



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Otholobium mexicanum* J.W Grimes.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: León López, Diana Lorena

DIRECTOR: Ramírez Robles, Jorge Yandry, MSc.

CO-DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio, Ph.D

LOJA - ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

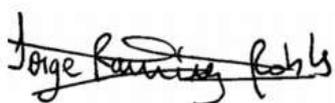
MSc. Jorge Yandry Ramírez Robles.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: "**Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Otholobium mexicanum* J.W Grimes.**" realizado por: León López Diana Lorena, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2014



MSc. Jorge Yandry Ramírez Robles

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Diana Lorena León López declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Otholobium mexicanum* J.W Grimes de la Titulación Bioquímico Farmacéutico siendo Jorge Yandry Ramírez Robles director 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.).....
León López Diana Lorena
CI.1104991367

DEDICATORIA

Dedicado primeramente a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se me presentaban, mostrándome día a día que con humildad, paciencia y sabiduría todo es posible.

A mis queridos padres Miltón y Nelsy, por su apoyo, consejos, comprensión, amor, y ayuda en los momentos más difíciles, que siempre tuvieron una palabra de aliento y que han sido incentivos de mi vida. A mi hermana Jessica por su solidaridad, compañía y motivación permanente.

Para mi amor Lenin por su paciencia, tolerancia y apoyo incondicional que siempre me brindo para seguir adelante y culminar esta etapa de mi vida.

Diana León López

AGRADECIMIENTO

A Dios por estar siempre junto a mí y darme las fuerzas necesarias para permitirme llegar a cristalizar esta meta. A mis amados padres Miltón y Nelsy, mi hermana Jessica por su amor, sacrificio y entrega total.

Al MSc. Jorge Ramírez de igual forma al PhD. Chabaco Armijos quienes con su gran sabiduría, profesionalismo y calidad humana me han ayudado culminar la presente investigación.

A Lenin por su amorosa compañía y apoyo infinito. A mí querida amiga Mirian Medina por su amistad, ayuda incondicional, su compañía y aliento a cada instante, porque juntas hemos hecho realidad este sueño.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, al Departamento de Química, Sección de Química Básica y Aplicada, a todos los profesores que a lo largo de mi carrera me han transmitido sus amplios conocimientos y sus sabios consejos.

Finalmente agradezco a todas las personas que de una u otra forma estuvieron conmigo, porque cada una aportó con un granito de arena.

Diana León López

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN EJECUTIVO	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
CAPITULO I	16
1 MARCO TEÓRICO	16
1.1 Antecedentes	17
1.2 Plantas medicinales.....	17
1.2.1 Metabolitos secundarios.	18
1.3 La flora Ecuatoriana	18
1.3.1 La familia Fabaceae.....	19
1.3.2 Género <i>Otholobium</i>	19
1.3.3 Especie <i>Otholobium mexicanum</i>	20
1.3.4 Taxonomía de <i>Otholobium mexicanum</i>	21
1.4 Cromatografía	21
1.4.1 Cromatografía de capa fina.....	21
1.4.2 Cromatografía en columna.....	22
1.4.3 Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas.	22
1.4.4 Resonancia Magnética Nuclear.	22

1.5 Actividad antibacteriana	23
1.5.1 Bacterias.....	23
1.5.1.1 Bacterias gram positivas.....	23
1.5.1.2 Bacterias gram negativas.	24
1.5.1.3 Enfermedades microbianas.	24
1.6 Actividad antifúngica.....	25
1.6.1 Hongos.	25
1.6.1.1 Dermatofitosis.	26
CAPITULO II	27
2 MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 Esquema de la metodología empleada.....	28
2.2 Recolección del material vegetal	29
2.3 Obtención de los extractos	30
2.4 Análisis de los extractos	30
2.5 Desclorofilación	32
2.6 Fraccionamiento en cromatografía en columna	32
2.7 Cromatografía de capa fina	33
2.8 Unión de fracciones.....	33
2.9 Caracterización química de las fracciones.....	33
2.9.1 Punto de fusión.....	33
2.9.2 Factor de Retención.....	34
2.9.3 Solubilidad.	34
2.10 Identificación de los compuestos aislados	35
2.10.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	35
2.10.2 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM).	35
2.11 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	36
2.11.1 Microdilución en Caldo: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	36
2.11.2 Microorganismos de Prueba.	36
2.11.3 Preparación de las muestras.....	37

2.11.4 Preparación del cultivo bacteriano (overnight).....	37
2.11.5 Preparación de la suspensión de los inóculos para bacterias.	37
2.11.6 Preparación de la suspensión de los inóculos para hongos.	38
2.12 Ensayo de Concentración mínima inhibitoria (CMI)	38
2.12.1 Bacterias.....	38
2.12.2 Hongos.	39
CAPITULO III	40
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1 Extractos obtenidos de la especie vegetal <i>O. mexicanum</i>	41
3.2 Compuestos aislados de la especie vegetal <i>O. mexicanum</i>	42
3.2.1 Fracciones 45-63 (DF5).	43
3.2.2 Fracciones 149-161(DF13).	46
3.2.3 Fracciones 162-174 (DF14).	50
3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) ...	54
3.3.1 Actividad antifúngica.	54
3.3.2 Actividad antibacteriana.	55
CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Otholobium mexicanum</i> J.W Grimes	20
Figura 2: Hongos a. <i>Trichophyton rubrum</i> b. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	25
Figura 3: Fotografía de caso clínico común dermatofitosis de pie. (Pie de atleta).	26
Figura 4: Mapa del cantón Loja, priorizando la ubicación de San Lucas.	29
Figura 5: Obtención de los extractos. a. Maceración dinámica (5min), b. Maceración estática (55min), c. Filtración al vacío, d. Rota evaporación.....	30
Figura 6: Placas de sílica gel CCF fase directa de los extractos de <i>O. mexicanum</i> . 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).	31
Figura 7: Placas de sílica gel CCF fase inversa de los extractos de <i>O. mexicanum</i> . a) F. móvil: MeOH- H ₂ O 8:2 (v/v); b) F. móvil: MeOH-H ₂ O 7:3 (v/v); c) F. móvil: MeOH- H ₂ O 9:1 (v/v).	31
Figura 8: Cromatografía en columna del extracto DL1.1.	32
Figura 9: Equipo de fusión Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22.....	34
Figura 10: Cálculo del R _f en la placa de sílica gel marca Merck60 F254.....	34
Figura 11: Microplaca TC 96.....	39
Figura 12: Cromatograma revelado de la fracción DF5. Fase estacionaria: sílica gel directa y fase móvil: Hex- AcOEt 7:3.....	43
Figura 13: Cromatograma de la fracción DF5.	44
Figura 14: Estructura química de Bakuchiol, identificado por CG-EM en la fracción DF5....	45
Figura 15: Cromatograma revelado de la fracción DF13.2. Fase estacionaria: sílica gel directa y fase móvil Hex- AcOEt 7:3.	48
Figura 16: Cromatograma de la fracción DF13.2.....	49
Figura 17: Estructura química del [1,1':3',1"-Terphenyl]-4-ol.	50
Figura 18: Cromatograma revelada de las fracciones DF14, fase estacionaria: sílica gel, y fase móvil Hex-AcOEt 7:3.....	51
Figura 19: Cromatograma de la fracción DF14.	52
Figura 20: Estructura química del Psoraleno (Ficusin).	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Descripción taxonómica de <i>Otholobium mexicanum</i>	21
Tabla 2: Características de la columna capilar.	36
Tabla 3: Medios de cultivo y condiciones de incubación para las cepas bacterianas.....	37
Tabla 4: Medios de cultivos y condiciones de incubación para las cepas de hongos.....	38
Tabla 5: Peso y rendimiento de los extractos y derivados obtenidos de <i>O. mexicanum</i>	41
Tabla 6: Fraccionamiento cromatográfico del extracto en acetato de etilo desclorofilado (DL1.1).	42
Tabla 7: Datos de CG-EM de la fracción DF5.....	44
Tabla 8: Fraccionamiento cromatográfico de las fracciones 149-161(DF13).	47
Tabla 9: Datos de (CG-EM) de la fracción DF13.2.	49
Tabla 10: Datos de (CG-EM) de la fracción DF14.	52
Tabla 11: Evaluación de la actividad antifúngica: CMI.....	54
Tabla 12: Evaluación de la actividad antibacteriana CMI.....	55

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano (DCM)
CHCl ₃	Cloroformo
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
Rf	Factor de retención
Pf	Punto de fusión
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear Protón
¹³ C RMN	Resonancia Magnética Nuclear Carbón 13
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<i>Tm</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Tr</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Sa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Ef</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Pv</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Wt</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>

<i>Pa</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<i>Kp</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
UV	Ultravioleta
DL1	Extracto de Acetato de Etilo
DL2	Extracto de Metanol
DL3	Extracto de Metanol/Agua
DL1.1	Extracto de Acetato de Etilo desclorofilado
DF5	Fracciones 45-63
DF13	Fracciones 149-161
DF13.2	Fracciones 9-14
DF14	Fracciones 162-174

RESUMEN EJECUTIVO

A partir de 200g de hojas secas de *Otholobium mexicanum*, recolectadas en la provincia de Loja, sector San Lucas, se obtuvo tres extractos en: Acetato de etilo (DL1), Metanol (DL2) y Metanol/Agua 7:3 (DL3). Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos mediante el método de Microdilución en caldo. En el extracto DL1 los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron de 15,62 µg/mL frente a las cepas de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 (*Tm*), *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188 (*Tr*), *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (*Sa*) y *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 (*Ef*); mientras que el extracto de AcOEt desclorofilado (DL1.1) presentó una CMI de 7,81 µg/mL frente a *Tm*, 15,62 µg/mL para *Tr* y <7,81 µg/mL contra *Sa* y *Ef*. Por tratarse de un estudio biodirigido se optó por seleccionar el extracto DL1.1 ya que presentó mayor actividad.

Se fraccionaron 1,33 g del extracto DL1.1 mediante cromatografía en columna (CC), lo cual permitió identificar por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) a: Bakuchiol, [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-ol y Psoraleno.

Palabras claves: Bakuchiol, [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-ol, *Otholobium mexicanum*, Psoraleno, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.

ABSTRACT

From 200g of *Otholobium mexicanum* dried leaves, which were collected in the province of Loja, Sector San Lucas it was obtained three extracts in: Ethyl acetate (DL1), Methanol (DL2) and methanol/water 7:3 (DL3). Antimicrobial activity of the extracts it was evaluated by the Broth Microdilution method. Minimum inhibitory concentration (MIC) values in the extract DL1 were 15.62 µg/mL against *Trichophyton mentagrophytes* ATCC ® 28185 (*Tm*), *Trichophyton rubrum* ATCC ® 28188 (*Tr*), *Staphylococcus aureus* ATCC ® 25923 (*Sa*) and *Enterococcus faecalis* ATCC ® 29212 (*Ef*) strains, while AcOEt extract without chlorophylls (DL1.1) showed a MIC of 7.81 µg/mL against *Tm*, 15.62 µg/mL to *Tr* and <7.81 µg/mL to *Sa* and *Ef*. Being a bio-guided study it was selected extract DL1.1, in agreement its higher activity.

It was fractionated 1.33 g of the DL1.1 extract by column chromatography (CC), which was permitted identification by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) of: Bakuchiol, [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-ol and Psoralen.

Keywords: Bakuchiol, [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-ol, *Otholobium mexicanum*, Psoralen, *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales para curar algunos malestares de la salud es una práctica muy común en muchos países (Muñetón, 2009). Hace miles de años que se utilizan remedios naturales, elaborados a partir de los experimentos de Pitágoras, Galeno e Hipócrates, y de las observaciones de médicos y herboristas recogidas a lo largo de los siglos. En los países en vía de desarrollo, muchas personas satisfacen sus necesidades sanitarias con plantas medicinales. En Europa y Norteamérica, ha renacido el interés por los productos naturales, estimulado por un mayor conocimiento de la acción de las plantas y la elaboración de normas relativas a la seguridad, la calidad y la fiabilidad de estos preparados (Wills, 2002).

La investigación química y la purificación de extractos vegetales han rendido numerosos compuestos puros que han probado ser indispensables en la medicina moderna. La mayoría de los productos naturales usados actualmente en medicina proceden de plantas medicinales usadas tradicionalmente (Morris & Boyd, 1998).

Las plantas han sido un recurso fundamental para las comunidades campesinas e indígenas de nuestro país. Se estima que el 80% de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas o productos naturales, para la atención primaria de la salud y bienestar (Buitrón, 1999).

O. mexicanum se acostumbra a beber como refresco la infusión de sus hojas. La corteza se utiliza para el tratamiento de la disentería por infecciones intestinales. Los indígenas norteamericanos solían alimentarse de la raíz. Otras propiedades que se le atribuyen son: antidiabética, astringente, balsámica, hemostática, carminativa, emenagoga y vulneraria (Gaibor, 2011). Bruneton (1993) aisló una furanocumarina llamada Psoraleno-Psoralea, compuesto tóxico que provoca enfermedades dérmicas.

Tomando como base lo anteriormente descrito, el presente trabajo investigativo busca aislar e identificar los metabolitos secundarios a partir de la especie vegetal *O. mexicanum* y evaluar su actividad antimicrobiana en el extracto obtenido con acetato de etilo, para así aportar con nuevos estudios al avance de la medicina natural. La especie en estudio se encuentra en el poblado de San Lucas, perteneciente al cantón y provincia de Loja.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

El uso de las plantas con fines medicinales se remonta a principio de la historia de la humanidad: 3.000 años antes de Cristo se escribió el libro más antiguo sobre plantas medicinales en China (Alarcón, 2011). La práctica de la fitoterapia es casi tan antigua como el hombre, es la medicina más tradicional y tratada del mundo (López, 2012).

Latinoamérica conserva uno de los recursos más valiosos en el mundo, como es su riqueza florística. El Ecuador cuenta proporcionalmente con una de las floras más ricas de Latinoamérica y del mundo; sumado a ella la inmensa riqueza cultural de la región por la presencia de diferentes grupos étnicos que hace que se conozca de la utilidad de un gran número de especies silvestres y cultivadas principalmente en el ámbito medicinal (Aguirre *et al.*, 2002).

El interés por las plantas medicinales utilizadas por los pueblos aborígenes del sur de Ecuador es cada día mayor, sabiendo que un alto porcentaje de las medicinas obtenidas en las farmacias provienen de las plantas, por tal razón son numerosas las investigaciones realizadas con la finalidad de descubrir y aislar nuevas sustancias para muchísimas enfermedades que afectan a la humanidad (Espinosa, 1997).

En la flora ecuatoriana la familia Fabaceae tiene una distribución cosmopolita y consta de unos 440 géneros y más de 12.000 especies. La familia es de gran importancia económica con especies comestibles, 60 géneros están representados en el Ecuador, varios de ellos introducidos y cultivados (Ulloa & Jorgensen, 1995).

En estudios anteriores de la especie *O. pubescens* se logró determinar por análisis fitoquímico los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas entre otros (Castro *et al.*, 2002).

1.2 Plantas medicinales

Las plantas medicinales han formado parte importante de la historia y cultura de los pueblos indígenas. El uso y aplicaciones para el remedio de enfermedades, constituyen un conocimiento que se transmite en forma orla de generación en generación (Pérez, 2008).

Es indudable la importancia de las plantas y los árboles para la medicina moderna, todas las culturas, a lo largo y ancho del planeta y en todos los tiempos han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Hernández, 2008).

Pérez (2008) define a las plantas medicinales como aquellas que contienen en algunos de sus órganos, principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general.

1.2.1 Metabolitos secundarios.

Son producto del metabolismo secundario de las plantas, no se encuentran en estado puro en las mismas, sino en forma de complejos cuyos componentes se complementan y se refuerzan en su acción sobre el organismo. Estas sustancias activas presentan un equilibrio fisiológico dentro de la planta y el organismo, debido a ello, resulta más asimilable por el cuerpo y carecen de efectos nocivos (Hernández, 2008).

Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (como alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, etc.). Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos (azúcar más un compuesto sin azúcar) que pueden ser glúcidos, galactósidos, etc. Otros componentes activos de las plantas son alcaloides, lípidos, gomas, mucilagos, taninos, aceites esenciales, cumarinas, flavonoides, terpenos resinas, etc. (Pérez, 2008).

Se estima que más de 100.000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas, y cada año se describe aproximadamente 1600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Pérez & Jiménez, 2011).

1.3 La flora Ecuatoriana

Ecuador ha ganado fama a nivel mundial en las últimas décadas por su alta diversidad biológica, y está incluida en la lista de los 17 países “megadiversos” todos los cuales están parcialmente o totalmente dentro de las zonas tropicales del planeta, aparte del Ecuador, los países megadiversos incluyen, en las Américas, a México, Brasil, Colombia, Perú, Venezuela y los Estados Unidos, en África a Madagascar, Sudáfrica, etc. Estos países abarcan alrededor del 70% de la biodiversidad del planeta en apenas 10% de la superficie terrestre del mundo.

En superficie, Ecuador es el más pequeño de los 17 países megadiversos, con alrededor de 258.000 km², es decir, apenas el 0,02% de la superficie terrestre del planeta, excluyendo la superficie marina (Neil, 2010).

El Ecuador ha sido considerado como uno de los “lugares de mayor diversidad” del mundo, puesto que presenta la mayor cantidad de especies de animales y plantas por km². Esto se explica por el clima que le confiere su ubicación territorial y la gran cantidad de hábitats diferentes existentes dentro de sus fronteras. Evidentemente, en los fríos y altos Andes viven especies muy distintas a las de las bajas selvas tropicales. Si se incluyen todas las zonas intermedias y se añade la región costera, el resultado es una abundancia de ecosistemas, fauna y flora (Vázquez & Saltos, 2009).

En Ecuador el 63% de las plantas que tratan infecciones causadas por virus y bacterias pertenecen a las familias Asteraceae, Solanaceae y Fabaceae. Mientras que las plantas utilizadas para tratar desórdenes del sistema digestivo representan el 15% del total de especies medicinal estas plantas son utilizadas sobre todo en la Sierra y las familias con gran número de registros fueron: Asteraceae, Fabaceae, Amaranthaceae y Lamiaceae (De la Torre *et al.*, 2008).

1.3.1 La familia Fabaceae.

La familia Fabaceae de distribución cosmopolita, es la familia botánica de las plantas generalmente con legumbre, y su importancia es fundamental en la economía de la naturaleza. Pueden ser árboles, arbustos (inermes o espinosos), sufrúticeso hierbas, perennes o anuales, trepadoras, de tallo voluble o con zarcillos (Bosisio, 2007).

1.3.2 Género *Otholobium*.

Las especies del género *Otholobium* son arbustos medianos de alrededor de 1 m de alto, con hojas alternas y compuestas con tres hojuelas lanceoladas y de margen simple. Inflorescencia que sale de las axilas en forma de racimos. Flores muy pequeñas, de blancas a lilas en forma de mariposa y con un pétalo más grande llamado quilla (Aguilar *et al.*, 2009). Estudios fitoquímicos y de actividad biológica en *O. pubescens* indican que contiene aceites esenciales, taninos, gomas, resinas, furocumarinas, terpenoides, tiene como componente mayoritario al bakuchiol, terpenoide fenólico, con actividades antimicrobianas y citotóxicas (Solgorré, 2005).

1.3.3 Especie *Otholobium mexicanum*.

Es un arbusto perenne de uno a tres metros de altura, que se lo encuentra desde los 2000 hasta los 2800 m.s.n.m., en lugares de insolación directa. Presenta ramificación alterna y corteza liza o ligeramente pubescente. Sus hojas son compuestas, trifoliadas, alternas con peciolo cortos, folíolos de forma lanceolada, borde entero y ápice acuminado, haz glabro de color verde oscuro, envés de color verde claro. Las flores se encuentran agrupadas en especies terminales o axilares, bisexuales, zigomorfas, color violeta o azul marino. Finalmente su fruto es una legumbre que produce una sola semilla fértil (Gaibor, 2011) (Ver Fig. 1).



Figura 1: *Otholobium mexicanum* J.W Grimes
Fuente: (Andrade *et al.*, 2009).

Los nombres comunes de la especie *O. mexicanum* son: wallwa, wallwa yura, washwa yana siki (kichwa), alpa trinitaria (castellano-kichwa), culén, trinitaria blanca (castellano). Los principales usos que se le atribuye en el Ecuador son: **alimenticios:** con las hojas y flores se preparan aguas aromáticas que se beben después de las comidas (Etnia no especificada Pichincha-Cañar), **social:** se emplea como anticonceptivo femenino (Etnia no especificada Imbabura), **medicinal:** la infusión de la planta, en particular de las hojas y flores, se usan para tratar la diarrea “recaídas”, acides estomacal, dolor de estómago, indigestión o empachos, flatulencias e infecciones intestinales(Kichwa de la Sierra Imbabura- Tungurahua- Cotopaxi-Chimborazo-Loja) (De la Torre *et al.*, 2008).

1.3.4 Taxonomía de *Otholobium mexicanum*.

Tabla 1: Descripción taxonómica de *Otholobium mexicanum*.

Nombre Científico	<i>Otholobium mexicanum</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Otholobium</i>
Epíteto Específico	<i>Mexicanum</i>
Autor Epíteto Específico	(L. f.) J.W. Grimes

Fuente: <http://www.biovirtual.unal.edu.co>.

1.4 Cromatografía

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos: retención es el efecto producido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido. Desplazamiento es el efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas. El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil, recibe el nombre de elución (Ábalos *et al.*, 2010).

1.4.1 Cromatografía de capa fina.

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. Permite determinar el grado de pureza de un compuesto, así por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación, además comparar muestras. Si dos muestras corren

igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia (León *et al.*, 2011).

1.4.2 Cromatografía en columna.

Es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánicos a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina con una placa porosa que impide su paso y en un estrechamiento con una llave. La mezcla se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria mientras que la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones, los más polares quedan más retenidos y para que salgan generalmente hace falta aumentar la polaridad del disolvente (Cartaya, 2013).

1.4.3 Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas.

Esta técnica es la más confiable, se utiliza el cromatógrafo de gases como separador de la muestra desconocida en sus componentes. El espectrómetro de masas ioniza los componentes separados y realiza un barrido electrónico de todos los iones comparando sus masas teóricas. Esta es una técnica absoluta ya que realiza el barrido de todos los congéneres basándose en el hecho de que la muestra es una familia de isómeros. Los isómeros son dos o más moléculas que tienen el mismo peso molecular pero diferente estructura. Al barrer electrónicamente solamente 10 pesos moleculares se obtiene un resultado absoluto. Sin lugar a dudas este es el medio más seguro para detectar y cuantificar (López, 2008).

1.4.4 Resonancia Magnética Nuclear.

La resonancia magnética nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno, si sólo implicase los núcleos no tendría interés para los químicos. Afortunadamente, los electrones van a producir modificaciones, débiles pero observables, a través de procesos que examinaremos más adelante, siendo esos efectos electrónicos los que darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento,

permitiendo así el estudio detallado de la estructura electrónica de las moléculas, razón del éxito de la RMN en química orgánica (Rico, 2011).

1.5 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 *et al.*, 2003). Se presenta cuando el antimicrobiano logra inhibir una población bacteriana, esta puede medirse de forma cuantitativa mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos frente a patógenos concretos (Tello, 2009).

Las especies vegetales son una fuente importante de nuevos fármacos, los que tienen una creciente demanda en compuestos antimicrobianos debido al aumento de la población con inmunodepresión y a la creciente resistencia a los antibióticos, lo que constituye una amenaza mundial según señala la Organización mundial de la salud (Vivot *et al.*, 2012).

1.5.1 Bacterias.

Las bacterias son microorganismos que poseen una amplia distribución en la naturaleza, según las características de su pared celular las bacterias pueden dividirse en dos grupos: gram positivas y gram negativas (Ruiz & Moreno, 2005).

1.5.1.1 Bacterias gram positivas.

Staphylococcus aureus: Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas, coloniza piel, el tracto gastrointestinal y producir infección (Gudiol, 2009).

Enterococcus faecalis: es una enterobacteria patógena del tracto urinario, puede causar endocarditis, infecciones de vejiga, próstata, epidídimo, mientras que las infecciones del sistema nervioso son menos comunes (Hancock & Perego, 2004).

1.5.1.2 Bacterias gram negativas.

Klebsiella pneumoniae: los factores de patogenicidad son la capsula y endotoxina, que es un factor antifagocitario; puede infectar diversos tejidos, especialmente del aparato respiratorio (Romero, 2007).

Pseudomona aeruginosa: es considerablemente más resistente a los antibióticos y uno de los microorganismos responsables de bacteriemias frecuentes, tiene una mayor mortalidad que las especies de *Pseudomon* otras especies de *Pseudomonas* (Bodi & garmacho, 2007).

Proteus vulgaris: su habitat natural es el intestino del hombre y analizado su patogenicidad se observa que habitualmente son poco patógenos, pero pueden originar infecciones en diversas regiones: sistema urinario, sistema digestivo, sistema nervioso, sistema digestivo (Largo *et al.*, 1973).

Escherichia coli: son comensales normales que se encuentran en el tracto digestivo, las cepas patógenas de este organismo se distinguen de la flora normal por poseer factores de virulencia, como exotoxinas, que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en los humanos (Faleiro, 2009).

Salmonella tiphymurium: es el agente causal mas frecuente de infecciones gastrointestinales que causa enfermedad diarreica bacteriana (Del Pozo *et al.*, 2006).

1.5.1.3 Enfermedades microbianas.

Las enfermedades microbianas, constituyen uno de los problemas terapéuticos más importantes de la medicina moderna. La utilización de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas la de etiología microbiana, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas patologías que son provocadas por agentes resistentes. Sin duda el reino vegetal ofrece una gran gama de especies de plantas que son potencialmente útiles para ser aplicadas a las enfermedades humanas, en concreto a aquellas producidas por microorganismos (Castillo *et al.*, 2012).

1.6 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 (Vidal, 2013).

1.6.1 Hongos.

Trichophyllum rubrum: es un hongo filamentososo con micronidios piroformes, sésiles sobre las hifas formando racimos. Posee macroconidios muy escasos, con varios tabiques, de formas irregulares, de pared fina y lisa, al final de la hifa. Abundan las clamidosporas intercalares, presentan hifas en raqueta, pero no filamentos espirales (Fig. 2a). Crece bien en la mayoría de los medios de cultivo comunes. Es el agente más común de dermatofitosis (tinea pedis, tinea 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*. Puede producir tinea capitis, tinea pedis, tinea corporis, tinea barbae y tinea unguium. Un rasgo único de esta especie es su capacidad de perforar pelo in vitro que ayuda a diferenciarlo de *T. rubrum* (Rueda, 2002). (Fig. 2b).

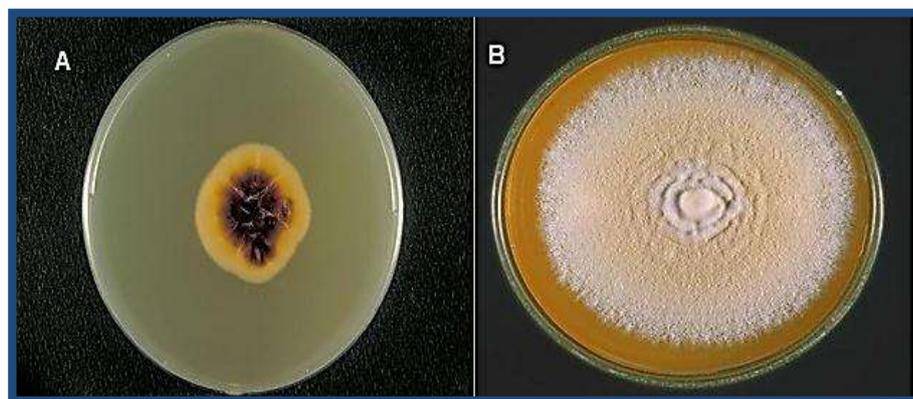


Figura 2: Hongos **a.** *Trichophyton rubrum* **b.** *Trichophyton mentagrophytes*

Fuente: <http://phil.cdc.gov>.

1.6.1.1 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 algunos animales. *Microsporum* y *Trichophyton* son patógenos humanos y animales, mientras que *Epidermophyton* es exclusivamente un patógeno humano (Jowa State University, 2005). Son las infecciones micóticas más comunes a nivel mundial, constituyen entre el 70 y el 80% de todas las micosis (Méndez *et al.*, 2004). Se clasifican en tiña de la cabeza, tiña del cuerpo, tiña de la mano, tiña de los pies (Fig. 3), tiña de la ingle, tiña del área del pañal tiña de las uñas (Schiwinn *et al.*, 2005).



Figura 3: Fotografía de caso clínico común dermatofitosis de pie. (Pie de atleta).

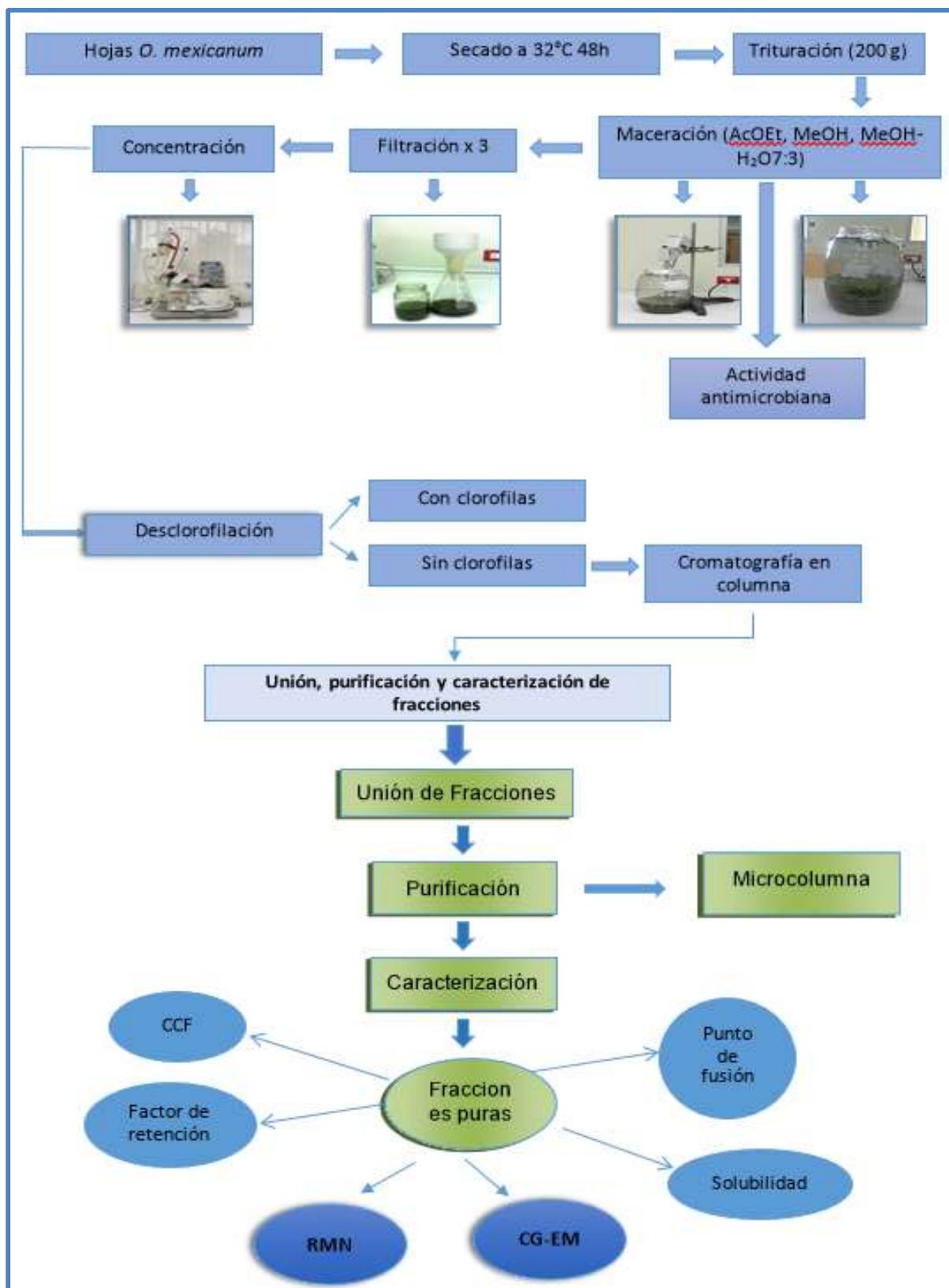
Fuente: www.ferato.com

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Esquema de la metodología empleada

A continuación se indica el esquema de las actividades realizadas dentro de la investigación.



2.2 Recolección del material vegetal

Se recolectó las hojas de *O. mexicanum* en la parroquia San Lucas del cantón Loja en la provincia de Loja (Fig.4), en las coordenadas geográficas 692229 E y 9589878 N a una altura de 2,656 m.s.n.m. La muestra la identificó Bolívar Merino curador del Herbario Loja de la Universidad Nacional de Loja (UNL), la muestra botánica reposa en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con voucher número PPN-FA-005.

Posteriormente el material vegetal fue sometido a una cámara de secado en la sección de Ingeniería de procesos a 32 °C por 48 horas.



Figura 4: Mapa del cantón Loja, priorizando la ubicación de San Lucas.

Fuente: <http://commons.wikimedia.org>.

2.3 Obtención de los extractos

A partir de 200 g de muestra seca y triturada se procedió a macerar con tres solventes de polaridad ascendente, AcOEt, MeOH y MeOH/H₂O en proporción 7:3 (v/v) respectivamente. En una relación 1:10 planta: solvente.

La maceración fue combinada, es decir, dinámica por 5 minutos (Fig. 5a), y estática por 55 minutos (Fig. 5b). Seguidamente se filtró al vacío (Fig. 5c). Los procesos de maceración y filtrado al vacío se realizaron tres veces. Luego mediante rota evaporación a presión reducida se obtuvo tres extractos a una temperatura entre 35-40°C (Fig. 5d).

Para facilitar la identificación y trabajo con los extractos obtenidos se los denominó de la siguiente manera: extracto en AcOEt (DL1), extracto en MeOH (DL2) y extracto en MeOH/H₂O (DL3).



Figura 5: Obtención de los extractos. a. Maceración dinámica (5min), b. Maceración estática (55min), c. Filtración al vacío, d. Rota evaporación.

Fuente: La autora, 2014.

2.4 Análisis de los extractos

Luego de obtener los tres extractos en DL1, DL2 y DL3 7:3 (v/v), utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄ y RP-18 se observó cuál de los tres extractos presentaba mayor riqueza de los compuestos (Fig. 6 y 7). Finalmente con los resultados obtenidos de las placas CCF y la actividad antimicrobiana se decidió elegir el extracto en AcOEt (DL1) para su posterior desclorofilación.

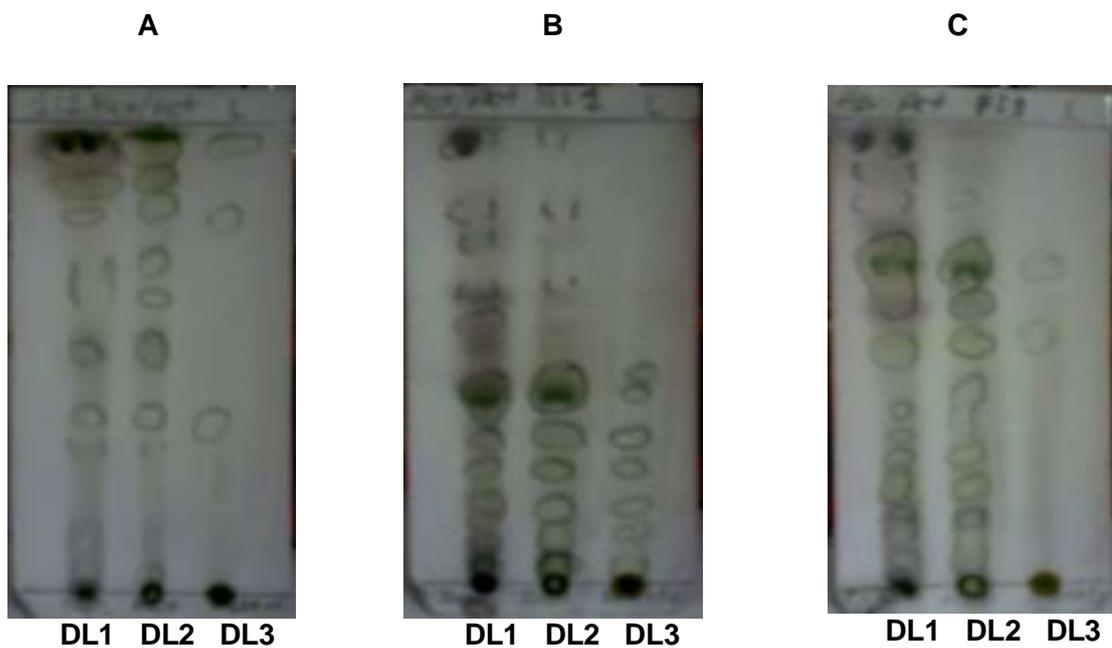


Figura 6: Placas de sílica gel CCF fase directa de los extractos de *O. mexicanum*. a) F. móvil: Hex-AcOEt 1:1 (v/v); b) F. móvil: Hex-AcOEt 4:1 (v/v); c) F. móvil: Hex-AcOEt 7: 3 (v/v).

Fuente: La autora, 2014.

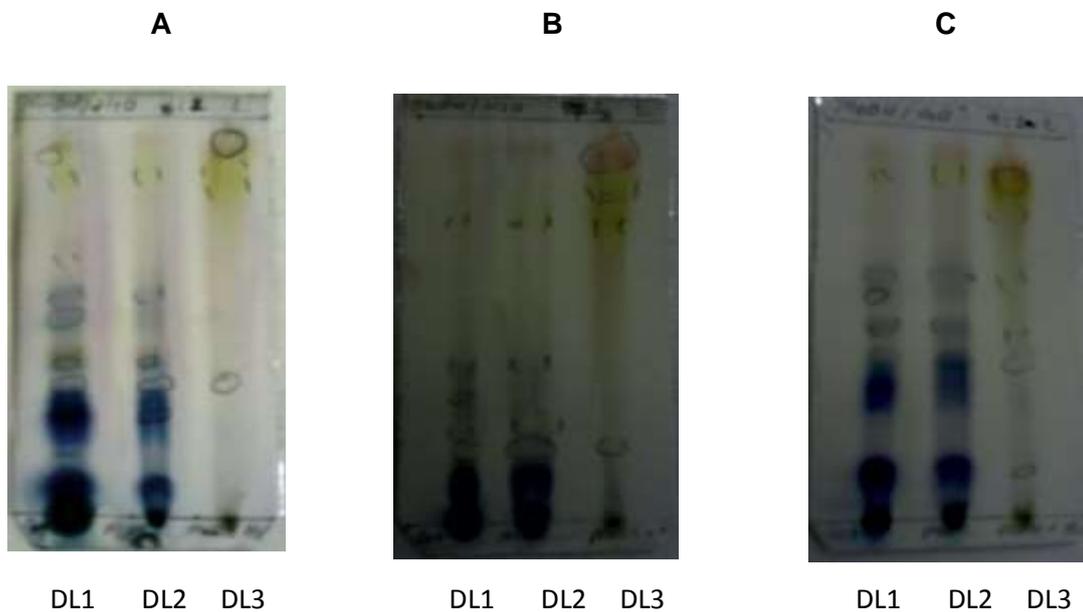


Figura 7: Placas de sílica gel CCF fase inversa de los extractos de *O. mexicanum*. a) F. móvil: MeOH- H₂O 8:2 (v/v); b) F. móvil: MeOH-H₂O 7:3 (v/v); c) F. móvil: MeOH- H₂O 9:1 (v/v).

Fuente: La autora, 2014.

2.5 Desclorofilación

Se pesó 6 g del extracto en AcOEt (DL1), para eliminar las clorofilas se utilizó una columna SPE Discovery-18 60 mL de 10 g eluyendo con una polaridad isocrática de MeOH/H₂O en proporción 8:2 (v/v), obteniéndose 2.52 g de extracto desclorofilado (DL1.1).

2.6 Fraccionamiento en cromatografía en columna

Para la cromatografía en columna (CC) se sembró 1,13 g del extracto (DL1.1) en una relación 1:100 (extracto: sílica). Se eluyó con solventes de polaridad creciente iniciando con: Hex-AcOEt 97:3 a MeOH 100%. La sílica gel empleada fue de marca Merck 0,0015-0040mm (Fig. 8).



Figura 8: Cromatografía en columna del extracto DL1.1.

Fuente: La autora, 2014.

2.7 Cromatografía de capa fina

Se realizó ensayos en cromatografía de capa fina (CCF) a las fracciones obtenidas, para ello se utilizó una placa de sílica gel 60 F₂₅₄ (fase directa). Los disolventes utilizados para la fase móvil fueron Hex/AcOEt 7:3 (v/v). La visualización posterior se realizó con luz ultravioleta de 254 y 365 nm. Finalmente todas las placas CCF fueron reveladas con una solución de ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

2.8 Unión de fracciones

Se recolectó fracciones de 20 mL de la primera columna. Para su unión se relacionó la altura de las manchas características de cada fracción, y la similitud visual que estas reflejaron ante la luz ultravioleta a una longitud de 254 y 365 nm; además se corroboró esta información con el agente revelador utilizado.

2.9 Caracterización química de las fracciones

Esta caracterización se realizó solamente a las fracciones que cristalizaron. Se determinó el punto de fusión (Pf), factor de retención (Rf) y su solubilidad (s).

2.9.1 Punto de fusión.

Para determinar el punto de fusión de las fracciones, se calentó lentamente una pequeña cantidad de la fracción a analizar en el equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60Hz (Fig. 9). A continuación se registra la temperatura a la cual la muestra pasaba de estado sólido a líquido.



Figura 9: Equipo de fusión Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22.

Fuente: La autora, 2014.

2.9.2 Factor de Retención.

Se lo calculó mediante la determinación de la relación entre la distancia recorrida por el compuesto y por el disolvente desde el origen o lugar de siembra (Fig. 10).

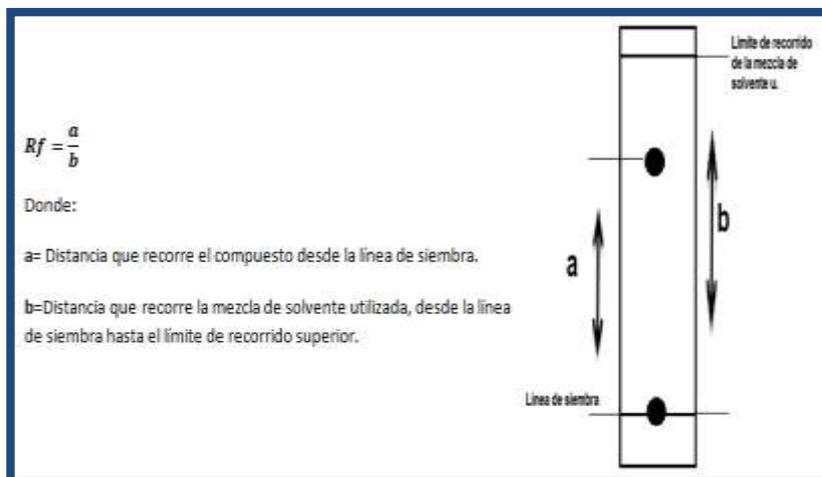


Figura 10: Cálculo del Rf en la placa de sílica gel marca Merck60 F254

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

2.9.3 Solubilidad.

Para determinar la solubilidad de las fracciones obtenidas se utilizó Hex, CH_2Cl_2 , AcOEt y MeOH.

2.10 Identificación de los compuestos aislados

2.10.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es utilizada para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes (Márquez *et al.*, 1999).

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β (Márquez *et al.*, 1999).

Los espectros de RMN fueron obtenidos en un equipo Varian N° de serie 21953 operando a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , usando CDCl_3 .

2.10.2 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM).

Los compuestos aislados de la especie *O. mexicanum*, fueron identificados mediante Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM), se hizo mediante un cromatógrafo de gases serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, cuenta con un inyector automatico split/splitless serie 7683. Las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano). (Tabla 2).

Tabla 2: Características de la columna capilar.

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

Fuente: Fielquimec©, 2012.

2.11 Determinación de la actividad antimicrobiana

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

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).

2.11.2 Microorganismos de Prueba.

Para la evaluación de la susceptibilidad antifúngica se emplearon dos cepas de hongos esporulados: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188. Mientras que para la evaluación antibacteriana se utilizaron bacterias gram positivas *Staphylococcus aureus* (Sa) ATCC® 25923 y *Enterococcus faecalis* (Ef) ATCC® 29212 y bacterias gram negativas *Proteus vulgaris* (Pv) ATCC® 8427, *Escherichia coli* (Ec) ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* (Wt) LT2, *Pseudomona aeruginosa* (Pa) ATCC® 27853 y *Klebsiella pneumoniae* (Kp) ATCC® 9997.

2.11.3 Preparación de las muestras.

Para disolver los extractos (DL1, DL2, DL3 y DL1.1) para las pruebas de Microdilución en Caldo se utilizó 20 mg de muestra diluido en 1000 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO). Cabe mencionar que esta dilución es la misma para CMI antibacteriano y CMI antifúngico.

2.11.4 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 las cepas bacterianas.

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Caldo Trypticasa Soya	37 °C por 14-16 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Trypticasa Soya	37 °C por 14-16 horas
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Muller Hinton	37 °C por 14-16 horas
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Trypticasa 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 Trypticasa Soya	37 °C por 14-16 horas

Fuente: La autora, 2014.

2.11.5 Preparación de la suspensión de los inóculos para bacterias.

Del cultivo overnight realizado 24 horas antes de iniciar las pruebas correspondientes, se tomaron 150-300 μ L en 7 mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una

concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland, de esta suspensión se tomó 140 μL y se inoculó en 7 mL de caldo Muller Hinton ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/ mL. Se tomó 100 μL de esta suspensión para completar a 200 μL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL.

2.11.6 Preparación de la suspensión de los inóculos para hongos.

Se preparó la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C , se tomó de la suspensión 14 μL este fue diluido en 7 mL de Caldo Sabouraud. De esta suspensión se tomaron 100 μL para completar a 200 μL 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 cultivos y condiciones de incubación para las cepas de 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).

2.12 Ensayo de Concentración mínima inhibitoria (CMI)

2.12.1 Bacterias.

El ensayo se realizó sobre microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución doble seriada del siguiente modo: colocamos 180 μL de caldo Mueller Hinton al primer pocillo y 100 μL a todos los demás pocillos restantes, luego se adiciona 20 μL del extracto diluido (20 mg/mL) en los pocillos de la fila A, después se realizó diluciones seriadas tomando 100 μL 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 (180 μL caldo + 20 μL extracto), control negativo (180 μL caldo + 20 μL DMSO) y para el control positivo (180 μL caldo + 20 μL Gentamicina® o Ampicilina® a 1000 ppm).

Después de preparada la placa se inocularon todas las columnas con 100 μL de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando un volumen final de 200 μL 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 8 $\mu\text{g/mL}$. Se sella las placas e incubamos a 37 °C por un periodo de 14-16 horas.

2.12.2 Hongos.

Se sigue el mismo procedimiento de dilución seriada aplicada variando únicamente ciertos parámetros: en hongos esporulados la concentración final del inóculo es 5×10^4 esporas/mL, y el control positivo que se emplea es una solución de 1 mg/mL de Intraconazol®. Se incuba las placas a 28°C y se monitorea el crecimiento hasta las 72 horas.

La lectura e interpretación de la CMI se la realizó visualmente. Se define como la menor concentración del extracto prueba necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de evaluación (Willey & Sons, 2005). (Fig. 11).



Figura 11: Microplaca TC 96

Fuente: La autora, 2014.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Extractos obtenidos de la especie vegetal *O. mexicanum*

En la tabla 5 se indica el peso y rendimiento de los extractos obtenidos a partir de 200 g de muestra vegetal seca (hojas) en los disolventes utilizados. Además los resultados del proceso de desclorofilación del extracto de acetato de etilo DL1.

Tabla 5: Peso y rendimiento de los extractos y derivados obtenidos de *O. mexicanum*

Extracto de la especie vegetal <i>O. mexicanum</i>			
EXTRACTOS	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Extracto en AcOEt (DL1)	200	9	4.5
Extracto en MeOH (DL2)		15	7.5
Extracto en MeOH - H₂O (DL3)		18	9
Extracto desclorofilado de la especie vegetal <i>O. mexicanum</i>			
EXTRACTOS	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Extracto en AcOEt desclorofilado (DL1.1)	7	2.52	36
Residuos con clorofilas del extracto en AcOEt (DL1.2)		4.22	60.28

Fuente: La autora, 2014.

3.2 Compuestos aislados de la especie vegetal *O. mexicanum*

Del extracto DL1.1 se obtuvieron 22 fracciones. En la tabla 6 se indican los pesos de cada fracción.

Tabla 6: Fraccionamiento cromatográfico del extracto en acetato de etilo desclorofilado (DL1.1).

Fracciones	Denominación	Proporción	Mezclas de disolventes	Apariencia física	Peso (mg)
1-23	DF1	97:3	Hex- AcOEt	Grumos	20
24-33	DF2	97:3	Hex- AcOEt	Aceitosa	25
34-38	DF3	97:3	Hex- AcOEt	Grumos	18
39-44	DF4	97:3	Hex- AcOEt	Grumos	21
45-63	DF5	97:3	Hex- AcOEt	Grumos	10
64-78	DF6	97:3	Hex- AcOEt	Sólido	81
79-113	DF7	97:3	Hex- AcOEt	Grumos	30
114-123	DF8	97:3	Hex- AcOEt	Grumos	40
124-128	DF9	90:10	Hex- AcOEt	Sólido	10
129-137	DF10	90:10	Hex- AcOEt	Grumos	7
138	DF11	90:10	Hex- AcOEt	Grumos	9
139-148	DF12	90:10	Hex- AcOEt	Sólido	59
149-161	DF13	90:10	Hex- AcOEt	Sólido	72
162-164	DF14	90:10	Hex- AcOEt	Sólido	9
165-213	DF15	90:10	Hex- AcOEt	Sólido	10
214-244	DF16	90:10	Hex- AcOEt	Sólido	12
245-247	DF17	90:10	Hex- AcOEt	Sólido	14
248-287	DF18	80:20	Hex- AcOEt	Sólido	16
288-278	DF19	80:20	Hex- AcOEt	Sólido	18
279-309	DF20	80:20	Hex- AcOEt	Sólido	23
310	DF21	100	AcOEt	Sólido	150
311	DF22	100	MeOH	Sólido	140

Fuente: La autora, 2014.

3.2.1 Fracciones 45-63 (DF5).

Las fracciones fueron obtenidas en Hex- AcOEt 97:3. Su peso es de 10 mg.

Características físicas

La fracción DF5 es grumosa de color blanco. Soluble en CH_2Cl_2 y CHCl_3 , No soluble en Hex y MeOH. Tiene un factor de retención (Rf) de 0,7 en CCF de fase directa utilizando el eluyente Hex- AcOEt 7:3 y un punto de fusión de 45-60°C.

Cromatografía de capa fina (CCF)

Fue visible en la luz UV de 254 y 365 nm; y al ser revelada con ácido sulfúrico/vainillina al 5%, presentó una sola mancha de color verde (Fig. 12).



Figura 12: Cromatograma revelado de la fracción DF5. Fase estacionaria: sílica gel directa y fase móvil: Hex- AcOEt 7:3

Fuente: La autora, 2014.

Espectro de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM)

Según la Base de Datos MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.I del equipo de CG-EM utilizado en la presente investigación, en el cromatograma de la fracción DF5 se encuentra un pico mayoritario con un tiempo de retención de 12,53 minutos que de acuerdo a los datos

presentados en el equipo se trata del compuesto 4-(3,7-dimethyl-3-vinyl-octa-1,6-dienyl)-phenol conocido como Bakuchiol (Fig.13).

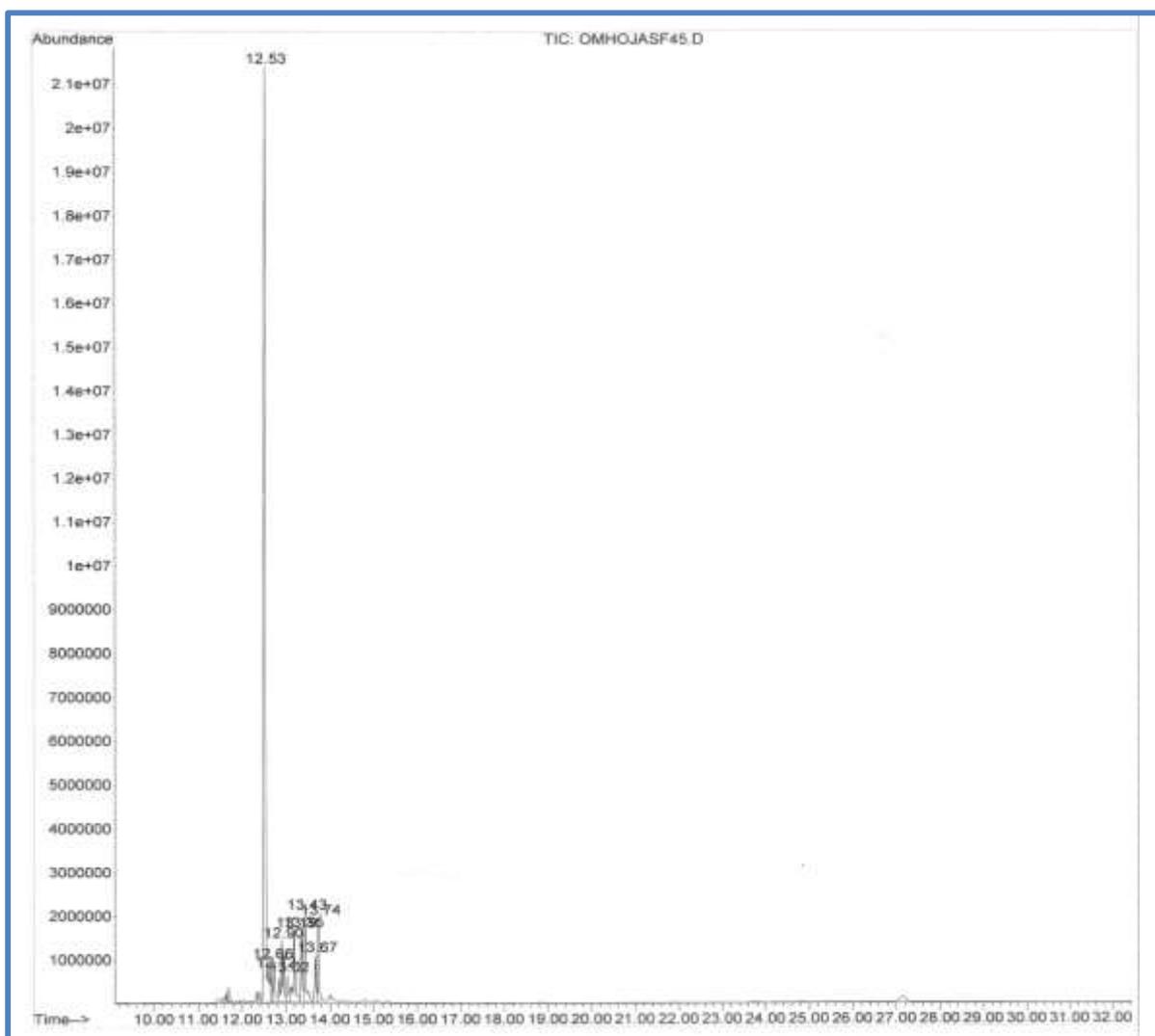


Figura 13: Cromatograma de la fracción DF5.

Fuente: Equipo de CG-EM.

En la tabla 7 se determina los datos de CG-EM reportados para la fracción DF5.

Tabla 7: Datos de CG-EM de la fracción DF5.

Compuesto	RT	ÁREA %	Qual %
4-(3-Ethenyl(- 3,7,dimethyl-1,6- octadienyl) phenol	12,53	66,57	87
DB-5MS capillary column			

Fuente: Equipo de CG-EM.

En el espectro de masa obtenido se observó el pico de ion molecular de 256 m/z, que es compatible con el peso molecular 256 g/mol de la fórmula molecular C₁₈H₂₄O del Bakuchiol (Fig.14).

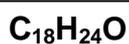
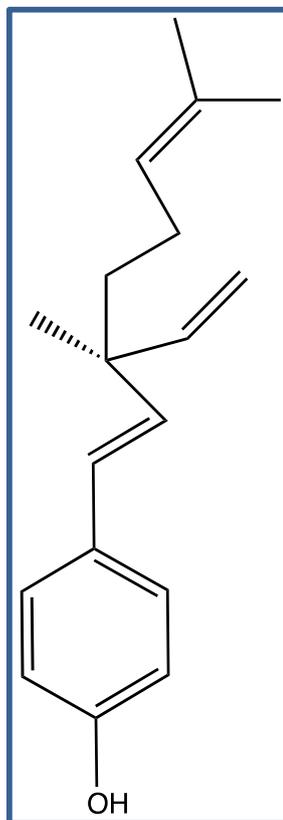


Figura 14: Estructura química de Bakuchiol, identificado por CG-EM en la fracción DF5.

Fuente: La autora, 2014.

Los espectros de masas del Bakuchiol identificado por CG-EM en la fracción DF5 (Anexo 2 A) fueron comparados con los espectros de la base de datos del equipo MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.I (Anexo 2 B).

El bakuchiol presente en la fracción DF5 es un monoterpene que ha sido determinado en *Psoralea corylifolia* (Asok & Chintalwar, 1983) (Balaraman *et al.*, 2009), y *O. pubescens* (Solgorré, 2005). Así mismo en un estudio similar se logró comprobar la presencia de este compuesto tanto en *O. pubescens* como en *O. Mexicanum* (Gorriti, 1998). Al bakuchiol se le

atribuye propiedad hipoglicemiante (Krenisky *et al.*, 1999), un estudio en ratas sugiere que el bakuchiol de la planta medicinal china *P. corylifolia* podría proteger contra la pérdida ósea (Lim *et al.*, 2009). Además ha mostrado actividad frente a numerosos patógenos orales gram positivos y gram negativos. Fue capaz de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* en virtud de un rango de concentraciones de sacarosa, valores de pH y en presencia de ácidos orgánicos en una manera dependiente de la temperatura; también inhibió el crecimiento de células adheridas a una superficie de vidrio (Parimala & Ramasubramaniam, 2009). Además en un estudio realizado del Bakuchiol asegura que posee una función antioxidante que hace posible su empleo como ingrediente adecuado para una formulación antienviejecimiento (DFarmacia.com, 2001).

En estudios anteriormente realizados por Solgorré, (2005) en las especies del género *Otholobium* se logró comprobar la presencia de Bakuchiol como componente mayoritario.

3.2.2 Fracciones 149-161(DF13).

Las fracciones fueron obtenidas en Hex- AcOEt 90:10. Su peso es de 72 mg.

Características físicas

Se presentaron de apariencia sólida de color blanco. Solubles en CH₂Cl₂ y CHCl₃ con un factor de retención (Rf) de 0,6 en CCF de fase directa utilizando el eluyente Hex-AcOEt 8:2.

Cromatografía de capa fina (CCF)

Fue visible en la luz UV de 254 y 365 nm; y al ser revelada con ácido sulfúrico/vainillina al 5%, se pudo apreciar dos manchas una de color verde y otra café.

Separación Cromatográfica mediante (CC)

Para su purificación se procedió a montar una microcolumna en una relación 1:100 (compuesto: sílica). Eluyendo isocráticamente con una mezcla de Hex-AcOEt 9:1. Todas las fracciones obtenidas fueron analizadas por CCF en una placa de sílica gel 60 F254 (fase directa). Los disolventes utilizados para la fase móvil fueron Hex: AcOEt 8:2 y la visualización posterior se realizó con luz ultravioleta de 254 y 365 nm. De esta microcolumna se observó la presencia de cristales en las fracciones 9-14 (DF13.2) (tabla 8).

Tabla 8: Fraccionamiento cromatográfico de las fracciones 149-161(DF13).

Fracciones	Denominación	Proporción	Mezclas de disolventes	Apariencia física	Peso (mg)
1-8	DF13.1	90:10	Hex	Grumos	
9-14	DF13.2	90:10	Hex- AcOEt	Cristales	20
15-20	DF13.3	90:10	Hex- AcOEt	grumos	
21-29	DF13.4	90:10	Hex- AcOEt	Grumos	
30-36	DF13.5	90:10	Hex- AcOEt	Grumos	
37-44	DF13.6	90:10	Hex- AcOEt	Sólido	
45-58	DF13.7	90:10	Hex- AcOEt	Grumos	
59-61	DF13.8	90:10	Hex- AcOEt	Grumos	
62-69	DF13.9	90:10	Hex- AcOEt	Sólido	
70-76	DF13.10	90:10	Hex- AcOEt	Grumos	
77-79	DF13.11	100	AcOEt	Grumos	
80-82	DF13.12	100	MeOH	Sólido	

Fuente: La autora, 2014.

Características físicas de las fracciones 9-14 (DF13.2)

Son cristales redondeados. Su punto de fusión es 68-69 °C. El factor de retención (Rf) es de 0,46 en CCF de fase directa utilizando el eluyente Hex-AcOEt 7:3. Solubles en CH₂Cl₂ y CHCl₃. Con un peso total de 20 mg.

Cromatografía de capa fina (CCF)

Fue visible en la luz UV de 254 y 365 nm; y al ser revelada con ácido sulfúrico/vainillina al 5%, se pudo apreciar una sola mancha de color café (Fig. 15).



Figura 15: Cromatograma revelado de la fracción DF13.2.
Fase estacionaria: sílica gel directa y fase móvil Hex-AcOEt 7:3.
Fuente: La autora, 2014.

Espectro de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM)

Según la Base de Datos MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.l del equipo de CG-EM se determinó que en la fracción DF13.2 probablemente se encuentra el [1,1':3',1''-Terphenyl]-4-ol con un tiempo de retención de 12,93 minutos (Fig. 16).

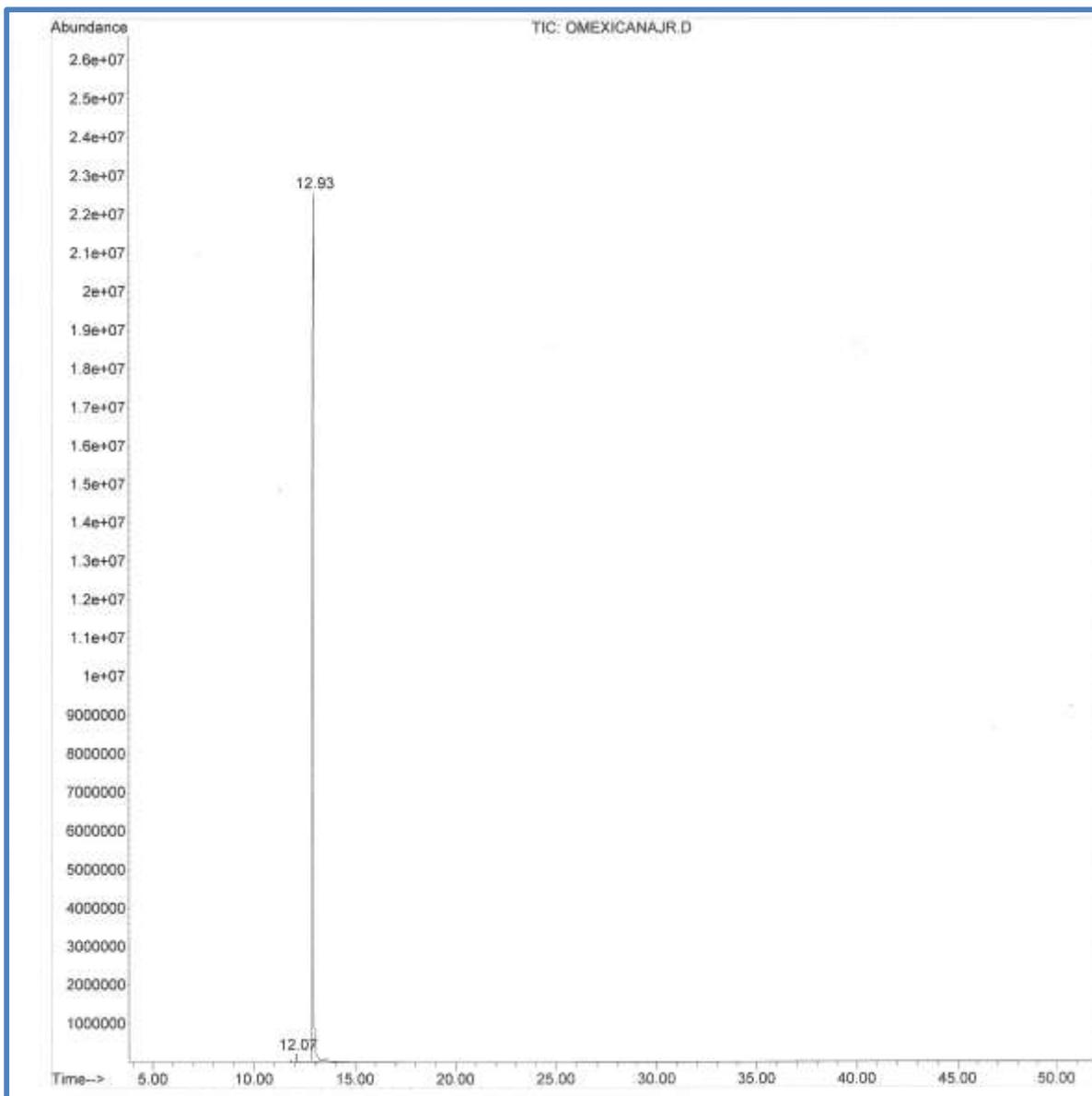


Figura 16: Cromatograma de la fracción DF13.2.

Fuente: Equipo de CG-EM.

Los datos obtenidos mediante CG-EM para el compuesto se indican en la tabla 9.

Tabla 9: Datos de (CG-EM) de la fracción DF13.2.

Compuesto	RT	ÁREA %	Qual %
[1,1':3',1''-terphenyl]-4'-ol.	12,93	99,55	90
DB-5MS capillary column			

Fuente: Equipo de CG-EM.

En los espectros de masa obtenidos se observaron los picos de ion molecular a 246 m/z, que es compatible con la fórmula molecular $C_{18}H_{14}O$ (Fig.17).

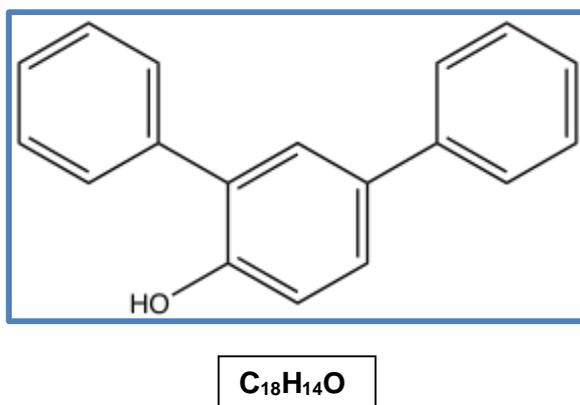


Figura 17: Estructura química del [1,1':3',1''-Terphenyl]-4-ol.

Fuente: La autora, 2014.

Los espectros de masas del [1,1':3',1''-Terphenyl]-4-ol identificado por CG-EM en la fracción DF13.2 (Anexo 3 A) fueron comparados con la base de datos del equipo MSD-Chemstation 0.01.00 sp1, Wiley 7n.l. (Anexo 3 B).

Así mismo se realizó el análisis de RMN obteniendo los siguientes datos:

1H -RMN: (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 1.789-1.781, 2.17, 3.36-3.35, 6.27-6.31, 6.79-6.81, 7.28-7.30, 7.60-7.64 ppm.

^{13}C -NMR: (100 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 115.12, 115.12, 115.14, 116.31, 121.22, 127.34, 127.54, 127.97, 130.25, 135.65, 18.06, 25.96, 29.72, 31.08, 51.73, 51.74, 145.03, 156.65, 168.06, 207.32 ppm.

Al finalizar el estudio por razones de tiempo no se logró establecer la estructura química completa del compuesto y son reportados como referencia para posteriores estudios que permitan la completa elucidación de la molécula, los datos espectrales de RMN de ^{13}C y 1H se indican en (Anexo 5 y 6).

3.2.3 Fracciones 162-174 (DF14).

Las fracciones fueron obtenidas en Hex- AcOEt 90:10. Su peso fue de 9 mg.

Características físicas

Son cristales, cubiertos parcialmente con unas partículas amarillas. Solubles en CH_2Cl_2 y CHCl_3 . Tienen un factor de retención (R_f) de 0,7 en CCF de fase directa utilizando el eluyente Hex-AcOEt 7:3.

Cromatografía de capa fina (CCF)

Se mostraron visibles en la luz UV de 254 y 365 nm; y posterior al revelado con ácido sulfúrico/vainillina al 5% se pudo apreciar una sola mancha de color café (Fig. 18).



Figura 18: Cromatograma revelada de las fracciones DF14, fase estacionaria: sílica gel, y fase móvil Hex-AcOEt 7:3.

Fuente: La autora, 2014.

Espectro de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM)

Según la Base de Datos MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.I del equipo de CG-EM se determinó que en la fracción DF14 posiblemente se encuentra el Psoraleno con un tiempo de retención de 11,02 minutos (Fig. 19).

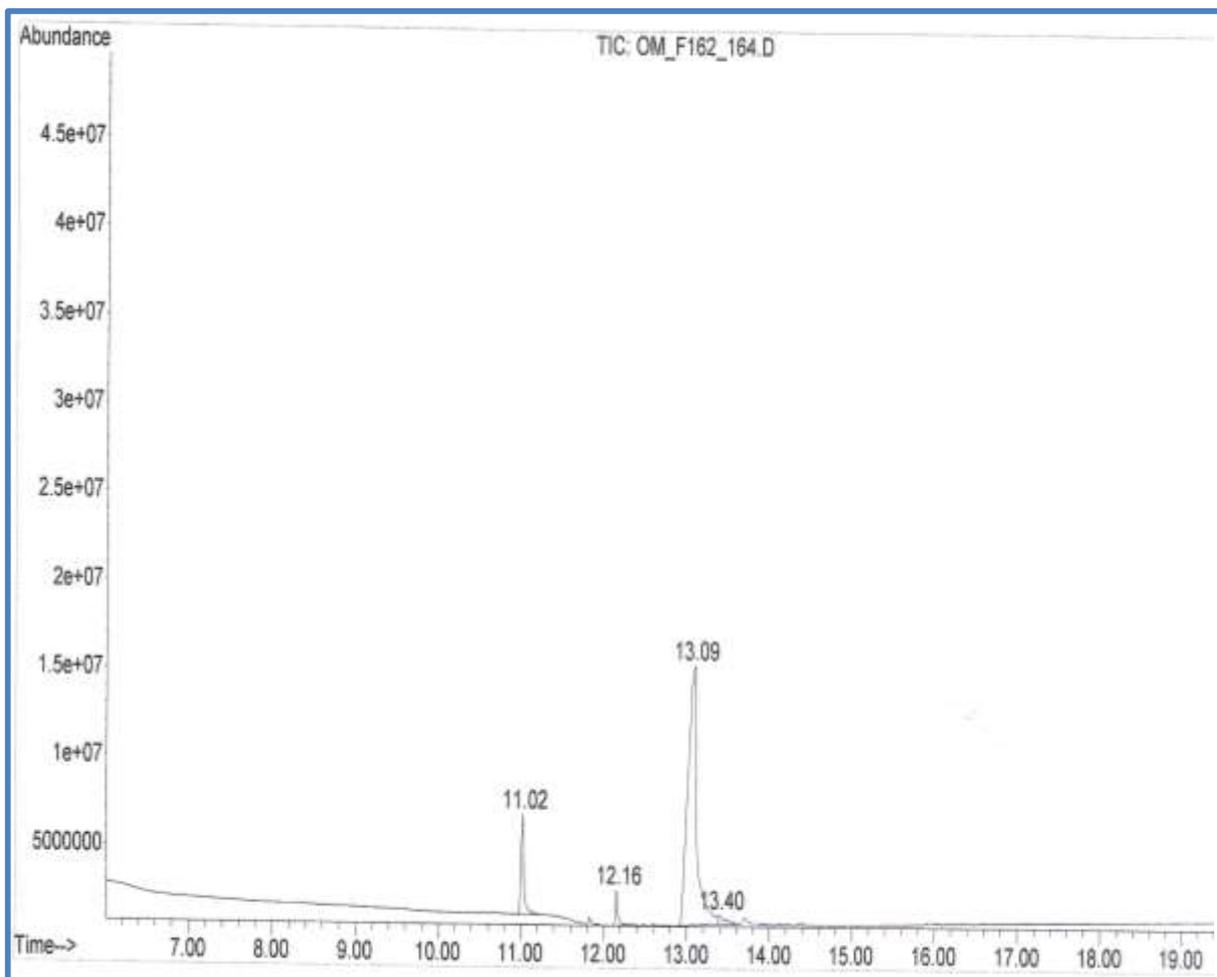


Figura 19: Cromatograma de la fracción DF14.
Fuente: Equipo de CG-EM.

En la tabla 10 se determina los datos de CG-EM reportados para la fracción DF14.

Tabla 10: Datos de (CG-EM) de la fracción DF14.

Compuesto	RT	ÁREA %	Qual %
Psoraleno (Ficusin)	11,02	0,56	94
DB-5MS capillary column			

Fuente: Equipo de CG-EM.

De los dos picos significativos que resultan en el cromatógrafo, se reporta los valores para el que presenta mayor porcentaje de probabilidad, este corresponde al pico 11,02 minutos.

En los espectros de masa obtenidos se observaron los picos de ion molecular a 186 m/z, que es compatible con la fórmula molecular $C_{11}H_6O$ (Fig.20).

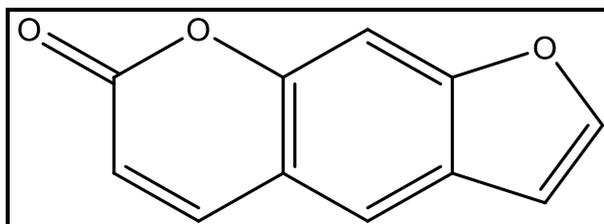


Figura 20: Estructura química del Psoraleno (Ficuin).

Fuente: La autora, 2014.

Los espectros de masas del Psoraleno identificado por CG-EM en la fracción DF14 (Anexo 4 A) fueron comparados con la base de datos del equipo MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.l (Anexo 4 B) y con el espectro de la base de datos NIST 2011(Anexo 4 C).

El Psoraleno presente en DF14 es un compuesto de origen en una familia de productos naturales conocidos como furanocumarinas, este compuesto ha sido reportado en *O. glandulosum* (Hirzel *et al.*, 2004), *O. pubescens* (Solgorré, 2005) e incluso en *O. mexicanum* por Bruneton, 1993 (Gaibor, 2011).

Históricamente, los psoralenos se han usado, junto con la luz U.V., en el tratamiento de varias enfermedades de la piel como el vitiligo, la psoriasis y la micosis fungoides; en el caso del vitiligo, el tratamiento con psoraleno y luz U.V., se explica por el incremento que ocasionan en la actividad de la tirosinasa (Torres, 1993).

3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Según Holetz *et al.*, (2002) si un extracto o compuesto presenta una CMI <100 µg/mL la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a 500 µg/mL moderada, de 500 a 1000 µg/mL mala y >1000 µg/mL nula.

3.3.1 Actividad antifúngica.

Los resultados indicaron que el extracto de AcOEt (DL1) mostró actividad antifúngica de 15,62 µg/mL contra *Trichophyton mentagrophytes* (*Tm*) y *Trichophyton rubrum* (*Tr*) que se considera como una actividad buena, mientras que el extracto de MeOH (DL2) tuvo un CMI de 125µg/mL contra *Tm* y *Tr* siendo esta una actividad antifúngica moderada. En tanto que el extracto de MeOH/H₂O (DL3) indicó una actividad antifúngica > 1000 µg/mL contra *Tm* y *Tr*, presentando una actividad nula. Finalmente el extracto de AcOEt desclorofilado (DL1.1) indicó una actividad antifúngica de 7,81 µg/mL para *Tm* y 15,62 µg/mL en *Tr* (tabla 11).

Tabla 11: Evaluación de la actividad antifúngica: CMI.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA (CMI) (µg/mL)				
EXTRACTOS	AcOEt	MeOH	MeOH/H ₂ O 7:3	AcOEt desclorofilado
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	15,62	125	>1000	7,81
<i>Trichophyton rubrum</i>	15,62	125	>1000	15,62
Control positivo: Itraconazol 1 mg/1mL Control negativo: DMSO				

Fuente: La autora, 2014.

De acuerdo a bibliografía para el género *Otholobium* se ha reportado actividad insecticida y antifúngica en las amidas, cumarinas y lignanos (Huamaní & Ruiz, 2005). En otros estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de las plantas se determinó que el aceite esencial

de las hojas puede ser considerado como un buen agente antibacteriano y antifúngico (Fuentes *et al.*, 1997). Otros de los metabolitos con actividad antimicrobiana son los terpenos, taninos, saponinas (Seigler, 2003). Además se ha demostrado que el Bakuchiol, uno de los compuestos identificados en la presente investigación, es utilizado durante siglos en la medicina india y china tradicional para tratar una variedad de enfermedades de la piel, como la psoriasis, infecciones fúngicas y bacterianas, y la alopecia. Se cree que el Bakuchiol tiene efectos anti-microbianos, anti-cicatrices y propiedades anti-inflamatorias (Berkowitz, 2013).

3.3.2 Actividad antibacteriana.

El extracto DL1 presentó una CMI de 15,62 µg/mL para *Staphylococcus aureus* (Sa) y *Enterococcus faecalis* (Ef) que se considera una actividad buena, mientras que el extracto DL2 presenta una actividad moderada de 125 µg/mL para Sa y 62,5 µg/mL en Ef con una buena actividad. En tanto que el extracto DL3 mostró una actividad nula de > 1000 µg/mL. Finalmente el extracto DL1.1 mostró una actividad buena de < 7,81 µg/mL. Cabe indicar que los cuatro extractos ensayados no son activos contra bacterias gram negativas: *Proteus vulgaris* (Pv), *Escherichia coli* (Ec), *Salmonella typhimurium* (Wt), *Pseudomona aeruginosa* (Pa) y *Klebsiella pneumoniae* (Kp) (Tabla 12).

Tabla 12: Evaluación de la actividad antibacteriana CMI.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA (CMI) (µg/mL)						
ESPECIES	EXTRACTOS				CONTROLES	
	DL1	DL2	DL3	DL1.1	GENTAMICINA	AMPICILINA
<i>Proteus vulgaris</i> (Pv)	>1000	>1000	>1000	>1000		
<i>Escherichia coli</i> (Ec)	>1000	>1000	>1000	>1000	7,81	
<i>Salmonella typhimurium</i> (Wt)	>1000	>1000	>1000	>1000	7,81	
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (Pa)	>1000	>1000	>1000	>1000	7,81	

<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Kp).	>1000	>1000	>1000	>1000		7,81
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa)	15,62	125	>1000	<7,81	7,81	
<i>Enterococcus faecalis</i> (Ef)	15,62	62,5	>1000	<7,81		7,81

Fuente: la autora.

Las especies del género *Otholobium* contienen diversos tipos de metabolitos entre los más importantes tenemos aceites esenciales, taninos, gomas, resinas, furocumarinas, terpenoides y tienen como componente mayoritario al bakuchiol (Solgorré, 2005), se ha demostrado que los terpenos o terpenoides son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios, de igual manera en las plantas los taninos tienen una actividad antimicrobiana esto se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos (Cowan, 1999).

El bakuchiol fue aislado de las semillas de *Psoralea corylifolia* presentando efectos bactericidas contra *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*. Razón por la cual se le atribuye su alta actividad antibacteriana, en especial al bakuchiol ya que se encuentra como el compuesto mayoritario en esta especie (Katsura *et al.*, 2001).

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 selectiva careciendo de una filtración efectiva contra grandes moléculas, a diferencia de las gram negativas que presentan una pared celular más compleja (Vidal, 2013).

CONCLUSIONES

A partir del extracto de Acetato de Etilo desclorofilado de la especie *O. mexicanum* se identificaron mediante Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM) el Bakuchiol en la fracción DF5, [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-ol de la fracción DF13.2 y Psoraleno (Ficusin) en la fracción DF14. Los compuestos Bakuchiol y Psoraleno de acuerdo a la bibliografía presentan actividad antimicrobiana.

El extracto de Acetato de Etilo desclorofilado, presentó una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 7,81µg/mL contra las cepas de hongos *T. mentragrophytes* ATCC 28185 ® y una CMI de 15,62µg/mL contra *T. rubrum* ATCC 28188 ®. Mientras que la CMI para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ® y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ® es <7,81µg/mL. La mayor actividad inhibitoria del extracto es contra *T. mentragrophytes* y para bacterias es contra *Enterococcus faecalis*.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de la especie *Otholobium mexicanum* realizando el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de los extractos de metanol, además realizar estudios de otras partes de la especie ya sea tallos, raíces u otros, ya que en estudios anteriores han demostrado tener compuestos secundarios importantes.
- Con los compuestos identificados realizar pruebas antioxidantes y actividad biológica contra líneas celulares.
- Finalmente continuar realizando estudios de investigación con otras especies del género *Otholobium* con antecedentes etnobotánicas en la búsqueda de nuevos compuestos farmacológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ábalos, A., Espuny, M., Bermúdez, R., & Manresa, A. (2010). Aplicación de la Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS) en la caracterización química de los polihidroxicanoatos. *Revista Cubana de Química*, 15(2).
- Aguilar, Z., Hildalgo, P., & Ulloa, C. (2009). *Guía de Plantas Útiles de los Páramos de Zuleta*, Ecuador. Quito: EcoCiencia.
- Alarcón, J. (2011). *Plantas aromáticas y medicinales. Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos*. ICA.
- Andrade, J., Armijos, C., Malagón, O., & Lucero, H. (2009). *Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia saraguro en la parroquia san lucas (Primera edicion ed.)*. Loja: Universitario UTPL.
- Asok, B., & Chintalwar, G. J. (1983). Biosynthesis of bakuchiol, a meroterpene from *Psoralea corylifoli*. *Phytochemistry*, 1945-1947.
- Balaraman, M., Soundar, D., & Kadimi, U. (2009). Amyloglucosidase Catalyzed Syntheses of Bakuchiol Glycosides in Supercritical Carbon Dioxide. *Korean Chem*, 1760-1766.
- Berkowitz, J. (9 de Septiembre de 2013). Derm Approved. Obtenido de Bakuchiol (*Psoralea corylifolia*) : <http://dermaproved.com/active-ingredients/bakuchiol>
- Bodi, M., & garmacho, J. (2007). pseudomonoterapias aeruginosa: tratamiento combinado frente a m. *Medicina Intensiva*, 83-87.
- Bosisio, A. (2007). *Catálogo de la Familia Fabaceae representada en el Herbario del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino" de Santa Fe*. Argentina.
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognoise. Tec: Techn.et documentation*. Londres: Lavoisier.
- Buitrón, X. (1999). *Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales, situacion actual y aspectos importantes para la conservación*. Quito: Traffic International.
- Cartaya, O. (2013). Características Químicas y Aplicaciones. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 22(2), 5-14.
- Castillo, E., & Martínez, I. (2007). *Manual de fitoterapia*. Barcelona: Editorial Elsevier Masson.
- Cowan, M. (1999). *Plant Products as antimicrobial agents*. Madrid, 564-582.

- Crespo, V. (2008). Generalidades sobre los hongos. Dermatomicosis: saprofitias y dermatofitosis Piel (Vol. 7).
- De la Torre, L., Alarcón, D., & Kvist, L. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas. Quito.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus.
- DFarmacia.com. (1 de Junio de 2001). Obtenido de Bakuchiol, nuevo ingrediente y nueva función: <http://www.dfarmacia.com>
- Espinosa, R. (1997). Estudios botánicos en el sur del Ecuador. Loja: Herbario-Loja Reinaldo Espinosa. Universidad Nacional de Loja, Facultad de ciencias agrícolas.
- Faleiro, P. (2009). Formación de biopelículas por "*Escherichia coli*" y su correlación con factores de virulencia. Madrid: Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Fuertes, C., Roque, M., & Tristan, M. (1997). Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* con actividad antibacteriana y antifúngica. Instituto de Microbiología UNMSM.
- Gaibor, D. (2011). Propuesta de una microempresa para producir té de trinitaria en la parroquia de San Joaquín. Cuenca: Previo al título de magister en ciencias de gerencia.
- Gorritti, C. (1998). Estudio fitoquímico de dos especies peruanas de *Otholobium* (Psoralba) quimiomodulación de Bakuchiol. Perú: Universidad Salamanca.
- Gudiol, F. A. (2009). Documento de consenso sobre el tratamiento de la bacteriemia y la endocarditis. Lima.
- Hancock, L., & Perego, M. (2004). Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis*. Journal of bacteriology.
- Hernández, A. (2008). Las plantas medicinales. Biocenosis, 1-2.
- Hirzel, J., Rodríguez, N., & Del Valle, P. (2004). Efecto de la nutrición mineral sobre la producción de culén (*Otholobium glandulosum* (L.) Grimes). Scielo.

- Holetz, F., Pessini, G., Sánchez, N., Cortez, D., Nakamura, C., & Filho, B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *MemInst Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027-31.
- 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 para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico.
- Jowa State University. (1 de Mayo de 2005). Dermatofitosis: Tiña, Tinea, Dermatomicosis. Recuperado el 4 de Enero de 2013, de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/dermatofitosis.pdf>
- Katsura, H., Tsukiyama, R., Suzuki, A., & Kobayashi, M. (2001). In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. *PubMed*, 3009-3013.
- Krenisky, J., Lou, J., Reed, M., & Carney, J. (1999). Isolation and Ant hyperglycemic Activity of Bakuchiol from *Otholobium pubescens* (Fabaceae), a Peruvian Medicinal Plant used for the treatment of Diabetes. *Biol. Pharm. Buil*, 1137-1140.
- León, C., Ferrer, A., & Domínguez, J. (2011). Un método práctico y conveniente para preparar 3-metil-2-oxo-1, 4-benzoxazina para estudiantes de Química Orgánica. *Revista de investigación*, 35(73), 3-14.
- Lim, S., Ha, T., Kim, S., Ahn, J., Park, H., & Kim, S. (2009). Ethanol extract of *Psoralea corylifolia* L. and its main constituent, bakuchiol, reduce bone loss in ovariectomised Sprague-Dawley rats. *Nutrition*, 1031-1039.
- Lock, O. (2004). *Métodos de estudio de productos naturales*. Fondo Editorial PUCP.
- López, J. (2008). Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos. Pereira.
- López, M. (2012). *Manual de plantas medicinales para Guinea Ecuatorial*. Fundación de Religiosos para la salud (FRS), 7-9.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson educación.

- Márquez, I., Cuellar, A., Martínez, J., Aléman, A., Lora, J., & Vélez, H. (1999). Estudio fitoquímico de la especie *Hibiscus elatus* SW. *Revista Cubana de Farmacia*, 33(2), 127-131.
- Morris, R., & Boyd, R. (1998). *Química orgánica*. México: Edición Addison Wesley Longam.
- Muñetón, P. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Revista unam mx*, Vol, 10 No 9.
- Neil, D. (2010). *Adiciones a la flora del Ecuador*. Quito: Jatun Sacha.
- Parimala, D., & Ramasubramaniraj, R. (2009). Dental Caries and Medicinal Plants. *Journal of Pharmacy Research*, 1669-1675.
- Pérez, A., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 195-211.
- Pérez, I. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Intercultural*, 23-24.
- Rico, M. (2011). Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución: una herramienta fundamental en Química y Biología Estructural. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química No. 1*, 46-57.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. México: Médica Panamericana.
- Rueda, R. (2002). Micosis superficiales y dermatomicosis. *Colombia médica* 2002(33), 10-16.
- Ruiz, C. (2012). *La diversidad biológica en cajamarca. Plantas medicinales*. Peru: CREAT T.S.R.L.
- Ruiz, V., & Moreno, S. (2005). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Seigler, D. (2003). Phytochemistry of *Acacia-sensu lato*. *Biochemistry Sys. Ecol*, 845-873.
- Solgorré, E. (2005). Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Otholobium pubescens* en la hiperglicemia experimental en *Rattus norvegicus* var. *Albinus*. Lima: Tesis para optar al Grado Académico de : Magister en recursos vegetales y terapéuticos.

- Tello, R. (2009). Actividad antibacteriana de plantas con actividad hemaglutinante (obtener el titulo de Químico Farmacobiologo. México: Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Torres, R. (1993). Acción biológica de las furanocumarinas. Colombia: Productos Naturales UNALMED.
- Ulloa, C., & Jorgensen, P. (1995). Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Abya-Yala, 17-56.
- Vázquez, L., & Saltos, N. (2009). Ecuador su realidad. Quito: Artes Gráficas Silva.
- Vidal, D. (2013). Aislamiento y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de la especie *Piper peltatum* L. (Tesis Pregrado). Loja: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Vivot, E., Sánchez, C., Cacik, F., & Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Rios. Scielo, Argentina.
- Willey, J., & Sons, L. (2005). Oxford: Update Software Ltd. Recuperado el 30 de Enero de 2013, de <http://www.update-software>
- Wills, R. (2002). Las plantas medicinales: sabiduría ancestral en el mundo de hoy. EUFIC.

ANEXOS

ANEXO 1

Preparación del revelador

Ácido sulfúrico 5% y vainillina:

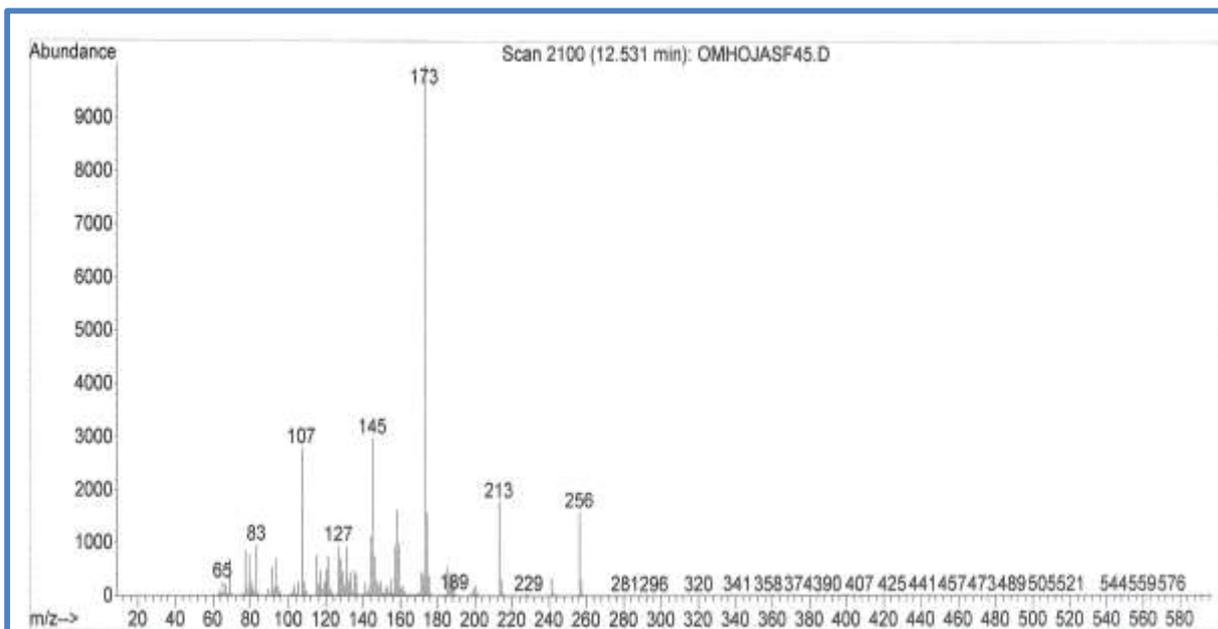
Reactivos	Composición
Ácido sulfúrico	250 mL de etanol
	12,5 mL de ácido sulfúrico
Preparación: Se afora los 12,5mL de ácido sulfúrico con los 250mL de etanol.	

Reactivos	Composición
Vainillina	250 mL de etanol
	2,5 mL de vainillina
Preparación: Se afora los 2,5mL de vainillina con los 250mL de etanol.	

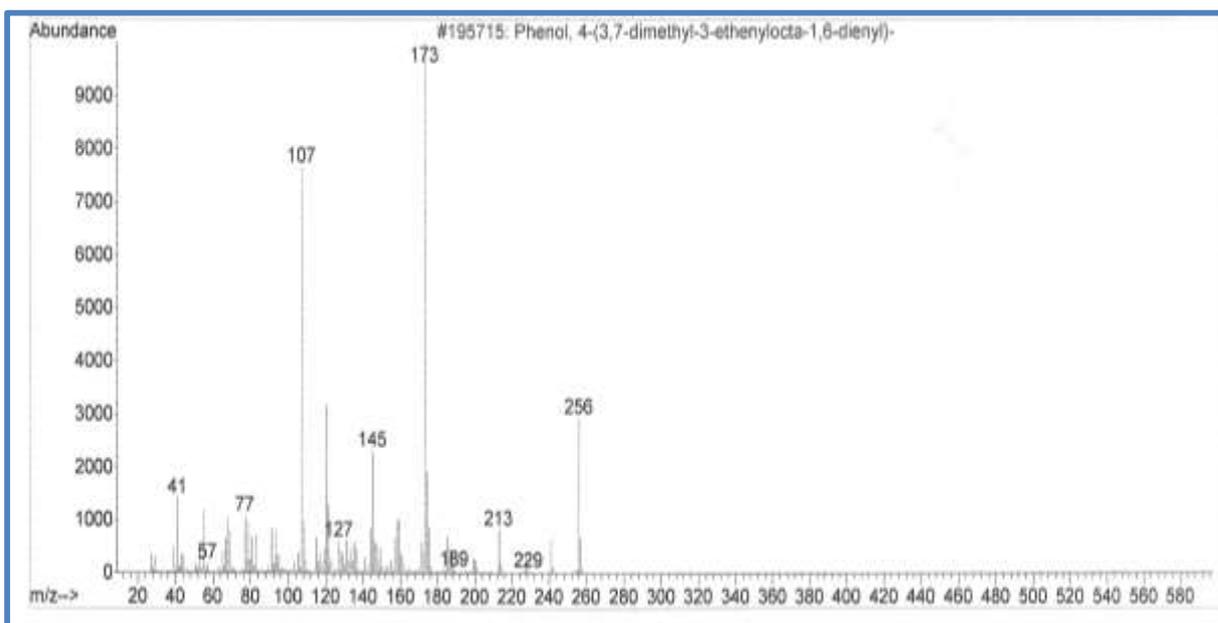
ANEXO 2

Espectros de masas del Bakuchiol identificado por CG-EM en la fracción DF5 (A), comparados con la base de datos del equipo MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.I (B).

A



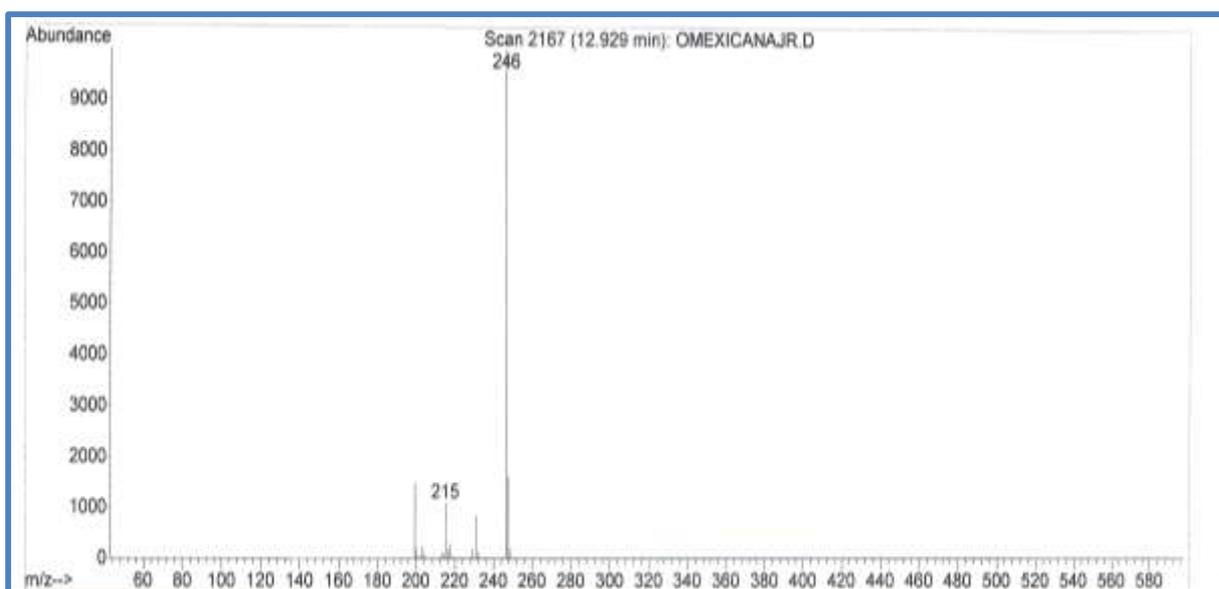
B



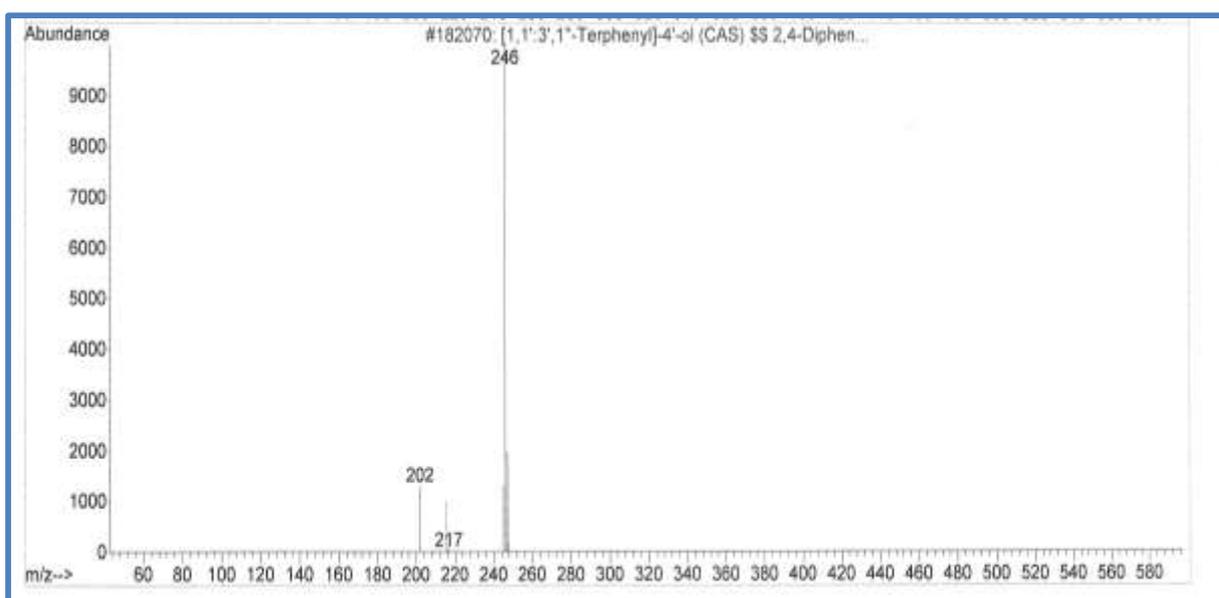
ANEXO 3

Los espectros de masas del [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-ol identificado por CG-EM de la fracción DF13.2 (A) fueron comparados con la base de datos del equipo MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.I (B).

A



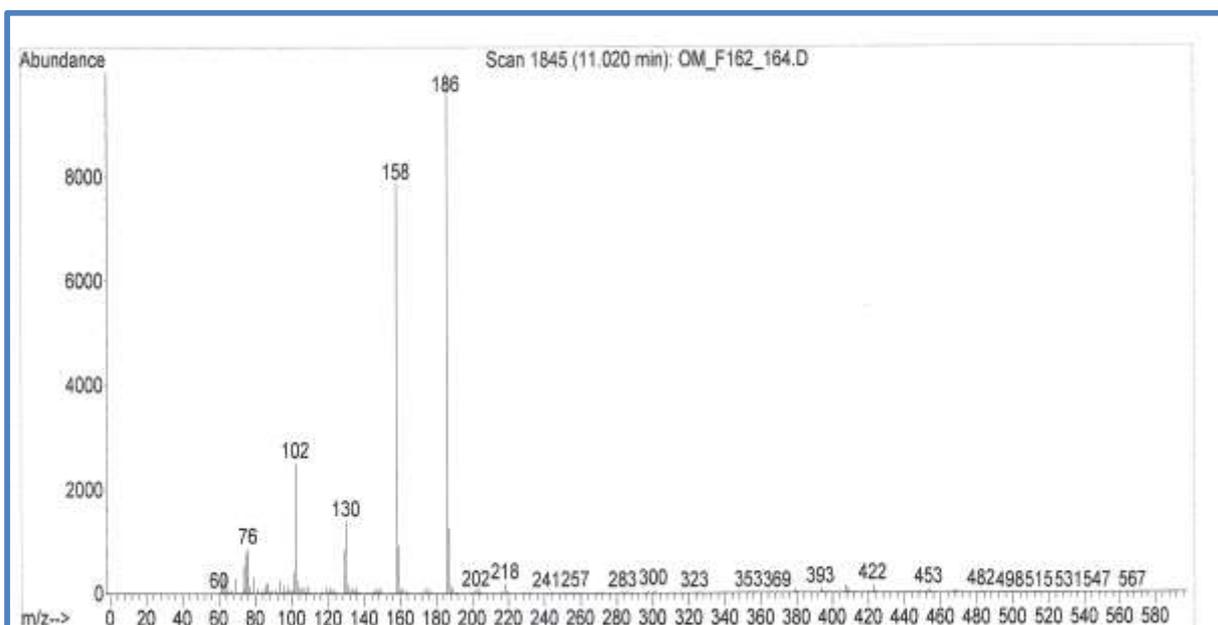
B



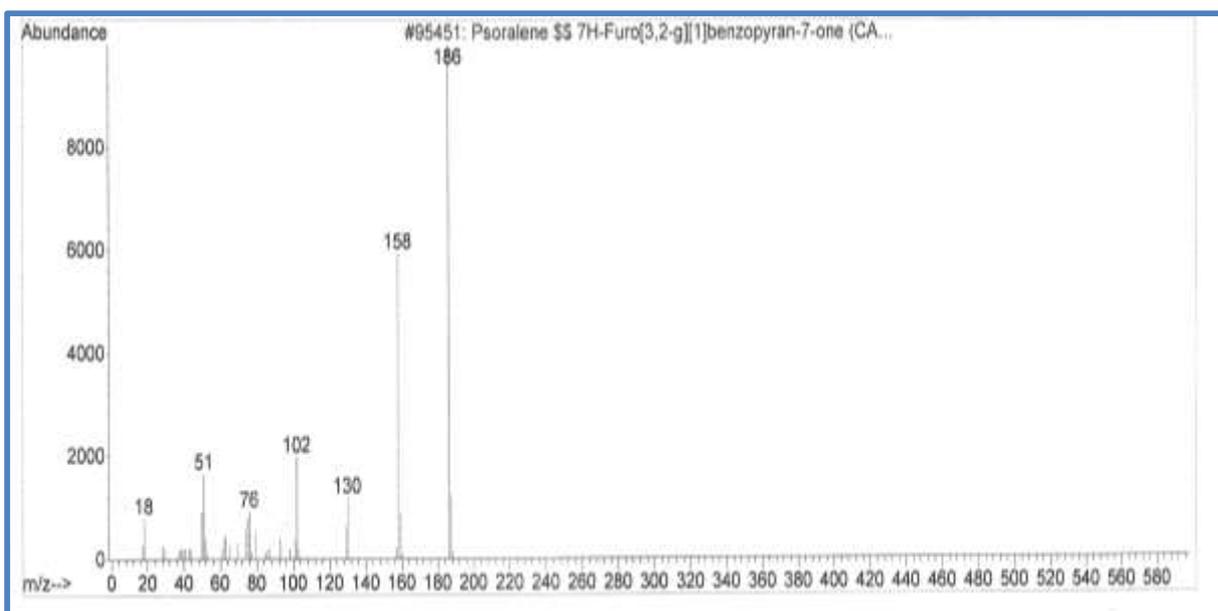
ANEXO 4

Los espectros de masas del Psoraleno identificado por CG-EM en la fracción DF14 (A) fueron comparados con la base de datos del equipo MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.l (B) y con el espectro de la base de datos NIST 2011(C).

A

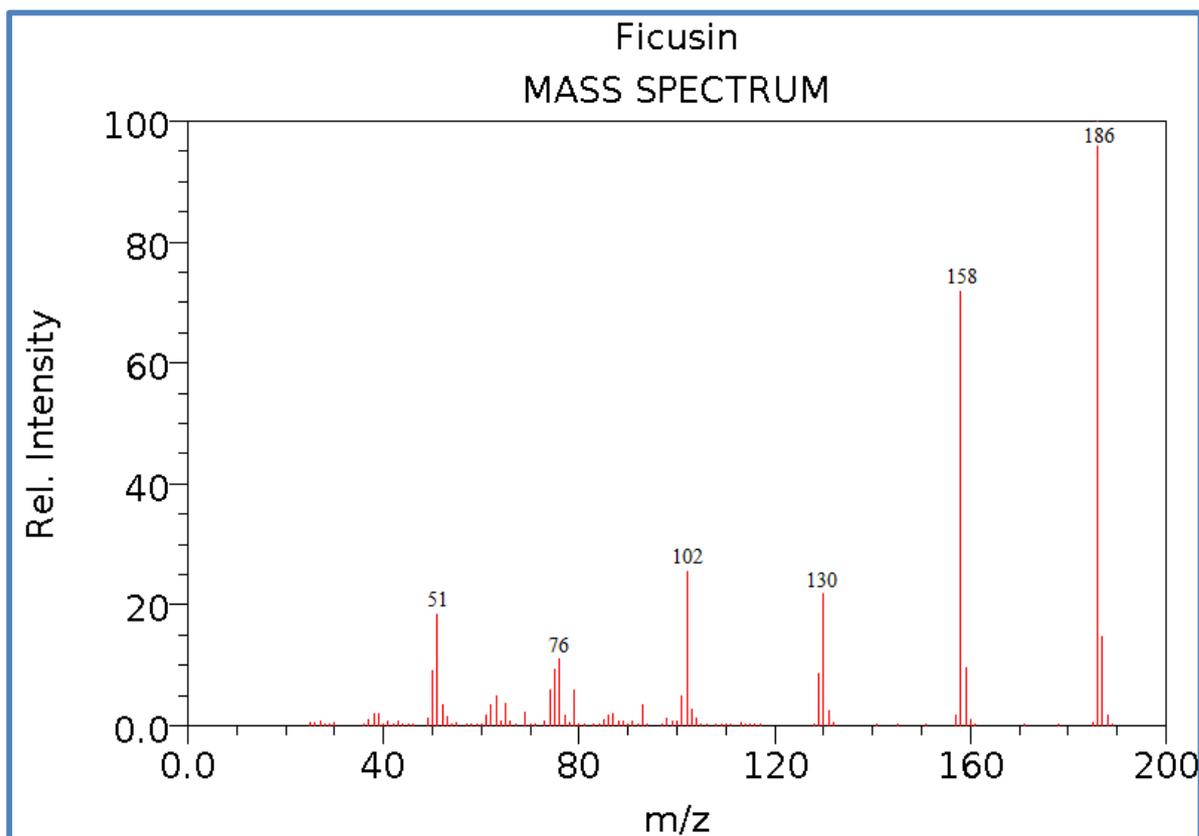


B



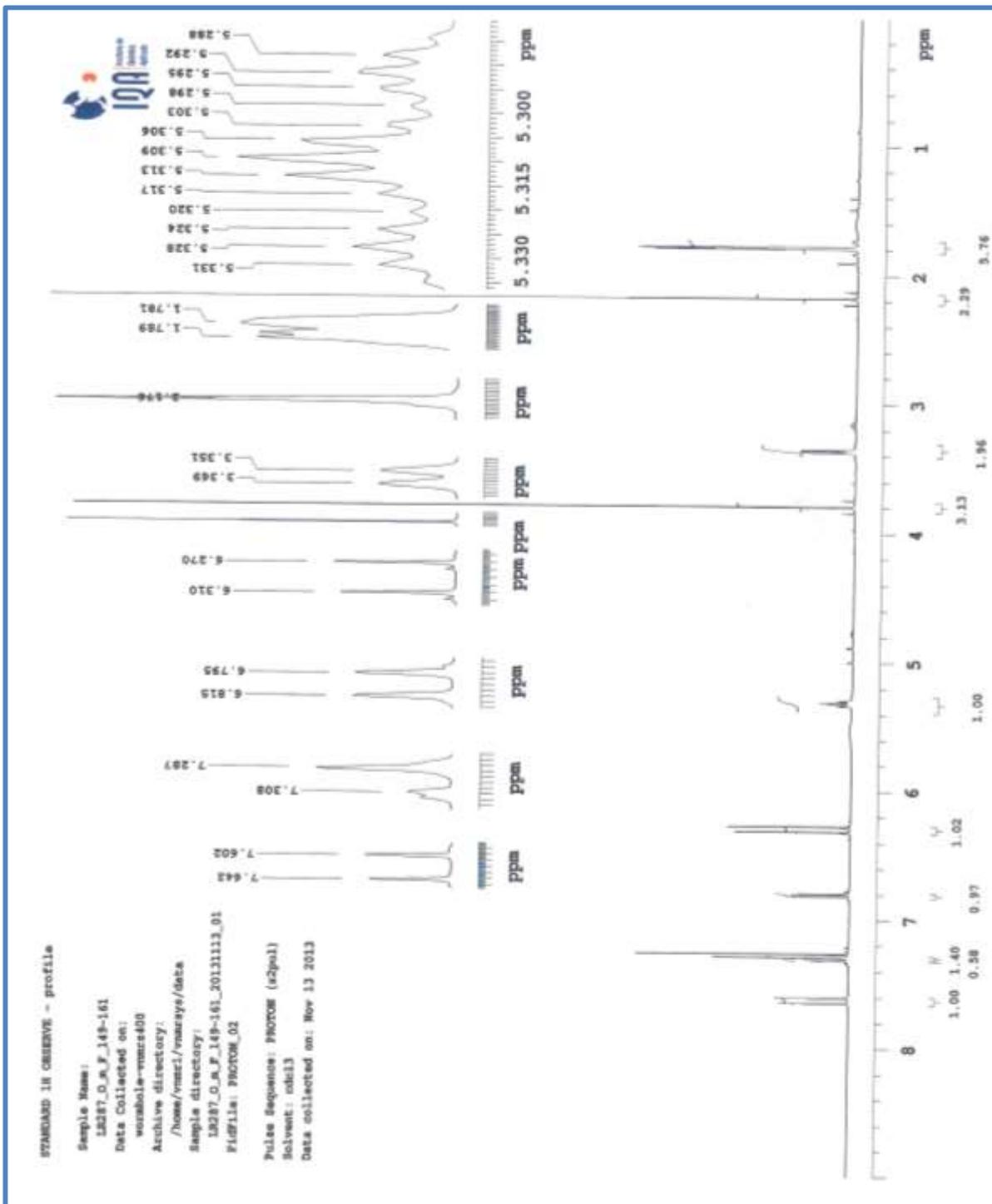
C

Ficusin
MASS SPECTRUM



ANEXO 5

Resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H , del [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-ol.



ANEXO 6

Resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C , del [1,1':3',1''-terphenyl]-4'-ol.

