*. *International journal of academic research*, 3, 381-384.

Urrego, O. (1988). *Contribución al estudio fitoquímico de las especies bejaria congesta, bejaria aestuans y bejaria resinosa*. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana.

Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kuth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8274-8281.

Verma, N., Singh, A. P., Amresh, G., Sahu, P., & Rao, C. V. (2010). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Rhododendron arboreum*. *Journal of Pharmacy Research*, 3, 1376–1380.

Vicenzo, D. F. (2003). Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. *Journal of Ethnopharmacology*, 85, 243–256.

Wilches, F. (1981). *Contribucion al estudio fitoquímico de Befaria glutinosa y sus posibles efectos fisiológicos*. Bogota D.C.

Wollenweber, E., Christa, M., Dunstanb, H., & Roitmanc, J. (2005). Exudate Flavonoids in Some Gnaphalieae and Inuleae (Asteraceae). *Naturforsch*, 60c, 671-678.

Xiao-Feng, N., Xia, L., & Lan Pan, L. (2011). Oleanene triterpenes from *Sedum lineare* Thunb. *Fitoterapia*, 82 (7), 960-963.

Zhang, B., LI HE, X., Ding, Y., & Du, G. (2006). Gaultherin, a natural salicylate derivative from *Gaultheria yunnanensis*: Towards a better non-steroidal anti-inflammatory drug. *European Journal of Pharmacology*, 530, 166-171.

Zhao, P., Tanaka, T., Hirabayashi, K., Zhang, Y., Yang, C., & Kouno, I. (2008). Caffeoyl arbutin and related compounds from the buds of *Vaccinium dunalianum*. *Phytochemistry*, 49: 3087-3094.