



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de *Jatropha nudicaulis* con posible actividad antiparasitaria

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Alejandro Cabrera, Stalin Paúl.

DIRECTOR: Romero Benavides, Juan Carlos, Ph.D.

LOJA-ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgr.

Edgar Santiago Ojeda Riascos

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de *Jatropha nudicaulis* con posible actividad antiparasitaria, realizado por Alejandro Cabrera Stalin Paúl, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre del 2017.

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Stalin Paúl Alejandro Cabrera, declaro ser autor del presente trabajo de Titulación: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de *Jatropha nudicaulis* con posible actividad antiparasitaria”, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo el Ph.D. Juan Carlos Romero Benavides 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. 88 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).....

Autor: Alejandro Cabrera Stalin Paúl

Cédula: 1105154973

DEDICATORIA

El presente trabajo le dedico ante todo a Dios, quien es el sabio, dueño y redentor de todo lo existente, y es la base fundamental para todo propósito siendo él quién fomenta todo símbolo de inspiración, fuerza y voluntad para desarrollar sin duda alguna todo lo que nos proponemos sin importar cuan duro sea el camino.

En especial a mis padres Erasmo Alejandro y Orfa Cabrera, quienes son el origen de mi inspiración para seguir adelante, y han sido un pilar fundamental en mi vida, que supieron fomentar en mí valores tan nobles como la responsabilidad, humildad y educación, los mismos que me hicieron crecer como persona hecha y derecha para superar los obstáculos que se presenten a lo largo del camino y culminar esta etapa de mi vida.

A mis hermanos Luis Fernando y Henry Xavier, ya que, con su apoyo incondicional, y sus consejos hicieron que desde niño me forje como persona de bien y que con sacrificio cumpla las metas que me proponga y no me dé por vencido.

Finalmente, a toda mi familia y amigos que desde un inicio pusieron un voto de fe, confianza y me apoyaron en todo momento para que pueda finalizar esta etapa universitaria, la cual es un sueño poder cumplirlo.

AGRADECIMIENTO

Primero y como más importante quiero agradecerte a ti Dios, por cuidarme, bendecirme, darme salud y fortaleza para llegar hasta donde he llegado, porque me diste una familia maravillosa, amigos, y herramientas necesarias para llegar a finalizar tan anhelado sueño.

De igual manera muy agradecido con mis queridos padres y hermanos, que sin importar que se encuentren lejos, supieron apoyarme y hacerme conocer que siempre cuento con ellos, que con sus consejos, ejemplo y palabras de aliento me dieron la fuerza y valentía necesaria para culminar este pequeño escalón de mi vida.

También me gustaría agradecer a mis amigos quienes fueron de gran ayuda y formaron parte de esta etapa universitaria, quienes de alguna forma me dieron a conocer que contaba con su apoyo, me brindaron su amistad y estuvieron ahí conmigo cuando los necesité.

Muy agradecido con el Ph.D. Juan Carlos Romero Benavides por su visión crítica constructiva cotidiana a lo largo de esta etapa para formarme como profesional, quien me brindó sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación, que fue de gran ayuda y me permitió que alcance esta meta con éxito.

Agradezco al Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja, en especial al Bq. Henry Cabrera, Bq. Ronald Silva, Bq. Paola Castillo, Ing. Ivannova Galarza, Ing. Mónica Vega y a la Dra. Alirica Suarez que me brindaron su apoyo y sus conocimientos para la elaboración de este trabajo.

Varias son las personas que formaron parte de mi vida a lo largo de este camino para mi formación profesional a quienes con todo respeto les agradezco por la amistad brindada, consejos y apoyo. Algunas están aquí conmigo, otras a la distancia y otras en mis recuerdos y en mi corazón, en donde se encuentren quiero darles las gracias por todo lo que me han brindado, sus buenas vibras y consejos.

Este proyecto se desarrolló con el financiamiento otorgado por la SENECYT (Código PIC-13-INSPI-005) y por la UTPL Código (PROY_FIN_QUI_0008).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO.....	5
1.1 Fin, propósito y componentes del proyecto	6
1.1.1 Fin del proyecto.....	6
1.1.2 Propósito del Proyecto.....	6
1.1.3 Componentes del Proyecto.....	6
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	7
2.1 Aspectos generales.....	8
2.1.1 Antecedentes y Biodiversidad en el Ecuador	8
2.1.2 Medicina tradicional.....	9
2.1.3 Metabolitos Secundarios	10
2.1.4 Fitoquímica.....	11
2.1.5 Familia Euphorbiaceae, género <i>Jatropha</i> y especie <i>Jatropha nudicaulis</i> ...	12
2.1.5.1 Descripción de la especie <i>Jatropha nudicaulis</i>	14
2.2 Técnicas de aislamiento, identificación y purificación de MS.....	15

2.2.1	Maceracion	16
2.2.2	Cromatografia en columna.....	16
2.2.3	Cromatografia en capa fina.....	17
2.2.4	Punto de Fusión	18
2.2.5	Cromatografia de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) ...	18
2.2.6	Resonancia magnética nuclear (RMN)	19
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS.....		20
3.1	Esquema de trabajo	21
3.2	Obtención y recolección de la especie <i>Jatropha nudicaulis</i>	21
3.2.1	Secado de la materia vegetal	22
3.3	Obtencion de extractos.....	23
3.3.1	Desclorofilacion de extractos.....	23
3.4	Fraccionamiento de los extractos	25
3.4.1	Cromatografia en columna abierta.....	25
3.4.2	Cromatografia en capa fina.....	26
3.5	Limpieza externa de solidos	27
3.6	Caracterización de metabolitos secundarios	28
3.6.1	Punto de fusión.....	28
3.6.2	Solubilidad	28
3.6.3	Factor de retención.....	29
3.6.4	Cromatografia de gases acoplada a espectroscopia de masas	29
3.6.5	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear	30
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES		31
4.1	Rendimiento de los extractos obtenidos	32
4.2	Aislamiento de metabolitos secundarios.....	32
4.2.1	Extracto Hexánico.....	32
4.2.2	Extracto de Acetato de Etilo	38

4.2.2.1 Desclorofilación del extracto de Acetato de Etilo	38
4.2.2.2 Fracción AcOEt_2 del extracto de acetato de etilo desclorofilado	39
4.2.2.3 Fracción MicroAcOEt_7 del extracto de acetato de etilo desclorofilado.....	43
4.2.2.4 Fracción JnAcOEt_9 del extracto de acetato de etilo desclorofilado.....	44
4.2.3 Extracto Metalónico	46
4.2.3.1 Fracción PPMeOH1 del extracto de metanol.....	47
4.2.3.2 Fracción PPMeOH2 del extracto de metanol.....	49
4.2.3.3 Fracción MeOHJn_2 del extracto de metanol.....	50
CONCLUSIONES.....	52
RECOMENDACIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXOS	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ácido Linoleico, Digoxigenina, Jatrofona, Vitexina	1
Figura 2: Esquema de la metodología aplicada.....	1
Figura 3: Sitio de recolección de la especie	2
Figura 4: Secado de bandejas	2
Figura 5: Maceración de la especie vegetal	3
Figura 6: Rotaevaporacion del extracto.....	4
Figura 7: Desclorofilación del extracto de AcOEt	5
Figura 8: Técnica de empleo de cromatografía en capa fina.....	6
Figura 9: Cámara de luz UV.....	27
Figura 10: Purificación	27
Figura 11: Equipo fisher Johns	28
Figura 12: Rf en placa TLC.....	29
Figura 13: Cromatografía en capa fina de la fracción JNHmicro 1	40
Figura 14: Cromatografía en capa fina de la fracción AcOET_2	41
Figura 15: Estructuras de eicosano, heneicosano y éster propílico del ácido palmítico.....	41
Figura 16: Estructura del compuesto éster propílico del ácido palmítico	43
Figura 17: Cromatografía en capa fina de la fracción MicroAcOEt_7	44
Figura 18: Cromatografía en capa fina de la fracción JnAcOEt_9	45
Figura 19: Cromatografía en capa fina de la fracción MeOHJn_2	48
Figura 20: Cromatografía en capa fina de la fracción PPMeOH1	50
Figura 21: Cromatografía en capa fina de la fracción PPMeOH2	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción de la especie <i>Jatropha nudicaulis</i>	15
Tabla 2: Condiciones de operación del equipo CG/EM.....	30
Tabla 3: Peso y porcentaje de los diferentes extractos de la especie <i>Jatropha nudicaulis</i>	32
Tabla 4: Unión de fracciones JN-Hex del extracto de Hexano.....	32
Tabla 5: Unión de fracciones JN-Hex 4 del extracto de Hexano.....	34
Tabla 6: Unión de fracciones JNHmicro del extracto de Hexano.....	35
Tabla 7: Unión de fracciones del extracto hexánico.....	36
Tabla 8: Unión de las fracciones del extracto de acetato de etilo desclorofilado.....	38
Tabla 9: Unión de fracciones D-AcOEt_2 del extracto de acetato de etilo desclorofilado.....	38
Tabla 10: Datos espectroscópicos de ¹ H-RMN (CDCl ₃) del éster propílico del á. palmítico....	41
Tabla 11: Datos espectroscópicos de ¹³ C-RMN (CDCl ₃) del éster propílico del á. palmítico...	41
Tabla 12: Unión de fracciones AcOEt_3 del extracto de acetato de etilo desclorofilado.....	42
Tabla 13: Unión de fracciones AcOEt_7 del extracto de acetato de etilo desclorofilado.....	43
Tabla 14: Unión de fracciones JN-MeOH del extracto metanólico.....	45
Tabla 15: Unión de fracciones MeOHmicro 1-10 del extracto metanólico.....	46
Tabla 16: Unión de fracciones MeOHmicro 4 del extracto metanólico.....	47
Tabla 17: Unión de fracciones U_Metanol del extracto metanólico.....	48

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato De Etilo
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCL ₃	Cloroformo Deuterado
CG/EM	Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear
DO ₂	Agua Deuterada
Hex	Hexano
IR	Índice de retención
MeOH	Metanol
MS	Metabolito secundario
Pf	Punto de Fusión
R _f	Factor de Retención
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbón
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
t _R	Tiempo de retención

RESUMEN

Jatropha nudicaulis es una especie endémica del Ecuador, se recolectaron las partes aéreas, en el cantón Catamayo en la provincia de Loja, Ecuador. Se obtuvieron tres extractos con disolventes: Hexano, Acetato de etilo y metanol, el extracto con mayor rendimiento fue el extracto de metanol con 7.90%, y el extracto con menor rendimiento fue el extracto de acetato de etilo con 1.90%. Los tres extractos fueron cromatografiados en columna abierta; del extracto de acetato de etilo desclorofilado se obtuvo una mezcla de 3 compuestos que fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas como RMN, CG-EM y corroborado con literatura, los cuales fueron identificados como (1) eicosano, (2) heneicosano y (3) éster propílico del ácido palmítico; del extracto metanólico se obtuvo un compuesto puro de peso molecular 218 g/mol que mostró un sólo pico en CG/EM y una sola mancha en cromatografía líquida (TLC), con punto de fusión 210-211 °C y soluble en acetona que probablemente sea decil benceno.

Palabras clave: *Jatropha nudicaulis*, eicosano, heneicosano, éster propílico.

ABSTRACT

Jatropha nudicaulis is a species endemic of Ecuador, the aerial parts were collected, in the Catamayo canton in the province of Loja, Ecuador. Three extracts were obtained with solvents: hexane, ethyl acetate and methanol, the extract with the highest yield was the methanol extract of with 7.90%, and the extract with lower performance was the ethyl acetate extract with 1.90%. The three extracts were chromatographed on an open column; of the extract of ethyl acetate unchlorinated obtained a mixture of 3 compounds that were identified by spectroscopic techniques as NMR, GC-MS and corroborated with literature, which were identified as: (1) eicosano, (2) heneicosano, and (3) propyl ester of palmitic acid; of the methanolic extract obtained a pure compound of molecular weight 218 g/mol molecular weight compound which showed a single in GC/MS and a single spot in liquid chromatography (TLC), with melting point 210-211°C and soluble in acetone which is probably benzene decyl.

Key words: *Jatropha nudicaulis*, eicosane, heneicosane, propyl ester.

INTRODUCCIÓN

Jatropha nudicaulis es una especie de la familia Euphorbiaceae, es endémica del Ecuador. Su hábitat natural es seco subtropical o tropical matorral (Jørgensen & León-Yáñez., 2000).

La familia Euphorbiaceae es una familia cosmopolita extensa y diversa en la zona tropical con 317 géneros y alrededor de 8000 especies (Neira L., et al. 2014), se caracterizan primordialmente por presentar típicamente un látex o exudado coloreado, estípulas, esta familia también se encuentra distribuida en zonas subtropicales y templadas. Algunas plantas de esta familia se asemejan a los cactus (Torres L., et al. 2008).

En un estudio realizado a nivel nacional en Ecuador se determinó que la zona de influencia donde existe la especie vegetal *Jatropha nudicaulis* es en la región sur del Ecuador (León-Yáñez S., et al. 2011).

Las plantas sintetizan compuestos bioactivos que podrían ser de utilidad para el mejoramiento de la salud de seres vivos: humanos, animales marinos, silvestres y domésticos. Dichas sustancias son el producto del metabolismo secundario de las plantas. Por lo general suelen encontrarse en gran abundancia en partes aéreas, como en sus hojas, también se puede encontrar en tallos y raíces. Por lo que son utilizadas en la medicina tradicional, medicina general, elaboración de fármacos, cosméticos y hasta en gastronomía (Cosme P., 2008).

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) es utilizada tradicionalmente por la comunidad africana oriental (CAO) como antihelmíntico contra *Haemonchus contortus*, que es un helminto propio de rumiantes el cual provoca una elevada tasa de mortalidad en ovejas y cabras a nivel del continente africano. A demás los extractos acuosos e hidroalcohólicos tienen actividad antiparasitaria contra la formación de embriones en los huevos, atribuidos a la presencia del monoterpene ascaridole, así como también de polifenoles (Quesada L., et al. 2009). Hasta la actualidad no se han desarrollado proyectos ni estudios fitoquímicos de *Jatropha nudicaulis*, por lo que es de interés en el Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL.

Este proyecto de fin de carrera es parte del Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador (PROPAD) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación en salud Pública (INSPI), que cuenta con el

financiamiento de la SENESCYT y está siendo desarrollado en colaboración entre el INSPI, la Universidad Central del Ecuador (UCE) y la UTPL dentro del proyecto resistencia antiparasitaria y perspectivas del uso de extractos de plantas nativas en ensayos preclínicos, pretendemos la obtención, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios con posible actividad antiparasitaria de *Jatropha nudicaulis* y posteriormente en una segunda fase se realizará en el INSPI la evaluación de la actividad antiparasitaria tanto de extractos como de los MS aislados en mayor proporción.

1 CAPÍTULO I FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 Fin, propósito y componentes del proyecto

1.1.1 Fin del proyecto

Aportar con el estudio de metabolitos secundarios que están presentes en especies nativas del sur del país y su posible actividad antiparasitaria.

1.1.2 Propósito del Proyecto

Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de *Jatropha nudicaulis* con posible actividad antiparasitaria.

1.1.3 Componentes del Proyecto

- Selección y recolección de especie vegetal.
- Obtención de extractos de hexano, acetato de etilo y metanol.
- Fraccionamiento de extractos mediante cromatografía en columna abierta.
- Purificación, caracterización e identificación de los metabolitos secundarios.

2 CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 Aspectos generales

2.1.1 Antecedentes y Biodiversidad en el Ecuador

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo atrás, se empezó con la clasificación escrita de plantas endémicas del Ecuador con la publicación del Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador (León-Yáñez S., et al. 2011).

Sin embargo, en la región sur del Ecuador su flora está catalogada entre una de las más ricas y diversas a nivel mundial, conformada por una amplia variedad de tipos de vegetación que va conforme a los diversos climas que se encuentran en la misma. Esta región ha sido explorada por científicos durante más de tres siglos y aún no ha sido explorada en su totalidad gracias a la inmensa diversidad de flora que existe en esta región (Madsen J., et al. 2002).

En el Ecuador existen aproximadamente alrededor de 4011 especies endémicas, lo cual es equivalente al 26% de la flora nativa (León-Yáñez S., et al. 2011). En el sur del país el Parque Nacional Podocarpus, que se encuentra ubicado entre las provincias de Loja y Zamora-Chinchipe, posee 211 especies endémicas, con 99 especies exclusivas de esta área (Karakas I., et al. 2012). Lo cual representa el número más alto de endemismo de todas las áreas protegidas del Ecuador.

A través de un análisis taxonómico, el empleo de las especies no está distribuido de manera regular entre las familias, como se atribuye a Fabaceae, Asteraceae y Rubiaceae las cuales poseen más de 200 especies útiles cada familia. Las familias como Meliaceae, Arecaceae, Rosaceae son de gran importancia puesto a que alrededor del 80% de sus especies se utilizan para uno o varios propósitos alimenticios, ornamentales entre otros, mientras que la familia Euphorbiaceae es un caso particular debido a que tiene gran diversidad de usos como son: ornamental, medicinal y económico ya que algunas de sus especies poseen látex y caucho (Marles R., et al. 2008).

En la provincia de Loja, Ecuador; hay zonas propicias e ideales para el cultivo y reproducción de la especie vegetal *Jatropha*, entre las principales especies que crecen en esta zona están la especie *Jatropha curcas* y *Jatropha nudicaulis*, las distribuciones de estas especies se encuentran ubicadas en zonas centrales de sectores cubiertos por bosque seco, específicamente en los cantones Zamora, Catamayo y Saraguro, ya que

estas zonas poseen una altitud media sobre el nivel del mar. (Plan de Ordenamiento territorial del Honorable Consejo Provincial de Loja. Dirección de Planificación. Loja Ecuador 2007).

2.1.2 Medicina tradicional

En gran parte de las regiones del mundo la medicina tradicional se ha practicado desde hace cientos de años, y hasta en la actualidad se puede encontrar zonas o regiones en donde los habitantes y pueblos indígenas todavía la practican para el mejoramiento de su salud (Hassan R., et al. 2012). La medicina ancestral está fundamentada principalmente en productos naturales como por ejemplo el caso de sabia de las hojas de muchas plantas con poderes medicinales y curativos, así como también sus semillas, hojas, frutos, pulpa y en algunos casos se emplea la totalidad de la planta, se pueden emplear por las personas solas o en conjunto con otros productos naturales con el fin de encontrar mejoría y sanar sus dolencias (Naranjo P., et al. 1995).

La nueva medicina o medicina moderna, no debe dejar de lado la medicina tradicional o ancestral, la cual debe ser un punto donde concurren de manera consumada todos los viejos y nuevos conocimientos impulsando una visión integral de la salud, en donde converjan el equilibrio espiritual, ambiental, social, mental y físico del hombre (Hassan R., et al. 2012).

La medicina tradicional, en el Ecuador tiene orígenes históricos las cuales se data hace 10 mil años atrás en el tiempo, donde su estancia se ha hecho meritoria a lo largo de sus posteriores siglos de colonia española y vida republicana. La que ha sido sostenida en complacer las necesidades y cosmovisiones de los diferentes pueblos necesitados del Ecuador, así se han alimentado con su esencia; indios, mestizos, montubios, campesinos, etnias y un sin fin de personas que han encontrado en ella una alternativa menos costosa, de fácil acceso y gran utilidad (Cabieses F., et al. 1998).

Ecuador es un país en donde se dispone de un inmenso conocimiento en lo que tiene ver con el uso de plantas medicinales gracias al saber ancestral que generación tras generación se ha venido forjando, formando y traspasando este conocimiento de gran utilidad curativa y médica. Hasta el momento se tiene conocimiento que existen aproximadamente unas 4011 especies de plantas (León-Yáñez S., et al. 2011),

pertenecientes a alrededor de 206 familias las que son usadas con fin medicinal (Hassan R., et al. 2012).

Por lo general las especies de *Jatropha* como son: *berlandieri*, *podagrica*, *nudicaulis* y *curcas*, son plantas ornamentales llamadas “ogiri oke” que significa “montaje en pared” en reconocimiento a su uso común como plantas decorativas y a su vez como limitantes debido a que marcaban límites territoriales. Aparte de eso, en África, Asia e incluso América Latina se utilizan en la medicina tradicional contra diversas enfermedades como: fiebre, reumatismo (Murganathan G., et al. 2012), parásitos (Fagbenro-Beyioku, 1998), diarrea (Mujumdar A., et al. 2001), efectos citopáticos inducidos por el VIH (Buitrón X., 1999).

2.1.3 Metabolitos Secundarios

El metabolismo secundario se define posiblemente como la transformación, biosíntesis, y la degradación de compuestos endógenos a través de proteínas de especialización, las cuales son el resultado de los diversos procesos de diferenciación, los que se organizan y clasifican según su significado biológico y función en la célula productora (Valdés & Balbín, 2000).

Según la definición en el marco ecológico propuesta por (Strasburger E., et al. 1994), estos compuestos son sustancias ecológicamente eficaces, delante a compuestos primarios que serían sustancias fisiológicamente eficaces.

Los metabolitos secundarios (MS) se acumulan en grandes cantidades en las células vegetales o pueden ser expulsados fuera de estas; son compuestos orgánicos que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo (García D., 2004).

Los MS además de no presentar alguna función determinada en procesos como: fotosíntesis; asimilación de nutrientes; respiratorios: síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, se diferencian también de los metabolitos primarios en que algunos grupos poseen una distribución limitada en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios están en todas las familias de plantas. Su síntesis no se da de forma general, encontrándose a menudo su producción limitada a un determinado género de plantas, a una familia, o inclusive a varias especies (García A., et al. 2009).

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por heridas, ataque de insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano, como parte de la protección química, las plantas utilizan la producción de MS con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros (Croteau R., et al. 2000).

Los MS son compuestos de bajo peso molecular que tienen gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como el establecimiento de simbiosis con otros organismos; una síntesis activa de MS se induce de varias formas, como por ejemplo cuando las plantas son puestas a condiciones desfavorable tales como: el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), ataque por microorganismos (virus, bacterias y hongos) o también pueden ser producidos por cultivos in vitro de células vegetales (Ávalos A., et al. 2009).

Se conocen más de 25.000 metabolitos secundarios, más de 8000 compuestos fenólicos, alrededor de 12.000 alcaloides y aproximadamente 9000 flavonoides (Neyoy C., 2012). Dependiendo de su composición química se clasifican en dos grandes grupos que son los nitrogenados y no nitrogenados. Los (MS) nitrogenados incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianógenos y glucosinolatos. Los (MS) no nitrogenados incluyen a terpenoides, poli acetilenos, policetidos y fenil propanoides. (Ávalos A., et al. 2009).

2.1.4 Fitoquímica

La Fitoquímica es orientada al análisis y determinación de metabolitos secundarios en especies vegetales, tiene como objetivo el aislamiento, análisis, elucidación y purificación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por estas especies vegetales las cuales pueden ser de índole medicinal, asociadas a propiedades como: actividad antitumoral, antihelmíntica, antiparasitaria y antibacteriana (Villavicencio O., et al. 2012).

La palabra “Fitoquímica” viene de prefijo griego “Phyto” que significa PLANTA y Química, significa entonces “COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS PLANTAS”. (Barnola P., et al. 2013). La Fitoquímica se refiere a los métodos de obtención de componentes activos (MS)

que se encuentran en las especies vegetales, su clasificación de acuerdo al grupo funcional químico orgánico al que pertenece y estudia los métodos analíticos para comprobar su calidad, a través de fluorescencias en las mismas, desarrollados en equipos especializados (UV) para observar su coloración y también mediante métodos como: RMN, CG/EM, CC y CCF; gracias a estos análisis fitoquímicos se han identificado gran variedad de compuestos químicos como son taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas, etc. (Villavicencio O., et al. 2012).

2.1.5 Familia Euphorbiaceae, género *Jatropha* y especie *Jatropha nudicaulis*

La familia *Euphorbiaceae* es una familia cosmopolita que ha sido reconocida a nivel mundial como una de las familias más extensas y cuestionable de las Angiospermas, con más de 300 géneros y más de 7.500 especies, la mayoría de ellas presentes en el continente americano y en África tropical. El nivel de variación morfológico de la familia es inmensamente grande y por lo tanto es muy complicado de caracterizar, hecho que ha sugerido que las especies de ésta tengan un origen polifilético (Strasburger E., 1986).

La utilización de esta familia tiene fines curativos, la cual exige un conocimiento exhaustivo de los metabolitos que esta familia posee. Esto ha sido motivo para que el campo médico, químico y farmacéutico los científicos se hayan interesado en conocer la composición química de esta familia y algunas actividades biológicas (Marticorena C., 1998). Estudios realizados sobre la familia Euphorbiaceae han dado como resultado la identificación de más de 200 compuestos químicos, los más relevantes son de tipo flavonoide, ácidos grasos, ácidos orgánicos, cumarinas, terpenoides, esteroides (Cao C., et al. 2008). Gran variedad de euforbiáceas posee látex que tiene caucho, taninos, resinas, aceites, y sustancias gomosas. Sin embargo, en ocasiones el látex puede ser venenoso y muy irritante. A dicha familia pertenecen algunas plantas muy familiares como: el ricino (*Ricinus communis*) el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), la yuca (*Manihot utilissima*), y la patora, corona del Inca (*Euphorbia pulcherrima*) (Marticorena C., 1998).

Del género *Jatropha* se conocen alrededor de 186 especies alrededor del mundo (Reddy M., et al. 2013). Estudios de plantas del género *Jatropha* han sido desarrollados como una alternativa óptima para la producción de biodiesel a partir del aceite extraído de sus semillas, las mismas que se caracterizan particularmente por crecer en condiciones climáticas no tan favorables. Existen estudios donde se menciona que la toxicidad de las

semillas de *Jatropha*, se atribuye primordialmente a la presencia de forbol-ésteres (diterpenoides) (King A., et al. 2009).

Hasta la actualidad no hemos encontrado estudios fitoquímicos o investigaciones sobre metabolitos secundarios aislados e identificados de la especie *Jatropha nudicaulis*, por lo que para este estudio se ha tomado información relevante de artículos científicos, investigaciones, y proyectos ya realizados de metabolitos secundarios aislados a partir de especies del mismo género como son: *J. curcas*, *J. cuneata*, *J. gossypifolia* (Reddy M., et al. 2013).

Una de las especies más relevantes del género *Jatropha* es *curcas*, esta tiene una utilidad multipropósito, resistente a sequía, con capacidad para crecer en suelos marginales e importancia por su uso industrial y medicinal (Makkar H., et al. 2007), ha sido ampliamente estudiada y se ha considerado como una planta prometedora para la obtención de biodiesel, donde en la extracción de aceite a partir de su semilla el cual contiene el 21% de ácidos grasos saturados y 79% de ácidos grasos insaturados, principalmente ácido linoleico (**a**) (Ver figura 1). En donde la mayor parte de su actividad biológica se correlaciona con el mejoramiento del metabolismo energético y reducción del apetito. (Reddy M., et al. 2013).

Jatropha cuneata es otra especie del género *Jatropha*, según estudios desarrollados en extractos de esta planta, se le atribuye una alta cantidad de saponinas como digoxigenina (**b**) (Figura 1), la misma que es un hapteno con alta antigenicidad (Riuz E., et al. 2009).

Jatropha gossypifolia se suma a la lista de especies del género *Jatropha* y estudios fitoquímicos realizados sobre esta especie muestran que partes aéreas de esta planta poseen diterpenos como jatrofona (**c**); la Jatrofona ejerce una actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* (Chávez G., et al. 2009), en sus hojas abundan flavonoides C-glicósidos tales como vitexina (**d**) cual tiene una propiedad antioxidante (Pongpan N., et al. 2007). En esta especie vegetal se utilizaron extractos de etanol, metanol y acetato de etilo, este último extracto fue el que obtuvo mayor rendimiento, del cual se observó la presencia de la mayor cantidad de MS como: ácidos grasos, azúcares, alcaloides, cumarinas, saponinas, taninos y terpenoides (Das B., et al. 2001).

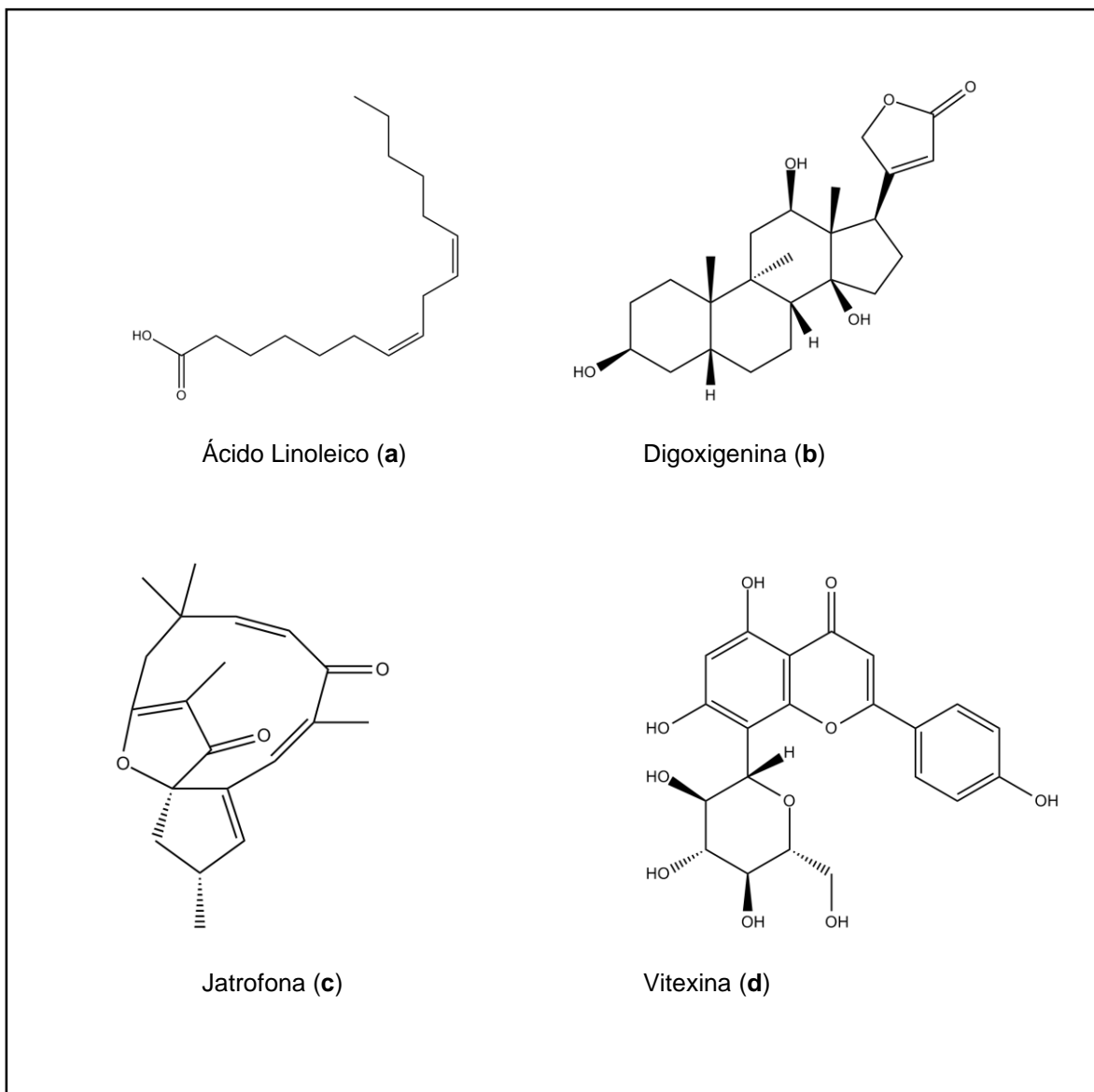


Figura 1. MS aislados a partir de especies vegetales del genero *Jatropha*

Fuente: Reddy M., et al. 2013; Riuz E., et al. 2009; Chávez G., et al. 2009 y Pongpan N., et al. 2007

Elaboración: El autor


2.1.5.1 Descripción de la especie *Jatropha nudicaulis*

Jatropha nudicaulis, es un arbusto cuyo tamaño oscila entre 1-4m, es endémico de los Andes del sur del Ecuador. Su hábitat natural son zonas de arbustos secos tropicales o subtropicales. Esta especie vegetal se encuentra situada en la provincia de Loja en cantones como Catamayo, Saraguro y Zamora, la misma que en la antigüedad era

utilizada como cerramiento para huertos, sin darle uso alguno en medicina ancestral (Santana J., et al. 2004).

En la tabla 1 se muestra la descripción de la especie vegetal *Jatropha nudicaulis*.

Tabla 1: Descripción de la especie *Jatropha nudicaulis*

Nombre científico	<i>Jatropha nudicaulis</i>	
Reino	Plantae	
Phylum	Magnoliophyta	
Clase	Magnoliopsida	
Orden	Malpighiales	
Familia	Euphorbiaceae	
Genero	<i>Jatropha</i>	
Especie	<i>Nudicaulis</i>	

Fuente: Trópicos

Elaboración: El autor

2.2 Técnicas de aislamiento, identificación y purificación de metabolitos secundarios

Uno de los aspectos más importantes que se debe tener en cuenta en el aislamiento, identificación y purificación de MS es garantizar altos rendimientos del material vegetal con un elevado porcentaje de principios activos, en donde se debe considerar como aspectos primordiales lo siguiente: selección y recolección de la materia vegetal, factores post cosecha (secado, maceración y almacenaje); a su vez los métodos de purificación que por lo general se utilizan son: filtración, decantación, destilación, cromatografía. Las técnicas de identificación de compuestos orgánicos de mayor uso son: Espectroscópicas como: luz UV, Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM), Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H , ^{13}C), y físicas como: IR (índice de retención), tiempo de retención (t_R), Punto de fusión (Pf), Cromatografía en capa fina (CCF), factor de retención (R_f). (Araujo P., et al. 2013).

Las condiciones de recolección y procesamiento de la materia vegetal influyen directamente en la cantidad final de metabolitos secundarios obtenidos de la especie

vegetal. Hay que tener muy en cuenta la parte de la planta a cosechar y la época estacionaria de cosecha (Chife C., 2005).

2.2.1 Maceración

La maceración es una correlación “sólido-líquido” que consiste en poner en contacto por un periodo prolongado de tiempo la materia vegetal de interés con el disolvente o solvente de extracción, para así tratar de extraer todos los compuestos presentes en esta materia prima vegetal, circulando a través en todas las direcciones en su totalidad y disolviendo sus principios activos hasta lograr una concentración en equilibrio con el contenido celular (Shelles F., 1992).

Este es el procedimiento de extracción más sencillo y simple, este proceso se lo coloca bajo protección solar, es decir que no exista contacto directo con la luz solar, para así evitar posibles reacciones y debe ser constantemente sometido a agitación alrededor de 3 veces al día; El tiempo de maceración es variable dependiendo, de la especie vegetal a tratar, disolventes a utilizar y propósito al cual se desea llegar, las distintas Farmacopeas prescriben un tiempo que oscila entre cuatro a diez días. A partir de este procedimiento o método no se consigue el agotamiento de las sustancias extraídas. “Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo (disolvente) y la especie vegetal, será mayoritariamente favorable su rendimiento” (Voigt R., 1982).

2.2.2 Cromatografía en columna (CC)

Es una técnica de purificación, que permite aislar los compuestos deseados de una mezcla a escala preparativa. Todas las cromatografías denominadas en columna se caracterizan por tener una fase estacionaria, en donde por lo general se usa gel de sílice o alúmina que se encuentra dentro de una columna de vidrio de 5 a 30 mm de diámetro por la cual se hace correr una fase móvil líquida que estará en permanente movimiento denominada eluyente o fase móvil la cual es propicia para una excelente separación de mezclas y/o compuestos. Según la afinidad de las moléculas por la fase móvil o la estacionaria, éstas se separan por efecto de la gravedad o a su vez por la aplicación de presión como puede ser la utilización de bombas de aire o de vacío (Rocha L., 2000).

Los MS son arrastrados gracias al eluyente que corre en su fase móvil y va a lo largo de la columna de sílice, los compuestos separados en CC pueden presentar color, el progreso de la separación se puede monitorizar visualmente. No obstante, regularmente los compuestos que deben ser aislados suelen ser incoloros; en este caso, se recogen secuencialmente pequeñas fracciones de eluatos que pueden ser de 5 a 10 ml en columna 30 mm de diámetro y 1 ml en micro columnas de 5 mm, se los debe colocar en tubos rotulados y la composición de cada fracción recogida se analiza mediante cromatografía en capa fina (CCF). Una vez identificadas las diferentes fracciones que poseen el mismo resultado, se únen, se elimina el disolvente y se analiza la identificación de los componentes mediante métodos espectroscópicos (Rocha L., 2000).

2.2.3 Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina (en inglés **Thin Layer Chromatography** o TLC) es una técnica de separación de compuestos rápida y sencilla que por lo general se la utiliza en los laboratorios de Química Orgánica. Esta técnica posee una fase estacionaria que se basa en un sólido y una fase móvil que es líquida, la fase estacionaria será un componente polar y el eluyente por lo general tiene una polaridad menor que la fase estacionaria, de manera que los componentes que sean menos polares tienden a desplazarse con mayor velocidad (Pérez C., 2000).

Este método de separación emplea una placa que se encuentra recubierta con el adsorbente (fase estacionaria) en forma de una lámina delgada, con espesor constante, adherida sobre una base rígida, que puede ser una placa de aluminio, vidrio, o poliéster. Hay adsorbentes que poseen un indicador de fluorescencia para facilitar la identificación de las muestras. Si en el caso que no se utilice algún indicador o revelador y los componentes no son coloridos, necesariamente se requerirá otras técnicas de revelado como por ejemplo indicadores fluorescentes en las placas, bajo una lámpara de luz UV (Tesso H., 2005).

Por CCF se puede determinar la efectividad de una etapa de purificación al comparar muestras. Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren de diferente forma entonces no son los mismos compuestos. Se basa en colocar la muestra a analizar cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta con una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). La

lámina se coloca en un recipiente cerrado el cual contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil) en diferentes polaridades. A medida que esta mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente (TLC), se producen “manchas” de los compuestos, las mismas que representan un reparto diferencial de los compuestos o sustancias presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente. El grado de elución de cada una de las sustancias depende tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado (Santos S., 2011).

2.2.4 Punto de Fusión (Pf)

El punto de fusión desde un punto de vista práctico se lo define como la temperatura a la cual un sólido se convierte en líquido, la temperatura a la que un sólido empieza a fundir debe mantenerse constante hasta que todo el sólido y el estado líquido de la sustancia están en equilibrio, una en presencia de la otra. Para que esto suceda es necesario que las fuerzas intermoleculares que mantienen cohesionadas las moléculas en una estructura cristalina se rompan y por tanto su determinación dependerá del balance de las diferentes fuerzas intermoleculares. Además, se debe tomar en cuenta que la presencia de impurezas, así sean estas en pequeñas cantidades, provocará una disminución del punto de fusión (Pf), acompañado generalmente de un incremento del intervalo en que funde, por lo cual se considera como otra utilidad de la medida del punto de fusión como criterio de pureza de un determinado compuesto (Jaramillo O., 2007).

2.2.5 Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas CG/EM.

La cromatografía de gases (CG) es una técnica separativa la cual permite la separación de mezclas muy complejas, sean compuestos orgánicos volátiles o semi volátiles que sean técnicamente estables. Dada una vez su separación, incluso su cuantificación y detección de cada uno de los componentes en forma individual de una muestra de interés, el único dato del que se basa para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Por otra parte, la espectrometría de masas (EM) por lo general identifica de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero por lo general no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin previa separación de cada uno de sus componentes, debido a la gran

complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente (McNair H., et al. 1997).

La co-relación de estas dos técnicas acopladas, (CG/EM) permite la separación e identificación de mezclas complejas y de cualquier tipo de compuestos volátiles presentes. La separación de las sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias de interés entre las fases móvil y estacionaria que conforman el sistema. Una vez que han sido separadas las sustancias son fragmentadas y analizadas en cuanto a su patrón de fragmentación, el que puede ser comparado con información pre existente en una base de datos de espectros de masas para su identificación preliminar, además se necesita una mínima cantidad muestra para su respectivo análisis (Gutiérrez M., et al. 2002).

2.2.6 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN es el método espectroscópico más utilizado para determinar la estructura molecular en disolución en líquidos puros y gases. Es la técnica que proporciona mayor información estructural, esto debido a que se observan los núcleos de los átomos y se puede conocer la influencia de cada estructura molecular sobre cada uno de los átomos. Los átomos que se encuentran mayoritariamente son ^1H , ^{13}C , además se pueden observar algunos otros átomos como ^{19}F y ^{31}P , siempre que exista una cantidad suficiente en función a la sensibilidad de cada uno de ellos, del isótopo magnéticamente activo. En el hidrogeno el isótopo más abundante y que es observable es el ^1H , así como para el carbono, el isótopo que se observa es el ^{13}C , mientras que el más abundante, ^{12}C , es magnéticamente inactivo. Para los átomos más relevantes entre las biomoléculas los isótopos magnéticamente activos que se pueden observar son ^{15}N y ^{31}P (Medare M., et al. 2012).

Esta técnica espectroscópica puede emplearse sólo para análisis de núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones. Relativamente esta situación se da en los átomos de ^1H , ^{13}C . Ya que este modelo de núcleos posee “espín” es decir son magnéticamente activos, semejante al de los electrones, debido a que los núcleos poseen carga positiva (+) y ejecutan un movimiento de rotación sobre un eje el que superpone su comportamiento similar a pequeños imanes (Pardo C., 2007).

3 CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Esquema de trabajo

En la figura 2 se observa la metodología que se aplicó para el desarrollo de este trabajo investigativo.

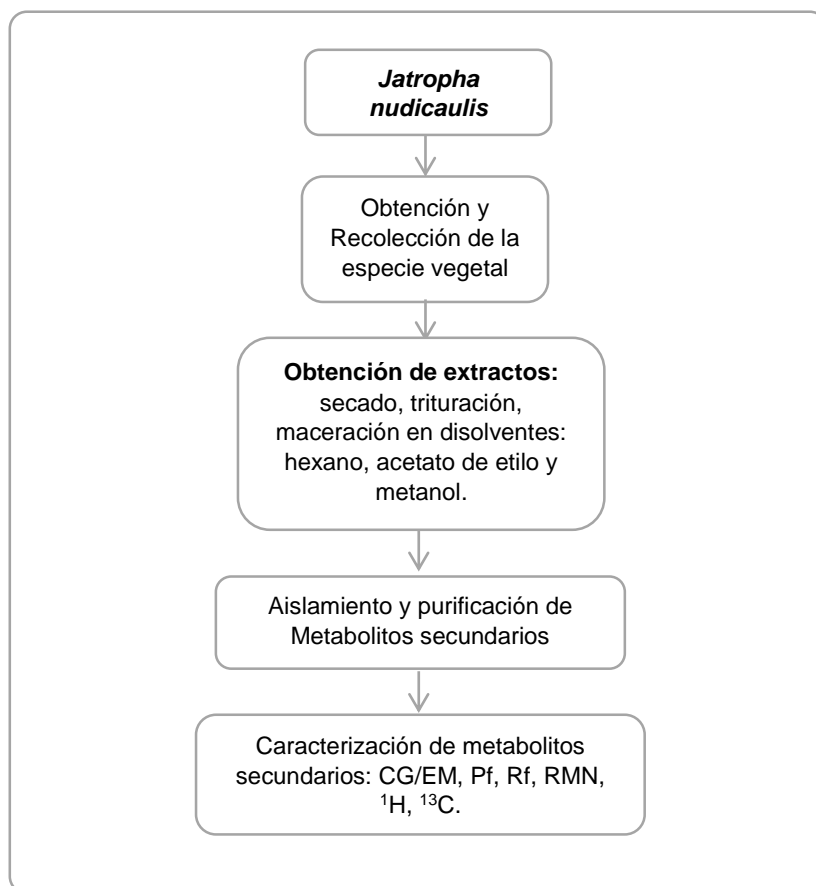


Figura 2: Esquema de la metodología aplicada

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

3.2 Obtención y recolección de la especie *Jatropha nudicaulis*

Se recolectó las partes aéreas de la especie vegetal *Jatropha nudicaulis* (hojas, flores, tallo), la recolección se realizó en el Cantón Catamayo en la provincia de Loja, con las siguientes coordenadas geográficas: 3°59'S; 79°21'O (Figura 3).

La especie vegetal fue identificada por parte de la Dra. Fani Tinitana, una muestra de esta especie vegetal fue depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja con el voucher HUTPL8022.

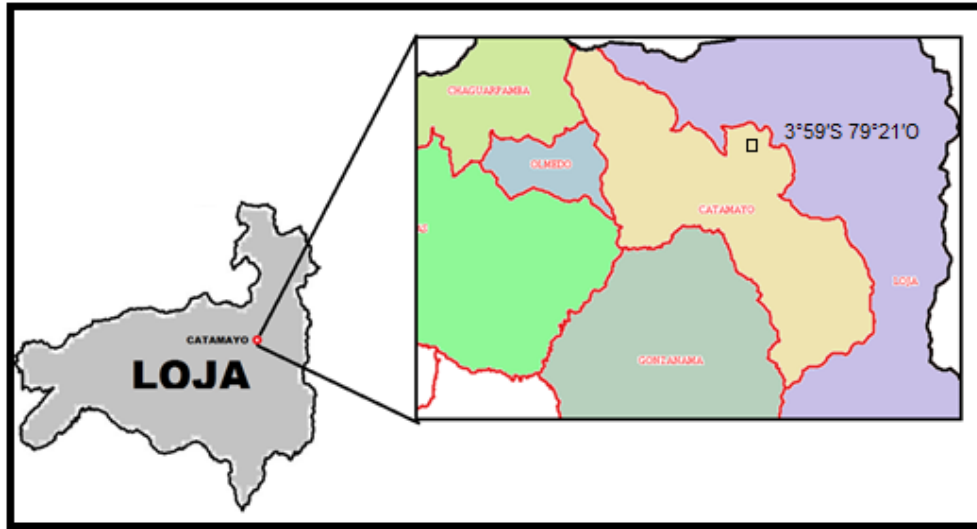


Figura 3: Sitio de recolección de la especie

Fuente: Mapas virtuales

Elaboración: El autor

3.2.1 Secado de la materia vegetal

La especie vegetal se pesó, posteriormente se sometió a un tratamiento de secado, el cual permitió que la especie vegetal pierda la humedad que posee en sus hojas, tallos y flores, se lo realizó en un secadero de bandejas (Figura 4) con flujo de aire continuo a 35°C durante 20 días. Este proceso se lo realizó en el Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL.



Figura 4: Secadero de Bandejas

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

3.3 Obtención de extractos

A la especie vegetal seca con un total de 3.4 kg de material vegetal se procedió a triturarla de forma manual para someterla a maceración estática, introduciéndola en recipientes con disolventes en polaridades crecientes (Hexano, Acetato de etilo y Metanol), se recubrieron completamente con alrededor de 20 litros de cada disolvente, se realizó tres repeticiones con cada uno de los disolventes durante el período de 3-5 días a temperatura ambiente (Figura 5). Se filtró al vacío y con la ayuda de un rota-evaporador Buchi modelo R-210 a 36°C (Figura 6), se concentró cada extracto obteniendo un total de tres extractos (Hex - AcOEt - MeOH), los cuales fueron pesados y etiquetados respectivamente.

La ecuación que se utilizó para calcular el rendimiento de los extractos fue la siguiente:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso total del extracto}}{\text{Peso de materia prima seca}} \times 100$$



Figura 5: Maceración de la especie vegetal

Fuente: El autor

Elaboración: El autor



Figura 6: Rota evaporación de extracto

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

3.3.1 Desclorofilación de los extractos

Al extracto de acetato de etilo se lo desclorofiló. En primer lugar, se utilizó un embudo de decantación al cual se le agregó una disolución conjunta del extracto de acetato de etilo con un disolvente (Hexano): (Metanol: H₂O 9:1) 1:10 en proporción 1g de extracto con 100 ml de disolvente, se agitó constantemente hasta que se logró una mezcla homogénea, luego se dejó en reposo durante 20 a 30 minutos hasta observar la separación bifásica (figura 7), la cual indica que mediante el proceso de decantación da efecto a la desclorofilación, que consiste en separar componentes que poseen fases diferentes con variabilidad significativa entre las densidades de cada fase por ejemplo dos líquidos no miscibles, o un sólido de un líquido.

Finalizado el primer paso de la desclorofilación se procede con el segundo paso donde se realizó una cromatografía en columna abierta (CC) con sílice gel C18 fase inversa y extracto de AcOEt (10g) en proporción 1:10, para la elución de la columna se utilizó mezclas de metanol-agua (9:1), recolectando fracciones de 10 ml. Finalmente se realizó

cromatografía en capa fina de las fracciones recolectadas para visualizar el perfil cromatográfico de cada una de ellas y unir las fracciones que tengan el mismo perfil.

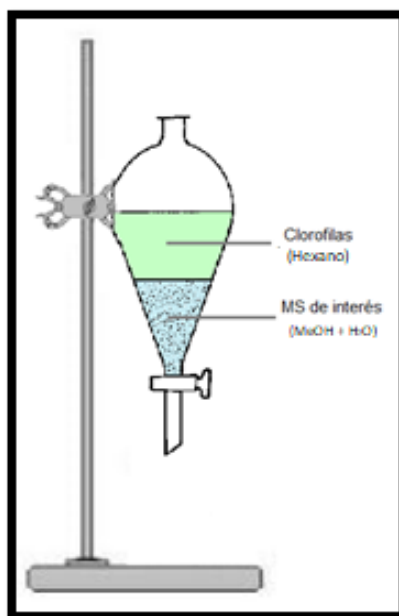


Figura 7: Desclorofilación del extracto de AcOEt

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

3.4 Fraccionamiento de los extractos

3.4.1 Cromatografía en columna abierta

Para el fraccionamiento de los extractos se realizó cromatografía en columna abierta, utilizando sílice gel 60 F24, en proporción 1:10 extracto-sílica, se trabajó con 50 g del extracto de cada uno de ellos (Hexano, Acetato de etilo y metanol), para la elución de la columna abierta se utilizó columnas de vidrio de 1.20 m de longitud y 15 mm de diámetro. Se usó mezclas de disolventes: hexano, acetato de etilo, y metanol, en forma ascendente en cuanto a su polaridad, con polaridad inicial de Hexano 100% y una polaridad final de Metanol 100%, se recolectó fracciones de aproximadamente 10 ml, estas fracciones fueron concentradas a rota evaporación para la eliminación de los disolventes, seguido se llevó a cabo una cromatografía en capa fina de cada fracción recolectada, esto se desarrolló con el fin de evaluar el perfil cromatográfico de cada una de ellas. Cabe recalcar que se unió las fracciones con el mismo perfil cromatográfico.

Se realizaron varias micro columnas de cromatografía en columna abierta, utilizando micro columnas de vidrio de 50 - 60 cm de longitud y 1-5 mm de diámetro aproximadamente. Cada micro columna fue eluída en polaridades de forma ascendente desde el menos polar al más polar, iniciando con una polaridad de Hexano 100%, seguido de una polaridad Hexano: AcOEt 1:1, luego Hexano: CH₂Cl₂ 1:1, Hexano: MeOH 1:1 y finalmente con Metanol 100%, en donde se recolectaron fracciones de 5ml aproximadamente, que fueron eluídas en cromatografía en capa fina para unir las fracciones con similitud en cuanto a su perfil cromatográfico.

3.4.2 Cromatografía en capa fina

Este método se usó para el análisis y fraccionamiento de las muestras/fracciones ya antes obtenidas de la cromatografía en columna abierta, para ello se utilizó placas de aluminio recubiertas con sílice gel 60 F₂₅₄, estas placas fueron eluídas con diferentes mezclas de disolventes como: hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol en proporciones ya previamente establecidas (Figura 8). A estas placas se las observó a través de una cámara de luz ultravioleta de onda corta UV (254 nm) y en luz ultravioleta de onda larga UV (365 nm) (Figura 9), finalmente se utilizó soluciones de ácido sulfúrico y vainillina para su revelado.

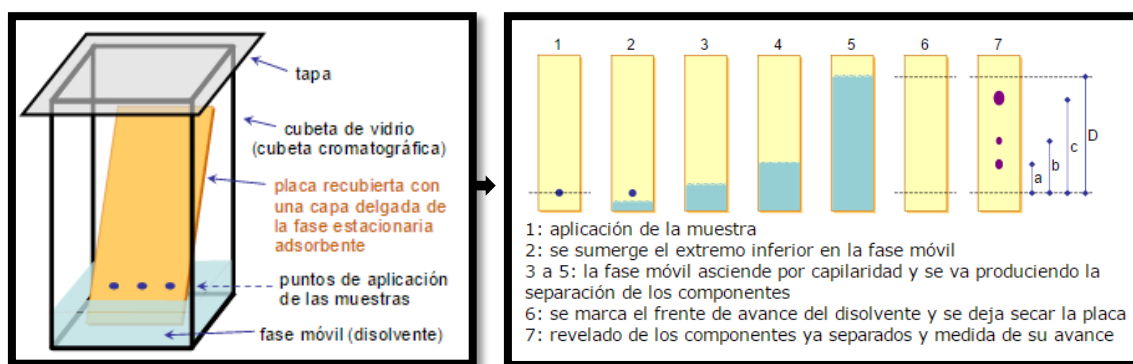


Figura 8: Técnica de empleo de la CCF

Fuente: Biomodel

Elaboración: El autor



Figura 9: Cámara de luz UV

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

3.5 Limpieza externa de solidos

Las fracciones recolectadas, fueron cromatografiadas y analizadas a través de luz UV (254 nm y 365 nm), aquellas que presentaban pequeñas impurezas fueron sometidas a un proceso de limpieza de impuresas, donde se utilizó disolventes como: Cloroformo (CHCl_3), MeOH, Hex, AcOEt, este procedimiento se lo realizó mediante filtración por gravedad, colocando el extracto o muestra con impurezas en papel filtro sobrepuesto en un matraz, se agregó el disolvente sobre este, de tal forma que limpie la fracción dejando caer junto al disolvente las impurezas que presentó la misma (Figura 10).

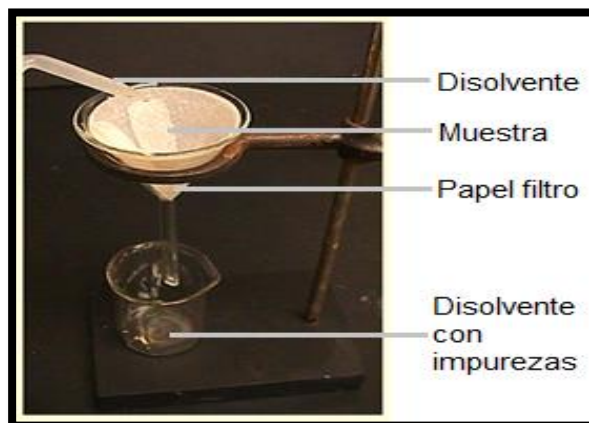


Figura 10: Purificación

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

3.6 Caracterización de metabolitos secundarios

Para la caracterización de los metabolitos secundarios aislados se utilizó técnicas como: Punto de fusión (Pf), factor de retención (R_f), solubilidad, cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG/EM) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

3.6.1 Punto de fusión

Se utilizó una muestra sólida de los compuestos aislados y purificados, el punto de fusión (Pf) se determinó mediante el equipo Fisher Johns (Figura 11), se colocó una cantidad pequeña de la muestra en un cubreobjetos y se lo colocó en el equipo, se observó el rango de temperatura a la cual el compuesto cambia de estado físico de sólido a líquido.



Figura 11: Equipo Fisher Johns

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

3.6.2 Solubilidad

Para determinar la solubilidad de los metabolitos secundarios aislados se utilizó varios disolventes: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, cloroformo, éter y acetona, y se determinó en cual o cuales los MS son solubles.

3.6.3 Factor de retención

El factor de retención (R_f), es la razón entre la distancia que recorrió la muestra desde el punto donde se colocó hasta el punto de llegada y la distancia recorrida por el disolvente (Figura 12).

El valor del factor de retención se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida (muestra)}}{\text{Distancia recorrida (disolvente)}}$$

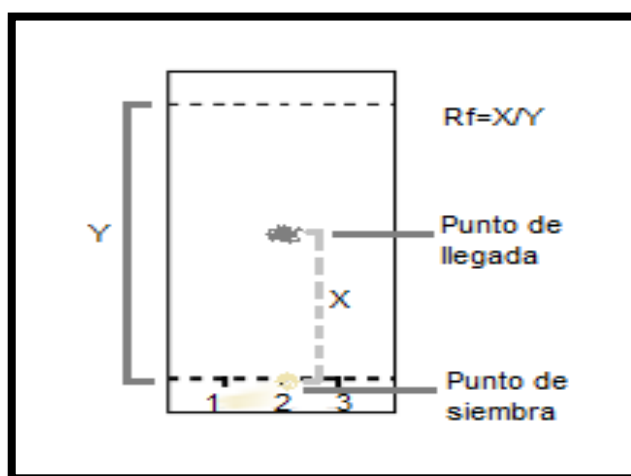


Figura 12: R_f en placa TLC

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

3.6.4 Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG/EM)

Para determinar los espectros de masas se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert) y columnas cromatográficas como Agilent 122-5562 DB-5ms. Para la identificación de los compuestos se emplearon las bases de datos Wiley 7n.l. Las condiciones de operación del equipo se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de operación del equipo CG/EM

COLUMNA	Columna capilar: Agilent 122-5562 DB-5ms, 0.25mm* 60mm*0.25µm
	Temperatura máxima: 350 °C
	Flujo constante. Flujo inicial 1.5 ml/min
	Presión inicial: 26.99 psi
	Velocidad promedio: 32 cm/s
	Presión de salida: vacío
INYECTOR en modo splitless	Temperatura inicial de 220 °C
	Gas: Helio
DETECTOR	Temperatura de 250 °C
	Gas: Nitrógeno
HORNO	Temperatura inicial: 80 °C
	Temperatura final: 300 °C
	Gradiente de temperatura de 5 °C/min

Fuente: Laboratorio de análisis químico e instrumental de la UTPL

Elaboración: El autor

3.6.5 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

A los compuestos que se logró aislar se los sometió a RMN para conseguir su espectro mediante la aplicación de varias técnicas como son: protón (^1H) y carbón (^{13}C). Para el análisis de los compuestos se tomó una cantidad pequeña de la muestra que fue disuelta con disolventes deuterados. Los resultados de este proceso se lograron analizar a través del empleo del espectrómetro RMN Varian 400 MHz de ^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz. Cabe recalcar que las constantes de acoplamiento J fueron expresadas en Hertz (Hz) y los desplazamientos químicos se expresaron en δ (ppm).

4 CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Rendimiento de extractos de la especie vegetal *Jatropha nudicaulis*

Los rendimientos de cada uno de los extractos (hexano, acetato de etilo y metanol) se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Peso y % de los diferentes extractos de la especie *Jatropha nudicaulis*

Disolventes	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexano	78.44	2.30
Acetato de etilo	64.63	1.90
Metanol	270.33	7.90

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

El extracto con mayor rendimiento de todos fue el extracto de metanol con 7.90%, y el extracto con menor rendimiento fue el extracto de acetato de etilo con un 1.90%.

4.2 Aislamiento de metabolitos secundarios

4.2.1 Extracto de Hexano

Se trabajó con 50 gr del extracto Hexánico sin desclorofilar, en relación 1:10 extracto-sílica, mediante cromatografía en columna abierta, utilizando como eluyente una mezcla de disolventes como: Hex, AcOEt, MeOH, se recolectó un total de 349 separaciones con un volumen aproximado de 10 ml por fracción, siendo unidas de acuerdo a su perfil cromatográfico, lográndose obtener 26 fracciones etiquetadas con el código JN-Hex, en la tabla 4 se muestran las fracciones obtenidas.

Tabla 4. Unión de fracciones JN-Hex del extracto hexánico

Unión de muestras	# de fracción	Proporción	Disolventes	Apariencia
-------------------	---------------	------------	-------------	------------

JN-Hex 1-13	JN-Hex1	100 %	Hexano	Sólida
JN-Hex 14-34	JN-Hex2	95:5	Hex : AcOEt	Sólida
JN-Hex 35-53	JN-Hex3	90:10	Hex : AcOEt	Sólida
JN-Hex 54-57	JN-Hex4	85:15	Hex : AcOEt	Sólida
JN-Hex 58-125	JN-Hex5	80:20	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 126-140	JN-Hex6	75:25	Hex : AcOEt	Sólida
JN-Hex 141-163	JN-Hex7	70:30	Hex : AcOEt	Sólida
JN-Hex 164-185	JN-Hex8	65:35	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 186-200	JN-Hex9	60:40	Hex : AcOEt	Sólida
JN-Hex 201-206	JN-Hex10	55:45	Hex : AcOEt	Sólida
JN-Hex 207-212	JN-Hex11	50:50	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 213-217	JN-Hex12	45:50	Hex : AcOEt	Sólida
JN-Hex 218-225	JN-Hex13	40:60	Hex : AcOEt	Sólida
JN-Hex 226-231	JN-Hex14	35:65	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 232-237	JN-Hex15	30:70	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 238-249	JN-Hex16	25:75	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 250-256	JN-Hex17	20:80	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 257-263	JN-Hex18	15:85	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 264-268	JN-Hex19	10:90	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 269-276	JN-Hex20	5:95	Hex : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 277-282	JN-Hex21	100%	AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 283-288	JN-Hex22	5:95	MeOH : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 289-302	JN-Hex23	25:75	MeOH : AcOEt	Semi sólida
JN-Hex 303-309	JN-Hex24	50:50	MeOH : AcOEt	Semi líquida
JN-Hex 310-322	JN-Hex25	75:25	MeOH : AcOEt	Semi líquida
JN-Hex 323-349	JN-Hex26	100%	Metanol	Líquida

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

A la fracción JN-Hex4 (JN-Hex 54-57), con un peso de 180 mg de un sólido amarillento, eluída con una polaridad Hex:AcOEt 85:15, posteriormente se le realizó una micro-columna, con una polaridad Hex:CH₂Cl₂, donde se obtuvieron 282 separaciones de 5 ml aproximadamente, luego se procedió a unir las según su perfil cromatográfico, que dio como resultado 18 fracciones etiquetadas con el código JN-Hex4(1) a la JN-Hex4(18) a continuación en la tabla 5 se muestran las fracciones obtenidas.

Tabla 5. Unión de fracciones de JN-Hex 4 del extracto hexánico

Unión de fracciones	# de fracción	Proporción	Disolventes	Apariencia
JN-Hex 4: 1-20	Micro_Hex 4(1)	9:1	Hex: CH₂Cl₂	Sólida cristalina
JN-Hex 4: 21-51	Micro_Hex 4(2)	9:1	Hex: CH ₂ Cl ₂	Sólida
JN-Hex 4: 52-81	Micro_Hex 4(3)	9:1	Hex: CH ₂ Cl ₂	Sólida
JN-Hex 4: 82-109	Micro_Hex 4(4)	9:1	Hex: CH ₂ Cl ₂	Sólida
JN-Hex 4: 110-169	Micro_Hex 4(5)	9:1	Hex: CH ₂ Cl ₂	sólida
JN-Hex 4: 170-181	Micro_Hex 4(6)	9:1	Hex: CH ₂ Cl ₂	Sólida
JN-Hex 4: 182-199	Micro_Hex 4(7)	9.5:0.5	Hex: CH ₂ Cl ₂	Sólida
JN-Hex 4: 200-210	Micro_Hex 4(8)	9.5:0.5	Hex: CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JN-Hex 4: 211-216	Micro_Hex 4(9)	9.5:0.5	Hex: CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JN-Hex 4: 217-219	Micro_Hex 4(10)	9.5:0.5	Hex: CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JN-Hex 4: 220-267	Micro_Hex 4(11)	9.5:0.5	Hex: CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JN-Hex 4: 268-270	Micro_Hex 4(12)	9.5:0.5	Hex: CH ₂ Cl ₂	Sólida
JN-Hex 4: 271-275	Micro_Hex 4(13)	100 %	Hexano	Sólida
JN-Hex 4: 276	Micro_Hex 4(14)	100 %	Hexano	Semi sólida
JN-Hex 4: 277-278	Micro_Hex 4(15)	100 %	Hexano	Semi sólida
JN-Hex 4: 279-280	Micro_Hex 4(16)	100 %	Hexano	Semi sólida
JN-Hex 4: 281	Micro_Hex 4(17)	100 %	Hexano	Semi sólida
JN-Hex 4: 282	Micro_Hex 4(18)	100 %	Hexano	Semi sólida

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

La fracción Micro_Hex 4(1) presentó un aspecto sólido cristalino con un peso de 65 mg, a la misma se le realizó una micro-columna, eluída en una polaridad Hex:CH₂Cl₂ 3:7, en

donde se obtuvieron 110 muestras de 5ml aproximadamente, que se unieron de acuerdo a la similitud en su perfil cromatográfico, obteniéndose 20 fracciones que fueron etiquetadas como JNHmicro1 a la JNHmicro20.

A continuación, en la tabla 6 se muestra la unión de las fracciones del extracto de hexano “JNHmicro”.

Tabla 6. Unión de fracciones de “JNHmicro” del extracto hexánico

Unión de fracciones	# de fracción	Proporción	Disolventes	Apariencia
JNHmicro1	JNHmicro 1	3:7	Hex:CH₂Cl₂	Sólida cristalina
JNHmicro2-3	JNHmicro 2	3:7	Hex:CH ₂ Cl ₂	Sólida cristalina
JNHmicro4-6	JNHmicro 3	3:7	Hex:CH ₂ Cl ₂	Sólida
JNHmicro7	JNHmicro 4	4:6	Hex:CH ₂ Cl ₂	Sólida
JNHmicro8-9	JNHmicro 5	4:6	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro10-12	JNHmicro 6	4:6	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro13-15	JNHmicro 7	5:5	Hex:CH ₂ Cl ₂	Sólida
JNHmicro16	JNHmicro 8	5:5	Hex:CH ₂ Cl ₂	Sólida cristalina
JNHmicro17-31	JNHmicro 9	5:5	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro32	JNHmicro 10	6:4	Hex:CH ₂ Cl ₂	Sólida
JNHmicro33-37	JNHmicro 11	6:4	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro38-39	JNHmicro 12	6:4	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro40-54	JNHmicro 13	7:3	Hex:CH ₂ Cl ₂	Sólida cristalina
JNHmicro55-73	JNHmicro 14	7:3	Hex:CH ₂ Cl ₂	Sólida
JNHmicro74-78	JNHmicro 15	7:3	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro79-80	JNHmicro 16	8:2	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro81-85	JNHmicro 17	8:2	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro86-92	JNHmicro 18	9:1	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro93	JNHmicro 19	9:1	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida
JNHmicro94-110	JNHmicro 20	9:1	Hex:CH ₂ Cl ₂	Semi sólida

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

De la fracción JNHmicro 1, se obtuvo un cristal blanquecino, el cual fue analizado por CCF y se observó impurezas, por lo que se purificó por re cristalización con metanol, acetona y acetato de etilo, lográndose obtener un polvo blanquecino con un peso de 15.3 mg, soluble en CHCl_3 , con punto de fusión 65-67 °C y R_f de 0.52.

En la figura 13 se observa el perfil cromatográfico de la fracción JNHmicro1 en CCF.



Figura 13. Cromatografía en capa fina de la fracción JNHmicro 1, polaridad Hex:AcOEt 8:2

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Del extracto de hexano se logró aislar 10 fracciones, las cuales fueron analizadas por CG/EM, cada una de las muestras del extracto hexánico poseía una mezcla de compuestos que no se han logrado identificar. En la tabla 7 se detalla la caracterización de cada fracción aislada del extracto hexánico.

Tabla 7. Fracciones aisladas del extracto hexánico

FRACCIÓN	CANT.	Pf	POLARIDAD	R_f	APARIENCIA	SOLUB.
JNHmicro 1	15.3 mg	65-67 °C	Hex:AcOEt 8:2	0.52	Polvo blanquecino	CHCl_3
JNHmicro 2	437.5 mg	59-60 °C	Hex:AcOEt 7:3	0.57	Polvo amarillento	CH_2Cl_2
JNHmicro 3	20 mg	63-65 °C	Hex: CH_2Cl_2 8:2	0.54	Polvo blanquecino	CH_2Cl_2
JNHmicro 4	162 mg	60-63 °C	Hex:AcOEt 7:3	0.51	Polvo blanco	CH_2Cl_2
JNHmicro 5	142.2 mg	69-71 °C	Hex: CHCl_3 8:2	0.53	Polvo blanco	CHCl_3
JNHmicro 6	416.8mg	68-70 °C	Hex: CH_2Cl_2 7:3	0.63	Polvo blanco	CH_2Cl_2
JNHmicro 7	566.9 mg	64-65 °C	Hex: CHCl_3 6:4	0.79	Polvo blanco	CHCl_3

JNHmicro 8	12.8 mg	70-71 °C	Hex:CH ₂ Cl ₂ 8:2	0.39	Polvo blanquecino	CH ₂ Cl ₂
JNHmicro 9	138.4 mg	58-60 °C	Hex:CH ₂ Cl ₂ 9:1	0.52	Polvo blanco	CH ₂ Cl ₂
JNHmicro10	154.8 mg	68-70 °C	Hex:CHCl ₃ 7:3	0.61	Polvo amarillento	CHCl ₃

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

4.2.2 Extracto de Acetato de Etilo

4.2.2.1 Desclorofilación del extracto de acetato de etilo.

Se utilizó 10 g del extracto de AcOEt para su desclorofilación mediante cromatografía en columna abierta, en una relación 1:100 con sílice fase inversa, eluída en una mezcla de disolventes de MeOH:H₂O en proporción 1:1, se recolectaron fracciones de 200 ml, las que fueron concentradas mediante rota-evaporación, se realizaron dos desclorofilaciones obteniendo en la primera desclorofilación (1D) un total de 18 separaciones, y en la segunda desclorofilación (2D) 24 separaciones, en total 42 separaciones que fueron unidas conforme a su similitud de acuerdo al perfil cromatográfico, dando como resultado final 13 fracciones desclorofiladas que fueron etiquetadas como "D-AcOEt_1 hasta D-AcOEt_13". En la tabla 8 se observa la unión de fracciones del extracto de Acetato de etilo desclorofilado.

Tabla 8. Unión de fracciones del extracto de acetato de etilo desclorofilado.

Unión de fracciones	Nº de fracción	Apariencia
1D1-3_2D1	D-AcOEt_1	Sólida
1D4-7_2D2-3	D-AcOEt_2	Sólida cristalina
1D8_2D4	D-AcOEt_3	Sólida cristalina
1D9-11_2D5-6	D-AcOEt_4	Semi sólida
1D12_2D7-9	D-AcOEt_5	Semi sólida
1D13_2D10	D-AcOEt_6	Semi sólida
1D14_2D11	D-AcOEt_7	Sólida
1D15_2D12	D-AcOEt_8	Sólida
1D16_2D13	D-AcOEt_9	sólida
1D17_2D14-15	D-AcOEt_10	Sólida

1D18_2D16	D-AcOEt_11	Semi sólida
2D17-21	D-AcOEt_12	Semi sólida
2D22-24	D-AcOEt_13	Semi sólida

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

4.2.2.2 Fracción AcOEt_2 del extracto de acetato de etilo desclorofilado

De la fracción (D-AcOEt_2), se realizó cromatografía en columna abierta eluída con una mezcla de disolventes (CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH), obteniéndose 66 separaciones con un volumen de 10 ml aproximadamente de cada fracción, se realizó una CCF para unir las de acuerdo a su perfil cromatográfico, obteniéndose un total de 10 fracciones que fueron pesadas y etiquetadas con el código AcOEt_1 hasta la AcOEt_10, a continuación, en la tabla 9 se muestran las fracciones obtenidas.

Tabla 9. Unión de las fracciones D-AcOEt_2 del extracto de acetato de etilo desclorofilado.

Unión de fracciones	# de fracción	Proporción	Disolventes	Apariencia
D-AcOEt_1-4	AcOEt_1	100 %	CH ₂ Cl ₂	Sólida cristalina
D-AcOEt_5-8	AcOEt_2	100 %	CH₂Cl₂	Sólida cristalina
D-AcOEt_9-16	AcOEt_3	100 %	CH₂Cl₂	Sólida
D-AcOEt_17-24	AcOEt_4	90:10	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	Semi sólida
D-AcOEt_25-32	AcOEt_5	90:10	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	Semi sólida
D-AcOEt_33-40	AcOEt_6	50:50	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	Semi sólida
D-AcOEt_41-46	AcOEt_7	50:50	CH₂Cl₂:AcOEt	Semi sólida
D-AcOEt_47-54	AcOEt_8	100 %	AcOEt	Sólida
D-AcOEt_55-62	AcOEt_9	50:50	MeOH: CH ₂ Cl ₂	sólida
D-AcOEt_63-66	AcOEt_10	100 %	Metanol	Líquida

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

De la fracción AcOEt_2, se logró obtener 17 mg de un sólido cristalino amarillento, al cual se le realizó CCF y se observó que poseía pequeñas impurezas, por lo que se purificó por re cristalización con CH₂Cl₂ y AcOEt, finalmente se obtuvo un total de 10.3 mg del

compuesto puro soluble en CHCl_3 , con un punto de fusión de 57-59 °C y un R_f de 0.53, eluída en Hex: CH_2Cl_2 8:2.

En la figura 14 se observa el perfil cromatográfico de la fracción AcOET_2 en CCF.



Figura 14. Cromatografía en capa fina de la fracción AcOET_2, Polaridad Hex: CH_2Cl_2 8:2

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Esta fracción fue analizada mediante RMN ^1H , ^{13}C y CG/EM.

El cromatograma de gases indicó la mezcla de 3 compuestos que probablemente serían: Eicosano (**1**) ($t_R=28.38$) con peso molecular de 282 g/mol, heneicosano (**2**) ($t_R=31.48$) con peso molecular de 296 g/mol y éster propílico del ácido palmítico (**3**) ($t_R=36.20$) cuyo peso molecular es 298 g/mol, según la base de datos Wiley 7n.I (Figura 15). (Anexos, espectros 1-3). Se comparó los patrones de fraccionamiento de masa con reportes en literatura los cuales son similares, corroborando las estructuras propuestas. (Sern C., et al. 2008, Zaikin V., et al. 2014).

El compuesto eicosano (**1**) se ha aislado, a partir del extracto metanólico de hojas de *Leea indica*, del cual se reporta actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (Srinivasan G., et al. 2008). Mientras que heneicosano (**2**) se ha aislado a partir de *Dittrichia viscosa*, presentando actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis* y *Proteus vulgaris* (Marie-Cécile B., et al. 2005).

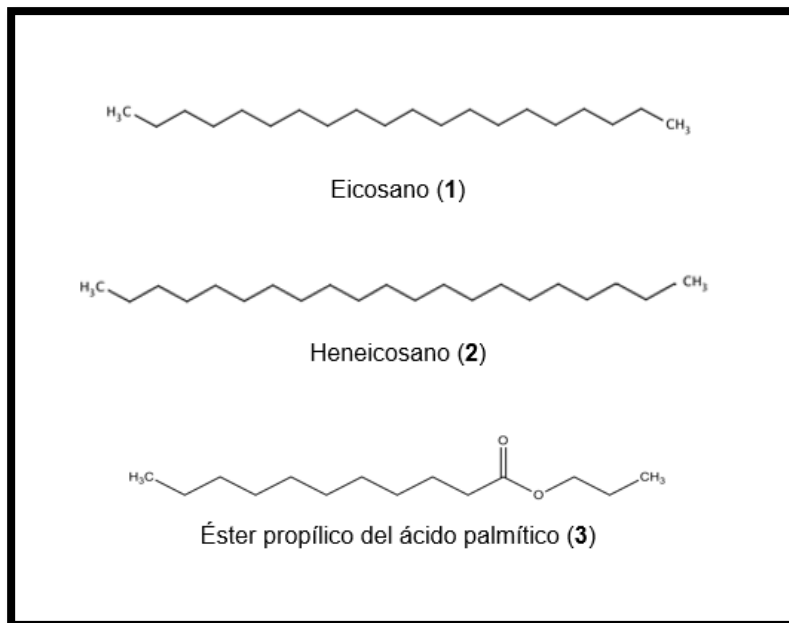


Figura 15. Estructuras de los compuestos de eicosano, heneicosano y éster propílico del ácido palmítico

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

El espectro de RMN de ¹H mostró una serie de señales de tipo alifáticas entre los desplazamientos de 0.87 y 4.07 ppm. El espectro mostró tres señales triplete a 0.87, 2.28 y 4.07 ppm, una señal multiplete a 1.62 ppm, un singulete ancho e intenso se presentó a 1.25 ppm. Los acoplamientos de estas señales sugieren un posible éster propílico de un ácido de cadena larga. En la tabla 10 y 11 se muestran las asignaciones de las diferentes señales. En el espectro de carbono se observó una señal que corresponde al carbonilo del éster a 173.2 ppm, un metileno oxigenado a 63.6 ppm y dos metilenos que se presentan en 21.8 y 28.9 ppm, respectivamente, dichos metilenos se encuentran junto al carbonilo que presenta una señal a 33.6 ppm y aquel que se encuentra entre el metilo y el CH₂O del grupo propilo. Las señales restantes de carbono pertenecen a un éster de cadena larga.

De acuerdo al espectro de masas del ion molecular con PM 298.6 g/mol que pertenece a la fórmula molecular C₁₉H₃₈O₂, por lo que se propone que el éster presente en esta mezcla es un éster propílico del ácido palmítico (3) (Anexos, espectros 4-7).

En la figura 16, se observa la estructura del compuesto aislado e identificado como éster propílico del ácido palmítico.

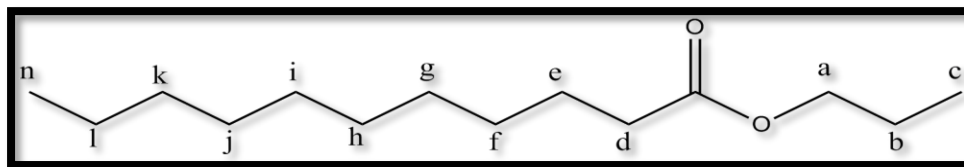


Figura 16. Estructura del compuesto identificado como éster propílico del ácido palmítico

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Este compuesto fue caracterizado mediante comparación de espectros reportados en literatura (Cai Z., et al. 2008, Banfi D., et al. 2008). En las tablas 10 y 11 se detallan los datos espectroscópicos en donde sus desplazamientos químicos se expresan en ppm, correspondientes a ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto.

Tabla 10. Datos espectroscópicos de ^1H -RMN (CDCl_3) del éster propílico del ácido palmítico.

^1H -RMN (400 Mhz, CDCl_3)		^1H -RMN (Banfi D. et al., 2008)	
POSICIÓN	δ (en ppm)	POSICIÓN	δ (en ppm)
a	4.07 (2H, t)	a	4.14 (2H, t)
b	1.56 (2H, m)	b	1.55 (2H, m)
c	0.87 (3H, t)	c	0.86 (3H, t)
d	2.28 (2H, t)	d	2.25 (2H, t)
e-n	1.25 (s ancho)	e-n	1.15 - 1.28 (s)

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Tabla 11. Datos espectroscópicos de ^{13}C -RMN (CDCl_3) del éster propílico del ácido palmítico.

^{13}C -RMN (100 Mhz, CDCl_3)		^{13}C -RMN (Banfi D. et al., 2008)	
POSICIÓN	δ (en ppm)	POSICIÓN	δ (en ppm)
a	63.6	a	67.0
b	31.1	b	32.4
c	13.3	c	14.0
d	33.6	d	34.4
e-n	21.8-28.9	e-n	22.6-29.4

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

Este metabolito ha sido aislado del extracto de acetato de etilo y del extracto metanólico de la especie vegetal *Grewia biloba* (Cai Z. et al., 2008). También ha sido identificado del extracto de dicloro etano de *Alcaligenes eutrophus* (Timothy A., et al. 1996).

4.2.2.3 Fracción MicroAcOEt_7 del acetato de etilo desclorofilado

De la fracción AcOEt_3 que corresponde a la unión de las fracciones 9-16, se realizó una micro columna isocrática, eluída en una polaridad de CH₂Cl₂:AcOEt 1:1, recolectándose 82 separaciones con un volumen de 5 ml aproximadamente, a las fracciones recolectadas se les realizó una CCF, uniéndolas de acuerdo a su perfil cromatográfico, obteniendo un total de 17 fracciones etiquetadas como MicroAcOEt_1 a la MicroAcOEt_17, en la tabla 12 se muestran las fracciones obtenidas.

Tabla12. Unión de las fracciones AcOEt_3 del extracto de acetato de etilo desclorofilado

Unión de fracciones	# de fracción	Apariencia
MicroAcOEt_1-3	MicroAcOEt_1	Sólido amarillento
MicroAcOEt_4-7	MicroAcOEt_2	Sólido amarillento
MicroAcOEt_8-10	MicroAcOEt_3	Sólida blanquecina
MicroAcOEt_11-15	MicroAcOEt_4	Sólido blanquecino
MicroAcOEt_16-17	MicroAcOEt_5	polvo blanquecino
MicroAcOEt_18-21	MicroAcOEt_6	polvo blanquecino
MicroAcOEt_22-26	MicroAcOEt_7	Cristales blancos
MicroAcOEt_27-29	MicroAcOEt_8	Polvo blanquecino
MicroAcOEt_30-35	MicroAcOEt_9	Polvo blanquecino
MicroAcOEt_36-42	MicroAcOEt_10	Polvo amarillento
MicroAcOEt_43-45	MicroAcOEt_11	Polvo amarillento
MicroAcOEt_46-55	MicroAcOEt_12	Polvo blanquecino
MicroAcOEt_56-59	MicroAcOEt_13	Polvo blanquecino
MicroAcOEt_60-68	MicroAcOEt_14	Polvo blanquecino
MicroAcOEt_69-77	MicroAcOEt_15	Polvo amarillento
MicroAcOEt_78-80	MicroAcOEt_16	Sólido amarillento
MicroAcOEt_81-82	MicroAcOEt_17	Sólido verdoso

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

De la fracción MicroAcOEt_7, se obtuvo 12.7 mg de cristales blancos soluble en CHCl_3 , se le realizó CCF y presentó una sola mancha, el punto de fusión fue de 61-63 °C y el R_f de 0.38, eluída en Hex: CH_2Cl_2 7:3. Este compuesto está en proceso de identificación.

En la figura 17 se observa el perfil cromatográfico de la fracción MicroAcOEt_7 en CCF.



Figura 17. Cromatografía en capa fina de la fracción MicroAcOEt_7, polaridad: (1) Hex: CH_2Cl_2 7:3; polaridad (2) Hex: CH_2Cl_2 9:1

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

4.2.2.4 Fracción JnAcOEt_9 del extracto de acetato de etilo desclorofilado

De la fracción AcOEt_7 que corresponde a la unión de las fracciones 41- 46, se realizó una micro columna, eluída en una mezcla de disolventes como: CH_2Cl_2 , AcOEt y MeOH, se recolectó 53 fracciones con un volumen aproximado de 5 ml, las fracciones recolectadas fueron sometidas a una CCF, uniéndolas de acuerdo a su perfil cromatográfico, se obtuvo un total de 12 fracciones etiquetadas como JnAcOEt1 hasta JnAcOEt12, en la tabla 13 se detallan las fracciones obtenidas.

Tabla 13 Unión de las fracciones AcOEt_7 del extracto de acetato de etilo

Unión de fracciones	# de fracción	Proporción	Disolventes	Apariencia
JnAcOEt:1-3	JnAcOEt_1	100 %	CH_2Cl_2	Sólido amarillento
JnAcOEt:4-8	JnAcOEt_2	100 %	CH_2Cl_2	Sólido amarillento
JnAcOEt:9-10	JnAcOEt_3	1:1	CH_2Cl_2 :AcOEt	Sólida blanquecina
JnAcOEt:11-16	JnAcOEt_4	1:1	CH_2Cl_2 :AcOEt	Sólido blanquecino
JnAcOEt:17-20	JnAcOEt_5	1:1	CH_2Cl_2 :AcOEt	polvo blanquecino

JnAcOEt:21-23	JnAcOEt_6	1:1	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	polvo blanquecino
JnAcOEt:24-26	JnAcOEt_7	100 %	AcOEt	Cristal blanquecino
JnAcOEt:27-28	JnAcOEt_8	100 %	AcOEt	Polvo blanquecino
JnAcOEt:29-35	JnAcOEt_9	100 %	AcOEt	Cristales blancos
JnAcOEt:36:44	JnAcOEt_10	1:1	AcOEt: MeOH	Polvo amarillento
JnAcOEt:45-49	JnAcOEt_11	1:1	AcOEt: MeOH	Polvo amarillento
JnAcOEt:50-53	JnAcOEt_12	100 %	MeOH	Polvo blanquecino

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

De la fracción JnAcOEt_9, se logró la obtener 9.8 mg de cristales blancos solubles en CHCl₃, se realizó CCF observándose una sola manch, por lo que aparentemente el compuesto no presenta impurezas. El punto de fusión fue de 70-72 °C y el R_f de 0.45, eluída en Hex:CH₂Cl₂ 2:8, el cual está en proceso de identificación.

En la figura 18 se observa el perfil cromatográfico de la fracción JnAcOEt_9 en CCF.



Figura 18. Cromatografía en capa fina de la fracción JnAcOEt_9, Polaridad (1) Hex:CH₂Cl₂ 2:8; polaridad (2) Hex:CH₂Cl₂ 7:3

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

4.2.3 Extracto de metanol

Se utilizó 20 gr del extracto metanólico sin desclorofilar, en una relación 1:10 extracto: sílica, se realizó una cromatografía en columna abierta isocrática, utilizando como

eluyente una mezcla de disolventes en polaridad: AcOEt:MeOH:H₂O 8.1:1.1:0.8, se recolectó un total de 177 separaciones con un volumen aproximado de 10 ml cada una, las separaciones fueron unidas de acuerdo a su perfil cromatográfico, finalmente se obtuvo un total de 25 fracciones etiquetadas con el código JN-MeOH1 hasta JN-MeOH11, en la tabla 14 se muestran las fracciones obtenidas.

Tabla 14. Unión de fracciones de “JN-MeOH” del extracto metanólico

Unión de muestras	# de fracción	Apariencia
JN-MeOH:1-3	JN-MeOH 1	Semi sólida
JN-MeOH:4-7	JN-MeOH 2	Semi sólida
JN-MeOH:8-10	JN-MeOH 3	Sólida
JN-MeOH:11-13	JN-MeOH 4	Sólida
JN-MeOH:14-16	JN-MeOH 5	Semi sólida
JN-MeOH:17-26	JN-MeOH 6	Sólida
JN-MeOH:27-40	JN-MeOH 7	Sólida
JN-MeOH:41-46	JN-MeOH 8	Semi sólida
JN-MeOH:47-58	JN-MeOH 9	Sólida
JN-MeOH:59-65	JN-MeOH 10	Sólida
JN-MeOH:66-67	JN-MeOH 11	Semi sólida
JN-MeOH:68-69	JN-MeOH 12	Semi líquida
JN-MeOH:70-73	JN-MeOH 13	Sólida
JN-MeOH:74-82	JN-MeOH 14	Semi sólida
JN-MeOH:83-89	JN-MeOH 15	Semi sólida
JN-MeOH:90-93	JN-MeOH 16	Semi sólida
JN-MeOH:94-98	JN-MeOH 17	Semi sólida
JN-MeOH:99-110	JN-MeOH 18	Sólida
JN-MeOH:111-117	JN-MeOH 19	Sólida
JN-MeOH:118-123	JN-MeOH 20	Sólida
JN-MeOH:124-135	JN-MeOH 21	Semi sólida
JN-MeOH:136-141	JN-MeOH 22	Semi líquida
JN-MeOH:142-153	JN-MeOH 23	Semi líquida

JN-MeOH:154-165	JN-MeOH 24	Semi líquida
JN-MeOH:166-177	JN-MeOH 25	Semi líquida

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

4.2.3.1 Fracción MeOHJn del extracto metanólico

Se unió las fracciones JN-MeOH 6,7,9, las que se etiquetó con el código MeOHJn, se obtuvo 1.63 g de un sólido café-amarillento, se realizó una micro-columna, eluída con una polaridad inicial de AcOEt:MeOH:H₂O 8.4:1.1:0.5 y una polaridad final de AcOEt:MeOH:H₂O 7.6:1.4:1.0, se recolectaron 120 separaciones de 5 ml aproximadamente, se las unió según su perfil cromatográfico, dando un total de 10 fracciones etiquetadas como MeOHmicro:1 hasta la MeOHmicro:10, en la tabla 15 se detallan las fracciones obtenidas.

Tabla 15. Unión de fracciones de “MeOHmicro: 1-10” del extracto metanólico

Unión de fracciones	# de fracción	Polaridad	Apariencia
MeOHmicro:1-5	MeOHmicro 1	AcOEt: MeOH : H ₂ O 8.4:1.1:0.5	Sólida café claro
MeOHmicro: 6-9	MeOHmicro 2	AcOEt: MeOH : H ₂ O 8.4:1.1:0.5	Sólida café claro
MeOHmicro: 10-13	MeOHmicro 3	AcOEt: MeOH : H ₂ O 8.4:1.1:0.5	Sólida café claro
MeOHmicro: 14-26	MeOHmicro 4	AcOEt: MeOH : H₂O 8.4:1.1:0.5	Sólida café claro
MeOHmicro: 27-38	MeOHmicro 5	AcOEt: MeOH : H ₂ O 8.4:1.1:0.5	Sólida café
MeOHmicro: 39-56	MeOHmicro 6	AcOEt: MeOH : H ₂ O 8.4:1.1:0.5	Sólida café
MeOHmicro: 57-77	MeOHmicro 7	AcOEt: MeOH: H ₂ O 7.6:1.4:1.0	Sólida café
MeOHmicro: 78-88	MeOHmicro 8	AcOEt: MeOH: H ₂ O 7.6:1.4:1.0	Semi sólida café
MeOHmicro: 89-109	MeOHmicro 9	AcOEt: MeOH: H ₂ O 7.6:1.4:1.0	Semi sólida café
MeOHmicro:110-120	MeOHmicro 10	AcOEt: MeOH: H ₂ O 7.6:1.4:1.0	Sólida verdosa

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

La fracción MeOHmicro4 presentó un aspecto sólido café claro, con peso de 66 mg, se realizó una micro-columna isocrática en fase inversa, en relación 1:200 extracto-sílica, eluída en una polaridad de MeOH:H₂O 4:6, se obtuvo 134 separaciones de 5ml que

fueron unidas de acuerdo a la similitud en su perfil cromatográfico, logrando un total de 7 fracciones que fueron etiquetadas como MeOHJn: 1-7.

En la tabla 16 se muestra la unión de las fracciones del extracto Metanólico “MeOHmicro4”.

Tabla 16. Unión de fracciones de “MeOHmicro4” del extracto metanólico

Unión de fracciones	# de fracción	Apariencia
MeOHJn:1-10	MeOHJn_1	Polvo blanquecino
MeOHJn:11-22	MeOHJn_2	Polvo amarillento
MeOHJn:23-52	MeOHJn_3	Polvo amarillento
MeOHJn:43-92	MeOHJn_4	Polvo amarillento
MeOHJn:93-130	MeOHJn_5	Polvo amarillento
MeOHJn:131-134	MeOHJn_6	Polvo amarillento

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

De la fracción MeOHJn_2, se obtuvieron 6.4 mg de un polvo amarillento, soluble en acetona, este compuesto fue analizado mediante CCF donde se observó una sola mancha. El punto de fusión fue de 243-245 °C y Rf de 0.38, eluída en MeOH:H₂O 4:6. El cual está en proceso de identificación.

En la figura 19 se observa el perfil cromatográfico de la fracción MeOHJn_2 en CCF.

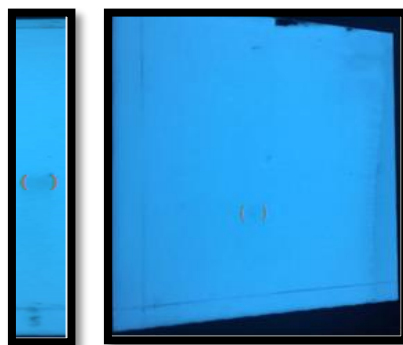


Figura 19. Cromatografía en capa fina de la fracción MeOHJn_2 revelada en luz UV de 365 nm, TLC normal y TLC bidimensional, polaridad MeOH:H₂O 1:1

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

4.2.3.2 Fracción PPMeOH1 del extracto metanólico

Las fracciones MeOHmicro2 y MeOHmicro3 presentaron similitud en su perfil cromatográfico por lo que se las unió y se etiquetó con el código U_Metanol, con aspecto sólido café claro, con un peso de 94 mg, se realizó una micro-columna isocrática, en relación 1:100 extracto-sílica, se eluyó con una polaridad de AcOEt:MeOH:H₂O 10:0.6:0.3, se recolectó 80 muestras de 5ml que se unieron de acuerdo a su similitud en cuanto al perfil cromatográfico, al final se obtuvo un total de 16 fracciones que se etiquetaron con el código MeOHF:1-80.

En la tabla 17 se observa la unión de las fracciones del extracto Metanólico “U_Metanol”.

Tabla 17. Unión de fracciones de “U_Metanol” del extracto metanólico

Unión de fracciones	# de fracción	Apariencia
MeOHF:1-3	MeOHF1	Polvo blanquecino
MeOHF:4-7	MeOHF2	Polvo blanquecino
MeOHF:8-11	MeOHF3	Polvo amarillento
MeOHF:12-15	MeOHF4	Polvo amarillento
MeOHF:16-17	MeOHF5	Polvo café
MeOHF:18-21	MeOHF6	Polvo café
MeOHF:22	MeOHF7	Polvo café
MeOHF:23	MeOHF8	Polvo café
MeOHF:24-25	MeOHF9	Polvo amarillento
MeOHF:26-27	MeOHF10	Polvo amarillento
MeOHF:28-72	MeOHF11	Polvo amarillento
MeOHF:73-80	MeOHF12	Polvo café

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

La fracción MeOHF11, presentó un polvo amarillento, con un peso de 30 mg, este compuesto fue analizado mediante CCF observándose 3 manchas bastante separadas; 1 mancha superior se observaba en luz UV de 365 nm y 2 manchas céntrica e inferior se

observaban en luz UV 254 nm, por lo que se realizó CCF preparativa, eluída en una polaridad de AcOEt:MeOH:H₂O 10:0.6:0.3.

El compuesto observado a luz UV 365 nm fue aislado y recolectado, etiquetándolo con el código PPMeOH1, el cual presentó un polvo amarillento soluble en acetona, mediante CCF se observó que presentó una sola mancha, con un peso de 5.37 mg, con punto de fusión de 249-251 °C y R_f de 0.73, eluída en AcOEt:MeOH:H₂O 10:0.6:0.3. El cual se encuentra en proceso de identificación.

En la figura 20 se observa el perfil cromatográfico de la fracción PPMeOH1.

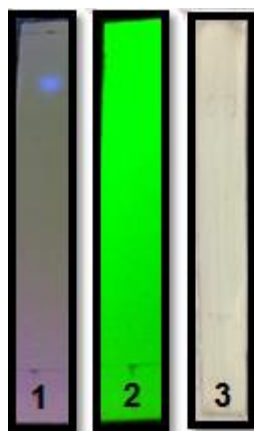


Figura 20. Cromatografía en capa fina de la fracción PPMeOH1 en luz UV de 365 nm (1), luz UV 254 nm (2), revelado de TLC con ácido sulfúrico y vainillina (3), polaridad AcOEt:MeOH:H₂O 10:0.6:0.3

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

4.2.3.3 Fracción PPMeOH2 del extracto metanólico

A la fracción MeOHF11 con peso de 30 mg, se la analizó por CCF mostrando 3 manchas, una mancha superior se observó en luz UV de 365 nm y dos manchas céntrica e inferior se observaron en luz UV 254 nm, por lo que se realizó CCF preparativa, se eluyó en una polaridad de AcOEt:MeOH:H₂O 10:0.6:0.3.

Se aisló y recuperó el compuesto céntrico que se observó en luz UV 365 nm y 254 nm, etiquetándolo con el código PPMeOH2, el cual presentó un polvo amarillento soluble en

acetona, mediante CCF se observó que presentaba una sola mancha, con peso de 6.20 mg, punto de fusión de 210-211 °C y Rf de 0.37, eluída en MeOH:H₂O 1:1.

Esta fracción se analizó mediante CG/EM mostrando un solo pico, a un tiempo de retención de 19.46, con peso molecular de 218 g/mol, el cual presentó un porcentaje de similitud del 95% con el decil benzeno según la base de datos Wiley 7n.I (Anexos, espectros 8-9). Este compuesto se encuentra en proceso de identificación.

En la figura 21 se observa el perfil cromatográfico de la fracción PPM₂.

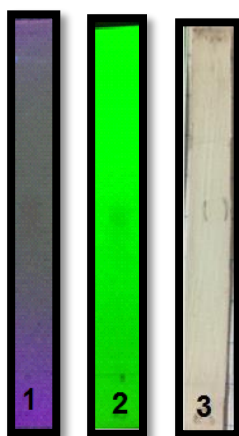


Figura 21. Cromatografía en capa fina de la fracción PPM₂ en luz UV de 365 nm (1) luz UV 254 nm (2), revelado con ácido sulfúrico y vainillina (3), polaridad MeOH:H₂O 1:1

Fuente: El autor

Elaboración: El autor

De la familia *Jatropha*, se han aislado metabolitos como polifenoles, el monoterpeno ascaridole, compuestos aislados de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de la especie vegetal *Jatropha curcas*, a los mismos que se les atribuye actividad antihelmíntica contra la formación de embriones en los huevos de *Haemonchus contortus*, que es un helminto propio de rumiantes el cual provoca una elevada tasa de mortalidad en ovejas y cabras (Quesada L., et al. 2009).

En un estudio fitoquímico de las especies vegetales *Jatropha gossypifolia* y *Jatropha gossypiflora*, de los extractos etanólicos se han aislado lignanos como: gossipidien y gossipifan, a estos compuestos se les atribuye actividad antiparasitaria (Chiappe A., et al. 2013).

CONCLUSIONES

El extracto con mayor rendimiento fue el extracto de metanol con 7.90%, y el extracto con menor rendimiento fue el extracto de acetato de etilo con un 1.90%.

Del extracto de acetato de etilo desclorofilado se logró identificar una mezcla de tres compuestos que son: Eicosano (1), heneicosano (2) y éster propílico del ácido palmítico (3).

Del extracto de acetato de etilo se obtuvieron dos compuestos probablemente puros, con pesos de 12.7 mg de cristales blanquecinos y 9.8 mg de un sólido blanco, los mismos que están en proceso de identificación.

Del extracto metanólico se logró aislar 6.20 mg de un polvo amarillento, probablemente puro, el cual fue analizado mediante CG/EM, donde se observó un solo pico, en cromatografía líquida (TLC) se observó una sola mancha, y masa molar de 218 g/mol, el mismo que se encuentra en fase de identificación.

RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio de la actividad antihelmíntica de los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y de los compuestos aislados de la especie vegetal *Jatropha nudicaulis*.

Utilizar técnicas con un mayor grado de selectividad como HPLC preparativa con el fin de tratar de aislar los componentes de las mezclas encontradas.

Continuar con la identificación y caracterización de los MS aislados.

BIBLIOGRAFÍA

A.J. King, W. He, J.A. Cuevas, M. Freudenberger, D. Ramiamanana, I.A. Graham. (2009). Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 10, pp. 2897–2905.

Akinmoladun A, Ibukun E, Afor E, Obuotor E, Farombi E. (2007) Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. *Scientific Research and Essay*; 5:163-6.

Araujo P., Carolina A. (2013). Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae). Trabajo de investigación para optar por el grado de Química Farmacéutica. Carrera de Química Farmacéutica. Quito: UCE. 132 p.

Ávalos A., Elena G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.

Banfi, D.; Patiny, L. (2008) Resurrecting and processing NMR spectra on-line *Chimia*, 2008, 62(4), 280-281.

Barnola P., Alarcon P., Maza M., Gavalda Ma., Saura I., Carreras A., Sinclair S., Carballido E. (2013). *Fitoquímicos. Productos químicos de las plantas*. Botanical. Universidad de Texas. Mexico.

Burkill H. (1994). *The useful plants of West Tropical Africa (Families EJ)*, Royal Botanical Gardens Kew, pp. 90-94.

Chávez G., Chávez D., Mendoza M., Luna L., Mejía M., Campos J., Mata S., Fuentes G., Galicia J. (2009). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). Buitrón, Ximena. (1999). Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para la conservación. Quito.

Cabieses, Fernando., Rolando Costa y Eduardo Estrella. (1998). *Recopilación andina de medicina tradicional (Bolivia, Ecuador, Perú)*. Editorial Panamerica. Quito-Ecuador.

Cai Z., Liu J, Wu J, Kou X, Hong Q. (2008). Studies on chemical constituents from *Grewia biloba*. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 3300042008. Oct; 31(10):1505-7.

Cao, C. M., Peng, Y., Shi, Q. W., y P. G (2008). Chemical constituents and bioactivities of plants of chloranthaceae. *Chemistry and Biodiversity*, 4(1), 220-235.

Chiappe A. (2013). Estudio fitoquímico de las hojas de la especie vegetal *Croton schiedeanus* (*Euphorbiaceae*). Productos Naturales Vegetales. Estudio Químico y de Actividad Biológica de Rutaceae y Myristicaceae Colombianas. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, Departamento de Química Bogotá D.C, Colombia.

Chife C. (2005). Garantía y control de calidad de materias primas vegetales para fines farmacéuticos. En: *LabCiencia*, 4 (8), 24-26.

Cosme Pérez, I. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural*, 18–22. Retrieved from http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/8921/1/tra6_p23-26_2010-0.pdf

Croteau, R. Kutcha, T.M., Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). pp. 1250-1318. In: B. Buchanan., W. Gruissem., and R. Jones R. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Vol. 24. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1367p.

Das B, Venkataiah B. (2001). A minor coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 213-214.

E. Ruiz-Bustos, C. Velázquez, A. Garibay-Escobar, Z. García, M. Plascencia-Jatomea, M.O. Cortéz-Rocha, J. HernándezMartínez, R.E. Robles-Zepeda. (2009) Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *J. Med. Food* 12 (6), 1398-1402.

Fagbenro-Beyioku, AF, Oyibo WA, Anuforom BC (1998). Disinfectant/antiparasitic activities of *Jatropha curcas*. *East Afr. Med. J.*, 75: 508-511.

Font, F. (2003). Las especies del género *Jatropha* L (*Euphorbiacea*, *Crotonoideae*) en Argentina. *Revista del Círculo de Coleccionistas de Cactus y Crasas de la República Argentina*. 2 (1):4-20.

García A. Ávalos., Pérez-Urria E. Carril. (2009). Metabolismo secundario de plantas Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.

García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y forrajes, 27(1), 1-12.

Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigación Textil Y de Cooperación Industrial*, (122), 35–41.

Hassan R., Bassam A. (2012). Medicinal Plants (Importance and Uses). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 03(10), 4172. <http://doi.org/10.4172/2153-2435.1000e139>.

Jaramillo O. (2007). Estados de Materia de Físico-Química. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 1-3.

Jorgensen, P & León, Y. (2000). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monographs of Systematic Botany of the Missouri Botanical Garden* 75: i–viii, 1–1182.

Karakas I., Yildirim A., Türker A., (2012), Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkia*.

León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa et H. Navarrete (eds.). (2011). Libro de las plantas endémicas del Ecuador, 2a. ed., Publicaciones del Herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Lozano C., P. E., T. E. Delgado Y Z. Aguirre M. (2002). La flora endémica de plantas vasculares del Parque Nacional Podocarpus. Pp. 453–460 en Z. Aguirre M., J. E. Madsen, E. Cotton y H. Balslev (eds.), *Botánica Austroecuatorialiana — Estudios sobre los Recursos Vegetales en las*.

M. Reddy, P. Sudheer, S. Mastan, H. Rahman, N. Carels, B. Bahadur. (2013) *Karyology and Genomics of Jatropha: Current Status and Future Prospects en Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*. Bahadur, B (ed.) New York, pp. 301-320.

Madsen J., Z. Aguirre M., E. Cotton y H. Balslev., (2002). Botánica Austroecuatoriana — Estudios sobre los Recursos Vegetales en las Provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchiipe. Pp. 289–303. Ediciones Abya Yala, Quito.

Makkar H., G. Francis, K. Becker, (2007) Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems, *Animal*, 1:1371-1391.

Marles, R., y Neil, D., (2008). "A contribution to the Ethno botanic in Ecuador". Edition special. Edit, International. Retrieved from http://clunix.uv.tr/cittream/123456789/5893/2/tra6_p78-81_2008-0.pdf

Marticorena C. (1998). Departamento de Botánica. Universidad de Concepción. Edición especial. Editorial independiente. Chile.

McNair, H.M. and J.M. Miller. (1997) *Basic Gas Chromatography*, ed. I. John Wiley & Sons.

Medare M., Peláez R., Álvarez R. (2012). Química Orgánica II. *En Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹H y ¹³C*, Fundamento. Univ. Salamanca. Facultad de Farmacia. (1)1-2.

Marie-Cécile Blanc, Pascale Bradesi, Maria José Gonçalves., Ligia Salgueiro and Joseph Casanova. (2005). Essential oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *Viscosa*: analysis by ¹³C-NMR and antimicrobial activity. 324 M.-C. BLANC ET AL. 2005 John Wiley & Sons, Ltd. *Flavour Fragr. J.* 2006; 21: 324–332 *Flavour And Fragrance Journal* *Flavour Fragr. J.* 2006; 21: 324–332.

Mujumdar AM, Misar AV, Salaskar MV, and Upadhye AS (2001). Antidiarrhoeal effect of an isolated fraction (JC) of *Jatropha curcas* roots in mice. *J. Nat. Remedies*, 1: 89-93.

Murganathan G., Chethan S. (2012) Antimicrobial constituents from plants.

Naranjo, Plutarco, y Ruperto Escaleras. (1995). *La medicina tradicional en el Ecuador: memorias de las Primeras Jornadas Ecuatorianas de Etnomedicina Andina*. Edit, Corporación Editora Nacional. Ecuador.

Neira L., Stashenko E., Escobar P. (2014). Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. Rev. Univ. Ind. Santander. Salud vol. 46 n°1. Bucaramanga Jan. /Apr.2014. Print version. ISSN 0121-0807.

Neyoy C. (2012). Fisiología Vegetal. Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui. Sonora, Mexico.

Oladele PE, Oshodi AA (2007). Nutritional potential of Berlandier nettle spurge (*Jatropha cathartica*) seed. Pakistan J. Nutr., 6(4): 345-348.

Pardo C. (2007). Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Fundamentos de Química Organica, 193–207.

Perez C. Ruth. (2000). Estudio de validación de la Metodología para la determinación de Vitamina A en Alimentos infantiles instantáneos por Cromatografía Líquida de alto rendimiento (HPLC). Rev. Perú. Med. Exp. Salud pública, 2000, vol.17, no.1-4, p.26-29. ISSN 1726-4634.

Plan de Ordenamiento Territorial del Honorable Consejo Provincial de Loja., (2007) Dirección de Planificación; Loja Ecuador.

Pongpan, N., Luanratana, O. y Suntornsuk, L. 2007. Rapid reversed-phase high performance liquid chromatography for vitexin analysis and fingerprint of *Passiflora foetida*. Current Science, 93 (3): 378-382.

Quesada L, Castaño O, Bilbao M. (2009). Antiparasitic effect of ethanolic and ethereal extracts of *Ficus obtusifolia* Kunth (*Moraceae*), against nematode class parasites (*Toxocara cati* and *Toxocara canis*). Infect. vol.13 no.4 Bogotá. Colombia. Oct./Dec. ISSN 0123-9392.

Rocha L. (2000). Control de calidad de productos Fito terapéuticos. Fundamentos de tecnología de productos Fito terapéuticos, 78, 157.

Santiana, J., Cerón, C. y Pitman, N. (2004). *Nudicaulis Jatropha*. La Lista Roja de la UICN de Especies Amenazadas 2004: e. T45197A10982230.

Santos S. (2011). Síntesis enantio selectiva del repelente bayrepel empleando reacciones de oxidación anódica. *Journal of Ethnopharmacology*.

Sern C., May C., Zakaria Z., Daik R. (2008). Synthesis of palmitic acid-based esters and their efecto on the pour point of palm oil methyl esters. *Journal of Oil Palm Research* Vol.20 December 2008 p. 541-547.

Shelles Flores. (1992) *Farmacia galénica*. Madrid, Selsa.

Srinivasan G., C Ranjith., K Vijayan. (2008). Identification of chemical compounds from the leaves of *Leea indica*. Organic Chemistry Research Laboratory Department of Chemistry University of Calicut Kerala-673 635, India.

Stransburger E., Noll F., Schenk H., & Schimper A. (1994). *Tratado de Botánica*. Marín. Barcelona, España. 520 p.

Strasburger E. (1986). "Botánica". Gustav Fischer Verlag 32ª edición actualizada por V. Denffer. Ziegler. Eherendorfer. Bresinsky 7ª edición española Editorial Marin, S.A. Barcelona., p. 867.

Tesso H. (2005). Isolation and Structure Elucidation of Natural Products from Plants. Hamburg: Institute of Organic Chemistry University of Hamburg. 126-131.

Timothy A. Leaf, Marvin S. Peterson, Sandra K. Stoup, David Somers³ and Friedrich Sriencl. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces pol y-3- hydroxybutyrate. Printed in Great Britain. *Microbiology*, 142, 1 169-1 180.

Torres L., Navarrete H., Muriel P., Macía M., Balslev H. (2008) *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Primera edición, pág. 527.

Valdés R., Balbín M. (2000). *Curso de fisiología y bioquímica vegetal*. UNAH. La Habana, Cuba. 89 p.

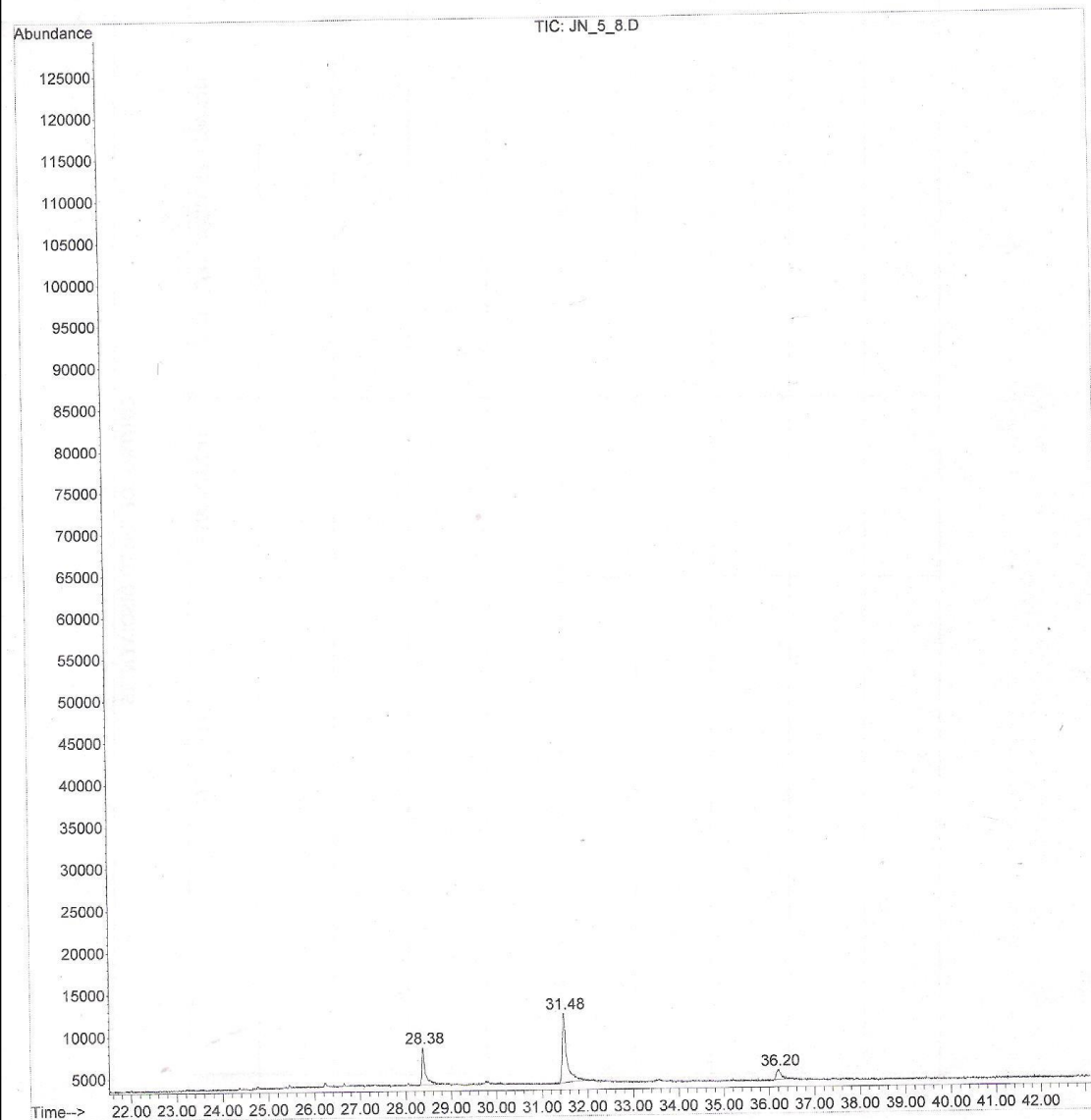
Villavicencio O., López V. (2012). *Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios*. Manual de Fitoterapia.

Voigt Rudolf. (1982). *Tratado de tecnología Farmacéutica*. España: Acriba.

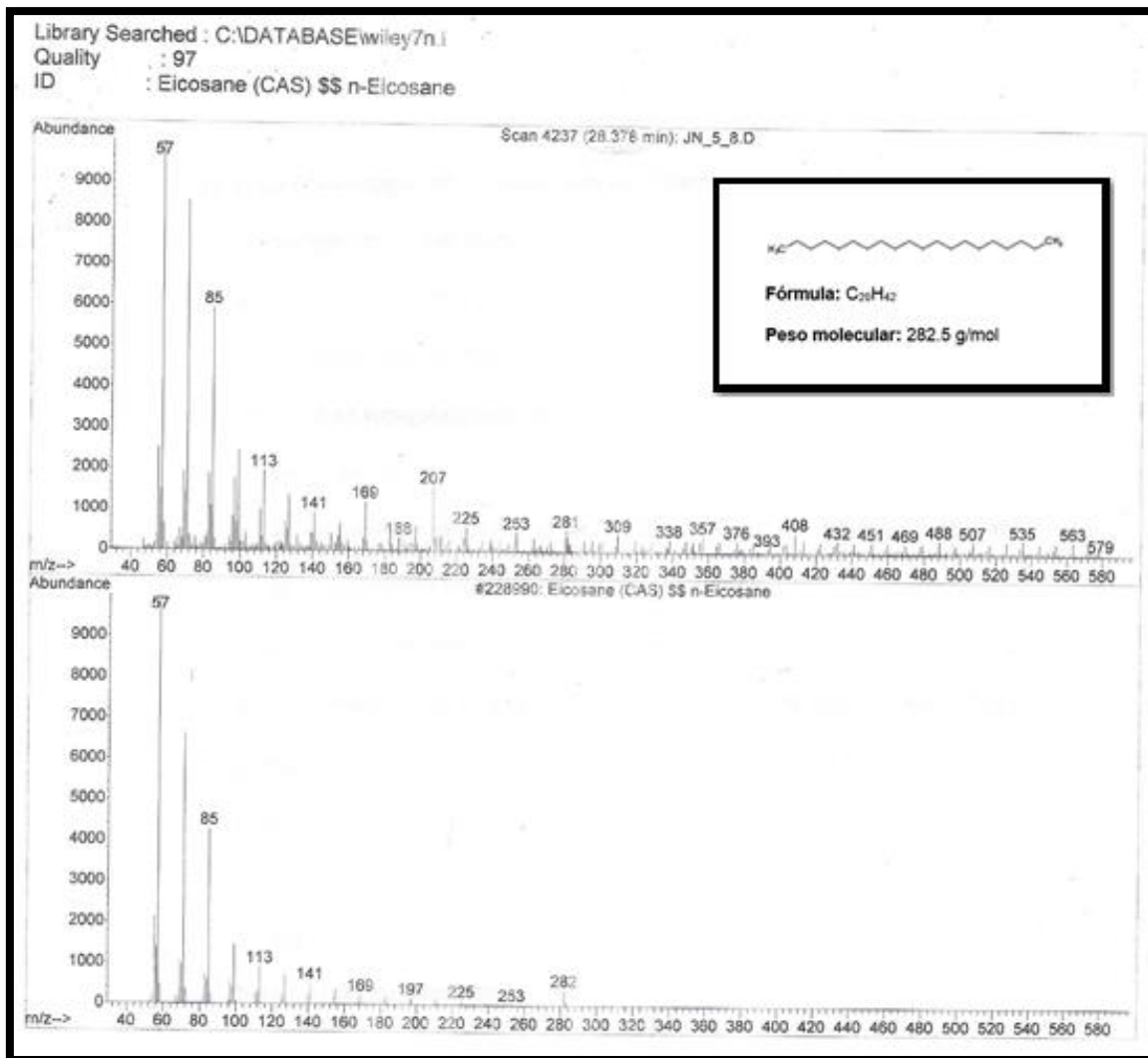
Zaicn V.G., R.S. Borisov. (2014). NIST Mass Spectrometry Data Center. NIST Standard Reference Data Program. U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. NIST MS 405146.

ANEXOS

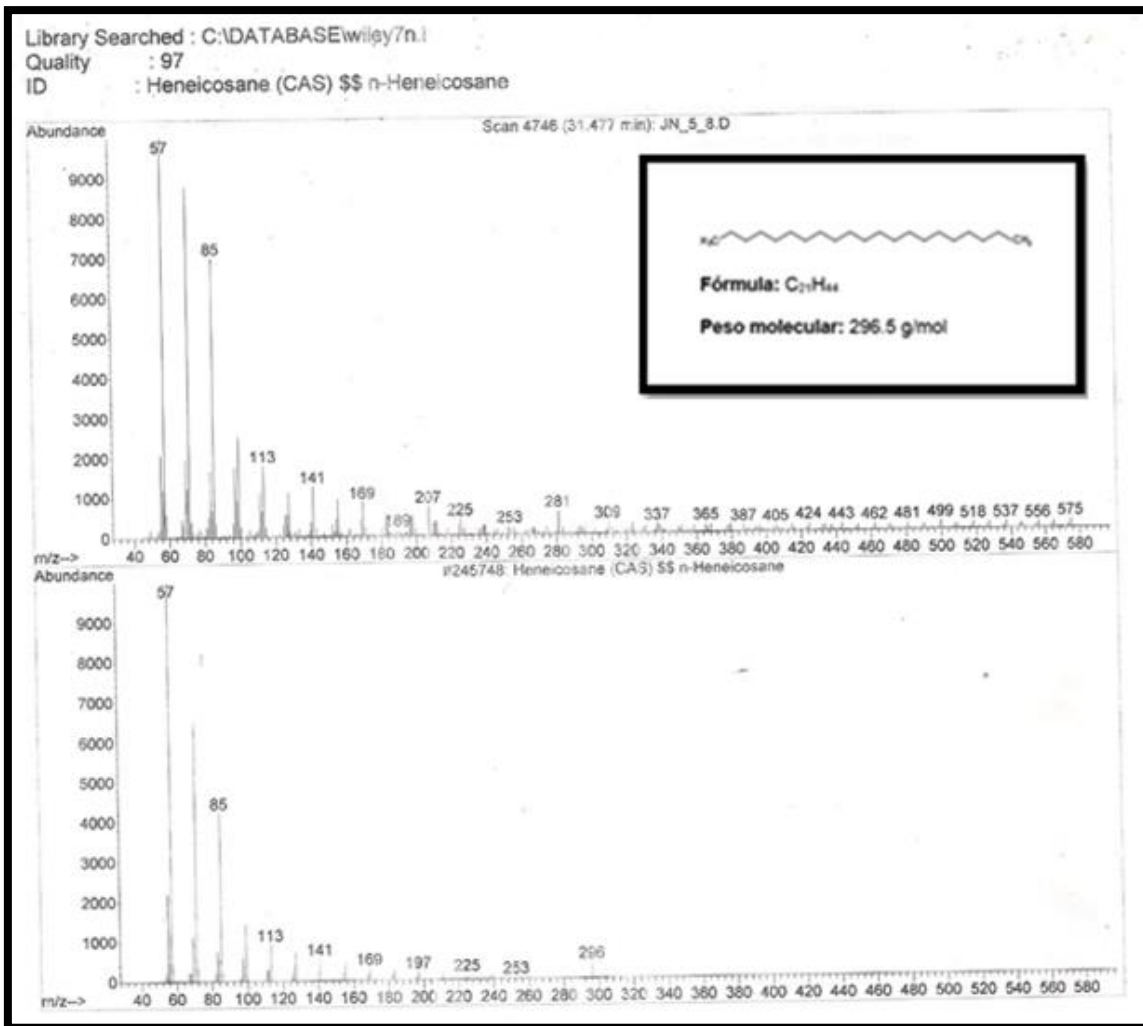
File :D:\MSDCHEM\DATA\2016\JUAN CARLOS\JN_5_8.D
Operator : JWCT
Acquired : 2 Aug 2016 18:06 using AcqMethod METODO_GENERAL
Instrument : GCMSD CET
Sample Name: JN_5_8
Misc Info :
Vial Number: 6



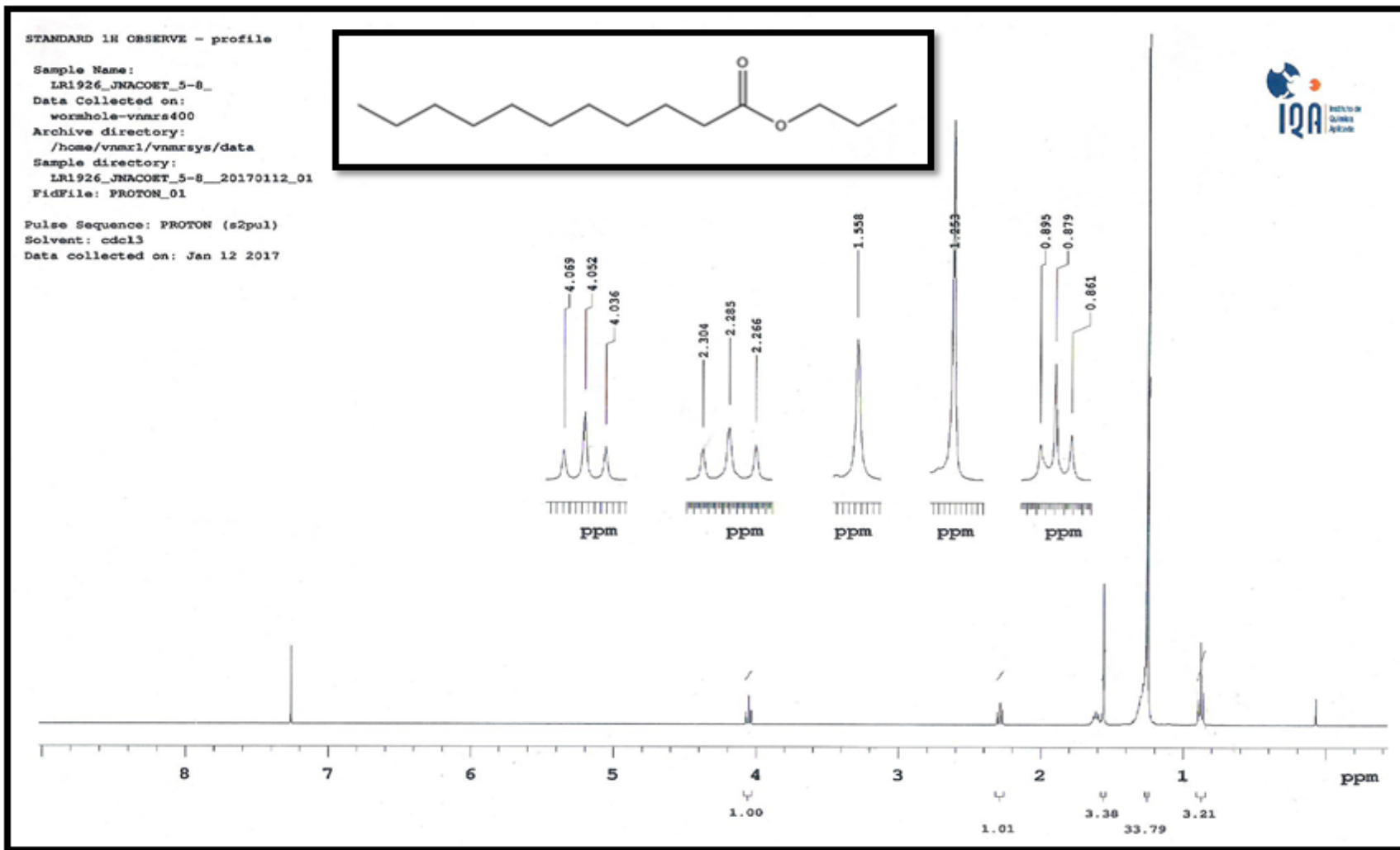
ANEXO 1. Espectro de Cromatografía de Gases de la fracción AcOEt₂ del extracto de acetato de etilo desclorofilado.



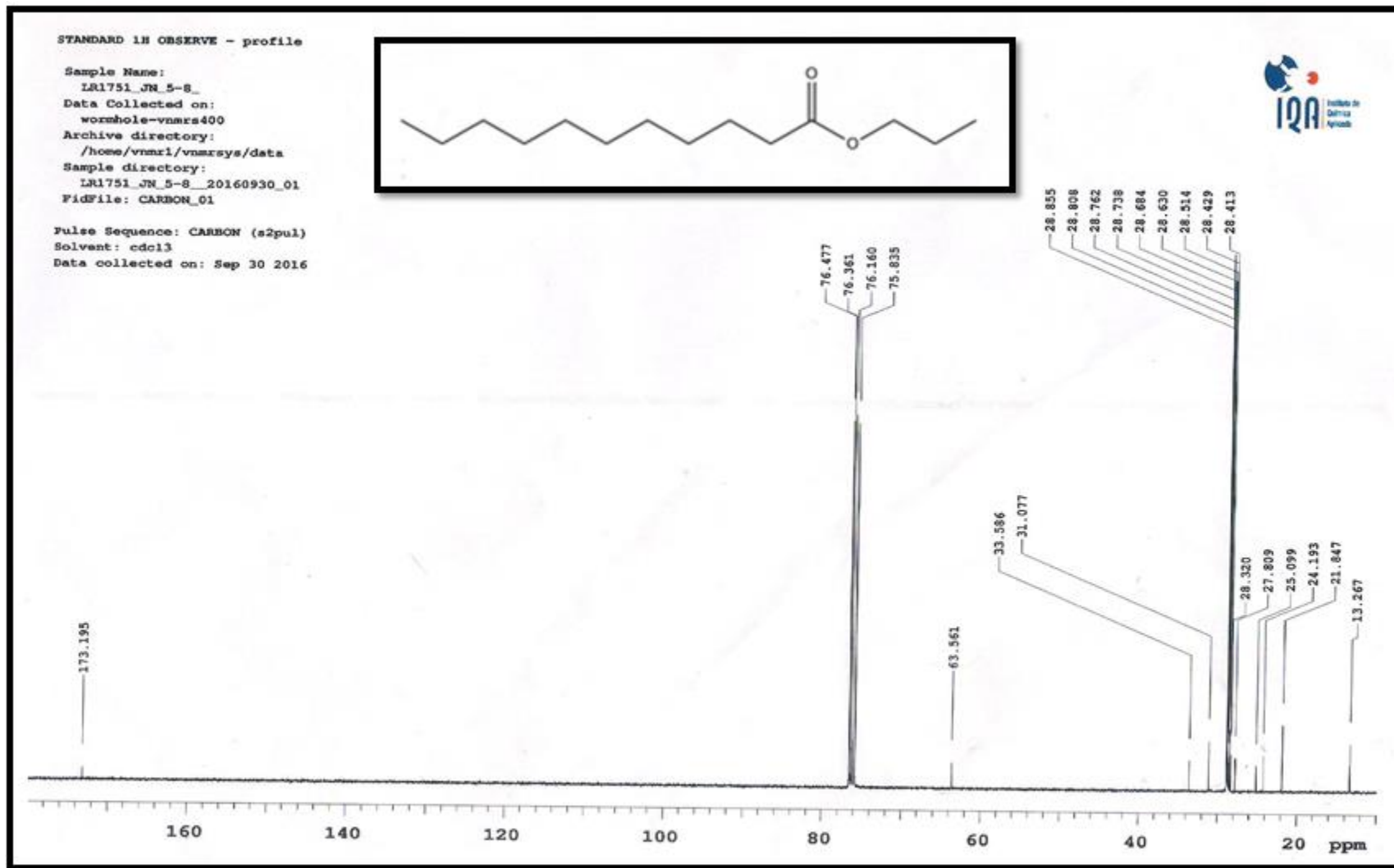
ANEXO 2. Espectro de Cromatografía de masas de la fracción AcOEt_2 del extracto de acetato de etilo desclorofilado, identificado como eicosano (1).



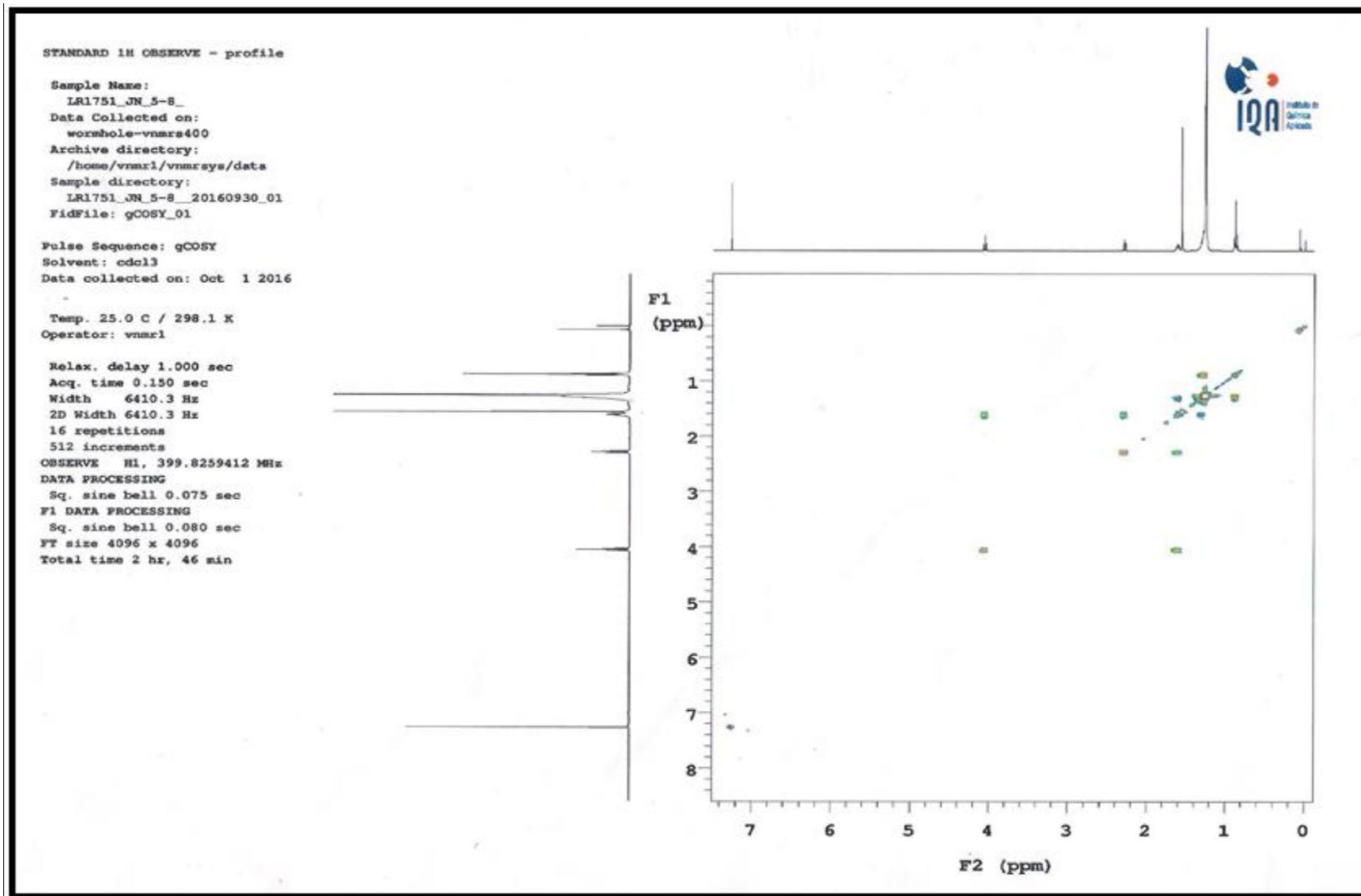
ANEXO 3. Espectro de Cromatografía de masas de la fracción AcOEt₂ del extracto de acetato de etilo desclorofilado, identificado como heneicosano (2).



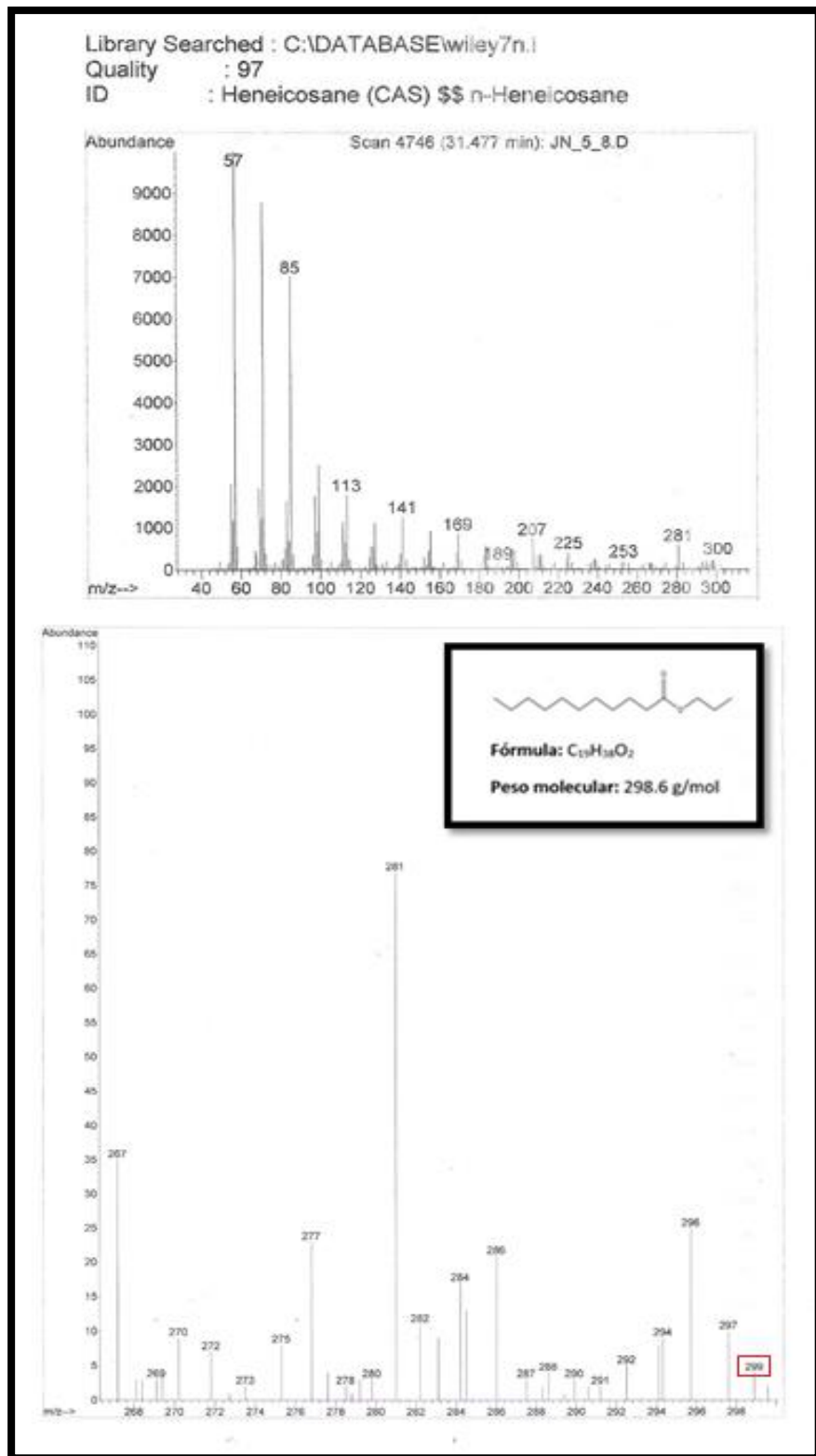
ANEXO 4. Espectro de ^1H RMN del compuesto éster propílico del ácido palmítico del extracto de acetato de etilo desclorofilado.



ANEXO 5. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto éster propílico del ácido palmítico del extracto de acetato de etilo desclorofilado.

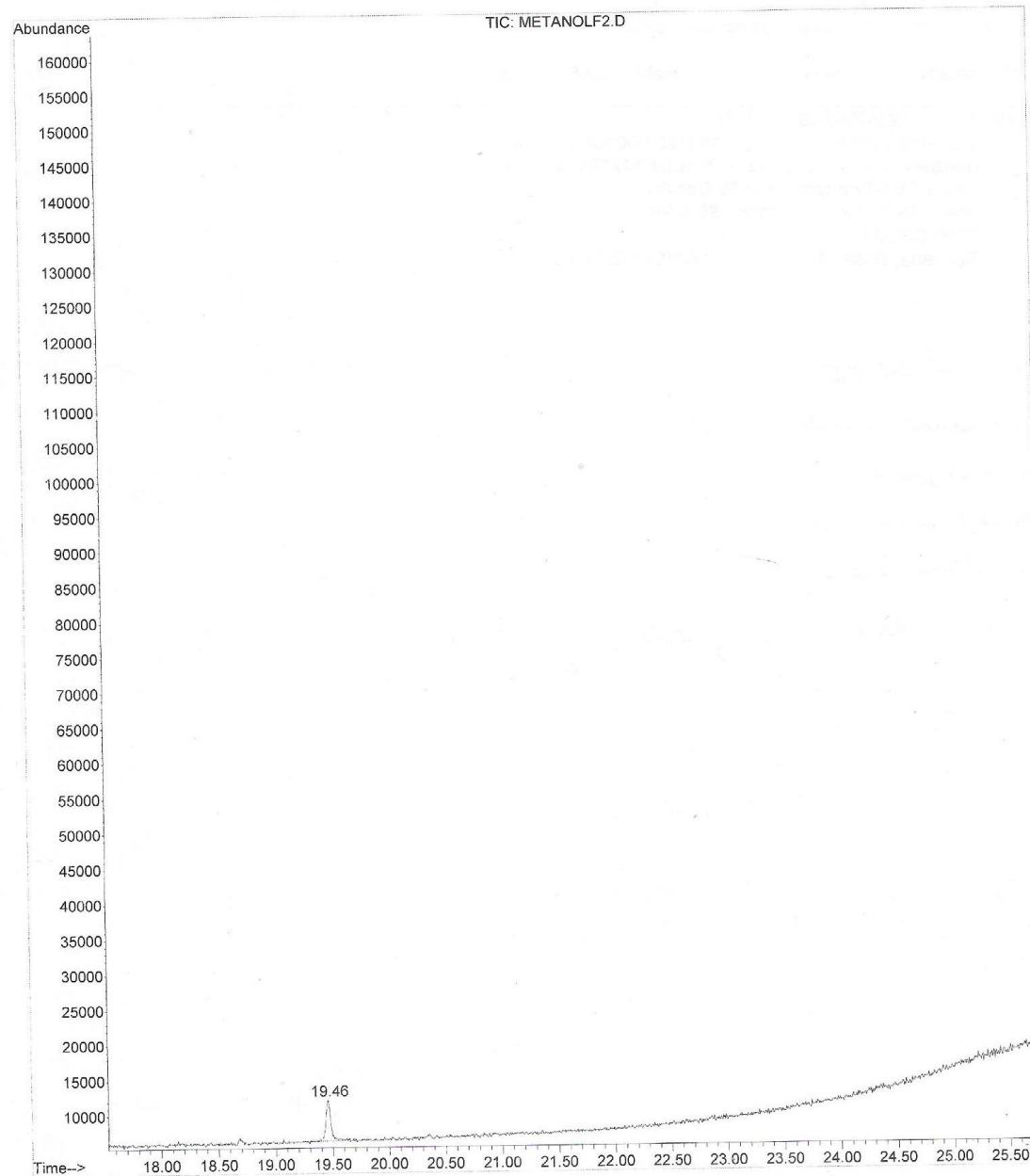


ANEXO 6. Espectro de COSY - RMN del compuesto éster propílico del ácido palmítico del extracto de acetato de etilo desclorofilado.

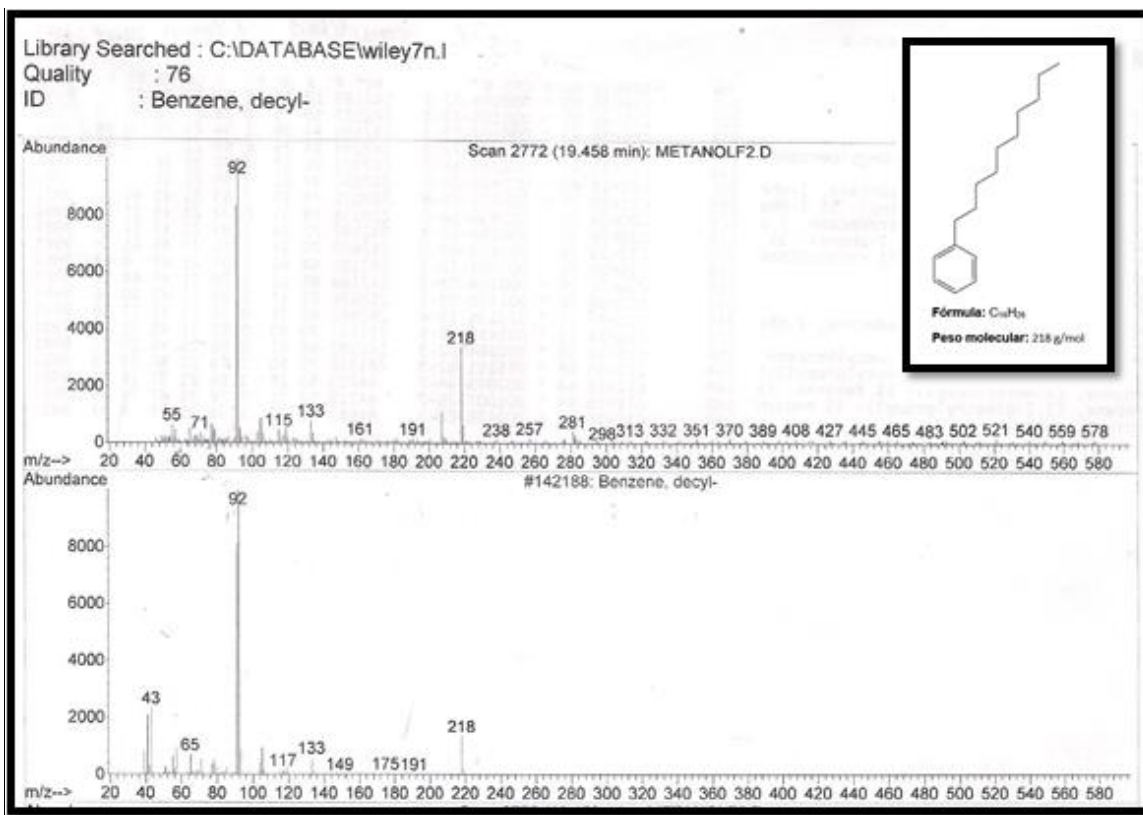


ANEXO 7. Espectro de Cromatografía de masas de la fracción AcOEt₂ del extracto de acetato de etilo desclorofilado, identificado como éster propílico del ácido palmítico (3).

File :D:\MSDCHEM\DATA\2017\Juan Carlos Romero\METANOLF2.D
Operator : JC
Acquired : 29 Jun 2017 11:05 using AcqMethod METODO_GENERAL
Instrument : GCMSD CET
Sample Name: METANOLF2
Misc Info :
Vial Number: 1



ANEXO 8. Espectro de Cromatografía de Gases de la fracción PPM_{OH2} del extracto metanólico



ANEXO 9. Espectro de Cromatografía de Masas de la fracción PPM_{OH2} del extracto metanólico.