



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento e identificación del diterpeno carnosol a partir de las especies
vegetales *Lepechinia mutica* Benth y *Rosmarinus officinalis* Linneo.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Padilla Soto, Jorge Luis

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: **Aislamiento del diterpeno carnosol a partir de las especies vegetales *Lepechinia mutica* Benth y *Rosmarinus officinalis* Linneo** realizado por Padilla Soto Jorge Luis ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2018

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Jorge Luis Padilla Soto declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **Aislamiento del diterpeno carnosol a partir de las especies vegetales *Lepechinia mutica* Benth y *Rosmarinus officinalis* Linneo**, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo Jorge Yandry Ramírez Robles director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 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).....

Autor: Padilla Soto Jorge Luis

Cédula: 0919405928

DEDICATORIA

A Dios primeramente por haberme guiado por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y por haber llegado en este momento tan especial de mi vida.

A mis padres Luis Padilla y Carmen Soto por haberme dado la vida, por su apoyo, consejos, estar pendiente de mí en todo momento, son mi pilar fundamental.

A mis queridas hermanas Karen y Sofía por brindarme su cariño, amor son mi motivación para terminar mi carrera universitaria.

AGRADECIMIENTO

A mis padres y hermanas que me brindan su amor, cariño y apoyo, gracias a ustedes he podido culminar esta carrera.

A mi tutor de tesis Ph.D. Jorge Ramírez por compartir sus conocimientos, brindarme su apoyo y guiarme durante la realización de este trabajo de investigación.

A los docentes que laboran en Departamento de Química y Ciencias Exactas en especial a la Ph.D. Alirica Suárez y la MSc. Mónica Vega por compartir sus conocimientos en realización de este proyecto.

A mis amigos y compañeros gracias por brindarme su amistad y ayuda directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

Jorge Luis Padilla Soto

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----------|
| PORTADA..... | i |
| APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN | ii |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS..... | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTO | v |
| INDICE DE CONTENIDOS..... | vi |
| INDICE DE FIGURAS..... | ix |
| INDICE DE TABLAS | x |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCION..... | 3 |
| 1 CAPÍTULO I FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO..... | 5 |
| 1.1 Fin, propósito y componentes del proyecto..... | 6 |
| 1.1.1 Fin del proyecto | 6 |
| 1.1.2 Propósito del proyecto | 6 |
| 1.1.3 Componentes del proyecto..... | 6 |
| 2 CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO | 7 |
| 2.1 Plantas medicinales..... | 8 |
| 2.2 Biodiversidad del Ecuador | 8 |
| 2.3 Descripción de la Familia Lamiaceae..... | 8 |
| 2.4 Descripción del Género <i>Rosmarinus</i> | 9 |
| 2.5 Descripción de la especie <i>Rosmarinus officinalis</i> Linneo | 9 |
| 2.5.1.1 Taxonomía de <i>Rosmarinus officinalis</i> Linneo | 10 |
| 2.6 Descripción del Género <i>Lepechinia</i> | 10 |
| 2.6.1 Descripción de la especie <i>Lepechinia mutica</i> Benth. | 11 |
| 2.6.2 Descripción taxonómica de la especie <i>Lepechinia mutica</i> Benth. | 11 |
| 2.7 Metabolitos secundarios | 12 |
| 2.7.1 Terpenos. | 12 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.7.1.1 | Diterpenos..... | 13 |
| 2.7.1.1.1 | Carnosol | 13 |
| 2.7.1.2 | Triterpenos..... | 14 |
| 2.8 | Técnicas de extracción, separación, identificación de metabolitos secundarios..... | 14 |
| 2.8.1 | Maceración..... | 14 |
| 2.8.2 | Cromatografía en columna (CC)..... | 15 |
| 2.8.3 | Cromatografía en capa fina (CCF)..... | 15 |
| 2.8.4 | Resonancia Magnética Nuclear (RMN)..... | 15 |
| 2.8.5 | Punto de fusión (Pf)..... | 16 |
| 3 | CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| 3.1 | Metodología empleada en la investigación | 18 |
| 3.2 | Recolección del material vegetal | 18 |
| 3.3 | Obtención de los extractos | 19 |
| 3.4 | Cromatografía de capa fina, Análisis de los extractos..... | 19 |
| 3.5 | Desclorofilación | 20 |
| 3.5.1 | Extracto de <i>Lepechinia mutica</i> Benth..... | 20 |
| 3.5.2 | Extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> Linneo. | 21 |
| 3.6 | Fraccionamiento en Cromatografía en Columna..... | 21 |
| 3.7 | Unión y Purificación de Compuestos. | 22 |
| 3.8 | Identificación de los metabolitos secundarios | 22 |
| 3.8.1 | Resonancia Magnética Nuclear. | 22 |
| 3.8.2 | Punto de fusión..... | 22 |
| 3.8.3 | Factor de retención (Rf)..... | 23 |
| 4 | CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 24 |
| 4.1 | Extractos obtenidos de las especies <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Lepechinia mutica</i> .. | 25 |
| 4.2 | Identificación de metabolitos secundarios..... | 25 |
| 4.2.1 | Extracto metanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 25 |
| 4.2.1.1 | Compuesto 1 (Fracción JP 015/7)..... | 25 |
| 4.2.1.2 | Identificación del compuesto 1 (Fracción JP 015/7). | 27 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2.2 | Extracto metanólico de <i>Lepechinia mutica</i> | 29 |
| 4.2.2.1 | Compuesto 2 (Fracción JP 008/29)..... | 29 |
| 4.2.2.2 | Identificación del compuesto 2 (Fracción JP 008/29). | 30 |
| 4.2.2.3 | Fracción JP 009/29. | 33 |
| 5 | CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 34 |
| | CONCLUSIONES..... | 35 |
| | RECOMENDACIONES..... | 36 |
| | BIBLIOGRAFÍA..... | 37 |
| | ANEXOS | 42 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura. 1 Distribución cosmopolita de la familia Lamiaceae | 9 |
| Figura. 2 <i>Rosmarinus officinalis</i> | 10 |
| Figura. 3 <i>Lepechinia mutica</i> | 11 |
| Figura. 4 Equipo de Resonancia Magnética Nuclear..... | 16 |
| Figura. 5 Esquema empleado en la investigación | 18 |
| Figura. 6 Recolección de la especie <i>Lepechinia mutica</i> | 19 |
| Figura. 7 Obtención de extractos totales a) Maceración estática b) Rotaevaporación a presión reducida c) Extracto total..... | 19 |
| Figura. 8 Cromatografía en columna del extracto desclorofilado de <i>L. mutica</i> | 20 |
| Figura. 9 Columna SPE Discovery-18 de <i>L. mutica</i> | 20 |
| Figura. 10 Partición liquido-liquido del extracto de metanol..... | 21 |
| Figura. 11 Equipo Fisher-Johns | 23 |
| Figura. 12 Fórmula para calcular el factor de retención..... | 23 |
| Figura. 13 CCF de la fracción JP 015/7 eluída en Hex/AcOEt 8:2..... | 26 |
| Figura. 14 Estructura química del Ácido betulínico..... | 27 |
| Figura. 15 CCF de la fracción JP 008/29 eluída en Hex/AcOEt 8:2..... | 30 |
| Figura. 16 Estructura química del Carnosol | 30 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie <i>Rosmarinus officinalis</i> | 10 |
| Tabla 2. Clasificación taxonómica de la especie <i>Lepechinia mutica</i> | 11 |
| Tabla 3. Clasificación de los terpenos de acuerdo al número de unidades de isopreno | 13 |
| Tabla 4. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Lepechinia mutica</i> | 25 |
| Tabla 5. Peso y rendimiento de los extractos desclorofilados de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Lepechinia mutica</i> | 25 |
| Tabla 6. Fraccionamiento cromatográfico del extracto desclorofilado de <i>R. officinalis</i> | 26 |
| Tabla 7. Datos de ¹ H RMN del ácido betulínico corroborado con la literatura. | 27 |
| Tabla 8. Datos de ¹³ C RMN del ácido betulínico corroborado con la literatura..... | 28 |
| Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico del extracto desclorofilado de <i>Lepechinia mutica</i> | 29 |
| Tabla 10. Datos de ¹ H RMN del Carnosol corroborado con la literatura. | 31 |
| Tabla 11. Datos de ¹³ C RMN del Carnosol corroborado con la literatura | 31 |
| Tabla 12. Fraccionamiento cromatográfico de la Fracción JP 009/29 | 33 |

RESUMEN

En la presente investigación, mediante técnicas cromatográficas se realizó el aislamiento de dos terpenos a partir de las especies *Lepechinia mutica* Benth y *Rosmarinus officinalis* Linneo. La especie *L. mutica* fue recolectada en el cantón Quilanga de la provincia de Loja y *R. officinalis* fue comprada en el Mercado Mayorista de la ciudad de Loja. A partir del extracto metanólico de *L. mutica* se aisló e identificó un diterpeno tricíclico llamado carnosol. También se aisló e identificó, un triterpeno pentacíclico conocido como ácido betulínico a partir del extracto metanólico *R. officinalis*. La identificación y caracterización se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), ^1H , ^{13}C , punto de fusión y factor de retención.

Palabras clave: *Lepechinia mutica*, *Rosmarinus officinalis*, carnosol, ácido betulínico.

ABSTRACT

In the present investigation, by means of chromatographic techniques, two terpenes were isolated from *Lepechinia mutica* Benth and *Rosmarinus officinalis* Linneo species. The species *L. mutica* was collected in the Quilanga canton of the province of Loja and *R. officinalis* was purchased in the Mercado Mayorista of the city of Loja. From the methanolic extract of *L. mutica*, a tricyclic diterpene called carnosol was isolated and identified. A pentacyclic triterpene known as betulinic acid was also isolated and identified from the methanolic extract *R. officinalis*. The identification and characterization was performed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ^1H , ^{13}C , melting point and retention factor.

Key words: *Lepechinia mutica*, *Rosmarinus officinalis*, carnosol, betulinic acid.

INTRODUCCION

Desde su origen, el hombre se sirvió de las plantas para cuidarse y prevenir enfermedades. En el curso de los siglos este saber, que es la medicina tradicional, se desarrolló y se transmitió verbalmente de generación en generación. En efecto, la medicina tradicional es muy desarrollada y utilizada por la población y puede ser una solución a problemas de acceso a los centros de salud, o de costo de los tratamientos (Philippe Le Loc'h, 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 80% de población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y gran parte de los tratamientos implica el uso de extractos o sus principios activos (Bermúdez, Oliveira-Miranda, & Velázquez, 2005). En el Ecuador la medicina tradicional se practica en todos los ciudadanos de toda clase social, pero esta práctica está ligada principalmente por habitantes de zonas rurales (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008).

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboran sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial para el organismo vivo (Quesada, 2008). La gran pérdida de vegetación en la actualidad pone en riesgo las especies vegetales poco o nada estudiadas ya que pueden contener compuestos esenciales que ofrezcan actividades farmacológicas (Jara, 2013). Alrededor de 10000 especies vegetales son utilizadas en el mundo como medicinales, en su mayoría en sistemas de medicina tradicional; pero un número reducido se emplea con un volumen significativo (Cañigueral, Dellacassa, & Bandoni, 2003).

Los géneros *Lepechinia* y *Rosmarinus* pertenecen a la familia Lamiaceae constituidos principalmente por arbustos y hierbas, son plantas aromáticas, utilizadas generalmente en la conservación de los alimentos y en la medicina tradicional, según estudios realizados a estos géneros se demuestran que tiene una alta actividad antioxidante gracias a la presencia compuestos fenólicos (Kwon MS, Vatter, & Shetty, 2006; Rosero, 2013).

En el Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL, se ha impulsado la investigación de moléculas de interés fitoquímico y farmacológico; siendo el carnosol una molécula potencial debido al gran número de actividades biológicas que posee como antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena en varias líneas de cáncer como próstata, mama, piel, leucemia y cáncer de colon (Johnson, 2011); el objetivo es aislar el carnosol y usarlo en un futuro como materia prima de hemisíntesis para realizar modificaciones estructurales y de esta manera realizar nuevos estudios en lo referente a diversas actividades biológicas, recientemente se ha encontrado que el carnosol posee actividad

enzimática contra butil colinesterasa, o butil colina, enzimas que son responsables de causar enfermedades degenerativas tales como Alzheimer.

1 CAPÍTULO I FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 Fin, propósito y componentes del proyecto

1.1.1 Fin del proyecto

La presente investigación pretende encontrar y aportar nuevas fuentes de las especies medicinales como *Lepechinia mutica* Benth y *Rosmarinus officinalis* Linneo las cuales tengan carnosol como uno de sus principales componentes.

1.1.2 Propósito del proyecto

Aislar e identificar el diterpeno carnosol a partir de dos especies vegetales.

1.1.3 Componentes del proyecto

Recolección y selección de las especies vegetales.

Obtención los extractos metanólicos de las especies vegetales *Lepechinia mutica* Benth y *Rosmarinus officinalis* Linneo.

Caracterización e identificación mediante técnicas espectroscópicas el diterpeno carnosol.

2 CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 Plantas medicinales

La interacción del hombre con las plantas ha quedado marcada en la historia. Aprendió de forma empírica, cultivó y uso las que le presentaban utilidad. Durante muchos años las plantas medicinales se estudiaban como si fueran medicamentos en las Universidades, cuyo conocimiento era imprescindible para los estudiantes de medicina (Castillo & Martínez, 2016). Durante un gran periodo de tiempo se convirtieron en la fuente principal de productos terapéuticos, pero con el auge y crecimiento de la industria farmacéutica las plantas medicinales han proporcionado principios activos que han sido fuente para la síntesis de nuevos medicamentos (Baulies & Torres, 2012). Por lo general, las plantas medicinales se usan para tratar síntomas leves o pasajeros, o como tratamiento preventivo. No obstante, también puede detectarse un uso de estas plantas en enfermedades crónicas como en la hipertensión arterial, diabetes mellitus, o incluso el cáncer (Muedra & Moreno, 2009).

En los países industrializados la obtención de extractos y aislamiento de metabolitos secundarios a partir de plantas medicinales es de un gran interés creciente por la variedad de propiedades farmacológicas que presentan y en los países en vías de desarrollo representan el 80% del arsenal terapéutico (Cañigüeral, 2002). Las especies medicinales en la mayoría de la población rural contribuyen a los sistemas de salud primaria por ser usadas de manera muy frecuente (Zambrano-Intriago, Buenaño-Allauca, Mancera-Rodríguez, & Jiménez-Romero, 2015).

2.2 Biodiversidad del Ecuador

El Ecuador es un país privilegiado, posee una de las mayores biodiversidades a nivel mundial, especialmente si se estima el número de especies que existe por unidad de área (Bravo, 2014). Alrededor del 80% de la población depende de los productos naturales o plantas para el manteniendo de la salud (Ansaloni et al., 2010). Se encuentran alrededor de 3118 especies vegetales pertenecientes a 206 familias que son utilizadas con fines medicinales, la mayoría son hierbas, arbustos y árboles. Las familias más representativas son Asteraceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Araceae las cuales engloban el mayor número de especies de plantas medicinales (De la Torre et al., 2008). Sobre las plantas medicinales, existen varios estudios de sus usos, en un estudio que documento 255 especies, de ellas, 199 (78%) son nativas, 43 (16,7%) introducidas y 13 (5,1%) endémicas; son utilizadas para atender 74 tipos de dolencias (Moraes, 2006).

2.3 Descripción de la Familia Lamiaceae

Es una familia muy diversa (Figura 1), incluye 236 géneros y 7173 especies (Martínez, Fragoso, García, & Montiel, 2013). Pueden encontrarse en cualquier parte del mundo, pero

están mejor representadas en la región mediterránea, en el país se localizan 14 géneros nativos además de plantas introducidas de los géneros *Mentha* L, *Rosmarinus* L, y *Thymus* L entre otras (Ulloa & Moller, 1993). Las especies de esta familia son comúnmente usadas como condimentos para alimentos o como medicinales. En general, esta familia es rica en aceites esenciales, compuestos fenólicos, taninos, iridoides, quinonas, cumarinas, diterpenos, triterpenos, saponinas y en algunos casos alcaloides de piridina y pirirrolidina. La familia tiene propiedades organolépticas, antioxidantes, antimicrobianas anticancerígena y antifúngica (El-Gharbaoui, Benítez, González-Tejero, Molero-Mesa, & Merzouki, 2017).

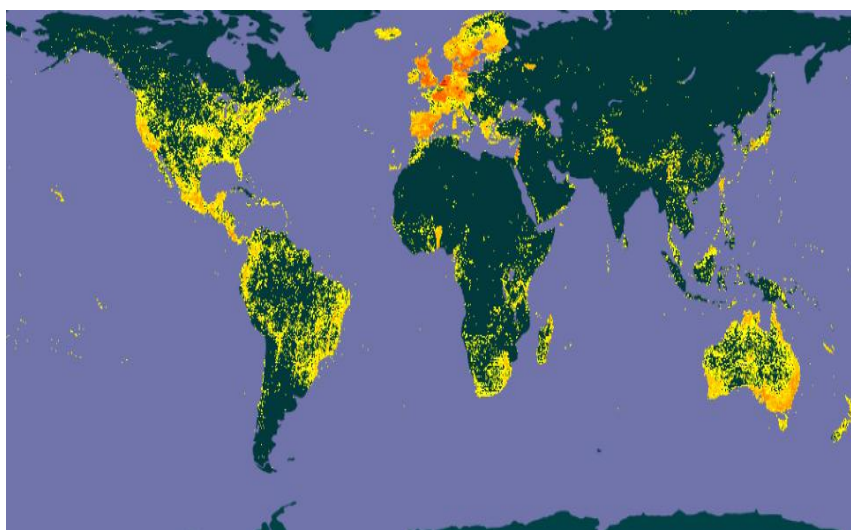


Figura. 1 Distribución cosmopolita de la familia Lamiaceae
Fuente: Global Biodiversity Information Facility, 2011
Elaboración: Autor, 2018

2.4 Descripción del Género *Rosmarinus*

Pertenece a la familia Lamiaceae, las especies de este género son arbustos perennes, con tallos erectos o procumbentes, hojas simples y enteras, pequeñas, flores pediceladas, cáliz bilabiado. Presenta una distribución mediterránea y se encuentran presente en otras partes del mundo con características edafoclimáticas similares. El origen biogenético del género podría estar en la Península Ibérica (Morales, 2010). Los estudios químicos son muy abundantes en este género logrando identificar compuestos fenólicos, flavonoides y aceites esenciales (Lax, 2014).

2.5 Descripción de la especie *Rosmarinus officinalis* Linneo

Conocida comúnmente como romero (Figura 2) es un arbusto aromático, de una altura de hasta dos metros. Las hojas son pequeñas y abundantes de forma lineal (Muñoz, 2002). Es una especie originaria de la región mediterránea, tiene múltiples usos entre ellos culinarios, cosméticos y medicinales (Ramírez, 2008).

Como planta medicinal es realmente muy usada por presentar propiedades antibacterianas, antioxidantes, antiespasmódica y ligeramente diurética; actúa asimismo como colágeno (Quijada, 2015), además estudios in vitro e in vivo del extracto del romero demuestran su poder anticancerígeno (Moore, Yousef, & Tsiani, 2016). Los estudios fitoquímicos realizados sobre esta especie se han logrado identificar polifenoles y flavonoides totales entre ellos ácido carnósico, ácido rosmarínico, ácido ursólico, carnosol y hesperidina (Lax, 2014). Pero la composición química varía según el origen, segmento de la planta y el período de desarrollo en la cual es recolectada (Muñoz, 2002).



Figura. 2 *Rosmarinus officinalis*

Fuente: Quijada, 2015

Elaboración: Autor, 2018

2.5.1.1 Taxonomía de *Rosmarinus officinalis* Linneo

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *Rosmarinus officinalis*

| | |
|------------------|-------------------------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Lamiales |
| Familia: | Lamiaceae |
| Género: | <i>Rosmarinus</i> |
| Especie: | <i>Rosmarinus officinalis</i> |

Fuente: (Purca, 2013)

Elaboración: Autor, 2018

2.6 Descripción del Género *Lepechinia*

Comprende alrededor de 40 especies, distribuidas desde el Estado de California en Estados Unidos hasta Argentina. El género *Lepechinia* en Ecuador incluye 9 especies, de los cuales 4 son endémicas (Ramírez, 2015). La composición química de este género incluye

diterpenos tricíclicos, triterpenos y flavonoides. Estudios microbiológicos sobre las quinonas diterpénicas aisladas de las partes aéreas de la especie *Lepechinia bullata* señalan que presentan actividad antibacteriana, diversas especies han sido utilizadas con fines medicinales como en la diabetes, infecciones uterinas, dolores estomacales y por sus actividades antitumorales (Pérez-Colmenares, Vivas-Guerrero, Rojas-Fermín, Usubillaga, & Chataing, 2014).

2.6.1 Descripción de la especie *Lepechinia mutica* Benth.

La especie *Lepechinia mutica* (Figura 3) conocida comúnmente como “turuyante”, es un arbusto endémico de la zona andina del Ecuador, se encuentra localizada en la parte sur del país en áreas cercanas a la ciudad de Loja, en el Nudo de Cajanuma, Cerro Villonaco y en el Parque Nacional Podocarpus (Montúfar & Pitman, 2004). Popularmente, es usada para el dolor de cabeza y afecciones nerviosas. Los estudios fitoquímicos realizados de esta especie se han identificado: carnosol, ácido ursólico, ácido oleanólico, viridoflorol, crisotol y 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona (Ramírez, 2015). En un estudio del aceite esencial de esta especie han demostrado la presencia de 79 compuestos, se encontró que los hidrocarburos sesquiterpénicos (38.50%) y los hidrocarburos monoterpénicos (30.59%) eran los más abundantes, además el aceite esencial presentó un actividad eficaz contra el dermatofito *Microsporum canis*, agente causal de enfermedades tanto en humanos como en la mascotas (Ramírez et al., 2017).



Figura. 3 *Lepechinia mutica*
 Fuente: Autor, 2018
 Elaboración: Autor, 2018

2.6.2 Descripción taxonómica de la especie *Lepechinia mutica* Benth.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la especie *Lepechinia mutica*.

| | |
|------------------|---------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |

| | |
|-----------------|--------------------------|
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Lamiales |
| Familia: | Lamiaceae |
| Género: | <i>Lepechinia</i> |
| Especie: | <i>Lepechinia mutica</i> |

Fuente: (Montúfar & Pitman, 2004)

Elaboración: Autor, 2018

2.7 Metabolitos secundarios

Son compuestos químicos que no están relacionados en el metabolismo básico de las plantas y cumplen funciones no esenciales en ellas, no participan en el crecimiento y desarrollo de las mismas, a estos compuestos se los conoce como metabolitos secundarios. Comúnmente denominados productos naturales constituyen una diversidad de moléculas y de distintos orígenes biosintéticos (Ringuelet & Viña, 2013). Las propiedades terapéuticas de las plantas se deben principalmente a la acción de los metabolitos secundarios (Guauque, Castaño, & Gómez, 2010) y son los responsables de la defensa frente al estrés biótico y abiótico, olor, color, sabor y de las propiedades medicinales (Castillo & Martínez, 2016). La distribución de estas sustancias es exclusiva por encontrarse en algunos grupos taxonómicos. Los metabolitos secundarios tienen un significativo valor medicinal y económico, están involucrados en la industria cosmética, alimentaria, en la fabricación de medicamentos, resinas, potenciadores de sabor, aromatizantes, colorantes, entre otras (Ávalos & Pérez, 2009).

Por la ruta de biosíntesis se clasifican en tres grandes grupos: terpenos, fenoles y compuestos nitrogenados (alcaloides) (Sepúlveda-Jimenez, Porta-Ducoing, & Rocha-Sosa, 2003). Los fenoles y terpenos están abundantemente distribuidos en las plantas pero solo una tercera parte de especies conocidas contienen alcaloides (Valares, 2011). Aproximadamente las plantas producen 100000 metabolitos secundarios de los cuales un gran número presentan actividad biológica (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

2.7.1 Terpenos.

Es el grupo más amplio de metabolitos que se caracterizan por estar formados por la unión de unidades de isopreno (unidades pentacarbonadas). La clasificación de los terpenos va de acuerdo a las unidades de isopreno que los forman. Los terpenos participan en la mayoría de las interacciones entre plantas y animales, plantas y plantas o plantas y microorganismos (Bonkanka, 2006).

Tabla 3. Clasificación de los terpenos de acuerdo al número de unidades de isopreno

| Nº de unidades de isopreno | Nº de carbonos | Grupo |
|----------------------------|----------------|----------------|
| 1 | 5 | Hemiterpenos |
| 2 | 10 | Monoterpenos |
| 3 | 15 | Sesquiterpenos |
| 4 | 20 | Diterpenos |
| 5 | 25 | Sesterterpenos |
| 6 | 30 | Triterpenos |
| 8 | 40 | Tetraterpenos |
| N | N | Politerpenos |

Fuente: (Ringuelet & Viña, 2013)

Elaboración: Autor, 2018

La mayoría de los terpenos tienen estructura cíclica con la presencia de uno o más grupos funcionales (hidroxilos, carbonilos, etc.) y químicamente son solubles en lípidos y se localizan en el citoplasma (Ringuelet & Viña, 2013).

2.7.1.1 Diterpenos.

Forma parte del grupo de los terpenos, constituyen un amplio grupo de compuestos conformados por 20 átomos de carbono, se originan a partir del geranylgeraniolpirofosfato (GGPP). En la naturaleza se encuentran en ciertos insectos y en organismos marinos, en el reino vegetal están mejor representados; algunos compuestos tienen una distribución más restringida, aunque algunos como las giberelinas son universales. Se los encuentra en mayor presencia en órdenes Lamiales y Asterales. Excluyendo los diterpenos tricíclicos producidos por plantas del género *Taxus* y sus derivados distribuidos últimamente, actualmente la industria farmacéutica no produce ningún diterpeno puro (Bruneton, 2001). A ciertos diterpenos se les atribuye actividad anticancerígena y/o citotóxica, antibacteriana, antifúngica, antirretroviral y antioxidante (Castillo & Martínez, 2016). Por poseer un elevado punto de ebullición no se los encuentra normalmente en la fracción volátil, pero si en la fracción fija de los aceites esenciales (Ringuelet & Viña, 2013).

2.7.1.1.1 Carnosol.

En 1942 fue aislado por primera vez el carnosol a partir de la planta salvia (*Salvia carnososa*) y hasta 1964 fue establecida su estructura química. Polifenoles como carnosol, ácido carnósico, rosmanol, ácido rosmarínico así como otros están presentes en la salvia.

Carnosol es un diterpeno orto-difenólico de tipo abietano, con grupos hidroxilos en las posiciones C-11 y C-12 y un resto de lactona a través del anillo B.

Estudios recientes en el romero han demostrado los muchos beneficios que podría proporcionar para enfermedades del corazón y para el tratamiento del cáncer, la actividad farmacológica se basa en tres principios activos principales: carnosol, ácido carnósico y ácido rosmarínico. La provisión de estándares de carnosol de alta pureza ha llegado a ser de gran importancia en la industria farmacéutica debido a su potencial terapéutico, para proporcionar un estándar confiable para el control de calidad de nuevos fármacos y para llevar a cabo estudios de investigación y toxicológicos (Bouju, Berthod, & Faure, 2016).

Estudios han indicado que los compuestos naturales especialmente en la quimioprevención del cáncer a lo largo de estos años han tomado importancia por sus propiedades anticancerígenas. El carnosol ha sido experimentado en varios modelos de líneas celulares que incluyen mama, próstata, leucemia entre otros (Johnson, 2011). Se ha reportado el potencial de detención del ciclo celular en varias líneas celulares de cáncer, el carnosol posee la acción de inhabilitar genes metastásicos y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Kashyap et al., 2016). Además este diterpeno presentó una importante y potente actividad antifúngica contra el dermatofito *Microsporum canis* y *Pyricularia oryzae* (Ramírez, 2015).

2.7.1.2 Triterpenos.

Son compuestos que contienen 30 átomos de carbono que poseen una estructura cíclica compleja, son ópticamente activos y habitualmente difíciles de caracterizar por su falta de reactividad química (Ringuelet & Viña, 2013). Por su gran importancia son empleados con fines terapéuticos e industrial en la obtención de formas galénicas simples o preparados de fitoterapia, en las industrias agroalimentarias, propiedades terapéuticas diversas: antivirales, insecticidas, antiinflamatorios y analgésicos (Bruneton, 2001).

2.8 Técnicas de extracción, separación, identificación de metabolitos secundarios

2.8.1 Maceración.

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido que consiste en un contacto de la materia vegetal con el disolvente durante un tiempo determinado constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado, en donde el disolvente actúa simultáneamente sobre las proporciones vegetales penetrando y disolviendo sus principios activos (López, 2008). La naturaleza de los metabolitos obtenidos depende de factores unidos a la droga como su

naturaleza, tamaño de la partícula, contenido de humedad y cantidad, además del disolvente empleado por su selectividad y la cantidad (Sharapin, 2000).

2.8.2 Cromatografía en columna (CC).

Técnica usada para la separar, purificar la variedad de metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales. La fase estacionaria que por lo general es gel de sílice o alúmina que se encuentra empacada en el interior de una columna de vidrio, la fase móvil (eluyente) que está formado por un solvente o una combinación de dos solventes se impregna a la fase estacionaria, la muestra de interés se deposita en la porción superior de la fase estacionaria para que la fase móvil arrastre los compuestos; los metabolitos no afines a la fase estacionaria por lo general son los primeros en salir se retienen poco o nada mientras que por el contrario los compuestos afines se quedan por más tiempo retenidos en el absorbente y son los últimos en salir (Méndez, 2011).

2.8.3 Cromatografía en capa fina (CCF).

Es una técnica analítica en donde la fase estacionaria es una capa delgada y uniforme que descansa sobre un soporte de vidrio, plástico o metal. La fase móvil (eluyente) transporta los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria, produciendo manchas que son observadas mediante la luz UV en diferentes ondas de longitud (detección no destructiva). Una de las ventajas que presenta la cromatografía en capa fina (CCF) es que se puede identificar una variedad de compuestos (Tesso, 2005).

2.8.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Tiene sus inicios en la década de 1950 al comercializarse los primeros espectrómetros para la obtención de espectros de protones (Garrido, Vélez, & Vérez, 2013). La resonancia magnética nuclear (Figura 4) es una de las técnicas más usadas que existen en la actualidad para determinar las estructuras de moléculas, principalmente moléculas orgánicas, esta técnica se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos, aporta información de los diferentes tipos de átomos presentes, como están conectados entre sí, su orientación en el espacio y su cercanía con otros átomos (Laurella, 2017).



Figura. 4 Equipo de Resonancia Magnética Nuclear

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

2.8.5 Punto de fusión (Pf).

El punto de fusión de un compuesto sólido cristalino es la temperatura de cambio al estado líquido. Cuando se calienta un sólido sus partículas vibran con más vigor. Al aumentar la temperatura, la sustancia se transforma de sólido en líquido cuando la vibración vigorosa vence las fuerzas de atracción del interior del sólido (Burns, 2011).

3 CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Metodología empleada en la investigación

Para la realización de la metodología se aplicó el siguiente esquema (Figura 5).

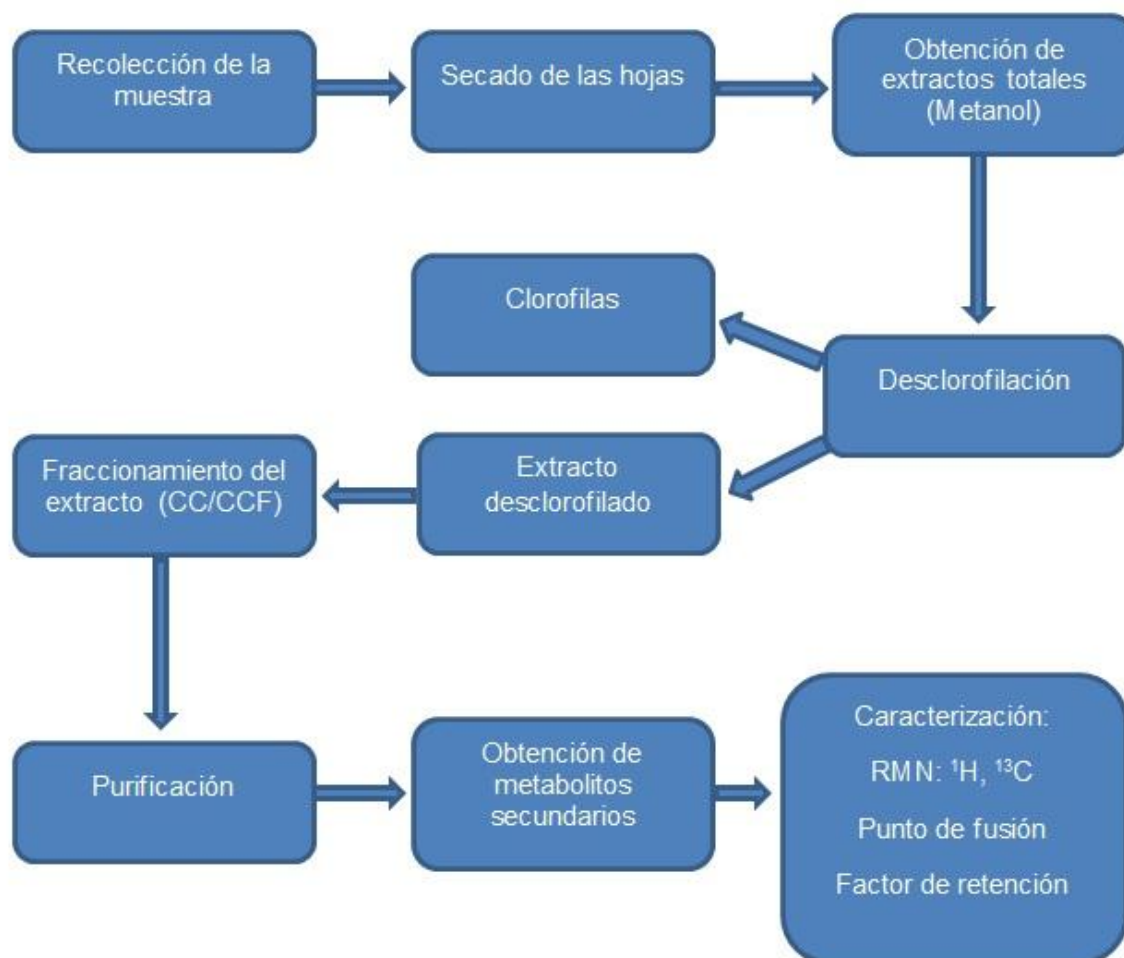


Figura. 5 Esquema empleado en la investigación

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.2 Recolección del material vegetal

Se recolectó las partes aéreas de la especie *Lepechinia mutica* (Figura 6), en estado de floración en el cantón Quilanga, perteneciente a la Provincia de Loja, con las coordenadas geográficas: 79° 26' 6.197" Oeste y 4° 14' 47.714" Sur.

La muestra fue caracterizada botánicamente por el señor Bolívar Merino y depositada con número de voucher HUTPL 1161 en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja. La especie *Rosmarinus officinalis* se la adquirió en El Mercado Mayorista de la ciudad.



Figura. 6 Recolección de la especie *Lepechinia mutica*
Fuente: Autor, 2018
Elaboración: Autor, 2018

3.3 Obtención de los extractos

Para obtener los extractos de las especies *L. mutica* y *R. officinalis* las hojas fueron secadas a una temperatura de 35 °C por el lapso de tres días, posteriormente se trituró y peso 500 g y 160 g respectivamente para la obtención del extracto metanólico.

Se utilizó el método de maceración dinámica (5 minutos) y estática (55 minutos) y como disolvente polar el metanol para la obtención del extracto, este proceso de maceración se lo realizó por tres veces consecutivas, después se filtró al vacío y se concentró mediante presión reducida en un Rotaevaporador a una temperatura no mayor a 40 °C, hasta obtener el extracto completamente seco (Figura 7).

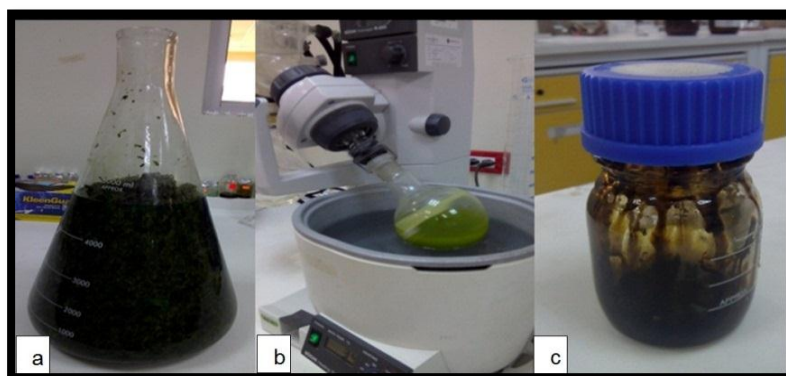


Figura. 7 Obtención de extractos totales **a)** Maceración estática **b)** Rotaevaporación a presión reducida **c)** Extracto total
Fuente: Autor, 2018
Elaboración: Autor, 2018

3.4 Cromatografía de capa fina, Análisis de los extractos

Los extractos totales fueron analizados mediante cromatografía de capa fina (CCF), para lo cual se empleó placas de sílice gel 60 F₂₅₄ fase directa y RP-18 fase inversa, en diferentes

polaridades, para determinar las mejores condiciones para la desclorofilación de los extractos y posteriormente el fraccionamiento en columna (Figura 8). Las placas fueron observadas en la luz Ultra Violeta con longitudes de onda de 254 y 365 nm, finalmente reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina.



Figura. 8 Cromatografía en columna del extracto desclorofilado de *L. mutica*

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.5 Desclorofilación

3.5.1 Extracto de *Lepechinia mutica* Benth.

A partir de 76 g del extracto obtenido se procedió a la eliminación de clorofilas mediante una columna SPE Discovery-18 de 60 ml que contiene 10 g de silica fase inversa, en donde se eluyó con una mezcla isocrática de MeOH:H₂O en una proporción 8:2 v/v. Como resultado se obtuvo un extracto libre de clorofilas, obteniendo 16.19 g de extracto desclorofilado, las clorofilas fueron recogidas con AcOEt al 100% (Figura 9).

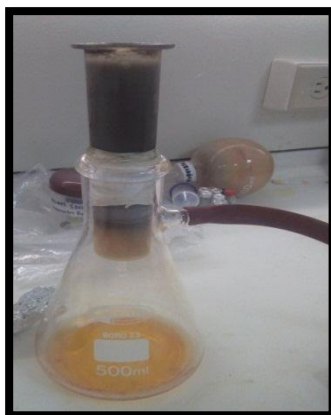


Figura. 9 Columna SPE Discovery-18 de *L. mutica*

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.5.2 Extracto de *Rosmarinus officinalis* Linneo.

El extracto de *R. officinalis* (13 g), fue sometido a una partición líquido-líquido se diluyó en una mezcla de MeOH:H₂O (95:5) y posteriormente se agregó hexano, se agitó constantemente hasta obtener una mezcla homogénea y luego se dejó reposar hasta la diferenciación de dos fases, este proceso se realizó por tres veces consecutivas: la fase orgánica formada por el Hexano se ubica en la parte superior por tener una densidad menor al agua y la fase MeOH:H₂O queda en la parte inferior del embudo de decantación, ambas fases fueron recolectadas y concentradas; pero solo se utilizó la fase acuosa para su posterior fraccionamiento en columna. Este procedimiento se lo realizo dos veces (Figura 10).



Figura. 10 Partición líquido-líquido del extracto de metanol
Fuente: Autor, 2018
Elaboración: Autor, 2018

3.6 Fraccionamiento en Cromatografía en Columna

El extracto desclorofilado de *Rosmarinus officinalis* fue sometido a un fraccionamiento en columna en una relación 1:100 (muestra: sílice) se sembró 3.54 g de extracto en 360 g de sílice gel 60 F₂₅₄, se eluyó con una mezcla isocrática Hex/AcOEt en proporción 8:2 y al final la columna fue lavada con AcOEt 100%. Se recolectaron 619 muestras de las cuales se realizan cromatografía de capa fina usando sílice gel 60 F₂₅₄ fase directa y eluída con una mezcla isocrática Hex:AcOEt en relación 8:2, posteriormente se observaron en la luz UV a longitudes de onda de 254 y 365 nm.

Las placas fueron reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina. Las fracciones se unieron de acuerdo a la similitud en placas de CCF y R_f obteniendo un total de 13 fracciones (JP 008/7 - JP 020/7).

El extracto desclorofilado de *Lepechinia mutica* fue sometido a un fraccionamiento en columna en una relación 1:100 (muestra: sílice) se sembró 10 g de extracto en 1 Kg de sílice gel 60 F254, se eluyó con una mezcla isocrática Hex:AcOEt en proporción 8:2 y al final de la elución la columna fue lavada con AcOEt 100%. Se recolectaron 479 muestras de las cuales se realizaron cromatografía de capa fina usando sílice gel 60 F₂₅₄ fase directa y eluida con una mezcla Hex:AcOEt en relación 8:2, posteriormente se observaron en la luz UV a longitudes de onda de 254 y 365 nm.

Las placas fueron reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina. Las fracciones se unieron de acuerdo a la similitud en placas de CCF y Rf obteniendo un total de 10 fracciones.

3.7 Unión y Purificación de Compuestos.

La unión se efectuó en función al Rf de las manchas observadas en la placa de cromatografía de capa fina y la similitud visual que estas reflejan ante la luz UV a una longitud de 254 y 365 nm, además se corrobora con los agentes reveladores ácido sulfúrico al 5% y vainillina. La purificación de las fracciones se realizó mediante cromatografía en columna y de acuerdo a la solubilidad que presentaba las fracciones a cada disolvente.

La fracción JP 008/29 según la CCF presentaba pequeñas impurezas de modo que se lavó con hexano. Las fracciones JP 015/7 y JP 013/32 empezaron a formarse pequeños cristales por lo cual se agregó metanol para disolver completamente la muestra, se dejó reposar hasta la formación nuevamente de los cristales, las impurezas solubles en el metanol se las separó y se volvió a agregar el disolvente hasta la formación de cristales totalmente puros.

3.8 Identificación de los metabolitos secundarios

3.8.1 Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros de cada compuesto fueron obtenidos a través de un equipo de Resonancia Magnética Nuclear Varian 400 MHz Premiun Schelded, con las siguientes condiciones: 100 MHz para ¹³C y 400 MHz para ¹H, utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃). Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón ppm (δ) y las constantes de acoplamiento (J) se registraron en Hz.

3.8.2 Punto de fusión.

Se determinó el punto de fusión en un equipo Fisher-Johns (Figura 11). Se calentó lentamente una pequeña cantidad de la fracción, luego se registra la temperatura a la cual el sólido pasa a estado líquido.



Figura. 11 Equipo Fisher-Johns
Fuente: Autor, 2018
Elaboración: Autor, 2018

3.8.3 Factor de retención (Rf).

Se calculó el Rf de cada compuesto aislado. Expresa la distancia recorrida por el compuesto sobre la distancia recorrida por la fase móvil (Figura 12).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil (Y)}}$$

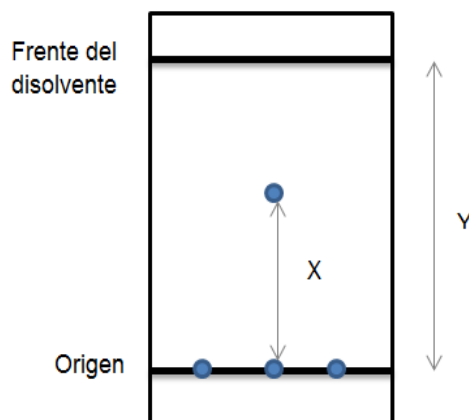


Figura. 12 Fórmula para calcular el factor de retención
Fuente: Autor, 2018
Elaboración: Autor, 2018

4 CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extractos obtenidos de las especies *Rosmarinus officinalis* y *Lepechinia mutica*

En la tabla 4 se muestra el peso y rendimiento de los extractos metanólicos obtenidos a partir de 500 g y 160 g de la muestra vegetal seca.

Tabla 4. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de *Rosmarinus officinalis* y *Lepechinia mutica*

| Especie | Extracto | Peso inicial muestra seca (Hojas) (g) | Peso final del Extracto (g) | Rendimiento (%) |
|-------------------------------|-----------------|--|------------------------------------|------------------------|
| <i>Lepechinia mutica</i> | Metanol | 500 | 76.70 | 15.34 |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | Metanol | 160 | 13.70 | 8.56 |

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

En la tabla 5 se muestra el peso y rendimiento de los extractos desclorofilados.

Tabla 5. Peso y rendimiento de los extractos desclorofilados de *Rosmarinus officinalis* y *Lepechinia mutica*

| Especie | Extracto | Peso inicial del extracto (g) | Peso final (g) | Rendimiento (%) |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>Lepechinia mutica</i> | MeOH:H ₂ O | 76.70 | 16.19 | 3.23 |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | MeOH:H ₂ O | 13.70 | 3.54 | 2.21 |

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

4.2 Identificación de metabolitos secundarios

4.2.1 Extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis*

4.2.1.1 Compuesto 1 (Fracción JP 015/7).

De la cromatografía en columna del extracto desclorofilado de *Rosmarinus officinalis* se obtuvieron 13 fracciones, en la tabla 6 se detalla las fracciones de donde de obtuvieron y peso se cada una de ellas. La fracción JP 015/7 empezó a cristalizarse, por lo cual se purificó usando como disolvente metanol, logrando obtener cristales puros y se observó una sola mancha en CCF.

Tabla 6. Fraccionamiento cromatográfico del extracto desclorofilado de *R. officinalis*

| Código | Fracciones | Peso en mg |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| JP 008/7 | 1-50 | 10.24 |
| JP 009/7 | 51-65 | 10.54 |
| JP 010/7 | 66-95 | 9.23 |
| JP 011/7 | 96-136 | 13.45 |
| JP 012/7 | 137-200 | 50.45 |
| JP 013/7 | 201-230 | 10 |
| JP 014/7 | 231-259 | 28 |
| JP 015/7 | 260-282 | 15 |
| JP 016/7 | 283-308 | 30 |
| JP 017/7 | 309-320 | 14.21 |
| JP 018/7 | 321-327 | 10.03 |
| JP 019/7 | 328-500 | 170 |
| JP 020/7 | 501-619 | 100 |

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

De la fracción JP 015/7 se obtuvo 15 mg de cristales blanquecinos en forma de aguja, con un punto de fusión de mayor a 300°C y factor de retención de 0.35 en cromatografía de capa fina utilizando como eluyente Hex:AcOEt en proporción 8:2 v/v. El compuesto no es visible en la luz UV de 254 y 365 nm y al revelarla la TLC con ácido sulfúrico 5% y vainillina se observó una mancha color morada (Figura 13).



Figura. 13 CCF de la fracción JP 015/7 eluída en Hex/AcOEt 8:2

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

4.2.1.2 Identificación del compuesto 1 (Fracción JP 015/7).

Se identificó el compuesto mediante la técnica espectroscópica RMN y comparando con la literatura se determinó de que se trataba del ácido betulínico (Figura 14) cuyo peso molecular es de 456.7 g/mol con fórmula química $C_{30}H_{48}O_3$.

El espectro de 1H RMN reveló la presencia de 6 grupos metilos en singulete a δ 0.75 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-25), 0.93 (3H,s, H-26), 0.96 (3H,s, H-23), 0.97 (3H, s, H-27), 1.68 (3H, s, H-30), un par de protones olefínicos a δ 4.60 (1H,d,J=1.6 Hz) y δ 4.73 (1H,d,J=1.2 Hz) que representan el doble enlace exocíclico y un protón carboxílico a δ 3.18 (dd, J=11.6, 4.8 Hz, H-3).

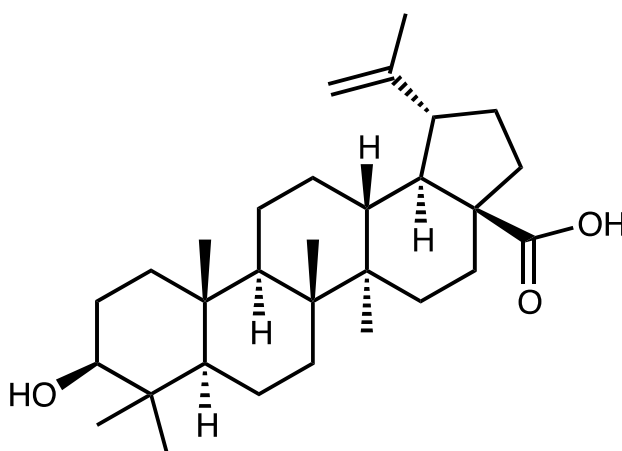


Figura. 14 Estructura química del Ácido betulínico
Fuente: Autor, 2018
Elaboración Autor, 2018

En la tablas 7 y 8 se muestran los datos espectroscópicos de RMN de 1H y ^{13}C del ácido betulínico corroborado con la literatura.

Tabla 7. Datos de 1H RMN del ácido betulínico corroborado con la literatura.

| Nº Protón | (Satiraphan et al., 2012) RMN 1H | Datos experimentales NMR 1H |
|-----------|--|-----------------------------------|
| H-5 | 0.70 | - |
| H-24 | 0.78 | 0.75 (3H, s) |
| H-25 | 0.82 | 0.82 (3H, s) |
| H-26 | 0.92 | 0.93 (3H, s) |
| H-23 | 0.96 | 0.96 (3H, s) |
| H-27 | 0.98 | 0.97 (3H, s) |

| | | |
|-------|------|--------------------------|
| H-30 | 1.71 | 1.68 (3H, s,) |
| H-19 | 3.04 | 3.03 (1H, m) |
| H-3 | 3.21 | 3.18 (1H, dd, J= 4.8 Hz) |
| H-29a | 4.62 | 4.60 (1H, d, J= 1.6 Hz) |
| H-29b | 4.75 | 4.73 (1H, d, J= 1.2 Hz,) |

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

Tabla 8. Datos de ^{13}C RMN del ácido betulínico corroborado con la literatura.

| Nº Carbonos | (Satiraphan et al., 2012) RMN ^{13}C | Datos experimentales RMN ^{13}C |
|-------------|--|---|
| 1 | 38.7 | 38.8 |
| 2 | 27.4 | 27.5 |
| 3 | 79.0 | 79.1 |
| 4 | 38.8 | 38.8 |
| 5 | 55.3 | 55.4 |
| 6 | 18.3 | 18.4 |
| 7 | 34.3 | 34.4 |
| 8 | 40.7 | 40.8 |
| 9 | 50.5 | 50.6 |
| 10 | 37.2 | 37.3 |
| 11 | 20.8 | 21.0 |
| 12 | 25.5 | 25.6 |
| 13 | 38.4 | 38.5 |
| 14 | 42.4 | 42.5 |
| 15 | 30.5 | 30.6 |
| 16 | 32.1 | 32.3 |
| 17 | 56.3 | 56.4 |
| 18 | 49.2 | 49.4 |
| 19 | 46.9 | 47.0 |
| 20 | 150.4 | 150.5 |
| 21 | 29.7 | 29.8 |
| 22 | 37.1 | 37.1 |
| 23 | 28.0 | 28.1 |
| 24 | 15.4 | 15.4 |
| 25 | 16.1 | 16.1 |
| 26 | 16.1 | 16.2 |
| 27 | 14.7 | 14.8 |
| 28 | 180.5 | 179.9 |
| 29 | 109.7 | 109.8 |
| 30 | 19.4 | 19.5 |

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

El ácido betulínico es un triterpeno pentacíclico con propiedades biológicas y farmacológicas notables como: anticancerígenas, antibacteriano, anti-VIH, virus del herpes simple 1, antipalúdicas y antiinflamatorias (Cavazos Garduño, Ochoa Flores, Serrano-Niño, Beristain, & García, 2014; Sousa et al., 2017). Estudios realizados en varias líneas celulares de cáncer como leucemia (CEM4 y MT-4), melanoma (MEL-1-4), ovario (A2780, OVCAR-5 e IGROV-1), cuello uterino (A431) y de pulmón (H460, POGB); en donde el ácido betulínico ha demostrado tener actividad citotóxica selectiva sobre células tumorales al inducir la apoptosis de estas células por la ruta mitocondrial (Cavazos Garduño et al., 2014; Zuco et al., 2002). Los compuestos que ejercen una acción directa sobre las mitocondrias presentan terapias experimentales y prometedoras contra el cáncer, ya que pueden desencadenar la muerte celular en situaciones en la quimioterapia puede fallar. El ácido betulínico es una prometedora alternativa en los tratamientos de cáncer humano (Fulda, 2008).

4.2.2 Extracto metanólico de *Lepechinia mutica*

4.2.2.1 Compuesto 2 (Fracción JP 008/29).

De la cromatografía en columna del extracto desclorofilado de *Lepechinia mutica* se obtuvieron 10 fracciones, en la tabla 9 se detalla las fracciones de donde se obtuvieron y peso de cada una de ellas. Esta fracción fue sometida a cromatografía de capa fina (CCF), la misma que fue eluída en Hex:AcOEt 8:2 mostró que la fracción presentaba algunas impurezas por lo cual fue sometida a una sucesiva purificación mediante lavados con hexano hasta obtener una sola mancha según la CCF.

Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico del extracto desclorofilado de *Lepechinia mutica*

| Código | Fracciones | Peso en mg |
|------------------|----------------|--------------|
| JP 001/29 | 1-9 | 26.3 |
| JP 002/29 | 10-28 | 25 |
| JP 003/29 | 29-59 | 79.8 |
| JP 004/29 | 60-89 | 55.5 |
| JP 005/29 | 90-109 | 25.2 |
| JP 006/29 | 110-210 | 104.1 |
| JP 007/29 | 211-250 | 91.5 |
| JP 008/29 | 251-289 | 10.4 |
| JP 009/29 | 290-390 | 327.9 |
| JP 010/29 | 391-472 | 130.7 |

Fuente: Autor, 2018

Elaboración Autor, 2018

De la fracción JP 008/29 se obtuvo 10.4 mg de un polvo de color blanco, con un punto de fusión de 210-215 °C y un factor de retención de 0.33 en cromatografía de capa fina utilizando como eluyente Hex:AcOEt en proporción 8:2 v/v. El compuesto es visible en la luz UV de 254 nm y se observó una mancha oscura y al revelarla la CCF con ácido sulfúrico 5% y vainillina se observó una mancha color verde (Figura 15).



Figura. 15 CCF de la fracción JP 008/29 eluída en Hex/AcOEt 8:2

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

4.2.2.2 Identificación del compuesto 2 (Fracción JP 008/29).

Se identificó el compuesto mediante la técnica espectroscópica de RMN y comparando con literatura se determinó de qué se trataba del carnosol (Figura 16) un diterpeno cuyo peso molecular es 340.42 g/mol con fórmula química $C_{20}H_{26}O_4$.

El espectro de 1H reveló características de un compuesto diterpeno, muestra la presencia de dos singletes asignados a metilo δ 0.90 (3H,s, H-18) y 0.85 (3H,s, H-19), dos dobletes que se integra para seis protones a δ 1.23 y 1.21 (2x3H, d, $J=1.6, 0.8$ Hz, H-16, H-17), un septuplete a δ 3.10 (1H, sept, $J= 6.8$ Hz, H-15), un singlete que es un protón aromático a δ 6.53 (1H, s, H-14) y un doble de dobles a 5.37 (1H, dd, $J= 1.6, 2$ Hz, H-7).

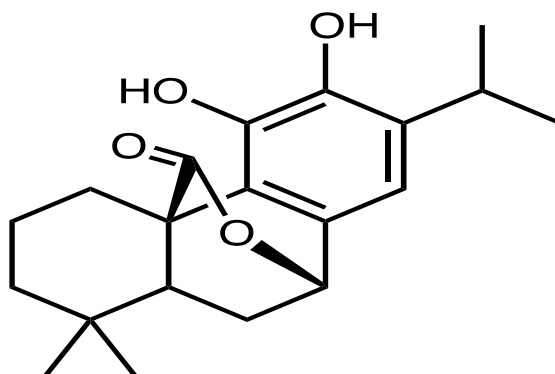


Figura. 16 Estructura química del Carnosol

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

En las tablas 10 y 11 se muestran los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C del carnosol corroborado con la literatura.

Tabla 10. Datos de ^1H RMN del Carnosol corroborado con la literatura.

| Nº Protón | (Topçu et al., 2013) ^1H RMN | Datos experimentales ^1H RMN |
|-----------|--|--|
| 1 a | 2.80 dd (J= 14, 3 Hz) | 2.90 (1H, dd, J= 2, 1.6 Hz) |
| 1 b | 2.56 ddd (J= 14.3, 4.5, 4.5 Hz) | 2.41 (1H, ddd, J=4.4, 4, 4.8 Hz) |
| 2 a | 1.91 m | 2.00 m |
| 2 b | 1.59 m | - |
| 3 a | 1.52 m | - |
| 3 b | 1.30 m | - |
| 5 | 1.69 dd (J= 4.2, 4.3 Hz) | 1.72 (1H, dd, J= 5.6, 5.2 Hz) |
| 6 a | 1.83 m | 1.87 (1H, ddd) |
| 6 b | 2.19 m | 2.20 (1H, m) |
| 7 a | 5.41 dd (J= 7.3, 7.5 Hz) | 5.37 (1H, dd, J= 1.6, 2 Hz) |
| 14 | 6.69 s | 6.63 (1H, s) |
| 15 | 3.25 m | 3.10 (1H, sept, J= 6.8 Hz) |
| 16 | 1.18 d (J= 6.7 Hz) | 1.23, 1.21 (2x3H, d, J= 1.6, 0.8 Hz) |
| 17 | 1.20 d (J= 6.9 Hz) | |
| 18 | 0.89 s | 0.90 (3H, s) |
| 19 | 0.90 s | 0.85 (3H, s) |

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

El espectro de RMN de ^{13}C se diferencian cuatro carbonos metilos, cuatro metilenos, dos metinos, un oximetino, un carbón éster, dos carbonos cuaternarios y seis carbonos aromáticos.

Tabla 11. Datos de ^{13}C RMN del Carnosol corroborado con la literatura

| Nº de Carbonos | (Hayes, 2016) ^{13}C RMN | Datos experimentales ^{13}C RMN |
|----------------|--------------------------------------|---|
| 1 | 29.1 | 29.2 |
| 2 | 18.8 | 19.0 |

| | | |
|----|-------|-------|
| 3 | 40.8 | 41.1 |
| 4 | 34.4 | 34.6 |
| 5 | 45.3 | 45.5 |
| 6 | 29.5 | 29.8 |
| 7 | 77.3 | 78.0 |
| 8 | 131.9 | 132.2 |
| 9 | 122.1 | 121.7 |
| 10 | 48.2 | 48.5 |
| 11 | 143.5 | 141.9 |
| 12 | 143.2 | 141.2 |
| 13 | 134.7 | 132.9 |
| 14 | 111.6 | 112.4 |
| 15 | 26.5 | 27.4 |
| 16 | 22.9 | 22.5 |
| 17 | 23.1 | 22.6 |
| 18 | 31.6 | 31.8 |
| 19 | 19.7 | 19.8 |
| 20 | 176.1 | 176.0 |

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

Este compuesto también ha sido identificado en especies como *Salvia carnososa* Dougl, *Salvia officinalis* L, *Sphacele chamaedryoides* y *Lepechinia hastate* (J. Ramírez, 2015). El carnosol presenta actividad antioxidante medida por DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) el cual presenta una actividad de eliminación de radicales libres de hasta 90%. Se ha comprobado que también inhibe la oxidación de LDL inducida por Cu^{2+} y los radicales libres de lípidos en microsomas en el hígado de ratón (Johnson, 2011). Esta actividad antioxidante probablemente se deba a la presencia de un grupo catecol en el anillo aromático (C11-C12) del esqueleto de este diterpeno fenólico (Del Baño et al., 2003). Es un agente en particular considerado como anticancerígeno en varias líneas celulares incluyendo próstata (PC-3), mama (MCF-7), piel (B16 / F10), leucemia (SEM, RS4:11 y MV4: 11) y cáncer de colon (HCT116) (Huang, Ho, Lin-Shiau, & Lin, 2005; Johnson, 2011). Los efectos anticancerígenos que se atribuyen se debe a que detiene el ciclo celular o induce la apoptosis mediante la activación de moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas inactivadoras (Kashyap et al., 2016).

La presencia de carnosol y ácido carnósico en los extractos proporcionan una base en la acción farmacológica antiinflamatoria. Debido a esto se ha evaluado el efecto antiinflamatorio a corto plazo de estos dos compuestos, se evidenció que inhiben los leucotrienos proinflamatorios en los leucocitos polimorfonucleares intactos, antagonizan potentemente la movilización de Ca^{2+} intracelular y atenúan la formación de especies de oxígeno reactivo (Poeckel et al., 2008).

4.2.2.3 Fracción JP 009/29.

De esta fracción (JP 009/29) se realizó una columna a partir de 327,9 mg de muestra en 33 g de sílica gel 60 F254, se eluyó con una mezcla isocrática Hex/AcOEt en proporción 8:2. Se obtuvieron 5 fracciones (JP 012/32 – JP 16/32) las mismas fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina, de los cuales la fracción JP 013/32, empezó a formarse pequeños cristales, se la purificó agregando metanol y se las dejó reposar hasta la formación de los cristales. En la tabla 12 se detalla las fracciones obtenidas a partir de la fracción JP 009/29.

Tabla 12. Fraccionamiento cromatográfico de la Fracción JP 009/29

| Código | Fracciones | Peso en mg |
|------------------|--------------|------------|
| JP 012/32 | 1-12 | 7.9 |
| JP 013/32 | 13-27 | 21 |
| JP 014/32 | 28-34 | 2.1 |
| JP 015/32 | 35-66 | 104.4 |
| JP 016/32 | 67-97 | 22.9 |

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

La fracción JP 013/32 se presentó en forma de cristales transparentes, se obtuvo un peso de 21 mg, con un factor de retención de 0.33 la cromatografía de capa fina utilizando como eluyente Hex:AcOEt en proporción 8:2 v/v. El compuesto es visible en la luz UV de 254 la cual se observa una mancha oscura y al ser revelada con ácido sulfúrico 5% y vainillina se observó una mancha color verde. Según el espectro de RMN ^1H el compuesto presenta impurezas, por lo que está en proceso de purificación mediante recristalización. Está pendiente la identificación, ya que todavía no se logró purificar del todo.

5 CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

El rendimiento de los extractos totales de metanol de *Lepechinia mutica* y *Rosmarinus officinalis* fueron de 15.34% y 8.56% respectivamente.

A partir de los extractos metanólicos desclorofilados se identificaron mediante resonancia magnética nuclear dos compuestos conocidos de origen terpénico; de la especie *Lepechinia mutica* el carnosol y del *Rosmarinus officinalis* el ácido betulínico.

RECOMENDACIONES

Continuar con el aislamiento e identificación del carnosol en diferentes disolventes como etanol y acetato de etilo para obtener una mayor cantidad de compuesto.

Determinar la actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante del extracto metanólico de la especie *Lepechinia mutica*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Peñaherrera, E., Tobar, V., & Witte, P. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1), 89–97.
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Baulies, G., & Torres, R. (2012). Actualización en fitoterapia y plantas medicinales. *Formación Médica Continuada En Atención Primaria*, 19(3), 149–160.
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M., & Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia: Revista de Ciencia Y Tecnología de América*, 30(8), 453–459.
- Bonkanka, C. (2006). *Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal*. Universidad de La Laguna.
- Bouju, E., Berthod, A., & Faure, K. (2016). Carnosol purification. Scaling-up centrifugal partition chromatography separations. *Journal of Chromatography A*, 59–66.
- Bravo, E. (2014). *La biodiversidad en el Ecuador*. Quito.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales*.
- Burns, R. (2011). *Fundamentos de Química* (Quinta Edi). Pearson Educación.
- Cañigueral, S. (2002). La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista de Fitoterapia*, 2(2), 101–121.
- Cañigueral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Lat. Am. J. Pharm*, 22(3), 265–278.
- Castillo, E., & Martínez, I. (2016). *Manual de Fitoterapia*.
- Cavazos Garduño, A., Ochoa Flores, A. A., Serrano-Niño, J. C., Beristain, C. I., & García, H. S. (2014). Operating and Compositional Variables for Preparation of Betulinic Acid Nanoemulsions. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(3), 689–703.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. In *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*.

- Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Río, J. A., Ortuño, A., & Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4247–4253.
- El-Gharbaoui, A., Benítez, G., González-Tejero, M. R., Molero-Mesa, J., & Merzouki, A. (2017). Comparison of Lamiaceae medicinal uses in eastern Morocco and eastern Andalusia and in Ibn al-Baytar's Compendium of Simple Medicaments (13th century CE). *Journal of Ethnopharmacology*, 202, 208–224.
- Fulda, S. (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(6), 1096–1107.
- Garrido, R., Vélez, H., & Vérez, V. (2013). Resonancia magnética nuclear: nuevas aplicaciones en la cuantificación y la evaluación de intermediarios de vacunas basadas en polisacáridos. *VacciMonitor*, 22(1), 35–42.
- Guaque, M., Castaño, J., & Gómez, M. (2010). Detección de metabolitos secundarios en *Ambrosia peruviana* Willd y determinación de la actividad antibacteriana y antihelmíntica. *Asociación Colombiana de Infectología*.
- Hayes, T. (2016). *Terpenes and Flavonoids From Salvia apiana and Their Affinities to Cannabinoid and Opioid Receptors*. University of Mississippi.
- Huang, S.-C., Ho, C.-T., Lin-Shiau, S.-Y., & Lin, J.-K. (2005). Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappaB and c-Jun. *Biochemical Pharmacology*, 69(2), 221–232.
- Jara, A. (2013). *Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie Piper imperiale (Piperaceae)*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.
- Johnson, J. (2011). Carnosol : A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters*, 305(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.02.005>
- Kashyap, D., Kumar, G., Sharma, A., Sak, K., Singh, H., & Mukherjee, T. (2016). Mechanistic insight into carnosol-mediated pharmacological effects: Recent trends and advancements. *Life Sciences*, 169, 27–36.
- Kwon MS, Y.-I. I., Vattem, D. A., & Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of

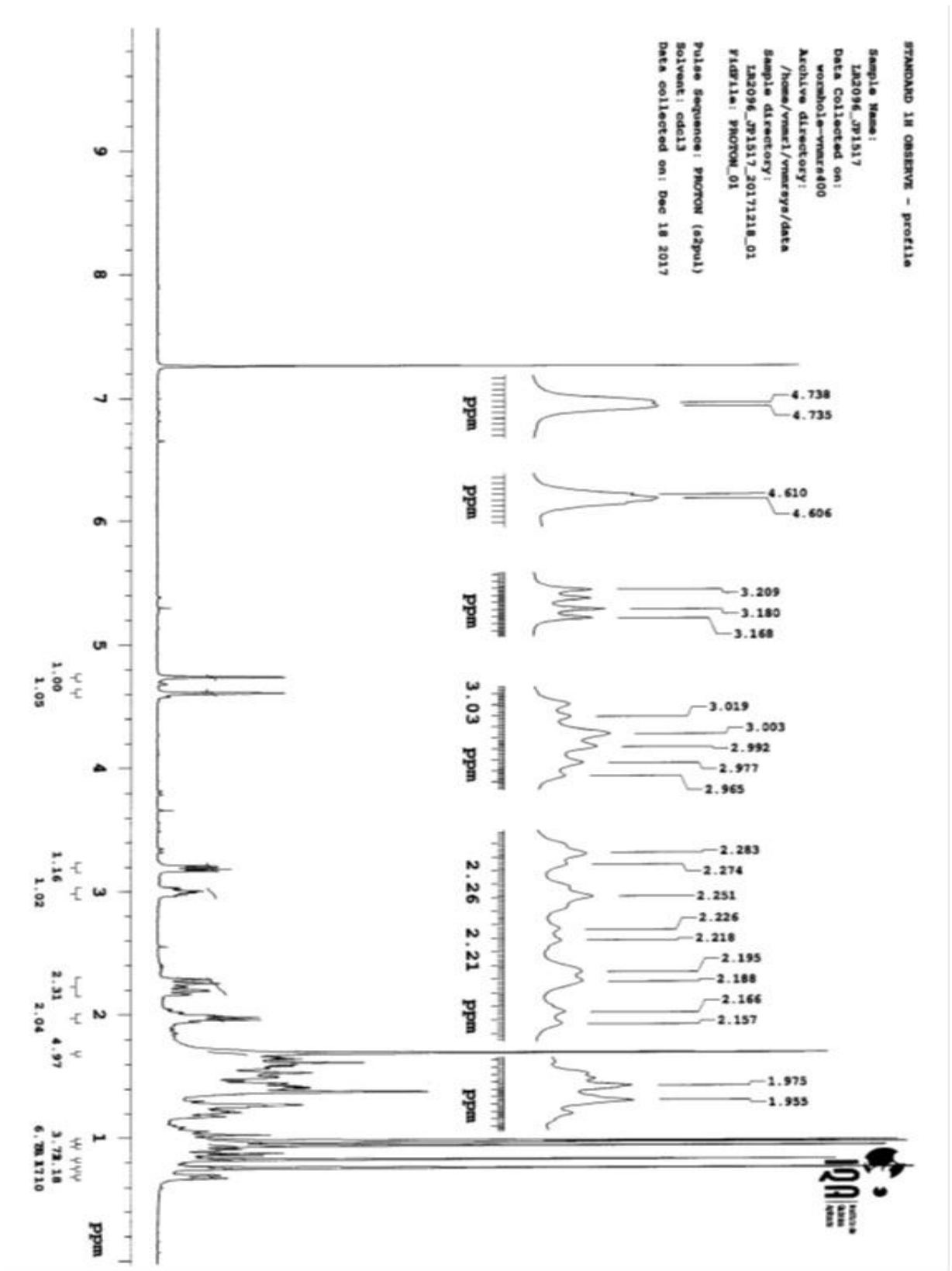
- Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pac J Clin Nutr*, 15(1), 107–118.
- Laurella, S. L. (2017). *Resonancia magnética nuclear: Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares* (Primera ed). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Lax, V. (2014). *Estudio de la variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de Rosmarinus officinalis L. en la Región de Murcia*. Universidad de Murcia.
- López, E. (2008). *Producción de Bebida Alcohólica de Alta Calidad*. Universidad de las Américas Puebla.
- Martínez, M., Fragoso, I., García, M., & Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 30–86.
- Méndez, Á. (2011). Cromatografía en columna. Retrieved from <http://quimica.laguia2000.com/general/cromatografia-en-columna>
- Montúfar, R., & Pitman, N. (2004). *Lepechinia mutica*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T45565A11000728.en>
- Moore, J., Yousef, M., & Tsiani, E. (2016). Anticancer Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract and Rosemary Extract Polyphenols. *Nutrients*, 8(11), 1–32.
- Moraes, M. (2006). *Botánica Económica de los Andes Centrales*. (B. M. Moraes R. & F. B. & H. B. Øllgaard, L. P. Kvist, Eds.). La Paz: Universidad Mayor de San Andrés.
- Morales, R. (2010). Género Rosmarinus. *In Flora Ibérica*, 12, 327–331.
- Muedra, V., & Moreno, L. (2009). Estudio sobre el conocimiento del riesgo perioperatorio de las plantas medicinales. *Rev. Esp. Anestesiología y Reanimación*, 56(8), 467–473.
- Muñoz, L. (2002). Plantas medicinales españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (LAMIACEAE) (ROMERO). *Studia Botanica*, 21, 105–118.
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- Pérez-Colmenares, A., Vivas-Guerrero, K., Rojas-Fermín, L., Usubillaga, A., & Chataing, B. (2014). Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling. *Rev Fac Farm*, 56(1), 40–45.

- Philippe Le Loc'h, J. (2014). *Lista de Plantas Medicinales Comunes en la Subregión Andina. Propuestas para su integración en los Sistemas de Salud*. Lima, Perú: Organismo Andino de Salud – Convenio Hipólito Unanue.
- Poeckel, D., Greiner, C., Verhoff, M., Rau, O., Tausch, L., Hörnig, C., & Werz, O. (2008). Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical Pharmacology*, 76, 91–97.
- Purca, T. (2013). *Efectividad antibacteriana “ in vitro ” del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) sobre flora salival*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Quesada, A. (2008). Las plantas medicinales. *Ambiente y Salud*, 21(1–2), 20–23.
- Quijada, P. (2015). Romero para mejorar la memoria. Retrieved from <http://abcblogs.abc.es/cerebro/public/post/romero-para-mejorar-la-memoria-16937.asp/>
- Ramírez, J. (2015). *Isolation and characterization of secondary metabolites from Ecuadorian species of the genus Piper and Lepechinia*. Università degli Studi di Pavia.
- Ramírez, J., Gilardoni, G., Jácome, M., Montesinos, J., Rodolfi, M., Guglielminetti, M. L., Cagliero, C., Bicchi, C., & Vidari, G. (2017). Chemical Composition, Enantiomeric Analysis, AEDA Sensorial Evaluation and Antifungal Activity of the Essential Oil from the Ecuadorian Plant *Lepechinia mutica* Benth (Lamiaceae). *Chemistry & Biodiversity*, 14(12).
- Ramírez, M. (2008). *Extracción por arrastre de vapor y análisis de propiedades antioxidantes del aceite esencial de romero*. Universidad de las Américas Puebla.
- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). *Productos naturales vegetales* (Primera ed). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Rosero, A. (2013). *Caracterización de los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial de hojas y tallo de la planta salvielugo del galeras “Lepechinia vulcanicola” por medio de CG-EM*. Universidad de Nariño.
- Satiraphan, M., Pamonsinlapatham, P., Sotanaphun, U., Sittisombut, C., Raynaud, F., Garbay, C., & Cachet, X. (2012). Lupane triterpenes from the leaves of the tropical rain forest tree *Hopea odorata* Roxb. and their cytotoxic activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44, 407–412.
- Sepúlveda-Jimenez, G., Porta-Ducoing, H., & Rocha-Sosa, M. (2003). La Participación de

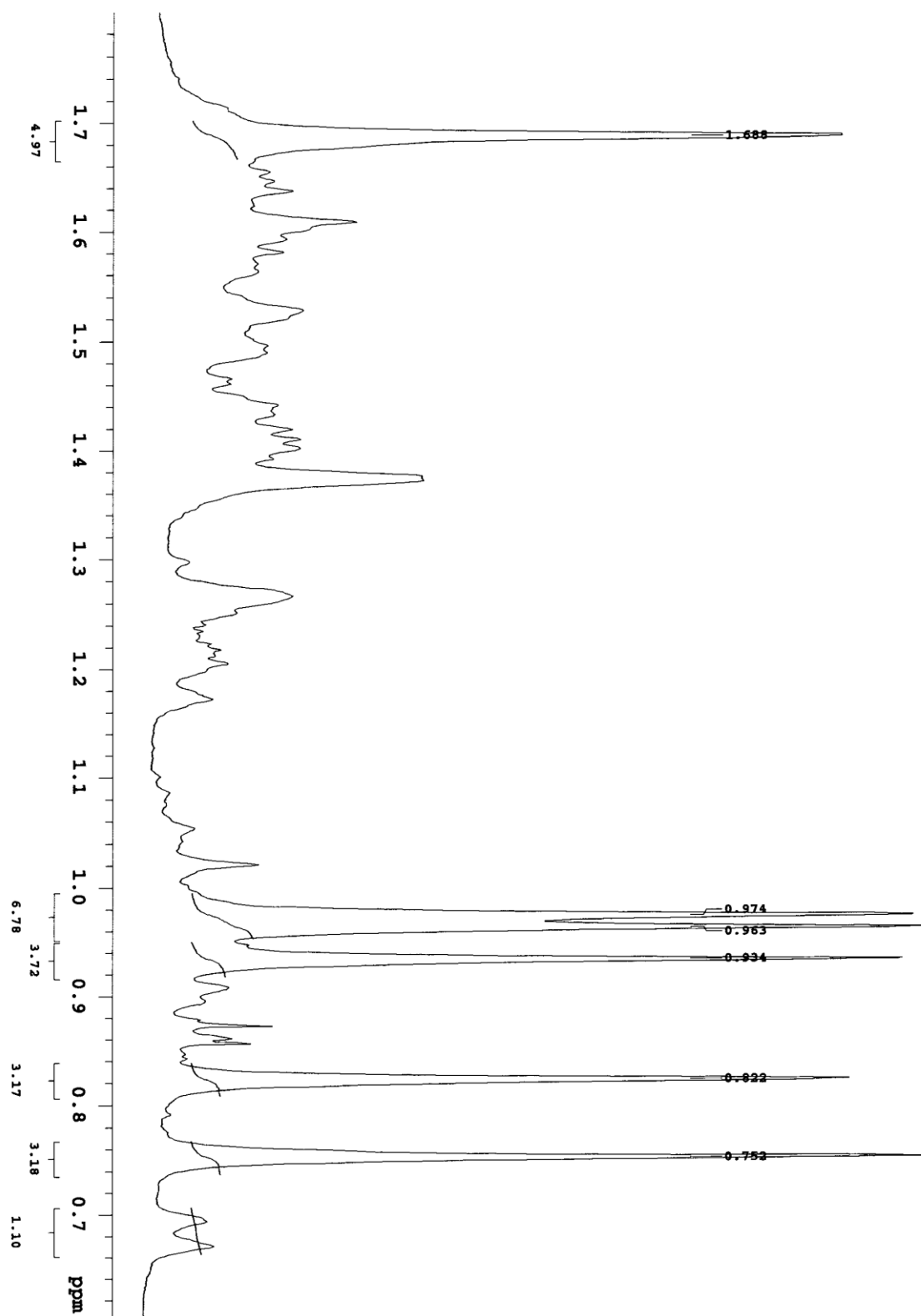
- los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355–363.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (vol 78). In F. B. & H. B. M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist (Ed.).
- Sousa, P., Souza, R., Tessarolo, L., de Menezes, R., Sampaio, T., Canuto, J., & Martins, A. (2017). Betulinic acid induces cell death by necrosis in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 174, 72–75.
- Tesso, H. (2005). *Isolation and Structure Elucidation of Natural Products from Plants*. University of Hamburg.
- Topçu, G., Ozturk, M., Kuşman, T., Barla, A., Kolak, U., & Ulubelen, A. (2013). Terpenoids, essential oil composition and fatty acids profile, and biological activities of Anatolian *Salvia fruticosa* Mill. *Turkish Journal of Chemistry*, 619–632.
- Ulloa, C., & Moller, P. (1993). *Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador*. Universitetsforlag, Aarhus.
- Valares, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*. Universidad de Extremadura.
- Zambrano-Intriago, L. F., Buenaño-Allauca, M. P., Mancera-Rodríguez, N. J., & Jiménez-Romero, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Rev Univ. Salud*, 17(1), 97–111.
- Zuco, V., Supino, R., Righetti, S., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C., & Formelli, F. (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letters*, 175(1), 17–25.

ANEXOS

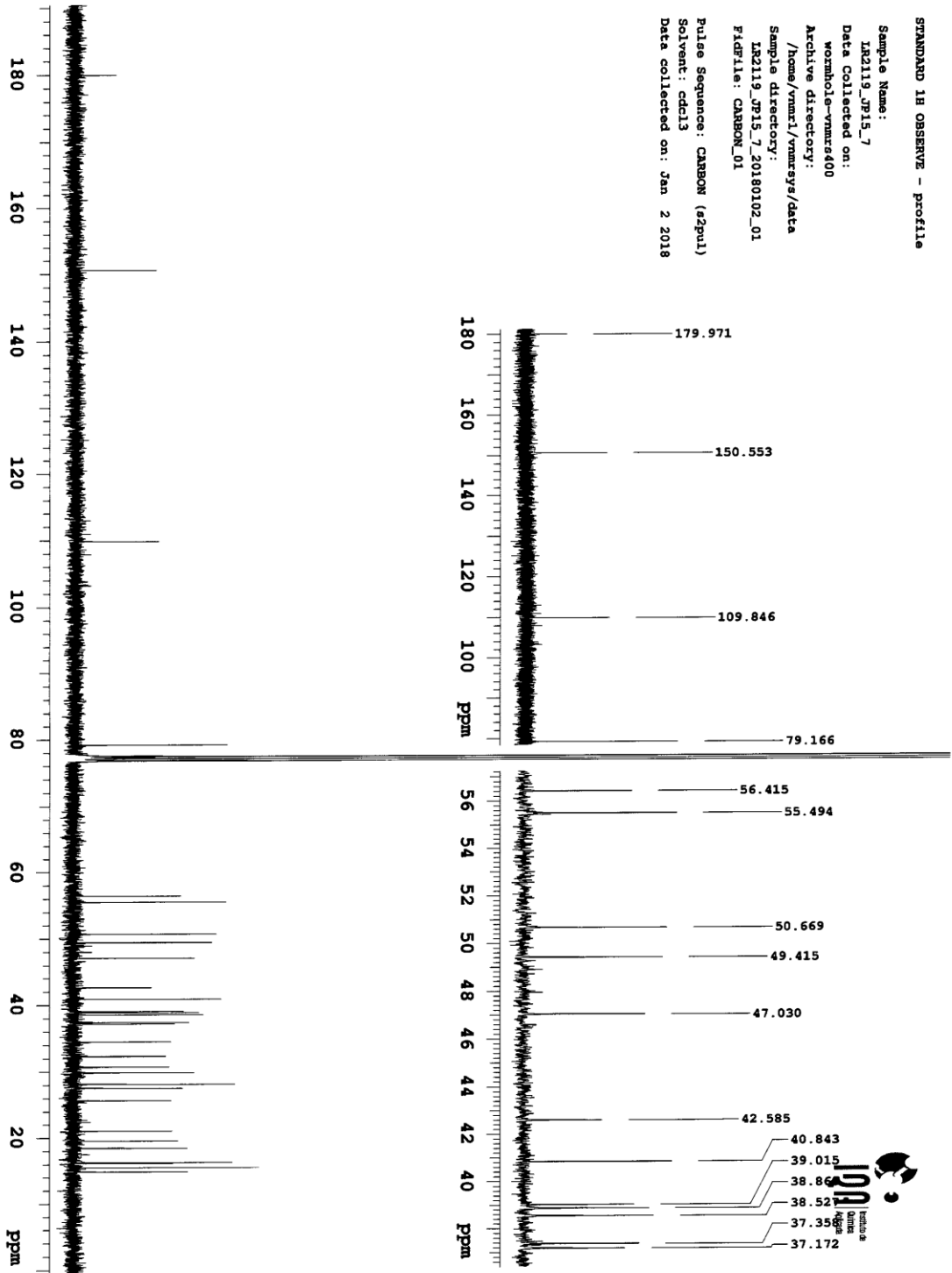
Anexo. 1 Espectro de RMN de ^1H correspondiente al Ácido betulínico



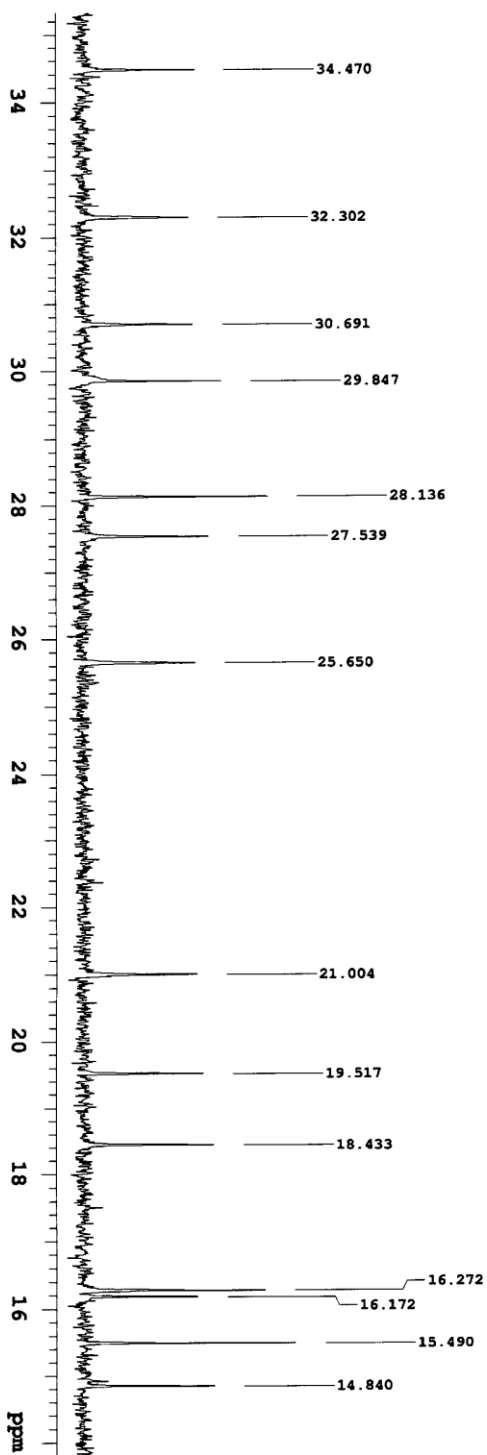
Anexo. 1 Espectro amplificado de RMN de ^1H correspondiente al Ácido betulínico



Anexo. 2 Espectro de RMN de ^{13}C correspondiente al Ácido betulínico



Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C correspondiente al Ácido betulínico



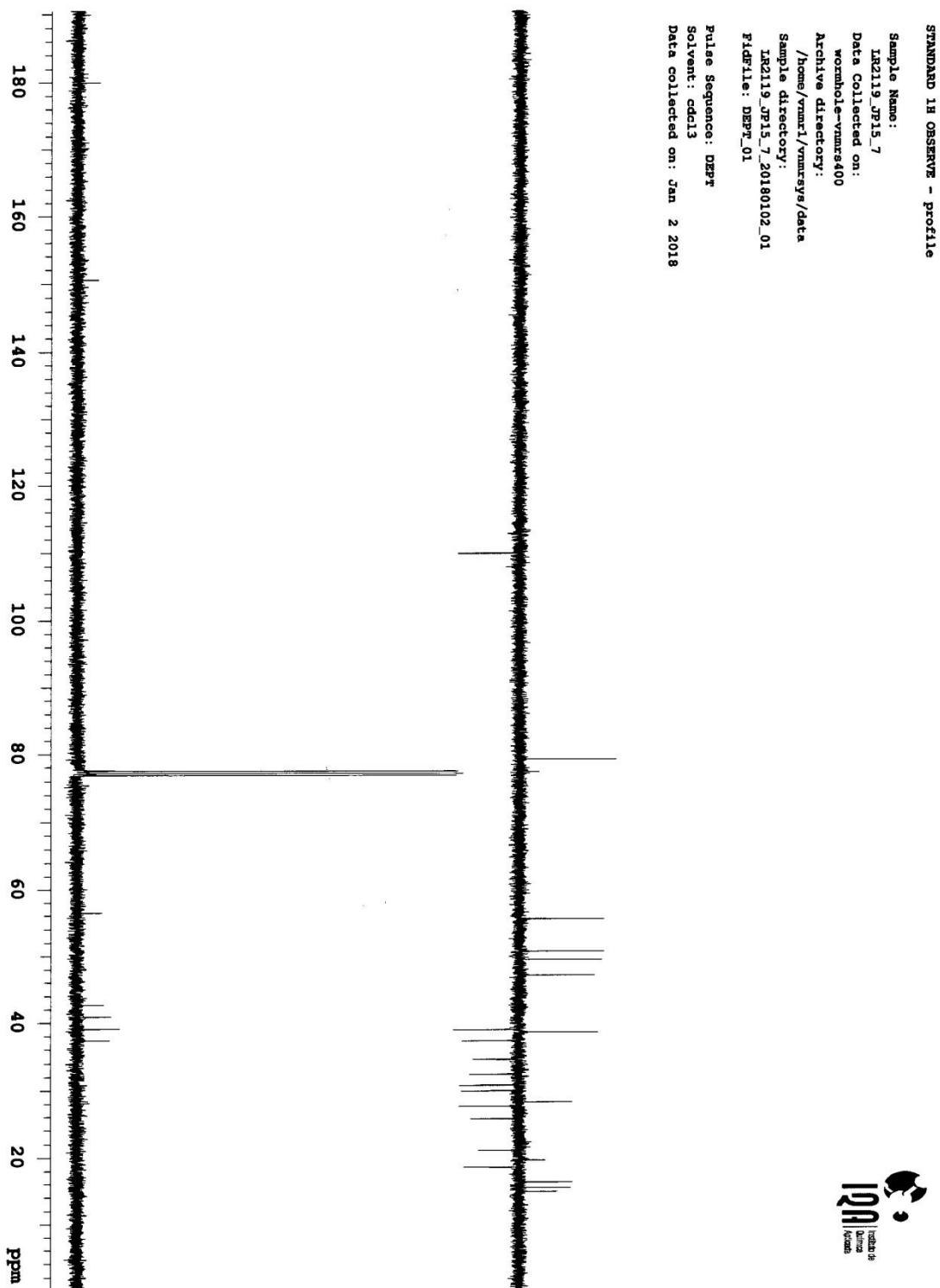
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name: IR2119_JP15_7
Data Collected on: wormhole-vnmrs400
Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: IR2119_JP15_7_20180102_01
F1: FILE: CARBON_01

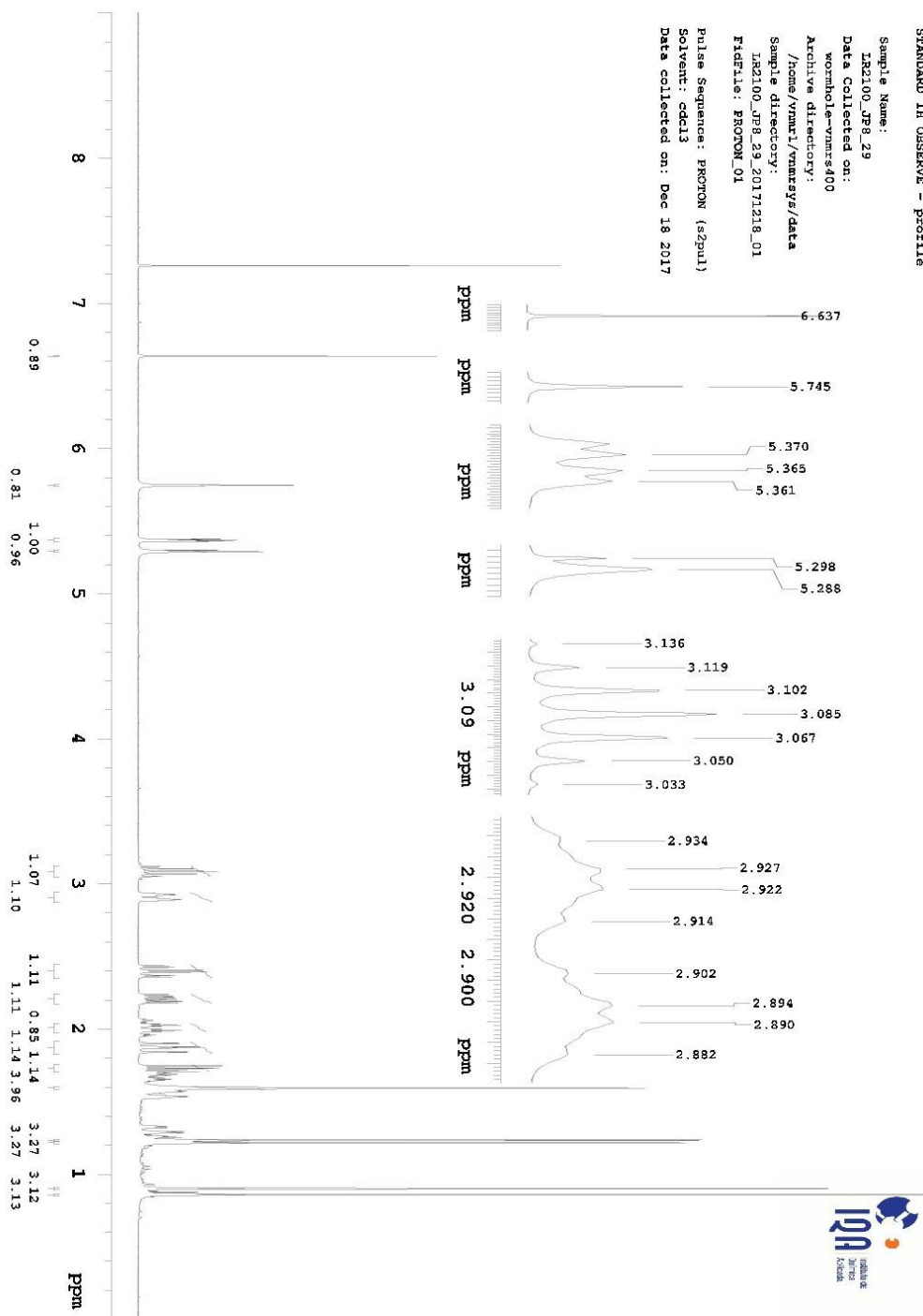
Pulse Sequence: CARBON (azpul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jan 2 2018



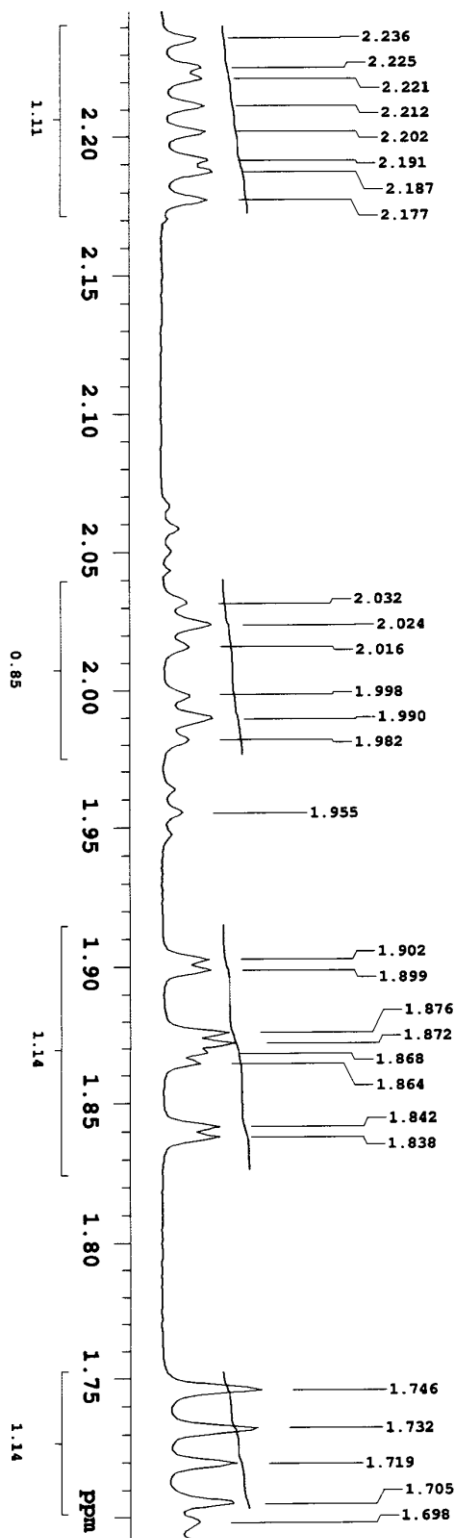
Anexo. 3 Espectro DEPT correspondiente al Ácido betulínico



Anexo. 4 Espectro de RMN de ^1H correspondiente al Carnosol



Anexo. 4 Espectro amplificado de RMN de ^1H correspondiente al Carnosol



STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
IR2100_JF8_29

Data Collected on:
wormhole-vnmrs400

Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data

Sample directory:
IR2100_JF8_29_20171218_01

Filename: PROTON_01

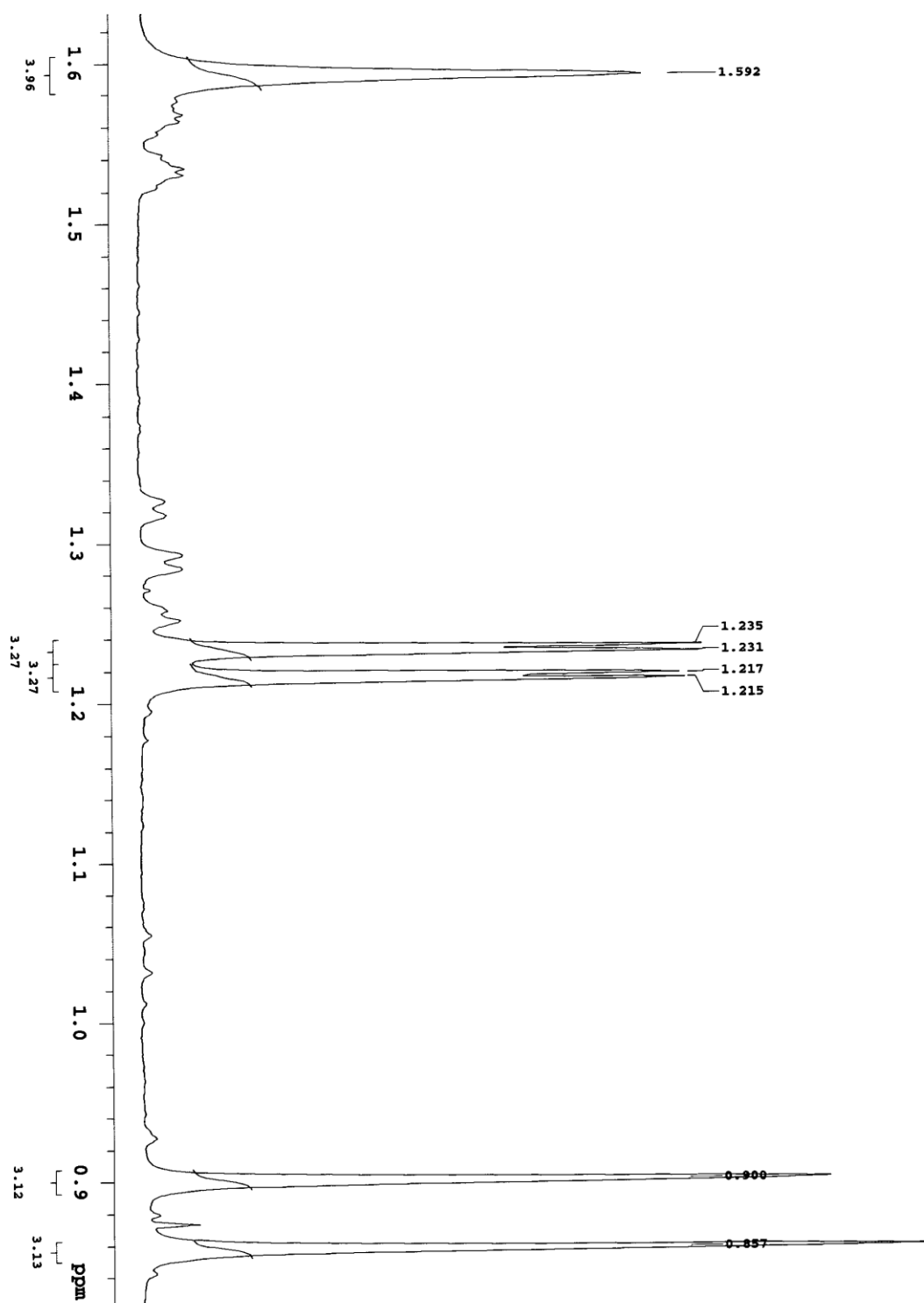
Pulse Sequence: PROTON (g2pul)

Solvent: cdcl3

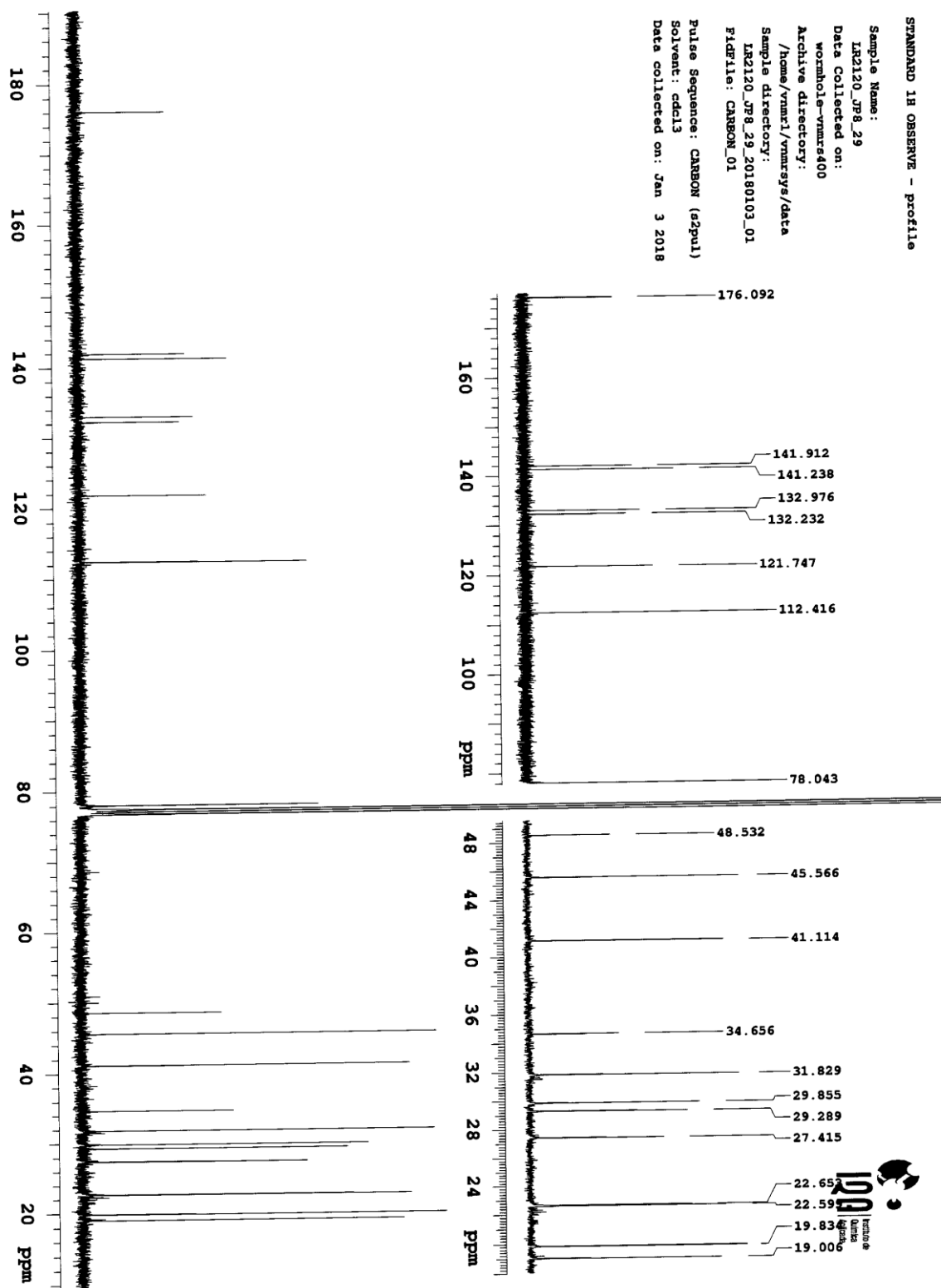
Data collected on: Dec 18 2017



Anexo 4. Espectro amplificado de RMN de ^1H correspondiente al Carnosol



Anexo. 5 Espectro de RMN de ¹³C correspondiente al Carnosol



Anexo. 6 Espectro DEPT correspondiente al Carnosol

