



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Estudio fitoquímico y biológico de la especie Briofita *Jamesoniella rubri caulis* (Ness) Grolle

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: León Valarezo, Gabriel Mauricio

DIRECTOR: Andrade Morocho, José Miguel, MSc.

LOJA – ECUADOR

2015



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2015

APROBACION DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACION

Magister.

José Miguel Andrade Morocho

DOCENTE DE LA TITULACION

De mi consideración

El presente trabajo de titulación: "**Estudio fitoquímico y biológico de la especie Briofita *Jamesoniella rubricaulis* (Ness) Grolle**" realizado por León Valarezo Gabriel Mauricio, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre del 2015.

f).....

MSc. José Miguel Andrade Morocho

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **León Valarezo Gabriel Mauricio**, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: “Estudio fitoquímico y biológico de la especie Briofita *Jamesoniella rubricaulis* (Ness) Grolle ” de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo José Miguel Andrade Morocho director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusividad responsabilidad.

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

León Valarezo Gabriel Mauricio

1104222342

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre, mi gran mujer, mi gran ejemplo a seguir, mi gran pilar fundamental, que por su fortaleza y su apoyo inmensurable, supo guiarme por el camino de Dios, convirtiéndome en una persona llena de éxitos y logros alcanzados, tal vez no me alcance las palabras para decirte lo mucho que significas para mí madre. Gracias Mamá.

GABRIEL LEÓN

AGRADECIMIENTO

A Dios por siempre bendecirme, y darme esa sabiduría necesaria para llegar a cumplir muchas metas en toda mi vida, por él es quien soy y por él es donde estoy " Sin ti nada, contigo todo"

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, a todos mis maestros por sus valiosos conocimientos impartidos durante mi formación profesional, y a mis compañeros y amigos que me supieron brindar su apoyo incondicional.

Al Mgs. José Miguel Andrade por su invaluable apoyo en la dirección y asesoría de esta investigación, supo guiarme para llevar con éxito a la culminación del proyecto.

Al PhD. Chabaco Armijos por compartir sus conocimientos, consejos e información, que fueron de gran ayuda en el desarrollo de mi tesis.

A todas aquellas personas que contribuyeron no solo en la realización de este proyecto, sino que también supieron alentarme en el transcurso de mi vida personal y universitaria.

GABRIEL LEÓN

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| CARÁTULA | i |
| APROBACION DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACION..... | ii |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS | iii |
| DEDICATORIA | iv |
| AGRADECIMIENTO | v |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| CAPITULO 1..... | 5 |
| REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 1.1 Briofitas | 6 |
| 1.2 Diversidad Química de las <i>Briofitas</i> | 7 |
| 1.3 Características de los compuestos bioactivos de las <i>Briofitas</i> | 8 |
| 1.4 Utilidad de las <i>Briofitas</i> | 8 |
| 1.5 Familia Jungermanniaceae..... | 10 |
| 1.5.1 Genero Jamesoniella..... | 10 |
| 1.5.2 Especie Jamesoniella rubricaulis..... | 11 |
| 1.6 Metabolitos secundarios | 12 |
| 1.6.1 Importancia de los metabolitos secundarios..... | 12 |
| 1.6.2 Clasificación de los metabolitos secundarios..... | 12 |
| 1.7 Actividad antioxidante..... | 13 |
| 1.8 Separación de Compuestos..... | 14 |
| 1.8.1 Cromatografía de capa fina..... | 14 |
| 1.8.2 Factor de retención..... | 15 |
| 1.8.3 Cromatografía en columna..... | 15 |
| 1.8.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas..... | 15 |
| 1.9 Elucidación química..... | 16 |
| CAPITULO 2..... | 17 |
| METODOLOGÍA | 17 |
| 2.1 Selección y recolección del material vegetal..... | 18 |
| 2.1.1 Obtención de extractos..... | 19 |
| 2.2 Fraccionamiento de los extractos en cromatografía de columna..... | 19 |
| 2.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)..... | 19 |
| 2.2.2 Unión y purificación de fracciones..... | 19 |

| | | |
|-----------------------------|---|----|
| 2.2.3 | Caracterización física de las fracciones..... | 19 |
| 2.2.4 | Punto de Fusión..... | 20 |
| 2.2.5 | Factor de retención..... | 20 |
| 2.2.6 | Solubilidad..... | 20 |
| 2.3 | Caracterización estructural de los compuestos aislados..... | 20 |
| 2.3.1 | Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas..... | 20 |
| 2.3.2 | Resonancia magnética nuclear (RMN)..... | 21 |
| 2.4 | Pruebas microbiológicas..... | 21 |
| 2.4.1 | Determinación de actividad antibacteriana..... | 21 |
| 2.4.1.1 | Preparación del cultivo bacteriano (overnight)..... | 21 |
| 2.4.2 | Preparación de la suspensión del inóculo para hongos..... | 22 |
| 2.5 | Determinación de la Actividad antioxidante..... | 22 |
| 2.5.1 | Método DPPH..... | 22 |
| 2.5.2 | Método ABTS..... | 22 |
| 2.6 | Obtención del aceite esencial..... | 23 |
| 2.6.1 | Determinación de humedad de la planta..... | 23 |
| 2.7 | Propiedades físicas del aceite esencial..... | 24 |
| 2.7.1 | Determinación del rendimiento..... | 24 |
| 2.7.2 | Densidad relativa..... | 24 |
| 2.7.3 | Índice de refracción..... | 25 |
| 2.8 | Identificación de la composición química del aceite esencial..... | 25 |
| 2.8.1 | Determinación de los compuestos químicos mediante índice de Kóvats (IK).. | 25 |
| CAPITULO 3..... | | 27 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | | 27 |
| 3.1 | Rendimiento del material vegetal..... | 28 |
| 3.2 | Obtención de extractos..... | 28 |
| 3.3 | Fraccionamiento del extracto diclorometano..... | 28 |
| 3.3.1 | Aislamiento e identificación del Spathulenol (JRD3)..... | 30 |
| 3.4 | Determinación de la actividad antibacteriana..... | 33 |
| 3.5 | Determinación de la Actividad antifúngica..... | 34 |
| 3.6 | Análisis del aceite esencial..... | 34 |
| 3.6.1 | Composición química del aceite esencial..... | 35 |
| 3.7 | Actividad Antioxidante..... | 36 |
| 3.7.1 | Método DPPH..... | 37 |
| 3.7.2 | Método ABTS..... | 37 |

| | |
|-----------------------|----|
| CONCLUSIONES | 39 |
| RECOMENDACIONES | 40 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 41 |
| ANEXOS..... | 47 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación tradicional de briofitas | 6 |
| Tabla 2. Taxonomía botánica de la especie <i>Jamesoniella rubricaulis</i> | 11 |
| Tabla 3. Humedad del material vegetal | 28 |
| Tabla 4. Rendimiento de los extractos vegetales..... | 28 |
| Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano..... | 29 |
| Tabla 6a. Comparación de los datos obtenidos de ^{13}C RMN de (+)-Spatulenol..... | 31 |
| Tabla 6b. Comparación de los datos obtenidos de $\text{RMN } ^1\text{H } \delta$ (de (+)-Spatulenol..... | 41 |
| Tabla 7 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos desclorofilados frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas | 33 |
| Tabla 8 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos desclorofilados frente a Hongos Dermatofitos. | 34 |
| Tabla 9 Propiedades físicas de Aceite esencial..... | 34 |
| Tabla 10 Composición química del aceite esencial de <i>J. Rubricaulis</i> | 35 |
| Tabla 11 Resumen de la actividad antioxidante de los extractos | 38 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Jamesoniella rubricaulis</i> | 11 |
| Figura 2. Fórmula para determinar el factor de retención..... | 15 |
| Figura 3. Esquema representativo de la metodología empleada..... | 18 |
| Figura 4. <i>Fisher-Johns- Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60Hz</i> | 20 |
| Figura 5. <i>Equipo de destilación por arrastre de vapor</i> | 23 |
| Figura 6. Fórmula para determinar la humedad..... | 24 |
| Figura 7. Fórmula para determinar el rendimiento..... | 24 |
| Figura 8. Fórmula para determinar la densidad relativa..... | 24 |
| Figura 9. Fórmula para determinar el índice de kóvats (IK)..... | 25 |
| Figura 10. Cromatografía de capa fina de JRD3..... | 30 |
| Figura 11. Estructura del Spathulenol..... | 31 |
| Figura 12 Compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>J. Rubricaulis</i> | 36 |
| Figura 13 Extractos con los valores respectivos expresados en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ (DPPH)..... | 37 |
| Figura 14 Extractos con los valores respectivos expresados en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ (ABTS)..... | 38 |

ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1 Esquema de determinación de actividad antioxidante (DPPH)..... | 48 |
| Anexo 2 Esquema de determinación de actividad antioxidante (ABTS) | 49 |
| Anexo 3 Determinación del Índice de refracción según la norma ANFOR NF 75 -112 | 50 |
| Anexo 4 Espectro ^1H NMR del Spathulenol (400MHz, CDCl_3) | 51 |
| Anexo 5 Espectro ^{13}C NMR del Spathulenol (101 MHz, CDCl_3) | 52 |
| Anexo 6 Espectro CG-EM del Aceite esencial..... | 53 |
| Anexo 7 Actividad Antioxidante: Curva de Calibración ABTS..... | 54 |
| Anexo 8 Actividad Antioxidante: Curva de Calibración DPPH. | 55 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|--|
| ABTS | Compuesto químico: 2,2'-azino-bis (-6-sulfónico 3-etilbenzotiazolina ácido). Pruebas de oxidación. |
| AcOEt | Acetato de Etilo. |
| CC | Cromatografía en columna. |
| CCF | Cromatografía en Capa Fina. |
| CG-EM | Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas. |
| CHCl₃ | Cloroformo. |
| CDCl₃ | Cloroformo deuterado |
| CMI | Concentración Mínima Inhibitoria. |
| CH₂CL₂ | Diclorometano. |
| DMSO | Dimetil-sulfoxido |
| DPPH | Compuesto químico orgánico: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (pruebas de Oxidación). |
| EtOH | Etanol. |
| Ext. | Extracto. |
| H₂O | Agua. |
| H₂SO₄ | Ácido Sulfúrico |
| Hex | Hexano. |
| IK | Índice de Kóvats |
| Min. | Minutos. |
| m.s.n.m. | Metros sobre el nivel del mar. |
| MeOH | Metanol. |
| Mg. | Miligramos. |
| Ppm | Partes por millón. |
| Pf | Punto de fusión. |
| Rf. | Factor de retención. |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear. |
| ¹HRMN | Resonancia Magnética Nuclear del Protón. |
| ¹³CRMN | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13. |
| TROLOX | 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid |
| UV | Luz Ultra Violeta. |
| µL | Micro litros. |
| µMolET/mg Ex | Micro moles equivalentes de Trólox por cada gramo de materia seca |

RESUMEN

Mediante el uso de técnicas cromatográficas y espectroscópicas (CCF, CC, CG-EM, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$), de los extractos de diclorometano y metanol de la especie *Jamesoniella rubricaulis* se logró el aislamiento e identificación del compuesto Spatulenol de origen terpenico con formula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$.

Se determinó la actividad antioxidante usando el método DPPH, ABTS, resultando positivo los extractos de $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ y AcOEt .

La actividad biológica de los extractos desclorofilados fue evaluada con cepas de bacterias gram positivas, gram negativas y hongos, donde la actividad antimicrobiana fue nula y actividad antifúngica leve.

Finalmente se evaluó la composición química del aceite esencial, donde se identificaron 20 compuestos según su porcentaje de área, siendo los compuestos mayoritarios: Selinene $\langle\delta\rangle$ (21,48%), Elemene $\langle\gamma\rangle$ (21,48%), Ledol (11,66%), Viridiflorol (8,65%) y Selinene $\langle\beta\rangle$ (6,79%).

Palabras claves: *Jamesoniella rubricaulis*, Spatulenol, Selinene $\langle\delta\rangle$, Elemene $\langle\gamma\rangle$, Ledol, Viridiflorol, Selinene $\langle\beta\rangle$, DPPH, ABTS.

ABSTRACT

Using chromatographic and spectroscopic techniques (CCF, CC, GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR) of dichloromethane and methanol extracts of the species *Jamesoniella* species *rubricaulis* achieve isolation and identification of the compound Spathulenol of origin terpene with molecular formula C₁₅H₂₄O.

Antioxidant activity was determinate by using the DPPH, ABTS method, resulting positive the extracts MeOH -H₂O and AcOEt.

The antimicrobial activity of extracts non-chlorophyllous, were evaluated with strains of gram positive bacteria, gram negative and fungi, where the antimicrobial activity was nil and activity antifungal mild.

Finally, the chemical composition of essential oil, which 20 compounds were identified according to their percentage of area, being the main compounds: selinene <δ-> (21,48%), Elemene <γ-> (21,48%), ledol (11.66%), viridiflorol (8.65%) and selinene <β-> (6.79%).

Keywords: *Jamesoniella* *rubricaulis*, Spathulenol, selinene <δ->, Elemene <γ->, ledol, viridiflorol, selinene <β->, DPPH, ABTS

INTRODUCCIÓN

Los briófitos son considerados como un grupo de plantas crucial en la transición a tierra de la vida fotosintética. A su relativa sencillez estructural se le unen caracteres únicos en la línea terrestre, que se resumen en la extremada simplificación de su esporofito, siempre monosporangiado y permanentemente unido al gametofito, que es generalmente la generación dominante en el ciclo de vida. La importancia de los briófitos no es solamente evolutiva: se trata del segundo grupo de plantas terrestres más diversificado (muy por delante de las gimnospermas y de los pteridófitos), y aunque raramente dominan en cuanto a biomasa los ecosistemas, juegan un papel estabilizador crecientemente reconocido. De ser los grandes olvidados entre las plantas, han pasado en los últimos años a atraer gran número de estudiosos por su enorme potencial en biotecnología y bioindicación. (Pérez et al. 2011).

El término "Briofita" designa a musgos, hepáticas y antocerotes, es decir plantas que tienen un ciclo de vida marcado por la alternancia de generaciones (esporofítico , gametofítico haploides y diploides) donde la generación gametofítico es dominante (Vanderpoorten & Goffinet, 2009). Los briófitos son criptógamas avasculares, generalmente pequeñas (hasta 10 cm), con amplia distribución geográfica (Lemos, 2001). Ellos constituyen el segundo grupo más grande de plantas de la tierra y son considerados los pioneros en la transición del ambiente acuático a terrestre (Vanderpoorten y Goffinet, 2009). En el mundo se conocen aproximadamente 24.000 especies (Martínez & Encarnación, 2004).

Exhiben variedad de compuestos químicos (terpenoides, flavonoides, bibenzilos, benzenoides, fenipropanoides, derivados de ácidos grasos y compuestos con S y N) que evitan el ataque de fitopatógenos e insectos (Goffinet & Shaw, 2009; Xie & Lou, 2009).

Los Antocerotes, hepáticas y musgos componen el phylum Bryophyta porque se creía que tenían un único ancestro común. Hoy, sin embargo, se sabe que los musgos, hepáticas y antocerotes no forman un grupo monofilético, pero comprenden tres diferentes: Anthocerotophyta (antocerotes), Marchantiophyta (hepáticas) y Bryophyta (musgos) (Vanderpoorten & Goffinet, 2009). En todo el mundo se estima que hay 100 tipos de antocerotes, 5.000 Marchantiophyta y 12.800 de Bryophyta (Gradstein et al. 2001)

En el resto de las plantas terrestres (pteridófitos, gimnospermas y angiospermas), y al igual que en los briófitos, también se da en el ciclo una alternancia de generaciones en la que el esporofito comienza su desarrollo asociado al gametofito materno, y dependiente de él nutricionalmente (esto es, con matrotrofia). Sin embargo, en los briófitos esta asociación es permanente, en tanto que en los pteridófitos y en las plantas con semilla, la asociación al gametofito está restringida a los estados iniciales del desarrollo esporofítico, que, una vez

alcanzado un cierto nivel de madurez, se establece independientemente y constituye la fase dominante del ciclo. (Pérez et al. 2011)

Como verdaderas plantas, la estructura briofítica destaca por su clara diferenciación histológica. Aunque de forma habitual los tratados de Botánica se refieren los briófitos como “plantas no vasculares”, lo cierto es que frecuentemente poseen tejidos conductores (tanto de nutrientes orgánicos como inorgánicos), y pueden desarrollar asimismo tejidos aislantes y de sostén. Sin embargo, el nivel de desarrollo que alcanzan (a menudo conocido como nivel u organización briofítica) no es el de las plantas vasculares en sentido estricto. (Pérez et al. 2011)

Basados en este contexto el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja emprendió el estudio fitoquímico de la especie briofita *Jamesoniella rubricaulis* de la familia Jungermanniaceae distribuidas en la región Sur del Ecuador.

En Ecuador no se ha registrado ningún estudio fitoquímico de alguna de las especies de la familia Jungermanniaceae, por lo cual la finalidad del proyecto consiste en extraer e identificar compuestos con posible actividad terapéutica que permitan el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

CAPITULO 1
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1.1 Briofitas

En el ambiente terrestre, hay cerca de 20,000 especies, las briofitas son el segundo grupo más importante de plantas verdes (Martínez & Encarnación, 2004). Para el Ecuador se han registrado 950 especies de musgos, 700 hepáticas y 2 antocerotes. Generalmente son pequeñas y habitan en ambientes muy variados, desde cerca del nivel del mar hasta las elevaciones más altas, en las selvas o en los desiertos pero, su vida siempre está íntimamente ligado al agua en estado líquido. Su ciclo de vida incluye dos fases: el gametofito y el esporofito (Benítez et al.2012). Son plantas que tienen la capacidad de revivir después de la hidratación e incluye a los musgos en sentido estricto, a las hepáticas y los antocerotes (Shaw & Renzaglia 2004)

Tabla 1. Clasificación tradicional de briofitas

| | |
|----------|--|
| División | <i>Bryophyta</i> |
| Clase | <i>Anthocerotopsida</i> - Antocerotes |
| Clase | <i>Hepaticopsida</i> – Hepáticas |
| Clase | <i>Bryopsida</i> - Musgos |

Fuente: Briología, 2003.

Si bien se cree que las briofitas son las plantas terrestres menos derivadas, presentan gran importancia, por ser consideradas un grupo de plantas crucial en la transición a tierra de la vida fotosintética. Están representadas por 13.000 a 20.000 especies distribuidas en más de 1200 géneros, y son el segundo grupo de plantas terrestres más diversas, después de las angiospermas (Pérez et al. 2011).

Las briofitas emplean una estrategia de tolerancia de protección celular constitutiva acoplada a la inducción de un mecanismo de recuperación / reparación tras la rehidratación. Sus estructuras celulares son intactas en el estado desecado, pero se interrumpe por la rápida absorción de agua después de la rehidratación. Su mecanismo fotosintético parece estar protegida de tal manera que la actividad fotosintética se recupera rápidamente. (Albert, 2005)

Sin embargo, debido a que dependen del agua para su reproducción sexual, los gametofitos de briófitos son pequeños en relación a la mayoría de plantas vasculares esporofitas. La reproducción sexual en las briofitas implica la liberación de los gametos masculinos móviles en el medio ambiente y requiere de navegación exitosa de estas células desnudas en los órganos sexuales femeninos. (Renzaglia et al. 2000)

1.2 Diversidad Química de las *Briofitas*

Las Hepáticas contienen muchos terpenoides inestables incluyendo dialdehídos y semiacetales y muchos ácidos grasos altamente insaturados y compuestos aromáticos.

En la actualidad, cientos de compuestos nuevos se han aislado de briofitas y sus estructuras fueron registradas. Los compuestos que se encuentran en las hepáticas se componen de lipofílica mono-, sesqui- y di-terpenoides y compuestos aromáticos, tales como: bibenzils típicos, y bis-bibenzils que se han aislado en las familias *Marchantiaceae*, *Aytoniaceae*, *Lejeuneaceae*, *Lepidoziaceae*, *Plagiochilaceae*, *Blasiaceae*, *Pelliaceae* y *Riccardiaceae*. (Asakawa, 1982, 1990a, 1990b, 1993, 1995, 1999).

Un fenómeno químico muy característico de las hepáticas es que la mayoría de sesqui- y di-terpenoides son enantiómeros de los encontrados en las plantas superiores, aunque hay algunas excepciones, como germac- sesquiterpenoides ranelato y de tipo Guaiane. Es muy notable que las diferentes especies del mismo género, como *Frullania tamarisci* y *Frullania dilatata* (*Frullaniaceae*) producen cada una diferentes enantiómeros sesquiterpenlactonas. Algunas hepáticas, tales como *Lepidozia* (*Lepidoziaceae*), biosintetizan ambos enantiómeros. Los flavonoides son componentes omnipresentes en briófitos y se ha detectado tanto en la Marchantiophyta como en la Bryophyta. (Asakawa, 1982, 1990a, 1990b, 1993, 1995, 1999).

La presencia de nitrógeno, azufre, o ambos, son muy raros en compuestos de las briofitas; sin embargo, recientemente varios compuestos que contienen nitrógeno han sido encontrados en varias especies del mediterráneo, estos compuestos son:

Indol prenil en la especie *Riccardia* de la familia *Metzgeriaceae* (Asakawa, 1995), Escatol en la especie *Asterella* de la familia *Aytoniaceae* (Asakawa et al. 1995) y bencil fenetilo en la especie *methylthioacrylates* de la familia *Isotachidaceae* (Asakawa, 1995). Nuestro género *Jamesoniella* se caracteriza por no producir sustancias amargas con la presencia de diterpenos, sesquiterpenos, compuestos de tipo kaurane- labdano- clerodano, hidrocarburos, etc. (Asakawa, 1995)

Las Hepáticas altamente evolucionadas que pertenecen a la *Marchantiaceae* producen fitoesteroles, como campesterol, estigmasterol y sitosterol. Casi todas las hepáticas elaboran un tocoferol y cuadra- lene. Los componentes característicos de las Bryophytas son ácidos grasos altamente insaturados y alcanonas, tales como 5,8,11,14,17- ácido eicosapentaenoico, ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico y 10,13,16-nonadecatrien-7-in-

2-ona y triterpenoides. Neolignanos son uno de los marcadores químicos más importantes de la Antho- cerotophyta (Asakawa, 1995).

1.3 Características de los compuestos bioactivos de las *Briofitas*

Las características biológicas de los terpenoides y compuestos aromáticos aislados de las hepáticas son:

Aromas característicos; la acritud y amargo característico; Alergénico; Citotóxico; Antimicrobiano, antifúngico y antiviral; Insecticida, nematocida; Anión superóxido que inhibe la liberación de radicales; 5-lipoxigenasa, calmodulina, la hialuronidasa, la ciclooxigenasa, la ADN polimerasa b y un inhibidora glucosidasa; Antioxidante; Neurotrófico; Inhibidora del músculo relajante y de calcio; antagonista de la vasopresina y cardiotónico, X-receptor (14) del hígado (LXR) un agonista y antagonista LXRB; catepsinas B y L; Antitrombina; Activación del receptor X farnesoide (FXR), inhibidora de la producción de óxido nítrico; inhibidor del crecimiento de las plantas, inhibidora de la polimerización y pher- sexo omones. Además, la actividad antiplaquetario letal (Asakawa, 1982, 1995).

1.4 Utilidad de las *Briofitas*

Las briófitas (en sentido amplio, incluyendo musgos, hepáticas y antocerotes) han sido sistemáticamente ignoradas a lo largo de la historia del hombre, principalmente debido a su pequeño tamaño y a la relativa dificultad que supone la determinación de las especies. Sin embargo, estas pequeñas plantas ofrecen una multitud de utilidades para el ser humano, ya sean directas o indirectas (Larraín, 2010).

Según Larraín (2010) las briófitas desempeñan un rol imprescindible en los ecosistemas, debido a que:

- Modulan la humedad ambiental, absorbiendo el exceso de agua mientras llueve y liberando esta agua lentamente cuando el aire se hace más seco. Se ha visto que en bosques lluviosos y en los ecosistemas dominados por el musgo *Sphagnum*, las comunidades de briófitas actúan como grandes esponjas que regulan el cauce de los ríos, protegiendo el suelo de inundaciones violentas y entregando agua constante durante los meses de verano a los ríos y arroyos que las desaguan.
- Interceptan, absorben y retienen los minerales disueltos en las aguas lluvias, permitiendo la incorporación de éstos en el ecosistema y disminuyendo su lavado hacia los ríos y mares.
- Las briófitas tienen diversas utilidades en horticultura, mejoramiento de suelos y cultivo de champiñones, orquídeas, y otras plantas ornamentales. Son cada vez más utilizadas para la

creación de “paredes vivas”, las que consisten en tapizar con plantas los muros de una construcción con fines estéticos.

- Los musgos brindan hogar y protección a un sinnúmero de pequeños animales, especialmente invertebrados como insectos, arácnidos, rotíferos, nemátodos, moluscos y anélidos.
- Sirven de material de construcción de nidos para varias aves y pequeños mamíferos, como el picaflor (*Sephanoides galeritus*) y el monito del monte (*Dromiciops gliroides*) en Chile.

Además de la importancia económica y ecológica de las briofitas también está la importancia desde el punto de vista científico y medicinal. La estructura del cuerpo de las briofitas era poco conocida hasta 1960; sin embargo, en las últimas décadas esta información se ha multiplicado, especialmente la que se refiere a la caracterización de productos naturales en hepáticas (Frahm, 2004).

Según Glime (2007) el uso de briofitas como plantas medicinales ha sido común en China, India, y entre los nativos americanos desde tiempos inmemoriales. Numerosos compuestos, incluyendo oligosacáridos, polisacáridos, polialcoholes, aminoácidos, ácidos grasos, compuestos alifáticos, prenilquinonas, y compuestos fenólicos y aromáticos ocurren en briofitas. Entre los usos medicinales se puede destacar los siguientes:

- El extracto en aceite de la caliptra peluda de *Polytrichum commune* era usada por las mujeres para fortalecer y embellecer el cabello.
- *Marchantia polymorpha*, ha sido usada para tratar enfermedades del hígado, pulmón, y furúnculos. Como fuente de marchantina A, puede tener reales propiedades medicinales contra las células KB involucradas en la leucemia.
- *Conocephalum conicum*, una hepática común usada como planta medicinal junto con *Marchantia polymorpha* y aceites vegetales como antídoto para quemaduras, furúnculos, mordidas, cortes, eczema y heridas, es conocida por inhibir microorganismos.
- *Rhodobryum giganteum* y *R. roseum* son usados para tratar enfermedades cardiovasculares o crisis nerviosas.
- *Polytrichum commune* para reducir la inflamación y la fiebre, como un detergente diurético, laxante, y como coagulante.
- *Haplocladium microphyllum* para tratar cistitis, bronquitis, amigdalitis y otitis.

- *Sphagnum portoricense*, *S. strictum*, *Conocephalum conicum* y *Dumortiera hirsuta*. Es por eso que se ha propuesto que los musgos serían una fuente de antibióticos.
- En 1966 se reportaron 18 musgos, de los cuales los más activos fueron *Atrichum*, *Dicranum*, *Mnium*, *Polytrichum* y *Sphagnum*, que inhibían claramente a bacterias gram-positivas o gram-negativas, o ambas a la vez.
- *Atrichum undulatum* efectivamente inhibía el crecimiento de todas las bacterias analizadas excepto *Aerobacter aerogenes* y *Escherichia coli*.
- *Dicranum scoparium* inhibe claramente todas las bacterias analizadas excepto (la gram-negativa).
- *Polytrichum juniperinum* poseen actividad anticáncer contra Sarcoma 37 en ratones.
- La diplofilina que se encuentra en las hepáticas *Diplophyllum albicans* y *D. taxifolium* tienen actividad significativa contra carcinoma epidermoide humano.
- El pequeño musgo *Physcomitrella patens* se utiliza para producir proteínas humanas, tienen una alta frecuencia de recombinación homóloga. Por esto, presenta una estable integración de los genes insertados.
- *Physcomitrella patens* es la única planta que está siendo utilizada para producir el factor coagulante de sangre con fines farmacéuticos.

1.5 Familia *Jungermanniaceae*

Según The plant list (2010) es una familia de hepáticas del orden Jungermanniales que incluyen 35 géneros, con 1.269 nombres de especies reconocidas pertenecientes para la familia *Jungermanniaceae*. De las cuales 332 briofitas han sido clasificados taxonómicamente y otros 178 nombres de briofitas son de rango intraespecífico.

Se trata de un grupo de pequeñas plantas que se distribuyen ampliamente. La mayoría de las especies de esta familia se encuentran en regiones templadas. Las principales características de la familia son:

Presenta hojas superpuestas sin lóbulos decurrentes a lo largo del tallo, su perianto es terminal en el vástago principal y sus rizoides se encuentran dispersos a lo largo del tallo.

1.5.1 Genero *Jamesoniella*.

Incluye 41 nombres de briofitas. De estos 6 se han aceptado a nivel de especie. Estas especies habitan en zonas tropicales y templadas de América del Norte, México, América Central, América del Sur, Europa, Asia, África, Australia y las Islas del Pacífico (Nueva

Zelanda). Este género se reconoce fácilmente cuando fructifica por el dentado a laciniado brácteas y bracteolo. (Schuster, 1983)

Entre las principales características tenemos que son *Plantas* postradas formando esteras gruesas o céspedes cespitosas de color verde a rojizo-marrón o negro violáceo en sitios expuestos, sus *tallos* son ascendentes erectos o postrados con pocas ramas terminales o intercalares, ya sea lateral o ventral; *hojas alternas* sucoblicua-oblicua, ovaladas o cuadradas-rotundates; *reproducción* asexual con condición dioico Sexual. (Schuster, 1983)

1.5.2 Especie *Jamesoniella rubricaulis*.

Se encuentra comúnmente expuesta sobre roca y suelo entre los 500-2500 m.s.n.m. Se distribuyen en las altas montañas neotropicales de México hasta Bolivia. Se reconoce fácilmente por sus erectos brotes poco ramificados con un ápice curvado de marrón verdoso a amarillento o anaranjado, lateralmente se observa la presencia de redondeadas hojas, la ausencia de rizoides, los grandes trígonos, y cutícula fuertemente papilosa (Stark et al. 2005).



Figura 1. *Jamesoniella rubricaulis*
Fuente: The plant list, 2010

Estas especies en su mayoría son estériles, sin capacidad de producir yemas y en consecuencia sólo son capaces de propagarse por la dispersión de fragmentos (Stark et al. 2005).

Tabla 2. Taxonomía botánica de la especie *Jamesoniella rubricaulis*

| Nombre Científico | <i>Jamesoniella rubricaulis</i> |
|--------------------------|---------------------------------|
| Reino | <i>Plantae</i> |
| Phylum | <i>Marchantiophyta</i> |
| Clase | <i>Jungermannniopsida</i> |
| Orden | <i>Jungermanniales</i> |
| Suborden | <i>Cephaloziineae</i> |
| Familia | <i>Jamesoniellaceae</i> |
| Género | <i>Jamesoniella</i> |
| Epíteto Específico | <i>Rubricaulis</i> |
| Autor Epíteto Específico | (Nees) Grolle |

Fuente: Instituto de Ciencias Naturales, 2007.

1.6 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos vegetales que no tienen una función directa en el crecimiento y desarrollo vegetal, pero pueden funcionar como defensa ante herbívoros e infecciones microbianas producidas por patógenos microbianos para atraer a insectos polinizadores para que otros animales dispersen las semillas y como agentes de competencia planta-planta (Taiz & Zeiger, 2006).

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o no de nitrógeno en su composición; los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides (o isoprenoides), los fenilpropanoides (o compuestos fenólicos) y los alcaloides (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura). Los terpenoides derivan del isopentenil difosfato (IPP) y se conocen unos 25.000. Los alcaloides contienen uno o más átomos de nitrógeno y se derivan principalmente de aminoácidos, de ellos se conocen unos 12.000. Mientras que los aproximadamente 8.000 fenilpropanoides provienen de las llamadas vías biosintéticas del shikimato o del malato/acetato (Sepúlveda et al. 2004).

1.6.1 Importancia de los metabolitos secundarios.

Los principios activos de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre (Torres, 2004). En la actualidad solo unos pocos metabolitos se utilizan de forma industrial, por lo que se ha creado la necesidad de generar opciones y alternativas de producción enfocadas al uso sostenible de todos aquellos recursos vegetales disponibles en el entorno, trabajando activamente en la detección y caracterización de sustancias producidas por diferentes especies promisorias que puedan tener aplicación en la industria tanto cosmética, farmacéutica, textilera y agroalimentaria (Torres, 2004).

1.6.2 Clasificación de los metabolitos secundarios.

Según Brooker et.al (2011) se conocen alrededor de 100.000 diferentes tipos de metabolitos secundarios, la mayoría de ellos producidos por las flores. Debido a que los metabolitos secundarios desempeñan un papel esencial en la estructura de la planta, la reproducción y la protección, la diversificación de estos compuestos ha influido en la evolución de plantas con flores.

Se producen tres clases principales de metabolitos secundarios en las plantas: los terpenos o terpenoides, compuestos fenólicos que incluyen flavonoides y los alcaloides.

1.6.1.1 Heterósidos.

Son compuestos que están formados por 2 partes: una es un azúcar (p.e. glucosa) y la otra no-azúcar o aglucona, aglicón o genina. El enlace entre ambas es hidrolizable y debe romperse para que se active el compuesto; esta ruptura es catalizada por fermentos que contiene la misma planta (Bruneton, 2001).

1.6.1.2 Polifenoles.

Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta muy complejas como las ligninas y taninos. Los grupos más importantes de este grupo son los ácidos fenólicos o fenoles, las cumarinas, los flavonoides, los lignanos, los taninos y las quinonas (Ginkel, 2003).

1.6.1.3 Terpenoides.

Están formados por la unión de un número entero de unidades de isopreno (C5). Según ese número se clasifican en: Monoterpenos (2 unidades de isopreno = C10 ej. Iridoides); Sesquiterpenos (3 unidades de isopreno = C 15 ej. Lactonas); Diterpenos (C20); Triterpenos C30 ej.saponinas); Carotenos (C40); Politerpenos (Cn) (Bruneton, 2001).

1.6.1.4 Alcaloides.

Grupo de productos naturales de mayor interés en la farmacognosia. Dentro de este grupo se encuentran sustancias tóxicas incluso a bajas dosis. El primer alcaloide aislado fue la morfina (Sertürner, 1805). En 1819 se le dio el nombre de alcaloides debido a su naturaleza básica. Debido a su gran complejidad, aunque comenzó a aislarse en el siglo XIX, la determinación de su estructura fue posterior. Ej. Drogas con alcaloides derivados del tropano (Cocaína); drogas con alcaloides derivados de la quinoleína (Quinina); drogas con alcaloides derivados de la isoquinoleína (Opio) (Bruneton, 2001).

1.7 Actividad antioxidante

Los antioxidantes son conocidos como moléculas que actúan antes o durante una reacción en cadena de los radicales libres; ya sea en la etapa de iniciación, propagación, terminación, descomposición o en la subsecuente oxidación de los productos (Cardoso et al., 2005). Por otro lado, los prooxidantes son especies altamente reactivas de radicales libres o especies reactivas de oxígeno que están presentes en los sistemas biológicos; provienen de una amplia variedad de fuentes y se encuentran tanto en los alimentos como en los sistemas biológicos. Una terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales provenientes de las plantas. La actividad antioxidante y

su relación con la propiedad curativa de una gran cantidad de plantas medicinales han sido reportadas en diversas investigaciones (Carocho et al., 2013).

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Marwah et al., 2007).

1.8 Separación de Compuestos

La cromatografía es esencialmente un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una inmóvil (lecho estacionario), y otra móvil (fase móvil) la cual percola a través de la primera. El proceso cromatográfico se da como resultado de repetidos procesos desorción-desorción durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. A la distribución final de los componentes en función de su posición sobre el lecho estacionario, o del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma (Cummins & col, 2011).

Prácticamente no existen restricciones sobre la naturaleza de las fases a utilizar, siempre que la fase estacionaria sea sólida o líquida y la fase móvil líquida o gaseosa, por lo que es posible, en principio, realizar por medio de estas técnicas la separación de los componentes de cualquier mezcla. Por otra parte, la utilización de las técnicas cromatográficas no está exenta de dificultades, debido fundamentalmente a la gran cantidad de parámetros que pueden influir en el proceso de separación, lo cual dificulta la elección de las condiciones óptimas de separación y en muchas ocasiones implica la irreproducibilidad de los resultados. Por ello la cromatografía no es una técnica de rutina que pueda aplicarse sin más a cualquier mezcla, sin invertir en muchos casos gran cantidad de esfuerzo y tiempo (Cummins & col, 2011).

1.8.1 Cromatografía de capa fina.

Consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana.

En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (silica, alumina, etc.) distribuido uniformemente (Sharapin, 2000).

1.8.2 Factor de retención.

El factor de retención es la medida de la migración de una sustancia determinada en un solvente dado, y se determina de la siguiente fórmula (Sharapin, 2000).

$$Rf = \frac{\text{Distancia desde el origen hasta el compuesto}}{\text{Distancia desde el origen frente del solvente}}$$

Figura 2. Fórmula para determinar el factor de retención
Fuente: Cruz, 2009

1.8.3 Cromatografía en columna.

Es una técnica en la cual se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa. Como fase estacionaria se usa, generalmente, gel de sílice o alúmina dentro de una columna. A través de la columna se hará pasar una cantidad de un disolvente o mezcla de disolventes denominada eluyente y/o fase móvil. La elección del disolvente es crucial para una buena separación. Dicho disolvente pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o bien por aplicación de presión. Los compuestos constituyentes de la mezcla son arrastrados por el eluyente a su paso, haciéndoles avanzar a lo largo de la columna. Sin embargo, no todos los compuestos avanzan a la misma velocidad, y esta es precisamente la clave de la cromatografía. Algunos compuestos se ven más fuertemente retenidos por el adsorbente (fase estacionaria) y por lo tanto avanzarán más despacio. Por el contrario, otros apenas son retenidos y avanzarán a mayor velocidad. En general se dice que la separación en la cromatografía se basa en la afinidad diferencial de los distintos compuestos por la fase móvil o la fase estacionaria (Rocha, 2000).

1.8.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Es una técnica para separar las sustancias químicas que se basa en las diferencias de conductas partitivas de una fase móvil y de una fase estacionaria, logrando una separación de componentes en una mezcla. La muestra es transportada por una corriente de gas a través de una columna empacada o capilar con un sólido. Debido a su simplicidad, sensibilidad y efectividad para separar los componentes de la mezclas, la cromatografía de gas es una de las herramientas más importantes en química. Es ampliamente usada para análisis cuantitativos y cualitativos de mezclas y para la determinación de constantes termoquímicas tales como calores de solución y vaporización, presión de vapor y coeficientes de actividad. La cromatografía de gases es también utilizada para monitorear los procesos industriales en forma automática, se analizan corrientes de gas periódicamente y se analizan reacciones de forma manual o automática para contrarrestar variaciones no deseadas (Hoffman & Stroobant, 2007).

La espectrometría de masas (MS) utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa- carga. De esta manera la espectrometría de masas es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos en campos eléctricos y magnéticos (Hoffman & Stroobant, 2007).

1.9 Elucidación química

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es un fenómeno que se produce cuando los núcleos de ciertos átomos se encuentran inmersos en un campo magnético estático y se expande a un segundo campo magnético oscilante. Para obtener un espectro de RMN, se coloca una pequeña cantidad de compuesto orgánico disuelto en un disolvente deuterado (CDCl_3) en un tubo de vidrio que se sitúa dentro del campo magnético del equipo. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical, el ordenador recoge la Intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, generando finalmente las respectivas gráficas. (Garcia, 2001).

A continuación se describe algunos de los experimentos utilizados:

^1H : este experimento nos permite determinar el número de protones, desplazamientos químicos y acoplamientos H-H (Fina, 2009).

^{13}C : Nos permite determinar el número de carbonos no equivalentes (Fina, 2009).

COSY: Es un experimento en 2D a partir del cual se obtiene información de la estructura secundaria y terciaria de una proteína teniendo en cuenta solo los acoplamientos escalares spin-spin. Este experimento está diseñado para correlacionar las transiciones de espines acoplados por transferencia de magnetización transversal desde una transición a otra en el curso de procesos de mezclado especialmente diseñados (Fina, 2009).

DEPT: permite la diferenciación de los CH, CH₂ y CH₃, así como la identificación de los carbonos cuaternarios. El experimento DEPT tiene una sensibilidad superior (x 4) que el experimento básico de C, debido a que implica transferencia de magnetización de H—C (Fina, 2009).

CAPITULO 2

METODOLOGÍA

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de fitoquímica, del departamento de química, de la Universidad Técnica Particular de Loja. En la figura 3 se detalla la metodología empleada.

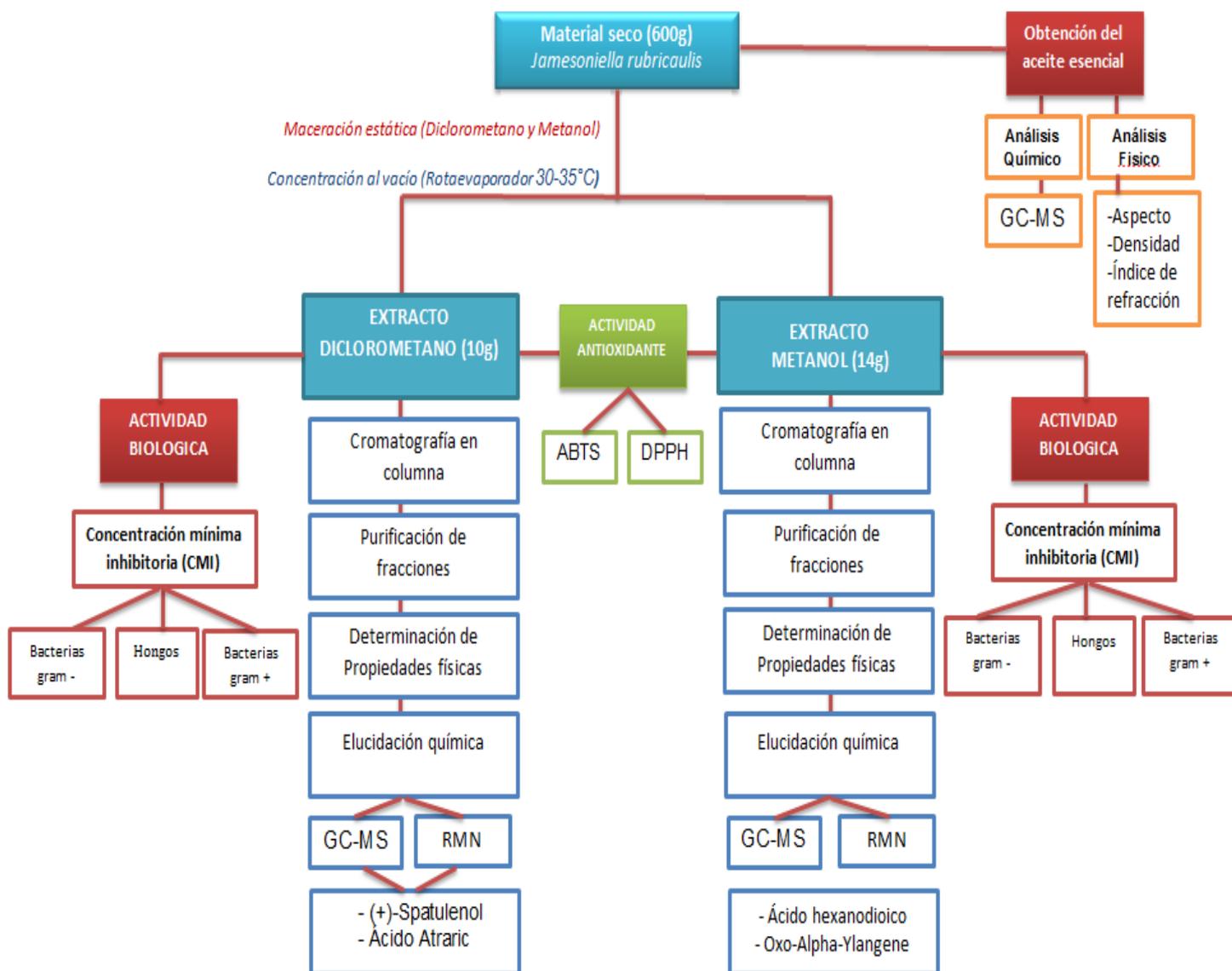


Figura 3. Esquema representativo de la metodología empleada

Fuente: Autor, 2015.

2.1 Selección y recolección del material vegetal

Jamesoniella rubricaulis fue recolectada en el sector El Tiro, Cantón Zamora, Provincia de Zamora Chinchipe, Ecuador, sobre suelo entre la vegetación del páramo arbustivo, a una altitud de 2801 m.s.n.m. Los puntos referenciales son: 3°59'17"S., 79°8'37"W. La identificación taxonómica de la especie fue realizada por expertos de la UTPL, con el código AB 01035, depositada en el museo de colecciones biológicas (MUTPL) de la UTPL.

2.1.1 Obtención de extractos.

El material vegetal recolectado fue secado a una temperatura de 32 °C durante 72 horas. A partir de 600 g de muestra seca se procedió a macerar con dos disolventes de polaridad ascendente: diclorometano y metanol respectivamente, luego se filtró y se concentró al vacío con ayuda de un rotaevaporador a presión reducida y temperatura moderada (30-35°C) hasta su total eliminación del disolvente. Los extractos totales obtenidos fueron 10g de extracto diclorometano y 18gr de extracto metanólico, posteriormente los extractos fueron sometidos a un proceso de desclorofilación mediante una columna SPE Discovery-18 60 ml que contiene 10 gramos de sílica gel inversa, se utilizó como eluyente una mezcla de MeOH: H₂O en proporción 8:2 (v/v), de este modo se obtuvo los extractos desclorofilados (Ext CH₂CL₂: 2g; Ext MeOH: 7,8g) finalmente la columna se limpió con acetona 100%.

2.2 Fraccionamiento de los extractos en cromatografía de columna

Las columnas utilizadas fueron montadas con sílica gel suspendida en disolvente a presión constante hasta alcanzar una compactación óptima. Para lo cual se utilizó sílica gel Merck 0.015-0040 nm de diámetro, en columnas de vidrio de 55 mm de diámetro por 60 cm de altura. Las muestras a sembrar fueron mezcladas con una mínima cantidad de sílica gel y disuelta en Hex para formar una matriz homogénea.

Los extractos totales de CH₂CL₂ 2,0g y MeOH 7,8g fueron sembrados en una relación 1:80 extracto: sílice (CH₂CL₂) y 1:40 extracto: sílice (MeOH), las mismas que fueron eluidas en solventes de polaridad ascendente (Hex, AcOEt y MeOH), tomando fracciones con un volumen de 25ml para el extracto CH₂CL₂ y de 100ml para el extracto MeOH.

2.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF).

Cada una de las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (CCF), para lo cual se utilizó placas de sílica gel 60 F 254 como fase estacionaria y solventes Hex, AcOEt y MeOH en mezcla de diferentes proporciones como fase móvil. Luego se realizó la visualización con luz UV 254 y 360 nm para finalmente revelarla con los reactivos ácido sulfúrico y vainillina al 1%.

2.2.2 Unión y purificación de fracciones.

La unión de las fracciones se llevó a cabo teniendo en cuenta el factor de retención (RF) y la similitud visual que estas reflejaron ante la luz UV de 254 y 360 nm. La purificación de las fracciones se realizó mediante micro columnas cromatográficas y lavados con Hex y MeOH.

2.2.3 Caracterización física de las fracciones.

La caracterización física se determinó mediante: el punto de fusión (Pf), factor de retención (Rf) y solubilidad.

2.2.4 Punto de Fusión.

El punto de fusión se determinó calentando lentamente en el equipo Fisher-Johns- Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60Hz.



Figura 4. Fisher-Johns- Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60Hz

Fuente: Autor, 2015

2.2.5 Factor de retención.

Se midieron las distancias recorridas denominada R_f con el fin de localizar los compuestos. Los R_f de los compuestos químicos se calcularon de acuerdo a la fórmula descrita anteriormente y se corroboraron con su bibliografía.

2.2.6 Solubilidad.

Los disolventes empleados para determinar la solubilidad de los compuestos fueron: Hex, AcOEt, MeOH, CH_2Cl_2 y acetona.

2.3 Caracterización estructural de los compuestos aislados

2.3.1 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Las fracciones se disolvieron en cloroformo (CHCl_3) y fueron inyectadas en el equipo, el cual consta de 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, biblioteca Wiley 7n.1. Columna capilar DB 5MS Modelo Agilent 122-5532 0,25 mm; 30 m; 0,25 μm ; Temperatura de horno, 60 °C (5 min) hasta 270 °C (25 min) a una velocidad promedio de 35 cm / seg; gas portador, helio; temperatura del detector 280 °C, energía de ionización 70 eV.

2.3.2 Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los compuestos se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3) para luego ser llevados al equipo, dichos espectros de RMN se registraron en un equipo Varian con No. de serie 21953, que opera a 400 MHz para RMN ^1H y a 100 MHz para RMN ^{13}C , usando COSY y DEPT a 25°C.

2.4 Pruebas microbiológicas

2.4.1 Determinación de actividad antibacteriana.

De los extractos obtenidos, se diluyeron 20 mg de muestra en 1000 μL de DMSO con la ayuda del ultrasonido, esto con el fin de obtener una muestra totalmente disuelta.

Para la evaluación de la susceptibilidad antibacteriana se empleó el método de microdilución en caldo, que determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) con 6 tipos de bacterias:

Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (Sa) ATCC® 25923 y *Enterococcus faecalis* (Ef) ATCC® 29212; Gram negativas: *Proteus vulgaris* (Pv) ATCC® 8427, *Escherichia coli* (Ec) ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* (St) LT2 y *Klebsiella pneumonia* (Kp) ATCC® 9997.

Mientras que en la evaluación antifúngica se utilizaron 2 organismos *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185), *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188).

2.4.1.1 Preparación del cultivo bacteriano (overnight).

El cultivo overnight se preparó 24 horas antes iniciar el análisis correspondiente, esto a partir de los microorganismos que se encontraban en reserva criogénica a -80°C.

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

2.4.1.2 El ensayo.

Mediante microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución de doble seriada, se colocó 180 μL de caldo Müller Hinton al primer pocillo y 100 μL a los pocillos restantes, luego se adicionó 20 μL de extracto diluido en DMSO en los pocillos de la fila A, después se realizó diluciones seriadas tomando 100 μL del primer pocillo de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B y se continúa hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se siguió el mismo proceso para el control de esterilidad (180 μL de caldo Müller Hinton + 10 μL de extracto diluido), control negativo (DMSO), y para el control positivo (180 μL de caldo Müller Hinton + 20 μL de Gentamicina® (1 mg/mL para Gram -) (4 mg/mL para Gram +).

Después de preparada la placa se inocularon todos los pocillos con 100 μL de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200 μL en la placa de cultivo. Se sellaron las placas y se incubó a 37°C durante 24 horas.

2.4.2 Preparación de la suspensión del inóculo para hongos.

Se preparó la suspensión de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C, tomando de ésta suspensión 14 μL en 7 mL de Caldo Sabouroud; posteriormente se tomaron 100 μL de ésta dilución los cuales se utilizaron para completar el volumen final de la placa de cultivo (200 μL), ajustando a la población fúngica a 5×10^5 esporas/mL.

2.5 Determinación de la Actividad antioxidante

Se pesó 5 mg de cada muestra y se disolvió en Metanol G.R (Pharmaco) para obtener una concentración de 1000ppm (p/v). Así mismo a cada una de las muestra se lo etiqueto con su respectivo código. Para los métodos DPPH y ABTS se utilizó Trolox como estándar de referencia.

2.5.1 Método DPPH.

El ensayo de DPPH se realizó basándose en la técnica de Bran-Williams et al. (1995), con algunas modificaciones descritas por Thaipong *et al.* (2006). Se preparó una solución patrón disolviendo 24 mg de DPPH en 100 mL de MeOH, la misma que fue almacenada a -4 °C hasta su uso. La solución de trabajo se preparó mezclando 10 mL de solución patrón con 45mL de MeOH hasta obtener una lectura en absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ unidades a una longitud de onda de 515 nm en un espectrómetro UV. Se emplearon curvas estándar de trólox con concentraciones entre 25 – 800 μMoles . De cada concentración así como de cada muestra de extracto se tomó 150 μL en un vial, se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo de DPPH y se dejó reaccionar por 24 horas en la obscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados en μMoles equivalentes de trólox por gramo de muestra seca ($\mu\text{MolIEt/g MS}$). En el Anexo 1 se muestra un esquema detallado de la experimentación.

2.5.2 Método ABTS.

Se prepararon dos soluciones: 5 mL de ABTS (0,0074 Molar) y 5 mL persulfato de potasio (0,0026 Molar), la mezcla de estas se dejó reposar por 12 horas de tal forma que se obtuvo la solución patrón de ABTS, la solución de trabajo se preparó mezclando 1 mL de solución patrón con 60 mL de MeOH hasta obtener una lectura en absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ unidades a una longitud de onda de 734 nm en un espectrómetro UV. Se emplearon curvas estándar de trólox en concentraciones entre: 25 y 800 μM . De cada concentración así como de cada muestra de extracto se tomó 150 μL en un vial, se adicionó 2,85 mL de la solución

trabajo de ABTS y se dejó reaccionar por 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Los resultados fueron expresados en μMoles equivalentes de $\alpha\text{-toc}$ por gramo de muestra seca ($\mu\text{MolET/gMS}$). Las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro de UV visible Helios β UVB091602. En el Anexo 2 se muestra un esquema detallado de la experimentación.

2.6 Obtención del aceite esencial

Por medio del método de arrastre de vapor se logró la obtención del aceite esencial, para lo cual se partió de 800g de muestra seca de planta y se colocó en el equipo de destilación por arrastre de vapor. (Fig. 5)



Figura 5. Equipo de destilación por arrastre de vapor

Fuente: Autor, 2015

El mismo consiste en una destilación de la mezcla de dos líquidos inmiscibles y en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición, de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite esencial, finalmente se separan en un vaso Florentino. El aceite es llevado para realizarle pruebas físicas y químicas por triplicado.

2.6.1 Determinación de humedad de la planta

Se realizó mediante un instrumento de humedad, el cual posee una lámpara de luz infrarroja para secar y una balanza sensible para pesar la muestra. Los resultados fueron obtenidos aplicando la fórmula siguiente:

$$Hm = \frac{m1 - m2}{m1 - cv} \times 100$$

Figura 6. Fórmula para determinar la humedad

Fuente: Autor, 2015

Dónde:

Hm: Porcentaje de humedad.

cv: Peso de la capsula vacía (gr).

m1: Peso de la capsula + muestra a analizar (gr).

m2: Peso de la capsula + muestra seca (gr).

2.7 Propiedades físicas del aceite esencial

2.7.1 Determinación del rendimiento.

Para la determinación del rendimiento se tomó en cuenta el peso total de la materia vegetal destilada y la cantidad de aceite esencial obtenido. El resultado fue obtenido aplicando la fórmula descrita a continuación.

$$\%R = \frac{\text{Volumen (ml)}}{\text{Peso (gr)}} \times 100$$

Figura 7. Fórmula para determinar el rendimiento

Fuente: Autor, 2015

2.7.2 Densidad relativa.

Se utilizó un picnómetro de 2mL y el resultado fue obtenido aplicando la siguiente formula:

$$d = \frac{m2 - m0}{m1 - m0}$$

Figura 8. Fórmula para determinar la densidad relativa

Fuente: Autor, 2015

Dónde:

d: Densidad relativa.

m0: Peso del picnómetro vacío (gr).

m1: Peso del picnómetro + agua destilada (gr).

m2: Peso del picnómetro + muestra de aceite esencial (gr).

2.7.3 Índice de refracción.

Para determinarlo se tomó en cuenta el principio de la norma ANFOR NF 75 -112. (Anexo 3)

2.8 Identificación de la composición química del aceite esencial

Se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en columna capilar DB-5MS (5%-Fenil–metilpolisiloxano), obteniendo resultados cualitativos.

Para la obtención de los cromatogramas se utilizó el equipo cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, constituido con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, el cual cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683, acoplado a un detector de ionización de llama.

2.8.1 Determinación de los compuestos químicos mediante índice de Kóvats (IK).

Los Índices de Kóvats (IK) se calcularon en base a la comparación de los tiempos de retención de una serie homologa de patrones de hidrocarburos a partir del C10 hasta C25 y los tiempos de retención de los componentes del aceite esencial. Los valores obtenidos se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$IK = 100n + 100x \left(\frac{\log tR_x - \log tR_n}{\log tR_N - \log tR_n} \right)$$

Figura 9. Fórmula para determinar el índice de kóvats (IK)

Fuente: Autor, 2015

Dónde:

IK = Índice de Kóvats.

n = Numero de átomos de carbono en el n-alcano.

tRx = Tiempo de retención del compuesto estudiado, que eluye en el centro de los . -n- alcanos.

tRn = Tiempo de retención del n-alcano, que eluye antes del compuesto estudiado.

tRN = Tiempo de retención del n-alcano, que eluye después del compuesto estudiado.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Rendimiento del material vegetal

El material vegetal húmedo inicial tuvo un peso de 1.500g, posteriormente fue secado a 32°C por 5 días, dando como resultado un material vegetal totalmente seco cuyo peso final era de 1.109g. En la tabla 3 se puede evidenciar la cantidad y la humedad obtenida de la especie *Jamesoniella rubricaulis*.

Tabla 3. Humedad del material vegetal

| Especie Vegetal | Peso Húmedo | Peso Seco | Humedad |
|---------------------------------|-------------|-----------|---------|
| <i>Jamesoniella rubricaulis</i> | 1500g | 1.109g | 73 |

Fuente: Autor, 2015

3.2 Obtención de extractos

Se obtuvieron los extractos de diclorometano y metanol a partir de 600g de material vegetal seco. En la tabla 4 se puede observar el porcentaje de rendimiento obtenido de cada uno de los extractos; en la cual se puede evidenciar que el extracto metanólico presentó un mejor rendimiento.

Tabla 4. Rendimiento de los extractos vegetales

| Peso material vegetal(g) | Extracto | Color y consistencia | Peso extracto(g) | Rendimiento extracto puro% | Rendimiento extracto desclorofilado% |
|--------------------------|---------------------------------|----------------------|------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| 600 | CH ₂ Cl ₂ | Verde oscuro/sólido | 10 | 1.6 | 20.0 |
| | MeOH | Verde oscuro/sólido | 18.00 | 3.0 | 43,33 |

Fuente: Autor, 2015

3.3 Fraccionamiento del extracto diclorometano

Se obtuvieron 167 muestras de 25ml c/u. Se analizaron por CCF y recogidas en 38 fracciones (JRD1-JRD38), utilizando como eluyentes Hex, AcOEt y MeOH en mezclas de diferentes polaridades.

En la tabla 5, se detalla la distribución de los disolventes utilizados y el número de fracciones obtenidas.

Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano.

| Mezcla de disolventes | Proporción | Fracción | Código |
|-----------------------|------------|----------|--------|
| Hex-AcOEt | 80:20 | 1-3 | JRD1 |
| | | 4-5 | JRD2 |
| | | 7-8 | JRD3 |
| | | 9 | JRD4 |
| | | 10-12 | JRD5 |
| | | 13 | JRD6 |
| | | 14-16 | JRD7 |
| | | 21-22 | JRD8 |
| | | 23 | JRD9 |
| | | 24-26 | JRD10 |
| | | 29-30 | JRD11 |
| | | 31 | JRD12 |
| | | 32-38 | JRD13 |
| | | 39-40 | JRD14 |
| Hex-AcOEt | 70:30 | 41 | JRD15 |
| | | 42-46 | JRD16 |
| | | 47 | JRD17 |
| | | 48-49 | JRD18 |
| | | 50-53 | JRD19 |
| Hex-AcOEt | 60:40 | 54-56 | JRD20 |
| | | 57-60 | JRD21 |
| Hex-AcOEt | 40:60 | 61-64 | JRD22 |
| | | 65-67 | JRD23 |
| | | 68-74 | JRD24 |
| | | 75-80 | JRD25 |
| | | 81-83 | JRD26 |
| | | 84-87 | JRD27 |
| | | 88-89 | JRD28 |
| | | 90-91 | JRD29 |
| | | 92-100 | JRD30 |
| | | 101-110 | JRD31 |
| | | 111-118 | JRD32 |

| | | | |
|-----------|-------|---------|-------|
| Hex-AcOEt | 20:80 | 119-137 | JRD33 |
| AcOEt | 100:0 | 138-157 | JRD34 |
| MeOH | 100:0 | 158-162 | JRD35 |
| | | 163-164 | JRD36 |
| | | 165 | JRD37 |
| | | 166-167 | JRD38 |

Fuente: Autor, 2015

3.3.1 Aislamiento e identificación del Spathulenol (JRD3).

El compuesto (+)-Spathulenol fue obtenido utilizando un gradiente de concentración Hex-AcOEt 80:20. Su peso original fue de 10.3mg que representaba un 0,10% en relación con el peso del extracto total desclorofilado; luego fue sometido a un método de purificación con una mezcla de Hex-MeOH.

3.3.1.1 Caracterización física.

Presenta una apariencia física líquida aceitosa de color amarillo, el cual era soluble en CH_2Cl_2 , AcOEt y CHCl_3 . Posee la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ con peso 220.35g. La placa de CCF fue eluida en Hex-AcOEt 80:20, y fue observada en luz UV, en la cual se distinguió una mancha morada a 365 nm y una mancha celeste a 254 nm, al ser revelada con H_2SO_4 al 5% y vainillina al 1% se presenció una mancha de color púrpura, cuyo R_f era de 0,93 (Fig. 10).

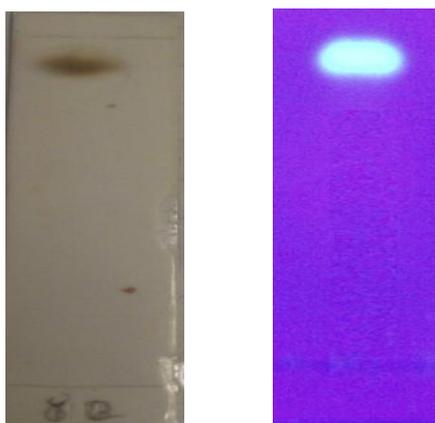


Figura 10. Cromatografía de capa fina de JRD3

Fuente: Autor, 2015

3.3.1.2 Interpretación espectral.

Los valores obtenidos de RMN ^1H y ^{13}C se muestran a continuación. Los espectros se indican en el Anexo 4 y 5.

RMN ¹³C (CDCl₃, 400 MHz): 13C δ (ppm): 53.55 (C-1); 26,23 (C-2); 41.89 (C-3); 81 (C-4); 54.49 (C-5); 29.85 (C-6); 27.64 (C-7); 24.93 (C-8); 38.61 (C-9); 153,60 (C-10); 20,41 (C-11); 16.27(C-12); 28.70 (C-13); 106.40 (C-14); 26.23 (C-15).

RMN ¹H δ (ppm): (2.22 m; H-1); (2.08 m; 1.90 m; 2H-2); (1.80 m; 1.60 m; 2H-3); (1.30 t 3.5; H-5); (0.49 dd, J = 11.3, 9.5 Hz; H-6); (0.74 m; H-7); (1.70 m; 2H-8); (2.4 dd, J = 12.3, 5.3 Hz, 2H-9); (1.06 s, 3H-12); (1.08 s, 3H-13); (4.71 s; 4.69 s; 2H-14); (1.32 s; 3H-15).

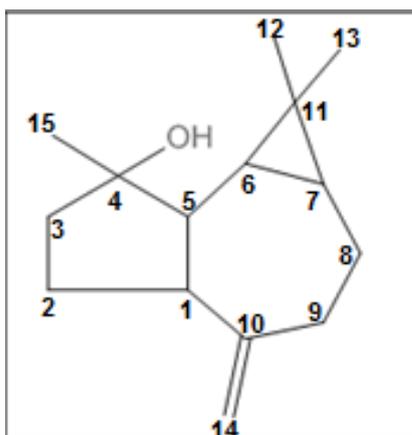


Figura 11. Estructura del Spathulenol

Fuente: Autor, 2015

En comparación con los datos espectrales de publicaciones anteriores (G. T. Malcher et al. 2004) y la muestra analizada en el presente estudio (Tabla 6), el producto final se identificó como (+)-Spatulenol (Fig. 11).

Tabla 6a. Comparación de los datos obtenidos de ¹³C RMN de (+)-Spatulenol

| Señal | (+)-Spatulenol <i>Jamesoniella</i> <i>Rubricaulis</i> | (+)-Spatulenol (G. T. Malcher et al. 2004) | Asignación |
|-------|---|--|-----------------|
| 1 | 53,55 | 53,42 | C |
| 2 | 26,23 | 26,73 | CH ₂ |
| 3 | 41,89 | 41,74 | CH ₂ |
| 4 | 81 | 80 | CH |
| 5 | 54,49 | 54,33 | CH |
| 6 | 29,85 | 29,91 | CH |
| 7 | 27,64 | 27,48 | CH |
| 8 | 24,93 | 24,77 | CH ₂ |
| 9 | 38,61 | 38,86 | CH ₂ |
| 10 | 153,60 | 153,40 | C |

| | | | |
|----|--------|--------|-----------------|
| 11 | 20,41 | 20 | C |
| 12 | 16,27 | 16,15 | CH ₃ |
| 13 | 28,70 | 28,69 | CH ₃ |
| 14 | 106,40 | 108,28 | CH ₂ |
| 15 | 26,23 | 26,10 | CH ₃ |

Fuente: Autor, 2015

Tabla 6b. Comparación de los datos obtenidos de *RMN*¹*H* δ (de (+)-Spatulenol

| (+)-Spatulenol <i>Jamesoniella Rubricaulis</i> | (+)-Spatulenol (Curcino et al. 2013) |
|--|---|
| (2.21 m; H-1) | (2.22 m; H-1) |
| (2.07 m; 1.89 m; 2H-2) | (2.08 m; 1.90 m; 2H-2) |
| (1.81 m; 1.57 m; 2H-3) | (1.80 m; 1.60 m; 2H-3) |
| (1.29 t3.5; H-5) | (1.30 t3.5; H-5) |
| (0.50 dd, <i>J</i> = 11.3, 9.5 Hz; H-6) | (0.49 dd, <i>J</i> = 11.3, 9.5 Hz; H-6) |
| (0.74 m; H-7) | (0.74 m; H-7) |
| (1.70 m; 2H-8) | (1.70 m; 2H-8) |
| (2.3 dd, <i>J</i> = 12.6, 5.7 Hz, 2H-9) | (2.4 dd, <i>J</i> = 12.3, 5.3 Hz, 2H-9) |
| (1.04 s, 3H-12) | (1.06 s, 3H-12) |
| (1.08 s, 3H-13) | (1.08 s, 3H-13) |
| (4.69 s; 4.71 s; 2H-14) | (4.71 s; 4.69 s; 2H-14) |
| (1.30 s; 3H-15) | (1.32 s; 3H-15) |

Fuente: Autor, 2015

El spathulenol también conocido como 1H-cycloprop[e]azulen-7-ol-decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene es perteneciente a la familia de los sesquiterpenos. Las briofitas son una rica fuente de terpenoides y compuestos fenólicos (Zinsmeister et al. 1991; Asakawa, 1995, 2001). Se han reportado estudios de especie de *Jamesoniella colorata* en la cual se ha logrado el aislamiento y caracterización de seis diterpenoides de tipo labdano y un sesquiterpeno waitziacuminone. (Jakupovic et al. 1989).

Según estudios Chemfaces (2014) el Spathulenol (SP) presenta efectos inmunomoduladores, al mostrar una disminución en la proliferación de linfocitos con una IC₅₀ de 85.4 ± 11.08 g / ml. El Análisis de citometría de flujo utilizando anexina V y yoduro de propidio a linfocitos de sangre periférica estimuladas en presencia de SP demostró un aumento dependiente de la dosis en el porcentaje de células apoptóticas (IC₅₀; 77,2 ± 5,31 g / ml) en la cual no se observó ningún aumento significativo en la actividad de caspasa 3 en un tratamiento 20h de linfocitos estimulados en comparación con el control. El SP mostró la capacidad de inhibir la proliferación de los linfocitos y para inducir la apoptosis en estas células, posiblemente a través de una vía independiente de la caspasa-3.

3.4 Determinación de la actividad antibacteriana

Los análisis de los extractos desclorofilados de diclorometano y metanol no presentaron ninguna actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. En la tabla 7 se puede evidenciar los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana.

Tabla 7 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos desclorofilados frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas

| BACTERIAS | CH ₂ CL ₂ | MeOH |
|-------------------------------|---------------------------------|-------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | >2000 ug/mL | >2000 ug/mL |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | >2000 ug/mL | >2000 ug/mL |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | >2000 ug/mL | >2000 ug/mL |
| <i>Escherichia coli</i> | >2000 ug/mL | >2000 ug/mL |
| <i>Proteus vulgaris</i> | >2000 ug/mL | >2000 ug/mL |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | >2000 ug/mL | >2000 ug/mL |
| <i>Staphylococcus Aureus</i> | >2000 ug/mL | >2000 ug/mL |

Fuente: Autor, 2015

No existen estudios en las que se evidencie algún tipo de actividad antibacteriana de nuestra especie *Jamesoniella*. Sin embargo otros investigadores han reportado actividad bacteriana en algunos géneros de la familia *Jungermanniaceae*, como por ejemplo se puede citar a Arróniz et al. (2006), quien demostró que la especie *Jungermannia exsertifolia cordifolia* tiene una actividad notable contra *Mycobacterium tuberculosis* virulenta H37Rv en concentraciones inhibitorias mínimas de 61 a 24 microg / ml.

Por otro lado Alonso et al. (2005) evaluó la actividad bacteriana de *Jungermannia* spp y reporto una significativa actividad contra bacterias y levaduras gram positivas y gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida tropicalis* y *Aspergillus niger*).

3.5 Determinación de la Actividad antifúngica

Los análisis de los extractos desclorofilados de diclorometano y metanol presentaron una actividad antifúngica muy leve o nula. En la tabla 8 se observa los resultados de actividad antifúngica, en la cual se puede evidenciar que el extracto metanólico presenta un mayor efecto ante las cepas utilizadas.

Tabla 8 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos desclorofilados frente a Hongos Dermatofitos.

| HONGOS DERMATOFITOS | CH ₂ CL ₂ | MeOH |
|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| <i>Trichophyton rubrum</i> | >1000 g/mL | 2000 ug/mL Positivo A |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 125 ug/ML Positivo D | 2000 ug/mL Positivo A |

Fuente: Autor, 2015

No existen investigaciones de actividad antifúngica de nuestra especie *Jamesoniella*, y los estudios realizados a la familia *Jungermanniaceae* son muy escasos, como por ejemplo podemos citar a Alonso et al. (2005) el cual reporto una actividad antifúngica moderada contra los dermatofitos en la especie *Jungermannia* spp, por tanto este estudio realizado de actividad antifúngica sería uno de los primeros para esta especie.

3.6 Análisis del aceite esencial

Cada análisis físico y químico realizado al aceite esencial se hizo por triplicado, tomando como resultados finales la media aritmética (\bar{x}) de cada uno de ellos. En la tabla 9 se evidencia los resultados de las propiedades físicas del aceite, obtenidos por los diferentes métodos físicos aplicados.

Tabla 9 Propiedades físicas de Aceite esencial

| Aceite | Aspecto | Densidad g/cm ³ | Índice de refracción | Rendimiento (%) |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------|
| <i>Jamesoniella rubricaulis</i> | Amarrillo viscoso | 0.940 | 1,47 | 0,56 |

Fuente: Autor, 2015

3.6.1 Composición química del aceite esencial.

La determinación de los compuestos del aceite esencial se realizó en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masa (CG-EM), utilizando la columna capilar DB-5MS basándose en la comparación de los espectros de masa con los espectros de la base de datos Wiley 7n.1 del equipo y los índices de Kóvats calculados y corroborando con los reportados en la literatura. Se identificaron un total de 20 compuestos que corresponden a un 98,23 % de los compuestos totales del aceite esencial (Tabla 10) y su cromatograma se lo puede apreciar en el Anexo 6.

Tabla 10 Composición química del aceite esencial de *J. Rubricaulis*.

| Compuesto | DB-5MS | | % Área | Literatura |
|----------------------------------|--------|------|--------|------------|
| | IKb | IKRF | | |
| Calamenene <cis-> | 1522 | 1528 | 2,75 | Adams 2007 |
| Ledol | 1596 | 1602 | 11,66 | Adams 2007 |
| Spathulenol | 1570 | 1577 | 0,74 | Adams 2007 |
| Germacrene B | 1552 | 1559 | 0,36 | Adams 2007 |
| α -Bulnesene | 1503 | 1509 | 3,99 | Adams 2007 |
| Selinene < δ -> | 1481 | 1492 | 21,48 | Adams 2007 |
| Viridiflorol | 1588 | 1592 | 8,65 | Adams 2007 |
| Cadinol < α -> | 1650 | 1652 | 0,30 | Adams 2007 |
| Hexadecanoic acid | 1973 | 1959 | 4,20 | Adams 2007 |
| Cycloisolongifolene <didehydro-> | 1359 | 1347 | 4,19 | Adams 2007 |
| Cadinene < δ -> | 1513 | 1522 | 0,94 | Adams 2007 |
| Selinene < β -> | 1545 | 1489 | 6,79 | Adams 2007 |
| Aromadendrene | 1451 | 1439 | 1,10 | Adams 2007 |
| Germacrene D | 1473 | 1484 | 0,33 | Adams 2007 |
| α -Humulen | 1479 | 1452 | 0,65 | Adams 2007 |
| Viridiflorene(=ledene) | 1484 | 1496 | 3,99 | Adams 2007 |
| Elemene < γ -> | 1489 | 1434 | 21,48 | Adams 2007 |
| α -Selinene | 1548 | 1498 | 0,32 | Adams |

| | | | | |
|--|------|------|--------------|---------------|
| | | | | 2007 |
| Longifolene | 1437 | 1407 | 0,27 | Adams 2007 |
| Benzoic acid, 2,4-dihydroxy-3,6-dimethyl-, methyl | 1707 | 1709 | 5,03 | Adams 2007 |
| | | | 99,23 | |

Fuente: Autor, 2015

Tomando en cuenta el % de Área, los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Jamesoniella rubricaulis* son: Selinene < δ -> (21,48%), Elemene < γ -> (21,48%), Ledol (11,66%), Viridiflorol (8,65%) y Selinene < β -> (6,79%). No se han encontrado estudios referentes a la composición del aceite esencial de nuestra especie.

Es importante mencionar que los compuestos químicos encontrados en el aceite esencial son de tipo terpenoide, los cuales han sido reportados según Hertewich (2013), como fuente química del genero *Jamesoniella*.

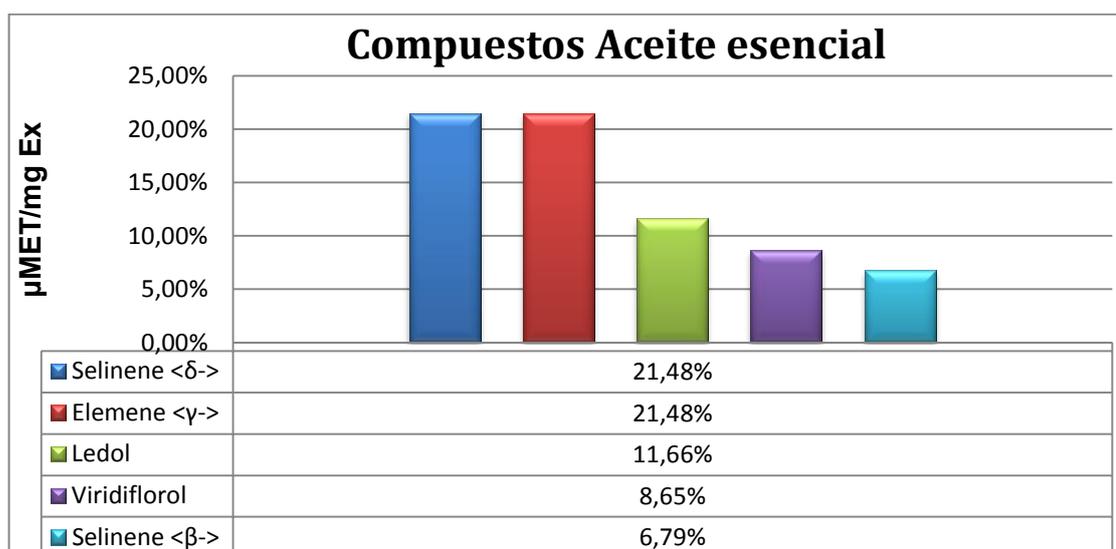


Figura 12 Compuestos mayoritarios del aceite esencial de J. Rubricaulis

Fuente: Autor, 2015

3.7 Actividad Antioxidante

Una vez analizadas los extractos por los métodos ABTS y DPPH y con los datos obtenidos se determinó dos extractos con actividad antioxidante elevada (MeOH-H₂O, AcOEt) y dos extractos con actividad antioxidante baja (Hex-CH₂Cl₂). Se ha considerado como actividad antioxidante elevada aquellos extractos que su concentración sea mayor a 400 μ MET/mg Ex y como actividad antioxidante baja aquellos que su concentración sea inferior a 400 μ MET/mg Ex.

En los anexos 7 y 8 constan los datos y la respectiva gráfica de la curva de calibración, elaborada con las absorbancias de cada concentración que van desde 25 hasta 800 μ Moles

para DPPH y para ABTS; además, se encuentra la pendiente (-0.0008), intersección (0,9217) y el valor R2 (coeficiente de determinación), datos utilizados para la obtención de la concentración final de los extractos; según Burneo P (2009), se debe destacar el valor R2, ya que permite evaluar la proporción de variabilidad de la variable dependiente, este coeficiente puede presentar valores entre 0 y 1, y mientras más se acerque a 1 los datos se ajustan de mejor manera al modelo de ecuación propuesto.

3.7.1 Método DPPH.

En la figura 13 se puede apreciar que los extractos con mayor actividad antioxidante para DPPH, es el extracto de MeOH-H₂O (903,08 $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$) y el extracto de acetato de etilo (877,19 $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$), mientras que los extractos de hexano y diclorometano presentan una actividad antioxidante baja, al presentar un valor inferior a 400 $\mu\text{MET/mg Ex}$

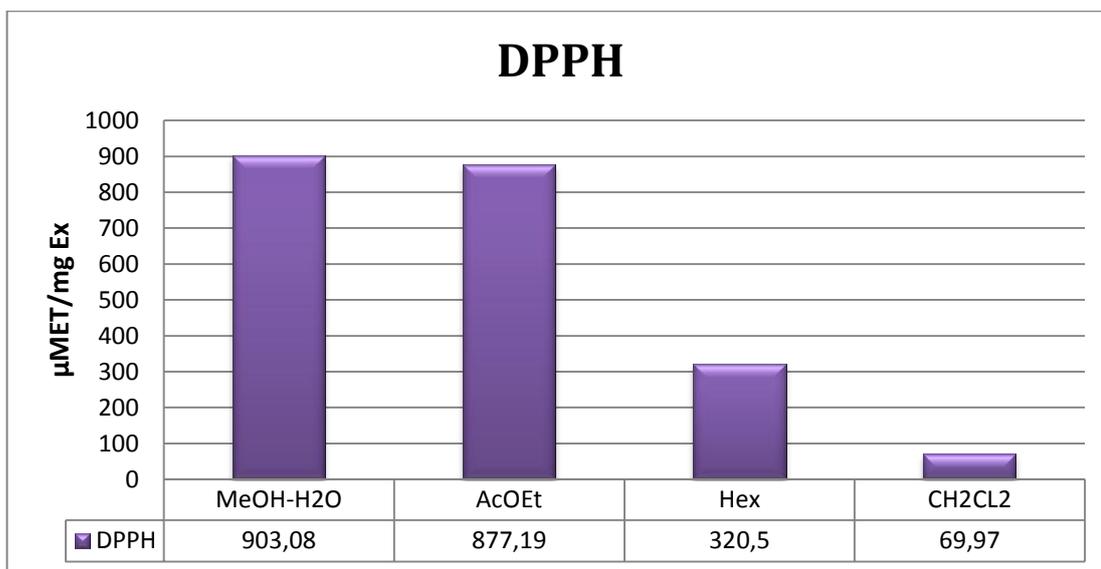


Figura 13 Extractos con los valores respectivos expresados en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ (DPPH).

Fuente: Autor, 2015

3.7.2 Método ABTS.

De igual manera en la figura 14 se puede evidenciar que los extractos con mayor actividad antioxidante para ABTS son los extractos de MeOH-H₂O (814,08 $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$) y de acetato de etilo (808,12 $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$), los otros dos extractos de hexano y diclorometano tienen actividad antioxidante baja al presentar un valor inferior a 400 $\mu\text{MET/mg Ex}$.

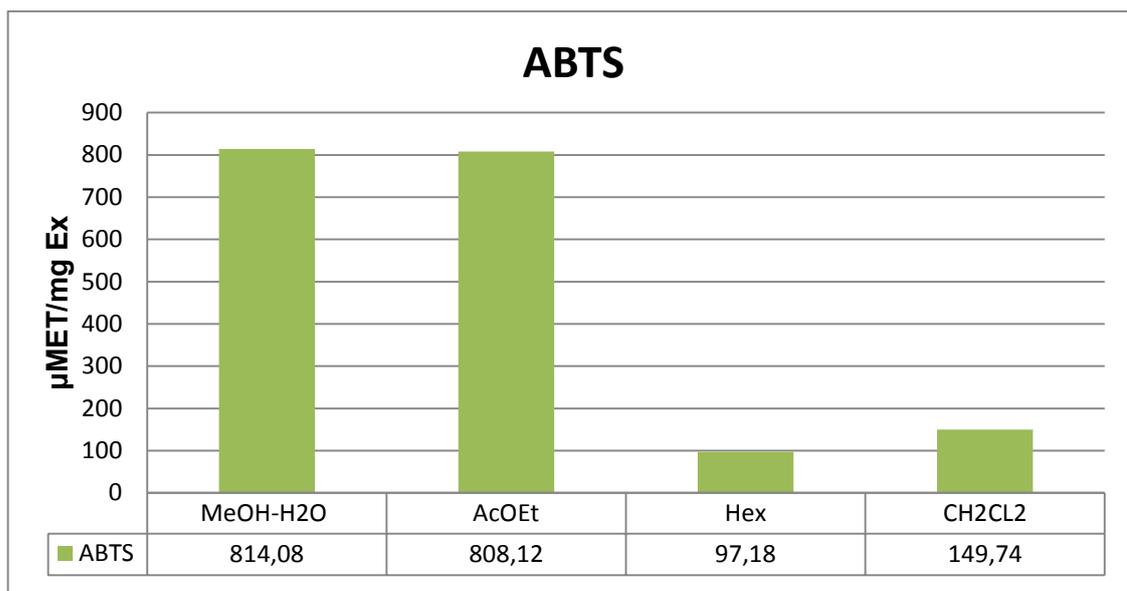


Figura 14 Extractos con los valores respectivos expresados en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ (ABTS).

Fuente: Autor, 2015

En la Tabla 11 se evidencia un resumen detallado de los valores de DPPH y ABTS de los cuatro extractos, expresados en ($\mu\text{MET/mg Ex}$),

Tabla 11 Resumen de la actividad antioxidante de los extractos

| ESPECIE VEGETAL | SOLVENTE | CAPACIDAD ANTIOXIDANTE | | | |
|----------------------------------|---|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
| | | ABTS ug Trolox/mg muestra | | DPPH ug Trolox/mg muestra | |
| <i>Jamesoniella rubri caulis</i> | CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃ | 97,18 | ± 8,18 | 320,50 | ± 9,54 |
| | CH ₂ CL ₂ | 149,74 | ± 9,82 | 69,97 | ± 7,57 |
| | C ₄ H ₈ O ₂ | 808,12 | ± 4,58 | 877,19 | ± 9,37 |
| | MeOH-H ₂ O | 814,08 | ± 2,02 | 903,08 | ± 3,36 |

Fuente: Autor, 2015

No existen estudios científicos de actividad antioxidante que nos permitan corroborar, nuestros valores, siendo estos los primeros resultados de actividad antioxidante en su clase dentro del género *Jamesoniella*.

CONCLUSIONES

- ✓ A partir del material vegetal seco de *J. rubricaulis* se obtuvo los extractos de diclorometano y metanol respectivamente, siendo el extracto metanólico con mayor rendimiento tanto en su estado puro y desclorofilado.
- ✓ La separación cromatográfica y análisis espectroscópico de los extractos desclorofilados de diclorometano y metanol de la especie *J. rubricaulis* condujo al aislamiento e identificación del Spatulenol de origen terpénico cuya fórmula molecular es $C_{15}H_{24}O$, el cual según la literatura tiene efectos inmunomoduladores, inhibiendo la proliferación de los linfocitos e induciendo la apoptosis en estas células.
- ✓ En los extractos de MeOH-H₂O y AcOEt se observó una mayor actividad antioxidante para DPPH y ABTS; mientras que en los extractos de CH₂CL₂ y Hex se evidencio una menor actividad antioxidante.
- ✓ Los extractos totales desclorofilados de diclorometano y metanol no presentaron ninguna actividad antimicrobiana para bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero si una leve actividad antifúngica contra *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.
- ✓ Del aceite esencial de *J. rubricaulis* fueron identificados un total de 20 compuestos, siendo los compuestos mayoritarios según su porcentaje de área: Selinene <δ-> (21,48%), Elemene <γ-> (21,48%), Ledol (11,66%), Viridiflorol (8,65%) y Selinene <β-> (6,79%); estos son principalmente de tipo terpénico los cuales se encuentran reportados en la literatura.

RECOMENDACIONES

- Seguir con la investigación científica de otras especies del género *Jamesoniella* presentes en el Ecuador, aislando e identificando nuevos compuestos.
- Lograr obtener mayor cantidad de muestra para lograr una plena identificación de los metabolitos aislados.
- Realizar estudios fitoquímicos de mayor profundidad mediante técnicas modernas que permitan la separación de compuestos más puros, su identificación y la evaluación de su actividad: así mismo, se debería continuar buscando mayores evidencias experimentales, que corroboren la actividad biológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, R.; Gomis, H.; Taddei, A.; Sajo, C. *Let. Drug Des. Discov.* 2005, 2, 255.
- Alpert, P. 2005. The Limits and Frontiers of Desiccation-Tolerant Life. *Integrative and Comparative Biology* 45: 685-695
- Arróniz-Crespo, M., Núñez-Olivera, E., Martínez-Abaigar, J., Becker, H., Scher, J., Zapp, J., Tomás, R., Beaucourt, N. (2006). Physiological changes and UV protection in the aquatic liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *cordifolia* along an altitudinal gradient of UV-B radiation. *Functional Plant Biology*, 33, 1025-1036.
- Aria Baniahmad; Hans-Rainer Hoffmann & Rudolf Matusch, "Aislamiento de Ácido Atraric, Síntesis de ácido Atraric derivados, y el empleo de ácido Atraric y sus derivados para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna, carcinoma de próstata y espinobulbar Atrofia Muscular", publicaron 2009-06- 04, asignado a Aria Baniahmad y Hans-Rainer Hoffmann
- Asakawa, Y., 1982. Componentes químicos de las hepáticas. En: Herz, W., Grisebach, H., Kirby, GW (Eds.), *El progreso en la Química de Productos Naturales Orgánicos*, vol. 42. Springer, Viena, pp. 1-285
- Asakawa, Y., 1990a. Las sustancias biológicamente activos de las briofitas. En: Chopra, RN, Bhatla, SC (Eds.), *Desarrollo Bryophyte: Fisiología y Bioquímica*. CRC Press, Boca Raton, pp. 259-287.
- Asakawa, Y., 1990b. Terpenos y compuestos aromáticos con farmacológico Actividad de briofitas. En: Zinsmeister, DH, Mues, R. (Eds.), *Briófitas: Su Química y Química Taxonomía*. Oxford University Press, Oxford, pp. 369-410
- Asakawa, Y., 1993. Terpenoides biológicamente activos y compuestos aromáticos de Hepáticas y no comestible Seta *Cryptoporus volvatus*. En: Colegate, SM Molyneux, RJ (Eds.), *Productos Naturales Bioactivos: Detección, aislamiento, y Determinación Estructural*. CRC Press, Boca Raton, pp. 319-347.
- Asakawa, Y., 1994. Destacados en fitoquímica de Hepaticae biológicamente activa terpenoides y compuestos aromáticos. *Pure Appl. Chem.* 66, 2193-2196.
- Asakawa, Y., 1995. Componentes químicos de las briofitas. En: Herz, W., Kirby, WB, Moore, RE, Steglich, W., Tamm, Ch. (Eds.), *El progreso en la Química de Productos Naturales Orgánicos*, vol. 65. Springer, Viena, pp. 1-618.
- Asakawa, Y., 1999. Fitoquímica de Briófitas: Terpenoides biológicamente activas y compuestos aromáticos de Las hepáticas. En: Romeo, J., fitoquímicos (Ed.) *Protección en Salud Humana, Nutrición y Defensa Vegetal*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, Nueva York, pp. 319-342

- Belkin, M., D. B. Fitzgerald & M. D. Felix. 1952–1953. Tumor-damaging capacity of plant materials. II. Plants used as diuretics. *J. Nat. Cancer Inst.* 13: 741–744.
- Benitez A., Gradstein R., Prieto M., Aragón G., León-Yanez S., Moscoso A. & Burghardt M. 2012. Adiciones a la Flora de Briófitas del Ecuador 2. *Tropical Bryology* 34: 99-106.
- Buss, Antonio; Marcos Butler (2010). *Química de Productos Naturales para el descubrimiento de fármacos*. Real Sociedad de Chemisry. pp. 145, 146. ISBN 978-0-85404-193-0.
- Bruneton J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A
- Cardoso C.L., Silva H.S, Castro-Gamboalan., Bolzani V.S. (2005). New Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis turbinata* and their Antioxidant Activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*; 16: 1353-1359.
- Carochi M., Ferreira I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*; 51: 15–25.
- Chemfaces. (2014). Product information. Recuperado de: <http://www.chemfaces.com/manual/Spathulenol-CFN97150.pdf>
- Chen YG., Canción XP., Hai LN., Lv YP., Colmillo A., Halaweish F., Liao XR. (2006). Compounds with DNA cleaving activity from *Kadsura ananosma*. *Pubmed* 61(10):8912. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Compounds+with+DNA+cleaving+activity+from+Kadsura+ananosma>.
- Churchill, S. y E. Linares. 1995. *Prodromus Bryologiae Novo Granatensis*. Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales de Colombia, Biblioteca «José Jerónimo Triana» No 12: 1- 924.
- Coecoceiba.(2003). La diversidad de plantas y el conocimiento tradicional en nuestras comunidades-problemas en torno a la protección y conservación del conocimiento tradicional y ejemplos de usos de las plantas en el Cantón de Upala y áreas aledañas, Zona Norte, Costa Rica, Publicaciones Iberia, 51p.
- Compound search. Compound name: 1-Hydroxy-1-methyl 7 (methylethenyl) [1,2,3,3a,4,5,6,7] octahydro azulene. Recuperado de: <http://www.compoundsearch.com/showRecordSummary.pl?productid=1&recordid=148521>
- Cummins, P.M., Dowling, O. y O'Connor, B.F.(2011). *Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application to the Partial Purification of Soluble Mammalian*

- ProlylOligopeptidase Protein Chromatography . In: Walls D, Loughran ST, editors: Humana Press.p 215-228
- Cruz, A., Padilla, I., Garcia, E. (2009). *Laboratorio de química bioorgánica. Manual de prácticas*. Instituto Politécnico Nacional. México. 105-111
 - De la Torre, L., Alarcón, D., Kvist, L., & Salazar, J. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas. Quito: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
 - Duh CY., El-Gamal AA., Canción PY. , Wang SK , Dai CF. (2004). Steroids and sesquiterpenoids from the soft corals *Dendronephthya gigantea* and *Lemnalia cervicorni*. Pubmed 67(10):1650-3. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=steroids%20and%20sesquiterpenoids%20from%20the%20soft%20coral%20dendronephthya%20gigantea%20and%20lemnalia%20cervicorni.&cmd=correctspelling>.
 - Frahm, J.-P. 2004. New frontiers in bryology and lichenology: Recent developments of commercial products from bryophytes. *The Bryologist* 107: 277-283
 - G. T. Malcher . C. Santos, M. A. S. Lima, E. R. Silveira. (2004). Unidimensional NMR, Very Simple but Important Tool for Plant Populational Studies: *Croton sonderianus* Muell. Arg. Ann. Magn. Reson. Vol. 3, Issue 3, 99-101. Recuperado de: <http://www.auremn.org.br/Annals/2004-vol3-num3/2004-3-99-101.pdf>
 - García L.A, (2001).Determinación de estructuras por método espectroscópicos. Memorias Curso UANL
 - Glime, J. M. & D. Saxena. 1991. *Uses of Bryophytes*. New Delhi. 100 Pp.
 - Glime J.M. 2007. *Bryophyte Ecology*. Volume 1. *Physiological Ecology*. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Consultado en Agosto 2011. Disponible en: <http://www.bryoecol.mtu.edu/>
 - Goffinet B. & Shaw J. 2009. *Byophyte Biology*. Second Edition. Cambridge University Press. New York. 565p.
 - Grosse-Brauckmann, G. 1979. Major plant remains of moor profiles from the area of a stone-age lakeshore settlement on Lake Duemmer, West Germany. *Phytocoenologia* 6: 106–117.
 - Gradstein, S.R., Churchill, S.P. & Salazar-Allen, N. 2001. Guide to the Bryophytes of Tropical America. *Memoirs of The New York Botanical Garden* 86: 1-577.
 - Hooijmaijers C. A. M. (2008). Desiccation tolerance in red and green gametophytes of *Jamesoniella colorata* in relation to photoprotection. – *Plantae* 227: 1301–1310.
 - Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and applications*. Third Edition John Wiley and Sons Ltd. Ed., U.K., (2007)

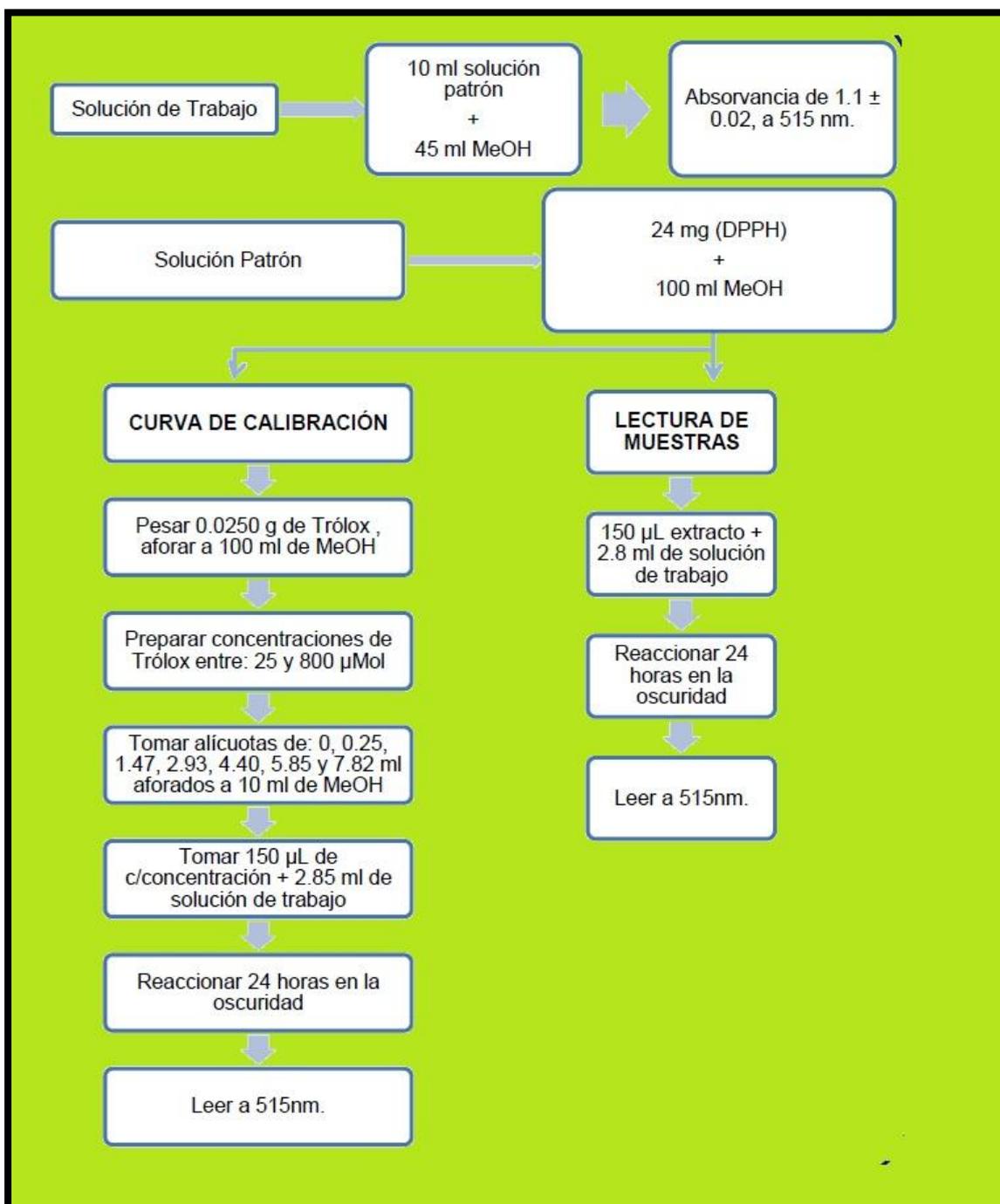
- Larraín, J. 2010. Musgos de Chile. Recuperado de: <http://www.musgosdechile.cl>
- Lemos-Michel, E. 2001. Hepáticas Epífitas sobre o pinheiro-brasileiro no Rio Grande do Sul. Editora da Universidad de, Porto Alegre, 191 p.
- López, M.(2012).Manual de plantas medicinales para guinea ecuatorial.1ra Ed.España
- López, E. (2009) Evaluación de Parámetros Para Pruebas De Susceptibilidad Antifúngica En Hongos Filamentosos Mediante La Técnica de Difusión en Agar. España
- Martínez J., Encarnación O. (2004). Los briofitos: Plantas diminutas al borde del masoquismo. *Paginas con firma*. Págs. 24-28. Recuperado de <https://www.uam.es/informacion/asociaciones/SEB/divulgacion/articuloinfoambiental.pdf>.
- Marwah R.G., Fatope M.O., Mahrooqi R.A., Varma G.B., Abadi H.A., Khamis S., Burtamani-Al. (2007) Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*; 101:465-470.
- Mishler, BD., E. DE LUNA. 1991. El uso de los datos ontogenéticos en análisis filogenético de los musgos. *Avances en Briología* 4: 121-167
- Ludwiczuk, A., Komala, I., Pham, A., Bianchini, J.-P., Raharivelomanana, P., Asakawa, Y., 2009. Los componentes volátiles de las hepáticas tahitianas seleccionados. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1387-1392
- Naranjo, P., Escaleras, R., (1995). La Medicina Tradicional en el Ecuador. Corporación Editora Nacional, Quito, p. 192
- Nuñez, M. E. (1982), Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore, Editorial Universidad de Costa Rica, 318p
- Pant G. & S. D. Tewari. 1990. Bryophytes and mankind. *Ethnobotany* 2: 97–103.
- Pengelly, A. (1996). *The constituents of Medicinal Plants*. 2nd Ed. Cab Publishing, U. K.
- Perez B., Drapper I., Aauri D., Bujalance R. 2011. Bryophytes: an approximation to the simplest land plants. *Memorias R. Soc. Esp. Hist. Nat.*, 2ª ép., 9.
- P.Pietta, P. Simonetti, P. Mauri “Antioxidant Activity of selected medicinal Plants”.1997
- Renzaglia, KS, RJ Duff, DL Nickrent, YD. Garbary. 2000. Vegetativo y las innovaciones reproductivas de las plantas terrestres principios: implicaciónes para una filogenia unificada. *Transacciones de la Royal Society, Londres* 355: 769-793

- Reub V, SH, König, WA, 2005. Olefínico isotiocianatos y iminodithiocarbonates de la agrimonia *coriandrina Corsinia*. Eur. J. Org. Chem., 1184-1188.
- Rocha, L. (2000). Control de calidad de productos fitoterapéuticos. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*, 78, 157.
- Romeh, A. A. (2013). Phytochemicals from *Ficus sycomorus* L. leaves act as insecticides and acaricides. *African Journal of Agricultural Research*, 3571-3579.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2004). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev Mex Fitopatol*, 21, 355-363.
- Sharapin, N., Leandro, M. R., Eliane, S. C., Elisabeth María, R. d., Elizabeth, V. d., & José María, L. d. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santa Fe de Bogotá, D.C.: Convenio Andrés Bello (CAB) y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
- Schuster, RM, (1983), Nuevo Manual de Briología 1: 605. Nichinan.
- Schuster, R. M. 1966. The Hepaticae and Anthocerotae of North America. Vol. 1. Columbia Univ. Press. N. Y. 1344 Pp.
- Scher JM, Schinkovitz A, Zapp J, Wang Y, Franzblau SG, Becker H, Lankin DC, Pauli GF. Structure and anti-TB activity of trachylobanes from the Liverwort *Jungermannia exsertifolia* ssp. *cordifolia*. J Nat Prod 2010;73: 656-663
- Stark, L. R.; McLetchie, D.N. & Mishler, B.D. (2005). Sex expression, plant size, and spatial segregation of the sexes across a stress gradient in the desert moss *Syntrichia caninervi*. The Bryologist 108: 183-193.
- Shaw, J. & K. Renzaglia. 2004. Phylogeny and diversification of bryophytes. American Journal of Botany 91(10): 1557–1581
- Silverstein R., Webster F., Kiemle D. 2005. Spectrometric identification for organic compounds. Edit: Jhon Wiley and Sons. USA.
- Taiz, L., E. Zeiger. (2006) Fisiología vegetal. 3ra edición. Publicaciones de la universidad de Jaume. 1265 pp.
- Techniques and Experiments for Advanced Organic Laboratory, Charles M. Garner/ "Experiment 3: Introduction to "Flash" Column Chromatography", Wiley, John & Sons, (1996), ISBN-13: 9780471170457
- Theplantlist.(2010).Jungermanniaceae.URL:www.theplantlist.org/browse/B/Jungermanniaceae/Tropical bryology. *Jamesoniella rubricaulis*. Recuperado de: http://tropicalbryology.org/pic/Moose_der_Welt/Bildergalerie/J/photo85.htm

- Van Ginkel, A. (2003). Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB“Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción.”
- Vanderpoorten, A. & Goffinet, B. 2009. Introduction of Bryophytes. Cambridge University Press, 294p.
- Vintimilla, M. G. (2013, Enero). Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos agroindustriales de. *Trabajo de fin de Titulación de Ingeniero en Industrias Agropecuarias*. Loja, Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Xie CF, Lou HX. 2009. Secondary Metabolites in Bryophytes: An Ecological Aspect. *Chemistry Biodiversity* 9:303-12.
- Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao y B. D. Oomah “Actividad Antioxidante y Fenoles totales y frutas selectas, vegetales y productos de grano” *Journal Agric Food Chem*. 1998
- Jakupovic, J., Schuster, A., Bohlmann, F., King, R.M., Haegi, L., 1989. Labdane derivatives and other constituents from *Waitzia acuminata*. *Phytochemistry* 28, 1943–1948.
- Wang, X.-N., Yu, W.-T., Lou, H.-X., 2005. Antifungal constituents from the Chinesemoss *Homalia trichomanoides*. *Chem. Biodivers.* 2, 139–145.
- Wang, M.C., Bohmann, D., Jasper, H. (2005). JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121(1): 115--125.
- Wink M. (1999). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*; Annual Plant Reviews, volumen 2Ed. Sheffield academic Press.

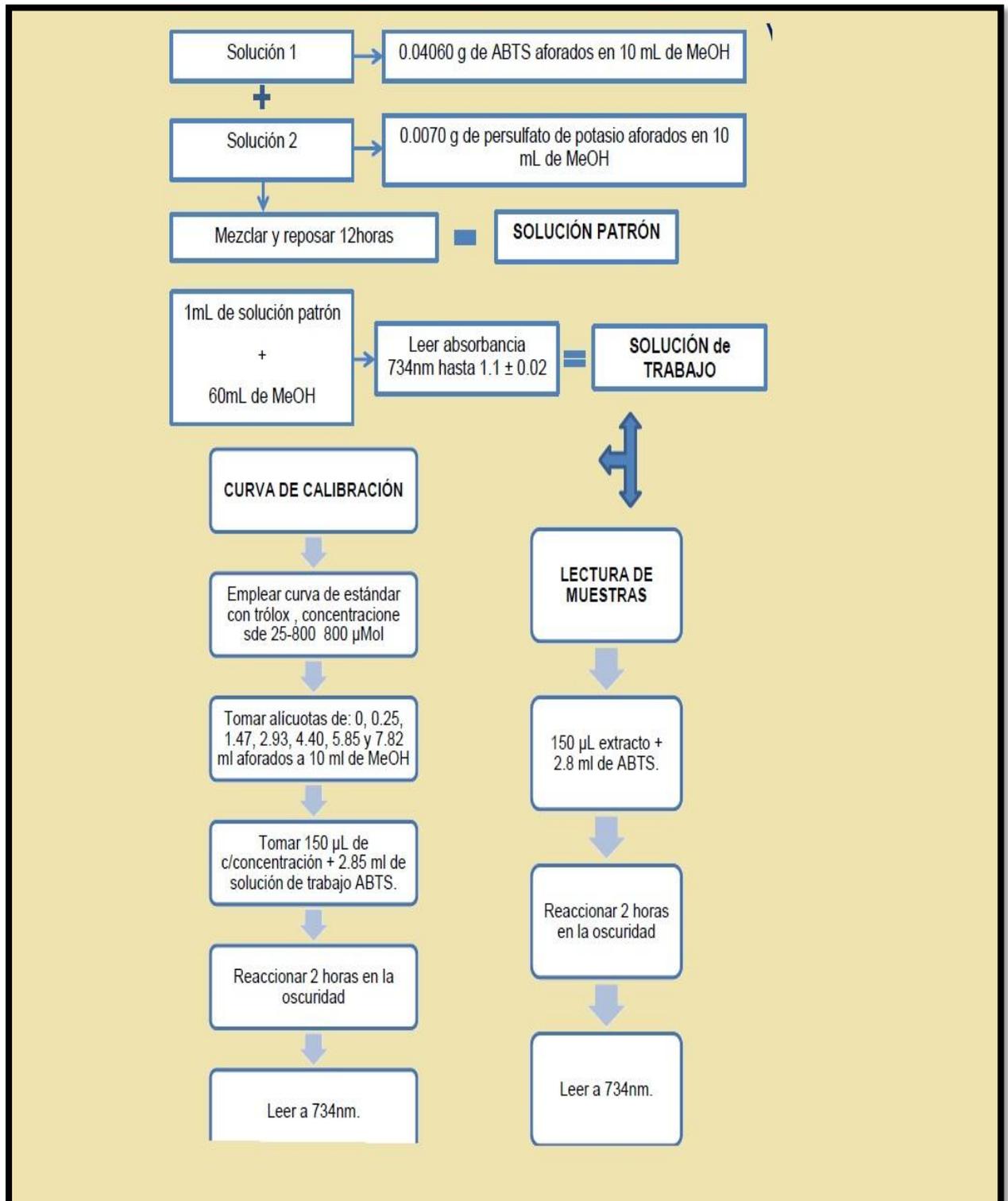
ANEXOS

Anexo 1 Esquema de determinación de actividad antioxidante (DPPH)



Fuente: Vintimilla, 2013

Anexo 2 Esquema de determinación de actividad antioxidante (ABTS)



Fuente: Vintimilla, 2013

Anexo 3 Determinación del Índice de refracción según la norma ANFOR NF 75 -112

Principio

El Índice de Refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del Aceite Esencial, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es (589.3 ± 0.3) nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20°C, salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 y 30 °C según el punto de fusión del aceite considerado.

Modo de operación

Determinación Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de $\pm 0.2^\circ\text{C}$ y debe mantenerse a $\pm 0.2^\circ\text{C}$.

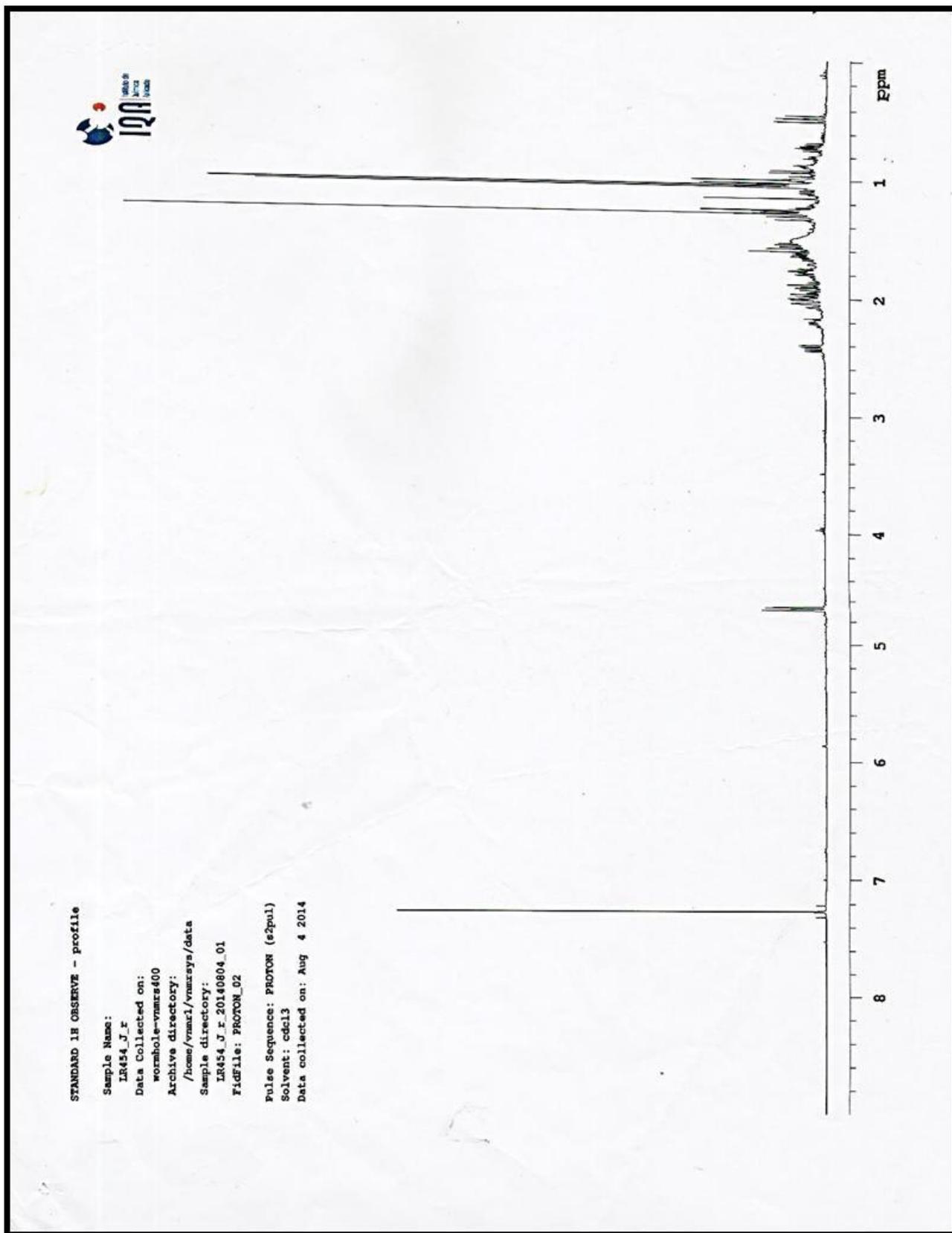
Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizará la medida.

Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

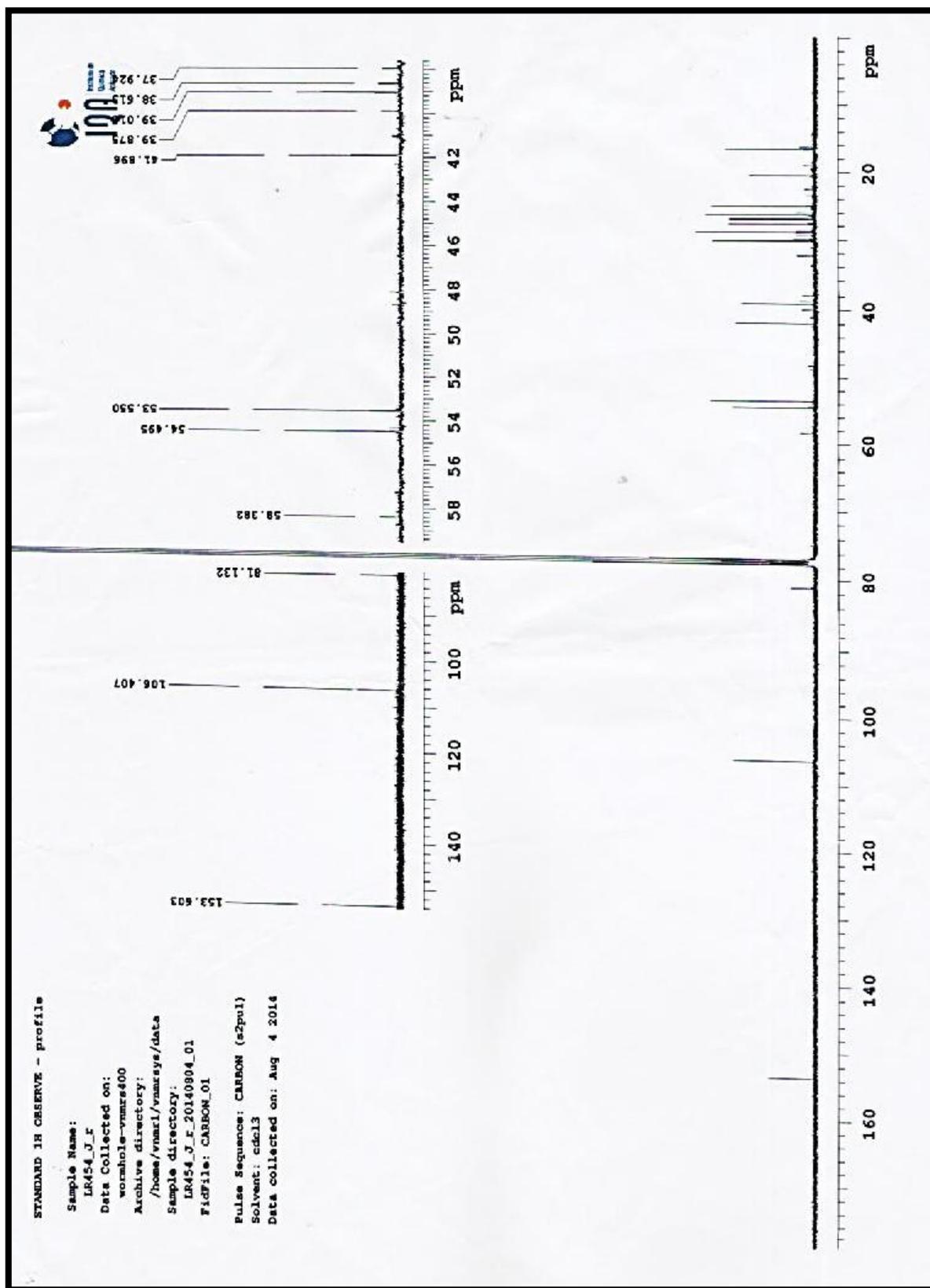
Nota:

- Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.
- La precisión de la determinación es de ± 0.0002 .

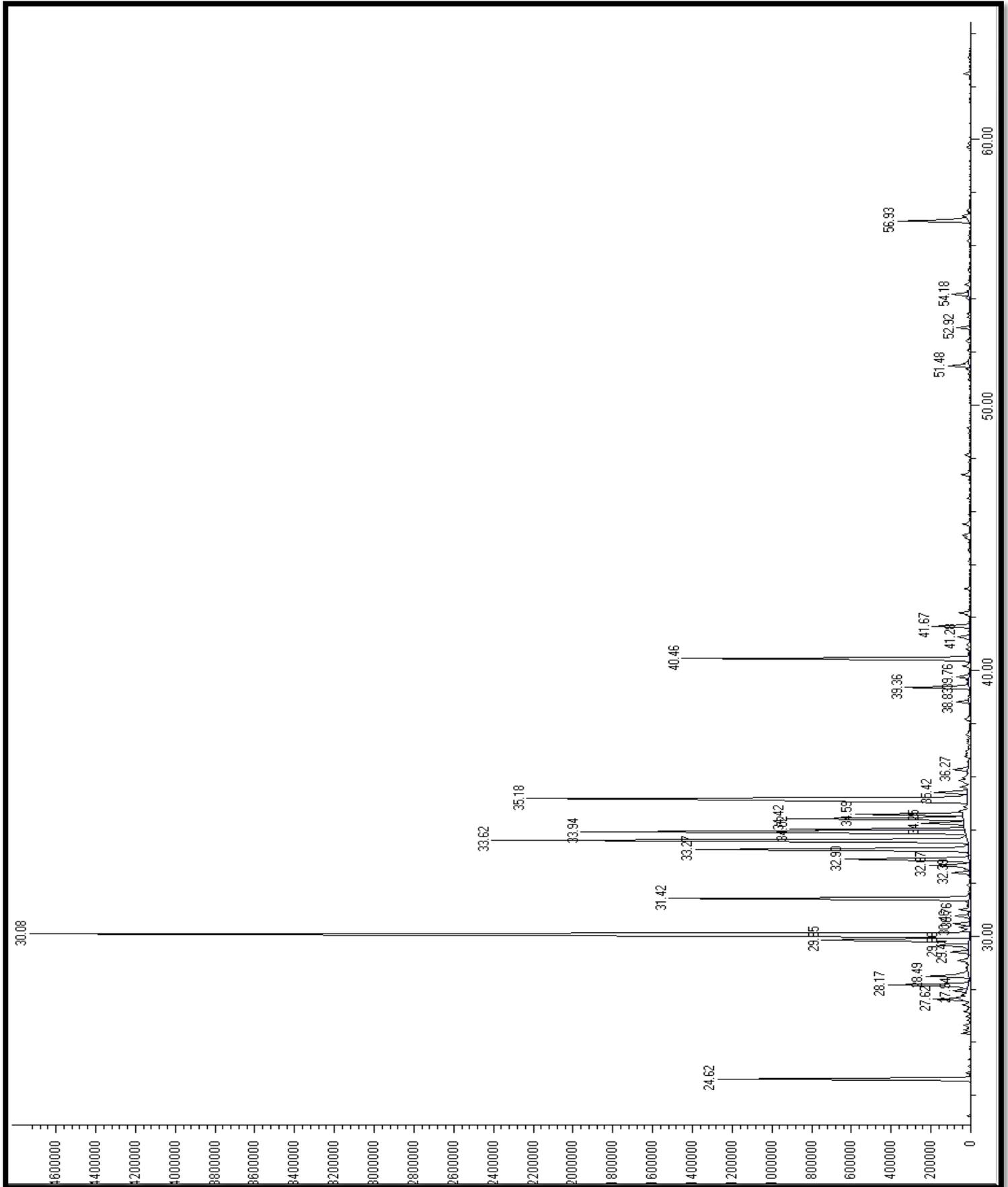
Anexo 4 Espectro ^1H NMR del Spathulenol (400MHz, CDCl_3)



Anexo 5 Espectro ^{13}C NMR del Spathulenol (101 MHz, CDCl_3)

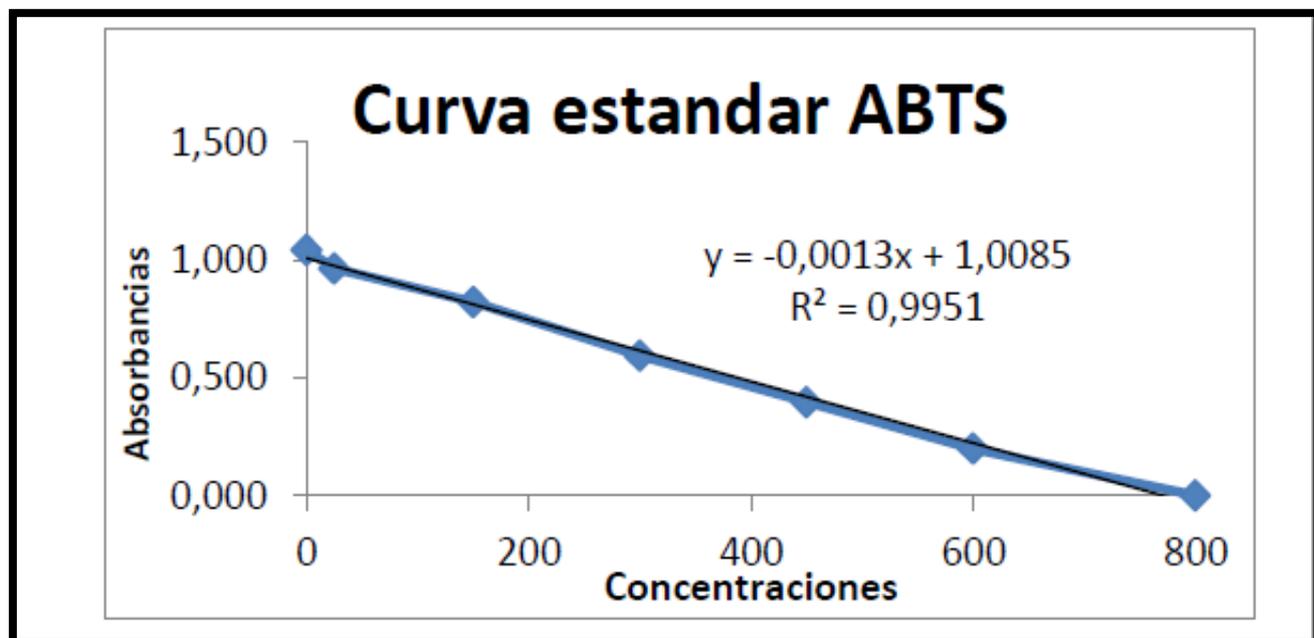


Anexo 6 Espectro CG-EM del Aceite esencial



Anexo 7 Actividad Antioxidante: Curva de Calibración ABTS.

| Concent. | Absorbancia | | | Promedio |
|-----------------|--------------------|-------|-------|-----------------|
| 0 | 1,043 | 1,037 | 1,048 | 1,043 |
| 25 | 0,965 | 0,958 | 0,968 | 0,964 |
| 150 | 0,823 | 0,815 | 0,828 | 0,822 |
| 300 | 0,597 | 0,591 | 0,596 | 0,595 |
| 450 | 0,4 | 0,397 | 0,397 | 0,398 |
| 600 | 0,202 | 0,2 | 0,198 | 0,200 |
| 800 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,002 |



Anexo 8 Actividad Antioxidante: Curva de Calibración DPPH.

| Concent. | Absorbancia | | | Promedio |
|----------|-------------|-------|-------|----------|
| 0 | 0,925 | 0,92 | 0,92 | 0,922 |
| 25 | 0,892 | 0,889 | 0,888 | 0,890 |
| 150 | 0,812 | 0,812 | 0,811 | 0,812 |
| 300 | 0,668 | 0,665 | 0,666 | 0,666 |
| 450 | 0,561 | 0,56 | 0,56 | 0,560 |
| 600 | 0,433 | 0,432 | 0,431 | 0,432 |
| 800 | 0,255 | 0,253 | 0,256 | 0,255 |

