



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Estudio fitoquímico y aislamiento de metabolitos secundarios a partir de la especie *Lepechinia radula* (Benth.) Epling.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTORA:** León Camacho, Jackeline del Rocío

**DIRECTOR:** Ramírez Robles, Jorge Yandry, 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 DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Jorge Yandry Ramírez Robles.

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Estudio fitoquímico y aislamiento de metabolitos secundarios a partir de la especie *Lepechinia radula* (Benth.) Epling realizado por León Camacho Jackeline del Rocío, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2018

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, León Camacho Jackeline del Rocío declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Estudio fitoquímico y aislamiento de metabolitos secundarios a partir de la especie *Lepechinia radula* (Benth.) Epling de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo el Ph.D. Ramírez Robles Jorge Yandry director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f) .....

Autora: León Camacho Jackeline del Rocío

Cédula: 1104716210

## DEDICATORIA

Con humildad este trabajo dedico en primer lugar a Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar a este momento tan importante de mi formación profesional, por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mis padres por el apoyo incondicional, especialmente a mi madre por ser la persona que me ha acompañado durante todo mi trayecto de estudiante y de mi vida, haber velado por mí durante este arduo camino. A toda mi familia porque me brindaron todo su apoyo y compartieron conmigo buenos y malos momentos.

*Jackeline del Rocío León Camacho*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haber sido mi guía y darme las fuerzas necesarias para superar todas las dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mis padres y hermanos por todo el apoyo brindado, agradezco en especial a mi madre por confiar en mí, ser el sustento de mi vida, que sin duda en todo el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor y corrigiendo mis faltas.

Y a mis amigas por demostrarme todo su apoyo y por haber estado presente en toda esta etapa de mi vida.

A mi director de tesis Ph.D. Jorge Ramírez por compartir conmigo sus conocimientos con toda responsabilidad, por todo su esfuerzo, paciencia y colaboración brindada durante este proyecto de investigación.

Al Ph.D. Vladimir Morocho por aportar sus conocimientos, por su amistad y por su valioso tiempo conmigo.

Y al Departamento de Química y Ciencias Exactas por la oportunidad de realizar mi tesis y por el asesoramiento para llevar a cabo este proyecto de investigación.

*Jackeline del Rocío León Camacho*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xi
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
CAPÍTULO I .....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
<b>1.1. Medicina Tradicional.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Plantas Medicinales .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Familia Lamiaceae.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Género <i>Lepechinia</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.5. Especie <i>Lepechinia radula</i> .....</b>	<b>7</b>
1.5.1. Clasificación Taxonómica.....	8
<b>1.6. Metabolitos Secundarios de las plantas.....</b>	<b>8</b>
1.6.1. Terpenos.....	8
1.6.2. Compuestos Fenólicos.....	9
1.6.3. Glicósidos. ....	9
1.6.4. Alcaloides.....	9
<b>1.7. Técnicas Espectroscópicas .....</b>	<b>9</b>
1.7.1. Cromatografía en columna (CC).....	9

1.7.2.	Cromatografía en capa fina (CCF).	10
1.7.3.	Cromatografía de Gases-Espectroscopia de Masas (CG-EM).	10
1.7.4.	Resonancia magnética nuclear (RMN).	10
<b>1.8.</b>	<b>Actividad Biológica</b>	<b>11</b>
<b>1.9.</b>	<b>Actividad antimicrobiana</b>	<b>11</b>
<b>1.10.</b>	<b>Bacterias</b>	<b>11</b>
1.10.1.	Bacterias Gram Positivas.	12
1.10.2.	Bacterias Gram Negativas.	12
<b>1.11.</b>	<b>Hongos</b>	<b>12</b>
1.11.1.	<i>Candida albicans</i> .	13
<b>1.12.</b>	<b>Enzima <math>\alpha</math>-glucosidasa</b>	<b>13</b>
CAPÍTULO II		14
MATERIALES Y MÉTODOS		14
<b>2.1.</b>	<b>Metodología empleada</b>	<b>15</b>
<b>2.2.</b>	<b>Recolección de la especie</b>	<b>15</b>
<b>2.3.</b>	<b>Proceso de secado del material vegetal</b>	<b>15</b>
<b>2.4.</b>	<b>Obtención de Extractos Totales</b>	<b>16</b>
2.4.1.	Maceración.	16
<b>2.5.</b>	<b>Desclorofilación</b>	<b>16</b>
<b>2.6.</b>	<b>Fraccionamiento y aislamiento de metabolitos secundarios</b>	<b>17</b>
2.6.1.	Cromatografía en Capa Fina.	17
<b>2.7.</b>	<b>Purificación de metabolitos secundarios</b>	<b>18</b>
2.7.1.	Purificación de la fracción JL7/7.	18
2.7.2.	Purificación de la fracción JL10-11/7.	18
<b>2.8.</b>	<b>Elucidación de metabolitos secundarios aislados</b>	<b>18</b>
2.8.1.	Factor de Retención.	18
2.8.2.	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	19
2.8.3.	Cromatografía de Gases acoplado a Espectroscopia de Masas (CG-EM).	19
<b>2.9.</b>	<b>Determinación de la actividad biológica de los extractos</b>	<b>19</b>



2.9.1.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	19
2.9.2.	Microorganismos de prueba.....	19
2.9.3.	Preparación de la muestra.....	20
2.9.4.	Preparación del cultivo overnight.....	20
2.9.5.	Preparación de la suspensión del inóculo para microorganismos.....	20
<b>2.10.</b>	<b>Concentración mínima inhibitoria (CMI).....</b>	<b>20</b>
2.10.1.	Concentración mínima inhibitoria antimicrobiana.....	20
<b>2.11.</b>	<b>Actividad enzimática.....</b>	<b>21</b>
2.11.1.	Ensayo de $\alpha$ -glucosidasa.....	21
CAPÍTULO III .....		22
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....		22
<b>3.1.</b>	<b>Extractos Obtenidos de <i>Lepechinia radula</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.</b>	<b>Análisis de Metabolitos Secundarios .....</b>	<b>23</b>
3.2.1.	Fracción JL25/11.....	23
3.2.2.	Fracción JL31/12.....	25
3.2.3.	Fracción JL88/27.....	27
<b>3.3.</b>	<b>Determinación de actividad biológica de los extractos totales desclorofilados de <i>Lepechinia radula</i>.....</b>	<b>28</b>
3.3.1.	Actividad antimicrobiana de extractos totales.....	28
3.3.2.	Actividad enzimática de extractos totales.....	29
CONCLUSIONES.....		30
RECOMENDACIONES .....		31
BIBLIOGRAFÍA .....		32
ANEXOS.....		38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Lepechinia radula</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Esquema de Metodología empleada en la presente investigación.....	15
<b>Figura 3</b> Obtención de extractos totales. a) Maceración, b) Filtración al vacío, c) Rotaevaporación a presión reducida, d) Extractos Totales.....	16
<b>Figura 4.</b> Proceso de desclorofilación .....	16
<b>Figura 5.</b> Aislamiento de compuestos en el extracto de AcOEt.....	17
<b>Figura 6.</b> CCF de las fracciones obtenidas extracto de AcOEt. a) Luz UV 254 nm, b) CCF revelada. ....	18
<b>Figura 7.</b> CCF de la fracción JL25/11 .....	24
<b>Figura 8.</b> Estructura química del Spathulenol .....	24
<b>Figura 9.</b> CCF de la fracción JL31/12 .....	25
<b>Figura 10.</b> Estructura química de Ácido Angustanoico E .....	26
<b>Figura 11.</b> CCF Luz UV 254nm de la fracción JL88/27 .....	27
<b>Figura 12.</b> Estructura química del 5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone. ....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de la especie <i>Lepechinia radula</i> . .....	8
<b>Tabla 2.</b> Características de la columna capilar .....	19
<b>Tabla 3.</b> Peso y Rendimiento de los extractos de <i>Lepechinia radula</i> .....	23
<b>Tabla 4.</b> Sesquiterpeno identificado en la fracción JL25/11 .....	24
<b>Tabla 5</b> Datos espectroscópicos de <sup>1</sup> H RMN del Spathulenol. ....	24
<b>Tabla 6</b> Datos espectroscópicos de <sup>1</sup> H RMN del Ácido Angustanoico E .....	26
<b>Tabla 7</b> Datos espectroscópicos de <sup>13</sup> C RMN del Ácido Angustanoico E .....	26
<b>Tabla 8</b> Datos espectroscópicos de <sup>1</sup> H RMN del 5-hidroxy-7-4'-dimethoxyflavone .....	28
<b>Tabla 9.</b> CMI antimicrobiana de los extractos totales desclorofilados de <i>L. radula</i> .....	28
<b>Tabla 10.</b> Actividad inhibitoria en $\alpha$ -glucosidasa en extractos totales desclorofilados.....	29

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Espectro de $^1\text{H}$ del sphaetulenol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	39
<b>Anexo 2.</b> Espectro de $^1\text{H}$ del ácido angustanoico E ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	40
<b>Anexo 3.</b> Espectro de $^1\text{H}$ de 5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	44

## RESUMEN

En la presente investigación se realizó el estudio fitoquímico de las partes aéreas de la especie *Lepechinia radula*, la misma que fue recolectada en el cantón Celica, provincia de Loja. Se obtuvo extractos de acetato de etilo y metanol. Mediante técnicas espectroscópicas NMR, CG-EM y corroborando con literatura del extracto desclorofilado de AcOEt se identificó un sesquiterpeno oxigenado llamado **spathulenol (1)**, un diterpeno abiatane **Ácido Angustanoico E (2)** y un flavonoide **5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone (3)**. La actividad antimicrobiana se determinó mediante Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Los extractos obtenidos fueron inactivos contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*. El extracto de acetato de etilo presentó una actividad inhibitoria buena sobre  $\alpha$ -glucosidasa con un valor de IC<sub>50</sub> de 35,47  $\mu$ g/mL, mientras que el extracto de Metanol presenta una actividad inhibitoria débil con un valor de IC<sub>50</sub> de 149,43  $\mu$ g/mL.

**Palabras claves:** *Lepechinia radula*, Spathulenol, Ácido Angustanoico E, 5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone, CMI.

## ABSTRACT

In the present investigation, the phytochemical study of the aerial parts of the species *Lepechinia radula* collected in Celica, Loja province. Ethyl acetate and methanol extracts were obtained. The structures of the compounds were identified by spectroscopic techniques NMR, GC-MS data and corroborated by literature. The AcOEt extract was identified as an oxygenated sesquiterpene **spathulenol (1)**, a diterpene abiatane **Angustanoic acid E (2)** and a flavonoid **5-hydroxy-4', 7-dimethoxy flavone (3)**. The antibacterial activities were determined by Minimum Inhibition Concentration (MIC). The total extracts were inactive against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus*. The ethyl acetate extract showed good inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase with an  $IC_{50}$  value of 35.47  $\mu\text{g/mL}$ , while the Methanol extract showed weak inhibitory activity with an  $IC_{50}$  value of 149.43  $\mu\text{g/mL}$ .

**Keywords:** *Lepechinia radula*, Spathulenol, Angustanoic acid E, 5-hydroxy-4', 7-dimethoxy flavone, MIC.

## INTRODUCCIÓN

Una de las mayores preocupaciones para la humanidad ha sido mantener la salud, el descubrimiento de nuevas enfermedades ha motivado al hombre a buscar una solución para estas dolencias y ha sido a través del ensayo con plantas, empezando así con el estudio científico de las plantas y sus componentes químicos con propiedades medicinales (Butler, 2004). Para el estudio de plantas medicinales se debe comprender una serie de investigaciones: etnobotánicas y etnofarmacológicas para conocer el uso tradicional y los efectos de las plantas que poseen propiedades medicinales, actividad biológica para comprobar científicamente el uso terapéutico por ensayos *in vitro* o *in vivo*, estudio fitoquímico para determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta a partir del fraccionamiento de extractos de la planta, estudio de toxicidad y citotoxicidad de posibles efectos tóxicos, y el desarrollo de un producto fitoterapéutico a partir de los extractos o compuestos activos (Butler, 2004; Dominguez, 1988).

Según la OMS, el 80% de la población mundial utiliza remedios naturales y medicina tradicional, y Ecuador no es la excepción (Roy, 1992). Ecuador se considera uno de los países con mayor diversidad en el mundo y donde la población local mantiene sus tradiciones ancestrales en el uso de remedios naturales. Cuenta con más de 17.000 especies de plantas vasculares de las cuales 5.172 son útiles, de estas 3.118 son usadas con fines medicinales de las cuales el 75% de estas son especies nativas y el 11% son plantas introducidas (Vásconez & Hofstede, 2006). Por este motivo en nuestro país se están desarrollando estudios fitoquímicos y farmacológicos de productos naturales a base de plantas medicinales, las cuales son utilizadas como materia prima para la producción de extractos o el aislamiento de sustancias naturales puras (Hart, 2015).

La familia Lamiaceae son ampliamente utilizadas en medicina, son de interés farmacológico como agentes espasmolíticos, expectorantes, antipiréticos y bactericidas. Flavonoides, terpenoides y alcaloides han sido extraídos de esta familia (Milevskaya, Temerdashev, Butylskaya, & Kiseleva, 2017). Previa investigación farmacológica del género *Lepechinia* y se ha reportado efectos hipoglucémicos, vasorelaxantes, actividad antioxidante y antibacteriana (Morocho et al., 2017). Tanto sesquiterpenos, diterpenos y flavonoides han sido aislados de diferentes especies de este género (Delgado et al., 2014). La especie *Lepechinia radula* es un arbusto nativo de la región andina del Ecuador, se encuentra en las provincias de Azuay y Loja (Jorgensen, 2003).

El propósito de este estudio es contribuir al conocimiento de la composición fitoquímica, las propiedades físicas y la actividad biológica de la parte no volátil de la especie *Lepechinia radula* (Benth.) Epling.

**CAPÍTULO I**  
**MARCO TEÓRICO**



## **1.1. Medicina Tradicional**

La medicina tradicional hace referencia a cualquier práctica del cuidado de la salud antigua y culturalmente diferente de la medicina científica, es considerada como práctica indígena, no ortodoxa o alternativa y en gran parte utilizada por comunidades de diferentes culturas (Dery, Otsyina, & Ng'atigwa, 1999).

El uso de la medicina tradicional en el tratamiento de enfermedades, se ha llevado a cabo desde tiempos ancestrales y ha demostrado que es una de las mejores opciones para beneficiar a las personas y comunidades que conservan su valor y uso cultural de las plantas medicinales (Ginebra, 2005).

La OMS define medicina tradicional como prácticas, enfoques, conocimientos y creencias que incorporan medicamentos basados en plantas, animales y minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados para tratar, diagnosticar y prevenir enfermedades o mantener el bienestar (WHO, 2003). Ecuador por su alta diversidad biológica y cultural se ha constituido en uno de los países con un gran potencial en la medicina tradicional, por ende es muy importante crear diferentes aspectos de valor, como formas de uso de cada planta y beneficios curativos que brinda en las diferentes comunidades del país (Zambrano, et al., 2015).

## **1.2. Plantas Medicinales**

La búsqueda de la actividad biológica en sus extractos, aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes y encontrar el o los principios activos el principal objetivo de la fitoquímica, a partir de estudios científicos de plantas tóxicas, medicinales y aun las que hasta ahora no han sido utilizadas con fines terapéuticos (Lagos, 2007).

En el reino vegetal sólo una parte de la planta radica su actividad farmacológica, puede tratarse de la raíz, la corteza del tronco del árbol o de las hojas de un árbol o arbusto, como también se puede localizar en las semillas, flores, frutos de la planta. Las drogas vegetales que provienen de la recolección de plantas nativas, presentan una gran variabilidad en contenidos de componentes activos (Aguirre, et al., 2006). Considerando el término droga como cada una de las partes activas del vegetal responsable de su utilización en terapéutica, siendo los principios activos aquellas sustancias de composición química establecida, responsables de la acción farmacológica de las drogas. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales proceden del metabolismo secundario (Cortes, Andreu, Bermejo, & Zafra, 2003).

Actualmente la literatura científica garantiza el uso de las plantas, sus extractos o sus compuestos activos frente a numerosas enfermedades como diabetes, hipertensión, cáncer, o con propiedades antimicrobianas, antibacterianas, antimicóticas, relajantes y sedativas (Huerta, 1997)

### **1.3. Familia Lamiaceae**

Las labiadas en botánica son conocidas con los nombres latinos de Labiatae o Lamiaceae (Fernández & Rivera, 2006). Son una familia de plantas aromáticas constituidas fundamentalmente por hierbas o arbustos, todas sus partes están dotadas de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles, las hojas son bilabiadas, de diferentes tamaños, solitarias o unidas en inflorescencias terminales o axiales. Muchas de las especies se usan como plantas ornamentales, como hierbas medicinales o aromáticas en las industrias como los cosméticos, los alimentos, los productos higiénicos y la perfumería (Lawrence, 1992).

Las lamiaceae en el reino vegetal están representadas por 220 géneros y alrededor de 3500 a 4000 especies alrededor del mundo (Almeida & Albuquerque, 2002; Castrillo, Vizcaíno, Moreno, & Latorraca, 2005). Los metabolitos secundarios encontrados normalmente en esta familia son los terpenoides especialmente los de tipo sesqui, di y tri terpenos y flavonoides (Cole, 1992), los alcaloides, los iridoides y el ácido ursólico (Watson & Dallwitz, 1991).

### **1.4. Género *Lepechinia***

*Lepechinia* es un género de la familia Lamiaceae presenta aproximadamente 43 especies distribuidas desde el norte de California en el oeste de los Estados Unidos hasta Argentina Central en el Sur de América. De las 43 especies de *Lepechinia* 30 se producen en América del Sur, la mayoría de las especies se encuentran en altas altitudes de 1500 a 4000m a nivel del mar, se localizan en sitios relativamente húmedos en los bordes de los bosques y en el páramo. Cuando está presente *Lepechinia* es abundante a lo largo de caminos, en campos perturbados y vegetación secundaria (Drew & Sytsma, 2013). En Ecuador el género *Lepechinia* comprende 9 especies, algunas de las cuales se utilizan en etnomedicina (Joergensen & León, 1999).

Debido a su alta diversidad morfológica varias especies de *Lepechinia* se valoran en el comercio de hortícola, los grupos indígenas norteamericanos y sudamericanos usan comúnmente *Lepechinia* con fines medicinales y antisépticos. Los compuestos químicos de este género dan un olor característico y también pueden ser responsables de sus propiedades medicinales y de limpieza (Harley et al., 2004). Las propiedades de algunas especies del género *Lepechinia* han sido demostradas con estudios farmacológicos tales

como hipoglucémicos, vasorelaxantes, actividad antioxidante, antibacteriana, antitumorales, insulino-miméticas, para tratar infecciones urinarias o calmar dolores de estómago (Drew & Sytsma, 2013; Vargas, Consiglio, Jørgensen, & Croat, 2004). Se ha logrado aislar sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y flavanoides de diferentes especies de este género (Delgado et al., 2014; Drew & Sytsma, 2013).

### **1.5. Especie *Lepechinia radula***

*Lepechinia radula* es un arbusto nativo que se encuentra en la región andina del Ecuador, se encuentra en las provincias de Azuay y Loja a 2000 - 2500 m a nivel del mar (Drew & Sytsma, 2013; Joergensen & León, 1999).

*L. radula* es un arbusto aromático, los tallos presentan una altura de 20 a 40 cm de largo, las hojas son elongadas, deltoides, agudas teniendo cada una de estas un largo de 4 a 6 cm de largo por 2 cm de ancho, (figura 1) (Joergensen & León, 1999).

En la provincia de Loja *L. radula* tradicionalmente se usa para tratar el espanto una enfermedad que se produce por experiencias desagradables, accidentes, episodios violentos o momentos de angustia que producen un impacto emocional en el paciente (Armijos, Cota, & González, 2014; Tene et al., 2007).

En un estudio realizado del aceite esencial de la parte aérea de *Lepechinia radula* se ha encontrado componentes mayoritarios como Hidrocarburos monoterpenos (49.6%), Monoterpenos oxigenados (2.3%), Hidrocarburos sesquiterpénicos (37.1%), Sesquiterpenos oxigenados (4.4%), con un total de componentes identificados del 93.4% (Morocho et al., 2017).



**Figura 1.** *Lepechinia radula*

**Fuente:** Autora, 2018

**Elaboración:** Autora, 2108

### 1.5.1. Clasificación Taxonómica.

**Tabla 1.** Taxonomía de la especie *Lepechinia radula*.

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Phylum</b>	Magnoleophyta
<b>Clase</b>	Magnoleopsida
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Lamiaceae
<b>Género</b>	<i>Lepechinia</i>
<b>Especie</b>	<i>radula</i>

Fuente: (Hart, 1983)

Elaboración: Autora, 2018

### 1.6. Metabolitos Secundarios de las plantas

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, tienen una distribución restringida en el reino vegetal. Una de las funciones más importantes de los metabolitos secundarios es proteger a las plantas de la ingestión por herbívoros y de la infección por patógenos microbianos (Taiz & Zeiger, 2002), como también contribuyen a los olor, sabor y color específico de la planta, son una fuente única de aditivos alimentarios y productos farmacéuticos importantes desde el punto de vista industrial (Akula, et al., 2011).

Los metabolitos secundarios se dividen según su estructura química, composición, solubilidad en diversos disolventes o la vía por la cual se sintetizan. Estos metabolitos comprenden una gran variedad de Terpenos, Compuestos fenólicos, Glicósidos y Alcaloides (Shilpa, et al., 2010).

#### 1.6.1. Terpenos.

Los terpenos o terpenoides constituyen el mayor grupo de metabolitos secundarios. Los diferentes compuestos de esta clase son básicamente insolubles en agua. Todos los terpenos derivan de la unión de cinco carbonos que tienen el esqueleto carbonado ramificado del isopentano, a elevadas temperaturas pueden descomponerse dando isopreno, y es así como en ocasiones se los llama también isoprenoides (Taiz & Zeiger, 2002). Se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos por diez (monoterpenos), quince (sesquiterpenos), veinte (diterpenos), treinta (triterpenos) o cuarenta átomos de carbono (tetraterpenos o carotenoides). Los compuestos terpenoides tienen gran

importancia medicinal debido a sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimicrobianas, etc., usados en la comercialización de productos cosméticos y alimenticios tanto en el aroma y fragancia de los mismos (Ávalos & Elena, 2009).

### **1.6.2. Compuestos Fenólicos.**

Compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en todas las clases de plantas que se producen como parte de mecanismo de defensa. En su estructura posee un anillo aromático con un radical hidroxilo. Los compuestos fenólicos incluyen fenoles simples, flavonoides, cumarinas, taninos, ácidos benzoicos y lignina. Poseen una gran variedad de bioactividad significativa y un impacto positivo a la salud humana, tales como antioxidante, anticancerígeno, neuroprotectoras, antidiabético, etc. (Kumar & Pruthi, 2014; Kwon, Barve, Yu, Huang, & Kong, 2007).

### **1.6.3. Glicósidos.**

Glicósidos hace referencia al enlace glicosídico formado por la condensación de una molécula de azúcar con otra que contiene un grupo carboxilo. En los glicósidos se encuentra saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos. Ligeramente solubles en agua, y mayor solubilidad en etanol y metanol. Intervienen en fenómenos de óxido-reducción, en el desarrollo y fecundación de las plantas. Se caracterizan por ser mecanismo de defensa para la planta. (Ávalos & Elena, 2009).

### **1.6.4. Alcaloides.**

Los alcaloides son compuestos nitrogenados heterocíclicos, se disuelven con dificultad en agua, pero reaccionan con ácidos para formar sales muy solubles, son considerados principios tóxicos que forman parte del mecanismo de defensa de la planta, (Yeransian, Kadin, Borker, & Stefanucci, 1963), son producidos y almacenados en cualquier parte de la planta (Dias, Urban, & Roessner, 2012). A altas dosis los alcaloides son muy tóxicos, sin embargo a dosis controladas actúan como relajante muscular, tranquilizante o analgésico (Ávalos & Elena, 2009).

## **1.7. Técnicas Espectroscópicas**

### **1.7.1. Cromatografía en columna (CC).**

Es una técnica de separación que permite aislar los compuestos deseados en una mezcla. Donde la fase estacionaria está contenida dentro de un tubo de vidrio o de plástico vertical, la muestra líquida o sólida se coloca en la fase estacionaria para su adsorción. A este

sistema por la parte superior del tubo cromatográfico se agrega la fase móvil o eluyente y se recogen volúmenes de eluato establecidos por el analista, donde la muestra está separada en sus componentes (Martinez, Valencia, Mesa, Jimenez, & Galeando, 2008). La separación se fundamenta en las diferencias de repartición de los solutos entre el adsorbente (Méndez, 2011).

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

Es una técnica analítica cuantitativa, de separación cromatográfico para el análisis de drogas vegetales. Consiste en la separación de componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, un solución de la muestra que va a ser analizada, se aplica por medio de un tubo capilar sobre una superficie de un adsorbente inerte (sílice, albúmina, etc.) distribuido uniformemente. La lectura de una placa puede ser llevada a cabo por transmitencia o reflectancia en la región ultravioleta y visible o por fluorescencia. Esta técnica permite proporcionar información de homogeneidad de los componentes químicos del producto y así garantizar que las sustancias responsables de la actividad farmacológica estén presentes en los niveles adecuados. Escoger el eluyente apropiado es de gran importancia para la buena separación de las sustancias, debe ser seleccionado en función de la fase estacionaria empleada y en función de la naturaleza de las sustancias que van a ser separadas (Sharapin, 2000).

#### **1.7.3. Cromatografía de Gases-Espectroscopia de Masas (CG-EM).**

Cromatografía de Gases acoplado a Espectroscopia de Masas (CG-EM) es una combinación de dos principales herramientas: la Cromatografía de Gases (CG) para la separación de componentes de gases en una mezcla compleja altamente eficiente y la Espectrometría de Masas (EM) confirma la identidad de estos componentes, por ende esta técnica permite identificar, determinar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Es una técnica que permite el análisis cuantitativo y cualitativo de una gran variedad de compuestos volátiles (Niessen, 2001).

#### **1.7.4. Resonancia magnética nuclear (RMN).**

El análisis del espectro RMN emite características magnéticas de núcleos que conforman una molécula, con frecuencia se examinan átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ . Los desplazamientos químicos de las señales de RMN de  $^1\text{H}$  (0-20ppm) y de  $^{13}\text{C}$  (0-200ppm) informan acerca de la naturaleza de hidrógenos y de carbonos. (Marcano & Hasegawa, 2002).

La resonancia magnética nuclear tiene la capacidad para investigar la estructura molecular primaria y la dinámica estructural de las biomoléculas a una resolución atómica, convirtiéndose en una herramienta principal para la investigación de estructuras de biomoléculas, generando un subcampo científico completo dedicado al sujeto (Kiss, Fizil, & Szántay, 2017).

### **1.8. Actividad Biológica**

La medicina tradicional ha sido mejorada en países desarrollados, no sólo como una forma de rescatar antiguas tradiciones, sino también como una solución alternativa a los problemas de salud. La investigación de medicina tradicional incluye las actividades de las plantas de uso común y seleccionar plantas medicinales para la actividad biológica (Martínez, Betancourt, González, & Jauregui, 1996).

### **1.9. Actividad antimicrobiana**

En la actualidad, la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos a partir de recursos naturales de manera sistemática y estratégica se han convertido en la tendencia mundial. Los medicamentos derivados de productos naturales son ampliamente utilizados y representan más del 30% de los agentes terapéuticos actualmente prescritos en clínicas (Yang, Li, & Tang, 2008). Las actividades han sido seleccionadas debido a su gran relevancia medicinal. En los últimos años, las infecciones han aumentado en gran medida y la resistencia a los antibióticos se convierte en un problema terapéutico en constante aumento (Austin, Kristinsson, & Anderson, 1999). La necesidad de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos y estrategias en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas y Gram positivas es evidente y mayor ya que se enfrenta a la resistencia a múltiples fármacos en patógenos comunes, la rápida aparición de nuevas infecciones y el potencial de uso de agentes resistentes a múltiples fármacos (Shah, 2005).

### **1.10. Bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ , de diversas formas como esferas, barras y hélices. Las bacterias son procariontes no tienen núcleo ni orgánulos internos. Poseen una pared celular compuesta de peptidoglucanos, en función a la estructura de la pared celular se clasifican en 2 grupos bacterias Gram positivas y Bacterias Gram negativas. Las bacterias son responsables de millones de muertes de personas a nivel mundial (Hobbie, Daley, & Jasper, 1977).

### **1.10.1. Bacterias Gram Positivas.**

#### **1.10.1.1. *Staphylococcus aureus.***

Es una bacteria anaerobia facultativa, responsable de un gran número de patologías en el ser humano, que va desde cutáneas, mucosas, infección en el SNC y tracto genital urinario. *S. aureus* ha desarrollado varios mecanismos de resistencia a los antibióticos (Mandel, Bennett, & Dolin, 1997).

#### **1.10.1.2. *Micrococcus luteus.***

Es una bacteria aerobia obligada, se encuentra en la tierra, polvo, aire y agua. Posee una forma esférica y una agrupación en tétradas. Esta bacteria vive sobre la piel humana transformando el sudor en compuestos de olor desagradable. Pueden crecer bien en ambientes con poca agua o con altas concentraciones de sal (Zhuang, Tay, Maszenan, Krumholz, & Tay, 2003).

#### **1.10.1.3. *Enterococcus faecalis.***

Es una bacteria comensal, habita en el tracto gastrointestinal, adquieren resistencia a los antibióticos. Son indicadores de contaminación fecal, la presencia de estas bacterias en los alimentos demuestra falta de higiene en los alimentos (Ryan K & C, 2004).

### **1.10.2. Bacterias Gram Negativas.**

#### **1.10.2.1. *Escherichia coli.***

Es una bacteria que se encuentra frecuentemente en el intestino del ser humano y de animales. *E. coli* es productora de la toxina *Shiga* que puede causar graves intoxicaciones a través del consumo de alimentos contaminados con materia fecal, como productos de carne cruda o poco cocida, leche, ensalada de vegetales, queso, etc. (Romero, 2007).

## **1.11. Hongos**

Los hongos son organismos eucariotas y cada uno tiene al menos un núcleo y una membrana nuclear, un retículo endoplasmático, mitocondrias y un aparato secretor, muchos son aerobios o facultativos. Las micosis son infecciones causadas por hongos. Muchos de estos organismos patógenos son exógenos y su hábitat natural se sitúa en el agua, tierra y restos orgánicos. La micosis que aparecen con mayor incidencia son candidosis y dermatofitosis, son causadas por hongos que forma parte de la flora microbiana normal o



que están muy adaptados a sobrevivir en el hospedador humano (Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner, 2010).

#### **1.11.1. *Candida albicans*.**

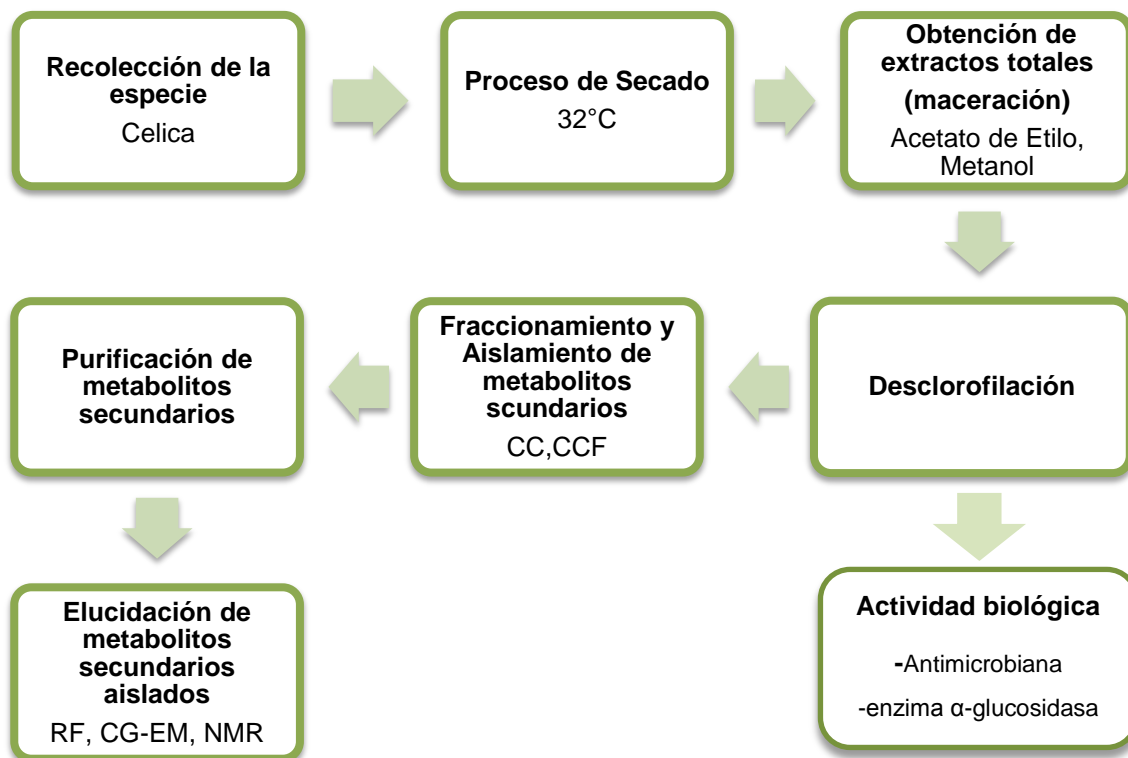
Es la especie más frecuente y causa del 85 al 90% de los casos de diferentes tipos de infecciones en pacientes sanos e inmunodeprimidos (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2007). *C. albicans* se desarrolla a menudo en las mucosas de la boca, tubo digestivo y aparato genitourinario, es la causa de candidiasis bucal (Tortora, Funke, & Case, 2007).

#### **1.12. Enzima $\alpha$ -glucosidasa**

La  $\alpha$ -glucosidasa es una subclase de enzima de los glucósidos hidrolasas. Está presente en una amplia gama de seres vivos como microorganismos, hongos, plantas y animales (Yamamoto et al., 2004). El estudio del mecanismo de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa es aplicable en el tratamiento de enfermedades en seres vivos (Ryu et al., 2009). La inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa está asociada a diferentes actividades biológicas como anti-alimentaria en animales herbívoros, anti-cáncer, anti-viral y anti-hiperglicemia convirtiéndose en objeto de investigación en distintas áreas a nivel farmacológico y a nivel ambiental. En la actividad anti-hiperglicemia, los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasa retrasan la absorción de carbohidratos, tienen un papel en el estado prediabético reduciendo la progresión de la prediabetes y obesidad (Liu, Deseo, Morris, Winter, & Leach, 2011).

**CAPÍTULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Metodología empleada



**Figura 2.** Esquema de Metodología empleada en la presente investigación  
**Fuente:** Autora 2018  
**Elaboración:** Autora, 2018

## 2.2. Recolección de la especie

Las partes aéreas de la especie *Lepechinia radula*, fueron recolectadas en estado de floración en el cantón Celica, provincia de Loja, en julio de 2015 a una altitud de 2450m.s.n.m. en las siguientes coordenadas: 618850E y 9549674N.

La planta fue identificada taxonómicamente en el "Herbario de la Universidad Nacional de Loja" por Bolívar Merino. La muestra botánica con un voucher PPN-la-034 ha sido depositada en el Herbario de la "Universidad Técnica Particular de Loja".

## 2.3. Proceso de secado del material vegetal

La especie recolectada se colocó en un cuarto de secado a una temperatura de 32°C durante 3 días para reducir el contenido de humedad de la planta, evitar el desarrollo de microorganismos y procesos de degradación. Luego se llevó a cabo el proceso de molienda para disminuir el tamaño de partículas del vegetal para adecuarla a la siguiente etapa del proceso de extracción.

## 2.4. Obtención de Extractos Totales

### 2.4.1. Maceración.

A partir de 300g de material molido en un recipiente de vidrio se maceró en disolventes de polaridad creciente iniciando con Acetato de etilo y luego Metanol durante una hora, a temperatura ambiente. Este proceso se repitió tres veces.

Posteriormente se procedió a filtrar a vacío cada extracto obtenido y se concentró mediante rota-evaporación a presión reducida a una temperatura de 35°C para evitar la degradación de compuestos termolábiles, obteniendo 2 extractos totales (figura 3).



**Figura 3** Obtención de extractos totales. a) Maceración, b) Filtración al vacío, c) Rotaevaporación a presión reducida, d) Extractos Totales

**Fuente:** Autora, 2018

**Elaboración:** Autora, 2018

## 2.5. Desclorofilación

Para la desclorofilación, se empleó las columnas SPE marca Discovery DSC-18, tubo de 60ml, que contienen 10g de fase inversa. Para ello se pesó 1g de extracto total, eluyendo en polaridad isocrática MeOH:H<sub>2</sub>O en proporción 98:2, este proceso se lo repitió por 3 veces con cada extracto (figura 4). Luego se procedió a filtrar a vacío y rota-evaporar a presión reducida.



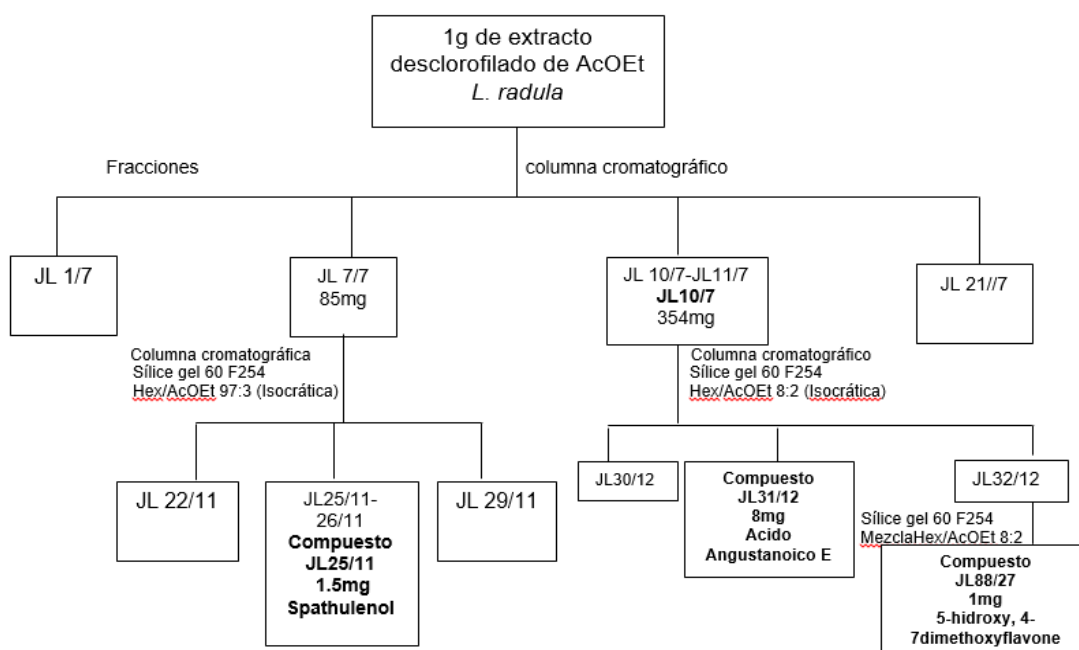
**Figura 4.** Proceso de desclorofilación

**Fuente:** Autora, 2018

**Elaboración:** Autora, 2018

## 2.6. Fraccionamiento y aislamiento de metabolitos secundarios

A partir de 1g de extracto desclorofilado de AcOEt se realizó un fraccionamiento en cromatografía en columna, empleando sílice gel 60F254 en una relación 1:100. Se eluyó en polaridad creciente iniciando con 95:5 Hex: AcOEt hasta 100% ACOEt. Se obtuvo un total de 400 fracciones unidas en 18 fracciones (JL1/7-JL21). Posteriormente cada fracción se rotaevaporó y se realizó el CCF para analizar los compuestos separados. El esquema de aislamiento se detalla en la figura 5.



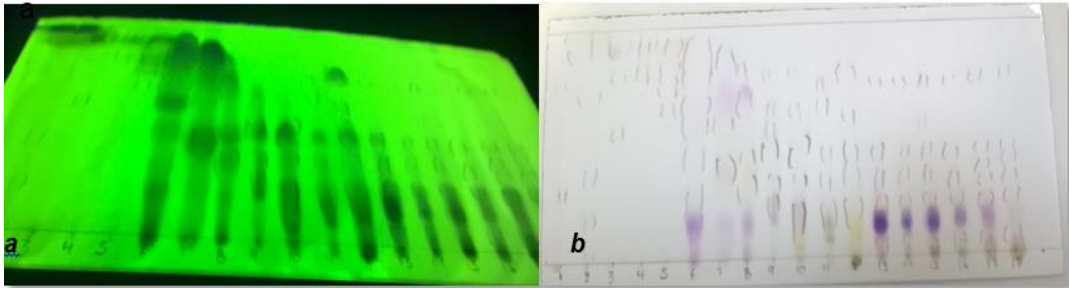
**Figura 5.** Aislamiento de compuestos en el extracto de AcOEt

Fuente: Autora, 2018

Elaboración: Autora, 2018

### 2.6.1. Cromatografía en Capa Fina.

Para observar la separación de compuestos se realizó la cromatografía en capa fina, haciendo el uso de la placa sílice gel, se sembró las fracciones obtenidas anteriormente de la cromatografía en columna, corridas en diferentes polaridades (Hex, AcOEt, MeOH, H<sub>2</sub>O y mezclas respectivas). Se observó el perfil cromatográfico de cada fracción por medio de la luz UV en 254 y 365 nm, revelándolas con ácido sulfúrico 5% y vainillina 12%. Figura 6



**Figura 6.** CCF de las fracciones obtenidas extracto de AcOEt. a) Luz UV 254 nm, b) CCF revelada.

**Fuente:** Autora, 2018

**Elaboración:** Autora, 2018

## 2.7. Purificación de metabolitos secundarios

### 2.7.1. Purificación de la fracción JL7/7.

De la fracción JL7/7 se realizó una columna cromatográfica con 85 mg de muestra y 10g de sílice gel 60F<sub>254</sub> (fase directa). La columna se eluyó en polaridad isocrática 97:3 Hex:AcOEt, obteniendo un total de 113 fracciones unidas en 8 fracciones (JL22/11-JL29/11). Para el aislamiento e identificación del metabolito secundario se unió de acuerdo a la visualización de la CCF y su RF obteniendo la fracción **JL25/11**.

### 2.7.2. Purificación de la fracción JL10-11/7.

Según la similitud del perfil cromatográfico de las fracciones JL10/7 y JL11/7 se procedió a unir las y se realizó una columna cromatográfica a partir de 196,7mg de muestra y 35g de sílice gel fase directa, eluyendo en una polaridad isocrática 9:1 Hex:AcOEt, de la cual se obtuvo 174 fracciones unidas en 5 fracciones (JL30/12-JL34/12). De estas se obtuvo una fracción purificada **JL31/12**. De la fracción JL32/12 se realizó columna cromatográfica con 3mg de muestra y 3 g de sílica gel fase directa, con una elución isocrática 8:2 Hex:AcOEt obteniendo 3 fracciones totales de la cual se obtuvo la fracción purificada **JL88/27**.

## 2.8. Elucidación de metabolitos secundarios aislados

### 2.8.1. Factor de Retención.

El factor de retención de los compuestos se calculó entre la distancia que recorre el compuesto desde la línea de siembra y la distancia que recorre el solvente desde la línea de siembra hasta el límite superior, mediante la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida muestra}}{\text{distancia recorrida solvente}}$$

### 2.8.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Mediante el equipo RMN marca Varian N° de serie 21953 bajo condiciones de 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz  $^{13}\text{C}$ . Los desplazamientos químicos son expresados en  $\delta$  ppm en relación tetrametil-silano (TMS) y las constantes de acoplamiento *son expresados en Hz*. Para la lectura se utilizó cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

### 2.8.3. Cromatografía de Gases acoplado a Espectroscopia de Masas (CG-EM).

La identificación de metabolitos secundarios de la especie *Lepechinia radula*, se realizó a través del cromatógrafo de gases acoplado a espectroscopia de masas. Las inyecciones se realizaron en columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano). En la tabla 2 se detallan las condiciones de operación del equipo CG/EM

**Tabla 2.** Características de la columna capilar

Fracción	Columna	Temperatura (°C)	Película ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
JL25/11	DB-5MS	300	0.25	0.25	30

Fuente: Autora, 2018

Elaboración: Autora, 2018

## 2.9. Determinación de la actividad biológica de los extractos

### 2.9.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante la técnica de Microdilución en caldo, utilizando placas de 96 pocillos.

### 2.9.2. Microorganismos de prueba.

Para la evaluación de la actividad biológica se utilizaron 4 cepas bacterianas y 1 fúngica como se detallan a continuación: cepas bacterianas Gram Positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433) y *Micrococcus luteus* (ATCC® 10240); 1 Cepa bacteriana Gram Negativa: *Escherichia coli* (ATCC® 43888), 1 Cepa fúngica: *Candida albicans* (ATCC® 10231).

### **2.9.3. Preparación de la muestra.**

Para la dilución se usó 100mg de los extractos de Acetato de etilo y Metanol en 1000µl de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se realizó tanto para la determinación de la CMI frente a bacterias y hongos.

### **2.9.4. Preparación del cultivo overnight.**

Para la preparación del cultivo overnight se utilizaron las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en el medio de cultivo tripticasa soya y para *Enterococcus faecalis* infusión cerebro corazón, ambos a una temperatura de 37 °C. Por otro lado para *Micrococcus luteus* se utilizó el caldo nutritivo y para la levadura *Candida albicans* caldo Sabouraud, incubados a una temperatura de 35°C. Finalmente todos los microorganismos fueron incubados de 14 a 16 horas y se encuentran en reserva criogénica a -80°C.

### **2.9.5. Preparación de la suspensión del inóculo para microorganismos.**

#### **2.9.5.1. Inóculo para bacterias.**

Se toman 10 µL del cultivo overnight con la bacteria a utilizar y se colocan en 10mL del caldo Muller Hinton, de esta dilución se toman 100µl para completar el volumen final 200µl de la placa de cultivo.

#### **2.9.5.2. Inóculo para levaduras.**

Se toman 10 µL del cultivo overnight con la bacteria a utilizar y se colocan en 10mL del caldo Sabouraud, de esta dilución se toman 100µl para completar el volumen final 200 µL de la placa de cultivo.

## **2.10. Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

### **2.10.1. Concentración mínima inhibitoria antimicrobiana.**

Para determinar la CMI se realizó en placas estériles de 96 pocillos: Primero, se colocó 180µl de caldo Muller Hinton (o Sabouraud) en la primera fila y 100µl en los pocillos restantes. Posteriormente, se adiciona 20µl del extracto diluido, en los pocillos de la fila A. Realizamos el procedimiento de dilución doble seriada, tomando 100µl de los pocillos de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B, continuamos con esta dilución hasta llegar a los pocillos de la fila H y desechamos los 100 µL sobrante, con lo que aseguramos diluciones desde 5000 hasta 39,06 µg/mL.



Para el control de esterilidad se usó la columna A10 – H10, colocando 200µl del caldo Muller Hinton (o Sabouraud). Para el control negativo en la columna A11 se coloca 180µl de caldo + 20µl de DMSO y para el control positivo en la columna A12 se coloca: 180µl de caldo + 20µl de una solución de gentamicina de 1mg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*, tetraciclina de 5mg/mL para *Enterococcus faecalis* e Itraconazol de 1mg/mL para *Candida albicans*. Preparadas las placas se inoculan con 100µl de la suspensión del inóculo completando el volumen final, ajustando así la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL para bacterias y  $5 \times 10^4$  UFC/mL para levaduras. Finalmente se sellan las placas, incubándose a 35°C durante 24 horas.

## **2.11. Actividad enzimática**

### **2.11.1. Ensayo de $\alpha$ -glucosidasa.**

Se determinó la actividad inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa usando una placa de microtitulación de 96 pocillos con p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (PNPG, SIGMA N1377) como sustrato, basados en el método descrito por Tao, Zhang, Cheng, & Wang, 2013, con ligeras modificaciones, utilizando acarbosa como control positivo. Las soluciones de muestra se prepararon usando 10mg de extracto en 210 µl de MeOH de manera que obtengamos como concentración final 2mg/mL. En el ensayo, en caso de conseguir la inhibición completa de la enzima se prepararon varias diluciones en PBS. En primer lugar se tomó 75µl de PBS (SIGMA-P4417), se mezcló con 5µl de la muestra y 20µl de la solución de enzima (SIGMA G5003, 0,15UI/mL en PBS pH 7.4), y se preincubó a 37°C durante 5 min antes de la iniciación de la reacción por la adición del sustrato. Posteriormente se añadió 20µl de una solución de PNPG (tampón fosfato 5mM, pH 7.4) a cada pocillo y se incubó durante 60 min a 37°C. La cantidad de para-nitrofenol ( $p$ -NP) liberado, se midió en un lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK®) a 405nm, registrando la absorbancia cada 5 minutos.

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### 3.1. Extractos Obtenidos de *Lepechinia radula*

En la tabla 3 se muestra el peso y el rendimiento del extracto de Acetato de Etilo y Metanol a partir de 300g de la muestra vegetal seca.

**Tabla 3.** Peso y Rendimiento de los extractos de *Lepechinia radula*

Extracto Total			
Extracto	Peso(g)	Peso Extracto Total	Rendimiento (%)
Acetato de Etilo	300	19.0946	6.36
Metanol		25.1469	8.38
Extracto Desclorofilado			
Extracto	Peso(g)	Peso desclorofilado (g)	Rendimiento (%)
Acetato de Etilo	3	1,0180	33,93
Metanol		1,9430	64,76

**Fuente:** Autora, 2018.

**Elaboración:** Autora, 2018

### 3.2. Análisis de Metabolitos Secundarios

#### 3.2.1. Fracción JL25/11.

Se obtuvo 1.4mg de un sólido blanquecino, soluble en diclorometano y cloroformo, con un RF 0.71 eluída en una mezcla 9:1 Hex:AcOEt. La CCF presenta una característica de compuesto puro (figura7).

El compuesto fue identificado como **Spathulenol**, el cual fue corroborado por su Espectro de Masas y su IR calculado. Además con el  $^1\text{H}$  (Anexo 1), y comparando con literatura (Ragasa, Ganzon, Hofilena, Tamboong, & Rideout, 2003) se puede confirmar el compuesto analizado. El compuesto es un alcohol sesquiterpénico tricíclico (figura 8), con fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ , (tabla 4).

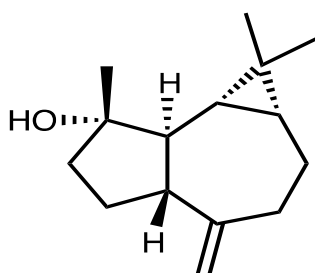
Este compuesto ha sido aislado de las especies del género *Lepechinia* como es el caso del extracto de hexano de las hojas de *L. caulescens*, presenta propiedades espasmolíticos (Perez, Ponce, Medina, & Joseph, 2008), también está presente en *L. chamaedryoides* (Areche, Schmeda, Theoduloz, & Rodríguez, 2009), además este compuesto se ha identificado en el aceite esencial de *L. radula* y ha demostrado ser antimicrobiano (Oliva, Demo, Lopez, Lopez, & Zygadlo, 2005; Schwob, Viano, Jann, Bessiere, & Dherbomez, 2006), antiulceroso (Esteves et al., 2005) y actividades antiinflamatorias (Chao et al., 2005).



**Figura 7.** CCF de la fracción JL25/11

**Fuente:** Autora, 2018

**Elaboración:** Autora, 2018



**Figura 8.** Estructura química del Spathulenol

**Fuente:** Autora, 2018

**Elaboración:** Autora, 2018

**Tabla 4.** Sesquiterpeno identificado en la fracción JL25/11

DATOS EXPERIMENTALES				
Compuesto	PM	TR	IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>
Spathulenol	220	13,94 min	1583	1577

PM: Peso Molecular; TR: Tiempo de Retención; IR<sup>a</sup>: índice de retención experimental; IR<sup>b</sup>: índice de retención de literatura

**Fuente:** Autora, 2018

**Elaboración:** Autora, 2018

**Tabla 5** Datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H RMN del Spathulenol.

Datos Experimentales (400 MHz <sup>1</sup> H, CDCL <sub>3</sub> )	Referencia Bibliográfica (Ragasa et al., 2003) (400 MHz <sup>1</sup> H, CDCL <sub>3</sub> )
0.47 (H-1, dd, J=9.6, 11.6 Hz),	0.47 (H-1, dd, J=9.6, 11.6 Hz),
0.71 (H-2)	0.71 (H-2)
1.00 (H-3a)	1.01 (H-3a)
1.96 (H-3b)	1.96 (H-3b)
2.05 (H-4a)	2.05 (H-4a)
2.43 (H-4b, dd, J=5.2, 13.6 Hz)	2.42 (H-4b, dd, J=5.2, 13.6 Hz)

2.21 (H-6)	2.20 (H-6)
1.64 (H-7a)	1.64 (H-7a)
1.91 (H-7b)	1.91 (H-7b)
1.55 (H-8a)	1.54 (H-8a)
1.76 (H-8b)	1.77 (H-8b)
1.30 (H-10)	1.31 (H-10)
1.05 (H-12)	1.05 (H-12)
1.04 (H-13)	1.04 (H-13)
4.66 (H-14a)	4.66 (H-14a)
4.69 (H-14b)	4.68 (H-14b)
1.25 (H-15)	1.28 (H-15)

**Fuente:** Autora, 2018

**Elaboración:** Autora, 2018

### 3.2.2. Fracción JL31/12.

Se obtuvo 8mg de un compuesto cristalino, soluble en diclorometano y cloroformo, con un RF 0.71 eluida en una mezcla 9:1 Hex:AcOEt, y se realizó CCF (figura 9). El compuesto se identificó mediante RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT (Anexo 2) un diterpeno abiatane llamado **Ácido Angustanoico E** (figura 10), con fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$  y peso molecular 298g/mol. Los datos experimentales se compararon con los datos espectroscópicos de la literatura (Say & Brown, 2015) confirmando así el compuesto (Tabla 6), (Tabla 7).

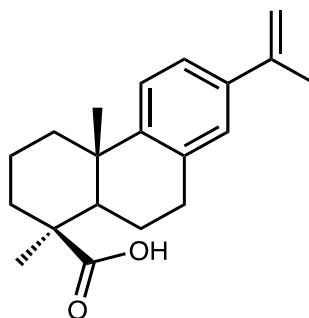
Ácido Angustanoico E posee propiedades antivirales y una buena actividad antiinflamatoria ( $\text{IC}_{50} = 2,47 \mu\text{M}$ ) (Zhang et al., 2013). Este compuesto es el primer reporte del género *Lepechinia*, pero indica su presencia en el género *Illicium* de la familia Illiciaceae, se caracteriza como un diterpeno aromático abietane, inusual porque están oxigenados en la posición axial (Say & Brown, 2015).



**Figura 9.** CCF de la fracción JL31/12

**Fuente:** Autora, 2018

**Elaboración:** Autora, 2018



**Figura 10.** Estructura química de Ácido Angustanoico E  
**Fuente:** Autora, 2018  
**Elaboración:** Autora, 2018

**Tabla 6** Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN del Ácido Angustanoico E

Datos Experimentales (400 MHz $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ )	Referencia Bibliográfica (Say & Brown, 2015) (500 MHz $^1\text{H}$ , $\text{CHCl}_3$ )
1.38( $\alpha$ )	1.38 (1 $\alpha$ )
2.28 (1 $\beta$ )	2.28 (1 $\beta$ )
1.62(2 $\alpha$ )	1.62(2 $\alpha$ )
2.03 (2 $\beta$ )	2.03 (2 $\beta$ )
1.09 (3 $\alpha$ )	1.09 (3 $\alpha$ )
2.26 (3 $\beta$ )	2.26 (3 $\beta$ )
1.57 (5H)	1.57 (5H)
2.19 (6 $\alpha$ )	2.19 (6 $\alpha$ )
2.06 (6 $\beta$ )	2.06 (6 $\beta$ )
2.80 (7 $\alpha$ )	2.80 (7 $\alpha$ )
2.94 (dd, $J=16.3, 4.1$ )	2.92 (dd, $J=16.3, 4.1$ )
7.21 d, $J=8.4$	7.20 (d, $J=8.4$ )
7.24 (dd, $J= 2 \text{ Hz}$ )	7.25 (dd, $J= 8.4, 1.7$ )
7.14	7.14
5.32 (s)	5.32 (s)
5.02 (t, $J=1.6$ )	5.02 (t, 1.4)
2.12(3H, s)	2.12 (3H, s)
1.34 (3H, s)	1.33 (3H, s)
1.12 (3H, s)	1.12 (3H, s)

**Fuente:** Autora, 2018  
**Elaboración:** Autora, 2018

**Tabla 7** Datos espectroscópicos de  $^{13}\text{C}$  RMN del Ácido Angustanoico E

Número de C	Datos Experimentales ( $\text{CDCl}_3$ )	Referencia Bibliográfica (Say & Brown, 2015) (100 MHz $^{13}\text{C}$ , $\text{CHCl}_3$ )
<b>C1</b>	39.3	39.3
<b>C2</b>	20.0	19.9
<b>C3</b>	37.5	37.4
<b>C4</b>	44.0	43.9
<b>C5</b>	52.9	52.9
<b>C6</b>	21.0	20.9
<b>C7</b>	32.2	32.1

<b>C8</b>	135.2	135.1
<b>C9</b>	147.4	147.4
<b>C10</b>	38.6	38.5
<b>C11</b>	125.5	125.4
<b>C12</b>	123.1	123.1
<b>C13</b>	138.3	138.3
<b>C14</b>	126.1	126.1
<b>C15</b>	143.0	143.0
<b>C16</b>	111.8	111.7
<b>C17</b>	21.9	21.9
<b>C18</b>	28.8	28.7
<b>C19</b>	183.1	184.1
<b>C20</b>	23.2	23.2

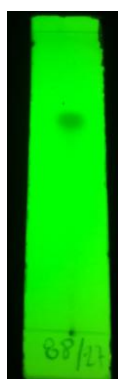
Fuente: Autora, 2018

Elaboración: Autora, 2018

### 3.2.3. Fracción JL88/27.

Se obtuvo 1mg de un sólido blanquecino, soluble en cloroformo, con un RF 0.67 eluida en una mezcla 6:4 Hex:AcOEt, y se procedió a realizar CCF (figura 11). El compuesto se identificó mediante RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 5) un **flavonoide llamado 5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone** (figura 12), con fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$ . Los datos experimentales se compararon con los datos espectroscópicos de la literatura (Sutthanut, Sripanidkulchai, Yenjai, & Jay, 2007) confirmando el compuesto, (Tabla 8).

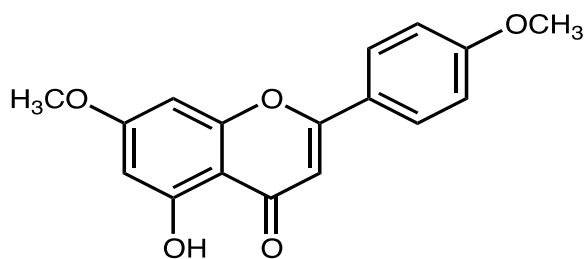
Este compuesto es un flavonoide con actividad antibacteriana, ha demostrado que tiene buena actividad contra *Vibrio cholerae* y *Enterococcus faecalis*, es potencialmente tóxico para las células humanas y presentó una actividad antioxidante muy pobre (Martini, Katerere, & Eloff, 2004).



**Figura 11.** CCF Luz UV 254nm de la fracción JL88/27

Fuente: Autora, 2018

Elaboración: Autora, 2018



**Figura 12.** Estructura química del 5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone.  
**Fuente:** Autora, 2018  
**Elaboración:** Autora, 2018

**Tabla 8** Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN del 5-hidroxy-7-4'-dimethoxyflavone

<b>Datos Experimentales</b> (400 MHz $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ )	<b>Referencia Bibliográfica</b> (Sutthanut et al., 2007) (400 MHz $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ )
12.82(1H, s, OH-5)	12.81 (1H, s, OH-5)
7.85 (2H, d, $J= 9.2$ Hz, H-2',6')	7.84 (2H, d, $J= 8$ Hz, H-2',6')
7.02 (2H, d, $J= 9.2$ Hz, H-3',5')	7.01 (2H, d, $J= 8$ Hz, H-3',5')
6.56 (1H, s, H-3)	6.57 (1H, s, H-3)
6.46 (1H, d, $J= 2.2$ Hz, H-6)	6.48 (1H, d, $J= 2.2$ Hz, H-6)
6.36 (1H, d, $J= 4$ Hz, H-8)	6.36 (1H, d, $J= 4$ Hz, H-8)
3.89 (3H, s, Me-7)	3.89 (3H, s, Me-7)
3.88 (3H, s, Me-4')	3.88 (3H, s, Me-4')

**Fuente:** Autora, 2018  
**Elaboración:** Autora, 2018

### 3.3. Determinación de actividad biológica de los extractos totales desclorofilados de *Lepechinia radula*

#### 3.3.1. Actividad antimicrobiana de extractos totales.

Los extractos desclorofilados de Acetato de Etilo y Metanol no presentaron actividad antimicrobiana para ninguna de las cepas empleadas en la prueba como se detallan en la tabla 9.

**Tabla 9.** CMI antimicrobiana de los extractos totales desclorofilados de *L. radula*

<b>Microorganismos</b>	<b>AcOEt</b>	<b>MeOH</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA
<i>Escherichia coli</i>	NA	NA
<i>Micrococcus luteus</i>	NA	NA



<i>Enterococcus faecalis</i>	NA	NA
<i>Candida albicans</i>	NA	NA
NA: No Activo		

Fuente: Autora, 2018

Elaboración: Autora, 2018

Estudios realizados en el aceite esencial de la *Lepechinia radula* no mostró actividad antimicrobiana pero demostró actividad contra dos hongos dermatofitos, en *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* con 31.25 µg/mL y 62.50 µg/mL, respectivamente (Morocho et al., 2017).

Estudios anteriores sobre el género *Lepechinia* han demostrado tener buena actividad antimicrobiana, como el caso del aceite esencial de la especie *L. caulescens*, demostró tener una actividad contra *Vibrio cholerae* con un valor CMI de 4 µg/mL (Correa, Tangarife, & Duran, 2010; Tangarife et al., 2012). Además, el extracto de etanol de *L. hastata* demostró una CIM de 87,50 µg/ml contra *S. aureus*. Según (Holetz et al., 2002) si el extracto muestra una CMI inferior a 100 µg/mL, la actividad antimicrobiana se considera buena, de 100 a 500 µg/mL la actividad antimicrobiana se considera moderada, y de 500 a 1000 µg/mL la actividad antimicrobiana es débil y más de 1000 µg/mL la extracto se considera inactivo.

### 3.3.2. Actividad enzimática de extractos totales.

La actividad inhibitoria en α-glucosidasa de extractos totales desclorofilados en Acetato de Etilo y Metanol se presenta en la tabla 10.

**Tabla 10.** Actividad inhibitoria en α-glucosidasa en extractos totales desclorofilados

Extractos Totales	IC <sub>50</sub> µg/mL
AcOEt	35,47
MeOH	149,43
El valor IC <sub>50</sub> =concentración de inhibidor para inhibir 50% de su actividad bajo las condiciones ensayadas.	

Fuente: Autora, 2018

Elaboración: Autora, 2018

En el ensayo realizado de α-glucosidasa el extracto de Acetato de etilo presenta una actividad inhibitoria buena con un valor de IC<sub>50</sub> de 35,47 µg/mL, mientras que el extracto de Metanol presenta una actividad inhibitoria media con un valor de IC<sub>50</sub> de 149,43 µg/mL.

Los valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 50 µM tienen una fuerte actividad inhibitoria contra α-glucosidasa, mientras que valores de IC<sub>50</sub> superior a 50 µM presentan una actividad inhibidora débil (Wang et al., 2015). La inhibición enzimática de α-glucosidasa de la especie *L. radula* hasta el momento no se ha reportado, en el presente estudio se informa por primera vez.

## CONCLUSIONES

En esta investigación se reporta por primera vez el aislamiento de metabolitos secundarios a partir de la especie *Lepechinia radula*. Se logró aislar e identificar un sesquiterpeno oxigenado el spathulenol, un diterpeno abiatane llamado ácido angustanoico E y un flavonoide 5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone.

El rendimiento del extracto desclorofilado de AcOEt fue de 6.36% y El extracto de MeOH tuvo mayor rendimiento de 8.38%.

Los extractos han sido evaluados contra actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus* dando resultados negativos con estas bacterias.

En el ensayo realizado de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa el extracto de Acetato de etilo presenta una buena actividad inhibitoria, mientras que el extracto de Metanol presenta una débil actividad inhibitoria.

## RECOMENDACIONES

Continuar con el aislamiento e identificación de compuestos químicos de la especie *Lepechinia radula* utilizando extractos de diferentes solventes, ya que no existen otros estudios fitoquímicos de esta especie.

Obtener mayor cantidad de muestra para aislar, identificar metabolitos secundarios y analizar actividad biológica de estos, ya que en este estudio no se pudo realizar debido a la insuficiente cantidad de muestra de estos.

Seguir desarrollando estudios fitoquímicos de las plantas, medicinales y las que aún no han sido utilizadas investigadas químicamente

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, F., Vergara, J., Villalobos, R., López, J., Navarrete, G., & Estrada, S. (2006). Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta, *79*, 1062–1068.
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(11), 1720–1731.
- Almeida, C., & Albuquerque, U. (2002). *Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology* (Vol. 45).
- Areche, C., Schmeda, G., Theoduloz, C., & Rodríguez, J. (2009). Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis ) Briq. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *61*, 1689–97.
- Armijos, C., Cota, I., & González, G. (2014). Traditional medicine applied by the Saraguro yachakkuna: a preliminary approach to the use of sacred and psychoactive plant species in the southern region of Ecuador. *Ethnobiol Ethnomed*, *10*, 26.
- Austin, D., Kristinsson, K., & Anderson, R. (1999). The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *96*, 1152–1156.
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, *2*(3), 119–145.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2010). Micología Médica. In *Microbiología Médica* (pp. 625–650).
- Butler, M. (2004). The role of natural product Chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, *67*, 2141–2153.
- Castrillo, M., Vizcaíno, D., Moreno, E., & Latorraca, Z. (2005). Specific leaf mass, fresh: Dry weight ratio, sugar and protein contents in species of Lamiaceae from different light environments. *Revista de Biología Tropical*, *53*(1–2), 23–28.
- Chao, K., Hua, K., Hsu, H., Cheng, S., Liu, J., & Chang, S. (2005). Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 7274–7278.
- Cole, M. (1992). The significance of the terpenoids in the Labiat. *In-Advances in Labiate*

*Science, Royal Botâ*, 315–124.

- Correa, J., Tangarife, V., & Duran, C. (2010). In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants. *Rev Bras Farmacogn.*, 20(5), 734–741.
- Cortes, D., Andreu, I., Bermejo, A., & Zafra, C. (2003). LOS PRINCIPIOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES. In *FITOTERAPIA. Vademecum de Prescripcion* (pp. 29–35).
- Delgado, G., Hernandez, J., Chavez, M., Alvarez, L., Gonzaga, V., & Martinez, E. (2014). Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata*, 56(1), 40–45.
- Dery, B., Otsyina, R., & Ng'atigwa, L. (1999). Indigenous knowledge of medicinal trees and setting priorities for their domestication in Shinyanga Region, Tanzania, 87 p.
- Dias, D., Urban, S., & Roessner, U. (2012). Metabolites. *A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery*.
- Dominguez, D. (1988). Metodos de investigación fitoquímica. In *Metodos de investigación fitoquímica*.
- Drew, B., & Sytsma, K. (2013). The South American radiation of *Lepechinia* (Lamiaceae): phylogenetics, divergence times and evolution of dioecy, 171–190.
- Esteves, I., Souza, I., Rodrigues, M., Cardoso, V., Santos, L., Sertie, J., & Perazzo, F. (2005). Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 191–196.
- Fernández, A., & Rivera, O. (2006). Las labiadas (familia Labiatae). *Libro Rojo*, 385–672.
- Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2007). *Diagnóstico Microbiológico*.
- Ginebra, S. (2005). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional.
- Harley, R., Atkins, S., Budansteve, A., Cantino, P., Conn, B., Grayer, R., & Harley, M. (2004). Flowering plants, dicotyledons. In: Kubitzki K, ed. *The families and genera of vascular plants* (Vol. 6. Berlin).
- Hart, J. (1983). *Lepechinia*. *Systematic and Evolutionary Studies in the Genus*, 1–305.
- Hart, J. (2015). Evolution of Dioecism in *Lepechinia* Willd. sect. *Parviflorae* (Lamiaceae), 10(2), 147–154.

- Hobbie, J., Daley, R., & Jasper, S. (1977). Use of nucleopore filter counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(May), 1225–1228.
- Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Cortez, D., Nakamura, C., & BDias, B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases, title. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 1027–1031.
- Huerta, C. (1997). La herbolaria: mito o realidad. *CONABIO. Biodiversitas*, 12, 1–7.
- Joergensen, P., & León, S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. In *Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* (pp. 1–1181).
- Jorgensen, P. (2003). Catalogue of the vascular plants of Ecuador.
- Kiss, R., Fizil, A., & Szántay, C. (2017). What NMR can do in the biopharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86–93.
- Kwon, K., Barve, A., Yu, S., Huang, M., & Kong, A. (2007). Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28, 1409–1421.
- Lagos, M. (2007). Estudio etnobotánico de especies vegetales con propiedades medicinales en seis municipios de Boyacá, Colombia. *Actualidades Biológicas*, 29(86), 87–96.
- Lawrence, B. (1992). Chemical components of Labiate oils and their exploitation. In *Advances in Labiate Science, Royal Botâ*, 399–436.
- Liu, L., Deseo, M., Morris, C., Winter, K., & Leach, D. (2011). Investigation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of wheat bran and germ. *Food Chemistry*, (126:), 553–561.
- Mandel, G., Bennett, J., & Dolin, R. (1997). *Enfermedades Infecciosas (Cuarta)*. Buenos Aires-Argentina.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Caracas: Editorial Torino, Segunda ed.
- Martinez, A., Valencia, G., Mesa, M., Jimenez, N., & Galeando, E. (2008). Martinez, A., Valencia, G. A., Mesa, M., Jimenez, N., & Galeando, E.

- Martínez, M., Betancourt, J., González, N., & Jauregui, A. (1996). Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(3), 171–174.
- Martini, N., Katerere, D., & Eloff, J. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae), 93, 207–212.
- Méndez, A. (2011). *Guía de Química. Cromatografía en columna*.
- Milevskaya, V., Temerdashev, Z., Butylskaya, T., & Kiseleva, N. (2017). Determination of phenolic compounds in medicinal plants from the Lamiaceae family. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(3), 342–348.
- Morocho, V., Toro, M., Cartuche, L., Guaya, D., Valarezo, E., Malagón, O., & Ramírez, J. (2017). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Lepechinia radula* Benth Epling. *Records of Natural Products*, 11(1), 57–62.
- Niessen, W. (2001). Current practice of gas chromatography-mass spectrometry. In *CRC Press*. (pp. 1–10).
- Oliva, M., Demo, M., Lopez, A., Lopez, M., & Zygadlo, J. (2005). Antimicrobial Of, activity and composition of *Hyptis mutabilis* essential oil. *Journal Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 11, 57–63.
- Perez, N., Ponce, H., Medina, J., & Joseph, P. (2008). Spasmolytic effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(1), 30–35.
- Ragasa, C., Ganzon, J., Hofilena, J., Tamboong, B., & Rideout, J. (2003). A New Furanoid Diterpene from *Caesaipiniapuicherrima*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 51(10), 1208–1210.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* (3° Edición).
- Roy, R. (1992). *Herbal Medicine for Human Health*.
- Ryan K, & C, R. (2004). *Sherris Medical Microbiology McGraw Hill. McGraw Hill*, 4.
- Ryu, H., Lee, B., Curtis, M., Jung, S., Ryu, Y., Lee, W., & Park, K. (2009). Polyphenols from *Broussonetia papyrifera* displaying potent  $\alpha$ -Glucosidase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (58:), 202–208.
- Say, L., & Brown, G. (2015). Abietane Diterpenes from *Illicium angustisepalum*. *J. Nat. Prod.*,

26(1), 32–39.

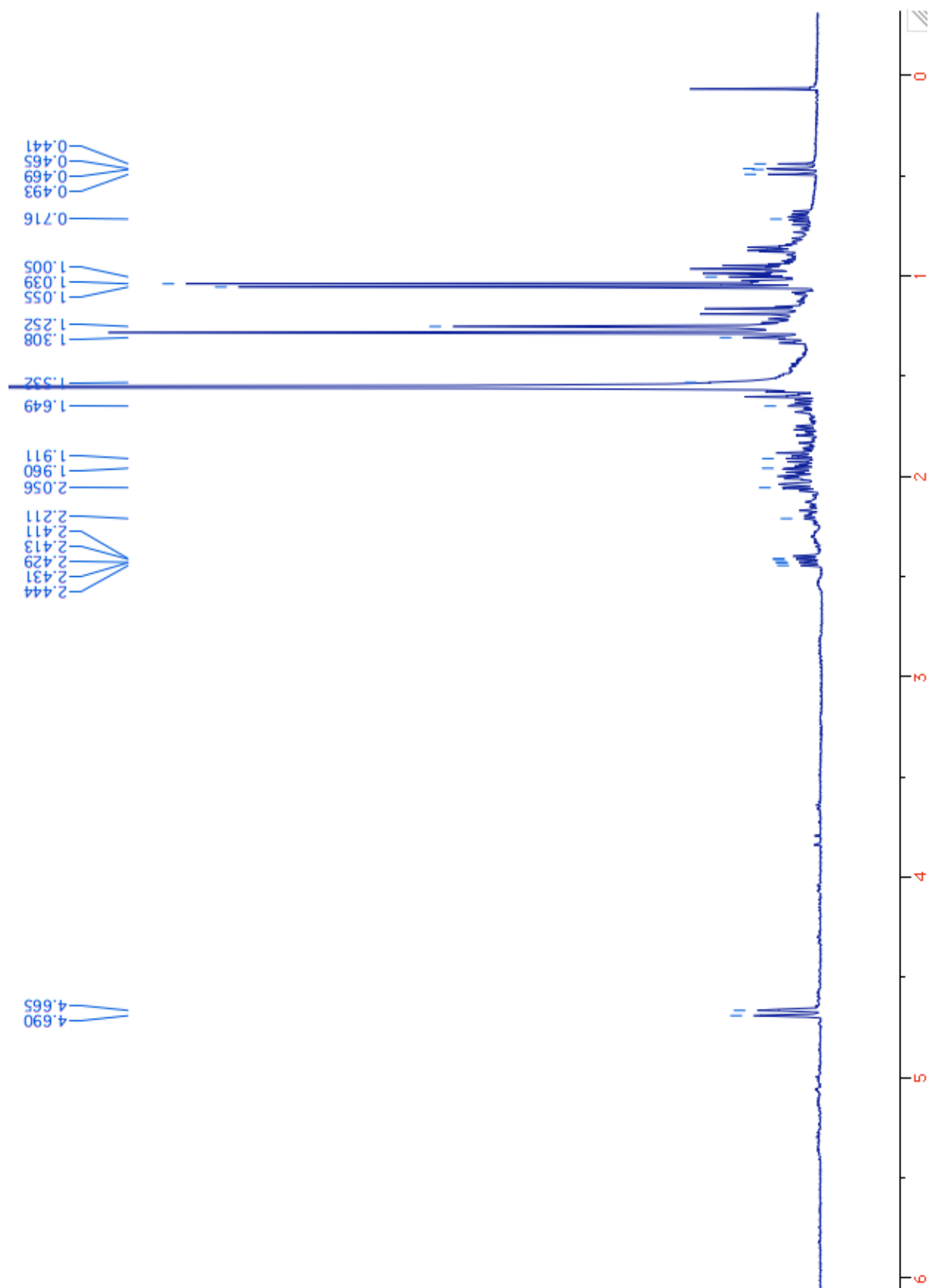
- Schwob, I., Viano, J., Jann, G., Bessiere, J., & Dherbomez, M. (2006). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum hyssopifolium* ssp. *hyssopifolium* from southeast France. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 469–471.
- Shah, P. (2005). The need for new therapeutic agents: what is in the pipeline? *Clin. Microbiol. Infec. Dis*, 11, 36–42.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamento de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*.
- Shilpa, K., Varun, K., & Lakshmi, B. (2010). An Alternate Method of Natural Drug Production: Eliciting Secondary Metabolite Production Using Plant Cell Culture. *Journal of Plant Sciences*.
- Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B., Yenjai, C., & Jay, M. (2007). Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography, 1143, 227–233.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). METABOLITOS SECUNDARIOS Y DEFENSA EN LAS PLANTAS. In *FISIOLOGÍA VEGETAL* (pp. 529–560).
- Tangarife, V., Roa, V., Betancur, L., García, D., Durán, D., Satashenko, E., & Mesa-Arango, A. (2012). Antifungal activity of Verbenaceae and Labiatae families essential oils. *Pharmacologyonline*, 1, 133–145.
- Tene, V., Malagón, O., Vita, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Ethnopharmacol*, 111, 63–81.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*.
- Vargas, J., Consiglio, T., Jørgensen, P., & Croat, T. (2004). Modelling distribution patterns in a species-rich plant genus , *Anthurium* ( *Araceae* ), in Ecuador, 211–216.
- Vásconez, P. M., & Hofstede, R. (2006). Los páramos ecuatorianos.
- Wang, K., Bao, L., Xiong, W., Han, J., Yin, W., & Liu, H. (2015). Inhibitory effects on HMG-CoA Reductase and  $\alpha$  - Glucosidase. *Lanostane Triterpenes from the Tibetan Medicinal*.
- Watson, L., & Dallwitz, M. (1991). The families of angiosperms: automated descriptions, with interactive identification and information retrieval. *Aust. Syst. Bot*, 4, 681–695.



- WHO, W. H. O. (2003). Traditional medicine., *Fact sheet*, Available on <http>.
- Yamamoto, T., Unno, T., Watanabe, Y., Yamamoto, M., Okuyama, M., Mori, H., ... Kimura, A. (2004). Purification and characterization of *Acremonium implicatum*  $\alpha$ -glucosidase having regioselectivity for  $\alpha$ -1,3- glucosidic linkage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.*, (1700:), 189–198.
- Yang, Y., Li, X., & Tang, C. (2008). Natural Products Chemistry Research 2006's Progress in China. *Chinese J. Nat. Med.*, 6, 0070–0078.
- Yeransian, J., Kadin, H., Borker, E., & Stefanucci, A. (1963). A more accurate method for determination of caffeine in decaffeinated coffee. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 46(2), 315.
- Zambrano, L., Buenaño, M., Mancera, N., & Jiménez, E. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by rural inhabitants of the parish San Carlos Quevedo in Ecuador. *Universidad Y Salud*, 17(1), 97–111.
- Zhang, G., Li, Y., Jiang, J., Yu, S., Qu, J., Ma, S., & Liu, Y. (2013). *Tetrahedron*, 69, 1017–1023.
- Zhuang, W., Tay, J., Maszenan, A., Krumholz, L., & Tay, S. (2003). Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediment. *Lett Appl Microbiol*, 36(4), 251–257.

## **ANEXOS**

Anexo 1. Espectro de  $^1\text{H}$  del sphaetulenol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

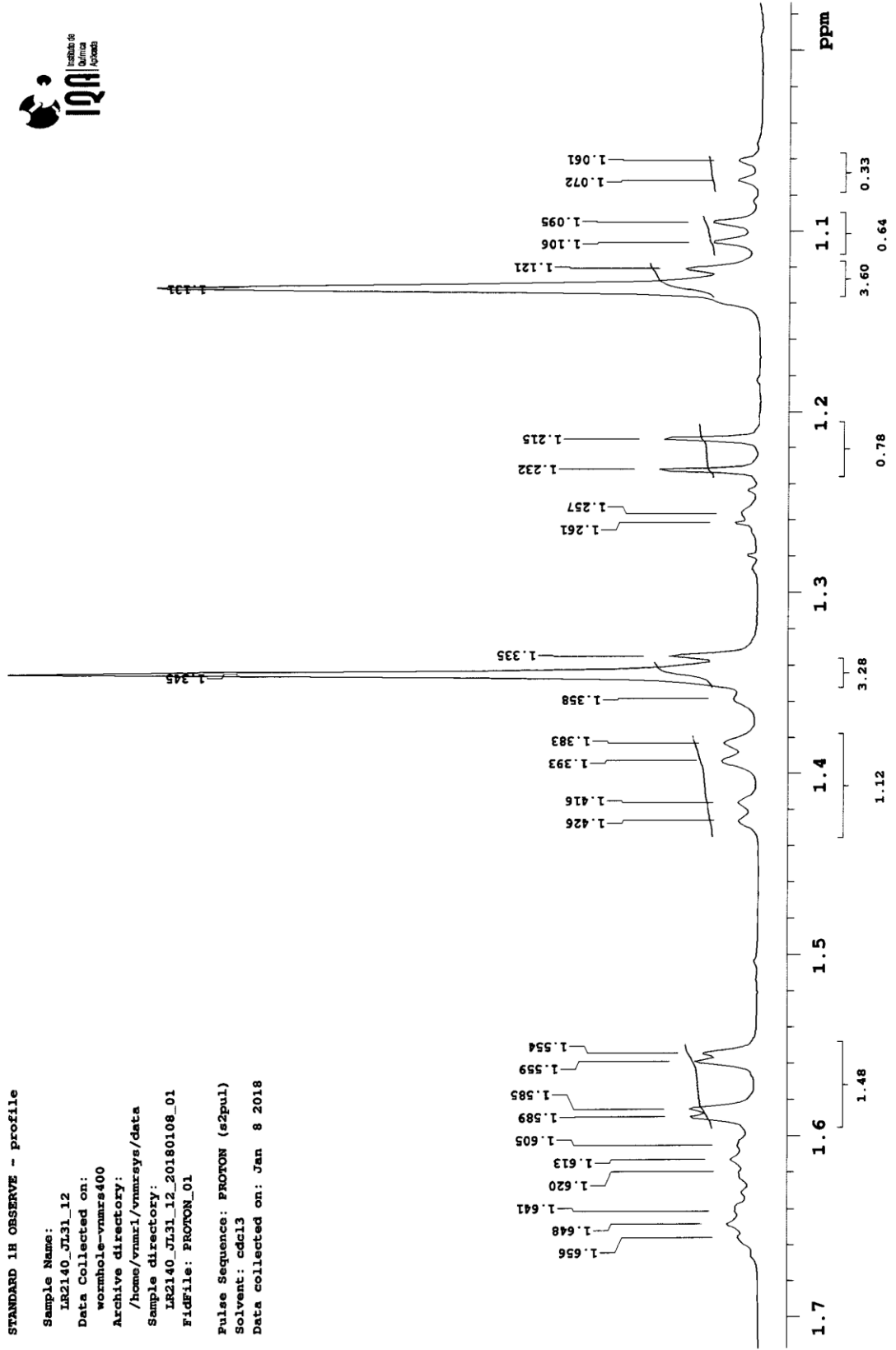




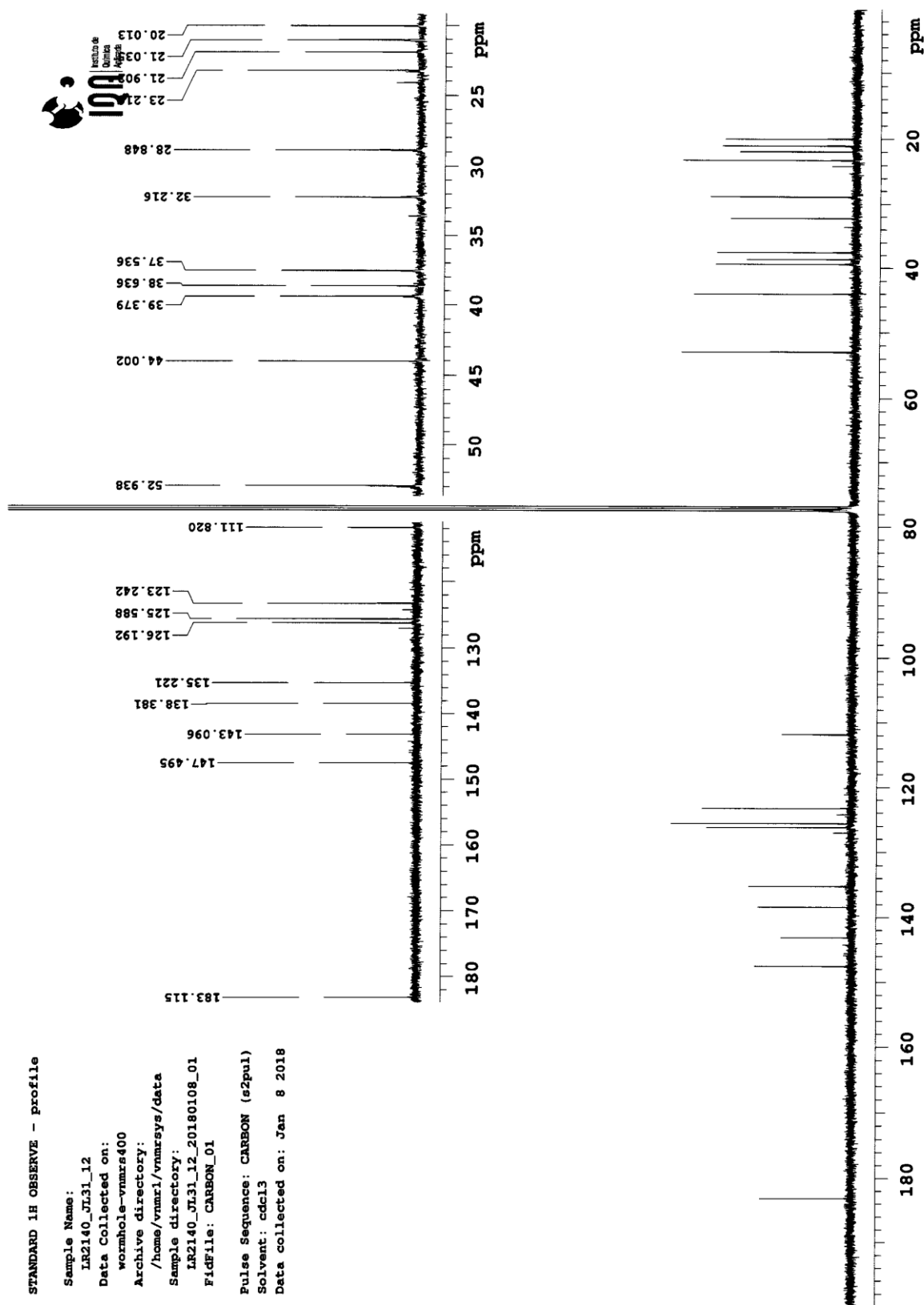


STANDARD 1H OBSERVE - profile

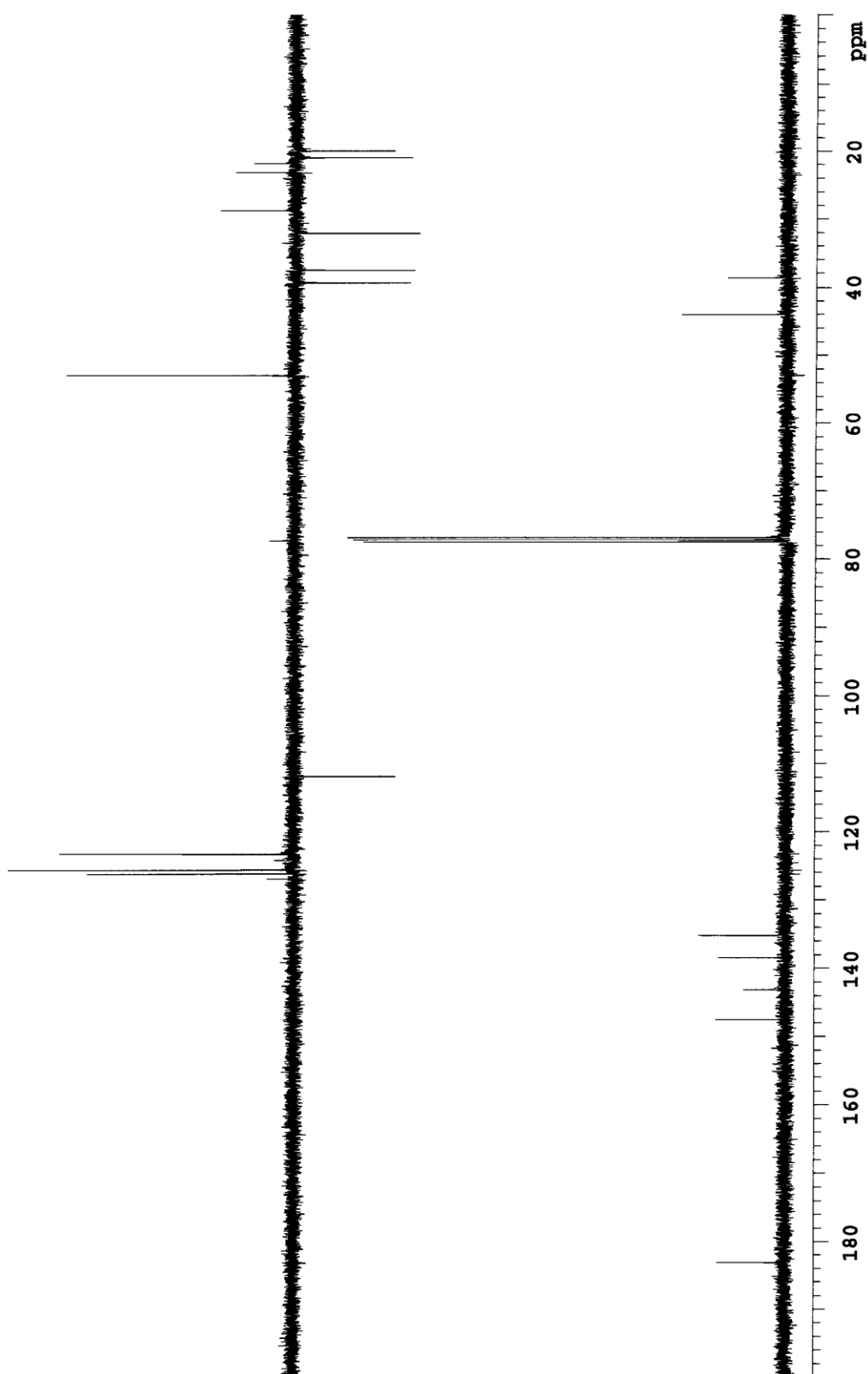
Sample Name:  
LR2140\_JL31\_L2  
Data Collected on:  
wormhole-vnmrs400  
Archive directory:  
/home/vnmri/vnmrsys/data  
Sample directory:  
LR2140\_JL31\_L2\_20180108\_01  
FidFile: PROTON\_01  
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
Solvent: cdcl3  
Data collected on: Jan 8 2018



Espectro de  $^{13}\text{C}$  del ácido angustanoico E ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



DEPT del ácido angustanoico E (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



Anexo 3. Espectro de  $^1\text{H}$  de 5-hydroxy-4',7-dimethoxy flavone ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

