



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

“Estudio de los Recursos Fitoterapéuticos Ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Iresine herbstii* Hook.”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTORA:

Mendoza Abarca Andrea Viviana

DIRECTOR:

Malagón Avilés Omar Germán, PhD.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

PhD. Omar Germán Malagón Avilés

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 de la especie vegetal *Iresine herbstii* Hook.” realizado por: Mendoza Abarca Andrea Viviana, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Marzo del 2015

f).....

PhD. Omar Germán Malagón Avilés

DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

La presente investigación forma parte de los resultados del proyecto SENESCYT PIC-12- INIAP-002, Convenio 20120315 “Estudio de los Recursos Fitoterapéuticos Ancestrales para su Conservación y Aprovechamiento Sostenible”. Siendo la directora del proyecto la Ing. Beatriz Brito del Departamento de Nutrición y Calidad. La tesis estuvo a cargo del PhD. Omar Germán Malagón Avilés del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Andrea Viviana Mendoza Abarca declaro ser autora 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 de la especie vegetal *Iresine herbstii* Hook., de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo PhD. Omar Germán Malagón Avilés director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f).....

Andrea Viviana Mendoza Abarca

CI: 1104224025

DEDICATORIA

A Dios por ser la fuerza que me inspira a ser mejor

A mi madre Florcita por su apoyo, sacrificio y amor incondicional

A mi padre Alberto por su amor, consejos y aliento

A mis hermanos Johanna y Boris, verdaderos amigos que están siempre presente con su comprensión y cariño.

A mi sobrinita Antonella la nueva alegría y bendición del hogar.

Andrea

AGRADECIMIENTO

A Dios fuente de inspiración, que con su bendición ha permitido la culminación del presente trabajo. A mis padres y hermanos que con amor, sabiduría y comprensión me han alentado siempre en mis metas.

Al PhD. Omar Germán Malagón Avilés, director de tesis, por desempeñar un papel importante en el presente trabajo ya que con paciencia, sabiduría, profesionalismo y apoyo constante, lo supo guiar de la manera más acertada.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca; y a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia y Tecnología, importantes instituciones que permitieron la realización de la presente investigación.

Al Coordinador de la Titulación MSc. Luis Emilio Cartuche por el apoyo y la aprobación para la ejecución de ésta investigación como trabajo de fin de carrera.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, y a todo el equipo de docentes, becarios y tesisistas del Departamento de Química, por transmitir sus amplios conocimientos y brindar su apoyo necesario en cada una de las etapas difíciles de éste proyecto, en especial al BF Lenin Chuquimarca, técnico responsable del proyecto INIAP-UTPL.

A mis abuelitos, familiares, amigos que con su estima estuvieron siempre presentes y me alentaron a culminar mi carrera a pesar de los obstáculos y a todas las personas que de una u otra forma hicieron posible la culminación del presente proyecto.

INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	ii
DIVULGACIÓN DE RESULTADOS.....	iii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
INDICE DE CONTENIDOS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I.....	5
MARCO TEORICO.....	5
1.1. Antecedentes.....	6
1.2. Biodiversidad del Ecuador y Región Sur.....	7
1.3. Medicina Tradicional Ancestral.....	8
1.4. Familia Amaranthaceae y Género Iresine.....	9
1.5. Escancel (<i>Iresine herbstii</i> Hook).....	10
1.5.1. Origen y Distribución.....	11
1.5.2. Partes utilizadas de la planta.....	11
1.5.2. Usos y Propiedades.....	11
1.6. Metabolitos Secundarios y Flavonoides.....	12
1.7. Métodos de Aislamiento e Identificación de Metabolitos Secundarios.....	12
1.7.1. Marchas Fitoquímicas Preliminares.....	12
1.7.2. Extracción.....	13
1.7.3. Cromatografía en Columna.....	14
1.7.4. Cromatografía en capa fina (CCF).....	14
1.7.5. Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM).....	15
1.7.6. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	16
CAPÍTULO II.....	17

MATERIALES Y METODOS	17
2.1. Estudio preliminar de <i>Iresine herbtii</i>	18
2.1.1. Recolección de materia vegetal.....	18
2.1.2. Obtención de extractos.....	19
2.1.3. Marchas fitoquímicas para el extracto etéreo.....	19
2.1.4. Marchas fitoquímicas para el extracto etanólico.....	20
2.1.5. Marchas fitoquímicas para el extracto acuoso.....	21
2.1.6. Cromatografía de capa fina y Rf.....	24
2.1.7. Bioactividad de Extractos.....	24
2.1.8. Actividad antioxidante.....	24
2.2. Fraccionamiento del Extracto bioactivo y aislamiento de los principios activos de <i>Iresine herbtii</i>	25
2.2.1. Recolección de materia vegetal.....	26
2.2.2. Obtención de extractos.....	26
2.2.3. Desclorofilación preliminar.....	26
2.2.4. Cromatografía de capa fina y Rf.....	27
2.2.5. Bioactividad de Extractos.....	27
2.2.6. Actividad antioxidante.....	27
2.3. Desclorofilación del Extracto de Acetato de Etilo.....	28
2.4. Cromatografía en Columna.....	28
2.5. Unión y Purificación de fracciones.....	29
2.6. Cristalización.....	29
2.7. Características químicas del compuesto.....	29
2.7.1. Punto de fusión.....	29
2.7.2. Factor de Retención.....	29
2.7.3. Solubilidad.....	30
2.8. Caracterización Estructural de las Moléculas aisladas.....	30
2.8.1. Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de masas (CG- EM).....	30
2.8.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	30
CAPITULO III	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
3.1. Estudios preliminares de <i>Iresine herbtii</i> Hook.....	32
3.1.1. Marchas Fitoquímicas.....	32
3.1.2. Actividad Antibacteriana preliminar.....	32
3.1.3. Actividad antioxidante.....	33

3.2. Aislamiento de Metabolitos secundarios de <i>Iresine herbstii</i>	34
3.2.1. Obtención de Extractos.....	34
3.2.2. Desclorofilación inicial: cromatografía líquido –líquido.....	35
3.2.3. Actividad antibacteriana de extractos desclorofilados.....	38
3.2.4. Desclorofilación del Extracto de Acetato de Etilo.....	39
3.2.5. Cromatografía en Columna de la fracción A	40
3.2.6. Unión y Purificación de fracciones.....	42
3.2.7. Cristalización.....	43
3.2.8. Características físicas y químicas del compuesto aislado.....	43
3.2.9. Resultados de CG- EM y RMN de la fracción 30-35.....	43
CONCLUSIONES:	49
RECOMENDACIONES:	50
BIBLIOGRAFÍA	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Marchas fitoquímicas	13
Tabla 2. Interpretación de Marchas fitoquímicas	23
Tabla 3. Fraccionamiento preliminar	28
Tabla 4. Características de la columna capilar utilizada.....	30
Tabla 5. Metabolitos secundarios encontrados en <i>Iresine herbstii</i> (Escancel).....	32
Tabla 6. Actividad Antibacteriana.....	33
Tabla 7. Actividad Antioxidante de <i>Iresine herbstii</i>	34
Tabla 9. Peso total de los extractos desclorofilados.	38
Tabla 10. Actividad Antibacteriana de Extracto desclorofilado.	38
Tabla 11. Peso de las fracciones obtenidas en la desclorofilación preliminar.....	39
Tabla 13. Características físicas y químicas del Compuesto aislado.	43
Tabla 14. Asignación espectral de tlatlanuayina aislada de <i>Iresine herbstii</i> (^1H y ^{13}C).....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Iresine herbstii</i> Hook	10
Figura 2. Procedimiento del estudio preliminar de <i>Iresine herbstii</i>	18
Figura 3. Pasos para Fraccionamiento y aislamiento de los principios activos de <i>Iresine herbstii</i> ...	25
Figura 4. Placas de CCF fase directa de los extractos de Hexano de <i>Iresine herbstii</i>	36
Figura 5. Placas de CCF fase inversa de los extractos de Hexano de <i>Iresine herbstii</i>	36
Figura 6. Placas de CCF fase directa de los extractos de Acetato de <i>Iresine herbstii</i>	36
Figura 7. Placas de CCF fase inversa de los extractos de Acetato de etilo de <i>Iresine herbstii</i>	37
Figura 8. Placas de CCF fase directa de los extractos de Metanol de <i>Iresine herbstii</i>	37
Figura 9. Placas de CCF fase inversa de los extractos de Metanol de <i>Iresine herbstii</i>	37
Figura 10. Placa CCF con luz UV 254	39
Figura 11. Placa CCF con la luz UV 365nm	40
Figura 12. CCF en fase inversa RP18(MeOH/H ₂ O 7:3). De der. a izq. las fracciones sembradas de la 30 a la 35.a luz UV 365 nm	41
Figura 13. CCF en fase inversa RP18(MeOH/H ₂ O 7:3). De der. a izq. las fracciones sembradas de la 30 a la 35.a luz UV 254 nm	42
Figura 14. Precipitado purificado fracciones 30-35.....	42
Figura 15. Placas de CCF en fase inversa y directa del compuesto purificado.	43
Figura 16. Espectro CG-EM.....	44
Figura 17. Espectro EI-MS y ESI-MS/MS	44
Figura 18. Espectro ¹ H-400MHz obtenido en DMSO-d ₆	45
Figura 19. Espectro ¹ H-400MHz obtenido en DMSO-d ₆	46
Figura 20. Espectro ¹³ C-100MHz obtenido en DMSO-d ₆ Espectro.....	47
Figura 21. Asignación espectral (¹ H, ¹³ C) y estructura de tlatlancuayina aislada de <i>Iresine herbstii</i> ...	47

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
CC	Cromatografía en Columna
DCM	Diclorometano
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CCF	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta
Pf	Punto de fusión
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas

RESUMEN

Mediante un tamizaje fitoquímico de la especie *Iresine herbstii* se identificaron cualitativamente la presencia de grasas, alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, fenoles totales y flavonoides. De las partes aéreas de la planta se obtuvieron los extractos totales: hexánico, de acetato de etilo y metanólico, los cuales fueron fraccionados mediante técnicas cromatográficas con el fin de aislar y purificar sus principios activos. El procedimiento fue biodirigido con ensayos de Microdilución en caldo, usando diferentes cepas bacterianas. El extracto desclorofilado de acetato de etilo presentó una buena actividad antibacteriana de 62,5 µg/ml contra *S.aureus*. Se evaluó el contenido de fenoles totales con el método de Folin-Cicolteau, y la actividad antioxidante de los extractos etéreo, etanólico y acuoso, con los métodos de DPPH y ABTS. Los extractos acuosos y etanólico tuvieron una mejor respuesta antioxidante tanto para DPPH, ABTS y compuesto fenólicos. Mediante RMN y CG-EM, se elucidó el principio activo, el isoflavonoide tlatlancuayina (C₁₈H₁₂O₆), aislado a partir del extracto de acetato de etilo.

PALABRAS CLAVES:

Iresine herbstii Hook, Tlatlancuayina, Tamizaje fitoquímico, CMI, DPPH, ABTS, Fenoles totales.

ABSTRACT

A phytochemical screening of the species *Iresine herbstii* was performed and determined qualitatively the presence of fats, alkaloids, triterpenes, steroids, saponins, phenols and flavonoids. Of the aerial parts of the plant extracts total were obtained : hexane, ethyl acetate and metanol, which were fractionated by chromatographic techniques, to isolate and purify the active substance. The procedure was bioassay-guided with broth microdilution tests, using different bacterial strains. The ethyl acetate extract showed good antibacterial activity of 62.5 µg / ml against *S.aureus*. The total phenolic content was evaluated with the Folin-Cicolteau, and the antioxidant activity of the ethereal and aqueous ethanolic extracts, to methods of DPPH and ABTS. Aqueous and ethanolic extracts showed better antioxidant response both DPPH, ABTS and phenolic compound. The active substance was elucidated by NMR and GC-MS, the tlatlancuayine isoflavonoid (C₁₈H₁₂O₆) isolated from the ethyl acetate extract..

KEYWORDS: *Iresine herbstii* Hook, Tlatlancuayine, phytochemical screening, CMI, DPPH, ABTS, total phenols

INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas se conoce la necesidad de estudiar mejor la biodiversidad de la flora ecuatoriana para aprovecharla en beneficio del mejoramiento de la calidad de vida del hombre y en especial de su salud.

El Ecuador es considerado como un país que cuenta con el mayor número de especies por superficie de área, pues ocupando sólo un 0,2% , posee el 10% de especies de plantas que existen en el planeta (CAAM, 1995) (Mittermeier, 1988) (Rios, Koziol, Borgtoft Pedersen, & Granda , 2007). De las 5172 especies útiles, el 60% son medicinales (De la Torre, Naverrete, Muriel M, Macía, & Balslev, 2008).

El interés por las plantas medicinales utilizadas por los pueblos aborígenes del sur del Ecuador es cada día mayor, y son numerosas las investigaciones que se realizan con la finalidad de descubrir y aislar nuevas sustancias para muchísimas enfermedades que afectan a la humanidad (Espinoza, 1997) (Peguero, 1998) (Andrade M., Armijos R., Malagón A., & Lucero M., 2009).

La Universidad Técnica Particular de Loja, llevó a cabo un estudio sobre las plantas medicinales y las fuentes etnobotánicas en las provincias de Loja y Zamora-Chinchipec. Los investigadores señalaron que el uso de tratamientos con plantas medicinales para curar las enfermedades es necesario para estas poblaciones, debido principalmente al alto costo de la medicina moderna, razón por la que acuden al uso de sus remedios tradicionales. Estas dos provincias tienen una gran biodiversidad y son ricas en conocimientos etnobotánicos, donde la conservación del saber ancestral es grandiosa, por lo que es urgente salvar su herencia cultural. Se confirman los usos terapéuticos de las plantas con criterios científicos y señalan que se debe fomentar las investigaciones fitoquímicas en especies que contienen principios activos con mucho potencial (Tene *et al.*, 2007).

Con el fin de contribuir a mejorar la calidad de vida de las poblaciones rurales más vulnerables del Ecuador, mediante la conservación y revalorización de las plantas medicinales, además de la sustentación científica de las propiedades atribuidas a su uso, los laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP y el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, han considerado llevar a cabo una investigación

fitoquímica de las plantas más utilizadas y promisorias de ésta región. Una de las plantas seleccionadas gracias a un análisis fitoquímico preliminar es *Iresine herbstii* Hook., comúnmente conocida como escancel.

Las hojas y flores de *I. herbstii* son utilizadas en decocción para la fiebre, como refrescante y para problemas renales (Tene *et al.*, 2007). Estudios preliminares han podido determinar la presencia de: 21,5-Dimethoxy-6,7-(methylenedioxy)-isoflavona; betacianinas aciladas (Vasinova, Marek, Vanco, & Suchy, 2004) (Cai Y. S., 2005), Iresinina I (amarantin acilada) y su C15 –isómero Iresinin II (Cai, Sun, & and Corke, 2001). Se ha establecido su uso como un buen agente antimicrobiano (Khare, 2007). Además el extracto etanólico posee una importante actividad anti cancerígena (Dipankar & Murugan, 2012)

En el presente trabajo investigativo, se aisló, purificó e identificó los principios activos de *Iresine herbstii* Hook. Se identificaron cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en dicha especie mediante marchas fitoquímicas preliminares. Se obtuvo extractos totales mediante el uso de diferentes solventes y los mismos fueron fraccionados mediante técnicas cromatográficas. El procedimiento fue biodirigido, por lo que se determinó su actividad antibacteriana y su actividad antioxidante. Se determinaron la estructura química de un compuesto mediante técnicas espectrométricas como CG-EM y RMN.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes.

Iresine es un género de la familia de las Amaranthaceae la cual está constituida por aproximadamente 65 géneros y 900 especies con una distribución casi cosmopolita, siendo evidentemente ausente en los hábitats árticos y alpinos, abundante en los trópicos y subtropicos del mundo (Alvarado Vásquez , Salcedo Martínez, & Vargas, 2011).

Diferentes especies del género *Iresine* son usadas en la medicina tradicional. Estas contienen muchas sustancias bioactivas y son usadas para tratar diferentes enfermedades. Por ejemplo, las hojas de *I. diffusa* son usadas para tratar la malaria (Céline V, 2009).

Los constituyentes del aceite de *I. celosía* son: lactonas sesquiterpénicas , tlatlancuayin, isoflavonas, carbohidratos y ácidos esteroideos glutapéptidos en su estado natural. Algunas sustancias se usan tradicionalmente como citostáticas (bloquean la división celular y la fuerzan a morir). La lactona sesquiterpénica de *Iresine* se encuentra en alta concentración en la "hierba de los mayas" y sus propiedades son anticancerígenas, antiinflamatorias, antialérgicas y antisépticas. La isoflavona tlatlancuayin tiene actividad antioxidante la cual captura radicales libres de oxígeno y contribuye a las células renales, y también es un poderoso agente antimicrobiano (Dipankar, Murugan, & Uma, 2011).

A *Iresine herbstii* se le conoce comúnmente como escancel u hojas de sangre. Es una planta nativa de los bosques tropicales de Sur América y fue probablemente recolectada por primera vez en Brasil. Pero también se encuentra disponible en los bosques tropicales de la India y Asia. En el norte de los andes de Perú es usada por la magia negra con el ritual principal de expulsar los malos espíritus del cuerpo (De Feo, 2003) y en asociación con la planta San Pedro para rituales mágicos (Dobkin De Rios, 1977) (De Feo, 2003) (Dipankar, Murugan, & Uma, 2011).

Nencini 2006, evaluó los efectos principales de como *I. herbstii* interactúa en el sistema nervioso central confirmando así su uso en los rituales. El extracto metanólico de *Iresine herbstii* es capaz de interactuar con los receptores 5-HT (2C) y D1., el extracto acuoso muestra afinidad por los receptores D2.

I. herbstii fue reportada como un ingrediente de la bebida ayahuasca (Bianchi, 1993), como un ingrediente en la decocción de San Pedro, con posibles propiedades alucinógenas (Schultes, 1973). Las hojas de *I. herbstii* son usadas para la cicatrización de heridas, y como agente anticancerígeno (Sebold, 2003), tónico post parto (Srithi, Henrik, Prasit, Prachaya, & Chusie, 2009), y externamente para depurar la piel de eczemas, llagas y espinillas (De Feo, 2003) y como un buen agente antimicrobiano (Khare, 2007). Las hojas y las flores sometidas a decocción son usadas para bajar la fiebre, refrescar y para problemas renales (Tene, *et al*; 2007). Sirve como espasmolítico, para aliviar cuadros de tosferina, para las migrañas y como antioxidante (De Feo, 2003) (Schmidt, y otros, 2009) (Dipankar, Murugan, & Uma, 2011).

Cai, Sun & Corke 2003, reportan también que ésta planta posee actividad antiinflamatoria, actividad citotóxica y apoptósica.

1.2. Biodiversidad del Ecuador y Región Sur.

Jorgensen & León-Yáñez 1999, en su “Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador” registran 16 087 especies en 273 familias, número que incluye 595 especies introducidas y 186 con distribución global, 15 306 especies son nativas de las cuales 4 173 son endémicas, es decir, el 27,3%; colocando a Ecuador en el séptimo lugar en diversidad de plantas vasculares a nivel mundial (Ministerio del Ambiente, 2001). De las 5 172 especies útiles en el Ecuador, el 60% son medicinales (De la Torre, *et al*; 2008).

La región sur del Ecuador ubicada en los Andes, Amazonía y bosque seco contiene una de las floras más ricas y diversas del país, gracias a factores ambientales, geológicos y climáticos. La cascarilla, el romerillo, chirimoya son especies que han dado renombre en ésta región (Lozano, Bussmann, & Navarrete, 2005). En el caso de la quina o cascarilla, su introducción desde Loja, a Europa en las primeras décadas del siglo XVII produjo una auténtica revolución de la medicina, ya que por primera vez una droga en el sentido fármaco terapéutico era capaz de curar la malaria y el paludismo, posteriormente investigadores aislaron los principios activos de la quina denominados quinina y cinconina (Alonso, 2004).

Si Ecuador pertenece al grupo de países megadiversos al poseer el 10% de las especies en el mundo de las plantas se puede concluir que el país debe promover la obtención de

productos naturales, además es de vital importancia identificar las especies promisorias, y mediante intensas investigaciones obtener la mayor información posible (Mahabir, 2006).

1.3. Medicina Tradicional Ancestral.

El Ecuador aparte de que es un país megadiverso, posee una inmensa riqueza cultural debido a la presencia de diferentes grupos étnicos, se estima que en el Ecuador un 30 % de la población es indígena, con una tradición etnobotánica muy rica, transmitida oralmente de una generación a otra (Benítez & Garcés, 1993 citado por Armijos, *et al*; 2012).

Los pueblos indígenas y tradicionales mantienen un antiguo vínculo con la naturaleza y tienen una comprensión profunda de ella (Beltrán, 2001). En los países en desarrollo el uso de plantas medicinales representa el 80 % del arsenal terapéutico (Sharapin, 2000).

Las plantas medicinales del Ecuador generalmente se encuentran cultivadas en las huertas de las familias indígenas o campesinas así como también en los bosques húmedos tropicales de la Costa y Amazonía, en los bosques secos de la Costa y los bosques montanos de los Andes (Cartuche, *et al.*, 2003).

La medicina tradicional es practicada popularmente por las personas de edad que por tradición conocen sus propiedades curativas (Naranjo & Crespo, 1997), pero su uso se lo realiza también a diario no sólo por habitantes de zonas rurales sino también por personas de cualquier clase social, y en el área urbana es común encontrarlas en los diferentes mercados de la Sierra, Costa y Amazonía (De la Torre, Naverrete, Muriel M, Macía, & Balslev, 2008).

El conocimiento actual de las plantas medicinales tiene dos objetivos principales: el primero consiste en descubrir la estructura molecular de los principios activos y el segundo la validación terapéutica para el uso de éstas plantas por parte de grandes sectores de la población, que hasta ahora y por diversos motivos no accede fácilmente a los sistemas de salud (Naranjo & Crespo, 1997).

Además se estima que en el Ecuador existe un 2,3% de deforestación al año equivalente a 3 400 km² de bosque/año, con lo que la pérdida de especies medicinales va en aumento a la par del conocimiento ancestral (Cartuche, *et al*; 2003), siendo importante realizar programas de conservación, utilización y sistemas de cultivos de dichas especies.

1.4. Familia Amaranthaceae y Género Iresine.

Iresine es un género de la familia de las Amaranthaceae la cual está constituida por aproximadamente 65 géneros y 900 especies con una distribución casi cosmopolita, siendo evidentemente ausente en los hábitats árticos y alpinos, abundante en los trópicos y subtropicos del mundo. Los centros de diversidad de la familia son el suroeste de Norteamérica, Centroamérica, Sudamérica y África (sur del desierto de Sahara). Algunas especies se desarrollan en ambientes severos como suelos arenosos, calcáreos, yesosos, salinos o de serpentina en los desiertos, semidesiertos y playas. A pesar de que muchos miembros de Amaranthaceae son considerados como malezas, la familia presenta una gran variedad de usos para el hombre (Alvarado Vásquez , Salcedo Martínez, & Vargas, 2011).

La familia Amaranthaceae se caracteriza por presentar hierbas y arbustos o trepadoras con hojas alternas u opuestas, simples sin estípulas, brácteas florales escariosas, inflorescencia terminal o axilar generalmente paniculada, flor bisexual o unisexual, pétalos 3-5 más o menos escariosos, estambres 5, gineceo de 2-3 carpelos unidos en un solo pistilo, ovario ovoide, cilíndrico o globoso unilocular, estilos 1 o 2, estigma bilabiado o capitado, fruto una utrícula seca, dehiscente o indehiscente a veces una cápsula abayada. Se distribuye en el área tropical, subtropical. Costa, Andes y Oriente, desde los 0 hasta los 3 000 m s.n.m. (Cerón, 2005).

Para el Ecuador se han registrado 20 géneros y 84 especies (Jorgensen & León-Yáñez, 1999) de las cuales 21 son endémicas para el país (Montúfar, 2000 citado por Freire, 2004). Los géneros importantes son: *Alternanthera*, *Amaranthus*, *Achyranthes*, *Blutaparon*, *Celosía*, *Chamissoa*, *Cyathula*, *Froelichia*, *Gomphrena*, *Guilleminea*, *Iresine*, *Irenella*, *Lithophila* *Pfaffia*, *Pleuropetalum* (Cerón, 2005). Los géneros *Alternanthera* e *Iresine* han sido cultivados como ornamentales por el color de su follaje (Alvarado Vásquez , *et al*; 2011).

Iresine es un género de la familia de los amarantos, plantas perennes de América y Australia, que posee unas 80 especies en total. Varían de hábito, desde erguido a pegado al suelo. Las flores son insignificantes, sus hojas a menudo de colores brillantes (Cheers, 2006)

1.5. Escancel (*Iresine herbstii* Hook).

Es una especie atractiva para macetas. Aunque es perenne se la trata a menudo como una anual. Alcanza 60 cm de alto con una extensión de 45 cm. Presenta tallos rojos y hojas redondeadas rojo purpúreo de hasta 10 cm de largo, con muescas en las puntas y nervios rojo amarillento. Las formas de jardín presentan colores variados: desde hojas verdes con nervio amarillo u hojas verde purpúreo y nervios rosa remolacha (Cheers, 2006), como se puede observar en la Figura 1.



Figura 1. *Iresine herbstii* Hook
Fuente: INIAP

Reino:	Plantae
Clase:	Magnoliópsida
Familia:	Amaranthaceae
Género:	<i>Iresine</i>
Especie:	<i>Iresine herbstii</i> Hook.
Nombre Común:	Escancel, hojas de sangre, brillantísima o iresine.

1.5.1. Origen y Distribución.

Iresine herbstii es una planta nativa de los bosques tropicales de Sur América y fue probablemente recolectada por primera vez en Brasil. Pero también se encuentra disponible en los bosques tropicales de la India y Asia (De Feo, 2003).

1.1.2. Partes utilizadas de la planta.

Las hojas y los tallos en infusión, bebidas o emplastos (Cartuche et al, 2003).

1.5.2. Usos y Propiedades.

Las hojas de *I. herbstii* son usadas para la cicatrización de heridas, y como agente anticancerígeno (Sebold, 2003), tónico pos parto (Srithi, Henrik, Prasit, Prachaya, & Chusie, 2009); externamente para depurar la piel de eczemas, llagas y espinillas (De Feo, 2003) y como un buen agente antimicrobiano (Khare, 2007). Astringente, diurético espasmolítico, para la tosferina y las raíces en migrañas.

Las hojas y las flores sometidas a decocción son usadas para bajar la fiebre, refrescante y para problemas renales (Tene, et al., 2007) y también como antipirético (Schmidt, et al., 2009), se reporta también que ésta planta posee actividad antiinflamatoria, actividad citotóxica y apoptósica.

En la región sur del Ecuador, en el pueblo Saraguro las ramas de escancel se usa junto a otras plantas medicinales en la preparación de bebidas para tratar alergias en la sangre (ronchas, fiebre), los nervios (insomnio, angustia), para gangrena del calor (infección de heridas y fiebres), cólicos menstruales y para insolación (Cartuche, et al; 2003).

1.6. Metabolitos Secundarios y Flavonoides.

En las plantas hay una gran cantidad de compuestos orgánicos que no están implicados directamente en su crecimiento y en su desarrollo denominados **metabolitos secundarios**, y son los responsables de proporcionar características de olor, color o sabor, y también otorgar propiedades medicinales. Los metabolitos secundarios pertenecen a una gran variedad de tipos estructurales a diferencia de los metabolitos primarios formados por las proteínas, ácidos nucleicos hidratos de carbono y lípidos (Castillo García & Martínez Solís, 2007)

Los metabolitos secundarios se sintetizan a partir de un número reducido de precursores: la acetil coA, el ácido sikímico, el ácido mevalónico y los aminoácidos.

Los metabolitos secundarios se clasifican en:

- Compuestos terpénicos, principalmente formados por la vía del mevalonato.
- Compuestos fenólicos provenientes de la vía del sikimato y/o acetato.
- Compuestos nitrogenados derivados de los aminoácidos.

Los **flavonoides** son compuestos fenólicos derivados de la vía del sikimato y acetato se clasifican en cinco grupos diferentes: antocianinas (pigmentos), flavonoides menores (que incluyen flavanonas, dihidroflavonoles, y dihidrochalconas), flavonas y flavonoles, isoflavonoides y taninos condensados (Castillo García & Martínez Solís, 2007).

1.7. Métodos de Aislamiento e Identificación de Metabolitos Secundarios.

1.7.1. Marchas Fitoquímicas Preliminares.

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica que permite una determinación cualitativa de los principales grupos de constituyentes químicos de una planta, permite orientar la extracción o fraccionamiento del grupo de mayor interés (Sharapin, 2000). Se extraen los mismos con diferentes tipos de solventes y luego se aplican pruebas de coloración (Lock, 1994).

Entre los ensayos preliminares (Tabla 1) más importantes que permiten determinar de manera cualitativa los metabolitos secundarios tenemos:

Tabla 1. Marchas fitoquímicas

ENSAYO	METABOLITO
Catequinas	Catequinas
Resinas	Resinas
Fehling	Azúcares reductores
Dragendorff	Alcaloides
Mayer	Alcaloides
Wagner	Alcaloides
Baljet	Cumarinas y compuestos lactónicos
Liebermann-burchard	Triterpenos y esteroides
Espuma	Saponinas (Tipo esteroideal y triterpénica)
Cloruro férrico	Fenoles y taninos
Ninhidrina	Aminoácidos libres o aminas en general
Shinoda	Flavonoides
Antocianidinas	Flavonoides c6-c3-c6
Kedde	Glicósidos cardiotónicos
Sudan	Grasas y aceites
Mucilagos	Polisacáridos
P. Amargos y astringentes	Sabores bien diferenciados al paladar

Fuente: Autora

1.7.2. Extracción.

El proceso de extracción se inicia luego de que la materia prima ha sido sometida a un correcto proceso de secado, estabilización y selección. Inicia con la molienda de la planta en partículas pequeñas para facilitar la penetración del solvente al tejido celular. Luego se coloca la materia prima con el solvente a agitación para permitir que el solvente entre en contacto con el sólido

y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado. La muestra puede ser también macerada por un tiempo (Sharapin, 2000).

1.7.3. Cromatografía en Columna.

La cromatografía es un método analítico empleado en la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. En donde los componentes de separación se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y una móvil en una dirección definida (Skoog, Crouch, & James Holler, 2008).

Se coloca un pequeño volumen de la muestra en la parte superior de la columna, la misma está llena con partículas cromatográficas de fase estacionaria y disolvente. Se agrega la fase móvil de disolvente a la columna y se deja que salga lentamente por su parte inferior. Los componentes individuales de la mezcla interactúan con la fase estacionaria con diversas intensidades (Christian, 2009).

1.7.4. Cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía de capa fina se aplica generalmente para el análisis cualitativo. La fase estacionaria es una capa delgada de adsorbente finamente dividido soportado sobre una placa de aluminio o de vidrio. Se deposita una muestra sobre la placa con una micropipeta sobre el lado inferior y el cromatograma se corre colocando el lado inferior de la placa en un disolvente adecuado. El disolvente asciende por la placa por acción capilar y los componentes de la muestra suben por la placa a diferentes velocidades que dependen de su solubilidad y de su grado de retención por la fase estacionaria. Después del desarrollo, las manchas individuales de soluto se ven o se hacen visibles tratándolas con un reactivo que forme un derivado colorido. En general las manchas se mueven a cierta fracción de la velocidad con la que se mueve el disolvente, y se caracteriza por su valor de **Rf**:

$$Rf = \frac{\text{distancia que recorre el soluto}}{\text{distancia que recorre el frente del disolvente}}$$

Donde las distancias se miden desde el centro donde se depositó la muestra, en el lado inferior de la placa. El frente de disolvente será una línea que cruza la placa. La distancia que recorre el soluto se mide desde el centro de la mancha del soluto, o a su densidad máxima si se presenta corrimiento (Chistian, 2009).

1.7.5. Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM).

La Cromatografía de Gases (CG) sirve principalmente para la detección de compuestos orgánicos, compuestos organometálicos o para separar mezclas muy complejas. La espectrometría de masas es una técnica sofisticada que produce, separa y detecta iones en fase gaseosa. Cuando la CG se acopla con la espectrometría de masas como sistema de detección, es posible la identificación de las sustancias eluidas con una elevada sensibilidad (Chistian, 2009).

Es de hecho uno de los detectores más usados en cromatografía de gases y su acoplamiento se conoce como GC-EM. El efluente que proviene de la CG pasa por la entrada de espectrómetro de masas, donde las moléculas de gas se fragmentan, ionizan, analizan y detectan. Los espectros de masas de iones seleccionados que se obtienen durante un experimento cromatográfico se conocen como cromatograma de masas (Skoog, Crouch, & James Holler, 2008).

En cromatografía de gases los componentes de una muestra se separan como consecuencia de que se reparten entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida estacionaria o inmovilizada en un relleno sólido inerte o en las paredes de un tubo capilar (columna), la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, la elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil y de un gas inerte (Skoog, Crouch, & James Holler, 2008). Los resultados se observan a través de cromatogramas los cuales determinan la pureza de compuestos orgánicos. Los tiempos o volúmenes de retención nos permiten una identificación cualitativa. Las alturas de los picos o sus áreas brindan una información cuantitativa. La aparición de picos adicionales revela que hay contaminantes presentes y las áreas bajo estos picos proporcionan un cálculo aproximado del grado de contaminación. Las técnicas de cromatografía de gases son útiles para evaluar la efectividad de los procedimientos de purificación.

1.7.6. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La resonancia magnética nuclear se centra en la determinación de las estructuras de compuestos orgánicos, en el estudio de los núcleos atómicos magnéticamente activos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Por ejemplo los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P ; poseen espín igual que los electrones y al ser de carga positiva tienen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. Los espines nucleares se orientan al azar, pero cuando se colocan en un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo magnético, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β . (Sierra, Pérez, Gómez, & Morante, 2010). Los dos elementos más frecuentes en los compuestos orgánicos son el carbono y el hidrógeno, siendo éstos los dos núcleos más estudiados en RMN (Weinenger & Stermitz, 1988).

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Estudio preliminar de *Iresine herbstii*.

En la figura 2 se resumen los pasos que se siguieron para el estudio preliminar de *Iresine herbstii*.

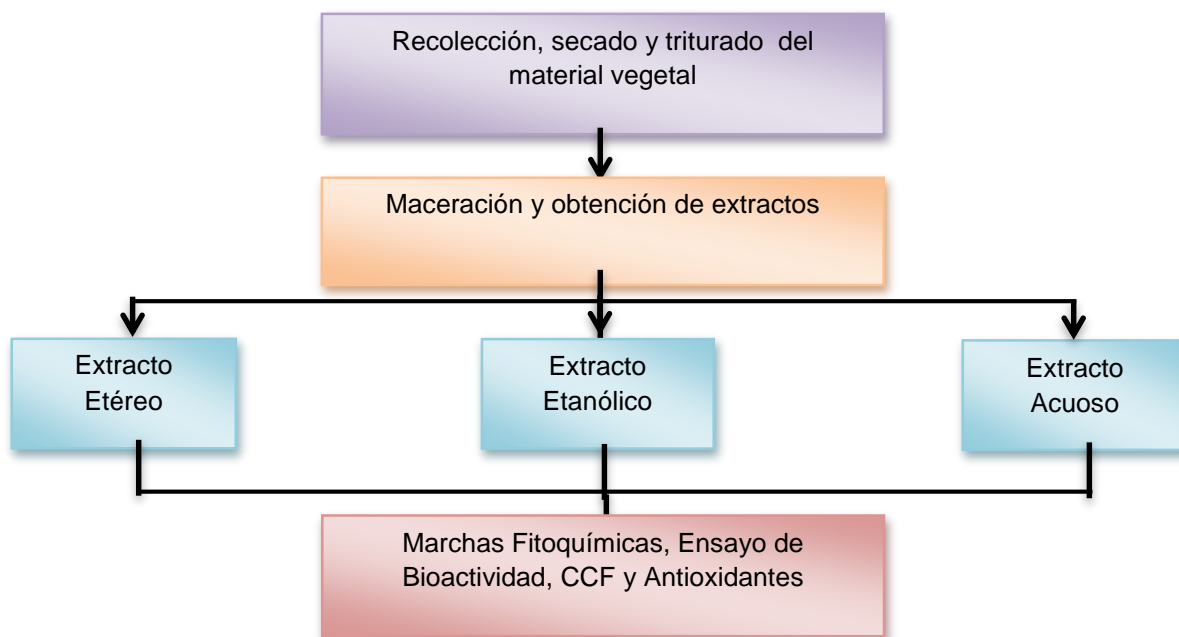


Figura 2. Procedimiento del estudio preliminar de *Iresine herbstii*
Fuente: Autora

2.1.1. Recolección de materia vegetal.

Las partes aéreas de la especie *Iresine herbstii* Hook., fueron recolectadas en los jardines de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP con voucher ECU 20137, dichos cultivos inicialmente procedieron del cantón Catamayo, Provincia de Loja. La identificación de la especie se la realizó en el Herbario Nacional del Ecuador. El secado y la trituración de la misma se realizaron en los laboratorios del INIAP.

2.1.2. Obtención de extractos.

Se utilizaron 20 g de planta seca y triturada, colocándola a maceración dinámica con solvente en un agitador por 4 horas. La relación planta disolvente fue de 1:10. Los solventes de polaridad creciente usados fueron éter etílico, etanol y agua. El extracto líquido se filtró a vacío y luego se concentró a presión reducida en un rotavapor Buchi (R-210) a 30 °C. Se realizaron 3 extracciones con cada solvente. El residuo sólido se secó a temperatura ambiente durante 5 horas antes de continuar la extracción con otro solvente de polaridad creciente. Los extractos obtenidos se utilizaron para el tamizaje fitoquímico según la metodología de Miranda & Cuéllar, 2001, para realizar TLC, y para ensayos de Bioactividad y antioxidantes.

2.1.3. Marchas fitoquímicas para el extracto etéreo.

Las técnicas que se describen a continuación fueron tomadas de la metodología de Miranda & Cuéllar, 2001.

Se identificó la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios por los cambios de color y precipitados. Los análisis se realizaron por triplicado.

- **Ensayo de Sudan** Se colocó en un tubo de ensayo 5ml del extracto, se le adicionó 1ml de la solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calentó en baño de agua hasta la evaporación del disolvente.
- **Ensayo de Dragendorff:** Se colocó en un tubo de ensayo 5 ml del extracto y se evaporó a baño de agua, el residuo se redisolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1% en agua. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo añadiendo tres gotas del reactivo de Dragendorff.
- **Ensayo de Mayer:** Se procedió de la forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida. Se colocó una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y filtró. Se agregaron 2 o 3 gotas de la solución reactivo de Mayer.
- **Ensayo de Wagner:** Se inició al igual que en los casos anteriores de la solución ácida y se añadió 2 o 3 gotas del reactivo.
- **Ensayo de Baljet:** Se colocó en un tubo de ensayo 5 ml del extracto, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, se evaporó el

disolvente en baño de agua y se re disolvió en la menor cantidad de alcohol (1 ml). En estas condiciones se adicionó 1 ml del reactivo.

- **Ensayo de Liebermann-Burchard:** Se evaporó el disolvente en baño maría, y el residuo se redisolvió en 1ml de cloroformo. Se adicionó 1ml de anhídrido acético y se mezcló bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

2.1.4. Marchas fitoquímicas para el extracto etanólico.

Las técnicas se describen a continuación, se identificaron la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios por los cambios de color y precipitados. Los análisis se realizaron por triplicado.

- **Ensayo de catequinas:** Se colocó una gota de la solución etanólica sobre papel filtro. Sobre la mancha aplicar la solución de carbonato de sodio
- **Ensayo de resinas:** Se añadió 2 ml de la solución alcohólica, 10 ml de agua destilada.
- **Ensayo de Fehling:** Se colocó 2 ml en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1-2 ml de agua. Se adicionó 2 ml del reactivo y se calentó en baño de agua 5-10 minutos la mezcla.
- **Ensayo de Dragendorff:** Se colocó en un tubo de ensayo 5 ml del extracto y se evaporó a baño de agua, el residuo se redisolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1% en agua. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo añadiendo tres gotas del reactivo de Dragendorff.
- **Ensayo de Mayer:** Se procedió de la forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida. Se colocó una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y filtró. Se agregaron 2 o 3 gotas de la solución reactivo de Mayer.
- **Ensayo de Wagner:** Se procedió de la forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida. Se colocó una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y filtró. Se agregaron 2 o 3 gotas de la solución reactivo de Mayer.

- **Ensayo de Baljet:** Se colocó en un tubo de ensayo 5 ml del extracto, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, se evaporó el disolvente en baño de agua y se re disolvió en la menor cantidad de alcohol (1 ml). En estas condiciones se adicionó 1 ml del reactivo.
- **Ensayo de Liebermann-Burchard:** Se evaporó el disolvente en baño maría, y el residuo se redisolvió en 1ml de cloroformo. Se adicionó 1ml de anhídrido acético y se mezcló bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.
- **Ensayo de espuma:** Se colocó 2 ml en un tubo de ensayo y se diluyó con 5 veces su volumen en agua, se agitó la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.
- **Ensayo de cloruro férrico:** Se colocó 2 ml del extracto alcohólico y se adicionó 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua).
- **Ensayo de ninhidrina:** Se tomaron 2 ml del extracto en alcohol, se mezcló con 2 ml de solución al 2% de ninhidrina en agua. La mezcla se calentó 5-10 minutos en baño de agua.
- **Ensayo de Shinoda:** Se colocó 2 ml en un tubo de ensayo, se diluyó con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se esperó 5 minutos, se añadió 1 ml de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejaron reposar hasta que se separen.
- **Ensayo de antocianidinas:** Se calentó 2 ml de extracto etanólico por 10 minutos con 1 ml de HCl concentrado. Se dejó enfriar y se adicionaron 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico. Se agitó y se dejaron separar las dos fases.
- **Ensayo de Kedde:** Se colocó 2 ml del extracto en un tubo de ensayo, se mezcló con 1 ml del reactivo y se dejó reposar durante 5-10 minutos.

2.1.5. Marchas fitoquímicas para el extracto acuoso.

Las técnicas se describen a continuación, se identificaron la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios por los cambios de color y precipitados. Los análisis se realizaron por triplicado.

- **Ensayo de Fehling:** Se colocó 2 ml en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente en 2 ml del reactivo y se calentó en baño de agua 5-10 minutos la mezcla.
- **Ensayo de Dragendorff:** Se colocó en un tubo de ensayo 5 ml del extracto y se evaporó a baño de agua, el residuo se redisolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1% en agua. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo añadiendo tres gotas del reactivo de Dragendorff.
- **Ensayo de Mayer:** Se procedió de la forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida. Se colocó una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y filtró. Se agregaron 2 o 3 gotas de la solución reactivo de Mayer.
- **Ensayo de Wagner:** Se procedió de la forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida. Se colocó una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y filtró. Se agregaron 2 o 3 gotas de la solución reactivo de Mayer.
- **Ensayo de espuma:** Se colocó 2 ml en un tubo de ensayo y se diluyó con 5 veces su volumen en agua, se agitó la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.
- **Ensayo de cloruro férrico:** Se colocó 2 ml del extracto alcohólico y se adicionó 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua).
- **Ensayo de Shinoda:** Se colocó 2 ml en un tubo de ensayo, se diluyó con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se esperó 5 minutos, se añadió 1 ml de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejaron reposar hasta que se separen.
- **Ensayo de mucílagos:** Se colocó 10 ml del extracto en un tubo de ensayo, se enfrió a 0-5°C.
- **Ensayo de principios amargos y astringentes:** Se saboreó 1 gota del extracto acuoso o del vegetal.

En la tabla 2 se indica que metabolito detecta cada ensayo y como analizar los resultados.

Tabla 2. Interpretación de Marchas fitoquímicas Prueba	Metabolito	Resultado
Sudan(s)	Grasas – aceites	Si se observa a presencia de Grasa o aceite se considera (+) el ensayo.
Dragendorff(d)	Alcaloides	Si hay opalescencia se considera (+), Turbidez definida (++) , precipitado (+++).
Mayer(m)		
Wagner(w)		
Baljet(b)	Cumarinas y compuestos lactónicos	Es (+) si hay aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.
Liebermann-burchard (l.b)	Triterpenos y esteroides	Es(+)si se tiene por un cambio rápido de coloración: Rosado-azul, muy rápido Verde-intenso, visible aunque rápido Verde oscuro-negro, al final de la reacción.
Catequinas(c)	Catequinas	La aparición de una mancha verde carmelita A la luz uv, indica un ensayo (+).
Resinas(r)	Resinas	La aparición de un precipitado, indica q es (+).
Fehling(f)	Azúcares reductores	Es(+) si la solución se colorea o precipita de rojo .
Espuma(e)	Saponinas (tipo esteroidal y triterpénica)	Es(+)si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persiste por más de 2 minutos.
Cloruro ferrico(cl)	Fenoles totales	Desarrollo de una coloración rojo-vino, Compuestos fenólicos en general. Desarrollo de una coloración verde intensa, Taninos del tipo pirocatecólicos. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.
Ninhidrina(n)	Aminoácidos libres o aminas en general	Este ensayo se considera positivo cuando Se desarrolla un color azul violáceo.
Shinoda(s)	Flavonoides	Es(+)cuando el alcohol amílico se Colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo: intensos en todos los casos.
Antocianidinas(a)	Flavonoides c6-c3-c6	Es(+) si apareceun color rojo a marrón en la fase amílca.
Kedde(k)	Glicósidos cardiotónicos	Es (+) cuando aparece una coloración violáceo, persistente durante 1 y 2 horas.
Mucilagos(m)	Estucturas tipos polisacáridos	Si la solución toma una consistencia gelatinosa ell ensayo es (+).

P.amargo astringentes(paa)	y	P.amargo astringentes	y	Reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar. (+)
-------------------------------	---	--------------------------	---	---

Fuente: Miranda & Cuéllar, 2001

2.1.6. Cromatografía de capa fina y Rf.

Posteriormente se analizó a cada uno de los extractos obtenidos: Etéreo, Etanólico y Acuoso mediante cromatografía de capa fina (CCF): en placas de fase directa (sílice 60) mediante la utilización de Hex:AcOEt como fase móvil, en las proporciones 9:1 y 1:1; y en fase inversa (Rp18) con MetOH:H₂O como eluyente, en las proporciones 1:1. Las CCF fueron reveladas con vainillina y ácido sulfúrico 5% y fueron observadas en la lámpara de luz UV (UVLS-28 EL) a 254 / 365 nm. Se midió el Rf de los compuestos.

2.1.7. Bioactividad de Extractos.

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), y para hongos dermatofitos: *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185).

2.1.8. Actividad antioxidante.

Para las medidas de actividad antioxidante se utilizó Trolox como control positivo y solo DPPH o ABTS como controles negativo (sin antioxidante). Los resultados expresados como microMoles equivalentes de trolox / g de muestra, indican que la muestra analizada tiene una actividad antioxidante equivalente a X microMoles de trolox. El trolox es un antioxidante sintético. En el caso de fenoles totales, se empleó ácido gálico como estándar (control positivo) y los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico, la ausencia de ácido gálico corresponde al control negativo.

2.2. Fraccionamiento del Extracto bioactivo y aislamiento de los principios activos de *Iresine herbtii*.

En la siguiente Figura 3 se resume el proceso:

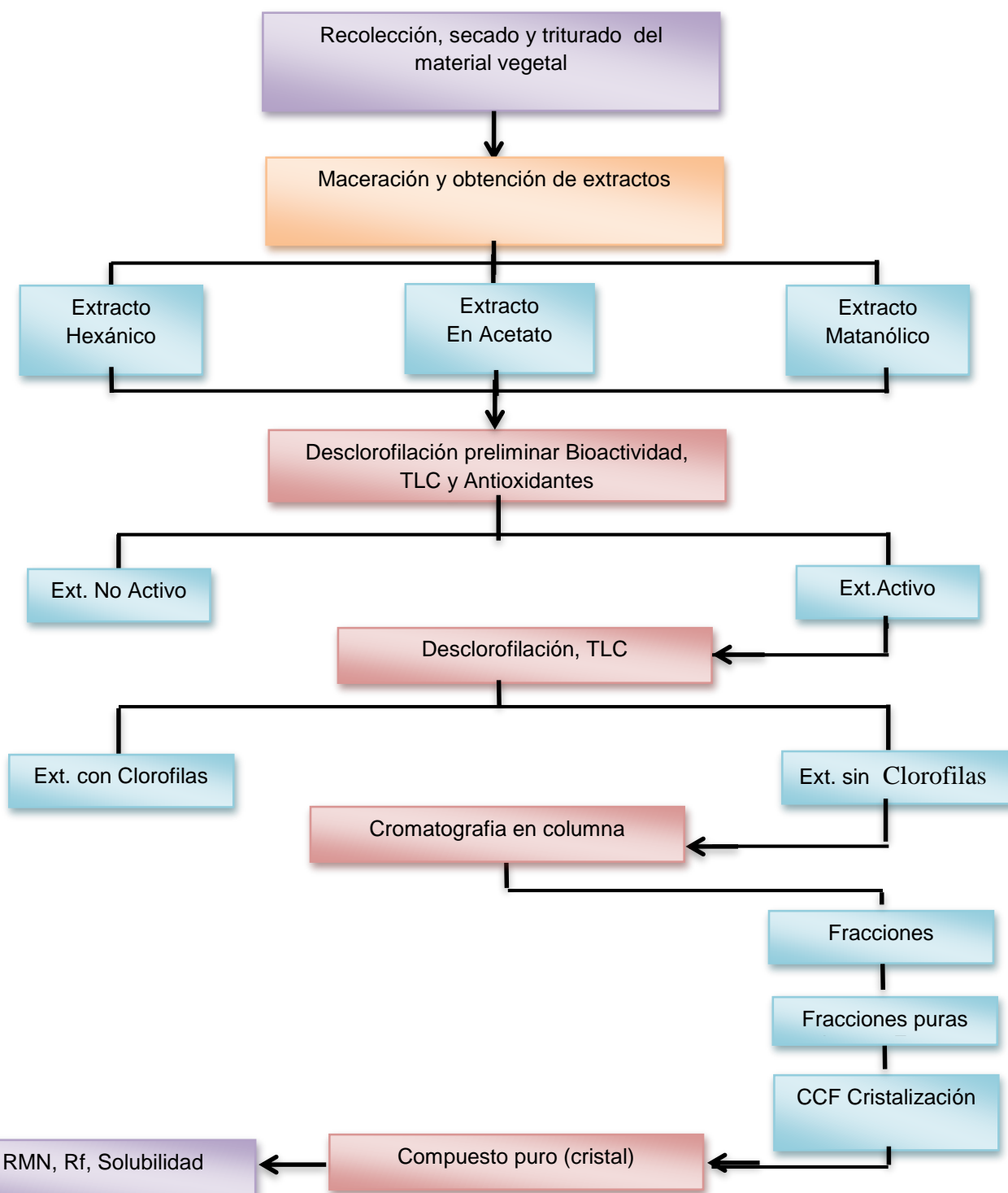


Figura 3. Pasos para Fraccionamiento y aislamiento de los principios activos de *Iresine herbtii*

Fuente: Autor

2.2.1. Recolección de materia vegetal.

Las partes aéreas de la especie *Iresine herbstii* Hook., fueron recolectadas en los jardines de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP con el voucher ECU 20137, dichos cultivos inicialmente procedieron del cantón Catamayo, Provincia de Loja. La identificación de la especie se la realizó en el Herbario Nacional del Ecuador. El secado y la trituración de la misma se realizaron en los laboratorios del INIAP.

2.2.2. Obtención de extractos.

Se utilizaron 412,87 g de planta seca y triturada, colocándola a maceración dinámica con solvente en un agitador por 1 hora. La relación planta disolvente fue de 1:10. Los solventes de polaridad creciente usados fueron hexano, acetato de etilo y metanol. El extracto líquido se filtró a vacío y luego se concentró a presión reducida en un rotavapor Buchi 210 a 30 °C. Se realizaron 3 extracciones con cada solvente. El residuo sólido se secó a temperatura ambiente durante 5 horas antes de continuar la extracción con otro solvente de polaridad creciente. Los extractos obtenidos se pasaron y etiquetaron para determinar su rendimiento y se usaron para realizar pruebas de desclorofilación preliminar, bioactividad, antioxidantes y CCF. Finalmente, el producto se almacenó en refrigeración.

2.2.3. Desclorofilación preliminar.

Al trabajar con material vegetal se obtuvo una gran cantidad de clorofila, en los dos primeros extractos. Para obtener extractos de trabajo, los sometimos a un proceso de desclorofilación, por lo cual, empleamos cromatografía líquido-líquido, donde cada extracto se disolvió en una cantidad suficiente (1 gramo: 100mL mezcla) de una mezcla de n-Hexano y [MeOH: H₂O (9:1)] en proporción 1:1 y se decantó.

La separación se basa en la diferencia de densidades y polaridades. En la parte superior del decantador se ubicó la proporción de disolvente que retiene las clorofilas y en la parte inferior la proporción de disolvente que tiene el producto de interés. La eficiencia de la separación se monitoreó con CCF.

La porción de interés se secó a presión reducida y a 30°C. Se registró el dato del peso obtenido y se etiquetó. Finalmente, el producto se almacenó en refrigeración. Al ser un

procedimiento bioguiado se realizó las pruebas de bioactividad de los extractos desclorofilados.

2.2.4. Cromatografía de capa fina y Rf.

Posteriormente se analizó en cromatografía de capa fina (CCF) a cada uno de los extractos (con clorofila y sin clorofila) obtenidos luego de la desclorofilación, para determinar la eficacia del proceso. Se usaron placas de fase directa (sílice 60) y los solventes de la fase móvil fueron Hex: AcOEt, en las proporciones 4:1, 1:1 y 7:3; y en fase inversa (Rp18) con MetOH: H₂O como eluyente, en las proporciones 8:2, 7:3 y 9:1. Las placas fueron reveladas con vainillina y ácido sulfúrico 5% y fueron observadas en la lámpara de luz UV (UVLS-28 EL) a 254 / 365 nm.

2.2.5. Bioactividad de Extractos.

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* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), y para hongos dermatofitos: *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185).

2.2.6. Actividad antioxidante.

Para las medidas de actividad antioxidante se utilizó Trolox como control positivo y solo DPPH o ABTS como controles negativo (sin antioxidante). Los resultados expresados como microMoles equivalentes de trolox / g de muestra, indican que la muestra analizada tiene una actividad antioxidante equivalente a X microMoles de trolox. El trolox es un antioxidante sintético. En el caso de fenoles totales, se empleó ácido gálico como estándar (control positivo) y los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico, la ausencia de ácido gálico corresponde al control negativo.

2.3. Desclorofilación del Extracto de Acetato de Etilo.

Se sembró 10 g del extracto acetato de etilo de *I. herbstii* que presentó una mayor actividad antimicrobiana en un embudo Büchner empacado previamente con 100 g de sílice inversa RP18. Se filtró con tres polaridades diferentes hasta que cada extracción ya no presentara coloración (Tabla 3).

Tabla 3. Fraccionamiento preliminar

	Meoh/h2o	Fraccion
Polaridad 1	7:3	A
Polaridad 2	8:2	B
Polaridad 3	9:1	C
Polaridad 4	Meoh	D

Fuente: La autora

Posteriormente se analizó a cada una de las fracciones obtenidos (A, B, C, D) mediante cromatografía de capa fina (CCF) con placas de fase inversa (Rp18) con MetOH:H₂O 7:3 como fase móvil. Las placas fueron reveladas con vainillina / ácido sulfúrico 5% y fueron observadas en la lámpara de luz UV (UVLS-28 EL) a 254 / 365 nm.

2.4. Cromatografía en Columna.

Se tomaron 2 gramos de la **fracción A** desclorofilada (polaridad 1 / MeOH: H₂O /7:3) del extracto en acetato de etilo y se sembraron en una columna de vidrio previamente empacada con fase inversa Rp18 en una proporción sílica: extracto 7:1. Se inició a fraccionar con una polaridad MeOH: H₂O 8:2 y se recolectaron 234 fracciones de 10 ml cada una, las cuales una vez secas fueron debidamente etiquetadas y pesadas.

Para monitorear la eficacia del fraccionamiento, se analizaron las fracciones obtenidas mediante cromatografía de capa fina (CCF) con placas de fase inversa (Rp18) y MetOH: H₂O 8:2, 9:1 y Metanol puro como eluyentes. Las placas fueron reveladas con vainillina

y ácido sulfúrico 5% y fueron observadas en la lámpara de luz UV (UVLS-28 EL) a 254 / 365 nm.

2.5. Unión y Purificación de fracciones.

Se recolectaron un total de 234 fracciones. Para su unión se relacionó el Rf de las manchas y la similitud visual que estas reflejaron ante la luz UV y el agente revelador vainillina / ácido sulfúrico 5%.

Las fracciones que presentaron un precipitado blanquecino (30-35) fueron unidas al diluirse con DCM y sometidas a un proceso de purificación mediante el lavado de las mismas con Hexano y unas gotas de AcOEt luego con MeOH grado reactivo y finalmente acetona . Se etiquetó y se tomó el peso final.

2.6. Cristalización.

Para cristalizar la muestra se utilizó $\frac{3}{4}$ de acetato de etilo y unas gotas de MeOH se calentaron a 35 °C por 5 minutos y se dejó que se evapore lentamente por dos días.

2.7. Características químicas del compuesto.

2.7.1. Punto de fusión.

Para determinar el punto de fusión se calentó lentamente una pequeña cantidad de las fracciones a analizar en el equipo Fisher – Johns- Melting Point Apparatus serial 40- 22 de 50-60 Hz, T max 300 °C. A continuación se registró los intervalos de temperatura a la cual la muestra pasaba de estado sólido al líquido.

2.7.2. Factor de Retención.

Se lo calculó mediante la determinación de la relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el solvente desde el origen y lugar de siembra.

2.7.3. Solubilidad.

Para determinar la solubilidad de los cristales se usó: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, acetona, agua.

2.8. Caracterización Estructural de las Moléculas aisladas.

2.8.1. Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de masas (CG-EM).

La identificación de los compuestos aislados de la especie *I. herbstii* Hook. por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas se hizo mediante un cromatografo de gases 6890N, acoplado a un Espectómetro de masas Agilent Technologies serie 5973 inert, dotado con un sistema de datos MSD –Chemstation D.01.00 SP1, cuenta con un inyector automático Split/splitless serie 7683. Las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB-5MS (5% -Fenilmetilpolisiloxano) y el gas usado como fase móvil fue el helio (Tabla 4).

Tabla 4. Características de la columna capilar utilizada

Características de la columna capilar Agilent 122-5532					
Fracciones	Columna	Temperatura max(°C)	Película (µm)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
30-35	DB-5MS	350	0,25	0,25	30

Fuente: Fielquimec ®

2.8.2. Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN ¹H Y ¹³C fueron obtenidos en un equipo Varian N° de serie 400-54 ASC operando a 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C, usando cloroformo deuterado (CDCl₃). Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm(δ), y las constantes de acoplamiento se expresaron en Hz.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estudios preliminares de *Iresine herbstii* Hook.

3.1.1. Marchas Fitoquímicas.

Los resultados obtenidos en la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Metabolitos secundarios encontrados en *Iresine herbstii* (Escancel)

Metabolitos secundarios de <i>Iresine herbstii</i> (Escancel)						
	Grasas, aceites Sudán	Alcaloides Dragendorff Mayer Wagner	Triterpenos y Estroides (Liebermann-Burchard)	Saponinas (Espuma)	Fenoles Totales (Cloruro Férrico)	Flavonoies (Shinoda)
Etéreo	+	+	+			
Etanólico		++	+	-	-	-
Acuoso		+++		+	ROJO VINO	+

Fuente: La autora

En el screening fitoquímico se encontró la presencia de: grasas, alcaloides, triterpenos y esteroides, saponinas, fenoles totales y flavonoides, los mismos metabolitos secundarios fueron reportados en el análisis fitoquímico preliminar de *I. herbstii* realizado por Dipankar & Murugan, 2012.

3.1.2. Actividad Antibacteriana preliminar.

Luego de evaluar 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), *Escherichiacoli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Actividad Antibacteriana

Actividad Antibacteriana						
Nombre Común	Nombre Científico	Tipo de Extracto	CMI(µg/ml)	M.O sensible	Control	CMI (µg/mL)
Escancel	<i>Iresine herbstii</i>	Acuoso	62,5	<i>S.aureus</i>	Gentamicina	0,195

Fuente: Bioensayos. DQ-UTPL

Se considera que sin 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 (Holetz , 2002). De acuerdo a esto el *extracto acuoso de Iresine herbstii* “Escancel” (62,5 µg/mL) presentó una buena actividad frente a *S. aureus*.

Las hojas de *Iresine herbstii* son utilizadas para cicatrizar heridas, como depurativo de la piel y como agente antimicrobiano (Srithi, Henrik, Prasit, Prachaya, & Chusie, 2009). En estudios antibacterianos realizados por Dipankar & Murugan, 2012, mediante el método de difusión en disco de agar se reportó que el extracto etanólico es más eficaz contra *S. aureus* que el antibiótico kanamicina y se manifestó que *I. herbstii* tiene un alto grado de actividad antibacterial contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae*.

3.1.3. Actividad antioxidante.

Para las medidas de actividad antioxidante de *Iresine herbstii* se utilizó Trolox como control positivo y solo DPPH o ABTS como controles negativo (sin antioxidante). Los resultados expresados como microMoles equivalentes de trolox / g de muestra, indican que la muestra analizada tiene una actividad antioxidante equivalente a X microMoles de trolox.

El trolox es un antioxidante sintético .En el caso de fenoles totales, se empleó ácido gálico como estándar (control positivo) y los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico, la ausencia de ácido gálico corresponde al control negativo. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7. Actividad Antioxidante de *Iresine herbstii*

Actividad Antioxidante de <i>Iresine herbstii</i>					
NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	EXTRACTO	ABTS(μ MolTrolox/g extracto)	DPPH (μ MolTrolox/g extracto)	FENOLES TOTALES (mg ac. Gálico/g extracto)
Escancel	<i>Iresine herbstii</i>	Etéreo	259,282 \pm 9,326	108,192 \pm 7,81	20,470 \pm 1,759
		Etanólico	217.316 \pm 1,648	129,101 \pm 7,811	31,482 \pm 1,858
		.vAcuoso	267,573 \pm 5,162	135,869 \pm 1,669	19,564 \pm 2,107

Fuente: Departamento de Ciencias Agropecuaria y Alimentos –UTPL

En el presente ensayo se evaluó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos etéreo, etanólico y acuoso de *Iresine herbstii* a través de los ensayos de decoloramiento del radical DPPH (2,2 - difenil - 1 - picrihidracilo) y ABTS.* (2,2 - azinobis(3 - etilbenzotiazolin - 6 - sulfónico) y el contenido de fenoles totales mediante el método de folin ciocalteu. Los resultados de la actividad antioxidante indican que todos los extractos fueron capaces de captar radicales DPPH y ABTS de una manera dependiente de la concentración. El extracto acuoso es el que mejor respuesta antioxidante dio tanto para DPPH y ABTS. El extracto con una mayor cantidad de compuestos fenólicos es el etanólico. Estos valores muestran la potencialidad de los extractos de *Iresine herbstii* como agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de daños causados por estrés oxidativo.

En un estudio realizado por Dipankar & Murugan en el 2012 se indicó que *i. herbstii* tiene un potencial significativo para ser usado como un antioxidante natural.

3.2. Aislamiento de Metabolitos secundarios de *Iresine herbstii*.

3.2.1. Obtención de Extractos.

En la tabla 8 se describe el peso y rendimiento de los extractos totales a partir de 412,87g de muestra vegetal seca (12% humedad). Así como los resultados del proceso de desclorofilación.

Tabla 8. Peso y rendimiento de los extractos desclorofilados y derivados obtenidos de *I. herbstii*

Peso y rendimiento de los extractos desclorofilados obtenidos de <i>I. Herbstii</i>		
Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexano	2,37	0,57
Acetato de etilo	6,09	1,47
Metanol	15,5 g	3,77

Fuente: La autora

Se puede observar que la planta tiene un alto contenido de agua al presentar un humedad inicial del 97 %, además el extracto metanólico presenta un mayor rendimiento: 3,77%, en comparación con el resto de extractos.

3.2.2. Desclorofilación inicial: cromatografía líquido –líquido.

La eficiencia de la separación o desclorofilación se monitoreó mediante CCF directa e inversa (Figuras de la 4 a la 9).

- **Extracto en hexano:**

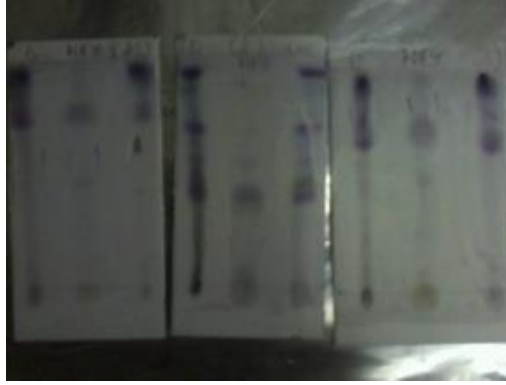


Figura 4. Placas de CCF fase directa de los extractos de Hexano de *Iresine herbstii*.

Fuente: La autora



Figura 5. Placas de CCF fase inversa de los extractos de Hexano de *Iresine herbstii*

Fuente: La autora

- **Extracto en acetato:**



Figura 6. Placas de CCF fase directa de los extractos de Acetato de *Iresine herbstii*

Fuente: La autora

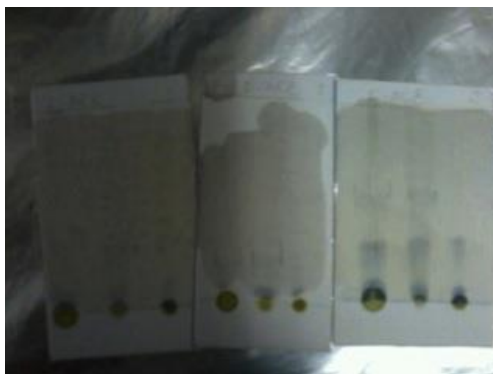


Figura 7. Placas de CCF fase inversa de los extractos de Acetato de etilo de *Iresine herbstii*.

Fuente: La autora



Figura 8. Placas de CCF fase directa de los extractos de Metanol de *Iresine herbstii*.

Fuente: La autora



Figura 9. Placas de CCF fase inversa de los extractos de Metanol de *Iresine herbstii*.

Fuente: La autora.

Según las placas de las figuras 4 a la 9 se pudo determinar que el proceso de desclorofilación no fue completamente eficiente (manchas verdes en los desclorofilados), además el rendimiento fue escaso. El peso de los extractos con y sin clorofila se resume a continuación en la tabla 9.

Tabla 9. Peso total de los extractos desclorofilados.

Extracto		Peso (g)
Hexano(2g)	Clorofilas	0,87
	Desclorofilado	0,21
Acetato de etilo(2g)	Clorofilas	1,18
	Desclorofilado	0,43
Metanol(2g)	Clorofilas	1,33
	Desclorofilado	0,55

Fuente: La autora

3.2.3. Actividad antibacteriana de extractos desclorofilados.

Los extractos desclorofilados fueron evaluados mediante 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* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), los resultados se resumen en la tabla 10.

Tabla 10. Actividad Antibacteriana de Extracto desclorofilado.

Actividad Antibacteriana de Extracto desclorofilado						
Nombre Común	Nombre Científico	Tipo de Extracto	CMI(µg/ml)	M.O sensible	Control	CMI (µg/mL)
Escancel	<i>Iresine herbstii</i>	Acetato De Etilo	62,5	<i>S.aureus</i>	Gentamicina	0,195

Fuente: La autora.

Según los resultados: los extractos hexánico y metanólico no presentan ninguna actividad antibacteriana, el extracto desclorofilado de acetato de etilo presenta una actividad antibacteriana de 62,5 ug/ml contra *S. aureus*. Se considera que sin un extracto o compuesto presenta una CMI <100 µg/mL la actividad antimicrobiana es buena. Al ser un procedimiento biodirigido se seleccionó este extracto para el fraccionamiento y aislamiento. En estudios antibacterianos realizados por Dipankar & Murugan, 2012, mediante el método de difusión en disco de agar se reportó que el

extracto etanólico es más eficaz contra *S. aureus* que el antibiótico kanamicina y se manifestó que *I. herbstii* tiene un alto grado de actividad antibacterial contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae*.

3.2.4. Desclorofilación del Extracto de Acetato de Etilo.

Con el fin de mejorar la calidad del extracto a fraccionar se empleó otro método de desclorofilación filtrando 10 g. del extracto de acetato de etilo en un embudo Büchner empacado previamente con 100 g de sílice inversa RP18. Se filtró con tres polaridades diferentes y se obtuvieron los siguientes pesos:

Tabla 11. Peso de las fracciones obtenidas en la desclorofilación preliminar

	MeOH / H ₂ O	Fracción	Peso
Polaridad 1	7:3	A	4,88
Polaridad 2	8:2	B	1,42
Polaridad 3	9:1	C	1,42
Polaridad 4	MeOH	D	1,99

Fuente: La autora

La eficacia del proceso se monitoreó con CCF en fase inversa y directa y se observó que en la polaridad MeOH:H₂O 7:3 la extracción presenta menor cantidad de clorofilas y que existe un compuesto fácil de aislar, el mismo se observa en la figura 10 y 11 en el primer punto de siembra.



Figura 10. Placa CCF con luz UV 254

Fuente: La autora

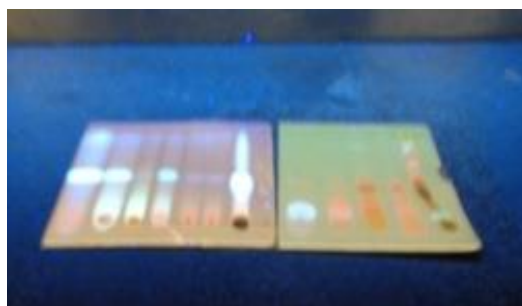


Figura 11. Placa CCF con la luz UV 365nm
Fuente: La autora

Figuras 10 y 11. Cromatografías en capa fina inversa MeOH/H₂O 8:2 y directa Hex/AcOEt 8:2 de las fracciones realizadas a partir del extracto total en acetato de etilo de *Iresine herbstii*. De der a izq: a) Extracto en MeOH:H₂O 7:3; b) Extracto en MeOH:H₂O 8:2; c) Extracto en MeOH:H₂O 9:1; d) Extracto en MeOH 100%; e) Extracto total de AcOet.

3.2.5. Cromatografía en Columna de la fracción A .

Se recolectaron 234 fracciones de 10 ml cada una de la Cromatografía en Columna de la fracción A (desclorofilada) del Extracto de Acetato de etilo. En la siguiente tabla se detalla las fracciones obtenidas:

Tabla 12. Resumen de las fracciones obtenidas en la columna 1.

	MeOH/H ₂ O	Fracciones	Apariencia Física
Polaridad 1	8:2	1-85	1-20 (melosa)
Polaridad 1	8:2	1-85	20-30(sólida)
Polaridad 1	8:2	1-85	30-35(precipitado blanquecino)
Polaridad 1	8:2	1-85	35-40(precipitado)
Polaridad 1	8:2	1-85	40-85(sólida)
Polaridad 2	8.5:1.5	85-120	Sólida (clorofila)
Polaridad 3	9:1	120-158	Sólida (clorofila)
Polaridad 4	9.5:0.5	159-200	Sólida (clorofila)

Polaridad 5	9.7:0.3	201-230	Sólida (clorofila)
Polaridad 6	MeOH	231-234	Sólida (clorofila)

Fuente: La autora

Para monitorear la eficacia del fraccionamiento, se analizaron las fracciones obtenidas mediante cromatografía de capa fina (CCF) con placas de fase inversa (Rp18). Se pudo determinar que las fracciones de la 30 a la 35 presentan compuesto azul casi puro (Figura 12 y 13).



Figura 12. CCF en fase inversa RP18 (MeOH/H₂O 7:3). De der. a izq. las fracciones sembradas de la 30 a la 35.a luz UV 365 nm

Fuente: La autora



Figura 13. CCF en fase inversa RP18 (MeOH/H₂O 7:3). De der. a izq. las fracciones sembradas de la 30 a la 35.a luz UV 254 nm

Fuente: La autora

3.2.6. Unión y Purificación de fracciones.

Las fracciones que presentaron un precipitado blanquecino (30-35), fueron unidas al diluirse con DCM al secarse se obtuvo un peso total de 120 m g y además el compuesto mayoritario precipito en forma sólida blanquecina (figura 14) por lo que se sometió a un proceso de purificación mediante el lavado con Hexano y unas gotas de AcOEt luego con MeOH grado reactivo y finalmente acetona. El peso final fue de 12,1mg.



Figura 14. Precipitado purificado fracciones 30-35

Fuente: La autora

Se realizaron dos CCF, una en fase inversa (MeOH: H₂O /9:1) y la otra en fase directa (Hex:AcOEt/1:1) y se pudo observar que existe una sola mancha como se observa a continuación en la figura 15.



Figura 15. Placas de CCF en fase inversa y directa del compuesto purificado.
Fuente: La autora

El compuesto cristalizó con $\frac{3}{4}$ de Hex y unas gotas de acetato de etilo, se calentó a 45 °C por 5 minutos y se dejó que se evapore lentamente por dos días, los cristales obtenidos fueron muy pequeños.

3.2.8. Características físicas y químicas del compuesto aislado

A continuación la tabla 13 se resumen las características físicas y químicas del compuesto aislado:

Tabla 13. Características físicas y químicas del Compuesto aislado.

Aspecto:	Precipitado blanquecino, cristaliza en Hex con gotas de AcOEt y AcOEt con gotas de MeOH a 45°C.
Punto de fusion:	140-145 °C
Rf:	0,51
Solubilidad elevada	DCM y MEOH :H2O 8:2
Solubilidad mediana	Acetato de Etilo
Solubilidad escasa	Metanol
No se disuelve	Hexano y agua

Fuente: Autora

3.2.9. Resultados de CG- EM y RMN de la fracción 30-35.

Según la base de datos del equipo del espectro CG-EM (Figura,16), indica que la fracción 30-35 es un compuesto puro cuyo tiempo de retención de 29,97 min

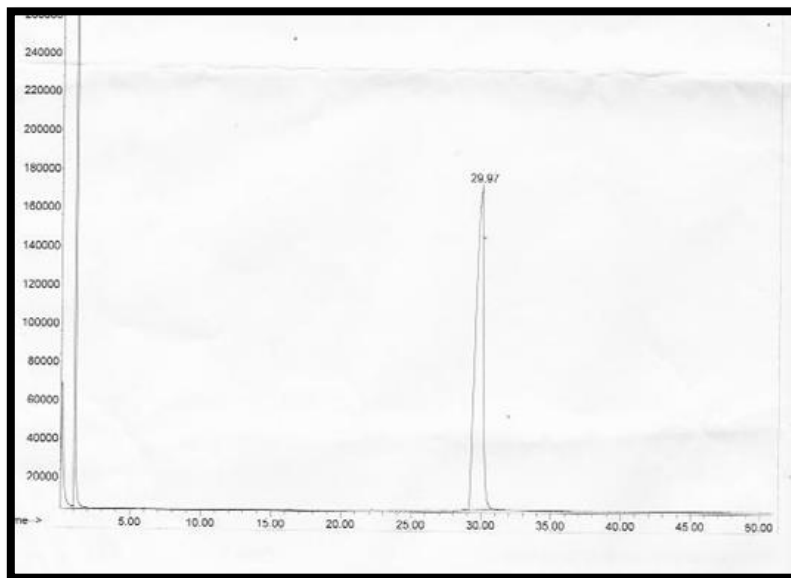


Figura 16. Espectro CG-EM
Fuente: La autora

ia en estudio

tiene un peso molecular es 326 (Figura 17), se nota que en el ensayo se obtiene un ión en 349 que corresponde a $(M+Na^+)$

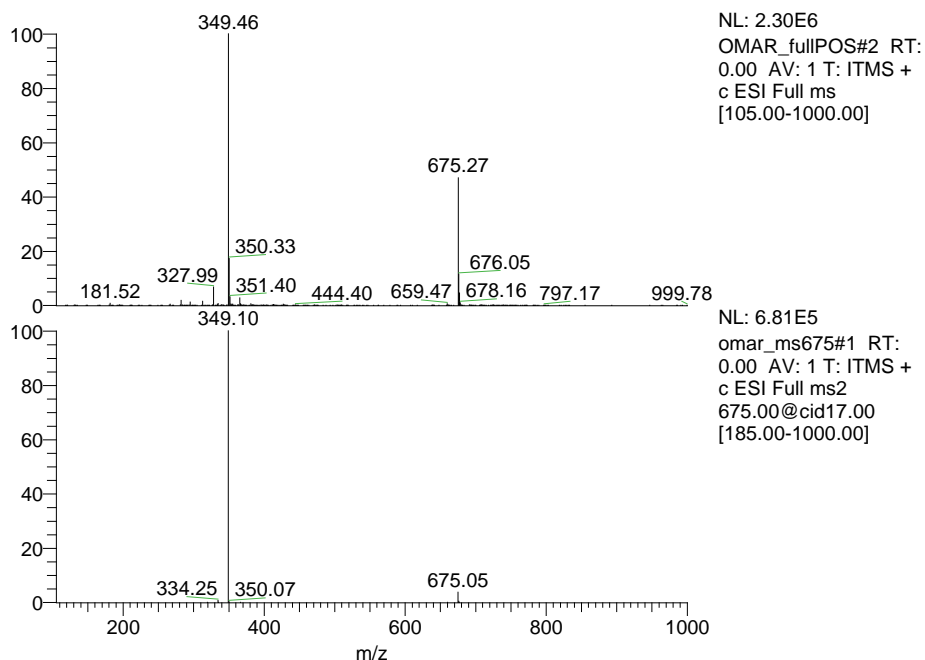


Figura 17. Espectro EI-MS y ESI-MS/MS
Fuente: Universidad de Pavia. Italia

El espectro de protón de la sustancia obtenida revela la presencia en la estructura de dos metoxilos, un metileno unido a dos heteroátomos en 6.16 ppm; una serie de protones aromáticos y un protón olefínico por encima de 8 ppm (Figura 18).

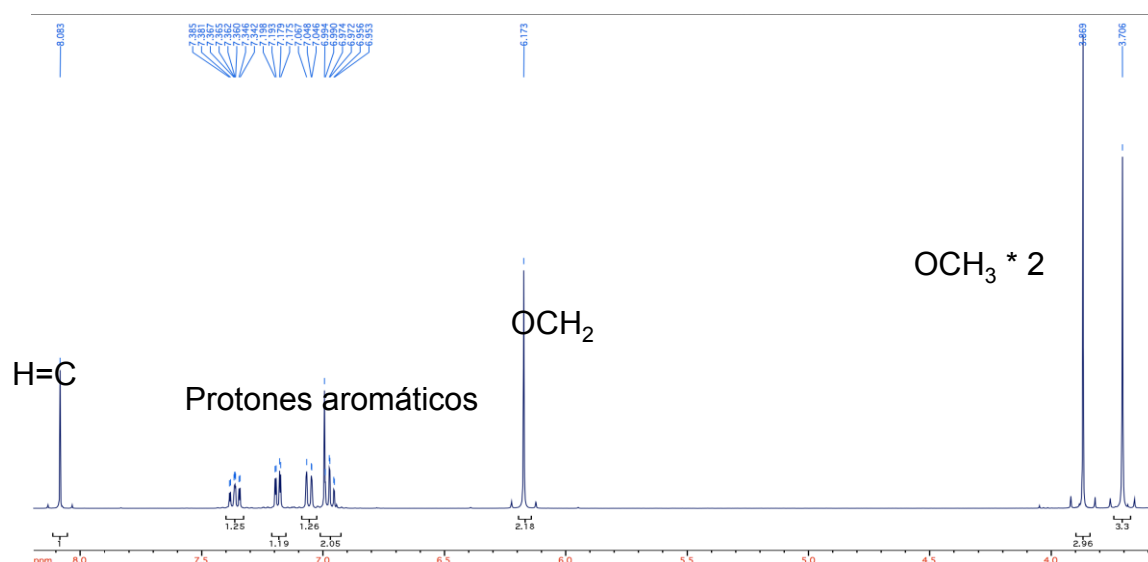


Figura 18. Espectro 1H-400MHz obtenido en DMSO-d6

Fuente: La autora.

El detalle de los protones aromáticos revela la presencia de protones aromáticos vecinales y un protón aromático aislado (Figura 19), lo cual demuestra la existencia de un par de anillos aromáticos, uno con un único protón y el otro con cuatro protones, los cuales son vecinales debido a la presencia de 4 multipletes, uno por cada protón. Esto a su vez indica que los dos sustituyentes son distintos entre sí, se sugiere que uno de ellos sea un grupo metoxilo.

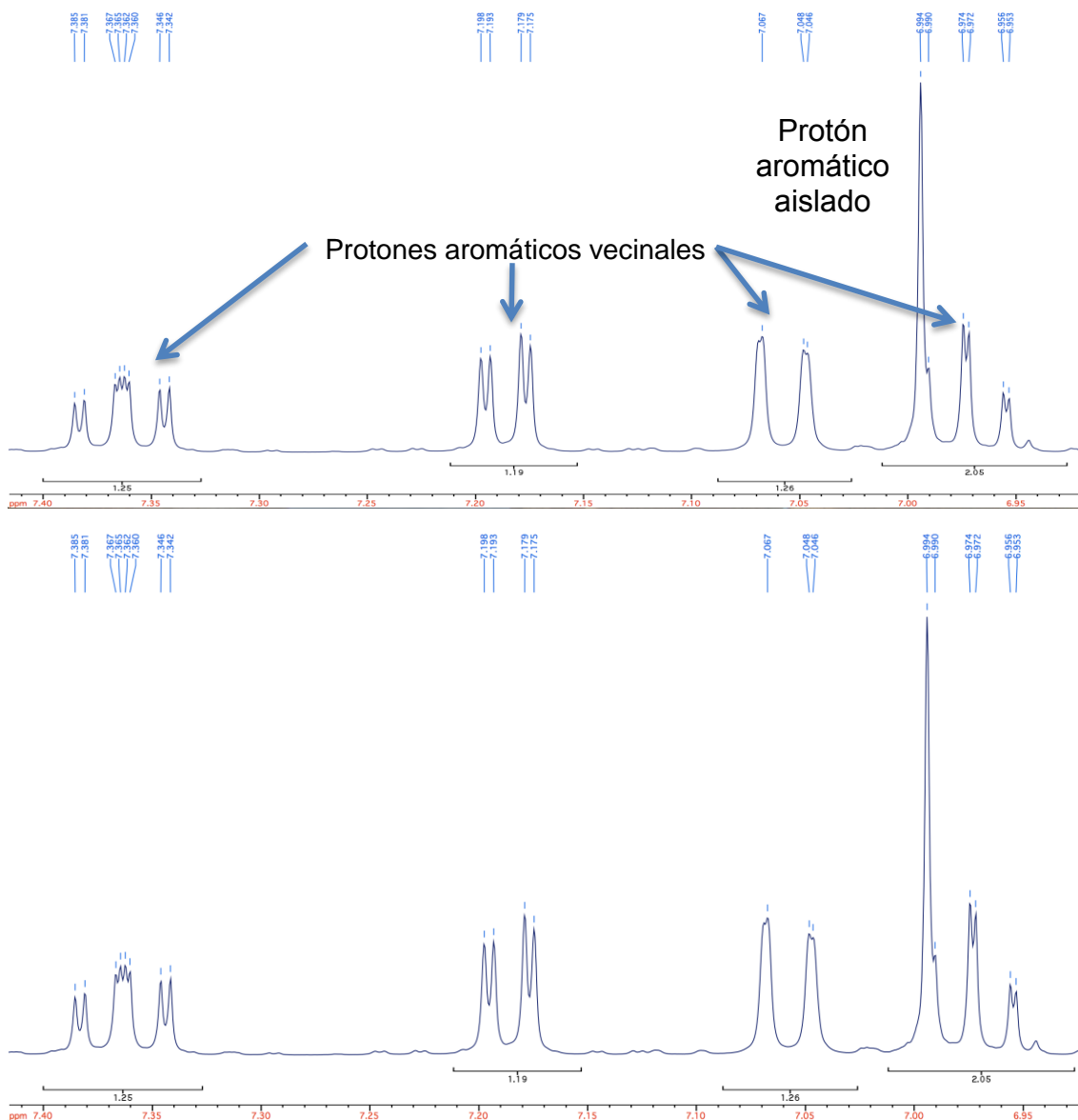


Figura 19. Espectro ^1H -400MHz obtenido en DMSO-d_6
Fuente: La autora

El espectro de ^{13}C -100MHz (Figura 20) revela la presencia de 18 carbonos, corrobora la presencia de los protones aromáticos, además muestra la presencia de un grupo carbonilo. La existencia de un grupo metileno unido a oxígeno sugiere la presencia de un anillo dioxolano. El número de hidrógenos por tanto que se obtienen del protón es de 12. Utilizando el peso molecular obtenido en MS podemos sugerir que la molécula cuenta con 6 átomos de oxígeno. Por tanto su fórmula molecular será $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_6$.

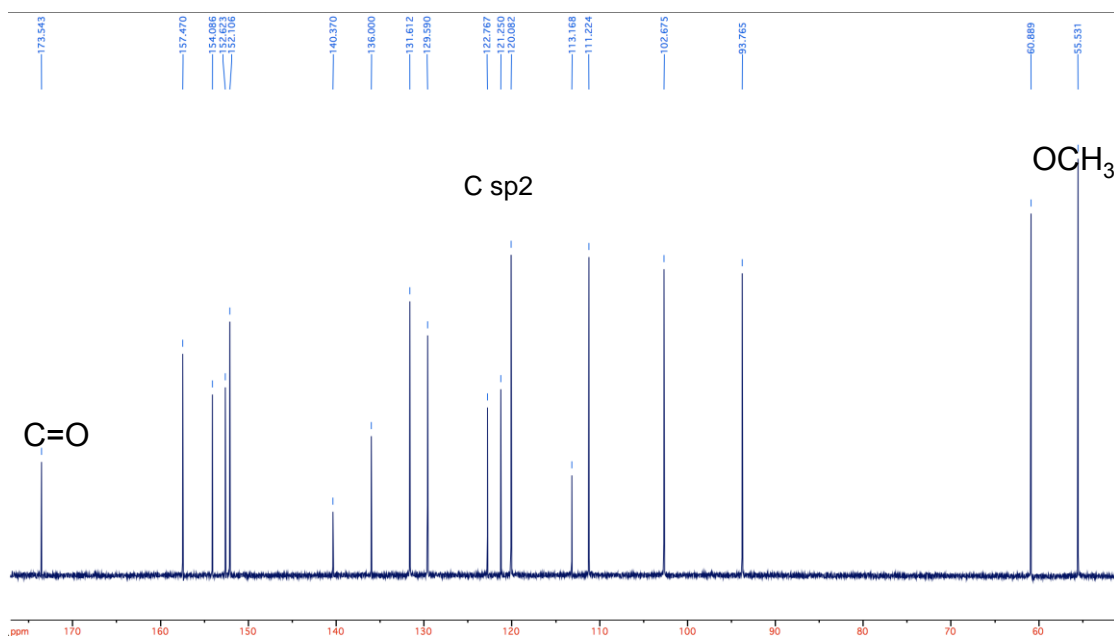


Figura 20. Espectro ^{13}C -100MHz obtenido en DMSO-d6
Fuente: La autora

Comparando la información espectroscópica (Figuras 16 a la 20), confirmamos que la sustancia es **tlatlancuayin** (Figura 21), un isoflavonoide previamente encontrado en esta misma especie y reportado como 2',5-dimethoxy-6,7-methylenedioxisoflavone por Valentová *et al.*, 2011. Los datos espectrales se detallan en la tabla 14.

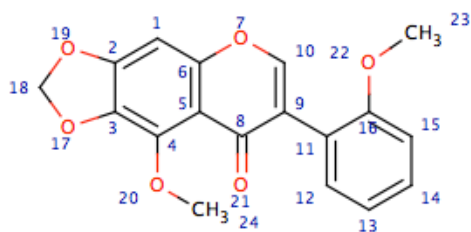


Figura 21. Estructura química de la tlatlancuayina aislada de *Iresine herbstii*
Fuente: La autora

Alfonso y Guido en 1983 reportaron que la isoflavona tlatlancuayin posee una importante actividad antioxidante al capturar radicales de oxígeno libre, contribuye a regenerar las células y también es un poderoso agente antimicrobiano (citado por Dipankar, Murugan, & Uma, 2011).

Tabla 14. Asignación espectral de tlatlanuayina aislada de *Iresine herbstii* (^1H y ^{13}C)

ÁTOMO	δH (ppm)	δC (ppm)	ÁTOMO	δH (ppm)	δC (ppm)
1	6.99	93.78	12	7.19	131.63
2	----	152.49	13	6.97	120.10
3	----	136.02	14	7.36	129.61
4	----	140.39	15	7.05	111.24
5	----	113.18	16	----	157.49
6	----	153.98	18	6.17	102.69
8	----	173.56	23	3.71	55.54
9	----	122.9	24	3.87	60.90
10	8.08	152.13			
11	----	121.27			

Fuente: Autora

CONCLUSIONES

- Mediante RMN y CG-MS, se determinó la presencia de un isoflavonoide llamado tlatlancuayina ($C_{18}H_{12}O_6$) en el extracto de acetato de etilo de *Iresine herbstii*, no es la primera vez que se reporta la presencia de éste compuesto en ésta especie.
- El extracto desclorofilado de acetato de etilo presenta una actividad antibacteriana de 62.5ug/ml contra *S.aureus*. Se considera que si un extracto o compuesto presenta una CMI <100 µg/mL la actividad antimicrobiana es buena.
- La especie *I. herbstii* demostró actividad antioxidante in-vitro, presumiblemente debido a la presencia de compuestos fenólicos de tipo isoflavonoídicos como tlatlancuayin.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio del resto de fracciones de *Iresine herbstii*, para aislar otros compuestos de interés.
- Efectuar más pruebas al compuesto de tipo isoflavonoide tales como IR y bioactividad para establecer de una manera más exacta su estructura y sus propiedades medicinales.
- Continuar realizando investigaciones con otras especies promisorias del sur del Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Rosario-Argentina: Corpus.
- Alvarado Vásquez , M. A., Salcedo Martínez, S. M., & Vargas, L. V. (2011). La Familia Amaranthaceae En El Estado De Nuevo León. Planta. Una publicación de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Andrade M., J. M., Armijos R., C., Malagón A., O., & Lucero M., H. (2009). Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas. Loja-Ecuador.64p.: Ediciones UTPL.
- Armijos, C., Bracco, F., Vidari, G., & Malagón, O. (2012). Plantas sagradas y psicoactivas usadas por los saraguros en la reegión sur del Ecuador. Loja: Ediloja.154 pp.
- Beltrán, J. (. (2001). Pueblos Indígenas y Tradicionales y Áreas protegidas: Principios Directrices y Casos de Estudio. Gland, Suiza y Cambridge, UK y WWF Internacional, Gland, Suiza. xii + 139pp.: UICN.
- Benítez, L., & Garcés, A. (1993). Culturas ecuatorianas ayer y hoy. Quito.231pp: Abya-Yala.
- Bianchi, A. a. (1993). Plants in association with ayahuasca . Jahrbuch für Ethnomedizin. 21–42. .
- CAAM. (1995). Liniamientos para la estrategia de conservación y uso de la biodiversidad del Ecuador. Quito -Ecuador: Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. 52pp.
- Cai, Y. S. (2005). HPLC characterization of betalains from plants in the Amaranthaceae. . J.Chromatograp. Sci. 43: 454–460. .
- Cai, Y., Sun, M., & and Corke, H. (2001). Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the Amaranthaceae. *J. Agri. and Food Chem.* 49: 1971–1978.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *J.Agric. Food Chem.* 51: 2288–2294.
- Cartuche, J., Guamán, M., Gualán, I., Guamán, D., Japón, L., & Lozano, L. (2003). El uso de las plantas medicinales en las prácticas ancestrales de curación y/o sanación de enfermedades del pueblo Saraguro. Dirección Provincial de Salud de Loja. Loja: Kapak Killa Raymi.

- Castillo García, E., & Martínez Solís, I. (2007). Manual de Fitoterapia. Barcelona, España: Elsevier-Masson. 506pp.
- Céline V, P. A.–C. (2009). Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *J. Ethnopharmacol.* 123: 413–422.
- Cerón, C. (2005). Sistemática, Etnobotánica y Métodos de Estudio en el Ecuador. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Cheers, G. (2006). Botánica. Guía ilustrada de plantas. España: h.f.ullmann.
- Chistian, G. D. (2009) . Química Analítica. México: McGraw-Hill, 828pp.
- De Feo, V. (2003). Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. *J. Ethnopharmacol.* 85: 243–256 .
- De la Torre, L., Naverrete, H., Muriel M, P., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Quito: Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus.
- Dipankar, C., & Murugan, S. (2012). Investigation On Phytochemicals And Antibacterial Activity Of The Leaf And Stem Extracts Of Iresine Herbstii. *Int J Pharm Bio Sci* 2012 Oct; 3: 697 - 705.
- Dipankar, C., Murugan, S., & Uma, D. (2011). Review On Medicinal And Pharmacological Properties Of Iresine Herbstii, Chrozophora Rottleri And Ecbolium Linneanum. *Afr J Tradit Complement Altern Med*:124-129 124.
- Dobkin De Rios, M. (1977). Plant hallucinogens and the religion of the Mochica-an ancient Peruvian people. *Economic Botany.* 31: 189–203.
- Espinoza, R. (1997). Estudios botánicos en el Sur del Ecuador. Herbario-Loja Reinaldo Espinosa: Universidad Nacional de Loja, Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Freire, A. (2004). Botánica Sistemática Ecuatoriana, Missouri Botanical Garden. St. Louis Missouri: Fundacyt, Qcne, Rlb Y Funbotanica 209pp.
- Holetz FB, P. G. (2002). 22. Holetz FB, Pessi Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* , 97: 1027-1031.
- Jorgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from The Missouri Botanical Garden* 75: 1-1181.

- Khare, C. (2007). *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. Indian: Springer.
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica: Métodos en el Estudio de Productos Naturales*. Lima-Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 300pp.
- Lozano, P., Bussmann, R., & Navarrete, H. (2005). *Memoria del II Congreso de Conservación de la Biodiversidad de los Andes y Amazonía y IV Congreso Ecuatoriano de Botánica*. Loja: UTPL.
- Mahabir, G. (2006). *The Future Of Products Of The Andean High Plateau And Central Valleys: Medicinal Plants Originating In The Andean High Plateau And Central Valleys Region Of Bolivia, Ecuador And Peru*. United Nations Industrial Development Organization Investment And Technology Promotion Branch.
- Ministerio del Ambiente, E. y. (2001). *La biodiversidad del Ecuador. Informe 2000*, editado por Carmen Josse. Quito: Ministerio del Ambiente, EcoCiencia y Unión Mundial para la Naturaleza (UICN).
- Mittermeier, R. (1988). Primate diversity and the tropical forest. Case studies from Brazil and Madagascar and the importance of the megadiversity countries. (E. O. Wilson, & F. M. Peter, Edits.) *Biodiversity*. The National Academy Press, Pp. 145-154.
- Montúfar, R. A. (2000). *Amaranthaceae*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Naranjo, P., & Crespo, A. (1997). *Etnomedicina. Progresos Italo-Latinoamericanos*. Quito: Abya-Yala.
- Nencini C, C. F. (2006). Affinity of Iresine herbstii and Brugmansia arborea extracts on different cerebral receptors. *J. Ethnopharmacol.* 105: 352-357 .
- Peguero, B. (1998). *Estudio Etnobotánico de las comunidades ubicadas dentro y en la periferia del parque nacional Juan Bautista Pérez Rancier (valle nuevo)*. <http://www.parksinperil.org/files/parte.pdf>.
- Rios, M., Koziol, M. J., Borgtoft Pedersen, H., & Granda, G. (2007). *Plantas útiles del Ecuador : aplicaciones, retos y perspectivas/Useful Plants of Ecuador: Applications, Challenges, and Perspectives*. Quito -Ecuador.: Abya-Yala.
- Schmidt, C., M, F., M, G., F, G., S, L., E.M.M, F., . . . I, a. M. (2009). Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 122: 523–532.
- Schultes, R. H. (1973). *The Botany and Chemistry of Hallucinogens*. Charles C. Thompson, .

- Sebold, D. (2003). Levantamento etnobotânico de plantas de uso medicinal no município de Campo Bom. Rio Grande do Sul, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Master thesis. 107. .
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá,D.C.,Colombia.: Convenio Andrés Bello -CYTED, 247pp.
- Sierra, I., Pérez, D., Gómez, S., & Morante, S. (2010). Análisis Instrumental. España: Gesbiblo S.L.
- Skoog, D. A., Crouch, S. R., & James Holler, F. (2008). Principios de análisis instrumental. México: CENGAGE Learning, 1038pp.
- Srithi, K., Henrik, B., P. ., Prachaya, S., & Chusie, T. (2009). Medicinal plant knowledge and its erosion among the Mien (Yao)in northern Thailand. J. Ethnopharmacol. 123: 335–342.
- Tene, V., Malagón, O., Vita, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (April 2007). An Ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora Chinchipe. Journal of Ethnofarmacology. Volume 111, Issue 1, 63-81pp.
- Vasinova, M., Marek , J., Vanco, J., & Suchy, V. (2004). Tlatlancuayin. Acta Crystallograph-ica. Section E:Structure Reports Online. E60: 2019–2021.
- Weinenger, S., & Stermitz, F. (1988). Química Orgánica. Barcelona: Reverté S.A.