



# UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA

*La universidad católica de Loja*

## ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de hojas de plantas con flores femeninas de *Hedyosmum strigosum* en el cantón Saraguro provincia de Loja.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**AUTOR:** Zaruma Gonzalez, Jessica Johanna

**DIRECTOR:** Morocho Zaragocín, Segundo Vladimir, PhD.

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

Ph.D.

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

### DOCENTE DE LA TITULACION

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de hojas de plantas con flores femeninas de *Hedyosmun strigosum* en el cantón Saraguro provincia de Loja realizado por Zaruma Gonzalez Jessica Johanna; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la ejecución del mismo.

Loja, octubre del 2015

f) \_\_\_\_\_

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

**CI:** 110326907-0

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Jessica Johanna Zaruma Gonzalez declaro ser autora del presente trabajo de Titulación: Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de hojas de plantas con flores femeninas de *Hedyosmun strigosum* en el cantón Saraguro provincia de Loja, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Segundo Vladimir Morocho Zaragocín director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente 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) \_\_\_\_\_

**Autora:** Jessica Johanna Zaruma Gonzalez  
**CI:** 110532714-0

## DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a Dios, la confianza y fe en él que siempre estuvo presente y me ayudo a no desmayar en llegar a mi meta.

A mis padres Elena y Milton que nunca dejaron de apoyarme y brindarme amor, que con paciencia supieron guiarme y darme consejo, a mis queridos hermanos Katty, Vinicio, Carlos y Nataly que cada día me apoyan. Así mismo quiero dedicárselo a mí querido abuelito Arnoldo aunque ya no se encuentre presente; a todos ellos que son mi pilar y fortaleza.

Les dedico con mucho amor este esfuerzo.

***“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”***

Filipenses 4:13

## AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios por brindarme las fuerzas para seguir adelante y culminar esta etapa primordial de mi vida.

A toda mi familia por su comprensión y amor que siempre me brindan, gracias por ser mi apoyo, sustento y pilar para no desmayar, gracias por permitirme realizar como profesional.

A mi director de tesis PhD. Vladimir Morocho que con paciencia me brindo sus conocimientos y me guio en la culminación del presente trabajo.

A mis queridos compañeros del laboratorio los cuales con sus ocurrencias, sus enseñanzas y su ánimo ayudaron a continuar siempre adelante.

Por ultimo quiero agradecer a la Universidad Técnica Particular de Loja y al Departamento de Química Aplicada por permitirme realizar dicho trabajo que marca un ítem importante en mi formación académica.

Jessica Johanna Zaruma Gonzalez

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACION DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACION.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
INDICE DE CONTENIDOS .....	6
RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUCCIÓN .....	14
CAPITULO I .....	16
1. Plantas Medicinales.....	17
1.1 Introducción.....	17
1.2 Familia Chloranthaceae .....	19
1.3. Descripción de la especie vegetal: Hedyosmum strigosum.....	20
1.3.1 Taxonomía.....	21
1.4 Metabolitos secundarios de las plantas .....	21
1.4.1 Clasificación de los metabolitos secundarios .....	23
1.5 Ruta Biosintética de los Terpenos .....	24
1.6 Cromatografía.....	26
1.6.1 Cromatografía de capa fina.....	26
1.6.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	27
1.7 Resonancia Magnética Nuclear .....	28
1.8 Hidrólisis.....	29
1.9 Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).....	30

1.10 Enfermedades Infecciosas.....	30
1.10.1 Bacterias Gram positivas .....	31
1.10.2. Bacterias Gram negativas .....	32
CAPITULO II .....	37
MATERIALES Y METODOS .....	37
2.1. Esquema metodológico .....	38
2.2 Recolección y selección del material vegetal .....	39
2.3 Obtención de extractos totales.....	39
2.4 Desclorofilación de extractos totales.....	39
2.5 Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo .....	40
2.5.1 Cromatografía en capa fina.....	40
2.5.2 Purificación de la fracción JZ 004/10.....	41
2.5.3 Hidrólisis .....	41
2.5.4 Caracterización de los alcoholes.....	41
2.5.5 Índice de Kovats .....	41
2.5.6 Caracterización del ácido.....	42
2.6 Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto de Hexano .....	43
2.7 Cromatografía de capa fina.....	43
2.8 Purificación de la fracción JZH 03.....	43
2.8.1 Elucidación de la fracción JZH 03/1 .....	44
2.9 Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) .....	44
2.10 Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI) .....	46
2.10.1 Microorganismos de Prueba .....	46
2.10.2 Preparación de las muestras.....	46
2.10.3 Preparación del cultivo overnight .....	46
2.10.4 Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias.....	47
2.10.5 Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias.....	47



2.10.6	Concentración mínima inhibitoria .....	48
2.10.7	Concentración mínima inhibitoria anti fúngico .....	49
CAPITULO 3 .....		50
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....		50
3.1.	Extractos obtenidos de la especie <i>Hedyosmun strigosum</i> .....	51
3.2	Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo .....	52
3.2.1	Fracción JZ 004/10 .....	52
3.3	Fraccionamiento del extracto de Hexano.....	58
3.3.1	Fracción JZH 03.....	59
3.4	Determinación de la actividad antimicrobiana .....	61
3.4.1	Determinación de la actividad antifúngica.....	61
3.4.2	Determinación de actividad antibacteriana.....	61
CONCLUSIONES .....		63
BIBLIOGRAFÍA.....		64
ANEXOS.....		67

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación botánica de <i>Hedyosmum strigosum</i> .....	21
<b>Tabla 2.</b> Características de la columna capilar utilizada .....	45
<b>Tabla 3:</b> Método de análisis de la columna DB-5MS .....	45
<b>Tabla 4:</b> Medios de cultivo y condiciones de incubación .....	47
<b>Tabla 5:</b> Medios de cultivo para hongos.....	48
<b>Tabla 6:</b> Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de <i>H. strigosum</i> .....	51
<b>Tabla 7:</b> Unión de fracciones del extracto total de Acetato de Etilo .....	52
<b>Tabla 8:</b> Índice de kovats del compuesto identificado .....	54
<b>Tabla 9:</b> Comparación de los datos obtenidos de RMN <sup>1</sup> H del ácido 4-hidroxicinámico. ....	56
<b>Tabla 10:</b> Unión de fracciones del extracto total de hexano .....	58
<b>Tabla 11:</b> Comparación de los datos obtenidos de RMN <sup>1</sup> H methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate .....	60
<b>Tabla 12:</b> Concentración mínima inhibitoria. ....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Hedyosmun strigosum.....	21
<b>Figura 2:</b> Estructura química del fenol .....	24
<b>Figura 3:</b> Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen. .....	25
<b>Figura 4:</b> Factor de Retención. ....	27
<b>Figura 5:</b> Staphylococcus aureus.....	31
<b>Figura 6:</b> Enterococcus faecalis.....	32
<b>Figura 7:</b> Escherichia coli .....	32
<b>Figura 8:</b> Pseudomona aeruginosa.....	33
<b>Figura 9:</b> Proteus vulgaris.....	33
<b>Figura 10:</b> Klebsiella pneumoniae.....	34
<b>Figura 12:</b> Trichophytum rubrum.....	35
<b>Figura 13:</b> Trichophytum mentographytes .....	36
<b>Figura 14:</b> Esquema del desarrollo de la investigación .....	38
<b>Figura 15:</b> Desclorofilación de extractos totales.....	40
<b>Figura 16:</b> Columna Cromatográfica.....	44
<b>Figura 17:</b> CCF fracciones 17- 20 (JZ 004/10).....	53
<b>Figura 18:</b> Cromatografía en capa fina de JZ 1. AC.....	54
<b>Figura 19:</b> Cis- Pinocarveol .....	55
<b>Figura 20:</b> Espectro GC-EM del compuesto cis-Pinocarveol.....	55
<b>Figura 21:</b> Ácido 4-Hidroxicinámico .....	56
<b>Figura 22:</b> Estructura química de (1R, 2R, 5R)- 6,6- dimethyl-2-methylidenebicyclo [3.1.1]heptan -3- y (2E)-3-(-4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate.....	57
<b>Figura 23:</b> CCF de la fracción JZ 03/1 .....	59
<b>Figura 24:</b> Estructura química de methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate .....	60

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción JZ 01/02.....	68
<b>Anexo 2:</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Muestra JZ 1.AC .....	69
<b>Anexo 3:</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Fracción JZH 03/1.....	70

## RESUMEN

*Hedyosmum strigosum* proveniente a la familia Chloranthaceae, es un arbusto aromático nativo de los Andes y Amazonia ecuatoriana, conocida como “Guayusa”, las hojas de esta especie son usadas en infusión por sus efectos analgésicos, antiinflamatorios; así como antiespasmódicos y antisépticos.

En el presente trabajo se realizó una hidrolisis del extracto de acetato de etilo, del cual se obtuvo como resultado una molécula, un alcohol cis-pinocarveol unido a un ácido 4-hidroxicinámico. En el extracto de hexano se identificó el compuesto de origen terpénico methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoato. La identificación de estos compuestos se hizo mediante técnicas espectroscópicas: CCF, CG-EM y RM.

La actividad antimicrobiana de los extractos y del compuesto fue evaluada contra siete especies de bacterias y 2 especies de hongos, usando el método de dilución en caldo los valores de CMI para el extracto de hexano y acetato fueron 62.5 µg/mL y 125 µg/mL respectivamente para *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, la fracción JZ 01/02 con una CMI de 15.62 µg/mL. Los valores del extracto de acetato fueron de 500 µg/mL para *Trichophyton mentagrophytes*.

**Palabras claves:** *Hedyosmum strigosum*, Chloranthaceae, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Trichophyton mentagrophytes*.

## ABSTRACT

*Hedyosmum strigosum* from Chloranthaceae family is an aromatic shrub of the Andes and Ecuadorian Amazon, known as “Guayusa”, the leaves of this species used in infusion as analgesic, anti-inflammatory; as antispasmodics and antiseptics.

In the present study there was realized a hidrólisis of the acetate of ethyl extract, It was obtained as a result one compound: alcohol cis-pinocarveol joined the acid 4- hydroxycinnamate. In hexane extract we found: the terpene methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoato The components were characterized using spectroscopic techniques: CCF, CG-EM and RM.

The antimicrobial activity of the hexane and acetate of ethyl extracts and two compound were tested against seven different bacterial and two fugal using microdilution in liquid broth. The minimal concentration to inhibit (MCI) for hexane and ethyl acetate extract were 62.5 µg/mL and 125 µg/mL respectively for *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, the JZ 01/02 fraction with a MCI of 15.62 µg/mL. The acetate extract values were 500 µg/mL for *Trichophyton mentagrophytes*

## INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, varias sociedades han recurrido a la naturaleza, principalmente a las plantas como fuentes médicas y de salud. Hoy en día, un gran porcentaje de la población mundial, en particular países en desarrollo, utilizan plantas para hacer frente a las necesidades primarias de la medicina. (Tene et al. 2006)

Las plantas elaboran y almacenan productos propios durante el crecimiento, debido al metabolismo. Algunas tienen valor medicinal aprovechable. (Polunin et al. 1992)

Casi siempre en la planta se encuentran varios principios activos, de los cuales uno de ellos determinaría la importancia de la especie para alguna aplicación. Estos principios activos no se distribuyen de forma homogénea por todo el cuerpo de la planta, sino preferentemente en las hojas, las flores o las raíces y a veces en las semillas, los frutos o en la corteza. Además es muy importante tener en cuenta que estos principios oscilan, según el hábitat de la planta, la recolección y la preparación. (Nájera, M. 1983)

Chloranthaceae es una pequeña familia de cuatro géneros, es decir, *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Ascarina*, distribuidas en 70 especies en la zona tropical y zonas subtropicales. Distribuidas en 70 especies en la zona tropical y zonas subtropicales. Las plantas enteras o raíces de plantas de esta familia son ampliamente utilizadas en medicamentos, medicina popular, como antiespasmódico, antiséptico, contra el cáncer o para aliviar el dolor, forúnculos y dermatopatía en Asia oriental. Los compuestos obtenidos a partir de las plantas de Chloranthaceae se puede asignar a las siguientes clases de compuestos: terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas, y esteroides. (Cao et al. 2008)

El género *Hedyosmum* también conocido como: Guayusa, Borracho, Tarqui; consta de 40 especies distribuidas principalmente en las montañas desde el estado de Veracruz (México), hasta el Brasil y Paraguay. En el Ecuador están representadas 15 especies, encontrándose 12 de ellas en los bosques andinos y subpáramos. (Ulloa, C. y Jorgensen, P. 2004)

El aceite esencial de diferentes especies del género *Hedyosmum* tales como: *H. angustifolium*, *H. scabrum*, *H. mexicanum*, *H. bonplandianum*, y *H. costaricensis* se analizaron por GC / MS o GC-FID demostrando así la existencia de monoterpenos: considerando así a los monoterpenos y sesquiterpenos los principales componentes en el aceite esencial de la mayoría de las plantas de esta familia. Así mismo la mayoría de las plantas de la familia Chloranthaceae muestran

actividad antibacteriana, los constituyentes efectivos corresponden a los aceites esenciales, ácidos orgánicos, y sesquiterpenos. (Cao et al. 2008)

La elucidación de estructuras químicas en dichas plantas medicinales se dificulta por la presencia de mezclas de compuestos en las mismas. La utilización combinada de métodos de separación tales como: cromatografía en columna (CC) y cromatografía de capa fina (TLC), permite separar y analizar a un mismo tiempo dichas mezclas. (Ábalos et al. 2003)

Es por eso que en su afán de investigación el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja desarrolla estudios fitoquímicos con respecto a especies vegetales a fin de obtener principios activos con potencial farmacológico.



**CAPITULO I**  
**GENERALIDADES**

## 1. Plantas medicinales

### 1.1 Introducción.

Las plantas medicinales son las que se utilizan comúnmente en el tratamiento y prevención de dolencias y enfermedades específicas, aquellas que generalmente se considera que juegan un rol beneficioso en el cuidado de la salud. (Srivastava et al. 1996). Aunque son llamadas “drogas”, esta denominación no significa alucinógenos o similares, sino simplemente ejemplares secos y bien preparados, o partes de los mismos. (Nájera, M. 1983)

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos. (Bermúdez et al. 2005)

En la actualidad, Ecuador, ubicado en América Latina- se considera uno de los países que poseen la mayor biodiversidad del mundo (Jorgensen y Leon-Yanez. 1999) y en el que la población local mantiene sus tradiciones ancestrales en el uso de los recursos naturales (Naranjo y Escaleras. 1995), jugando un papel fundamental en el desarrollo de las culturas andinas, en su sistema de creencias y ritos.

Existe importante información sobre los usos tradicionales de especies vegetales andinas ecuatorianas provisto en publicaciones, tal es el caso del científico botánico Misael Acosta-Solís (1994) quien realizó estudios detallados de plantas conocidas desde antes de la conquista en la región interandina por sus propiedades medicinales, entre las que se encuentran especies importantes culturalmente como la valeriana (*Valeriana sorbifolia* y *V. decusata*), utilizada como estimulante y antiespasmódico. (Ulloa, C. 2006)

La Condamine elaboró en 1738 la primera descripción científica de la quina de Loja (*Cinchona officinalis*, 1753), especie que ya en 1630 se dio a conocer en Europa por sus virtudes en el tratamiento del paludismo y que pasó a ser el mayor aporte americano a la farmacopea universal. (Acosta-Solís, M.1976)

La labor de los investigadores de las plantas útiles de la región andina ecuatoriana ha continuado hasta la actualidad, merecen mencionarse las investigaciones del botánico y químico Alfredo Paredes (1905) quien publicó los trabajos *Especies ecuatorianas de importancia industrial* (1952) y *Plantas usadas por nuestros aborígenes* (1955), realizando estudios fitoquímicos en el chamico (*Datura spp.*) y del pungal (*Solanum crinitipes*). (Ulloa, C. 2006)

En Sud América tropical la mayor parte de las plantas psicoactivas fue documentada de grupos indígenas que residen en la región oeste de la Amazonía, incluyendo a las laderas húmedas orientales de los Andes. (Kvist, L. y Morales, R. 2006)

Otro ejemplo del gran potencial de los recursos medicinales es la identificación de más de 3.000 especies de plantas con propiedades anti cancerígenas, representando así un gran ingreso para la industria farmacéutica. Resaltándose, que los descubrimientos de varios fármacos tuvieron lugar al analizar propiedades químicas de las plantas utilizadas por curanderos, shamanes, herbalistas, parteras y otros profesionales afines, quienes practican la medicina tradicional en los andes y trópico ecuatorianos. (Ríos, M. 2007)

El conocimiento científico de ciertas especies es desconocido y es necesaria la investigación de los recursos naturales, pero con los métodos y requerimientos técnicos que la ciencia actual lo exige. (Calixto, M. 2006). Los recursos genéticos vegetales con propiedades medicinales pueden contribuir a los servicios modernos de salud y a la producción de productos farmacéuticos de varios modos ya que pueden usarse directamente como agentes terapéuticos. (Oldfield, H.1981)

Los metabolitos secundarios de origen vegetal, en los últimos años, ha contribuido en gran medida a nuestra comprensión actual de los mecanismos importantes relacionadas con el proceso de transmisión y el tratamiento del dolor. Los recientes avances en nuestra comprensión de los mecanismos de acción de las sustancias derivadas de las plantas superiores, junto con el uso de técnicas de biología molecular, se han acelerado en gran medida, así como los intentos de identificar objetivos prometedores para el descubrimiento de nuevos, seguros y eficaces fármacos analgésicos. (Calixto et al. 2001)

Sin embargo, un sinnúmero de especies con gran utilidad de la flora tropical se encuentran amenazadas de extinción y en una situación en que sus poblaciones indican que ya sus tasas de crecimiento son irrecuperables. Por lo tanto es indispensable en esta época que se ejecute un uso sostenible de las especies de plantas, respetando sus tasas de reproducción para evitar así su extinción. (Ríos, M. 2007)

## 1.2 Familia Chloranthaceae.

Chloranthaceae representan uno de los linajes más antiguos de angiospermas (Martinez, C. et al. 2012); una familia constituida principalmente por arbustos o árboles, con hojas simples opuestas, fuertemente aromáticas, con estípulas, inflorescencia hermafrodita o unisexual, las flores estaminadas en espigas, con frutos en drupas. (Grijalva, A. 2006)

Es una pequeña familia distribuida en 75 especies existentes con una distribución disjunta en el nuevo mundo: *Ascarina* aparecen en Asia, las islas del Pacífico, y Madagascar; *Chlorantus* y *Sacandra* aparecen en Asia oriental; y *Hedyosmun* tiene lugar en el centro y sur de América, las Indias Occidentales y de China. (Eklund, H. et al 2004)

Las plantas de esta familia son reconocidas por sus usos tradicionales, gracias a sus efectos analgésicos, antisépticos, anti fúngicos, antiespasmódicos, a más de sus propiedades anti cancerígenas; también se las usa en el tratamiento de picaduras de serpientes e insectos. Su tallo se usa como material para construcción de viviendas y para la fabricación de carbón. (De la Torre et al. 2008)

Con lo que respecta a los constituyentes químicos de la familia Chloranthaceae, se han identificado 124 compuestos obtenidos de diferentes especies de dicha familia, tales como: terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas, y esteroides. (Cao et al. 2008)

Los terpenoides aislados abarcan: monoterpenos, diterpenos, triterpenos y sesquiterpenos, siendo estos últimos los componentes principales. El aceite esencial de diferentes especies de la familia Chloranthaceae tales como *S. glabra*, *C. spicatus*, *C. fortunei*, *C. holostegius*, *C. japoncius*, *H. angustifolium*, *H. scabrum*, *H. mexicanum*, *H. bonplandianum*, y *H. costaricensis* se analizaron por GC/MS o GC-FID demostrando así la existencia de monoterpenos. Componentes similares se encontraron en el aceite esencial de plantas dentro del mismo género; considerando así a los monoterpenos y sesquiterpenos los principales componentes en el aceite esencial de la mayoría de las plantas de esta familia. (Cao et al. 2008)

### 1.3. Descripción de la especie vegetal: *Hedyosmum strigosum*.

El nombre *Hedyosmum* es, de hecho, derivado de las palabras griegas hedy (agradable) más osmum (olor) en referencia a este olor que ha sido comparado con la pimienta, limón y anís. Este género es el más abundante de la familia Cholranthaceae, representada por 40 especie de árboles o arbustos, ubicándose en terrenos montañosos y con gran abundancia a lo largo de América del Sur y parte del suroeste de Asia. (Carles et al. 1999)

*Hedyosmun strigosum* es un árbol de 4 m de altura, nativo de los Andes y Amazonia ecuatoriana, con hojas aromáticas que tienen agradable olor a limón fresco, estípulas con flecos y flores de color verde y estigmas. (De la Torre et al. 2008)

Este tipo de especie contiene flores bisexuales, las Espigas masculinas, solitarias o reunidas en racimos o panículas de 60–200 flores, consistiendo de 1 estambre solitario ditecal, cuadrangular, sin filamento; las espigas femeninas solitarias, en cimas, tirsos o panículas; brácteas florales suculentas, parcial o totalmente envolviendo a la flor; generalmente 2–15 reunidas en címulas, con el perianto adnato al ovario con 3 segmentos libres, parcial o totalmente fusionados en el tope del ovario. (Ulloa, C. y Jorgensen, P. 2004). Conocido comúnmente como Quinillo, Olloco, Guayusa, las hojas de esta especie se usa en infusión como agua aromática, su tallo es maderable y se utiliza para construcción de cercas (Etnia no especificada – Imbabura, Tunguragua). (De la Torre et al. 2008)

En varios países latinoamericanos las hojas aromáticas de arbolitos de varias especies de *Hedyosmum*, son usadas como bebida refrescante o como sustituto del café o té y para calmar varias dolencias; *H. cumbalense* (Colombia a Perú) se usa localmente para saborear alcohol destilado en la provincia del Azuay, Ecuador (Todzia, C. 1988), el té hecho de las hojas de estas especies también se sirve como un diurético, , y en la curación de enfermedades de los ovarios Las especies de este monte se conocen como guayusa de monte o limoncillo. (Ulloa, C. 2006)

### 1.3.1 Taxonomía

Tabla 1. Clasificación botánica de *Hedyosmum strigosum*

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Chloranthales
<b>Familia:</b>	Chloranthaceae
<b>Género :</b>	<i>Hedyosmum</i>
<b>Especie:</b>	<i>strigosum</i>

Fuente: Tropicos.org



Figura 1: *Hedyosmum strigosum*

Fuente: Tropicos.org- Jardín Botánico de Missouri.

### 1.4 Metabolitos secundarios de las plantas.

El metabolismo es considerado como el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos con el fin de sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o viceversa. Las plantas, como seres autótrofos, se caracterizan por realizar dos tipos de metabolismo, a saber: primario y secundario. (Ávalos et al 2009)

- Metabolismo secundario es el conjunto de procesos mediante los cuales se generan compuestos de naturaleza química diversa, que cumplen funciones no esenciales para la

plantas, de forma tal, que su ausencia no es fatal. Estos productos poseen características muy variadas y una extrema complejidad química. En la mayoría de los casos intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. (Ávalos et al 2009)

Cabe resaltar que la diferencia entre metabolitos primarios y metabolitos secundarios es sólo funcional, por lo que no pueden ser distinguidos en base a moléculas precursoras, estructura química, ni origen biosintético. Inclusive, las vías bioquímicas de biosíntesis son difusas. A veces, un compuesto considerado metabolito primario, por la acción de una sola enzima se convierte en lo que se considera un metabolito secundario. (García, D .2004)

Hasta inicios del siglo XX se ignoraba el valor adaptativo de los metabolitos secundarios. Se pensaba que simplemente eran productos finales de procesos metabólicos, sin función específica, o bien, productos de desecho de las plantas. Inclusive, en la actualidad, muchas de sus funciones aún se desconocen. (Ávalos et al 2009). El estudio de estas sustancias se originó por el interés de químicos orgánicos que querían conocer su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria. Su investigación estimuló el desarrollo de modernos métodos de Análisis Instrumental, como espectroscopia y técnicas de separación, que permitieron conocer de mejor manera su estructura y procesos de síntesis. (Bennett, R y Wallsgrave, R. 2006)

Actualmente, se conoce que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actuando como agentes alelopáticos (son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores y dispersores de las semillas. (Sepúlveda et al. 2003)

El reconocimiento de sus propiedades biológicas fomenta el desarrollo de la bioquímica industrial, porque está permitiendo el descubrimiento y aplicación exitosa de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. (Ballare, C. 2012)

### **1.4.1 Clasificación de los metabolitos secundarios.**

Aunque existen diversas formas de clasificar los metabolitos secundarios, la más utilizada, es en atención a sus orígenes biosintéticos. Según esto, los metabolitos secundarios de las plantas se dividen en 3 grandes grupos: terpenoides, compuestos fenólicos y sus derivados, y compuestos nitrogenados o alcaloides. (Ávalos et al 2009)

#### **1.4.1.1 Terpenos**

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con más de 40.000 moléculas diferentes (Ávalos et al 2009). Son hidrocarburos que pertenecen a las familias de los alquenos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y cetonas. Cuando las moléculas contienen átomos de oxígeno se da preferencia al término terpenoide, aunque ambas denominaciones, terpeno y terpenoide suelen usarse indistintamente. (Ormeño, E. y Fernandez C. 2012)

La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas (Ávalos A. et al 2009); con propiedades antioxidantes que protegen a lípidos y componentes celulares del ataque de agentes oxidantes como radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos. (Drago et al. 2006)

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno. (Ávalos et al 2009)

Los terpenos se localizan sobre todo en las hojas, las flores y los frutos y, en menor medida, en los tallos, el tronco y las raíces. Por ejemplo, la resina del tronco de los pinos contiene cantidades muy elevadas de terpenos. (Ormeño et al 2012)

La mayoría de las plantas sintetizan y liberan terpenos, unos compuestos orgánicos volátiles, que desempeñan diversas funciones ecológicas y que tienen importantes repercusiones ambientales. Se sabe que los terpenos confieren protección a las plantas al evitar la



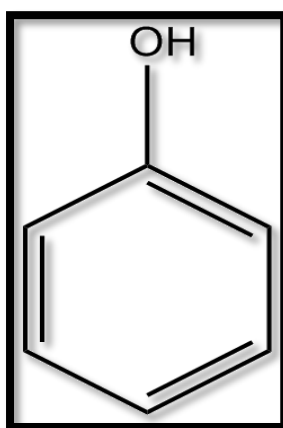
depredación por los herbívoros y contrarrestar las condiciones oxidantes de las sequias o la contaminación. (Ormeño et al 2012)

Precisamente, por esta característica, algunos tipos de terpenos son utilizados extensamente dentro de la Botánica Sistemática para establecer relaciones de parentesco entre diferentes taxones de organismos. Por ejemplo, la orden Chloranthales, a la que pertenece *Hedyosmum strigosum*, conjuntamente con la de los Magnoliales y Laurales, se caracterizan por producir aceites esenciales característicos basados en compuestos terpenoides.

#### 1.4.1.2 Compuestos fenólicos y sus derivados

En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Ávalos et al 2009). **Fig. 2**

Los más de 8.000 compuestos fenólicos conocidos como metabolitos secundarios se forman por la vía del ácido shikímico o la del malonato/acetato.



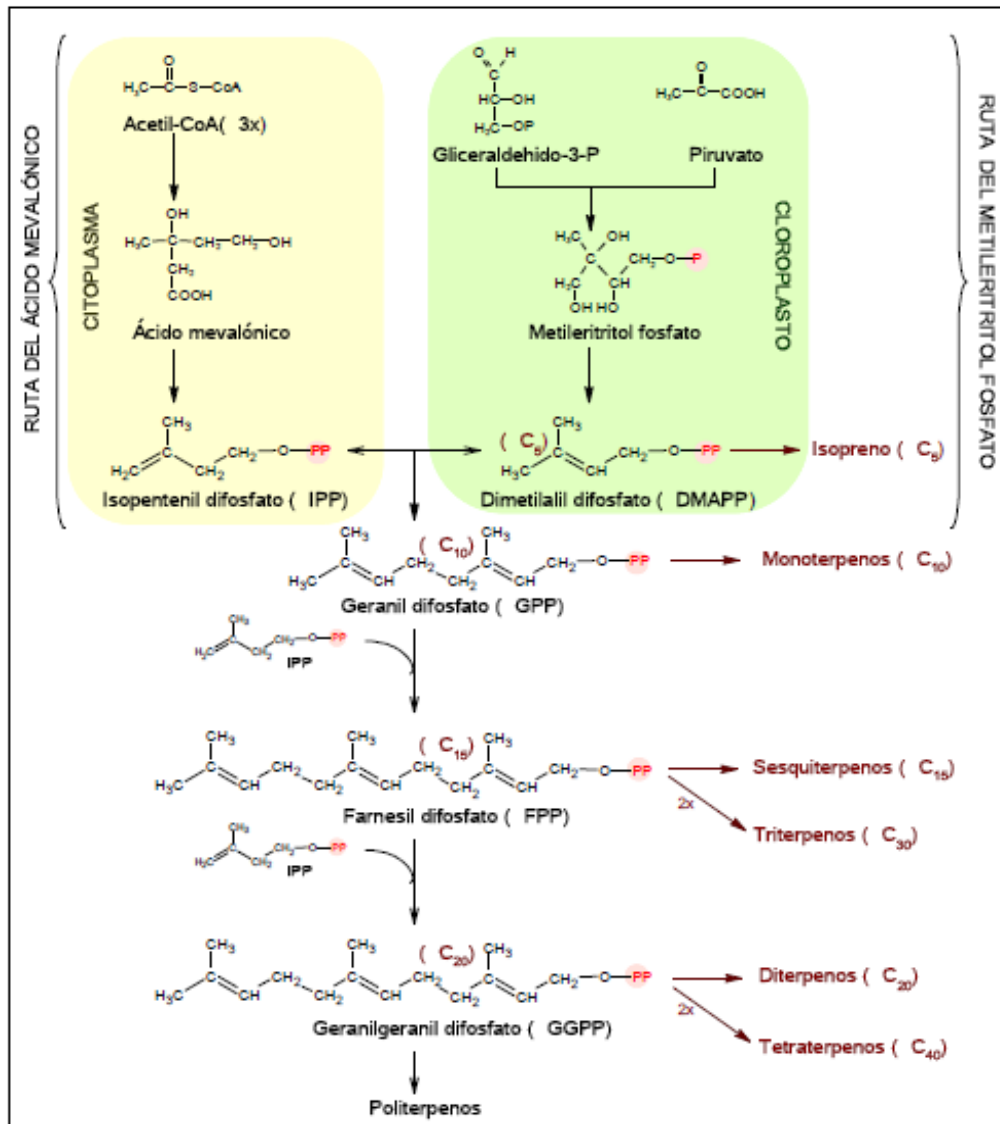
**Figura 2:** Estructura química del fenol  
**Fuente:** Ávalos et al 2009

### 1.5 Ruta Biosintética de los Terpenos

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico

que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. (Eisenreich et al., 2001)

El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranyl difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranylgeranyl difosfato (GGPP) precursor de diterpenos. (Ávalos A. et al 2009). **Fig. 3**



**Figura 3:** Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen. **Fuente:** Avalos, A. 2009

## 1.6 Cromatografía.

La cromatografía, es uno de los medios útiles de separación de mezclas de compuestos, usada tanto como una técnica para purificar los componentes e identificarlos. En la cromatografía, la mezcla se separa por la distribución diferencial de los componentes entre una fase estacionaria y una fase móvil. Principales métodos de cromatografía en aislamiento y análisis de productos naturales incluyen los siguientes: cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía en columna líquida (LC), cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En la cromatografía de adsorción, materiales adsorbentes inertes (por ejemplo, gel de sílice o alúmina) sirven como la fase estacionaria, y los disolventes orgánicos sirven como la fase móvil. La separación de la mezcla, entonces, se logra por las diferencias en la polaridad de los componentes individuales. Dependiendo del tamaño de poro del material, diferentes técnicas pueden ser utilizadas para lograr separaciones.

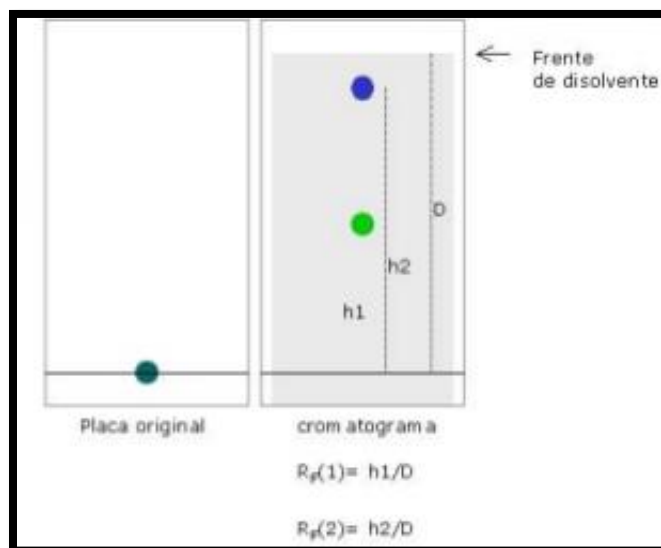
### 1.6.1 Cromatografía de capa fina.

La cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o CCF) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en un laboratorio de Química Orgánica (Oriols, N. 2011). Entre otras cosas permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto. Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.
- Comparar muestras; Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado.

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como  $R_f$ , y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones

cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.) (Oriols, N. 2011). El  $R_f$  se calcula mediante la siguiente expresión: **Fig. 4**



**Figura 4:** Factor de Retención.

**Fuente:** Okumura et al. 2001

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). El indicador absorbe la luz UV y emite luz visible. La presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto. En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización (o revelado) del cromatograma requiere utilizar un agente revelador. Este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados. (Hernández et al. 2006)

### **1.6.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.**

La cromatografía de gases-masas es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de

masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos volátiles y semivolátiles en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. (Martin, O. y Miranda, A. 2001)

Una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o "TIC" (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado. (Gutierrez, M. y Droguet, M. 2002)

### **1.7 Resonancia Magnética Nuclear.**

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), es posiblemente la técnica más poderosa y ampliamente aplicable para la determinación de la estructura. Proporciona la mayoría de la información acerca de la estructura molecular, y en algunos casos, la estructura de un compuesto se puede determinar usando sólo espectroscopía de RMN. (Klen, D. 2012)

Implica el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y los núcleos de los átomos. Una amplia variedad de núcleos puede ser estudiada mediante RMN, incluyendo H, C, N, F y P. En la práctica, espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN y espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN se utilizan con mayor frecuencia porque el hidrógeno y el carbono son los constituyentes principales de compuestos orgánicos, el análisis de un espectro de RMN proporciona información sobre cómo los átomos de carbono y de hidrógeno individuales están conectados el uno al otro en una molécula. (Klen, D. 2012)

Un núcleo con un número impar de protones y / o un número impar de neutrones posee una propiedad mecánica cuántica llamada espín nuclear, y puede ser sondeado por un espectrómetro de RMN. (Cseke et al. 2006)

La clave de cualquier técnica espectroscópica se basa en la posibilidad de que la molécula en estudio pueda estar en más de un nivel de energía, de tal forma, que haciendo incidir radiación electromagnética (r.e.m) de la frecuencia adecuada, se pueda pasar a nuestro sistema

(molécula) de un nivel energético a otro. El núcleo de un protón, inmerso en un campo magnético, puede ocupar dos niveles diferentes asociados al espín nuclear, por tanto haciendo incidir un haz de r.e.m de la frecuencia adecuada sobre un núcleo de  $^1\text{H}$  que esté ocupando el nivel inferior, se le puede pasar al nivel superior. Este tipo de transiciones es lo que da lugar a la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Considere el núcleo de un átomo de hidrógeno, el cual consiste de un solo protón y por lo tanto tiene una vuelta. Un protón con spin puede ser visto como una esfera rotativa de carga, que genera un campo magnético, llamado momento magnético. El momento magnético es similar al campo magnético producido por un imán de barra. El núcleo de un átomo tiene un número par de protones y un número par de neutrones y por lo tanto no posee esta propiedad. En contraste, el núcleo de C tiene un número impar de neutrones y por lo tanto exhibe girar. (Klen, D. 2012)

Cuando el núcleo de un átomo de hidrógeno (un protón) está sujeto a un campo magnético externo, la interacción entre el momento magnético y el campo magnético se cuantifica, y el momento magnético debe alinearse con el campo o de nuevo el campo. Un protón alineado con el campo se dice que ocupan el estado de espín alfa, mientras que un protón alineado de nuevo el campo se dice que ocupar el estado espín beta. (Klen, D. 2012)

Un breve pulso de radiación rf excita a todos los núcleos simultáneamente. Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias los protones individualmente absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín). A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial. Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia. Un espectro RMN puede registrarse en 2 segundos utilizando menos de 5 mg de muestra. (Klen, D. 2012)

## **1.8 Hidrólisis.**

En términos generales, la hidrólisis se define como una transformación química en la que una molécula orgánica, RX, reacciona con el agua, resultando la formación de un nuevo enlace covalente con OH y la escisión del enlace covalente con X (el grupo saliente) en la molécula

original, la reacción neta es el desplazamiento de X por OH; a menudo cambia el pH de una solución (Petrucci et al. 2007)

Los productos de la hidrólisis dependen de lo que se está hidrolizado.

1. La hidrólisis de una amida primaria forma un ácido carboxílico y amoníaco.
2. La hidrólisis de una amida secundaria forma un ácido carboxílico y amina primaria.
3. La hidrólisis de un éster forma un ácido carboxílico y un alcohol.
4. La hidrólisis de un halógeno alcano forma un alcohol.

### **1.9 Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).**

Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado. La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar, test comerciales o mediante métodos cualitativos (disco difusión) que son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. (Taroco et al. 2006)

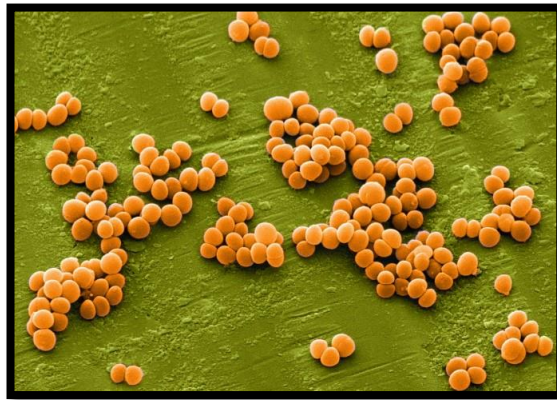
La gama de concentraciones de antibióticos utilizadas para la determinación de CIM es universalmente aceptada, deben estar duplicados los pasos de dilución arriba y hacia abajo desde 1 mg/L como sea necesario. (Andrews, J. 2006)

### **1.10 Enfermedades Infecciosas.**

Las enfermedades son un estado patológico, que surge como consecuencia de una agresión de patógenos al organismo humano (Antoni, S. 2005). Con el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos, se pensó que las enfermedades infecciosas serían eliminadas rápidamente y quedarían sólo con interés histórico en el campo de la medicina. No sucedió así; por el contrario, hoy a este tipo de patología se le dedica gran atención. Después de la Segunda Guerra Mundial se desarrollaron nuevas drogas antimicrobianas mucho más potentes y seguras (Sanchez et al. 2012). Los agentes patógenos pueden ser reunidos, por sus características comunes y/o especiales en grupos y los mismos interactúan con el sujeto de diversas maneras. (Antoni, S. 2005)

### 1.10.1 Bacterias Gram positivas.

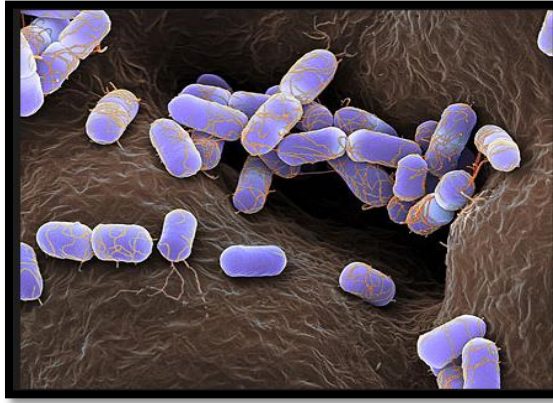
***Staphylococcus aureus***: Es un microorganismo grampositivo que se dispone en cocos individuales, con fuerte tendencia a agruparse en racimos (**Fig 5**), con un diámetro de 0.7-1.2  $\mu\text{m}$ . Patógeno humano importante que coloniza y afecta tanto a personas con disminución de sus defensas como a pacientes sanos. Dicho organismo puede contaminar cualquier sitio sobre la piel, mucosas; atribuyéndole así infecciones de tejidos blandos, endocarditis, bacteriemia, síndrome de piel escaldada y shock toxico. (Mandell et al.1997)



**Figura 5:** *Staphylococcus aureus*  
**Fuente:** Parra, M. 2013

***Enterococcus faecalis***: Los enterococos son cocos gram positivos, que se encuentran aislados, de a pares, o formando cadenas cortas (**Fig 6**). Son parte de la flora normal endógena humana, y tienen poco potencial patogénico en el huésped normal. Sin embargo, en el anciano o en el paciente inmunocomprometido, estos organismos se vuelven patógenos oportunistas. Los enterococcus son responsables de enfermedades como endocarditis, bacteriemia primaria, infecciones de vías urinarias, infecciones abdominales y meningitis neonatal. (Walker, S. 1998)

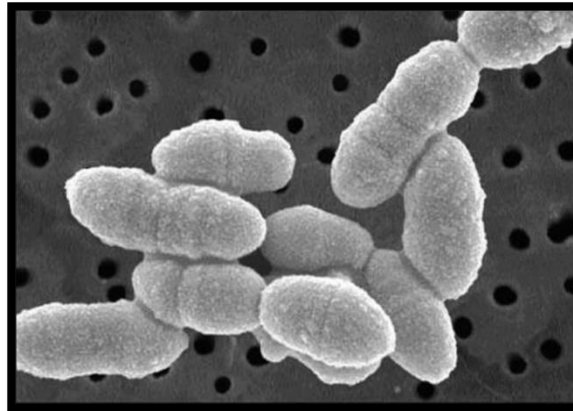




**Figura 6:** Enterococcus faecalis  
**Fuente:** Moghadas, L et al. 2012

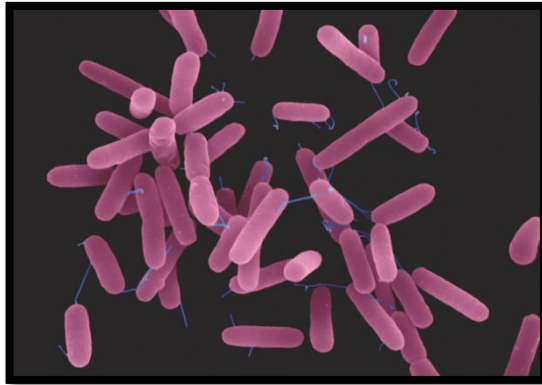
### **1.10.2. Bacterias Gram negativa.**

**Escherichia coli:** Bacilo gram negativo, anaerobio facultativo es la especie bacteriana más común de la micro biota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento, existen cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. (Rodríguez-Angeles, G. 2002) **Fig 7**



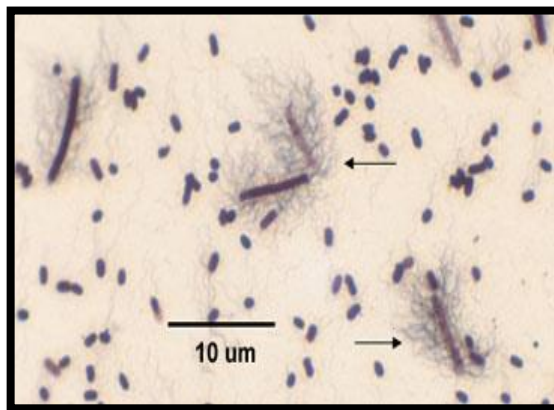
**Figura 7:** Escherichia coli  
**Fuente:** Oeggerli, M. 2011

**Pseudomonas aeruginosa:** Estas bacterias forman parte del amplio grupo de bacilos gram negativos aerobios estrictos (**Fig 8**), ocasionalmente pueden colonizar el tubo digestivo, la oro faringe o la piel del hombre y causar infecciones oportunistas como lesiones destructivas o septicemia y meningitis (Ureña, J. 1997)



**Figura 8:** Pseudomonas aeruginosa  
**Fuente:** Potera, C. 2012

**Proteus vulgaris:** Bacilos gram negativos rectos, móviles por flagelos periticos (**Fig. 9**); en el ser humano causan infecciones hospitalarias y extra hospitalarias de las vías urinarias, también se la identifica se le identifica en varios estados de septicemia, otitis, neumonías y como invasor secundario en heridas y quemaduras infectadas. La bacteriemia es común en pacientes debilitados. (Carmona et al .1997)



**Figura 9:** Proteus vulgaris  
**Fuente:** Kaiser, G. 2001

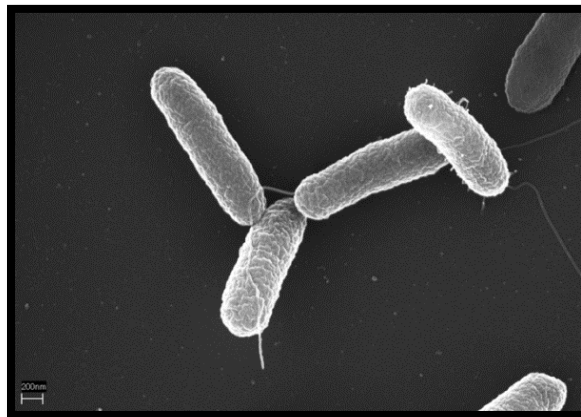
**Klebsiella pneumoniae:** Bacteria Gram negativa que puede causar una neumonía primaria adquirida en la comunidad, así como también la neumonía nosocomial (**Fig.10**). El paciente típico es el hombre de edad media con problemas médicos subyacentes como alcoholismo, enfermedad broncopulmonar crónica o diabetes mellitus. La formación de abscesos o necrosis

son las más probables infecciones por esta bacteria, así como también infección de heridas, vías urinarias. (Joklik et al. 1994)



**Figura 10:** *Klebsiella pneumoniae*  
**Fuente:** Joklik et al. 1994

***Salmonella typhimurium*:** Bacilos anaerobios facultativos causantes de patologías en el hombre y animal, nunca como microbiota normal. Se los asocia a enfermedades gastrointestinales, fiebre entérica, bacteremia, endocarditis, puede asociarse también a infecciones de los tejidos blandos, urogenitales, neumonías e infecciones del sistema nervioso. (Mandell et al. 1997) **Fig. 11**



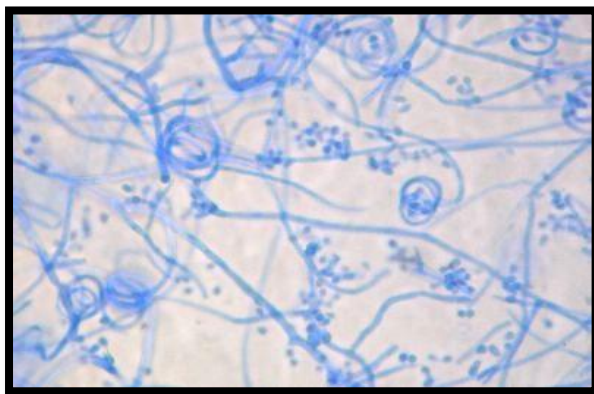
**Figura 11:** *Salmonella typhimurium*  
**Fuente:** Brinkman, V et al. 2005

### 1.10.3 Dermatofitos.

Los dermatofitos son hongos filamentosos que afectan a la epidermis y anexos cutáneos. La principal característica de ellos es que invaden las capas superficiales queratinizadas de la piel, pelos y uñas. Algunos atacan la queratina, otros son altamente especializados y, por tanto, restringen su patogenicidad a ciertos huéspedes y tejidos. Producen manifestaciones clínicas muy variables, desde síntomas leves, hasta lesiones supuradas e inflamatorias intensas, que reciben el nombre genérico de dermatofitosis o tiñas. (Caballería et al. 2001)

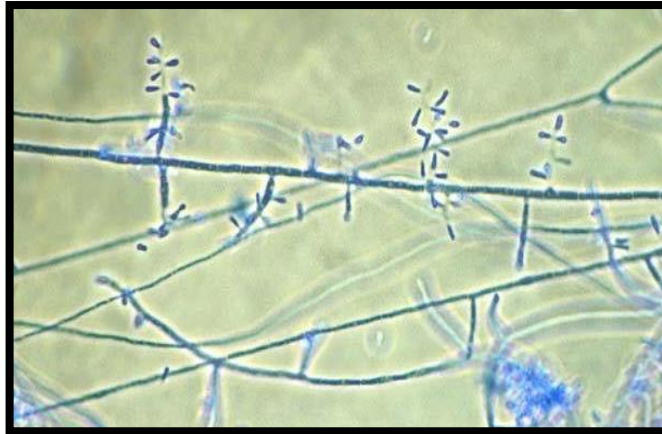
La taxonomía de los dermatofitos y su identificación rutinaria en el laboratorio de Micología clínica se basa fundamentalmente en criterios morfológicos, macro y microscópicos, relacionados con la fase de reproducción asexual (fase imperfecta, anamorfo, mitospórico) de estos hongos. Los géneros que agrupan a las especies productoras de dermatofitosis son: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. (Cabañes, F. 2001)

***Trichophytum rubrum***: Es un hongo filamentososo conocido como tineas o tiña que causa infecciones en la piel humana y uñas (**Fig. 12**), es reconocido como cosmopolita y es uno de los más frecuentemente encontrados dermatofitos (Ferreira-Nozawa, M. et al. 2003); *T. rubrum* tiene algunas características clave que contribuye a que sea el agente etiológico más común de dermatofitosis, teniendo propiedades como la producción de estructuras de resistencia a enzimas proteolíticas, así como compuestos que inhiben la respuesta inmune del huésped y su capacidad para desarrollar mecanismos de resistencia a los anti fúngicos.



**Figura 12:** *Trichophytum rubrum*  
**Fuente:** Ellis, D. 2003

***Trichophyton mentagrophytes***: Reconocible por la forma espiral que podría tomar las microconidios y forma de lágrima que son como racimos de uvas; a veces aparecen macroconidios en forma de cigarro (**Fig. 13**). Es una de las causas del pie de atleta, onicomicosis y la tiña (tinea corporis). También hay una infección del cabello (tinea capitis, celsi kerion, tiña de la barba) Tienen una marcada afinidad por la queratina, atacando a la piel, el cabello y uñas. (Oyeka, C. 2000)



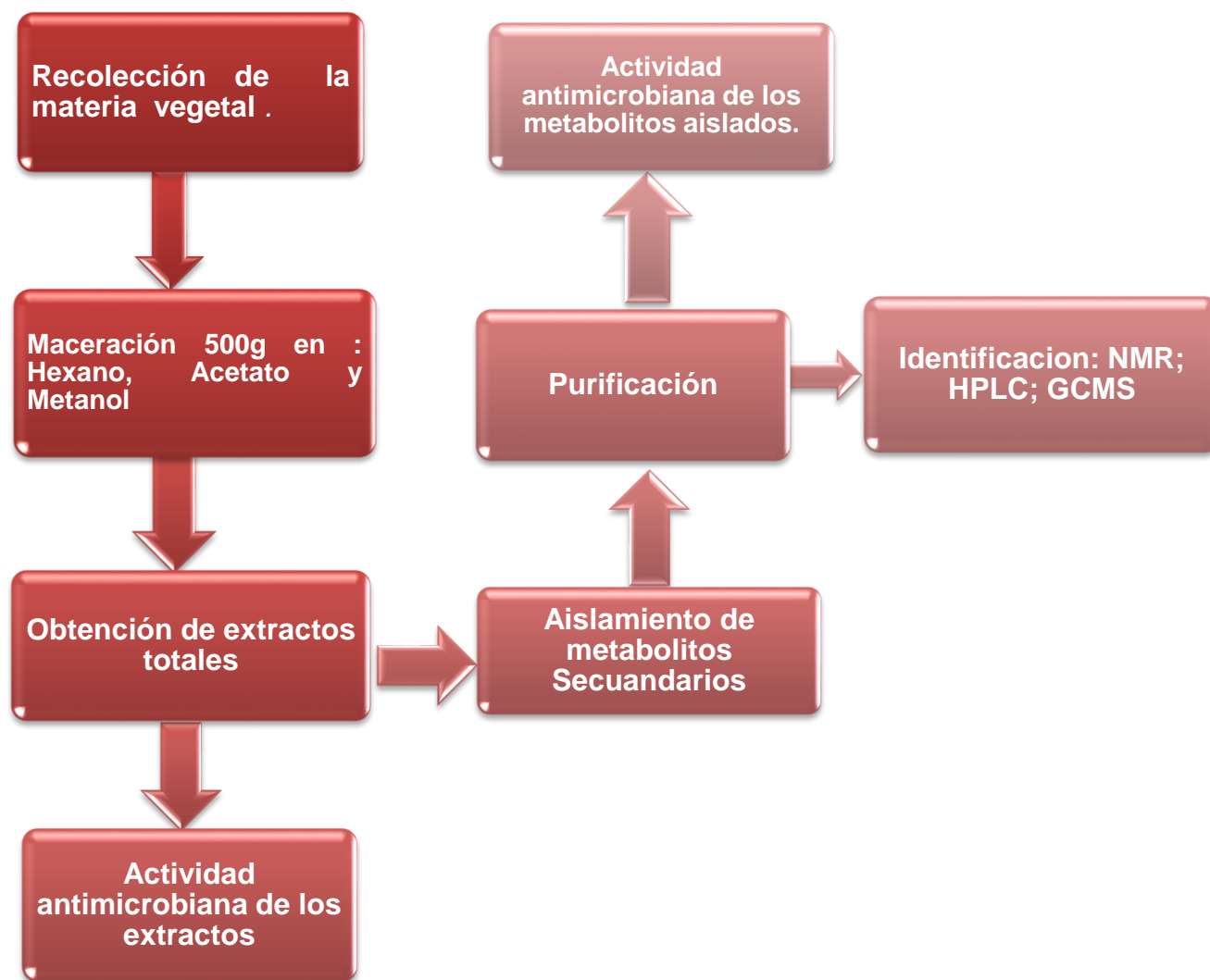
**Figura 13:** *Trichophyton mentagrophytes*

**Fuente:** Lavrijsen, A. et al. 2004

**CAPITULO II**  
**MATERIALES Y METODOS**

## 2.1. Esquema metodológico.

Para la presente investigación se realizó la siguiente metodología: **Fig. 14**



**Figura 14:** Esquema del desarrollo de la investigación  
**Fuente:** La autora, 2015.

## **2.2 Recolección y selección del material vegetal.**

Se colectaron las partes aéreas de *Hedyosmun strigosum* con flores femeninas en estado de fructificación en el Bosque “Washapampa” en el cantón Saraguro, mes de Diciembre del 2012. El material vegetal fue identificado por el curador Bolivar Merino y depositado en el herbario de la UTPL.

El material colectado fue llevado al laboratorio de Ingeniería de Procesos del Departamento de Química para continuar la selección de las hojas para su posterior maceración, se eliminan impurezas, partes deterioradas con el fin de obtener material vegetal de mejor calidad. Posterior a esto se realizó una deshidratación a temperatura de 34° C durante 5 días.

## **2.3 Obtención de extractos totales.**

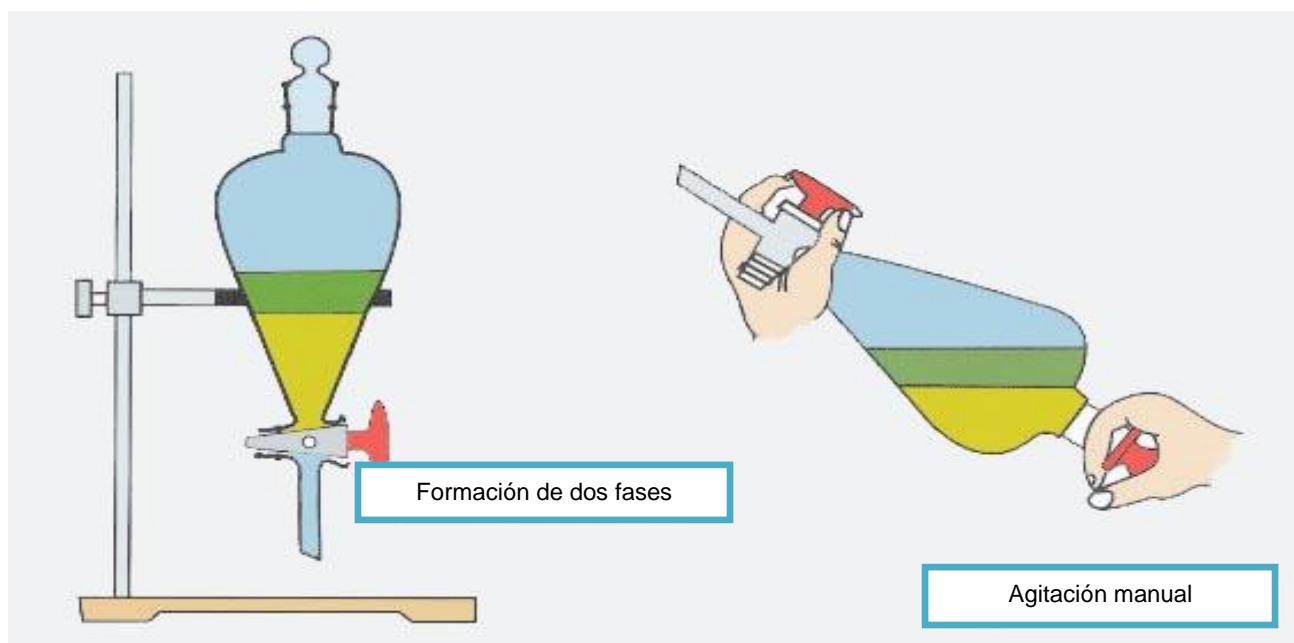
A partir de 500 g de muestra seca se procedió a macerar con disolventes de polaridad creciente tales como: Hexano, Acetato de Etilo y Metanol en un periodo de 24 horas, realizando este procedimiento por tres veces con cada disolvente. Luego de esto se filtró al vacío cada extracción y mediante rota evaporación a presión reducida 50 mbar y a una temperatura de 30° C se obtuvieron los extractos totales.

Una vez obtenidos los tres extractos en Hexano, AcOEt y MeOH, se realizaron CCF de cada extracto a distintas polaridades, usando placas de sílica gel 60 F254, con la finalidad de determinar cuál de los tres presentaba mayor riqueza y mejor separación de los compuestos.

## **2.4 Desclorofilación de extractos totales.**

Con el fin de eliminar la mayor cantidad de clorofilas, se procedió a desclorofilar los extractos de Hexano y Acetato de Etilo, la cual realizamos de la siguiente manera: Se pesó 5gr de muestra, se diluyó en una mezcla de MeOH-H<sub>2</sub>O en una proporción 9:1, luego colocamos en un embudo de decantación añadiendo a esto Hexano en proporción 1:1 y agitamos. Posterior a esto dejamos reposar quince minutos y observamos la formación de dos fases, en la primera fase obtenemos la mezcla (MeOH-H<sub>2</sub>O) y en la siguiente fase la hexanica, el proceso se realizó dos veces con el fin de eliminar todas las clorofilas de la muestra. Al final concentramos el extracto desclorofilado (MeOH-H<sub>2</sub>O) (**Fig. 15**)





**Figura 15:** Desclorofilación de extractos totales  
**Fuente:** La autora, 2015.

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

Para el fraccionamiento en cromatografía en columna se tomó 1.0 g de extracto desclorofilado de acetato de etilo, y se sembró en Silica Gel (Merck 0.0015-0040mm) relación 1:100. Se eluyó con disolventes de polaridad creciente empezando con una relación 9:1 Hexano:AcOEt hasta llegar al 100% de AcOEt.

### 2.5.1 Cromatografía en capa fina.

Se realizó ensayos en cromatografía de capa fina (CCF) a todas las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica; se utilizó placas de Silica gel 60 F<sub>254</sub> (fase directa) y para la fase móvil se usaron disolventes Hex-AcOEt en relación 9:1, 7:3 y 6:4 (v/v). Con la finalidad de observar la separación de los compuestos, se reveló la placa cromatográfica con ácido sulfúrico al 5% y vainillina, finalmente se visualizó en una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365 nm; así a partir de la CCF procedemos a unir las fracciones que presentaban un R<sub>f</sub> semejante y color similar.

### **2.5.2 Purificación de la fracción JZ 004/10.**

Para purificar la fracción JZ 04/10 (391,6 mg) realizamos una columna cromatografía con 80 g de Silica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) en relación 1:50, utilizando disolventes de polaridad creciente empezando con Hex – AcOEt en relación 9:1 hasta 7:3. Una vez recolectadas las 10 fracciones se procedió a realizar ensayos de cromatografía en capa fina (CCF) con el fin de visualizar los compuestos. Posteriormente se realizó una hidrólisis de la fracción 01/02.

### **2.5.3 Hidrólisis.**

Diluimos con etanol la fracción que contiene la molécula de interés (01/02) y mezclamos con NaOH 1M, se dejó agitar por 30 minutos a una temperatura de 80° C. Posterior a esto agregamos éter etílico a la solución total y realizamos tres lavados, observamos la formación de dos fases, en la parte etérea se recogen los alcoholes y a la solución restante se le agrega H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% hasta obtener un pH ácido (0-2) , a dicha solución acidificada le agregamos éter etílico y realizamos tres lavados , obteniendo así el ácido.

A las soluciones de ácidos y alcoholes se les agrego sulfato de sodio anhidro, por dos horas, con el fin de eliminar residuos de agua.

### **2.5.4 Caracterización de los alcoholes.**

La caracterización de los alcoholes se realizó en un Cromatografo de Gases Acoplado a Espectroscopia de Masas, usando una columna DB- 5 MS de 30 mm x 0.25 mm, espesor 0.25 µm (Agilent 122-5532). (Tabla 2-3)

### **2.5.5 Índice de Kovats.**

El cálculo de los índices de Kovats se aplica a los compuestos volátiles presentes en numerosos extractos (d'Acampora, B. 2008). Para un soluto dado este índice puede deducirse del cromatograma resultante tras analizar una mezcla del soluto y de al menos dos alcanos de cadena lineal que tengan unos tiempos de retención tales, que el del soluto considerado quede

entre los mismos. Por tanto los alcanos son los patrones en los que se basa la escala de índices de retención, y se aplica la siguiente relación:

$$IK = 100N + 100 * \frac{(tRx - tRn)}{(tRN - tRn)}$$

**Dónde:**

**IK:** Índice de retención Kovats o índice de Kovats

**n:** Numero de atomos de carbono en el n-alcano

**t<sub>RX</sub>:** Tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n-alcanos

**t<sub>Rn</sub>:** Tiempo de retención de n-alcano que eluye antes del compuesto analizado

**t<sub>RN</sub>:** Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto analizado

Los compuestos obtenidos se identificaron por comparación en base a sus índices de retención y los espectros de masas encontrados en literatura (Adams, 2009), los cuales podemos encontrar en la base de datos (NIST 1998)

### **2.5.6 Caracterización del ácido.**

Para la determinación del ácido se realizó RMN 400 MHz para <sup>1</sup>H, utilizando como disolvente DMSO deuterado.

## **2.6 Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto de Hexano.**

El extracto de hexano desclorofilado (1g) fue sometido a cromatografía en con Silica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) en relación 1:100. Se eluyó con disolventes de polaridad creciente iniciando con una mezcla de Hex-AcOEt en relación 9:1, hasta llegar 100% AcOEt.

## **2.7 Cromatografía de capa fina.**

Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (CCF), para ello se utilizó placas de Silica gel 60 F<sub>254</sub> (fase directa). Los disolventes utilizados para la fase móvil fueron Hex-AcOEt en relaciones 9:1, 7:3 y 1:1 (v/v). Las TLC fueron visualizadas mediante una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365 nm para luego ser reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina, posterior a esto se unieron las fracciones de igual R<sub>f</sub>.

## **2.8 Purificación de la fracción JZH 03.**

Para purificar la fracción JZH 03 a partir de 15 mg se realizó una columna cromatografica con Silica Gel de fase inversa Rp18 (**Fig. 16**) usando polaridad isocrática MeOH: H<sub>2</sub>O en relación 9:1, la fracción JZH 03/1 presento la formación de cristales.



**Figura 16:** Columna Cromatográfica  
**Fuente:** La autora, 2015

### ***2.8.1 Elucidación de la fracción JZH 03/1.***

La elucidación de la fracción JZH 003/1 se realizó mediante análisis de NMR 400 MHz para  $^1\text{H}$  en un equipo Varian N<sup>o</sup> de serie 21953, usando como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

### **2.9 Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).**

Para obtener el peso molecular de los compuestos, se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inerte, dotado con un sistema de operación de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, que cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. Las características de la columna capilar utilizada se detallan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Características de la columna capilar utilizada

Fracción	Columna	Temperatura (°C)	Película (um)	Diámetro Interno (mm)	Longitud (m)
JZ 01/02	DB-5MS	350	0,25	0,25	325

Fuente: La autora, 2015.

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras para su posterior análisis mediante CG-EM se detallan en la **Tabla 3**:

**Tabla 3:** Método de análisis de la columna DB-5MS

<b>Columna</b>	<p><b>Columna capilar :</b> DB- 5MS Modelo Agilent 122-5532 0,25 mm ; 30 m; 0,25 µm</p> <p><b>Temperatura Maxima:</b> 350 ° C</p> <p><b>Flujo:</b> Constante</p> <p><b>Flujo Inicial:</b> 1.0 ml/min</p> <p><b>Presion Inicial :</b> 52,7 KPa</p>
<b>Inyector</b>	<p><b>Modo:</b> Split</p> <p><b>Radio de Particion:</b> 50:1</p> <p><b>Temperatura inicial:</b> 250° C</p> <p><b>Presion Inicial:</b> 44.8 Kpa</p> <p><b>Gas de Arrastre:</b> Helio</p>
<b>Horno</b>	<p><b>Espectrometro de masas</b></p> <p><b>Temperatura de la fuente:</b> 230°C</p> <p><b>Temperatura del Cuadropolo:</b> 200°C</p>
<b>Detector</b>	<p><b>Temperatura Inicial:</b> 60°</p> <p><b>Temperatura Final:</b> 270°C</p> <p><b>Gradiente de Temperatura:</b> 10°C /min</p>

Fuente: La autora, 2015

## 2.10 Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante el método de micro dilución en caldo

### 2.10.1 Microorganismos de Prueba.

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

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

### 2.10.2 Preparación de las muestras.

Se realizó una dilución de 20 mg de los extractos desclorofilados de AcOEt, Hexano, así mismo del extracto de MeOH y de las fracciones aisladas, en 500 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se la realizó tanto para CMI antibacteriana como antifúngica.

### 2.10.3 Preparación del cultivo overnight.

Los microorganismos utilizados se encuentran en reserva criogénica a -80°C. Los medios de cultivo y las condiciones de incubación para cada microorganismo se detallan en la **Tabla 4** a continuación:

**Tabla 4:** Medios de cultivo y condiciones de incubación

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>MEDIOS DE CULTIVO</u>	<u>CONDICIONES DE INCUBACION</u>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Tripticasa Soya	
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Tripticasa Soya	
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Muller Hinton	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusion Cerebro Corazon	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Tripticasa Soya	

Fuente: La autora, 2015.

Una vez preparados los medios se los esterilizó y se procedió a realizar el inóculo de cada bacteria.

#### **2.10.4 Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias.**

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

#### **2.10.5 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 14µL en 7 mL de Caldo Sabouroud; posteriormente se tomaron 100µL de ésta dilución los cuales se utilizaron para completar el volumen final de la placa de cultivo (200µL), ajustando a la población fúngica a 5x10<sup>4</sup> esporas/mL. (Tabla 5)



**Tabla 5:** Medios de cultivo para hongos

Hongos Esporulados	Medio de Cultivo
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caldo Sabouraud
<i>Trichophyton rubrum</i>	

Fuente: La autora, 2015.

### 2.10.6 Concentración mínima inhibitoria.

Para la realización de las pruebas se utilizaron placas estériles de 96 pocillos, colocando la dilución de 180µL de caldo Mueller Hinton en la primera fila de pocillos, excepto en la columna 10 y 100µL a los pocillos restantes; posteriormente se adiciona 20µL del extracto diluido (20mg/mL) en estudio, en los pocillos de la fila A y mezclamos. Seguidamente realizamos diluciones seriadas tomando 100µL de los pocillos de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B, continuando con ésta dilución hasta llegar a los pocillos de la fila H y deseamos los 100µL sobrantes.

Se realiza las mismas diluciones en los pocillos de control de esterilidad (columna 10) (180µL de caldo + 20µL del extracto diluido), control negativo (columna 11) (180µL de caldo + 20µL de DMSO) y control positivo (columna 12) (180µL de caldo + 20µL de Gentamicina para *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*; y 20µL de Ampicilina para *Salmonella tiphymurium* y *Enterococcus faecalis* a 1000ppm).

Preparadas las placas se inoculan con 100µL de la suspensión del inóculo completando a su volumen final de 200µL, excepto los controles de esterilidad que se completan con 100µL de Caldo Mueller Hinton, ajustando así a la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL, y la concentración final del extracto de 1000 a 8µg/mL.

Finalmente se sellan las placas y se incuban a 37°C por un periodo de tiempo 18-24 horas.

### **2.10.7 Concentración mínima inhibitoria anti fúngico.**

Se realizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas que la CMI antibacteriana, modificando algunos parámetros tales como: el medio de cultivo que fue Caldo Sabouraud, la concentración final del inóculo es de  $5 \times 10^4$  esporas/mL, el control positivo donde se empleó Itraconazol de 1mg/mL. Se incuban las placas a 28°C por 72-96 horas.

**CAPITULO III**  
**RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### 3.1. Extractos obtenidos de la especie *Hedyosmun strigosum*.

En la **Tabla 6** se describe el peso y rendimiento de los extractos de Hexano, AcOEt y MeOH, a partir de 500g de muestra vegetal seca.

**Tabla 6:** Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de *H. strigosum*

Extracto	Peso Inicial de planta seca (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
<b>Extracto total de Hexano</b>	500	10.33	2.06
<b>Extracto total de AcOEt</b>		8.45	1.69
<b>Extracto total de MeOH</b>		39.12	7.82

Fuente: La autora, 2015.

Los rendimientos obtenidos en *H. strigosum* con flores masculinas (Solano de la Sala, E. 2015) no varían significativamente con los que se obtuvieron en el presente trabajo, considerando que es la misma especie con flores de distinto género.

### 3.2 Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo.

Con 1g de muestra se fracciono el extracto desclorofilado de AcOEt, se obtuvieron 72 fracciones de 100 ml cada una, las cuales luego de analizar las características presentadas mediante cromatografía de capa fina y Rf se unieron , resultando así 10 fracciones. **(Tabla 7)**

**Tabla 7:** Unión de fracciones del extracto total de Acetato de Etilo

Fracciones	Muestra	Mezcla de disolventes	Polaridad	Peso (mg)
JZ 001/10	1-10	Hex-AcOEt	9:1	15
JZ 002/10	11-12	Hex-AcOEt	8:2	32
JZ 003/10	13-16	Hex-AcOEt	8:2	9
<b>JZ 004/10</b>	<b>17-20</b>	<b>Hex-AcOEt</b>	<b>8:2</b>	<b>391</b>
JZ 005/10	21-23	Hex-AcOEt	7:3	24
JZ 006/10	24-27	Hex-AcOEt	7:3	42
JZ 007/10	28-29	Hex-AcOEt	7:3	22
JZ 008/10	30-32	Hex-AcOEt	5:5	37
JZ 009/10	33-35	Hex-AcOEt	5:5	123
JZ 0010/10	36-40	Hex-AcOEt	4:6	59

Fuente: La autora, 2015.

#### 3.2.1 Fracción JZ 004/10.

A partir de 391,6 mg de la fracción JZ 004/10 realizamos una columna cromatografica con 80 g de Silica Gel fase directa en relación 1:50, utilizando disolventes de polaridad creciente empezando con Hex – AcOEt en relación 9:1 hasta 7:3. **(Fig.17)**



**Figura 17:** CCF fracciones 17- 20 (JZ 004/10)

**Fuente:** La autora, 2015

Se obtuvieron 93 fracciones de 5ml cada una y basándonos en CCF procedimos a unir las, como resultado conseguimos 6 fracciones; tomamos la fracción JZ 01/02 y realizamos un NMR 400 MHz  $^1\text{H}$  (**ver Anexo 1**) que nos indica la presencia de una mezcla de compuestos por lo que se realizó una hidrólisis de la misma.

### **3.2.1.1 Hidrolisis Fracción JZ 01/02.**

Con 58 mg de muestra de la fracción JZ 01/02 se procedió a realizar una hidrólisis, consiguiendo así 2 muestras las cuales se etiquetaron como JZ 1. AC y JZ 1. AH siendo el ácido y el alcohol respectivamente, elaboramos cromatografía de capa fina usando disolventes como Hex-AcOEt en proporción 7:3 revelando el ácido. (**Fig. 18**)



**Figura 18:** Cromatografía en capa fina de JZ 1. AC  
**Fuente:** La autora, 2015

### 3.2.1.1.1 Muestra JZ 1. AH.

Se determinó mediante CG-EM un compuesto de origen terpénico en la columna DB- 5MS, el cual fue identificado mediante el índice de kovats y se compararon con los espectros de masas reportados en literatura. (Adams, R. 2009)

A continuación en la **tabla 8** se indican el tiempo de retención del compuesto, así mismo el índice de kovats calculado y el obtenido de literatura.

**Tabla 8:** Índice de kovats del compuesto identificado

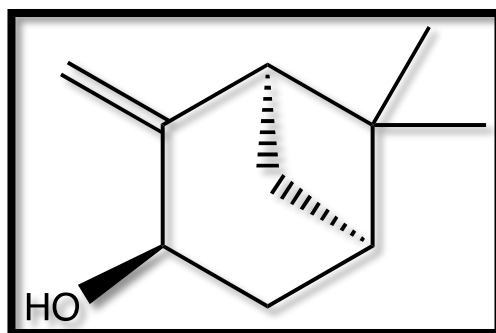
Compuesto	Tiempo de Retención	IKE	IKR
Cis-Pinocarveol	10.86	1184	1184

**IKR:** Índice de Kovats referencial (Adams, R. 2009)

**IKE:** Índice de Kovats experimental

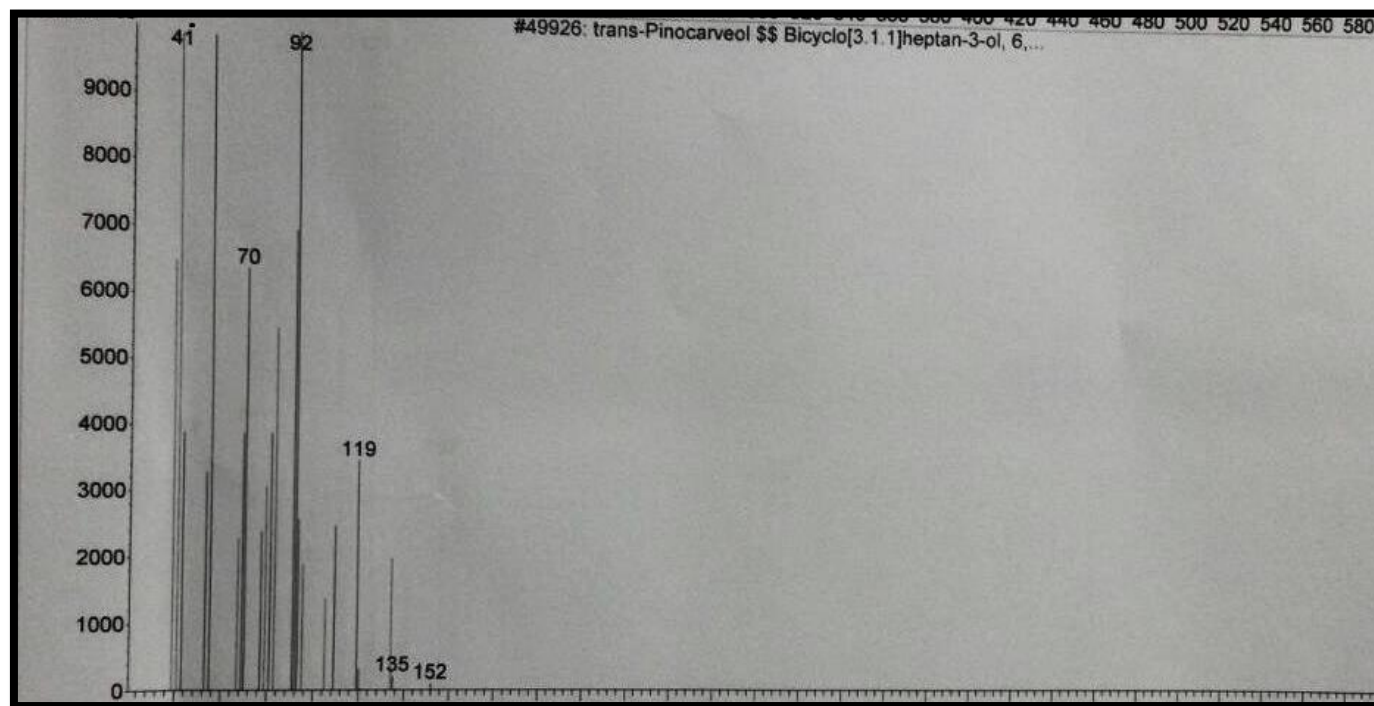
**Fuente:** La autora, 2015

En la **Fig. 19** se muestra la estructura química del cis-Pinocarveol



**Figura 19:** Cis- Pinocarveol  
**Fuente:** La autora, 2015

En la **Fig. 20** observamos el espectro CG-EM del compuesto cis-Pinocarveol



**Figura 20:** Espectro GC-EM del compuesto cis-Pinocarveol  
**Fuente:** La autora, 2015



### 3.2.1.1.2 Muestra JZ 1.AC.

Se realizó  $^1\text{H}$  NMR con cloroformo deuterado y se obtuvo lo siguiente: 6.35 (d,  $J=15.9\text{Hz}$ , 1H,  $\text{ArCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$ ), 6.90 (d,  $J= 7.2\text{Hz}$ , 2H, ArH ortho a OH), 7.56 (d,  $J= 7.2 \text{ Hz}$ , 2H, ArH meta a OH), 7.59 (d,  $J=15.9 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{ArCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$ ). (**ver Anexo 2**)

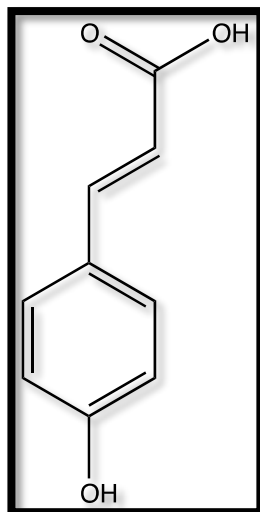
Los resultados obtenidos se compararon en  $^1\text{H}$  NMR con los reportados en (Morocho, S. 2014) (**tabla 9**), así como también (Solano de la Sala, E. 2015).

**Tabla 9:** Comparación de los datos obtenidos de RMN  $^1\text{H}$  del ácido 4-hidroxicinámico.

Ácido 4-hidroxicinámico - <i>Hedyosmum strigosum</i>	Ácido 4-hidroxicinámico - Morocho, S. 2014
6.35 (d, $J= 15.9\text{Hz}$ , 1H)	6.33 (d, $J=15.9\text{Hz}$ , 1H)
6.90 (d, $J= 7.2\text{Hz}$ , 2H)	6.90 (d, $J= 7.2\text{Hz}$ , 2H)
7.56 (d, $J= 7.2 \text{ Hz}$ , 2H)	7.54 (d, $J= 7.2 \text{ Hz}$ , 2H)
7.59 (d, $J=15.9 \text{ Hz}$ , 1H)	7.61 (d, $J=15.9 \text{ Hz}$ , 1H)

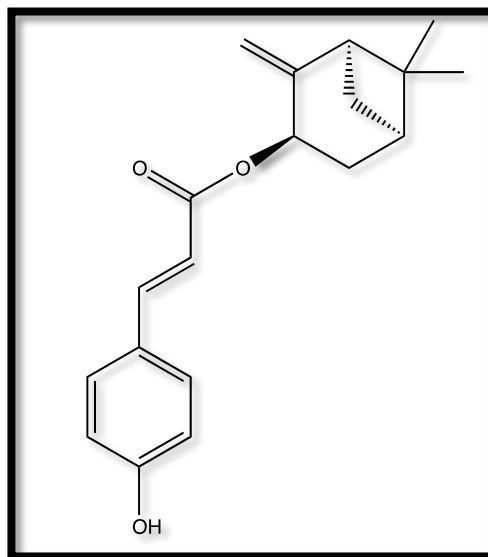
**Fuente:** La autora, 2015

A continuación en la **fig. 21** se observa la estructura del ácido 4-hidroxicinámico.



**Figura 21:** Ácido 4-Hidroxicinámico  
**Fuente:** La autora, 2015

Como resultado final de la hidrólisis se identificó un ácido (4-Hidroxicinámico) unido a un alcohol (cis-pinocarveol), con nombre IUPAC (1R, 2R, 5R)- 6,6- dimethyl-2-methylidenebicyclo [3.1.1]heptan -3- y (2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate (**Fig. 22**)



**Figura 22:** Estructura química de (1R, 2R, 5R)- 6,6- dimethyl-2-methylidenebicyclo [3.1.1]heptan -3- y (2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate  
**Fuente:** La autora, 2015

Según estudios reportados en *H. scabrum* se identificó la presencia del ácido 4-Hidroxicinámico y el alcohol cis-pinocarveol los cuales se obtuvieron mediante hidrólisis. (Morochó, S. 2014). El tipo de estructura reproductiva en una planta es un factor importante, lo que podría influir en la producción y/o acumulación de metabolitos. En las plantas dioicas, los individuos femeninos asignan más energía y nutrientes para la reproducción de plantas masculinas. Por lo tanto, las plantas femeninas tienen su crecimiento reducido, el estado nutricional bajo, y son menos atacados por insectos herbívoros que las plantas masculinas. (Lago, E. et al. 2008)

Estas diferencias fisiológicas también podrían afectar el metabolismo secundario, como la producción de compuestos volátiles; esto podría explicar porque en *H. strigosum* con flores masculinas se reporta la presencia del ácido 4-Hidroxicinámico, el alcohol cis-pinocarveol y el broneol (Solano de la Sala, E.2015), el cual no lo encontramos en el presente estudio de la misma especie con flores femeninas.

### 3.3 Fraccionamiento del extracto de Hexano.

Al fraccionar el extracto de hexano se obtuvieron 92 fracciones y se procedió a unir de acuerdo a las características presentadas en cromatografía de capa fina y Rf, dando como resultado 18 fracciones. (Tabla 10)

**Tabla 10:** Unión de fracciones del extracto total de hexano

Fracciones	Muestra	Mezcla de solventes	Polaridad	Peso (mg)
JZH 01	1-2	Hex-AcOEt	9:1	3
JZH 02	3	Hex-AcOEt	9:1	13
JZH 03	4-5	Hex-AcOEt	9:1	15
JZH 04	6-8	Hex-AcOEt	9:1	17
JZH 05	9-10	Hex-AcOEt	8:2	6
JZH 06	11-13	Hex-AcOEt	8:2	36
JZH 07	14-17	Hex-AcOEt	8:2	522
JZH 08	18-21	Hex-AcOEt	7:3	42
JZH 09	22-27	Hex-AcOEt	7:3	23
JZH 10	28-34	Hex-AcOEt	6:4	32
JZH 11	35-37	Hex-AcOEt	6:4	28
JZH 12	38-41	Hex-AcOEt	5:4	47
JZH 13	42-53	Hex-AcOEt	5:5	101
JZH 14	54-60	Hex-AcOEt	4:6	19
JZH 15	61-68	Hex-AcOEt	3:7	21
JZH 16	69-72	Hex-AcOEt	2:8	8
JZH 17	73-85	Hex-AcOEt	2:8	16
JZH 18	86-92	AcOEt	100	11

Fuente: La autora, 2015

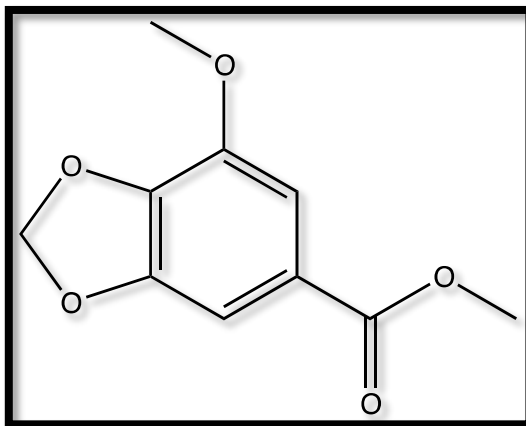
### 3.3.1 Fracción JZH 03.

A partir de 15 mg de la fracción JZH 03 realizamos una columna cromatográfica con 10 g de Silica Gel de fase inversa Rp18 usando polaridad isocrática MeOH: H<sub>2</sub>O en relación 9:1. Se obtuvieron 25 fracciones y basándonos en CCF procedimos a unir las, consiguiendo 4 fracciones; De estas la fracción JZH 03/1 con 3mg presento cristales blancos, se le realizo cromatografía de capa fina (**Fig.23**) en TLC inversa proporción 9:1 MeOH-H<sub>2</sub>O para revelar un color morado.



**Figura 23:** CCF de la fracción JZ 03/1  
**Fuente:** La autora, 2015

Al analizar la muestra mediante <sup>1</sup>H RNM el compuesto fue identificado como un monoterpeno de formula molecular C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> con masa molecular de 210g/mol. En la **fig.24** se muestra la estructura química de la molécula methyl-3,4-methylenedioxy-5 methoxybenzoate.



**Figura 24:** Estructura química de methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate

**Fuente:** La autora, 2015

Las señales del compuesto son:

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCL<sub>3</sub>):** 3.87 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 6.0 (s, 2H), 7.21 (d, 1H, J=1.5 Hz), 7.28(d,1H, J=1.5 Hz) **(ver Anexo 3)**

Los datos obtenidos en <sup>1</sup>H NMR fueron exactamente igual a los espectros de datos reportados en literatura, (Morocho, S. 2014) **(Tabla 11)**; así mismo los resultados obtenidos en *H. strigosum* de otras investigaciones corroboraron la presencia de la molécula methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate. (Solano de la Sala, E. 2015).

**Tabla 11:** Comparación de los datos obtenidos de RMN <sup>1</sup>H methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate

methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate– <i>Hedyosmum strigosum</i>	methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate - Morocho, S. 2014
3.87 (s, 3H)	3.89 (s, 3H)
3.94 (s, 3H)	3.94 (s, 3H)
6.0 (s, 2H)	6.06 (s, 2H)
7.21 (d, 1H, J=1.5 Hz),	7.21 (d, 1H, J=1.5 Hz)
7.28(d,1H, J=1.5 Hz)	7.33(d,1H, J=1.5 Hz)

**Fuente:** La Autora, 2015

### 3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana fue realizada por el método de microdilución en caldo a partir de los extractos Hex, AcOEt, MeOH y de las moléculas aisladas.

**Tabla 12:** Concentración mínima inhibitoria.

Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)				
Extracto/Fracc	Bacterias		Hongos	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
Hex.	62.5 µg/mL	62.5 µg/mL	-	-
AcOEt	125 µg/mL	125 µg/mL	500 µg/mL	-
MeOH	-	-	1000 µg/mL	-
JZ 01/02	15.62 µg/mL	15.62 µg/mL	-	-
JZH 03/1	-	-	-	-

Fuente: La autora, 2015

#### 3.4.1 Determinación de la actividad antifúngica.

Al analizar la actividad antifúngica del extracto de AcOEt este presentó actividad moderada con respecto a *T. mentagrophytes* con un valor de 500 µg/mL; por otro lado el extracto de MeOH no presentó actividad.

Investigaciones realizadas en el aceite esencial de *Hedyosmum brasiliense* muestran actividad antifúngica significativa contra hongos patógenos (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*) (Kirchner et al. 2010)

#### 3.4.2 Determinación de actividad antibacteriana.

La actividad antimicrobiana del extracto de hexano y acetato de etilo mostraron una actividad antibacteriana moderada con valores de 62.5 µg/mL y 125 µg/mL respectivamente contra

bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Así mismo la fracción JZ 01/02 presento la misma actividad con un valor de 15.62 µg/mL para ambos tipos de bacterias.

Estudios realizados en especie de *H. strigosum* (Solano de la Sala, E. 2015) y *H. brasiliense* (Kirchner et al. 2010) presentan actividad antibacteriana contra estas bacterias gram positivas por lo que los resultados obtenidos contrastan con la literatura reportada.

## CONCLUSIONES

- Del extracto de acetato de etilo se identificó IUPAC (1R, 2R, 5R)- 6,6- dimethyl-2-methylidenebicyclo [3.1.1]heptan -3- y (2E)-3-(-4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate.
- Del extracto de hexano se identificó un monoterpeno, con nombre IUPAC methyl-3,4-methylenedioxy-5-methoxybenzoate de formula molecular  $C_{10}H_{10}O_5$  y una masa molecular de 210g/mol.
- El extracto total de acetato de etilo presento actividad antifúngica moderada frente a *Trychophytum mentagrophytes* con 500  $\mu\text{g/mL}$ .
- Extractos totales de hexano y acetato de etilo presentaron actividad antibacteriana contra bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con una CMI de 62.5  $\mu\text{g/mL}$  y 125  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. La fracción JZ 01/02 presento actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con un CMI de 15.62  $\mu\text{g/mL}$ .



## BIBLIOGRAFÍA

1. Ábalos, A., Espuny, M., Bermúdez, R., Manresa, A. (2003). *Aplicación de la Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS) en la caracterización química de los polihidroxicanoatos de Pseudomona aeruginosa AT10. Revista Cubana de Química. Cuba.*
2. Acosta, M. (1992). *Vademécum de plantas medicinales de Ecuador. Quito, Ecuador. 243 p.*
3. Adams, R. (2009). *Identification de Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry.* Estados Unidos: Allured Books.
4. Andrade, M. (2011). *Las plantas Medicinales y sus saberes ancestrales, Revista En contexto, 2011. Guayaquil, Ecuador. p. 56-57.*
5. Avalos, A., Perrez-Urria, E. (2009). *Metabolitos Secundarios de las Plantas. Revista Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal, 2, 119-145*
6. Bermúdez, A., Oliviera-Miranda, M., Velásquez, D. (2005). *La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Revista Scielo. Caracas, Venezuela.*
7. Brinkmann, V. Planck, M. (2005). *Institute for infection biology, berlin, germany - a novel data-mining approach systematically links genes to traits. plos biology vol. 3/5/2005, e166 doi:10.1371/journal.pbio.0030166.*
8. Caballeria, A., Segarra, C., Bosque, M. (2001). *Microsporium canis: CARACTERÍSTICAS Y DIAGNÓSTICO. Unidad de Microbiología del Hospital Arnau de Vilanova, Valencia. Valencia, Espana.*
9. Cabañes, F. (2001). *Identificación de hongos dermatofitos. Revista Iberoamericana de Micología. España.*
10. Cao, C., Peng, Y., Shi, Q., Xiao, P. (2008). *Chemical Constituents and Bioactivities of Plants of Chloranthaceae . Beijing, China.*
11. Carmona, O., Gómez, M., Montes, T., Marcano, C., Marino, F. (1997). *Microbiología Médica de Divo. Caracas- Venezuela: McGRAM-HILL Interamericana Editores.*
12. d'Acampora, B., Bicchi, C., Dugo, P., Rubiolo, P., Dugo, G., Mondello, L. (2008). *Linear retention indices in gas chromatographic analysis. Flavour and Fragrance Journal. 23 (5):297-314*

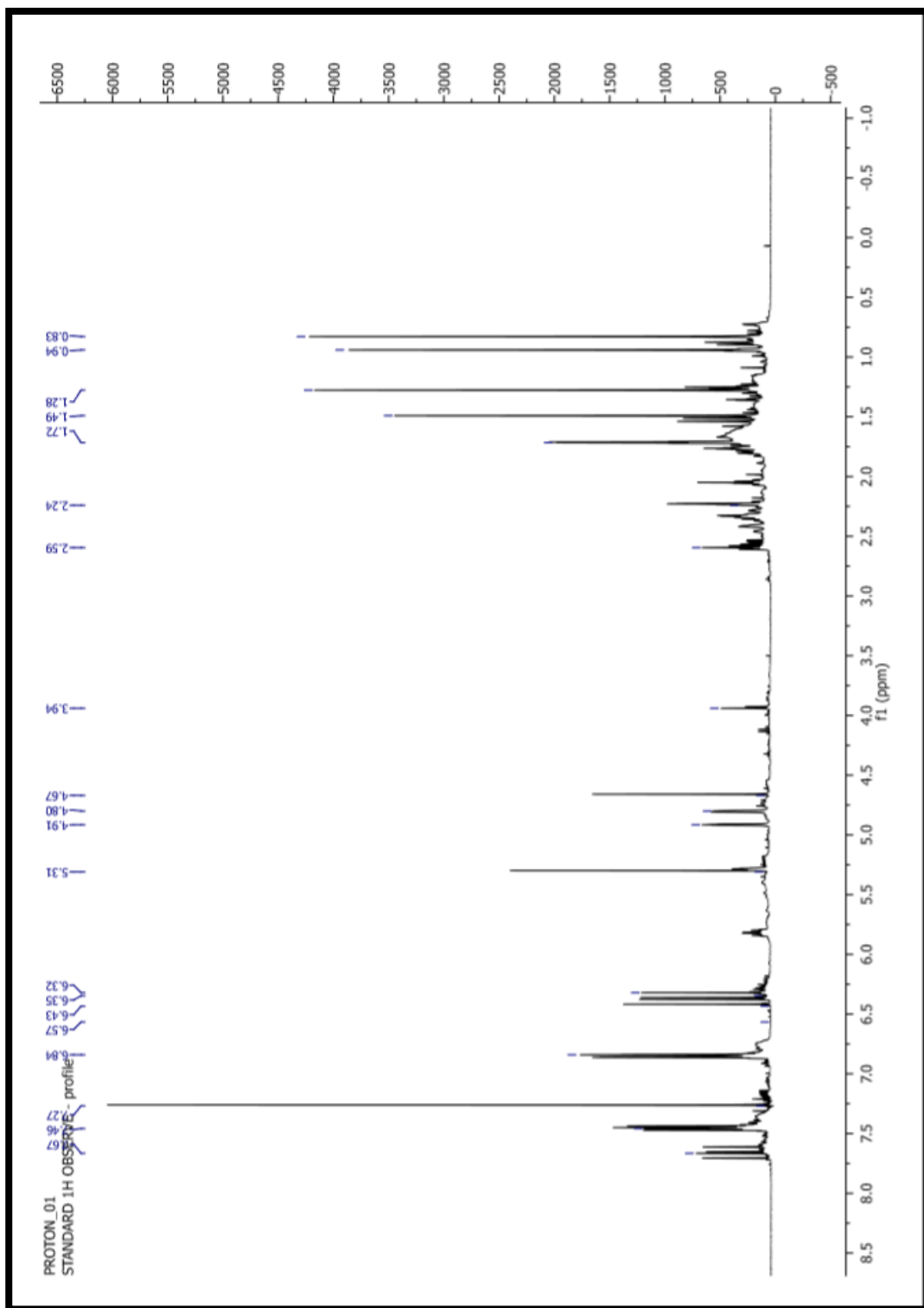
13. Ferreira-Nozawa, M., Nozawa, S., Martínez- Rossi, N., Rossi, A. (2003). *El dermatofito Trichophyton rubrum segrega una fosfatasa alcalina EDTA-sensible en medio-alto-fosfato. Sao Paulo- Brasil. Vol 34.*
  
14. Garcia, D. (2004). *Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y Forajes, 27. España.*
  
15. Grijalva, A. (2006). *Flora útil, Etnobotánica de Nicaragua. Managua- Nicaragua*
  
16. Gutierrez, M., Droget, M. (2002). *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. Cataluya, España.*
  
17. Hernández, J., Reyes, L., Villarreal, C. (2006). *Evaluación de la actividad antibacteriana (Staphylococcus aureus) y anti fúngica (Trichophyton mentagrophytes) del extracto diclorometano del pericarpio del fruto Sapindus saponaria. El Salvador.*
  
18. Joklik, W. Willet, H., Amos, B., Wilfert, C. (1994). *Zinsser Microbiología. Buenos Aires – Argentina: Editorial Médica Panamericana.*
  
19. Kirchner, K., Wisniewski, A., Cruz., Biavatti, M., Netz, D. (2010). *Chemical composition and antimicrobial activity of Hedyosmum brasiliense Miq., Chloranthaceae, essential oil. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 20(5): 692-699.*
  
20. Kvist, L., Moraes, M., (2006). *Plantas Psicoactivas. Botanica Economica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. Bolivia.*
  
21. Lavrijsen, A., Raaij-Helmer, E., Bergman, W., Brouwer, A., Douw, Krab. (2004). *Microscopie van directe preparaten voor de dermatologische praktijk. Leids Universitair Medisch Centrum.*
  
22. Lago, J., Romoff, P., Fávero, O., Souza, F., Soares, M., Baraldi, P., Correa, A. (2008). *Chemical composition of male and female Baccharis trimera (Less) DC. (Asteraceae) essential oils. Biochemical Systematics and Ecology, 36, 737-740.*
  
23. Martin, O. Miranda, A. (2001). *Cromatografía de gases/masas (GC/MS). Colombia*
  
24. Mandell, G., Bennett, J., Dolin, R. (1997). *Enfermedades Infecciosas: Principios y Prácticas. Madrid-España: Editorial Medica Panamericana.*
  
25. Moghadas, L., Shahmoradi, M., Narimani, T. (2012). *La actividad antimicrobiana de una nueva solución de irrigación endodontica basado en un estudio in vitro. Hipotesis Dent, 3, 142-146*

26. Morocho, S. (2014). *Valutazione Ecologica, Studio Fitochimico Ed Analisi Dell'Olio Essenziale Di Hesyomum Scabrum (Ruiz&Pav.) Solms (Chloranthaceae), Dalla Provincia Di Loja E Zamora-Ecuador.* (Tesis Doctoral). Universidad de Pavia, Italia.
27. Okumura, F., Barbosa, M., Gomes, E. (2001). *Identificacion de tinta natural utilizando cromatografía en papel.* *Revista Scielo*, 25. Sao Paulo - Brasil
28. Oriols, N. (2011). *Cromatografia en Capa Fina (TLC). Una herramienta útil para el Conservador.* *Revista de la Escuela Superior de Conservación.*
29. Oyeca, C. (2000). *Trichophyton mentagrophytes un hongo queratinófilos.* *Revista Iberoamericana de Mico biología. España.*
30. Parra, M. (2013). *Descubriendo el punto débil de la bacteria "Staphylococcus aureus" multirresistente.* *Revista Medcienca. España.*
31. Percec, V., Petercs, M., Sienkowska, M., Llies, M., Aqad, E., Smidrkal, J., Heiney, P. (2006). *Synthesis and Retrostructural Analysis of Libraries of AB<sub>3</sub> and Constitutional Isomeric AB<sub>2</sub> Phenylpropyl Ether-Based Supramolecular Dendrimers.* *Journal of the American Chemical Society*, 128, 3324-3334.
32. Rios, M., De la Cruz, R., Mora, A. (2008). *Conocimiento Tradicional y Plantas Utiles del Ecuador: Saberes y Prácticas.* Quito: Ediciones Abya-Yala.
33. Rodríguez-Angeles G. (2002). *Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli.* *Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México, D.F. vol. 44. pag 1 (13).*
34. Sepulveda, G., Porta, H., Rocha, M. (2003). *La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas.* *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355-366.
35. Srivastava, J., Lambert, J., Vietmeyer, N. (1996). *Medicinal Plants: An Expanding Role in Development.* Washington, DC. USA. 1-2 p.
36. Tene, V., Malagon, O., Vita, P., Vidari, G., Armijos, A., Zargoza, G., (2006). *An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchiipe.* *ELSEVIER, Journal of Ethnopharmacology.*
37. Ulloa, C. (2006). *Aromas y sabores andinos.* *Botanica Economica de los Andes centrales.*
38. Ureña, J. (1997). *Microbiología oral.* Mexico, DF: McGRAM-HILL Interamericana Editores.

## **ANEXOS**

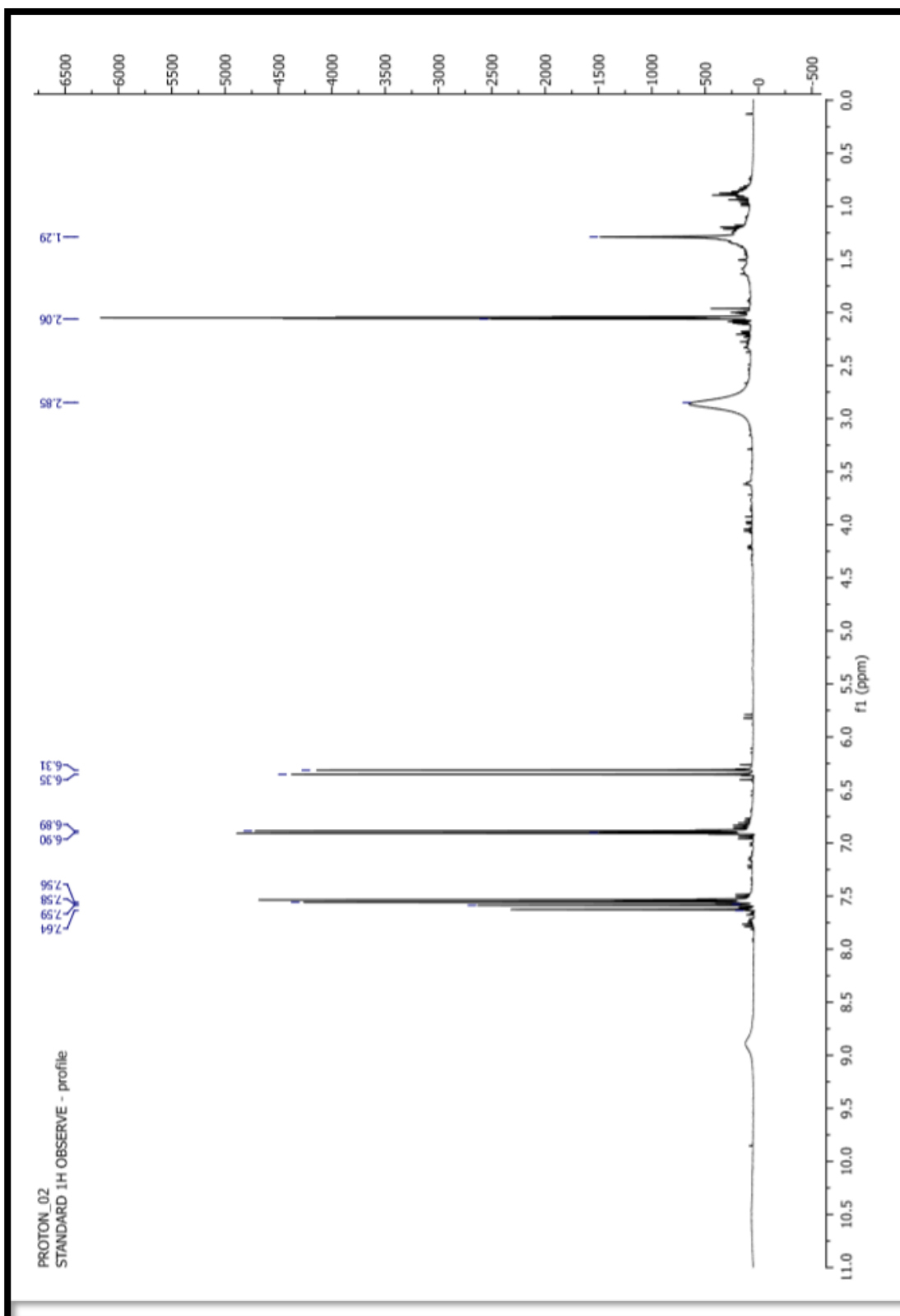
# Anexo 1: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción JZ 01/02

## Anexo 1. Espectro de $^1\text{H}$ (400 MHz, Acetona)



## Anexo 2: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Muestra JZ 1.AC

Anexo 2. Espectro de  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona)



### Anexo 3: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Fracción JZH 03/1

Anexo 3. Espectro de  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona)

