



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULO DE INGENIERO QUÍMICO

**Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de
Triplaris cumingiana con posible actividad antiparasitaria**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Solano Cuenca, Karol Tatiana

DIRECTOR: Romero Benavides, Juan Carlos, Ing.

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

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniero.

Juan Carlos Romero Benavides

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración

El presente trabajo de titulación: Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de *Triplaris cumingiana* con posible actividad antiparasitaria, realizado por Solano Cuenca Karol Tatiana ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2015

f) Juan Carlos Romero Benavides

C.I: 1103018477

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Solano Cuenca Karol Tatiana declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de *Triplaris cumingiana* con posible actividad antiparasitaria, de la Titulación de Ingeniero Químico, siendo Juan Carlos Romero Benavides director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f.

Autor: Solano Cuenca Karol Tatiana

Cédula: 1104734304

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado a mis padres, Alfredo y Rosa, por todo su amor, sacrificio y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida estudiantil y que hoy permiten que logre alcanzar uno más de mis sueños.

Karol Tatiana

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser el centro de mi vida, mi motor principal, mi fuente de inspiración, mi escudo y fortaleza, sobre todo por darme la sabiduría necesaria y acompañarme en el transcurso de toda mi vida estudiantil para culminar con una etapa más de mi vida.

A mis padres, Alfredo y Rosa, por su apoyo incondicional en el transcurso de mi vida académica, por sus sabios consejos, por su paciencia y sobre todo por el amor que día a día han sabido darme, este logro no solo es mío, juntos logramos este éxito.

Al Ing. Juan Carlos Romero, mi director de tesis, quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo y quien ha sabido guiarme con sus conocimientos y enseñanzas.

A los miembros de mi tribunal, PhD. Vladimir Morocho y MSc. Luis Cartuche, quienes me guiaron en la realización de este trabajo, gracias por el tiempo, las enseñanzas, sugerencias y comentarios que me ayudaron a crecer profesionalmente durante el desarrollo de esta investigación.

A la SENESCYT (Código PIC-13-INSPI-005) y a la UTPC Código (PROY_FIN QUI_ 0008) por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este trabajo.

A mis amigas Katty y Gabby, por su amistad y por compartir tantos momentos, dentro y fuera de las aulas, durante todos estos años.

A Yandela por haberme acompañado en el lapso de desarrollo de este trabajo, gracias por el tiempo compartido dentro y fuera de los laboratorios, por la ayuda y el apoyo incondicional.

En especial a Ivannova, porque más que una amiga eres una hermana para mí; gracias por tu amistad, por el apoyo incondicional, por estar en los buenos y malos momentos, por el tiempo compartido dentro y fuera de la Universidad, por creer en mí y alentarme a seguir adelante, sé que sin tu ayuda y apoyo no hubiera podido conseguir este logro, gracias por motivarme día con día hermanita.

A todas las personas que formaron parte de mi desarrollo profesional, gracias por la amistad brindada, apoyo, consejos, y ánimo en los momentos más difíciles de mi vida, siempre los llevaré en mi mente y mi corazón.

Gracias Totales.

INDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDOS	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I – MARCO TEORICO	5
1.1. Medicina tradicional	6
1.2. Diversidad biológica en el Ecuador	6
1.3. Fitoquímica	7
1.4. Metabolitos secundarios.....	7
1.5. Familia Polygonaceae.....	8
1.6. Género <i>Triplaris</i> Loelf. Ex L.....	8
1.7. <i>Triplaris cumingiana</i> Fisch. & C.A. Mey.....	9
CAPITULO II – MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. Esquema general de la metodología empleada	12
2.2. Material vegetal.....	12
2.3. Obtención de extractos	13
2.4. Desclorofilación de extracto de acetato de etilo y metanol	13

2.5. Cromatografía en columna.....	15
2.6. Cromatografía en capa fina.....	15
2.7. Purificación	16
2.8. Caracterización e identificación de metabolitos secundarios.....	16
3. CAPITULO III – RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	17
3.1. Rendimiento de los extractos obtenidos.....	18
3.2. Extracto de acetato de etilo.....	18
3.2.1. Desclorofilación del extracto acetato de etilo.....	18
3.2.2. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto desclorofilado de acetato de etilo	19
3.3. Extracto de metanol	23
3.3.1. Desclorofilación del extracto de metanol	23
3.3.2. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto desclorofilado de metanol	24
3.3.3. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto de metanol sin desclorofilar	26
 CONCLUSIONES.....	 28
RECOMENDACIONES	29
 BIBLIOGRAFÍA	 30
ANEXOS	35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Triplaris cumingiana</i> Fisch. & C.A. Mey.....	10
Tabla 2. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de <i>Triplaris cumingiana</i>	18
Tabla 3. Número de fracciones obtenidas mediante la desclorofilación.....	18
Tabla 4. Unión de fracciones desclorofiladas.....	19
Tabla 5. Fracciones obtenidas en cromatografía en columna abierta.....	19
Tabla 6. Unión de fracciones de cromatografía en columna abierta.....	20
Tabla 7. Datos espectroscópicos ^{13}C del compuesto aislado.....	22
Tabla 8. Datos espectroscópicos RMN de ^1H del compuesto aislado.....	22
Tabla 9. Unión de fracciones desclorofiladas de acuerdo al grupo.....	23
Tabla 10. Fracciones obtenidas en cromatografía en columna abierta.....	24
Tabla 11. Unión de fracciones de cromatografía en columna abierta.....	25
Tabla 12. Fracciones obtenidas en cromatografía en columna abierta.....	26
Tabla 13. Unión de fracciones de cromatografía en columna abierta.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Triplaris cumingiana</i> Fisch. & C.A. Mey.....	10
Figura 2. Esquema general de la metodología a desarrollar en el presente estudio.....	12
Figura 3. Desclorofilación de extracto de acetato de etilo en columna.....	14
Figura 4. Xantoxilina (2-Hidroxi, 4-6dimetoxiacetofenona) (1) aislada del extracto desclorofilado de acetato y metanol.....	21

ABREVIATURAS

Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de Etilo
MeOH	Metanol
CH₂Cl₂	Diclorometano
CI₅₀	Concentración Inhibitoria 50
RMN	Resonancia Nuclear Magnética
RMN ¹H	Resonancia Nuclear Magnética de protón
RMN ¹³C	Resonancia Nuclear Magnética de carbono 13
p.f	Punto de fusión
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
UV	Ultravioleta
Rf	Factor de retención
CDCl₃	Cloroformo Deuterado

RESUMEN

En la presente investigación se reporta el estudio fitoquímico de las partes aéreas de *Triplaris cumingiana* por medio de cromatografía en columna abierta; obteniéndose tres extractos vegetales en hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH).

Del extracto de AcOEt se obtuvo un compuesto de aspecto blanquecino conocido como 2-hidroxi,4-6 dimetoxiacetofenona (**1**) con un peso de 46,4 mg y con un Rf de 0,6 el cual se eluyó en Hex:AcOEt 7:3 y cuyo punto de fusión es de 67-68°C; además se obtuvo una muestra cristalizada, eluída en AcOEt:MeOH 4:6 con un peso de 30,3 mg y cuyo punto de fusión es mayor a 300 °C, se sospechó que se trata de una sal inorgánica, la cual se analizó por difracción de rayos X y no ha sido identificada debido a que no existe la base de datos correspondiente; y del extracto metanólico se obtuvo una sustancia de color amarilla anaranjada eluída en CH₂Cl₂:MeOH 90:10 con un peso de 40,8 mg y con un punto de fusión de 295 - 300 °C, soluble en piridina que está en proceso de identificación, también se obtuvo el compuesto **1** aislado en el extracto de AcOEt; los compuestos aislados fueron identificados por métodos espectroscópicos como cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas CG/EM y resonancia magnética nuclear de protón RMN de ¹H y de carbono RMN de ¹³C

Palabras clave: *Triplaris cumingiana*, 2-hidroxi,4-6 dimetoxiacetofenona, CG/EM, RMN ¹H, RMN ¹³C

ABSTRACT

In the present investigation we report the phytochemical study the aerial parts of *Triplaris cumingiana* by open column chromatography; obtaining three vegetal extracts in hexane (Hex), ethyl acetate (AcOEt) and methanol (MeOH).

Of the AcOEt extract we obtained a whitish compound known as 2-hydroxy, 4-6 dimethoxyacetophenone (**1**) weighing 46,4 mg and with a R_f of 0,6 which was eluted in Hex:AcOEt 7:3 and whose melting point is 67-68 °C; also a crystallized sample was obtained, which has not been identified, eluted in EtOAc:MeOH 4:6, weighing 30,3 mg and whose melting point is above 300 °C, it suspected that is an inorganic salt, which was analyzed by X ray diffraction and It has not been identified because it not exist in the corresponding database; and of the methanol extract was obtained a yellow orange color substance, eluted in CH₂Cl₂:MeOH 90:10 weighing 40,8 mg and with a melting point of 295-300 °C, soluble in pyridine that is in process of identification, also the compound 1 isolated in AcOEt extract was obtained; the isolated compounds were identified by spectroscopic methods as gas chromatography coupled with mass spectroscopy GC/MS and proton nuclear magnetic resonance ¹H NMR and ¹³C NMR carbon.

Keywords: *Triplaris cumingiana*, 2-hydroxy, 4-6 dimethoxyacetophenone, GC/MS, ¹H NMR, ¹³C NMR

INTRODUCCIÓN

Justificación

Las plantas medicinales desde la antigüedad han sido un recurso indispensable del hombre para la curación de sus enfermedades, las mismas que eran admiradas por los atributos que se les había reconocido, transmitiéndose los conocimientos de generación en generación (Maldonado, Coba & Cerna, 2010). En la actualidad un gran número de población mundial, en particular en los países en vías de desarrollo, usan plantas para enfrentar necesidades primarias de salud (Tene, Malagón, Vita, Finizi, Vidari, Armijos & Zaragoza, 2007).

El interés por las plantas medicinales utilizadas por los pueblos aborígenes del sur de Ecuador, cada día va aumentando; se conoce que un alto porcentaje de las medicinas obtenidas en las farmacias, son provenientes de las plantas y es por ello que son numerosas las investigaciones que se realizan con la finalidad de descubrir y aislar nuevas sustancias para tratar las diferentes enfermedades que afectan hoy en día a la humanidad. Es por ello que Latinoamérica conserva uno de los recursos más valiosos en el mundo, su riqueza florística; y en el caso particular del Ecuador, éste cuenta con una de las floras más ricas de Latinoamérica y del mundo; además de la inmensa riqueza cultural debido a la presencia de diversos grupos étnicos, los cuales aportan con su conocimiento ancestral del uso de un gran número de especies de plantas silvestres y cultivadas principalmente en el ámbito medicinal (Andrade, Armijos, Malagón & Lucero, 2009).

Ecuador es considerado como uno de los países más ricos en diversidad de especies y ecosistemas en todo el mundo, donde se encuentra una extensa variedad de plantas medicinales nativas e introducidas (Barrera, 2002). Existen 4011 especies endémicas, lo cual es equivalente al 26% de la flora nativa (Valencia, Pitman, León & Jorgensen, 2000). El Parque Nacional Podocarpus, ubicado entre las provincias de Loja y Zamora-Chinchiipe, posee 211 especies endémicas, con 99 especies exclusivas de esta área (Lozano, Delgado & Aguirre, 2002) lo cual representa el número más alto de endemismo de todas las áreas protegidas del Ecuador.

Triplaris cumingiana, llamado comúnmente como Tankarana o Fernán Sánchez; es utilizada en la medicina tradicional para tratar la diarrea y dolor de estómago; además es usada como alimento de vertebrados e invertebrados; y también es usada como refugio de hormigas (Torres, Navarrete, Muriel, Macía & Balslev, 2008).

La presente investigación forma parte del Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador (PROPAD) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), que cuenta con el financiamiento de la SENESCYT, y que se está desarrollando en colaboración entre el INSPI, la Universidad Central del Ecuador (UCE) y la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), dentro del proyecto 5: “*Residencia antiparasitaria y perspectivas de uso de extractos de plantas nativas en ensayos preclínicos*”, pretendemos la obtención, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios con posible actividad antiparasitaria de *Triplaris cumingiana* y posteriormente en una segunda fase se realizará en la UCE la evaluación de la actividad antiparasitaria tanto de extractos como de los metabolitos secundarios aislados en mayor proporción.

Fin del proyecto

Contribuir con el estudio de metabolitos secundarios presentes en la especie nativa del sur del país, *Triplaris cumingiana*, y su posible actividad antiparasitaria.

Objetivos

Objetivo general:

- Aislar e identificar metabolitos secundarios a partir de *Triplaris cumingiana* con posible actividad antiparasitaria.

Objetivos específicos:

- Recolectar las partes aéreas de *Triplaris cumingiana*.
- Obtener extractos con disolventes en orden de polaridad ascendente: hexano, acetato de etilo y metanol.
- Aislar, identificar y caracterizar los compuestos obtenidos.

CAPÍTULO I - MARCO TEÓRICO

1.1. Medicina tradicional

La medicina tradicional es el cúmulo de prácticas empíricas introducidas en el conocimiento de un grupo social, transmitido con frecuencia por vía oral de generación en generación con la finalidad de resolver problemas de salud, es decir, se trata de una alternativa a la medicina occidental y está fuertemente ligada a las creencias religiosas y las diferentes prácticas de las culturas indígenas (Busmann & Sharon, 2006).

El conocer las diferentes propiedades curativas que presentan las plantas medicinales, ha permitido identificar, aislar y caracterizar los distintos compuestos químicos con actividad biológica o bien con propiedades farmacológicas y a su vez llevarlos al mercado en forma de medicamentos reconocidos por una institución, que posee la facultad para ello, o también como medicamentos convencionales (Ponz, Carpio & Meo, 2005).

1.2. Diversidad biológica en el Ecuador

La posición geográfica y la presencia de la cordillera de los Andes determinan la existencia de una enorme variedad de bosques y microclimas desde los húmedos de la Amazonía y noroccidente, a los ecosistemas secos del sur; desde las cálidas playas del Pacífico hasta las nieves eternas de los volcanes (Vallejo, Quingaísa, Ortiz & Vinueza, 2007).

Las más de 17000 especies de plantas vasculares que existen en el Ecuador (Ulloa Ulloa & Neil, 2005; Jorgensen, Ulloa & Maldonado, 2006) son el resultado de una historia de adaptaciones a medios diversos, de coevolución con otros organismos y de la dinámica de la superficie terrestre. La cuarta parte de las especies ecuatorianas son endémicas (Valencia *et al.*, 2000) y de ellas, el 7% han sido reportadas como útiles.

En Ecuador, la aplicación de la medicina natural tiene importancia relevante en la salud, en el caso de sus comunidades indígenas, donde se aprovechan los recursos naturales del país, que posee mayor biodiversidad por Km² alrededor del mundo. A nivel nacional las provincias de Loja y Zamora Chinchipe son consideradas como zonas muy

importantes y de gran relevancia internacional por la diversidad de especies y ecosistemas siendo algunos de ellos únicos en el Ecuador (Cerón, 2002).

Loja y Zamora Chinchipe poseen el 36 % del total de las especies del Ecuador (Myers *et al.*, 2000; Ordoñez *et al.*, 2006; Richter *et al.*, 2005).

1.3. Fitoquímica

La fitoquímica es una disciplina científica que tiene como objetivo el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de distintas sustancias producidas por los vegetales; e incluye la extracción y evaluación cualitativa y cuantitativa de los componentes químicos de las plantas (Buchanan, Grissem & Jones, 2000).

Así el análisis fitoquímico tiene como propósito determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal que se va a estudiar, aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, separación, purificación y de determinación estructural (Lock, 2000).

1.4. Metabolitos secundarios

Las especies vegetales, además de metabolitos primarios, tales como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, poliaminas, citocromos, clorofilas e intermediarios metabólicos, también producen metabolitos secundarios, es decir, sustancias que no participan directamente en el crecimiento o desarrollo, sustancias que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno (Bourgaud, Gravot, Milesi & Gontier, 2001).

Son compuestos derivados del metabolismo secundario, los mismos que presentan propiedades biológicas, algunos de estos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros; además poseen un valor medicinal y económico muy importante y significativo (García & Pérez-Urria, 2009).

1.5. Familia Polygonaceae

La familia Polygonaceae, es la única representante del orden Polygonales, y esta comprende cerca de 30 géneros y 1000 especies ampliamente distribuidas en todo el mundo, especialmente en regiones templadas y sub-tropicales (Melo, 2000).

La familia Polygonaceae a la cual pertenece la especie *Triplaris cumingiana*, posee compuestos de naturaleza glucosídica pero carecen de alcaloides y saponinas, y son raras las esencias. A menudo contienen ácidos orgánicos; principalmente ácido oxálico en forma de sales, con menor frecuencia presenta ácido málico y ácido cítrico; asimismo poseen taninos, hallados en la mayoría de especies de la familia (Brack, 1999; Brako & Zarucchi, 1993; Furnari, Guglielmo & Longhitano 2008).

1.6. Género *Triplaris* Loefl. Ex L.

El género *Triplaris* se encuentra distribuido ampliamente en el bosque húmedo tropical y en lugares totalmente secos. Es un árbol que crece entre 20 y 35 m de altura y cuyo tronco mide 50 cm de diámetro (Cruz, Morante & Acosta, 2008).

Estudios fitoquímicos de este género revelan la presencia de carbohidratos y compuestos fenólicos, especialmente en la especie *T. americana* donde se han reportado la existencia de triterpenos: friedelina y friedelinol; además carbohidratos y compuestos fenólicos entre ellos taninos y flavonoides como: ácido gálico, quercetina 3-O- α -L-arabinofuranósido; los cuales poseen actividad antioxidante con un valor de CI_{50} de 9,54 μ g/mL (Oliveira, Conserva & Lemos, 2008; Camones *et al.*, 2009).

A partir del extracto de acetato de etilo de hojas frescas de *Triplaris* han sido aislados cinco flavonoles glicósidos: quercetina 3-O- β -D-(400,600-digaloil)-glucopiranósido, camferol 3-O- α -L-(500-galoil)-arabinofuranósido, quercetina 4-O- α -L-arabinofuranósido, quercetina 3-O- α -L-(500-galoil)-rabinofuranósido, y quercetina 3-O- β -D-(600-galoil)-glucopiranósido (Oliveira *et al.*, 2008, Hussein *et al.*, 2005).

1.7. *Triplaris cumingiana* Fisch. & C.A. Mey.

Esta especie es comúnmente conocida como Tankarana o Fernán Sánchez, en Ecuador está distribuida en laderas de bosques secos en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Esmeraldas, Galápagos, Los Ríos, Manabí, Morona, Pichincha, Guayas, El Oro y Loja. Su periodo de florecimiento se da en los meses de septiembre - octubre, y la maduración de su fruto en octubre; crece desde 0 a 1500m s.n.m. La presencia de hormigas asociadas a los tallos es un atributo importante para su identificación (González, García & Correa, 2005). Se puede observar la especie y su taxonomía correspondiente en la figura 1 y tabla 1.

Dentro de la medicina tradicional es utilizada para curar infecciones intestinales, fiebre, diarrea, etc. (Desmarchelier & Alonso, 2005). De acuerdo con reportes de especies del mismo género, tales como: *T. americana*, se emplea de dos formas: por vía oral mediante decocción de la corteza la cual es utilizada contra la diarrea, dolor de estómago, disentería, vómitos, dolor abdominal, lombrices intestinales, apendicitis, dolor de hígado y el dolor de la vesícula, y en forma de cataplasmas se utiliza en lesiones de piel inducidas por leishmaniasis (Deharo, Baelmans, Gimenez, Quenevo & Bourdy, 2004); *T. peruviana*, usada para tratar diarreas y fiebre interna mediante decocción de su corteza, además para la picadura de raya y mosquitos en forma de cataplasma (Mayca, Medina & Niño de Guzmán, 2003); de *T. poeppigiana* usan la decocción de la corteza para el tratamiento de diarrea, enteritis y fiebre (Brack, 1999); además *T. surinamensis*, el zumo de su corteza destinada al dolor de muelas y hemorroides (Bourdy, 1999). Sin embargo no existen reportes fitoquímicos ni de actividad biológica sobre esta especie; por lo cual se considera un estudio importante sobre la misma, para determinar y corroborar las diferentes aplicaciones para las que son usadas las especies de este género.



Figura 1. *Triplaris cumingiana* Fisch. & C.A. Mey
Fuente: (Vinueza, 2012)

Tabla 1. Taxonomía de *Triplaris cumingiana* Fisch. & C.A. Mey

Reino	Plantae
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Polygonaceae
Género	<i>Triplaris</i> Loefl.
Especie	<i>Triplaris cumingiana</i>
Nombre común	Fernán Sánchez

Fuente: (Tropicos.org)

CAPITULO II - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Esquema general de la metodología empleada

En la figura 2 se muestra el esquema que se utilizó en la presente investigación.

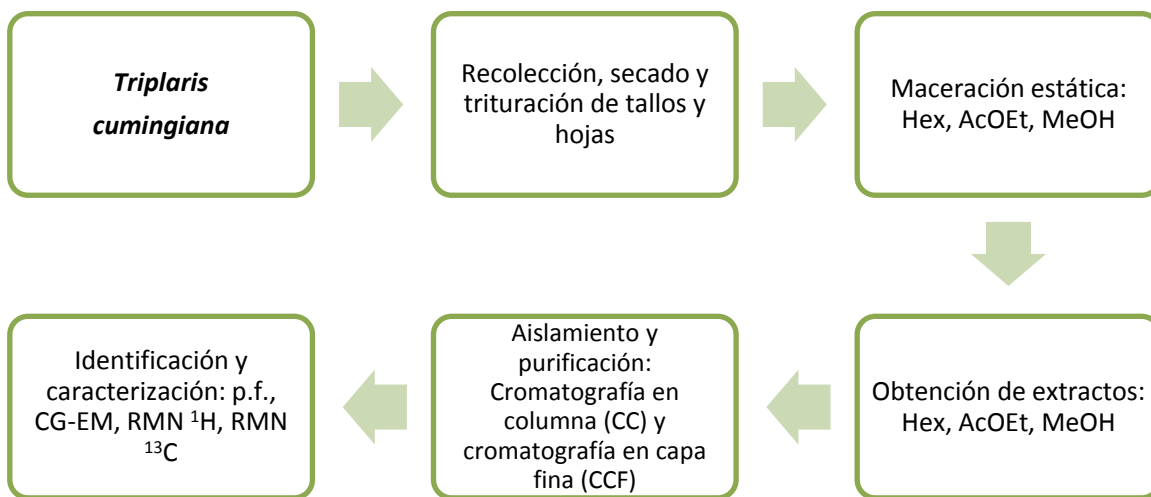


Figura 2. Esquema general de la metodología a desarrollar en el presente estudio

Fuente: Autora

2.2. Material vegetal

Se recolectó 5,2 kg de partes aéreas de la especie *Triplaris cumingiana*, en estado de floración, en el catón Catacocha – Paltas (4° 1' 44'' S; 79° 38' 32'' W) en la provincia de Loja – Ecuador, la identificación de la especie la realizó la Dra. Fani Tinitana en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja y se depositó una muestra de herbario con voucher botánico HUTPL9014.

El material vegetal se llevó a secado a una temperatura de 35 °C durante el lapso de siete días en un secadero de bandejas con flujo de aire. Una vez que la especie se secó, se redujo a partículas de menor tamaño mediante trituración manual.

2.3. Obtención de extractos

Las partes aéreas de la planta (hojas y tallos) se trabajaron por igual, debido a la similitud que presentaron en el perfil cromatográfico; las mismas que se sometieron a maceración estática a temperatura ambiente y con disolventes de polaridad ascendente: hexano, acetato de etilo y metanol. Dicha maceración se realizó, durante el lapso de tres días con cada disolvente; y se repitió por tres veces con cada disolvente, posterior a ello se filtró al vacío y se procedió a obtener el extracto, mediante el uso de un rotaevaporador, el cual trabaja a presión reducida y a una temperatura entre 30-35°C, para obtener cada uno de los extractos totales.

Se evaluó el rendimiento de cada uno de los extractos, en función de la relación entre el peso del extracto con el peso total de la especie vegetal seca, conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso de extracto}}{\text{Peso de material vegetal seca}} * 100$$

(Fórmula 1)

Se procedió a analizar los extractos obtenidos mediante cromatografía de capa fina (CCF) en fase directa del extracto de AcOEt y en fase inversa comparativa del extracto de MeOH y AcOEt.

2.4. Desclorofilación del extracto de acetato de etilo y metanol

Para obtener el extracto de acetato de etilo y metanol libre de clorofila y facilitar el fraccionamiento se procedió a desclorofilar, para lo cual se usó cromatografía en columna con sílica gel fase inversa C-18.

Para el extracto de acetato de etilo se sembró 10 g de extracto en 100 g de sílica gel fase inversa C-18, en una columna cromatográfica, de dimensiones de 42 mm de ancho por 50

cm de alto, en donde se eluyó con una mezcla isocrática de MeOH:H₂O en relación 9:1. Se recolectaron fracciones de 200 ml y concentradas a presión reducida y 35°C, finalmente se registró el peso y se procedió a la unión de fracciones, dependiendo del perfil cromatografico mostrado.

Mientras que para el extracto de metanol se sembró 15 g de extracto en 150 g de silica gel fase inversa C-18, en una columna cromatográfica de dimensiones de 60 mm de ancho por 70 cm de alto, se eluyó con una mezcla isocrática de MeOH:H₂O 5,5:4,5 (v/v). Se recolectaron fracciones de 200 ml y se concentraron a presión reducida y 35°C, finalmente se registró el peso y se procedió a la unión de fracciones dependiendo del perfil cromatografico mostrado.



Figura 3. Desclorofilación de extracto de acetato de etilo en columna cromatográfica

Fuente: Autora

2.5. Cromatografía en columna

En la cromatografía en columna abierta (CC) se utilizó columnas de diferentes dimensiones, las mismas que fueron empaquetadas con silica gel 60 F254.

Para el extracto de acetato de etilo desclorofilado, se realizó relación 1:100, es decir se sembró 1,39 g de extracto en 139 g de silica gel 60 F254 en una columna cromatográfica de dimensiones de 60 mm de ancho y 70 cm de alto, utilizandose como eluyentes mezclas de Hex, AcOEt y MeOH en polaridad creciente. Se recolectaron fracciones de 100 ml cada una y se concentraron en un rota-evaporador a presión reducida y 35°C para eliminar el disolvente; el residuo se recuperó con diclorometano y finalmente se registró el peso y se procedió a realizar cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones, para luego reunir las mismas.

Para el extracto de metanol desclorofilado, se realizó relación 1:50, es decir se sembró 1,63 g de extracto desclorofilado y 90 g de silica gel 60 F254 en una columna cromatográfica de igual dimensión que la utilizada para el extracto de acetato de etilo; para su fraccionamiento se utilizó mezclas en polaridad creciente de CH_2Cl_2 :MeOH. Las fracciones obtenidas se recolectaron de 50 ml cada una y se siguió el mismo procedimiento antes mencionado.

Mientras que para el extracto de metanol sin desclorofilar, se trabajó con relación 1:15, es decir se utilizó 40 g de extracto y 600 g de silica gel 60 F254 en una columna cromatográfica de dimensiones de 60 mm de ancho y 100 cm de alto; el fraccionamiento se realizó con mezclas de CH_2Cl_2 :MeOH. Las fracciones recolectadas fueron de 200 ml y se realizó el mismo procedimiento empleado en el extracto de acetato de etilo y de metanol previamente desclorofilados.

2.6. Cromatografía en capa fina

Las fracciones que se recolectaron de la cromatografía en columna abierta, se sembraron en placas de aluminio de silica gel 60 F254, las cuales se hicieron correr en elución de disolventes en distintas polaridades (Hex, AcOEt, MeOH, CH_2Cl_2 y mezclas respectivas),

posterior a ello se observó en luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm); finalmente se reveló las placas con vainillina al 1% y ácido sulfurico al 5%.

2.7. Purificación

Para esto se unió las fracciones que presentaban un perfil similar y se las purificó utilizando la técnica de par de disolvente, la misma que consiste en utilizar pares de disolventes miscibles entre sí, en donde el compuesto se disuelve en el disolvente en el que es muy soluble a su temperatura de ebullición, luego se añadió gota a gota el otro disolvente caliente, en el que el compuesto es ligeramente soluble, hasta que se observa una turbidez tenue persistente; en ese punto se procede a añadir unas cuantas gotas del otro disolvente para eliminar la turbidez y finalmente se filtra por gravedad para separar la disolución (Buendía, Gómez, López, Tomas, Cerón, Espinosa & Moya, 1991).

2.8. Caracterización e identificación de metabolitos secundarios

Una vez aislados y purificados los metabolitos secundarios se determinó su punto de fusión en el equipo Fisher Johns, serial 40-22 de 50-60Hz, las temperaturas obtenidas no fueron corregidas.

Mientras que los espectros RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron a 400 y 100 MHz respectivamente en un equipo de resonancia magnetica nuclear modelo Varian 400 MHz-Premiun Schelded, en el cual se usó tetrametilsilano como referencia interna; además se utilizó cloroformo deuterado como disolvente y los desplazamiento químicos fueron expresados en partes por millón (ppm), y las constantes de acoplamiento (J) se reportaron en (Hz).

Por otro lado los espectros de masas fueron determinados en el cromatógrafo de gases, modelo Agilent Technologies 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas, modelo Agilent Technologies 5973 inert, con una columna cromatográfica BSNS y las inyecciones se realizaron en columnas capilares DB-5MS (5% Fenil-metilpolisiloxano).

CAPITULO III - RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Rendimiento de los extractos obtenidos

En la tabla 2 se muestra el peso y rendimiento obtenido de cada uno de los extractos de Hex, AcOEt y MeOH, a partir de 2,75 kg de material vegetal seca.

Tabla 2. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de *Triplaris cumingiana*

Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexano	25,17	0,48
Acetato de Etilo	30,47	0,58
Metanol	318,34	6,12

Fuente: Autora

3.2. Extracto de Acetato de Etilo

3.2.1. Desclorofilación del extracto de acetato de etilo

En la tabla 3 se indica el número de fracciones obtenidas de la desclorofilación, con el respectivo eluyente y el volumen recolectado en todos los casos fue de 200 ml.

Tabla 3. Número de fracciones obtenidas mediante la desclorofilación.

Disolvente utilizado en la desclorofilación	Relación en la que se utilizó el disolvente	Número de fracciones obtenidas
MeOH:H ₂ O	9:1	15

Fuente: Autora

Una vez obtenidas las fracciones desclorofiladas, se realizó cromatografía en capa fina (CCF) de cada una de ellas y de acuerdo a la similitud en los perfiles cromatográficos se procedió a unir las, dándonos finalmente cuatro fracciones que se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Unión de fracciones
desclorofiladas

Fracciones unidas	Peso (g)
F(2-4)	1,39
F(7-8)	0,33
F(10-11)	1,10
F(13-14)	0,15

Fuente: Autora

3.2.2. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto desclorofilado de acetato de etilo

Se realizó cromatografía en columna abierta de la fracción F(2-4) del extracto de etilo previamente desclorofilado.

En la tabla 5 se detalla las gradientes de polaridad y las fracciones obtenidas.

Tabla 5. Fracciones obtenidas en
cromatografía en columna abierta

Número de fracciones	Proporción de disolventes en la mezcla de elución		
	Hex	AcOEt	MeOH
1 – 5	9,5	0,5	
6 – 17	9	1	
18 – 23	8,5	1,5	
24 – 34	7	3	
35 – 42	1	1	
43 – 51		4	6
52 – 54		1	1
55 – 71			100

Fuente: Autora

Las fracciones obtenidas se monitorean mediante cromatografía en capa fina (CCF) y se unieron dependiendo de la similitud en los perfiles cromatográficos, obteniéndose con ello 15 fracciones las cuales se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Unión de fracciones de cromatografía en columna abierta.

Fracciones unidas	Peso (g)
F(10-12)	0,0464
F(13-15)	0,0032
F(16-18)	0,0031
F(19-20)	0,0070
F(21-22)	0,0107
F(23-24)	0,0104
F(30-31)	0,0165
F(32-36)	0,0151
F(40-41)	0,0266
F(46-47)	0,0107
F(48-49)	0,0275
F(51-52)	0,0023
F(53-60)	0,0088
F(61-62)	0,0093
F(64-66)	0,0112
F(67-68)	0,0055

Fuente: Autora

De la fracción F(10-12) eluída en cromatografía en columna abierta en Hex:AcOEt 90:10 (v/v) se obtuvo 46,4 mg de una sustancia, la cual posee un color blanquecino cuyo punto de fusión es de 67-68°C; esta sustancia es soluble en diclorometano y cloroformo.

Se identificó el compuesto como 2-hidroxi, 4-6 dimetoxiacetofenona (figura N° 4), en base a los análisis de RMN y CG/EM, conocida como xantoxilina, cuya fórmula molecular es $C_{10}H_{12}O_4$ y de peso molecular 196,2 g/mol. El compuesto presentó un Rf de 0,6 eluido en una mezcla de Hex: AcOEt 7:3.

Este compuesto se reporta aislado en Brasil en hojas de la especie *Peperomia glabella* (Soares, De Felipe, Guimarães, Kato, Ellena & Doriguetto, 2006) y en la especie *Sebastiania schottiana* (Gaertner, 1997; Miguel, 1987 & Niero, 2000).

Se ha reportado que la Xantoxilina es un compuesto importante, debido a que este muestra actividad analgésica, antiinflamatoria, antiespasmódica y antibacteriana contra bacterias que se encuentran presentes en el tracto urinario como: *Rhodospirillum rubrum*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* (Cechinel, Dalmagro & Yunes, 1996); además de ello se ha evidenciado actividad contra algunos

hongos pertenecientes a los géneros *Epidermophyton*, *Candida*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Calixto, Miguel, Yunes & Rae, 1990).

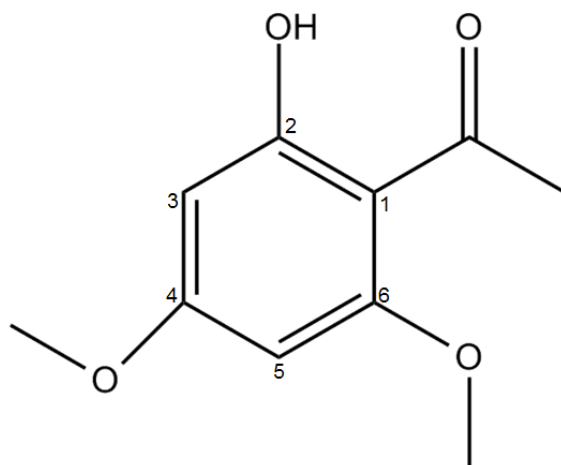


Figura 4. Xantoxilina (2-Hidroxi, 4-6dimetoxiacetofenona). **(1)** aislada del extracto desclorofilado de acetato y metanol.

Fuente: Autora

Los datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H en CDCl_3 que se obtuvieron de la xantoxilina **(1)**, se detallan en las tablas 7 y 8 en donde los desplazamientos químicos se hallan expresados en ppm.

Tabla 7. Datos espectroscópicos RMN ¹³C del compuesto aislado

Compuesto 1			Referencia (Soares, M.; et al 2006)		
Desplazamiento Químico ¹³ C (δppm)	Tipo de Carbonos	Asignación	Desplazamiento Químico ¹³ C (δppm)	Tipo de Carbonos	Asignación
33,0	CH ₃	CH ₃	32.7	CH ₃	CH ₃
55,7 x 2	CH ₃	CH ₃ -O	55.4 x 2	CH ₃	CH ₃ -O
90,8	CH	C-3	90.6	CH	C-3
93,6	CH	C-5	93.8	CH	C-5
106,1	C	C-1	105.8	C	C-1
163,0	C	C-6	162.7	C	C-6
166,2	C	C-2	166.0	C	C-2
167,7	C	C-4	167.5	C	C-4
203,0	C	C=O	203.5	C	C=O

*CDCl₃

Fuente: Autora

Tabla 8. Datos espectroscópicos ¹H RMN del compuesto aislado

Compuesto 1				Referencia (Soares, M.; et al 2006)		
Desplazamiento Químico (δppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento, J (Hz)	Asignación	Desplazamiento Químico (δppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento, J (Hz)
2,60	S	-	H ₃ -C	2,60	S	-
3,81	S	-	H ₃ -C	-	S	-
3,85	S	-	H ₃ -C	-	S	-
5,91-5,92	D	2,4	H	5,93	D	2,2
6,05-6,06	D	2,4	H	6,05	D	2,2

*CDCl₃

Fuente: Autora

De la fracción F(48-49) eluída en cromatografía en columna abierta en polaridad 4:6 AcOEt:MeOH se obtuvo 30,3 mg de una sustancia cristalizada, el cual posee un punto de fusión mayor a 300°C; esta sustancia es soluble en agua.

Por su punto de fusión alto se sospechó que se trate de una sal inorgánica por lo que se analizó por medio de difracción de rayos X, pero no se ha logrado identificar debido a que no existe la base de datos correspondiente.

3.3. Extracto de metanol

3.3.1. Desclorofilación del extracto de metanol

Se realizó tres desclorofilaciones del extracto metanólico, obteniéndose con ello tres grupos desclorofilados. La desclorofilación se realizó con elución isocrática de disolventes MeOH:H₂O 5,5:4,5 (v/v).

En el grupo 1 se obtuvieron dos fracciones desclorofiladas, debido a que hubo un mal compactamiento de la columna y la sílica gel bajo igual con la mezcla de disolventes empleados, recolectándose 200 ml de cada fracción; mientras que en el grupo 2 y 3 se obtuvieron 16 fracciones desclorofiladas respectivamente, con el mismo volumen recolectado que el grupo 1.

Obtenidas las fracciones se realizó cromatografía en capa fina (CCF) de cada una de las fracciones conseguidas en cada grupo y se procedió a unir las, tomando en cuenta la similitud en el perfil cromatográfico. En la tabla 9 se detalla la unión de las fracciones y sus respectivos pesos, de acuerdo a la unión de cada grupo desclorofilado.

Tabla 9. Unión de fracciones desclorofiladas de acuerdo al grupo

Grupo	Fracciones unidas	Peso (g)
2	F(4-5)	1,47
	F(6-8)	1,63
	F(9-11)	0,31
	F(12-15)	0,28
3	F(2-5)	11,01
	F(6-8)	0,33
	F(10-12)	0,16
	F(15-16)	0,13

Fuente: Autora

3.3.2. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto desclorofilado de metanol

Se realizó cromatografía en columna abierta (CC) de la fracción F(6-8) del grupo 2 desclorofilado.

En la tabla 10 se detalla las gradientes de polaridad en la que se trabajó y las fracciones obtenidas, recolectándose 50 ml de volumen.

Tabla 10. Fracciones obtenidas en cromatografía en columna abierta

Número de fracciones	Elución de disolventes	
	CH ₂ Cl ₂	MeOH
1 – 13	100	
14 – 31	98	2
32 – 46	95	5
47 – 62	90	10
63 – 76	1	1
77 – 113		100

Fuente: Autora

Una vez obtenidas las fracciones en cromatografía en columna abierta, se realizó cromatografía en capa fina (CCF) de cada una de ellas y de acuerdo a la similitud en los perfiles cromatográficos, se procedieron a unir las, obteniéndose con ello 22 fracciones, en la tabla 11 se detallan.

Tabla 11. Unión de fracciones de cromatografía en columna abierta.

Fracciones unidas	Peso (g)
F(1-3)	0,0010
F(4-6)	0,0015
F(7-8)	0,0008
F(9-16)	0,0639
F(19-24)	0,0277
F(25-26)	0,0030
F(27-32)	0,0083
F(33-35)	0,0021
F(37-40)	0,0030
F(42-48)	0,0114
F(49-50)	0,0480
F(51-56)	0,0336
F(58-59)	0,0029
F(65-70)	0,0074
F(75-80)	0,0787
F(81-84)	0,0184
F(86-88)	0,0083
F(89-90)	0,0384
F(91-92)	0,0131
F(95-96)	0,0886
F(97-104)	0,1084
F(105-107)	0,0049

Fuente: Autora

De la fracción F(19-24) eluída en cromatografía en columna abierta en polaridad 98:2 CH₂Cl₂:MeOH se obtuvo 27,7 mg de una sustancia de color blanquecino y cuyo punto de fusión es de 66-68°C; esta sustancia es soluble en diclorometano y cloroformo.

Luego de la identificación del compuesto, resulto ser el mismo compuesto **1** aislado en el extracto de acetato de etilo.

3.3.3. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto de metanol sin desclorofilar

Se realizó cromatografía en columna abierta (CC) del extracto metanólico sin desclorofilar.

En la tabla 12 se detalla las gradientes de polaridad en la que se trabajó y las fracciones obtenidas.

Tabla 12. Fracciones obtenidas en cromatografía en columna abierta

Número de fracciones	Elución de disolventes	
	CH ₂ Cl ₂	MeOH
1 – 10	90	10
11 – 20	80	20
21 – 25	70	30
26 – 30	60	40
31 – 35	1	1

Fuente: Autora

Una vez obtenidas las fracciones en cromatografía en columna abierta, se realizó cromatografía en capa fina (CCF) de cada una de ellas y de acuerdo a la similitud en los perfiles cromatográficos, se procedieron a unir las obteniéndose con ello 8 fracciones, en la tabla 13 se detallan.

Tabla 13. Unión de fracciones de cromatografía en columna abierta

Fracciones unidas	Peso (g)
F(1-3)	0,0010
F(5-8)	0,0023
F(10-15)	0,0639
F(17-20)	0,0277
F(22-25)	0,0030
F(27-28)	0,0083
F(32-34)	0,0021

Fuente: Autora

De la fracción F(5-8) eluída en cromatografía en columna abierta en polaridad 90:10 CH₂Cl₂:MeOH, se obtuvo una sustancia de color amarilla anaranjada con un peso de 40,8 mg y cuyo punto de fusión es de 295 – 300 °C; dicha sustancia se disuelve en piridina.

Este compuesto no se ha podido identificar, debido a que es soluble en piridina y no se dispone del disolvente deuterado, por lo cual no es posible realizar los análisis de en RMN de ¹H y ¹³C.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico fue el que mayor rendimiento mostró 6,12 % mientras que para los extractos de acetato de etilo y de hexano los rendimientos fueron de 0,58 % y 0,48 % respectivamente.
- A partir del extracto de acetato de etilo previamente desclorofilado se aisló la 2-hidroxy, 4-6 dimetoxiacetofenona (**1**).
- Del extracto metanólico, se aisló el mismo compuesto **1** obtenido previamente del extracto de acetato de etilo.
- El compuesto **1** obtenido tanto en el extracto de acetato de etilo como de metanol, han sido aislado con anterioridad en otras especies de diferente género, *Peperomia glabella* y *Sebastiania schottiana*; la estructura de este metabolito secundario constituye el primer reporte para la especie *T. cumingiana* y el género *Triplaris*.

RECOMENDACIONES

- Continuar con la investigación, purificación e identificación de metabolitos secundarios presentes en la fracción F(5-8) del extracto metanólico.
- Los procesos de purificación de los metabolitos secundarios deben hacerse con sumo cuidado, debido a las pequeñas cantidades en los que estos se encuentran.
- Continuar con el estudio fitoquímico de especies vegetales endémicas de nuestra provincia, que poseen antecedentes etnobotánicos con la finalidad de validar científicamente su aplicación dentro de la medicina tradicional.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, J. M.; Armijos, C.; Malagón, O. & Lucero, H. (2009). *Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas, Provincia de Loja-Ecuador*, UTPL, Ed.; Loja-Ecuador, pág. 11.
- Barrera, J. (2002). *Fundación Aliñambi, Curso de Exportación de productos no tradicionales, Plantas medicinales*
- Bourdy, G. (1999). *Tacana: conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas (Tacana: ecuanasha aquí, ecunasha id'renecwana, me schanapaque)*. FONAMA-IRD. UMSA. CIPTA. La Paz.
- Bourgau, F.; Gravot, A.; Milesi, S.; Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*, 161, pág. 839-851.
- Brack, A. (1999) *Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles de Perú*. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cuzco.
- Brako, L.; Zarucchi, J. (1993). *Catálogo de las plantas con flores y gimnospermas del Perú*. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. Lima, pág. 45
- Buchanan, B.; Grisse, R.; Jones, R. (2000). Natural products (Secondary metabolites). Capítulo 24. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. USA.
- Buendía, P.; Gómez, A.; López, V.; Tomas, A.; Cerón, M.; Espinosa, J. & Moya, A. (1991). *Prácticas de química orgánica*. Universidad de Murcia. España.
- Bussmann, R. & Sharon, D. (2006). *Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture*. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*.
- Calixto, J.; Miguel, O.; Yunes, R. & Rae, G. (1990). *Action of 2-Hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone isolated from Sebastiania schottiana*. *Planta Med*, v.56. p. 31-35.

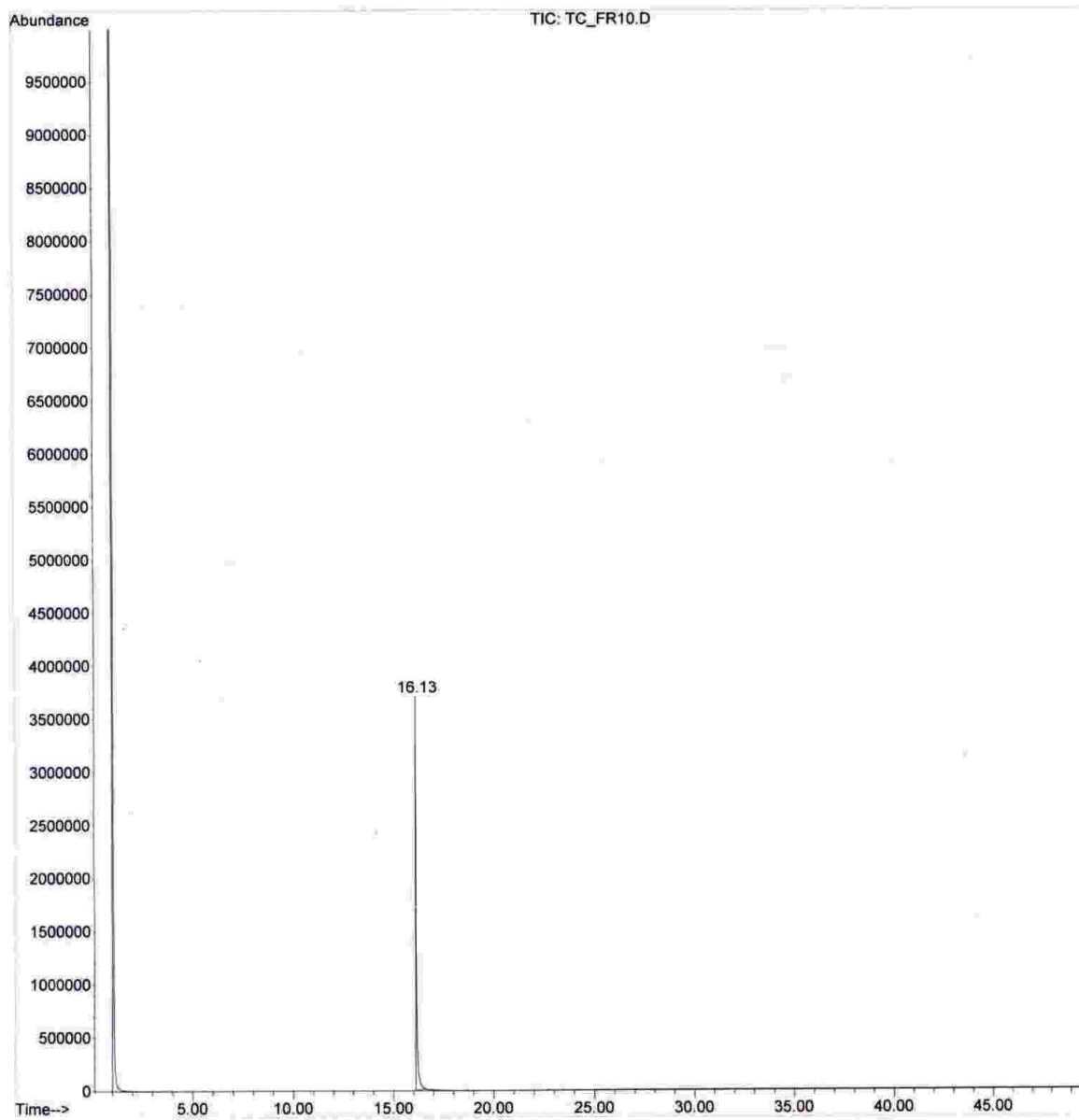
- Camones, M.; Fuertes, C.; Jurado, B.; Texeira, I.; Mondragón, G.; Taype, E. & Ostos, H. (2009). *Estudio farmacognóstico, actividad antioxidante y toxicidad a dosis límite de Triplaris americana L. (tangarana colorada)*.
- Cechinel, V.; Dalmagro, J. & Yunes, R. (1996). *Importância dos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais brasileiras*. Grifos. v. 3, p. 36 -70.
- Cerón, C. (2002). *La Etnobotánica en el Ecuador*. *Cinchonia* 3(2): 1-16. : a) 109-205, b) 206-214, c) 224-255, d) 256-263 e) 264-276, f) 284-295
- Cruz, N.; Morante, J. & Acosta, M. (2008). *Propagación vegetativa de Fernan Sánchez (Triplaris guayaquilensis) mediante la utilización de hormonas de enraizamiento (ANA y AIB)*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- Deharo, E.; Baelmans, R.; Gimenez, A.; Quenevo, C.; Bourdy, G. (2004). *In vitro immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolivia*. *Phytomedicine*; 11: 516-522.
- Desmarchelier, C. & Alonso, J. (2005). *Plantas Medicinales para la atención primaria en la salud. Vademécum de Fitoterapia – 2005*. PRODAPP. Lima.
- Furnari, G.; Guglielmo, A. & Longhitano, N. (2008). *Tabla de botánica sistémica. Departamento de Botánica*. Universidad de Catania.
- Gaertner, M. (1997). *Isolamento e identificação de compostos farmacologicamente ativos, presentes nas raízes de Sebastiania schottiana (Euphorbiaceae)*. Itajaí, 1997. Monografía (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade do Vale do Itajaí-UNIVALI.
- García, A.A & Pérez, U-C.E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. Universidad Complutense. Madrid.
- González, E.; García, C. & Correa, J. (2005). *Especies forestales del bosque seco "Cerro Negro-Cazaderos" Zapotillo-Puyango*. Loja, Ecuador. Fundación Ecológica Arcoíris, pág. 39.
- Hussein, A.; Barberena, I.; Correa, M.; Coley, P.; Solís, P. (2005). *Cytotoxic Flavonol Glycosides from Triplaris cumingiana*. *Journal Natural Products*, pág. 68, 231-233.

- Jorgensen, P. M., C. Ulloa & C. Maldonado. (2006). *Riqueza de plantas vasculares*. Pp. 37-50. En: Moraes R., M., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev (eds.) *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés, Plural Editores, La Paz.
- Lock, O. (2000). *Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios*. Pontificia Universidad Católica de Perú. Perú.
- Lozano, C.; Delgado & Aguirre, M. (2002). *La flora endémica de plantas vasculares del Parque Nacional Podocarpus*. En Z. Aguirre M., J. E. Madsen, E. Cotton y H. Balslev (eds.), *Botánica Austroecuatorialiana — Estudios sobre los Recursos Vegetales en las Provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchipec*. Ediciones Abya Yala, Quito, pág 453-460.
- Maldonado, M.; Coba, P. & Cerna, M. (2010). *Colección de especies vegetales e la provincia de Morona Santiago con potencial uso medicinal: aislamiento, caracterización química y biológica*. *Revista de Biotecnología*. pág. 23-28.
- Mayca, J.; Medina, A.; Niño de Guzmán, A. (2003). *Uso de plantas medicinales en comunidades nativas del distrito de río Santiago, Amazonas*. SALUD INTERCULTURAL. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. Instituto Nacional de Salud.; 20.
- Melo, E. (2000). *Acta Botánica Brasilica*, pág. 273.
- Miguel, O. (1987). *Componentes químicos de Sebastiania schottiana Muell Arg, hipótesis sobre a correlação entre a estrutura e atividade farmacológica*. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.
- Myers, N.; Mittermeier, R.; Mittermeier, G.; Fonseca, D. & Kent, J. (2000). *Biodiversity hotspots for conservation priorities*. *Nature* 403, pág. 853-858.
- Niero, R. (2000). *Obtenção de novas moléculas com atividade analgésica e antiinflamatória a partir de plantas medicinais brasileiras*. Florianópolis. Centro de ciências físicas e matemáticas. Curso de pós-graduação em química. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

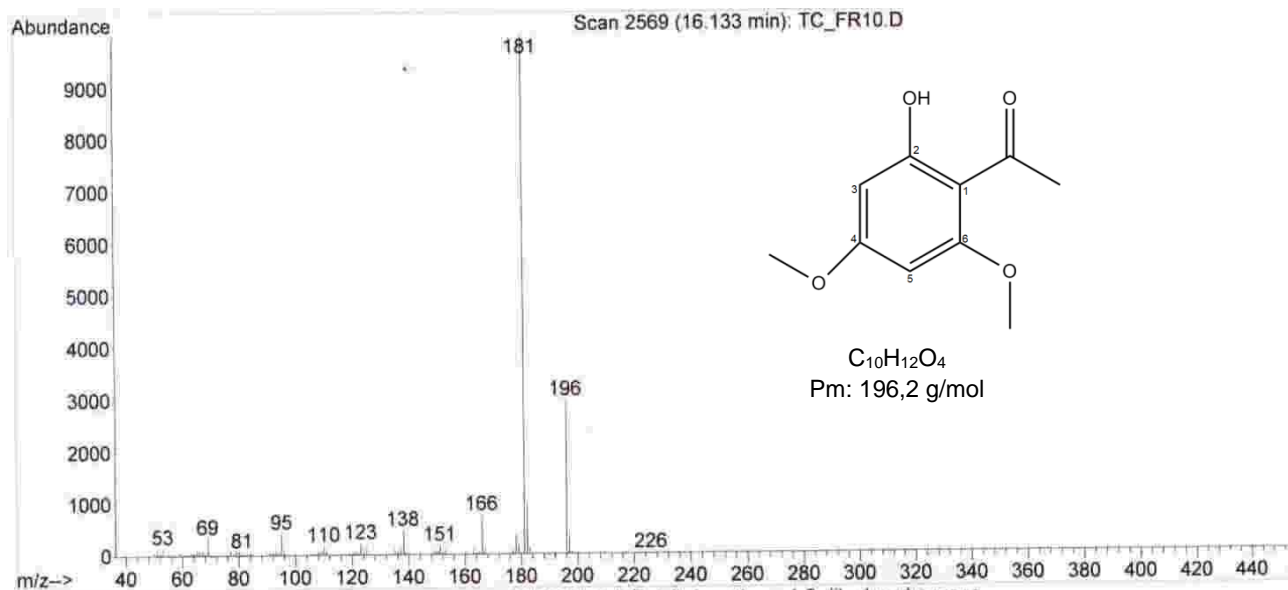
- Oliveira, P.; Conserva, L. & Lemos, R. (2008). *Chemical constituents from Triplaris Americana L. (Polygonaceae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*. Maceió, pág 36, 134-137.
- Ordoñez, L.; Ambrose, K.; Borja, R.; Cueva, K. & Gonzales, L. (2006). *Proyecto “La biodiversidad como sustento de vida en los bosques de ceja andina: uso sustentable de la agrobiodiversidad de los bosques de ceja de montaña del Carchi-Ecuador”*, Anexos 1- 4 Informe final del Proyecto Ceja Andina. Ecopar, IDRC y CRDI. 86 p. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, pág. 489.
- Ponz, E.; Carpio, G. & Meo, S. (2005). *La medicina tradicional de los Tacana y Machineri*; Jiménez, P., Ed.; La Paz- Bolivia; pág. 2.
- Richter, M. & Moreira, A. (2005). *Heterogeneidad climática y diversidad de la vegetación en el sur de Ecuador: un método de fitoindicación*. *Rev. Peru. biol.* pág. 217- 238.
- Soares, M.; De Felipe, A.; Guimarães, E.; Kato, M.; Ellena, J.; & Doriguetto, A. (2006). 2-*Hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone from Leaves of Peperomia glabella*. *J. Braz.Chem.Soc.*, Vol. 17, No 7, 1205-1210. São Paulo-Brazil.
- Tene, V.; Malagón, O.; Vita, Finizi, P.; Vidari, G.; Armijos, C. & Zaragoza, T. (2007). *An Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador*. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 111; pág. 63-81.
- Torres, L.; Navarrete, H.; Muriel, P.; Macía, M. & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Primera edición, pág. 527.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 13 Septiembre 2015
<http://www.tropicos.org/Name/26000377>
- Ulloa Ulloa, C. & D. A. Neill. (2005). *Cinco años de adiciones a la flora del Ecuador: 1999-2004*. UTPL, Missouri Botanical Garden, Funbotanica. Editorial Universidad Técnica Particular de Loja, Loja. 75 Pp.
- Valencia, R.; Pitman, S.; León, Y & Jorgensen, M (eds.). (2000). *Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador 2000*. Herbario QCA.
- Vallejo, S.; Quingaísa, E; Ortiz, P. & Vinuesa, L. (2007). *El Agro y Vida Rural en Ecuador: Comportamiento 2000-2007 y Perspectivas 2008*, IICA, Quito-Ecuador.

Vinueza, M. (2012). *Ficha técnica N° 8: Fernán Sánchez*. Ecuador Forestal.

ANEXOS



Espectro N°1. Espectro de CG/EM del compuesto **1** (Xantocilina) aislado de la fracción F(10-12) del extracto desclorofilado de acetato de etilo.

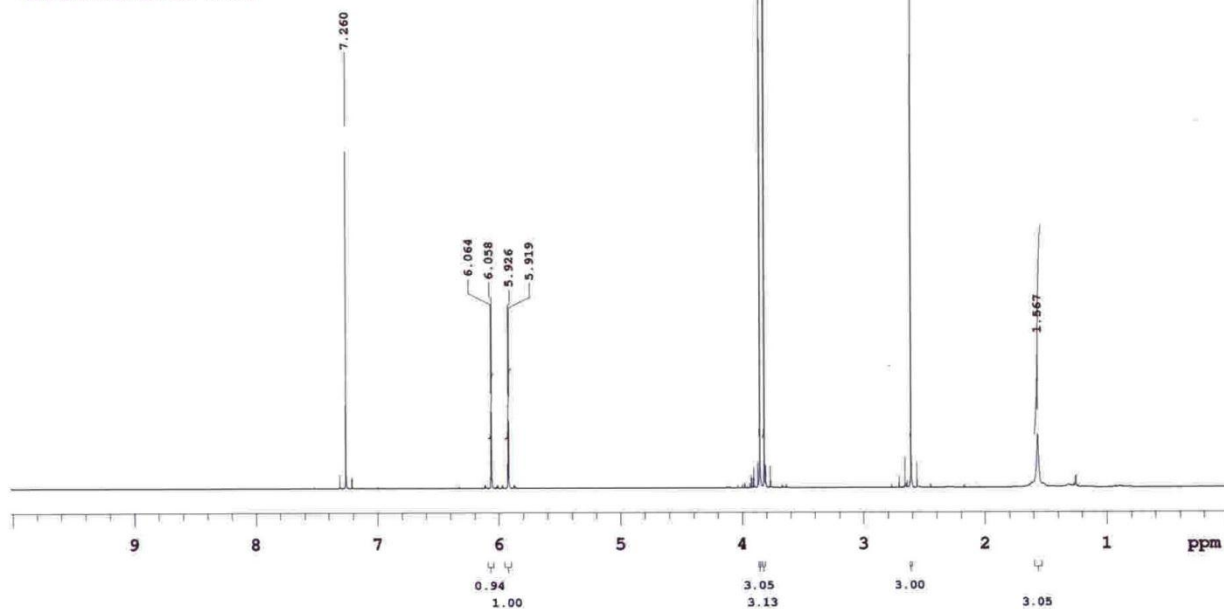
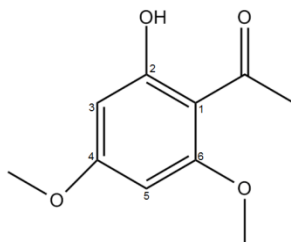


Espectro N°2. Espectro de masas del compuesto **1** (Xantocilina) aislado de la fracción F(10-12) del extracto desclorofilado de acetato de etilo.

STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR701_T_c_F_10
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LR701_T_c_F_10_20150303_01
Fidfile: PROTON_02

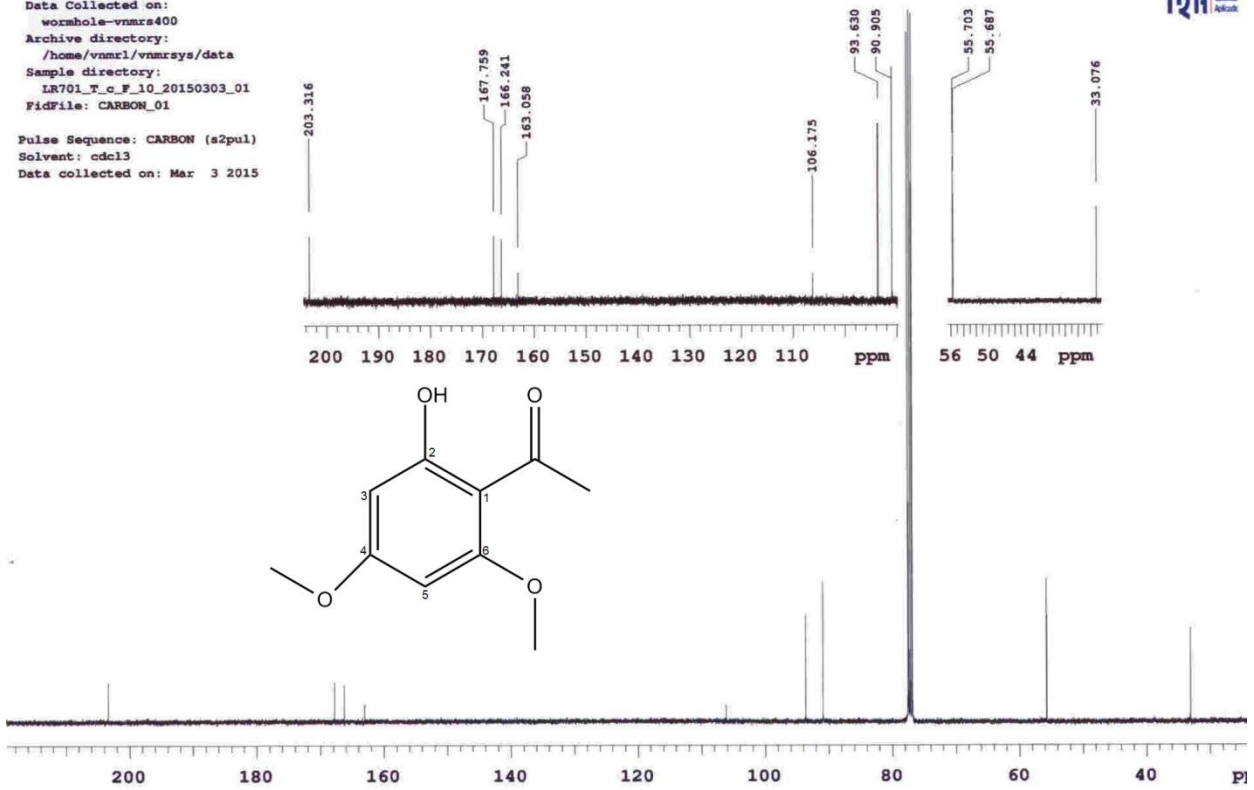
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 3 2015



Espectro N°3. Espectro de RMN ¹H de **1** aislado de la fracción F(10-12) del extracto de acetato de etilo desclorofilado.

STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR701_T_c_F_10
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LR701_T_c_F_10_20150303_01
FidFile: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 3 2015

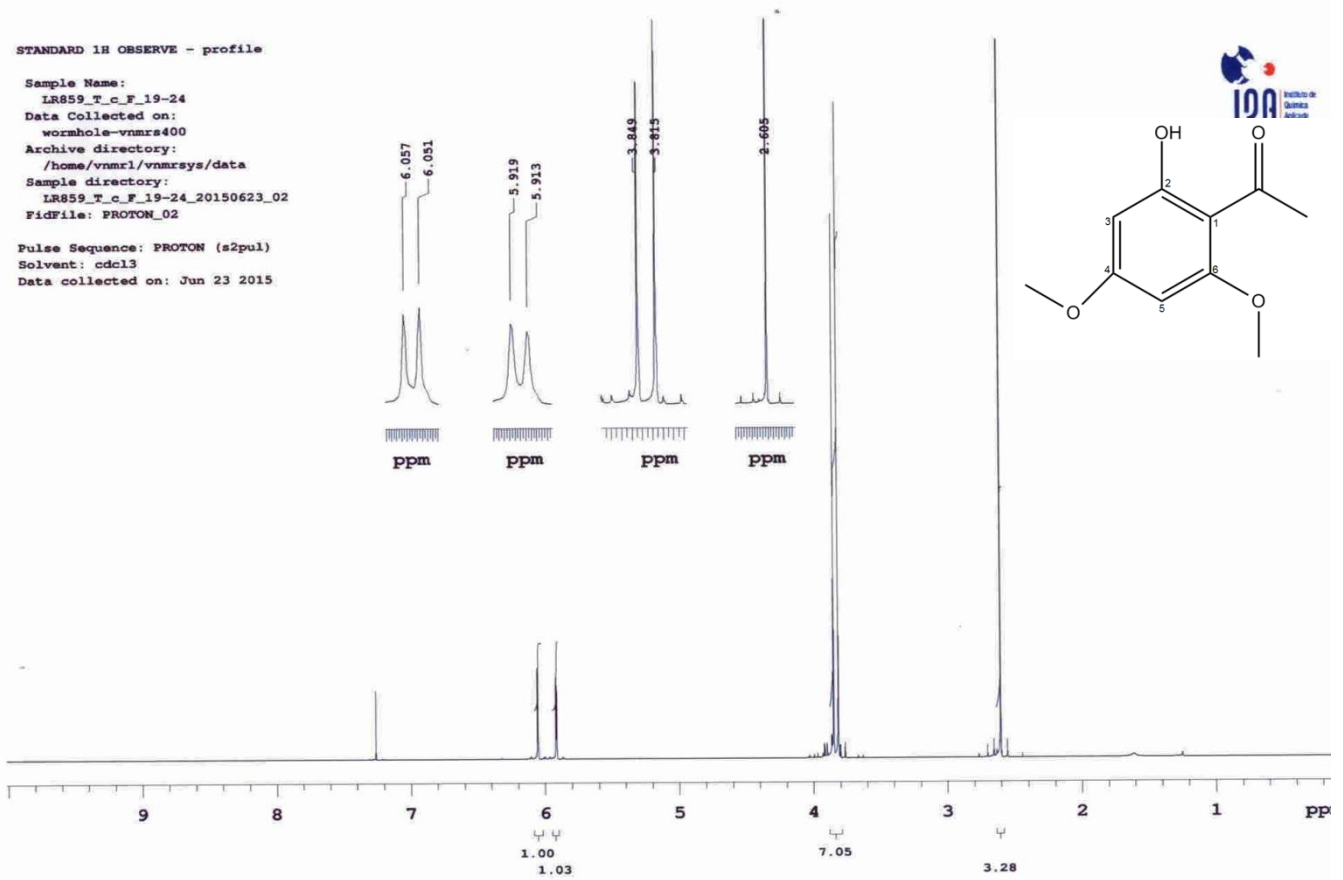


Espectro N°4. Espectro de RMN ^{13}C de **1** aislado de la fracción F(10-12) del extracto de acetato de etilo desclorofilado.

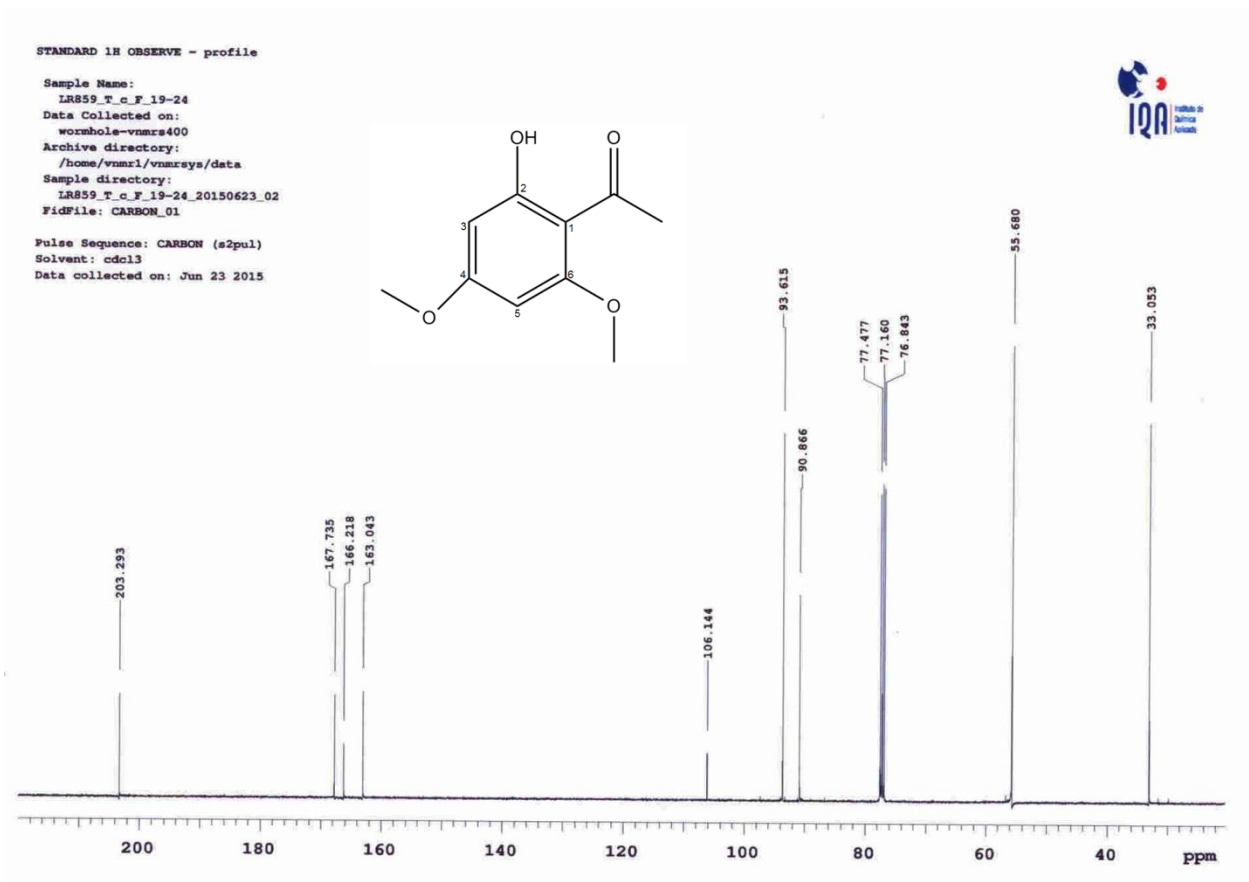
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR859_T_c_F_19-24
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmrl/vnmrsws/data
Sample directory:
LR859_T_c_F_19-24_20150623_02
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jun 23 2015



Espectro N°5. Espectro de RMN ^1H de **1** aislado de la fracción F(19-24) del extracto metanólico desclorofilado.



Espectro N°6. Espectro de RMN ^{13}C de **1** aislado de la fracción F(19-24) del extracto metanólico desclorofilado.