



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EMBRIOFETOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE *Lantana camara* EN ROEDORES.

Diego Armando Galvis Sánchez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2014

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EMBRIOFETOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE *Lantana camara* EN ROEDORES.

Diego Armando Galvis Sánchez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Miguel Ángel Torres Wilches Ph.D.-M.Sc.

Codirector (a):

Patólogo. Ángel Yobany Sanchez Merchán

Línea de Investigación:

Toxicología

Grupo de Investigación:

GIFFUN

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá D.C., Colombia

2014

Dedico este trabajo a todas las personas que pese a las adversidades que se presentan en el camino, levantan la cabeza y llegan a cumplir sus sueños y metas en la vida.

Dedico también este trabajo a todas aquellas personas que con su granito de arena fueron partícipes en el desarrollo de esta Maestrea; al profesor Miguel Ángel Torres Wilches, a mi novia Catalina Azcarate, a mi papá Jorge Alfredo Galvis, a mi mamá Clara Sánchez, mis hermanos, a Luis Alejandro Guerra Peña, a María Catalina Palacios y a Daniela Contreras por ser las personas que tuvieron palabras de aliento cada día de trabajo.

Agradecimientos

A Dios por darme fuerzas y presentarme personas que me colaboraron durante el desarrollo de esta tesis, por darme la provisión diaria para continuar mis estudios y nunca abandonarme pese a los malos momentos. Por sentir cada día que realizaba un experimento después de mi jornada laboral, sábados y vacaciones que siempre tenía alguien a mi lado. Por eso doy infinitas gracias a Dios todopoderoso.

A la gloriosa Universidad Nacional de Colombia quien con sus enseñanzas me ha permitido avanzar profesionalmente e intelectualmente, a su vez siempre dando un gran número de alegrías y satisfacciones personales.

Al doctor Miguel Ángel Torres Wilches por ser aquella persona que cuando me encontraba en uno de los momentos más difíciles no dudo en ningún momento con su don de gente apoyarme y permitirme desarrollar un trabajo junto a él. Nunca dudando en mí y apoyándome siempre pese a las adversidades.

Al Doctor Ángel Yobany por su apoyo académico su excelente disposición, su alto grado de colaboración y su don de gente.

A la Doctora Maritza Rojas por colaborarme en la parte fitoquímica del proyecto y siempre aportar buscando un desarrollo más satisfactorio.

Al Doctor Javier Rincón por permitirme hacer parte de su grupo de investigación y siempre hacerme ver que hacia parte de él y por ser una persona tan noble y colaboradora.

Al Doctor Cástor Guisande González de la Universidad de Vigo por su colaboración en el manejo estadístico de la información.

A la Doctora Yolima Baena por ser una voz de apoyo y una persona que me enseñó a nunca juzgar por las apariencias.

A mi novia y a mis muchachos de pregrado por colaborarme en el desarrollo del trabajo experimental.

A mi familia mi mamá, mi papá y mis hermanos porque siempre creyeron en mi a mis abuelitos que me acompañan desde el cielo.

A Diana Argenis Rojas, Nataly Duarte, Reina Marcela, Hilbert Medina, al profesor Luis Fernando Ospina por ser personas que con sus granitos de arena aportaron a este trabajo.

Resumen

Lantana camara es un arbusto ramificado perteneciente a la familia Verbenaceae, que contiene una diversidad de metabolitos que incluyen triterpenos, sesquiterpenos, alcaloides entre otros. Esta planta es reconocida en Colombia y el mundo, como invasiva y reportada como planta con actividad abortiva. Por lo anterior nació la necesidad, a partir de los usos tradicionales de esta, el evaluar su actividad embriofetotóxica producto de su ingesta. Se verificó la presencia de terpenos, flavonoides y furanonaftoquinonas en el extracto hidroalcohólico 70:30. Se encontró actividad embriofetotóxica asociada a la ingesta de infusiones de planta completa, flores y extracto. Encontrando una mayor actividad embriofetotóxica en el extracto hidroalcohólico, comparado con la infusión de la planta completa y la infusión de flores.

Palabras Clave: *Lantana camara*, embriofetotoxicidad, aborto y malformación.

Abstract

Lantana camara is one belonging to the family Verbenaceae branched shrub, containing a variety of metabolites which include triterpenes, sesquiterpenes, alkaloids and others. This plant is recognized in Colombia and the world, as reported as invasive plant abortifacient activity. Therefore the necessity was born from the traditional uses of this, the activity embryo fetal toxicity evaluate their product intake. The presence of terpenes, flavonoids and the hydroalcoholic extract furanonaftoquinonas 70:30 was verified. Embryo fetal toxicity activity associated with infusions intake whole plant, flower extract was found. Embryo fetal toxicity finding greater activity in the hydro-alcoholic extract, compared to the infusion of the entire plant and flower infusion.

Keywords: *Lantana camara*, embryo-fetal toxicity, abortion and malformation.

Contenido

	Pág.
1. Introducción	15
2. Marco Teórico.....	17
2.1 <i>Lantana camara</i> L.....	17
2.1.1 Fitoquímica de <i>Lantana camara</i>	18
2.1.2 Etnofarmacología y actividades farmacológicas asociadas a <i>Lantana camara</i>	22
2.1.3 Toxicidad de <i>Lantana camara</i>	25
2.2 Estudios de embriofetotoxicidad.....	27
2.2.1 Teratogénesis.....	28
2.2.2 Aborto.....	28
2.3 Ciclo reproductivo de los ratones.....	29
3. Objetivos.....	30
3.1 Objetivo General	30
3.2 Objetivos específicos:	30
4. Metodología.....	32
4.1 Recolección e identificación taxonómica de <i>Lantana camara</i>	32
4.2 Obtención de extractos e infusiones.....	32
4.3 Evaluación de la fitoquímica fundamental del extracto hidroalcohólico 70:30 de <i>L. camara</i>	33
4.4 Criterios bioéticos.....	34
4.5 Evaluación toxicidad aguda extracto <i>Lantana camara</i>	37
4.5.1 Evaluación comportamental mediante el Test de Irwin	38
4.6 Reproducción de animales (ratones) y evaluación de la preñez.....	40
4.7 Evaluación de la embriofetotoxicidad de <i>Lantana camara</i> en roedores.....	41
4.7.1 Verificación del aborto	42
4.7.2 Evaluación histológica de los órganos de la madre.....	43
4.7.3 Evaluación de malformaciones óseas de los fetos.....	43
4.8 Análisis estadístico de resultados	44
5. Resultados y discusión	46
5.1.1 Clasificación taxonómica y botánica.....	46
5.1.2 .Obtención extractos.....	46
5.1.3 Evaluación fitoquímica básica del extracto hidroalcohólico de <i>L. camara</i>	47
5.1.4 Estudio de toxicidad aguda.....	50

5.1.5	Determinación del número de implantaciones en cada hembra gestante, perteneciente a cada grupo de tratamiento.....	57
5.2	Evaluación de la embriofetotoxicidad de <i>Lantana camara L.</i> en roedores.....	59
5.2.1	Variaciones de peso de los animales tratados.....	59
5.2.2	Incidencia de aborto.....	62
5.2.3	Incidencia de Malformaciones óseas.....	68
5.2.4	Evaluación histopatológica de la madre tratada con extracto hidroalcohólico 70:30 de <i>Lantana camara L.</i>	75
4.2.5	Relación entre la embriofetotoxicidad por administración de infusión de flores, planta y extracto de <i>Lantana camara L.</i>	76
4.2.5. 1	Embriofetotoxicidad por administración de infusión de flores de <i>Lantana camara L.</i>	76
4.2.5.2	Embriofetotoxicidad por administración de infusión de planta completa de <i>Lantana camara L.</i>	77
4.2.5.3	Embriofetotoxicidad por administración del extracto hidroalcohólico 70:30 de <i>Lantana camara</i>	79
6.	Conclusiones y recomendaciones	81
6.1	Conclusiones.....	81
6.2	Recomendaciones.....	83
7.	Bibliografía.....	89

Lista de imágenes

Imagen 1: <i>Lantana camara</i>	17
Imagen 2: Sesquiterpenos presentes en <i>Lantana camara</i>	18
Imagen 3: Triterpenos presentes en <i>Lantana camara</i>	20
Imagen 4: Tevesido	21
Imagen 5: Flavonoides presentes en <i>Lantana camara</i>	22
Imagen 6: Furanonaftoquinonas <i>Lantana camara</i> -diodantunezona	22
Imagen 7: Ensayo de campo abierto toxicidad aguda extracto Hidroalcoholico 70:30, <i>Lantana camara</i>	39
Imagen 8: Evaluación del reflejo corneal animales tratados.	40
Imagen 9: Condiciones de apareamiento de los animales.....	41
Imagen 10: Grupos de Tratamiento del estudio de embriofetotoxicidad <i>Lantana camara</i>	42
Imagen 11: A. Extracto <i>L. camara l.</i> , lupeol y colesterol. FM: CHCl ₃ -CH ₃ OH 80:20 B. Infusión planta completa <i>L. camara l.</i> , lupeol y colesterol. FM: CHCl ₃ -CH ₃ OH 70:30.....	48
Imagen 12: Placa cromatografía en capa fina, presencia de compuestos de tipo flavonoide observación a luz natural y 375nm. A: Extracto hidroalcohólico 70:30 <i>L.</i> <i>camara l.</i> B: Quercetina C: Infusión planta <i>L. camara l.</i>	49
Imagen 13: Animal grupo control vs animal grupo tratado con 2000 mg/Kg del extracto hidroalcohólico	55
Imagen 14: Corte transversal del hígado de animal tratado con una dosis de 2000 mg/Kg de extracto hidroalcoholico de <i>L. camara l vista 4X</i>	56
Imagen 15: Órgano reproductor donde se evidencian implantaciones.....	57
Imagen 16: Hembra que evidencio proceso de expulsión.....	63
Imagen 17: Hembra que evidencio proceso de reabsorción.	64
Imagen 18: Feto expulsado por infusión de planta completa al día 17 de administración.	64
Imagen 19: a) Feto con cráneo anormal expuesto al extracto hidroalcohólico 70:30. b) Feto del grupo control con cráneo normal	69
Imagen 20: Corte transversal hígado animal tratado con extracto observación a 40X	75

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1: Datos evaluación test de Irwin a 0 días. Relaciona el número de animales que presentaron alteración durante la evaluación de toxicidad aguda.	51
Tabla 2: Datos evaluación test de Irwin a 7 días. Relaciona el número de animales que presentaron criterio de evaluación respecto a la dosis de tratamiento.	52
Tabla 3: Datos evaluación test de Irwin a 15 días. Relaciona el número de animales que presentaron criterio de evaluación respecto a la dosis de tratamiento.	53
Tabla 4: Evaluación anatómica de los diferentes grupos de dosificación del extracto hidroalcohólico 70:30.	54
Tabla 5: Número de implantaciones por cada animal tratado con el vehículo control, infusión de planta completa e infusión de flores.	58
Tabla 6: Número de implantaciones por cada animal tratado con el control del extracto y el extracto hidroalcohólico 70:30 <i>L. camara</i>	58
Tabla 7: Variaciones de peso de los animales durante el desarrollo del estudio.	59
Tabla 8: Variaciones de peso de los animales durante el desarrollo del estudio.	61
Tabla 9: Porcentaje de abortos por animal tratado con control, infusión de flores y planta completa.	65
Tabla 10: Porcentaje de abortos por animal tratado con control y extracto hidroalcohólico 70:30.	67
Tabla 11: Datos que relacionan los fetos que presentaron malformaciones, producto del tratamiento a dosis de 1500mg/Kg del extracto hidroalcohólico de <i>L. camara</i>	70
Tabla 12: Datos que relacionan los fetos que presentaron malformaciones, producto del tratamiento con dosis de 1500mg/Kg de las infusiones de planta y flores de <i>L. camara</i>	72
Tabla 13: “Datos de embriofetotoxicidad de infusión de flores de <i>Lantana camara</i> L. vs control de infusión”	76
Tabla 14: Test de Chi-cuadrado: correlación entre administración de la infusión de flores y el efecto embriofetótico.	77
Tabla 15: Datos de embriofetotoxicidad de infusión de planta completa <i>Lantana Camara</i> L vs control de infusión.	77
Tabla 16: Test de Chi-cuadrado: correlación entre administración de la infusión de planta completa y efecto embriofetótico.	78
Tabla 17: Datos de embriofetotoxicidad de extracto hidroalcohólico 70:30 de planta completa de <i>Lantana camara</i> vs control de infusión.	79
Tabla 18: Test de Chi-cuadrado: correlación entre administración de la infusión de planta completa y efecto embriofetótico.	79

Gráficos

pág.

Gráfico 1: Variación de peso en el tiempo para los animales tratados con infusión de <i>Lantana Camara L.</i>	60
Gráfico 2: Variación de peso en el tiempo para los animales tratados con extracto de <i>Lantana Camara L.</i>	61

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras

Símbolo	Termino
H_2O	Agua
B	Blanco
Δ	Calor
t_d	Días de tratamiento
$De_{1500mg/Kg}$	Dosis de extracto hidroalcohólico 70/30
$Di_{1500mg/Kg}$	Dosis de infusión
D_T	Dosis de Tratamiento
DL_{50}	Dosis Letal 50
$EtOH$	Etanol
$Ext\ Seco$	Extracto seco
$F_{EtOH\ 70:30}$	Fracción de etanol 70:30
$Glic$	Glicerina
G_1	Grupo 1
G_2	Grupo 2
G_3	Grupo 3
G_c	Grupo control
♀	Hembras
Ip	Índice de pérdida
Kg	Kilogramo
$L. camara$	<i>Lantana camara</i>
♂	Machos
Mg	Miligramo
MI	Mililitro
$N_{vivos.}$	Número de fetos
$N_{Malf.}$	Número de fetos con malformaciones
$N_{Imp.}$	Número de Implantaciones
N	Número de ratones
T	Temperatura
$Tw80$	Tween 80
V_{oral}	Vía oral

1. Introducción

Lantana camara es una planta perteneciente a la familia Verbenaceae, es un arbusto ramificado con una altura entre 0,6 m a 1,0 m, descrito como planta que presenta inflorescencias de colores blanco, rosado, naranja, rojo y morado de tipo *Umbelliferae*, a su vez sus hojas de márgenes dentados que se ubican de forma opuesta con peciolo corto (Romeu, González, & Martin, 2001). La planta *Lantana camara* se encuentra ampliamente distribuida por centro y Suramérica en climas tropicales a alturas de 2000 m sobre el nivel del mar (Ghisalberti, 2000), en Colombia es conocida comúnmente como Sanguinaria (Ross, 2003). *Lantana camara* ha sido reportada como una planta invasiva y reconocida alrededor del mundo por sus diferentes usos tradicionales como agente anticancerígeno (Ross, 2003), antiespasmódico, antipirético, agente efectivo contra la dismenorrea y abortivo (Trujillo & Madrigal, 2005). Adicionalmente, *Lantana camara* recolectada en Brasil, mostró efectos embriofetotóxicos producto de la administración del extracto hidroalcohólico donde se evidenciaron malformaciones morfológicas de fetos y abortos en un modelo roedor (Mello J. , 2005), probando a dosis mayores a las utilizadas comúnmente en estudios de este tipo. Por esto, y de acuerdo con

la comercialización no controlada en los mercados locales de Bogotá, donde es recomendada por su actividad abortiva y para evitar la dismenorrea, nace la inquietud en el grupo de investigación, acerca de los posibles efectos embriofetotóxicos causados por la administración de la especie que se comercializa en territorio colombiano y de las formas de administración recomendadas, considerando el uso del modelo roedor que permite predecir la ocurrencia de estos efectos en humanos. Para este estudio, se realizó una evaluación de embriofetotoxicidad en un modelo roedor (ratón albino), evaluando durante la administración de los extractos el periodo de preñez de las respectivas hembras, comprendiendo el ciclo reproductivo de las mismas, evaluando cambios de peso, evidenciando el tapón vaginal, cambios comportamentales, cambios morfológicos y alteraciones histológicas.

2. Marco Teórico

2.1 *Lantana camara* L. (Verbenaceae)

Lantana camara (**Figura 1**), proveniente de Suramérica o Centroamérica, es una planta que crece en los jardines y en gran número de lugares en todo el mundo, reconocida por sus pequeñas flores de diversos colores y por ser un arbusto de pequeño tamaño (Ghisalberti, 2000). En Colombia se encuentra ampliamente distribuida por todo el territorio nacional, reconocida como una planta ornamental, comercializada localmente en las plazas de mercado debido a sus diferentes usos tradicionales, conocida en Cundinamarca como sanguinaria (Gonzales, 2010) y en Boyacá como venturosa (Gómez, 2011). Adicionalmente, *Lantana camara* es considerada como una planta invasora, que afecta diferentes cultivos como: frijol y café, entre otros (Aldama, 2007). Se usa en los herbarios para atraer mariposas dado su vistoso color (Caroprese, Parra, Prieto, & Stashenko, 2011).



Imagen 1: *Lantana camara*

2.1.1 Fitoquímica de *Lantana camara*

La planta *Lantana camara* contiene un gran número de metabolitos dependientes de su lugar de origen y de las condiciones ambientales en las cuales se encuentra. Dentro de los metabolitos secundarios que se han reportado para esta planta se reconocen, mono y sesquiterpenos (Ngassoum, 1999), triterpenos (Barton, 1954), glicósidos de iridoides y flavonoides (Ghisalberti, 2000).

2.1.1.1 Sesquiterpenos presentes en *Lantana camara*:

Dentro de este grupo de compuestos que se han reportado para *Lantana camara* están los siguientes (Imagen 2):

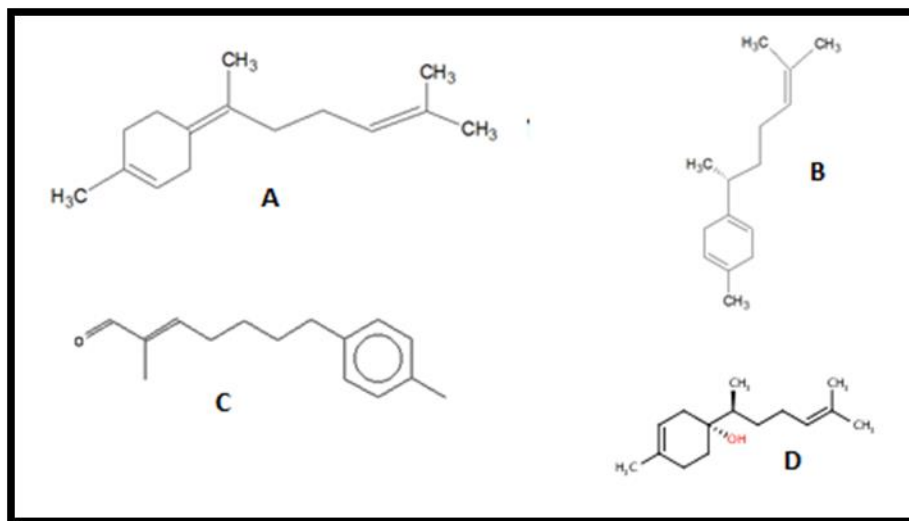


Imagen 2: Sesquiterpenos presentes en *Lantana camara*

Bisaboleno: Un sesquiterpeno extraído del aceite esencial de *Lantana camara* recolectada en Brasil (Imagen 2A).

β -Curcumeno : Sesquiterpeno extraído por hidrodestilación del aceite esencial de *Lantana camara* colectado en diferentes lugares de la Amazonía **(Imagen 2B)** (L. da Silva, 1999).

(E)-nuciferal: Sesquiterpeno aislado del aceite esencial de *Lantana camara* **(Imagen 2C)** (Ghisalberti, 2000).

(-)- epi-b-bisabolol: Sesquiterpeno aislado del aceite esencial de flores de *Lantana camara* de India **(Imagen 2D)** (Khan, 2002).

Entre otros mono-terpenos y sesquiterpenos que se han encontrado para esta planta originaria de diferentes lugares de Brasil y Madagascar están: el α -curcumeno (Jean-Aimé, 2006) y γ - curcumeno (Stashenko, 2003).

2.1.1.2 Triterpenos presentes en *Lantana camara*:

Entre los terpenos que han sido reportados para la *Lantana camara* se encuentran **(Imagen 3)**:

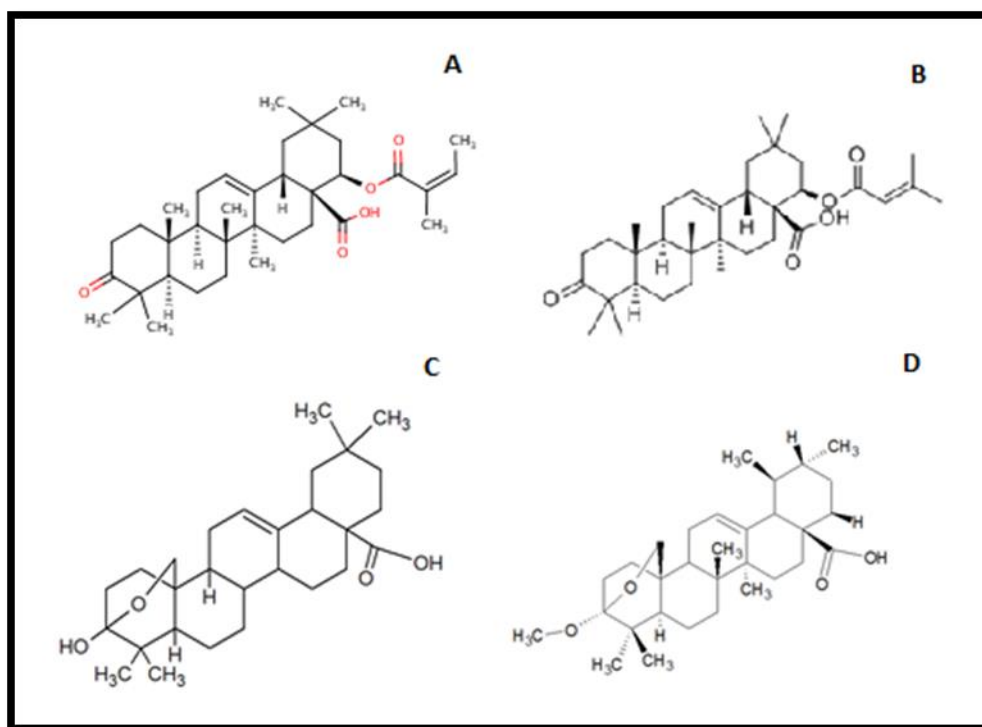


Imagen 3: Triterpenos presentes en *Lantana camara*.

Lantadeno A (Imagen 3A) y Lantadeno B (Imagen 3B): primeros triterpenos elucidados estructuralmente y reconocidos como compuestos hepatotóxicos de *Lantana camara* (Barton, 1954).

Ácido lantanólico (Imagen 3C) y Ácido lántico (Imagen 3D): Triterpenos originalmente aislados de las raíces de *Lantana camara* de un ejemplar colectado en la India, los cuales incorporan un esqueleto de oleanano y un esqueleto de ursano, con un arreglo estructural entre un alcohol en el C25 y la cetona del C3 (Barua, 1971).

2.1.1.3 Glicósidos iridoides de *Lantana camara*:

Un número de glicósidos de iridoide ha sido aislado de las flores blancas, rosadas y rojas de especímenes de *L. camara*.

Tevesido: Un glicósido iridoide que se encuentra presente en forma de sal sódica, del cual varían las proporciones de acuerdo a la estación de recolección **(Imagen 4)** (Ghisalberti, 2000).

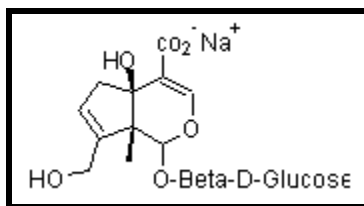


Imagen 4: Tevesido

Genipósido: Un glicósidoiridoide precursor del tevesido aislado de las hojas de *Lantana camara* (Ghisalberti, 2000).

2.1.1.4 Flavonoides de *Lantana camara*:

Entre los flavonoides que han sido aislados de *Lantana camara* por extracción con acetona, se encuentran la 3 metoxiquercetina **(Imagen 5A)**, 3-7 dimetoxiquercitina **(Imagen 5B)** y 3, 7,4'-trimetoxiquercetina **(Imagen 5C)** (Dorr, 1997) y la hispidulina aislada de tallos de la misma (Ghisalberti, 2000).

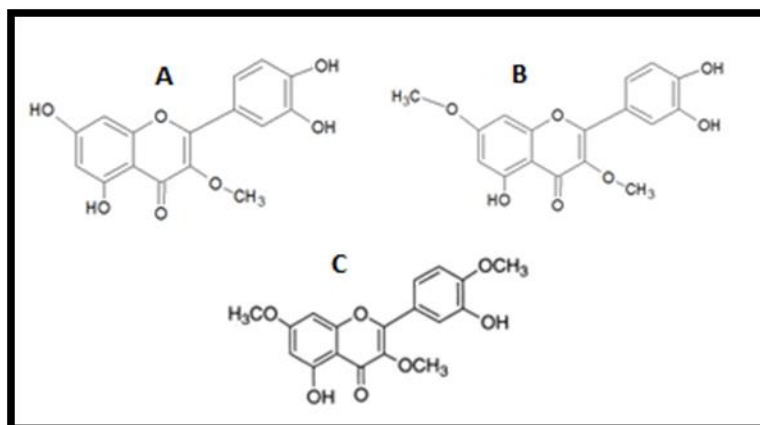


Imagen 5: Flavonoides presentes en *Lantana camara*

2.1.1.5 Furanonaftoquinonas de *Lantana camara*:

Diodantunezona (**Imagen 6**) extraído con hexano de las hojas de *L. camara* en plantas colectadas en Sri Lanka (Abeygunawardena, 1991).

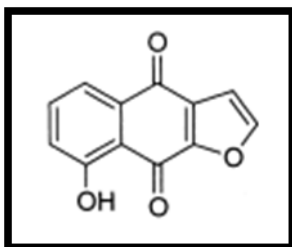


Imagen 6: Furanonaftoquinonas *Lantana camara* -diodantunezona

2.1.2 Etnofarmacología y actividades farmacológicas asociadas a *Lantana camara*

Lantana camara es una planta que ha sido reportada en un gran número de países, por su gran variedad de usos tradicionales en diferentes desórdenes y enfermedades, los cuales incluyen úlcera, catarros, tétanos, reumatismo, malaria,

cáncer, varicela, asma, hinchazón, eczema, tumor, hipertensión, llagas, sarampión, fiebre y ataxia (Kalita & Kumar, 2012).

Un preparado de hojas de *Lantana camara* en forma de té se ha utilizado en el tratamiento de fiebre y dolor de estómago (Sapari, 2010).

En Sur y Centroamérica las hojas se emplean en un cataplasma para tratar las llagas, sarampión y varicela. Adicionalmente, preparaciones de esta planta han sido utilizadas en el tratamiento del reumatismo, asma e hipertensión arterial (Ross, 2003).

En Ghana la infusión de toda la planta se utiliza para la bronquitis y la raíz en polvo, se adiciona a la leche para el tratamiento del dolor de estómago de los niños (Irvine, 1961).

En países asiáticos se utilizan las hojas para tratar cortes, reumatismos, úlceras y como vermífugo. Adicionalmente, autores han reportado el uso de las decocciones de la planta para aplicar externamente como agente terapéutico de la lepra y la sarna (Irvine, 1961).

A infusiones de flores y hojas de *Lantana camara* se les ha atribuido propiedades curativas que incluyen actividad broncodilatadora, espasmolítica, antirreumática, antitumoral, antitusígena, antiasmática, antipirética, expectorante, dermatológica, diaforética, tónica, sedante y antitetánica (Romeu & Martín, 2001).

Dentro de los usos, se han reportado propiedades cardiotónicas causadas por la lancamarona un compuesto esteroide (Shingari, 2011), presente en las hojas de *Lantana camara* (Hidayat, 2011); de la misma forma se ha reportado actividad antipirética y antiespasmódica, asociada a un alcaloide conocido como lantamina, presente en la corteza del tallo y las raíces de *Lantana camara* (Sastri, 1962).

En el año 1991 Herbert y Maffrand evaluaron un compuesto aislado de un extracto metanólico de hojas de *Lantana camara*, conocido como vervascósido que es un glucósido de fenilpropanoide (Costa, 2012), el cuál presentó actividad inhibitoria competitiva con respecto al ATP en el dominio catalítico de la PKC e inhibición no competitiva con respecto al receptor de fosfato. Los autores demuestran actividad antitumoral evaluada *in vitro*, debido a la actividad de la PKC en los procesos de transducción, proliferación, diferenciación celular y regulación enzimática (Herbert, 1991).

En el año 1997 Barre y Browden, reportaron un grupo de terpenos y flavonoides, presentes en diferentes extractos de *Lantana camara*, que mostraron actividad antimicrobial y antimutagénica (Barre, 1997).

Malcolm en 1998, describió el efecto inhibitor ejercido por un compuesto aislado de un extracto metanólico de *L. camara*, sobre la alfa-trombina humana conocido como 5-5 trans-lactona (Malcom, 1998).

En el año 1997, Safayhi reportó valores de actividad antiinflamatoria de algunos triterpenos como el ácido oleanólico y el ácido ursólico, compuestos que inhiben la leucocito-elastasa humana con valores de actividad IC₅₀ de 4 y 6 µM respectivamente (Safayhi, 1997).

Lantana camara ha evidenciado efectos inhibitorios en la inflamación y disminución del crecimiento de los tumores posterior al proceso de radiación (Hsu, 1997). Estudios en el año 1998, permitieron encontrar actividad inhibidora de la COX-2 a valores de 130 µM y mayor selectividad sobre COX-1 que sobre la COX-2, asociados al ácido ursólico de *Lantana camara* (Ghisalberti, 2000).

Entre otras actividades farmacológicas que se reportan en Colombia para ésta planta es su uso como abortivo, antianémico, antiespasmódico, antimalárico, diurético, emenagogo, tónico nervioso, útil para disminuir la inflamación (Trujillo & Madrigal, 2005) y como agente antifúngico (Pardo, 2011).

2.1.3 Toxicidad de *Lantana camara*

La planta se reconoce mundialmente por su potencial toxicológico marcado y ampliamente reportado por una gran número de autores (Díaz, 2011).

En el año 1964, Seawright y colaboradores realizaron un estudio patológico, referente a la intoxicación de un grupo de 25 ovejas por consumo de *Lantana camara*, encontrando alteraciones en el hígado de algunas de estas por acumulación centrolobulillar de bilis en las células parenquimatosas y en las de Kupffer (Seawright, 1964).

El efecto de la administración oral de hojas de *L. camara* en conejillos de indias mostró disminución en el peso del tejido hepático y renal. Disminución de la cantidad de carbohidratos en el hígado y sin afectaciones en los riñones. Por otra parte Sharma y colaboradores encontraron alteraciones del ADN y ARN procedente de ambos tejidos (Sharma O. , 1987).

Los mismos autores en otro estudio, encontraron incremento en el hematocrito, número de eritrocitos, número de leucocitos, N-uréico y contenido de bilirrubina en sangre (Sharma O. , 1982).

La administración oral de hojas de *L. camara* en conejillos de india, evidenció alteración de la actividad enzimática en el citosol y lisosomas, verificado por aumento de la actividad de las enzimas glucoquinasa, lactato deshidrogenasa, glucosa 6-fosfatasa y disminución de la actividad del glutatión-S-transferasa (O.P, 1983).

En el año 1991 Sharma y colaboradores evaluaron la toxicidad de tres grupos de *Lantana camara* con diferente color de flores, encontrando diferente constitución química y una mayor hepatotoxicidad cuando las flores son de colores amarillo y rojo (Sharma O. , 1991).

Estudios en el año 1992, han reportado actividad hepatotóxica del metabolito Lantadeno C extraído de las hojas de *Lantana camara var. aculeata*, encontrando daño en las células hepáticas a nivel celular y subcelular. Evidenciando además,

lesiones hepáticas y cambios en los constituyentes del plasma (Sharma O. , 1992).

2.2 Estudios de embriofetotoxicidad

Este tipo de estudio corresponde a la evaluación realizada durante el periodo de desarrollo fetal, a partir de la implantación, y permiten correlacionar la actividad suscitada por el agente evaluado durante el periodo reproductivo posterior a su administración. Dentro de las posibles anomalías que pueden ser suscitadas se encuentran daños estructurales tanto en la madre como en el feto, alteraciones o deficiencias funcionales en el desarrollo fetal incluyendo la muerte del organismo en desarrollo (Staples, 2001).

La embriofetotoxicidad es entendida como la afección generada sobre el proceso de implantación del blastocito y el desarrollo embrionario en la formación de las criptas uterinas (tejido decidual). En este periodo, podrán ser afectadas la generación de las primeras líneas tisulares, trofoectodermo, endodermo primitivo y epiblasto o ectodermo primitivo, y a partir de ellas, posible alteración de la placenta y el saco vitelino extraembrionario; estructuras imprescindibles para la interacción con la madre (Staples, 2001).

Especies animales empleadas en estudios de desarrollo:

Dentro de las especies animales más utilizadas para la realización de este tipo de estudios, se encuentran las especies de roedores dada su facilidad de manejo y reproducción (Staples, 2001).

Puntos finales de la toxicología del desarrollo:

Durante los estudios de toxicidad reproductiva por administración de sustancias exógenas, se puede considerar uno o más puntos finales de estudio que resultan producto de la administración de la sustancia. Dentro de los puntos finales a considerar en el presente estudio de embriofetotoxicidad, se encuentran el aborto, muerte de la hembra preñada, determinación del porcentaje de abortos, determinación de procesos de reabsorción, daños anatomopatológicos de los órganos principales de la madre y malformaciones de los fetos (Staples, 2001).

2.2.1 Teratogénesis

Proceso por el cual se producen malformaciones estructurales o anatómicas generadas durante el desarrollo del embrión o el feto (Gutiérrez, 2001). Las malformaciones pueden determinarse con el ensayo de alizarina que permite definir las malformaciones óseas (Lizano, 2012).

2.2.2 Aborto.

El término se ha definido como todo mecanismo que propicia la interrupción de la preñez por intercepción o contracepción posimplantación del blastocito (Staples, 2001).

2.3 Ciclo reproductivo de los ratones.

Las hembras de los ratones presentan en sus ovarios miles de células germinales (ovogonias), las ovogonias se encuentran rodeadas de capas celulares denominados como folículos primordiales o primarios, las hembras llegan a madurez sexual a la 6 semana y son maduras sexualmente hasta los 13 a 14 meses de vida. El ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) de las ratonas dura de 4 a 6 días con un estro (o celo) de aproximadamente 8-12 horas. Durante el estro, las hembras aceptan la monta del macho.

La fertilización ocurre en la parte superior del oviducto y al día 5 el embrión se implanta en la pared del útero. La gestación dura entre 18,5 y 19,5 días en las hembras primíparas (Fernando J. Benavides, 2003).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad de embriofetotoxicidad de extractos de *Lantana camara* en un modelo de roedor (ratón).

3.2 Objetivos específicos:

Recolectar la especie *Lantana camara* en lugares cercanos a la sabana de Bogotá y establecer la clasificación taxonómica y caracterización botánica respectiva.

Obtener extractos hidroalcohólicos totales (70:30) de planta de *Lantana camara*, y las infusiones (total y flores) de la planta.

Evaluar la fitoquímica fundamental del extracto hidroalcohólico (70:30) de *Lantana camara* y de las infusiones (total y flores).

Implementar el bioensayo para la evaluación de la embriofetotoxicidad de los extractos e infusiones de *Lantana camara* en modelo roedor (ratón).

Realizar la evaluación anatomopatológica de los individuos tratados y los controles.

4. Metodología

4.1 Recolección e identificación taxonómica de *Lantana camara*

El material vegetal de *Lantana camara* fue colectado en el La Mesa, Cundinamarca, Colombia a 1200 m.s.n.m. Un ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional Colombiano (Universidad Nacional de Colombia), para su respectiva clasificación taxonómica, registrado con el número No. COL. 580112 (Anexo 1).

4.2 Obtención de extractos e infusiones

Se tomaron 15,6 Kg de material vegetal fresco de *Lantana camara*, que se secó durante un periodo de 48 horas en una estufa de aire circulante a una temperatura de 45°C; 3,5 Kg del materia seco se sometió a un proceso de molienda, posteriormente 3,1 kg de este se humecta con la mezcla etanol-agua 70:30 y es colocado en un percolador con 500 mL de la misma mezcla por un tiempo de 48 horas, finalizadas las 48 horas la solución obtenida es colectada, para proceder a la evaporación del solvente empleando un rotavapor unido a una bomba de vacío. El producto obtenido es sometido a un proceso de liofilización y disolución en un vehículo adecuado para la administración en el modelo animal.

Por su parte la infusión obtenida de la planta y las flores, son obtenidas a partir de 35 g de material vegetal fresco, que es colocado en 100 mL de agua a ebullición por un periodo de 5 minutos. Posteriormente se procede a filtrar y a congelar las infusiones obtenidas para su posterior administración vía oral a las hembras preñadas.

4.3 Evaluación de la fitoquímica fundamental del extracto hidroalcohólico 70:30 de *L. camara*.

4.3.1 Terpenos

La detección de los terpenos se lleva a cabo por medio de cromatografía en capa delgada, eluyendo con una mezcla diclorometano-metanol en proporciones (70:30), revelando las placas cromatográficas con reactivo de godín y posterior calentamiento a 110°C.

4.3.2 Flavonoides

La detección de flavonoides se lleva a cabo por medio de separación por cromatografía en capa delgada con una mezcla acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua en cantidades en mL de 99,9:11,1:11,1:22,2, revelando la placa con el reactivo NP-PEG, observando a la luz natural y a 275nm con lámpara UV.

4.3.3 Alcaloides

Para la determinación de alcaloides se realiza la separación en cromatografía en capa fina, con una mezcla diclorometano: metanol (70:30) y se revela con reactivo de Dragendorff (Alfonso, 2003).

4.3.4 Naftoquinonas

Para la determinación de naftoquinonas se realiza cromatografía en capa fina utilizando una mezcla solvente: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua en cantidades en mL de 99,9:1,1:1,1:2,2 y se revela la placa con hidróxido de potasio en metanol, posteriormente se realiza la observación de cambios de coloración a la luz natural y a 375 nm.

4.3.5 Saponinas

Para la determinación de saponinas se toma una cantidad determinada de extracto y liofilizado de la infusión, se colocan 5 mL de agua y se agita hasta la formación de espuma.

4.4 Criterios bioéticos.

De acuerdo a los postulados que se expondrán a continuación, se entenderá los principios que guían esta investigación. El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas, siendo utilizados como modelo para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano y a los animales. El animal de

laboratorio es “cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos”, es considerado como un reactivo biológico por ser este un animal estandarizado, lo que significa que tiene una composición genético-sanitaria definida. Son criados y mantenidos en ambientes controlados que cumplen con los requerimientos específicos para cada especie, los cuales garantizan además el bienestar animal. En 1959 William Russell y Rex Burch, en Inglaterra, en su famoso libro “The principles of humane animal experimental techniques”, exponen claramente las normas sobre las cuales se basan los principios éticos en la investigación con animales: las tres “R”: Reducir, Reemplazar y Refinar. Estos son los fundamentos para una racional e inteligente estrategia, que busca minimizar el uso de animales y las causas de dolor y de estrés (The Principles of Humane Experimental Technique, 1959).

Por lo anterior como investigadores hemos decidido aplicar los principios de uso de animales de los Institutos Nacionales de Salud y Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, que tienen relación con el proyecto:

1. Dado que el experimento involucra animales vivos, es realizado bajo supervisión de una persona calificada, en el presente caso supervisado por el Profesor Miguel Ángel Torres Wilches, quien da una capacitación a los colaboradores y al tesista de este proyecto.
2. El cuidado de los animales de experimentación fue realizado por personal calificado y estos fueron suministrados, por el bioterio del departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.

3. La investigación debe ser necesaria para el bien de la sociedad. Este proyecto busca responder a un problema de mala utilización de una planta con posible actividad tóxica, lo cual permitirá generar información sobre el cuidado en el uso de esta planta.

4. El experimento se debe basar en el conocimiento previo de la enfermedad o problema en estudio. El proyecto se basa en el uso etnobotánico de esta planta, considerando su posible actividad abortiva y el conocimiento respecto a sus características hepatotóxicas.

5. Cuando sea apropiado, el análisis estadístico, los modelos matemáticos o los sistemas biológicos *in vitro*, deben ser usados para complementar los experimentos realizados con animales y así, reducir el número de animales usados. Este estudio busca evaluar una actividad que no puede ser valorada directa y totalmente mediante estudios *in vitro* que sean disponibles en nuestro medio, por tanto, es necesario utilizar una especie animal en nuestro caso roedora, considerando usar como muestra poblacional por extracto un número de animales reducido ($n = 10$).

6. Se debe evitar todo daño y sufrimiento innecesario en los animales durante los experimentos. Para la manipulación de los animales, se hará una capacitación de dos días antes del inicio de la experimentación y siempre estará acompañada por una persona versada en la materia.

7. El investigador responsable debe ser capaz de decidir si concluyen o no los experimentos que provoquen algún sufrimiento a los animales. La investigación concluirá para los animales que sufran un gran estrés durante la experimentación

y finalizará con un sacrificio de todos los sujetos del estudio, se realizarán observaciones a diario evaluando cambios físicos y comportamentales. En caso de observar un animal con daños físicos irreversibles, se procederá inmediatamente a su sacrificio.

8. Si es necesario sacrificar algún animal de experimentación, el procedimiento debe ser realizado humanitariamente. Ningún animal debe ser descartado hasta que se esté seguro de su muerte. El procedimiento de sacrificio a utilizar es la dislocación cervical, por facilidad y rapidez en su aplicación, y porque permite que el animal no sufra alteraciones en los órganos a analizar.

De acuerdo a lo anterior, podemos asegurar que el proyecto seguirá los lineamientos de la norma descrita en las Guías para Cuidado y Uso de los Animales.

Adicionalmente, el proyecto fue sometido a evaluación por el Comité de Ética de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, lo cual se plasma en el acta 05 del 28 de octubre de 2013, considerando que el proyecto cumplía con los aspectos éticos básicos para el desarrollo de una evaluación biológica.

4.5 Evaluación toxicidad aguda extracto hidroalcoholico 70:30 de *Lantana camara*

Animales de experimentación: Los animales utilizados para la evaluación de la toxicidad aguda corresponden a ratones albino ICR, mantenidos bajo

condiciones de habitat de 12 horas luz y 12 horas oscuridad junto a alimentación y bebida *ad libitum*, temperatura $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y humedad entre 30 - 70%.

Para la determinación de la toxicidad aguda del extracto se evaluaron 6 grupos de 5 hembras (ratones albino cepa: Suizo ICR) de 8 a 12 semanas de edad, para cinco de los cuales cada uno recibe una de las siguientes dosis: 250, 500, 1000, 1500 y 2000mg/Kg: el sexto grupo se toma como control, al cual se administra exclusivamente el vehículo de administración del extracto.

La evaluación se realiza durante un periodo de 15 días, posterior a una única administración y evaluando el comportamiento de las hembras mediante el Test de Irwin (Roux, 2004), en los días 0, 7 y 15; variaciones de peso y cualquier otra alteración evidente en los sujetos de estudio. La prueba finaliza el día 15 con el sacrificio de los animales de prueba y la realización de la evaluación anatomopatológica respectiva.

4.5.1 Evaluación comportamental mediante el Test de Irwin

En el presente estudio los cambios comportamentales se evalúan mediante la aplicación del Test de Irwin (Irwin, 1968), descrito como un procedimiento observacional que permite detectar efectos asociados con la sustancia de prueba, evidenciados por manifestaciones diferenciales de los signos evaluados entre los animales control y tratados (Irwin, 1968). El test de Irwin evalúa tres tipos de parámetros (Avellaneda, 2011):

- Perfil comportamental: estados de alerta, acicalamiento, pasividad, actividad motora. En el presente estudio se evaluó por un tiempo de 5 minutos mediante la aplicación del ensayo de campo abierto, observando y calificando cambios en los animales tratados respecto a los animales del grupo control (**Imagen 7**).



Imagen 7: Ensayo de campo abierto toxicidad aguda extracto Hidroalcoholico 70:30, *Lantana camara*.

- Perfil motor: excitación central, incoordinación motora, tono muscular y reflejos, observada mediante la aplicación del ensayo de campo abierto y la aplicación del test de evaluación del reflejo pinal y del reflejo corneal (**Imagen 8**).



Imagen 8: Evaluación del reflejo corneal animales tratados.

- Perfil autonómico: Cambios en las secreciones como diarrea.

4.6 Reproducción de animales (ratones) y evaluación de la preñez.

El cruce de los animales se realiza tomando 20 grupos de tres hembras por cada macho de 8 semanas de edad, que se mantienen juntos durante una semana; realizando evaluación permanente de los signos de preñez momento en el cual el macho es sacado del grupo (**Imagen 9**). La determinación de la preñez se realiza mediante control de peso diario de las hembras y observación de la aparición del tapón vaginal, entre los días 2 a 5 posterior al contacto con el macho (The Jackson Laboratory, 2007). Tras la observación de alguno de los signos anteriormente descritos, se procede a la administración de las sustancias de prueba y al sacrificio del macho.



Imagen 9: Condiciones de apareamiento de los animales.

4.7 Evaluación de la embriofetotoxicidad de *Lantana camara* en roedores

Para la evaluación de la embriofetotoxicidad del extracto hidroalcohólico y las infusiones, se toman 5 grupos cada uno de 10 hembras preñadas (**Imagen 10**), a tres de estos se les administraron dosis de 1500 mg/Kg de cada sustancia a evaluar infusiones y extracto, y los dos restantes, se toman como controles, que reciben los respectivos vehículos usados con las sustancias de prueba. Las administraciones son realizadas por un periodo de 19 días con control de peso y observación diaria, tras los cuales finaliza la prueba con el sacrificio de las hembras y la realización de la evaluación anatomopatológica durante la necropsia, con extracción del órgano reproductor, hígado y riñones, a los cuales se les realiza además evaluación histopatológica.

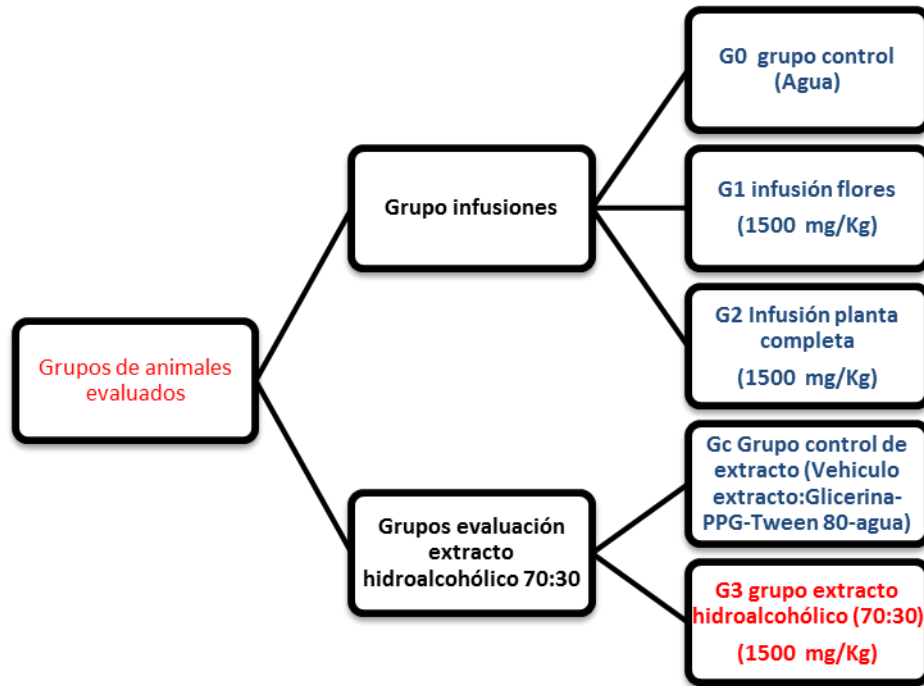


Imagen 10: Grupos de Tratamiento del estudio de embriofetotoxicidad *Lantana camara*.

4.7.1 Verificación del aborto

Para la verificación de posibles abortos ocurridos durante el periodo de gestación, el día 19 se realiza la respectiva necropsia a cada hembra y se determina el número de implantaciones, teniendo en cuenta el número de crías o fetos hallados en el final del ciclo gestacional (Staples, 2001).

Para el presente estudio cuatro tipos de eventos se correlacionaron con el aborto:

1. Evidencia de la implantación sin presencia feto.
2. Rastros del feto por procesos de reabsorción en el organismo
3. Rastros del feto por expulsión del mismo durante la gestación.

4. Perdida abrupta de peso de la madre durante el periodo de evaluación.

4.7.2 Evaluación histológica de los órganos de la madre.

Los tejidos fueron fijados en una solución en formol bufferado al 10%, permitiendo su fijación por un periodo de 24 horas posterior a lo cual se hicieron cortes histológicos para su respectiva evaluación histopatológica de los fetos y los órganos de la madre, se realiza mediante tinción con hematoxilina y eosina, que permite evidenciar las correspondientes alteraciones y realizar la comparación entre los órganos de los animales control y los animales tratados. Proceso realizado y evaluado por el patólogo Ángel Yobany Sánchez Merchán.

4.7.3 Evaluación de las malformaciones óseas de los fetos

En la evaluación de las malformaciones óseas de los fetos, se coloca cada uno en un recipiente individual con el fin de establecer una fijación con alcohol isopropílico (IPA), por un periodo de una semana, después de la cual se realiza un lavado con KOH al 1% por 24 horas, a continuación de las 24 horas se realiza un lavado con una solución de alizarina de 50mg/Gal en KOH al 1% por otras 24 horas, con el fin de colorear el Ca libre de la estructura esquelética de los fetos. Finalizadas estas últimas 24 horas, se hacen lavados con soluciones con gradiente de glicerina del 20%, 40%, 60%, 80% y 99%. Finalmente se dejan los fetos en glicerina al 99%, con algunos cristales de timol, con el fin de preservar el individuo de estudio para realizar observaciones con un estereoscopio. Dentro de

las alteraciones óseas a evaluar se realiza una revisión detallada: tamaño y forma de los huesos nasal, frontal, parietales, maxilar, vertebras, pelvis, extremidades posteriores y extremidades anteriores (Staples, 2001).

4.8 Análisis estadístico de resultados

Para el presente estudio los cambios significativos de peso en el estudio de toxicidad aguda y el de embriofetotoxicidad, son evaluados mediante un análisis estadístico ANOVA, para factores con medidas repetidas y no repetidas, con el fin de determinar las variaciones significativas de peso durante el estudio utilizando un valor $p < 0,05$ y el programa estadístico **RWizard**® (Guisande, 2014).

Para establecer la relación de los efectos embriofetotóxicos (aborto y teratogénesis), observados tras la administración de los diferentes productos de *Lantana camara*, en relación con lo observado para el grupo control, y así establecer si existe significancia entre las diferencias encontradas, utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, mediante la aplicación del programa estadístico **Rwizard**®, aplicando un valor $p < 0,05$ (Guisande, 2014).

Por otro parte, para determinar la relación existente entre las manifestaciones de embriofetotoxicidad, mostradas entre los diferentes productos de *Lantana camara* administrados (infusión de flores, infusión de planta y extracto de planta

completa), se realizó la prueba de Chi-cuadrado usando con un valor $p < 0,05$, prueba que permite relacionar la dependencia entre dos variables cualitativas, utilizando el programa **IBM SPSS STATISTICS 20**®, considerando tan solo que este tipo de efecto se presenta sí o no.

5. Resultados y discusión

5.1.1 Clasificación taxonómica y botánica.

La planta colectada en la Mesa (Cundinamarca) fue identificada en el herbario Nacional Colombiano por el Profesor Carlos Parra bajo el No. Col.580112 siendo identificada como: *Lantana camara* L (**VERBENACEAE**) (**Anexo 1**).

5.1.2 .Obtención extractos

Se obtuvieron 55 g de extracto liofilizado de *Lantana camara* a partir de 3,1 kg de material vegetal seco y triturado, encontrando un rendimiento de extracción en base seca del 1,7%, rendimiento menor al reportado por Mello en el año 2005 del 4,7%, evidenciando que el rendimiento encontrado en el presente estudio es menor, por lo cual se puede inferir, que el proceso de extracción por percolación utilizado no resulta tan eficiente como el método de extracción (maceración), implementado por Mello (Mello F. B., 2005).

Los resultados obtenidos de la extracción están directamente relacionados con el tipo de extracción que se utilice (Sharapin, 2000); en nuestro caso los pasos de extracción pudieron conllevar a disminución del rendimiento, producto de pérdidas

durante la eliminación de los solventes (orgánico y acuoso), manipulación del material vegetal y en el proceso de humectación del mismo.

5.1.3 Evaluación fitoquímica básica del extracto hidroalcohólico de *L. camara*.

En la evaluación de la fitoquímica del extracto hidroalcohólico se caracterizaron los siguientes grupos de metabolitos secundarios: terpenos, naftoquinonas, saponinas, alcaloides y flavonoides.

5.1.3.1 Prueba para la detección de terpenos

La **Imagen 11 A** corresponde a la placa cromatográfica obtenida para la detección de los terpenos para el extracto hidroalcohólico 70:30, donde la placa permite asegurar que pueden existir terpenos con posible polaridad similar al lupeol y al colesterol.

Por su parte la **Imagen 11 B** indico una posible presencia de compuestos terpénicos de mayor polaridad que el lupeol y el colesterol en la infusión de planta completa.

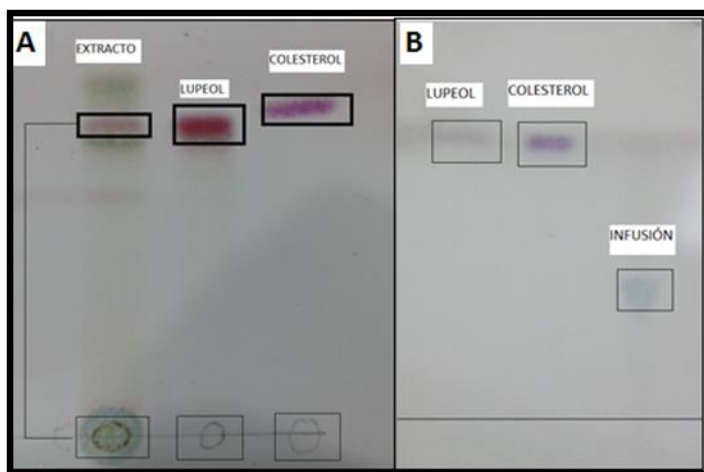


Imagen 11: A. Extracto *L. camara l.*, lupeol y colesterol. FM: CHCl₃-CH₃OH 80:20 B. Infusión planta completa *L. camara l.*, lupeol y colesterol. FM: CHCl₃-CH₃OH 70:30.

Dichos hallazgos indican que el extracto hidroalcohólico presenta posiblemente terpenos de carácter medianamente polar que podrían ser los lantadenos descritos por otros autores (Stashenko, 2003). Por su parte para la infusión los posibles compuestos terpénicos corresponderían a terpenos de carácter polar de acuerdo a la cromatografía de la **Imagen 11 B**.

La detección indicó la presencia de terpenos de acuerdo a los reportes anteriores para esta planta.

5.1.3.2 Prueba de detección de flavonoides NP-PEG

La detección de flavonoides se realizó por medio de cromatografía en capa delgada, para lo cual se utilizó como fase móvil Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (99,9:1,1:1,1:2,2). Posteriormente, se asperjó un agente cromogénico NP-PEG que consiste en (a) una solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina y (b) una solución etanólica al 5% de polietilenglicol – 400

(PEG), observando a luz natural manchas de tonalidad amarilla similares a las del patrón de quercetina, que indican la posible presencia de compuestos de tipo flavonoide de polaridad similar a la quercetina en la infusión y el extracto, cuando se observa la placa al UV a 275nm se evidencian manchas naranjas que indican la presencia de flavonoides de mayor polaridad que la quercetina.

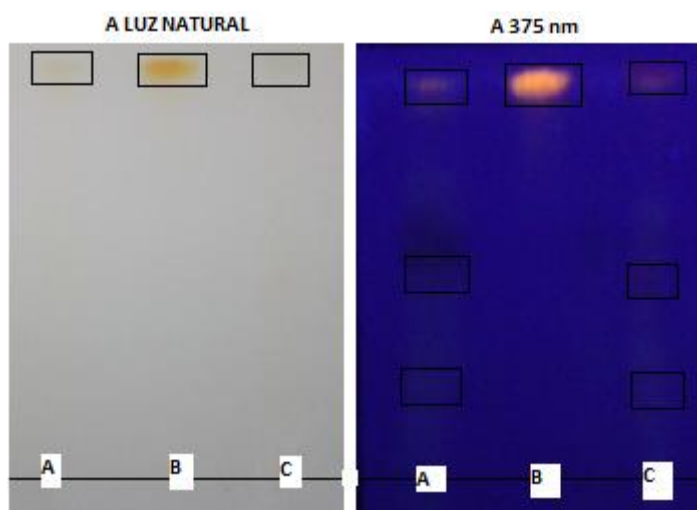


Imagen 12: Placa cromatografía en capa fina, presencia de compuestos de tipo flavonoide observación a luz natural y 375nm. A: Extracto hidroalcohólico 70:30 *L. camara*. B: Quercetina C: Infusión planta *L. camara*.

La detección para la infusión y el extracto, indicó la presencia de flavonoides y concuerda con los reportes anteriores para esta planta (Dorr, 1997).

5.1.3.3 Ensayo para alcaloides

El ensayo de alcaloides no evidenció presencia de este tipo de compuestos en el extracto, puesto que el alcaloide reportado para esta planta corresponde a la tamina un alcaloide no verdadero (Carillo, 2006), que podría estar presente en esta especie, pero que no puede ser determinado por el reactivo de Dragendorff.

5.1.3.4 Ensayo para saponinas.

El ensayo de saponinas evidencio una posible presencia de este tipo de compuestos en el extracto *L. camara l.* y la infusión de *L. camara L* , cuando se sometió una cantidad de estos en un volumen de agua y se generó espuma que se mantuvo por un tiempo mayor a 15 minutos **(Anexo 4)**.

5.1.3.5 Ensayo para naftoquinonas.

El ensayo de naftoquinonas no demostró presencia de este tipo de compuestos en el extracto hidroalcohólico ni las infusiones de planta completa y flores de *Lantana camara*.

5.1.4 Estudio de toxicidad aguda.

Para realizar la prueba de toxicidad aguda, las hembras se distribuyeron de forma aleatoria en seis grupos de cinco animales, cada uno de los cuales se sometió a tratamiento por vía oral, con una de cinco dosis del extracto y el último se conservó como grupo control, siendo este último tratado tan solo con el vehículo usado para administrar el extracto.

Se realizó la evaluación comportamental y se realizó el control de peso respectivo, durante los quince días de evaluación, al final de los cuales, los animales fueron sacrificados para realizar su necropsia y el respectivo análisis anatomopatológico, de cada uno de los animales tratados frente a los del grupo control.

5.1.4.1 Evaluación comportamental durante la toxicidad aguda.

Los resultados de evaluación comportamental mediante el Test de Irwin realizado durante los días 0, 7 y 15 a cada animal se presentan a continuación:

Tabla 1: Datos evaluación test de Irwin a 0 días. Relaciona el número de animales que presentaron alteración durante la evaluación de toxicidad aguda.

Criterio de evaluación	DOSIS					
	Control	250mg/Kg	500mg/Kg	1000mg/Kg	1500mg/Kg	2000mg/Kg
Perfil comportamental						
Estado alerta	5	5	5	5	5	5
Acicalamiento	0	0	0	0	0	1
Nerviosismo	0	0	0	0	0	2
Agresividad	0	0	0	0	0	1
Pasividad	2	2	2	2	2	3
Temeroso	3	3	3	3	3	1
Respuesta al dolor/ analgesia	0	0	0	0	1	1
Ubicación espacial	5	5	5	5	4	4
Perfil motor						
incoordinación motora	0	0	0	0	0	0
Perdida de reflejo corneal	0	0	0	0	0	0
Perdida de reflejo pineal	0	0	0	0	0	0
Perfil autonómico						
Aumento o disminución tamaño de la pupila	0	0	0	0	0	0
Secreciones	0	0	0	0	0	0

***Los valores en la tabla corresponden al número de animales que evidenciaron efecto, teniendo como número de animales por grupo 5.**

Los resultados obtenidos por medio de la evaluación de Test de Irwin a la hora de administración (**Tabla 1**), indicaron que no existen cambios en el perfil autonómico en ninguno de los animales, producto de la administración del extracto hidroalcohólico de *Lantana camara*, evaluados por cambios en el tamaño de la pupila y presencia de secreciones. Se evidenció que al menos uno de los animales presente en los grupos de dosificación de 1500 y 2000 mg/Kg, presenta respuesta negativa al dolor al ser sometidos a un estímulo, resultados posiblemente relacionados a compuestos de carácter analgésico presentes en la planta que no han sido reportados para el extracto hidroalcohólico 70:30 de planta

completa, pero si para extracto alcohólico de hojas de *Lantana camara* (Viswanatha, 2008) y que pueden ser relacionados con el uso etnobotánico de infusiones de la misma (Irvine, 1961).

Frente a la evaluación de pruebas para el perfil neurológico no se describió cambios en ninguno de los animales indicando una posible ausencia de compuestos que alteren el SNC, a pesar de que han sido descritos compuestos con actividad anestésica para este género como el óxido de Cariofileno (Adoga, 2013).

Por su parte se observó que uno de los animales del grupo de 2000 mg/Kg presentó un excesivo acicalamiento, signo asociado a una posible estimulación simpática o central, por parte de uno de los metabolitos de la planta o producto del estrés al cual fue sometido el animal.

Tabla 2: Datos evaluación test de Irwin a 7 días. Relaciona el número de animales que presentaron criterio de evaluación respecto a la dosis de tratamiento.

Criterio de evaluación	DOSIS					
	Control	250mg/Kg	500mg/Kg	1000mg/Kg	1500mg/Kg	2000mg/Kg
Perfil comportamental						
Estado alerta	5	5	5	5	5	5
Acicalamiento	0	0	0	0	0	0
Nerviosismo	0	0	0	0	0	0
Agresividad	0	0	0	0	0	1
Pasividad	5	3	3	3	3	3
Temeroso	0	2	2	2	2	1
Respuesta al dolor/ analgesia	0	0	0	0	0	0
Ubicación espacial	5	5	5	5	5	5
Perfil motor						
incoordinación motora	0	0	0	0	0	0
Perdida de reflejo corneal	0	0	0	0	0	0
Perdida de reflejo pineal	0	0	0	0	0	0
Perfil autonómico						
Aumento o disminución tamaño de la pupila	0	0	0	0	0	0
Secreciones (diarrea)	0	0	0	0	0	0

***Los valores en la tabla corresponden al número de animales que evidenciaron efecto, teniendo como número de animales por grupo 5**
Respecto a la evaluación al día 7 por medio del Test de Irwin no se evidenció algún cambio en los perfiles de evaluación comportamental, motora y autonómica en los animales tratados, probablemente asociado a la excreción de los compuestos por vía renal o por heces (Lorenzo, 2009).

Por otra parte, la temerosidad o agresividad que presentaron algunos animales de los grupos de mayor dosificación, se cree que está directamente relacionada con la manipulación experimental, anteriormente descrita por otros autores (Monamy, 2009).

Tabla 3: Datos evaluación test de Irwin a 15 días. Relaciona el número de animales que presentaron criterio de evaluación respecto a la dosis de tratamiento.

Criterio de evaluación	DOSIS					
	Control	250mg/Kg	500mg/Kg	1000mg/Kg	1500mg/Kg	2000mg/Kg
Perfil comportamental						
Estado alerta	5	5	5	5	5	4
Acicalamiento	0	0	0	0	0	0
Nerviosismo	0	0	0	0	0	0
Agresividad	0	0	0	0	0	0
Pasividad	5	3	3	3	3	3
Temeroso	0	0	0	0	0	1
Respuesta al dolor/ analgesia	0	0	0	0	0	0
Ubicación espacial	5	5	5	5	5	4
Perfil motor						
incoordinación motora	0	0	0	0	0	0
Perdida de reflejo corneal	0	0	0	0	0	0
Perdida de reflejo pineal	0	0	0	0	0	0
Perfil autonómico						
Aumento o disminución tamaño de la pupila	0	0	0	0	0	0
Secreciones (diarrea)	0	0	0	0	0	0

***Los valores en la tabla corresponden al número de animales que evidenciaron efecto, teniendo como número de animales por grupo 5**
En el día 15, se realizó la evaluación sin encontrarse alteraciones de los perfiles comportamental, motor y autonómico de los animales tratados, por la ya citada excreción total de los productos administrados.

5.1.4.2 Evaluación anatomopatológica de los animales

Al día 15 de evaluación, se procedió a la disección de los animales y la evaluación anatomopatológica comparativa, entre los órganos principales de los animales del grupo tratado y los del grupo control, teniendo como finalidad verificar alteraciones hepáticas, renales y cardíacas, resultados que se muestran en la **Tabla 4**:

Tabla 4: Evaluación anatómica de los diferentes grupos de dosificación del extracto hidroalcohólico 70:30.

Grupo/ Órgano	Control	250mg/Kg	500mg/Kg	1000mg/Kg	1500mg/Kg	2000mg/Kg
Hígado	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	4 (4)
Corazón	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	4 (4)
Riñones	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	3 (4)
Intestinos	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	1 (4)
Estomago	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (4)
Ovarios	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (4)
Bazo	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (4)

El número externo corresponde al número de individuos que presentaron alteraciones anatomopatológicas y el número interno al número de individuos en cada grupo de tratamiento.

Se determinó, que la totalidad de animales tratados a dosis de 2000mg/Kg presentaron alteraciones morfológicas en hígado (hepatomegalia) que ya había sido reportada por otros autores (Sharma O. , 1987), asociado a los terpenos lantadeno A y lantadeno B, que se encuentran posiblemente en el extracto evaluado considerando el resultado de la detección de este tipo de compuestos, por el reactivo de Godin (**Imagen 11**), compuestos que han sido reportados como compuestos hepatotóxicos (Sharma O. , 2011).

Adicionalmente se encontró un incremento en el tamaño de los riñones, en todos los animales tratados bajo la dosis de 2000 mg/Kg con respecto a los animales del grupo control, resultados similares a los reportados por Mello (Mello F. B., 2005).

A continuación se presenta una imagen comparativa entre uno de los animales del grupo control y uno del grupo tratado, donde se observa hepatomegalia en el animal tratado (**Imagen 13**).

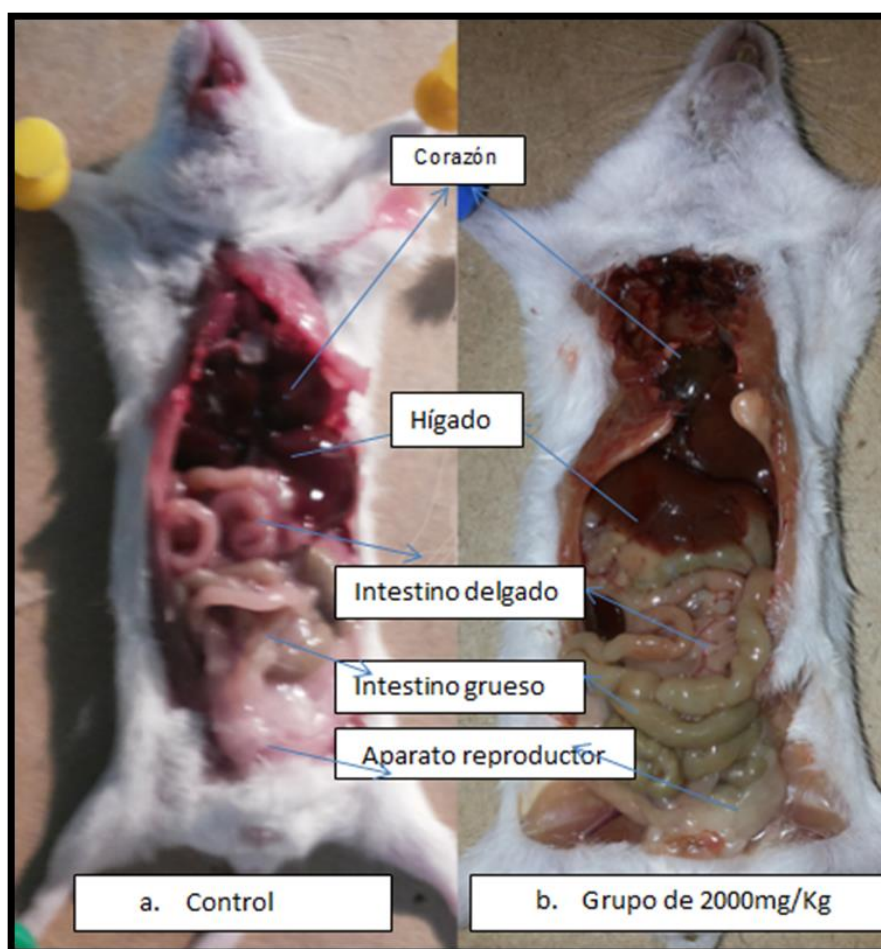


Imagen 13: Animal grupo control vs animal grupo tratado con 2000 mg/Kg del extracto hidroalcohólico

Mediante la evaluación histológica se evidenció lesión hepática, donde los tejidos de las hembras mostraron colestasis y necrosis focal de hepatocitos, como se puede observar en la **Imagen 14**.

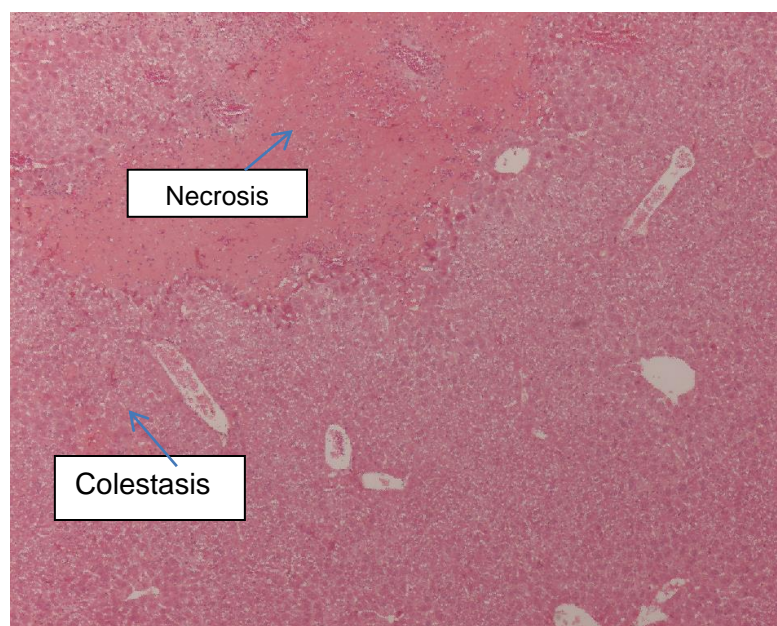


Imagen 14: Corte transversal del hígado de animal tratado con una dosis de 2000 mg/Kg de extracto hidroalcohólico de *L. camara* / vista 4X.

El estudio descrito anteriormente, determinó que la dosis de 1500 mg/Kg del extracto, no ocasiona efectos adversos en las hembras, por lo que se considera la dosis de prueba para el estudio de la embriofetotoxicidad, teniendo en cuenta que en los estudios de embriofetotoxicidad no debe existir daño sobre la madre, porque este podría incidir directamente en el desarrollo embrio-fetal.

5.1.5 Determinación del número de implantaciones en cada hembra gestante, perteneciente a cada grupo de tratamiento.

El número de implantaciones se determinó en el sacrificio de los animales al final del periodo gestacional, encontrándose este número como marcador de la evaluación del efecto abortivo después de la administración del extracto y la infusión.

La **Imagen 15** corresponde al órgano reproductor de una hembra tratada con el extracto hidroalcohólico, en el cual se observa un implante con su respectivo feto en desarrollo (implante viable), contrastado con otro donde se aprecia implantación, pero no dicho desarrollo (implante no viable).



Imagen 15: Órgano reproductor donde se evidencian implantaciones

La **Tabla 5** corresponde al número de implantaciones por animal tratado en el grupo de infusión de flores, grupo infusión de planta completa y control de infusión.

Tabla 5: Número de implantaciones por cada animal tratado con el vehículo control, infusión de planta completa e infusión de flores.

	Grupo control	Grupo de infusión Flores	Grupo de infusión de Planta completa
Animal	Número de Implantes	Número de Implantes	Número de Implantes
Hembra 1	12	10	10
Hembra 2	12	10	10
Hembra 3	13	10	11
Hembra 4	13	11	11
Hembra 5	13	11	12
Hembra 6	14	11	13
Hembra 7	14	11	14
Hembra 8	14	12	14
Hembra 9	16	13	14
Hembra 10	17	13	19
Número total de implantaciones por grupo de tratamiento	138	112	128
Promedio de Implantaciones por grupo de tratamiento	13,8	11,2	12,8

La **Tabla 6** corresponde al número de implantaciones por animal, tratados con el control y el extracto hidroalcohólico.

Tabla 6: Número de implantaciones por cada animal tratado con el control del extracto y el extracto hidroalcohólico 70:30 *L. camara*.

	Grupo control de extracto	Grupo extracto hidroalcohólico 70:30 <i>L. camara</i> 1500mg/Kg
Animal	Número de Implantes	Número de Implantes
Hembra 1	12	13
Hembra 2	13	14
Hembra 3	13	14
Hembra 4	14	14
Hembra 5	16	14
Hembra 6	16	15
Hembra 7	17	17
Hembra 8	17	17
Hembra 9	18	18
Hembra 10	18	18
Número total de implantaciones por grupo de tratamiento	154	154
Promedio de Implantaciones por grupo de tratamiento	15,4	15,4

5.2 Evaluación de la embriofetotoxicidad de *Lantana camara L.* en roedores

5.2.1 Variaciones de peso de los animales tratados

La evaluación continua del peso de los animales tratados, permitió relacionar la posible preñez verificada por la existencia del tapón vaginal, con la posible incidencia de aborto, relacionada además con la disminución de peso producto de la administración continua de la sustancia a evaluar.

A continuación se presenta los datos de peso de los animales, sometidos estadísticamente a la prueba ANOVA para medidas repetidas y no repetidas, obtenidas tras la administración de la infusión de flores, de planta completa y control (**Tabla 7**):

Tabla 7: Variaciones de peso de los animales durante el desarrollo del estudio Promedio +/- DS.

	Control Infusión. Peso en g.	Infusión planta completa Peso en g.	Infusión flores Peso en g.
N de cada grupo:	10	10	10
1 Día de monta.	31,1 +/- 3,4	31,1 +/- 2,2	31,0 +/- 1,8
3 Día de monta.	32,3 +/- 2,7	32,4 +/- 2,4	31,7 +/- 1,8
1 Día de admón.	33,4 +/- 2,4	32,7 +/- 3,0	33,2 +/- 2,9
7 Día de admón.	34,0 +/- 3,5	35,0 +/- 3,5	34,8 +/- 4,1
14 Día de admón.	38,4 +/- 2,1	35,7 +/- 5,0	34,9 +/- 5,1
19 Día de admón.	39,6 +/- 2,3	37,3 +/- 4,7	37,6 +/- 4,0

La prueba estadística indicó que existe una diferencia significativa de peso entre los grupos de infusión de planta completa, infusión flores y control, durante el desarrollo de los fetos como se muestra en el **Grafico 1**.

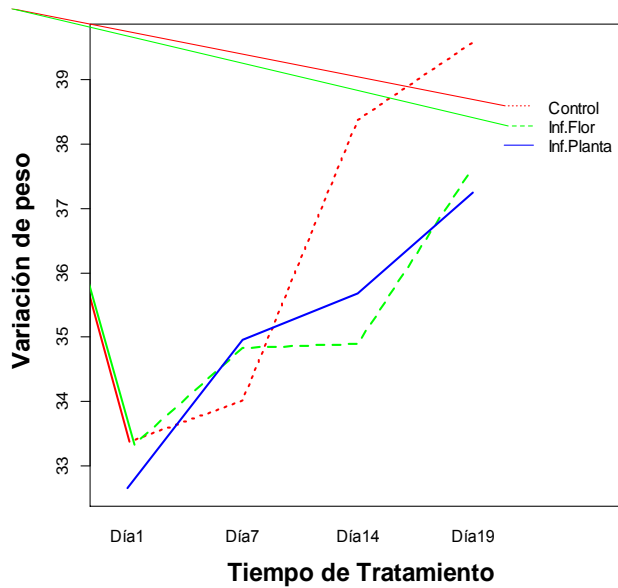


Gráfico 1: Variación de peso en el tiempo para los animales tratados con infusiones de *Lantana Camara L.*

El anterior gráfico, indica que existen diferencias significativas de variación de peso entre los grupos de tratamiento, durante el periodo comprendido entre los días 7 y 14, periodo en el cual los fetos del ratón se encuentran en desarrollo. Se puede asumir el fenómeno del aborto, basado en el comportamiento de las pendientes de las gráficas entre grupos, donde para los grupos tratados la pendiente es menor que la del grupo control, resultado que podemos asociar al aborto inducido por compuestos presentes en la infusión, como bien se evidencio en la determinación del porcentaje de abortos que se explica más adelante (**Numeral 5.5.2**).

A continuación se presenta los datos de peso tratados estadísticamente por medio de la prueba ANOVA para medidas repetidas y no repetidas, que evalúa

los cambios significativos de peso del grupo control y del grupo con el extracto hidroalcohólico durante el tiempo de evaluación.

Tabla 8: Variaciones de peso de los animales durante el desarrollo del estudio.

	Control extracto. Peso en g.	Extracto hidroalcohólico 70:30. Peso en g.
N de cada grupo:	10	10
1 Día de monte.	31,2 +/- 3,4	31,1 +/- 2,2
3 Día de monte.	32,5 +/- 2,7	32,4 +/- 2,4
1 Día de admón.	33,7 +/- 2,6	32,7 +/- 3,0
7 Día de admón.	33,9 +/- 3,5	34,6 +/- 4,2
14 Día de admón.	38,2 +/- 2,2	34,3 +/- 6,1
19 Día de admón.	39,8 +/- 2,5	37,0 +/- 5,3

La prueba estadística indicó que existe una diferencia significativa de variación de peso, entre el grupo de tratamiento y el grupo control, asumiéndose que el incremento de peso en el periodo de tiempo entre los días 7 y 14, son propios del proceso de desarrollo fetal, como se muestra en el Grafico 2.

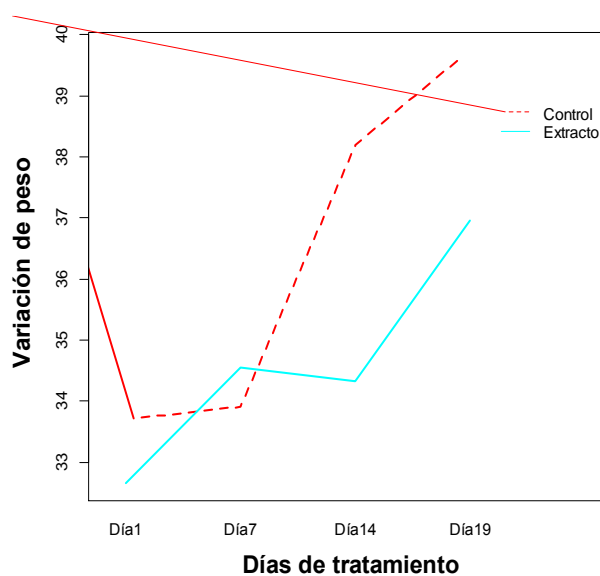


Gráfico 2: Variación de peso de los animales tratados con extracto de *Lantana Camara L.* durante el tiempo de evaluación.

La grafica 2 indica que el grupo tratado con extracto presentó disminuciones significativas de peso después del día 7 de administración, resultado asociado a la posibilidad de ocurrencia de abortos, efecto reportado para la *Lantana camara* colectada en Brasil (Mello F. B., 2005), que a diferencia del presente estudio no mostro variaciones significativas de peso en los animales, como si lo reflejo el presente estudio.

5.2.2 Incidencia de aborto

Para la determinación de aborto se utilizó como indicador la diferencia entre el número de implantes y el número de fetos encontrados durante la necropsia, teniendo en cuenta como parámetro fundamental en la evaluación la pérdida de peso individual en las hembras del estudio.

Para el presente estudio cuatro tipos de eventos se correlacionaron con el aborto:

1. Evidencia de la implantación sin presencia de feto (**Imagen 15**).
2. Rastros del feto por procesos de reabsorción en el organismo
3. Rastros del feto por expulsión del mismo durante el desarrollo fetal.
4. Perdida abrupta de peso de la madre durante el periodo de evaluación.

A continuación se presentan las imágenes que corresponden a los tipos de eventos relacionados como aborto:

- Hembra tratada con extracto hidroalcohólico 70:30 de *Lantana Camara L*, que presento proceso de expulsión el día 18 de administración, advirtiéndose que el feto se encontraba en retrasado estado de desarrollo (**Imagen 16**).



Imagen 16: Hembra que evidenció proceso de expulsión.

- Hembra tratada con infusión de flores de *Lantana Camara L* a dosis de 1500 mg/kg, que presento un proceso de reabsorción, como se puede observar en la **Imagen 17** donde se evidencian restos de un feto.

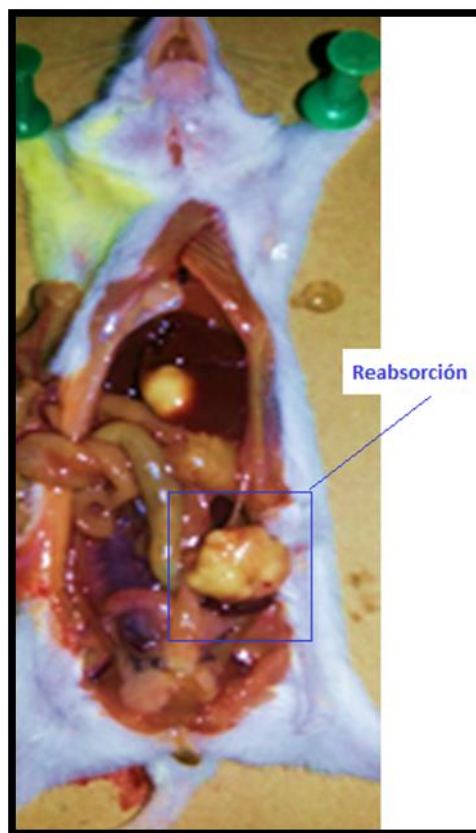


Imagen 17: Hembra que evidenció proceso de reabsorción.

- Feto expulsado por administración de la infusión de planta completa de *Lantana camara L.* a dosis de 1500 mg/kg, al día 17 (**Imagen 18**).



Imagen 18: Feto expulsado por infusión de planta completa al día 17 de administración.

- Las pérdidas abruptas de peso se relacionaron con aborto y dichas variaciones se analizan en el **numeral 4.1.1.2.**

La **Tabla 8**, corresponde al número de abortos por cada animal perteneciente a cada grupo de tratamiento, encontrándose un mayor porcentaje promedio de abortos en el grupo tratado con infusión de planta completa frente al promedio de abortos del grupo tratado con la infusión de flores.

Tabla 9: Porcentaje de abortos por animal tratado con control, infusión de flores y planta completa

Animal	Grupo control				Grupo de infusión Flores				Grupo de infusión de Planta completa			
	Número de Implantes	Número de abortos	% de abortos	Fetos Viabiles	Número de Implantes	Número de abortos	% de abortos	Fetos Viabiles	Número de Implantes	Número de abortos	% de abortos	Fetos Viabiles
Hembra 1	12	0	0,0	12	10	0	0,0	10	10	4	40,0	6
Hembra 2	12	0	0,0	12	10	0	0,0	10	10	1	10,0	9
Hembra 3	13	1	7,7	12	10	3	30,0	7	11	2	18,2	9
Hembra 4	13	0	0,0	13	11	2	18,2	9	11	5	45,5	6
Hembra 5	13	0	0,0	13	11	3	27,3	8	12	2	16,7	10
Hembra 6	14	0	0,0	14	11	1	9,1	10	13	5	38,5	8
Hembra 7	14	0	0,0	14	11	3	27,3	8	14	0	0,0	14
Hembra 8	14	0	0,0	14	12	4	33,3	8	14	0	0,0	14
Hembra 9	16	0	0,0	16	13	3	23,1	10	14	2	14,3	12
Hembra 10	17	0	0,0	17	13	3	23,1	10	19	5	26,3	14
Porcentaje Promedio de abortos por grupo de tratamiento	0,8				19,1				20,9			

Para evaluar la relación existente entre el porcentaje de abortos y los respectivos tratamientos, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis entre los grupos de tratamiento, indicando un valor p de 0.001642, obteniéndose una diferencia significativa entre tratamientos.

El análisis estadístico por medio de la prueba no paramétrica de Kruskall Wallis, demostró que existía una varianza significativa entre los grupos de administración de infusiones a dosis de 1500 mg/Kg, frente al grupo control, indicando un efecto abortivo para las infusiones de la planta completa y flores, que no habían sido descritos en estudios anteriores para la planta *L. camara* recolectada en Colombia y además, posiblemente asociado a uno de los metabolitos de carácter polar presente en la planta (Bernardi, 2011).

Adicionalmente, no se evidenció diferencia significativa por medio de la prueba no paramétrica de Kruskall Wallis para un valor $p < 0,05$, entre los grupos de tratamiento de infusiones de planta completa y flores, indicando la presencia de compuestos abortivos tanto en la planta completa como en las flores. Dentro de los posibles metabolitos asociados a dicha actividad, se pueden encontrar compuestos fenólicos y fitoesteroles, compuestos que han sido descritos en extractos acuosos de *Lantana camara* (Kokati, 2011).

La **Tabla 10** correspondiente al porcentaje de abortos por cada animal perteneciente a cada grupo de tratamiento, permite evidenciar que en este estudio se encontró un mayor porcentaje de aborto (promedio de 15,5), para el grupo tratado con extracto de planta completa, valor similar al reportado para la *Lantana camara L* recolectada en Brasil, pero a dosis de 3000 mg/Kg de acuerdo con la evaluación realizada en ratas (Mello J. , 2005). De acuerdo con esto, podríamos asumir que aquellos compuestos que fueron reportados en el trabajo citado y que también fueron encontrados en este trabajo, podrían

encontrarse en mayor concentración para la especie Colombiana de *Lantana camara* L colectada.

Tabla 10: Porcentaje de abortos por animal tratado con control y extracto hidroalcohólico 70:30.

Animal	Grupo control				Grupo de extracto hidroalcohólico			
	Número de Implantes	Número de abortos	% de abortos	Fetos Viabiles	Número de Implantes	Número de abortos	% de abortos	Fetos Viabiles
Hembra 1	13	0	0,0	13	14	2	14,3	12
Hembra 2	13	2	15,4	11	14	1	7,1	13
Hembra 3	16	1	6,3	15	18	4	22,2	14
Hembra 4	18	0	0,0	18	17	4	23,5	13
Hembra 5	12	0	0,0	12	14	2	14,3	12
Hembra 6	17	0	0,0	17	17	4	23,5	13
Hembra 7	16	0	0,0	16	18	0	100,0	0
Hembra 8	14	0	0,0	14	13	3	23,1	10
Hembra 9	18	0	0,0	18	15	4	26,7	11
Hembra 10	17	0	0,0	17	14	0	0,0	14
Porcentaje Promedio de abortos por grupo de tratamiento	2,2				25,5			

Para evaluar la relación entre el porcentaje de abortos en la administración del extracto, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis entre los grupos que se muestran en la tabla 10, obteniendo un valor p de 0.004664, que indica una diferencia significativa en el porcentaje de abortos entre los grupos.

Por otra parte, el porcentaje de abortos encontrado, se estima que se encuentra relacionado con uno o una combinación de los metabolitos presentes en la composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico 70:30 de *Lantana camara* L recolectada en La Mesa., donde se verificó la presencia de terpenos, flavonoides

y saponinas como se mostró anteriormente, adicionalmente el efecto abortivo ya había sido reportado para un extracto hidroalcohólico 70:30 de una planta colectada en Brasil administrando dosis de 3000mg/Kg, donde se indica que el efecto está asociado posiblemente a la presencia de los terpenos lantadeno A y lantadeno B (Mello J. , 2005), que se puede asumir se encuentran en el extracto evaluado en el presente estudio, considerando la prueba efectuada para la detección de terpenos y la solubilidad de estos compuestos.

Adicionalmente, en el caso del grupo tratado con el extracto hidroalcohólico, fue posible verificar aborto en 8 de los 10 animales tratados, encontrándose en 2 de ellos fenómenos de reabsorción como los mostrados en la imagen 7, efectos que no habían sido descritos en estudios anteriores (Mello F. B., 2005).

5.2.3 Incidencia de Malformaciones óseas.

El ensayo de tinción con alizarina, permitió encontrar alteraciones óseas en los grupos de tratamiento, como las que se mencionan a continuación: crecimiento irregular de extremidades inferiores, desarrollo anormal de caja torácica, desarrollo tardío en fetos de una misma madre, alteraciones en orejas y desarrollo irregular de la mandíbula.

En las siguientes imágenes se presentan algunos fetos que exhibieron alteraciones morfológicas, producto de la administración del extracto hidroalcohólico 70:30, infusiones de planta completa e infusiones de flores.

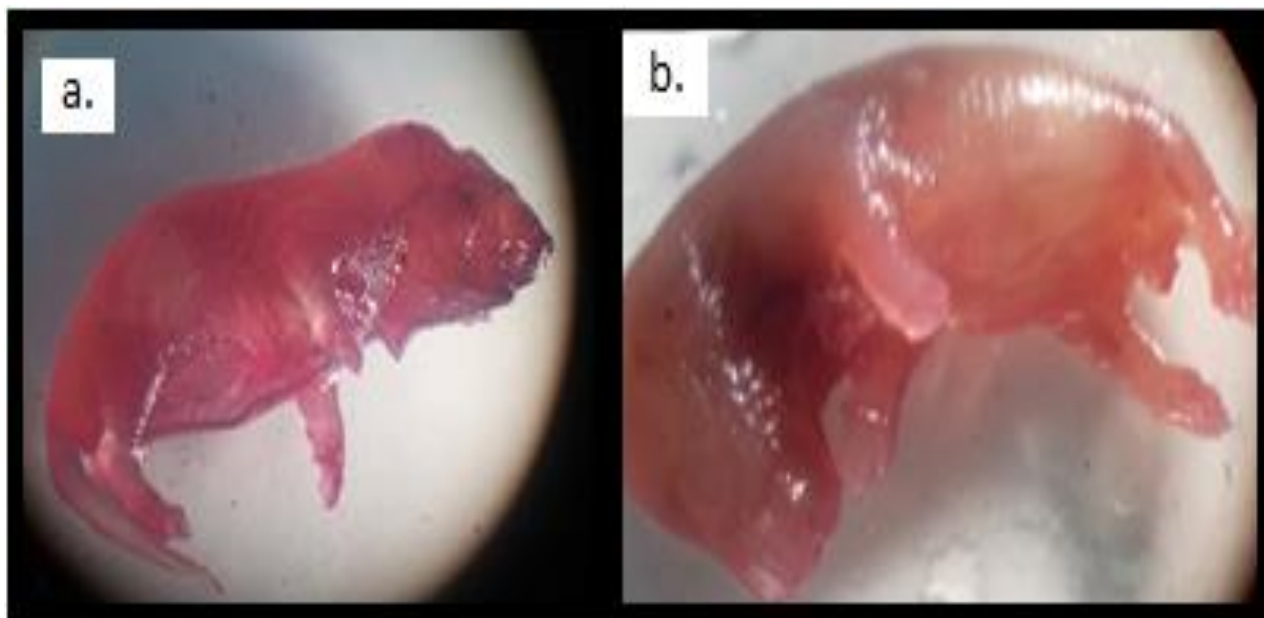


Imagen 19: a) Feto con cráneo anormal expuesto al extracto hidroalcohólico 70:30. b) Feto del grupo control con cráneo normal

En la **Imagen 19 a)** se evidencian malformaciones morfológicas en el cráneo de un feto perteneciente a una de las hembras del grupo tratado con el extracto hidroalcohólico, frente a un feto de una hembra del grupo control **Imagen 19 b)**.

A continuación se presenta la tabla 11 que relaciona los valores del porcentaje de malformaciones presentes en los fetos de cada hembra gestante por grupo de tratamiento:

Tabla 11: Datos que relacionan los fetos que presentaron malformaciones, producto del tratamiento a dosis de 1500mg/Kg del extracto hidroalcohólico de *L. camara*

Animal	Grupo control					Grupo extracto planta completa				
	Número de Implantes	Viables	Número de animales con malformaciones	%de malformaciones	Animales normales	Número de Implantes	Viables	Número de animales con malformaciones	% de malformaciones	Animales normales
Hembra 1	13	13	0	0,0	13	14	12	2	16,7	10
Hembra 2	13	11	0	0,0	11	14	13	0	0,0	13
Hembra 3	16	15	1	6,7	14	18	14	2	14,3	12
Hembra 4	18	18	0	0,0	18	17	13	2	15,4	11
Hembra 5	12	12	0	0,0	12	14	12	0	0,0	12
Hembra 6	17	17	0	0,0	17	17	13	2	15,4	11
Hembra 7	16	16	0	0,0	16	18	-	-	-	-
Hembra 8	14	14	0	0,0	14	13	10	1	10,0	9
Hembra 9	18	18	0	0,0	18	15	11	1	9,1	10
Hembra 10	17	17	0	0,0	17	14	14	0	0,0	14
% Promedio de teratogénesis	0,7					9,0				

Se evaluó si existían diferencias significativas en el porcentaje de malformaciones entre el grupo control y el grupo de extracto, mediante la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis, para un valor de significancia $p < 0,05$, determinándose un p entre grupos del 0.07142, indicando una diferencia significativa en el porcentaje de malformaciones entre los grupos.

La administración del extracto por 19 días, constató la aparición de teratogénesis en al menos un feto de las seis hembras cuyos hijos presentaron estos defectos, encontrándose alteraciones en el cráneo, el desarrollo de extremidades inferiores y el desarrollo de la caja torácica (**Imagen 19 a**), efectos que habían sido reportados para la *Lantana Camara L* recolectada en Brasil (Mello J. , 2005), demostrando un efecto embriofetotóxico del extracto, producto de alteraciones en el desarrollo normal de los fetos, como se evidencia en las imágenes y diferencias

con los fetos de los animales del grupo control (**Imagen 20 y 21**), tal como se evidencia en estudios de otros agentes teratogénos (Orueta Sánchez, 2011).

Adicionalmente, la evaluación del extracto hidroalcohólico de la planta colectada en Colombia, reveló un efecto similar al causado por la planta *Lantana camara* L. recolectada en Brasil, para la que se reportó malformaciones en fetos de ratas tratadas a dosis de 3000 mg/kg, 5000mg/kg y 7000 mg/kg, dosis superiores a las del presente estudio (Mello F. B., 2005).

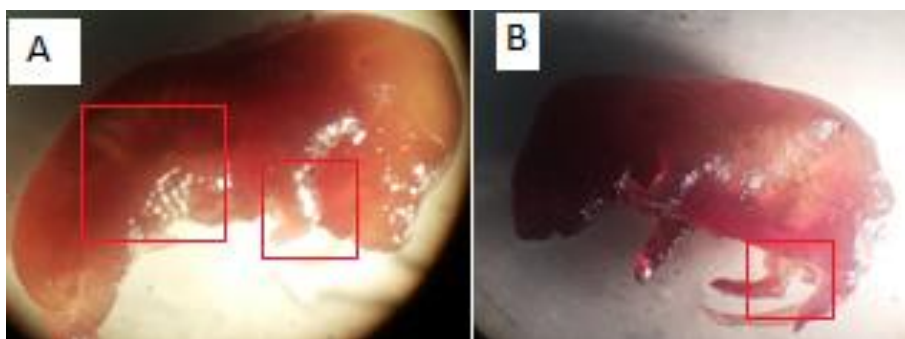


Imagen 20: Fetos tratados con extracto de *L. camara* y grupo control.

De igual manera, en el caso de las infusiones de planta completa y flores, se encontraron fetos con desarrollo anormal de las extremidades inferiores, como se observa a continuación:

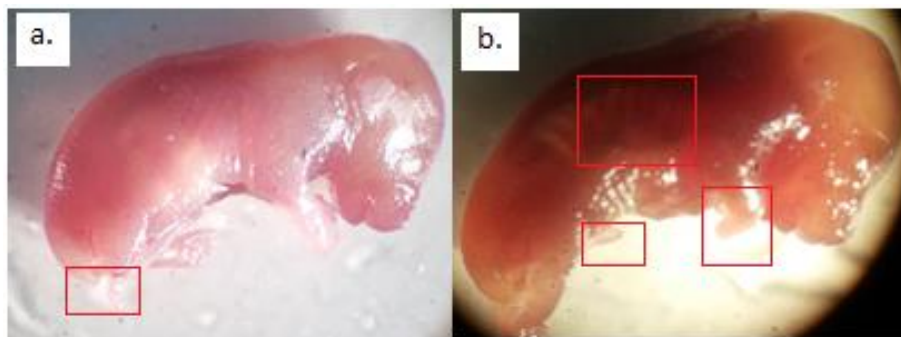


Imagen 21: a) Feto infusión planta completa *L. camara*, b) Feto infusión flores *L. camara*

En la **Imagen 21a)** se muestra un feto con desarrollo anormal de la extremidad inferior izquierda, posible resultado de la administración de la infusión de la planta completa. En cuanto a la **Imagen 21b)** se evidencia el desarrollo anormal de la extremidad superior derecha y la inferior izquierda, de un feto de la madre tratada con la infusión de flores.

La tabla 12 corresponde a los datos de porcentaje de fetos de cada hembra que presentaron malformaciones por la administración de la infusión de planta completa, infusión de flores y del control.

Tabla 12: Datos que relacionan los fetos que presentaron malformaciones, producto del tratamiento con dosis de 1500mg/Kg de las infusiones de planta y flores de *L. camara*

Animal	Grupo control					Grupo infusión flores					Grupo infusión planta				
	Número de Implantes	Viabiles	Número de animales con malformaciones	%de malformaciones	Animales normales	Número de Implantes	Viabiles	Número de animales con malformaciones	% de malformaciones	Animales normales	Número de Implantes	Viabiles	Número de animales con malformaciones	% de malformaciones	Animales normales
Hembra 1	12	12	1	8,3	11	10	10	1	10,0	9	10	6	1	16,7	5
Hembra 2	12	12	0	0,0	12	10	10	2	20,0	8	10	9	0	0,0	9
Hembra 3	13	12	0	0	12	10	7	0	0,0	7	11	9	1	11,1	8
Hembra 4	13	13	0	0,0	13	11	9	2	22,2	7	11	6	0	0,0	6
Hembra 5	13	13	0	0,0	13	11	8	1	12,5	7	12	10	0	0,0	10
Hembra 6	14	14	0	0,0	14	11	10	0	0,0	10	13	8	2	25,0	6
Hembra 7	14	14	0	0,0	14	11	8	0	0,0	8	14	14	0	0,0	14
Hembra 8	14	14	0	0,0	14	12	8	0	0,0	4	14	14	0	0,0	14
Hembra 9	16	16	0	0,0	16	13	10	3	30,0	7	14	12	0	0,0	12
Hembra 10	17	17	0	0,0	17	13	10	0	0,0	10	19	14	0	0,0	14
% Promedio abortos	0,83%					9,5%					5,3%				

Se evaluó si existían diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de infusión de flores, mediante la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis para un valor de significancia de $p < 0,05$, determinándose un valor de p

entre grupos del 0.03024, indicando la existencia de diferencia significativa en el porcentaje de malformaciones entre los grupos.

Dichas malformaciones encontradas para el grupo de infusión de flores, corresponden a alteraciones en el desarrollo esquelético de los fetos en extremidades inferiores y la formación del cráneo, como se evidencia en la **Imagen 21**.

Dichas alteraciones permiten asociar estos cambios como producto de metabolitos presentes en las flores, que posiblemente pueden incidir en el proceso de organogénesis, debido a una implantación anormal o una formación anormal del blastocito, tal vez siguiendo los mismos mecanismos descritos por otros autores y considerando, malformaciones estructurales y de organogénesis (Rivadeneira, 2007).

Por otra parte, el posible mecanismo que puede llegar a verse asociado a estas malformaciones, producto de la administración de infusión de flores y planta completa, implicaría posiblemente los fenómenos que pueden acontecer producto de deficiencias en la alimentación, que inciden en las pruebas de diferentes compuestos, habiendo sido divulgado como causantes de este tipo de alteraciones por otros autores (Chamorro, 1997).

No se evidencio una diferencia estadística significativa entre las malformaciones halladas para el grupo control y el grupo de infusión de la planta, cuando se aplicó la prueba estadística no paramétrica de Kruskall Wallis con un valor de significancia de $p < 0,05$, lo cual puede deberse a menor concentración de los metabolitos responsables de esta acción en la infusión de la planta, metabolitos que al parecer generan el mayor efecto suscitado por la infusión de flores.

Se determinó que la administración de infusión de flores mostro la aparición de malformaciones en fetos pertenecientes a 5 hembras del grupo tratado. Por otro lado, la administración de infusión de planta completa a pesar de no haber presentado una relevancia significativa, evidencio teratogénesis en alguno de los fetos de 3 de las hembras tratadas.

En los grupos tratados con infusiones, los efectos que se presentaron en mayor proporción, corresponden a desarrollo anormal en extremidades inferiores, al mismo tiempo las madres presentan fetos con y sin anormalidad en el desarrollo.

5.2.4 Evaluación histopatológica de la madre tratada con extracto hidroalcohólico 70:30 de *Lantana camara* L.

Para la evaluación histopatológica de la madre, se tomó como indicador la evaluación anatomopatológica de la madre, frente a la de las hembras del grupo control, encontrando cambios histológicos en el hígado de las hembras tratadas.

La evaluación histológica evidenció alteraciones en 3 de las hembras tratadas con el extracto hidroalcohólico, respecto a lo observado en el grupo control, como se muestra a continuación:

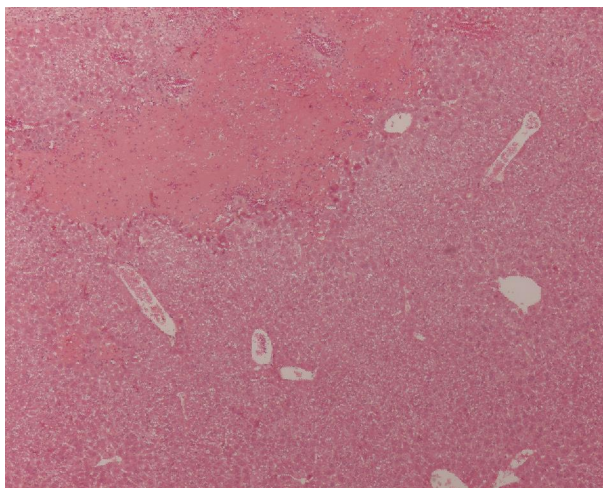


Imagen 20: Corte transversal del hígado de un animal tratado con extracto hidroalcohólico - observación a 40X

La evaluación histológica de la imagen 20, corresponde al hígado de un animal tratado con el extracto, donde se observa la imagen de un corte de hígado que presenta arquitectura conservada, congestión, presencia hepatocitos con edema celular, necrosis focal dispersa de hepatocitos, áreas de necrosis de coagulación que comprometen un 10% de la muestra e

infiltración por PMN neutrófilos y linfocitos en la periferia, esteatosis microvacuolar focal, hepatocitos con cambio reactivo y colestasis focal. Dichos cambios descritos comprometen todas las zonas del lobulillo hepático.

4.2.5 Relación entre la embriofetotoxicidad por administración de infusión de flores, planta y extracto de *Lantana camara* L.

4.2.5. 1 Embriofetotoxicidad por administración de infusión de flores de *Lantana camara* L.

A continuación se presentan los datos del grupo control y el de infusión de flores, con su correspondiente análisis estadístico:

Tabla 13: “Datos de embriofetotoxicidad de infusión de flores de *Lantana camara* L. vs control de infusión”

			EMBRIOFETOTOXICIDAD		Total
			Si	No	
GRUPO DE TRATAMIENTO	Infusión flores	Hembras preñadas que presentaron efecto	9	1	10
	Control Infusión	Hembras preñadas que presentaron efecto	2	8	10
Total		Hembras preñadas	11	9	20

La prueba chi-cuadrado permitió determinar la relación existente entre la administración de la infusión de flores y el efecto embriofetotóxico, asumiendo la hipótesis nula H_0 , que corresponde a la independencia entre las variables mencionadas y como hipótesis alternativa H_1 la dependencia entre estas.

A continuación se representa la tabla que correlaciona los datos de la prueba chi-cuadrado para el grupo de infusión y el grupo control:

Tabla 14: Test de Chi-cuadrado: correlación entre administración de la infusión de flores y el efecto embriofetotóxico

	Valor	Df
Pearson Chi-Cuadrado	9,899	1
N valido de casos	20	

Puesto que el valor presentado por la prueba de Chi-cuadrado equivale a un valor mayor al correspondiente a una $p < 0,05$ y un grado de libertad (Anexo 1), se indica el rechazo de la hipótesis nula y por tanto una dependencia entre la administración de la infusión de flores de *Lantana camara L.* y el efecto embriofetotóxico.

4.2.5.2 Embriofetotoxicidad por administración de infusión de planta completa de *Lantana camara L.*

A continuación se muestran los datos con su correspondiente análisis estadístico:

Tabla 15: Datos de embriofetotoxicidad de infusión de planta completa *Lantana Camara L* vs control de infusión

			EMBRIOFETOTOXICIDAD		Total
			Si	No	
GRUPO DE TRATAMIENTO	Infusión Planta completa	Hembras preñadas que presentaron efecto	9	1	10
	Control Infusión	Hembras preñadas que presentaron efecto	2	8	10
Total		Hembras preñadas	11	9	20

La tabla 15 corresponde al número de individuos que presentaron embriofetotoxicidad en cada grupo de tratamiento.

La prueba chi-cuadrado permitió determinar la relación existente entre la administración de la infusión de planta completa y el efecto embriofetotóxico, asumiendo la hipótesis nula H_0 que corresponde a la independencia entre las variables mencionadas y como hipótesis alternativa H_1 la dependencia entre estas.

A continuación se representa la tabla que correlaciona los datos de la prueba chi-cuadrado para el grupo infusión de planta completa y el grupo control:

Tabla 16: Test de Chi-cuadrado: correlación entre administración de la infusión de planta completa y efecto embriofetotóxico.

	Valor	Df
Pearson Chi-Square	9,899	1
N valido de casos	20	

El valor de chi cuadrado de la tabla 16 indica el rechazo de la hipótesis nula y por tanto, una dependencia entre la administración de la infusión de planta completa y el efecto embriofetotóxico, asumiendo un valor mayor al reportado para $p < 0,05$ y un grado de libertad.

4.2.5.3 Embriofetotoxicidad por administración del extracto hidroalcohólico 70:30 de *Lantana camara*

A continuación se muestran los datos de embriofetotoxicidad del extracto hidroalcohólico 70:30 de *Lantana camara*, frente al respectivo grupo control, con su correspondiente análisis estadístico:

Tabla 17: Datos de embriofetotoxicidad de extracto hidroalcohólico 70:30 de planta completa de *Lantana camara* vs control de infusión.

			EMBRIOFETOTOXICIDAD		Total
			Si	No	
GRUPO DE TRATAMIENTO	Extracto hidroalcohólico 70:30	Hembras preñadas que presentaron efecto	8	2	10
	Control extracto	Hembras preñadas que presentaron efecto	2	8	10
Total		Hembras preñadas	10	10	20

La tabla 17 corresponde al número de individuos que presentaron efecto embriofetotóxico por administración del extracto, en relación con los animales del grupo control.

La prueba chi-cuadrado permitió determinar la relación existente entre la administración del extracto y el efecto embriofetotóxico, asumiendo la hipótesis nula H_0 que corresponde a la independencia entre las variables mencionadas y como hipótesis alternativa H_1 la dependencia entre estas.

Tabla 18: Test de Chi-cuadrado: correlación entre administración de la infusión de planta completa y efecto embriofetotóxico

	Valor
Pearson Chi-Square	7,200
N valido de casos	20

El valor de chi cuadrado de la tabla 18 indica el rechazo de la hipótesis nula y por tanto una dependencia entre la administración de la infusión de planta completa y el efecto embriofetotóxico, asumiendo un valor de $p < 0,05$.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Se determinó la taxonomía y la etnobotánica de la planta recolectada siendo clasificada como: *Lantana camara L.*

La obtención del extracto hidroalcohólico 70:30 tuvo como rendimiento el 2% en base seca.

En la fitoquímica fundamental del extracto y la infusión de planta completa se evidencio la posible presencia de terpenos, flavonoides y saponinas.

Mediante la realización de la curva dosis respuesta de toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de *Lantana camara L.* en hembras nulíparas, se determinó como dosis de tratamiento de las hembras gestantes 1500 mg/kg de peso, gracias a que bajo esta dosis no se evidenció efectos morfológicos en órganos en las hembras.

La dosis letal 50 del extracto hidroalcohólico e infusiones de planta completa y flores correspondió a valores >2000mg/kg.

Se implementó el ensayo de embriofetotoxicidad para el extracto hidroalcohólico 70:30 de *Lantana camara L*, infusiones de planta completa y flores de la misma en un modelo roedor (ratón).

Tanto el extracto hidroalcohólico como las infusiones de planta completa y flores de *Lantana camara L*. mostraron un efecto embriofetotóxico claro caracterizado por los respectivos eventos suscitados.

Se presentaron malformaciones óseas en extremidades inferiores, superiores, torácicas en los fetos tras la exposición a dosis de 1500 mg/Kg del extracto hidroalcohólico 70:30 y las infusiones de planta completa y flores de *Lantana camara L...*

Se evidenció aborto producto de la exposición a dosis de 1500 mg/Kg del extracto hidroalcohólico 70:30, de las infusiones de planta completa y flores de *Lantana camara*, caracterizados por posibles reabsorciones o bien expulsión fetal antes del tiempo de alumbramiento.

De acuerdo con la anterior podemos resaltar que la embriofetotoxicidad manifestada fue ocasionada por exposición a menores dosis que las reportadas en trabajos anteriores.

Se relacionó la actividad embriofetotóxica con la administración del extracto hidroalcohólico 70:30 de *Lantana camara* dosis de 1500mg/Kg, por medio de la prueba Chi-cuadrado.

Se relacionó la actividad embriofetotóxica con la administración de la infusión de flores de *Lantana camara* dosis de 1500mg/Kg, por medio de la prueba Chi-cuadrado.

Se relacionó la actividad embriofetotóxica con la administración de la infusión de planta completa de *Lantana camara* dosis de 1500mg/Kg, por medio de la prueba Chi-cuadrado.

6.2 Recomendaciones

Se recomienda la profundización del estudio fitoquímico para tratar de determinar los metabolitos secundarios que podrían ser causantes de la actividad embriofetotóxica.

Este tipo de evaluación debe ser escalonado a una especie animal mayor (rata), que permita hacer un seguimiento de tipo hormonal en el desarrollo gestacional, que permita la caracterización de la influencia de los extractos de *Lantana camara* sobre el metabolismo gestacional.

La utilización de herramientas tecnológicas en la observación durante el periodo gestacional de los animales expuestos a los diferentes extractos de *Lantana camara* de tal forma que se permita evidenciar posibles abortos caracterizados por el sangrado vaginal o bien por la expulsión fetal.

ANEXO 1: Tablas de significancia frente a grados de libertad prueba de chi cuadrado

TABLA 3-Distribución Chi Cuadrado χ^2

P = Probabilidad de encontrar un valor mayor o igual que el chi cuadrado tabulado, v = Grados de Libertad

v/p	0,001	0,0025	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
1	10,8274	9,1404	7,8794	6,6349	5,0239	3,8415	2,7055	2,0722	1,6424	1,3233	1,0742	0,8735	0,7083	0,5707	0,4549
2	13,8150	11,9827	10,5965	9,2104	7,3778	5,9915	4,6052	3,7942	3,2189	2,7726	2,4079	2,0996	1,8326	1,5970	1,3863
3	16,2660	14,3202	12,8381	11,3449	9,3484	7,8147	6,2514	5,3170	4,6416	4,1083	3,6649	3,2831	2,9462	2,6430	2,3660
4	18,4662	16,4238	14,8602	13,2767	11,1433	9,4877	7,7794	6,7449	5,9886	5,3853	4,8784	4,4377	4,0446	3,6871	3,3567
5	20,5147	18,3854	16,7496	15,0863	12,8325	11,0705	9,2363	8,1152	7,2893	6,6257	6,0644	5,5731	5,1319	4,7278	4,3515
6	22,4575	20,2491	18,5475	16,8119	14,4494	12,5916	10,6446	9,4461	8,5581	7,8408	7,2311	6,6948	6,2108	5,7652	5,3481
7	24,3213	22,0402	20,2777	18,4753	16,0128	14,0671	12,0170	10,7479	9,8032	9,0371	8,3834	7,8061	7,2832	6,8000	6,3458
8	26,1239	23,7742	21,9549	20,0902	17,5345	15,5073	13,3616	12,0271	11,0301	10,2189	9,5245	8,9094	8,3505	7,8325	7,3441
9	27,8767	25,4625	23,5893	21,6660	19,0228	16,9190	14,6837	13,2880	12,2421	11,3887	10,6564	10,0060	9,4136	8,8632	8,3428
10	29,5879	27,1119	25,1881	23,2093	20,4832	18,3070	15,9872	14,5339	13,4420	12,5489	11,7807	11,0971	10,4732	9,8922	9,3418
11	31,2635	28,7291	26,7569	24,7250	21,9200	19,6752	17,2750	15,7671	14,6314	13,7007	12,8987	12,1836	11,5298	10,9199	10,3410
12	32,9092	30,3182	28,2997	26,2170	23,3367	21,0261	18,5493	16,9893	15,8120	14,8454	14,0111	13,2661	12,5838	11,9463	11,3403
13	34,5274	31,8830	29,8193	27,6882	24,7356	22,3620	19,8119	18,2020	16,9848	15,9839	15,1187	14,3451	13,6356	12,9717	12,3398
14	36,1239	33,4262	31,3194	29,1412	26,1189	23,6848	21,0641	19,4062	18,1508	17,1169	16,2221	15,4209	14,6853	13,9961	13,3393
15	37,6978	34,9494	32,8015	30,5780	27,4884	24,9958	22,3071	20,6030	19,3107	18,2451	17,3217	16,4940	15,7332	15,0197	14,3389
16	39,2518	36,4555	34,2671	31,9999	28,8453	26,2962	23,5418	21,7931	20,4651	19,3689	18,4179	17,5646	16,7795	16,0425	15,3385
17	40,7911	37,9462	35,7184	33,4087	30,1910	27,5871	24,7690	22,9770	21,6146	20,4887	19,5110	18,6330	17,8244	17,0646	16,3382
18	42,3119	39,4220	37,1564	34,8052	31,5264	28,8693	25,9894	24,1555	22,7595	21,6049	20,6014	19,6993	18,8679	18,0860	17,3379
19	43,8194	40,8847	38,5821	36,1908	32,8523	30,1435	27,2036	25,3289	23,9004	22,7178	21,6891	20,7638	19,9102	19,1069	18,3376
20	45,3142	42,3358	39,9969	37,5663	34,1696	31,4104	28,4120	26,4976	25,0375	23,8277	22,7745	21,8265	20,9514	20,1272	19,3374
21	46,7963	43,7749	41,4009	38,9322	35,4789	32,6706	29,6151	27,6620	26,1711	24,9348	23,8578	22,8876	21,9915	21,1470	20,3372
22	48,2676	45,2041	42,7957	40,2894	36,7807	33,9245	30,8133	28,8224	27,3015	26,0393	24,9390	23,9473	23,0307	22,1663	21,3370
23	49,7276	46,6231	44,1814	41,6383	38,0756	35,1725	32,0069	29,9792	28,4288	27,1413	26,0184	25,0055	24,0689	23,1852	22,3369
24	51,1790	48,0336	45,5584	42,9798	39,3641	36,4150	33,1962	31,1325	29,5533	28,2412	27,0960	26,0625	25,1064	24,2037	23,3367
25	52,6187	49,4351	46,9280	44,3140	40,6465	37,6525	34,3816	32,2825	30,6752	29,3388	28,1719	27,1183	26,1430	25,2218	24,3366
26	54,0511	50,8291	48,2898	45,6416	41,9231	38,8851	35,5632	33,4295	31,7946	30,4346	29,2463	28,1730	27,1789	26,2395	25,3365
27	55,4751	52,2152	49,6450	46,9628	43,1945	40,1133	36,7412	34,5736	32,9117	31,5284	30,3193	29,2266	28,2141	27,2569	26,3363
28	56,8918	53,5939	50,9936	48,2782	44,4608	41,3372	37,9159	35,7150	34,0266	32,6205	31,3909	30,2791	29,2486	28,2740	27,3362
29	58,3006	54,9662	52,3355	49,5878	45,7223	42,5569	39,0875	36,8538	35,1394	33,7109	32,4612	31,3308	30,2825	29,2908	28,3361

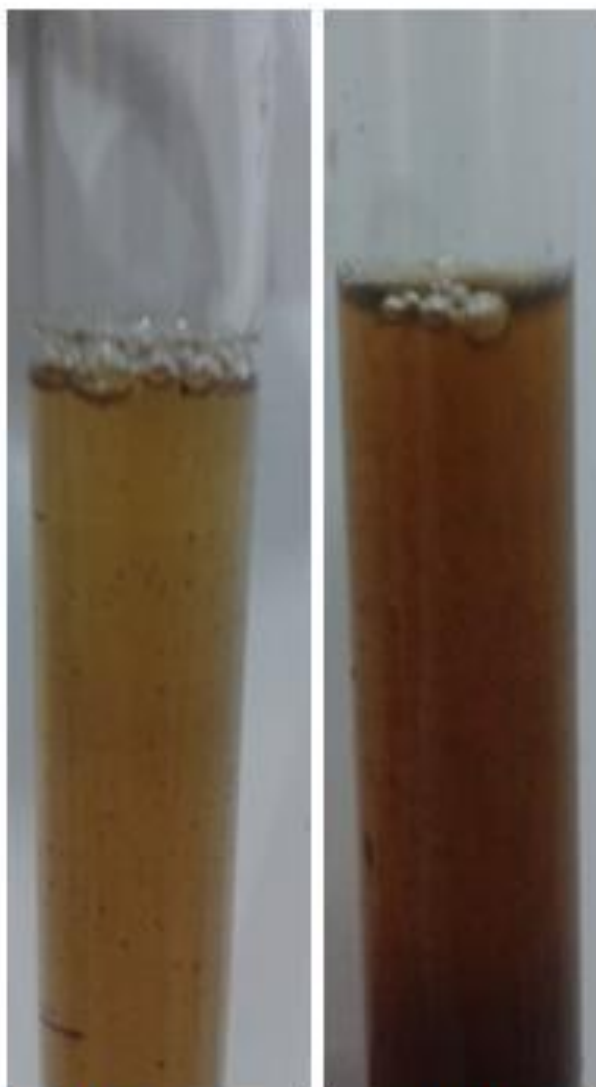
ANEXO 2: Tablas de peso control infusión e infusiones planta completa o flores

Grupo	Día 1 reproducción	Día 3 reproducción	Día 1 administración	Día 7 administración	Día 14 administración	Día 19 administración
Control Infusión	33,0	33,8	32,1	34,6	39,8	39,7
Control Infusión	33,5	34,4	34,3	36,2	39,7	41,1
Control Infusión	37,0	37,6	38,1	41,9	42,4	44,9
Control Infusión	32,0	32,5	33,5	29,4	38,5	38,9
Control Infusión	30,0	30,6	32,5	31,5	36,9	37,6
Control Infusión	29,0	29,7	32,4	34,6	36,4	38,4
Control Infusión	30,0	31,7	33,5	34,4	38,5	40,1
Control Infusión	32,6	33,1	34,9	30,0	34,5	36,5
Control Infusión	24,1	28,0	28,9	33,2	38,5	38,5
Control Infusión	30,0	31,7	33,5	34,4	38,5	40,1
Infusión flores	32,6	33,1	34,9	35,7	37,5	38,5
Infusión flores	31,1	28,0	28,9	33,2	38,5	39,5
Infusión flores	32,3	32,8	34,6	45,2	43,9	42,6
Infusión flores	30,0	30,9	38,2	37,8	39,2	38,5
Infusión flores	29,2	32,4	32,6	34,2	33,6	36,1
Infusión flores	28,9	30,4	30,3	31,2	28,4	34,9
Infusión flores	32,4	30,4	31,3	32,3	29,9	36,9
Infusión flores	30,7	34,0	31,5	32,4	28,8	37,8
Infusión flores	28,6	32,0	33,2	32,1	32,7	28,7
Infusión flores	34,0	33,2	36,8	34,3	36,4	42,8
Infusión planta completa	34,9	35,6	34,2	33,5	36,8	38,3
Infusión planta completa	30,0	32,4	34,6	42,0	46,7	47,6
Infusión planta completa	32,7	30,9	38,2	37,4	36,6	38,5
Infusión planta completa	30,0	32,4	32,6	34,5	35,7	36,1
Infusión planta completa	29,2	30,4	30,3	31,0	34,2	34,9
Infusión planta completa	28,9	30,4	31,3	32,9	31,3	36,9
Infusión planta completa	32,4	34,0	31,5	32,2	28,7	37,8
Infusión planta completa	30,7	32,0	33,2	31,9	33,9	28,7
Infusión planta completa	28,6	28,9	27,0	35,3	34,7	34,9
Infusión planta completa	34,0	36,5	33,7	38,9	38,2	38,8

ANEXO 3: Tablas de control de pesos animales de los grupos control y extracto

Grupo	Día 1 Administración	Día 3 reproducción	Día 1 administración	Día 7 administración	Día 14 administración	Día 19 administración
GRUPO CONTROL	33,0	33,8	32,1	34,6	39,8	39,7
GRUPO CONTROL	33,5	34,4	34,3	35,2	39,7	40,1
GRUPO CONTROL	37,0	37,6	38,1	41,9	42,4	44,9
GRUPO CONTROL	32,0	32,5	33,5	29,4	38,5	38,9
GRUPO CONTROL	30,0	30,6	32,5	31,5	36,9	37,6
GRUPO CONTROL	29,0	29,7	32,4	34,6	36,4	38,4
GRUPO CONTROL	30,0	31,7	33,5	34,4	38,5	40,1
GRUPO CONTROL	32,6	33,1	34,9	30,0	34,5	36,5
GRUPO CONTROL	24,1	28,0	28,9	33,2	38,5	38,5
GRUPO CONTROL	30,4	33,2	36,8	34,3	36,8	42,8
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	34,9	35,6	34,2	33,2	33,6	38,3
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	30,0	32,4	34,6	45,2	48,9	49,6
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	32,7	30,9	38,2	37,8	39,2	38,5
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	30,0	32,4	32,6	34,2	33,6	36,1
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	29,2	30,4	30,3	31,2	28,4	34,9
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	28,9	30,4	31,3	32,3	29,9	36,9
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	32,4	34,0	31,5	32,4	27,8	37,8
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	30,7	32,0	33,2	32,1	32,8	28,7
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	28,6	28,9	27,0	35,0	34,8	34,9
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO 70:30	34,0	36,5	33,7	32,1	34,2	33,8

ANEXO 4



Extacto

Infusión

7. Bibliografía

- Abeygunawardena, C. (1991). Furanonaphthoquinones from two *Lantana* species. *Phytochemistry*, 941–945.
- Adoga, G. (2013). Chemical Constituents of Essential Oil of *Lantana camara* Linn. Leaves. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 155-157.
- Aldama, G. (11 de Junio de 2007). *Revista de Divulgación Científico- Tecnológica del gobierno del estado de Morelos*. Obtenido de Revista de Divulgación Científico- Tecnológica del gobierno del estado de Morelos.: http://hypatia.morelos.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=81&Itemid=20
- Alfonso, R. (2003). *Remington Farmacia*. Buenos aires: Panamericana.
- Avellaneda, D. (Diciembre de 2011). Evaluación experimental en roedores, de la toxicidad de la procaína en algunos esquemas de utilización comoneural terapéutico. Bogotá, Cundinamarca, Colombia.
- Barre, J. (1997). A biactive triterpene from *Lantana Camara*. *Phytochemistry*, 321-324.
- Barton, D. (1954). Triterpenoids. Part XIX. The constitution of lantadene B. *Journal of the Chemical Society*, 3689-3692.
- Barua, A. (1971). Triterpenoids—XXXVII : The structure and stereochemistry of lantanolic acid—a new triterpenoid from *Lantana camara*. *Tetrahedron*, 1141–1147.
- Bernardi, M. (2011). Toxicity of apolar and polar *Lantana camara* L. crude extracts in mice. *Research in Veterinary Science*, 106-115.
- Carillo, R. (2006). Actividad antimalárica de extractos acuosos de *Lantana*. *Revista de la facultad de farmacia*, 14-20.
- Caroprese, J., Parra, M., Prieto, D., & Stashenko, E. (2011). Anatomía microscópica y metabolitos secundarios volátiles en tres estadios del desarrollo de las inflorescencias de *Lantana camara* (Verbenaceae). *Revista de Biología Tropical*, 473-486.

- Costa, J. (2012). Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1155-1180.
- Diaz, G. (2011). Toxic Plants of Veterinary and Agricultural Interest in Colombia. *International Journal of Poisonous Plant Research*, 1-19.
- Dorr, M. M. (1997). Flavonoid aglycones and triterpenoids from the leaf exudate of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis*. *Biochemical systematics and ecology*, 269.
- Fernando J. Benavides. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones. En Fernando J. Benavides, *Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones* (págs. 59-83). Alcala: Universidad de Alcala.
- Ghisalberti, E. (2000). *Lantana camara* L. Verbenaceae. *Fitoterapia*, 467-486.
- Gutiérrez, J. B. (2001). *Fundamentos de ciencia toxicológica*. Madrid : Diaz de Santos .
- Herbert, J. (1991). Verbascoside Isolated from *Lantana camara*, an Inhibitor of Protein Kinase C. *Journal of natural products*, 1595–1600.
- Hidayat, H. (2011). CHEMISTRY OF SOME SPECIES GENUS *LANTANA*. *Medicinal Plants: Conservation & Sustainable use*, 51-62.
- Hsu, H. (1997). Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer letter*, 7-13.
- Irvine, F. R. (1961). *Woody plants of Ghana: with special reference to their uses*. Oxford: Oxford University.
- Irwin, S. (1968). Procedure for Assessing the Behavioral and Physiological State of the Mouse Comprehensive Observational Assessment: A Systematic, Quantitative. *Psychopharmacologia*, 222-257.
- Jean-Aimé, R. (2006). Chemical Compositions of Aerial Part Essential Oils of *Lantana camara* L. Chemotypes from Madagascar. *J. Essent. Oil Res*, 405-407.
- Kalita, S., & Kumar, G. (2012). A Review on Medicinal Properties of *Lantana camara* Linn. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 711-715.
- Kaur, J. (2009). Antitumor Activity of Lantadenes in DMBA/TPA Induced Skin Tumors in Mice: Expression of Transcription Factors. *American Journal of Biomedical Sciences* , 79-90.

- Khan, M. (2002). Chemical composition of leaf and flower essential oil of *Lantana camara* from India. *Flavour and fragrance journal*, 75-77.
- Kokati, V. (2011). Phytochemical Composition and In Vitro Hemolytic Activity of *Lantana Camara* L. (Verbenaceae) Leaves . *Pharmacologyonline* 1, 59-67.
- L. da Silva, M. H. (1999). The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*, 208-210.
- Lemasters, G. (1989). *Ministerio de empleo y seguridad social Gobierno de españa*. Recuperado el 02 de Mayo de 2014, de Ministerio de empleo y seguridad social: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/9.pdf>
- Lizano, P. (2012). Prenatal Stress Caused by Movement Restriction Induces . *International Journal Morphologia*, 1132.
- Lock, O. (2006). Análisis de flavonoides en plantas. *IUPAC*, 1-8.
- Malcom, P. (1998). Novel natural product 5,5 Trans- Lactone inhibitors of human 1595–1600 alfa-trombina: Mechanism of action and structural studies. *Biochemistry*, 6645-6657.
- Mello, F. B. (2005). Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. *Toxicon*, 459–466.
- Mello, J. (2005). Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. *Toxicon*, 459-466.
- Monamy, V. (2009). *Animal Experimentation: A Guide to the Issues*. New York: Cambridge.
- Ngassoum, M. B. (1999). Chemical composition of essential oils of *Lantana camara* leaves and flowers from Cameroon and Madagascar. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*, 245-250.
- O.P, S. (1983). Effect of *Lantana* Toxicity on lysosomal and cytosol enzymen in guinea pig liver. *Toxicology Letters*, 41-45.
- Orueta Sánchez, R. (2011). Manejo de fármacos durante el embarazo. *IT del Sistema Nacional de Salud.*, 107-113.
- Pardo, A. (2011). Determinación de la actividad antifúngica de extractos de *Lantana camara* frente a *Candida* spp. *Infectio*, 235-242.

- Ringbom, T., Segura, L., Noreen, Y., & Bohlin., P. P. (1998). Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products*, 1212-1215.
- Romeu, C. G., & Martín, A. (2001). Reseña de "Lantana camara L. Algunas características y propiedades". *Fitosanidad*, 29-33.
- Romeu, C., González, T. A., & Martin, A. (2001). Reseña de "Lantana camara L. Algunas características y propiedades". *Fitosanidad revista Online*, 29-33.
- Ross, I. A. (2003). *Medicinal Plant of the World Volume 1: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*. New Jersey: Humana Press.
- Roux, S. (2004). Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and Physiological Function. *Current Protocols*, 10.10.1-10.10.23.
- Safayhi, H. (1997). Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med.*, 487-493.
- Sapari, H. (s.f.). The detail study of lantana camara plant for their medicinal importance -a review. *pharmatutor-art*.
- Sastri, B. (1962). *The wealth of India, vol. VI. New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research*. New Delhi: Naiscair.
- Seawright, A. (1964). Studies on the Pathology of Experimental Lantana (*Lantana camara* L.) Poisoning of Sheep. *Pathologia Veterinaria Online*, 504-529.
- Sharma, O. (1982). Changes in blood constituents of Guinea pigs in Lantana Toxicity . *Toxicology Letters*, 73-76.
- Sharma, O. (1987). Hepatic and renal toxicity of lantan in teh Guinea Pig. *Toxicology Letters*, 347-351.
- Sharma, O. (1991). Comparison of Lantadenes content and toxicity of different Taxa of the Lantana Plant. *Journal of Chemical Ecology*, 2283-2291.
- Sharma, O. (1992). Biological action of Lantadene C, a New Hepatotoxicant from *Lantana camara* var. *aculeata* . *Journal Biochem Toxicology*, 73-79.
- Sharma, O. (7 de Diciembre de 2011). *An overview of the research in the hepatotoxic plant Lantana Camara*. Recuperado el 13 de 02 de 2014, de Hillagric: <http://www.hillagric.ac.in/edu/covas/vpharma/winter%20school/lectures/4%20Overview%20of%20Research%20on%20Lantana%20camara.pdf>
- Shingari, Z. (2011). Chemistry of some species genus lantana. *Pak. J. Bot.*, 51-62.

- Staples, R. (2001). Female Reproductive and developmental toxicology. En A. Hayes, *Principles and methods of toxicology* (págs. 1305-1374). New York: Taylor and Francis.
- Stashenko, E. E. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 579-597.
- The Jackson Laboratory. (2007). *Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice*. Bar Harbor: The Jackson Laboratory.
- Trujillo, S. B., & Madrigal, B. (2005). *Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica colombiana*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Viswanatha, G. (2008). analgesic and anti-inflammatory activity of topical preparation of lantana camara leaves. *Pharmacologyonline* , 90-96 .