



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA**

**TITULACIÓN BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**“Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible”. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios en la especie vegetal *Phyla strigulosa* Mart. & Gal.**

**TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN**

**AUTOR: Ogoño Pucha, Cristian Fernando**

**DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio, PhD**

**LOJA – ECUADOR**

**2015**

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

PhD.

Chabaco Patricio Armijos Riofrío

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **“Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible”**. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios en la especie vegetal *Phyla strigulosa* Mart. & Gal., realizado por Ogoño Pucha Cristian Fernando; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se apruebe la presentación del mismo

Loja, enero de 2015

f.....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Ogoño Pucha Cristian Fernando, declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: “Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible”. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios en la especie vegetal *Phyla strigulosa* Mart. & Gal., de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo Chabaco Patricio Armijos Riofrio 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 exclusividad responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....  
Autor: Ogoño Pucha Cristian Fernando  
Cédula: 19004790

## **DEDICATORIA**

Dedicado especialmente a mis padres, por su apoyo y amor incondicional. A mis hermanos, a todos los profesores que han colaborado a que siga engrandeciendo mis conocimientos. A todas las personas que me han brindado su confianza y su amistad que han sido base fundamental en el desarrollo de mi persona.

Cristian Ogoño

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios , a mis padres por todo el esfuerzo que hicieron para poder llegar a conseguir una profesión y hacer de mí una persona de bien, gracias por los sacrificios y la paciencia que demostraron todos estos años, juntos logramos este éxito.

Al PhD. Chabaco Armijos, por sus sabios consejos, por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación, y por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Al PhD. Gianluca Gilardoni, por compartir sus conocimientos, que fueron de gran ayuda en el desarrollo de mi tesis.

A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias por su paciencia y enseñanzas.

A todas aquellas personas que contribuyeron no solo en la realización de este proyecto, si no en el transcurso de mi vida universitaria y a todos los que han influenciado positivamente en mi vida.

Cristian Ogoño

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
<b>CAPÍTULO I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO</b>	
1.1. Fin del proyecto.....	5
1.2. Propósito del proyecto.....	5
1.3. Componentes del proyecto.....	5
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b>	
2.1. Plantas medicinales.....	7
2.2. Medicina tradicional.....	8
2.3. Productos naturales: Descripción de metabolitos secundarios (MS), clasificación e importancia.....	8
2.3.1. Terpenoides.....	9
2.4. Familia Verbenaceae.....	10
2.5. <i>Phyla strigulosa</i> .....	10
2.6. Técnicas de separación, purificación e identificación de MS.....	11
2.6.1. Maceración.....	11
2.6.2. Cromatografía en columna.....	11
2.6.3. Cromatografía en capa fina.....	12
2.6.4. Resonancia magnética nuclear.....	12
2.6.5. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia masas CG –EM....	13
2.7. Actividad antimicrobiana.....	13
<b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA</b>	
3.1. Recolección del material vegetal.....	16

3.2.	Obtención de extractos.....	16
3.3.	Actividad antimicrobiana.....	17
3.3.1.	Preparación del cultivo bacteriano (overnight) .....	17
3.3.2.	Ensayo.....	17
3.4.	Selección de extractos.....	18
3.5.	Fraccionamientos de cromatografía de columna.....	18
3.6.	Cromatografía de capa fina.....	19
3.7.	Purificación de fracciones.....	19
3.7.1.	Fraccionamiento en columna de fase RP-18, de la fracción 46-51 obtenido previamente.....	19
3.7.2.	Unión de las fracciones obtenidas en la columna RP- 18.....	22
3.8.	Resonancia magnética nuclear.....	20
3.9.	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	20
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		
4.1.	Rendimiento de los extractos obtenidos.....	22
4.2.	Actividad antimicrobiana.....	22
4.3.	Cromatografía en columna del extracto obtenido.....	23
4.4.	Aislamiento en columna RP-18 de compuesto (+)-hernandulcina.....	25
4.4.1.	Unión de las fracciones obtenidas en la columna RP-18.....	26
4.5.	Identificación del sesquiterpeno hernandulcina.....	26
<b>CONCLUSIONES.....</b>		30
<b>RECOMENDACIONES.....</b>		31
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		32
<b>ANEXOS.....</b>		35

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Rendimiento de Extractos.....	22
<b>Tabla 2.</b> CMI de los extractos frente a bacterias gram positivas y negativas.....	23
<b>Tabla 3.</b> Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano. Unión de fracciones.....	24
<b>Tabla 4.</b> Comparación de los datos obtenidos de <sup>13</sup> C RMN de hernandulcina....	28

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general de la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios en plantas.....	9
<b>Figura 2.</b> <i>Phyla strigulosa</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> Esquema de le metodología de obtención de extractos.....	16
<b>Figura 4.</b> CCF MeOH:H <sub>2</sub> O 5:1 del compuesto mayoritario.....	20
<b>Figura 5.</b> CCF de las fracciones unidas usando sílice RP-18 y con eluyentes (MeOH:H <sub>2</sub> O 5:1).....	25
<b>Figura 6.</b> CCF: MeOH:H <sub>2</sub> O 4:1 de la Fracciones 46-51.....	25
<b>Figura 7.</b> CCF MeOH:H <sub>2</sub> O 5:1 del compuesto aislado hernandulcina.....	26
<b>Figura 8.</b> Estructura química de la hernandulcina.....	29

## ABREVIATURAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>Hex</b>	Hexano
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>CC</b>	Cromatografía en columna
<b>CCF</b>	Cromatografía de capa fina
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b><sup>13</sup>CRMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de Masas
<b>INIAP</b>	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
<b>UTPL</b>	Universidad Técnica Particular de Loja
<b>SENESCYT</b>	Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación
<b>MS</b>	Metabolitos secundarios
<b>CG-SM</b>	Cromatografía de gases
<b>DMSO</b>	Dimertil-sulfoxido

## RESUMEN

La Región Sur del Ecuador cuenta con una gran riqueza vegetal y constituye una de las zonas menos estudiadas; sin embargo ofrece grandes posibilidades para la obtención de nuevos metabolitos que pueden llevar al desarrollo de productos farmacéuticos. El propósito de la presente investigación fue extraer (mediante maceración), purificar (empleando técnicas cromatográficas: CCF, CC) e identificar (analizando por técnicas espectroscópicas CG-EM, RMN) metabolitos secundarios de la especie *Phylla strigulosa*. Se obtuvieron 3 extractos: Hexánico, de acetato de etilo y Metanólico. Mediante CCF se visualizó la riqueza y separación de los compuestos de cada uno de los extractos, se optó por trabajar con el de hexano, y de este se logró aislar el compuesto hernandulcina, el cual ha sido catalogado como 1000 veces más dulce que la sacarosa bajo una base molar. Además se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos, la cual resulto negativa según los estudios.

**PALABRAS CLAVES:** *Phylla strigulosa*, metabolitos secundarios, Hernandulcina.

## ABSTRACT

The Southern Region of Ecuador has a rich vegetation and is one of the least studied areas; however it offers great potential for the obtaining of new metabolites that may lead to the development of pharmaceuticals. The purpose of this investigation was: to extract (by maceration), purify (using chromatographic techniques: TLC, CC) and identify (analyzing by spectroscopic techniques like GC-MS and NMR) secondary metabolites from *Phyla strigulosa* species. Three extracts were obtained: Hexane, Ethyl acetate and methanol, of which we chose to work with hexane, and from this was isolated the hernandulcin compound, which has been rated 1000 times sweeter than sucrose under molar basis. Also, it was determined the antimicrobial activity of the extracts, which was negative according studies.

**KEYWORDS:** *Phyla strigulosa*, secondary metabolites, Hernandulcin.

## INTRODUCCIÓN

Es indudable la importancia de las plantas para la medicina moderna, durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponía el médico; todas las culturas, a lo largo y ancho del planeta y en todos los tiempos, han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Hernández, 2008).

Las plantas de la familia Verbenaceae llaman la atención de los investigadores no sólo por su alta diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por su uso tradicional (Compadre, 1985). La permanente búsqueda de nuevos productos y combinaciones de sustancias de origen natural, con potencial aplicación en diferentes industrias, tales como la farmacéutica, de alimentos, textil, química orgánica (Stashenko et al, 2003).

Dentro de esta familia se han realizado estudios en aceites esenciales de diferentes especies como *Phyla dulcis* (Compadre, 1985,1987), Compadre *et al.* (1987), aislaron, sintetizaron y caracterizaron el compuesto hernandulcina, un sesquiterpeno 1000 veces más dulces que la sacarosa.

La presente investigación tiene la finalidad de aislar e identificar metabolitos secundarios de la especie *Phyla strigulosa*. En el Ecuador se encuentra en galápagos, la región costa, específicamente en la provincia de guayas y en la región sierra en Loja (Jorgensen, 1999). Cabe señalar que la planta a estudiar ha sido seleccionada por el equipo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) con la finalidad de validar su uso tradicional con estudios fitoquímicos.

La investigación de llevo a cabo dentro de un proyecto de colaboración interinstitucional entre el INIAP y la UTPL, con el financiamiento de la SENESCYT denominado: "Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible." La evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos, el análisis fitoquímico de la especie *Phyla strigulosa* se está realizó en el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

## **CAPÍTULO I**

### **FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO**

### **1.1. Fin del proyecto.**

Contribuir a mejorar la calidad de vida de las poblaciones más vulnerables del Ecuador, mediante la conservación, revalorización de las propiedades medicinales, para su conservación y uso sustentable, en un contexto de respeto por el ambiente, el conocimiento ancestral y la cultura.

### **1.2. Propósito del proyecto.**

Efectuar la investigación fitoquímica de los metabolitos secundarios presentes en la especie *Phyla strigulosa*, evaluar su actividad antimicrobiana.

### **1.3. Componentes del proyecto.**

1. Obtener y evaluar la actividad biológica del extracto hexánico, de acetato de etilo y metanólico.
2. Fracción de los extractos biológicamente activos.
3. Metabolitos secundarios aislados y debidamente identificados.

**CAPITULO II**  
**MARCO TEÓRICO**

## 2.1. Plantas medicinales.

La utilización de las plantas medicinales tiene su origen desde el inicio de la historia del ser humano sobre la tierra que, en íntimo contacto con la naturaleza, se fue desarrollando con la imitación de las costumbres de otros animales y con la experiencia acumulada tras la ingestión accidental o voluntaria de algunas especies vegetales (Cruz, 2007).

Es indudable la importancia de las plantas para la medicina moderna, durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponía el médico; todas las culturas a lo largo y ancho del planeta y en todos los tiempos han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Hernández, 2008).

El 80% de la población mundial depende para su salud de medicinas basadas en plantas y animales. El doble papel que juegan hoy las plantas medicinales, tanto como fuente de salud como de ingresos económicos para cultivadores, comerciantes, colectores y fabricantes de medicinas basadas en plantas, contribuye de una manera importante al proceso del desarrollo. No obstante, la materia prima requerida no siempre está a disposición; en algunos casos, especies con valor medicinal se encuentran en poca cantidad y esto plantea una amenaza tanto para el bienestar humano como para las especies silvestres (Vidaurre, 2006).

Las plantas medicinales y sus productos derivados, han sido milenariamente utilizados en la medicina tradicional y ahora son cada vez más valiosos como materia prima en la preparación de medicamentos modernos (occidentales) para la industria farmacéutica y herbal, el mercado, igualmente importante, sigue una tendencia hacia un aumento significativo (Araujo, 2006).

Ecuador ha dado origen a uno de los medicamentos más importantes para la humanidad, a través de la *Cinchona*, cuyo compuesto Quinina fue descubierto en el siglo XVII y utilizado para la cura del paludismo. Otros compuestos igualmente importantes se han derivado también de otras plantas nativas, como el Curare (*Chondodendron* spp., *Strychnos* sp.), utilizado en cirugías oculares y como anestésico y el Modulador Biológico de la Respuesta Inmune (BIRM), producido de la Dulcamara (*Psychotria viridis*, *Kalanchoe pinnata* y/o *Solanum dulcamara*), el cual modifica la conducta biológica del tumor cancerígeno y eleva las defensas bajas proporcionando una mejor calidad de vida a pacientes con cáncer y SIDA (Ortiz & Suárez, 1999). No obstante, es muy poco lo que se conoce sobre la situación del

país con relación al comercio de plantas medicinales y sus productos, así como la importancia de esta actividad y problemática a nivel nacional, regional y global.

## **2.2. Medicina tradicional.**

La medicina tradicional es una parte de la cosmovisión indígena y representa el conocimiento milenario sobre la madre tierra y el uso de las plantas medicinales, los pueblos autóctonos han resguardado como un importante activo de incalculable valor para el fortalecimiento y preservación de su identidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define de la siguiente manera: La medicina tradicional es la suma total de conocimiento, habilidades, y practicas basadas en las teorías, la creencia, y las experiencias indígenas en diversas culturas, sean susceptibles de explicación o no, utilizados en el mantenimiento de la salud así como en la prevención, la diagnosis, la mejora o el tratamiento de la enfermedad física y mental, practicas trasmitidas de generación en generación sea oralmente o por escrito (de la Riva & Moraes, 2006).

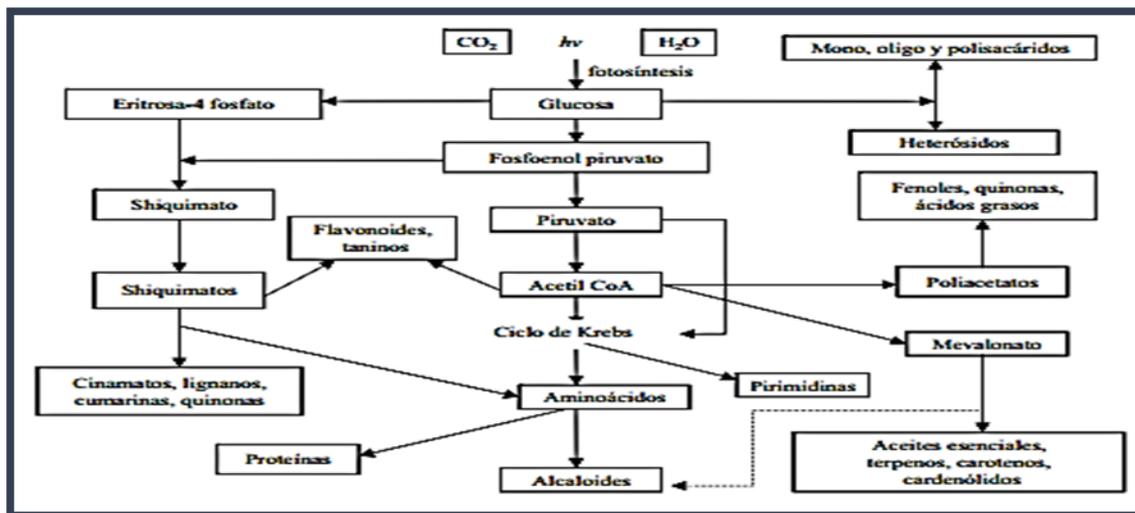
En múltiples ocasiones la medicina tradicional indígena ha representado la única opción de prevención y curación de enfermedades para los habitantes de las comunidades originarias; esto debido principalmente a la exclusión y a la pobreza extrema en la que viven (Araujo, 2006).

## **2.3. Productos naturales: Descripción de metabolitos secundarios (MS), clasificación e importancia.**

Los productos naturales, como es el caso de las plantas medicinales, han sido ampliamente utilizados desde tiempos atrás, bien sea como alimento, medicamento, agente conservante, etc. Aunque los avances tecnológicos y de síntesis orgánica fina han ido desplazando cada vez más su uso por sustancias artificiales, hoy por hoy, los consumidores naturales son más inocuos y por ellos los prefieren; de esa manera, se observa cómo crece su consumo y utilización, lo que ha dado paso a un desarrollo importante de la agroindustria de plantas medicinales a nivel mundial (Castañeda et al, 2007).

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o no de nitrógeno en su composición; los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides (o isoprenoides), los

fenilpropanoides (o compuestos fenólicos) y los alcaloides (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura). Los terpenoides derivan del isopentenil difosfato (IPP) y se conocen unos 25.000. Los alcaloides contienen uno o más átomos de nitrógeno y se derivan principalmente de aminoácidos, de ellos se conocen unos 12.000. Mientras que los aproximadamente 8.000 fenilpropanoides provienen de las llamadas vías biosintéticas del shiquimato o del malato/acetato (Bennett & Wallsgrave, 1994). En la Fig 1., se presenta un esquema de la biosíntesis de los metabolitos primarios y secundarios en las plantas.



**Figura 1.** Esquema general de la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios en plantas

Fuente: Castañeda *et al*, 2007

### 2.3.1. Terpenoides.

Los terpenoides o isoprenoides, se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamada isopreno (C5) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato que se lleva a cabo en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta DXP, la cual es independiente de la del mevalonato y que se realiza en los plástidos. Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plástidos (Eisenreich, *et al*, 2004). Los monoterpenos tales como el mentol, que es un antimicrobiano, el citronelal, que es un repelente de insectos y las piretrinas que funcionan como venenos del sistema nervioso de

los insectos, son componentes químicos con actividad biológica potencial durante la respuesta de defensa de las plantas que los producen. Los sesquiterpenos tales como la risitina y lubimina de la papa (*Solanum tuberosum* L.), el capsidiol del chile (*Capsicum annuum* L.) y el 2,7-dihidroxicadalenol del algodón (*Gossypium hirsutum* L.) son compuestos con actividad antimicrobiana; mientras que el poligodial de *Polygonum hidropiper* L. inhibe fuertemente la alimentación de diversos insectos herbívoros, el diterpeno atractilósido inhibe la fosforilación oxidativa en mitocondrias, y el casbeno del ricino (*Ricinus spp.*) es un agente antifúngico (Sepúlveda et al, 2004).

#### **2.4. Familia Verbenaceae.**

Esta familia tiene 300 especies agrupadas en 75 géneros, se destacan por poseer una gran cantidad de especies útiles productoras de aceites esenciales, medicinales, frutales, de gomas y taninos, así como numerosos ornamentales. Comprende especies de diferente hábitat: hierbas, arbustos, árboles, y numerosas lianas. La distribución natural de la familia es casi completamente tropical y subtropical, con unos pocos representantes en zonas templadas (Andrada, Pastoriza, & Martínez, 1998).

Las plantas de la familia Verbenaceae llaman la atención de los investigadores no sólo por su alta diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por su variable uso. La permanente búsqueda de nuevos productos y combinaciones de sustancias de origen natural con potencial aplicación en diferentes industrias, tales como la farmacéutica, de alimentos, textil, química orgánica motivo del estudio de esta especie (Stashenko et al., 2003).

Dentro de esta familia se han realizado estudios en aceites esenciales de diferentes especies dentro de las cuales resaltan *Phyla dulcis*, que fue estudiada por Compadre *et al.*, quienes aislaron la hernandulcina, sesquiterpeno 1000 veces más dulces que la sacarosa (Stashenko et al., 2003).

#### **2.5. *Phyla strigulosa*.**

*Phyla strigulosa* (M. Martens & Galeotti) Mold., es una especie nativa del Ecuador se ubican a 1000-1500, 1500-2000 m.s.n.m, se encuentra en galápagos y la región costa, específicamente en las provincias de guayas y en la región sierra en Loja. (Jorgensen, 1999). En la Fig. 2. se presenta una imagen de la especie *Phyla strigulosa*



Reino: Plantae

Clase: Dicotiledónea

Familia: Verbenacea

Género: Phyla

Especie: *Phyla strigulosa* (M. Martens & Galeotti) Moldenke. (Tropicos.org, 2014)

**Figura 2.** *Phyla strigulosa*

Fuente: Autor

## **2.6. Técnicas de separación, purificación e identificación de MS.**

### **2.6.1. Maceración.**

Consiste en poner en contacto el material vegetal y el disolvente, se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre el material vegetal y el disolvente, depende de factores que están unidos al material vegetal, como su naturaleza, el tamaño de la partícula, su contenido de humedad y cantidad y factores que están relacionados con el disolvente, como la selectividad y la cantidad. El hinchamiento del material vegetal es factor importante, porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del disolvente. El proceso clásico de maceración consiste en dejar en contacto el material vegetal con el disolvente varios días, con agitación ocasional, este proceso es conocido como maceración estática. Para abreviar el tiempo de operación, el material vegetal y el disolvente deben mantenerse en movimiento constante, este proceso es conocido como maceración dinámica (Sharapin, 2000).

### **2.6.2. Cromatografía en columna.**

Se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa. Como fase estacionaria se usa, generalmente, gel de sílice o alúmina dentro de una columna. A través de la columna se hará pasar una cantidad de un disolvente o mezcla de disolventes denominada eluyente y/o fase móvil. La elección del disolvente es crucial para

una buena separación. Dicho disolvente pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o bien por aplicación de presión. Los compuestos constituyentes de la mezcla son arrastrados por el eluyente a su paso, haciéndoles avanzar a lo largo de la columna. Sin embargo, no todos los compuestos avanzan a la misma velocidad, y esta es precisamente la clave de la cromatografía. Algunos compuestos se ven más fuertemente retenidos por el adsorbente (fase estacionaria) y por lo tanto avanzarán más despacio. Por el contrario, otros apenas son retenidos y avanzarán a mayor velocidad. En general se dice que la separación en la cromatografía se basa en la afinidad diferencial de los distintos compuestos por la fase móvil o la fase estacionaria (Rocha, 2000).

### **2.6.3. Cromatografía en capa fina.**

La separación de mezclas de moléculas mediante la cromatografía de capa fina se basa en el principio del reparto entre dos fases. En general, una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interaccione con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria. Un segundo medio (la fase móvil) que es inmiscible con la fase estacionaria se hace fluir a través de ésta para "lavar" (eluír) a las moléculas en la muestra. En la cromatografía de capa fina, la fase estacionaria es una delgada capa de un soporte sólido granulado, tal como gel de sílica, alumina, ácido silícico u otros, que se depositan sobre una placa de vidrio, aluminio u otro soporte inerte. La movilidad relativa o  $R_f$  es la relación entre la distancia recorrida por la mancha de un compuesto, dividida por la distancia recorrida por el frente de solvente al momento de sacar la placa del solvente (del Castillo Ochoa, 2004).

### **2.6.4. Resonancia magnética nuclear.**

La RMN se basa en irradiar mediante radiofrecuencias una muestra sometida a un campo magnético estático y registrar la respuesta de la muestra, la cual es sometida a transiciones inducidas por la radiación entre niveles energéticos que corresponden a distintas orientaciones de los momentos magnéticos de espín de los núcleos respecto del campo estático. (McMurry, 2012)

Los átomos más abundantes en los compuestos orgánicos, H y C, se pueden observar fácilmente con cantidades no muy grandes de muestra. Puesto que en cada caso se pueden

sacar conclusiones sobre el entorno próximo (e incluso lejano) a cada átomo, se puede llegar a deducir la estructura de dichos compuestos. Además de los átomos de H y C, se pueden observar otros átomos, siempre que haya una abundancia suficiente de un isótopo magnéticamente activo. En presencia de un campo magnético, los núcleos de los átomos que poseen momento magnético de spin, pueden tener dos (o más) orientaciones en dicho campo. En el caso de los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , con momento de spin  $\frac{1}{2}$ , pueden tener dos orientaciones, una a favor y otra en contra del campo externo. El cambio de energía se observa como un pico o líneas de resonancia en los experimentos (Medarme et al, 2010).

#### **2.6.5. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia masas (CG-EM).**

La CG es la principal técnica analítica para la separación de compuestos volátiles, por su rápido análisis, resolución, fácil operación y excelentes resultados cuantitativos. Los tiempos de retención son característicos de cada compuesto pero no son únicos. El espectro de masa es simplemente un plano de la abundancia de los iones en función de masa-carga ( $m/z$ ), bajo condiciones controladas, las razones de abundancia y específico que presentan las especies son únicos para cada compuesto. Estos pueden ser utilizados para determinar el peso molecular y la estructura química de cada compuesto. CG-EM combina las ventajas de ambas técnicas: el alto poder de resolución y la velocidad de análisis de CG, mientras la EM es una técnica capaz de proporcionar información acerca de: la composición elemental de las muestras; la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas y de las relaciones isotópicas de átomos en las muestras (López, 2008).

#### **2.7. Actividad antimicrobiana.**

La mayoría de las especies vegetales poseen propiedades bactericidas, insecticidas y fungicidas. Estas propiedades se explican por la presencia de sustancias activas capaces de combatir enfermedades que potencialmente ponen en riesgo a la salud de la sociedad actual. Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos cuya finalidad fue y ha sido controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y disminuir los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos de síntesis química. (Miranda et al, 2012)

Por medio de diversos estudios se conoce que la mayoría de las especies vegetales poseen propiedades bactericidas, antiinflamatorias, antivirales, antipiréticas, insecticidas y fungicidas. Es importante mencionar que no existe una reglamentación o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas in vivo sobre bacterias y hongos como se establece para los antibióticos. La mayoría de los métodos están basados en aquellos que son utilizados para evaluar la resistencia o susceptibilidad a antibióticos, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación (Delgado et al, 2013).

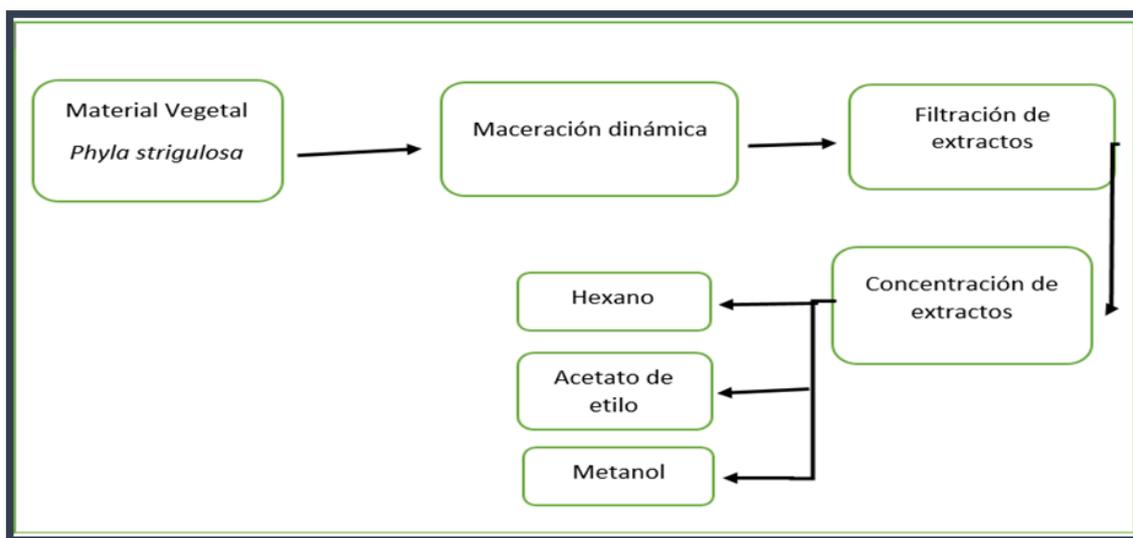
**CAPÍTULO III**  
**METODOLOGÍA**

### 3.1. Recolección del material vegetal.

La materia vegetal de *Phyla strigulosa* se recolectó en el sector Mejeche perteneciente al cantón Yantzaza, provincia de Zamora Chinchipe, durante 26/03/2013, a una altura de 881 m.s.n.m. con las siguientes coordenadas; 03.58.43,5S y 78.51.42,6W. Se preparó una muestra de herbario para su identificación cuyo voucher ECU 20327 se encuentra depositado en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja. La identificación de la especie fue realizada por los técnicos de INIAP.

### 3.2. Obtención de extractos.

En la Fig. 3. se presenta el esquema de la metodología utilizada en la obtención de extractos.



**Figura 3.** Esquema de la metodología de obtención de extractos

Fuente: Autor

El material vegetal recolectado fue secado a una temperatura de 37 °C durante 48 horas. A partir de 500 g de muestra seca se procedió a macerar con tres disolventes de polaridad ascendente: hexano, acetato de etilo y metanol respectivamente, en una relación 1:10 planta: solvente (p/v).

La maceración fue dinámica por 1 hora, seguidamente se filtró al vacío. Los procesos de maceración y filtrado al vacío se realizaron tres veces. Luego las muestras se concentraron al vacío hasta total eliminación del disolvente.

### **3.3. Actividad antimicrobiana.**

El ensayo se lo realizó en el Departamento de Química Aplicada, específicamente en el laboratorio de Bioensayos de la UTPL; ejecutado por el Bq. Luis Cartuche y Daniela Romero.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por el método de Microdilución en Caldo, que determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra las cepas de bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Para disolver los extractos, se diluyeron 10 mg de muestra en 500 uL de Dimetil-sulfoxido (DMSO). Se utilizó el ultrasonido para disolver completamente las muestras.

#### **3.3.1. Preparación del cultivo bacteriano (overnight).**

El cultivo overnight se preparó 24 horas antes de iniciar el análisis correspondiente, esto a partir de los microorganismos que se encontraban en reserva criogénica a -89 °C.

Del cultivo overnight se tomaron 150-300 uL en 7 mL de suero fisiológico, de esta suspensión se tomó 140 uL y se inoculó en 7 mL de caldo Muller-Hinton ajustado a una población bacteriana de  $2 \times 10^6$  UFC / mL. Se utilizó 100 uL de esta suspensión para completar a 200 uL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajustó la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC / mL.

#### **3.3.2. Ensayo.**

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución de doble seriada; así:

Se colocaron 180  $\mu$ L de caldo Muller Hinton al primer pocillo y 100  $\mu$ L a los pocillos restantes, luego se adiciono 20  $\mu$ L de extracto diluido en DMSO en los pocillos de la fila A, luego se realizó diluciones seriadas tomando 100  $\mu$ L del primer pocillo de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B y se continúa hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se siguió el mismo proceso para el control de esterilidad (180  $\mu$ L de caldo Muller Hinton + 10  $\mu$ L de extracto diluido), control negativo (DMSO), y para el control positivo (180  $\mu$ L de caldo de Muller Hinton + 20  $\mu$ L de Gentamicina <sup>®</sup> (1 mg / ml para Gram -)(4 mg / ml para Gram +)). Luego de preparada la placa se inocularon todos los pocillos con 100  $\mu$ L de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200  $\mu$ L en la placa de cultivo. Se sellaron las placas y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

### **3.4. Selección de extractos.**

La selección de los extractos se basó en la riqueza y separación de los componentes, los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico fueron analizados en cromatografía de capa fina, utilizando placas de fase directa (sílica) e inversa RP-18 al fin de determinar el extracto caracterizado por la mayor riqueza de metabolitos. De estos análisis se optó por el extracto hexánico.

### **3.5. Fraccionamientos en cromatografía de columna del extracto hexánico de la planta *Phyla strigulosa*.**

Las columnas cromatográficas (húmedas) se las realizó con sílica gel Merck 0.015-0040 nm de diámetro, en columnas de vidrio de 55 mm de diámetro por 60 cm de altura. Las columnas húmedas se montaron con sílica gel suspendida en disolvente, con compactación por presión. La muestra a sembrar fue mezclada con una mínima cantidad de sílica gel y disuelta con el disolvente hexano para formar una matriz homogénea.

Se sembró 6 g del extracto hexánico para su fraccionamiento en cromatografía de columna (CC) en una relación 1:70 (extracto: sílice). Se eluyó según un gradiente creciente de fuerza eluotrópica, aplicando mezclas de disolventes (Hex, AcOEt y MeOH), se eliminó el disolvente en las cabinas de extracción y se realizó placas de CCF para el control cromatográfico.

### **3.6. Cromatografía de capa fina (CCF).**

La fracción correspondiente al producto mayoritario fue analizada separadamente en TLC de fase inversa RP-18 (MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1), luego observada a la luz UV y revelada con el reactivo de ácido sulfúrico y vainillina 1%. Está, aparentemente constituida por un solo compuesto en fase directa, resultó en la realidad constituida por diferentes productos; por lo que se decidió de purificar el metabolito mayoritario por cromatografía preparativa en fase inversa.

### **3.7. Purificación de fracciones.**

#### **3.7.1. Purificación de la fracción 46-51 en CC RP-18.**

Se sembró la fracción seleccionada (46-51) para su fraccionamiento en cromatografía de columna en fase inversa RP-18, según una relación ponderal 1:70 (extracto: fase fija). Se eluyó según un gradiente creciente de fuerza eluotrópica (MeOH:H<sub>2</sub>O 3:1, MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1 y MeOH 100%), obteniendo 209 fracciones.

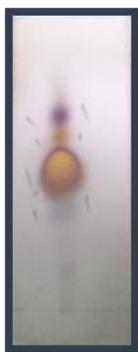
#### **3.7.2. Unión de las fracciones obtenidas de la columna RP-18.**

Las fracciones obtenidas fueron colocadas en la cabina de extracción por 4 días para la evaporación del solvente, a las fracciones se les realizó CCF y se reunieron las que presentaron similitud del compuesto mayoritario (14-22), estas fueron diluidas en un vaso con un volumen de agua (aproximadamente 10 ml) y extraídas repetidamente con hexano. Se observó la formación de una emulsión y la fase orgánica fue separada por adición de cloruro de sodio.

La fase hexánica fue secada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y el disolvente eliminado a presión reducida.

### 3.8. Resonancia magnética nuclear.

La fracción 14-22 se envió a RMN, por presentar en CCF la presencia del compuesto mayoritario.



**Figura 4.** CCF: MeOH:H<sub>2</sub>O 5:1 del compuesto mayoritario  
**Fuente:** Autor

Los espectros de RMN se registraron en el equipo Varian Unity con No. de serie 21953, que opera a 400 MHz para RMN <sup>1</sup>H y a 100 MHz para RMN <sup>13</sup>C, como también COSY y DEPT a una temperatura de 25°C. Los compuestos se disolvieron en cloroformo deuterado (CHCl<sub>3</sub>). Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz.

### 3.9. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Los espectros de masas se registraron en un aparato Aligent 6890N GC-MS, con una columna capilar de cuarzo (30 m x 250  $\mu$ m) modelo Agilent 122-5532. Las condiciones de operación fueron: Temperatura de horno, 60 °C (5 min) hasta 270 °C (25 min) a una velocidad promedio de 35 cm / seg; gas portador, helio; temperatura del detector 250 °C, energía de ionización 70 eV.

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En base a la metodología antes señalada, a continuación se presentan los resultados obtenidos durante todo el proceso.

#### 4.1. Rendimiento de extractos obtenidos.

Se obtuvieron los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol, los extractos presentan una consistencia semi-sólida, con un color café oscuro, los porcentajes de rendimiento oscilan entre 1,41% - 14,63%, siendo el extracto de metanol el que presenta mayor rendimiento. Estos valores fueron obtenidos en base al peso de la materia vegetal seca.

La tabla 1 muestra la cantidad y el rendimiento de los extractos obtenidos del proceso de maceración dinámica con diferentes disolventes de polaridad ascendente a partir del material vegetal.

**Tabla 1.** Rendimiento de los extractos

MUESTRA VEGETAL		EXTRACTO	PESO (g)	RENDIMIENTO (%)
PESO MUESTRA VEGETAL INICIAL (g)	500	HEXANO	7,07	1,41
		ACETATO DE ETILO	9,39	1,87
		METANOL	73,17	14,63

Fuente: Autor

#### 4.2. Actividad antimicrobiana.

Holetz et al, (2002) consideran que si un extracto o compuesto presenta una CMI <100 µg /mL la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a 500 µg / mL moderada, de 500 a 1000 µg / mL mala, y >1000 µg / mL nula. Del análisis realizado se puede determinar que los extractos Hex, AcOEt y MeOH, de la especie *Phyla strigulosa* no presentaron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram + y Gram - que fueron evaluadas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos frente a bacterias gram positivas y negativas

Extractos <i>Phyla strigulosa</i>			
Bacterias Gram -	Hex	AcOEt	MeOH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Proteus vulgaris</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
Bacterias Gram +			
<i>Enterococcus faecalis</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
Control de esterilidad	180 uL de caldo Muller Hinton + 10 uL de extracto diluido		
Control negativo	DMSO		
Control positivo	180 uL de caldo de Muller Hinton + 20 uL de Gentamicina ® (1mg/ml para Gram -)(4mg/ml para Gram +)		

**Fuente:** Autor

#### 4.3. Cromatografía en columna del extracto hexánico.

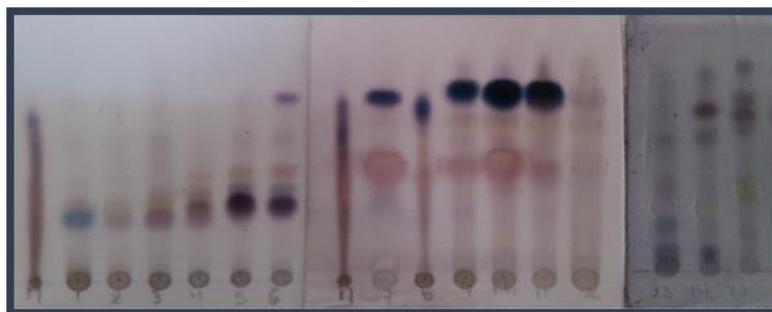
En el presente estudio se optó por trabajar con el extracto hexánico por presentar en CCF un compuesto mayoritario claramente visible al UV y luego revelada con el reactivo de ácido sulfúrico y vainillina 1%. Para la elución en columna cromatográfica se usó sistemas de disolventes de polaridad ascendente Hex (100%), Hex-AcOet (95:5) cambiando cada 5 de polaridad hasta llegar a AcOet (100%), AcOet-MeOH (95:5) cambiando cada 5 de polaridad hasta llegar a MeOH (100%), obteniéndose 256 muestras, basándose en las características similares que presentaban en las CCF se procedió a realizar la unión de fracciones, como se detalla en la Tabla 3. obteniendo 16 fracciones.

**Tabla 3.** Fraccionamiento cromatográfico del extracto de hexano de *Phyla strigulosa*.

Unión de fracciones del extracto hexánico		
Nº	FRACCION	ASPECTO
1	1-24	Transparente
2	20-24	Naranja Viscosa
3	25-28	Naranja Viscosa
4	29-35	Naranja Viscosa
5	36-39	Naranja Viscosa
6	40-45	Naranja Viscosa
7	46-51	Naranja Viscosa
8	52-53	Verde Petróleo Viscosa
9	54-57	Naranja Viscosa
10	58-68	Naranja Viscosa
11	69-82	Amarillo-Verdoso Viscoso
12	83-86	Amarillo-Verdoso Viscoso
13	87-100	Amarillo-Verdoso Viscoso
14	108-114	Amarillo-Verdoso Viscoso
15	115-121	Amarillo-Verdoso Viscoso
16	122-256	Transparente

**Fuente:** Autor

En la Fig. 5 se presentan las CCF comparativas, de las fracciones unidas.



**Figura 5.** CCF RP-18 de las fracciones unidas (MeOH:H<sub>2</sub>O 5:1)

Fuente: Autor

De la figura anterior se puede resaltar que en la unión de las fracciones 46-51 (Nº 7), se identifica un compuesto mayoritario (Figura 6) y el cual fue seleccionado para un aislamiento posterior como se indica en el siguiente apartado.



**Figura 6.** CCF: MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1 de las Fracciones 46-51

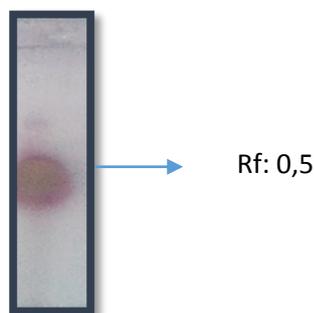
Fuente: Autor

#### 4.4. Aislamiento en columna RP-18 del compuesto (6S, 1'S)-(+)-hernandulcina.

Se realizó la elución en cromatografía de columna fase inversa RP-18 de las fracciones 46-51, con sistema de disolventes de polaridad ascendente (MeOH:H<sub>2</sub>O 3:1, MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1 y MeOH 100%). Se obtuvieron 209 muestras, las cuales fueron evaluadas mediante CCF comparativas para su posterior unión.

#### 4.4.1. Unión de las fracciones obtenidas de la columna RP-18.

De las fracciones 14-22 eluidas en MeOH-H<sub>2</sub>O (3:1), se procedió a extraer la fase orgánica con hexano y así purificar la muestra, al momento de eliminar tanto el MeOH y H<sub>2</sub>O, se obtuvo 330,4 mg de un compuesto de aspecto aceitoso, y de color naranja (Hernandulcina). Como se observa en la Fig. 7. el compuesto mayoritario.



**Figura 7.** CCF: MeOH:H<sub>2</sub>O 5:1 del compuesto aislado hernandulcina  
**Fuente:** Autor

A partir de los 6 gramos sembrados del extracto hexánico, el porcentaje de rendimiento de hernandulcina es del 5,50 %, que es un porcentaje bajo.

#### 4.5. Identificación del sesquiterpeno hernandulcina.

El compuesto hernandulcina fue obtenida utilizando una mezcla de solventes MeOH-H<sub>2</sub>O (3:1). La estructura fue asignada en base a su análisis por métodos espectroscopicos y espectrometricos y por los datos obtenidos en bibliografía. La (6S, 1'S)-(+)-hernandulcina es reconocida como el principio dulce de la planta *Phyla dulcis*, antes conocida como *Lippia dulcis*. El compuesto, es un sesquiterpeno tipo bisabolano aislado por primera vez de las hojas y flores de la planta *P. dulcis* en México. Fue catalogada como 1000 veces más dulce que la sacarosa bajo una base molar, en ensayos de expertos. (Compadre et al. 1988).

La forma racémica del compuesto ha sido sintetizada por condensación aldólica partiendo de dos cetonas comercialmente disponibles, la 6-metil-5-hepten-2-ona y la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona, que son también sus productos de degradación térmica. La molécula hernandulcina debe su poder edulcorante al grupo carbonílico en C1, el hidroxilo en C1' y la

olefina en C4', funciones esenciales para la mediación de su sabor (Zheng & Kakisawa, 1989).

En plantas colectadas de *Lippia dulcis* en Puerto Rico se determinó altas proporciones de sesquiterpenoides (79%). Entre los principales compuestos se encontraron: el sesquiterpenoide intensamente dulce (+)-hernandulcina (36%) y (-)-epi-hernandulcina (22%). Alcanfor no fue determinado (<0.01%). En un trabajo previo en México, *L. dulcis*, presentó solamente cantidades traza de hernandulcina (40 ppm peso/peso, peso seco), mientras que el aceite esencial extraído por destilación por arrastre con vapor, presentó principalmente monoterpenoides (86%), alcanfor (53%) (Jayes et al. 2006).

Compadre et al (1985) evaluó el potencial mutagénico de la hernandulcina en un ensayo de mutación utilizando la cepa de *Salmonella typhimurium* TM677, no se observó actividad mutagénica significativa cuando hernandulcina fue ensayada en la presencia o ausencia de un sistema de activación metabólica derivada de los hígados de ratas tratadas con Aroclor 1254.

El compuesto se encuentra en forma semi-líquida y tiene un color naranja, posee la fórmula molecular  $C_{15}H_{24}O_2$ . Se presentan el espectro de masas de hernandulcina obtenido del análisis por CG-EM de la fracción de *P. strigulosa* de Ecuador (Anexo 1).

Mediante CG-MS se identificó sus productos de degradación 6-metil-5-hepten-2-ona (Anexo 2) y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (Anexo 3). Estos resultados están acorde a los obtenidos por Compadre et al, 1987 y Celis et al, 2007 en *Phyla dulcis*.

Mediante el análisis de RMN  $^{13}C$  (Anexo 4). Los datos espectrales se muestran a continuación:

**$^{13}C$ - NMR:** (100 MHz, cloroformo- $d_6$ ):  $\delta$  ppm 204,0 (C-1); 163,7 (C-3); 131,2 (C-5'); 127,4 (C-2); 124,6 (C-4'); 73,8 (C-1'); 52,1 (C-6); 40,1 (C-2'); 31,2 (C-4); 25,7 (C-6'); 25,0 (C-5); 24,1 (C-7); 23,6 (C-8'); 21,5 (C-3'); 17,6 (C-7').

En comparación con los datos espectrales de publicaciones anteriores (Compadre et al, 1987, 1985) y la muestra analizada en el presente estudio (Tabla 4.), el producto final se identificó como (+)-hernandulcina (Figura 8).

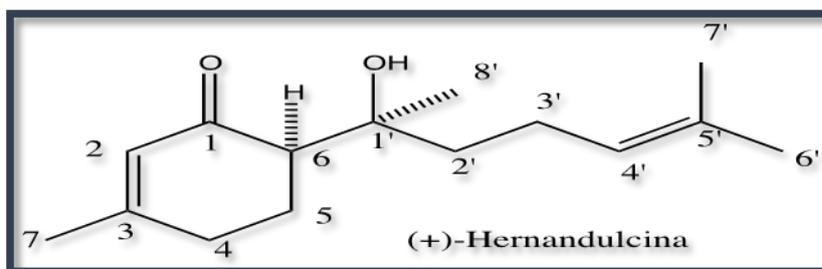
**Tabla 4.** Comparación de los datos obtenidos de  $^{13}\text{C}$  RMN de hernandulcina

Carbón	Hernandulcina <i>Phyla strigulosa</i>	Hernandulcina Compadre et al, (1988).
C-1	204,0 s	204,0 s
C-2	127,4 d	127,4 d
C-3	163,7 s	163,6 s
C-4	31,2 t	31,2 t
C-5	25,0 t	25,0 t
C-6	52,1 d	52,0 d
C-7	24,1 q	24,1 q
C-1'	73,8 s	73,9 s
C-2'	40,1 t	40,1 t
C-3'	21,5 t	21,5 t
C-4'	124,6 d	124,4 d
C-5'	131,2 s	131,4 s
C-6'	25,7 q	25,7 q
C-7'	17,6 q	17,6 q
C-8'	23,6 q	23,6 q

s=singlete; d=doblete; t=triplete; q=cuartete.

Espectro obtenido a 100 MHz

Fuente: Autor



**Figura 8.** Estructura química de la Hernandulcina

Fuente: Autor

## CONCLUSIONES

- Los extractos de Hex, AcOEt y MeOH, no presentan actividad antibacteriana frente a gram negativas y gram positivas.
- Las técnicas cromatográficas y espectroscópicas permitieron la separación e identificación del compuesto hernandulcina a partir del extracto de hexano, además se identificó sus productos de degradación 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2ciclohexen-1-ona.
- La presencia de la hernandulcina al ser un edulcorante resalta la importancia de la planta en el Ecuador, para poder darle un mejor uso industrial.

## RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio fitoquímico de la especie *Phyla strigulosa*, con la finalidad de obtener una validación química completa de la especie.
- Realizar trabajos similares con diferentes especies para obtener un registro de metabolitos secundarios de la familia Verbenaceae en el Ecuador.
- Determinar actividad toxicológica de la hernandulcina, para evaluar su uso industrial como endulzante natural.

## BIBLIOGRAFÍA

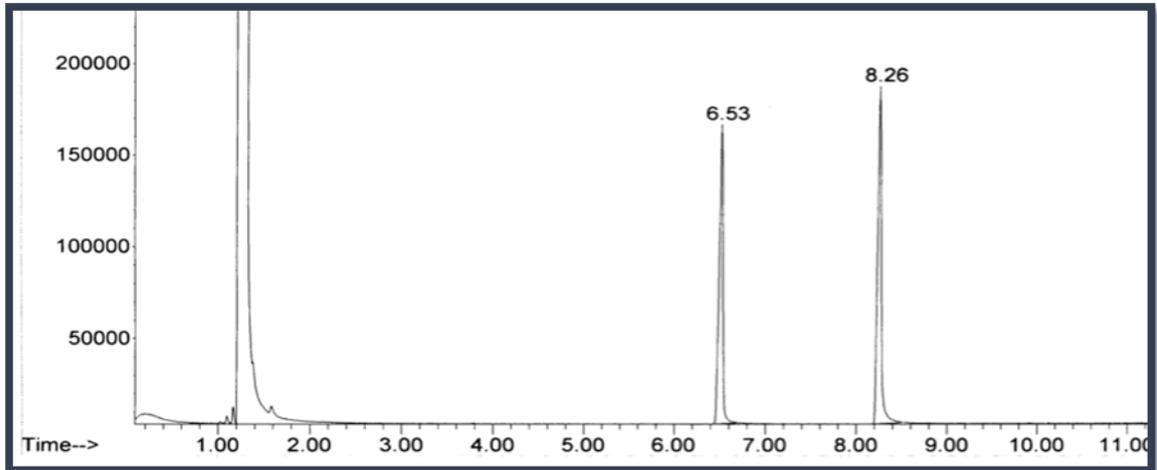
- Alea Pino, J. A., (2011). *Contribución al estudio de la composición volátil de la flora cubana*: Editorial Universitaria.
- Amsler, C. D., McClintock, J. B., & Baker, B. J. (2001). Secondary metabolites as mediators of trophic interactions among Antarctic marine organisms. *American Zoologist*, 41(1), 17-26.
- Andrada, A., Pastoriza, A., & Martínez, V. (1998). Citogenética en tres especies de Verbenaceas. *Rev. Fac. Agron*, 15, 312-318.
- Araujo Murakami, A. & Zenteno, F. (2006). Bosques de los Andes orientales de Bolivia y sus especies útiles. *Moraes R., B. Ollgaard, LP Kvist, F. Y H. Blslev. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz*, 146-161.
- Avalos García, A. & Pérez Urria, E. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3).
- Bennett, R. & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127(4), 617-633.
- Castañeda, M., Muñoz, A., Martínez, J., Stanshenko, E. (2007). Estudio de la Composición Química y la Actividad Biológica de los Aceites Esenciales de Diez Plantas Aromáticas Colombianas. Scientia et Technica.
- Celis, C. N. (2007). "Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae." Scientia et Technica 1(33).
- Compadre, C., Pezzuto, J., Kinghorn, A., Kamath S. (1895). Hernandulcin: An Intensely Sweet Compound Discovered by Review of Ancient Literature. *Science*. Vol. 227.
- Compadre, C., Hussain, R., Lopez de Compadre, L., Pezzuto, J. & Kinghorn, A. (1987). "The Intensely Sweet Sesquiterpene Hernandulcin: Isolation, Synthesis, Characterization, and Preliminary Safety Evaluation." *J. Agric. Food Chem*. Vol. 35.
- Croteau, R., Kutchan, T. & Lewis, N. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Cruz, J. (2007). Más de de 100 Plantas Medicinales Medicina popular Canaria. La Obra Social de la Caja de Canarias.

- de la Riva, P. & Moraes, M. (2006). Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 268-284.
- del Castillo Ochoa, S., González Lavaut, J., González Guevara, J., Prieto González, S., & Urquiola-Cruz, A. (2004). Identificación fitoquímica de las hojas y ramas de la *Helietta cubensis* Monach-Moldenke, especie endémica de Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*, 38(1), 0-0.
- Delgado Vargas, F., Pío León, J., Díaz, Silvia, L., Uribe, M., Willms, K. & Montes, Julio. (2013). Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(4).
- Esquinca González, A. & Moreno, M. C. (2008). Papel ecológico de los metabolitos secundarios. *Lacandonia*, 123.
- García Mateos, R. & Pérez Leal, R. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 9(1), 5-10.
- Hernández, Alonso Quesada. (2008). Las plantas medicinales. *Revista Biocenosis/Vol*, 21(1-2), 1-2.
- Holetz, F., Nakamura, T., Dias Filho, B., Cortez, D., Mello, J., & Nakamura, C. (2002). Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined medium. *Acta sci*, 24(3), 657-662.
- Jayes Reyes, P., León Arana L., Navas R., Pérez Sabino, J. (2006). Aceites Esenciales De Nueve Plantas Nativas de Guatemala, Familias Verbenaceae y Lauraceae. (Tesis Doctoral). "UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN INDUSTRIAL FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA."
- Jorgensen, P. (1999). Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador, Peter Moller Jorgensen, Susana León-Yáñez. *Monographs in systematic botany*. 75.
- Leyva, E., Navarro Tovar, G., Loredó Carrillo, S. & Díaz, M. (2011). Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides.

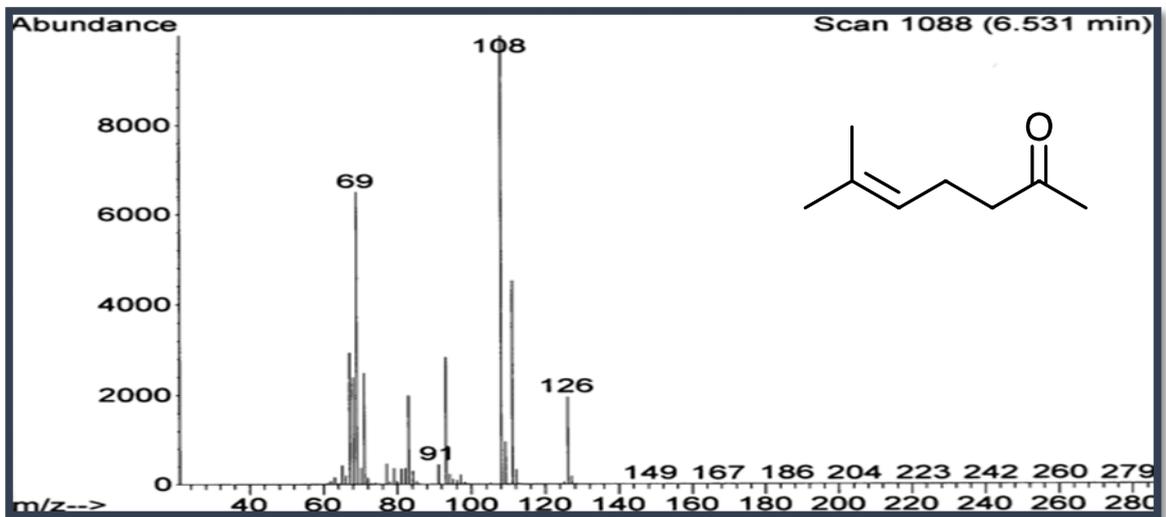
- López Valencia, J. (2008). Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos.
- McMurry, J. (2012). *Química orgánica*: Cengage Learning Editores.
- Ortiz, B, & Suárez, L. (1999). Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales. Situación actual y aspectos importantes para su conservación.
- Rocha, L. (2000). Control de calidad de productos fitoterapéuticos. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*, 78, 157.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2004). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev Mex Fitopatol*, 21, 355-363.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Vol. 78): Convenio Andrés Bello.
- Stashenko, E., Jaramillo, B. & Martínez, J. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 27(105), 579-597.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 09 Sep 2014  
<<http://www.tropicos.org/Name/33701260>>
- Vidaurre, P., Paniagua, N. & Moraes, M. (2006). Etnobotánica en los Andes de Bolivia. *Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia*, 224-238.

## ANEXOS

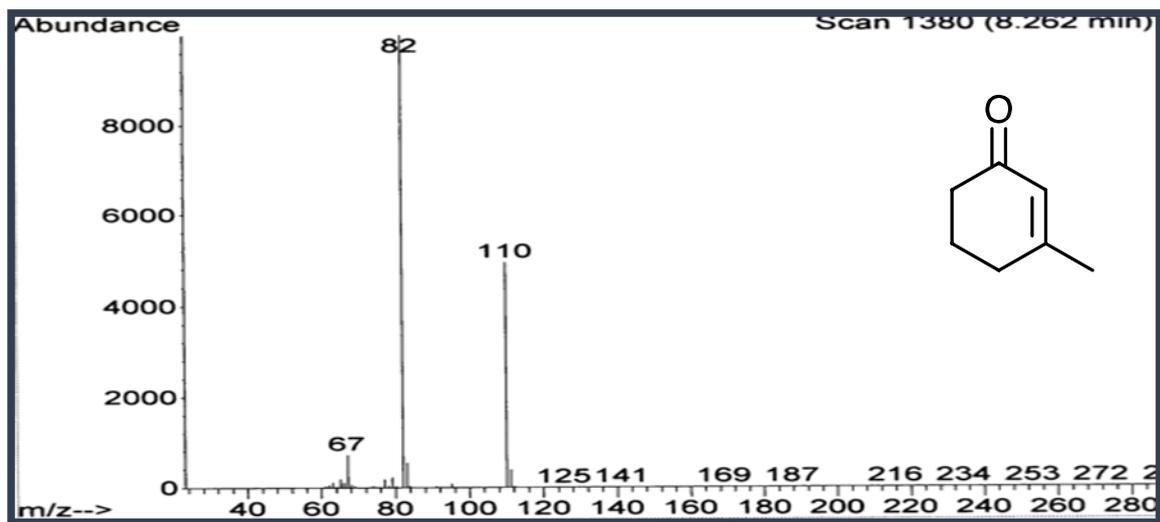
**Anexo 1.** Cromatograma CG-EM del compuesto hernandulcina



**Anexo 2.** Espectro EI-MS de 6-metil-5-hepten-2-ona producto degradación de hernandulcina.



**Anexo 3.** Espectro EI-MS de 3-metil-2-ciclohexen-1-ona producto de degradación de hernandulcina.



**Anexo 4.** Espectro  $^{13}\text{C}$ -NMR del compuesto aislado Hernandulcina.

