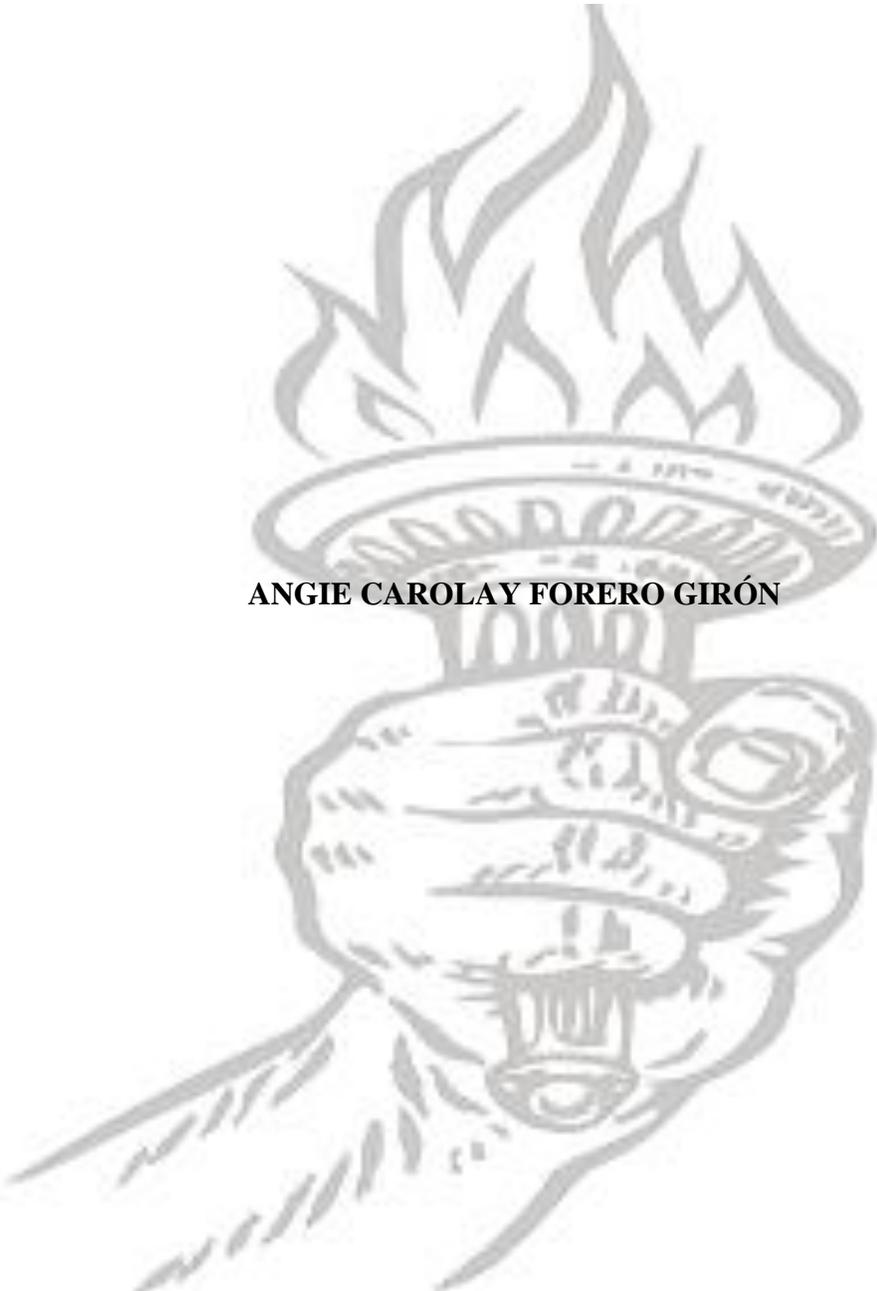


**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA, ANSIOLÍTICA Y  
ANTICONVULSIVANTE DE *Cyperus hermaphroditus* Y DE SU MECANISMO  
ANTIINFLAMATORIO**



**ANGIE CAROLAY FORERO GIRÓN**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2016**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA, ANSIOLÍTICA Y  
ANTICONVULSIVANTE DE *Cyperus hermaphroditus* Y DE SU MECANISMO  
ANTIINFLAMATORIO**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial  
para optar al título de químico

**ANGIE CAROLAY FORERO GIRÓN**

Directora:

**DRA. TANIA MILENA GUTIÉRREZ VALENCIA**

Grupo de Investigación Procesos Electroquímicos.

Departamento de Química

Universidad del Cauca

Co-Director:

**MG. VICTOR CAMPO DAZA**

Farmacología, Toxicología y Plantas medicinales

Departamento de Ciencias Fisiológicas

Universidad del Cauca

Asesor:

**DR. GERMÁN CUERVO OCHOA**

Grupo de Investigación Procesos Electroquímicos.

Departamento de Química

Universidad del Cauca

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2016**

NOTA DE ACEPTACIÓN:

---

---

---

---

---

---

---

Directores

---

Firma de jurado

---

Firma de jurado

Fecha de sustentación: 12 de mayo del 2016

### AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Le agradezco a Dios porque me ha bendecido con su profundo amor y me ha dado gracia, poder y ternura para poder cumplir este, nuestro sueño. Por darme fuerza y cariño en los momentos de angustia y sobre todo por darme felicidad y luz.

A mi madre Bellanir Girón Becerra a quien dedico este triunfo, una mujer que con mucho amor me ha sostenido en momentos de debilidad y aflicción, el amor de Dios a través de ella es insuperable. Te amo mami, hoy estoy cumpliendo nuestro sueño que un día pensamos en tu pansita.

A mi padre, hermanitas y hermanos, Jesús Antonio Forero Mosquera, Evangellyne Forero Girón, Lici Samanta Forero Girón, Jesús Antonio Forero Girón y Jonathan Forero Collazos por todo el apoyo y amor brindado durante toda mi vida, gracias por ser mi familia, mi sostenimiento, mi fuerza y mi pensamiento de madrugada para seguir día a día.

A Juan David Figueroa Alegría por su amor, paciencia, ternura y acompañamiento en toda la carrera. Eres una gran bendición de Dios, gracias por cumplir conmigo, muchos de mis logros.

A todos mis tíos, tías y primos, especialmente a Nohora Emilena Girón Becerra y Mayer Becerra por sus incomparables palabras, amor y ejemplo, que fueron vitales para perseguir este sueño. A mis abuelitos Blanca Becerra, Teresa Mosquera y Ángel Girón por darme su hermoso cariño, paciencia, amor y generosa alimentación. A la Sra. Lili Alegría por su hermosa hospitalidad, cariño y deliciosa comida.

Mi más profundo y sincero agradecimiento a los directores de este trabajo, doctores, químicos, docentes, y amigos: Tania Milena Gutiérrez Valencia y Germán Cuervo Ochoa. Muchas gracias por el gran y excelente trabajo que hacen a pesar de todas dificultades, gracias por siempre querer ser mejores, nosotros sus hijitos aprendemos esas lecciones profesionales y éticas, gracias por creer en proyectos diferentes, por hacer gratamente felices a estudiantes que quieren a pesar de todas las dificultades construir algo grande. Gracias por todo el tiempo, la paciencia, las enseñanzas y el amor que me han brindado.

A mi codirector Víctor Hugo Campo por recibirme en su oficina y sin conocerme aceptar la propuesta con gran entusiasmo, gracias por el tiempo empleado en este trabajo.

A los jurados que evaluaron este trabajo, a los doctores Juan Carlos Argoti y Fabio Cabezas por el tiempo empleado y las correcciones realizadas a este trabajo.

A mis profesores Olga Hoyos, Ricardo Benítez, Alberto Lenis, Juan Carlos Argoti, Alfonso Ramirez, Luis Alfonso Vargas, Jaime Martín, Fabio Cabezas, Johnny Gutiérrez, Claudia Martínez y a todos los del departamento que me han guiado y orientado en mi formación intelectual y personal siendo un gran modelo a seguir. Gracias por su disposición, colaboración y carisma.

## Agradecimientos

A los doctores, Fernando Cárdenas de la Universidad de los Andes, José Beltrán, Jimmy Guerrero, Jaime Martín de la Universidad del Cauca por el apoyo generoso y desinteresado al brindarme algunos de los reactivos, biomodelos, implementos, equipos o análisis necesarios en este trabajo. Gracias por la ayuda intelectual que siempre me brindaron. Al Sr. Luis Eduardo Hurtado de la Unidad de Análisis Industriales de la Universidad del Valle por todo su apoyo en las pruebas de identificación del leucotrieno.

Infinitas gracias a la Unidad de Análisis Industriales del Departamento de Química por el apoyo logístico, por el préstamo del equipo de cromatografía y demás, por el espacio y por el soporte intelectual y material a este trabajo. Muchísimas gracias al Coordinador, el Dr. German Cuervo Ochoa, quien permitió el desarrollo de este trabajo en esta Unidad.

Al Grupo de Investigación en Procesos Electroquímicos por acogerme en su grupo, orientar y permitir el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Bioterio-CIBUC por toda la ayuda y el apoyo brindado a este trabajo. Mi más sincero agradecimiento a Don Libardo por su ayuda incondicional con los biomodelos y a todos los monitores y compañeros del CIBUC-Bioterio, especialmente a Mary Bueno, Desire Rios, Felipe y Alexandra Lasso por su hermosa disposición. Muchísimas gracias al director del CIBUC-Bioterio, Dr. Jimmy Guerrero, por permitir el desarrollo los procedimientos animales en este centro de investigación.

A los tecnólogos de química, física, hidráulica, equipos e ingeniera electrónica de la Universidad del Cauca muchas gracias por siempre brindarme su ayuda incondicional en el préstamo y elaboración de reactivos y equipos químicos o conductuales; Don Oscar, Doña Melida, Sra. Yenny, Sr. Juan Pablo, Don Johany, Don Alfonso, Sr Luis, Sr Eiver, Sr. Elmer a quienes moleste por mucho tiempo.

A mis mejores amigas, Kelly Yohana Zúñiga, Diana Marcela Agredo, Sandra Marcela Muñoz, por toda una etapa llena de vida, experiencias, de esfuerzo, lágrimas y risas, gracias por ser mi compañía, mi cargo de conciencia y mi apoyo, las quiero mucho, niñas de mi corazón.

A mis amigos Yeniffer Usurriaga, Eymi Ramirez, Leidy Conú, Karen Castro, Lina Restrepo, Xime Prieto, Daniela Solarte, Lucia López, Oscar Velazco, Taylor Urbano, Daira Ipaz, Yensy Arciniegas, Omar Portilla, Hernán Astudillo, Marco Fidel, Brandon Rosero, Hamilton Martínez, Wilson Viveros, Katerin Perafan, Rafa Solano, Jeison Cortes, Sebastián Elvira, Daniel Hernández y TODOS LOS QUE ME FALTAN, por todos los momentos compartidos, mil gracias, son increíbles. A las niñas de la casa, Xiomi, Tati, muchas gracias por todo.

Y a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de este trabajo y mi formación personal e intelectual durante la carrera, para todos ustedes muchísimas gracias.

*Flor morada que nace de mis sueños, ¿qué quieres decirme?, tu resplandor es visible en las manos de mi padre, mis años pasan, pero tu esencia y atracción permanece en mí, como mi investigación hacia ti.*

**TABLA DE CONTENIDO**

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS .....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VII
RESUMEN .....	1
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>3</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
<b>3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....</b>	<b>5</b>
3.1. GÉNERO <i>Cyperus</i> .....	5
3.1.1. Género <i>Cyperus</i> .....	5
3.1.2. <i>Cyperus hermaphroditus</i> .....	7
3.2. ENFERMEDADES DEL SNC .....	9
3.2.1. Necesidad de nuevos tratamientos.....	9
3.3. INFLAMACIÓN Y EICOSANOIDES.....	10
3.3.1. Lipooxigenasas .....	11
3.3.2. Ciclooxygenasas.....	12
3.3.3. Métodos de detección para metabolitos derivados del AA .....	12
3.3.4. Modelos Experimentales de Ansiedad y Depresión .....	13
3.3.4.1. Laberinto elevado en cruz.....	14
3.3.4.2. Prueba del tablero agujereado.....	14
3.3.4.3. Nado forzado .....	14
3.3.5. Modelos para evaluar efectos anticonvulsivantes .....	15
3.3.6. Test del PTZ.....	15
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>16</b>
4.1. REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIALES .....	16
4.1.1. Reactivos.....	16
4.1.2. Equipos.....	16
4.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Cyperus hermaphroditus</i> .....	18
4.2.1. Recolección del material vegetal.....	18
4.2.2. Obtención del extracto acuoso por el método de maceración percolación.....	18
4.3. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LEUCOTRIENOS CON EL MODELO DE DISMINUCIÓN DE LTB <sub>4</sub> EN LPMN DE RATAS .....	19
4.3.1. Animales de experimentación .....	19
4.3.2. Optimización del modelo inflamatorio. ....	19
4.3.3. Evaluación del mecanismo antiinflamatorio de <i>C. hermaphroditus</i> mediado por la 5-lipooxigenasa.....	20
4.3.4. Determinación cromatográfica de la inhibición de la producción del LTB <sub>4</sub> por medio de CLAR, EM e IR:.....	21
4.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA Y ANTIDEPRESIVA DE <i>Cyperus hermaphroditus</i> MEDIANTE PRUEBAS CONDUCTUALES .....	22

## Índice de acrónimos

4.4.1. Animales de experimentación.....	22
4.4.2. Determinación de la dosis de extracto acuoso de <i>Cyperus hermaphroditus</i> a utilizar en las pruebas conductuales.....	23
4.4.3. Diseño de experimentación conductual de comparación.....	24
4.4.4. Modelos experimentales de ansiedad y depresión.....	24
4.4.4.1. Determinación de la actividad ansiolítica mediante el modelo del laberinto en cruz.....	24
4.4.4.2. Determinación de la actividad ansiolítica a partir de la prueba de tablero agujereado.....	25
4.4.4.3. Determinación de la actividad antidepresiva mediante el modelo de nado forzado.....	26
4.5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIVANTE DE <i>Cyperus hermaphroditus</i> MEDIANTE EL TEST PTZ.....	27
4.5.1. Animales de experimentación.....	27
4.5.2. Determinación de la actividad anticonvulsivante por el Test del PTZ a 85 mg/kg.....	27
4.5.3. Determinación de la dosis de PTZ administrada a los roedores evitando mortalidad.....	28
4.5.4. Determinación de la actividad anticonvulsivante de <i>Cyperus hermaphroditus</i> utilizando el test del PTZ a 55 mg/kg.....	28
<b>5. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....</b>	<b>29</b>
5.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Cyperus hermaphroditus</i> .....	29
5.2. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LEUCOTRIENOS MEDIANTE EL MODELO DE DISMINUCIÓN DE LTB <sub>4</sub> EN LPMN DE RATAS .....	29
5.2.1. Resultados cromatográficos de CLAR de los diferentes tratamientos.....	31
5.2.2. Identificación de la fracción cromatográfica a 5,388 ± 0,16 minutos por espectrometría de masas. 38	
5.3. PRUEBAS CONDUCTUALES COMO MODELOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA Y ANTIDEPRESIVA DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Cyperus hermaphroditus</i> .....	42
5.3.1. Determinación de la dosis de extracto a utilizar.....	42
5.3.2. Pruebas conductuales.....	43
5.3.2.1. Determinación de la actividad ansiolítica mediante el laberinto elevado en cruz y el tablero agujereado.....	44
5.3.2.2. Determinación de la actividad antidepresiva mediante la prueba de nado forzado.....	47
5.3.3. Test del PTZ.....	48
5.3.3.1. Determinación de la actividad anticonvulsivante mediante el test PTZ (85 mg/kg).....	48
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>54</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

5-COX	5-Ciclooxigenasa
5-HETE	5-Hidroperoxieicosatetraenoico
5-LOX	5-Lipooxigenasa
AA	Ácido Araquidónico
AGPI	Ácidos Grasos Poli-Insaturados
ANOVA	Análisis de varianza
AINES	Anti-inflamatorios no Esteroides
CAUP	Herbario Universidad del Cauca
CCK	Colecistoquinina
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
EM	Espectroscopia de masas
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
HT	Receptores de serotonina
I.P.	Intraperitoneal
IR	Espectrofotometría infrarroja
LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
LTA <sub>4</sub>	Ácido 5(S)- trans-óxido-7,9-trans-11,14-cis-eicosatetraenoico
LTB <sub>4</sub>	(5S,6Z,8E,10E,12R,14Z)-5,12-dihidroxi-6,8,10,14- ácido eicosatetraenoico
LTC <sub>4</sub>	Ácido 5(S)-hidroxi-6(S)-glutathionil-7,9-trans-11-14-cis-eicosatetraenoico
LTD <sub>4</sub>	Ácido 5(S)-hidroxi6(R)-S-Cisteinil-glicil-7,9-trans-11,14-cis-eicosatetraenoico
LTE <sub>4</sub>	Ácido 5(S)-hidroxi6(R)-S-Cisteinil-7,9-trans-11-cis-eicosapolienoico
LTs	Leucotrienos
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Solución buffer de fosfato
PBS1	Solución buffer de fosfato 1
PBS2	Solución buffer de fosfato 2
PG	Prostaglandinas
PMN	Neutrófilos
PTZ	Pentilentetrazol
RIA	Radioinmunoensayo
TX	Tromboxanos
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Factores y niveles estudiados para la optimización del método antiinflamatorio. ....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 2. Condiciones utilizadas en el análisis de EM. ....</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 3. Análisis de Varianza para el Área LTB<sub>4</sub>.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 4. Condiciones óptimas de extracción de LTB<sub>4</sub> para el diseño factorial 2<sup>5</sup>.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 5. Área, desviación estándar y % de disminución del pico cromatográfico a 5,388 ± 0,160 minutos en muestra control y el tratamiento con extracto acuoso de Cyperus hermaphroditus. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 6. Área, desviación estándar y % de disminución del pico cromatográfico a 5,388 ± 0,160 minutos en muestra control y el tratamiento positivo, ketoprofeno. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 7. Area cromatográfica a 5,5 min para diferentes dosis de ketoprofeno. ....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 8. Principales terpenoides aislados de diferentes especies Cyperus. ....</i>	<i>65</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Cyperus hermaphroditus</i> en floración .....	7
<b>Figura 2.</b> Principales vías metabólicas del ácido araquidónico inducidas por la acción de las ciclooxigenasas y lipooxigenasas .....	10
<b>Figura 3.</b> Enzimas y eicosanoides implicados en el proceso de inflamación mediante la vía de las lipooxigenasas .....	11
<b>Figura 4.</b> a). Espécimen b) Raíces de <i>C. hermaphroditus</i> c) Extracto acuoso de <i>C. hermaphroditus</i> .....	18
<b>Figura 5.</b> a) Administración i.p de PBSI después del sacrificio del biomodelo. b) Peritoneo abierto para realizar el segundo lavado c) Lavado peritoneal recogido .....	20
<b>Figura 6.</b> a) Cajas de policarbonato para alojamiento de biomodelos, cada caja incluye un tetero, una almacena de alimentos y aserrín, biomodelos en el laboratorio de experimentación conductual. b) Alimento de los biomodelos. c) Biomodelos en la sala de ratones.....	23
<b>Figura 7.</b> Dimensiones y descripción del laberinto elevado en cruz. a) Vista superior, b) Vista lateral superior.....	25
<b>Figura 8.</b> Dimensiones del tablero de agujeros. a) Vista superior, b) Vista lateral superior.....	26
<b>Figura 9.</b> a) Dimensiones del cilindro de nado forzado b) Ratones secados con toallas .....	27
<b>Figura 10.</b> Diagrama de Pareto estandarizada para el área del LTB <sub>4</sub> .....	30
<b>Figura 11.</b> Superficie de respuesta estimada .....	30
<b>Figura 12.</b> Cromatograma del blanco de reactivos que contiene buffer, ionóforo de calcio y cloruro de calcio. Protocolo sección 4.3 de la metodología. ....	32
<b>Figura 13.</b> Cromatograma del blanco de reactivos y extracto acuoso de la planta. Protocolo de la sección 4.3 de la metodología. Reactivos: buffer, ionóforo de calcio y cloruro de calcio .....	32
<b>Figura 14.</b> Cromatograma del blanco positivo, que contiene reactivos y ketoprofeno a 0,025 mg/mL. Protocolo de la sección 4.3 de la metodología. ....	33
<b>Figura 15.</b> Cromatograma de la muestra control, contiene los reactivos del blanco y el lavado peritoneal de rata. Protocolo de la sección 4.3 de la metodología. ....	34
<b>Figura 16.</b> Cromatograma de la muestra control positivo, contiene los reactivos del blanco, el lavado peritoneal de rata y ketoprofeno a 0,0025 mg/mL.....	34
<b>Figura 17.</b> Cromatograma de la muestra con extracto acuoso de <i>C. hermaphroditus</i> , contiene los reactivos del blanco y el lavado peritoneal de rata. Protocolo 4.3 de la metodología. ....	35
<b>Figura 18.</b> Comparación del cromatograma control negativo y el cromatograma de la muestra con extracto acuoso de <i>C. hermaphroditus</i> .....	35
<b>Figura 19.</b> Esquema general de las condiciones de extracción del LTB <sub>4</sub> .....	36
<b>Figura 20.</b> Fragmentograma EM del pico cromatográfico a 5,388 ± 0,16 minutos obtenido por CLAR.....	39
<b>Figura 21.</b> Rearreglo de McLafferty para ácidos carboxílicos. ....	40
<b>Figura 22.</b> Escisiones de ácidos carboxílicos alifáticos .....	40
<b>Figura 23.</b> Ester del LTB <sub>4</sub> y su fragmentación. ....	41
<b>Figura 24.</b> Efecto del extracto de <i>Cyperus hermaphroditus</i> a distintas dosis sobre el número de empinamientos y cruces del círculo central. ( $p \leq 0,05$ ) entre todos los grupos excepto en la dosis de 5 mg/kg con la de 0 mg/kg. ..	42
<b>Figura 25.</b> Efecto del extracto de <i>Cyperus hermaphroditus</i> a distintas dosis sobre el tiempo neto en el círculo central. ( $p \leq 0,05$ ) solo para la dosis de 2,5 mg/kg y control negativo .....	42
<b>Figura 26.</b> Fotografías de un biomodelo inyectado i.p. con una dosis alta del extracto acuoso de <i>Cyperus hermaphroditus</i> . El biomodelo está situado en el equipo de la prueba de campo abierto .....	43
<b>Figura 27.</b> Fotografías tomadas de las sesiones experimentales de conducta exploratoria. a) Laberinto en cruz b) Tablero con agujeros c) nado forzado. ....	44
<b>Figura 28.</b> % de permanencia registrada para los tres tratamientos realizados en la prueba del laberinto en cruz elevado. ....	44
<b>Figura 29.</b> Efecto de los tres tratamientos: cloruro de sodio, extracto acuoso de <i>Cyperus hermaphroditus</i> y diazepam sobre el número total de entradas a las ramas abiertas. ( $p \leq 0,05$ ) para control positivo y control negativo. ....	45

<b>Figura 30.</b> Efecto de los tres tratamientos: cloruro de sodio, extracto acuoso de <i>Cyperus hermaphroditus</i> y diazepam sobre el número de exploraciones subterráneas en la prueba del tablero abierto con agujeros. (( $p \leq 0,05$ ) para control positivo y control negativo. ....	45
<b>Figura 31.</b> Efecto de los tres tratamientos cloruro de sodio, extracto acuoso de <i>Cyperus hermaphroditus</i> y diazepam, sobre el tiempo de exploraciones subterráneas realizadas por los ratones en la prueba del tablero agujereado. (( $p \leq 0,05$ ) para control positivo y control negativo. ....	46
<b>Figura 32.</b> Efecto de los tres tratamientos: cloruro de sodio, extracto acuoso de <i>C. hermaphroditus</i> y diazepam sobre el número total de entrada a ambas ramas del laberinto elevado en cruz. (( $p \leq 0,05$ ) para todos los grupos .....	46
<b>Figura 33.</b> Efecto de los tres tratamientos cloruro de sodio, extracto acuoso de <i>C. hermaphroditus</i> y diazepam, sobre el número de cruces de cuadrados realizadas por los ratones en la prueba del tablero agujereado. (( $p \leq 0,05$ ) para control positivo y control negativo. ....	47
<b>Figura 34.</b> Efecto de los tres tratamientos cloruro de sodio, extracto acuoso de <i>Cyperus hermaphroditus</i> y diazepam, sobre la inmovilidad en la prueba de nado forzado. (( $p \leq 0,05$ ) entre todos los grupos. ....	48
<b>Figura 35.</b> Determinación de la actividad anticonvulsivante medida como porcentaje de mortalidad. (( $p \leq 0,05$ ) entre todos los grupos. ....	49
<b>Figura 36.</b> Porcentaje de mortalidad a diferentes dosis de PTZ .....	49

## ÍNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Protocolo para la extracción del LTB<sub>4</sub>.....</i>	<i>58</i>
<i>Anexo 2. Datos del compuesto a tiempo de 9,917 minutos en EM de la fracción aislada por CLAR a 5,3 min. ...</i>	<i>60</i>
<i>Anexo 3. Optimización de la dosis de ketoprofeno, mediante la eliminación de la sustancia interferente a 5,5 min .....</i>	<i>61</i>
<i>Anexo 4. Aval ético aprobado por el comité de ética de la Universidad del Cauca. ....</i>	<i>62</i>
<i>Anexo 5. Participación en eventos .....</i>	<i>63</i>
<i>Anexo 6. Compuestos aislados del genero Cyperus .....</i>	<i>65</i>

## RESUMEN

*Cyperus* es un género de plantas herbáceas pertenecientes a la familia **Cyperaceae**, actualmente son consideradas malezas invasoras sin un aprovechamiento completo de su potencial farmacéutico o químico. Algunas investigaciones demuestran que la especie *Cyperus rotundus*, considerada la maleza más perniciosa del planeta, presenta gran actividad antiinflamatoria [1], antioxidante [2], anticonvulsivante, analgésica, diurética, ansiolítica [3], antidepresiva [4], entre otros efectos, evidencia que puede convertir a las plantas del género *Cyperus* en una alternativa para tratar diferentes enfermedades. Actualmente, *Cyperus pilosus* Vahl, *Cyperoides*, *alopecuroides*, *conglomeratus*, *scarosius*, *capitatus*, *articulatus*, *esculentus*, entre otras, presentan estudios de actividades antiinflamatorias, anticonvulsivantes, ansiolíticos o antidepresivos [5-8].

La especie *Cyperus hermaphroditus* ha sido utilizada desde tiempo atrás por diferentes etnias para tratar convulsiones, inflamación, ansiedad y depresión. Giraldo y Gutiérrez, 2001 demostraron que el extracto acuoso del sistema radical de *Cyperus hermaphroditus* posee una actividad analgésica central no opioide, posiblemente mediada por la inhibición de ciclooxygenasas ó lipooxygenasas [9].

En este trabajo, se estudió el mecanismo de acción antiinflamatorio del extracto acuoso de las raíces de *Cyperus hermaphroditus*, mediante la optimización del modelo de la disminución de los niveles de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) producido por leucocitos polimorfonucleares (LPMN) de rata. La producción de este eicosanoide se origina a partir de la estimulación con ionóforo de calcio A23187 de los LPMN obtenidos del lavado peritoneal de rata. Los niveles de LTB<sub>4</sub> son comparados con los obtenidos al exponer a los LPMN a una dosis del extracto acuoso de la planta y los presentados por la acción antiinflamatoria del fármaco no esteroideo ketoprofeno.

El LTB<sub>4</sub> fue monitoreado por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y la fracción correspondiente al pico cromatográfico del LTB<sub>4</sub> fue aislado y liofilizado. Posteriormente el sólido fue sometido al análisis por espectrometría de masas.

Los ensayos antiinflamatorios del extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* realizados en los LPMN de rata, indican que hay una disminución del 97,2 % del pico cromatográfico correspondiente al LTB<sub>4</sub>.

A partir de una curva dosis respuesta, se determinó la dosis óptima del extracto de la planta para ser utilizada en las pruebas conductuales. La dosis de la planta que aumentó la conducta exploratoria de los ratones, fue 2,5 mg/kg de extracto acuoso de la planta por peso del animal. Con la dosis fijada del extracto, se evaluó el efecto ansiolítico a través de las pruebas conductuales de laberinto en cruz y tablero agujereado y el efecto antidepresivo se estudió mediante las pruebas de nado forzado. Los resultados indicaron, que en las condiciones experimentales utilizadas el extracto

acuoso de la planta no evidenció actividad ansiolítica, ni actividad motora, sin embargo, si presentó acción antidepresiva.

La actividad anticonvulsivante fue evaluada en ratones sometidos al test del PTZ, las pruebas realizadas a 85 mg/kg de PTZ por peso del animal y a 2,5 mg/kg de extracto acuoso de la planta, mostraron un efecto protector ante la mortalidad inducida por el agente convulsivante en los ratones no tratados con el extracto. Por otro lado, se registró que a 55 mg/kg de PTZ no hay mortalidad de roedores, sin embargo, los efectos de la planta sobre el número de convulsiones a esta dosis de PTZ no fueron concluyentes.

**PALABRAS CLAVES:** Leucotrienos, cromatografía líquida, modelos conductuales, *Cyperus*, pentilentetrazol.

### 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde tiempo atrás, las especies del género *Cyperus* han contribuido a la medicina, textilera, indumentaria, química y manutención de muchas culturas del planeta, esto plantea un mismo problema, las especies *Cyperus* aunque son consideradas malezas invasoras, presentan grandes propiedades que deben ser aprovechadas en todas las áreas.

En los países en vías de desarrollo, se consume menos del 15 % del mercado total de medicamentos, por ello las plantas representan un importante recurso terapéutico para sectores desfavorecidos, por lo que las autoridades de salud han incrementado su interés en estas nuevas alternativas [10]. *Cyperus hermaphroditus* es una planta poco estudiada, sin embargo, un estudio farmacológico publicó que el extracto acuoso radicular presentó actividad antiinflamatoria y se sugiere un mecanismo diferente a los opiáceos mediado posiblemente por las ciclooxigenasas o lipooxigenasas [9].

La mayoría de los fármacos utilizados para tratar las enfermedades inflamatorias como los no esteroideos tienen un mecanismo de acción en el cual inhiben solamente la vía de las ciclooxigenasas y no inhiben la vía de las lipooxigenasas la cual puede ocasionar la formación de leucotrienos como el B<sub>4</sub>, que está asociada a la producción de efectos adversos importantes, principalmente en pacientes asmáticos [11-13]. Por lo anterior, la presente investigación busca indagar acerca del efecto del extracto acuoso de *C. hermaphroditus* al inhibir estas enzimas, específicamente la 5-lipooxigenasa considerando que los principios activos que bloquean tanto la ciclooxigenasa como la lipooxigenasa presentan un mejor perfil de seguridad y efectividad terapéutica. En la actualidad existe un renovado interés en las alternativas antiinflamatorias en la que su efecto analgésico este mediado por la inhibición de la producción de prostaglandinas y leucotrienos.

En Colombia, los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), señalan que los trastornos de ansiedad son de alta prevalencia a nivel nacional, afectando al 19,3% de la población [14]. De la misma manera, la depresión es uno de los trastornos más importantes que afectan la salud mental del país.

Por todo lo anterior, en este trabajo se pretende continuar con el estudio del posible mecanismo de acción antiinflamatorio del extracto acuoso de *C. hermaphroditus* tomando como modelo la disminución de los niveles de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) producido por leucocitos polimorfonucleares (LPMN) de ratas. El interés científico de esta especie no solo radica en el mecanismo de su actividad antiinflamatoria, si no también, en otras propiedades como la anticonvulsivante, ansiolítica y antidepresiva que serán estudiadas mediante un modelo animal, utilizando la prueba del pentilentetrazol (PTZ) y las pruebas exploratorias del tablero agujereado, laberinto en cruz y nado forzado.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad anticonvulsivante, ansiolítica, antidepresiva y el mecanismo antiinflamatorio del extracto acuoso de *C. hermaphroditus*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Elucidar el mecanismo de acción antiinflamatorio de *C. hermaphroditus* por medio del modelo de la disminución de leucotrieno B<sub>4</sub> indicando la acción en la 5-lipooxigenasa.

2.2.2. Evaluar y relacionar la acción ansiolítica y el efecto sobre la actividad motora de un extracto acuoso de *C. hermaphroditus* administrado en ratones.

2.2.3. Comprobar mediante un modelo animal la actividad anticonvulsivante y antidepresiva de *C. hermaphroditus* utilizada como medicina popular.

## 3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Desde la prehistoria hasta nuestros días todas las culturas del planeta han utilizado las plantas para usos medicinales; las bondades de la diversidad etnobotánica se ha manifestado gracias a los conocimientos farmacéuticos ancestrales que se demostraron desde los laboratorios científicos. El uso de plantas medicinales como alternativas terapéuticas inició con la elaboración de infusiones o decocciones de partes aéreas o radicales de la planta, actualmente se aíslan los principios activos, se determina su composición y se comercializa el medicamento farmacéutico [15].

La OMS ha mencionado que los países en vías de desarrollo utilizan en un 80 % la medicina tradicional. Colombia es uno de los países con mayor diversidad vegetal, se reportan cerca de 50.000 especies de flora, de las cuales cerca de 6.000 poseen características medicinales, pero sólo 127 especies son aceptadas en Colombia. De las 127 especies medicinales aceptadas y registradas por la Sala Especializada de Productos Naturales del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA, un total de 38 especies son nativas [16]. Lo anterior, demuestra la falta de explotación científica de la diversidad colombiana y su aplicabilidad en diferentes tratamientos. A continuación, se describen algunos de los estudios realizados con el género *Cyperus*.

### 3.1. Género *Cyperus*

#### 3.1.1. Género *Cyperus*

El género *Cyperus* pertenece al grupo de plantas ciperáceas cosmopolitas y en algunos casos monopolizadoras de muchos ambientes (malezas invasoras); tiene más de 700 especies aceptadas por el Real Jardín Botánico de Kew, de más de 2.500 descritas en la literatura y distribuidas en todos los tipos de vegetación [3].

Debido a su amplia variedad, *Cyperus* es utilizado desde la prehistoria como material para indumentaria, construcción, perfumería, forrajera, alimentación y farmacología [18-21]. Sus usos farmacológicos datan del código de Florentino, en la época prehispana, donde el dios Nappatechuhtli llevaba en su mano una rama de *Cyperus* sp. a la cual le atribuía diferentes usos medicinales; de la misma manera, se encuentra bibliografía paleobotánica, códigos y manuscritos del siglo XVI que confirman actividades biológicas [22].

En la medicina tradicional este género ha sido empleado por muchas culturas étnicas del planeta incluyendo a la africana, egipcia, china, tailandesa, hindú, japonesa, meso y suramericana en usos tales como repelente, insecticida, ansiolítico, antidepresivo, molusquicida, antimicrobiano, antimalárico, antitrombótico, analgésico central, antiepiléptico, antiinflamatorio y antipirético.

En la actualidad, los sharanahua en el Amazonas pulverizan sus raíces para mezclarla con vino, las mujeres kofàn, sionas y secollan cocinan las raíces y el té es bebido para

### 3. Marco teórico

controlar y regular los problemas menstruales, los hombres tukano por su parte, la beben como un fuerte contraceptivo [23], [24].

En la literatura se encuentra más de 370.000 artículos reportados para este género, la especie más destacada lo constituye *Cyperus rotundus*, considerada la maleza más perniciosa del planeta, pero con actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticonvulsivante, analgésica, antidiurética, antidiarreica, antidepresiva, antipirética, antiemética, antimalárica, antibacterial, antimutagénica, antiradial, ansiolítica, entre otras muchas propiedades demostradas que se han evaluado principalmente en el sistema radicular de la planta [2,3,5]. Por ejemplo, las ciperonas, compuestos extraídas de sus raíces, inhiben la síntesis de las prostaglandinas, mediadores de la inflamación [25].

Al igual que *C. rotundus* muchas especies de su género consideradas malezas invasoras, tienen grandes propiedades, entre la más estudiadas se destacan la actividad antiinflamatoria, ansiolítica, antidepresiva y anticonvulsivante [5].

*C. cyperoides* es utilizada en Indonesia para el tratamiento de problemas intestinales e inflamatorios, dado que se conoce su contenido en tricina, luteolina, y ciperquinona [26]. La especie *C. pilosus Vahl* es usada en tratamientos de prurito, ictericia, malaria, dolor de cabeza, reumatismo, epilepsia, infección urogenital, hipo, cáncer y problemas urinarios [27]. Sus propiedades antiinflamatorias fueron confirmadas gracias a la tricina aislada de la planta la cual inhibe la actividad enzimática de la ciclooxigenasa 1 y 2 [28]. El aceite esencial de *C. esculentus* fue capaz de bloquear la fase neurogénica y la fase tardía producida por formalina, explicando posiblemente un efecto potencial como inhibidor de ciclooxigenasas y lipooxigenasas, el aceite demostró además gran actividad anticonvulsivante contra la generalizada crisis tónico clónica [5], [6].

El aceite esencial de *Cyperus scariosus* mostró actividad antiinflamatoria debido a su contenido en cyperene, en otro estudio, el extracto metanólico de los rizomas reveló compuestos anti-inflamatorios, mostró tres compuestos que interactuaban como receptores anti-inflamatorios de la COX-2 [7], [29], [30]. De la misma manera, la actividad antiinflamatoria de *C. tegetum* fue demostrada al reducir significativamente la inflamación en el edema de pata inducida [31]. Así mismo, las especies *Cyperus alopecuroides*, *kyllinga*, *conglomeratus*, *tenuis*, *prolificus*, *capitatus*, *articulatus*, *corymbosus*, *papyrus*, *adoratus*, *luzulae*, *involucratus*, entre otras, también presentan estudios de actividades antiinflamatorios, anticonvulsivantes, ansiolíticos o antidepresivos.

A continuación, se describe la especie silvestre *Cyperus hermaphroditus* y los estudios reportados en la literatura especializada referente a la actividad antiinflamatoria resaltando la importancia de la investigación en especies nuevas como gran potencial farmacéutico.

#### 3.1.2. *Cyperus hermaphroditus*

La especie *Cyperus hermaphroditus* perteneciente al complejo *Cyperus reflexus* es conocida comúnmente como: tule, juncia, coquillo rojo, pimentillo, caltolí, carrizo, nacacetoli, tollín, hugra, chonda, zacate de tres filos, piomía, paragüey, hierba, jacinto zacate, zacate jacintillo y zacate de caballo en las diferentes etnias [9].

*C. hermaphroditus* presenta una altura entre los 8 a 80 cm, tallo triangular y liso originado desde el rizoma y con base bulbosa-engrosado, sus rizomas tienen una longitud de 0,5 a 30 cm de longitud y un grueso de 1 a 5 mm, las hojas de 6 a 70 cm de longitud, y 1,3 a 12 mm de ancho, son ásperas sobre los márgenes y la costilla dorsal, vainas fibrosas de color café verdoso, brácteas desiguales de longitud de 2 a 48 cm y de 2 a 9 mm de ancho. Las espigas cilíndricas se encuentran solitarias o en grupos de 3 en cada pendúlo, contiene 15 a 60 espiguillas, en general tetragonales y dísticas; pendúnculos de 20 cm de largo, simples o ramificados, cada espiguilla contiene hasta 9 flores, raquilla café, con las hialinas de 1.2 a 1,5 mm de longitud. Esta especie se encuentra generalmente en lugares perturbados a orillas de caminos y cultivos [32].



Figura 1. *Cyperus hermaphroditus* en floración<sup>1</sup>

Entre los usos populares de *C. hermaphroditus* se encuentra el tratamiento de los cólicos, síncope, diabetes, convulsiones, enfermedades urinarias, cardíacas e inflamatorias [9], [33], [34]. También, es empleada en usos forrajeros (ganado bovino, caprino, equino y ovino) y como muchas especies de su género, se ha registrado que afecta los cultivos de arroz, café, frutas y maíz [22].

El sistema radical de *Cyperus* ha sido estudiado en los últimos años como superficie de biosorción de sustancias contaminantes como fenantrenos o metales pesados, su potencial eliminación de estos compuestos ha generado gran interés científico [35].

<sup>1</sup> Plantas del Mundo Fotorevista, "*Cyperus hermaphroditus*," *Cyperus*. Guatemala, 2008. [Online]. Available: <http://worldplantsfotorevista.com/Espanol/cyperushermaphroditus.html>

### 3. Marco teórico

En la literatura se encuentran pocos estudios fitoquímicos, farmacológicos y tóxicos. El único estudio referenciado relativo a la actividad farmacológica fue realizado por Giraldo y Gutierrez 2001, en este se demostró, que el extracto acuoso de las raíces posee actividad antiinflamatoria y analgésica central no opioide, similar a la reportada para *C. articulatus*, además posee una actividad analgésica periférica importante, posiblemente mediada por la inhibición de ciclooxigenasas ó lipooxigenasas y directamente relacionada con su efecto antiinflamatorio. En la investigación se realizó un análisis fitoquímico a la raíz de la planta, indicando la presencia de esteroides no identificados, alcaloides, derivados de cumarina, esteroides y triterpenos, taninos y flavonoides lo que suponen la presencia de un amplio grupo de metabolitos como posibles responsables de la acción farmacológica [9].

La actividad analgésica-antiinflamatoria se evaluó mediante varias pruebas. La prueba de la contracción abdominal realizada a diferentes dosis (125, 250, 500, 1000, 2000 mg/kg) mostró disminución significativa respecto al control y una acción aparentemente dependiente de la dosis aplicada. El porcentaje de inhibición del número de contracciones presentado por la planta fue igual a 77,4% a 97,6% comparado con la respuesta analgésica del diclofenaco sódico y la morfina clorhidrato con un 99,6 y 100 % de inhibición. En el mismo sentido, el método de la placa caliente, de la retirada de la cola, y la presión en la pata mostraron acción analgésica. La actividad antiinflamatoria se demostró a partir del método de edema auricular por aplicación tópica de ácido araquidónico y el método del edema en pata de rata por carragenina, en los cuales se encontró una gran disminución de la inflamación respecto al control y comparable a la dosis de 75 mg/kg de diclofenaco sódico.

En este estudio se encontró que la toxicidad  $DL_{50}$  del extracto acuoso fue superior a 4000 mg/kg para ratones y a dosis altas los animales presentaron un comportamiento pasivo, somnolencia y movimientos estereotipados que indicaron leve acción depresora del SNC, así mismo se registró que las heces fueron escasas y blandas lo cual sugirió alguna acción secundaria de tipo colinérgico sobre el tracto digestivo [9].

Por lo anterior, se permitió suponer un radio de acción analgésico-antiinflamatorio relacionado a ciclooxigenasas y lipooxigenasas, con ventajas respecto a los fármacos AINES, los cuales producen efectos adversos como los antiagregación plaquetaria, agresión gastrointestinal y formación de úlceras gástricas con posibilidad de sangrado.

La acción sedante sobre el SNC en la prueba de toxicidad aguda sugiere efectos similares a los mostrados por otras plantas del mismo género, y con posibles efectos antiepilépticos mediados por el GABA.

Toda la investigación científica realizada verifica el gran potencial que tiene el género *Cyperus* y la especie *C. hermaphroditus* como tratamiento alternativo de enfermedades inflamatorias mediadas por ciclooxigenasas y lipooxigenasas. Además, sugiere efectos sedantes y antiepilépticos dado su implicación en el SNC. A

continuación, se describen dos enfermedades del SNC, que son consideradas un gran problema de salud mental en la actualidad y dados los datos de la OMS es un reto disminuir su impacto futuro.

#### 3.2. Enfermedades del SNC

Dentro de las patologías que más afectan el SNC la ansiedad y la depresión son las más tratadas en la actualidad. La ansiedad es un estado mental que puede ser considerado como una emoción o un trastorno psiquiátrico. En condiciones normales, la ansiedad es un impulso motivador para realizar funciones de un individuo, no obstante, se vuelve patológica cuando el estado se prioriza, constituye un sentimiento de amenaza psicosomática y ocasiona problemas en el comportamiento psicosocial, fisiológico, bioquímico, vivencial, conductual y cognitivo de la persona. Por otra parte, la depresión es considerada un trastorno patológico heterogéneo del estado del ánimo que se manifiesta mediante un cuadro clínico complejo, caracterizado por la angustia, tristeza, inhibición psicomotora y de la función cognitiva, como síntomas predominantes [36].

La OMS ha pronosticado que la depresión será la segunda causa de muerte prematura o incapacidad laborar para el año 2020 en todo el mundo, al igual los índices mostrados para la ansiedad son desalentadores [37], [38]. Actualmente los tratamientos implican, medicamentos que tienen en sus estructuras principios químicos activos y/o definidos con propiedades reguladores del sistema nervioso central, un ejemplo son las diazepinas ampliamente utilizadas en la salud debido a su gran potencial psicoterapéutico, pero con limitaciones en su eficacia [39].

##### 3.2.1. Necesidad de nuevos tratamientos

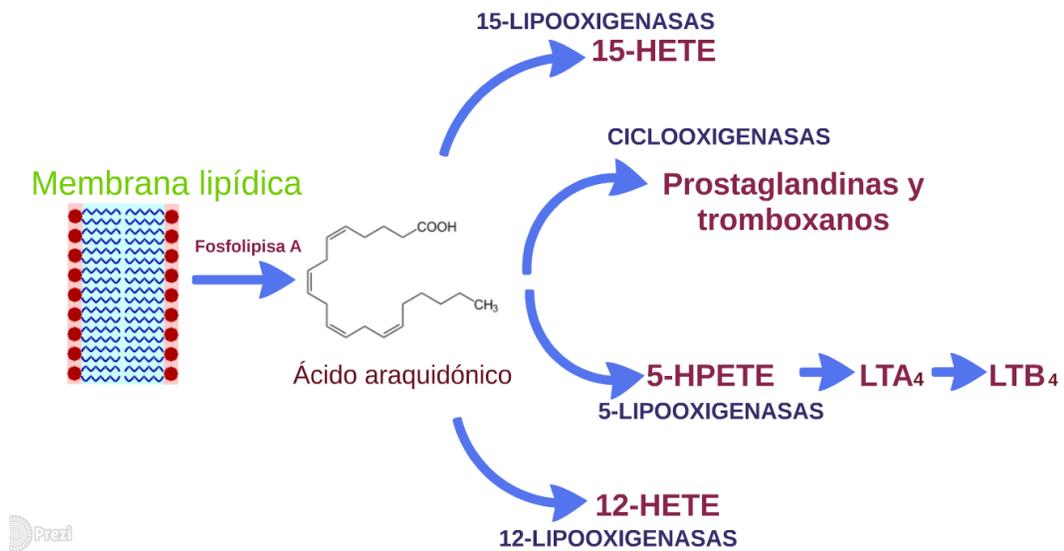
A pesar de todas las investigaciones farmacológicas, la mayoría de los medicamentos actuales para tratar la ansiedad y la depresión son poco versátiles, por un lado, un tercio de los pacientes son intolerantes o refractarios a los tratamientos disponibles, por otro, el costo elevado los hace inasequibles y en algunos casos con limitaciones en su eficacia [40]. Es así, que se busca trabajar con alternativas eficientes, tolerables y de bajo costo para ser usadas en países en vías de desarrollo donde las posibilidades de tratar estos trastornos sean altas. En la actualidad, se conoce el gran potencial de las plantas medicinales, los estudios fitoquímicos y clínicos demuestran que extractos de plantas contienen compuestos activos con potencial psicoterapéutico [41]. Por lo tanto, las enfermedades psiquiátricas están siendo tratadas con un número creciente de plantas medicinales, cada planta, con propiedades demostradas en su mayoría mediante un primer tamiz, modelos conductuales en animales [42]. Al igual que la ansiedad y la depresión como enfermedades del SNC, la inflamación es una de los síntomas más comunes en la mayoría de enfermedades vasculares, lo que implica una necesidad de nuevos tratamientos con mayor posibilidades y accesibilidad.

### 3.3. Inflamación y Eicosanoides

La inflamación es una respuesta bioquímica inespecífica causada por el daño físico, químico o biológico sobre el tejido mesenquimal vascularizado, que desencadena sucesivamente fenómenos vasculares, humorales, exudativos, celulares, reparativos y proliferativos. En la fase I, II y III de la inflamación se produce la inducción patogénica, incremento de permeabilidad y el edema tisular, en la fase IV gran variedad de leucocitos migra por las vénulas poscapilares y rodean el tejido dañado, el comportamiento y la composición de las células es dependiente de los mediadores de la inflamación [43].

Los PMN fagocitan bacterias y hongos, los monocitos y células T y B producen moléculas protectoras y analgésica desarrollándose una quimiotaxis inflamatoria ante los agentes infecciosos, isquemias, interacciones antígeno-anticuerpo, lesiones inducidas, entre otros [44]. En estos procesos interviene los eicosanoides, que son lípidos insaturados derivados de los ácidos grasos poliinsaturados de veinte átomos de carbono como son las prostaglandinas, los leucotrienos, lipoxinas, y ácidos hidroxieicosanoicos.

Estos eicosanoides son producidos por el ácido araquidónico, el cual es liberado de los fosfolípidos de membrana por la acción de la fosfolipasa 2 activada por diferentes estímulos, el ácido araquidónico es entonces metabolizado por dos vías, la primera la vía de la ciclooxigenasa la cual produce ciclooxigenasas y tromboxanos, la segunda, la vía de la lipooxigenasa que origina leucotrienos, lipoxinas y ácidos hidroxieicosanoicos [45]. La muestra las diferentes rutas metabólicas del ácido araquidónico a partir de las ciclooxigenasas y lipooxigenasas.

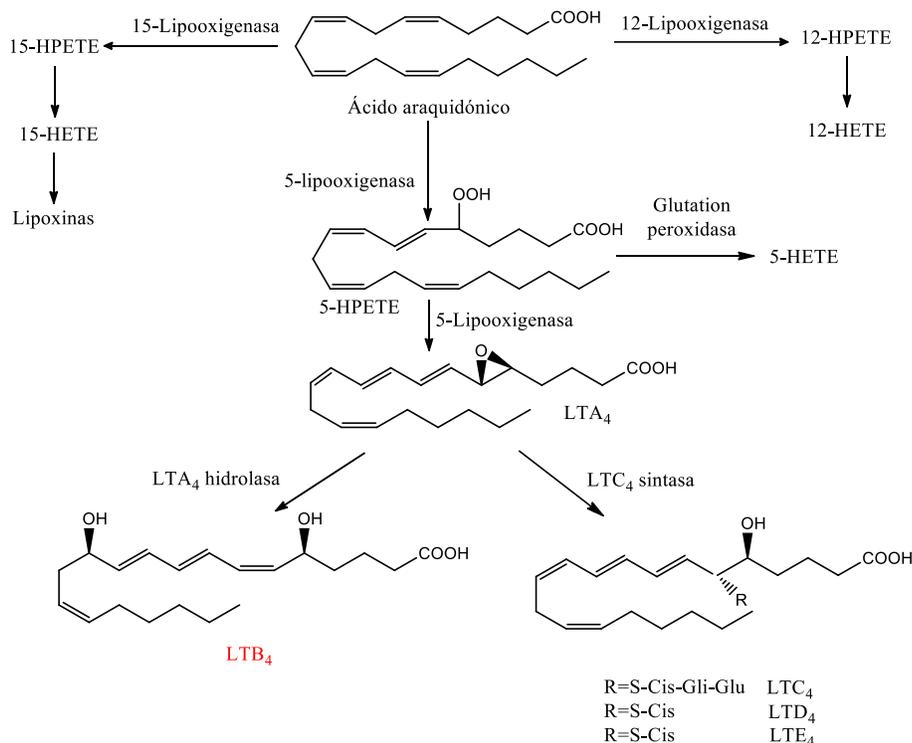


**Figura 2.** Principales vías metabólicas del ácido araquidónico inducidas por la acción de las ciclooxigenasas y lipooxigenasas

### 3.3.1. Lipooxigenasas

Las lipooxigenasas LOX son una familia de enzimas dioxigenasas citosólicas, entre las que se encuentra la 5,12 y 15 lipooxigenasas, que catalizan la oxidación estereoespecífica de los carbonos 5,12 ó 15 del AA a sus correspondientes hidroperóxidos. La 5-LOX juega un papel importante en la oxidación de ácido araquidónico en ácido 5-hidroieicosatetraenoico (5-HETE) también llamado LTA<sub>4</sub>, considerado el primer paso en la síntesis del resto de leucotrienos LTs. El LTA<sub>4</sub> puede, o bien ser convertido en LTB<sub>4</sub> por la enzima LTA<sub>4</sub>-hidrolasa, o puede conjugarse con glutatión reducido para dar LTC<sub>4</sub> por acción de la LTC<sub>4</sub> hidrolasa [46].

Por otro lado, el LTC<sub>4</sub> puede sufrir modificaciones para dar lugar a los LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. El LTB<sub>4</sub> es un potente estimulador de las respuestas de leucocitos como son la quimiotaxis, la adhesión celular, la producción de anión superóxido, la translocación de calcio y la liberación de enzimas hidrolíticas. El LTB<sub>4</sub> es producido en los granulocitos, monocitos, macrófagos, mastocitos y linfocitos B pero debido a la deficiencia de la 5-LOX en plaquetas, células endoteliales, células T y eritrocitos su producción es baja. La figura 3 muestra las rutas metabólicas del ácido araquidónico mediante las LOXs, hasta la producción de LTs [43].



**Figura 3.** Enzimas y eicosanoides implicados en el proceso de inflamación mediante la vía de las lipooxigenasas<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Imagen tomada de Z. Yuequin, "Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias," Universidad de Valencia, 2007. Página 31.

Los antiinflamatorios no esteroideos AINES como el ketoprofeno inhiben la síntesis de la 5-lipooxigenasa, disminuyendo así, la concentración de los mediadores generados por ambas vías, en especial la del LTB<sub>4</sub> por ser un compuesto biológicamente activo e involucrado en muchas enfermedades crónicas inflamatorias. El ketoprofeno actúa directamente sobre la fosfolipasa evitando la producción de prostaglandinas y leucotrienos, sin embargo, debido a los efectos secundarios se ha planteado nuevas drogas antiinflamatorias [47].

#### 3.3.2. Ciclooxygenasas

Las ciclooxygenasas o prostaglandinas endoperóxido sintasas corresponde a la familia de enzimas responsables de la síntesis de PGs, TXs y PGI<sub>2</sub> a partir de AA, cada uno de estos compuestos con efectos fisiológicos y fisiopatológicos implicados en procesos homeostáticos. Existen dos formas de la COX, la COX-1 y COX-2. La COX-2 se encuentra en grandes concentraciones en estados de inflamación aguda como es el caso de la artritis, y da lugar a la síntesis de PGs proinflamatorias [48].

Como se ha descrito, el proceso de inflamación basado en las rutas de las ciclooxygenasas y lipooxigenasas es complejo, hasta la fecha, se siguen estudiando vías alternas por la cuales un organismo es inflamado, actualmente los estudios reportar métodos de detección de derivados del ácido araquidónico con el fin de poder estudiar los mecanismos de inflamación que se siguen en el organismo y poder ayudar a tratar diferentes enfermedades con mayor eficacia terapéutica que los AINES.

#### 3.3.3. Métodos de detección para metabolitos derivados del AA

Existen diferentes métodos empleados para la detección y posterior cuantificación de metabolitos derivados del AA, entre los más utilizados se encuentran la cromatografía en capa fina CCF, radioinmunoensayo RIA, cromatografía de alta resolución CLAR acoplada a un detector ultravioleta/fotodiodos/masas, cromatografía de gases CG acoplada a espectroscopia de masas EM, radio inmunoensayos y enzimo inmunoensayos, que difieren entre ellas en especificidad, sensibilidad y costos.

La cromatografía líquida es una técnica adecuada para cuantificar varios eicosanoides distintos en un solo análisis, sin embargo, utilizando un detector ultravioleta, se limita a la presencia de compuestos con grupos cromóforos. En la actualidad, el método más aceptado y aplicado para medir la actividad de la 5-LOX medida por la producción de 5-HETE, LTB<sub>4</sub> y sus isómeros, es la cromatografía líquida/masas debido a que ofrece la posibilidad de encontrar inhibidores de la 5-LOX. No obstante, todos los derivados de la 5-LOX poseen grupos cromóforos como insaturaciones que tienen como uno de los máximos de absorción 235 nm ó 274-280 nm por tanto, son fácilmente detectables y cuantificables utilizando CLAR con detector UV, presentando correlación entre su absorbancia y su concentración. Por otro lado, la detección de PGs es difícilmente medida pues el máximo de absorción en UV es 192 nm y por lo tanto hace difícilmente

medir inhibidores de la COX[43]. La técnica, aunque es de gran utilidad es difícil de emplear si no se cuenta con un patrón de referencia, sin embargo, la separación de la fracción cromatográfica del pico correspondiente y su identificación por EM, IR y UV es una gran alternativa de caracterización.

El interés científico en la planta fue más allá de su mecanismo antiinflamatorio, la evaluación de la actividad antidepresiva y ansiolítica se evaluaron a través de modelos conductuales en ratones, a continuación, se presenta un bosquejo general de los métodos más utilizados.

#### 3.3.4. Modelos Experimentales de Ansiedad y Depresión

Establecer un modelo conductual que describa fácilmente un fenómeno biológico representa entre otras cosas, comprimir los factores esenciales a las características básicas minimizando los elementos limitantes y adecuando una consistencia estadística, facilidad de la metodología y una buena reproducción [49]. Al limitar los elementos, realizar un modelo psiquiátrico implica imposibilidad para reproducir los síntomas subjetivos de los pacientes, no obstante, los modelos conductuales de respuesta no condicional han permitido encontrar drogas que ayuden a describir los mecanismos neuroquímicos y los sustratos neuronales implicados en enfermedades mentales, por esta razón constituyen una interface de utilidad con las neurociencias [50].

Los modelos conductuales proporcionan fácilmente el desarrollo de terapias farmacológicas alternativas, así como el comportamiento de los biomodelos permite resaltar información valiosa acerca de diferentes patologías. Los extractos de las plantas son un claro ejemplo de terapias farmacológicas desarrolladas sobre modelos de ansiedad y depresión debido a que principios activos de las plantas son los generadores de la eficacia [51].

Por otro lado, los ratones son comúnmente utilizados en estudios comportamentales, pues son especímenes pequeños que posibilitan un mejor manejo, facilidad al realizar pruebas, gran capacidad exploratoria, una respuesta espontánea y cortos periodos de gestación y cría.

El modelo conductual más utilizado para la tratar la depresión es el nado forzado y los más empleados para la ansiedad son el test de tablero agujereado y el laberinto en cruz. Para comprender la complejidad de estos modelos, es evidente recordar que los roedores son animales de costumbres nocturnas que viven formando colonias en madrigueras estrechas, son fotofóbicos y tienen una tendencia togmotáctica [52].

#### 3.3.4.1. Laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz es el modelo mejor validado desde el punto de vista conductual, farmacológico y fisiológico para este fin. El principio es la preferencia de los biomodelos por los espacios cerrados del laberinto en contraste a los abiertos, la interpretación más aceptada es que la exposición a un ambiente novedoso promueve tanto la exploración como el miedo, generando un conflicto de aproximación-evitación, así, cuando el espécimen está cerca de las ramas abiertas y a una altura de 40 cm, experimenta sensaciones de vértigo, agorafobia y xenofobia [53]. Pellow y File, 1986 demostraron que los ratones eran ansiogénicos en los espacios abiertos y que las drogas ansiolíticas como los benzodiazepinas, aumentan la exploración de las ramas abiertas [54]. Adicionalmente, el laberinto permite obtener información de la actividad motora de los animales, medida por el número total de entradas a ambas ramas.

En los últimos años se ha tenido en cuenta diferentes posturas, como nuevos parámetros de medidas y nuevas formas de observación basados en programas de videograbación [55].

#### 3.3.4.2. Prueba del tablero agujereado

Esta prueba combina las características de un tablero con agujero tradicional y el campo abierto, está diseñado para medir múltiples dimensiones de la conducta no condicionada en pequeños mamíferos de laboratorio [56]. El fundamento del test se basa en la modificación del comportamiento exploratorio de los animales, evaluado en términos de cambios en la actividad motora (No de cruces) y en la frecuencia y duración de las exploraciones subterráneas [40].

Hay una gran variedad de diseños en los equipos utilizados en esta prueba, cada uno implica un instrumento acorde a las condiciones ambientales, biológicas y químicas que se sometan, todos los factores afectan de manera directa o indirecta, se debe tener en cuenta la iluminación, la temperatura del ambiente, el peso del animal, el sexo, entre otros factores.

#### 3.3.4.3. Nado forzado

El test de nado forzado de Porsolt, es uno de los modelos más ampliamente utilizados para detectar actividad antidepresiva en un gran número de sustancias [57]. La inmovilidad que presentan los animales forzados a nadar en un cilindro sin salida, ha sido utilizada para evaluar las acciones de los fármacos antidepresivos a nivel experimental. Al iniciar la prueba, los biomodelos presentan movimientos escapatorios, pero a medida que va pasando el tiempo van desarrollando una postura de inmovilidad. Hay una menor inmovilidad cuando se utilizan antidepresivos tricíclicos, como imipramina, debido a que son inhibidores no selectivos de la recaptación de monoaminas (algunos son selectivos de la noradrenalina) [49]. No obstante, la mayoría

tienen efectos secundarios como son la sedación, hipotensión postural, xerostomía, visión borrosa, estreñimiento, a veces manía y convulsiones [58].

Adicionalmente, el aprovechamiento de *C. hermaphroditus* se realizó sobre su capacidad anticonvulsivante, con el objetivo de ser una ayuda en los problemas de epilepsia.

#### **Epilepsia**

La epilepsia es una enfermedad crónica definida como un conjunto de trastornos neurológicos con una elevada predisposición en el cerebro para generar convulsiones recurrentes [59]. Aunque no hay una cura para la enfermedad, existen tratamientos como fármacos anticonvulsivantes que inhiben diferentes mecanismos bioquímicos, a pesar de ello, en las últimas décadas se ha promovido la investigación de fuentes naturales de moléculas activas. La investigación preclínica tradicional de los fármacos o extractos se realiza en modelos animales, gracias a su simplicidad, buenos resultados y reproducibilidad, el modelo más utilizado para la epilepsia es el test del pentilentetrazol [60]. El pentilentetrazol PTZ, es utilizado como agente convulsivante desde 1926.

#### **3.3.5. Modelos para evaluar efectos anticonvulsivantes**

Los modelos anticonvulsivantes constituyen una gran herramienta para comprender el mecanismo neuronal de problemas epilépticos en el hombre. Estos modelos pueden ser agudos o crónicos, los primeros implican la administración de agentes químicos, eléctricos y metabólicos produciendo convulsiones temporales a biomodelos sanos no epilépticos [60]. Los modelos agudos siguen siendo objeto de estudio para desarrollar nuevos fármacos anticonvulsivantes pues la facilidad de uso, costos y efectividad los hacen una propuesta interesante [61].

#### **3.3.6. Test del PTZ**

El modelo de inducción química de convulsiones por pentilentetrazol es útil para evaluar las convulsiones clónico-tónicas, ya que son muy similares a las que se presentan en humanos, es ampliamente utilizado en la evaluación de la actividad anticonvulsivante de nuevas moléculas debido a que se busca que dichos compuestos funcionen como antagonistas al PTZ.

En la literatura se encuentran varios estudios que indican que el PTZ reacciona con el receptor GABA bloqueando los canales de cloro, lo que genera dependiendo de la dosis aplicada en el biomodelo diversos tipos de convulsiones. Una dosis baja de PTZ inyectada produce espasmos musculares, a dosis medias produce crisis convulsivas de tipo clónico-tónicas generalizadas, a dosis altas se producen una serie de movimientos repetitivos en partes específicas, posteriormente una fase clónica, tónica y a dosis elevada puede producir la muerte [62], [63].

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIALES

#### 4.1.1. Reactivos

- Glucógeno Tipo IX, 98,5 % (Sigma)
- Imipramina clorhidrato, 12,5 mg/kg (Tofranil® 25 Novartis)
- Ácido acético glacial, (Fischer Scientific)
- Agua desionizada, conductividad 0,4-5,5  $\mu$ S/m
- Cloro-trimetilsiloxano, 98 % (Sigma)
- Cloruro de calcio granulado,  $\leq$ 100 % (Merck)
- Cloruro de potasio argentométrico, 99,5 % (Merck)
- Cloruro de sodio argentométrico, 99,5 % (CARLO ERBA)
- Diazepam, 5 mg/mL (Calox Internacional)
- Etanol grado CG (Sigma) 99,8 %
- Fosfato de potasio dibásico, reactivo analítico, 99,8 (Mallinckrodt)
- Fosfato de sodio dibásico anhidro granular, reactivo analítico 99,8 % (Mallinckrodt)
- Fosfato monobásico de potasio, 98 %, (CARLO ERBA)
- Glucosa anhidra, grado analítico, 98 %
- Ionóforo de calcio A23187, 98 % (Sigma)
- Ketoprofeno, 50 mg/mL (Sanofi)
- Metanol grado HPLC (Fischer Scientific)
- Nitrógeno grado analítico, (Cryogas)
- Pentilentetrazol, 99,8 % (Sigma)
- Solución salina, 0,9 % USP (Baxter)

#### 4.1.2. Equipos

Balanza analítica, Ohaus Adventurer™, $\pm$ 0.0001 g (Shangai, China)	Preparación de soluciones
Caja de vidrio 30x20x15 cm con un círculo concéntrico dibujado de 10 cm de diámetro en la superficie inferior	Determinación de la dosis exploratoria
Cajas separadoras	Actividad anticonvulsivante
Cámara de gas con cloroformo	Sacrificio de biomodelos
Cámara de grabación, Nikon Coolpix 32 (Shangai, China)	Videograbación de pruebas conductuales
Centrifuga, Hermle Z300, 0-4000 rpm (Wehingen, Alemania)	Eliminación de residuos celulares de LPMN

#### 4. Metodología

Cilindro de vidrio de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura	Prueba de nado forzado
Cromatógrafo líquido de alta resolución, Hewlett Packard HP 1100 (Palo alto California, EUA).	Análisis de muestras del lavado peritoneal y determinación de la actividad antiinflamatoria en Unicauca.
Cromatografo de gases acoplado a espectrómetro de masas, Ultra-CG EM QP2010, (Columbia, EUA)	Identificación del LTB <sub>4</sub> en Univalle
Cronómetro, Casio HS3 W. L (Tokio, Japón)	Registro del tiempo en pruebas conductuales
Equipo de disección básico (Tijeras, bisturí, pinzas)	Realizar la disección y facilitar el lavado peritoneal
Laberinto en cruz elevado realizado en poliestireno, 40 cm de altura, ramas de 8 cm de ancho×30 cm de largo, 15 cm de altura de las ramas cerradas.	Medición de la actividad ansiolítica
Liofilizador, Labconco Freezone 2.5, (Estados Unidos)	Secado del extracto de la planta
Mini-vap Supelco (Wisconsin, Estados Unidos)	Secado de extracto con LPMN
Molino de rotor de impacto de palas, Retsche SK100 (Mettmann,Alemania)	Trituración de las raíces de la planta
pH-metro, Metroohm 827 (Herasiu, Suiza)	Controlar pH en tratamientos de LPMN
Rotaevaporador, Buchi R-124, acoplado a un sistema de vacío R-169 y un controlador de vacío B-72 (Essen, Alemania)	Concentración de muestras de LPMN
Baño de agua Buchi, B-480 (Essen, Alemania)	Incubación de balón de rotaevaporación
Sistema de filtración para membrana de celulosa 0,45 µm	Separación y eliminación de impurezas tejidos
Tablero de campo abierto con agujeros, caja 30x30x15 cm, agujeros 2,3 cm de diámetro	Medición de la actividad ansiolítica y motora
Termómetro, BRIXCO	Temperatura en nado forzado
Termostato, Thermo Scientific 206 (Massachusetts, Estados Unidos)	Incubación de los LPMN

### 4.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Cyperus hermaphroditus*

#### 4.2.1. Recolección del material vegetal

El material vegetal de *Cyperus hermaphroditus* fue recolectado en el mes de enero del 2015. La planta completa se arrancó con una pala, en la finca Santa Teresa (1°48'13,675" Norte, 76°07'41,982" Oeste, latitud 1,8037 longitud -76,1283)<sup>3</sup> de la vereda Santa Inés, km 9 vía Pitalito-Huila, el sistema radicular de la planta se mantuvo en el suelo de procedencia con el fin de conservarlas y posteriormente enviarlas al laboratorio de Análisis Industriales del departamento de química de la Universidad del Cauca. Los ejemplares recolectados fueron identificados por el Director del Herbario CAUP, Bernardo Ramiro Ramírez Padilla de la institución, una muestra se guardó en el museo de Historia Natural, con número de colecta N1 del mes de enero.

#### 4.2.2. Obtención del extracto acuoso por el método de maceración percolación

El sistema radicular de *C. hermaphroditus* fue tratado con agua potable, las raíces se cortaron y se limpiaron con agua destilada, se secaron a temperatura ambiente por un día y por 24 horas en una estufa de secado a 40 °C. Con el fin de disminuir el tamaño de partícula, las raíces se trituraron en un molino de rotor de impacto de palas, empleando un tamiz de fondo con abertura de malla de 1,2 milímetro, a una velocidad de rotor de 2850 rpm.

Las raíces secas y molidas se maceraron en agua desionizada por 10 horas. La muestra percolada se pasó inicialmente por un filtro de 100 mm, seguido de uno de 0,42 µm. El extracto acuoso se concentró en un rotaevaporador con una presión promedio de 150 mm de Hg y a una de temperatura de 40 °C, consecutivamente el extracto se pasó a un vial y se liofilizó utilizando una presión de  $4 \pm 2$  mBar y una temperatura de  $-51 \pm 1$ °C. El extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* se almacenó en un desecador protegido de la luz hasta su posterior uso en el estudio de las actividades biológicas. La figura 4 muestra el proceso de extracción acuosa.



**Figura 4.** a). Espécimen b) Raíces de *C. hermaphroditus* c) Extracto acuoso de *C. hermaphroditus*

<sup>3</sup> Datos satelitales ©2016 Google Maps ©2016 Digital Globe. Escala indeterminada. Pitalito; Huila. Accedido por: Angie Carolay Forero Girón, el 24 de febrero del 2016. URL: <http://www.coordenadas-gps.com/>

### 4.3. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LEUCOTRIENOS CON EL MODELO DE DISMINUCIÓN DE LTB<sub>4</sub> EN LPMN DE RATAS

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se optimizó el protocolo de extracción de los LTB<sub>4</sub> a partir del lavado peritoneal de los individuos en estudio, planteado por Arce, 2001 [64]. Mediante un diseño de experimentos factorial 2<sup>5</sup> se evaluaron diferentes variables independientes que pudieran afectar la producción de los LTB<sub>4</sub> en los individuos inyectados con una solución de glucógeno. Los factores evaluados en la obtención del LTB<sub>4</sub> fueron: la masa del individuo, temperatura de incubación de los extractos, el tiempo de sacrificio del espécimen, la cantidad de glucógeno inyectado y la alimentación. La variable dependiente fue el aumento del área del pico cromatográfico a 5,322 min considerado como LTB<sub>4</sub> por Arce, 2001 [64].

#### 4.3.1. Animales de experimentación

En este estudio se emplearon 39 ratas de ambos sexos, albinos suizos Univalle y Probiol con 10-12 meses de edad y pesos entre 300-400 gramos. Los especímenes provinieron del Bioterio del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca, los cuales fueron cuidados desde su nacimiento, optimizando el peso, el alimento y la edad. Durante todos los experimentos los animales permanecieron en condiciones estándar de temperatura (20-24 °C), humedad (60-70%) e iluminación (12h luz- 12h oscuridad); con alimento y agua *ad libitum*. Los biomodelos estuvieron en cajas de policarbonato y fueron alimentadas con alimento Lab Diet® 5001, los ensayos se realizaron en el cubículo número 1 del Centro de Investigaciones Biomédicas CIBUC.

Los procedimientos utilizados están sujetos a los principios y normativas del cuidado de animales de laboratorio de la Universidad del Cauca y a los estipulados en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de la Protección Social de Colombia, la ley 84 de 1989 del Congreso de la República de Colombia y a las directrices éticas de la Organización Mundial de la Salud. En cuanto a los aspectos ético-legales consultar documento Marco Legal Comité de Ética para La Investigación Científica (pM-IV-6.1-OD-2) Universidad del Cauca. El trabajo cuenta con el aval ético aprobado por el comité de ética de la Universidad del Cauca, acta número 14 del 24 de septiembre del 2014 (Ver anexo 4).

#### 4.3.2. Optimización del modelo inflamatorio.

La optimización del modelo de la disminución del LTB<sub>4</sub> en LPMN de ratas se realizó explorando los cinco factores más influyentes en el área del pico cromatográfico a 5,388 ± 0,16 minutos. Para ello se diseñó una matriz sencilla de 2<sup>5</sup>, los factores y los niveles que se estudiaron fueron (Ver tabla 1):

Tabla 1. Factores y niveles estudiados para la optimización del método antiinflamatorio.

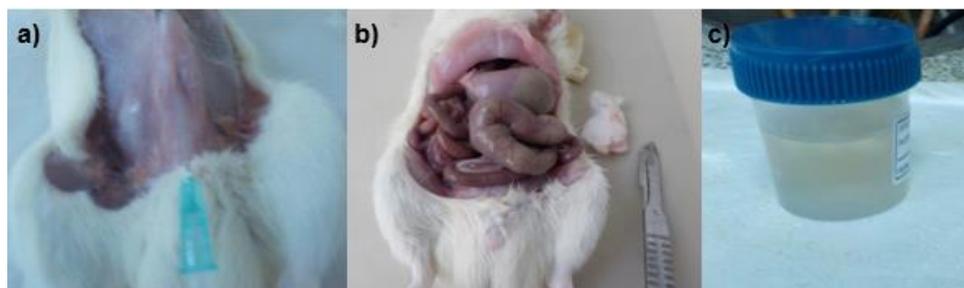
<b>FACTOR</b>	<b>NIVEL BAJO</b>	<b>NIVEL ALTO</b>
<i>Masa del biomodelo (g)</i>	200-300	300-400
<i>Concentración de glucógeno (g/kg)</i>	1	1,5
<i>Alimentación previa</i>	NO	SI
<i>Temperatura de rotaevaporación (°C)</i>	35	41
<i>Hora de sacrificio (h)</i>	4	6
<i>Variable respuesta</i>	Área del pico cromatográfico	

Para el análisis del diseño de experimentos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics versión 16 desarrollado por Statpoint Technologies, Inc. (Virginia, Estados Unidos) el cual permitió establecer las condiciones óptimas para la extracción del LTB<sub>4</sub> por cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta visible.

#### 4.3.3. Evaluación del mecanismo antiinflamatorio de *C. hermaphroditus* mediado por la 5-lipooxigenasa.

Se utilizaron 33 ratas (Arce, 2001) de ambos sexos a las cuales se les inyectó vía i.p. glucógeno al 1,7% (1,5 g/kg del peso del animal) en PSB2 (8,6 mM NaCl, NaHPO<sub>4</sub> 0,125 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3125 mM, KCl 0,17 mM, Glucosa 5 mM, pH:7,2), después de 6 horas las ratas fueron sacrificadas en una cámara de gas para extraer los leucocitos de la cavidad peritoneal usando buffer de fosfato como fluido amortiguador.

Se realizó una inyección i.p. de 15 mL de PBS1 (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, KCl 2,7 mM, 2,5 mM de glucosa pH:7,2) sobre la zona abdominal y se efectuó masajeo local. Se realizó disección del biomodelo, hasta llegar a la zona peritoneal y se recogió por decantación el fluido amortiguador. Se abrió el peritoneo y se lavó en varios ciclos los órganos internos de la cavidad peritoneal con 30 mL de PBS2, moviendo la zona intestinal inflamada, los órganos superiores y el peritoneo parietal, se sostuvo la rata en posición decúbito dorsal se transvasó el fluido extraído (evitando causar daños sobre el hígado y el corazón), se unieron las fracciones recolectadas y se homogenizó la solución suave y lentamente (evitando muerte celular). La figura 5 muestra el proceso de extracción del LTB<sub>4</sub>.



**Figura 5.** a) Administración i.p de PBS1 después del sacrificio del biomodelo. b) Peritoneo abierto para realizar el segundo lavado c) Lavado peritoneal recogido

El lavado peritoneal de cada rata se dividió en tres porciones y a cada una se le agregó:

1. El control negativo: 200  $\mu$ L de solución PBS1
2. El control positivo: 200  $\mu$ L de solución acuosa de ketoprofeno 0,025 g/mL. El ketoprofeno es un AINES que inhibe la ruta de las LOXs
3. El extracto vegetal: 200  $\mu$ L de extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* 0,075 g/mL.

Los sistemas se incubaron en un baño maría a 35 °C por 15 minutos, la enzima 5-lipooxigenasa se activó mediante la adición de 200  $\mu$ L de ionóforo de calcio A23187 (1  $\mu$ g/mL) a 37 °C por 15 minutos, se adicionó 50  $\mu$ L de una solución de cloruro de calcio 0,9 mM manteniendo la temperatura durante 2 minutos. La actividad enzimática se suspendió incubando a 0,0 °C por 10 minutos y se eliminó el material celular centrifugando por 15 minutos a 4000 rpm. Al sobrenadante obtenido se adicionó 8 mL de etanol, se filtró y se llevó a sequedad en un rotaevaporador a 35 °C y presión reducida. Las muestras se conservaron a 0,0 °C para su posterior análisis por CLAR en el laboratorio de la UAI de la Universidad del Cauca.

### 4.3.4. Determinación cromatográfica de la inhibición de la producción del LTB<sub>4</sub> por medio de CLAR, EM e IR:

El seguimiento del mecanismo antiinflamatorio se realiza a partir de la formación del LTB<sub>4</sub>, monitoreado mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de Ultravioleta Visible y posteriormente identificado por espectrometría de masas.

*Pre-tratamiento de las muestras de estudio:* Las muestras secas se disolvieron en 1,5 mL de metanol y se pasaron por filtros Simple Pure PTFE de 0,45  $\mu$ m. Los tres extractos se concentraron en un minivap con chorro de nitrógeno grado 5.0, hasta un volumen de 100  $\mu$ L. Antes de cada inyección las muestras fueron homogenizadas.

Para el análisis por CLAR se inyectó 20  $\mu$ L de muestra, empleando como fase estacionaria una columna Hypersyl C<sub>18</sub> ODS 250 mm x 0.4  $\mu$ m x 5 mm, fase móvil metanol/agua/ácido acético 72/27,8/0,2 operada en modo isocrático, a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min, la identificación se realizó utilizando un detector ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm. El tiempo para cada corrida cromatográfica fue 20 minutos de análisis y 10 minutos de lavado en gradiente con metanol.

La fracción identificada como LTB<sub>4</sub> a un tiempo de 5,388  $\pm$  0,16 minutos, se recolectó, se concentró a presión reducida y se secó con chorro de nitrógeno, posteriormente se sometió a un equipo de espectrometría de masas por sonda de la Universidad del Valle.

Espectrometría de masas (EM): La muestra secada por chorro de nitrógeno, se inyectó por sonda a un EM utilizando un capilar de vidrio. Las condiciones del método fueron (Ver tabla 2):

Tabla 2. Condiciones utilizadas en el análisis de EM.

FACTOR	CONDICIÓN
Temperatura de la fuente de iones (°C)	240
Temperatura de la interface (°C)	220
Temperatura final (°C)	350
Modo de adquisición	Scan
Velocidad de scan	2000
Inicio de detección (min)	5
Finaliza método (min)	25

Cromatografo de gases acoplado a espectrómetro de masas, Ultra-CG EM QP2010.

Los fragmentogramas se realizaron en el programa Origin Pro 8, los datos originales del fragmentograma se pueden observar en el anexo 2.

### 4.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA Y ANTIDEPRESIVA DE *Cyperus hermaphroditus* MEDIANTE PRUEBAS CONDUCTUALES

#### 4.4.1. Animales de experimentación

Para las pruebas farmacológicas se emplearon 200 ratones macho albinos cepa procedentes del Bioterio de las Universidades del Valle y Cauca con 4-5 meses de edad y pesos entre 30-40 gramos. Los especímenes se cuidaron desde su nacimiento en el Bioterio del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca considerando día de por medio el peso, comportamiento, alimentación, aseo y edad. 12 horas antes de cada experimento los especímenes fueron aislados de fuentes de alimentación y fueron llevados 1 hora antes a los módulos de investigación con el fin de familiarizar al animal con los equipos conductuales. Los animales fueron seleccionados aleatoriamente para las pruebas farmacológicas y para los tratamientos aplicados.

Durante todos los experimentos, los biomodelos permanecieron en condiciones estándar de temperatura, humedad e iluminación, agua *ad libitum*. Los biomodelos se mantuvieron en cajas de policarbonato pequeñas y en cada caja se tuvo un máximo de seis ratones destinados a un mismo tratamiento. Antes y después de cada prueba realizada, se observó el comportamiento de los biomodelos. Todos los experimentos se realizaron alrededor de las 10 y 17 horas; periodo del día en el cual la actividad diurna de los animales es la máxima. En la figura 6 se aprecian algunas condiciones utilizadas para los biomodelos.



**Figura 6.** a) Cajas de policarbonato para alojamiento de biomodelos, cada caja incluye un tetero, una almacena de alimentos y aserrín, biomodelos en el laboratorio de experimentación conductual. b) Alimento de los biomodelos. c) Biomodelos en la sala de ratones.

En las pruebas conductuales se realiza un ensayo previo con el objetivo de asegurar y optimizar el sistema de grabación y de mantener las condiciones externas adecuadas y uniformes. La prueba de nado forzado incluye un pretest de 15 minutos un día antes de la prueba [40].

Después de finalizar las pruebas con un espécimen, todos los equipos son limpiados con alcohol para remover los signos de territorialidad dejados por cada ratón. Los experimentos farmacológicos realizados siguen los estatutos fijados por el Consejo Internacional de Organizaciones Médicas para la Investigación Biomédica en Animales [65].

#### **4.4.2. Determinación de la dosis de extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* a utilizar en las pruebas conductuales.**

La cantidad de extracto administrada a los biomodelos en las pruebas conductuales, fue optimizada mediante el modelo de campo abierto con círculo central, evaluando la dosis con mayor actividad a través una curva de dosis respuesta versus la modificación de la conducta exploratoria de los animales [66].

Para este estudio se emplearon 60 ratones albinos suizos entre 30-40 gramos, los cuales fueron divididos en seis grupos de 7 o 8 cada uno; a cada grupo se le inyectó una dosis diferente del extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* e inmediatamente después de la inyección se situó el espécimen en el círculo central dibujado sobre una caja de vidrio con dimensiones 20 cm de ancho, 30 cm de largo y 15 cm de alto. Las dosis aplicadas fueron 0,0 (solución salina), 2,0; 5,0; 5,0; 10,0; 50,0 y 150 mg/kg, masa de extracto por peso de animal.

La prueba inició a partir de la instalación del animal en la caja de campo abierto y durante seis minutos se observó el número de empinamiento y número de veces que el animal presentó conducta diagonal (atravesada el círculo central). El tiempo fue registrado utilizando un cronómetro manual y las pruebas fueron videograbadas para su posterior análisis. El extracto que aumentó significativamente la conducta exploratoria se utilizó como dosis i.p. de administración. El procedimiento siguió el

protocolo reportado por Cofré, 2009 [40], con modificaciones en las dimensiones y el material de la caja.

### 4.4.3. Diseño de experimentación conductual de comparación

Las actividades farmacológicas tuvieron el mismo diseño de experimentación comparativo, que consta de modelar un fenómeno biológico, reducirlo a sus características más relevantes y con una consistencia estadística adecuada a una ética ligada, exponer el animal a un entorno nuevo de comportamiento. Para la evaluación de la actividad ansiolítica y antidepresiva se manejaron 24 ratones para cada prueba, siendo 8 el número de ratones para cada tratamiento. Cada prueba se efectuó en sesiones diferentes y alrededor de las horas con mayor actividad diurna. Los tres tratamientos comparativos, control negativo (solución salina), control positivo (imipramina como antidepresivo y diazepam como ansiolítico y anticonvulsivante) y grupo evaluado (extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* resuspendido en solución salina) fueron expuestos a las pruebas de campo abierto con agujeros y laberinto en cruz para evaluar su actividad ansiolítica y a la prueba de nado forzado para determinar la actividad antidepresiva [40]. Las comparaciones entre los tratamientos se realizaron mediante un análisis ANOVA y dado el caso con un post hot de comparaciones múltiples Tukey. El valor de la significancia estadística a partir del control fue de  $p < 0.05$ .

### 4.4.4. Modelos experimentales de ansiedad y depresión

#### 4.4.4.1. Determinación de la actividad ansiolítica mediante el modelo del laberinto en cruz

El laberinto en cruz elevado sigue el protocolo planteado por Pellow, 1985 con algunas modificaciones, utiliza un aparato en cruz que se compone de dos brazos abiertos, uno frente al otro, perpendiculares a dos brazos cerrados con dimensiones 30 x 8 x 15 cm; los cuatro brazos están unidos por un centro de plataforma de 8 x 8 x 0 cm. Los brazos cerrados tienen una pared de 15 cm de alto. Los brazos y la plataforma están fabricadas de láminas de poliestireno negras, soportadas sobre una base en cruz de madera. Todo el aparato está a 40 cm sobre el suelo y se sitúa en el centro de 4 paredes oscuras, como se observa en la figura 7 [67-69].

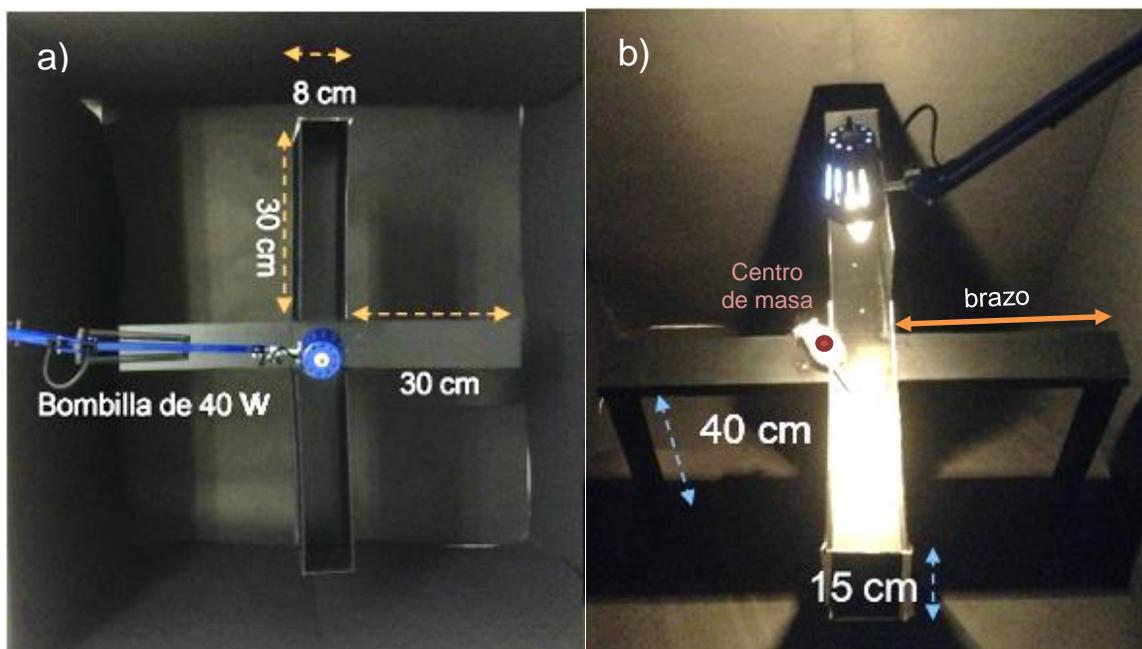


Figura 7. Dimensiones y descripción del laberinto elevado en cruz. a) Vista superior, b) Vista lateral superior.

Previo a la realización a las pruebas los animales se dividieron en tres grupos de 8 ratones cada uno, a los cuales se les administró via i.p. 30 minutos antes de la prueba:

Grupo 1: Control negativo	NaCl 0,9 % 12,5 mg/kg
Grupo 2: Control positivo	Diazepam® 0,3 mg/kg. El diazepam es un ansiolítico diazepínico que facilita la inhibición del GABA.
Grupo 3: Extracto	Extracto acuoso de <i>Cyperus hermaphroditus</i> a dosis fijada por la prueba de campo abierto.

El número de entradas en cada brazo (una entrada del ratón en el brazo se define como el centro de la masa del ratón que entra en el brazo), el tiempo en cada uno, la distancia recorrida, y el porcentaje de entradas en los brazos abiertos son evaluadas en seis minutos desde la videograbación [40].

#### 4.4.4.2. Determinación de la actividad ansiolítica a partir de la prueba de tablero agujereado

En la prueba de tablero agujereado realizada por Boissier, J.R., Simon, P. 1962 se realizan varias modificaciones. En este ensayo se utilizó una caja de vidrio de 35x35x35 cm, la plataforma de aluminio se encuentra a 5 cm del piso y está dividida en 16 cuadrados de iguales dimensiones. En cada cuadrado, se encuentra un orificio concéntrico de 2,5 cm de diámetro (ver figura 8). En la parte superior de la caja se encuentra una videocámara que registra durante cinco minutos el movimiento del ratón [70].

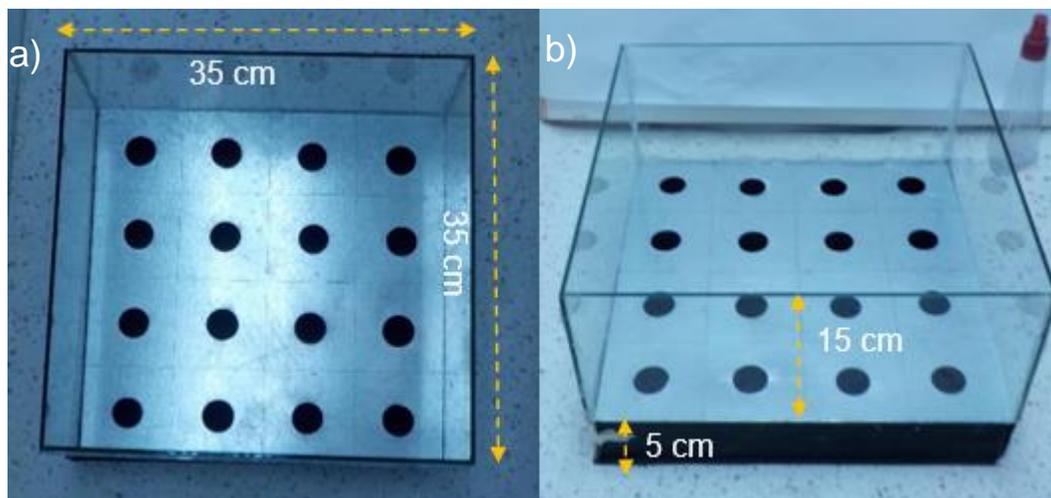


Figura 8. Dimensiones del tablero de agujeros. a) Vista superior, b) Vista lateral superior.

Los animales se dividieron para ser utilizados en tres tratamientos de 8 ratones cada uno, y se les administró vía i.p. 30 minutos antes:

Grupo 1: Control negativo	NaCl 0,9 % 12,5 mg/kg
Grupo 2: Control positivo	Diazepam® 0,3 mg/kg
Grupo 3: Extracto	Extracto acuoso de <i>Cyperus hermaphroditus</i> a dosis fijada por la prueba de campo abierto.

El experimento inició colocando el animal en el centro del tablero agujereado. Se registró durante 5 min el número de veces que el ratón introduce la cabeza en los agujeros, su duración y el número de veces que atraviesa los cuadrados [71].

#### 4.4.4.3. Determinación de la actividad antidepressiva mediante el modelo de nado forzado

La evaluación de la actividad antidepressiva se realizó a partir de la prueba de nado forzado Porsolt 1977 con varias modificaciones, en este test se utilizó un cilindro de vidrio transparente de 30 cm de alto y 20 cm de diámetro [49] [72]. El cilindro contenía agua hasta una altura de 15 cm a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C [57]. Los animales se dividieron en tres grupos de 8 ratones cada uno, a los cuales se les administró vía i.p. 30 minutos antes:

Grupo 1: Control negativo	NaCl 0,9 % 12,5 mg/kg
Grupo 2: Control positivo	Imipramina ® 12,5 mg/kg. La imipramina es un antidepressivo tricíclico que inhibe la recaptación de serotonina y noradrenalina.
Grupo 3: Extracto	Extracto acuoso de <i>Cyperus hermaphroditus</i> a dosis fijada por la prueba de campo abierto.



**Figura 9.** a) Dimensiones del cilindro de nado forzado b) Ratones secados con toallas

La duración de la prueba es 6 minutos, después de los animales fueron secados con toallas, Los parámetros registrados por medio de la videograbación son: el nado, definido como todos aquellos movimientos escapatorios, es decir, desplazamiento circular, trepado o buceo, y la inmovilidad definida como los movimientos mínimos que debe realizar el animal necesarios para mantener su cabeza fuera del agua y poder respirar [73].

### 4.5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTICONVULSIVANTE DE *Cyperus hermaphroditus* MEDIANTE EL TEST PTZ

#### 4.5.1. Animales de experimentación

En el test del PTZ se emplearon 63 ratones macho albinos suizos obtenidos en los bioterios de las Universidades del Valle (Cali, Colombia) y Cauca (Popayán, Colombia) con 4-5 meses de edad y pesos entre 30-40 gramos.

Todos los especímenes se asistieron desde su nacimiento optimizando peso, alimentación y edad para las pruebas en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca. Una hora antes de cada sección, los biomodelos fueron trasladados a la sala de investigación. Durante todos los experimentos los animales permanecieron en condiciones estándar de temperatura, humedad e iluminación, agua *ad libitum*. Los tres tratamientos realizados en las pruebas anticonvulsivantes se realizaron simultáneamente.

#### 4.5.2. Determinación de la actividad anticonvulsivante por el Test del PTZ a 85 mg/kg

El PTZ provoca crisis convulsivas del tipo tónico-clónicas generalizadas, en este test se utilizaron 24 ratones divididos en tres grupos formados por 8 ratones cada uno, a cada grupo se inyectó 30 minutos antes:

Grupo 1: Control negativo    NaCl 0,9 % 12,5 mg/kg

Grupo 2: Control positivo      Diazepam ® 0,3 mg/kg.  
Grupo 3: Extracto                Extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* a dosis fijada por la prueba de campo abierto.

Después de 30 minutos, a cada grupo se le inyectó vía i.p. pentilentretazol a una dosis de 85 mg/kg. La prueba inició inmediatamente después de la inyección i.p. de PTZ al biomodelo y su instalación en el lugar de grabación. La prueba duró 6 minutos [74][75].

### **4.5.3. Determinación de la dosis de PTZ administrada a los roedores evitando mortalidad**

En este test se realizaron ensayos a diferentes dosis de PTZ con el fin de optimizar la cantidad administrada i.p., para ello se disminuyó la cantidad de PTZ sin alcanzar mortalidad en los roedores. La cantidad base de PTZ, trabajada en las sesiones anteriores arrojaron que a 85 mg/kg se encontraba 100 % de mortalidad. Las pruebas se realizaron a 40, 50, 55, 60, 70 y 85 mg/kg de PTZ por kg de animal. El tiempo de observación fue de 30 minutos y se registró la mortalidad [5].

### **4.5.4. Determinación de la actividad anticonvulsivante de *Cyperus hermaphroditus* utilizando el test del PTZ a 55 mg/kg.**

Optimizando la cantidad de PTZ administrada i.p. se realizó el mismo procedimiento de la sección 4.5.3, empleando 55 mg/kg como dosis de pentilentetrazol para producir convulsiones.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 5.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Cyperus hermaphroditus*

El método de maceración-percolación es uno de los principales métodos de extracción de los principios activos de una planta debido a los altos porcentaje de extracción y a la reducción de costos por solventes. La maceración-percolación permite que el agua entre en contacto con las raíces secas y molidas de *Cyperus hermaphroditus* y durante 10 horas actúe simultáneamente sobre todas las relaciones de las raíces, circulando a través y en todas las direcciones, disolviendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido radicular. Aplicando la metodología anterior y utilizando agua como solvente, el porcentaje de extracción obtenido a partir de las raíces secas y molidas de *Cyperus hermaphroditus* fue igual al 2,36 %.

Los grupos Kamëntsá e Inga del Valle de Sibundoy, Putamayo, Colombia [76] utilizan las raíces para realizar las infusiones, extractos o bebidas. El extracto fue liofilizado con el fin de aumentar la estabilidad y disminuir el porcentaje de humedad.

### 5.2. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LEUCOTRIENOS MEDIANTE EL MODELO DE DISMINUCIÓN DE LTB<sub>4</sub> EN LPMN DE RATAS

Teniendo en cuenta los resultados acerca de la actividad antiinflamatoria de la planta, reportada por Giraldo y Gutiérrez, 2001, y siguiendo la metodología 4.3 se estudió el proceso de inhibición en la producción del leucotrienos, mediante el modelo de disminución de LTB<sub>4</sub> en leucocitos polimorfonucleares de rata (LPMN). Los LPMN fueron extraídos por medio de un buffer de fosfatos con las condiciones necesarias para mantener estable el sistema celular durante algunas horas, la adición del ionóforo de calcio y del cloruro de calcio se realizó con el fin de promover la activación enzimática de la 5-lipooxigenasa y disminuir la acción de las otras enzimas, es conocido que muchos factores pueden alterar la producción de los metabolitos derivados del ácido araquidónico [77] [78]. Tomando como referencia la metodología propuesta por Arce, 2001 [64] se optimizó los parámetros relevantes en el proceso de extracción de LTB<sub>4</sub> a partir de ratas con inflamación inducida por glucógeno. Las variables independientes analizadas en el proceso de extracción de los LTB<sub>4</sub> fueron: masa del individuo, cantidad de glucógeno inyectada, alimentación, tiempo de sacrificio y temperatura de incubación. Aplicando un modelo factorial simple 2<sup>5</sup> con dos niveles experimentales y cinco factores se obtuvieron los siguientes resultados (ver tabla 3):

## 5. Resultados y análisis de resultados

Tabla 3. Análisis de Varianza para el Área LTB<sup>4</sup>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura Rota	4,75106	1	4,75106	0,17	0,6885
B: Glucógeno	41,5503	1	41,5503	1,45	0,2439
C: Tiempo sacrificio	3315,54	1	3315,54	115,83	0,0000
D: Alimentación	518,325	1	518,325	18,11	0,0005
E: Masa del individuo	5387,35	1	5387,35	188,22	0,0000
AB	36,8464	1	36,8464	1,29	0,2714
AE	4,57425	1	4,57425	0,16	0,6940
BC	220,593	1	220,593	7,71	0,0125
BD	92,6562	1	92,6562	3,24	0,0888
BE	7,43919	1	7,43919	0,26	0,6164
CD	47,9265	1	47,9265	1,67	0,2120
CE	1766,19	1	1766,19	61,70	0,0000
DE	202,209	1	202,209	7,06	0,0160
Error total	515,216	18	28,6231		
Total (corr.)	12161,2	31			

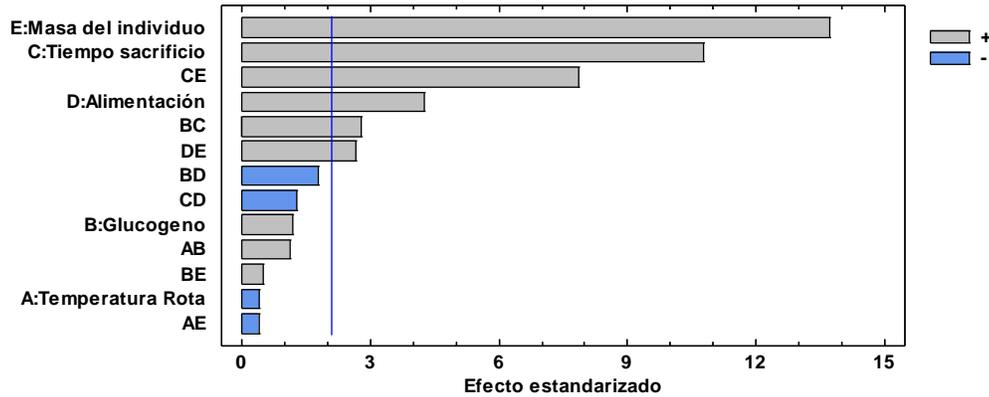


Figura 10. Diagrama de Pareto estandarizada para el área del LTB<sub>4</sub>

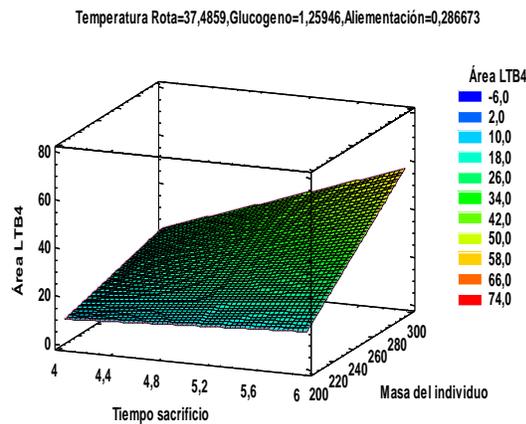


Figura 11. Superficie de respuesta estimada

<sup>4</sup> R-cuadrada = 95,7634 % y R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 92,7037 %

## 5. Resultados y análisis de resultados

La tabla 3 resume los resultados del análisis de varianza ANOVA para el diseño ejecutado, puede observarse que los valores de  $P < 0.05$  son efectos principales correspondientes a los factores de masa del individuo, el tiempo de sacrificio y la alimentación; es decir que las anteriores variables afectan significativamente, con un nivel de confianza del 95 %, la extracción positiva de los LTB<sub>4</sub>. Caso contrario ocurrió con la temperatura de concentración a presión reducida de los extractos entre 35 y 40°C y la cantidad de glucógeno inyectado a las ratas (1,0 y 1,5 g/kg), estos factores no presentaron efecto significativo sobre el proceso de extracción de los LTB<sub>4</sub>. El anterior comportamiento pudo verificarse en la figura 10 de Pareto, en la cual se confirma que los factores anteriormente mencionados inciden fuertemente en la variable respuesta de una forma positiva.

En la figura 11, se presenta la superficie de respuesta del modelo estudiado y en donde es posible encontrar las condiciones óptimas de extracción. En la Tabla 4, se resumen las condiciones empleadas en el transcurso de todos los experimentos.

Tabla 4. Condiciones óptimas de extracción de LTB<sub>4</sub> para el diseño factorial 2<sup>5</sup>

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura Rotaevaporación	35,0	40,0	35,0
Glucógeno	1,0	1,5	1,5
Tiempo sacrificio	4,0	6,0	6,0
Alimentación	Con	Sin	Sin
Masa del individuo	200,0	300,0	300,0

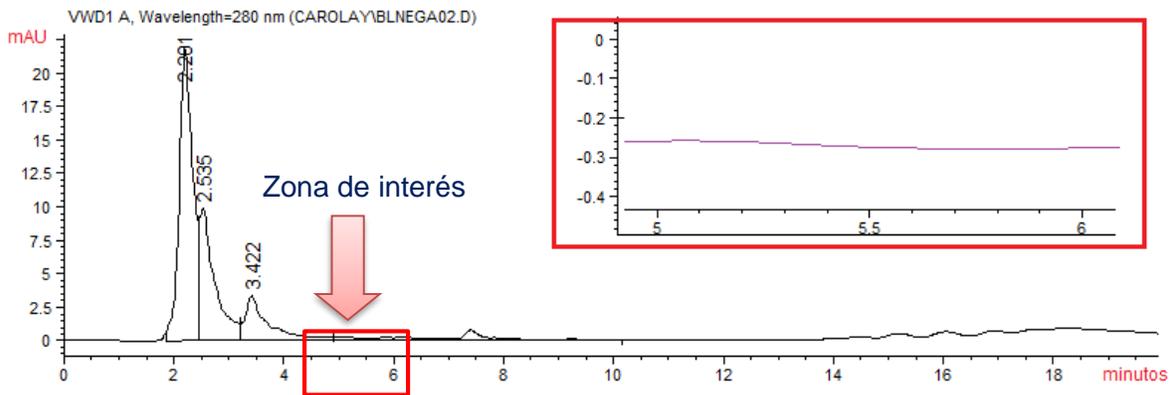
Con base en la información obtenida, se formuló un protocolo para la extracción de los LTB<sub>4</sub> a partir de ratas inducidas con inflamación, ver anexo 1. Posteriormente se realizaron los estudios referentes al mecanismo antiinflamatorio del extracto acuoso de la planta versus el control positivo de un fármaco comercial.

### 5.2.1. Resultados cromatográficos de CLAR de los diferentes tratamientos

Tomando como referencia la metodología descrita en el apartado 4.3.3, el lavado peritoneal se dividió en tres porciones, a cada una de las cuales se sometió a un tratamiento diferente. Para identificar adecuadamente el LTB<sub>4</sub> vía cromatográfica se realizaron los blancos correspondientes a reactivos, fármaco antiinflamatorio (ketoprofeno) y extracto acuoso vegetal, para los cuales se registró el perfil cromatográfico correspondiente.

La figura 12 muestra el cromatograma de una muestra blanco de reactivos a una longitud de onda de 280 nm ( $\lambda$  de absorción del LTB<sub>4</sub>). La muestra blanco de reactivos, identificada como un control negativo del lavado peritoneal de rata, está constituida por PBS pH 7,2, ionóforo de calcio a concentración de 1  $\mu$ g/L y cloruro de calcio 0,9 mM.

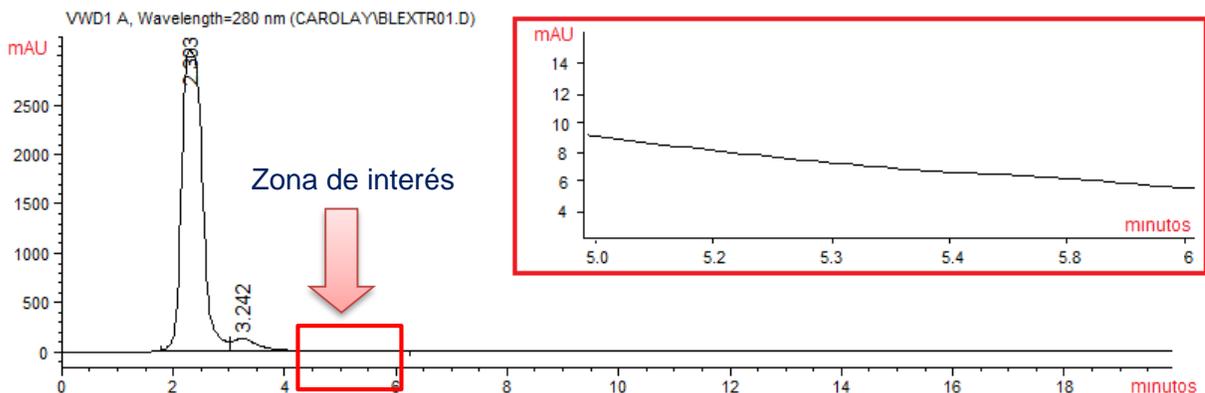
## 5. Resultados y análisis de resultados



**Figura 12.** Cromatograma del blanco de reactivos que contiene buffer, ionóforo de calcio y cloruro de calcio. Protocolo sección 4.3 de la metodología.

En la figura 12 se observa el perfil cromatográfico del blanco de reactivos, en el cual se observan picos a tiempos de retención de 2,281, 2,535 y 3,422 minutos, que son característicos del blanco de reactivos (ionóforo y glucógeno). Por otro lado, se puede observar que entre los 5 y 6 min la línea base del sistema no registró picos cromatográficos; esta zona es considerada la de interés pues en anteriores investigaciones [64] registraron la presencia del leucotrieno, utilizando los mismos parámetros cromatográficos y la misma instrumentación. La absorción del blanco de reactivos a 280 nm corresponde a transiciones electrónicas de insaturaciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de cromóforos del blanco de reactivos. La estructura química del ionóforo de calcio A23187, tiene varias insaturaciones en sus anillos, lo que sugiere varias transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

En la figura 13 se presenta el cromatograma del blanco de reactivos con extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus*, esta muestra contiene PBS pH 7,2, ionóforo de calcio a concentración de 1  $\mu\text{g/L}$ , cloruro de calcio 0,9 mM y el extracto acuoso de la planta a 0,0075 g/mL.



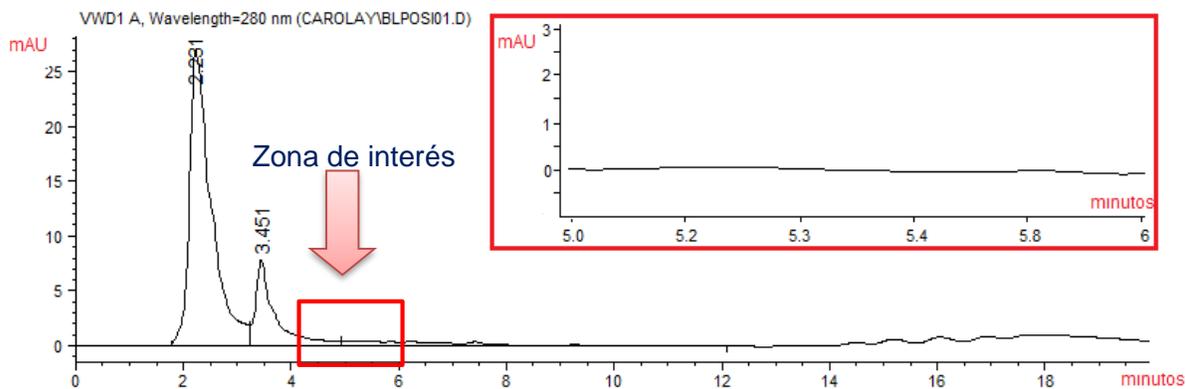
**Figura 13.** Cromatograma del blanco de reactivos y extracto acuoso de la planta. Protocolo de la sección 4.3 de la metodología. Reactivos: buffer, ionóforo de calcio y cloruro de calcio

El cromatograma del blanco del extracto acuoso presenta picos de absorción de gran intensidad a tiempos de retención de 2,303 y 3,242 minutos pertenecientes al extracto

## 5. Resultados y análisis de resultados

de la planta, los picos del blanco en estas regiones son solapados con los anteriores; debido a los bajos tiempos de retención se presume la existencia de compuestos altamente polares. La zona comprendida entre 5 y 6 min nuevamente se observa limpia. Los picos registrados por la planta se deben a compuestos químicos del extracto acuoso que absorben a 280 nm. Giraldo y Gutiérrez, 2001 reportaron en sus anexos, estudios fitoquímicos de la fracción etanólica y clorofórmica encontrando alcaloides, derivados de cumarina, esteroides y triterpenos, flavonoides y taninos [9].

En la figura 14 puede observarse el cromatograma del blanco control positivo, esta muestra contiene los reactivos del blanco y el fármaco ketoprofeno a una concentración de 0,025 mg/mL.



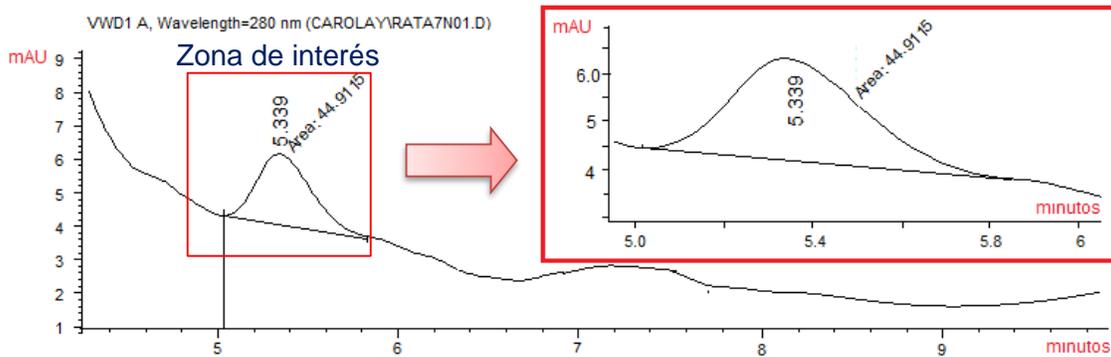
**Figura 14.** Cromatograma del blanco positivo, que contiene reactivos y ketoprofeno a 0,025 mg/mL. Protocolo de la sección 4.3 de la metodología.

Los picos cromatográficos que se reportan son los característicos del blanco de reactivos solapados a los del ketoprofeno que salen a 2,231 minutos y más adelante un pico cromatográfico a 3,451 minutos. El ketoprofeno es un ácido orgánico con varias instauraciones en sus anillos bencénicos, en un espectro UV a 280 nm el ketoprofeno presenta una máxima absorción [79].

La figura 15 representa el cromatograma de una muestra control negativo que contiene los reactivos del blanco y el lavado peritoneal de la rata sometidos al modelo de inhibición de leucotrienos.

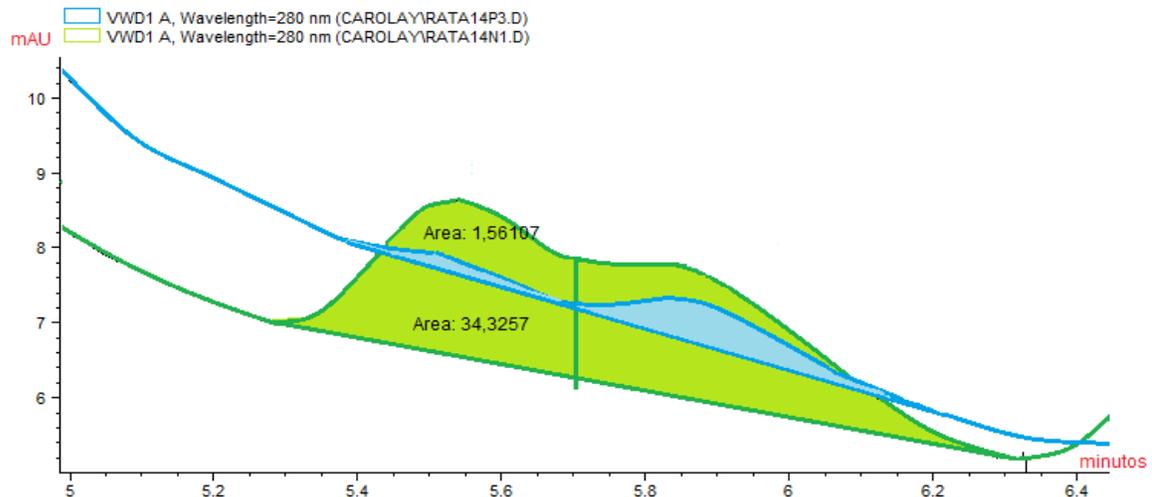
En este cromatograma se puede encontrar un aumento significativo en la intensidad de los picos de absorción a 2,353 minutos debido a sustancias presentes en el lavado peritoneal de rata. En el rango de 5 - 6 minutos se observa la presencia de un pico no registrado en los blancos anteriores, cuyo tiempo de retención es  $5,388 \pm 0,160$  minutos que, al compararlo con el obtenido por el trabajo de Arce, 2001, el cual tuvo un tiempo de retención de 5,322 min, se puede referenciar probablemente como un eicosanoide presente en la fracción del lavado peritoneal e identificado, en el trabajo anteriormente mencionado, como LTB<sub>4</sub>.

## 5. Resultados y análisis de resultados



**Figura 15.** Cromatograma de la muestra control, contiene los reactivos del blanco y el lavado peritoneal de rata. Protocolo de la sección 4.3 de la metodología.

La figura 16 representa el cromatograma de la muestra tratada con el fármaco ketoprofeno. La muestra contiene los reactivos del blanco, el lavado peritoneal de rata y el ketoprofeno como fármaco antiinflamatorio.

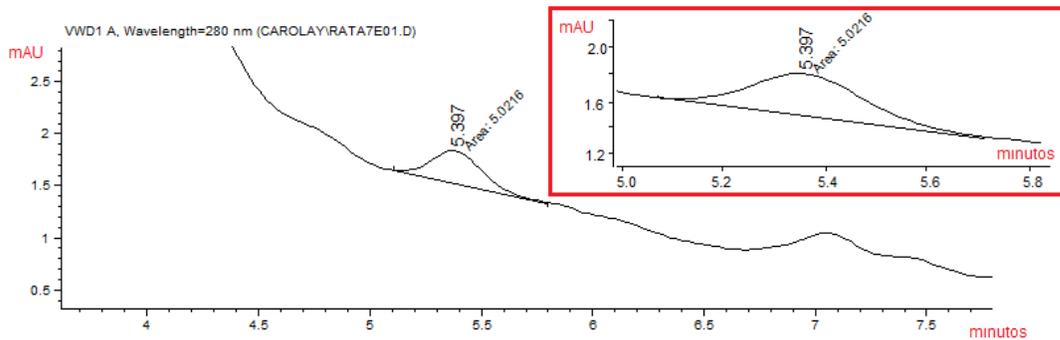


**Figura 16.** Cromatograma de la muestra control positivo, contiene los reactivos del blanco, el lavado peritoneal de rata y ketoprofeno a 0,0025 mg/mL.

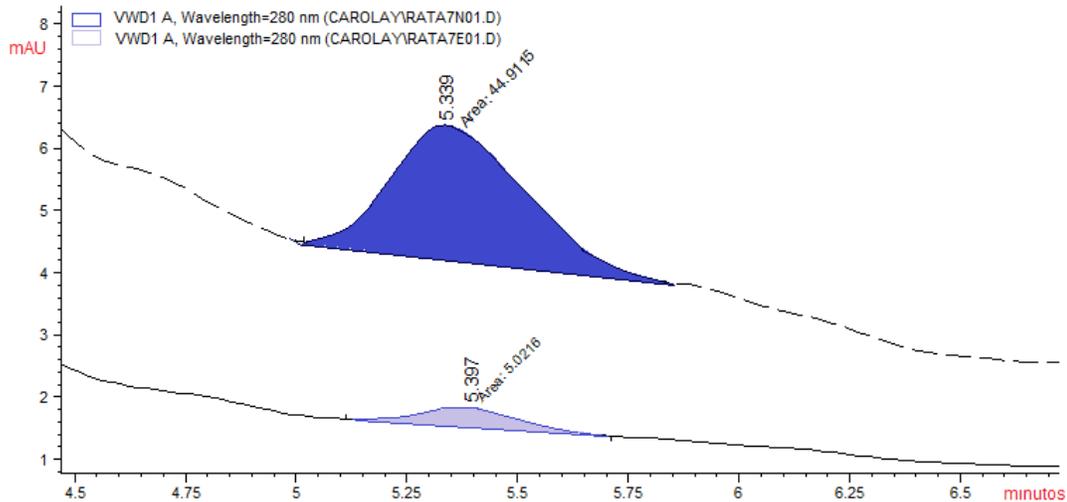
En el cromatograma, se observan los picos del blanco de reactivos, del ketoprofeno y del lavado peritoneal de rata descritos anteriormente; se encuentra además que el pico a  $5,388 \pm 0,16$  minutos disminuye en un 95,452 % comparado con la muestra del control negativo, verificando así que el fármaco ketoprofeno, es un antiinflamatorio no esteroideo con una potente acción sobre las lipooxigenasas inhibiendo la oxidación de derivados del AA. Esto verifica la presencia de una sustancia generada por los LPMN y que responde a la actividad del fármaco; lo anterior es evidente por la disminución del área del pico cromatográfico ( $LTB_4$ ) mientras que el resto del perfil permanece inalterado. Ahora bien, el paso siguiente fue comparar la actividad del extracto acuoso de la planta frente a la sustancia denominada eicosanoide  $LTB_4$ . En la figura 17 se observa el cromatograma de una muestra que contiene el extracto acuoso de la planta

## 5. Resultados y análisis de resultados

*C. hermaphroditus* en lugar del fármaco antiinflamatorio previamente analizado, ketoprofeno, los reactivos y el lavado peritoneal de la rata.



**Figura 17.** Cromatograma de la muestra con extracto acuoso de *C. hermaphroditus*, contiene los reactivos del blanco y el lavado peritoneal de rata. Protocolo 4.3 de la metodología.



**Figura 18.** Comparación del cromatograma control negativo y el cromatograma de la muestra con extracto acuoso de *C. hermaphroditus*.

En la figura 18 se puede apreciar la disminución del área del pico cromatográfico a  $5,388 \pm 0,160$  min en un 88,82 %, esta remoción se debe a compuestos presentes en las raíces de la planta con actividad inhibitora.

En la tabla 5 y 6, se resumen los porcentajes de remoción del eicosanoide LTB<sub>4</sub> a partir del lavado peritoneal de rata con los dos tratamientos: con extracto acuoso de la planta y con el ketoprofeno como fármaco antiinflamatorio. La tendencia de disminución de la señal cromatográfica se obtuvo en un 97,2 % y 89,2 %, esto indica la remoción de las sustancias antiinflamatorias por parte del extracto y del fármaco respectivamente.

## 5. Resultados y análisis de resultados

Tabla 5. Área, desviación estándar y % de disminución del pico cromatográfico a  $5,388 \pm 0,160$  minutos en muestra control y el tratamiento con extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus*.

Biomodelo	Muestra control	Muestra extracto	% de disminución
Rata 1	9,17931 $\pm$ 2,31392	ND	100
Rata 2	39,96820 $\pm$ 8,57013	4,02325 $\pm$ 0,69994	89,88640 $\pm$ 0,44236
Rata 3	3,79713 $\pm$ 0,78946	ND	100
Rata 4	5,56671 $\pm$ 1,39479	ND	100
Rata 5	44,91150 $\pm$ 0,79853	5,0216 $\pm$ 0,78321	88,8189 $\pm$ 1,95606
PROMEDIO			97,20472 $\pm$ 0,75685

<sup>1</sup> ND: No detectado a 280 nm

Tabla 6. Área, desviación estándar y % de disminución del pico cromatográfico a  $5,388 \pm 0,160$  minutos en muestra control y el tratamiento positivo, ketoprofeno.

Biomodelo	Muestra control	Muestra con ketoprofeno	% de disminución
Rata 1	26,16330 $\pm$ 2,28090	3,17704 $\pm$ 2,54297	86,28414 $\pm$ 0,15407
Rata 2	24,88230 $\pm$ 2,31784	2,29492 $\pm$ 2,67147	90,77690 $\pm$ 0,10664
Rata 3	11,91935 $\pm$ 1,49716	1,78321 $\pm$ 1,26092	85,03937 $\pm$ 0,12797
Rata 4	26,46145 $\pm$ 8,34902	2,01005 $\pm$ 3,08009	89,36009 $\pm$ 0,03113
Rata 5	34,35270 $\pm$ 4,53670	1,56107 $\pm$ 0,42011	95,45576 $\pm$ 0,01362
PROMEDIO			89,18326 $\pm$ 0,22944

El siguiente esquema resume las condiciones de extracción de los LPMN a partir del lavado peritoneal de ratas.

Figura 19. Esquema general de las condiciones de extracción del LTB<sub>4</sub>



## 5. Resultados y análisis de resultados

### 3. PRODUCCIÓN DEL LTB<sub>4</sub> Y SEPARACIÓN



### 4. ANÁLISIS CLAR DEL LTB<sub>4</sub>



20 µL

C18ODS

280 nm (UV-Vis)

Met/Agua/A.Acético

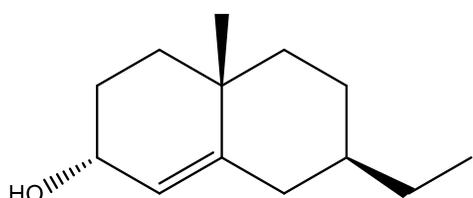
20 Min

Se han aislado muchos compuestos de las plantas *Cyperus* que pueden estar asociados a la capacidad inflamatoria, algunos presentes en sus raíces, otros en el extracto acuoso, sin embargo, no existe una prueba concluyente acerca de los metabolitos más importantes para la especie *C. hermaphroditus*. Giraldo y Gutierrez, 2001 asociaron la actividad antiinflamatoria del extracto a una posible fracción beta-sitosterol en la muestra responsable de efectos antiinflamatorios, como la presentada por *C. rotundus* [9], [25].

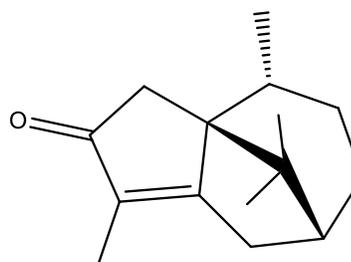
En la literatura se describen muchos estudios antiinflamatorios de las plantas *Cyperus*, se han encontrado metabolitos responsables de esta actividad como es el caso de los aislados por *C. rotundus* (cyperene, cariofileno, cyperol, rotundiene, cyperene, metoxi cyperotundol, oxo-isolongifolene,  $\alpha$ -gurjuneno, acetato de Z valereryl 3,4-dihidroxifenil, quercetina, kamperol, catequina, miricetina, cyperotundol, entre otros [8]), algunos de estos compuestos con nuevas estructuras, propios de este género *Cyperus*, lo que sugiere que puedan estar presentes en *Cyperus hermaphroditus*. En la figura siguiente se exponen las dos estructuras (cyperol y cyperotundol) aisladas de este género. En el anexo 6 se encuentra otras estructuras aisladas.

Estructura 1. Compuestos aislados de las especies *Cyperus*.

Cyperol



Cyperotundol



## 5. Resultados y análisis de resultados

Los compuestos aislados de las plantas *Cyperus* responden a los buenos resultados farmacológicos encontrados para las plantas evaluadas. Como se demostró por el método de inhibición de leucotrienos, la planta estudiada presenta actividad antiinflamatoria mediada por lipooxigenasas; en la literatura hay evidencia que metabolitos específicos o efectos sinérgicos del extracto pueden tener conexión en la inhibición de derivados del AA, por ejemplo las ciperonas, inhiben la síntesis de las prostaglandinas mediadores de la inflamación, también en *Cyperus cyperoides* su actividad antiinflamatoria se presentó gracias a su contenido en tricina y luteolina, así como de ciperaquinona [29], [80], [81].

Como se ha descrito, los estudios reportados en la literatura demuestran que este género es un gran antiinflamatorio, y que metabolitos de la planta pueden actuar en la inhibición de leucotrienos y posiblemente sobre prostaglandinas y tromboxanos.

### 5.2.2. Identificación de la fracción cromatográfica a $5,388 \pm 0,16$ minutos por espectrometría de masas.

Para la identificación del pico cromatográfico correspondiente al tiempo de retención de  $5,388 \pm 0,16$  min, se recolectó la fracción de la fase móvil al tiempo establecido con el fin de analizarse por espectrometría de masas (EM), esta fracción es responsable de la inflamación en la rata y es inhibida por el fármaco AINES ketoprofeno. El fragmentograma obtenido a 9,917 minutos por EMS se presenta en la figura 20.

## 5. Resultados y análisis de resultados

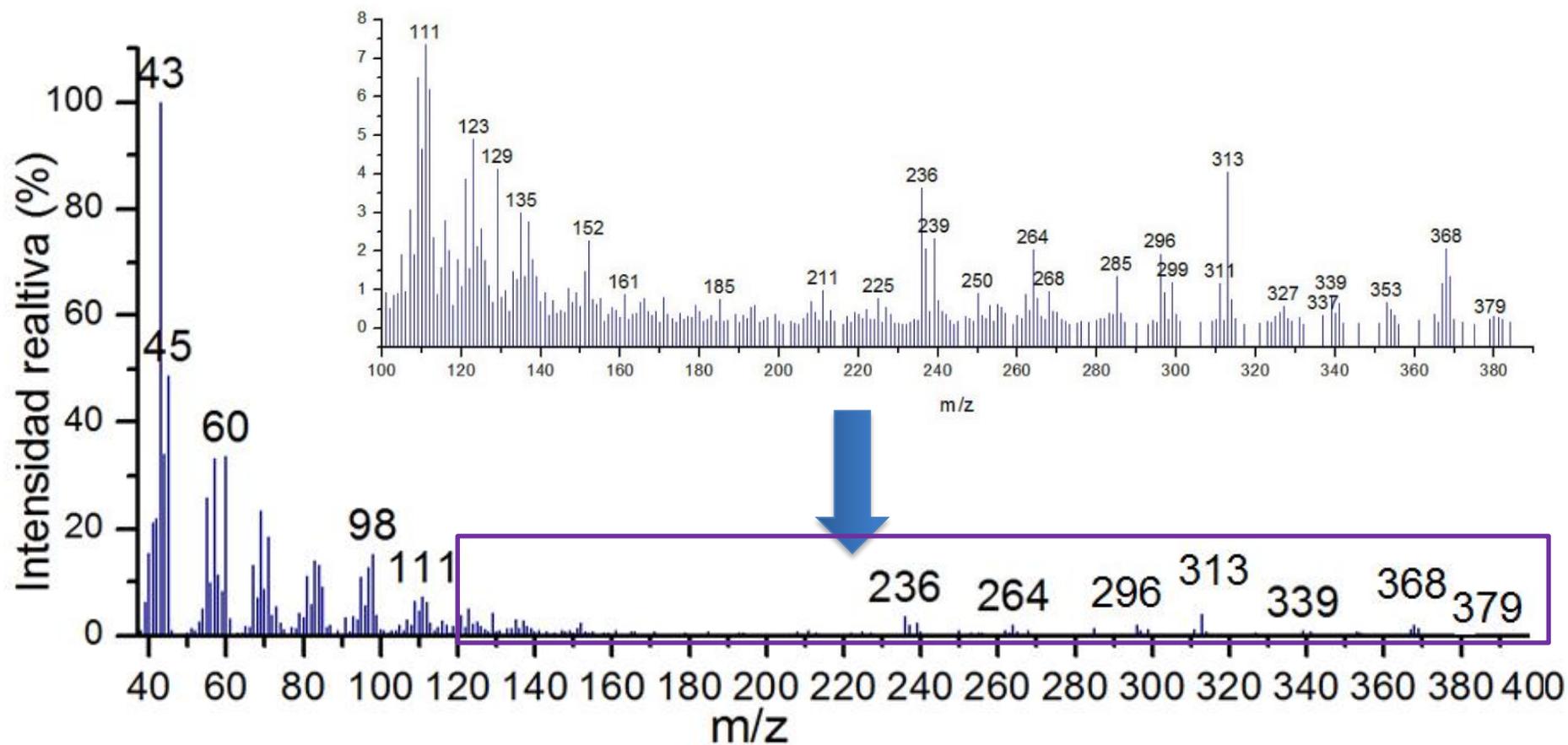
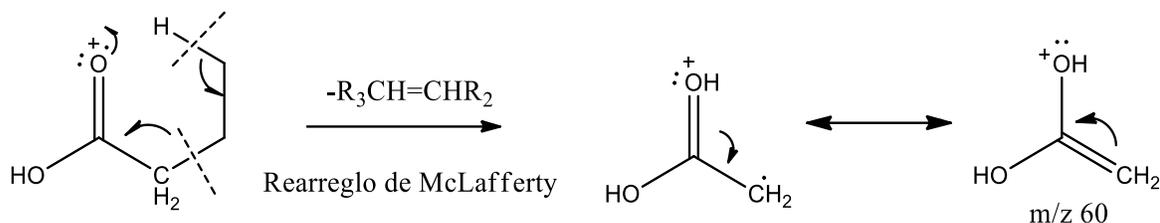


Figura 20. Fragmentograma EM del pico cromatográfico a  $5,388 \pm 0,16$  minutos obtenido por CLAR.

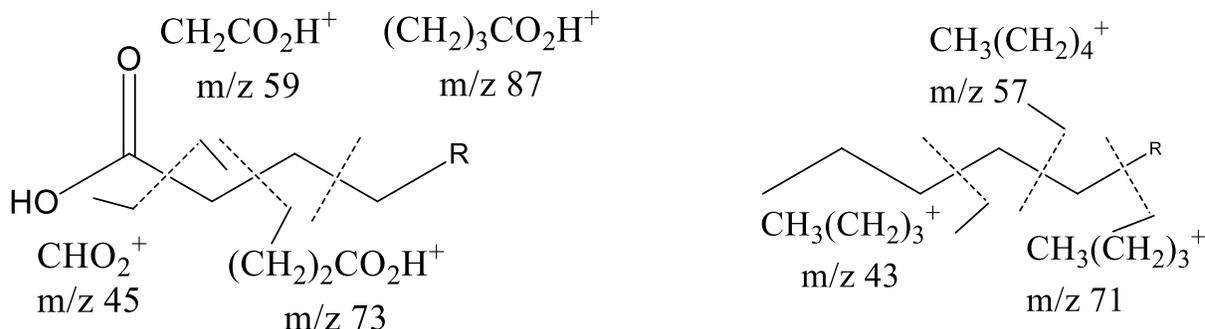
## 5. Resultados y análisis de resultados

La Figura 21 muestra un pico  $m/z$  a 43 seguido de 45 y 60. El pico más característico de los ácidos es  $m/z$  60 debido al rearrreglo de McLafferty, como se observa en la figura 21.



**Figura 21.** Rearreglo de McLafferty para ácidos carboxílicos.

Para ácidos con cadena larga, se puede encontrar dos series de picos resultantes de la escisión de los enlaces C-C, si se retiene la carga en el fragmento con oxígeno  $m/z$  (45,59,73,87,...) o en el fragmento alquilo  $m/z$  (43,57,71,85,...) [82] (Ver figura 22). En el fragmentograma se observan las dos series, esto sugiere la presencia un ácido con cadena larga que inicia y termina con enlaces C-C tipo saturados. La primera serie acaba en  $m/z$  73 y la segunda en 71 (no se encuentra  $m/z$  relevantes a 101 y 87). Esto sugiere una cadena inicial del tipo  $\text{HO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{R}$  y una cadena final  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{R}$ . Los ácidos grasos derivados del ácido araquidónico presentan un  $m/z$  a 111 característico de la terminación de la cadena del mismo ácido.



**Figura 22.** Escisiones de ácidos carboxílicos alifáticos

El ion molecular de la muestra analizada limita a compuestos con peso molecular menor a 379, los leucotrienos con esta característica son el  $\text{LTA}_4$  y el  $\text{LTB}_4$ .

Al secar la muestra separada por CLAR se evapora el metanol, agua y el ácido acético que en solución acuosa puede reaccionar con el compuesto extraído. El ácido acético puede perder el protón del grupo carboxilo, su  $\text{pK}_a$  es de 4,8 a 25 °C, lo cual sugiere que, a pH moderadamente ácido (4,9), alguno de sus iones hidrógenos se habrán desprendido, permitiendo un ataque del leucotrieno al ácido para formar el éster correspondiente con eliminación de agua. Para el  $\text{LTB}_4$  el peso del éster es igual a 378, por otro lado, el  $\text{LTA}_4$  no posee hidroxilos que puedan sufrir esterificación. La molécula del éster formado a partir del  $\text{LTB}_4$  se muestra en la figura 23.

## 5. Resultados y análisis de resultados

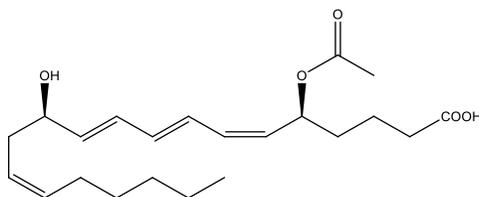
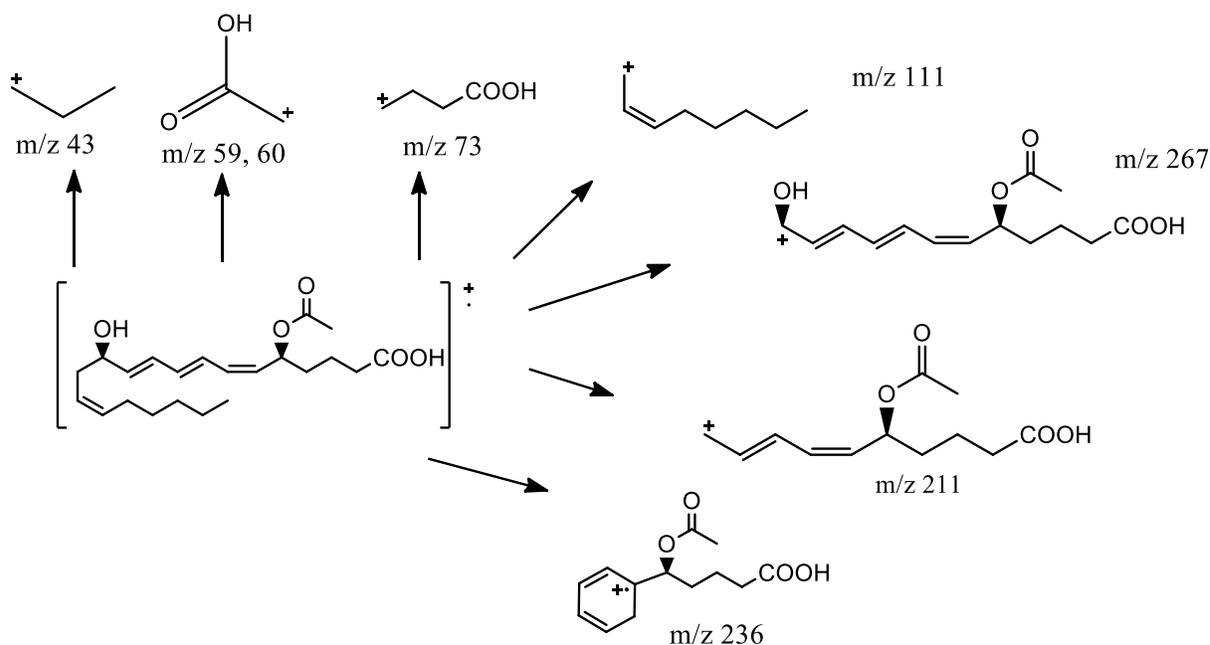


Figura 23. Ester del LTB<sub>4</sub> y su fragmentación.

Para este compuesto las fracciones más comunes son:

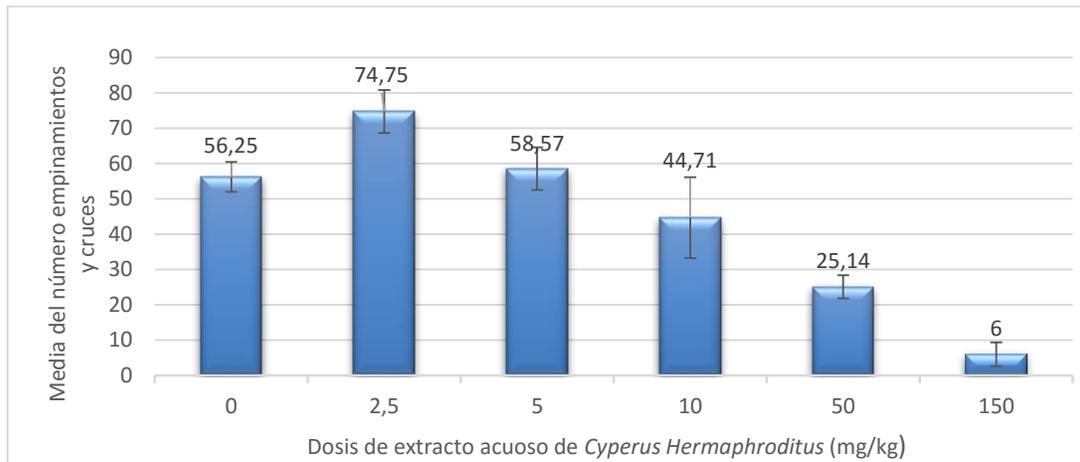


Arce, 2001 reportó en su trabajo de investigación que el pico cromatográfico a 5,3 minutos correspondía a LTB<sub>4</sub> y PGG<sub>2</sub>. Es posible que en la muestra aislada por CLAR se evidencien distintas sustancias inflamatorias, sin embargo, ninguno de los derivados del ácido araquidónico responde al pico 313 ó 129 con un ion molecular de 379, como se indica en el fragmentograma.

### 5.3. PRUEBAS CONDUCTUALES COMO MODELOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA Y ANTIDEPRESIVA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Cyperus hermaphroditus*.

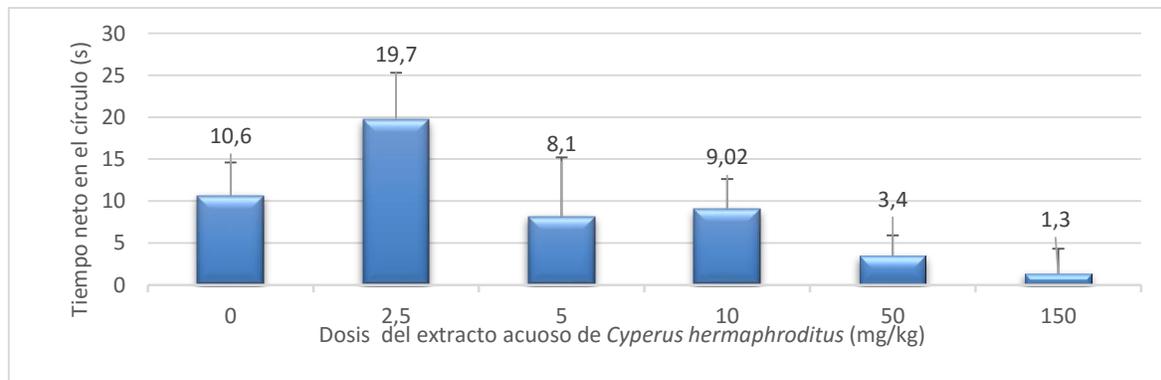
#### 5.3.1. Determinación de la dosis de extracto a utilizar

Para establecer la dosis del extracto acuoso que presentó la mayor actividad exploratoria en las pruebas conductuales, se realizó la prueba de campo abierto la cual fue descrita en la metodología sección 4.4.2. Los datos fueron tomados en la prueba (observación in situ) y en la videograbación. Para cada dosis se reporta la media del parámetro conductual  $\pm$  la desviación estándar registrado en el grupo de ratones. La figura 24 y 25, muestran la media del número de empujamiento y cruces, y el tiempo neto en el círculo, evaluados para la curva conductual que inicio en 0,0 mg/kg y finalizó en 150,0 mg/kg de extracto acuoso de *C. hermaphroditus*.



**Figura 24.** Efecto del extracto de *Cyperus hermaphroditus* a distintas dosis sobre el número de empujamientos y cruces del círculo central. ( $p \leq 0,05$ ) entre todos los grupos excepto en la dosis de 5 mg/kg con la de 0 mg/kg.

Cada columna contiene la media  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 25.** Efecto del extracto de *Cyperus hermaphroditus* a distintas dosis sobre el tiempo neto en el círculo central. ( $p \leq 0,05$ ) solo para la dosis de 2,5 mg/kg y control negativo

## 5. Resultados y análisis de resultados

En la primera dosis a 2,5 mg/kg, se observa un aumento de la conducta exploratoria respecto al control. A dosis más altas la conducta exploratoria disminuye y es observada en los biomodelos como una respuesta de aislamiento, molestia e inmovilidad. A una dosis de 150 mg/kg, después de algunos días se presentó mortalidad de varios especímenes. La figura 26 muestra el aislamiento presentado por un biomodelo al ser inyectado con una dosis alta del extracto acuoso de la planta.



**Figura 26.** Fotografías de un biomodelo inyectado i.p. con una dosis alta del extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus*. El biomodelo está situado en el equipo de la prueba de campo abierto

Giraldo y Gutiérrez 2001, reportaron que a una dosis de 2000 mg/kg del extracto acuoso de *C. hermaphroditus*, no se presentaba mortalidad ni ningún efecto adverso anticoagulantes y ulcerogénicos apreciable, sin embargo, produjo leve degeneración hidropónica renal [9]. El extracto acuoso de *C. hermaphroditus* obtenido en esta investigación fue liofilizado, lo que sugiere que el extracto se encontraba más concentrado que el presentado por Giraldo y Gutiérrez, 2001, esto explica que a una dosis de 150 mg/kg se presentara mortalidad en los ratones. Por otro lado, es reportado a dosis altas la disminución de la conducta exploratoria en ratones considerada como comportamiento pasivo, somnolencia y movimientos estereotipados lo que llevó a considerar acción depresora sobre el SNC.

En los gráficos 24 y 25 se puede observar que la dosis del extracto acuoso de *C. hermaphroditus* capaz de aumentar significativamente la conducta exploratoria de los ratones respecto al control, medida en términos del número de empujamiento y cruces del círculo central, y latencia ó tiempo total neto en el círculo central en el campo abierto fue de 2,5 mg/kg. Esta dosis es elegida como dosis de extracto para utilizar en las pruebas conductuales posteriormente realizadas.

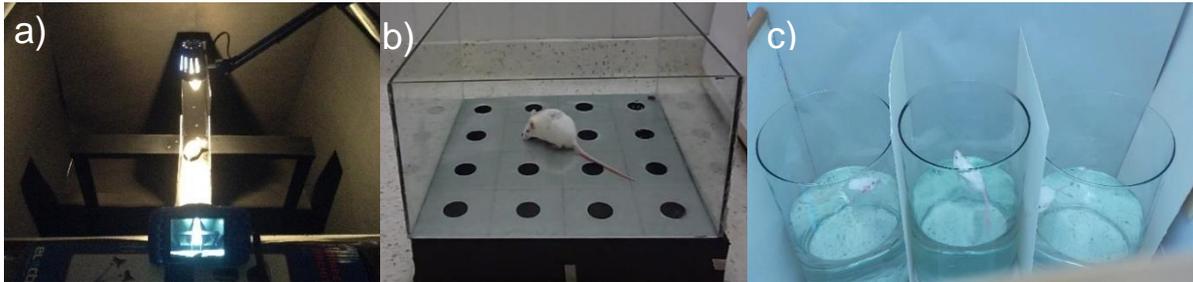
### 5.3.2. Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales utilizadas para determinar la ansiedad fueron el laberinto elevado en cruz y la prueba del tablero agujereado. La prueba para determinar el efecto

## 5. Resultados y análisis de resultados

antidepresivo del extracto fue el nado forzado. La figura 27 muestra fotografías tomadas en el momento de la experimentación de las pruebas conductuales.

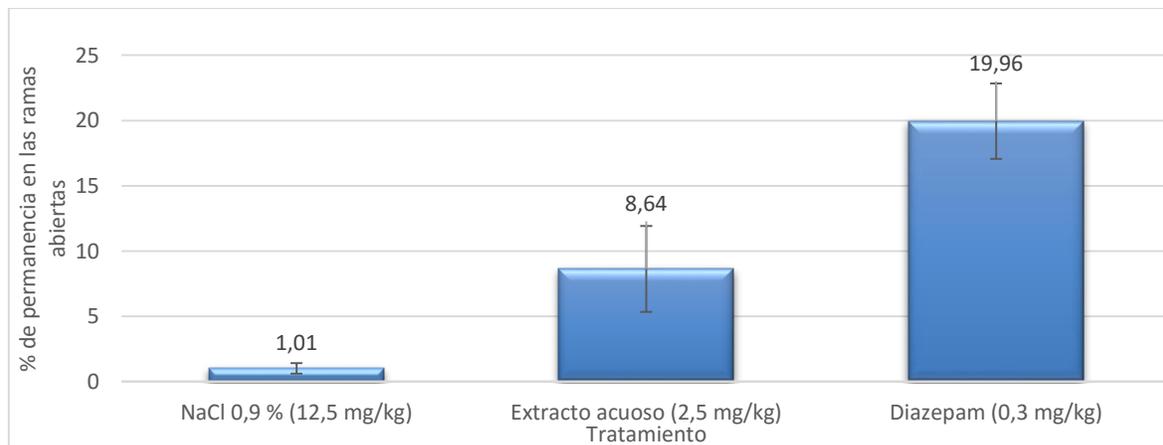
### 5.3.2.1. Determinación de la actividad ansiolítica mediante el laberinto elevado en cruz y el tablero agujereado.



**Figura 27.** Fotografías tomadas de las sesiones experimentales de conducta exploratoria. a) Laberinto en cruz b) Tablero con agujeros c) nado forzado.

La figura 28 muestra el porcentaje de tiempo de permanencia de los ratones en las ramas abiertas respecto al tiempo total de exploración del laberinto en cruz. El control negativo (solución salina) presentó un porcentaje de permanencia igual a  $1,01 \pm 0,40$  %, el extracto por otro lado, aumento el porcentaje a  $8,64 \pm 3,29$  % y el diazepam presentó un porcentaje igual a  $19,96 \pm 2,89$  %.

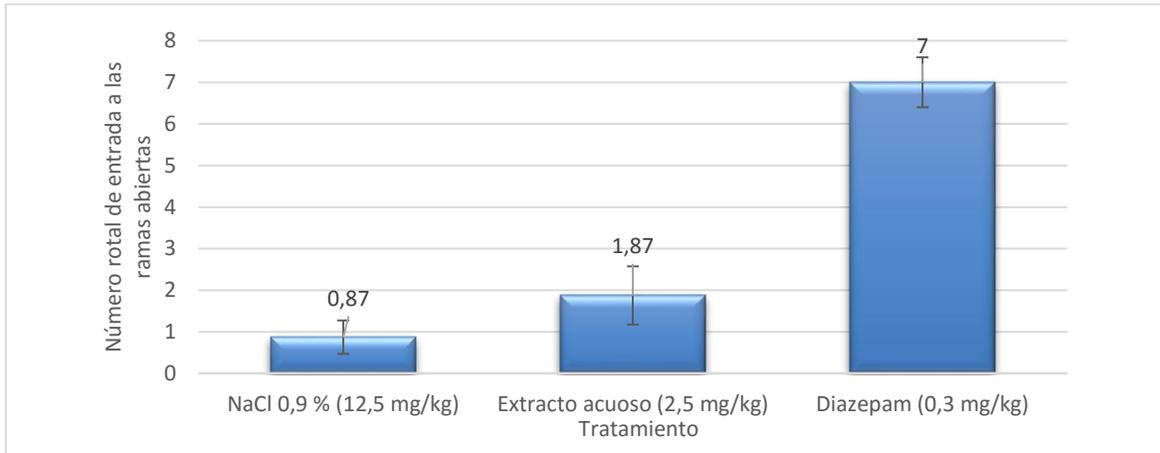
Estos datos fueron comparados con los realizados por Cofre, 2009 [40] y se observa que el porcentaje de permanencia para los grupos control negativo y positivo son similares 2,94 % y 18,83 % respectivamente a un nivel de confianza de un 95 %.



**Figura 28.** % de permanencia registrada para los tres tratamientos realizados en la prueba del laberinto en cruz elevado.

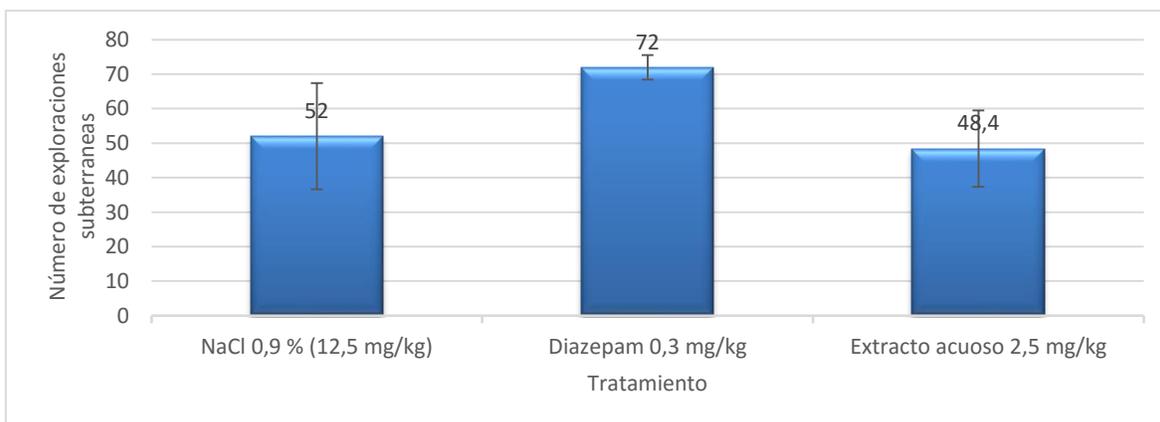
En la figura 29 se presentan los resultados obtenidos para el número total de entradas de los ratones a las ramas abiertas, el control negativo presentó un valor igual a  $0,87 \pm 0,4$ , el extracto a  $1,87 \pm 0,7$  y con el diazepam  $7,0 \pm 0,6$ .

## 5. Resultados y análisis de resultados



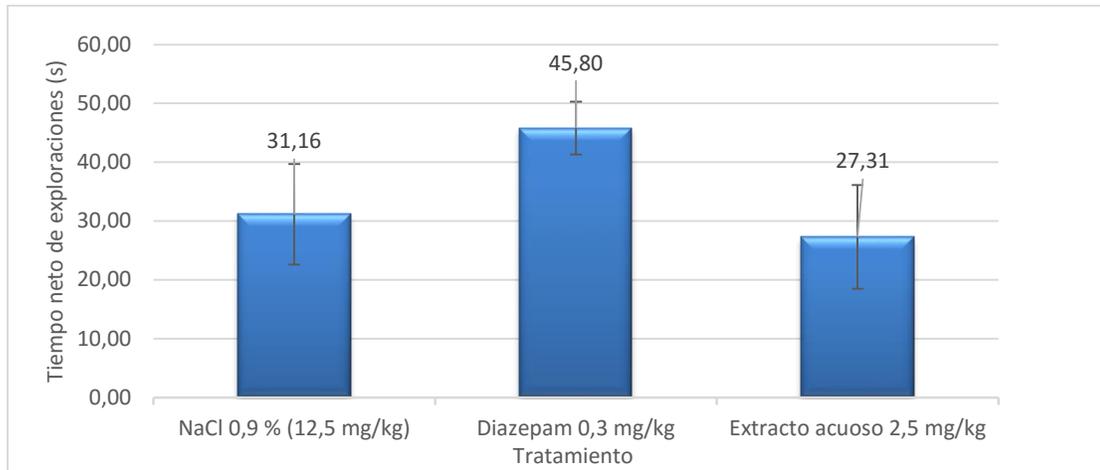
**Figura 29.** Efecto de los tres tratamientos: cloruro de sodio, extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* y diazepam sobre el número total de entradas a las ramas abiertas. (( $p \leq 0,05$ ) para control positivo y control negativo).

Este primer resultado sugiere actividad ansiolítica o estimuladora expresada como un incremento en el porcentaje de permanencia y un número total de entradas a las ramas abiertas. A pesar de ello, la ansiedad es un cuadro clínico complejo que debe ser evaluado en por lo menos dos pruebas conductuales. El siguiente gráfico muestra el efecto de los distintos tratamientos sobre el número de las exploraciones subterráneas durante cinco minutos de duración en la prueba del tablero agujereado. El número de exploraciones para el control tratado con NaCl fue de  $52 \pm 15,4$ , para el extracto acuoso fue de  $48,4 \pm 11,1$  y para el diazepam fue de  $72 \pm 3,6$ . La grafica 31, resume el tiempo neto de las exploraciones subterráneas; para el tratamiento negativo se registra un tiempo igual a  $31,16 \pm 8,5$  s para el tratamiento positivo se registra un tiempo igual a  $45,8 \pm 4,5$  y para el extracto acuoso de *C. hermaphroditus* se registró un valor igual a  $27,31 \pm 8,82$  s.



**Figura 30.** Efecto de los tres tratamientos: cloruro de sodio, extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* y diazepam sobre el número de exploraciones subterráneas en la prueba del tablero abierto con agujeros. (( $p \leq 0,05$ ) para control positivo y control negativo).

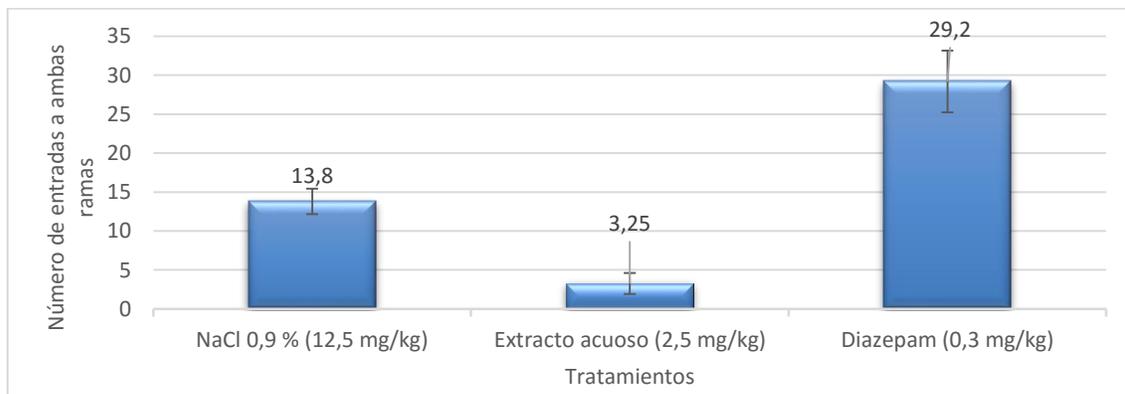
## 5. Resultados y análisis de resultados



**Figura 31.** Efecto de los tres tratamientos cloruro de sodio, extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* y diazepam, sobre el tiempo de exploraciones subterráneas realizadas por los ratones en la prueba del tablero agujereado. (( $p \leq 0,05$ ) para control positivo y control negativo).

En las figuras 30 y 31 se pueden apreciar que el extracto no posee actividad ansiolítica en la prueba de tablero con agujeros lo que implica que efectos posiblemente estimuladores de la planta puedan causar un porcentaje mayor respecto al control en la prueba del laberinto, no sólo en las ramas abiertas del laberinto en cruz sino también en ramas cerradas. Estudios demuestran que ratas con lesiones en el hipocampo dorsal son hiperactivas, pero no son ansiolíticas, lo que genera un falso positivo en la prueba del laberinto en cruz [69], [83]. También, es bien conocido que el test del laberinto en cruz no tiene gran sensibilidad agonistas parciales de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, antagonistas 5-HT<sub>3</sub> y antagonistas CCK<sub>B</sub> [84].

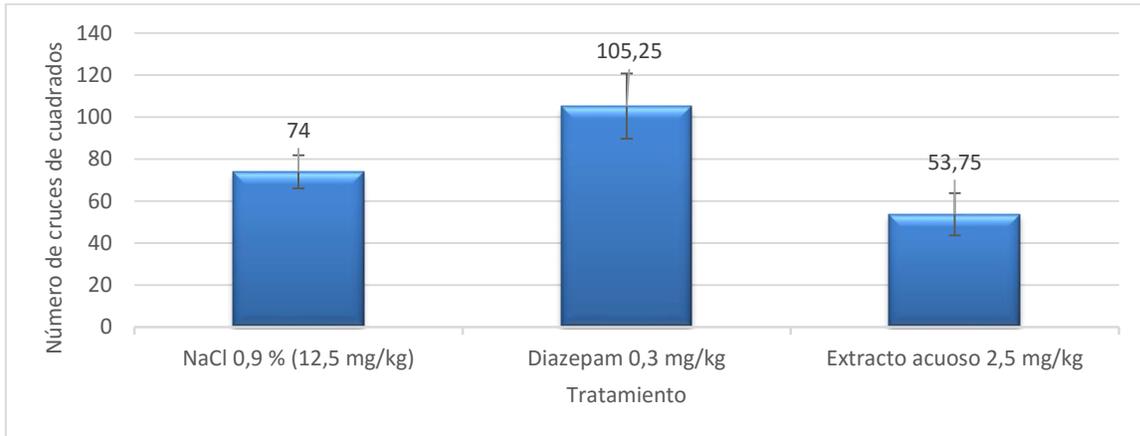
La figura 32 presenta los resultados obtenidos de la actividad motora de los ratones en el laberinto expresados como el número total de entradas a ambas ramas. Los resultados arrojan un valor de  $13,8 \pm 1,6$  para el control negativo,  $3,25 \pm 1,4$  para el extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* y  $25,2 \pm 4,0$  para el control positivo.



**Figura 32.** Efecto de los tres tratamientos: cloruro de sodio, extracto acuoso de *C. hermaphroditus* y diazepam sobre el número total de entrada a ambas ramas del laberinto elevado en cruz. (( $p \leq 0,05$ ) para todos los grupos)

## 5. Resultados y análisis de resultados

Por otro lado, la actividad motora es medida en la prueba del tablero agujereado como el número de cruces de los cuadrados, la figura 33 muestra que para el tratamiento negativo se registra un valor igual a  $74 \pm 7,9$  para el tratamiento positivo se obtuvieron  $105,25 \pm 15,5$  veces y para el extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* se registra un valor igual a  $53,75 \pm 10,1$ .



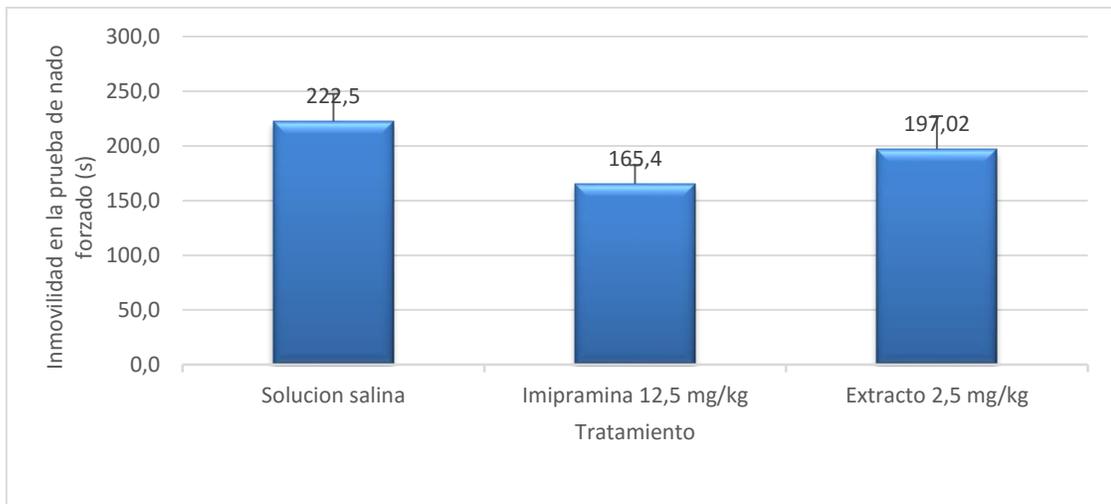
**Figura 33.** Efecto de los tres tratamientos cloruro de sodio, extracto acuoso de *C. hermaphroditus* y diazepam, sobre el número de cruces de cuadrados realizadas por los ratones en la prueba del tablero agujereado. (( $p \leq 0,05$ ) para control positivo y control negativo).

Las pruebas de ansiedad demuestran que el extracto acuoso de *C. hermaphroditus* no presenta actividad motora significativa expresada en la prueba de laberinto en cruz como número de entrada a ambas ramas y en la prueba del tablero agujereado expresada como número de cruces de los cuadrados.

### 5.3.2.2. Determinación de la actividad antidepresiva mediante la prueba de nado forzado

En la gráfica 34, pueden observarse los resultados obtenidos en la prueba de nado forzado, expresada como inmovilidad de los roedores durante 6 minutos. La inmovilidad para el tratamiento negativo fue igual a  $222,5 \pm 25,32$  s, la inmovilidad para el tratamiento positivo fue  $165,4 \pm 17,2$  s y el tratamiento para el extracto arrojó un valor igual a  $197,02 \pm 30,3$  s.

## 5. Resultados y análisis de resultados



**Figura 34.** Efecto de los tres tratamientos cloruro de sodio, extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* y diazepam, sobre la inmovilidad en la prueba de nado forzado. ( $p \leq 0,05$ ) entre todos los grupos.

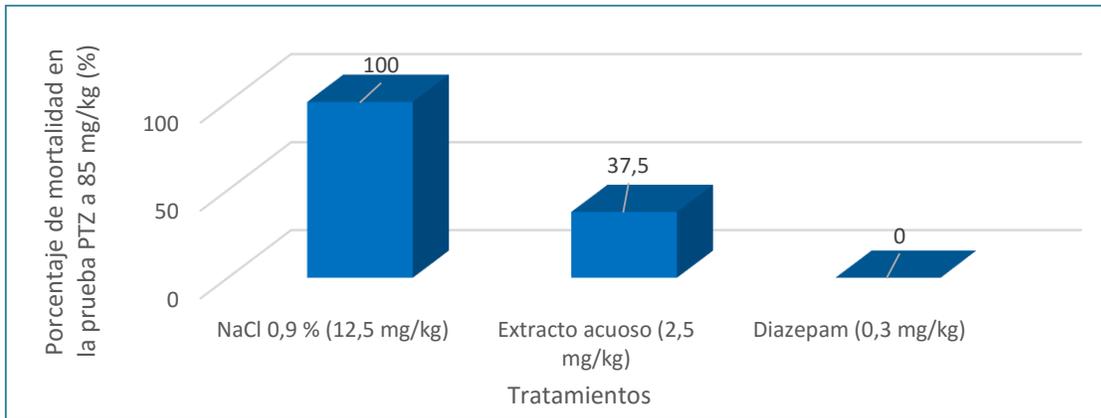
Los resultados demuestran actividad antidepresiva del extracto en un porcentaje igual a 12,74 % comparada con la imipramina 12,5 mg/kg con una actividad igual a 28,24 %. Giraldo y Gutiérrez, 2001 demostraron que el extracto de *Cyperus hermaphroditus* no posee acción depresora sobre el SNC en la prueba de la potenciación de la hipnosis experimental por amobarbital en ratones, además concluyen que la comparación de los tiempos de sueño producidos por el barbitúrico con la dosis probadas del extracto no mostraron diferencias significativas [9], esto nos lleva a concluir que la acción antidepresiva del extracto es dependiente de la dosis aplicada.

### 5.3.3. Test del PTZ

#### 5.3.3.1. Determinación de la actividad anticonvulsivante mediante el test PTZ (85 mg/kg)

La figura 35, indica el porcentaje de mortalidad producida en ratones después de ser inyectados con diferentes tratamientos, previa administración de PTZ, para producir convulsiones tónico-clónicas. La gráfica muestra actividad anticonvulsivante significativa para el extracto acuoso de *C. hermaphroditus*.

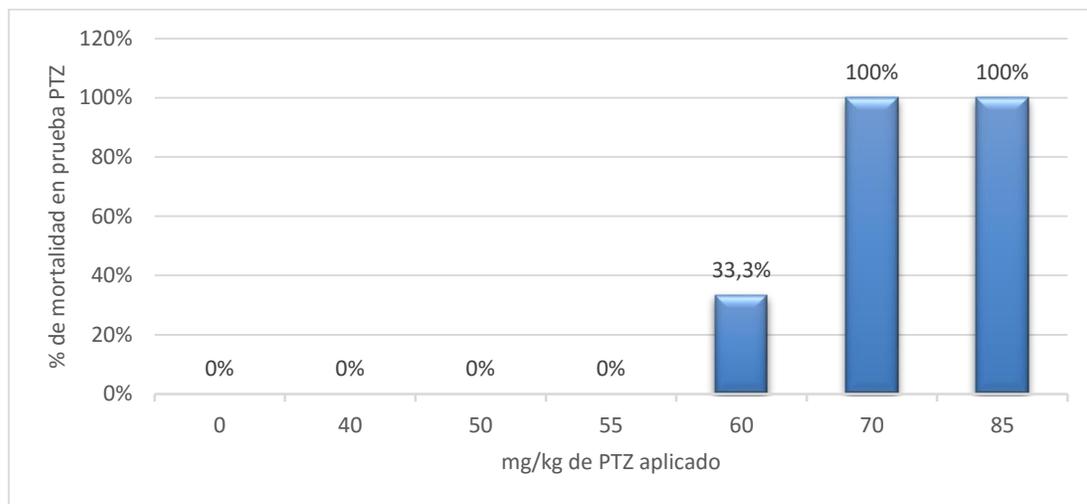
## 5. Resultados y análisis de resultados



**Figura 35.** Determinación de la actividad anticonvulsivante medida como porcentaje de mortalidad. (( $p \leq 0,05$ ) entre todos los grupos).

La acción sedante observada en las pruebas conductuales puede estar relacionada a la actividad anticonvulsivante. Giraldo y Gutiérrez reportaron que la actividad sedante sobre el SNC presentada por su extracto (dependiente de la dosis) estaría relacionada con la afinidad filogenética presentada por *C. articulatus*, con inhibición funcional de receptores aminoácidos excitatorios, inhibiendo receptores NMDA y por lo tanto estimulando las respuestas evocadas del GABA en las neuronas hipocampales de los ratones [9].

En la gráfica 36, se observa el porcentaje de mortalidad causada por la administración de PTZ a distintas dosis. En las primeras dosis de 0 a 40 mg/kg se observó crisis de ausencia, a dosis medias 50 y 55 mg/kg de PTZ se observaron convulsiones tónico clónica generalizadas y a dosis superiores a 60 las convulsiones causaban la muerte. La dosis óptima para observar convulsiones en un 100%, sin causar mortalidad a los especímenes fue 55 mg/kg.



**Figura 36.** Porcentaje de mortalidad a diferentes dosis de PTZ

## 5. Resultados y análisis de resultados

Después de optimizar la dosis de PTZ para los especímenes estudiados y con el fin de observar el tiempo y tipo de convulsiones producidas por el extracto a la dosis óptima de PTZ, se realizó el ensayo a 55 mg/kg. En la mayoría de los casos los roedores no mostraron convulsiones tónico-clónicas durante los primeros 30 minutos, en cambio se observaron espasmos de baja frecuencia y duración, los datos tomados de los videos observados no son suficientes para concluir el tipo de convulsiones y el efecto del extracto sobre la dosis aplicada.

### 6. CONCLUSIONES

El mecanismo de acción antiinflamatorio de *Cyperus hermaphroditus* se determinó mediante el modelo de la inhibición de leucocitos polimorfonucleares en un sistema *in vitro* procedente del lavado peritoneal de rata. El modelo se optimizó mediante un diseño estadístico sencillo a la metodología planteada por Arce, 2001 con los factores más determinantes del pico cromatográfico a  $5,388 \pm 0,16$  minutos, reconocido por ES como LTB<sub>4</sub>.

La actividad antiinflamatoria se evidenció por cromatografía líquida de alta resolución a través del pico cromatográfico identificado como LTB<sub>4</sub>. Los resultados mostraron que el extracto acuoso de *C. hermaphroditus* inhibió la producción del pico cromatográfico en un porcentaje igual a 97,2 % comparado con el ketoprofeno en un 89,2 %. Este resultado es la base para afirmar que la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso radicular de *C. hermaphroditus* es antiinflamatorio y está mediado por la vía de la 5-lipooxigenasa.

Las actividades antidepresiva y ansiolítica de la planta se evaluaron por primera vez a partir de modelos conductuales. La dosis del extracto acuoso radicular de *Cyperus hermaphroditus* inyectado i.p. en ratones capaz de aumentar significativamente la conducta exploratoria en el modelo de campo abierto fue 2,5 mg/kg. Los resultados de la actividad ansiolítica mostraron un aumento en el porcentaje de exploraciones en las ramas abierta, sin embargo, en el tablero agujereado registró menor conducta exploratoria subterránea en el extracto, que en los ratones inyectados con solución salina lo que sugiere un bajo efecto no ansiolítico y posible efecto estimulador. Por otro lado, las dos pruebas demuestran que el extracto no presenta actividad motora significativa.

La actividad antidepresiva fue evaluada en el modelo de nado forzado, a partir de la dosis 2,5 mg/kg de extracto acuoso radicular de *C. hermaphroditus* inyectada en ratones, la respuesta de la prueba fue positiva, el extracto tuvo un porcentaje de inmovilidad igual a 12,74 % comparado con la imipramina igual a 28,24 % con respecto a solución salina

El modelo del PTZ permitió encontrar que la actividad anticonvulsivante del extracto acuoso radicular de *C. hermaphroditus* presentó una protección igual al 62,5% comparado con el diazepam que mostró 100% de inhibición. Se optimizó el rango de la dosis i.p. de PTZ que producía convulsiones sin causar mortalidad, la curva dependiente de la dosis mostró que valores dentro del rango 45-55 mg/kg de PTZ es posible estudiar la actividad anticonvulsivante, observando convulsiones tónico-clónicas sin causar mortalidad.

Se demostró a partir de estudios químicos farmacológicos, bioquímicos y analíticos que el extracto acuoso radicular de *C. hermaphroditus* a 2,5 mg/kg presenta propiedades antiinflamatorias, antidepresivas y anticonvulsivantes significativas, y no

## 6. Conclusiones

presenta actividad ansiolítica y actividad motora. Sin embargo, a dosis altas el extracto es un sedante, a dosis más bajas de 2,5 mg/kg se sugiere actividad estimuladora del SNC, observadas en la prueba de laberinto.

### 7. RECOMENDACIONES

Acorde a los resultados obtenidos se recomienda determinar a partir del extracto acuoso radicular de *C. hermaphroditus* los metabolitos que actúen sobre la inflamación, depresión o crisis convulsivas. Investigar y aislar las sustancias más influyentes en este género y con ayuda de técnicas espectroscópicas identificarlas y evaluarlas en sistemas *in vitro* o modelos animales.

Realizar investigaciones con las mismas condiciones cromatográficas para evidenciar e identificar la presencia de sustancias encontrados en la zona de interés. Se supone la presencia de otros eicosanoides en la región de (5,8 a 7,3 minutos).

Investigar el efecto del ketoprofeno genéricos sobre la disminución del leucotrieno LTB<sub>4</sub>.

Se sigue evaluando actividad sedante a concentraciones altas del extracto acuoso de *C. hermaphroditus* y evaluar efectos estimuladores del SNC para concentraciones menores a 2,5 mg/kg.

Para la reproducción de los métodos conductuales se debe tener en cuenta los factores externos a la metodología como luz, temperatura, color de la sala, estabilidad del equipo, forma y espacio seleccionado para realizar los experimentos, en la literatura hay muchos procesos optimizados no obstante estos dependen del lugar y las condiciones.

Evaluar la actividad exploratoria para dosis del rango de 0 a 5 mg/kg del extracto de la planta de *Cyperus hermaphroditus*, esta zona es la más influyente en su actividad, para conocer la concentración aproximada que se tiene de la muestra observar los resultados de la prueba de campo abierto, las concentraciones tienen un efecto marcado en el comportamiento de los ratones.

Determinar efectos ansiogénicos para el extracto de la planta, las pruebas ansiolíticas sugieren una tendencia al aumento de la ansiedad observada desde la disminución los parámetros comportamentales.

Seguir promoviendo las investigaciones científicas multidisciplinarias alternativas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, epilépticas, ansiolíticas y depresivas con el fin de buscar soluciones que conlleven a mejores resultados en efectividad y costos.

Incentivar el uso de plantas medicinales y apreciar los conocimientos milenarios de diferentes grupos indígenas del país, ampliando los conocimientos para un mejor aprovechamiento de los recursos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] G. A. Mohamed, "Iridoids and other constituents from *Cyperus rotundus* L. rhizomes," *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.*, vol. 53, no. 1, pp. 5–9, Jun. 2015.
- [2] S. Kilani, M. Ben Sghaier, I. Limem, I. Bouhleb, J. Boubaker, W. Bhouri, I. Skandrani, A. Neffatti, R. Ben Ammar, M. G. Dijoux-Franca, K. Ghedira, and L. Chekir-Ghedira, "In vitro evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 18, pp. 9004–9008, Dec. 2008.
- [3] K. Hemanth Kumar, S. Razack, I. Nallamuthu, and F. Khanum, "Phytochemical analysis and biological properties of *Cyperus rotundus* L.," *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 815–826, Jan. 2014.
- [4] A. M. Pirzada, H. H. Ali, M. Naeem, M. Latif, A. H. Bukhari, and A. Tanveer, "*Cyperus rotundus* L.: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 174, pp. 540–560, Nov. 2015.
- [5] S. Biradar, V. A. Kangralkar, Y. Mandavkar, M. Thakur, and N. Chougule, "Anti-inflammatory, anti-arthritic, analgesic and anticonvulsant activity of *Cyperus* essential oils," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 112–115, 2010.
- [6] A. Adewuyi, C. A. Otuechere, Z. O. Oteglolade, O. Bankole, and E. I. Unuabonah, "Evaluation of the safety profile and antioxidant activity of fatty hydroxamic acid from underutilized seed oil of *Cyperus esculentus*," *J. Acute Dis.*, vol. 4, no. 3, pp. 230–235, Aug. 2015.
- [7] S. B. Nerali, P. S. Kalsi, K. K. Chakravarti, and S. C. Bhattacharyya, "Terpenoids LXXVII. Structure of isopatchoulone, A new sesquiterpene ketone from the oil of *Cyperus scariosus*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 6, no. 45, pp. 4053–4056, 1965.
- [8] M. A. Gamal, K. M. Hani, and I. R. Sabrin, "A review: Compounds isolated from *Cyperus* Species (Part II): Terpenoidal," *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 83–99, 2015.
- [9] C. E. Giraldo and J. O. Gutierrez, "Estudio de la actividad analgésica y antiinflamatoria del Extracto Acuoso de *Cyperus hermaphroditus*. Trabajo de grado de maestría para químico farmacéutico," Universidad del Valle, 2001.
- [10] M. Canales, T. Hernández, J. Caballero, A. R. de Vivar, G. Avila, A. Duran, and R. Lira, "Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 97, no. 3, pp. 429–439, Mar. 2005.
- [11] R. M. G. Camin, M. Cols, J. L. Chevarria, R. G. Osuna, M. Carreras, J. M. Lisbona, and J. Coderch, "Fracaso renal agudo secundario a combinación de inhibidores del sistema renina-angiotensina, diuréticos y AINES. 'La Triple Whammy'1," *Nefrología*, vol. 35, no. 2, pp. 197–206, Mar. 2015.
- [12] M. Perpiñá Tordera, "Asma," *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado*, vol. 10, no. 64, pp. 4400–4407, Oct. 2010.
- [13] L. Kern, K. Nour, S. Laforest, and S. Duvallet, "Activités physiques et dépressions chez des aînés arthritiques: Le cercle vicieux ?," *Kinésithérapie, la Rev.*, vol. 11, no. 109–110, pp. 74–75, Jan. 2011.
- [14] J. A. Posada, "La salud mental en Colombia," *Bioméτρική*, vol. 33, pp. 497–498, 2013.
- [15] N. J. Jacobo-Herrera, F. E. Jacobo-Herrera, A. Zentella-Dehesa, A. Andrade-Cetto, M. Heinrich, and C. Pérez-Plasencia, "Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 179, pp. 391–402, Feb. 2016.
- [16] H. Y. Bernal, M. H. García, and S. F. Quevedo, *Pautas para el conocimiento, conservación, y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia*. Bogota, Colombia: Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2011.
- [17] Real Jardín botánico de Kew, "Catálogo del Herbario de Kew," *Colecciones del Catalogo del Herbario de Kew. Cyperus. Richmond, Reino Unido*, 2014. [Online]. Available: [http://apps.kew.org/herbcat/navigator.do?\\_ga=1.16757110.1392512787.1456091450](http://apps.kew.org/herbcat/navigator.do?_ga=1.16757110.1392512787.1456091450).
- [18] J. Quer and J. Martinez, *Flora española*, 1st ed. Madrid, España, 1784.
- [19] I. Cabrera R., *Las plantas y sus usos en las islas de Providencia y Santa Catalina*, 1st ed. Cali, Colombia, 2005.
- [20] L. de la Torre, *Enciclopedia de las plantas útiles de Ecuador*. Quito, Ecuador: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2008.
- [21] G. J. V. Rodríguez, *Origen del textil en Mesoamérica*. Chicago, Mexico: Instituto Politécnico Nacional, 1995.
- [22] B. Ludlow Wiechers and N. D. Pérez, "Utilidad e importancia histórica y cultural de las Cyperaceae," *Etnobiología*, vol. 2, no. 1, pp. 90–102, 2002.
- [23] A. O. Caycelo and R. M. Bonzani, *San Jacinto I: La ecología histórica, orígenes de la cerámica e inicios de la vida sedentaria en el Caribe colombiano*. Alabama, EU, 2014.
- [24] H. E. D. Sumar, "Cultura (Cosmovision) y salud entre los secoya," Lima, Perú, 1986.
- [25] S.-H. Jung, S. J. Kim, B.-G. Jun, K.-T. Lee, S.-P. Hong, M. S. Oh, D. S. Jang, and J.-H. Choi, "α-Cyperone,

- isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NFκB signalling in RAW 264.7 cells," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 147, no. 1, pp. 208–214, May 2013.
- [26] D. Wu, Y. Kong, C. Han, J. Chen, L. Hu, H. Jiang, and X. Shen, "d-Alanine:d-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 32, no. 5, pp. 421–426, Nov. 2008.
- [27] N. X. Nhiem, N. H. Tung, P. Van Kiem, C. Van Minh, Y. Ding, J.-H. Hyun, H.-K. Kang, and Y. H. Kim, "Lupane Triterpene Glycosides from Leave of *Acanthopanax koreanum* and Their Cytotoxic Activity," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 57, no. 9, pp. 986–989, 2009.
- [28] J. D. Bacon, G. L. Hannan, N. Fang, and T. J. Mabry, "Chemosystematics of the hydrophyllaceae: Flavonoids of three species of eriodictyon," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 14, no. 6, pp. 591–595, Nov. 1986.
- [29] R. K. SRIVASTAVA, A. SINGH, G. P. SRIVASTAVA, A. LEHRI, A. NIRANJAN, S. K. TEWARI, K. KUMAR, and S. KUMAR, "Terpenoids CXVII - Structures of cyperenol and patchoulenol. Two new sesquiterpene alcohols from the oil of *Cyperus scariosus*," *Proc Indian Natn Sci Acad*, vol. 80, no. 3, pp. 525–536, 2015.
- [30] L. Kakarla, P. Mathi, P. R. Allu, C. Rama, and M. Botlagunta, "Identification of human cyclooxygenase-2 inhibitors from *Cyperus scariosus* (R.Br) rhizomes," *Bioinformation*, vol. 10, no. 10, pp. 637–646, 2014.
- [31] N. C. Chaulya, P. K. Haldar, and A. Mukherjee, "Anti-inflammatory and Analgesic Activity of Methanol Extracts of *Cyperus tegetum* Roxb. Rhizome," *J. PharmaSciTech*, vol. 1, no. 2, pp. 27–29, 2012.
- [32] G. C. Rzedowski and J. Rzedowski, *Flora fanerogámica del Valle de México*, 2nd ed. Michoacán, México: Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2001.
- [33] "INDEX TO NON-TZELTAL PLANT NAMES A2 - RAVEN, BRENT BERLINDENNIS E. BREEDLOVEPETER H. BT - Principles of Tzeltal Plant Classification." Academic Press, pp. 625–646, 1974.
- [34] M. Canales Martinez, T. Hernández Delgado, J. Caballero Nieto, J. De Vivar Romo, Á. Durán Díaz, and R. Lira Saade, "Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán de Tehuacan-Cuicatlán, Puebla, México," *Acta Botánica Mex.*, vol. 75, no. 1, pp. 21–43, 2006.
- [35] A. Zúñiga Guerrero, A. Cruz Orea, J. Galindez Mayer, and A. Rodríguez Dorantes, "Análisis de biosorción de fenantreno sobre las raíces de *Cyperus hermaphroditus* por microscopía, espectroscopía y las técnicas fotoacústicas," *African J. Plant Sci.*, vol. 3, no. 10, pp. 222–228, 2009.
- [36] K. Wiedemann, "Anxiety and Anxiety Disorders A2 - Wright, James D. BT - International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences (Second Edition)," Oxford: Elsevier, 2015, pp. 804–810.
- [37] S. Berenzon, M. A. Lara, R. Robles, and M. E. Medina-Mora, "Depresión: estado del conocimiento y la necesidad de políticas públicas y planes de acción en México," *Salud Publica Mex.*, vol. 55, no. 1, pp. 74–80, 2013.
- [38] OMS, "Guía de Intervención para los trastornos mentales, neurológicos y por uso de sustancias," 2011.
- [39] K. Rickels, E. Schweizer, W. Case, and G. DJ, "Long-term therapeutic use of benzodiazepines: I. effects of abrupt discontinuation," *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 47, no. 10, pp. 899–907, Oct. 1990.
- [40] R. A. C. Cofré, "Evaluación de efecto ansiolítico y antidepresivo del extracto metanólico de *Modiola Caroliniana* en ratones," Universidad Austral de Chile, 2009.
- [41] K. Saki, M. Bahmani, and M. Rafieian-Kopaei, "The effect of most important medicinal plants on two important psychiatric disorders (anxiety and depression)-a review," *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. S34–S42, Sep. 2014.
- [42] G. Díaz Véliz and S. Mora, "Uso de modelos animales en el estudio de plantas medicinales con propiedades ansiolíticas y antidepresivas," *Rev. Farmacol. Chile*, vol. 5, no. 2, pp. 21–26, 2012.
- [43] Z. Yuequin, "Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias," Universidad de Valencia, 2007.
- [44] H. B. Fleit, "Chronic Inflammation A2 - Mitchell, Linda M. McManusRichard N. BT - Pathobiology of Human Disease," San Diego: Academic Press, 2014, pp. 300–314.
- [45] J. Balsinde and E. A. Dennis, "Chapter 149 - Role of Phospholipase A2 Forms in Arachidonic Acid Mobilization and Eicosanoid Generation BT - Handbook of Cell Signaling (Second Edition)," San Diego: Academic Press, 2010, pp. 1213–1217.
- [46] C. Bandeira-Melo and P. F. Weller, "Eosinophils and cysteinyl leukotrienes," *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 69, no. 2–3, pp. 135–143, Aug. 2003.
- [47] P. Theodosios-Nobelos, M. Kourti, P. Tziona, P. N. Kourounakis, and E. A. Rezza, "Esters of some non-steroidal anti-inflammatory drugs with cinnamyl alcohol are potent lipoxygenase inhibitors with enhanced anti-inflammatory activity," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 25, no. 22, pp. 5028–5031, Nov. 2015.
- [48] A. Volterra, "ARACHIDONIC ACID METABOLITES AS MEDIATORS OF SYNAPTIC MODULATION A2 - Meldolesi, Francesco ClementiJacopo BT - Neurotransmitter Release the Neuromuscular Junction," Academic Press, 1990, pp. 209–219.
- [49] E. J. Ruge Gil, "Discriminación de los efectos de fluoxetina y cocaína sobre la ejecución en el test de nado forzado en ratas cepa wistar," Pontificia Universidad Javeriana, 2007.

## 8. Bibliografía

- [50] L. A. Polancio, "Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad," *Suma Psicol.*, vol. 18, no. 2, pp. 141–148, 2011.
- [51] J. del C. Rejón Orantes, D. Placer Perdomo, and G. Roldan, "Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas," *Univ. Méd.*, vol. 52, no. 1, pp. 78–89, 2011.
- [52] B. Scheich, B. Gaszner, V. Kormos, K. László, C. Ádori, É. Borbély, Z. Hajna, V. Tékus, K. Bölskei, I. Ábrahám, E. Pintér, J. Szolcsányi, and Z. Helyes, "Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models," *Neuropharmacology*, vol. 101, pp. 204–215, Feb. 2016.
- [53] M. Komada, K. Takao, and T. Miyakawa, "Elevated plus maze for mice," *J. Vis. Exp.*, vol. e1088, no. 22, pp. 1–4, 2008.
- [54] L. F. de A. Vieira, M. D. dos S. Reis, A. R. A. Brandão, I. M. M. N. Viana, J. P. da Silva, E. Barreto, and S. Smanioto, "Anxiolytic-like effect of the extract from *Bowdichia virgilioides* in mice," *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 23, no. 4, pp. 680–686, Jul. 2013.
- [55] K. S. Tatem, J. L. Quinn, A. Phadke, Q. Yu, H. Gordish-Dressman, and K. Nagaraju, "Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases," no. 91, p. e51785, 2014.
- [56] M. Labots, H. A. Van Lith, F. Ohl, and S. S. Arndt, "The Modified Hole Board - Measuring Behavior, Cognition and Social Interaction in Mice and Rats," no. 98, p. e52529, 2015.
- [57] B. Petit Demouliere, F. Chenu, and M. Bourin, "Test de nado forzado en ratones: Un review de actividad antidepressiva," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 177, no. 1, pp. 245–255, 2005.
- [58] N. Shetty and H. Gunduz-Bruce, "Psychopharmacotherapy: Side Effects A2 - Wright, James D. BT - International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences (Second Edition)," Oxford: Elsevier, 2015, pp. 462–469.
- [59] H. E. Scharfman, "Chapter 17 - Epilepsy A2 - Coyle, Michael J. Zigmond Lewis P. Rowland Joseph T. BT - Neurobiology of Brain Disorders," San Diego: Academic Press, 2015, pp. 236–261.
- [60] E. Esneault, G. Peyon, C. Froger-Colléaux, and V. Castagné, "Evaluation of pro-convulsant risk in the rat: Spontaneous and provoked convulsions," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 72, pp. 59–66, Mar. 2015.
- [61] S. L. G. Gutiérrez, R. R. Chilpa, and H. B. Jaime, "Medicinal plants for the treatment of 'nervios', anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine," *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 24, no. 5, pp. 591–608, Sep. 2014.
- [62] D. Getova-Spassova, "Study of the interaction between glutamate receptor antagonist and GABA-B receptor antagonists in PTZ-induced kindling in mice," *Eur. Neuropsychopharmacol.*, vol. 12, Supple, p. 376, Oct. 2002.
- [63] A. K. Shetty and D. Upadhya, "GABA-ergic cell therapy for epilepsy: Advances, limitations and challenges," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 62, pp. 35–47, Mar. 2016.
- [64] A. C. Arce, "Estandarización de la técnica de medición de niveles de leucotrieno B4 producido por leucocitos polimorfonucleares como indicadores de actividad antiinflamatorio utilizando HPLC para su determinación," Universidad del Cauca, 2001.
- [65] Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), "Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos," Santiago de Chile, 2003.
- [66] A. Komaki, F. Hoseini, S. Shahidi, and N. Baharlouei, "Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats," *J. Tradit. Complement. Med.*
- [67] S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, and M. Brile, "Validacion de entradas: Brazos cerrados en el laberinto elevado en cruz como una medida de ansiedad en ratas," *J. Neurosci.*, vol. 14, no. 1, pp. 149–167, 1985.
- [68] R. G. Lister, "El uso de un laberinto elevado en cruz para medir ansiedad en ratones," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 92, no. 1, pp. 180–185, 1987.
- [69] M. T. Gamberini, D. S. Rodrigues, D. Rodrigues, and V. B. Pontes, "Effects of the aqueous extract of *Pimpinella anisum* L. seeds on exploratory activity and emotional behavior in rats using the open field and elevated plus maze tests," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 168, pp. 45–49, Jun. 2015.
- [70] Y. Litvin, N. S. Pentkowski, R. L. Pobbe, D. C. Blanchard, and R. J. Blanchard, "Chapter 2.5 Unconditioned models of fear and anxiety," in *Handbook of Anxiety and Fear*, vol. Volume 17, D. C. B. Robert J. Blanchard Guy Griebel and David Nutt BT - Handbook of Behavioral Neuroscience, Ed. Elsevier, 2008, pp. 81–99.
- [71] T. Kalouda and N. Pitsikas, "The nitric oxide donor molsidomine induces anxiolytic-like behaviour in two different rat models of anxiety," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 138, pp. 111–116, Nov. 2015.
- [72] R. Sunal, B. Gumusel, and S. O. Kayaalp, "Efecto del cambio en el área de nado en los resultados del comportamiento del test de desesperacion," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 49, no. 1, pp. 891–896, 1994.
- [73] C.-C. Qi, Y.-M. Shu, F.-H. Chen, Y.-Q. Ding, and J.-N. Zhou, "Sensitivity during the forced swim test is a key factor in evaluating the antidepressant effects of abscisic acid in mice," *Behav. Brain Res.*, vol. 300, pp. 106–113, Mar. 2016.

## 8. Bibliografía

- [74] F. R. Ramos Morales, J. Correa Basurto, M. Saavedra Vélez, M. E. Acosta Hernández, E. Gasca Pérez, A. Pérez Palacios, and J. Trujillo Ferrara, "Modelo PTZ: Un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante," *Arch. Neurociencias*, vol. 17, no. 1, pp. 45–48, 2012.
- [75] J. R. Souza-Monteiro, M. Hamoy, D. Santana-Coelho, G. P. F. Arrifano, R. S. O. Paraense, A. Costa-Malaquias, J. R. Mendonça, R. F. da Silva, W. S. C. Monteiro, H. Rogez, D. L. de Oliveira, J. L. M. do Nascimento, and M. E. Crespo-López, "Anticonvulsant properties of Euterpe oleracea in mice," *Neurochem. Int.*, vol. 90, pp. 20–27, Nov. 2015.
- [76] J. A. Otero and R. Cadena, "Investigación etnofarmacológica de plantas medicinales utilizadas por el grupo Ingano-Kamsa como analgésico anti-inflamatorio. Proyecto CEUCSA/UNIVALLE/COLCIENCIAS/SECRETARIA MUNICIPAL DE CALI," Cali, 1990.
- [77] A. Panchaud, L. Avois, M. Roulet, M. Pilet, C. Hug, M. Saugy, and L. A. Decosterd, "A validated liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of leukotrienes B4 and B5 produced by stimulated human polymorphonuclear leukocytes," *Anal. Biochem.*, vol. 341, no. 1, pp. 58–68, Jun. 2005.
- [78] R. Filosa, A. Peduto, A. M. Schaible, V. Krauth, C. Weinigel, D. Barz, C. Petronzi, F. Bruno, F. Roviezzo, G. Spaziano, B. D'Agostino, M. De Rosa, and O. Werz, "Novel series of benzoquinones with high potency against 5-lipoxygenase in human polymorphonuclear leukocytes," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 94, pp. 132–139, Apr. 2015.
- [79] K. Mohan, K. Jayakumar, H. D. Narayanaswamy, M. Manafi, and B. H. Pavithra, "An initial safety assessment of hepatotoxic and nephrotoxic potential of intramuscular ketoprofen at single repetitive dose level in broiler chickens.," *Poult. Sci.*, vol. 91, no. 6, pp. 1308–1314, Jun. 2012.
- [80] J. B. Harborne, C. A. Williams, and K. L. Wilson, "Flavonoids in leaves and inflorescences of australian *Cyperus* species," *Phytochemistry*, vol. 21, no. 10, pp. 2491–2507, 1982.
- [81] R. D. Allan, R. J. Wells, R. L. Correll, and J. K. MacLeod, "The presence of quinones in the genus *Cyperus* as an aid to classification," *Phytochemistry*, vol. 17, no. 2, pp. 263–266, 1978.
- [82] R. M. Silverstein, *Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos*. México, 1981.
- [83] R. M. J. Deacon, "The Successive Alleys Test of Anxiety in Mice and Rats," no. 76, p. e2705, 2013.
- [84] J. Cárdenas and J. F. Navarro, "Modelos animales de ansiedad incondicionada (I)," *Psiquiatr. Biológica*, vol. 09, no. 01, pp. 18–32, 2002.

## 9. ANEXOS

### *Anexo 1. Protocolo para la extracción del LTB<sub>4</sub>*

Seguido de la optimización, el proceso de extracción de LTB<sub>4</sub> a partir de LPMN es:

Se utiliza 5 ratas de ambos sexos con pesos entre los 300-400 g a las cuales se les inyectó vía i.p. glucógeno al 1,7% (1,5 g/kg del peso del animal) utilizando aguja de insulina calibre 23, aplicando un suave masaje en la región abdominal con el objetivo de distribuir la solución y aumentar la producción de LPMN, después de 6 horas las ratas fueron sacrificadas en una cámara de gas para extraer los leucocitos de la cavidad peritoneal usando buffer de fosfato como fluido amortiguador. Se asegura durante algunos minutos la muerte del animal sin pérdida del calor corporal y se coloca en postura decúbito supino sobre la placa de disección, se realiza una inyección i.p. de 15 mL de PBS1 sobre la zona abdominal y se efectúa masajeo local y movimientos de vaivén hacia arriba y atrás.

Se hace una pequeña incisión en la piel con un escalpelo, debajo del esternón y arriba del abdomen, se sujeta la piel con la pinza de disección y con la tijera se corta el tejido conjuntivo que une el musculo y la piel teniendo la precaución de no romper vasos abdominales que puedan llenar de sangre la región subcutánea o peritoneal, se levanta suavemente la piel hacia las extremidades posteriores, observando así la zona abdominal inflamada, se realiza una incisión en el musculo y se sostiene el animal en una postura decúbito dorsal para recoger por decantación el fluido amortiguador. Se coloca el animal en la placa de disección y se corta cuidadosamente el musculo desde la punción central hasta los extremos inferiores de la caja torácica, se lava en varios ciclos los órganos internos de la cavidad peritoneal con 20 mL de PBS2 (definir) masajeando con una espátula la zona intestinal inflamada, los órganos superiores y el peritoneo parietal, se sostiene la rata en posición decúbito dorsal y con cuidado se transvasa el fluido a un recipiente, se purga con 10 mL de PBS2 realizando movimiento suaves sobre los órganos evitando causar daños sobre el hígado y el corazón.

Se unen las fracciones recolectadas y se realiza una homogenización suave y lenta considerando que fuertes movimientos pueden causar la muerte celular de los LPMN. El lavado peritoneal de cada rata se dividió en tres porciones y a cada una se le agregó:

1. El control negativo: 200 µL de solución PBS1
2. El control positivo: 200 µL de solución acuosa de ketoprofeno 0,025 g/mL
3. El extracto vegetal: 200 µL de extracto acuoso de *Cyperus hermaphroditus* 0,075 g/mL.

La dosis del ketoprofeno fue optimizada en el equipo. Los sistemas se incubaron en un baño maría a 35 °C por 15 minutos, la enzima 5-lipooxigenasa se activó mediante la adición de 200 µL de ionóforo de calcio A23187 (1 µg/mL) a 37 °C por 15 minutos, se adicionó 50 µL de una solución de cloruro de calcio 0,9 mM manteniendo la temperatura durante 2 minutos. La actividad enzimática se suspendió incubando a 0,0

°C por 10 minutos y se eliminó el material celular centrifugando por 15 minutos a 4000 rpm. Al sobrenadante obtenido se adicionó 8 mL de etanol, se filtró y se llevó a sequedad en un rotaevaporador a 35 °C y presión reducida. Las muestras se conservaron a 0,0 °C para su posterior análisis por CLAR en el laboratorio de la UAI de la Universidad del Cauca.

## 9. Anexos

Anexo 2. Datos del compuesto a tiempo de 9,917 minutos en EM de la fracción aislada por CLAR a 5,3 min.

m/z	Intens.														
36	0,3	76	0,35	116	2,78	156	0,18	197	0,29	240	0,72	285	1,34	354	0,49
37	0,32	77	1,61	117	2,02	157	0,37	199	0,35	241	0,44	286	0,39	355	0,34
38	0,93	78	1,35	118	0,59	158	0,53	200	0,18	242	0,35	287	0,15	356	0,1
39	6,29	79	4,19	119	1,78	159	0,47	201	0,1	243	0,2	290	0,13	361	0,2
40	15,45	80	3,45	120	1,09	160	0,28	203	0,18	244	0,1	293	0,1	365	0,37
41	21,2	81	11,23	121	3,87	161	0,88	204	0,12	245	0,17	294	0,2	366	0,14
42	22,03	82	5,87	122	1,55	162	0,23	205	0,11	247	0,3	295	0,16	367	1,17
43	100	83	13,97	123	4,91	163	0,37	206	0,27	248	0,27	296	1,92	368	2,06
44	33,99	84	13,19	124	2,11	164	0,39	207	0,39	249	0,18	297	0,92	369	1,34
45	48,7	85	8,98	125	2,58	165	0,68	208	0,7	250	0,89	298	0,22	370	0,23
46	0,97	86	1,6	126	1,75	166	0,78	209	0,42	251	0,34	299	1,18	372	0,15
47	0,45	87	1,98	127	1,12	167	0,45	210	0,21	252	0,26	300	0,37	375	0,1
48	0,39	88	0,43	128	0,68	168	0,33	211	0,98	253	0,59	301	0,19	379	0,23
49	0,13	89	0,95	129	4,13	169	0,44	212	0,18	254	0,18	306	0,16	380	0,31
50	0,59	90	0,2	130	0,81	170	0,16	213	0,46	255	0,63	309	0,18	381	0,28
51	1,43	91	3,37	131	0,99	171	0,8	214	0,18	256	0,55	310	0,24	382	0,22
52	0,82	92	0,81	132	0,44	172	0,36	216	0,11	257	0,39	311	1,16	384	0,14
53	2,62	93	3,52	133	1,46	173	0,27	217	0,3	259	0,1	312	0,2	386	0,11
54	5,13	94	3,04	134	1,27	174	0,14	218	0,15	260	0,33	313	4,04	393	0,23
55	25,77	95	10,93	135	2,98	175	0,39	219	0,42	261	0,26	314	0,75	394	0,23
56	9,94	96	5,57	136	1,33	176	0,24	220	0,37	262	0,87	315	0,25	395	0,27
57	33,2	97	12,87	137	2,77	177	0,3	221	0,26	263	0,47	317	0,1	396	0,15
58	11,31	98	15,24	138	1,79	178	0,29	222	0,5	264	2,04	321	0,12		
59	8,33	99	3,78	139	1,35	179	0,59	223	0,22	265	0,77	323	0,19		
60	33,65	100	1,21	140	0,69	180	0,43	224	0,22	266	0,31	324	0,14		
61	3,25	101	0,94	141	0,94	181	0,19	225	0,78	267	0,23	325	0,31		
62	0,35	102	0,51	142	0,34	182	0,24	226	0,15	268	0,96	326	0,42		
63	0,55	103	0,85	143	0,72	183	0,33	227	0,55	269	0,44	327	0,56		
64	0,5	104	0,9	144	0,38	184	0,17	228	0,37	270	0,41	328	0,25		
65	1,67	105	1,9	145	0,47	185	0,75	229	0,12	271	0,22	329	0,18		
66	1,53	106	0,95	146	0,4	186	0,18	230	0,13	272	0,18	331	0,29		
67	13,13	107	3,08	147	1,03	187	0,21	231	0,1	273	0,11	332	0,1		
68	7,07	108	1,92	148	0,67	189	0,35	232	0,1	275	0,12	337	0,34		
69	23,28	109	6,5	149	0,92	190	0,14	233	0,15	276	0,17	339	0,86		
70	8,64	110	4,65	150	0,57	191	0,33	234	0,24	278	0,14	340	0,39		
71	18,52	111	7,35	151	1,47	192	0,27	235	0,2	280	0,2	341	0,65		
72	3,83	112	6,18	152	2,26	193	0,54	236	3,63	281	0,25	342	0,12		
73	5,42	113	2,34	153	0,75	194	0,6	237	2,06	282	0,26	346	0,13		
74	2,43	114	0,88	154	0,63	195	0,14	238	0,43	283	0,39	351	0,13		
75	1,14	115	1,56	155	0,78	196	0,2	239	2,31	284	0,36	353	0,68		

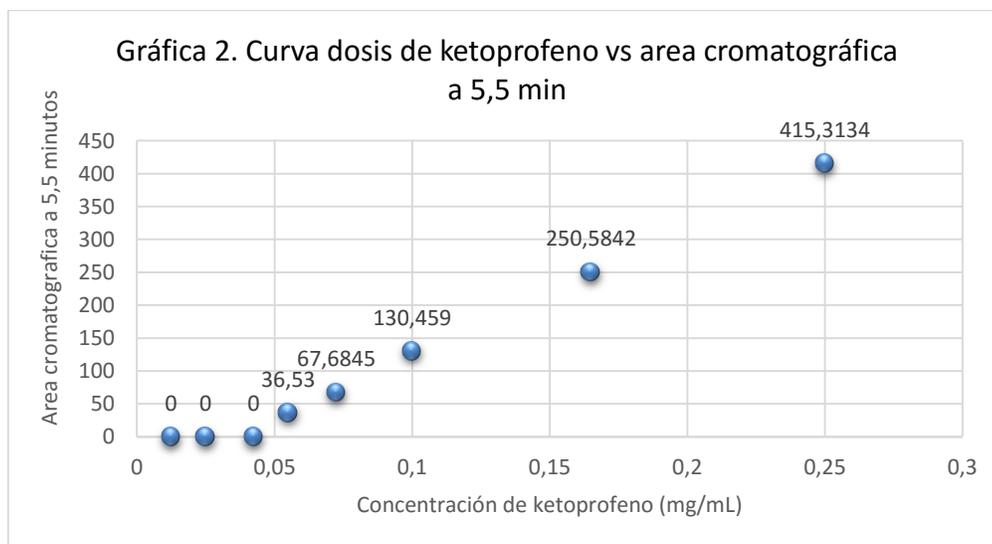
Anexo 3. Optimización de la dosis de ketoprofeno, mediante la eliminación de la sustancia interferente a 5,5 min

Preparación de las muestras: Se realizó una curva de ketoprofeno entre 0,0125 mg/mL a 0,25 mg/mL a partir de una ampolla de 50 mg/mL.

Condiciones cromatográficas: Para el análisis por CLAR se inyectó 20  $\mu$ L de muestra, empleando como fase estacionaria una columna Hypersyl C<sub>18</sub> ODS 250mm x 0.4 $\mu$ m x 5mm, fase móvil metanol/agua/ácido acético 72/27,8/0,2 operada en modo isocrática, a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min, la identificación se realizó utilizando un detector ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm. El tiempo para cada corrida cromatográfica fue 20 minutos de análisis y 10 minutos de lavado en gradiente con metanol.

Tabla 7. Area cromatográfica a 5,5 min para diferentes dosis de ketoprofeno.

Concentración de ketoprofeno (mg/mL)	Área cromatográfica
0,25	415,3134
0,165	250,5842
0,1	130,459
0,0725	67,6845
0,055	36,53
0,0425	0
0,025	0
0,0125	0



Anexo 4. Aval ético aprobado por el comité de ética de la Universidad del Cauca.



Universidad  
del Cauca

Vicerrectoría de Investigaciones

EL SUSCRITO JEFE DE LA DIVISIÓN DE GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN  
DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA

CERTIFICA:

El Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca, en sesión del día 24 de septiembre de 2014, acta N° 14, aprobó el aval ético para el proyecto de investigación "Evaluación de la actividad antidepresiva, ansiolítica y anticonvulsivante de *Cyperius Hermaphroditus* y de su mecanismo antiinflamatorio"

Se expide la presente certificación en Popayán a los veintiséis días del mes de enero de dos mil quince.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'H. Chacón'.

HELDER MAURICIO CHACÓN VILLOTA  
Jefe de División de Gestión de la Investigación

Anexo 5. Participación en eventos





SOCIEDAD  
COLOMBIANA  
DE CIENCIAS  
QUÍMICAS

Se otorga el presente certificado a:

**ANGIE CAROLAY FORERO GIRÓN**

1083904883

Por su participación como ASISTENTE al

**V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales CIPNat, al XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica y al VIII Congreso Colombiano de Cromatografía COCOCRO.**

*Barbara Moreno Murillo*  
Barbara Moreno Murillo  
Presidente Congreso

*Harold Dabán Ardila*  
Harold Dabán Ardila  
Presidente SCCQ

Bogotá, Colombia, 25 al 29 de Abril de 2016



V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales  
XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica  
VIII Congreso Colombiano de Cromatografía



Código: QM-15

**CERTIFICADO**

El Comité Organizador del V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales CIPNat 2016, el XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica y el VIII Congreso Colombiano de Cromatografía COCOCRO 2016, certifica que los autores AC Forero G, TM Gutiérrez V, G Cuervo O, V Campo presentaron en modalidad POSTER el trabajo titulado:

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA,  
ANTI-DEPRESIVA Y ANTICONVULSIVANTE DE  
Cyperus hermaphroditus Y DE SU MECANISMO ANTIINFLAMATORIO”**

Dado en Bogotá D.C., 29 de abril de 2016.

En constancia firma

*Barbara Moreno Murillo*

Bárbara Moreno-Murillo  
Presidente  
V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales

1083904883

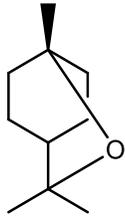
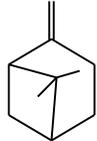
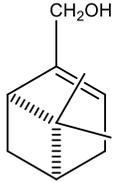
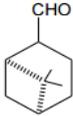
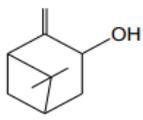
Anexo 6. Compuestos aislados del genero *Cyperus*

Estas tablas son tomadas del artículo original:

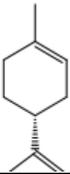
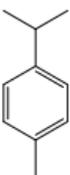
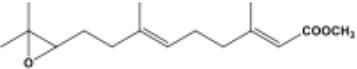
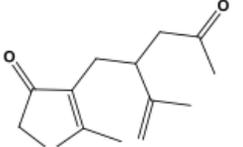
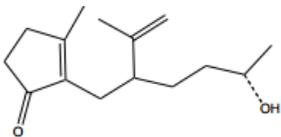
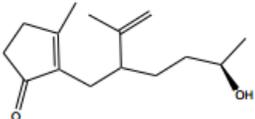
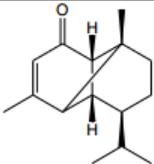
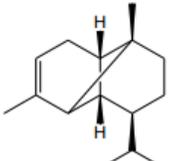
M. A. Gamal, K. M. Hani, and I. R. Sabrin, "A review: Compounds isolated from *Cyperus species* (Part II): Terpenoidal," *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 83–99, 2015.

Para referencias específicas de cada compuesto, revisar el review, el cual indica al lado de la tabla el artículo tomado del compuesto aislado.

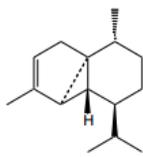
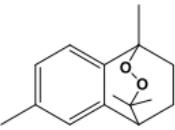
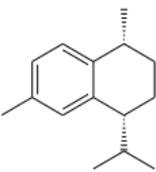
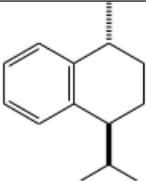
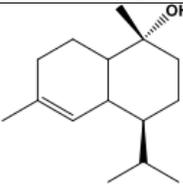
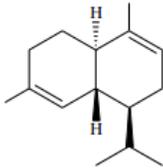
Tabla 8. Principales terpenoides aislados de diferentes especies *Cyperus*.

Nombre del compuesto	Estructura	Parte de la planta	Organo
1,8-Cineole		<i>C. alopecuroides</i> Rottb. <i>C. rotundus</i> L.	Tubérculos Tubérculos
$\beta$ -Pinene		<i>C. alopecuroides</i> Rottb. <i>C. rotundus</i> L.	Tubérculos Tubérculos
Myrtenol		<i>C. articulatus</i> L.	Rizoma
Myrtenal		<i>C. articulatus</i> L.	Rizoma
<i>Trans</i> -Pinocarveol		<i>C. alopecuroides</i> Rottb. <i>C. articulatus</i> L. <i>C. scariosus</i> R. Br. <i>C. rotundus</i> L.	Tubérculo Rizomas Tubérculos Tubérculos

## 9. Anexos

Limoneno		<i>C. rotundus L.</i>	Rizomas
4-Cymene		<i>C. rotundus L.</i>	Rizomas
JH-III		<i>C. iria L.</i>	Tubérculos
Metil (2E, 6E)-Farnesoato		<i>C. iria L.</i>	Tubérculos
Mandassidione		<i>C. articulatus L.</i>	Rizomas
Cyperusol B1		<i>C. longus L.</i>	Toda la planta
Cyperusol B2		<i>C. longus L.</i>	Toda la planta
Mustakone		<i>C. articulatus L.</i> <i>C. rotundus L.</i> <i>C. maculatus Boeck</i>	Rizomas Raíces Rizomas
Ylanga-2,4-diene		<i>C. rotundus L.</i>	Tubérculos maduros

## 9. Anexos

cubebene		<i>C. alopecuroides</i> Rottb.	Rizomas
10,12 Peroxi-calameneno		<i>C. rotundus</i> L.	Tubérculos
Clameneno		<i>C. rotundus</i> L. <i>C. serotinus</i> Rottb	Tubérculos Tuberculos
Trans-calameno		<i>C. alopecuroides</i> Rottb <i>C. rotundus</i> L.	Rizomas Tubérculos maduros
A-cadinol		<i>C. difformis</i> L. <i>C. globosus</i> Allioni <i>C. iria</i> L. <i>C. microriria</i> Steud <i>C. pilosus</i> Vahl <i>C. polystachos</i> Rottb	Tubérculos Tubérculos Tubérculos Tubérculos Tubérculos Tubérculos
$\alpha$ -cadineno		<i>C. microiria</i> Steud	Tubérculos

Otros 30 compuestos aislados se pueden encontrar en el artículo original.