



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

**Extracción, aislamiento, caracterización y actividad biológica de
metabolitos secundarios de *Hedyosmum strigosum* con flores
masculinas en la provincia de Loja**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Solano de la Sala Lozano, Estefany Sofía

DIRECTOR: Morocho Zaragocín, Segundo Vladimir, PhD

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

PhD

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Extracción, aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios de *Hedyosmum strigosum* con flores masculinas en la provincia de Loja” realizado por Solano de la Sala Lozano Estefany Sofía, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 2015

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Estefany Sofía Solano de la Sala Lozano declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación Extracción, aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios de *Hedyosmum strigosum* con flores masculinas en la provincia de Loja”, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Segundo Vladimir Morocho Zaragocín 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)

Autor Solano de la Sala Lozano Estefany Sofía

Cédula 1105172496

DEDICATORIA

El presente trabajo de fin de titulación es dedica con mucho amor.

A Dios principalmente por permitirme cumplir una meta más en mi vida y por llenarme de sabiduría para la realización de esta investigación.

A mis padres Carmita y Alberto que son mi mayor orgullo y son a quienes debo mi profesión, a mis hermanas Diana, Verónica, Mónica y Paola por el apoyo y los consejos brindados durante este camino.

A mi abuelita que aún me acompaña, por su compañía, sus palabras y su inmenso cariño.

Por todos ustedes queridos familiares he llegado hasta aquí, estoy infinitamente agradecida y les dedico con mucha alegría este trabajo, fruto de mi esfuerzo y dedicación.

Estefany Sofía Solano de la Sala Lozano

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a quienes de manera directa e indirectamente han hecho posible la culminación de una de las etapas primordiales dentro del ámbito profesional.

Primeramente agradezco infinitamente a Dios por mantenerme con fe, sabiduría y con las fuerzas necesarias para terminar mi carrera universitaria.

A mis padres Carmita y Alberto por su apoyo, comprensión, amor y por creer en mí. A mis queridas hermanas Diana, Verónica, Mónica y Paola por ser el soporte para seguir siempre adelante y por los consejos brindados.

A mi director de tesis PhD Vladimir Morocho Zaragocín quien con paciencia pudo llenarme de conocimientos para poder realizar de la mejor manera este trabajo.

A Cristina Fierro estudiante de la Universidad por su ayuda prestada en la realización de mi trabajo, y a mis compañeros de laboratorio con los cuales se intercambiaron conocimientos.

Finalmente agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja y al Departamento de Química Aplicada por la oportunidad de realizar mi trabajo de fin de titulación y por permitirme adquirir más conocimientos.

Estefany Sofía Solano de la Sala Lozano

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
LISTA DE ANEXOS	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Plantas Medicinales	6
1.2. Familia Chloranthaceae.....	7
1.3. Descripción del género: <i>Hedyosmum</i>	8
1.3.1. <i>Taxonomía</i>	9
1.4. Terpenos.....	9
1.5. Ácidos Orgánicos.	10
1.6. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	11
1.6.1. <i>Principios de Espectroscopía RMN</i>	12
1.7. Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM).	14
1.8. Microdilución en caldo.	14
1.9. Enfermedades Infecciosas.....	15
1.10. Bacterias.....	15
1.10.1. <i>Bacterias Gram Positivas</i>	15
1.10.2. <i>Bacterias Gram Negativas</i>	16
1.11. Hongos.....	18

1.11.1. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	19
1.11.2. <i>Trichophytum rubrum</i>	19
CAPÍTULO II	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. Esquema de metodología utilizada.....	21
2.2. Recolección y selección del material vegetal.....	21
2.3. Obtención de extractos totales.	22
2.4. Desclorofilación.....	22
2.5. Fraccionamiento en cromatografía en columna de extracto de acetato de etilo.	23
2.5.1. <i>Cromatografía de capa fina</i>	24
2.5.2. <i>Purificación de fracción</i>	24
2.5.3. <i>Hidrólisis</i>	24
2.5.4. <i>Caracterización de los alcoholes</i>	25
2.5.5. <i>Índice de kovats</i>	25
2.5.6. <i>Caracterización del ácido</i>	26
2.6. Fraccionamiento en cromatografía en columna extracto en Hexano.....	26
2.6.1. <i>Purificación de la fracción ES062/37</i>	26
2.7. Caracterización química y estructural de las fracciones.	26
2.7.1. <i>Punto de fusión</i>	26
2.7.2. <i>Factor de retención</i>	26
2.7.3. <i>Resonancia Magnética Nuclear</i>	27
2.7.4. <i>Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM)</i>	27
2.8. Determinación de actividad antimicrobiana.....	29
2.8.1. <i>Microorganismos de prueba</i>	29
2.8.2. <i>Preparación de las muestras</i>	30
2.8.3. <i>Preparación del cultivo overnight</i>	30
2.8.4. <i>Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias</i>	30

2.8.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI)	30
CAPÍTULO III	32
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	33
3.1. Extractos obtenidos de la especie <i>Hedyosmum strigosum</i> Todzia	33
3.2. Fraccionamiento del extracto de Acetato de etilo de <i>Hedyosmum strigosum</i>	33
3.2.1. Fracción ES006/10.....	34
3.2.1.1. Hidrólisis fracción ES018/13.	35
3.2.3. Fracción ES020/16.....	35
3.2.4. Fracción ES022/16 del ácido.....	37
3.3. Fraccionamiento del extracto de Hexano de <i>Hedyosmum strigosum</i>	39
3.3.1. Fracción ES062/37.....	39
3.4. Determinación de la Actividad Antimicrobiana.....	42
3.4.1. Determinación de la actividad antifúngica.....	42
3.4.2. Determinación de la actividad antibacteriana.	43
CONCLUSIONES.....	44
ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Muestra Botánica de <i>Hedyosmum strigosum</i>	8
Figura 2. Estructura química de Paeoniflorina.....	10
Figura 3. Estructura química del Ácido Cumárico.....	11
Figura 4. Diagrama de un espectrómetro de RMN.....	13
Figura 5. <i>Enterococcus faecalis</i>	15
Figura 6. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Figura 7. <i>E. coli</i>	16
Figura 8. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
Figura 9. <i>Salmonella typhimurium</i>	17
Figura 10. <i>Proteus vulgaris</i>	18
Figura 11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Figura 12. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	19
Figura 13. <i>Trichophytum rubrum</i>	19
Figura 14. Esquema del Desarrollo de la Investigación.....	21
Figura 15. Desclorofilación del extracto de Acetato.....	23
Figura 16. Columna del extracto desclorofilado de Acetato.....	24
Figura 17. Factor de Retención.....	27
Figura 18. Método de análisis de la columna DB-5MS.....	28
Figura 19. Método de análisis de la columna DB-5MS.....	29
Figura 20. CCF de las fracciones del extracto de AcOEt.....	34
Figura 21. CCF fracción ES006/10.....	35
Figura 22. Espectro de CG-EM de Compuesto ES020/16 (Borneol).....	36
Figura 23. Borneol.....	36
Figura 24. Espectro de CG-EM de Compuesto cis-pinocarveol.....	37
Figura 25. Cis-Pinocarveol.....	37
Figura 26. Ácido 4-Hidroxicinámico.....	38

Figura 27. Estructura química de (1R, 2R, 4S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate.....	38
Figura 28. Estructura química de (1R, 2R, 5R)-6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptan-3-yl(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate.....	39
Figura 29. CCF fracción 081/45 proporción 8:2.....	40
Figura 30. Molécula de la fracción ES081/45 methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate	40
Figura 31. Espectro de CG-EM de Compuesto ES081/45	41
Figura 32. RMN de compuesto ES081/45.....	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de la Columna Capilar Fracción ES020/16	27
Tabla 2. Características de la Columna Capilar Fracción ES081/45	28
Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación para bacterias	30
Tabla 4. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de <i>H. strigosum</i>	33
Tabla 5. Índice de Kovats de los compuestos identificados	35
Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria.....	42

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de compuesto 018/13.....	51
Anexo 2. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón compuesto 021/16	52
Anexo 3. Espectros de ¹³ C Resonancia Magnética Nuclear de compuesto 021/16.....	53
Anexo 4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Compuesto ES081/45	54

RESUMEN

Hedyosmum strigosum proveniente de la familia *Chloranthaceae* es un arbusto aromático de la región amazónica de los Andes de Ecuador. Esta especie es ampliamente utilizada en medicina popular como anticonvulsivante, antiséptico y antiinflamatorio. En el presente estudio se realizó una hidrólisis, del extracto de acetato de etilo, dónde se pudieron identificar dos moléculas, la primera compuesta por el alcohol cis-pinocarveol unido al ácido 4-hidroxicinámico, y la segunda molécula compuesta por el alcohol borneol unido al mismo ácido. En el extracto de hexano se identificó el compuesto de origen terpénico methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoato. Estos compuestos fueron caracterizados usando diferentes técnicas espectroscópicas: CCF, CG-EM y RMN. La actividad antimicrobiana de los extractos totales y del compuesto fue evaluada contra siete especies de bacterias y dos especies de hongos usando el método de microdilución en caldo. Los valores de CMI del extracto de acetato de etilo y hexano fueron de 15.62µg/mL para *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, los valores del extracto de Metanol fueron de 500µg/mL para *Trichophyton rubrum* y la fracción ES018/13 fue activo contra las bacterias gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con un CMI de 3.25µg/mL.

Palabras claves: *Hedyosmum strigosum*, *Chloranthaceae*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

ABSTRACT

Hedyosmum strigosum in the family Chloranthaceae is an aromatic shrub from the Andean Amazon of Ecuador. This species is widely used in folk medicine as an anticonvulsant, an antiseptic treatment, and an anti-inflammatory drug. In the present study there was realized a hydrolytic, of the extract of acetate of ethyl, where there could be identified two molecules, the first one composed by the alcohol cis-pinocarveol joined the acid 4-hydroxycinnamate, and the second molecule composed by the alcohol borneol joined the same acid. Using hexane as a solvent, the terpene methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate was identified. The components were characterized using different spectroscopic techniques: thin layer chromatography (TLC), gas chromatograph mass spectrometry (GC-MS), and nuclear magnetic resonance (NMR). The antimicrobial activity of the total extract and of each component were tested against seven different bacterial species and two fungal species using microdilution in liquid broth. The minimal concentration to inhibit (MCI) *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* were 15.62µg/mL using ethyl acetate as a solvent as well as hexane. The MCI value using methanol as a solvent to inhibit *Trichophyton rubrum* was 500µg/mL. The ES018/13 fraction of this extract had an MCI value of 3.25µg/mL against the gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*.

Keywords: *Hedyosmum strigosum*, Chloranthaceae, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban; este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia. Sin los recursos que le ofreció la naturaleza, el hombre no hubiera sobrevivido (Hernández et al., 1981).

El tema de las plantas medicinales es quizá tan antiguo como el hombre mismo, sin embargo, los conocimientos al respecto siempre han estado diseminados. A pesar de la invasión farmacológica mundial, las personas siguen recurriendo a los remedios vegetales para aliviar sus enfermedades comunes, por ello un esfuerzo por regresar a los productos naturales representa un aporte muy significativo ya que son un recurso que debe conocerse, usarse y cuidarse (Quezada, 2008).

Las plantas con actividad curativa son todas aquellas que contienen uno o más principios activos, los cuales, administrados en la dosis adecuada, producen un efecto curativo frente a las enfermedades del hombre y de los animales. El hecho de contener más de un principio activo hace que una planta medicinal pueda servir para tratar diferentes afecciones o trastornos (OMS, 2002).

La familia Chloranthaceae consta de 4 géneros: *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Ascarina*, con un total de 70 especies distribuidas en zonas tropicales y subtropicales (Cao et al., 2008).

Estudios anteriores en la familia Chloranthaceae han dado como resultado el aislamiento de varios compuestos de origen terpénico como: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos, siendo los componentes principales, también contiene flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas y esteroides (Su et al., 2008).

Hedyosmum strigosum, es conocida como quinillo, olloco esta especie es comestible y la infusión de sus hojas se bebe como agua aromática (Balslev et al. 2008).

En este contexto el presente estudio busca extracción, identificación y caracterización de metabolitos secundarios aislados de la especie *Hedyosmum strigosum*, con fines científicos y farmacológicos.

CAPÍTULO I

1. Marco Teórico

1.1. Plantas medicinales.

El uso de las plantas medicinales es muy antiguo y a ellas han recurrido casi todos los pueblos, desde los más primitivos hasta los más civilizados. El valor medicinal de las plantas curativas se debe a la presencia en sus tejidos de sustancias químicas conocidas como principios activos, que producen un efecto fisiológico (Vander, 1999).

Elaboran sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial para el organismo vivo. Son producto del metabolismo secundario de las plantas, no se encuentran en estado puro en las mismas, sino en forma de complejos cuyos componentes se complementan y se refuerzan en su acción sobre el organismo. Estas sustancias activas presentan un equilibrio fisiológico dentro de la planta y el organismo, debido a ello, resultan más asimilables por el cuerpo y carecen de efectos nocivos (Quezada, 2008).

Es indudable la importancia de las plantas y los árboles 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 (Núñez, 1982).

Ecuador ha dado origen a uno de los medicamentos más importantes para la humanidad, a través de la *Chinchona*, 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 (*Chondodendronspp.*, *Strychnossp*), utilizado en cirugías del ojo y como anestésico y el Modulador Biológico de la respuesta inmune (BIRM), producido de la Dulcamara (*Psychotriavidris*, *Kalanchoepinnata* 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. 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 (Buitrón, 1999).

Se han identificado algunas especies con propiedades medicinales que se han empleado tradicionalmente por los distintos grupos étnicos y que en la actualidad se comercializan. Entre ellas destacan las siguientes: la sangre de drago (*Crotonlechleri*), usada principalmente por sus propiedades cicatrizantes y vigorizantes, la uña de gato (*Uncaria guianensis*, *U. tomentosa*), por sus propiedades antiinflamatorias y para combatir dolencias renales, y el chukchwasu (*Maytenuskrukovii*, *M. laevis*), por sus propiedades antirreumáticas, antidiarreicas y vermífugas plantas usadas como estimulantes como la guayusa (*Ilex guayusa*) (Buitrón, 1999).

La diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello se debe conservar el ambiente que las sustenta. Esta situación ha originado una preocupación creciente por la biodiversidad y por el estado natural de las plantas y árboles con propiedades curativas. Actualmente, el deterioro del ambiente causado por la deforestación, el uso indiscriminado de agroquímicos, la contaminación del aire y del agua y otros factores están agravando las condiciones ecológicas donde crecen miles de especies con potencial medicinal, en última instancia muchas de estas especies desaparecen aún antes de haberlas identificado o haberlas estudiado (Quezada, 2008).

1.2. Familia chloranthaceae.

Chloranthaceae es una pequeña familia con cuatro géneros: *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Ascarina* y *Hedyosmum*, y alrededor de 70 especies que se encuentran en áreas tropicales y subtropicales de América y zonas tropicales de Asia oriental, Polinesia, Nueva Zelanda y Madagascar (Trentin et al., 1999).

Investigaciones fitoquímicas llevadas a cabo sobre esta familia han demostrado la presencia estructural y biogénica de diversos metabolitos secundarios, tales como flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, esteroides, ligninas y fenoles (Trentin et al., 1999).

Esta familia es considerada primitiva entre angiospermas, comparte la presencia de las células secretoras en las hojas y tallos como rasgo característico común. Por ejemplo, *Chloranthus* y *Hedyosmum*, se utilizan como plantas ornamentales o medicinales y con fines alimentarios, como las bebidas (Kawabata et al., 1981).

Varios extractos y algunos compuestos derivados de plantas de la familia Chlorantaceae, poseen una acción anti-inflamatoria y antimicrobiana, se ha observado que estos compuestos interfieren con algunos eventos del proceso inflamatorio como en la vía metabólica del ácido araquidónico, la vía del óxido nítrico o interfieren con el Factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), así como también inhiben la síntesis o activación de citosinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y quimiocinas (Calixto et al., 2004).

1.3. Descripción del género: *Hedyosmum*.

El nombre *Hedyosmum* deriva del griego: olor dulce, en alusión al agradable aroma de las hojas (Reitz, 1965).

Especialmente son árboles y arbustos, con una especie herbácea en el lejano oriente. En el Nuevo Mundo se encuentran especies desde el sur de México hasta Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil y Paraguay, así como en las Indias Occidentales (Todzia, 1987).

La mayor densidad de especies se produce en lo húmedo del norte de los Andes. Sus características principales de distinción son sus hojas opuestas con bases de los pecíolos, apéndices estipulares a lo largo del margen distal de la vaina, inflorescencias estaminadas compuestas de muchas flores de estambres individuales, e inflorescencias pistiladas compuestas de flores bracteadas solitarias o agrupadas (Todzia, 1987).

En la figura 1 se observa la muestra botánica de la especie estudiada *Hedyosmum strigosum*.



Figura 1. Muestra Botánica de *Hedyosmum strigosum*
Fuente: Herbario UTPL

Crece en las montañas, en América se encuentra principalmente, *H. angustifolium* y *H. scabrum*, son pequeños árboles que crecen a 12 metros de altura, se dan en la altitud, en selvas subtropicales cálidas en la región del Chapare, Provincia Carrasco, de Bolivia. El primero es conocido comúnmente como Chemelaque, Malva y Hierba de la vida, y el segundo como Matico. Las hojas de ambas especies se utilizan en la medicina popular como antirreumático y en el tratamiento de frío (Lorenzo et al., 2002).

Se han realizado estudios fitoquímicos de algunas especies del género *Hedyosmum*, por ejemplo de *H. angustifolium*, se identificaron nuevos sesquiterpenos empleados para enfermedades como leishmaniasis (Acebey et al., 2010).

H. orientale es una especie que crece en China, las investigaciones químicas de este género han conducido al aislamiento de sesquiterpenos y flavonoides glicosídicos (Su et al., 2008).

De *H. bonplandianum* se obtuvo un nuevo flavonoide glicosídico, caracterizado por una actividad analgésica significativa (Cárdenas et al., 1993).

1.3.1. Taxonomía.

Reino: Plantae

Filo: Angiospermophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Chloranthales

Familia: Chloranthaceae

Género: *Hedyosmum*

Especie: *strigosum*

Nombre Científico: *Hedyosmum strigosum* Todzia

1.4. Terpenos.

Los terpenos son compuestos orgánicos producidos por las plantas, caracterizados por esqueletos carbonados que contienen diez átomos de carbono o múltiplos de diez. Los monoterpenos tienen esqueletos de carbono con diez átomos de carbono. Los compuestos afines llamados sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, entre otros,

tienen quince, veinte o treinta átomos de carbono y hay múltiples adicionales del esqueleto terpénico (Smith & Cristol, 1972).

La gran diversidad estructural de los terpenos dificulta resumir las características comunes de éstos compuestos, pues no solamente se trata de la variedad en los grupos funcionales, sino del número de átomos de carbono que conforman. Entre los primeros grupos encontramos, los oxigenados ocupan un lugar prioritario (alcoholes, ésteres, éteres, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, cetales, etc.) y le siguen funciones con azufre, halógenos (principalmente encontrados en compuestos de origen marino) y nitrógeno, en cuyo caso la molécula se la clasifica como alcaloide. Los terpenos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y su frecuencia y abundancia están íntimamente ligados a factores genéticos y climáticos (Marcano & Hasegawa, 2002).

Existen algunos terpenos que son productos aromáticos de ciertas plantas, como el pineno, mentol etc. (Peña et al., 2004).

Además los terpenos pueden encontrarse en la fuente vegetal solos o formando glicósidos. Estos son más frecuentes para triterpenos (conocidos como saponinas) aunque hay algunos ejemplos de glicósidos de terpenos inferiores, como el 1-glucosilmircenol, aislado de *Tagetes patula*, fuente comercial de β -caroteno y la paeoniflorina (figura 2), un hemi-orto-éster de diez átomos de carbono, que se aísla como el glucósido correspondiente, a partir de *Paeonia albiflora*, utilizada en la medicina tradicional japonesa como antialérgico, analgésico, antiespasmódico y sedante (Marcano & Hasegawa, 2002).

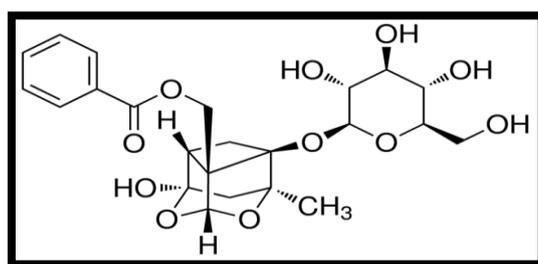


Figura 2. Estructura química de Paeoniflorina
Fuente: La autora, 2015

1.5. Ácidos orgánicos.

Los ácidos orgánicos (RCOOH) se hallan muy difundidos en la naturaleza, se encuentran con frecuencia en frutas; por ejemplo, el ácido cítrico de los frutos cítricos,

el ácido benzoico en arándanos agrios y las ciruelas verdes, el ácido sórbico en la fruta del fresno. El galato de metilo el cual se encuentra de las hojas de diversos géneros de plantas (Ocampo et al., 2008).

Los ácidos orgánicos, como los alcoholes, tienen puntos de ebullición relativamente altos en relación con su peso molecular a causa de los enlaces de hidrógeno. Las estructuras diméricas y poliméricas, superiores en estado líquido, son la causa de que el ácido tenga un peso molecular elevado (Griffin, 1981).

Los ácidos orgánicos se caracterizan por la presencia de un átomo de hidrógeno polarizado positivamente y son de dos tipos principales: aquellos ácidos como el metanol y el ácido acético que contienen un átomo de hidrógeno unido a un átomo de oxígeno electronegativo (O-H) y aquellos como la acetona, que contienen un átomo de hidrógeno unido a un átomo de carbono al lado de un enlace C=O (O=C-C-H) (McMurry, 2012).

Los ácidos orgánicos son de gran importancia en la salud humana, por ejemplo, el ácido cumárico (figura 3) posee actividades antioxidantes, antiinflamatorias y la capacidad de quelar diversos metales ya que están estrechamente relacionados con su estructura química. Los ácidos también pueden inhibir la expresión del factor de transcripción denominado receptor activado por proliferadores de los peroxisomas, el cual está involucrado en el proceso de adipogénesis y en la acción sistémica de la insulina (Gil, 2010).

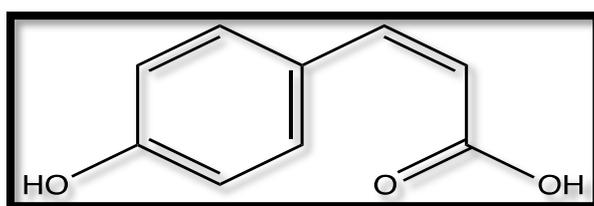


Figura 3. Estructura química del ácido cumárico
Fuente: La autora, 2015

1.6. Resonancia magnética nuclear (RMN).

La resonancia magnética nuclear (RMN) es otro de los métodos espectroscópicos capaces de proporcionar información acerca de la estructura de los polímeros biológicos, sobre las interacciones entre moléculas y sobre los movimientos moleculares.

Sus ventajas especiales según (Freifelder, 2003) son:

1. Que la teoría es lo suficientemente buena como para poder calcular la disposición detallada de los átomos a partir de los espectros de RMN, al menos en principio;
2. Que se pueden localizar los átomos de hidrógeno, átomos que quedan fuera del alcance de los análisis de difracción con rayos X; y
3. Que se pueden examinar separadamente distintos átomos (por ejemplo, H, N, C y P). Para las moléculas pequeñas (hasta 500 de peso molecular), la RMN ha tenido un éxito extraordinario en la determinación de estructuras.

1.6.1. Principios de espectroscopía RMN.

La técnica de RMN se sirve de la propiedad del spin (momento angular y su momento magnético asociado) poseído por los núcleos cuyo número atómico y número másico no son pares (Billmeyer, 2004).

La aplicación de un campo magnético fuerte al material que contiene tales núcleos, desdobra a los niveles de energía en dos, que se representa en estados con spin. Los equipos de RMN pueden llegar a ser muy complejos, para ayudar en la interpretación han sido de gran importancia dos modificaciones experimentales (figura 4) (Billmeyer, 2004).

La primera es la utilización de campos magnéticos de elevada intensidad, en el intervalo de 60.000 a 220.000 gauss, en comparación a los de algunos millares de gauss, utilizados en los trabajos iniciales con líneas anchas. Se utilizan imanes superconductores para obtener las máximas intensidades de campo. La resolución se ve incrementada para campos de fuerza más intensos y es de gran ayuda en la interpretación de los espectros (Billmeyer, 2004).

El segundo método desarrollado recientemente, la doble resonancia o desacoplamiento de spin, suministra simplificaciones notables en el espectro. Se utiliza para ellos un segundo campo de radio frecuencia, que tiene la propiedad de eliminar el acoplamiento, y de destruir los espectros de multipletes originando otros más sencillos (Billmeyer, 2004).

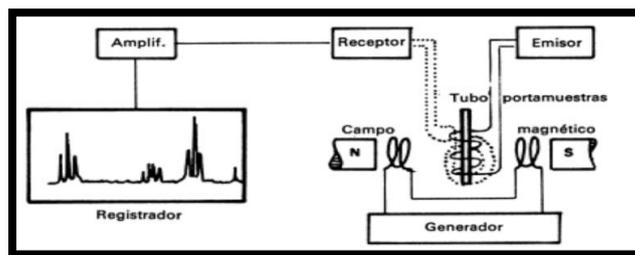


Figura 4. Diagrama de un espectrómetro de RMN
Fuente: Pickering, 1980

Los experimentos unidimensionales como el ^1H -RMN y el ^{13}C solo miden las interacciones entre un mismo tipo de átomos, mientras que los experimentos multidimensionales permiten capturar las correlaciones entre diferentes tipos de átomos (Günther, 1995).

A continuación se detalla una descripción de los tipos de espectros más utilizados y de la información estructural:

^1H - RMN: Las señales de los protones en estos espectros, se registran como máximo de absorción individuales correspondientes a los núcleos no equivalentes. Un espectro de este tipo proporciona cuatro elementos de información importantes: el número de señales distintas, el desplazamiento químico, el patrón de desdoblamiento y la integración de la intensidad de las señales (Fox & Whitesell, 2000).

^{13}C - RMN: Un espectro de este tipo proporciona dos elementos básicos de información: el número de señales distintas, que corresponde al número de tipos diferentes de átomos de carbono, y el desplazamiento químico de cada señal, que está determinado por el entorno molecular de cada carbono (Fox & Whitesell, 2000).

COSY: Experimento bidimensional homonuclear (RMN 2D) que correlaciona todos los desplazamientos químicos de protones sobre carbonos contiguos, con lo cual es posible ubicar los protones vecinos que están acoplados (Marcano & Hasegawa, 2002).

DEPT: Técnica basada en la transferencia de polarización, lo que hace posible distinguir entre las señales CH_3 , CH_2 , CH , y carbonos cuaternarios. Es decir, que el número de hidrógenos unidos a cada carbono en una molécula puede determinarse (McMurry, 2012).

HMBC: Informa la correlación entre protones unidos a carbono o heteroátomo y carbonos separados por dos y tres enlaces (Marcano & Hasegawa, 2002).

NOESY: Es un experimento de RMN bidimensional que utiliza efecto NOE (Overhauser) el cual permite determinar la cercanía espacial de los protones de una molécula (Pavia, 2009).

HSQC: Es un experimento bidimensional heteronuclear que provee un buen diagnóstico bajo condiciones óptimas, y con ello poder establecer que protones están unidos a que carbonos en la molécula (Sem, 2007).

1.7. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).

La cromatografía de gases permite controlar y fijar los distintos parámetros del detector: energía de ionización, voltaje de las lentes, resolución de las masas, ganancia del fotomultiplicador, además de seleccionar el modo de ionización (Valcárcel et al., 2000).

El procedimiento consiste en introducir la muestra en el sistema a través del inyector en el cromatógrafo de gases, donde se separan en la columna cromatográfica antes de pasar al espectrómetro de masas. En él, los compuestos se ionizan, se clasifican en función de su relación masa/carga y se detectan. La información se transfiere desde el detector hasta el sistema de tratamiento de datos para su almacenamiento y posterior procesamiento (Valcárcel et al., 2000).

1.8. Microdilución en caldo.

La técnica de microdilución en caldo es de gran utilidad práctica para el estudio de las CIM. Ni es más que la técnica de dilución en medio líquido, realizada en placas de poliestireno, con microposillos en lugar de tubos. Existen comercializados diversos paneles con varias columnas de posillos, cada una con diferentes antimicrobianos. Los posillos de cada columna contienen concentraciones crecientes de un antibiótico en forma de suspensión liofilizada o desecada, por lo que solo debe añadirse el medio de cultivo líquido en el que se ha efectuado una suspensión de la bacteria a estudiar (generalmente alrededor de 200uL de medio por posillo). Tras la incubación, se determina la CIM (Prats, 2007).

Como la macrodilución, la concentración inhibitoria mínima de cada antibiótico se lleva a una tabla que señala si el microorganismo es sensible o resistente; es decir, si la CIM del antibiótico es inferior o superior a la plasmática (Prats, 2007).

1.9. Enfermedades infecciosas.

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de morbimortalidad en el mundo. A pesar del importante progreso en la prevención, diagnóstico y tratamiento de las infecciones en los últimos 100 años, el control de las enfermedades infecciosas se mantiene como un desafío científico crucial, con implicaciones médicas y farmacológicas mundiales (Rocha et al., 2005).

1.10. Bacterias.

Las bacterias constituyen un grupo heterogéneo de organismos desde el punto de vista morfológico. Difieren de los eucariotas, además de su pequeño tamaño, porque carece de núcleo diferenciado; contiene un solo cromosoma, formado por un DNA circular, sin proteínas asociadas, carecen de retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondrias (Macarulla et al., 1994).

Las bacterias se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared. Un grupo, las denominadas gram positivas, sólo poseen peptidoglicano; el otro, las denominadas gram negativas, tienen adosada por fuera del peptidoglicano una membrana rica en lipopolisacáridos. Algunas bacterias tienen una cápsula rodeando la pared; también pueden poseer flagelos, que facilitan su movilidad, y fimbrias (*pili*), que desarrollan varias funciones, fundamentalmente de adherencia. En las bacterias, además del DNA cromosómico (nucleoide) puede existir DNA extra cromosómico formando plásmidos (Prats, 2008).

1.10.1. Bacterias gram positivas.

Enterococcus faecalis: Es una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa, que se encuentran formando cadenas cortas. En el ser humano causa principalmente infecciones de la vejiga y próstata (figura 5) (Guevara et al., 2000).

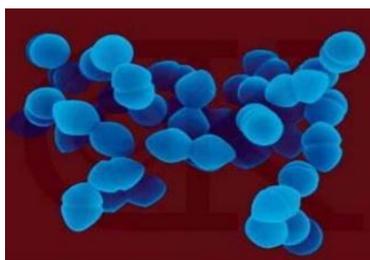


Figura 5. *Enterococcus faecalis*
Fuente: Quiñones, 2010

Staphylococcus aureus: Son cocos gram-positivos en racimos (figura 6), catalasa y coagulasa positivos, aerobios y anaerobios facultativos, poco exigentes en sus requerimientos nutricionales, que toleran la desecación y que crecen en medios de cultivo convencionales (Zaragoza et al., 2008).

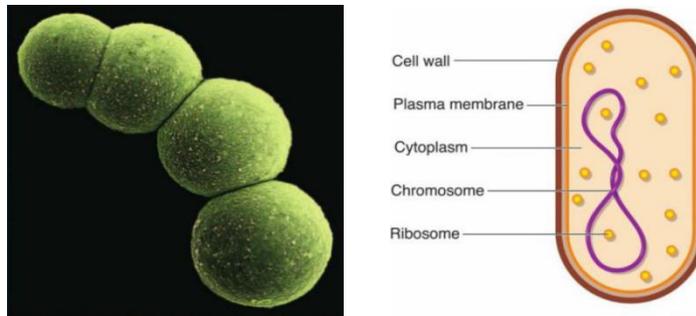


Figura 6. *Staphylococcus aureus*
Fuente: Freeman, 2006

1.10.2. **Bacterias gram negativas.**

Algunas de las enfermedades que producen las bacterias Gram Negativas son:

Escherichia coli: Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae (figura 7). *E. coli*, como es comúnmente llamado, es normalmente inofensivo. Un microorganismo que se encuentra naturalmente en intestino de humanos y animales, desempeña un papel vital en la digestión y ayuda al cuerpo a absorber las vitaminas importantes de los alimentos (Hayhurst, 2004).

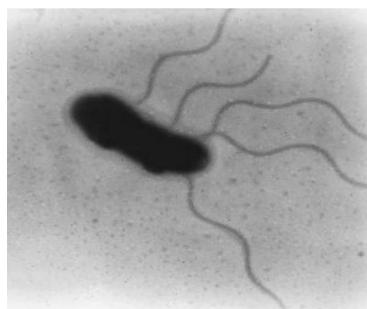


Figura 7. *E. coli*
Fuente: Hayhurst, 2004

Klebsiella pneumoniae: Es un bacilo aerobio, está presente en el sistema respiratorio y en las heces de casi 5% de las personas sanas. Produce infecciones urinarias y bacteremia con lesiones focales en pacientes débiles (Brooks et al., 2011).

Las bacterias de este género muestran multiplicación mucoide, cápsulas de polisacáridos de gran tamaño y falta de motilidad (figura 8) (Brooks et al., 2011).

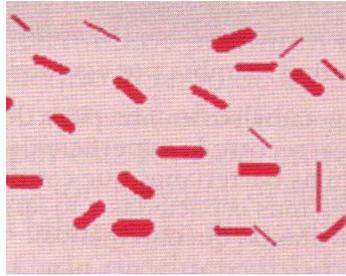


Figura 8. *Klebsiella pneumoniae*
Fuente: Prats, 2008

***Salmonella typhimurium*:** Es un bacilo Gram negativo, que fermenta la glucosa. Comprende más de 2000 cepas diferentes que pueden diferenciarse entre sí por pruebas serológicas. Es responsable de infecciones intestinales, potencialmente mortal (figura 9) (Ingraham et al., 1998).

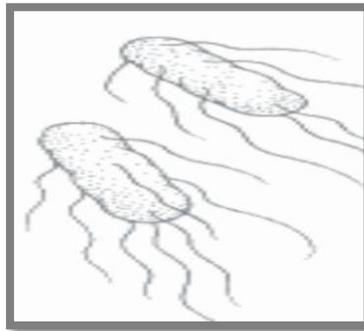


Figura 9. *Salmonella typhimurium*
Fuente: Romero, 2007

***Proteus vulgaris*:** Es una bacteria Gram negativa, anaeróbia en forma de bacilo. Este tipo de bacteria vive en el tracto intestinal de las personas. Es un patógeno oportunista en humanos por ende produce infecciones como neumonías, urinarias, bacteriemias, septicemias, nosocomiales e infecciones ópticas (figura 10) (Gómez et al., 1991).

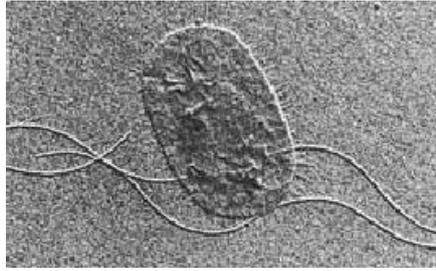


Figura 10. *Proteus vulgaris*
Fuente: Prescott, 1999

***Pseudomonas aeruginosa*:** Son bacilos gramnegativos, aerobio y anaerobios facultativos. La mayoría son móviles por un flagelo polar o por un mechón formado por dos o tres flagelos. Casi todas las especies de *pseudomonas* poseen fimbrias o *pilis*. Éste es el patógeno de mayor importancia médica ya que provoca infecciones nosocomiales, éstas se presentan más en pacientes con inmunidad deprimida, por ello presenta una elevada mortalidad (figura 11) (Romero, 2007).

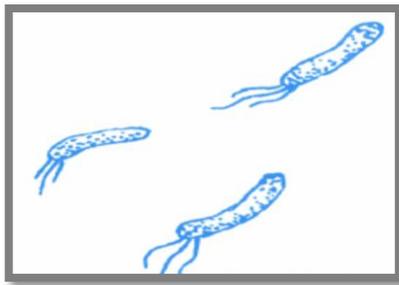


Figura 11. *Pseudomonas aeruginosa*
Fuente: Romero, 2007

1.11. Hongos.

Los hongos están formados por células eucariotas. El DNA está organizado en cromosomas que se hallan envueltos por membrana nuclear (Prats, 2008).

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares. Los primeros están formados por células aisladas redondas u ovaladas, denominadas levaduras. Los pluricelulares están constituidos por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos, formando largos filamentos, estos hongos se denominan moho (Prats, 2008).

1.11.1. *Trichophyton mentagrophytes*.

Produce dos formas de colonias: la variedad vellosa que se aísla en casos de tiña de pie y la variedad granular aislada de lesiones adquiridas por contacto con animales. Las colonias de crecimiento rápido pueden ser colonias blancas, algodonosas o vellosas o amarillas con gránulos gruesos y con pigmentos rojos. Las colonias vellosas blancas producen pocos microconidios esféricos (figura 12) (Forbes et al., 2009).

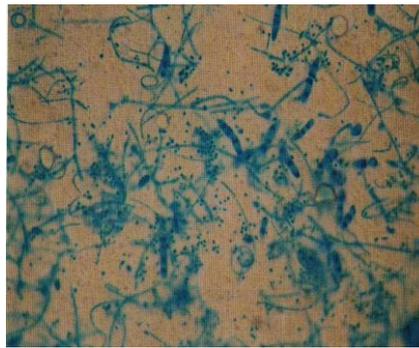


Figura 12. *Trichophyton mentagrophytes*
Fuente: Prats, 2007

1.11.2. *Trichophytum rubrum*.

Es el agente causal más frecuente en tiñas del cuerpo, de la ingle, de los pies, así como de onicomycosis. Se cultiva en los medios habituales, como agar glucosado de Sabouraud con NaCl al 5%. Se han descrito dos cepas diferentes. La cepa granular se caracteriza por colonias planas, la cepa aterciopelada es la más común, con micelio aéreo algodonoso, blanco o beige, como “colas de conejo” (figura 13) (Hernández et al., 2005).



Figura 13. *Trichophytum rubrum*
Fuente: UNAM, 2013

CAPÍTULO II

2. Materiales y Métodos

2.1. Esquema de metodología utilizada.

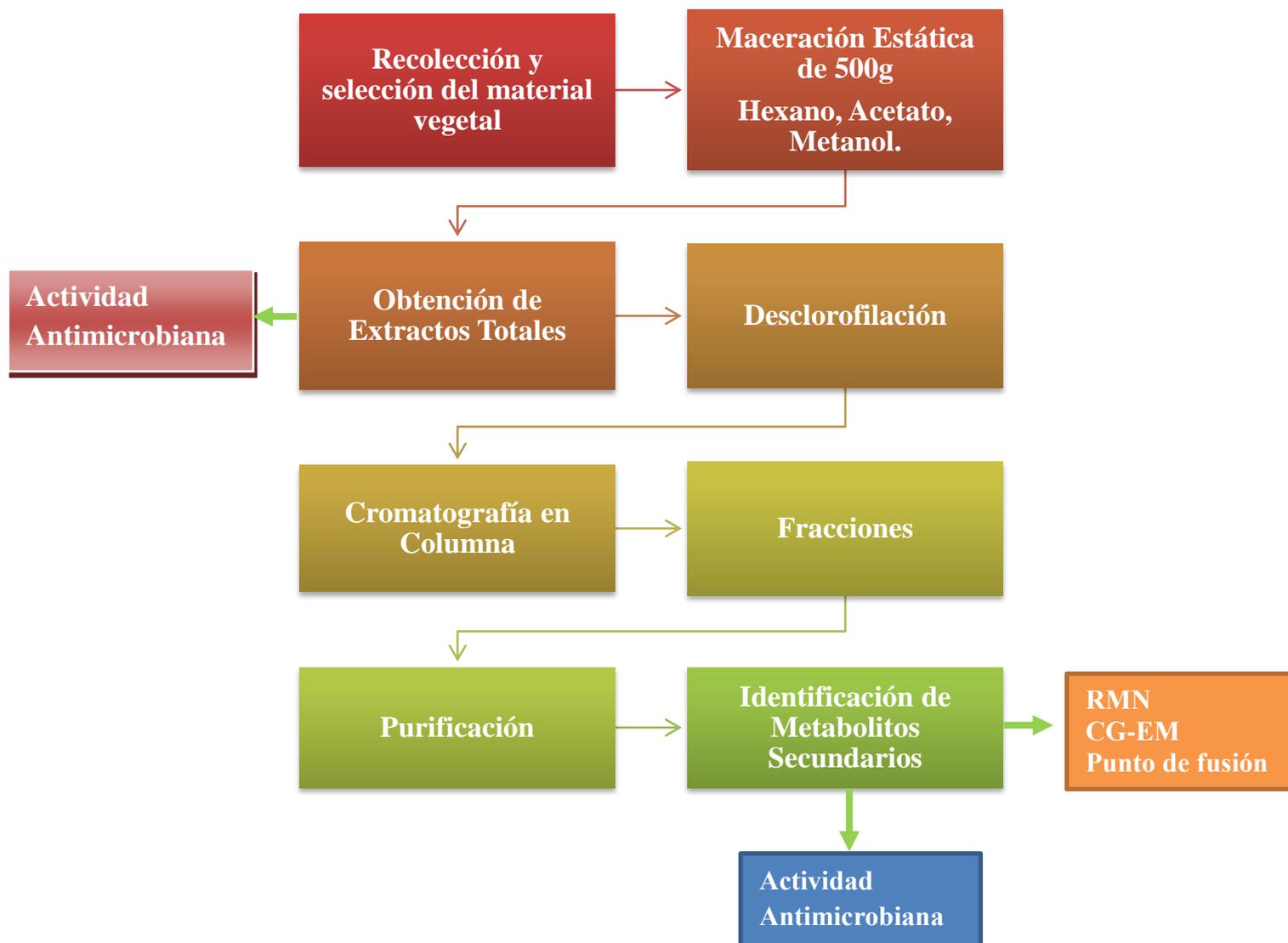


Figura 14. Esquema del Desarrollo de la Investigación

Fuente: La autora 2015

2.2. Recolección y selección del material vegetal.

Se recolectaron las partes aéreas de *Hedyosmum strigosum* en estado de fructificación en el Bosque Washapampa en el cantón de Saraguro en el mes de Diciembre del 2012, con coordenadas 692104E, 9593236N, 2190 m s.n.m.

El material vegetal recolectado se llevó a la cámara de secado del Departamento de Química para realizar su tratamiento post cosecha, esto con el fin de eliminar impurezas y partes deterioradas de la planta

Posteriormente el material vegetal fue deshidratado a una temperatura de 34°C durante cinco días.

2.3. Obtención de extractos totales.

A partir de 500g de muestra seca se procedió a macerar con disolventes de polaridad creciente, Hexano, Acetato de Etilo y Metanol, durante 24 horas con cada disolvente a temperatura ambiente. El proceso de maceración se realizó por tres veces con cada disolvente.

A continuación se filtró al vacío cada extracción y mediante rotaevaporación a presión reducida 50mbar y a 30°C se obtuvieron tres extractos.

Se procedió a obtener los extractos totales. Se realizó CCF de cada uno de los extractos en distintas polaridades empleando placas de sílica gel 60 F₂₅₄, para poder conocer cuál extracto es el que contiene mayor riqueza de compuestos.

2.4. Desclorofilación.

Se realizó el proceso de desclorofilación con el objeto de eliminar la mayor cantidad de clorofilas (figura 15). Para ello se siguió el siguiente procedimiento: se pesó 5 gramos de muestra, se diluyó en una mezcla (metanol-agua) en proporción (9:1). Y posteriormente se agrega Hexano en relación 1:1. De esto se forman dos fases, la primera fase es la parte metanólica y la segunda, la fase hexánica. Cabe señalar que se agrega 3 veces hexano a la parte metanólica.



Figura 15. Desclorofilación del extracto de acetato de etilo

Fuente: La autora, 2015

2.5. Fraccionamiento en cromatografía en columna de extracto de acetato de etilo.

Para el fraccionamiento de la columna del extracto total de Acetato de Etilo se tomó 1g de muestra (metanol:agua), y se sembró en Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040mm) en relación 1:100, y se eluyó con disolventes de polaridad creciente iniciando con una mezcla de Hexano y AcOEt en relación 7:3, hasta llegar a AcOEt 100% (figura 16).



Figura 16. Columna del extracto desclorofilado de acetato de etilo
Fuente: La autora, 2015

2.5.1. Cromatografía de capa fina.

La cromatografía de capa fina (CCF) se realiza con el fin de poder observar la separación que se produce de los compuestos, para ello se utiliza placas de Sílica gel 60 F254 en fase directa.

Se realizó CCF de todas las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica, utilizando proporciones adecuadas de los disolventes Hexano: Acetato de etilo.

2.5.2. Purificación de fracción.

Se realizó una columna cromatográfica para purificar la fracción ES006/10, para ello se pesó 86 gramos de Sílica Gel de fase directa y se sembró la muestra obtenida, utilizando polaridad creciente iniciando con una mezcla de hexano y AcOEt en relación 9:1 y terminando con Hexano:Acetato (7:3).

Posteriormente se recolectó las fracciones obtenidas de la purificación. Obteniendo la fracción de la cual se realizó posteriormente un proceso de Hidrólisis.

2.5.3. Hidrólisis.

Se diluye en etanol la fracción de interés, y luego se la mezcla con NaOH 1M, por 30 minutos a una temperatura de 80°C. Luego se agrega éter etílico por tres veces a la fracción, observándose 2 fases, en la parte etérea se recogen los alcoholes. A la solución restante, posteriormente se le agrega H₂SO₄ al 5% hasta que tenga un pH

ácido, y a la solución acidificada se agrega éter etílico por tres veces formándose 2 fases una parte etérea donde encontramos el ácido.

A los ácidos y alcoholes se les agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar residuos de agua por dos horas.

2.5.4. Caracterización de los alcoholes.

La caracterización de los alcoholes se realizó en un Cromatografo de Gases Acoplada a Espectroscopía de Masas, usando una columna DB-5MS de 30 m x 0.25 mm, espesor 0.25 μm (Agilent 122-5532).

2.5.5. Índice de kovats.

Consiste en relacionar el tiempo de retención ajustado del soluto que se desea identificar con los de una serie homóloga de hidrocarburos saturados que se utiliza como referencia. Para ello se cromatografía dicho soluto con la mezcla patrón de hidrocarburos cuyos tiempos de retención son próximo a los del soluto. Se eligen los tiempos de retención ajustados de los dos picos que flanquean al del problema, que corresponderán a los hidrocarburos que contiene los átomos, y se aplica la relación:

$$IK = 100n + 100 * \frac{(t_{RX} - t_{Rn})}{(t_{RN} - t_{Rn})}$$

Donde:

IK: Índice de retención de kovats

n: Número de átomos de carbono en el n-alcano

t_{RX}: Tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n-alcanos

t_{Rn}: Tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado

t_{RN}: Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto analizado

Los compuestos se identificaron por comparación de sus índices de retención (con respecto a n-alcanos que contiene de 9 a 25 átomos de carbono) y los espectros de masas encontrados en la literatura (Adams, 2009), estos se almacenan en la base de datos (NIST 1998).

2.5.6. Caracterización del ácido.

Para la determinación del ácido se realizó RMN de 400 MHz, utilizando como disolvente DMSO.

2.6. Fraccionamiento en cromatografía en columna extracto en Hexano.

Para el fraccionamiento de la columna del extracto total de Hexano se tomó 1g de muestra desclorofilada, y se sembró en Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040mm) en relación 1:100 sílica: extracto, eluyendo con disolventes de polaridad creciente iniciando con una polaridad de Hexano 100% hasta AcOEt 100%.

Seguidamente se realizó la cromatografía en capa fina y se recolectaron fracciones siendo la de interés la fracción ES062/37.

2.6.1. Purificación de la fracción.

Se realizó una columna cromatográfica para purificar la fracción ES062/37, para ello se pesó 10g de Sílica Gel de fase directa y se sembró 30.7mg de muestra obtenida, iniciando con una polaridad de hexano 100% hasta 7:3 Hexano: AcOEt, donde se obtuvo la fracción ES081/45 la cual cristalizó y posteriormente se realizó los análisis en CG-EM y RMN.

2.7. Caracterización química y estructural de las fracciones.

2.7.1. Punto de fusión.

Para determinar el punto de fusión de la fracción ES021/18 se calentó una pequeña cantidad del compuesto en el equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60Hz y se registró la temperatura a la cual la muestra pasó de estado sólido a líquido.

2.7.2. Factor de retención.

El valor R_f es la relación de la distancia recorrida por una sustancia en comparación con el punto más lejano alcanzado por el disolvente (Ann et al. 2000). El R_f se calcula con la siguiente ecuación: (figura 17)

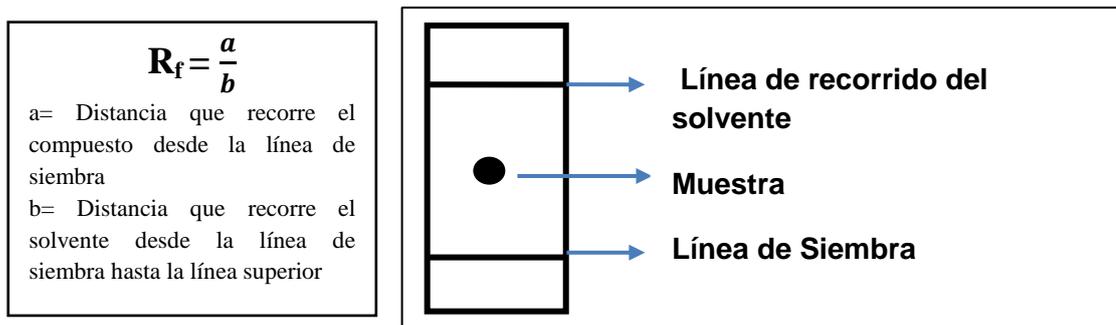


Figura 17. Factor de Retención
Fuente: La autora, 2015

2.7.3. Resonancia magnética nuclear.

Los espectros de RMN fueron logrados en el equipo Varian N° de serie 21953 operando a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , usando Cloroformo Deuterado (CDCl_3) y dimetilsulfóxido (DMSO).

2.7.4. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).

La identificación de los compuestos aislados se realizó mediante un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, dotado con un sistema de operación de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, que cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. Las características de la columna capilar utilizada se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de la columna capilar fracción ES020/16

Fracciones	Columna	Temperatura (C°)	Película (µm)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
ES020/16	DB-5MS	350	0,25	0,25	30

Fuente: La autora, 2015

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras para su posterior análisis mediante CG-EM se detallan en la figura 18.

COLUMNA

- **Columna capilar** DB 5MS Modelo Agilent 122-5532 0,25 mm; 30 m; 0,25 μm
- **Temperatura máxima:** 350 °C
- **Flujo:** Constante
- **Flujo Inicial:** 0.9 ml/min
- **Presión Inicial:** 44,8 KPa
- **Velocidad Promedio:** 35 cm/s

INYECTOR

- **Modo:** split
- **Radio de Partición:** 50:1
- **Temperatura Inicial:** 250 °C
- **Presión Inicial:** 44.8Kpa
- **Gas de Arrastre:** Helio

DETECTOR

- **Espectrometro de masas**
- **Temperatura de la fuente:** 230 °C
- **Temperatura de Cuadrupolo:** 200 °C

HORNO

- **Temperatura Inicial:** 60 °C
- **Temperatura Final:** 270 °C
- **Gradiente de Temperatura:** 10 °C/min

Figura 18. Método de análisis de la columna DB-5MS
Fuente: La autora, 2015

Las características de la columna capilar utilizada para la fracción ES081/45, se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de la columna capilar fracción ES081/45

Fracciones	Columna	Temperatura (C°)	Película (μm)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
ES081/45	DB-5MS	350	0,25	0,25	30

Fuente: La autora, 2015

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras para su posterior análisis mediante CG-EM se detallan en la figura a continuación.

COLUMNA

- **Columna capilar** DB 5MS Modelo Agilent 122-5532 0,25 mm; 30 m; 0,25 μ m
- **Temperatura máxima:** 350 °C
- **Flujo:** Constante
- **Flujo Inicial:** 1.0 ml/min
- **Presión Inicial:** 52,7 KPa
- **Velocidad Promedio:** 36 cm/s

INYECTOR

- **Modo:** split
- **Radio de Partición:** 50:1
- **Temperatura Inicial:** 250 °C
- **Presión Inicial:** 52.7Kpa
- **Gas de Arrastre:** Helio

DETECTOR

- **Espectrometro de masas**
- **Temperatura de la fuente:** 280 °C
- **Temperatura de Cuadrupolo:** 200 °C

HORNO

- **Temperatura Inicial:** 50 °C
- **Temperatura Final:** 270 °C
- **Gradiente de Temperatura:** 10 °C/min

Figura 19. Método de análisis de la columna DB-5MS
Fuente: La autora, 2015

2.8. Determinación de actividad antimicrobiana.

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se utilizó la técnica de micro dilución en caldo.

2.8.1. Microorganismos de prueba.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se emplearon 9 microorganismos; 7 cepas bacterianas y 2 fúngicas:

- 5 cepas de bacterias Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 9997), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Salmonella tiphymurium* (LT2), *Escherichia coli* (ATCC® 25922) y *Proteus vulgaris* (ATCC® 8427)
- 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923)
- 2 organismos fúngicos: *Trichophyton rubrum* (ATCC® 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 28185).

2.8.2. Preparación de las muestras.

Se realizó una dilución de 20mg del extracto de MeOH y de igual manera con los extractos desclorofilados de AcOEt y Hexano en 500µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se la utilizó tanto para CMI antibacteriano como antifúngico.

2.8.3. Preparación del cultivo overnight.

Los microorganismos utilizados se encuentran en reserva criogénica a -80°C (Tabla 3). Una vez preparados los medios se los esterilizó y se procedió a realizar el inóculo de cada bacteria.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación para bacterias

Microorganismos	Medios de Cultivo	Condiciones de Incubación
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Trypticasa Soya Caldo	37°C por 14-16 horas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Trypticasa Soya Caldo	37°C por 14-16 horas
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Nutritivo Oxoid Caldo	37°C por 14-16 horas
<i>Escherichia coli</i>	Trypticasa Soya Caldo	37°C por 14-16 horas
<i>Proteus vulgaris</i>	Mueller Hinton Caldo	37°C por 14-16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Infusión Cerebro-Corazón	37°C por 14-16 horas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Trypticasa Soya	37°C por 14-16 horas

Fuente: La autora, 2015

2.8.4. Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias.

- Se toman 10 µL de cultivo overnight con la bacteria respectiva y se los coloca en 10 ml de caldo Muller Hinton, de esta dilución se tomaron 100µL, las cuales se utilizaron para completar el volumen final de la placa de cultivo (200µL).

2.8.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

a) CMI antibacteriana.

- Para ésta prueba se utilizaron placas estériles de 96 pocillos.

- Colocamos 180µL de caldo Mueller Hinton en la primera fila de pocillos, excepto en la columna 10 y 100µL a los pocillos restantes.
- Se adiciona 20µL del extracto diluido (20mg/ml) disuelto en 500µL de DMSO en estudio, en los pocillos de la fila A y mezclamos.
- Realizamos diluciones seriadas tomando 100µL de los pocillos de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B, hasta llegar a los pocillos de la fila H y desecharos los 100µL sobrantes.
- Se realiza las mismas diluciones en los pocillos de control de esterilidad (columna 10) (200µL de caldo + 20µL del extracto diluido), control negativo (columna 11) 180µL de caldo + 20µL de DMSO y control positivo (columna 12) 180µL de caldo + 20µL de Gentamicina para *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*; y 20µL de Ampicilina para *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus faecalis* a 1000ppm.
- Una vez preparadas las placas se inoculan con 100µL de la suspensión del inóculo, a excepción de los controles de esterilidad, completando los 200uL de volumen final, ajustando así a la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL, y la concentración final del extracto de 2000 a 15.625µg/mL. Finalmente se sellan las placas y se incuban a 37°C durante 18-24 horas.

b) CMI antifúngico.

Se realizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas cambiando únicamente los siguientes parámetros:

- En hongos esporulados dermatofitos la concentración final del inóculo es de 5×10^4 esporas/mL, y el control positivo que se utilizó fue Itraconazol de 1mg/mL.
- Se incuban las placas a 30°C por 96 horas.

CAPÍTULO III

3. Resultados y Análisis

3.1. Extractos obtenidos de la especie *Hedyosmum strigosum* Todzia.

En la tabla 4 se describe el peso y rendimiento de los extractos de Hexano, Acetato de etilo y Metanol a partir de 500g de muestra vegetal seca.

Tabla 4. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de *H. strigosum*

Extracto	Peso Inicial de Planta seca (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Extracto total de Hexano	500	9,64	1,93
Extracto total de AcOEt		7,78	1,56
Extracto total de MeOH		37,30	7,46

Fuente: La autora, 2015

3.2. Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de *Hedyosmum strigosum*.

Las fracciones del extracto en Acetato de Etilo, se recolectaron en frascos de 100ml. Se obtuvieron 75 fracciones, éstas se las unió según el RF, obteniendo un total de 14 subfracciones (figura 20).

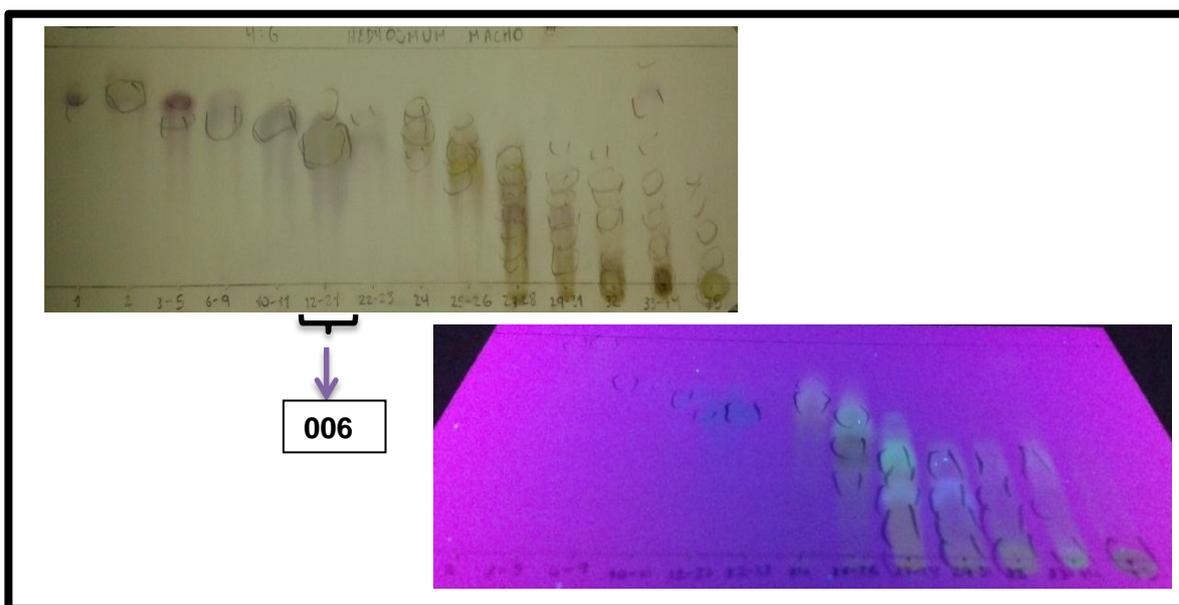


Figura 20. CCF de las fracciones del extracto de AcOEt
Fuente: La autora, 2015

3.2.1. Fracción ES006/10.

La reunión de fracciones (12-21) obtenida con Hex-AcOEt en proporción 8:2, fue etiquetada como ES006/10 (página 10 bitácora del investigador). De ésta se obtuvo un peso de 418 mg (figura 21).

Se realizó una columna cromatográfica para purificar la fracción ES006/10, para ello se pesó 80 gramos de Sílica Gel de fase directa y se sembró 418 mg de muestra obtenida, utilizando polaridad creciente iniciando con una mezcla de hexano y AcOEt en relación 9:1 y finalizando con hexano:AcOEt (7:3). Obteniendo 78 fracciones éstas se las unió según el RF, obteniendo 5 fracciones. De éstas se empleó la fracción ES018/13 de la cual se realizó una Hidrólisis.

Posteriormente se realizó un NMR ^1H de ES018/13, indicando una mezcla de compuestos.



Figura 21. CCF fracción ES006/10

Fuente: La autora, 2015

3.2.1.1. Hidrólisis fracción ES018/13.

Con un peso de 90mg de ES018/13, se procedió a realizar la hidrólisis del cual se obtuvieron 2 fracciones **ES020/16** y **ES021/16**.

Se realizó cromatografía en capa fina, empleando hexano:AcOEt para los alcoholes se utilizó una proporción 8:2 y para los ácidos 1:1.

3.2.3. Fracción ES020/16.

En *Hedyosmum strigosum* se determinaron mediante CG-EM dos compuestos de origen terpénico en la columna DB-5MS, los cuales fueron identificados mediante el índice de kovats y comparación de los espectros de masas reportados en literatura.

En la tabla 5 se indica los tiempos de retención de cada compuesto, además de los índices de kovats calculados, como los reportados en la literatura (Adams, 2009).

Tabla 5. Índice de kovats de los compuestos identificados

Compuesto	Tiempo de Retención	IKE	IKR
Borneol	10,5	1167	1169
Cis-pinocarveol	10,8	1184	1184

IKR: Índice de Kovats referencial

IKE: Índice de Kovats experimental

Fuente: La autora, 2015

En la figura 22 se muestra el espectro de CG-EM del compuesto borneol.

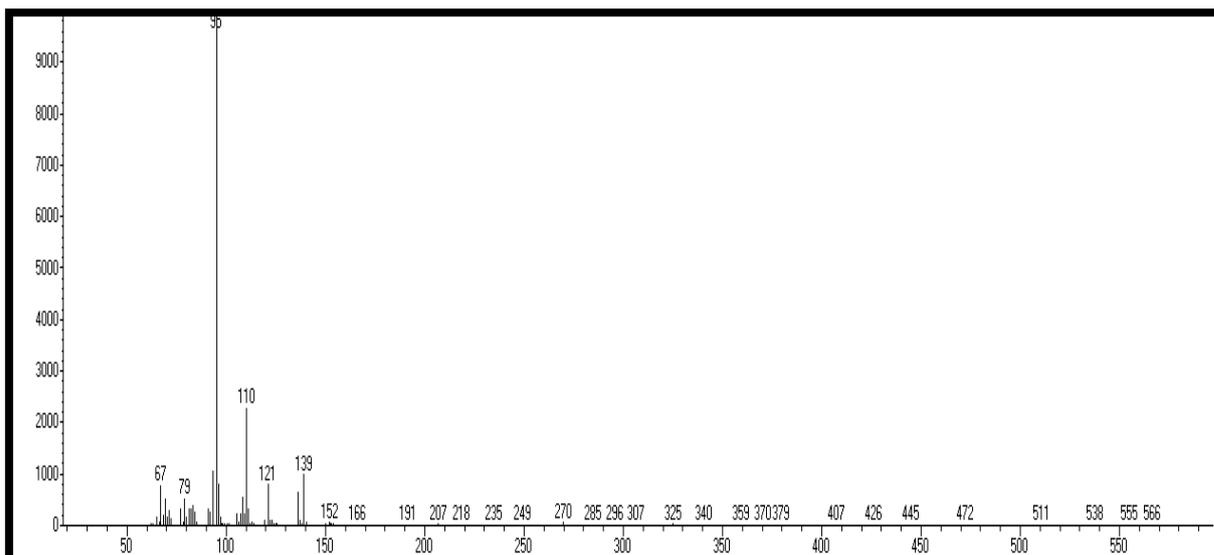


Figura 22. Espectro de CG-EM de compuesto ES020/16 (Borneol)
Fuente: La autora, 2015

En la figura 23 se muestra la estructura química del borneol.

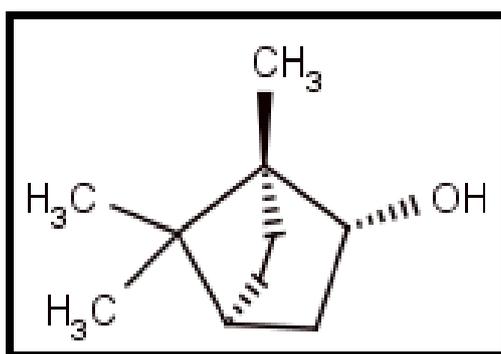


Figura 23. Borneol
Fuente: La autora, 2015

En la figura 24 se muestra el espectro CG-EM del compuesto cis-Pinocarveol

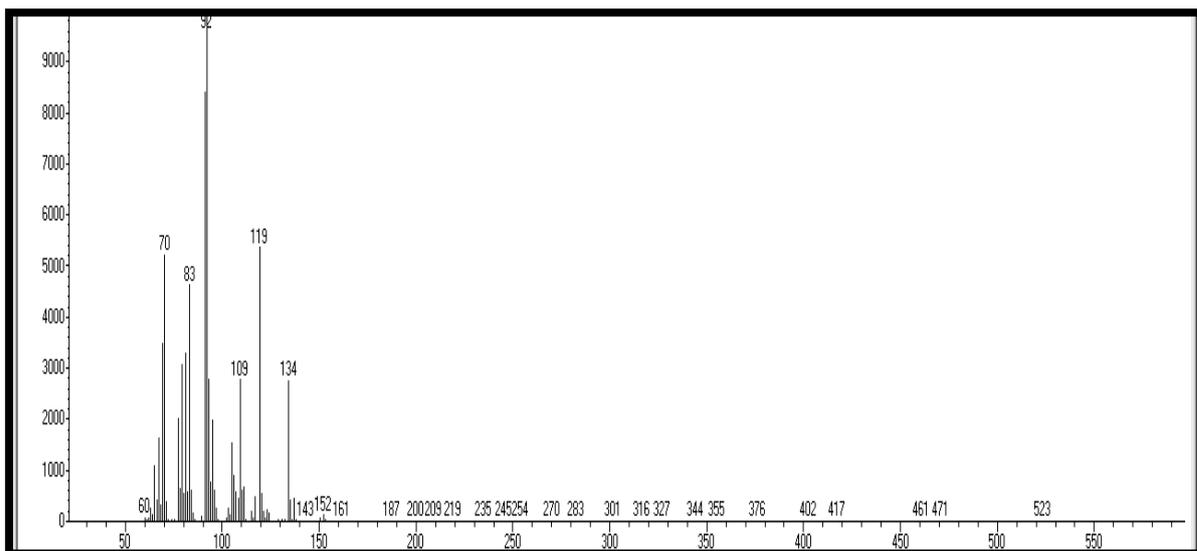


Figura 24. Espectro de CG-EM de compuesto cis-pinocarveol
Fuente: La autora, 2015

En la figura 26 se muestra la estructura química del cis-Pinocarveol.

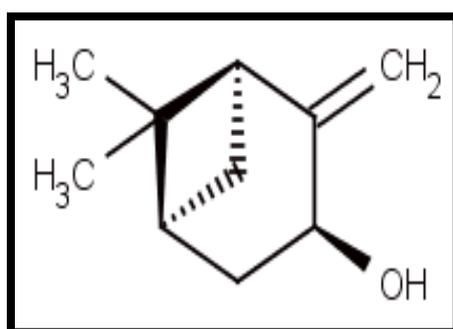


Figura 25. Cis-Pinocarveol
Fuente: La autora, 2015

3.2.4. Fracción ES022/16 del ácido.

Se realizó ^1H NMR con acetona y se obtuvo lo siguiente: 6.33(d, $J=15.9\text{Hz}$, 1H, ArCH=CHCO₂H), 6.90(d, $J= 7.2$ Hz, 2H, ArH ortho a OH), 7.54 (d, $J= 7.2$ Hz, 2H, ArH meta a OH), 7.61(d, $J= 15.9$ Hz, 1H, ArCH=CHCO₂H).

En ^{13}C NMR (acetona- d_6 , d, ppm, TMS): 115.6, 116.9, 127.4, 128.2, 145.6, 156.7, 171.8.

Se realizó la comparación de los datos reportados en (Percec et al. 2006), con los datos obtenidos en el ^1H NMR y ^{13}C NMR experimental.

En la siguiente figura se puede observar la estructura del ácido 4-hidroxicinámico (figura 27).

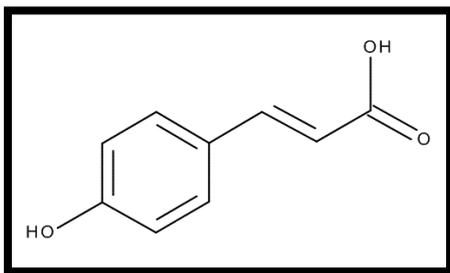


Figura 26. Ácido 4-Hidroxicinámico
Fuente: La autora, 2015

Como resultado de la hidrólisis se identificaron dos alcoholes unidos a un ácido, en la figura 28 se muestra la molécula compuesta por el ácido 4-Hidroxicinámico y el alcohol borneol, con nombre IUPAC (1R, 2R, 4S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate

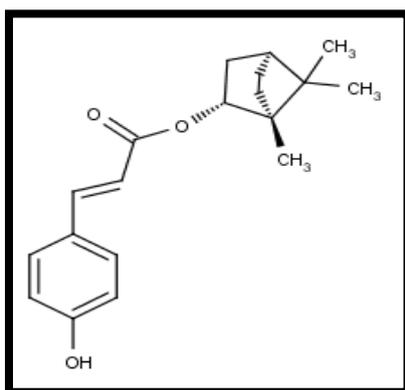


Figura 27. Estructura química de
(1R,2R,4S)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate
Fuente: La autora, 2015

En la figura 29 se muestra la estructura química de la segunda molécula, ácido (4-Hidroxicinámico) y el alcohol (cis-pinocarveol), con nombre IUPAC (1R, 2R, 5R)-6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptan-3-yl(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate

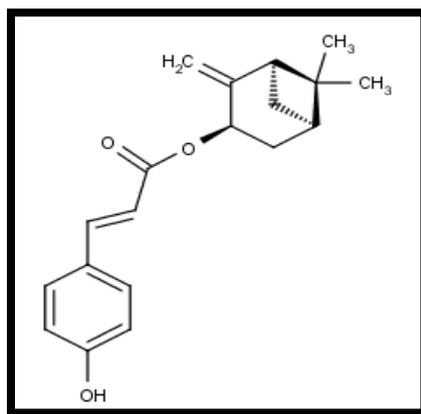


Figura 28. Estructura química de (1R, 2R, 5R)-6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptan-3-yl(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate
Fuente: La autora, 2015

En comparación con la investigación realizada de *H. scabrum* presentó estructuras moleculares identificadas por hidrólisis dando como resultado el ácido 4 hidroxicinámico y el alcohol cis-pinocarveol (Morocho, 2014).

3.3. Fraccionamiento del extracto de hexano de *Hedyosmum strigosum*.

Las fracciones del extracto en Hexano, se recolectaron en frascos de 100ml. Se obtuvieron 240 fracciones, éstas se las unió según el RF, obteniendo 13 subfracciones.

3.3.1. Fracción ES062/37.

La reunión de fracciones (20-30) obtenida en proporción 8:2 fue etiquetada como ES062/37. Se realizó una columna cromatográfica para purificar dicha fracción, para ello se pesó 10g de Sílica Gel de fase directa y se sembró 30.7mg de muestra obtenida, iniciando con una polaridad de hexano 100% hasta 7:3 Hexano: AcOEt. Del fraccionamiento se obtuvieron 58 fracciones, éstas se las unió según el RF, obteniendo 3 fracciones. De éstas se empleó la fracción ES081/45 (0,9mg), la cual cristalizó en forma de cristales blancos, solubles en CH_2Cl_2 .

El compuesto fue visible en luz 254 y 365nm, donde se observó una mancha oscura, al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina al 5% se observó una mancha de color morado (figura 30).



Figura 29. CCF fracción 081/45
proporción 8:2
Fuente: La autora, 2015

Del análisis de CG-EM (figura 31) y ^1H RMN (figura 32) el compuesto ES081/45 fue identificado como un terpeno de fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$ y una masa molecular de 210g/mol.

La muestra ES081/45 se caracterizó por espectroscopia ^1H NMR y CG-EM. Los datos espectrales fueron idénticos a los datos reportados en la literatura (Morocho, 2014).

En la figura 30 se muestra la estructura química de la molécula methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate.

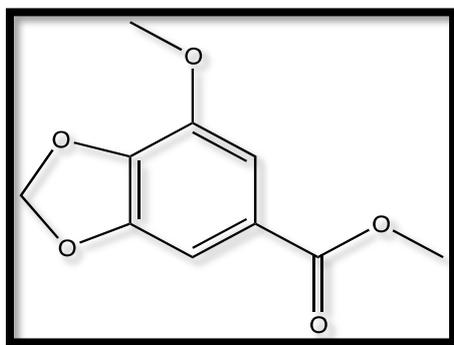


Figura 30. Molécula de la fracción ES081/45 methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate
Fuente: La autora, 2015

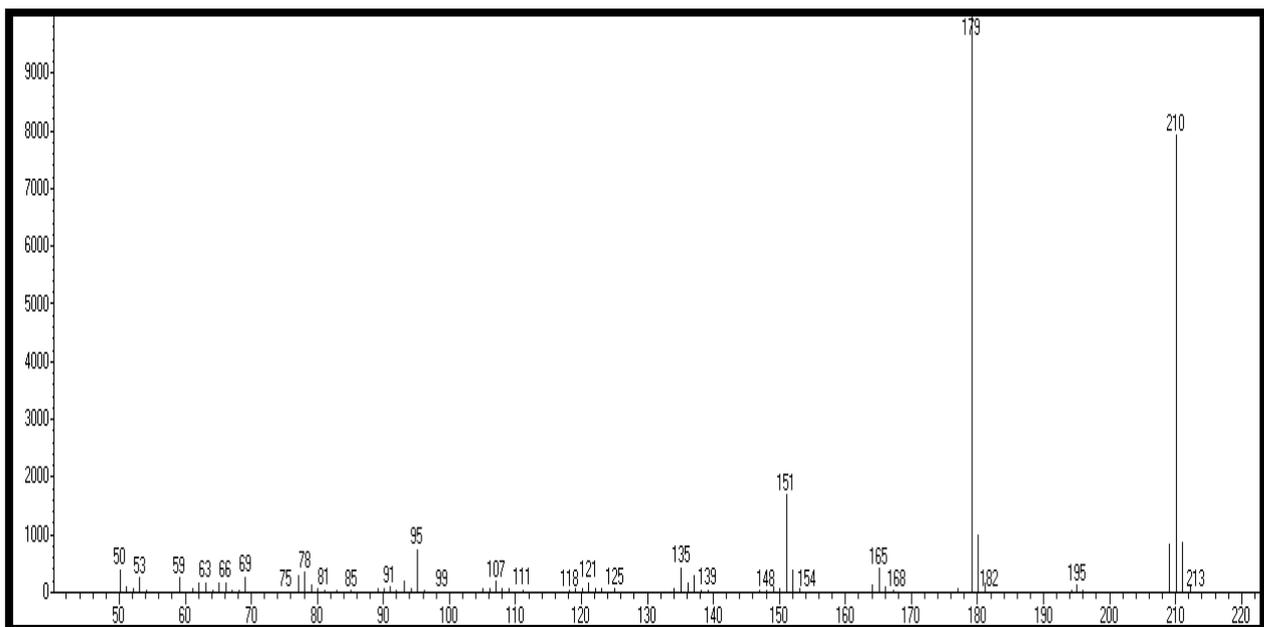


Figura 31. Espectro de CG-EM de Compuesto ES081/45
Fuente: La autora, 2015

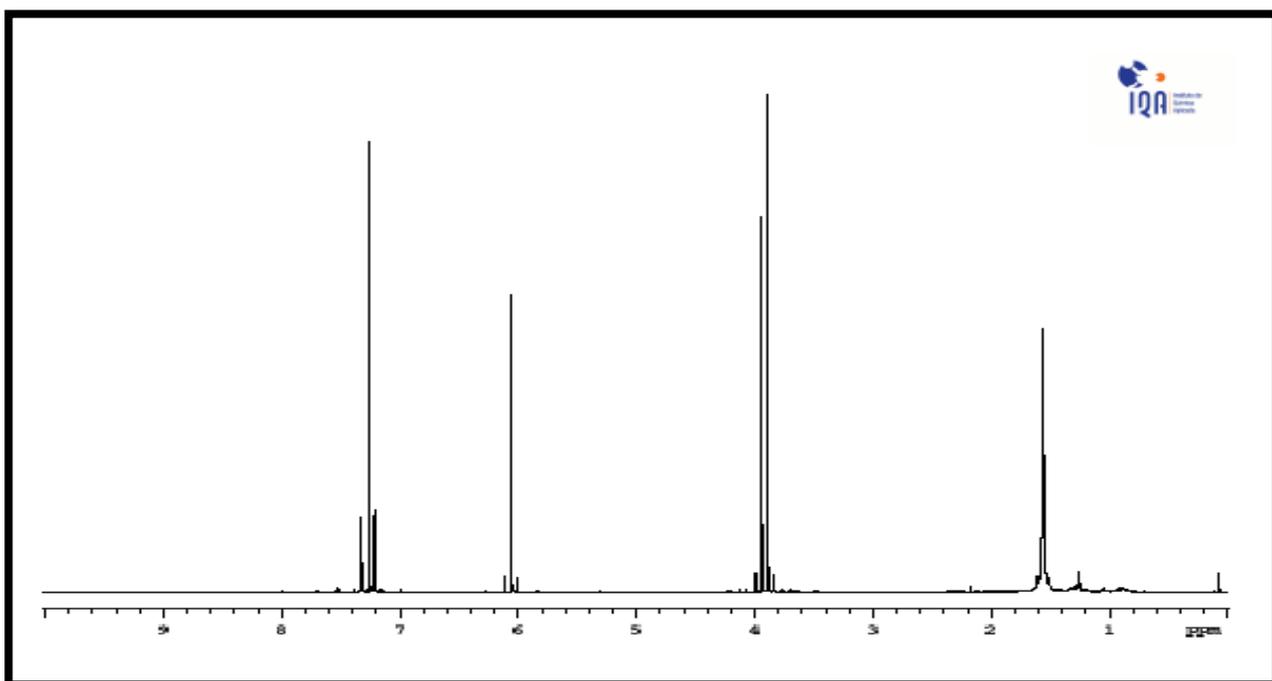


Figura 32. RMN de compuesto ES081/45
Fuente: La autora, 2015

Las señales del compuesto son:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 3.89 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 6.06 (s, 2H), 7.21(d, 1H, $J=1,5\text{Hz}$), 7.33 (d, 1H, $J=1.5\text{Hz}$).

3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana se realizó por el método de microdilución en caldo, los resultados se los ilustra en la tabla 6. Se considera que si un compuesto presenta una CMI <100µg/ml la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a 500µg/ml es moderada, de 500 a 1000µg/ml es mala y >1000µg/ml es nula. (Holetz et al. 2002).

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria

Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)				
Extracto/Fracción	Bacterias		Hongos	
	Sa	Ef	Tm	Tr
Hexano	15,62	15,62	-	-
Acetato de etilo	15,62	15,62	-	-
Metanol	-	-	2000	500
ES018/13	3,25	3,25	-	-
ES081/45	-	-	-	-

Tm: *T. mentagrophytes*

Tr: *T. rubrum*

Sa: *Staphylococcus aureus*

Ef: *Enterococcus faecalis*

Fuente: La autora, 2015

3.4.1. Determinación de la actividad antifúngica.

En la actividad antifúngica el extracto de metanol presentó modera actividad antifúngica contra *T. rubrum* con un valor de 500µg/ml; mientras que, contra *T. mentagrophytes* presentó nula actividad antifúngica con un valor de 2000µg/ml.

Esta actividad antifúngica ha sido reportada en otros estudios de extractos de algunas plantas de la familia Chlorantaceae.

Según Kirchner et al. (2010) en su estudio realizado de *Hedyosmum brasiliense* en aceite esencial, determinan que su actividad es buena contra los dermatofitos *T. mentagrophytes* con un valor de 0,25 µg/mL y *T. rubrum* con un valor de 0,125 µg/mL.

3.4.2. Determinación de la actividad antibacteriana.

En la actividad antibacteriana el extracto de hexano y de acetato de etilo presentaron buena actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con un valor de 15,62µg/ml.

De igual forma la fracción ES018/13 presentó buena actividad antibacteriana con un valor de 3,25µg/ml para ambas bacterias gram positivas.

Esta actividad ha sido reportada en otros estudios de actividad antimicrobiana de extractos de algunas plantas de la familia Chlorantaceae, donde se ha determinado que poseen una buena actividad contra *Staphylococcus aureus*, responsable de infecciones cutáneas invasivas, infecciones metastásicas, toxiinfecciones alimentarias, ya que estas bacterias evaden los sistemas defensivos de nuestro organismo (Pahissa, 2009).

CONCLUSIONES

- Del extracto de acetato de etilo se identificaron dos compuestos mediante hidrólisis, con nombre IUPAC (1R, 2R, 5R)-6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptan-3-yl(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate, y (1R, 2R, 5R)-6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptan-3-yl(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate.
- Del extracto de hexano se identificó un terpeno, methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate de formula molecular $C_{10}H_{10}O_5$ y una masa molecular de 210g/mol
- Los extractos totales de hexano y de acetato de etilo presentaron buena actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con un CMI de 15,625µg/ml. La fracción ES018/13 presentó buena actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con una CMI de 3,25 µg/mL

BIBLIOGRAFÍA

- Acebey, L., Sauvain, M., Beck, S., Moulis, C., Gimenez, A., Jullian, V. (2007). Bolivianine, A New Sesterpene with an Unusual Skeleton from *Hedyosmum angustifolium*, and Its Isomer, Isobolivianine. *Organic Letters*, 9(23): 4693-4696
- Adams, R.P. (2009). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Estados Unidos: Allured Books
- Andrade, M. (2011). Las Plantas Medicinales y sus saberes ancestrales. *Revista en contexto*, P. 56-57.
- Ann, M., Whitesell, J. (2000). *Química Orgánica*. México: Pearson Editorial.
- Balslev, H., Navarrete, H., Torre, L., Macía, M. (2008). Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador., Herbario QCA & Herbario AAU., Quito.
- Billmeyer, F. (2004). *Ciencia de los Polímeros*. Barcelona-España: Reverté Editorial.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., Mietzner, T. (2011). *Microbiología Médica*. China: McGraw Hill Editorial.
- Buitron, C. X. (1999). Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. *TRAFFIC International*. Reino Unido: Edigraf.
- Calixto, B., Campos, M., Otuki, F., Santos, S. (2004). Antiinflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Plant Med.* 70(2): 93-103.
- Cárdenas, L., Rodríguez, J., Villaverde, C., Riguera, R., Cadena, R., Otero, J. (1993). The Analgesic Activity of *Hedyosmum bonplandianum*: Flavonoid Glycosides, *Planta Med.*
- Cao, Cong-Mei., Peng, Y., Shi, Qing-Wen., Xiao, Pei-Gen. (2008). REVIEW. Chemical Constituents and Bioactivities of Plants of Chloranthaceae. *Chemistry & Biodiversity*. 5, 220-227.
- Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires- Argentina: Panamericana Editorial.
- Fox, M. & Whitesell, J. (2000). *Química Orgánica*. México: Pearson Editorial.
- Freeman, L. & Freeman, K. (2006). *Staphylococcus Aureus Infections*. Recuperado de:
<https://books.google.com.ec/books?id=EPIhgRlnSkC&printsec=frontcover&dq=Staphylococcus+Aureus+Infections&hl=es&sa=X&ei=vGdIVfGol8O8ggT>

twoHoDg&ved=0CB4Q6AEwAA#v=onepage&q=Staphylococcus%20Aureus%20Infections&f=false

- Freidfelder, D. (2003). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. España: Reverte Editorial.
- Gil, A. (2010). *Tratado de Nutrición Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Madrid-España: Panamericana Editorial.
- Gómez, A., Baquero, F., Nombela, C. (1991). El género *Proteus*: aspectos microbiológicos y clínicos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*.; 9, 567-75.
- Guevara, J., Cáseres, A., Valencia, E. (2000). Significado Clínico de la presencia de *Enterococcus* en secreción vaginal, *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Marcos*, 61 (3), 2000, 223-226.
- Griffin, R. (1981). *Química Orgánica Moderna*. Barcelona- España: Reverté Editorial.
- Günther, H. (1995). *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, Wiley. Segunda Edición. ISBN: 978-0-471-95201-5
- Hayhurst, C. (2004). *Epidemics- E.coli*. New York-Estados Unidos: The Rosen Publishing Group
- Hernández, A., Carbajal, P., Fernández, R., Arenas, R. (2007). Dermatofitofitosis por *Trichophyton rubrum*. *Revista Iberoam Micol*, 24: 122-124
Recuperado de: <http://www.reviberoammicol.com/2007-24/122124.pdf>
- Hernández, R. & Gally, M. (1981). *Plantas Medicinales*. México Distrito Federal: Árbol Editorial
- Holetz, F., Pessini, G., Sanchez, N., Cortez, D., Nakamura, C., Filho, B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Meminst Oswaldo Cruz*, 97, 1027-31p.
- Ingraham, J., Ingraham, C. (1998). *Introducción a la Microbiología*. Barcelona-España: Reverté Editorial.
- Kawabata, J., Tahara, S. & Mizutani, J. (1981). Isolation and structural elucidation of four sesquiterpenes from *Chloranthusjaponicus* (Chloranthaceae). *Agric Biol Chem*, 45: 1447-1453.
- Kirchner, K., Wisniewski, A., Cruz, A., Biavatti, M., Netz, D. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(5): 692-699. doi: 10.1590/S0102-695X2010005000005

- Lorenzo, D., Loayza, I. & Dellacassa, E. (2003). Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal*. 18: 32–35. doi: 10.1002/ffj.1146
- Macarulla, J. & Goñi F. (1994). *Bioquímica Humana*. Barcelona-España: Reverté Editorial.
- Marcano, D. & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Venezuela: Torino Editorial.
- McMurry J. (2012). *Química Orgánica*. México: Cengage Learning Editorial.
- Morocho Zaragocín, V. (2014). *Valutazione Ecologica, Studio Fitochimico Ed Analisi Dell'Olio Essenziale Di Hesyosmum Scabrum (Ruiz&Pav.) Solms (Chloranthaceae), Dalla Provincia Di Loja E Zamora-Ecuador*. (Tesis Doctoral). Universidad de los estudios de Pavia, Italia.
- Núñez, M.E. (1982). *Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore*, Editorial Universidad de Costa Rica, 318p
- Ocampo, R., Ríos, L., Betancur, L., Ocampo, D. (2008). *Curso Práctico de Química Orgánica Enfocado a Biología y Alimentos*. Manizales-Colombia: Universidad de Caldas Editorial
- Organización Mundial de la Salud. (2002). *Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional*. Ginebra
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Barcelona-España: Marge Books
- Pavia, D., Gary, M., Lampman, G., Vyvyan, J. (2009). *Introduction to Spectroscopy*. Estados Unidos: Cengage Learning
- Peña, A., Arroyo, A., Gómez, A., Tapia, A. (2004). *Bioquímica*. México: Limusa Editorial.
- Percec, V., Peterca, M., Sienkowska, M., Llies, M., Aqad, E., Smidrkal, J., Heiney, P. (2006). Synthesis and Retrostructural Analysis of Libraries of AB₃ and Constitutional Isomeric AB₂ Phenylpropyl Ether-Based Supramolecular Dendrimers. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 3324-3334.
- Pickering, F. (1980). *Química analítica moderna*. Barcelona- España: Reverté Editorial.
- Prats, G. (2008). *Microbiología Clínica*, Madrid-España: Panamericana Editorial.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (1991). *Microbiología*. Madrid- España: McGraw-Hill Interamericana Editorial.

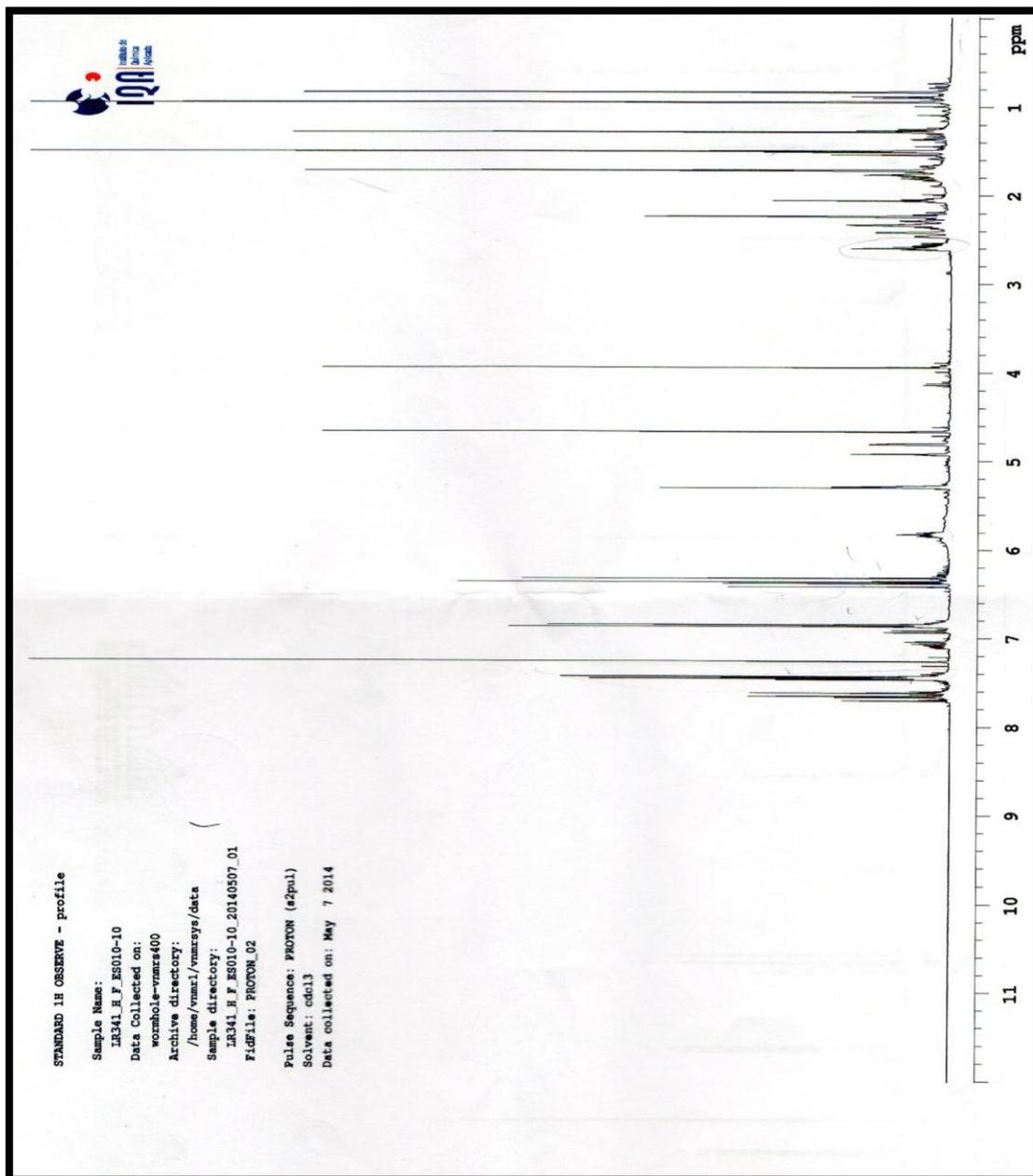
- Quesada, A. (2008). Las plantas Medicinales., Ambiente y Salud., *Revista Biocenosis*, 21 (1-2), 20-23.
Recuperado de:
<http://nicolasdiruscio.redirectme.net/archivos/Libros/Las%20plantas%20medicinales.pdf>
- Quiñonez Pérez, D. (2010). *Enterococcus aislados en Cuba: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética*. (Tesis Doctoral). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Cuba.
- Reitz, R. (1965). *Clorantáceas. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí*, 4–10pp.
- Rocha, R., Lozano, P., Martínez, Y. (2005). *Modelos de la Patogénesis en las Enfermedades Infecciosas*. México: BUAP Editorial.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. México: Panamericana Editorial.
- Sem, D. (2007). *Spectral Techniques in Proteomics*. Recuperado de:
<https://books.google.com.ec/books?id=AXlql-oCaX4C&printsec=frontcover&dq=Spectral+Techniques+in+Proteomics&hl=es&sa=X&ei=3WVIVbCoGcHAaggTjkoGQBQ&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Spectral%20Techniques%20in%20Proteomics&f=false>
- Su, ZS., Yin, S., Zhou, ZW., Wu, Y., Ding, J., Yue, JM. (2008). Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*. *Journal of Natural Products*. doi: 10.1021/np800240v
- Smith, J., Cristol, J. (1972). *Química Orgánica*. Barcelona-España: Reverté Editorial.
- Todzia, C. (1987). A New Variety of *Hedyosmum* (Chloranthaceae) From Nicaragua. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 74:457-459
- Trentin, A., Santos, A., Guedes, A., Pizzolatti, M., Yunes, R., Calixto, J. (1999). Antinociception Caused by the Extract of *Hedyosmum brasiliense* and its Active Principle, the Sesquiterpene Lactone 13-Hidroxy-9,9-dehidroshizukanolide. *Planta Médica*, 517-521
- Vacárcel, M., Cárdenas, S. (2000). *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*. Barcelona-España: Springer-Verlag Ibérica Editorial.
- Valcárcel, C., Gómez, A. (1988). *Técnicas Analíticas de separación*. Barcelona-España: Reverté Editorial.
- Vander, A. (1999). *Plantas Medicinales: las enfermedades y su tratamiento por plantas*. Barcelona-España: Sintesis Editorial.

- Zaragoza, R., Gimeno, C., Pemán, J., Salavert, M. (2008). *Microbiología Aplicada al Paciente Crítico*. Madrid-España: Panamericana Editorial.
- Zu-Shang Su, Sheng Yin, Zhi-Wang Zhou, Yan Wu, Jian Ding, and Jian-Min Yue. (2008). Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*. *Journal of Natural Products*. 71 (8), 1410-1413.

ANEXOS

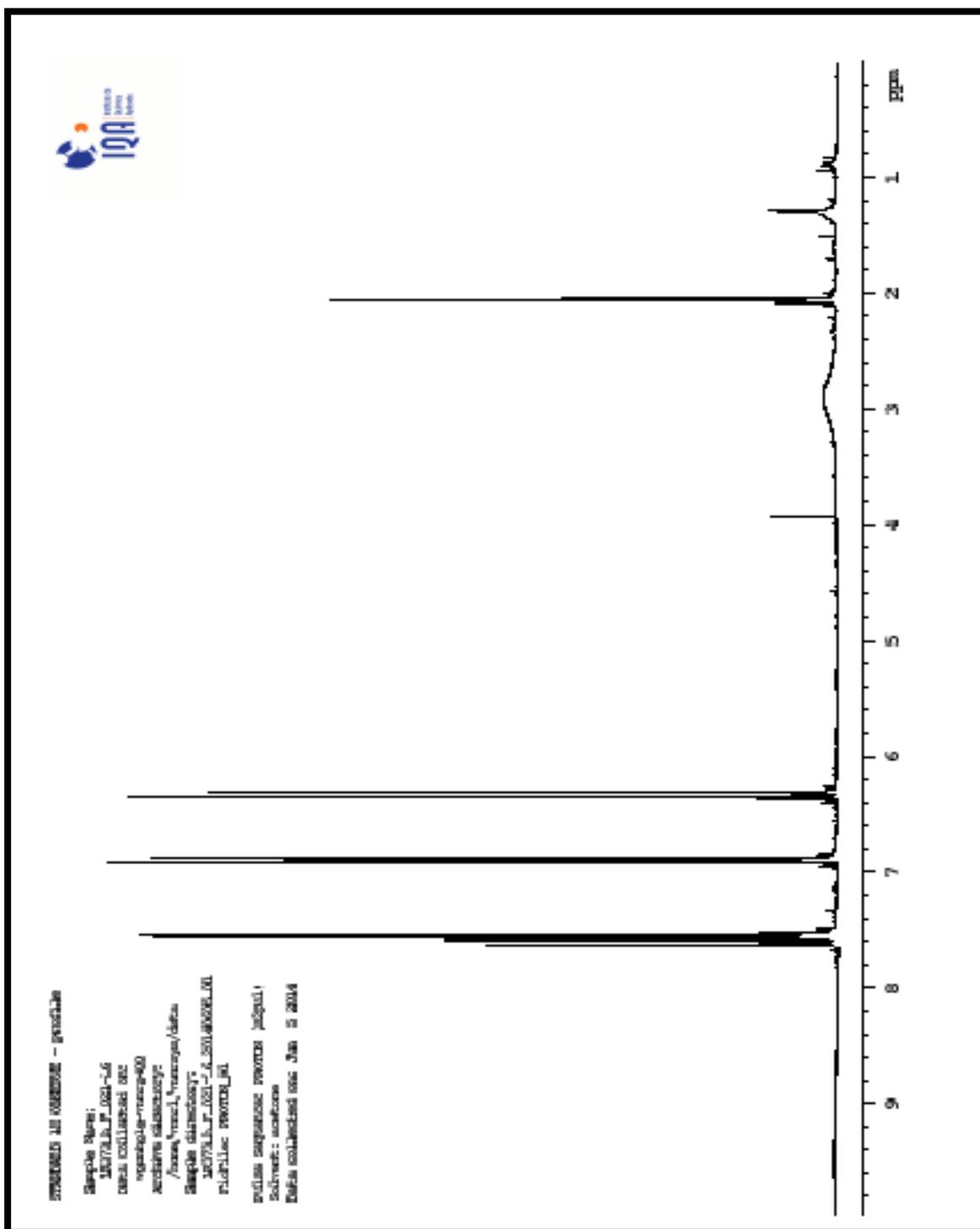
Anexo 1. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de compuesto 018/13

Anexo1: Espectro de ^1H NMR (400 MHz, Acetona)



Anexo 2. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón compuesto 021/16

Anexo2: Espectro de ^1H NMR (400 MHz, Acetona)



Anexo 3. Espectros de ^{13}C Resonancia Magnética Nuclear de compuesto 021/16

Anexo 3: Espectro de ^{13}C NMR (Acetona)

