



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja
ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO Y FARMACÉUTICO

“Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de la especie *Piper peltatum* L.”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Vidal Espinosa Dayana Cecibel

DIRECTOR: M.Sc. Ramírez Robles Jorge Yandry

CO-DIRECTOR: Armijos Riofrio Chabaco Patricio PhD.

LOJA- ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

M.Sc. Jorge Yandry Ramírez Robles

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Chabaco Patricio Armijos Riofrio PhD.

CO-DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: Aislamiento caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de la especie *Piper peltatum* L. realizado por Dayana Cecibel Vidal Espinosa, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja Septiembre de 2013

f.....

M.Sc. Ramírez Robles Jorge Yandry

C.I:1103536311

f.....

Chabaco Patricio Armijos Riofrio PhD.

C.I: 1102430509

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Dayana Cecibel Vidal Espinosa declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de la especie *Piper Peltatum* L. de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo. Jorge Yandry Ramírez Robles y Chabaco Patricio Armijos Riofrío; director y co-director, respectivamente del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Dayana Cecibel Vidal Espinosa

C.I:1103269906

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido ver reflejado en este momento una de las tantas metas que me he propuesto en mi vida; a mis queridos y amados padres VICTOR y BACHITA por su amor, confianza, esfuerzo, comprensión y sobre todo por darme sus sabios consejos de superación y entrega durante todo mi trayecto estudiantil y de vida; a mis hermanos Ramiro, Paulina, Johanna y Andrea *por brindarme todo su apoyo incondicional.*

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios quien me dio la vida y me ha llenado de bendiciones en todo este tiempo, a él que con su infinito amor me ha dado la sabiduría suficiente para culminar mi carrera universitaria.

A mis padres por todo el esfuerzo que hicieron para darme una profesión y hacer de mí una persona de bien, gracias por los sacrificios y la paciencia que demostraron todos estos años, juntos logramos este éxito.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en especial a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por permitirme ser parte integral de la misma; a mis profesores que durante toda mi carrera profesional han aportado con un granito de arena a mi formación.

Un especial reconocimiento al M.Sc. Jorge Ramirez y al PhD. Chabaco Armijos quienes con su experiencia, su paciencia y vastos conocimientos supieron dirigir este trabajo de investigación; por su gran calidad humana y don de gente. GRACIAS.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mi vida, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Para ellos muchas gracias y que Dios los bendiga.

Dayana Cecibel Vidal Espinosa

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	i
CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	
1.1. Antecedentes.....	5
1.2. Estudios Fitoquímicos en el género <i>Piper</i>	6
1.2.1. Flavonoides.....	6
1.2.2. Fitoesteroles.....	7
1.3. Características Botánicas de la especie <i>Piper peltatum</i> L.	8
1.3.1. Usos populares.....	8
1.4. Actividad antibacteriana.....	9
1.4.1. Bacterias Gram Positivas.....	9
1.4.2. Bacterias Gram Negativas.....	9
1.5. Actividad antifúngica.....	10
1.5.1. Dermatofitosis.....	10
CAPÍTULO II	
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Recolección del material vegetal.....	13
2.2. Obtención de los extractos.....	13
2.3. Selección del extracto a fraccionar.....	14
2.4. Desclorofilación.....	14

2.5.	Fraccionamiento en cromatografía en columna (CC).....	15
2.6.	Cromatografía de capa fina (CCF).....	16
2.7.	Unión y purificación de fracciones	16
2.8.	Características químicas de las fracciones	16
2.8.1.	Punto de fusión (Pf).....	16
2.8.2.	Factor de Retención (Rf)	17
2.8.3.	Solubilidad.....	17
2.9.	Caracterización estructural de las moléculas aisladas	17
2.9.1.	Resonancia magnética nuclear (RMN).	17
2.9.2.	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM).....	18
2.10.	Determinación de la actividad biológica	18
2.10.1.	Microdilución en Caldo: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	18
2.10.2.	Preparación de las muestras.	19
2.10.3.	Preparación del cultivo bacteriano (overnight)	19
2.10.4.	Preparación de la suspensión de inóculos para bacterias	20
2.10.5.	Preparación de la suspensión de inóculos para hongos	20
2.10.6.	Ensayo de Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	20
III.	CAPÍTULO	
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	22
3.1.	Extractos obtenidos de la especie <i>P. peltatum</i> L.....	22
3.2.	Compuestos aislados de la especie <i>P. peltatum</i> L.....	22
3.2.1.	Mezcla Esteroidal.....	23
3.2.2.	Compuesto 1: 5 hidroxí-4',7-dimetoxi-flavona.	26
3.3.	Evaluación de la actividad Biológica: Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	28
CAPÍTULO IV		
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
4.1.	Conclusiones.....	31

4.2. Recomendaciones.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXOS	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie <i>Piper peltatum</i> L.....	8
Tabla 2. Características de la columna capilar	18
Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación para bacterias	19
Tabla 4. Medios de cultivo y condiciones de incubación para hongos	20
Tabla 5. Peso y rendimiento de los extractos y derivados obtenidos	22
Tabla 6. Fraccionamiento cromatográfico del extracto total en AcOEt (EXT1).....	22
Tabla 7. Evaluación de la actividad antifúngica: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de AcOE de <i>Piper peltatum</i> L.....	29
Tabla 8. Evaluación de la actividad bacteriana: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de AcOE de <i>Piper Peltatum</i> L.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los flavonoides.....	7
Figura 2. Fotografía de <i>Piper peltatum</i> L. en el sitio de recolección	8
Figura 3. Esquema del desarrollo de la investigación	12
Figura 4. Obtención de los extractos totales	13
Figura 5. TLC fase directa de los extractos totales.....	14
Figura 6. Esquema del procedimiento de extracción de extractos totales	15
Figura 7. Columna cromatográfica del extracto en AcOEt.....	16
Figura 8. Equipo para determinar punto de fusión	17
Figura 9. TLC de la fracción EF8 en Hex-AcOEt 1:1.....	24
Figura 10. Estructura química de los compuestos identificados fracción EF8	25
Figura 11. TLC de las fracción EF10 en Hex-AcOEt 1:1	26
Figura 12. Estructura química del compuesto 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-flavone	27
Figura 13. TLC de las fracción EF10 en Hex-AcOEt 1:1.....	26

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
DCM	Diclorometano
CC	Cromatografía en columna
CH₂Cl₂	Diclorometano
CHCl₃	Cloroformo
CDCl₃	Cloroformo deuterado
TLC	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta
Pf	Punto de fusión
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada espectroscopía de masas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
Tm	<i>Trichophyton mentagraophytes</i>
Tr	<i>Trichophyton rubrum</i>
EXT1	Extracto total en acetato de etilo
EXT1.1	Extracto en acetato de etilo desclorofilado
EXT1.2	Residuo con clorofilas del extracto total en acetato de etilo
EXT2	Extracto total en metanol
EXT3	Extracto total en Metanol-Agua 7:3
EF8	Fracciones 35-36
EF10	Fracción 42
Ppm	Partes por millón

RESUMEN

A partir del extracto total en AcOEt (EXT1) de *Piper peltatum* L. se aisló la flavona 5-Hydroxy-4',7-dimethoxy-flavona y una mezcla de esteroides: β -sitosterol, estigmasta-5,22-dien-3-ol y campesterol que fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM).

La actividad biológica de los extractos en AcOEt fue evaluado contra cepas de bacterias y hongos usando el método microdilución en caldo. Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto total en AcOEt fueron de 125ug/ml contra *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, en cambio el extracto desclorofilado presentó una CIM de 125 μ g/mL contra *Trichophyton mentagrophytes*, 62.5 μ g/mL para *Trichophyton rubrum* 31,25 μ g/mL para *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, mientras que el extracto con residuo de clorofilas no mostró ser activo.

PALABRAS CLAVES: *Piper peltatum* L., 5-Hydroxy-4',7-dimethoxy-flavone, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes*.

ABSTRACT

From total extract of AcOEt (EXT1) of *Piper peltatum* L. it was isolated a flavone 5-Hydroxy-4',7-dimethoxy-flavone and a mixture of sterols: β -sitosterol, stigmasta-5,22-dien-3-ol and campesterol which were characterized by spectroscopic techniques, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

Biological activity of AcOEt extracts it was evaluated against strains of bacteria and fungi using the broth microdilution method. The values of minimum inhibitory concentration (MIC) of the total extract were 125ug/ml AcOEt against *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, while the extract without chlorophylls presented a MIC of 125ug/mL against *Trichophyton mentagrophytes*, 62.5 μ g/mL for *Trichophyton rubrum*, 31.25 ug/mL for *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, in contrast the extract with chlorophyll residue showed being inactive.

KEY WORDS: *Piper peltatum* L., 5-Hydroxy-4',7-dimethoxy-flavone, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes*.

INTRODUCCIÓN

Recientemente ha surgido un interés cada vez mayor en las plantas como una fuente de nuevas moléculas para la medicina y la salud, por lo que más del 50% de los medicamentos de uso clínico hoy en día en el mundo provienen de fuentes naturales o se derivan de productos naturales (Gurib-Fakim, 2006). El descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos puede satisfacer las necesidades de tratamientos terapéuticos, ya que muchos de estos se realizan con medicamentos que siguen siendo insuficientes ante enfermedades como la malaria, el cáncer, las infecciones virales, bacterianas y fúngicas (Parra, 2011).

La Organización Mundial de la Salud en el 2005 estimaba que más del 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos. En el Ecuador se reportan alrededor de 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales, esto se debe afortunadamente a las condiciones climáticas y agrícolas que favorecen el crecimiento de especies con distintas propiedades terapéuticas (De la Torre et al., 2008).

Dentro de la familia Piperaceae encontramos el género *Piper* que es ampliamente utilizado en la medicina tradicional debido a su gran riqueza química (Flores, 2006). Cabe destacar que de las especies de este género distribuidas por todo el mundo, solo el 12% de ellas han sido sometidas a estudios fitoquímicos. En particular, las investigaciones sobre especies ecuatorianas son muy limitadas, este tipo de plantas es una gran fuente de nuevos metabolitos secundarios bioactivos (De la Torre et al., 2008; Parmar et al., 1997). A modo de ejemplo, sólo en los últimos cinco años, investigaciones fitoquímicas de 16 especies de *Piper* L. han contribuido con el aislamiento de 101 nuevos compuestos, 14 de los cuales mostraron actividades Biológicas diferentes (Parmar et al., 1997).

Por tales razones y basándonos en este contexto, el Departamento de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja está desarrollando un estudio fitoquímico de algunas especies del género *Piper* presentes en la región Sur del Ecuador.

FIN, PROPOSITO, Y COMPONENTES DEL PROYECTO

FIN

Contribuir a la prospección de nuevos metabolitos secundarios a partir de la investigación fitoquímica de la especie *Piper peltatum* L. Los mismos que puedan ser utilizados como principios activos para la elaboración y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas que aportarán al crecimiento de este importante sector industrial del país.

PROPÓSITO DEL PROYECTO

Aislar, identificar y determinar la actividad antifúngica y antibacteriana del extracto y metabolitos secundarios de la especie *Piper peltatum* L.

COMPONENTES DEL PROYECTO

- 1.- Recolectar la muestra vegetal y obtener los extractos.
- 2.- Realizar el fraccionamiento de los metabolitos secundarios de *Piper peltatum* L. mediante técnicas cromatográficas: cromatografía en columna (CC) y cromatografía de capa fina (TLC).
- 3.- Caracterizar los compuestos aislados presentes en la especie mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de masas (CG-EM).
- 4.- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto y de los metabolitos secundarios aislados de *Piper peltatum* L. contra cepas de hongos y bacterias.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Durante mucho tiempo las plantas fueron los únicos medicamentos utilizados por los seres humanos, las primeras culturas en su afán de bienestar y prosperidad empezaron a adquirir conocimientos empíricos sobre la utilización de plantas para curar enfermedades (Muñoz, 2008). Con el desarrollo de las primeras civilizaciones y del lenguaje estos conocimientos empezaron a transmitirse de generación en generación con el fin de prolongarse, de esta manera se empezó a acumular conocimientos sobre la naturaleza que los rodeaba (Oliveira, Vásquez & Bermúdez, 2005).

La familia Piperaceae, comprende 14 géneros distribuidos entre 1950 a 2000 especies (Quijano, Callejas & Miranda, 2006). Entre estos, *Piper* y *Peperomia* son los géneros más abundantes, con 700 y 600 especies, respectivamente (Danelutte et al., 2003). En la flora ecuatoriana esta familia está representada por cuatro géneros y 441 especies, de éstas 134 son endémicas (Jorgensen & León-Yáñez, 1999).

Las especies del género *Piper* se encuentran distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo y la gran mayoría se encuentran en los trópicos de América (Flores, 2006). Las plantas de este género han sido utilizadas en la medicina tradicional con fines terapéuticos por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas antiparasitarias y como desinfectante en heridas, además de utilizarse también contra los dolores de estómago y como un remedio contra los parásitos, fiebre, gastritis, reumatismo, gripe, tos, dolor de cabeza, dermatitis, problemas de próstata (Dyer, Richards & Dodson, 2004; Flores et al., 2000).

La fitoquímica de algunas especies del género *Piper* han revelado la ocurrencia de una amplia variedad de metabolitos secundarios fisiológicamente activos tales como alcaloides, amidas, pironas, chalconas, dihidrochalconas, terpenoides, flavonoides, fenilpropanoides, lignanos, y neolignano, los mismos que presentan propiedades fungicidas, antibacterial, insecticida, citotóxicos y antioxidantes (Parmar et al., 1997; Flores, 2001).

Dentro de los reportes de investigación de este género constan:

En extractos de *P. regnelli* y *P. tuberculatum* se aislaron varias moléculas con actividad contra hongos patógenos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*, causantes de dermatofitosis en mamíferos (Benavides, Sartorelle & Kato, 1999). De *P. carpunya* se aislaron cuatro nuevas flavonas y neolignanos que fueron activos con bacterias Gram-positivas y moderadamente activas contra bacterias Gram-negativas (Flores et al., 2000)

Flores et al. (2006), realizó un estudio fitoquímico en Bolivia de las especies *P. heterophyllum* y *P. aduncum* y encontraron tres nuevos derivados del ácido benzoico, flavonas y alcaloides como posibles agentes antibacterianos y antiparasitarios de leishmaniasis, tripanozomiasis.

En trabajos previos se ha reportado el aislamiento y estructura química de varias amidas como la piplartina, piperamina, piperina, y pelitorina, aisladas de hojas de *P. betle*, además evaluaron la actividad biológica contra hongos *Cladosporium sphaerospermum* y *Cladosporium* clasdosporioides mostrando una concentración mínima inhibitoria moderada de 500µg/mL (Huamaní & Ruiz, 2005).

Un importante estudio evaluó el extracto de hojas de la *Piper peltatum* L., demostrando que esta especie presenta propiedades antioxidantes, lo cual corrobora el uso tradicional para el tratamiento de diferentes afecciones de la piel y otras enfermedades (Puertas et al., 2009).

1.2. Estudios Fitoquímicos en el género *Piper*

Las especies del género *Piper* contienen diversos tipos de metabolitos, entre los que se destacan las amidas, flavonoides, kavapirona, lignanos, neolignanos, piperolidos, propenilfenoles, terpenos y fitoesteroles (Parmar et al., 1997). A continuación se presentan algunos ejemplos de los tipos de metabolitos aislados en el género.

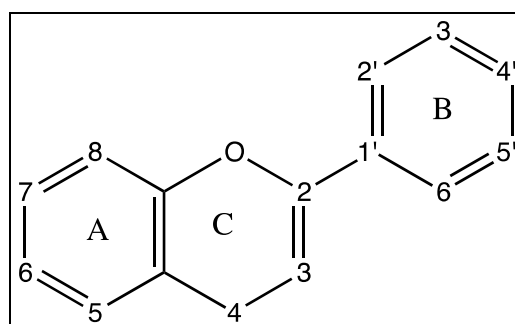
1.2.1. Flavonoides.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenil-piranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C (heterocíclico), se hallan presentes en todas las partes de las plantas (Figura 1).

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en el género *Piper*, dentro los principales tipos que se aislaron encontramos las flavonas, flavanonas, chalconas y dihidrochalconas.

Su actividad biológica es variada, ya que presenta actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria destacándose su actividad antioxidante por los grupos hidroxilo de tipo fenólico presentes en la mayoría de sus estructuras (Parra, 2011; Brueneton, 1993). Estudios de laboratorio, investigaciones epidemiológicas y estudios clínicos indican que los flavonoides tienen efectos importantes en la quimio prevención y quimioterapia del cáncer. Algunos mecanismos de acción celular se han identificado gracias al estudio de flavonoides, como son por ejemplo la interrupción del ciclo celular y la inducción a la apoptosis (García et al., 2003).

Figura 1. Estructura química de los flavonoides



Fuente: La autora.

1.2.2. Fitoesteroles.

El grupo de los fitoesteroles comprende esteroides y estanoles de origen vegetal, que cuentan con una estructura casi idéntica a la del colesterol, difieren únicamente en la presencia de grupos metilo o etilo en la cadena lateral de la molécula (Higdon et al., 2008).

Dentro de las principales funciones que se atribuyen a los fitoesteroles está la de ser antiinflamatorio aunque limitada, también juegan papeles importantes en enfermedades cardiovasculares gracias a su influencia en el nivel de colesterol en la sangre, ayudan a prevenir arterioesclerosis y enfermedades coronarias (Honey, 2012). Se han encontrado algunas evidencias de que los fitoesteroles, particularmente el sitoesterol, podrían inducir apoptosis en células de cáncer de próstata, mama y de colon mediante un incremento en la actividad de la caspasa-3, enzima proteasa que participa en la cascada de la apoptosis, los fitoesteroles también pueden interferir en el

crecimiento y la multiplicación celular aunque se desconoce la forma en que se lleva a cabo (Honey, 2012).

1.3. Características Botánicas de la especie *Piper peltatum*

Comúnmente conocida por la comunidad Shuar como Santa María, habita principalmente en bosques de tierras bajas o matorrales húmedos (De la Torre et al., 2008; Puertas et al., 2009). Son plantas erectas, rígidas, total o casi totalmente herbáceas, de 1.5m de altura, escasamente ramificadas, los tallos diminutamente puberulentos; hojas largas, con pecíolo largo, ancho, largamente vaginado; láminas de las hojas muy delgadas, ovado orbiculares, mayormente de 20 a 30cm de largo, algunas veces más anchas que largas, abruptamente agudas en el ápice que es redondeado, base suavemente cordada o redondeada, peltada, verde oscuro en el haz, más pálidas y punteadas en el envés (Stendley & Steyemark, 1952).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *Piper peltatum* L.

	División:	Magnoliophyta
	Clase:	Magnoliopsida
	Orden:	Piperales
	Familia:	Piperaceae
	Género:	Piper
	Especie:	<i>Piper Peltatum</i>
Figura 2. Fotografía de <i>Piper peltatum</i> en el lugar de recolección.		Fuente: (Texeira & Eurico, 2000)

Fuente: La autora

1.3.1. Usos populares.

Se usa en emplastos para tratar dolores, la planta actúa como tónico estomacal, como remedio para edemas y escorbuto. Las hojas la utilizan para enfermedades de la piel, para aliviar el dolor de cabeza, fiebre, contusiones, dolores de parto y actúa como estomáquico y diurético. La infusión de las hojas es efectivo para el tratamiento de artritis, dolor de muela y para tratar el paludismo. Las hojas frescas son aplicadas como emolientes sobre el hígado o en los testículos para aliviar la inflamación de

éstos. Las hojas estrujadas, calientes se aplican en tumores y úlceras. (Cleaves, 2002; De la Torre et al., 2008).

1.4. Actividad antibacteriana

Un extracto con actividad antibacteriana es aquel que es capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o estimular su eliminación (Madigan, Martinko & Parker, 2003).

Según estudios epidemiológicos, América Latina se encuentra entre las regiones con más alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por bacterias que presentan resistencia a múltiples antibióticos. También en los últimos años se ha visto un interés marcado por evidenciar la presencia de mecanismos de resistencia cruzada tanto para antisépticos y desinfectantes como para antibiótico (Rodríguez & Angeles, 2002). La creciente demanda de alternativas a los antibióticos, junto a la aparición de algunas enfermedades ligadas a infecciones bacterianas, ha puesto de relieve el potencial de los extractos vegetales y en especial de algunos metabolitos secundarios como agentes antibióticos (Cleaves, 2002).

1.4.1. Bacterias Gram Positivas.

Staphylococcus aureus: Es un coco gram-positivo, no móvil, posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel, causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario. En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistente (Bustos, Hamdan & Gutiérrez, 2006).

Enterococcus faecalis: Bacteria inmóvil, anaerobia facultativa, puede ser un patógeno oportunista y causa endocarditis, infecciones de vejiga y próstata. En los últimos años se ha desarrollado un interés creciente por el género *Enterococcus*, debido a la mayor incidencia de infecciones hospitalarias graves que provoca, así como la resistencia a diversos agentes microbianos (Guevara, Cásares & Valencia, 2000).

1.4.2. Bacterias Gram Negativas.

Escherichia coli: Es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas

después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea y dolor abdominal (Rodríguez & Angeles, 2002).

Proteus vulgaris: Facultativamente anaeróbico en forma de bacilo han sido reconocidos como agentes etiológicos de distintos procesos infecciosos, tales como infección urinaria, infección quirúrgica, neumonías, bacteriemias y septicemias. Así mismo, varios estudios mostraron la creciente implicancia del género en infecciones nosocomiales. *P. vulgaris* presenta resistencia a ampicilina y cefalotina (Castro, 2006).

Klebsiella pneumoniae: Es un bacilo aerobio patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos. Esta bacteria es uno de los principales microorganismos causantes de infecciones intrahospitalarias (Andrade & Silva, 2004).

Salmonella typhimurium: Es un bacilo corto gram-negativos no esporulado, anaerobio facultativo, estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia Enterobacteriaceae. Las bacterias pertenecientes a este género son causantes de un amplio número de manifestaciones clínicas en los seres humanos como son fiebres entéricas, gastroenteritis, bacteremia (Andrade & Silva, 2004).

1.5. Actividad antifúngica

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de alterar las estructuras de una célula fúngica, modificando su viabilidad o capacidad de supervivencia y por lo tanto inhibiendo su desarrollo directa o indirectamente (Gregori, 2005).

1.5.1. Dermatofitosis.

Las dermatofitosis son micosis superficiales causadas por hongos de los géneros *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, que tienen la capacidad de invadir tejido queratinizado como la piel, el pelo y las uñas del hombre y de algunos animales.

Son las infecciones micóticas más comunes a nivel mundial, constituyen entre el 70 y el 80% de todas las micosis (Méndez, López & Hernández, 2004). Las dermatofitosis

son también llamadas “tiñas”, y según la topografía se clasifican en tiña de la cabeza, cuerpo, manos, pies, ingle, del área del pañal y de las uñas (Winn, Janda & Procop, 2008).

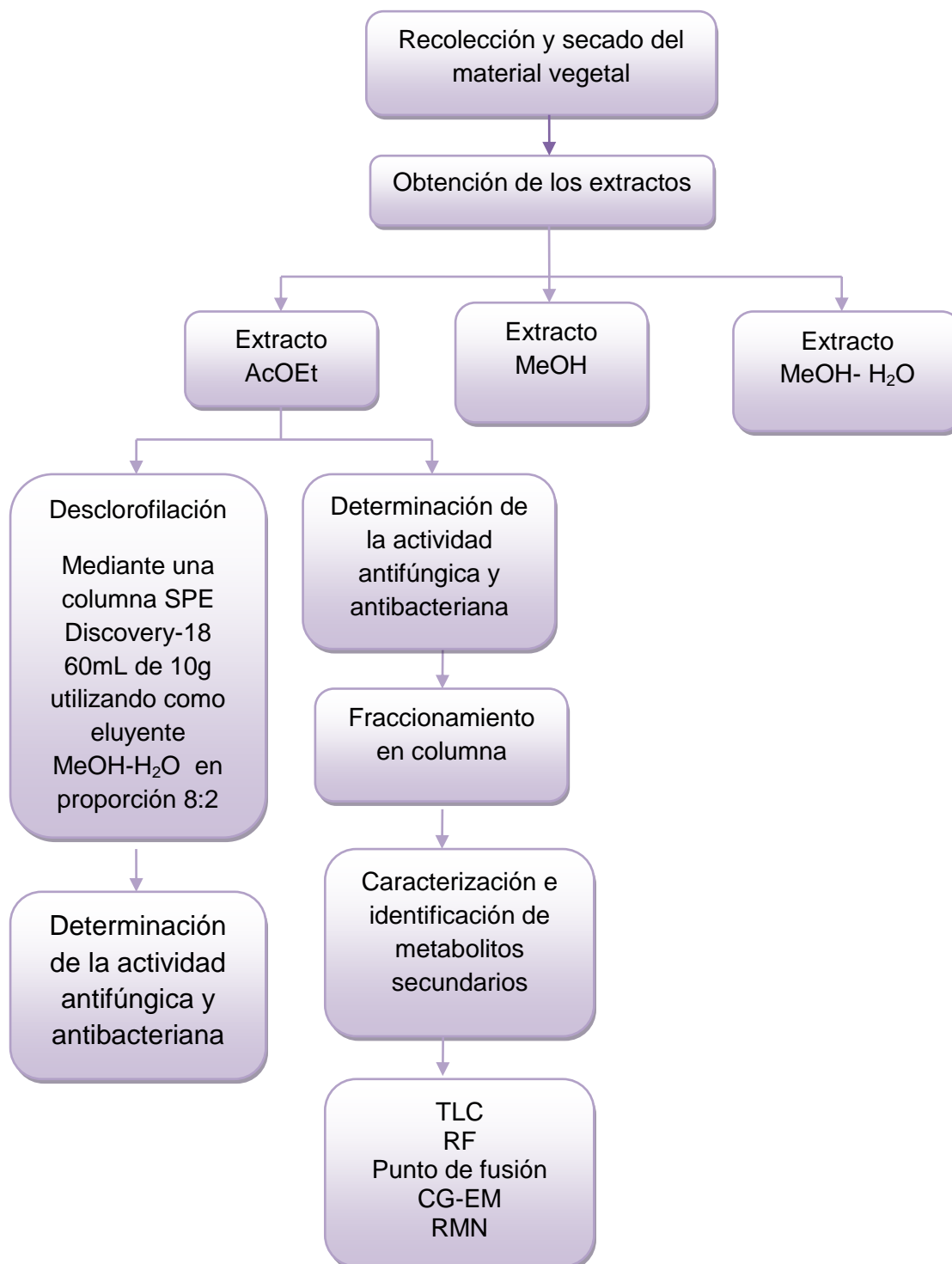
Trichophyton rubrum: Es un hongo filamentoso con micronidios piroformes que se caracteriza por que forman colonias planas que carecen de micelio aéreo, y semejan polvo de azúcar. Es el agente más común de dermatofitosis (tinea pedis, corporis y onicomicosis) con lesiones eritematosas, poco inflamatorias, pruriginosas que pueden ser resistentes a los tratamientos convencionales (Crespo, 2008).

Trichophyton mentagrophytes: Es el segundo agente causal de dermatofitosis luego de *Trichophyton rubrum*. Posee dos variedades *T. mentagrophytes* var. *Mentagrophytes* es un organismo zoofílico y *T. mentagrophytes* var. *Interdigitale* que es antropofílico. La variedad antropofílica produce mínima reacción inflamatoria usualmente en la piel interdigital de los pies, y la variedad zoofílica produce considerable inflamación y ampollas. Pueden producir tinea capitis, pedis, corporis, barbae y tinea unguium (Rueda, 2002).

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo la presente investigación se siguió la siguiente metodología ver Figura 3.

Figura 3. Esquema del desarrollo de la investigación.



Fuente: La autora.

2.1. Recolección del material vegetal

Las partes aéreas (hojas) de la especie *P. peltatum* L. fueron recolectadas en octubre de 2012 en el barrio Jamboe, perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe, con coordenadas geográficas 729384E, 9551255N, a una altitud de 904 m.s.n.m. La identificación taxonómica la realizó el curador Bolivar Merino del Herbario de la Universidad Nacional de Loja. Un ejemplar de la muestra fue depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja con el código voucher: Pi-004-10.

2.2. Obtención de los extractos

El material vegetal recolectado fue deshidratado a 34°C por 8 días. A partir de 500g del material seco y triturado se procedió a realizar maceración dinámica por 5 minutos (Figura 4a) y maceración estática por 55 minutos (Figura 4b) por tres veces con disolventes de polaridad creciente: EtOAc, MeOH y MeOH-H₂O 7:3 (v/v) en una relación 1:10 (planta: solvente). Posteriormente los extractos se filtraron al vacío (Figura 4c), se concentraron a presión reducida y a temperatura moderada de 35-40 °C en el equipo rota evaporador (Figura. 4d).

Para facilitar la identificación de los extractos obtenidos se los denominó como se muestra a continuación: Extracto total en EtOAc (EXT1), Extracto en MeOH (EXT2) y Extracto en MeOH-H₂O (EXT3).

Figura 4. Obtención de los extractos totales: a. Maceración dinámica (5min), b. Maceración estacionaria (55min), c. Filtración al vacío, d. Rotaevaporación.

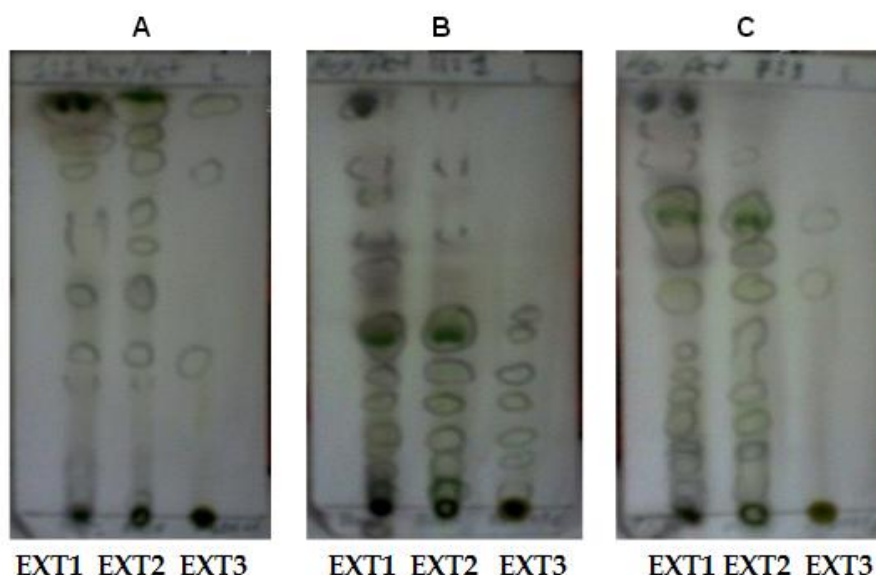


Fuente: La autora.

2.3. Selección del extracto a fraccionar

Luego de obtener los tres extractos en AcOEt, MeOH, y MeOH-H₂O 7:3 (v/v), se realizó TLC de cada extracto a distintas polaridades empleando placas de sílica gel 60 F₂₅₄ fase directa y sílica gel RP18 fase reversa, con la finalidad de determinar cuál de los tres extractos presentaba mayor riqueza y mejor separación de los compuestos (Figura 5).

Figura 5. TLC fase directa de extractos totales: **a)** F. móvil: Hex-AcOEt 1:1 (v/v); **b)** F. móvil: Hex-AcOEt 4:1 (v/v); **c)** F. móvil: Hex-AcOEt 7: 3 (v/v).



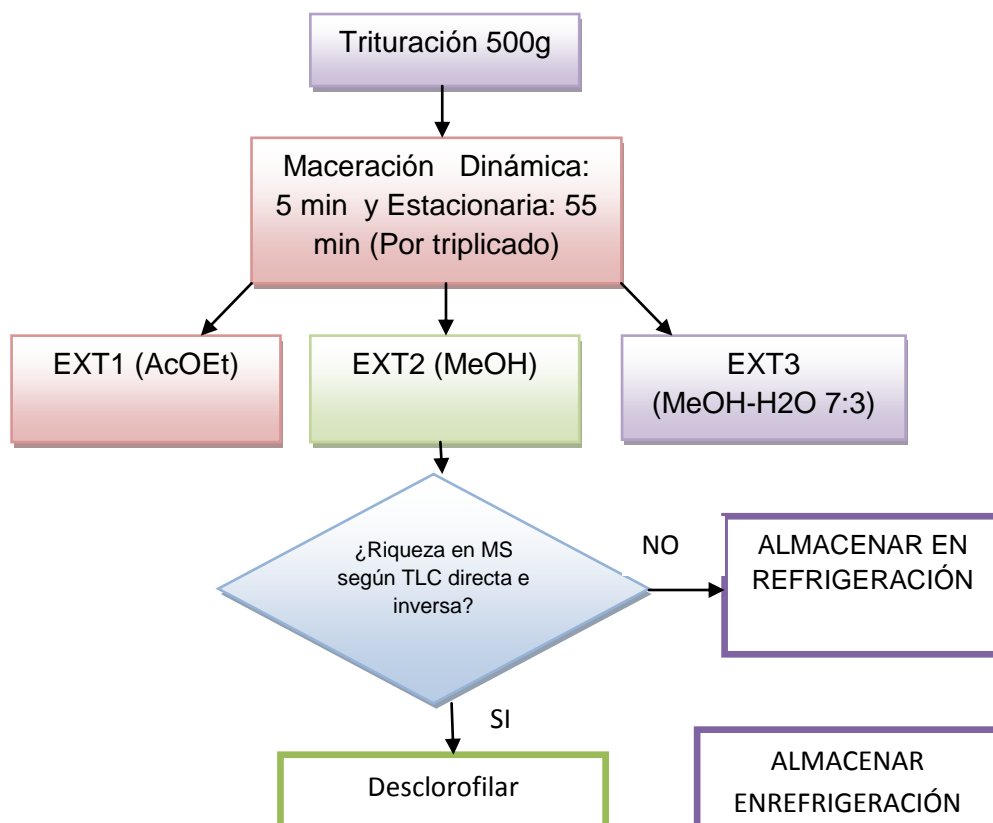
Fuente: La autora

2.4. Desclorofilación

El extracto total en AcOEt (6g) fue sometido a desclorofilación empleando una columna fase reversa marca SPE Discovery-18 60mL de 10g. Se utilizó como eluyente MeOH-H₂O en proporción 8:2 (v/v), obteniendo un total 0,511 de extracto desclorofilado (EXT1.1). El residuo del extracto de AcOEt con clorofilas (EXT1.2), fue recogido con Acetona al 100%.

El proceso general de obtención y análisis cromatográfico de los extractos se resumen en el esquema de la Figura 6.

Figura 6. Esquema del procedimiento de extracción de extractos totales.

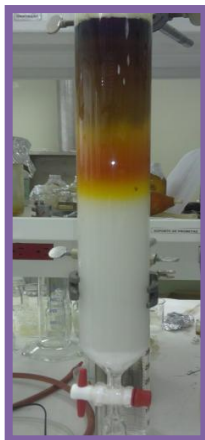


Fuente: La autora

2.5. Fraccionamiento en cromatografía en columna (CC)

Se fraccionaron 6g del extracto total en acetato de etilo (EXT1), empleando como fase estacionaria silica-gel fase directa (Merck 0,0015-0040mm) en una relación extracto-silica gel 1:40 y como fase móvil disolventes de polaridad creciente Hex, AcOEt, MeOH (Figura 7). Se tomó un volumen de 200mL por cada fracción eluída, la concentración de éstas se llevó a cabo utilizando un rota-evaporador a temperatura 30-35°C.

Figura 7. Columna cromatográfica del extracto en AcOEt.



Fuente: La autora

2.6. Cromatografía de capa fina (CCF)

El análisis de las fracciones obtenidas se realizó mediante ensayos en cromatografía de capa fina (TLC), para ello se utilizó placas de aluminio cubiertas de sílice gel 60 F₂₅₄ (fase directa). Los disolventes utilizados para la fase móvil fueron Hex: AcOEt en relación 1:1, con el fin de que se observe el fraccionamiento de la columna realizada, la visualización se realizó con una lámpara de luz ultravioleta de 254 y 365nm.

2.7. Unión y purificación de fracciones

Se recolectaron un total de 32 fracciones. Para su unión se relacionó el R_f de las manchas y la similitud visual que estas reflejaron ante la luz ultravioleta a una longitud de 254 y 365nm; y al agente revelador utilizado ácido sulfúrico al 5% y vainillina (Anexo 1).

Las fracciones que cristalizaron, fueron sometidas a un proceso de purificación: fracción EF10 purificada con Hexano y AcOEt, fracción EF8 se lavo con MeOH y AcOEt.

2.8. Características químicas de las fracciones

La caracterización química se realizó solamente a las fracciones que cristalizaron. Se determinó el punto de fusión (Pf), factor de retención (R_f) y solubilidad.

2.8.1. Punto de fusión (Pf).

Para determinar el punto de fusión se calentó lentamente una pequeña cantidad de las fracciones a analizar en el equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22

de 50-60Hz (Figura 8), a continuación se registró los intervalos de temperatura a la cual la muestra pasaba de estado sólido a líquido. Para evitar falsos negativos, el ensayo se realizó por duplicado.

Figura 8. Equipo para determinar punto de fusión.



Fuente: La autora

2.8.2. Factor de Retención (Rf)

Se lo calculó mediante la determinación de la relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen o lugar de siembra (Anexo 2).

2.8.3. Solubilidad

Para determinar la solubilidad de los cristales obtenidos se utilizó CH_2Cl_2 , AcOEt, MeOH y CHCl_3 .

2.9. Caracterización estructural de las moléculas aisladas

2.9.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).

Para obtener el espectro de NMR, se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en un disolvente deuterado en un tubo de vidrio que se sitúa dentro del campo magnético del equipo. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical, el ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, generando finalmente las respectivas graficas (García, 2001).

Los espectros de HNMR y ^{13}C fueron registrados en un equipo Varian N°400-54 ASC a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , usando CDCl_3 . Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm (δ), y las constantes de acoplamiento se expresaron en Hz.

2.9.2. Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de masas (CG-EM).

La identificación de los compuestos aislados por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM), se hizo mediante un cromatógrafo de gases serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas Agilent Technologies serie 5973 inert, dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. En la tabla 2 se detallan las características de las columnas capilares que se usaron para las inyecciones en esta investigación.

Tabla 2. Características de la columna capilar utilizada

Características de la columna capilar					
Fracciones	Columna	Temperatura (°C)	Película (µm)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
EF8 y EF10	DB-5MS	350	0,25	0,25	30

Fuente: Fielquimec®

Elaboración: La autora

Los datos espectroscópicos obtenidos de la base de datos wiley7n.l fueron comparados con la base de datos NIST, (2010).

2.10. Determinación de la actividad biológica

2.10.1. Microdilución en Caldo: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

a. Fundamento

Es un método de cultivo líquido al cual se le agrega un estándar bacteriano o fúngico y es inoculado dentro de los pocillos de una microplaca (llamada TC96, porque contiene 96 pocillos) que contienen diferentes diluciones del extracto a ensayar para tener concentraciones decrecientes inhibitorias en caldo.

Este método define la menor concentración del extracto necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de prueba (Willey & Sons, 2005).

b. Microorganismos de prueba

Para realizar las pruebas de actividad biológica se emplearon 5 cepas Gram negativas: *Proteus vulgaris* (ATCC® 8427), *Escherichia coli* (ATCC® 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 9997), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) y *Salmonella typhimurium* (LT2), 2 cepas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212), mientras que para la evaluación antifúngica se emplearon 2 hongos esporulados: *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 28185) y *Trichophyton rubrum* (ATCC® 28188).

2.10.2. Preparación de las muestras.

Para disolver los extractos (extracto total en AcOEt, extracto desclorofilado, extracto con residuo de clorofila) se utilizó 20µL de muestra diluido en 1000µl de Dimetilsulfóxido (DMSO). Cabe mencionar que ésta dilución es la misma para CMI antibacteriano y CMI antifúngico.

2.10.3. Preparación del cultivo bacteriano (overnight).

El cultivo overnight se preparó a partir de los microorganismos que se encuentran en reserva criogénica a -80°C. Los medios de cultivo y las condiciones de incubación para cada microorganismo se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación para bacterias.

Microorganismo	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Tripticasa soya	37°C por 14-16 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Tripticasa soya	37°C por 14-16 horas
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Mueller Hinton	37°C por 14-16 horas
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Tripticasa soya	37°C por 14-16 horas
<i>Salmonella typhimurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	37°C por 14-16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	37°C por 14-16 horas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Tripticasa soya	37°C por 14-16 horas

Fuente: La autora.

2.10.4. Preparación de la suspensión de inóculos para bacterias.

De el cultivo overnight realizado 24 horas antes de iniciar las pruebas correspondientes, se tomaron 150-300µL en 7mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland, de ésta suspensión se tomó 140µL y se inoculó en 7mL de Caldo Mueller Hinton ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/mL. Se tomó 100µL de ésta suspensión para completar a 200µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL.

2.10.5. Preparación de la suspensión de inóculos para hongos.

Se preparó la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C, se tomó de la suspensión 14µL este fue diluido en 7mL de Caldo Sabouraud. De esta suspensión se tomaron 100µL para completar a 200µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajustó la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL. Las condiciones de cultivo de las cepas empleadas se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Medios de cultivo y condiciones de incubación para hongos.

Hongos Esporulados	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caldo Sabouraud	28°C por 24-72 horas
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caldo Sabouraud	28°C por 24-72 horas

Fuente: (Willey & Sons, 2005).

Elaboración: La autora

2.10.6. Ensayo de Concentración mínima inhibitoria (CMI)

a. Bacterias

El ensayo se realizó sobre microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución doble seriada del siguiente modo: colocamos 180µL de caldo Mueller Hinton al primer pocillo y 100µL a todos los demás pocillos restantes, luego se adiciona 20µL del extracto diluido (20mg/mL) en los pocillos de la fila A, después se realizó diluciones seriadas tomando 100µL del primer pocillo de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B y se continúa este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se

siguió el mismo procedimiento para el control de esterilidad (180µL caldo + 20µL extracto), control negativo (180µL caldo + 20µL DMSO) y para el control positivo (180 µL caldo + 20µL Gentamicina® o Ampicilina® a 1000ppm).

Después de preparada la placa se inocularon todas las columnas con 100µL de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200µL en la placa de cultivo, de esta manera se ajusta tanto la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL, así como la concentración final del extracto de 1000 a 8ug/mL. Se sella las placas e incubamos a 37°C por un período de 18-24 horas.

b. Hongos

Se sigue el mismo procedimiento de dilución seriada aplicada variando únicamente ciertos parámetros: en hongos esporulados la concentración final del inóculo 5×10^4 esporas/mL, y el control positivo que se emplea una solución de 1mg/mL de Itraconazol®. Se incuban las placas a 28 °C y se monitorea el crecimiento hasta las 96 horas.

**III. CAPÍTULO
RESULTADOS Y ANÁLISIS**

3.1. Extractos obtenidos de la especie *P. peltatum* L.

En la tabla 5 se describe el peso y rendimiento de los extractos EXT1, EXT2 y EXT3 a partir de 500g de muestra vegetal seca, así como los resultados del proceso de desclorofilación de 7g de extracto EXT1.

Tabla 5. Peso y rendimiento de los extractos y derivados obtenidos de *P. peltatum* L.

EXTRACTO	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Extracto total en AcOEt (EXT1)	16,12	3,22
Extracto total en MeOH (EXT2)	23,03	4,60
Extracto total en MeO-H ₂ O 7:3 (EXT3)	33,08	6,16
Extracto en AcOEt desclorofilado (EXT1.1)	0,51	7,28
Residuo con clorofilas del extracto total en AcOEt (EXT1.2)	5,58	79,71

Fuente: La autora

3.2. Compuestos aislados de la especie *P. peltatum* L.

A partir de la cromatografía en columna del Extracto total en AcOEt (EXT1) se obtuvo 32 fracciones. De las 32 fracciones la fracción EF8 y EF10 presentaron formación de cristales, luego de que el disolvente en el que fueron eluidas se evaporara. En la tabla 6 se indica el número total de fracciones eluidas.

Tabla 6: Fraccionamiento Cromatográfico del extracto total en AcOEt (EXT1)

Fracciones	Denominaciones	Proporción	Mezclas de disolventes	Apariencia física
1 – 11	EF1	100	Hex – AcEOt	Grumosa
12 -15	EF2	95:5	Hex – AcEOt	Grumosa
16 -18	EF3	95:5	Hex – AcEOt	Aceitosa
19 -23	EF4	95:5	Hex – AcEOt	Aceitosa
24 – 27	EF5	90:10	Hex – AcEOt	Aceitosa
28 – 31	EF6	90: 10	Hex – AcEOt	Aceitosa

32 – 34	EF7	90:10	Hex – AcEOt	Aceitosa
35- 36	EF8	85:15	Hex – AcEOt	Cristales
37- 41	EF9	85-15	Hex – AcEOt	Aceitosa
42	EF10	80:20	Hex – AcEOt	Cristales
43-45	EF11	80:20	Hex – AcEOt	Sólido
46	EF12	80:20	Hex – AcEOt	Cristales
47-50	EF13	80:20	Hex – AcEOt	Sólido
51 – 55	EF14	70:30	Hex – AcEOt	Sólido
56 – 70	EF14	70 : 30	Hex – AcEOt	Sólido
71 – 74	EF15	65: 35	Hex – AcEOt	Sólido
75 – 90	EF16	60 : 40	Hex – AcEOt	Sólido
91 – 106	EF17	50: 50	Hex – AcEOt	Sólido
107- 115	EF18	40 : 60	Hex – AcEOt	Sólido
116-127	EF19	30 : 70	Hex – AcEOt	Sólido
128 – 137	EF20	20 : 80	Hex – AcEOt	Sólido
137- 145	EF21	10 :90	Hex – AcEOt	Sólido
146 – 151	EF22	100	AcEOt	Sólido
152 – 162	EF23	90 : 10	AcOEt – MeOH	Sólido
163 – 167	EF24	85 :15	AcOEt – MeOH	Sólido
168 -171	EF25	80 : 20	AcOEt – MeOH	Sólido
172 – 175	EF26	6:4	AcOEt – MeOH	Sólido
176-179	EF27	5:5	AcOEt – MeOH	Sólido
180-185	EF28	4:6	AcOEt – MeOH	Sólido
186-189	EF29	3:7	AcOEt – MeOH	Sólido
190-193	EF30	2:8	AcOEt – MeOH	Sólido
194-195	EF31	1:9	AcOEt – MeOH	Sólido
196	EF32	100	MeOH	Sólido

3.2.1. Mezcla Esteroidal.

Se obtuvo en la fracción EF8. Su peso original fue de 25mg; pero luego del proceso de purificación se obtuvo un total de 13mg. La fracción EF8 presento una apariencia conforma de agujas cristalinas de color blanco, solubles en AcOEt, CH₂Cl₂, CHCl₃, y no solubles en Hexano y MeOH, con un punto de fusión de 135-142 °C, y un factor de retención (Rf) de 0,80. En cromatografía de capa delgada no fue visible en la luz UV de 254 y 365nm, pero al ser revelada con Ácido sulfúrico 5%/vainillina presentaba una sola mancha de color violeta (Figura 9).

Figura 9. TLC de la fracción EF8 en Hex-AcOEt 1:1



Fuente: La autora

Interpretación del espectro de CG-EM

Según la Base de Datos del equipo de Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM), que se utilizó en esta investigación, indica que en la fracción EF8, con una probabilidad del 95%, se encuentra el β -sitosterol. Así mismo con un 99%, y en menor concentración el Campesterol. Finalmente con una certeza del 98%, y como compuesto minoritario el Stigmasta-5,22-dien-3-ol (Anexo 3).

Los espectros de masas presentaron picos de ion molecular a 414, 412 y 400m/z (Anexos 4-6), que son compatibles con las fórmulas moleculares $C_{29}H_{50}O$ del β -sitosterol, $C_{29}H_{48}O$ del Stigmasta-5,22-dien-3-ol y $C_{28}H_{48}O$ del campesterol, Todos estos datos fueron comparados con la base de datos NIST, (2010) y se encuentran también acordes con los datos de mezclas de esteroides comúnmente encontradas en plantas ya conocidas en la literatura (Andrade, 2003).

Para el campesterol se obtuvo un tiempo de retención de 29,71 minutos, con un porcentaje de área relativo de 3,50% y un pico de ion molecular de 400 m/z (Anexo 4). Seguidamente el Stigmasta-5,22-dien-3-ol, con un tiempo de retención de 30,54 minutos, con un área relativa de 3,00% y un pico de ion molecular de 412 (Anexo 5). Y en el caso del β -sitosterol, el tiempo de retención fue de 33,08 minutos, el porcentaje de área relativa de 13,01 % y el pico de ion molecular de 414 m/z (Anexo 6).

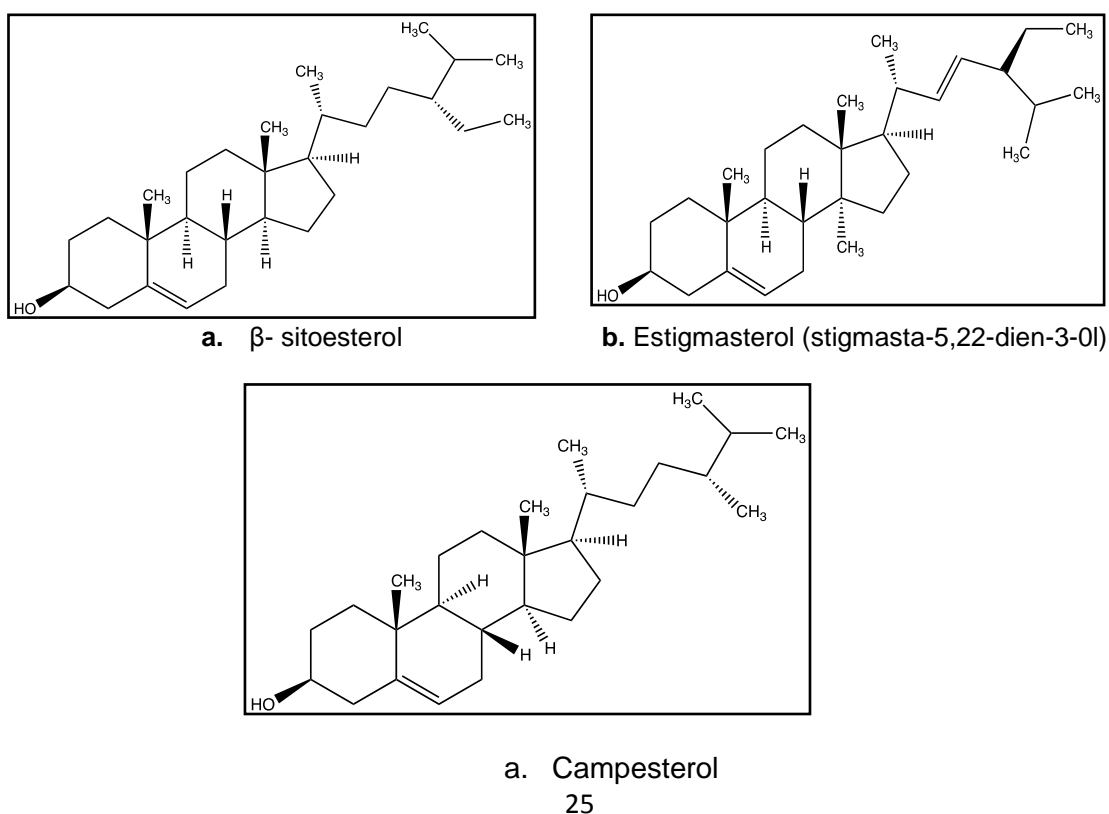
Cabe indicar que es muy difícil identificar al β -sitosterol, Stigmasta-5,22-dien-3-ol y al Campesterol, cuando se encuentran juntos en una misma fracción, mediante la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ya que los tres compuestos poseen el mismo

núcleo esteroidal, de tipo Δ^5 -3-3 hidroxianrosteno (Figura 10) (Martinez, 2001). Pero, en caso de no ser posible obtenerlos en estado puro, la Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de Masas (CG-EM) es un método válido para identificarlos (Parra, 2011).

En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroles: β -Sitosterol, Estigmasterol y Campesterol (Harborne & Willams, 2000). Los esteroides se derivan biogénicamente de la AcetilCoA vía mevalonato y escualeno. Se han aislado esteroides como el Estigmasterol en *P. betle* y *P. cumanesense* (Parmar et al. 1997). Así mismo en un estudio realizado en el Departamento de Química de la UTPL se aisló e identificó la misma mezcla esteroidal en *P. asperiusculum* (Chuquimarca, 2013). Los estudios anteriormente descritos, indican que es frecuente encontrar resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

La mayoría de los fitosteroles no se les conocen actividades biológicas específicas en la naturaleza excepto como componentes de las membranas celulares. Se han reportado diversas propiedades terapéuticas al ser ingeridos en determinadas dosis, entre ellas, la reducción del colesterol sérico, inhibición del crecimiento en células de cáncer, actividad antiinflamatoria, antipirética, liberación de insulina e inmunomodulación (Garibello, 2010).

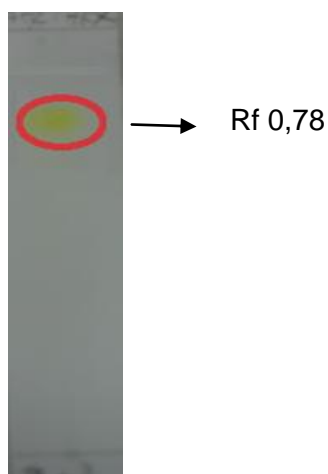
Figura 10. Estructura química de los compuestos identificados fracción EF8.



3.2.2. Compuesto 1: 5 hidroxí-4',7-dimetoxi-flavona.

Se obtuvo en la fracción EF10 en Hex-AcOEt proporción 80:20 v/v. Su peso final es de 15mg, tiene la apariencia de agujas de color amarillo, soluble en AcOEt, CH₂Cl₂, CHCl₃, y MeOH, no solubles en Hexano, con punto de fusión 216-218 °C, y un R_f de 0,78. En cromatografía de capa delgada al ser revelados con Ácido sulfúrico 5%/vainillina presento una mancha de color amarilla (Figura 11).

Figura 11. TLC de las fracción EF10 en Hex-AcOEt 1:1.



Resultado de CG-EM y RMN

El espectro de masas del compuesto 1 presentó un pico de ion molecular de 298 m / z (Anexo 7) que sugiere una fórmula molecular de C₁₇H₁₄O₅. Estos datos están de acuerdo con las que se encuentran en la base de datos Chem Spider (2013); Díaz et al. (1990); Carrillo. (2009).

El análisis de RMN de ¹³C fue realizado a 100 MHz, e indicó la presencia de 17 átomos de carbono incluyendo un grupo carbonil (Anexo 9). En la zona alifática δC (55-63ppm), aparecen dos señales de grupos metoxilo y en el rango (98-164ppm) se observaron 15 señales de átomos de carbono (Anexo), constituyendo el esqueleto típico de un flavonoide C6-C3-C6, que en este caso se encuentra sustituido por dos grupos metoxilo. El espectro de RMN para el ¹H se muestra en el Anexo 8.

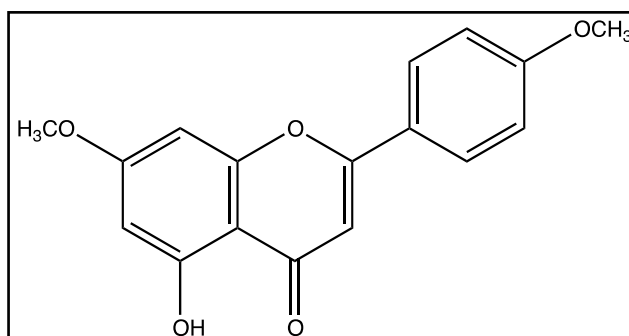
Los datos espectrales de RMN de ¹³C y ¹H se muestran a continuación.

¹H-RMN: (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 3.88 (s, 3H, OMe - 4'), 3.89 (s, 3 H, OMe - 7), 6.36 (d, 1H, H-6), 6.48 (d, 1H, H-8), 6.58 (s, 1H, H-3), 7.00 (dd, 2H, H-3', H-5'), 7.81 (dd, 2H, H-2', H-6').

¹³C-RMN: (100 MHz, CDCl₃): δ 55, 687 (OCH₃ en C-4'), 55.943 (OCH₃ en C-7), 92.786 (C-8), 98.207 (C-6), 104.417(C-3), 105.682 (carbono entre C-4 y C-5 del núcleo benzopirona), 114.654 (C3',C5'), 123.714 (C -1'), 128.213 (C2',C6'), 162.315 (carbono entre oxígeno y C-8 del núcleo y- benzopirona), 162.315 (C-4'), 162.764 (C-5), 164.212 (C-2), 165.606 (C-7), 182.572 (C-4).

Finalmente la comparación de los datos RMN y de CG-EM obtenido en el presente estudio con los reportados previamente en la literatura (Salama, Velandia, Torres, & Iregui, 1996) (Díaz, 1990) (Pérez, Roa & Castellanos, 1999) (Pérez & Céspedes, 2000) (Carrillo, 2009) (Kolak & Hacibek, 2009) el compuesto 1 fue identificado como 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-flavona (Figura 12).

Figura 12. Estructura química del compuesto 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-flavone.



Fuente: La autora

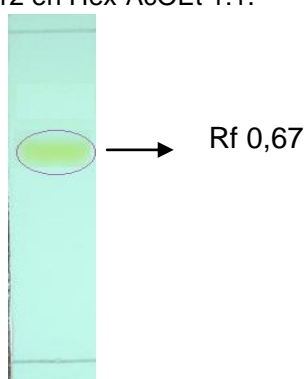
Esta es la primera vez que se reporta el aislamiento de este compuesto en *Piper peltatum* L. y solo se ha reportado anteriormente en *P. manausense* y *P. heterophyllum* (Díaz et al., 1990; Flores, 2006) (Díaz, 1990) (Flores, 2006).

En la literatura se describen las propiedades farmacológicas del 5 Hidroxi-4',7-dimetoxiflavona, como antialérgica (Tewtrakul, 2008), antibacteriana, pobre actividad antiinflamatoria (Martini, Katerete & Eloff, 2004).

- **Fracción EF12**

Vale mencionar que en la fracción 46 se obtuvo una sustancia sólida con apariencia de cristales pequeños de color amarillo que presentó un punto de fusión de 192-197 °C, con un peso de 4mg. Su cromatografía de capa fina dio una mancha color amarillo (Figura 13). Luego de analizar el espectro de RMN de ^1H (Anexo 10) no se pudo llegar a su caracterización ya que los datos obtenidos para este compuesto no lo permitieron, pues el espectro de RMN indicó que el compuesto no estuvo totalmente puro.

Figura 13. TLC de la fracción EF12 en Hex-AcOEt 1:1.



Fuente: La autora.

3.3. Evaluación de la actividad Biológica: Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se considera que si un extracto o compuesto presenta una CMI mayor 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ moderada, de 500 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mala y menor 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nula (Holetz, 2002).

Se ha reportado actividad insecticida y antifúngica en las amidas, cumarinas y lignanos (Huamaní & Ruiz, 2005). El extracto en AcOEt desclorofilado (EXT1.1) tuvo una CMI de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, frente *Trichophyton mentagrophytes* que se considera actividad antifúngica moderada y para *Trichophyton rubrum* presentó una CMI de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que se considera actividad buena (Tabla 7). Mientras que el extracto total en AcOEt (EXT1) y el extracto con residuo de clorofilas (EXT1.2) no mostraron ser activos contra las dos cepas de hongos (Tabla 7).

Tabla 7: Evaluación de la actividad antifúngica: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de AcOEt.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA (CMI) (µg/mL)		
EXTRACTOS	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
Extracto total en AcOEt (EXT1)	>1000	>1000
Extracto en AcOEt desclorofilado (EXT1.1)	125	62.5
Extracto con residuo de clorofilas (EXT1.2)	>1000	>1000
Control : Itraconazole(1mg/ml)	7.81	

Fuente: La autora.

En la actividad antibacteriana el extracto en AcOEt (EXT1) presento una CMI de 125µg/ml para *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* que es una actividad moderada, mientras que el extracto en AcOEt desclorofilado (EXT1.1) presento una inhibición de 31,25 µg/mL frente *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, que se considera una actividad buena (Tabla 8). Los tres tipos de extractos ensayados no son activos contra las bacterias *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* (Tabla 8). Finalmente el extracto con residuo de clorofilas no mostraron actividad contra ninguna cepa bacteriana.

Bajo las condiciones utilizadas en el presente trabajo todas las muestras de ensayo tienen efectos inhibidores más potentes en bacterias gram positivas su susceptibilidad se le puede atribuir a que su pared celular es menos compleja y menos selectiva careciendo de una filtración efectiva contra grandes moléculas, a diferencia de las gram negativas que presentan una pared celular más compleja (Krolickaa et al., 2008; Chouna, et al., 2009; Borroto et al., 2011)

Tabla 8: Evaluación de la actividad antibacteriana: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de AcOEt..

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (CMI) (µg/mL)					
ESPECIES	EXTRACTOS			CONTROLES	
	EXT1	EXT1.1	EXT1.2	GENTAMICINA	AMPICILINA
<i>Proteus vulgaris</i>	>1000	>1000	>1000		
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	>1000	7,81	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1000	>1000	>1000	7,81	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	7,81	
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1000	>1000	>1000		7,81
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	31.25	>1000	7,81	
<i>Enterococcus faecalis</i>	125	31,25	>1000		7,81

Fuente: La autora

Referente a los resultados de los tres tipos de extractos, el extracto en AcOEt desclorofilado (EXT1.1) fue el que presento actividad antimicrobiana en comparación con los otros dos extractos EXT1 y EXT1.2, posiblemente esta diferencia fue producto de un efecto antagónico o un enmascaramiento por la mezcla tan compleja de compuestos del extracto total en AcOEt como lo reporta Ospina (2012), el mismo autor también sugieren que la concentración inhibitoria de los extractos y metabolitos puede aumentar o disminuir debido al fraccionamiento o a la eliminación de clorofilas (Ospina, 2012).

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Por medio de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM) se identificó una flavona conocida como 5-Hydroxy-4',7-dimethoxy-flavona, este es el primer reporte para la especie *Piper peltatum* L. y así como también por medio de Espectroscopia de masas (CG-EM) se determinó la presencia de una mezcla esteroideal de β -sitosterol, stigmasta-5,22-dien-3-ol y campesterol.
- La CMI determinó que los extractos total en AcOEt (EXT1) y extracto desclorofilado (EX1.1) únicamente presentaron actividad frente a las bacterias gram positivas.
- El extracto en acetato de etilo desclorofilado (EX1.1) presentó actividad antifúngica contra las dos cepas de hongos *T. mentagrophytes* con un CMI 125 μ g/mL y *T. rubrum* con un CMI 62,5 μ g/mL.

4.2. Recomendaciones

- Continuar con el estudio de la especie vegetal *Piper peltatum*, a partir del aislamiento e identificación de compuestos en las fracciones que no cristalizaron, con el fin de determinar cuáles son los responsables de las propiedades terapéuticas que se le atribuyen a la planta.
- Desarrollar investigaciones como la presente, en otras especies del género *Piper*, ya que varios estudios avalan su riqueza en metabolitos secundarios, que se presentan como una alternativa a la medicina tradicional.

Bibliografía

- Aenasom, J., Dursty, P., & Philogene, L. (2005). Phychemical discovery of new botanical insecticides. (R. Regnault, B. Philogene, C. Vient. Edits), 37-46.
- Andrade, M. (2003). Alcaloides de Rutaceae:Química e Actividade Biológica. Centro de Ciências Exactas e de Tegnologia, Universidade Federal de Sao Carlos. Brazil. 77-79.
- Andrade, V., & Silva, J. (2004). Caracterización de bacterias y Hongos. *Revista de Salud Pública de México*, 46(6), 215-261.
- Benavides, P., Sartorelle, P., & Kato, M. (1999). Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnelli*. *Phytochemistry*, 13 (52), 339-343.
- Borroto, J., Trujillo, R., Torre, Y., Waksman, N., Hernández, M., & Salazar, R. (2011). Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de Morinda royoc L. *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 16(1),124-130.
- Brueneton, J. (1993). *Farmacognosia Fitoquímica plantas Medicinales.Segunda Edicion*. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Bustos, J., Hamdan, A., & Gutiérrez, M. (2006). Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica*, 17(3), 287-305.
- Carrillo, N. (2009). *Actividad antioxidante de Satureja macrostema*. (Maestría en ciencias de los alimentos). Escuela nacional De Ciencias Biológicas México, Df.
- Castro, S. (2006). Comparación de diferentes métodos para identificar las especies del género *Proteus*. *Revista Argentina de Microbiología*, 12(38), 119-124.
- Chouna, J., Efouet, P., Lenta, B., Devkota, K., Neumann, B., & Stammler, H. (2009). Antibacterial endiandric acid derivatives from *Beilschmiedis anarcardioides*. *Phytochemistry*, 5(7), 214-222.
- Chuquimarca, L. (2013). *Actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie Piper asperiusculum,"matico-matapiojo" al Sur del Ecuador. (Tesis Pregrado)*. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja.

- Cleaves, C. (2002). *Etnobotánica Médica Participativa en siete comunidades del Parque Nacional Laguna*. (Tesis de graduación). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Crespo, V. (2008). Generalidades sobre los hongos. Dermatomicosis: saprofitias y dermatofitosis Piel. (Vol.7).
- Danelutte, A., Lago, J., Young, M., & Kato, M. (2003). Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, 64(2), 555-9.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Marcia, M., & Balsle, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito.
- Díaz, A. (1990). Dioxoaporphine Alkaloid and Flavone from *Piper manausense* YUNK. *Revista Colombiana de Química*, 19(5), 63-66.
- Dyer, L., Richards, J., & Dodson, C. (2004). Isolation, Synthesis and Evolutionary Ecology of *Piper* Amides. *MRM/KJ*, (7), 117-139.
- Flores, E. (2006). Metabolitos secundarios bioactivos de la especie del género *Piper* de la flora boliviana. (Tesis Doctoral). Universidad Mayor de San Andrés.
- Flores, E., Jiménez, A., Ravelo, A., & Bourdy, G. (2000). Fitoquímico de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida in vitro. *Revista Biofarbo*, VIII: 9 -16.
- Flores, N. (2001). Metabolitos Bioactivos aislados de cinco especies *Piper* con actividad antiparasitaria y/o leishmanicida. *La Paz, Bolivia; Universidad Mayor de San Andrés . Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimica*.
- García, H. (2002). *Flora medicinal de Colombia*. Bogotá: Tercer Mundo Editores.
- García L. A, 2001. Determinación de estructuras por métodos espectroscópicos. Memorias Curso UANL.
- Garibello, C. (2010). *Estudio de hojas de Pentacalia vaccinioides (Kunth) cuatro como nueva fuente natural de sustancias esteroidales y cumarinas* (Tesis Mestría). Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias .
- Gregori, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Biofarbo*, 4(5), 34-38.

- Guevara, J., Cásares, A., & Valencia, E. (2000). Significado clínico de la presencia de *Enterococcus* en secreción vaginal, *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Marcos*, Vol: 2000,3 : 223.226.
- Gurib-Fakim, A. (2006). *Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicines*, 27, 1-93.
- Harborne, J., & Willams, C. (2000). Advances in flavonoid reserch since 1992. *Phytochemistry*, 13(12), 481-504.
- Higdon, J. (30 de Julio de 2012). *Micronutrient Information Center: Phytosterols*. Obtenido de Base de la alimentación humana: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/>
- Holetz, F., Pessini, G., Sánchez, N., Cortez, D., Nakamuca, C., & Filho, B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious disease. *MemInst Oswaldo Cruz*. 97, 1027-31.
- Honey, G. (2012). *Estudios preclínicos y clínicos de los fitoesteroles . Enciclopedia de naturaceuticos*.
- Huamaní, A., & Ruiz, Q. (2005). Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. (*Tesis doctoral*).Universidad Nacional de Perú, Lima.
- Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. USA: Missouri Botanical Garden Press*.
- Kolak, U., & Hacibek, G. (2009). Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. *Journal Chemical Turkey*, 33(15), 813-823.
- Krolickaa, A., Szpitter, A., Gilgenest, E., Romanik, G., Kaminski, M., & Lojkowska. (2008). Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors. *Enzyme Microbial Technology*, 13(18,)216-221.
- León, L., Cueva, P., Aguirre, Z., & Kvist, L. (2006). Floristic composition, structure, endemic and ethnobotany in the native forest “El Colorado”, in Puyango, Province of Loja.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson educación.

- Martinez, A. (2001). Esteroles. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.
- Martini, N., Katerete, D., & Eloff, J. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Ethnopharmacology*, 93(12), 207-212.
- Méndez, L., López, R., & Hernández, F. (2004). *Micosis Superficiales. Dermatofitos* (Segunda ed.). *Actualidades en Micología Médica. Facultad de Medicina de la UNAM*.
- Muñoz, D. (2008). *Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Actividad fungicida e insecticida de la especie Piper eridopon* (Piperaceae). (Tesis inédita de maestría). Universidad Nacional de Colombia: Bogota.
- Oliveira, M., Vásquez, D., & Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales una revision. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 30(8), 453-459.
- Organización Mundial de la Salud, O. (2005). Estrategias de la OMS de la Medicina Tradicional. 2004-2005. Ginebra.
- Ospina, D. (2012). *Actividad Antifungica del Extracto Crudo de Azdirachta índica A. Juss, De suspensión de células sobre hongos dermatofitos causantes de enfermedades patógenas al hombre*. (Tesis Doctorado). Universidad Nacional de Colombia.
- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., & Jha, A. (1997). Phytochemistry of the genus Piper. *Pytochemistry*,(46), 1866-1870.
- Parra, J. (2011). *Contribución al Estudio Fitoquímico de la Parte Aéres de Piper cf. cumanense Kunth* (Piperaceae). (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Pérez, C., & Céspedes, A. (2000). Aislamiento De 5,4'-DIHIDROXI-7-Metoxiflavona y 5-HIDROXI-7,4'-DIMETOXIFLAVONA DE *Eupatorium Angustifolium* (H.B.K.) SPRENG (COMPOSITAE). *Revista Colombiana de Química*, 10(8), 49-56.
- Pérez, C., Roa, A., & Castellanos, Y. (1999). Aislamiento de de 5-Hidroxi-7, 4'-Dinnetoxiflavona. *Revista Colombiana de Ciencias Química*, 10(7), 17-20.

- Puertas, M., Gómez, L., Rojano, B., & Sáez, J. (2009). Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Revista Cubana Plantas Medicinales*,2(14), 0-0.
- Quijano, M., Callejas, M., & Miranda, D. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*, 5(33), 1266-1278.
- Rivera, D. (2008). *Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género piper y evaluación de la actividad citotóxica*. (Tesis de grado). Universidad de San Carlos de la Laguna. .
- Rodriguez, G., & Angeles, M. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Revista de Salud pública de México*, 44(5), 220-224.
- Rueda, R. (2002). Micosis superficiales y dermatomicosis. *Colombia medica*,(33), 10-16.
- Salama, A., Velandia, R., Torres, M., & Iregui, C. (1996). Efecto abortivo, aislamiento e identificación de principios activos de *Alnus acuminata*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico -Farmacéutica*, 25(3), 36-46.
- Stendley, P., & Steyemark, J. (1952). Flors de Guatenala Fieldiana. *Botany*, 24(3), 228-231.
- Tewtrakul, S. (2008). Anti -allergic activity of compounds from. *Kaempferia pasiflora*. . *Journal Ethopharmacology*,116 (1), 191-193.
- Texeira, F., & Eurico, P. (2000). *Diccionario bótico de plantas medicinales brassileñas*. 129.
- Vásquez, R., Debonsi, H., Kato, M., Bolzani, V., Méda, C., Young, M., & Furlan, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 59, 521-527.
- Wiley, J., & Sons, L. (29 de Junio de 2005). *Oxford; Update Software Ltd*. Obtenido de <http://www.update-software>
- Winn, A., Janda, K., & Procop, S. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Bogotá: Editorial Médica Panamericana.

ANEXOS

Anexo 1

Preparación de la solución de revelado (ácido sulfúrico/ vainillina 5%)

Ácido sulfúrico y vainillina: Se emplea como revelador en los cromatogramas de Aceites esenciales y la mayor parte de compuestos orgánicos.

Reactivos	Composición
Ácido sulfúrico	250mL de etanol
	12,5mL de ácido sulfúrico

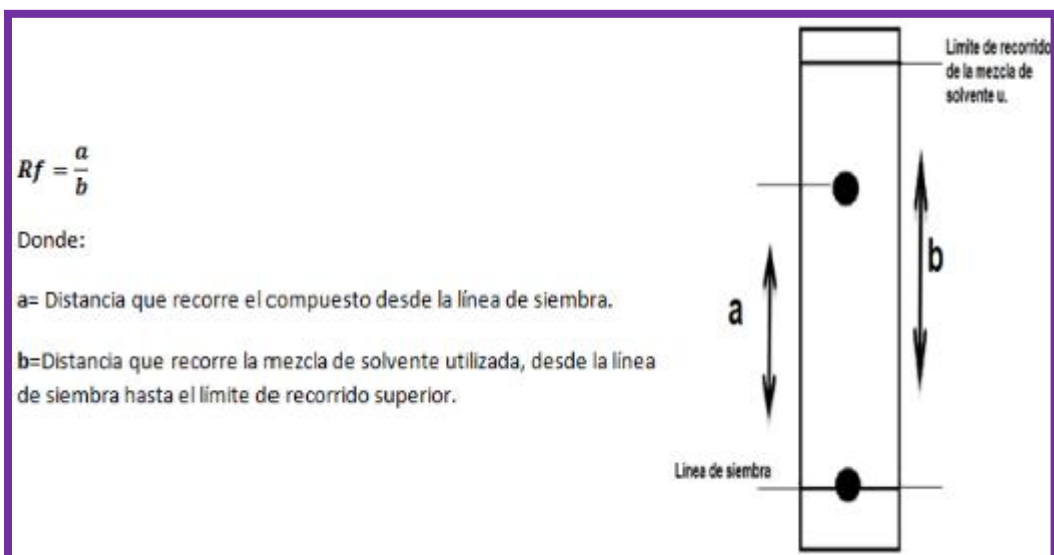
Procedimiento: Se aforan los 12,5mL de ácido sulfúrico con los 250mL de etanol.

Reactivos	Composición
Vainillina	250mL de Etanol
	2,5g de vainillina

Procedimiento: Se aforan los 2,5g de vainillina con los 250mL de etanol.

Anexo 2

Cálculo del Rf en la placa de sílica gel marca Merck60 F254

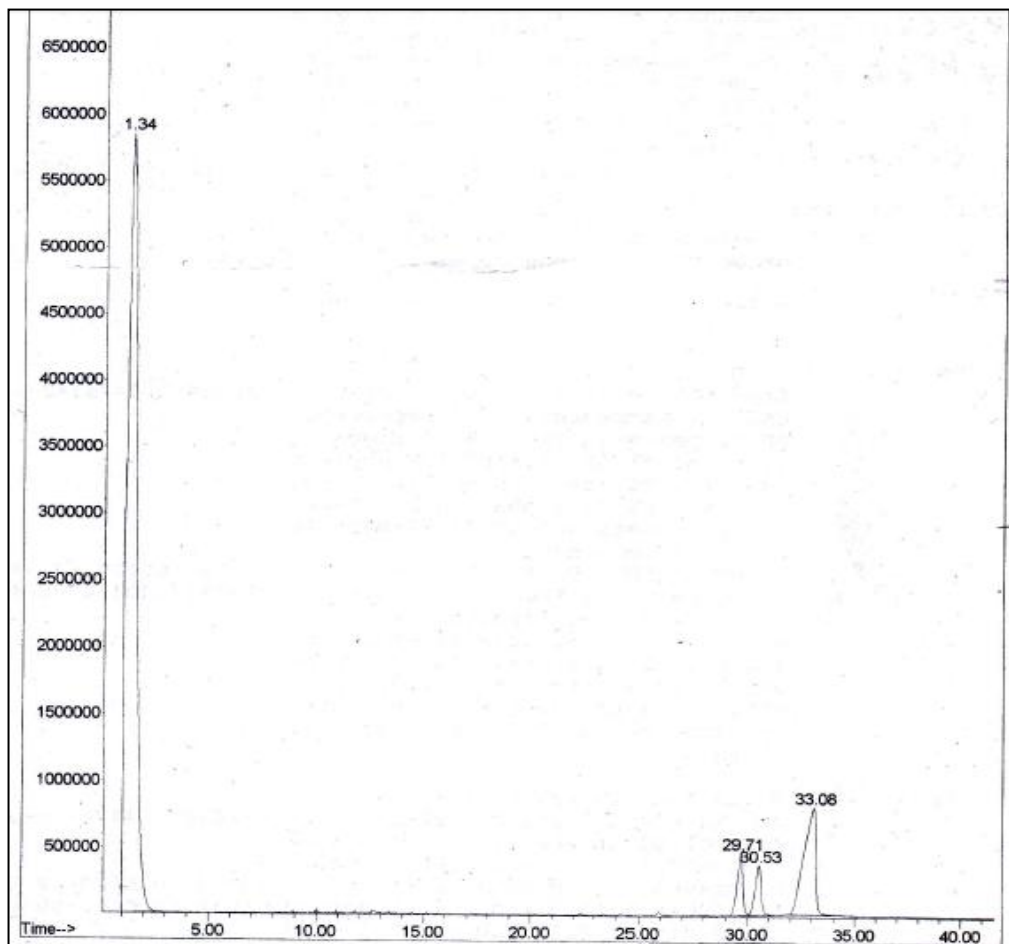


Fuente: http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf

Se define como la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación / distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.

Anexo 3

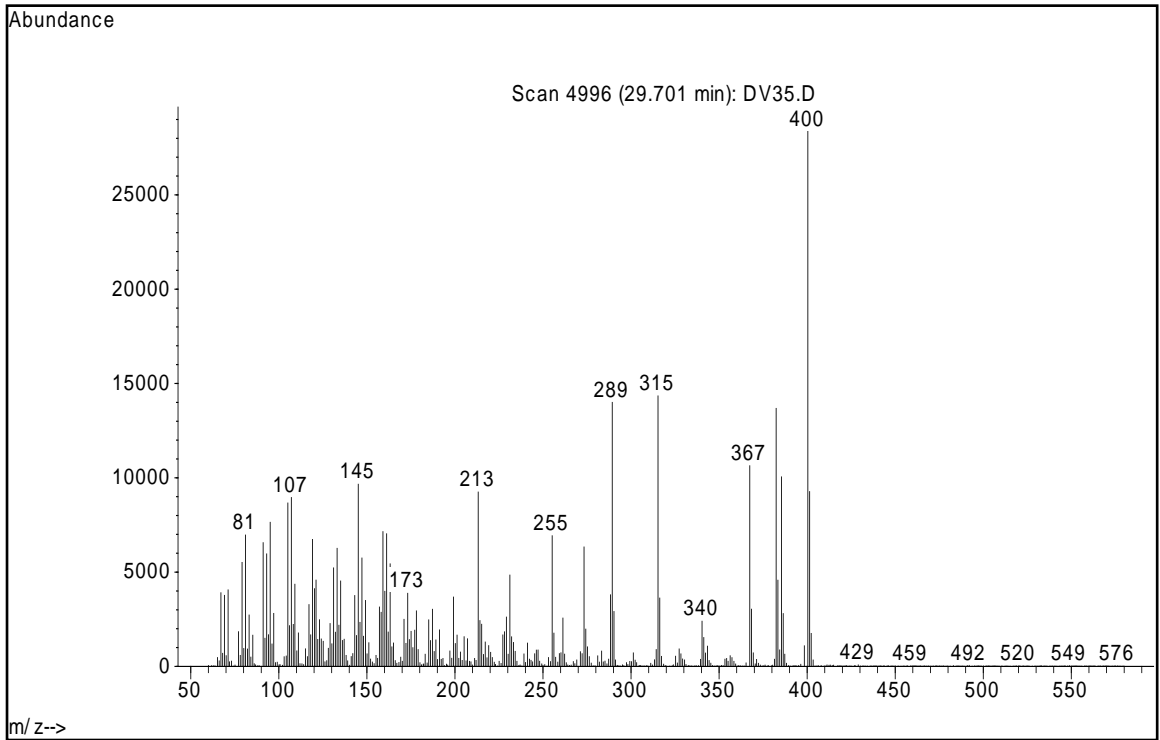
Cromatograma de gases (CG-EM) de la fracción EF8 de la especie *P. peltatum* L.



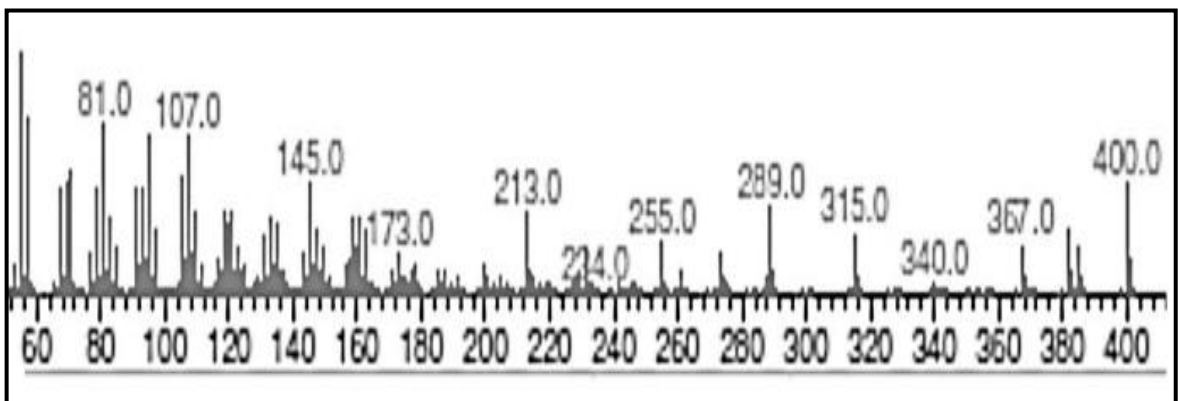
PK #	RT	Área%	Cas#	Qual%
β.-sitosterol	33,08	13.01	00083-46-5	95
Stigmasta5,22-dien-3-ol	30.54	3.50	00083-48-7	98
Campesterol	29.71	3.00	00474-62-4	99
Diclorometano (disolvente)	1.02	93.05	00075-09-2	86
DB-5MS capillary column				

ANEXO 4

Espectro de masas del campesterol identificado por CG-EM, en la fracción EF7 pico 29,7. (Anex. 4a) comparado con el espectro de la base de datos NIST (Anex. 4b).



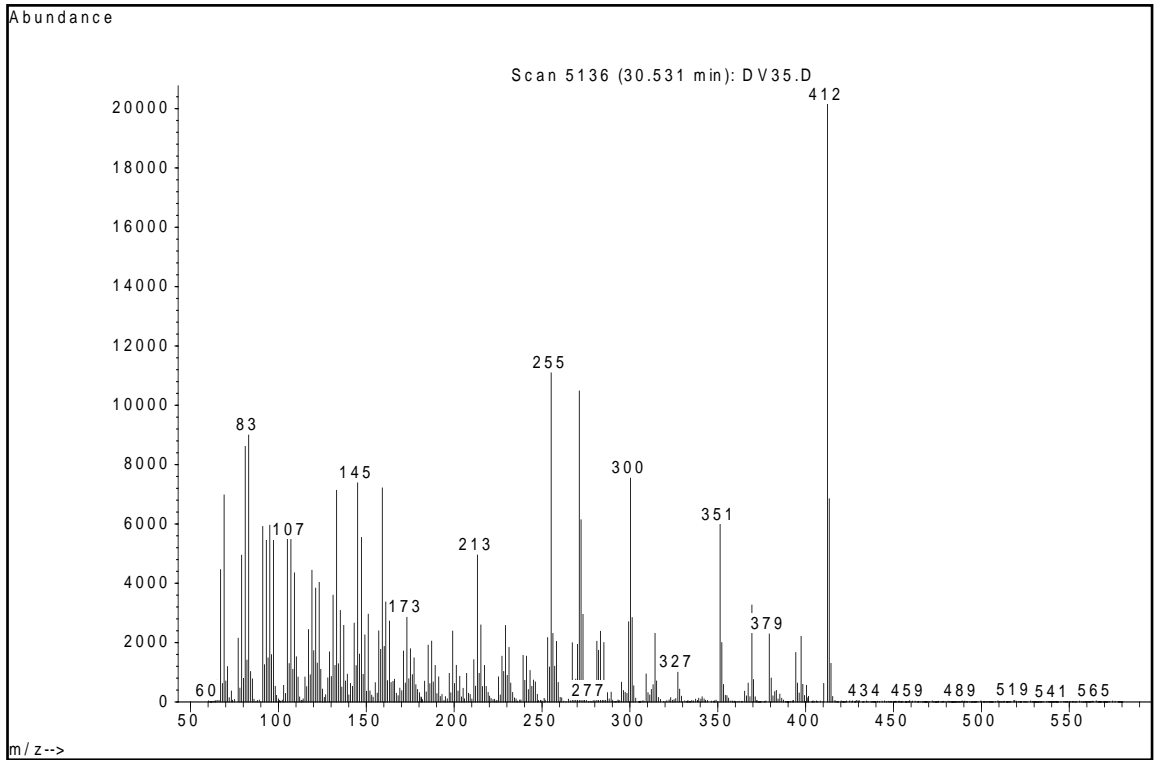
a.



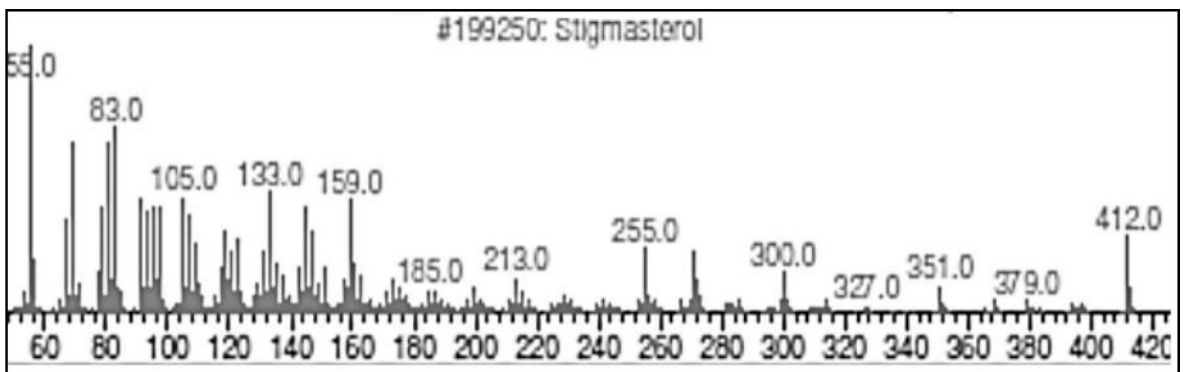
b.

ANEXO 5

Espectro de masas del Estigmasterol identificado por CG-EM, en la fracción EF8 pico 30,54. (Anex. 5a) comparado con el espectro de la base de datos NIST (Anex. 5b).



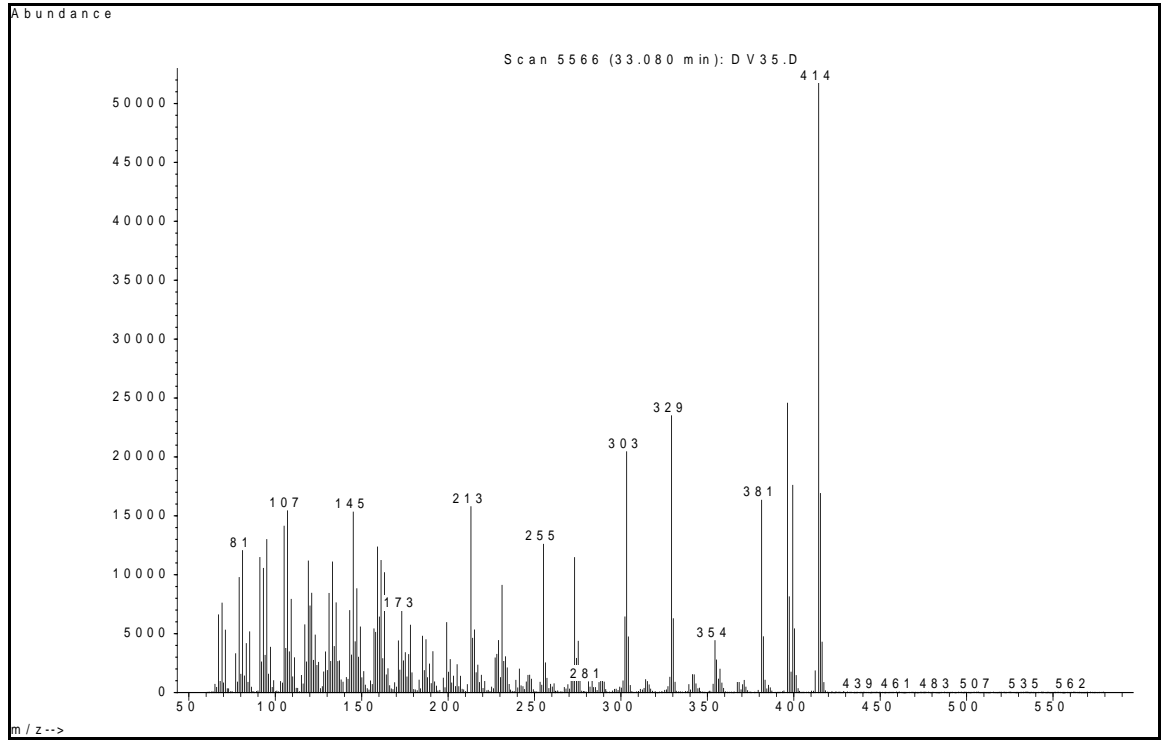
a.



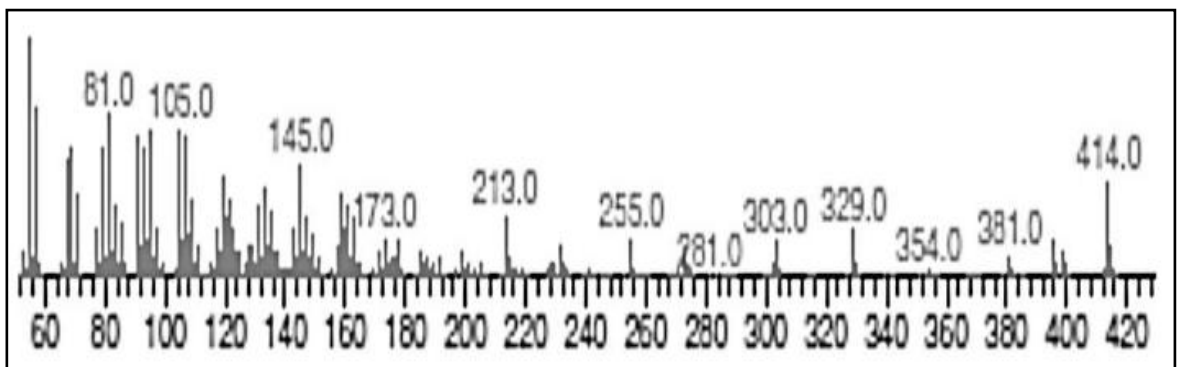
b.

Anexo 6

Espectro de masas del β -sitosterol identificado por CG-EM, en la fracción EF8 pico 33,08. (Anex. 6a) comparado con el espectro de la base de datos NIST (Anex. 6b).



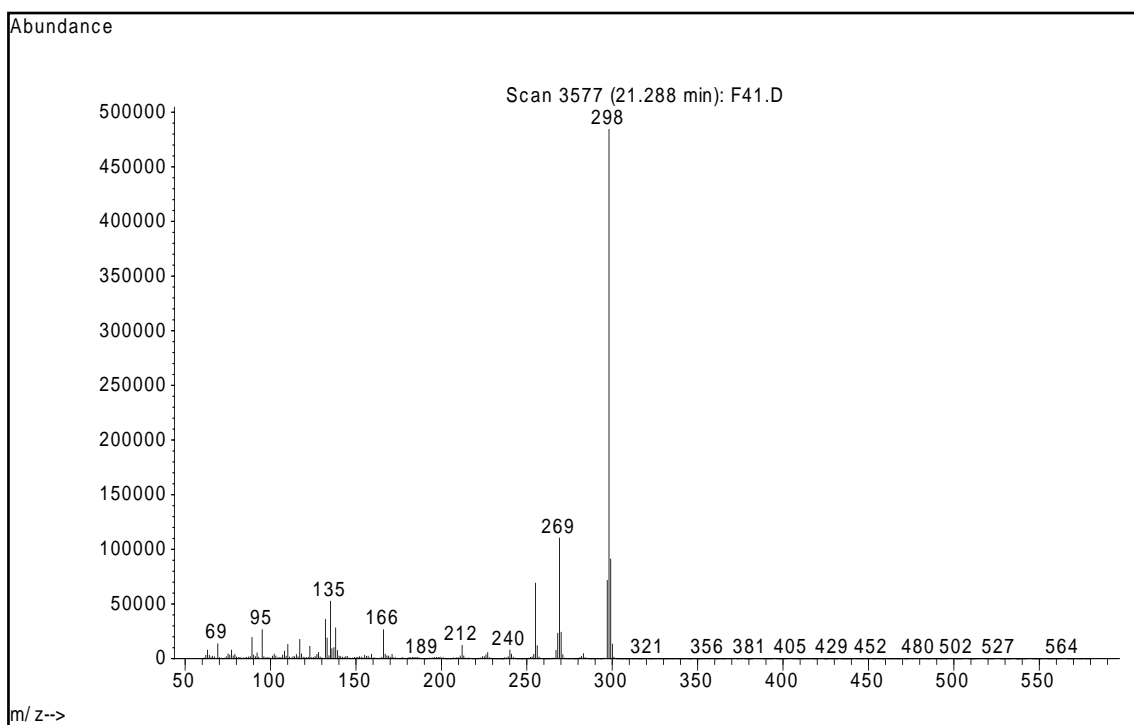
a.



b.

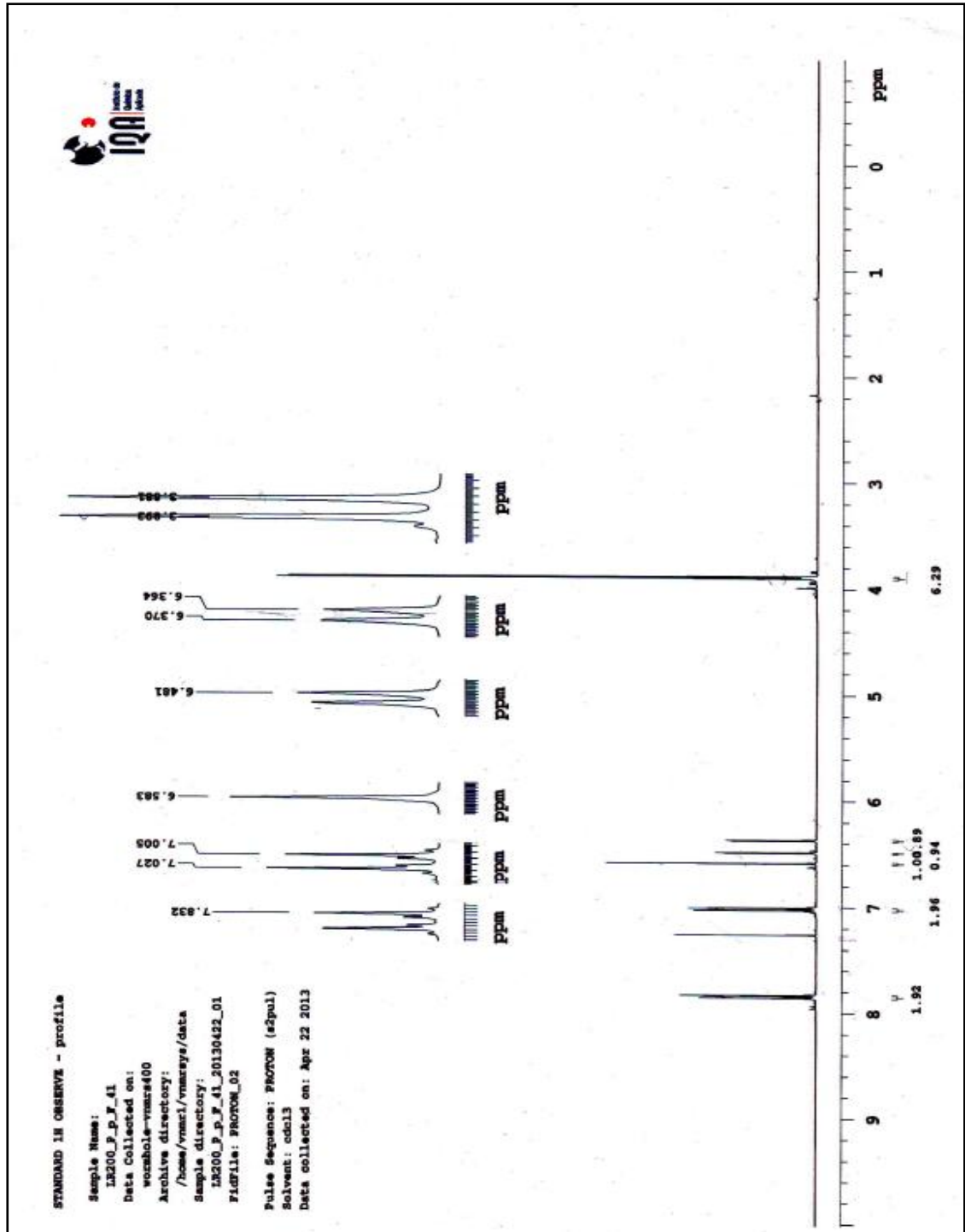
Anexo 7

Espectro de masa del 5-Hydroxy-4',7-dimethoxy-flavone por CG-EM, en la fracción EF10.



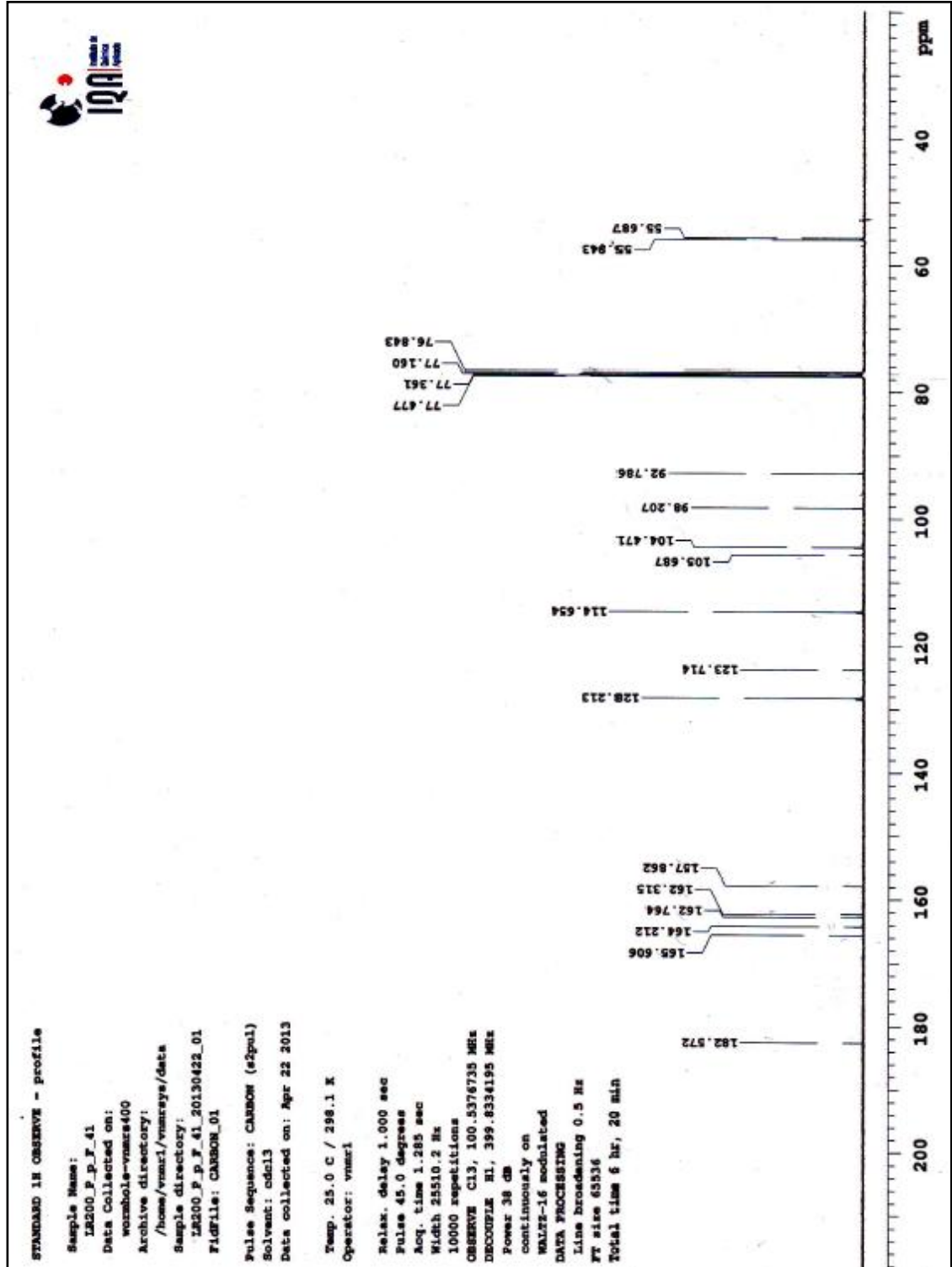
Anexo 8

Espectro de RMN ^{13}H del 5-Hydroxy-4',7-dimethoxy-flavone de la fracción EF10.



Anexo 9

Espectro de RMN ^{13}C del 5-Hydroxy-4',7-dimethoxy-flavone de la fracción EF10



Anexo 10

Espectro de RMN ^1H de la fracción EF12

