



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

**Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Silybum marianum* L. Gaertn con posible actividad antitumoral**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Castillo Jaramillo, Johanna Maribel.

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

LOJA – ECUADOR

2018



*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>*

2018

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D. Juan Carlos Romero Benavides

**DOCENTE DE TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Silybum marianum* L. Gaertn con posible actividad antitumoral realizado por Castillo Jaramillo Johanna Maribel, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, enero del 2018

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Castillo Jaramillo Johanna Maribel, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Silybum marianum* L. Gaertn con posible actividad antitumoral de la titulación de Ingeniería Química, 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, o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico e institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

**Autor:** Castillo Jaramillo Johanna Maribel

**Cédula:** 1104892482

## **DEDICATORIA**

Siempre me he sentido maravillada y bendecida por la linda familia que tengo, me han cuidado y se han preocupado desde el momento en que nací y me han formado para saber cómo luchar y salir victoriosa ante las adversidades. Años después, sus enseñanzas no cesan, por eso quiero dedicar este trabajo de manera especial a mis padres: Miguel Castillo y Maribel Jaramillo, por ser el pilar fundamental en mi vida y por su incondicional apoyo, porque gracias a su sacrificio constante y amor han logrado apoyarme en cada uno de mis pasos para cumplir esta meta. Al dedicarles este trabajo quiero corresponder cada esfuerzo y sacrificio que han realizado. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

## **AGRADECIMIENTO**

Principalmente agradezco a Dios por ser mi mentor y mi guía, por permitirme crecer en una familia que me ha formado con su palabra y su amor. A mis padres y hermanos por ser siempre la palabra de aliento que motivaba mí día a día y sobre todo por ser un incondicional apoyo en vida.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por darme la oportunidad de formarme como profesional en sus aulas con los mejores guías y maestros.

A los ingenieros y maestros que dedicaron su tiempo para instruirme con sus conocimientos y formarme como profesional.

Al Dr. Juan Carlos Romero Benavides por su orientación, apoyo y sobre todo por instruirme con sus conocimientos en el transcurso de la realización de mí trabajo de investigación.

A los Bioquímicos Farmacéuticos Ronald Silva, Paola Castillo y Sara Vivanco, quienes con su conocimiento y paciencia me brindaron su apoyo y guía para poder culminar la fase experimental de mi trabajo de investigación.

Agradezco también al Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, especialmente al personal técnico: Mgtr James Calva e Mgtr. Mónica Vega por aportar en el desarrollo de mi proyecto de investigación.

## INDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA .....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTO .....	V
INDICE DE CONTENIDOS .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
ÍNDICE DE ANEXOS.....	X
ABREVIATURAS .....	XI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
<b>1. CAPÍTULO I .....</b>	<b>5</b>
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
<b>2. CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
2.1. Aspectos generales.....	8
2.1.1. Antecedentes.....	8
2.1.2. Biodiversidad en el Ecuador.....	8
2.1.3. Cáncer y medicina tradicional.....	9

2.1.4. Fitoquímica .....	10
2.1.5. Metabolitos secundarios .....	11
2.1.6. Descripción de las características de la familia Asteraceae y de la especie <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn. ....	11
2.1.6.1. Familia Asteraceae .....	11
2.1.6.2. Descripción de la especie <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn. ....	12
2.1.6.3. Composición química .....	13
2.2. Técnicas utilizadas para la obtención, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios .....	18
2.2.1. Maceración .....	18
2.2.1.1. Maceración Estática .....	18
2.2.2. Cromatografía.....	18
2.2.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	19
2.2.2.2. Cromatografía en columna abierta (CCA).....	20
2.2.3. Cristalización .....	20
2.2.4. Punto de fusión .....	21
2.2.5. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG/EM).....	21
2.2.6. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	21
<b>3. CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Materiales y métodos.....	24
3.2. Selección y preparación de la muestra .....	25
3.3. Materia vegetal .....	25
3.4. Obtención de extractos.....	26
3.5. Fraccionamiento de extractos .....	26
3.5.1. Cromatografía en columna abierta.....	26
3.5.1.1. Extracto Hexano.....	26
3.5.2. Cromatografía en capa fina.....	26
3.6. Unión y cristalización .....	27
3.7. Particiones del extracto de acetato de etilo.....	27
3.8. Microcolumna .....	29
3.9. Caracterización de metabolitos.....	29



3.9.1. Punto de fusión. ....	29
3.9.2. Factor de retención. ....	29
3.9.3. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (CG/EM). ....	29
3.9.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). ....	30
3.10. Evaluación de la actividad antitumoral de extractos y metabolitos secundarios. ....	30
<b>4. CAPÍTULO VI RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> .....	<b>32</b>
4. Resultados y análisis. ....	33
4.1. Obtención de extractos en hexano, acetato de etilo y metanol. ....	33
4.2. Rendimientos y análisis de los extractos obtenidos de <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn. ....	33
4.3. Evaluación de la actividad antitumoral. ....	34
4.4. Aislamiento de metabolitos secundarios. ....	35
4.4.1. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto de hexano. ....	35
4.4.1.1. Fracción HexF18. ....	38
4.4.1.2. Fracción HexF38. ....	41
4.4.2. Particiones del extracto de acetato de etilo. ....	42
4.4.2.1. Fracción Acuosa ....	43
4.4.2.2. Fracción de Acetato de etilo. ....	45
4.5. Caracterización e identificación de metabolitos secundarios. ....	47
4.5.1. Extracto de hexano. ....	47
4.5.1.1. Fracción HexF18FP12. ....	47
CONCLUSIONES .....	51
RECOMENDACIONES .....	52
BIBLIOGRAFÍA .....	53
ANEXOS .....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras de compuestos aislados de la especie <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn .....	13
<b>Figura 2.</b> Esquema de la metodología experimental empleada .....	24
<b>Figura 3.</b> Mapa del lugar de recolección de la especie vegetal <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn .....	25
<b>Figura 4.</b> Esquema de metodología para la partición del extracto de acetato de etilo	27
<b>Figura 5.</b> Partición del extracto de acetato de acetato de etilo .....	28
<b>Figura 6.</b> Extractos obtenidos de la especie <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn .....	33
<b>Figura 7.</b> Cromatografía en capa fina de la fracción HexF18.....	38
<b>Figura 8.</b> Cromatografía en capa fina de las uniones de la fracción HexF18FP .....	39
<b>Figura 9.</b> Cromatografía en capa fina de la fracción HexF18FP1 .....	39
<b>Figura 10.</b> Cromatografía en capa fina de las uniones de la fracción HexF18FP12 ...	40
<b>Figura 11.</b> Cromatografía en capa fina de la fracción Hex1 .....	41
<b>Figura 12.</b> Cromatografía en capa fina de las fracciones HexF38F1 y HexF38F2.....	42
<b>Figura 13.</b> Cromatografía en capa de la fracción AcHex1 .....	43
<b>Figura 14.</b> Cromatografía en capa fina de las uniones de fracciones de la microcolumna de la fracción AcBAE .....	46
<b>Figura 15.</b> Cromatografía en capa fina de la fracción AcBAEP1 .....	47
<b>Figura 16.</b> Estructura del compuesto identificado como acetato de moretenol .....	48
<b>Figura 17.</b> Caracterización de los extractos secos por HPTLC, revelado con luz UV de longitud de onda de 254nm y utilizando como revelador cloruro férrico al 1%. Se utiliza como un parámetro la medición de R <sub>f</sub> de las muestras.....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de <i>Silybum Marianum</i> L. Gaertn.....	13
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de operación del equipo CG/EM .....	30
<b>Tabla 3.</b> Rendimiento de los extractos de la especie vegetal <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn .....	33
<b>Tabla 4.</b> Inhibición de crecimiento celular de extractos.....	34
<b>Tabla 5.</b> Unión de fracciones de extracto de hexano .....	36
<b>Tabla 6.</b> Uniones de acuerdo a cromatografía en capa fina de la fracción HexF18 ...	38
<b>Tabla 7.</b> Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción HexF18FP .....	40
<b>Tabla 8.</b> Fracciones obtenidas de la partición del extracto de acetato de etilo.....	43
<b>Tabla 9.</b> Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción acuosa .....	44
<b>Tabla 10.</b> Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción AcBAF7 .....	44
<b>Tabla 11.</b> Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción AcBAE .....	45

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Espectro de Cromatografía de Gases del extracto de hexano de la especie <i>S. marianum</i> (L.) Gaertn de la fracción HexF18FP12, se muestran los 3 tiempos de retención destacados: 44.48, 43.66 y 44.18.....	60
<b>ANEXO 2.</b> Espectro de Cromatografía de Gases del extracto de hexano de la especie <i>S. marianum</i> L. Gaertn de la fracción HexF18FP12, correspondiente al compuesto identificado como acetato de moretenol con un tR= 44.18 min .....	61
<b>ANEXO 3.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del extracto de hexano de la especie <i>S. marianum</i> L. Gaertn de la fracción HexF18FP12, correspondiente al compuesto identificado como acetato de moretenol .....	62
<b>ANEXO 4.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del extracto de hexano de la especie <i>S. marianum</i> L. Gaertn de la fracción HexF18FP12, correspondiente al compuesto identificado como acetato de moretenol .....	63

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DMSO	Dimetilsulfóxido
D-384	Línea celular de astrocitoma cerebral
GLOBOCAN	Incidencia, mortalidad y prevalencia estimadas del cáncer en todo el mundo
Hex	Hexano
HCT-116	Línea celular de cáncer de colon
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alta resolución
HPCE	Electroforesis capilar de alto rendimiento
% INHB ± E.E	Porcentaje de inhibición más menos error estándar
MeOH	Metanol
MCF-7	Línea celular cáncer de mama
MS	Metabolitos secundarios
MTT	Metiltetrazolium
PC-3	Línea celular de próstata
Pf	Punto de fusión
Rf	Factor de retención
RKO	Línea celular de cáncer de colon
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear del Protón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear del Carbón

$t_R$  Tiempo de retención

UV Ultravioleta

## RESUMEN

La especie *Silybum marianum* L. Gaertn fue recolectada en el barrio Los Geranios, de la ciudad de Loja, cantón Loja; perteneciente a la Provincia de Loja. De las partes aéreas de la especie vegetal se obtuvieron 3 extractos con disolventes como: hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH), siendo el extracto de MeOH el que presentó mayor rendimiento con 11,96%. A los 3 extractos se les evaluó la actividad citotóxica (inhibición de crecimiento celular) mediante MTT en 3 líneas celulares de cáncer humano, MCF-7 (cáncer de mama), D-384 (astrocitoma cerebral), PC-3 (cáncer de próstata). Los extractos con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento celular fueron el de AcOEt y MeOH con 37,37 y 32,34, respectivamente en la línea celular de astrocitoma cerebral, los mismo que presentaron una inhibición celular de 15,54 y 16,03% respectivamente para la línea celular de cáncer de próstata. Los extractos fueron trabajados mediante técnicas de aislamiento, identificación y caracterización de metabolitos secundarios. De la fracción **HexF18FP12** del extracto hexánico se logró aislar, caracterizar e identificar el acetato de moretenol.

**Palabras claves:** *Silybum marianum* L. Gaertn, inhibición de crecimiento celular, MCF-7, D-384, PC-3, acetato de moretenol.

## ABSTRACT

The species *Silybum marianum* L. Gaertn was collected in the Los Geranios neighborhood, in the city of Loja, canton Loja; belonging to the Province of Loja. From the aerial parts of the plant species, 3 extracts were obtained with solvents, such as: hexane (Hex), ethyl acetate (AcOEt) and methanol (MeOH), being the MeOH extract the one with the highest yield with 11.96%. The 3 extracts were evaluated for cytotoxic activity (inhibition of cell growth) by MTT in 3 human cancer cell lines, MCF-7 (breast cancer), D-384 (cerebral astrocytoma), PC-3 (prostate cancer). The extracts with the highest percentage of cell growth inhibition were AcOEt and MeOH with 37.37 and 32.34, respectively, in the cell line of cerebral astrocytoma, which presented a cellular inhibition of 15.54 and 16.03% respectively for the prostate cancer cell line. The extracts were worked through techniques of isolation, identification and characterization of secondary metabolites. From the **HexF18FP12** fraction of the hexanic extract it was possible to isolate, characterize and identify the acetate of Moretenol.

**Key words:** *Silybum marianum* L. Gaertn, cell growth inhibition, MCF-7, D-384, PC-3, moretenol acetate.

## INTRODUCCIÓN

El mundo desde hace mucho tiempo se ve amenazado por el cáncer, esta enfermedad constituye un obstáculo al bienestar del desarrollo humano, siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Los resultados de GLOBOCAN (Proyecto de salud que tiene por objetivo proporcionar las estimaciones contemporáneas de la incidencia de la mortalidad y la prevalencia de los principales tipos de cáncer) muestran que en el 2012 hubo un estimado de 14,1 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en todo el mundo y 8,2 millones de muertes estimadas por cáncer, excluyendo el cáncer de piel. Esta tendencia se prevé que continúe en aumento en un 75%. Esto hará que el número de casos de cáncer llegue cerca de 25 millones en las próximas décadas. Más del 60% de los casos de cáncer en el mundo se producen en África, Asia y América Central y del Sur, y estas regiones representan aproximadamente el 70% de los casos de muerte por cáncer en el mundo. (Stewart & Wild, 2014).

A nivel mundial entre los hombres, los diagnósticos de cáncer con mayor frecuencia en el 2012 fueron: pulmón (16,7% del total), próstata (15%), colorrectal (10%), estómago (8,5%), e hígado (7,5%). Entre las mujeres, fueron: mama (25,2% del total), colon y recto (9,2%), pulmón (8,7%), cuello uterino (7,9%) y estómago (4,8%) (Stewart & Wild, 2014).

La incidencia de cáncer en el Ecuador se encuentra a nivel medio en la escala mundial y regional, es la segunda causa de muerte en el país. Según GLOBOCAN se estimó que en el 2013 la incidencia de cáncer en hombres fue de 125,9 y en mujeres fue de 134,9 casos por cada 100 000 habitantes (Espinoza, 2017).

El cáncer que se presenta con mayor frecuencia en mujeres es el de mama (34,7 casos por cada 100 000 mujeres) y en los hombres el cáncer de próstata es el más frecuente, con una incidencia de 37,8 casos por cada 100 000 hombres (Espinoza, 2017).

En el 2015 se estimó un 4,7% de muertes por cáncer en una población de 30 a 64 años, este porcentaje se estima que irá en aumento hasta un 45% para el 2030 (Espinoza, 2017).

El Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad del continente y del mundo, con un alto número de especies de plantas por unidad de área en América del Sur. Su posición geográfica y la presencia de la cordillera de Los Andes determinan la existencia de una enorme variedad de bosques y microclimas. Existen alrededor de 25 000 especies vasculares distribuidas en las distintas regiones geográficas del país, siendo la familia Asteraceae la más rica con 43 géneros y 249 especies (Tapia, Zambrano et al., 2008).



Las plantas son consideradas como fuente de productos metabólicos y son utilizadas en diferentes ramas de la industria como: farmacéutica, alimenticia, cosmética y agroquímica, entre otras. Los metabolitos secundarios son compuestos que se distribuyen limitadamente entre grupos taxonómicos diferenciados (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

El género *Silybum* perteneciente a la familia Asteraceae, comprendía dos especies: *Silybum marianum* y *Silybum eburneum*, la incompatibilidad que se esperaba entre estas dos especies no fue encontrada, por lo que el género *Silybum* tiene una sola especie a estudiar, *Silybum marianum* L. Gaertn (Corchete, 2008), nativa de la región mediterránea y se cultiva en América y el sur de Europa (Lin et al., 2007).

Las hojas de la planta y las semillas se han utilizado continuamente desde tiempos de los Romanos para tratar muchas enfermedades (Cancer & Yarnell, 1929). Esta planta contiene la silimarina (1,5 a 3%), una mezcla de isómeros de tres flavolignanos (silicristalina, silidianina y silibina), de los que se encuentran sus desoxiderivados, así como isosilicristalina, isosilibina y su desoxiderivado silandrina, silihermina, neosiliherminas A y B. Asimismo se han encontrado flavonoides: taxifolia, quercetina, dihidrokempferol, kaempferol, apigenina, naringina y otros. Contiene además ácido linoleico, ácido oleico y ácido palmítico (Fonnegra, 2007). La silimarina y su componente activo, la silibina son de considerable interés farmacológico debido a su fuerte actividad anti-hepatotóxica y hepatoprotector, además de tener actividad antitumoral (Roustakhiz & Saboki, 2016).

La silimarina y silibina han sido evaluadas por su capacidad para ejercer efectos citotóxicos directos, mitigar la toxicidad de ciertos agentes contra el cáncer, y mejorar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos (Greenlee et al., 2007). La silibina es el componente principal que forma el 70-80% de la silimarina y consta de dos isómeros, silibina A y B (30-50%), que han mostrado actividad antineoplásica en varios modelos de cáncer (próstata, pulmones, astrocitoma cerebral, riñones, páncreas, hígado y piel), y en estudios clínicos fase I en pacientes con cáncer (Lin et al., 2007).

La especie *Silybum marianum* L. Gaertn contiene importantes concentraciones de silimarina y silibina; por ello en este proyecto evaluamos la actividad antitumoral de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de *Silybum marianum* L. Gaertn en tres líneas celulares de cáncer humano y se fraccionó mediante cromatografía en columna los extractos más activos.

**CAPÍTULO I**  
**FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO**

## **1.1. Fin, propósito y componentes del proyecto.**

### **1.1.1. Fin del proyecto.**

Contribuir con el estudio de metabolitos secundarios a partir de *Silybum marianum* L. Gaertn con posible actividad anticancerígena.

### **1.1.2. Propósito del Proyecto.**

Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Silybum marianum* L. Gaertn con posible actividad antitumoral.

### **1.1.3. Componentes del Proyecto.**

- Seleccionar y recolectar la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn.
- Obtener extractos con disolventes de polaridad ascendente: hexano, acetato de etilo y metanol.
- Aislar, identificar y caracterizar los compuestos obtenidos.
- Evaluar la actividad antitumoral de los extractos y metabolitos secundarios aislados en tres líneas celulares de cáncer humano.

**CAPÍTULO II**  
**MARCO TEÓRICO**

## **2.1. Aspectos generales.**

### **2.1.1. Antecedentes.**

El uso de plantas medicinales se remota desde tiempos ancestrales de regímenes coloniales y republicanos, este tipo de medicina tradicional ha tenido una sostenida permanencia en pueblos de bajos recursos como: indios, montubios, campesinos y mestizos, quienes encontraron en este tipo de medicina una alternativa menos costosa y más vinculada a su cosmovisión (Naranjo & Escaleras, 1995).

La cosmovisión andina en el Ecuador, posee una serie de elementos enriquecedores y expresiones culturales de gran valor, tales como la medicina tradicional andina, plantas milenarias y procesos curativos ancestrales (Méndez, 2013). La fitoterapia, una de las prácticas más antiguas, es la medicina más tradicional y tratada del mundo y se fundamenta en el empleo de extractos o principios activos de las plantas (López, 2012).

El conocimiento tradicional de las plantas medicinales y la medicina tradicional ha recobrado un lugar importante en los países desarrollados y sobre todo en los países en vías de desarrollo (Ponz et al., 2005). La industria farmacéutica ha realizado estudios para desarrollar tanto la síntesis como la producción de fármacos, muchos son replicados y otros obtenidos mediante aislamiento de principios activos de plantas tradicionales (Estrada & Imbaquingo, 2015).

### **2.1.2. Biodiversidad en el Ecuador.**

La biodiversidad es considerada por definición como una variedad de formas de vida que se extienden en un ambiente natural, involucrando todas las especies vegetales, animales, microorganismos y material genético (Piantanida, 2011).

El Ecuador es considerado como un país de gran biodiversidad en relación con su reducido territorio, por esta razón se encuentra formando parte del pequeño grupo de países mega diversos (Arévalo, 2010), siendo así uno de los 17 países con mayor concentración biodiversa del planeta (Quiroz, 2008). Las razones para que el Ecuador sea considerado un país megadiverso se debe a su singular topografía, su diversidad de zonas climáticas, su ubicación en una zona tórrida bajo la línea ecuatorial, estar atravesado por la Cordillera de los Andes y tener sus Costas hacia el Océano Pacífico. Debido a estos factores el Ecuador cuenta con una multiplicidad de especies vegetales y animales (Bravo Velásquez, 2013).

En cuanto a especies vegetales en el Ecuador cuenta con 25000 especies vasculares distribuidas en diferentes regiones geográficas del país (Tapia & Zambrano, 2008) y existen aproximadamente 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas utilizadas con fines terapéuticos. El 75% de estas especies son plantas nativas, el 5% endémicas y el 11% son introducidas. En el ámbito terapéutico se utiliza las hojas en un 30%, la planta entera en un 10% y las flores o inflorescencias en un 6% (Balslev et al., 2008).

En los últimos años se ha notado un acrecentamiento de la demanda de productos naturales, debido a que las plantas presentan una gran diversidad de compuestos que se utilizan con fines terapéuticos (Hernández, 2017). La Organización Mundial de la Salud estima que el 80% de la población de los países en desarrollo sigue dependiendo de la medicina tradicional, la estrategia de la OMS para ayudar a zonas rurales en el 2014-2023 es buscar mejoras en el ámbito de la salud y autonomía de los pacientes que hacen uso de esta medicina tradicional para tratar enfermedades de diferente índole (Chan, 2013).

Las plantas han sido consideradas de gran importancia para la producción de medicamentos debido a que producen una gran cantidad de moléculas bioactivas (Pehlivan Karakaş et al., 2012).

Los productos naturales obtenidos de especies vegetales han tenido un importante papel en el tratamiento de cáncer. Es por eso que se está implementando la medicina tradicional como nueva terapia contra esta enfermedad crónica degenerativa (Hernández, 2017).

### **2.1.3. Cáncer y medicina tradicional.**

Desde tiempos pasados la humanidad se ve amenazada por el cáncer, es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. El término «cáncer» se aplica generalmente para cualquier enfermedad, presentándose tumores malignos en diferentes localizaciones afectando a cualquier parte del organismo (Stewart & Wild, 2015).

A nivel mundial, hubo 14,1 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes en el 2012, estas estimaciones no incluyen los cánceres de piel y melanoma. Para el 2030, se espera que la incidencia del cáncer a nivel mundial se incremente en un 75% en un aproximado de 21,7 millones de nuevos casos y 13 millones de muertes (American Cancer Society, 2015).

En el Ecuador según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los tipos de cáncer más comunes en mujeres y hombres son el de mama y próstata respectivamente, y de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) en el año 2013 se registraron 8191 defunciones. La incidencia y la mortalidad por cáncer están aumentando rápidamente en todo el mundo, especialmente en los países de ingresos bajos y medios (Vance, 2015).

Por lo tanto, desde un punto de vista farmacológico se busca encontrar un fármaco que logre combatir las células cancerígenas sin dañar las células normales, buscando alternativas en los principios activos de fuentes naturales como potenciales agentes quimioterapéuticos (Laza et al., 2003).

La medicina tradicional en el Ecuador es poseedora de un rico legado cultural que ha pasado de generación en generación en las comunidades nativas. Un alto porcentaje de la población mundial hace uso de los remedios naturales y medicamentos tradicionales, es decir la cultura ecuatoriana tiene el conocimiento ancestral de los diferentes grupos étnicos sobre el uso de plantas silvestres y cultivadas principalmente con fines terapéuticos, afirmando que gran parte de las terapias tradicionales entrañan el uso de extractos de plantas o de sus principios activos (Tene et al., 2007; Balslev et al., 2008).

Conocimiento que puede ser aprovechado para el estudio fitoquímico de las diferentes especies vegetales utilizadas con fines terapéuticos, como en el caso de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn la misma que presenta posible actividad antitumoral de acuerdo a información bibliográfica.

#### **2.1.4. Fitoquímica.**

La fitoquímica es el estudio de la química de las plantas, el prefijo “phyto” se deriva del griego *phyto* que significa planta (Doughari et al., 2009). Esta abarca procesos químicos que producen las plantas como la absorción de nutrientes inorgánicos como: dióxido de carbono, nitrógeno, agua, fósforo, potasio, etc., para dar lugar a la formación de: proteínas, grasas, azúcares, etc. Los productos vegetales contienen un extenso grupo de materiales y productos químicos naturales que son utilizados como materias primas en la industria (*Dorland: Diccionario enciclopédico ilustrado de medicina*, 2005). La fitoquímica nos permite identificar compuestos de importancia como: cumarinas, lignanos, glúcidos, quinonas, taninos, flavonoides, fitoesteroles, alcaloides, terpenos, entre otros. (Bermúdez Cañete, 2009).

### **2.1.5. Metabolitos secundarios.**

El metabolismo es conjunto de cambios químicos y biológicos que se producen en las células de los seres vivos, sintetizando sustancias complejas a partir de sustancias más simples (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011). Todas las especies vegetales están conformadas por un metabolismo primario y un metabolismo secundario, el mismo que les permite producir y almacenar diversos compuestos de interés farmacológico (Ávalos & Elena, 2009).

Los metabolitos secundarios presentan propiedades biológicas y funciones ecológicas, pero principalmente se caracterizan por los diferentes usos y aplicaciones en el ámbito terapéutico, estos productos naturales se encuentran distribuidos en diferentes grupos taxonómicos (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

Las plantas producen un gran número de metabolitos secundarios (aproximadamente 100 000) (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011). Pero estos productos naturales no se encuentran en todas las especies de plantas debido a que se sintetizan de forma generalizada y en mínima cantidad, consiguiendo una producción más específica y limitada a una determinada especie, género o familia de plantas (Ávalos & Elena, 2009).

Su estudio implica utilizar tecnologías diversas para su producción, caracterización e identificación (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011), considerando factores como la biosíntesis de los metabolitos, ya que esta suele estar restringida a estados específicos de desarrollo y a periodos de estrés (Ortega Maldonado, 2012).

Los productos naturales de interés se pueden clasificar en terpenos, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos de acuerdo a sus rutas biosintéticas (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

### **2.1.6. Descripción de las características de la familia Asteraceae y de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn.**

#### **2.1.6.1. Familia Asteraceae.**

Las familias Asteraceae, o de las compuestas (Compositae), es el grupo de plantas vasculares más grandes. Se estima que en el mundo existen alrededor de 1535 géneros y 23000 a 32000 especies (Duran Garcia & Mendez Gonzalez, 2010). Por lo que son la familia de angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica. La familia está caracterizada por presentar las flores dispuestas en una inflorescencia compuesta las cuales se encuentran rodeadas de filas de brácteas. El nombre "Asteraceae" deriva del



griego *Aster* que significa “estrella” y hace alusión a la forma de la inflorescencia (Soto Montoya, 2015).

Está distribuida en todas las latitudes y altitudes que van desde el nivel del mar hasta las zonas alpinas, por lo que es posible encontrar ejemplares en todos los tipos de vegetación, desde plantas herbáceas, arbustos, trepadoras, estepifitas y suculentas hasta árboles. La diversidad de la familia puede atribuirse, entre otros factores, a su plasticidad genética, sus excelentes mecanismos de dispersión y su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ecológicas. Aunque la familia alcanza una mayor diversidad en las zonas templadas y menor en las zonas tropicales (Duran Garcia & Mendez Gonzalez, 2010).

Las plantas de la familia Asteraceae presentan un perfil medicinal, investigaciones han revelado que muchos componentes de esta familia son altamente bioactivos, por lo que han sido utilizadas tradicionalmente desde la antigüedad como antiinflamatorios, antioxidantes, antivirales, anticancerígenos, antineoplásicos, hepatoprotectores, laxantes, antifibrótico, antibacterianos, astringentes, antipiréticos, entre otras (Achika et al., 2014).

Varios efectos medicinales de estas plantas pueden deberse a la presencia de una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos tales como flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos) y esteroides que han sido frecuentemente reportados de las familias Asteraceae. Además presentan compuestos como lactonas sesquiterpénicas que tienen actividad antitumoral, antiulcerosa, cardiotónica y neurotóxica (Achika et al., 2014).


#### **2.1.6.2. Descripción de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn.**

*Silybum marianum* L. Gaertn, también conocida como cardo mariano, es una especie herbácea anual o bienal, nativa de región mediterránea y originaria de Europa, se localiza al sur de Europa, norte de África y medio Oriente (Taboas, 2008). Crece en terrenos infértiles, rocosos y bien iluminados, a los costados de las aceras y caminos (Moench, 2007).

Esta especie se caracteriza por tener en sus hojas ovaladas franjas de color blanco lechoso siendo de un color verde lustroso, presentan márgenes fuertemente espinosos y llegan a medir hasta 30 cm. El tallo tiene una altura entre 20 y 180 cm, de apariencia ligeramente aracnoide pubescente, erecto y raramente ramificado; las flores son de tonalidad violáceo o púrpura, se agrupan en capítulos solitarios de 2.5 a 4 cm de diámetro están ubicadas en el ápice de los tallos florales (Taboas, 2008). El fruto es el aquenio es

de color negro brillante mide de 6-7 mm de longitud, 3 mm de ancho y 1,5 mm de espesor, está compuesto de 6-8 semillas blancas y tiene un conjunto de pelillos que rodean las flores de hasta 20 mm. Esta especie florece en los meses de mayo y junio (Moench, 2007). En la tabla 1 se muestra la taxonomía de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn.

**Tabla 1.** Taxonomía de *Silybum Marianum* L. Gaertn.

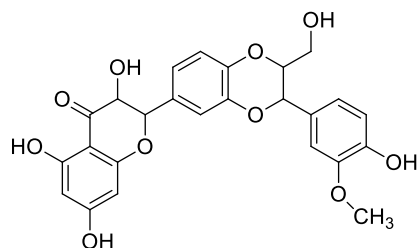
Reino	Plantae	
División:	Magnoliophyta	
Clase:	Magnoliopsida	
Orden:	Asterales	
Familia:	Asteraceae	
Sub-familia:	Cichorioideae	
Tribu:	Cardue	
Género:	Silybum	
Especie:	<i>Silybum marianum</i>	

Fuente: (Taboas, 2008).

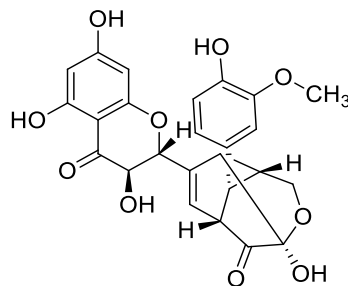
Elaborado por: Castillo, J. 2017

### 2.1.6.3. Composición química.

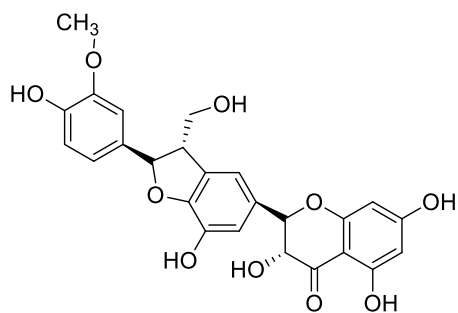
La especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn contiene silimarina, una mezcla de isómeros de tres flavolignan (silibina (1), silidianina (2), silicristalina (3)), de los que se encuentra sus desoxiderivados, así como isosilicristalina (4), isosilibina (5) y 3-desoxiderivado silandrina (6), 3-desoxiderivados silihermina (7), neosiliherminas A (9) y B (10). Asimismo se han encontrado flavonoides como: taxifolia (10), quercetina (11), dihidrokempferol (12), kaempferol (13), apigenina (14), naringina (15) y otros. Contiene además ácido linoleico, ácido oleico y ácido palmítico. (Fonnegra G and Jiménez R, 2007). A continuación se muestran las estructuras moleculares de algunos compuestos aislados de la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn. (Figura 1.).



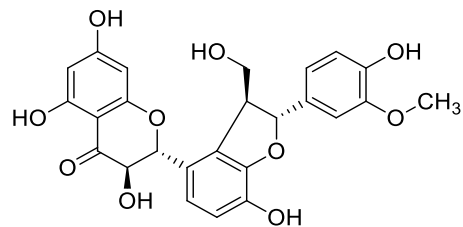
Silibina (1)



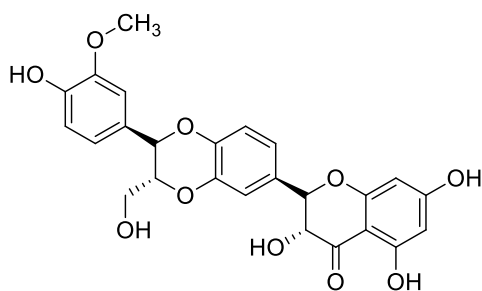
Silidianina (2)



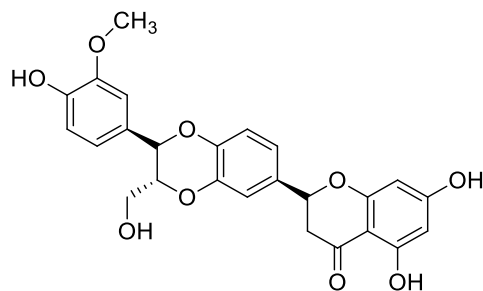
Silicristalina (3)



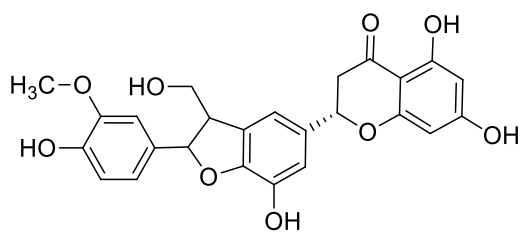
Isosilicristalina (4)



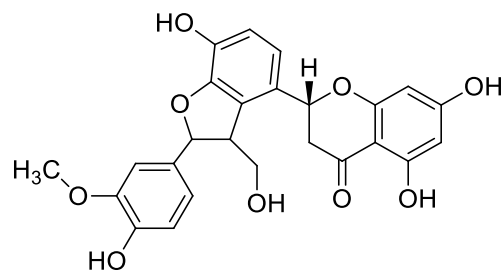
Isosilibina (5)



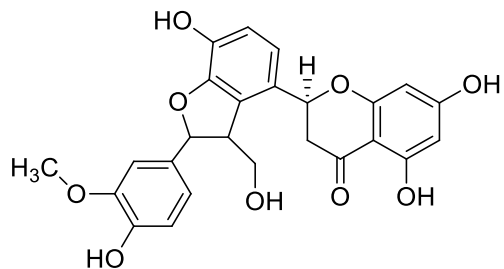
Silandrina (6)



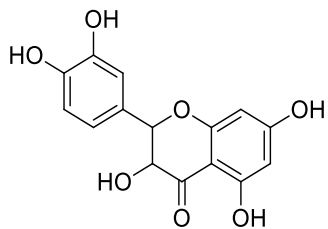
Silihermina (7)



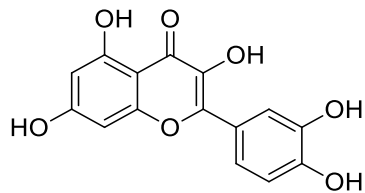
Neosilihermina A (8)



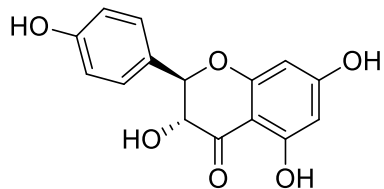
Neosilihermina B (9)



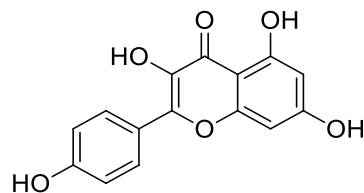
Taxifolia (10)



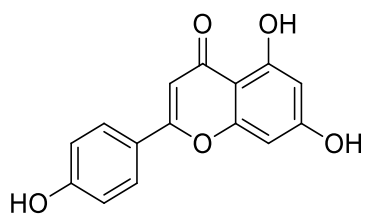
Quercetina (11)



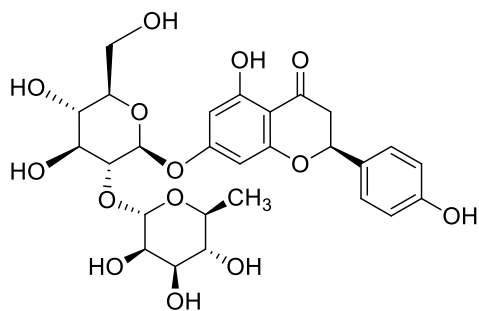
Dihidrokaempferol (12)



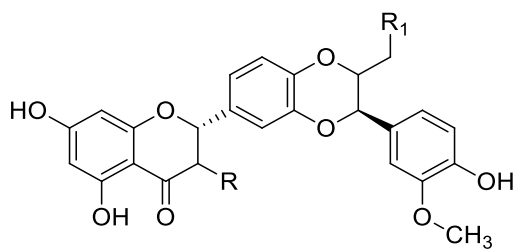
Kaempferol (13)



Apigenina (14)

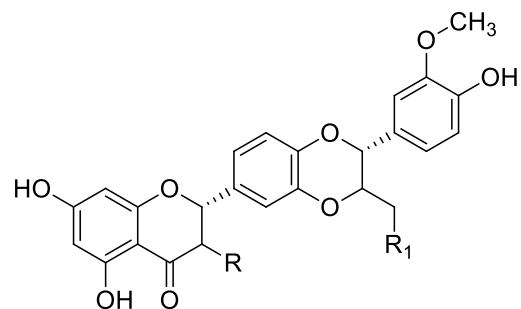


Naringina (15)



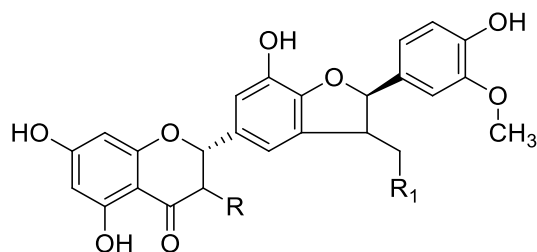
Silibina A (16)  $R = \blacktriangleleft OH$   $R_1 = \cdots\cdots\cdots CH_2 - OH$

Silibina B (17)  $R = \blacktriangleleft OH$   $R_1 = \blacktriangleleft CH_2 - OH$



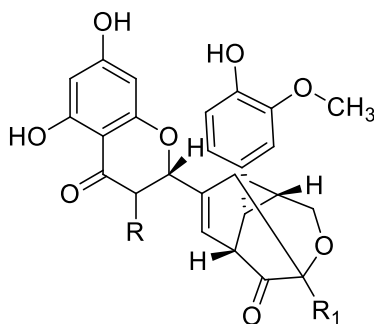
Isosilibina A (18)  $R = \blacktriangleleft \text{OH}$   $R_1 = \blacktriangleleft \text{CH}_2\text{—OH}$

Isosilibina B (19)  $R = \blacktriangleleft \text{OH}$   $R_1 = \cdots\cdots\cdots\text{CH}_2\text{—OH}$



Silicristalina A (20)  $R = \blacktriangleleft \text{OH}$   $R_1 = \cdots\cdots\cdots\text{CH}_2\text{—OH}$

Silicristalina B (21)  $R = \blacktriangleleft \text{OH}$   $R_1 = \blacktriangleleft \text{CH}_2\text{—OH}$



Silidianina A (22)  $R = \blacktriangleleft \text{OH}$   $R_1 = \cdots\cdots\cdots\text{OH}$

Silidianina B (23)  $R = \cdots\cdots\cdots\text{OH}$   $R_1 = \cdots\cdots\cdots\text{OH}$

**Figura 1.** Estructuras de compuestos aislados de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn  
**Fuente:** (Fonnegra G and Jiménez R, 2007).  
**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.

Dentro de la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn se han encontrado reportes de metabolitos secundarios bioactivos aislados. La silimarina ha sido descrita como agente hepatoprotector, antiinflamatorio, antifibrótico, inmunomodulador, antineoplásico, antiviral, antibacteriano, antioxidante, anticancerígeno y regenerador de tejidos, además es utilizada como protección de las células normales durante la quimioterapia (Mata-Santos , y otros, 2010). Según estudios de toxicidad se considera al cardo mariano como una planta segura, no toxica; en altas concentración puede provocar un efecto laxante (Cordova, 2015). Las dosis recomendadas (para adultos, por vía oral), son extractos equivalentes a 154 – 324 mg de silimarina (calculadas por el método HPLC de la Farmacopea Europea) o de 200 – 400 mg de silimarina (calculados por espectroscopia UV), divididos en 2-3 dosis (Navarro & Montilla Herrera, 2012).

De acuerdo a estudios la silicristalina A (**20**) y la silicristalina B (**21**) han mostraron una buena actividad inhibitoria, fueron ligeramente más potentes que el bien conocido promotor antitumoral  $\beta$ -caroteno. La silibina A (**16**), la silibina B (**17**), la isosilibina A (**18**) y la isosilibina B (**19**) fueron más activas que los componentes de prevención de cáncer clínicamente probados, el  $\beta$ -caroteno, la curcumina y la glicirricina, que son todos productos naturales ampliamente estudiados y conocidos como promotores antitumorales (Lin et al., 2007).

El efecto anticancerígeno de la silimarina se ha relacionado con el componente principal, la silibina, esta se compone de dos isómeros, la silibina A y la silibina B, que han demostrado actividad antineoplásica en varios modelos de cáncer, se reportó un estudio clínico fase I en pacientes con cáncer de próstata (Lin et al., 2007). La silibina tuvo un efecto antiproliferativo sobre la proliferación de células estimuladas con andrógenos y la secreción de antígenos prostáticos específicos (Abascal & Yarnell, 2003).

La silimarina tópica redujo significativamente el eritema por radiación UV en humanos, por lo que es considerada un compuesto importante para aumentar la protección anticancerígena y trabajar para prevenir daños por UV (Abascal & Yarnell, 2003) Se identificaron siete flavonolignanos que son potentes inhibidores de tumores cutáneos o cáncer de piel, silicristalina A (**20**), silicristalina B (**21**), silidianina A (**22**), silidianina B (**23**), silibina B (**17**), isosilibina A (**18**) e isosilibina B (**19**). La evaluación con un ensayo de activación de EBV-EA (virus de Epstein-Barr) se demostró que la silicristalina B era el compuesto más activo de inhibición EBV-EA, además presento un índice bajo de citotoxicidad lo que lo convertiría en un promotor antitumoral para el desarrollo de nuevos medicamentos preventivos contra el cáncer (Lin et al., 2007).

La silimarina y la silibina inhiben el crecimiento de células cancerosas y formación de lesiones en células mamarias, impiden además el crecimiento in vitro de cáncer de ovario, resistentes a fármacos. En tratamientos de carcinomas renales, pulmonares y leucemia la silibina inhibe la proliferación celular (Abascal & Yarnell, 2003).

## **2.2. Técnicas utilizadas para la obtención, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios.**

### **2.2.1. Maceración.**

La maceración es un proceso de extracción de compuestos químicos entre materia de diferente estado físico de sólido – líquido, los compuestos de interés se extraen de la materia sólida mediante un líquido de extracción en el que sean solubles los compuestos. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción (Usuga & Lopez , 2014).

Para el proceso de maceración se coloca una cantidad de materia prima en un depósito en relación al disolvente, recubriendo toda la materia vegetal. Por medio de este método se puede obtener el extracto vegetal y conseguir la mayor cantidad de compuestos de la especie vegetal en estudio. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del disolvente de extracción, el mismo que se lo debe proteger de la luz para evitar posibles reacciones (Carrión & García, 2010).

Es el proceso de extracción más simple y utilizado, a la planta o la estructura morfológica escogida más disolvente se lo protege de la luz, para evitar posibles reacciones, el tiempo de maceración es diverso, el tiempo establecido por las diferentes Farmacopeas oscilan entre cuatro y diez días (Carrión & García, 2010).

#### **2.2.1.1. Maceración Estática.**

La maceración simple o estática consiste en colocar la materia vegetal, en contacto con el disolvente en recipientes o equipos cerrados, protegidos de la luz solar, a temperatura ambiente y por un tiempo que puede variar entre horas o varios días en maceración. No se realizan agitaciones para lograr que el disolvente penetre en la membrana celular de la materia vegetal (Naveda, 2010).

### **2.2.2. Cromatografía.**

La cromatografía es una técnica que permite la separación de varios de los componentes que se conjugan a una mezcla que en algunos de los casos no son separables por otros

métodos, se utiliza para obtener los componentes individuales puros de una mezcla y determinar la proporción de estos en la especie vegetal en estudio (Vargas, 2011).

Esta técnica es un método físico que se basa en la distribución de una muestra entre dos fases, una fase estacionaria que soporta sobre un sólido y una fase móvil que debe ser inmisible sobre la fase estacionaria, la misma que puede encontrarse como gas, líquido o fluido supercrítico. La eficacia y la velocidad de corrida de la muestra depende de la afinidad de las fases y de cada uno de los componentes empleados (Vargas, 2011).

Por lo tanto, los componentes que tienen afinidad con la fase móvil serán extraídos con rapidez, a diferencia de la fase estacionaria donde los compuestos afines avanzarán con menor velocidad. Por eso esta técnica logra separar las mezclas de compuestos presentes en las muestras e identificar y caracterizar los compuestos de obtenidos (Braithwaite, 2007).

#### **2.2.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF).**

La cromatografía en capa fina es una técnica que se basa en el fenómeno fisicoquímico de adsorción selectiva de compuestos químicos en una fase sólida estacionaria en relación a una fase líquida móvil (Vizcaino, 2009).

El procedimiento de cromatografía se inicia sembrando una muestra sobre la placa de vidrio o aluminio generalmente, mientras tanto en una cámara se coloca el eluyente este debe permanecer en reposo por un tiempo hasta que la cámara se sature y se alcance un equilibrio de fases. Seguidamente se ubica la placa en la cámara y se la tapa para que el eluyente suba por capilaridad a través la fase estacionaria, una vez que el eluyente o fase móvil pasa los 2/3 de altura de la placa, esta es retirada y secada para posteriormente poder observar mediante una lámpara de UV en dos longitudes de onda de 254 nm (onda corta) y 365 nm (onda larga). La energía de estas longitudes de onda permitirán que los grupos funcionales que contengan el analito absorban energía para que se observen brillantes o no se vean (Vargas, 2011).

La cromatografía en capa fina es una técnica simple que tiene algunas ventajas dentro de la investigación, la separación es mejor y se necesita de poco tiempo para lograr separar los compuestos, además los resultados son fácilmente reproducibles, por lo tanto esta técnica es considerada apropiada para fines analíticos (Vizcaino, 2009).



### **2.2.2.2. Cromatografía en columna abierta (CCA).**

La cromatografía en columna es una técnica que se utiliza para separar o purificar compuestos. Al igual que la cromatografía en capa fina esta técnica tiene una fase móvil y una fase estacionaria, generalmente como fase estacionaria se utiliza la sílice o alúmina y como fase móvil, un disolvente o mezcla de disolventes. En este tipo de cromatografía la fase móvil se desplaza de manera descendente (Vizcaino, 2009).

Para desarrollar esta técnica primeramente se coloca la fase estacionaria, sílice o alúmina en la columna de vidrio, una vez empaquetada la columna se coloca en la parte superior de la fase estacionaria, el extracto o la mezcla a separar. La fase móvil se coloca desde la parte superior de la columna y corre a través de la fase estacionaria, los compuestos se van separando en la columna de acuerdo a la polaridad o disolventes que se empleen (Kenndler, 2004).

La ventaja que ofrece la cromatografía en columna es que durante la separación, la polaridad del disolvente puede variarse según la necesidad de separación de la muestra (Vizcaino, 2009).

### **2.2.3. Cristalización.**

La cristalización es una técnica selectiva de purificación, la misma se la puede realizar a través de un gas, líquido o una dilución para formar un sólido cristalino.

Esta es una de las técnicas de purificación de compuestos sólidos más adecuada, siempre que el sólido a refinar contenga una cantidad moderada de impurezas. Por medio de esta técnica se han logrado separar sólidos cristalinos que precipitan en una solución líquida (Mendez, 2010).

Esta técnica de purificación consiste en disolver la muestra o el compuesto en poca cantidad de disolvente obteniendo así una disolución concentrada, a la misma se la lleva a altas temperaturas y seguidamente la enfriamos, logrado un choque térmico y una disolución sobresaturada, si sometemos a esta disolución a enfriamiento bajo control se conseguirá que cristalizará. El compuesto de interés se cristalizará y se enriquecerán las llamadas aguas madres (impurezas presentes en la mezcla inicial). Para separar los cristales de interés de las aguas madres se filtra por repetidas veces hasta eliminar por completo las impurezas del sólido de interés (Mendez, 2010).

#### **2.2.4. Punto de fusión.**

El punto de fusión es la temperatura a la que un sólido y un líquido de una sustancia pura pueden encontrarse en equilibrio, es decir que la materia cambia de estado sólido a líquido. Este proceso ocurrirá si se rompen las fuerzas intermoleculares que se conservan enlazadas las moléculas de un compuesto en una estructura cristalina, su valor estará dado por el balance de las distintas fuerzas intermoleculares (Jaramillo, 2001).

Las sustancias puras tienen un punto de fusión definido, por lo que cabe reiterar que las impurezas presentes actúan como soluto y disminuyen o varían el punto fusión por ende no se puede tener un valor certero del compuesto de interés. También se debe considerar que si existe presencia de humedad o de disolvente en la sustancia sólida se darán resultados de puntos de fusión incorrectos (Imaculada, y otros, 2015).

#### **2.2.5. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC/EM).**

La cromatografía de gases acoplada de espectroscopia de masas (GC/EM), es una técnica analítica que combina la capacidad de separación del cromatógrafo de gases dedicada a la separación y el detector de masas que permite identificación y cuantificación de compuestos volátiles y semivolátiles de mezclas complejas (Olguín Pérez & Rodríguez Magadan, 2004). La espectroscopia de masas puede identificar cualquier sustancia pura de manera inequívoca, pero esto no es posible sin antes ser separados los compuestos de la mezcla individualmente (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Por lo tanto, la combinación de estas dos técnicas nos da lugar a la cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (GC/EM) (Gallego, 2011). Estas técnicas trabajan con mínimas cantidades de muestra y en una fase gaseosa, es decir con compuesto volátiles y semivolátiles, cada uno de los componentes de la mezcla o del compuesto puro están representados por un pico cromatográfico en un espectro de masas (Gutiérrez & Droguet, 2002).

#### **2.2.6. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una técnica empleada para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos en disolución en líquidos puros y en gases. La terminología de esta técnica proviene del suceso que los núcleos están en resonancia con la radiación. Es decir que los núcleos responden a la radiación a la que son sometidos pasando a un estado de espín a otro. (Requena & Zuñiga, 2012).

Esta técnica se puede aplicar solamente para analizar núcleos atómicos con un número de impar de protones o neutrones, se da en átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ , estos núcleos son magnéticamente activos, poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje, comportándose como pequeños imanes, por lo tanto poseen espín, igual de los electrones. La abundancia y la magnitud del momento magnético nuclear determinaran su sensibilidad, entre otros parámetros (Murga Clausell & Flomir Ventura Eva, 2011).

El RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  son complementarios para determinar las estructuras del esqueleto carbonado, observando los entornos magnéticos de los átomos de hidrogeno y de acuerdo al entorno magnético presentado en la espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  se determina los átomos de carbono (Pérez, 2000).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear comprende aplicaciones como son: elucidación estructural, determinación conformacional, establecimiento de equilibrios químicos, cinética química, cuantificación de mezclas, control de calidad, análisis conformacionales y estereoquímicos, entre otros (Pérez, 2000).

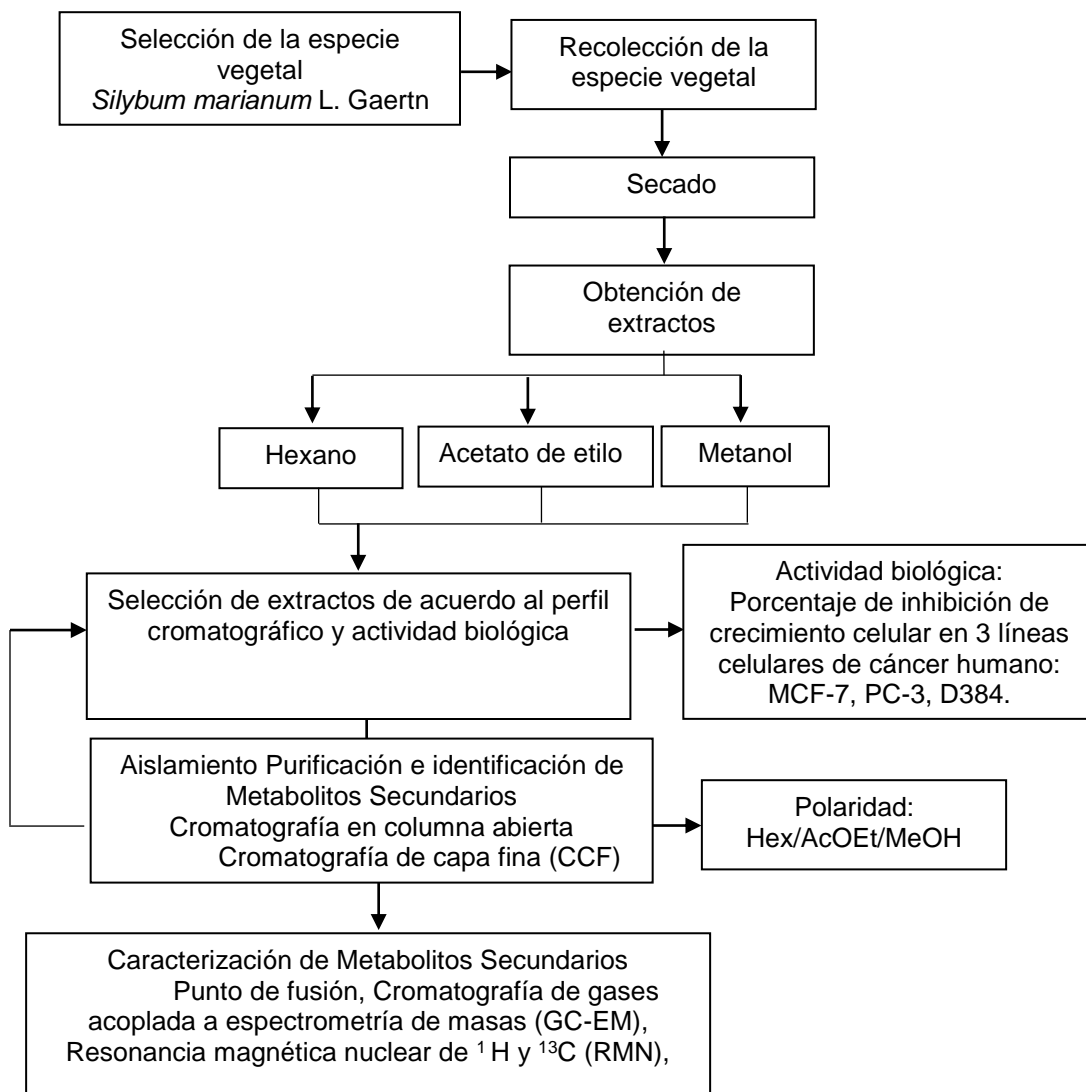
## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Materiales y métodos.

La metodología que se empleó para el presente trabajo de investigación se realizó en el en el Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja.

El esquema de la metodología empleada se presenta a continuación en la Figura 2.



**Figura 2.** Esquema de la metodología experimental empleada.

**Fuente:** Castillo, J. 2017

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.

### 3.2. Selección y preparación de la muestra.

La especie vegetal fue seleccionada en base a estudios etnobotánicos e información bibliográfica. La recolección de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn se realizó en el Barrio “Los Geranios” ubicado en la ciudad Loja, cantón Loja perteneciente a la Provincia de Loja, Ecuador, con coordenadas 4°0'55.652797” S; 79°12'4.724744” W (Figura 3). La identificación de la especie vegetal la realizó la Dra. Fanni Tinitana Imaicela, y un espécimen botánico fue depositado en el herbario de la UTPL con el código de voucher HUTPL9016.



**Figura 3.** Mapa del lugar de recolección de la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn.

Fuente: Google Maps

Elaborado por: Castillo, J. 2017.

### 3.3. Materia vegetal.

Se recolectó 15,3 Kg de la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn. Se realizó la limpieza de la materia vegetal para eliminar impurezas.

Una vez que la materia vegetal fue pesada, se la colocó en un secadero de bandejas con flujo de aire continuo a una temperatura de 37°C, con la finalidad de someter a la materia vegetal a un proceso de deshidratación y secado. Esta permaneció aproximadamente 8 días en el secadero hasta que se obtuvo un peso constante de la muestra.

### 3.4. Obtención de extractos.

Los extractos fueron preparados de las partes aéreas de la planta, a partir de 3,9 Kg de materia vegetal seca. La obtención de extractos se realizó mediante maceración estática en un lapso de tiempo de 3 a 4 días empleando disolventes de polaridad creciente (Hexano, Acetato de etilo y Metanol). Para la maceración se distribuyó la materia vegetal seca en dos contenedores de aluminio y se cubrió en su totalidad con aproximadamente 20 litros de disolvente, se realizaron 3 extracciones por cada disolvente para obtener una cantidad considerable de cada extracto.

Posteriormente, utilizando un sistema de vacío se filtró y se concentró en un rota-evaporador a una temperatura de 35°C, con la finalidad de separar y evaporar el disolvente para obtener el extracto seco de la planta, finalmente el extracto obtenido fue pesado y etiquetado.

El rendimiento de los extractos se evaluó en relación al peso del extracto obtenido y el peso de la materia vegetal seca, como se indica en la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso de extracto}}{\text{Peso de materia seca}} \times 100 \quad (1)$$

### 3.5. Fraccionamiento de extractos

#### 3.5.1. Cromatografía en columna abierta.

##### 3.5.1.1. Extracto Hexano

Se realizó el fraccionamiento del extracto de hexano, por medio de la técnica de cromatografía en columna abierta, usando una columna 42 mm de diámetro y 50 cm de altura, utilizando silica gel 60 (0.015-0.040mm) en relación 1:15 extracto: silica, se realizó un empaquetamiento en húmedo y para su elución se empleó disolventes como Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo y Metanol, así como también mezclas de los mismos. Se recolecto fracciones de 10 mL aproximadamente y se realizó cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas.

##### 3.5.2. Cromatografía en capa fina.

Se realizó fraccionamiento en cromatografía en capa fina (CCF) a cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna abierta, utilizando placas de aluminio cubiertas de silica gel 60 F<sub>254</sub> y silica gel RP-18. Como fase móvil se utilizaron disolventes de diferentes polaridades (Hex, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, MeOH y mezclas de los mismos en proporciones determinadas). Las placas obtenidas se las observo en la

lámpara de UV, utilizando la luz de 254nm (onda corta) y 360nm (onda larga). Como reveladores se utilizó ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

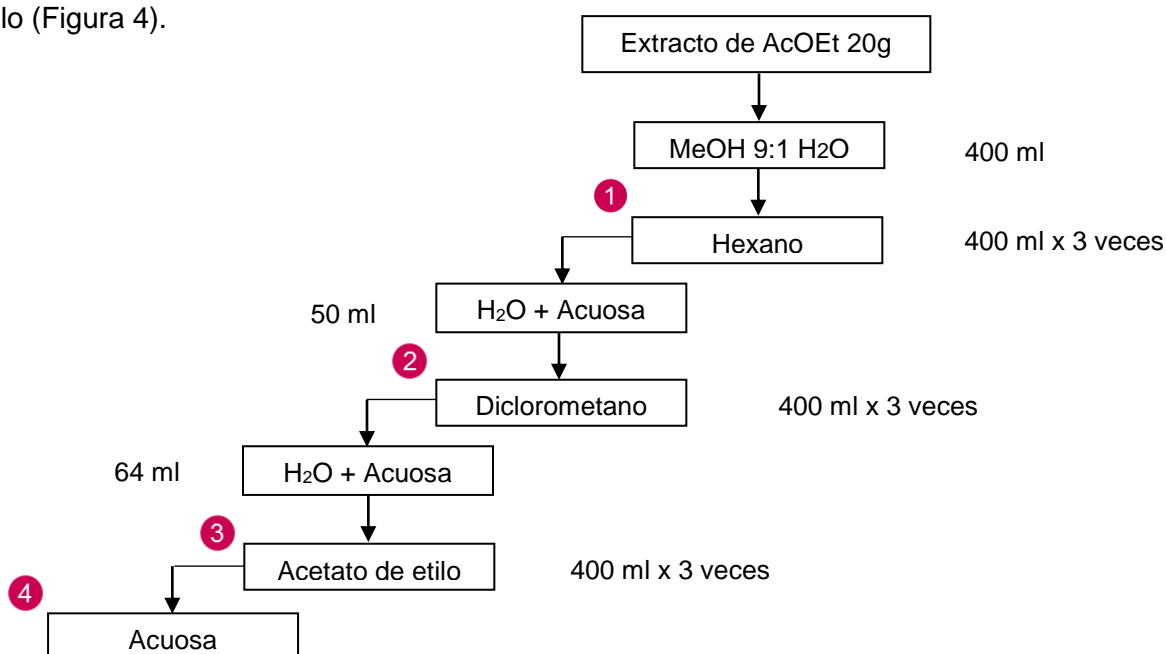
### 3.6. Unión y cristalización.

La unión de las fracciones obtenidas se realizó observando la cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones sembradas y de acuerdo con la similitud en el perfil cromatográfico, se tomó en cuenta la altura de las manchas que se observó en la lámpara UV con la onda de luz de 254nm y 360nm y seguidamente se corroboró utilizando agentes reveladores como ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

Unidas las fracciones se las purificó por un proceso selectivo de cristalización, utilizando diferentes solventes y sometiendo las fracciones a un cambio de temperatura hasta obtener un precipitado, en donde se formaron los cristales. Posteriormente se filtró repetidas veces hasta lograr separar los cristales de las llamadas aguas madres o impurezas.

### 3.7. Particiones del extracto de acetato de etilo.

Del extracto de acetato de etilo se realizó particiones en un embudo de decantación con 20g de extracto y se utilizó solventes como: hexano, acetato de etilo, diclorometano, metanol y agua destilada con el objetivo de fraccionar de mejor manera el extracto. A continuación se presenta el método empleado para la partición del extracto de acetato de etilo (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de metodología para la partición del extracto de acetato de etilo.

**Fuente:** Silva, R. 2017.

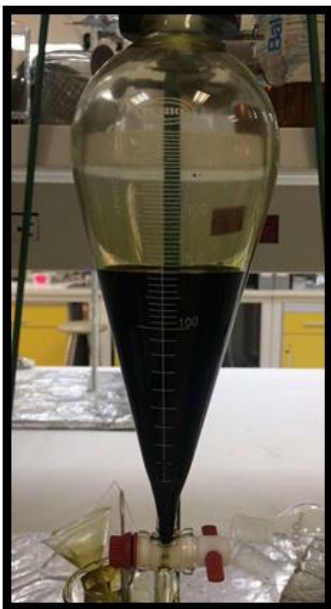
**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.



Para realizar la partición del extracto de acetato de etilo se disolvió el extracto seco utilizando como solvente acetato de etilo, se le adicionó 400ml de MeOH:H<sub>2</sub>O relación 9:1 y 400ml de hexano por tres veces, de esta primera partición se obtuvo una fracción 1 de hexano.

A la fracción acuosa obtenida se le agregó 50ml de agua destilada más 400ml de diclorometano por tres veces, obteniendo una fracción 2 de diclorometano. A la fracción acuosa resultante se le adiciono 64ml de agua y 400ml de acetato de etilo por 3 veces y se obtuvo una fracción 3 y 4 correspondiente a la fracción de acetato de etilo y acuosa (Figura 5).

Para la obtención de cada una de las fracciones producto de las particiones se agito constantemente el embudo de decantación hasta que se consiguió una mezcla homogénea, se mantuvo en reposo durante unos 5 a 10 minutos hasta visualizar la separación de las dos fases de interés.



**Figura 5.** Partición del extracto de acetato de etilo.

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.

### 3.8. Microcolumna.

De las uniones obtenidas del extracto de hexano se seleccionó la fracción con el compuesto mayoritario y de interés. En el caso del extracto de acetato de etilo, se seleccionó las fracciones de interés obtenidas luego de la desclorofilación.

El fraccionamiento en microcolumna se realizó en una columna de 40 cm de altura y 15 mm de diámetro, para su montaje se usó silica gel 60 (0.015-0.040mm). Como fase móvil se empleó mezclas de disolventes como Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo y Metanol y se recolectaron fracciones de 3 mL aproximadamente y se realizó cromatografía en capa fina para proceder a unir las fracciones que presentaban similitudes en su perfil cromatográfico.

### 3.9. Caracterización de metabolitos.

#### 3.9.1. Punto de fusión.

Mediante el equipo Fisher-Johns-Melting se determinó el punto de fusión de los compuestos aislados, en el se colocó una pequeña cantidad de la muestra sólida y se tomó la temperatura en la que el sólido paso a estado líquido.

#### 3.9.2. Factor de retención.

El valor de factor de retención se calculó para cada uno de los compuestos aislados. Este se define como la relación entre la distancia recorrida por la muestra desde el punto de siembra y la distancia que recorre el solvente. El factor de retención se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida (muestra)}}{\text{Distancia recorrida (solvente)}} \quad (2)$$

#### 3.9.3. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (CG/EM).

Los compuestos aislados de la especie vegetal *Silybum marianum* (L.) Gaertn fueron identificados por medio de un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert) con columna cromatográfica capilar DB-5MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano). Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones de operación del equipo CG/EM

<b>COLUMNA</b>	<b>Columna capilar:</b>
	<b>Agilent 122-5532 DB-5 ms, 0,25 mm* 30 m*0,25 µm</b>
	Temperatura máxima: 350 °C
	Flujo constante. Flujo inicial 1.0 ml/min
	Presión inicial: 52,66 kPa
	Velocidad promedio: 36 cm/s
	Presión de salida: vacío
<b>INYECTOR EN MODO SPLITLESS</b>	Temperatura inicial: 250 °C
	Gas: Helio
<b>DETECTOR</b>	Temperatura: 250 °C
	Gas: Nitrógeno
<b>HORNO</b>	Temperatura inicial: 50 °C
	Temperatura final: 270 °C
	Gradiente de temperatura de 3 °C/min

**Fuente:** Laboratorio de análisis químico e instrumental de la UTPL

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.

#### **3.9.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).**

La técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear nos permite determinar las estructuras de los compuestos orgánicos aislados. Para conseguir los espectros de RMN, se colocó en un tubo de vidrio una pequeña cantidad de la muestra y se la disolvió en 500 µL de disolvente deuterado (CDCl<sub>3</sub> y MeOH), se colocó el tubo dentro del equipo y el ordenador recopiló los datos de la muestra a analizar.

Se utilizó un equipo de resonancia magnética nuclear Varian 400 MHz-Premium Schelded, usando tetrametilsilano como referencia interna para obtener los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, se lo hizo a 400 MHz y 100 MHz respectivamente.

#### **3.10. Evaluación de la actividad antitumoral de extractos y metabolitos secundarios.**

Se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento celular de los extractos; se utilizó 3 líneas celulares de cáncer humano: MCF-7 (cáncer de mama), PC-3 (próstata) y D384 (astrocitoma cerebral). Los extractos más activos en la inhibición de crecimiento en las líneas celulares se los fraccionó en cromatografía en columna.

Cada una de las líneas celulares se cultivó en medio RPMI (GIBCO) a 37°C con una humedad del 95% y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las líneas celulares fueron expuestas por 48 horas en una dosis de 50 µg/mL a todos los extractos y compuestos, determinándose el efecto inhibitorio empleando el método de MTT, siguiendo el siguiente protocolo: en un caja multidish de 96 pocillos se sembraron 3000 células con 100 µL de

medio de cultivo por pocillo, se incubó por 24 horas; se aplicó tratamiento con cada uno de los derivados disueltos en DMSO (0,5%) y medio de cultivo , también se aplicó DMSO 0,5% como control negativo y Doxorrubicina 2  $\mu$ M como control positivo; en todos los casos se llegó a un volumen final de 200  $\mu$ L en cada pocillo; cada dosis se aplicó por triplicado en tres experimentos diferentes, se incubó por 48 horas y se añadió 20  $\mu$ L de reactivo de MTT Gibco (Kit cell titer 96<sup>o</sup>, Aqueous one solution reagent), se incubó por 2 horas y se realizó la lectura en el espectrofotómetro (Sunrise) a una absorbancia de 490 nM; los datos obtenidos fueron analizados por medio del programa Prisma.

## **CAPÍTULO VI**

### **RESULTADOS Y ANÁLISIS**

#### 4. Resultados y análisis.

##### 4.1. Obtención de extractos en hexano, acetato de etilo y metanol.

A continuación se muestran los extractos obtenidos de hexano, acetato de etilo y metanol previamente etiquetados e identificados de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn (Figura 4).



**Figura 6.** Extractos obtenidos de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn.

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.

##### 4.2. Rendimientos y análisis de los extractos obtenidos de *Silybum marianum* L. Gaertn.

El rendimiento de los extractos (Tabla 3) fue determinado en relación a la cantidad de extracto obtenido y el peso correspondiente a 3,9 kg de materia vegetal seca (Ecuación 1).

**Tabla 3.** Rendimiento de los extractos de la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn

	Solvente	Peso (g)	Rendimiento %
<i>Silybum marianum</i>	Hexano	46,85	1,2
	Acetato de etilo	28,50	0,73
	Metanol	466,26	11,96

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.

### 4.3. Evaluación de la actividad antitumoral.

A los extractos obtenidos de hexano, acetato de etilo y metanol se les evaluó la actividad citotóxica (inhibición de crecimiento celular) mediante MTT en 3 líneas celulares de cáncer humano, MCF-7 (cáncer de mama), D-384 (astrocitoma cerebral), PC-3 (cáncer de próstata), obteniendo los resultados que se muestran a continuación (Tabla 4).

**Tabla 4.** Inhibición de crecimiento celular de extractos

Solvente	Líneas celulares tumorales		
	MCF-7	PC-3	D-384
	% INHB. $\pm$ E.E	% INHB. $\pm$ E.E	% INHB. $\pm$ E.E
HEXANO	4,51 $\pm$ 1,25	13,99 $\pm$ 1,321	31,41 $\pm$ 1,66
AC.ETILO	SA	15,54 $\pm$ 1,489	37,37 $\pm$ 2,68
METANOL	SA	16,03 $\pm$ 2,154	32,34 $\pm$ 2,07

MCF-7 cáncer de mama. PC-3 cáncer de próstata. D-384 astrocitoma cerebral.

SA sin actividad.

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.

De acuerdo a los ensayos de citotoxicidad de los extractos presentados en la tabla anterior se puede observar que el extracto con mayor porcentaje de inhibición fue el extracto de acetato de etilo (37,37%) en comparación con los extractos de hexano y metanol en las tres líneas celulares analizadas siendo más activos en la línea celular D-384 (Línea celular tumoral de astrocitoma cerebral).

La actividad anticancerígena reportada en bibliografía de los extractos hidroalcoholicos (etanol 70%) de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn sobre cinco líneas celulares de cáncer humano: adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), cuello uterino humano (SiHa), colon (HT-29), ovario (ovcar-5), próstata (DU145) e hígado (HepG2) presentan un porcentaje de inhibición de 21,34; 32,30; 46,56; 59,58; 22,23 y 36,20 respectivamente para cada una de las líneas (S. Singh, 2013).

La especie *Silybum marianum* L. Gaertn (silimarina) estabiliza las membranas celulares e inhibe la carcinogénesis inducida químicamente, aunque es seguro y no presenta efectos secundarios adversos graves, pocos estudios han evaluado su uso junto con terapias citotóxicas convencionales y su administración a largo plazo es incierta, pero puede ser utilizado como complemento de la quimioterapia y la radioterapia para potenciar los tratamientos, aumentando la absorción y las acciones de los agentes quimioterapéuticos,

previniendo la resistencia y efectos secundarios de dichos medicamentos. Además muestra una actividad anticarcinogénica directa contra varias células de carcinoma humano, no mata las células cancerígenas pero consigue que estas se comporten normalmente, ejerciendo sus efectos anticancerosos por múltiples mecanismos moleculares que podrían bloquear todas las etapas de la carcinogénesis, iniciación, promoción y progresión. En particular los efectos antiinvasivos y antimetastásicos de la silimarina autentican su posible utilidad como agente preventivo y terapéutico en el tratamiento de formas de cáncer más avanzadas y agresivas (Abascal & Yarnell, 2003; Kumaraguruparan & Rajesh, 2008; Sagar, 2007; Greenlee et al., 2007).

El efecto anticancerígeno de la silimarina se ha relacionado con el constituyente principal, silibina que consta de dos isómeros, silibina A y silibina B, que han mostrado actividad antineoplásica en varios modelos de cáncer como se mencionó anteriormente (Lin et al., 2007).

La evaluación de la actividad que se reportó de acuerdo a bibliografía, utilizo extractos hidroalcohólicos a diferencia de la metodología empleada en la presente investigación para la que se obtuvieron extractos de diferente polaridad como hexano, acetato de etilo y metanol, con la finalidad de lograr un mejor fraccionamiento e identificación del componente mayoritario de la especie en estudio (silimarina) considerado potencialmente como un beneficiario para tratar una amplia variedad de cánceres.

#### **4.4. Aislamiento de metabolitos secundarios.**

##### **4.4.1. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto de hexano.**

Del extracto de hexano se realizó cromatografía en columna abierta en fase directa en relación 1:15 extracto: sílice, utilizando 20g de extracto de Hexano y 300g de sílice gel.

Se obtuvieron 273 separaciones con un volumen de 10 ml cada una, las mismas que se unieron de acuerdo a su similitud en el perfil cromatográfico, obteniéndose un total de 38 fracciones. Las fracciones HexF1 a HexF29 (separaciones de la 1-189) son solubles en hexano, acetato de etilo, diclorometano y cloroformo, las fracciones HexF30 a HexF37 (separaciones de la 190-273) no son solubles en los solventes mencionados anteriormente y tienen una consistencia viscosa. A continuación se muestran las fracciones obtenidas en la tabla 5.



**Tabla 5.** Unión de fracciones de extracto de hexano

Fracción	Separación	Polaridad	Proporción	Apariencia	Peso (mg)
HexF1	1-6	Hex	100	Sólidos, cristales blancos	7,4
HexF2	7-8	Hex	100	Sólidos, polvo blanco	126
HexF3	9-10	Hex	100	Sólidos, cristales blancos	78,5
HexF4	11-15	Hex	100	Sólidos, cristales amarillo pálido	65,3
HexF5	16-18	Hex	100	Consistencia semisólido-viscoso amarillo pálido	13,5
HexF6	19-22	Hex	100	Consistencia semisólido-viscoso amarillo pálido	13,8
HexF7	23-25	Hex	100	Consistencia semisólido-viscoso anaranjado intenso	20,3
HexF8	26-28	Hex	100	Consistencia semisólido-viscoso amarillo intenso	22,5
HexF9	29-35	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	Consistencia semisólido-viscoso amarillo intenso	26,8
HexF10	36	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	Sólido cristalino blanco	1,8
HexF11	37-42	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	Consistencia semisólido-viscoso amarillo pálido	563,5
HexF12	43-57	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	Consistencia semisólido-viscoso amarillo	2297
HexF13	58-63	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	Consistencia semisólido-viscoso amarillo	501,7
HexF14	64-70	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	Consistencia semisólido-viscoso amarillo intenso	481,1
HexF15	71-74	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	Sólidos cristalinos amarillos	245,1
HexF16	75-77	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	Sólidos cristalinos amarillo pálido	228,3
HexF17	78-84	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	Sólidos cristalinos amarillo pálido	589,9
<b>HexF18</b>	<b>85-98</b>	<b>Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<b>70:30</b>	<b>Sólidos cristalinos amarillo</b>	<b>1086,6</b>
HexF19	99-100	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	Sólidos cristalinos amarillo pálido	55,4
HexF20	101-107	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	Sólidos cristalinos anaranjados	70,7
HexF21	108-112	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	Consistencia semisólido-viscoso anaranjado	25,9

**Tabla 5.** Unión de fracciones de extracto de hexano (Continuación)

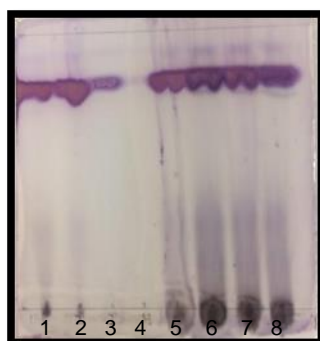
Fracción	Separación	Polaridad	Proporción	Apariencia	Peso (mg)
HexF22	113-119	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	Consistencia semisólido-viscoso anaranjado intenso	20,5
HexF23	120-126	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	Consistencia semisólido-viscoso anaranjado intenso	2,11
HexF24	127-140	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	Consistencia semisólido-viscoso anaranjado intenso	68,8
HexF25	141-147	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	Sólido cristalino anaranjado intenso	86,9
HexF26	148-154	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	Sólido cristalino anaranjado intenso	181,8
HexF27	155-175	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	Sólido cristalino anaranjado intenso	1078,3
HexF28	176-182	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	Consistencia semisólido-viscoso anaranjado	389,7
HexF29	183-189	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	Consistencia semisólido-viscoso amarillo	383
HexF30	190-210	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	Consistencia semisólido-viscoso amarillo pálido	900,2
HexF31	211-217	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	Sólidos cristalinos amarillo pálido	118,3
HexF32	218-224	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	Sólidos cristalinos amarillo pálido	871,1
HexF33	225-231	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	Sólidos cristalinos amarillo pálido	207,4
HexF34	232-238	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20:80	Sólidos cristalinos amarillo intenso	145,7
HexF35	239-245	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	Sólidos cristalinos marrón-amarillo	82,3
HexF36	246-266	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	Sólidos cristalino marrón	421,2
HexF37	267-270,272-273	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	Sólidos cristalino marrón-amarillo	136,6
<b>HexF38</b>	<b>271</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<b>100</b>	<b>Sólido cristalino amarillo</b>	<b>30,7</b>

Fuente: Castillo, J. 2017.

Elaborado por: Castillo, J. 2017.

#### 4.4.1.1. Fracción HexF18.

De la fracción HexF18 eluída en una polaridad Hex 70:30 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se obtuvieron 1086,6mg de un sólido cristalino amarillo, al mismo se le realizó cromatografía en capa fina y punto de fusión de 210-230 °C, con lo que se pudo determinar la presencia de impurezas por lo que se recrystalizo con acetato de etilo y se obtuvieron las fracciones purificadas y las fracciones correspondientes al agua madre de la misma (Figura 5).



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%

**Figura 7.** Cromatografía en capa fina de la fracción HexF18. Fracciones purificadas (1-5) y agua madre (6-8).

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.

Se unió las fracciones de acuerdo a su perfil cromatográfico las mismas que se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Uniones de acuerdo a cromatografía en capa fina de la fracción HexF18

Fracción	Unión	Apariencia	Peso (mg)
HexF18A	1,2,5	Solidos cristalinos blancos	146,9
<b>HexF18B</b>	<b>3</b>	<b>Solidos cristalinos blancos</b>	<b>1</b>
HexF18C	4	-	0,1
HexF18D	6-8 (-i)	Solidos cristalinos amarillo pálido	58,3
HexF18E	6-8 (+i)	Solidos cristalinos amarillo pálido	343,7

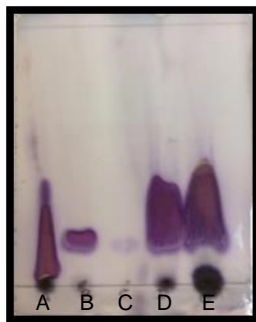
-i: menos impurezas

+i: más impurezas

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

En la figura 8 se muestra la cromatografía de capa fina de las diferentes fracciones unidas luego del proceso de purificación de la fracción HexF18.



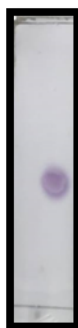
Hex 8:2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Figura 8.** Cromatografía en capa fina de las uniones de la fracción HexF18.

**Fuente:** Castillo, J. 2017

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

De la fracción B denominada HexF18B se obtuvo 1mg de un sólido cristalino blanco, soluble en diclorometano y cloroformo, se realizó punto de fusión de 200-205 °C y cromatografía en capa fina en una polaridad Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 en la que se pudo observar una sola mancha con un R<sub>f</sub> de 0,4 (Figura 9).



Hex 1:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Figura 9.** Cromatografía en capa de la fracción HexF18B.

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

Se unió las fracciones A, D y E obteniendo una fracción HexF18FP y se realizó una microcolumna con polaridad isocrática Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 80:20 en fase directa en relación 1:100 extracto: sílica, utilizando 0,55g de la fracción HexF18FP y 55,16g de sílice gel.

Se obtuvieron 249 separaciones con un volumen de 3 ml aproximadamente, las mismas se unieron de acuerdo a la similitud en su perfil cromatográfico, obteniéndose un total de 20 fracciones. A continuación se muestran las fracciones obtenidas en la tabla 7.

**Tabla 7.** Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción HexF18FP

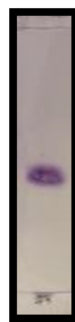
Fracción	Separación	Apariencia	Peso (mg)
<b>HexF18FP1</b>	<b>0</b>	<b>Solido blanco</b>	<b>29,5</b>
HexF18FP2	1-2	Solido blanco	2,9
HexF18FP3	3-4	-	2
HexF18FP4	5-7	Solido blanco	1,3
HexF18FP5	8-14	Solido blanco	2,6
HexF18FP6	15-33	Solido blanco	1,7
HexF18FP7	34-47	-	0,5
HexF18FP8	48-49	Solido cristalino blanco	5,8
HexF18FP9	50-52	Solido cristalino blanco	0,2
HexF18FP10	53-67	Solido cristalino blanco	106,3
HexF18FP11	56,62,64,68	Solido cristalino blanco	35,2
<b>HexF18FP12</b>	<b>69-88</b>	<b>Solido cristalino blanco</b>	<b>132,7</b>
HexF18FP13	89,91-99	Solido cristalino blanco	0,2
HexF18FP14	90,100-102	Solido cristalino blanco	6
HexF18FP15	103-158	Solido cristalino amarillo pálido	30,8
HexF18FP16	159-174	Solido blanco	2,2
HexF18FP17	175-238	Solido blanco	3
HexF18FP18	239	Consistencia semisólido-viscoso marrón	60,1
HexF18FP19	240	Consistencia semisólido-viscoso verde	37,9
HexF18FP20	241-249	Consistencia semisólido-viscoso marrón	30

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

#### **A. Fracción HexF18FP1.**

De la fracción HexF18FP1 eluída en una polaridad Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 80:20, se obtuvo 29,5mg de un semisólido blanquecino, parcialmente soluble en diclorometano y metanol, con un punto de fusión de 203-207 °C.



Hex 6:4 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Figura 10.** Cromatografía en capa de la fracción HexF18FP1.

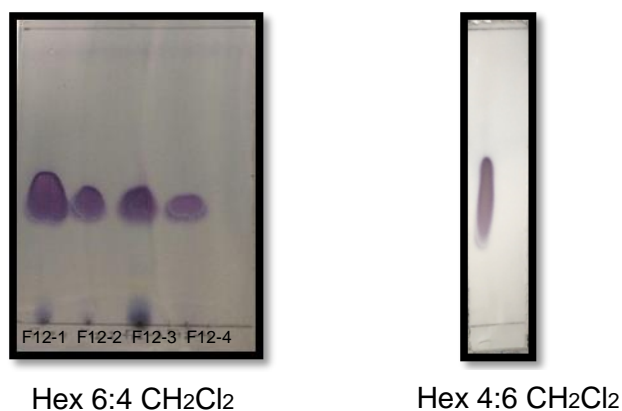
**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

Se realizó cromatografía en capa fina y se pudo observar una sola mancha con un Rf de 0,4 en una polaridad Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 6:4 (Figura 10).

### B. Fracción HexF18FP12.

De la fracción HexF18FP12 eluída en una polaridad Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 80:20, se obtuvo un sólido cristalino blanco con un peso de 132,7mg, se realizó cromatografía en capa fina y punto de fusión de 190-205 °C, con lo que se pudo determinar la presencia de impurezas por lo que se recristalizó con diclorometano y metanol por diferencia de temperatura y se obtuvieron 4 fracciones de la misma. Se unió las fracciones obtenidas, estas fueron recristalizadas nuevamente y se realizó cromatografía en capa fina en una polaridad Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4:6 con un Rf de 0,4 (Figura 11).



**Figura 11.** Cromatografía en capa fina de las uniones de la fracción HexF18FP12.

F12-1: sólido inicial, F12-2: sólido filtrado 1, F12-3: agua madre, F12-4: Sólido filtrado 2.

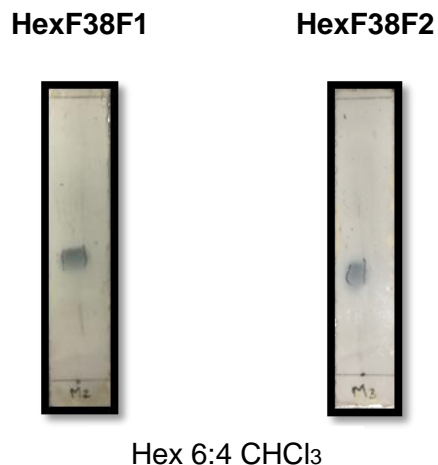
**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

Finalmente se pesó la fracción HexF18FP12 obteniéndose 105mg del compuesto soluble en diclorometano y cloroformo.

#### 4.4.1.2. Fracción HexF38.

De la fracción HexF38 eluída en una polaridad 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se obtuvo 30,7mg de un sólido cristalino amarillo, se realizó cromatografía preparativa de dimensiones de 8cm de alto por 10cm de ancho, en una polaridad Hex:CHCl<sub>3</sub> 4:6, se corrió por dos ocasiones en la misma polaridad, lográndose separar dos compuestos de la mezcla existente. De la que se obtuvo 1,4 y 1,5mg de un sólido blanquecino, con puntos de fusión de 150-160 °C y 240-250 °C respectivamente para el compuesto **1** y **2**, son solubles en diclorometano y cloroformo. Se les realizó cromatografía en capa fina con una polaridad Hex:CHCl<sub>3</sub> 4:6 en la que se pudo observar una sola mancha (Figura 12).



**Figura 12.** Cromatografía en capa fina de las fracciones HexF38F1 y HexF38F2.  
**Fuente:** Castillo, J. 2017.  
**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

De acuerdo a la cromatografía en capa fina se pudo determinar el factor de retención de los compuestos obtenidos, siendo de 0,42 y 0,35 para los compuestos **1** y **2** respectivamente.

Se trabajó también las fracciones HexF2, HexF11 y HexF32, sin conseguir una purificación satisfactoria.

Las fracciones HexF2 y HexF11 con un peso de 126mg y 563,5mg respectivamente se recrystalizaron utilizando acetato de etilo y metanol, a las mismas se les realizo cromatografía en capa fina con el que se pudo determinar la presencia de impurezas en las fracciones.

A la fracción HexF32 se le realizó cromatografía en capa fina, punto de fusión (>300 °C) y solubilidad, debido a que era una fracción parcialmente soluble en solventes como: hexano, acetato de etilo, metanol, diclorometano, cloroformo, benceno y DMSO, y totalmente soluble en piridina; por lo que se podría tratar de un polímero.

#### **4.4.2. Particiones del extracto de acetato de etilo.**

De las particiones del extracto de acetato de etilo se obtuvieron 4 fracciones de hexano, diclorometano, acetato de etilo y la fracción acuosa. Adicional a las fracciones obtenidas se logró separar de la fracción 1 de hexano una fracción adicional denominada AcHex1 que no era soluble en hexano y se recuperó con metanol, que presentó un punto de fusión

de 190 a 200 °C y cromatografía en capa fina en la que se observó una sola mancha con un Rf de 0,7 (Figura 13).



Hex 4:6 AcOEt

**Figura 13.** Cromatografía en capa de la fracción AcHex1

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

En la tabla 8 se presentan los pesos y la apariencia de las fracciones obtenidas de la partición del extracto de acetato de etilo.

**Tabla 8.** Fracciones obtenidas de la partición del extracto de acetato de etilo

Fracción	Apariencia	Peso (mg)
Hexano	Solido cristalino marrón	1665,5
Hexano 1	Solido blanco	14,3
Diclorometano	Solido viscoso marrón	15723,3
<b>Acetato de etilo</b>	<b>Solido viscoso marrón</b>	<b>150,1</b>
<b>Acuosa</b>	<b>Solido viscoso marrón</b>	<b>756,7</b>

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

#### 4.4.2.1. Fracción Acuosa

De la partición del extracto de acetato de etilo se obtuvo una fracción acuosa, con la que se realizó una microcolumna en fase directa en relación 1:100 extracto: sílica, utilizando 0,8065g de la fracción acuosa y 80,65g de sílice gel. Se obtuvieron 118 separaciones con un volumen de 5ml aproximadamente, las cuales se unieron de acuerdo a la similitud en su perfil cromatográfico, obteniéndose un total de 8 fracciones. En la tabla 9 se muestran las fracciones obtenidas.



**Tabla 9.** Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción acuosa

Fracción	Separación	Polaridad	Proporción	Apariencia	Peso (mg)
AcBAF1	1	AcOEt:MeOH	90:10	Semisólido blanquecino	1
AcBAF2	2	AcOEt:MeOH	90:10	Semisólido amarillo pálido	7,3
AcBAF3	3-7	AcOEt:MeOH	90:10	Semisólido amarillento	17,9
AcBAF4	8-15	AcOEt:MeOH	90:10	Semisólido amarillento	7,4
AcBAF5	16-22	AcOEt:MeOH	90:10	Semisólido amarillento	5,5
AcBAF6	23-31	AcOEt:MeOH	80:20	Semisólido amarillento	5,5
<b>AcBAF7</b>	<b>32-54</b>	<b>AcOEt:MeOH</b>	<b>80:20</b>	<b>Semisólido marrón</b>	<b>107,4</b>
AcBAF8	55-118	AcOEt:MeOH	70:30	Semisólido marrón	98

Fuente: Castillo, J. 2017.

Elaborado por: Castillo, J. 2017

De la fracción AcBAF7 se realizó una microcolumna en polaridad isocrática en fase directa en relación 1:200 extracto: sílica con polaridad AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O 90:6:4, utilizando 0,1074g y de la fracción AcBAF7 y 25g de sílice gel. Se recolectaron 225 separaciones con un volumen de 3 ml aproximadamente, las mismas se unieron de acuerdo a la similitud que presentaron en el perfil cromatográfico, obteniéndose un total de 25 fracciones. En la tabla 10 se muestran las fracciones obtenidas.

**Tabla 10.** Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción AcBAF7

Fracción	Separación	Apariencia	Peso (mg)
AcBAF7M1	1-15	Semisólido amarillo pálido	1,7
AcBAF7M2	16-18	-	0,4
AcBAF7M3	19-23	-	0,6
AcBAF7M4	24-34	Semisólido amarillo	1,5
AcBAF7M5	35-46	Semisólido amarillo	1,5
AcBAF7M6	47-58	Semisólido amarillo	2,3
AcBAF7M7	59	-	0,4
AcBAF7M8	60-70	Semisólido amarillo	3,1
AcBAF7M9	71-76	Semisólido amarillo	2,2
AcBAF7M10	77-81	Semisólido amarillo	2,1
AcBAF7M11	82-83	Semisólido amarillo	0,9
AcBAF7M12	84-95	Semisólido amarillo	5,1
AcBAF7M13	96-107	Semisólido amarillo	3,3
AcBAF7M14	108-123	Semisólido amarillo	4
AcBAF7M15	124-140	Semisólido amarillo	3,3
AcBAF7M16	141-156	Semisólido amarillo	16,1
AcBAF7M17	157-172	Semisólido amarillo	8,1

**Tabla 10.** Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción AcBAF7 (Continuación)

Fracción	Separación	Apariencia	Peso (mg)
AcBAF7M18	173-188	-	1
AcBAF7M19	189-205	Semisólido amarillo pálido	1,2
AcBAF7M20	206-221	Semisólido amarillo pálido	7,8
AcBAF7M21	222-225	Semisólido amarillo pálido	6,8

Fuente: Castillo, J. 2017.

Elaborado por: Castillo, J. 2017

#### 4.4.2.2. Fracción de Acetato de etilo

De la partición del extracto de acetato de etilo se obtuvo una fracción de acetato de etilo, se realizó una microcolumna en fase directa en relación 1:100 extracto: sílica, utilizando 0,1501g de la fracción acuosa y 15g de sílice gel.

Se recolectaron 158 separaciones con un volumen de 3ml aproximadamente, las mismas se unieron de acuerdo a la similitud en el perfil cromatográfico, obteniéndose un total de 22 fracciones. En la tabla 11 se muestran las fracciones obtenidas.

**Tabla 11.** Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción AcBAE

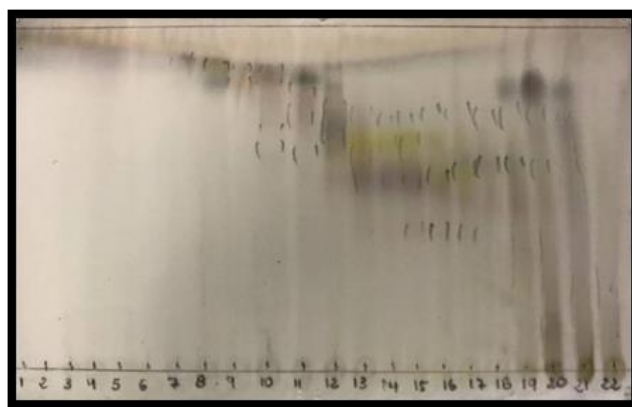
Fracción	Separación	Polaridad	Proporción	Apariencia	Peso (mg)
AcBAEF1	1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	98:2	-	1
AcBAEF2	2-3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	98:2	Sólido blanquecino	1,6
AcBAEF3	4-10	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	98:2	Sólido blanquecino	1
AcBAEF4	11-20	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	98:2	Sólido blanquecino	1,6
AcBAEF5	21-30	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	98:2	Sólido blanquecino	1,2
AcBAEF6	31	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	95:5	Sólido blanquecino	1,1
AcBAEF7	32-35	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	95:5	Sólido blanquecino	1,5
AcBAEF8	36-40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	95:5	Viscoso amarillo pálido	8,1
AcBAEF9	41-47	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	95:5	Viscoso amarillo pálido	7,5
AcBAEF10	48-50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	90:10	Viscoso amarillo pálido	2,5
AcBAEF11	51-58	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	90:10	Viscoso amarillo	6,7
AcBAEF12	59-71	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	90:10	Viscoso amarillo	8,6
<b>AcBAEF13</b>	<b>72-81</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH</b>	<b>90:10</b>	<b>Viscoso amarillo</b>	<b>3,9</b>
<b>AcBAEF14</b>	<b>82-84</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH</b>	<b>90:10</b>	<b>Viscoso amarillo</b>	<b>2,2</b>
<b>AcBAEF15</b>	<b>85-91</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH</b>	<b>90:10</b>	<b>Viscoso amarillo</b>	<b>4,2</b>
AcBAEF16	92-104	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	90:10	Viscoso amarillo	5,4
AcBAEF17	105-124	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	90:10	Viscoso amarillo	6,1

**Tabla 11.** Unión de fracciones de la microcolumna de la fracción AcBAE (Continuación)

Fracción	Separación	Polaridad	Proporción	Apariencia	Peso (mg)
AcBAEF18	125	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	50:50	Viscoso amarillo	2,2
AcBAEF19	126	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	50:50	Viscoso amarillo intenso	8,3
AcBAEF20	127-131	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	50:50:00	Viscoso naranja	23,3
AcBAEF21	132-142	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	50:50:00	Viscoso marrón	10,1
AcBAEF22	143-158	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	50:50:00	Viscoso marrón	6,1

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 8:2 MeOH

**Figura 14.** Cromatografía en capa fina de las uniones de fracciones de la microcolumna de la fracción AcBAE.

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017

Se unió las fracciones 13,14 y 15 denominada AcBAEP1 obteniendo un peso de 10,3mg de una sustancia amarilla viscosa soluble en metanol, se realizó cromatografía preparativa de dimensiones de 8cm de alto por 10cm de ancho, en una polaridad Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH en relación 2:7,1:0,9; se corrió por dos ocasiones en la misma polaridad lográndose separar 2,2mg del compuesto de interés, al mismo que se le realizó punto de fusión de 200-203 °C y cromatografía en capa en la que se observó una sola mancha con un R<sub>f</sub> de 0,4 (Figura 15).



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 8:2 MeOH

**Figura 15.** Cromatografía en capa fina de la fracción AcBAEP1.

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo .I. 2017

Para esta placa se utilizó un reactivo general como vapor de yodo debido a que la misma no se logró revelar con ácido sulfúrico - vainillina, sulfato cerico, verde de bromocresol y dragendorff.

Los vapores de yodo son considerados como un reactivo inespecífico, debido a que casi todos los compuestos absorben o reaccionan con estos vapores formando manchas violetas o cafés en la placa revelada.

#### **4.5. Caracterización e identificación de metabolitos secundarios.**

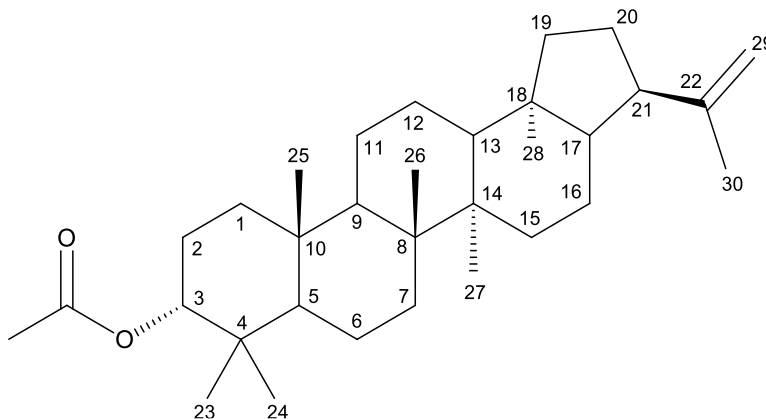
##### **4.5.1. Extracto de hexano.**

##### **4.5.1.1. Fracción HexF18FP12.**

La fracción identificada como HexF18, correspondiente a la fracción 85-98 fue eluída en cromatografía en columna abierta en una polaridad Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 70:20, obteniendo un peso de 1086,6 mg de un sólido cristalino amarillo, se recrystalizo con acetato de etilo. Se realizó una microcolumna para separar el compuesto de interés, la columna fue eluída en polaridad isocrática Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 80:20, de la fracción HexF18FP12 (69-88) se obtuvo 132,7 mg de un sólido cristalino blanco, se recrystalizo con diclorometano y metanol, obteniendo 105 mg de un sólido cristalino blanco soluble en diclorometano y cloroformo, con un punto de fusión de 190 a 250 °C y un R<sub>f</sub> de 0,4 en una polaridad Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4:6.

Para su identificación, se analizó mediante CG/EM para obtener el peso molecular del compuesto (Anexo 1 y 2) en el que se muestra un t<sub>R</sub>=44.18 min y la estructura del compuesto se identificó mediante RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Anexo 3 y 4), los datos experimentales se compararon con espectros reportados en literatura.

El compuesto de fórmula molecular  $C_{32}H_{52}O_2$  y peso molecular de 468,75 g/mol fue identificado como acetato de moretenol (**1**) (Figura 16).



**Figura 16.** Estructura del compuesto identificado como acetato de moretenol.

**Fuente:** Castillo, J. 2017.

**Elaborado por:** Castillo, J. 2017.

Los datos espectroscópicos de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  en  $CDCl_3$  que se obtuvieron del compuesto **1**, se detallan a continuación:

**$^1H$ -NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ):** 4.62 (br.d J=5.8Hz, 2H,  $CH_2=$ ), 4.49 (dd, J=7,7,5 Hz, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2.05 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 1.56 (s, 3H,  $CH_3 - C=$ ), 1.03 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.85 (s, 6H), 0.84 (s, 3H), 0.88 (s, 3H).

**$^{13}C$ -NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ):** 38.0 (C-1), 23.9 (C-2), 81.1 (C-3), 38.4 (C-4), 55.5 (C-5), 18.3 (C-6), 34.2 (C-7), 41.2 (C-8), 50.5 (C-9), 37.2 (C-10), 21.5 (C-11), 22.7 (C-12), 48.8 (C-13), 42.2 (C-14), 36.5 (C-15), 21.1 (C-16), 55.6 (C-17), 43.2 (C-18), 39.5 (C-19), 27.2 (C-20), 48.2 (C-21), 151.1 (C-22), 28.1 (C-23), 16.7 (C-24), 16.0 (C-25), 16.5 (C-26), 16.5 (C-27), 14.9 (C-28), 107.3 (C-29), 19.6 (C-30), 171.2 ( $COCH_3$ ), 21.6 ( $COCH_3$ ).

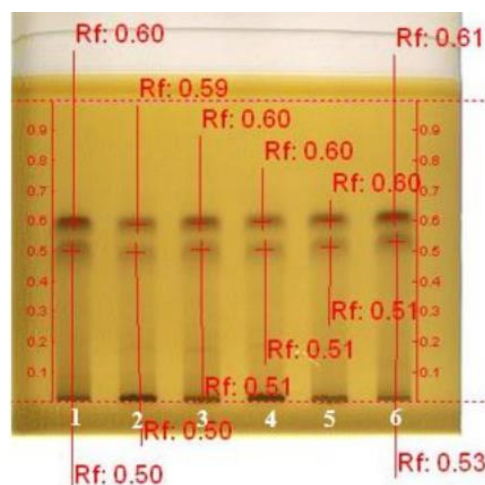
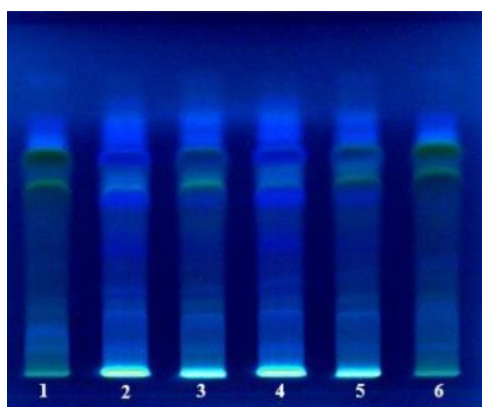
El espectro de  $^1H$ -NMR muestra en  $\delta$  4.62 ppm un doble de tripletes que corresponde al metileno en la posición H-29,  $\delta$  4.49 ppm un doble de dobletes atribuidos a los protones de H-3, en  $\delta$  2.05 ppm un singulete asignado al protón del grupo acetilo,  $\delta$  1.56 ppm un singulete que corresponde al metilo en la posición H-30,  $\delta$  1.03 ppm un singulete que corresponde al metilo en la posición H-28,  $\delta$  0.93 ppm un singulete que corresponde al metilo en la posición H-27,  $\delta$  0.84 ppm un singulete que corresponde al metilo en la posición H-23,  $\delta$  0.88 ppm un singulete que corresponde al metilo en la posición H-24 y  $\delta$

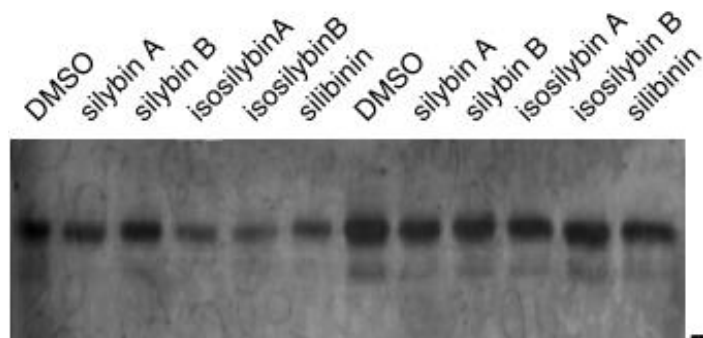
0.85 ppm un singulete que integra para 6 protones que corresponde a los metilos en las posiciones H-25 y H-26. En el  $^{13}\text{C}$ -NMR el desplazamiento correspondiente a  $\delta$  171.2 ppm que corresponde al acetato.

Realizada la comparación de los espectros experimentales con los de la literatura (Delgado et al., 2014), se confirmó que se trata del compuesto acetato de moretenol.

El acetato de moretenol es un triterpeno, que ha sido aislado a partir del extracto de hexano en especies como *Pluchea lanceolata*, *Achillea ligustica* y *Launaea residifolia* de la familia Asteraceae mostrando propiedades bioactivas como antiinflamatorio, antibacteriano, antiprotozoario, antidiabético y antioxidante (Singh Lehra et al., 2014; Mohd Lip et al., 2009; Cheriti et al., 2015). También se han encontrado reportes de este compuesto en la especie *Ficus deltoide* de la familia Moraceae el mismo que inhibe las células cancerígenas de próstata en la línea celular DU145 en un 45.45% (Binti Soid, 2016). En la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn es el primer reporte de este compuesto.

La metodología empleada para caracterizar y aislar los compuestos de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn ha sido a partir de extractos secos etanólicos utilizando técnicas avanzadas como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), HPTLC (cromatografía de capa fina de alta resolución), CG/EM (cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas), HPCE (electroforesis capilar de alto rendimiento) y espectrometría UV-Vis. La TLC tiene una aplicabilidad limitada a esta mezcla debido a una pobre eficacia de separación y un proceso tedioso (Mora Gilces , 2015; Davis Searles et al., 2005; XiuLan et al., 2009).





**Figura 17.** Caracterización de los extractos secos por HPTLC, revelado con luz UV de longitud de onda de 254nm y utilizando como revelador cloruro férrico al 1%. Se utiliza como un parámetro la medición de Rf de las muestras.

**Fuente:** (Mora Gilces , 2015).

**Elaborado:** Castillo, J. 2017.

La técnica más efectiva de acuerdo a bibliografía es mediante HPLC, la separación se completó en una columna de ODS (Columnas Hypersil ODS C18) usando solución de ácido acético acuoso al 1% y metanol como fase móvil con elusión en gradiente (XiuLan et al., 2009).

En el análisis cuantitativo contenido de flavonoides (HPLC en base seca), los extractos contenían 80-90% de silibina A y B, 1,5-2,5% de isosilibina A y B, 1,5-3,5% de silicristalina, silidianina no superior al 1% y taxifolina no superior al 1%. Dentro de las características físicas del flavonoide silimarina se ha determinado apariencia: polvo amarillento, solubilidad: metanol y etanol pero insoluble en agua y su identificación como ya se había mencionado se ha realizado por HPTLC y HPLC (Mora Gilces , 2015).

Para la metodología experimental empleada del presente proyecto se utilizaron todas las partes aéreas de la especie en estudio, se fracciono usado solventes de polaridad ascendente obteniendo 3 extractos: hexano, acetato de etilo y metanol; se utilizaron técnicas convencionales como cromatografía en columna abierta, TLC (cromatografía en capa fina) con estas técnicas se logra aislar compuestos mayoritarios de la especie y para su identificación se utilizaron técnicas como punto de fusión, CG/EM (cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas) y RMN (resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ). Debido a que los compuestos reportados de la especie *Silybum marianum* L. Gaertn son isómeros es complejo lograrlos aislar por las técnicas convencionales empleadas experimentalmente. Además de acuerdo a los reportes estudiados y según la Farmacopea Europea son más utilizadas las semillas secas de la especie por su gran cantidad del flavonoide silimarina (Mora Gilces , 2015).

## CONCLUSIONES

De los extractos obtenidos de la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn el que obtuvo el mayor rendimiento con un porcentaje de 11,96 fue el extracto metanólico, en comparación con los extractos de hexano y acetato de etilo con rendimiento de 1,2 y 0,731, respectivamente.

De los tres extractos que se analizaron el que presentó un mayor porcentaje de inhibición en las líneas celulares de cáncer humano, fue el extracto de acetato de etilo con un porcentaje de inhibición de 37,37 para la línea D-384 (astrocitoma cerebral).

A partir del fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto de hexano, se obtuvieron 5 fracciones HexF18B, HexF18FP1, HexF18FP12, HexF38F1, Hex38F2, las cuales aparentemente podrían ser metabolitos secundarios puros.

De la fracción de hexano HexF18FP12 se obtuvo un compuesto identificado por CG/EM y RMN como acetato de moretenol (1), la presencia de este compuesto constituye el primer reporte en la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn.

Del extracto de acetato de etilo desclorofilado se obtuvo una fracción AcHex1 y del fraccionamiento en columna de la fracción de acetato de etilo se obtuvo una fracción AcBAEP1, las cuales aparentemente podrían ser metabolitos secundarios puros.



## RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio fitoquímico de la especie vegetal *Silybum marianum* L. Gaertn realizando el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios separando tallo, flor y semilla, para un mejor fraccionamiento e identificación de los compuestos presentes en los extractos de la especie. Según la Farmacopea Europea son más utilizadas las semillas secas de la especie por su gran cantidad del flavonoide silimarina.

Utilizar técnicas cromatográficas con mayor selectividad como HPLC preparativo, cromatografía flash, entre otras con la finalidad lograr la separación de compuestos presentes en los extractos y fracciones obtenidas de especie, para obtener los compuestos de interés responsables de la actividad citotóxica a la especie vegetal.

Continuar con la caracterización de los 6 compuestos aislados, los que aparentemente se encuentran puros de acuerdo con la técnica empleada de cromatografía en capa fina, los mismos que deben ser caracterizados por CG/EM y RMN (fuera de servicio).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abascal , K., & Yarnell , E. (2003). The Many Faces of *Silybum marianum* (Milk Thistle). *Alternative and Complementary Therapies*, 170-175. doi:<https://doi.org/10.1089/107628003322256878>
2. Achika, J., Arthur, D. E., Gerald, I., & Adedayo, A. (2014). A Review on the Phytoconstituents and Related Medicinal Properties of Plants in the Asteraceae Family. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 1-8. Recuperado el 12 de Septiembre de 2016, de <http://www.iosrjournals.org/iosr-jac/papers/vol7-issue8/Version-1/A07810108.pdf>
3. American Cancer Society. (2015). Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. *American Cancer Society*, (800), 1–64. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.27711>
4. Arevalo, G. (2010). El Ecuador y su biodiversidad, 1-3. Recuperado el 25 de Noviembre de 2016, de Monografias: <http://www.monografias.com/trabajos81/ecuador-biodiversidad/ecuador-biodiversidad.shtml#ixzz4TCuEBFD8>
5. Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. Recuperado el 25 de Noviembre de 2016, de Recursos Educativos: <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>
6. Balslev, H., Navarrete, H., Torre, L. De, & Macías, M.J. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, 1-3. Herbario QCA & Herbario AAU.Quito. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de Pontificia Universidad Católica del Ecuador: <http://www.puce.edu.ec/portal/wr-resorce/blobs/1/PUB-QCA-PUCE-2008-Enciclopedia.pdf>
7. Bermudez Cañete, M. P. (2009). Los principios activos de las plantas medicinales y aromaticas. 56-65. Recuperado el 7 de Junio de 2016, de Universidad Politecnica de Madrid: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema6.pdf>
8. Binti Soid, H. (2016). Prostate cancer cell inhibition by ethanolic fraction of Ficus Deltoide. *Planta Medica Thieme*, 1-5. Recuperado el 19 de Octubre de 2017, de <http://eprints.utm.my/60703/1/HusnulHananiSoibMFChE2016.pdf>
9. Braithwaite, A. (2007). Técnicas Cromatográficas. *Química Analítica Instrumental II*, 1–123. Recuperado el 20 de Noviembre de 2016, de Universidad Nacional Autónoma de México: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
10. Bravo Velasquez, E. (2013). *Apuntes sobre la biodiversidad del Ecuador*. Cuenca: Universitaria Abya-Yala. Recuperado el 18 de Octubre de 2016, de Universidad Politecnica Salesiana: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5581/1/APUNTES%20SOBRE%20LA%20BIO DIVERSIDAD%20.pdf>
11. Carrión, A., & García, C. (2010). "Preparación De Extractos Vegetales: Determinación De Eficiencia De Metodica. *Universidad De Cuenca*, (Tesis previa a la obtención del título de Bioquímica y Farmecéutica), 27–31. Recuperado el 10 de Diciembre de 2016, de Universidad de Cuenca: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
12. Córdova, L. (2015). La complejidad de las plantas medicinales: Cardo mariano, pasado, presente y futuro., 1–20. Recuperado el 17 de Diciembre de 2016, de Universidad Complutense de Madrid: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/LAURA CORDOBA GONZALEZ.pdf>
13. Corchete, P. (2008). *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the Source of Silymarin. *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, 123–148. doi:[https://doi.org/10.1007/978-3-540-74603-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74603-4_6)

14. Chan, M. (2013). Estrategias de la OMS sobre medicina tradiciones 2014-2023. 12-34. China. Recuperado el 29 de Julio de 2017, de Organización Mundial de la Salud: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf)
15. Cheriti, A., Belboukhari, M., Belboukhari, N., & Djeradi, H. (2015). Phytochemical and biological studies on *Launaea* Cass. genus (Asteraceae) from Algerian Sahara. *Current Topics in Phytochemistry*, 67-80. Recuperado el 21 de Octubre de 2017, de [https://www.researchgate.net/publication/272743447\\_Terpenoids\\_of\\_the\\_Saharan\\_medicinal\\_plants\\_Launaea\\_Cass\\_Genus\\_Asteraceae\\_and\\_their\\_biological\\_activities](https://www.researchgate.net/publication/272743447_Terpenoids_of_the_Saharan_medicinal_plants_Launaea_Cass_Genus_Asteraceae_and_their_biological_activities).
16. Davis Searles, P., Nakanishi, Y., Kim, N.-C., Graf, T., Oberlies, N., Wani, M., Kroll, D. (2005). Milk Thistle and Prostate Cancer: Differential Effects of Pure Flavonolignans from *Silybum marianum* on Antiproliferative end Points in Human Prostate Carcinoma Cells. *PubMed*, 2-11. doi:<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4662>
17. Delgado, G., Hernandez, J., & Rios, M. Y. (2014). Pentadecyclic Triterpenes from *Cnidioscolus multilobus*. *Planta Medica*, 2. doi: <https://doi.org/10.1055/s-2006-959514>
18. Doughari, J. H., Human, I. S., Bennade, S., & Ndakidemi, P. A. (2009). Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 839–848. Recuperado el 14 de Junio de 2017, de ResearchGate: [https://www.researchgate.net/publication/228667783\\_Phytochemicals\\_as\\_chemotherapeutic\\_agents\\_and\\_antioxidants\\_Possible\\_solution\\_to\\_the\\_control\\_of\\_antibiotic\\_resistant\\_verocytotoxin\\_producing\\_bacteria](https://www.researchgate.net/publication/228667783_Phytochemicals_as_chemotherapeutic_agents_and_antioxidants_Possible_solution_to_the_control_of_antibiotic_resistant_verocytotoxin_producing_bacteria)
19. Dorland, B. (2005). *DORLAND DICcionario ENCICLOPEDICO ILUSTRADO DE MEDICINA* (30th ed.). Madrid: S.A. ELSEVIER ESPAÑA.
20. Espinoza, V. (2017). ESTRATEGIA NACIONAL PARA LA ATENCIÓN INTEGRAL DEL CÁNCER EN EL ECUADOR. 1-23. Recuperado el 12 de Enero de 2017, de Ministerio de Salud Publica: [https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/ac\\_0059\\_2017.pdf](https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/ac_0059_2017.pdf)
21. Estrada Narvaez, A. M., & Imbaquingo Ger, H. M. (2015). Medicina Tradicional y uso de plantas medicinales en los cantones Antonio Ante y Cotacachi, de la provincia de Imbabura 2015. 20-35. Ibarra. Recuperado el 8 de Octubre de 2016, de Repositorio Digital Universidad Tecnica del Norte: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/4573/1/06%20ENF%20673%20TESIS.pdf>
22. Fonegra, R., & Jimenez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia* (Segunda ed.). 82-85. Colombia: Universidad de Antioquia.
23. Gallego, L. (2011). Técnicas. Recuperado el 12 de Diciembre de 2016, de Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) Universidad de Málaga: <http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/ems/ems.html>
24. 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. Recuperado el 5 de Agosto de 2016, de Universidad Politecnica de Catalunya: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>
25. Greenlee, H., Abascal, K., Yarnell, E., & Ladas, E. (2007). Clinical applications of *Silybum marianum* in oncology. *Integrative Cancer Therapies*, 6(2), 158–165. doi:<https://doi.org/10.1177/1534735407301727>

26. Hernández, J. (2017). Reunion Internacional de Investigacion en Productos Naturales. (D. Navarrete, Ed.) *Latinoamericana de quimica*, 399. Recuperado el 29 de Julio de 2017, de [www.relaquim.com/archive/2017/RLQSuplementoEspecial2017.pdf](http://www.relaquim.com/archive/2017/RLQSuplementoEspecial2017.pdf)
27. Imaculada, A., Casamitjana, N., Caubet, A., Muñoz, D., Seco, M., & Rosell, G. (2015). *Punto de Fusion*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2016, de Universitat de Barcelona: <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/punt1.html>
28. Jaramillo, L. P. (2001). Punto De Fusión. *Santiago de Cali*, 20. Recuperado el 20 de Diciembre de 2016, de Universidad del Valle: [http://objetos.univalle.edu.co/files/Origen\\_importancia\\_estructura\\_propiedades\\_de\\_compuestos\\_organicos.pdf](http://objetos.univalle.edu.co/files/Origen_importancia_estructura_propiedades_de_compuestos_organicos.pdf)
29. Duran Garcia, R., & Mendez Gonzalez, M. E. (2010). *Biodiversidad y Desarrollo en Yucatan*. Mexico: Cicy. Recuperado el 2016 de Noviembre de 5, de <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/18%20Asteraceas.pdf>
30. Kenndler, E. (2004). Introduction to Chromatography, 1-25. Recuperado el 10 de Noviembre de 2016, de Instituto de Química Analítica, Universidad de Viena: <https://pdfs.semanticscholar.org/1bb8/d730abfdb2df57b22ba1e93317de086bef77.pdf>
31. Kumaraguruparan, R., & Rajesh, A. (2008). Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *ScienceDirect*, 11. doi:<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.canlet.2008.03.053>
32. Laza-Loaces, D., Rodríguez-Luis, I., & Sardiña-Cabrera, G. (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(3), 10. Recuperado el 13 de Agosto de 2016, de Scielo Cuba: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962003000300012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000300012)
33. Lin, A.-S., Shibano, M., Nakagawa-Goto, K., Tokuda, H., Itokawa, H., Morris-Natschke, S. L., & Lee, K.-H. (2007). Cancer Preventive Agents. 7. Antitumor-Promoting Effects of Seven Active Flavonolignans from Milk Thistle ( *Silybum marianum* ) on Epstein-Barr Virus Activation. *Pharmaceutical Biology*, 45(10), 735–738. doi:<https://doi.org/10.1080/13880200701585592>
34. López, M. (2012). Manual de plantas medicinales para Guinea Ecuatorial. Fundación de Religiosos para la salud (FRS), 7-9. Recuperado el 7 de Mayo de 2017, de [http://www.academia.edu/6947967/MANUAL\\_DE\\_PLANTAS\\_MEDICINALES\\_PARA\\_GUINEA\\_ECUATORIAL](http://www.academia.edu/6947967/MANUAL_DE_PLANTAS_MEDICINALES_PARA_GUINEA_ECUATORIAL)
35. Mata-Santos, H., Lino, F., Paiva, C., Rocha, C., Castelo Branco, M., & Pyrrho, A. (2010). Silymarin treatment reduces granuloma and hepatic fibrosis in experimental schistosomiasis. *Pubmed*. Recuperado el 14 de Diciembre de 2016, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694562>
36. Mendez, A. (2010). *Cristalizacion*. Recuperado el 11 de Diciembre de 2016, de La Guía: <http://quimica.laguia2000.com/general/cristalizacion>
37. Mendez, R. C. A. (2013). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. *Tesis*, 1–100. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de Universidad Politecnica Salesina Sede Quito: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
38. Moench, S. (2007). *Silybum marianum* L Cardo mariano, 1–22. Recuperado el 10 de Noviembre de 2016, de Instituto de Salud Pública de Chile: [http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fce.77s/doc/monografias/Silybum\\_marianum.pdf](http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fce.77s/doc/monografias/Silybum_marianum.pdf)
39. Mohd Lip, J., Nazrul Hisham, D., Arif Zaidi, J., Musa, Y., Ahmad, A., Normah, A., & Sharizan, A. (Febrero de 2009). Isolation and identification of moretenol from *Ficus deltoidea* leaves.

*Journal of tropical agriculture and food science*, 195-201. Recuperado el 12 de Octubre de 2017, de <http://ejtafs.mardi.gov.my/jtafs/37-2/Moretenol.pdf>

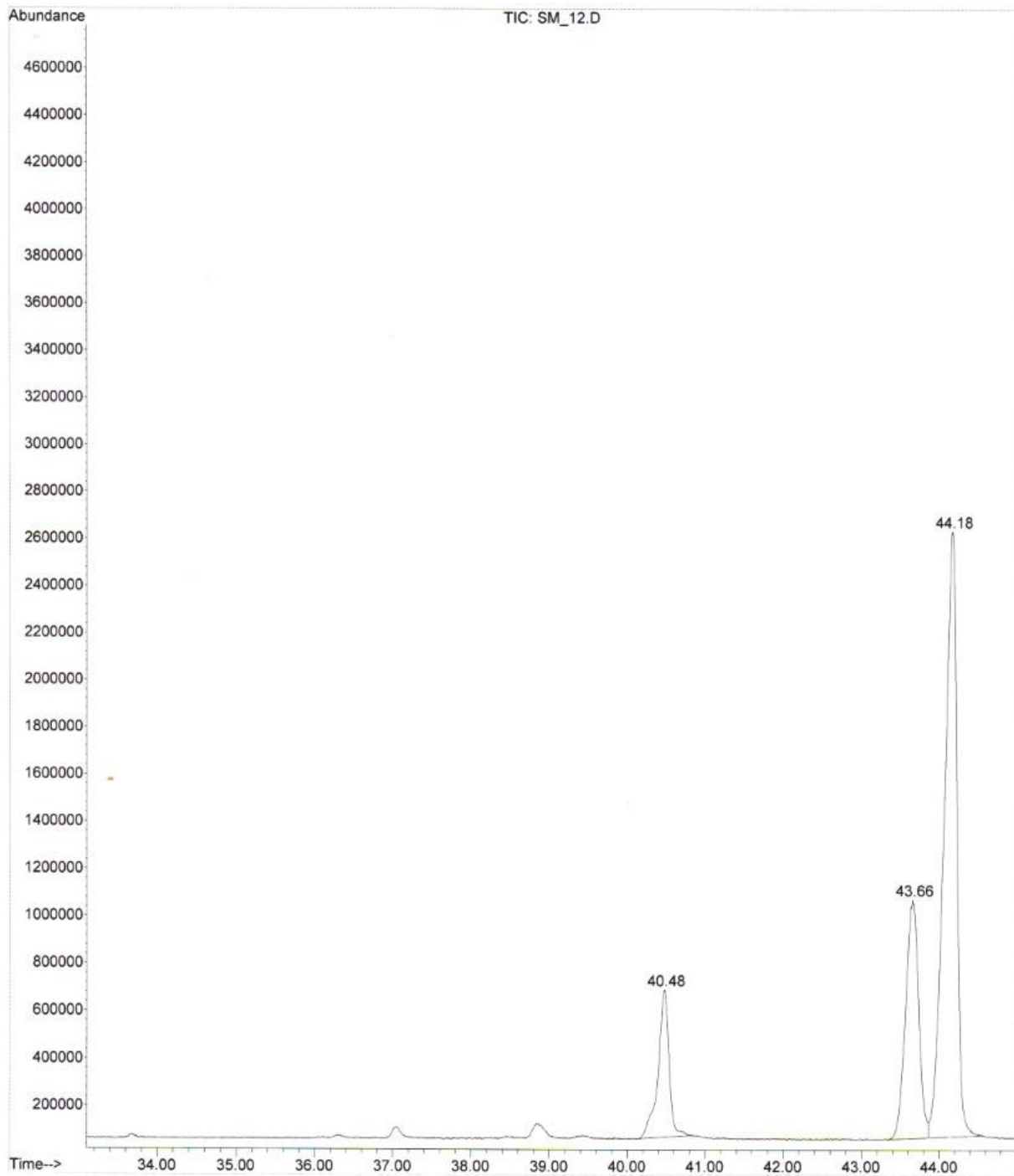
40. Mora Gilces , T. (Octubre de 2015). Propuesta de implementación de procedimientos operativos estándar (POE) en la línea de producción de tabletas en base de silimarina, contenida en *Silybum marianum* (CARDO MARIANO). *Universidad Central del Ecuador* , 73-76. Recuperado el 15 de Octubre de 2017, de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6323/1/T-UCE-0008-058.pdf>
41. Murga Clausell, J., & Flomir Ventura Eva. (2011). Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear. 193-207. Recuperado el 8 de Diciembre de 2016, de Fundamentos de Química Orgánica: <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA10FQO.pdf>
42. Naranjo, P., & Escaleras, R. (1995). *La medicina tradicional en el Ecuador: memorias de las Primeras Jornadas Ecuatorianas de Etnomedicina Andina*. Quito: Universidad Andina Simón Bolívar / Corporación Editora Nacional. Recuperado el 11 de Agosto de 2016, de <http://www.uasb.edu.ec/web/area-de-salud/publicacion?la-medicina-tradicional-en-el-ecuador-memorias-de-las-primeras-jornadas-ecuatorianas-de-etnomedicina-andina-239>
43. Navarro, M. C., & Montilla Herrera, M. P. (2012). Interes terapeutico del fruto cardo mariano. *Fitoterapia*, 101-116. Recuperado el 11 de Junio de 2017, de [https://www.fitoterapia.net/php/descargar\\_documento.php?id=4378&doc\\_r=sn](https://www.fitoterapia.net/php/descargar_documento.php?id=4378&doc_r=sn)
44. Naveda, G. (2010). Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (*Ruta graveolens*), con alto contenido de polifenoles , 118. Recuperado el 19 de Diciembre de 2016, de Ecuelsa Politecnica Nacional: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2295/1/CD-3036.pdf>
45. Olguin Pérez, L. P., & Rodríguez Magadan, H. (8 de Junio de 2004). Métodos en biotecnología - Cromatografía de gases. Recuperado el 19 de noviembre de 2016, de Universidad Nacional Autónoma de México: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf)
46. Ortega Maldonado, L. (2012). Producción de silimarina en cultivos celulares de Cardo mariano (*Silybum marianum*): efecto de distintos elicitores. 2. Salamanca. Recuperado el 19 de Diciembre de 2016, de Secretaria de Educacion Superior, Ciencia, Tecnologia e Innovacion: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/502/1/T-SENESCYT-0313.pdf>
47. Pehlivan Karakaş, F., Yildirim, A., & Türker, A. (2012). Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish Journal of Biology*, 36(6), 641–652. doi:<https://doi.org/10.3906/biy-1203-16>
48. Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211. Recuperado el 10 Agosto de 2016, de Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central Marta Abreu de Las Villas:<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/download/255/228>
49. Perez, G. (2000). *Espectrometría de resonancia magnética nuclear*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de [http://www.espectrometria.com/espectrometra\\_de\\_resonancia\\_magntica\\_nuclear](http://www.espectrometria.com/espectrometra_de_resonancia_magntica_nuclear)
50. Piantanida, M. (2011). *Biodiversidad*. Recuperado el 30 de Noviembre de 2016, de Centro Científico Tecnológico (CCT) Mendoza.: <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Biodiver.htm>
51. Ponz, E., Carpio, G., & Meo, S. (2005). *La Medicina Tradicional de los Tacana y Machineri*. (P. Jimenez , Ed.). 1-5. Bolivia: Fundacion PIEB.
52. Quiroz, N. (2008). *Estudio Para La Creación de Una Hostería Ecoturística Ubicada al Noroccidente de la Ciudad de Quito, Parroquia Nanegalito*. Escuela Politécnica del Ejército. 18-

20. Sangolquí. Recuperado el 20 de Junio de 2016, de Repositorio Institucional de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1732/1/T-ESPE-020277.pdf>
53. Requena, A., & Zuñiga, J. (2012). Resonancia Magnética Nuclear. 1-36. Recuperado el 12 de Noviembre de 2016, de Universidad de Valencia: [http://www.uv.es/tunon/QFIII/tema\\_1.pdf](http://www.uv.es/tunon/QFIII/tema_1.pdf)
54. Roustakhiz, J., & Saboki, E. (2016). Plant Tissue Culture of *Silybum Marianum* L. and Check out Elicitor Effect on the Amount of Silymarin. *Journal of Novel Applied Sciences*, 161-168. Recuperado el 15 de Junio de 2017, de [https://www.researchgate.net/publication/311648976\\_Plant\\_Tissue\\_Culture\\_of\\_Silybum\\_Marianum\\_L\\_and\\_Check\\_out\\_Elicitor\\_Effect\\_on\\_the\\_Amount\\_of\\_Silymarin](https://www.researchgate.net/publication/311648976_Plant_Tissue_Culture_of_Silybum_Marianum_L_and_Check_out_Elicitor_Effect_on_the_Amount_of_Silymarin)
55. Sagar, S. (2007). Future Directions for Research on *Silybum marianum* for Cancer Patients. *Sage journals*, 8. Recuperado el 23 de Noviembre de 2017, de <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1534735407301566>
56. Singh Lehra, K., Kaur, R., Sharma, S., Kapoor, A., & Singh, S. (2014). Anti-inflammatory agents from plants- Part III. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, V, 121-128. Recuperado el 21 de Octubre de 2017, de [op.niscair.res.in/index.php/IJNPR/article/download/12452/658](http://op.niscair.res.in/index.php/IJNPR/article/download/12452/658)
57. Soto Montoya, M. Y. (2015). Determinación del efecto antimicrobiano in vitro de un gel elaborado con extracto etanólico de hojas de *Senecio rhizomatus* Rusby (Asteraceae). 3. Lima, Peru. Recuperado el 22 de Noviembre de 2016, de Universidad Nacional Mayor de San Marcos: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4628/1/Soto\\_mm.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4628/1/Soto_mm.pdf)
58. Stewart, B., & Wild, C. (2015). Cáncer. Recuperado el 12 de Diciembre de 2016, de Organizacion Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
59. Stewart, B., & Wild, C. (2014). World Cancer Report 2014. *World Health Organization*, 26-32. Francia. Recuperado el 16 de Julio de 2016, de International Agency for Research on Cancer: <https://inovelthng.files.wordpress.com/2016/11/world-cancer-report.pdf>
60. S. Singh, A. M. (2013). Anticancer Activity of *Andrographis paniculata* and *Silybum marianum* on Five Human Cancer Cell Lines. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 42-48. Recuperado el 30 de Julio de 2017, de [https://www.researchgate.net/publication/270977277\\_Anticancer\\_Activity\\_of\\_Andrographis\\_paniculata\\_and\\_Silybum\\_marianum\\_on\\_Five\\_Human\\_Cancer\\_Cell\\_Lines](https://www.researchgate.net/publication/270977277_Anticancer_Activity_of_Andrographis_paniculata_and_Silybum_marianum_on_Five_Human_Cancer_Cell_Lines)
61. Taboas, S. (2008). *Silybum marianum* (*Cardo mariano* o *borriquero*). Recuperado el 5 de Diciembre de 2016, de Perdido en el Amazonas: <http://perdidoenelamazonas.blogspot.com/2008/05/silybum-marianum-cardo-mariano-o.html>
62. Tapia, C., Zambrano, E., & Monteros, Á. (2008). Informe Nacional sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación. *INIAP*, 107. doi:<https://doi.org/10.1080/13880200701585592>
63. Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>
64. Usuga, M. M., & Lopez, D. F. (2014). Evaluacion del efecto de taninos obtenidos de la *Garcinia mangostana* L. sobre los microorganismos de interes agricola *Erwinia* sp, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp y *Botrytis* sp. 19-21. Bogota. Recuperado el 11 de Junio de 2016, de Fundacion Universitaria Agraria de Colombia Programa Ingenieria Agroindustrial: [https://issuu.com/maosabo/docs/monograf\\_\\_a](https://issuu.com/maosabo/docs/monograf__a)

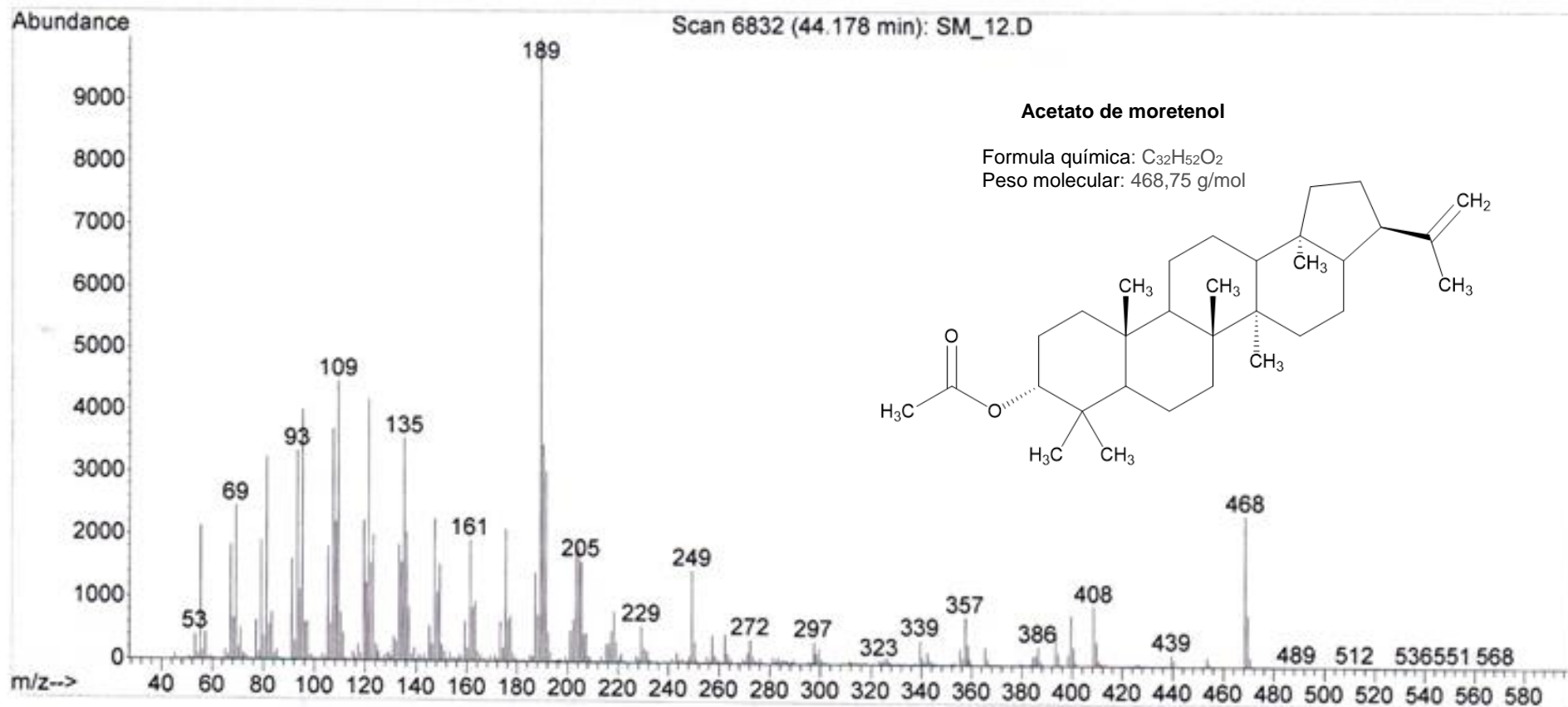
65. Vance, C. (2015). En el Día Mundial contra el Cáncer 2015 se destaca la prevención y la detección temprana. Recuperado el 3 de Diciembre de 2016, de Ministerio de Salud Pública: <http://www.salud.gob.ec/en-el-dia-mundial-contra-el-cancer-2015-se-destaca-la-prevencion-y-la-deteccion-temprana/#>
66. Vargas, J. (2011). Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en hojas de *Wigandia urens* (HYDROPHYLLACEAE), 118. Recuperado el 25 de Noviembre de 2016, de Universidad Tecnológica de Pereira: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/2559/547756V297.pdf?sequence=1>
67. Vizcaino, D. (2009). "Aislamiento y caracterización de alcaloides identificadas en el extracto de *Chrysanthemum morifolium* y su aplicación sobre el cultivo in vitro," 69. Recuperado el 12 de Diciembre de 2016, de DSpace: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/31077/1/VizcainoHdz.pdf>
68. XiuLan, C., DanNi, L., JunQin, Q., HongZhen, L., & Shaokun, W. (2009). Determination of silymarin flavonoids by HPLC and LC-MS and investigation of extraction rate of silymarin in *Silybum marianum* fruits by boiling water. *Asian Journal of Chemistry*, 63-74. Recuperado el 12 de Octubre de 2017, de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093256185>

## **ANEXOS**

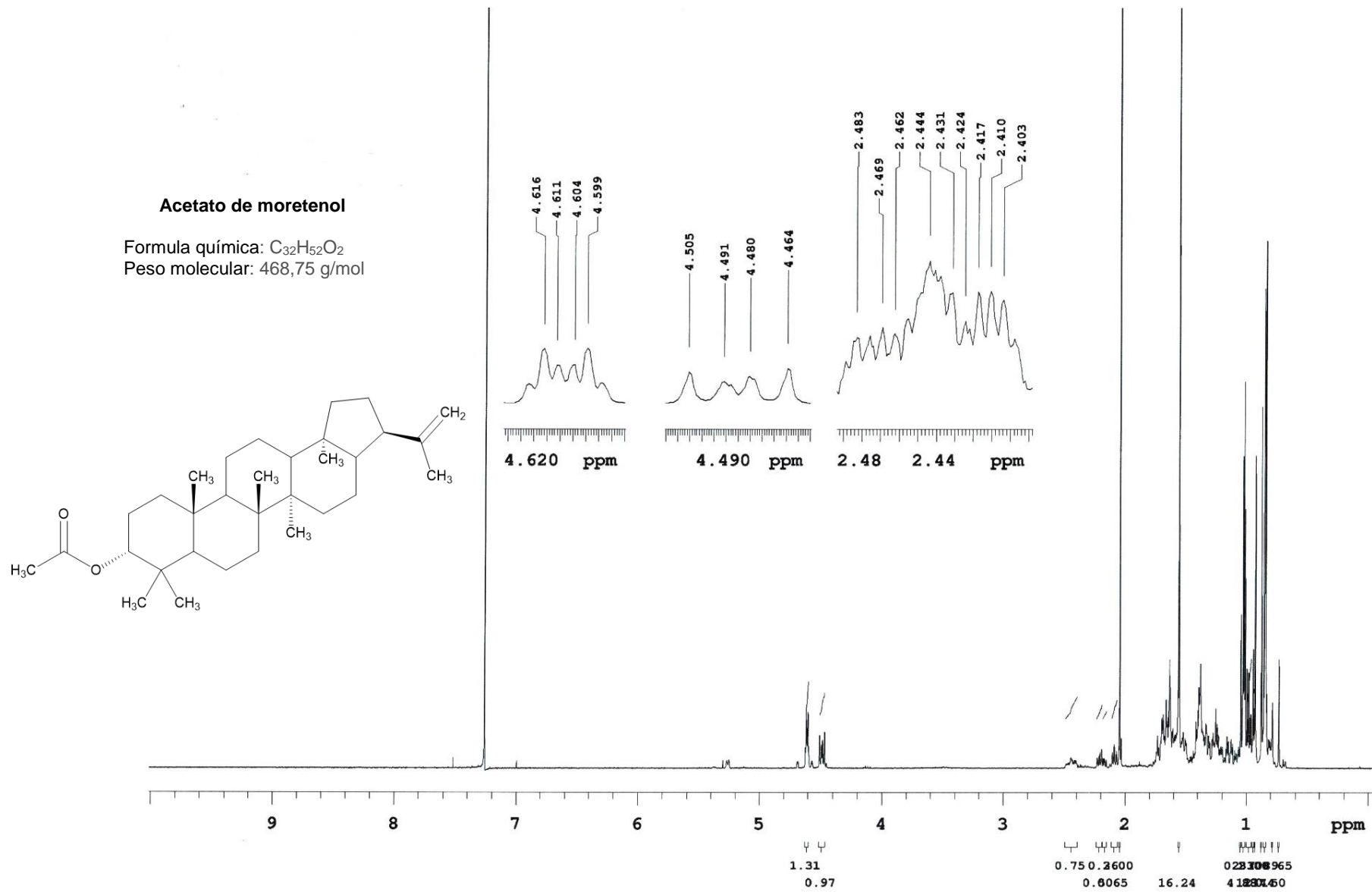




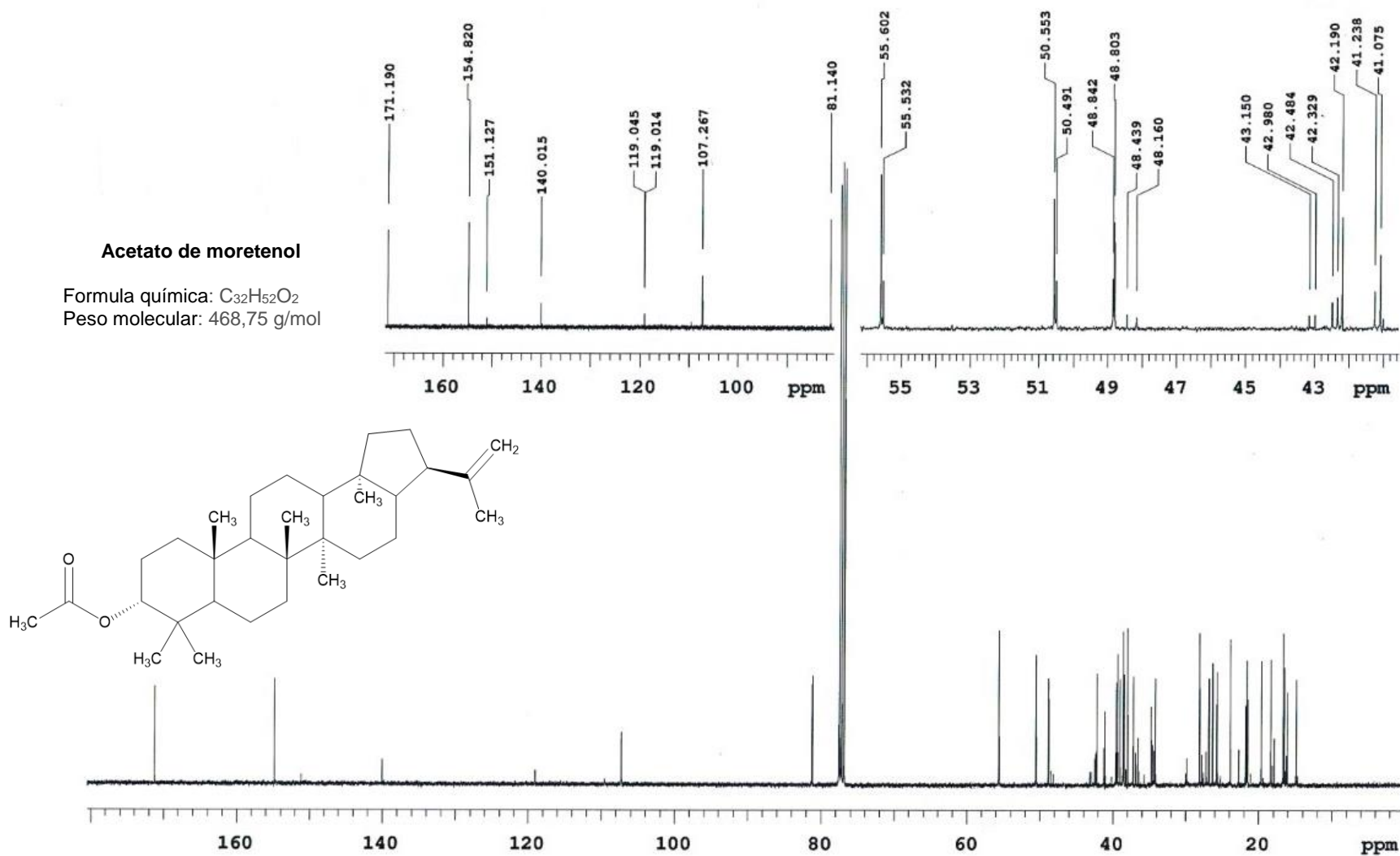
**ANEXO 1.** Espectro de Cromatografía de Gases del extracto de hexano de la especie *S. marianum* (L.) Gaertn de la fracción HexF18FP12, se muestran los 3 tiempos de retención destacados: 44.48, 43.66 y 44.18.



**ANEXO 2.** Espectro de Cromatografía de Gases del extracto de hexano de la especie *S. marianum* L. Gaertn de la fracción HexF18FP12, correspondiente al compuesto identificado como acetato de moretenol con un  $t_R = 44.18$  min.



**ANEXO 3.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del extracto de hexano de la especie *S. marianum* L. Gaertn de la fracción HexF18FP12, correspondiente al compuesto identificado como acetato de moretenol.



**ANEXO 4.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del extracto de hexano de la especie *S. marianum* L. Gaertn de la fracción HexF18FP12, correspondiente al compuesto identificado como acetato de moretenol.

