



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie de la familia Lycopodaceae: *Huperzia weberbaueri*, Loja – Ecuador.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Jara Paltín, Ángel Adrián

DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio

LOJA – ECUADOR

2016



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>

Febrero, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

PhD.

Chabaco Patricio Armijos Riofrío

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie de la familia Lycopodaceae: *Huperzia weberbaueri*, Loja – Ecuador” realizado por Jara Paltín Ángel Adrian, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2016

PhD. Chabaco Patricio Armijos Riofrío

C.I.: 1102430509

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Angel Adrian Jara Paltin, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie de la familia Lycopodaceae: *Huperzia weberbaueri*, Loja – Ecuador”, de la Titulación de Bioquímico y Farmacéutico, siendo PhD. Chabaco Patricio Armijos Riofrío, 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.

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”

Angel Adrian Jara Paltin
1103980965

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico primeramente a Dios que me ha dado las fuerzas y energías para superar las dificultades de mi vida. A mis padres, por su esfuerzo, sacrificio diario, por su apoyo incondicional y por ser el pilar fundamental de motivación que me ha permitido cumplir con mis metas.

A mis hermanos que me han brindado su cariño y valor y así poder levantarme día a día.

A todos mis amigos que con sus frases de aliento me han sabido dar el apoyo para culminar este trabajo

Angel Adrian Jara Paltin

AGRADECIMIENTO

A mis padres René y Julia que han sido mi inspiración que con su amor, perseverancia, esfuerzo y humildad, me han sabido guiar para seguir cada día adelante. A mis hermanos Paulo, Danny, Rommel y Oscar que han sido mi apoyo en mis caídas, y me han sabido levantar.

Al PhD Chabaco Armijos, por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta investigación, y brindarme y guía para la culminación de la misma, a todo el personal que labora en el Departamento de Química.

Angel Adrian Jara Paltín

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
CAPITULO I.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Antecedentes.	6
1.2. Metabolitos secundarios.....	6
1.2.1. Fenoles.....	7
1.2.1.1. Los flavonoides.	8
1.2.1.2. Los no favonoides.	8
1.3. Cromatografía.....	9
1.3.1. Principios básicos.....	9
1.3.2. Cromatografía de Adsorción.....	9
1.4. Resonancia Magnética Nuclear.	10
1.5. Hemicelulosa.....	10
1.5.1. Galactosa.....	11
CAPITULO II.....	12

METODOLOGÍA.....	12
2.1. Esquema de Metodología	13
2.2. Recolección de la muestra.....	13
2.3. Tratamiento del material vegetal.....	13
2.4. Obtención de los extractos.....	14
2.5. Extracto Hexánico.....	15
2.5.1. Desclorofilación del extracto Hexánico.....	15
2.5.2. Fraccionamiento en columna del extracto hexánico.....	15
2.6. Extracto Metanólico.....	15
2.6.1. Obtencion de la fase fenólica mediante extracción con NaOH-AcOEt/NaOH-HCl-AcOEt.....	15
2.6.2. Fraccionamiento en columna de la fase fenólica obtenida del extracto MeOH.....	16
2.7. Cromatografía de capa fina (CCF).....	16
2.8. Purificación de compuestos obtenidos.....	16
2.9. Elucidación e identificación de los compuestos aislados.....	16
2.10. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	16
CAPITULO III.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIONES	17
3.1. Rendimiento de extractos obtenidos.....	18
3.2. Extracto de Hexano.....	18
3.2.1. Cromatografía en columna del extracto de Hex	18
3.2.2. Identificación del compuesto aislado.....	20
3.3. Extracto de Metanol.....	23
3.3.1. Cromatografia en columna de la fase fenólica del Extracto de MeOH.....	23
3.3.2. Obtencion e Identificación del compuesto Tricetina (5,7-Dihidroxy-3',4',5'-Trimetoxyflavona).....	23
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES.....	27

BIBLIOGRAFIA	28
ANEXOS	31

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Maceración dinámica.....	14
Fig. 2 Obtención de extracto seco.....	144
Fig.3: CCF de la fraccion 11	20
Fig. 4 Estructura en silla de 1,4 B-galactosa	22
Fig.5: Proyección de Haworth de 1,4 B-galactosa	22
Fig. 6: Flavona Tricetina	24

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Porcentaje de rendimiento de hojas.....	18
Tabla 2: Fraccionamiento cromatográfico extracto Hex.....	19
Tabla 3: Fraccionamiento cromatográfico de la fracción Hw-2 extracto Hex.....	19
Tabla 4: Comparación de ¹³ C-NMR de la muestra analizada con otros autores.....	22
Tabla 5: Fraccionamiento en columna de la porción fenólica del extracto de metanol.....	23
Tabla 6: Fraccionamiento en columna de la fracción Hw-4.....	23

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl₃	Cloroformo
CG-EM	Cromatografía gases acoplado a espectroscopia de masas
C₂H₃N	Acetonitrilo
COSY	Espectroscopia de correlación
DCM	Diclorometano
DEPT	Distorsión por transferencia de polarización
DMSO	Dimetilsulfóxido
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
MS	Metabolito secundario
Pf	Punto de fusión
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN 1H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN 13C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
UV	Ultravioleta

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se obtuvo cuatro extractos por medio de maceración de la especie *Huperzia webverbaueri* con diversos disolventes como son: Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo y Metanol. La obtención de metabolitos secundarios se llevó a cabo mediante el uso de técnicas cromatográficas tales como Resonancia Magnética Nuclear. En la especie *Huperzia weberbaueri* en el presente estudio se aisló e identificó la 1-4-B-galactosa que forma parte de la hemicelulosa que se encuentran en las paredes de las células vegetales y la Tricetina (5,7-Dihidroxy-3',4',5'-Trimetoxiflavona) que es una flavona, a las que se les puede atribuir propiedades farmacológicas, entre ellas se pueden mencionar: antioxidante, anti-proliferativa, anti-tumoral, anti-microbiana, actividades anti-inflamatorias así como también se utilizan en tratamientos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otros.

Palabras Clave: Metabolitos secundarios, *Lycopodiaceae*, *Huperzia weberbaueri*,

ABSTRACT

In this research four extracts through maceration of the species *Huperzia webverbaueri* with various solvents was obtained as: Hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. Obtaining secondary metabolites was carried out using chromatographic techniques such as Nuclear Magnetic Resonance. In weverbauerien *Huperzia* species in this study was isolated and identified 1-4-B-galactose which is part of the hemicellulose found in plant cell walls and Tricetina (5,7-Dihydroxy-3', 4', 5'-Trimetoxylavona) which is a flavone, wings can attribute pharmacological properties, among them we can mention: antioxidant, anti-proliferative, anti-tumorale, anti-microbial, anti-inflammatory activities as well as also used in treatment of cancer, cardiovascular diseases, among others.

Keywords: Secondary metabolites, Lycopodiaceae, *Huperzia webverbaueri*,

INTRODUCCION

La naturaleza produce una riqueza asombrosa de metabolitos secundarios biológicamente activos en el control de enfermedades, su marcada acción fisiológica sobre el organismo humano y animal les confiere su valor medicinal (Grayer y Harorne, 1996) (Sanchez, Fonseca, Capiro y Fernandez, 2000), los mismos que no cumplen con funciones directas de crecimiento y desarrollo de la planta, estos le ayudan a la planta como protección contra herbívoros y organismos patógenos (Osbourn, 1996).

Por tal motivo la investigación etnobotánica presenta una gran relevancia debido que en nuestro país aún se transmite el uso tradicional de las plantas medicinales, sin obtener conocimientos certeros de los propiedades medicinales, cabe recalcar que pueden presentar algún potencial de toxicidad si se utiliza de forma incorrecta (Rios, De la Cruz y Mora, 2008).

El objetivo de extraer, aislar y caracterizar estructuralmente metabolitos secundarios es desarrollar nuevos agentes terapéuticos. Este proceso a menudo se acopla con la vigilancia biológica de los compuestos aislados, con el fin de validar los usos de las plantas en la medicina tradicional (Ntie-kang, et al., 2013)

Actualmente estos productos naturales se los utiliza como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes (Zhang, et al., 2005). Se estima que más de 100000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla, Narasimhan, y Swarup, 2005). Aproximadamente 1600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas superiores se describen cada año, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Sajca, Grubisicb, y Vunjak-Novakovicc, 2000)

Nuestro país cuenta con una gran variedad de plantas medicinales, aquellas que por muchos años han sido utilizadas con fines medicinales, estas plantas han sido empleadas en forma empírica y en la actualidad han llamado la atención de los investigadores a fin de descubrir los posibles principios activos que justifiquen los usos terapéuticos (Bruneton, 2001)

La familia de las Lycopodiaceae se compone de cuatro géneros: *Huperzia*, *Phylloglossum*, *Lycopodium* y *Lycopodiella*, todos estos géneros presentan una amplia distribución en todo el mundo (Ortega, Agnese, Barboza y Cabrera, 2007). Lycopodiaceae incluye unas 500 especies

de las cuales una minoría es de América tropical y en el Ecuador se reportan 67 especies y para la provincia de Loja 33 especies (Jorgensen y Leon-Yanez, 1999).

Huperzia es el género más diverso de la familia Lycopodiaceae, no son muy abundantes, su crecimiento es lento y solo se encuentran en hábitats muy especializados. (Guaman, 2010). Las *huperzias* son usadas para tratar diferentes enfermedades algunas de tipo sobrenatural, así la *Huperzia brevifolia* se utiliza para tratar enfermedades de tipo sobrenatural como el espanto, la “shuka”, “vaho de agua”, para proteger y prevenir del “mal de aire” a una persona; la *Huperzia columnaris* se utiliza para el espanto y “vaho de agua”; la *Huperzia espinosana* para el espanto, “mal de aire”; la *Huperzia crassa* es utilizada para el espanto, la “shuka”; la *Huperzia compacta* para tratar el “mal de aire”; la *Huperzia tetragona* trata enfermedades sobrenaturales como el “mal hecho”, espanto (Armijos, Lozano, Bracco, Vidari, Malagon, 2012).

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes.

Las Lycopodiaceas son un grupo de plantas vasculares con una larga historia evolutiva, ya que fueron parte de los principales elementos de la flora terrestre primitiva las licopodiáceas comprenden aproximadamente 400 especies vivas, la mitad de ellas en el Neotrópico. Ellos se consideran descendientes de una línea basal de traqueofitas, con una historia de 390 millones de años (Wikström y Kenrick, 2001), en América se encuentran ampliamente distribuidas desde Alaska hasta tierra de fuego mencionan 190 especies para Sudamérica (Arana y Øllgaard, 2012)

Las Lycopodiaceae son un grupo monofilético de pteridófitos con microfilos que comprende al género *Lycopodium* y afines. Los esporofitos de las licopodiáceas que viven en la actualidad son de porte pequeño y con característicos microfilos libres (no soldados entre sí). Los esporangios se ubican en la cara adaxial de los microfilos, la parte del tallo con microfilos con esporangios ("microesporofilos") forma el "estróbilo". Poseen esporangios de tipo eusporangiado, de dehiscencia transversal, típicamente reniforme (con forma de riñón). Los microfilos son "microfilos verdaderos" (Pryer, et al., 2001)

En Ecuador la familia se reportan por tres géneros: *Huperzia* con 67 especies, *Lycopodiella* con 8 especies y *Lycopodium* con 5 especies (Jorgensen y Leon-Yanez, 1999).

1.2. Metabolitos secundarios.

Las plantas sintetizan una extensa gama de compuestos orgánicos que tradicionalmente se clasifican como metabolitos primarios y secundarios, aunque los límites precisos entre los dos grupos pueden en algunos casos ser algo borrosa. Metabolitos primarios son compuestos que tienen funciones esenciales asociados con la fotosíntesis, la respiración, y el crecimiento y el desarrollo. Estos incluyen fitosteroles, lípidos, nucleótidos, aminoácidos y ácidos orgánicos. Otros fitoquímicos, muchos de los cuales se acumulan en sorprendentemente altas concentraciones en algunas especies, se denominan como metabolitos secundarios. Estos son estructuralmente diversa y muchos se distribuyen entre un número muy limitado de especies dentro del reino vegetal por lo que puede ser diagnóstica en estudios quimiotaxonómicos. Aunque ignorado por mucho tiempo, su función en las plantas está atrayendo la atención como algunos parecen tener un papel clave en la protección plantas de herbívoros y la infección

microbiana, como atrayentes para los polinizadores y semillas de dispersión de los animales, como agentes alelopáticos, protectores UV y moléculas de señal en la formación de nódulos de las raíces de nitrógeno-fijación en las legumbres. Metabolitos secundarios son también de interés debido a su uso como colorantes, fibras, pegamentos, aceites, ceras, agentes saborizantes, fármacos y perfumes, y que son vistos como fuentes potenciales de nuevas drogas naturales, antibióticos, insecticidas y herbicidas (Croteau, Kutchan y Lewis, 2000) (Dewick, 2002).

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas que no están involucrados en el crecimiento normal y el desarrollo de un organismo, son un grupo muy diverso de productos naturales sintetizados por las plantas, hongos, bacterias, algas, y los animales. La mayor parte de los metabolitos secundarios, como los terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides se clasifican en función de su origen biosintético. Muchos miles de metabolitos secundarios se han aislado a partir de plantas, y muchos de ellos tienen potentes efectos fisiológicos en seres humanos y se utilizan como medicamentos. Es sólo a partir de finales del siglo XX que los metabolitos secundarios han sido claramente reconocidos por tener funciones importantes en las plantas (Agostini-Costa, Vieira, Bizzo, Silveira y Gimenes, 2012).

Metabolitos secundarios se producen con frecuencia en niveles más altos durante una transición de crecimiento activo hasta la fase estacionaria. El organismo productor puede crecer en ausencia de su síntesis, lo que sugiere que el metabolismo secundario no es esencial, al menos para la supervivencia a corto plazo. Un segundo punto de vista propone que los genes implicados en el metabolismo secundario proporcionan un " campo de juego genética "que permite a la mutación y la selección natural para fijar nuevos rasgos beneficiosos a través de la evolución. Un tercer punto de vista caracteriza metabolismo secundario como una parte integral del metabolismo celular y biología; se basa en el metabolismo primario de suministrar las enzimas necesarias, energía, sustratos y maquinaria celular y contribuye a la supervivencia a largo plazo del productor (Roze, Chanda y Linz, 2012).

1.2.1. Fenoles.

Los fenoles se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos. Se han reportado más de 8.000 estructuras fenólicas y están ampliamente dispersos por todo el reino vegetal (Strack 1997). Los fenoles van desde peso molecular bajo o simple, como compuestos aromáticos de anillado individuales hasta grandes y complejos

taninos y derivados de polifenoles. Se pueden clasificar en función del número y la disposición de sus átomos de carbono y por lo general se encuentran conjugados con azúcares y ácidos orgánicos. Los potenciales beneficios para la salud de los ácidos fenólicos, han sido de interés en diferentes áreas, tales como la alimentación, fitomejoramiento, fisiología, medicina, epidemiología, etc. La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos, que es aportado por el grupo hidroxilo en el anillo aromático, se considera que desempeña un papel importante en los beneficios para la salud. Algunos poseen la capacidad de inhibir la inflamación, la diferenciación celular, la proliferación celular y mejoran la actividad antioxidante ya que afectan los procesos celulares asociados con la apoptosis (Xu & Howard, 2012). Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en dos grupos: los flavonoides y el no flavonoides.

1.2.1.1. Los flavonoides.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que comprenden quince carbonos, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son los más numerosos de los compuestos fenólicos y se encuentran en todo el reino vegetal (Harborne 1993). Estan presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y la piel de las frutas y tienen papeles importantes y variados, como metabolitos secundarios. En las plantas, los flavonoides están implicados en diversos procesos como la protección UV, la pigmentación, la estimulación de la fijación de nitrógeno y resistencia a las enfermedades (Koes et al 1994;. Pierpoint 2000).

Los principales subclases de flavonoides son las flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas Otros grupos de flavonoides, que cuantitativamente son en comparación componentes menores de la dieta, son dihidroflavonoles, flavan-3,4-dioles, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas y auronas El esqueleto básico del flavonoide puede tener numerosos sustituyentes. Los grupos hidroxilo están normalmente presentes en las posiciones 4, 5 y 7. Los azúcares son muy comunes con la mayoría de los flavonoides existentes naturalmente como glucósidos. Mientras tanto los azúcares y grupos hidroxilo aumentan la solubilidad en agua, otros sustituyentes de flavonoides, tales como grupos metilo y unidades isopentilo, hacer flavonoides lipofílicas.(Crozier A. et. al. 2006)

1.2.1.2. Los no favonoides.

Los principales no flavonoides de importancia en la dieta son los ácidos fenólicos C6-C1, más notablemente el ácido gálico, que es el precursor de los taninos hidrolizables, los

hydroxycinnamates C6-C3y sus derivados conjugados, y los polifenólicos estilbenos C6-C2-C6 .(Crozier A. et. al. 2006)

1.3. Cromatografía.

La cromatografía se introduce generalmente como una técnica para separar e identificar los componentes en una mezcla. El principio básico es que los componentes de una mezcla tienen diferentes tendencias para adsorber sobre una superficie o disolver en un disolvente. Es un método poderoso en la industria, donde se utiliza a gran escala para separar y purificar el productos intermedios y productos en diversas síntesis. Se puede separar una mezcla en sus componentes individuales y al mismo tiempo proporcionar una estimación cuantitativa de cada constituyente. Las muestras pueden ser gaseosos, líquidos o sólidos en la naturaleza y pueden variar en complejidad de una mezcla simple de dos componentes a una mezcla de múltiples componentes que contiene especies químicas muy diferentes (Gehrke, Wixom y Bayer, 2001).

Hay varios tipos diferentes de cromatografía actualmente en uso - es decir, papel cromatografía; cromatografía de capa fina (TLC); cromatografía de gases (GC); líquido cromatografía (LC); cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); ion cromatografía de intercambio; y de permeación en gel o cromatografía de filtración en gel

1.3.1. Principios básicos.

Todos los métodos cromatográficos requieren una parte estática (la fase estacionaria) y una parte móvil (la fase móvil). Las técnicas se basan en una de los siguientes fenómenos: la adsorción; partición; intercambio iónico; o exclusión molecular.

1.3.2. Cromatografía de Adsorción.

Cromatografía de adsorción es quizás uno de los más antiguos tipos de cromatografía alrededor. Tiene una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. cada soluto tiene su propio equilibrio entre la adsorción sobre la superficie del sólido y la solubilidad en el disolvente, los menos solubles o mejor adsorbidos viajan más lentamente. El resultado es una la separación en bandas que contienen diferentes solutos. La cromatografía líquida usando una columna que contiene gel de sílice o alúmina es un ejemplo de cromatografía de adsorción (Vailaya y Horváth, 1998).

1.4. Resonancia Magnética Nuclear.

La Resonancia Magnética Nuclear (NMR) es un fenómeno físico por el que núcleos atómicos situados bajo la influencia de un campo magnético exterior de intensidad determinada absorben selectivamente energía del rango de radiofrecuencias pasando a un estado excitado. Al cesar el aporte energético externo, estos mismos núcleos devuelven la energía absorbida para regresar a su situación de equilibrio termodinámico, en un proceso de relajación que puede ser captado, medido y cuantificado permitiendo la identificación de la molécula donde se ubican pues la liberación ocurre de forma característica según el tipo de átomos que los rodean y los enlaces establecidos con esos átomos.

La Resonancia Magnética Nuclear (NMR) es, por lo tanto, una técnica instrumental no destructiva que permite el análisis de compuestos orgánicos y algunos inorgánicos. Por medio de ella se puede deducir la identidad de la gran mayoría de compuestos orgánicos conocidos y desconocidos. Tan sólo se necesitan unos cuantos miligramos de sustancia para realizar un análisis. Por su versatilidad y la riqueza de la información que produce, es la técnica más usada en la identificación de nuevos compuestos orgánicos (James, 1998).

1.5. Hemicelulosa.

Las plantas superiores hacen una multitud de hidratos de carbono complejos, muy diversos y de los cuales existen en la pared celular. Las estructuras de polisacáridos de la pared celular varían fuertemente entre tipos de células individuales y diferentes fases de desarrollo. En última instancia, tiene que haber una relación entre la estructura de la pared celular y las propiedades funcionales de cada célula diferenciada (Somerville, et al., 2004).

La estructura de la pared de la célula se modifica continuamente para acomodar la etapa de desarrollo y las condiciones ambientales. La planta celular establece la lámina media y la pared primaria durante crecimiento inicial y expansión de la célula. En muchas células, la pared es más engrosada y aún más reforzada por la adición de una pared secundaria (Hosmer Caffall y Mohnen, 2009).

Las paredes celulares primarias de las plantas se componen de microfibrillas de celulosa (9 a 25%) y una matriz interpenetrante de hemicelulosas (25-50%), pectinas (10-35%) y proteínas (10%), las paredes celulares secundarias de plantas contienen celulosa (40-80%), hemicelulosa (10-40%) y lignina (5-25%) (Bidlac, Malone y Benson, 1992).

La hemicelulosa, una fibra dietética y el componente de las paredes celulares de las plantas, se compone de un grupo heterogéneo de polisacáridos en donde el contenido y la estructura de la hemicelulosa en varias plantas son diferentes y dentro de una planta dependiendo de la ubicación. Las hemicelulosas contienen una serie de azúcares en sus cadenas principales y secundarias. Los azúcares, que forman una base para la hemicelulosa incluyen, xilosa, manosa, y galactosa en la cadena principal de hemicelulosa y arabinosa, ácido glucurónico, y galactosa en las cadenas laterales de hemicelulosa. Los números de azúcares en las cadenas laterales varían de tal manera que algunas hemicelulosas son relativamente lineales, mientras que otros están altamente ramificados confiriendo características importantes en la hemicelulosa (Gropper & Smith, 2012).

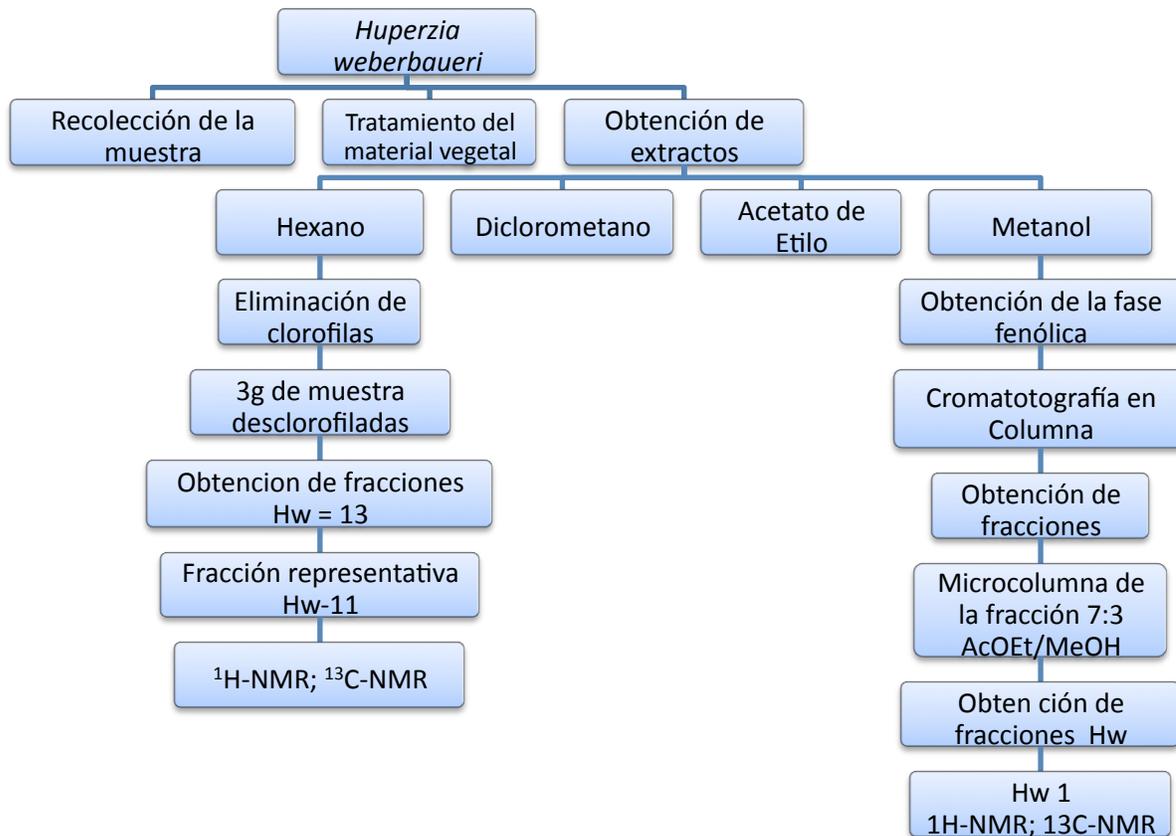
1.5.1. Galactosa.

Glucosa, galactosa y fructosa son los principales monosacáridos absorbidos tras la ingestión de una comida mixta. La galactosa (azúcar de la leche) es cuantitativamente menor importante de los tres, excepto en la infancia. Es casi siempre ingerido en forma de lactosa, un disacárido compuesto por glucosa y galactosa. La galactosa es una hexosa que difiere de la glucosa sólo por la configuración del grupo hidroxilo en la posición del carbono-4. A menudo presentes como una mezcla anomérica de α -D-galactosa y β -D-galactosa, existe este monosacárido abundantemente en la leche, los productos lácteos y muchos otros tipos de alimentos tales como frutas y verduras. La galactosa es uno de los monosacáridos de importancia en la nutrición humana. Se convierte a la glucosa-1-fosfato en el hígado y posteriormente se almacena en forma de glucógeno, o se convierte en glucosa y libera en la circulación (Gannon, Khan y Nuttall, 2001)

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Esquema de Metodología



2.2. Recolección de la muestra.

La recolección de la materia vegetal se la llevó a cabo en la provincia de Loja, en la comunidad de Sunín en el cantón Saraguro, con coordenadas geográficas 17697649E– 9590439N y con una altitud de 3219 m.s.n.m. Se preparó una muestra de herbario para su identificación; el cual se encuentra depositado en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja, con el código voucher Ly-H-001-008. La caracterización botánica la realizó Bolívar Merino del herbario de la Universidad Nacional de Loja

2.3. Tratamiento del material vegetal.

El material vegetal recolectado fue limpiado, separando todas las impurezas y material vegetal que no pertenece a la especie, para posteriormente ser secado a una temperatura de 37 °C, durante ocho días, para eliminar toda el agua, a continuación fue dividido sus hojas y tallos, luego se trituro cada material uniformemente por separado

2.4. Obtención de los extractos.

Para la obtención del extracto se procedió a la maceración tanto estática y dinámica de la especie, este proceso se realizó en 2 horas en maceración dinámica, en varias repeticiones hasta extracción completa con cada disolvente, los mismos que se emplearon de acuerdo al orden ascendente de polaridad (Hex, CH_2Cl_2 , AcOEt, MeOH). En la figura 1 se observa el proceso de extracción mediante la técnica de maceración dinámica.



Fig. 1 Maceración dinámica
Fuente: Autor

Luego se utilizó filtración al vacío para la separación del residuo vegetal del disolvente, para posteriormente concentrar con ayuda del rotaevaporador a temperatura de 30 °C y presión reducida para evitar la degradación de los constituyentes químicos obteniéndose el extracto seco, proceso se que observa en la figura 2.



Fig. 2 Obtención de extracto seco
Fuente: Autor

2.5. Extracto Hexánico.

2.5.1. Desclorofilación del extracto Hexánico.

El extracto de Hex 12 g se lo sometió a una mezcla de MeOH-H₂O 7:3 que luego se filtro al vacío en donde la porción líquida se colocó en una columna cromatográfica en una relación 1:10 de muestra sílice gel de fase inversa con el objeto de desclorofilar la muestra. El disolvente utilizado fue una mezcla MeOH-H₂O 7:3. El eluyente de la columna se recolectó en muestras de 200 ml; posteriormente las muestras fueron sometidas a evaporación por rota evaporador con su respectivo análisis en las placas cromatográficas CCF tanto en fase directa como inversa, obteniendo como resultado un peso de 6.6925 g de muestras desclorofiladas.

2.5.2. Fraccionamiento en columna del extracto hexánico.

Mediante el fraccionamiento en columna del extracto hexánico se utilizan 3 g muestra desclorofilada y se someten a una nueva cromatografía en columna en una relación 1:50 de muestra sílice gel y se recogen eluyentes de 20 ml en un total de 30 muestras, que son unidas de acuerdo a la similitud de R_f en placas CCF, dándonos como resultado 13 fracciones. El disolvente que se utilizó fue en gradientes de polaridad de 50 ml cada uno, comenzando por AcOEt 100% y luego AcOEt-MeOH desde 99:1 hasta 90:1.

2.6. Extracto Metanólico.

2.6.1. Obtención de la fase fenólica mediante extracción con NaOH-AcOEt/NaOH-HCl-AcOEt.

Para la obtención de la fase fenólica se pesaron 3g del extracto de MeOH y se lo disolvieron en 300ml de AcOEt que fue colocado en un embudo de decantación al cual se le añadieron 200ml de NaOH 1M y se lo dejó por una hora hasta observar dos fases, luego de la cual se recolecta la parte inferior que corresponde a la fase acuosa de NaOH, esto lo realizamos por cuatro veces.

La parte inferior recolectada se le adiciona HCl 1M hasta obtener un pH de 5, una vez acidificada la muestra se coloca en un embudo de decantación y se le adiciona AcOEt se deja reposar durante una hora hasta observar nuevamente dos fases y se recolecta la parte superior que corresponde a la fase orgánica de AcOEt, esto lo realizamos por cuatro ocasiones. Una vez obtenida la fase de AcOEt procedemos a secar la muestra con ayuda del rotaevaporador

2.6.2. Fraccionamiento en columna de la fase fenólica obtenida del extracto MeOH.

Para el fraccionamiento en columna se pesaron 732mg de muestra obtenida de la doble decantación en 70g de sílice gel y se recogen los eluyentes obteniendo 7 fracciones. El disolvente que se utilizó fue en gradientes de concentración desde AcOEt puro para luego ir cambiando AcOEt-MeOH 9-1; hasta llegar a AcOEt-MeOH 5-5 y finalmente colocarle MeOH puro.

De las fracciones recolectadas se realiza una microcolumna de la fracción Hw-4 con 4.5g de sílice gel y 45.9mg de muestra en la cual se recolectan 44 muestras que fueron agrupadas en 7 fracciones de acuerdo a su similitud en Rf. mediante placas de CCF

2.7. Cromatografía de capa fina (CCF).

Para las cromatografías de capa fina (CCF) se utilizó placas pre-recubiertas (20x20cm) en sílice gel Merck 60, con indicador de fluorescencia a 254nm. La detección de los compuestos sobre las placas se realizó por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y 360nm. y como revelador H₂SO₄-Vainillina 1%

2.8. Purificación de compuestos obtenidos.

Para la purificación se realizó un lavado de las sustancias cristalinas con MeOH (grado reactivo), teniendo en cuenta el grado de solubilidad de cada fracción y mediante microcolumnas.

2.9. Elucidación e identificación de los compuestos aislados.

La elucidación e identificación se la realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

2.10. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de NMR se registraron en el equipo Varian Unity con No. de serie 21953, que opera a 400 MHz para RMN ¹H y a 100 MHz para RMN ¹³C, como también COSY y DEPT a una temperatura de 25°C. Los compuestos se disolvieron en Dimetil-Sulfóxido (DMSO) y Acetona

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación se detallan los resultados obtenidos de acuerdo a la metodología antes señalada.

3.1. Rendimiento de extractos obtenidos.

Para la obtención del rendimiento de los diferentes extractos a partir de hojas de *H. weberbaueri* se realizó el proceso de maceración dinámica con disolventes de polaridad ascendente permitiendo obtener los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol.

Todos los extractos presentan consistencia sólida. Los porcentajes de rendimiento (en base seca) para los diferentes solventes utilizados oscilan entre: 2.78% - 23.18% (hojas); siendo el extractos de metanol el que mayor rendimiento presenta. Estos valores fueron obtenidos en base al peso de la materia vegetal.

La tabla1, muestra la cantidad en gramos y el rendimiento de los extractos, obtenidos del proceso de maceración con diferentes disolventes de polaridad ascendente a partir de las hojas de *H. weberbaueri*

Tabla 1: Porcentaje de rendimiento de hojas.

Extracto Hojas	Peso (g)	Rendimiento(%)
Hex	1.68	2.78
CH₂Cl₂	3.08	5.11
AcOEt	1.37	2.27
MeOH	13.98	23.18

Fuente: Autor

3.2. Extracto de Hexano

3.2.1. Cromatografía en columna del extracto de Hex

Para el fraccionamiento en columna del extracto de Hex se obtuvieron 12 muestras de la desclorofilación de las cuales se unieron de acuerdo a su similitud en Rf presentadas en placas CCF obteniéndose los siguientes pesos.

Tabla 2: Fraccionamiento cromatográfico extracto Hex

Fraciones	Pesos (mg)
Hw-1	1116.2
Hw-2	6692.5
Hw-3	123.39
Hw-4	79.7
Hw-5	79.6

Fuente: Autor, 2015

De la fracción Hw-2 se obtuvieron 30 muestras que se unieron de acuerdo a su similitud en R_f presentada en CCF, obteniéndose 13 fracciones, de las cuales las fracciones 10 y 11 presentaron un precipitado blanquecino que luego de ser lavado sucesivamente con MeOH se obtuvieron 55.7 mg para la fracción 10 y 425.1 mg para la fracción 11 siendo soluble en DMSO. Los pesos en mg del fraccionamiento en columna se detallan a continuación

Tabla 3: Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 2 extracto Hex.

Fraciones	Pesos (mg)	Fraciones	Pesos (mg)
Hw-1	1.4	Hw-8	2.29
Hw-2	1.8	Hw-9	5.49
Hw-3	17.9	Hw-10	843.5
Hw-4	42.4	Hw-11	834.7
Hw-5	142.3	Hw-12	185.8
Hw-6	1.2	Hw-13	42.4
Hw-7	3.6		

Fuente: Autor

3.2.2. Identificación del compuesto aislado.

Para la identificación se realizó, CCF y un espectro ^{13}C -NMR los cuales se detallan a continuación:



Fig.3: CCF de la fracción 11
Fuente: Autor 2015

El análisis del espectro de ^1H -NMR mostró señales en el rango de 3.1-5.23 (Anexo1) lo que señala la presencia de estructuras de tipo carbohidratos, esto fue corroborado con los espectros de ^{13}C -NMR (Anexo2) y DEPT(Anexo3) que indicaron que la estructura contenía solo carbonos de tipo CH. Comparando los resultados de la muestra analizada con bibliografía proporcionada por (González, Martínez, León y Bahsas, 2001), en la interpretación del espectro unidimensional de ^{13}C -NMR se asignan inequívocamente algunas señales del espectro, la región anomérica contiene las resonancias atribuibles a los carbonos anoméricos de los residuos D-galactosa (103,47; 104,16 ppm). Siendo las señales de nuestro espectro las siguientes ^{13}C - NMR: (400 MHz, DMSO) δ ppm 104.12(C_1), 75.2 (C_2), 72.97(C_3), 71.73(C_4), 74.38(C_5), 62.16(C_6) 91.85(C_1'), 82.62(C_2'), 69.93(C_3'), 77.13(C_4'), 72.91(C_5'), 60.58(C_6'). Según (Popper, Sadler, Fry, 2001) este compuesto ha sido reportado para genero Lycopodium, Huperzia y Diphasiastrum.

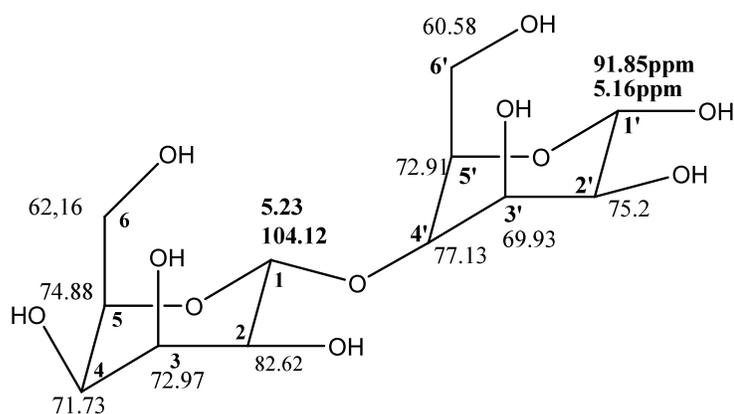


Fig.4: Estructura en silla de B-galactosa

Fuente: Autor 2015

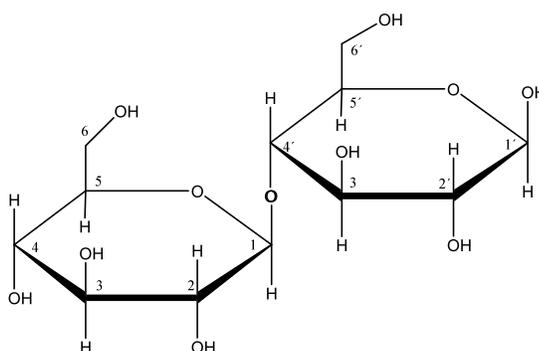


Fig.5: Proyección de Haworth de B-galactosa

Fuente: Autor 2015

Para su estudio, los carbohidratos suelen representarse en estructuras bidimensionales de líneas cruzadas, mejor conocidas como Proyección de Fisher. Sin embargo, en el caso de Carbohidratos que se encuentran ciclados, la forma más eficiente de representarlos es utilizando Proyección de Haworth, donde el Alcohol (-OH) del carbono anomérico, señalará la propiedad anomérica del carbohidrato en cuestión. El carbohidrato ciclado tendrá una configuración Dextro (D) o Levo (L), que será la misma que poseía la estructura abierta según su estereoisomería (D y L son letras que designan a que enantiómero pertenece el carbohidrato). Entonces, para su configuración anomérica α el alcohol en el carbono 1 tendrá una dirección opuesta al grupo terminal en el carbohidrato ciclado, y para una configuración β deberán tener una misma dirección. De éste modo, si el carbohidrato pertenece a la familia D, entonces el carbono en la posición 6 de la proyección Haworth (CH_2OH) estará representado hacia arriba, y el Alcohol en el Carbono anomérico estará representado hacia abajo si es α , o

hacia arriba, si es β . Recordando que puede tener ambas configuraciones anoméricas tanto en D como en L (Bubb, 2006).

En la tabla 6, se detallan algunos espectros de galactosa. En la columna A se muestra las señales obtenidas del ^{13}C -NMR de la muestra en estudio, en la columna B se especifican señales proporcionadas por (Koerner, Cary, Li y Li, 1981), en la columna C1 y C2 observamos señales de los autores (Bailey y Butterfield, 1980), y en la columna D (Chandrashkar, Arun, Satyanarayana y Subramanyam) nos muestran señales para galactosa. Demostrando de esta manera que se puede obtener diferentes señales de espectro para la misma molécula como se describe en las columnas B y C1 para una B-galactosa; así como para una galactosa en C2 y D. En química orgánica, los isómeros conformacionales o confórmeros son estereoisómeros que se caracterizan por poder interconvertirse (modificar su orientación espacial, convirtiéndose en otro isómero) debido a las complejas interrelaciones entre los diferentes confórmeros y sus derivados. Confórmeros diferentes pueden tener propiedades diferentes, incluyendo estabilidad y reactividad química.

Tabla4: Comparación de ^{13}C -NMR de la muestra analizada con otros autores

Galactosa					
	A	Koerner B	Bailey C1	Bailey C2	Chandrashkar D
C1	104.12	103.3	97.66		
C1'	91.85	102.2	92.74	91.83	104.8
C2	82.62	72.2	72.27		
C2'	75.20	65.2	68.93	68.75	78.1
C3	72.97	76.5	73.67		
C3'	69.93	80.6	69.05	73.61	73.7
C4	71.73	79.0	68.44		
C4'	77.13	69.6	69.60	68.38	71.2
C5	74.88	73.9	75.12		
C5'	72.91	71.8	70.45	76.58	75.2
C6	62.16	61.1	60.73		
C6'	60.58	62.2	60.73	60.55	61.9

Fuente: Autor 2015

3.3. Extracto de Metanol.

3.3.1. Cromatografía en columna de la fase fenólica del Extracto de MeOH.

Mediante el fraccionamiento en columna de la fase fenólica se obtuvieron 7 fracciones que se detallan a continuación con sus respectivos pesos

Tabla 5: Fraccionamiento en columna de la porción fenólica del extracto de metanol

Fraccciones	Pesos (mg)
Hw - 1	25.09
Hw - 2	38.16
Hw - 3	24.90
Hw - 4	45.49
Hw - 5	67.59
Hw - 6	34.20
Hw - 7	36.60

Fuente: Autor, 2015

Del fraccionamiento en columna de la fracción Hw-4 se obtuvieron 7 fracciones las cuales tienen los siguientes pesos

Tabla 6: Fraccionamiento en columna de la fracción Hw - 4

Fraccciones	Pesos (mg)
Hw - 1	4.80
Hw - 2	2.90
Hw - 3	0.50
Hw - 4	4.90
Hw -5	13.89
Hw -6	16.20
Hw -7	2.29

Fuente: Autor, 2015

3.3.2 Obtencion e Identificación del compuesto Tricetina (5,7-Dihidroxy-3',4',5'-Trimetoxyflavona)

La flavona (5,7-Dihidroxy-3',4',5'-Trimetoxyflavona) tricetina se la obtuvo de las muestras 1-5 eluidas en AcOEt (100:0) de la fracción Hw-4 (tabla 5), de la cual se obtuvo un peso de 4.80mg

que corresponde a la fracción Hw-1 de la tabla 6, el compuesto se encuentra en forma cristalina y tiene un color amarillo, la placa de CCF eluida en AcOEt(100:0) permite determinar el Rf del compuesto aislado en 0.59. En el anexo 4, se muestra el espectro de ^1H NMR ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 400 MHz) en el que resaltan como señales significativas: un singulete en δ_{H} 13.02 ppm (1H) correspondiente al protón hidroxilo en el carbono C-5. Dos dobletes en δ_{H} 6.56 ppm (1H) y δ_{H} 6.57 ppm (1H), lo que indica un anillo A sustituido en las posiciones C-6 y C-8. La señal δ_{H} 7.39 ppm (2H) es asignada al anillo B sustituido en las posiciones C-2' y C-6'. El espectro de ^{13}C -NMR ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 100 MHz) determina C cuaternarios que no son fácilmente observables ya que la cantidad de muestra es muy poca para ser analizada, pero se presenta señales correspondientes al esqueleto de la flavona. La señales ^1H -NMR δ_{H} 3.97 ppm (9H) y RMN ^{13}C δ_{C} 56.95 ppm (OCH_3) indican la presencia de tres grupos metoxi, en las posiciones C-3', C-4', C-5'. Estos datos se los puede corroborar con los proporcionados por (Wollenber E.,2006)

Tabla 7: Comparación ^1H -NMR de la muestra con Eckhard Wollenber

	Muestra Obtenida	Wollenber
H-3	6.74	6.98
H-6	6.26	6.40
H-8	6.57	6.78
H-2'	7.39	7.19
H-6'	7.39	7.22
5-OH	13.02	12.88
3'-OMe	3.97	3.77
4'-OMe	3.97	3.88
5'-OMe	3.97	3.90

Fuente: Autor, 2015

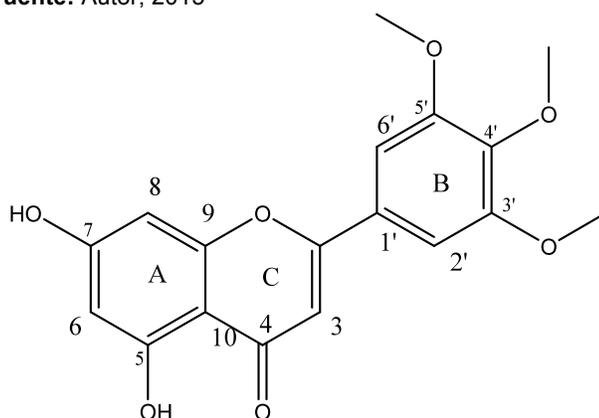


Fig. 6: Flavona Tricetina

Fuente: Autor, 2015

Dicho compuesto se ha encontrado en otras especies como Australian Eucalyptus (Yao L. et al. 2004), en *Lethedon tannaensis* (Zahir A. et al. 1996), así como en *Trigona spinipes* (Freitas, Ponte, Lima y Silveira, 2008). Sus propiedades farmacológicas o medicinales se han estudiado en el efecto anticancerígeno de tricetina, en dos líneas celulares de cáncer de hígado humano, Hep G2 y PLC / PRF / 5. La tricetina indujo cáncer tratamiento muerte celular mediante la activación del receptor mitocondrial y muerte 5 (DR5) las vías de apoptosis (Hsu, Hou, Tsai, Kuo, 2010). Otros estudios han analizado la actividad citotóxica contra células humanas de carcinoma de nasofaringe de la leucemia murina (Zahir A. et al. 1996).

CONCLUSIONES

Las técnicas cromatográficas y espectroscópicas permitieron la separación e identificación del compuesto 1.4 B-galactosa partir del extracto de Hex. El metabolito aislado se fracciono en la columna de AcEOt-MeOH 9:1 del extracto de Hex, siendo este un azúcar que forma parte de la hemicelulosa que se encuentran en las paredes de las células vegetales.

Se determinó la presencia de un compuesto flavonoide Tricetina (5,7-Dihidroxy-3',4',5'-Trimetoxyflavona) que se obtuvo del extracto de MeOH de la fracción 1, cuya estructura química se determinó por el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear

RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio de *Huperzia weberbaueri* realizando el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de otros extractos como son de DCM y AcEOt así como de otras partes de la especie como son los tallos, ya que en estudios anteriores han demostrado tener compuestos secundarios importantes; con el fin de detectar cual son los componentes que le dan las propiedades curativas a la planta.

BIBLIOGRAFIA

- Agostini-Costa, T. d., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2012). *Secondary Metabolites*. Recuperado el 10 de 02 de 2015, de INTECH JOURNALS; Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Chromatography and Its Applications": <http://www.intechopen.com/books/chromatography-and-its-applications/secondary-metabolites>
- Arana, M. D., & Øllgaard, B. (2012). Revisión de las Lycopodiaceae (Embryopsida, Lycopodiidae) De Argentina y Uruguay. *Darwiniana*, 50 (2), 266-295.
- Araujo-Murakami, A., & Zenteno Ruiz, F. S. (2006). Bosques de los Andes orientales de Bolivia y sus especies útiles. (B. Ø. M. Moraes R., Ed.) *Botánica Económica de los Andes Centrales* , 146-161.
- Armijos Ch., Lozano M., Bracco F., Vidari G., Malagon O. (2012); Plantas sagradas y psicoactivas usadas por los saraguros en la región sur del Ecuador. *Ediloja*. 124-128
- Bhalla, R., Narasimhan, K., & Swarup, S. (2005). Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Rep* , 562–571.
- Bidlac, J., Malone, M., & Benson, R. (1992). Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in. *Department of Biology, University of Central Oklahoma* , 51-55.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica plantas medicinales* (2ª edición ed.). (A. M. Fresno, Trad.) Zaragoza: Acribia.
- Croteau, R., Kutchan, T., & Lewis, N. (2000). Natural products (secondary metabolites). En B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones. *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*. American Society of Plant Physiologists.
- Crozier A, Michael N. Clifford, Hiroshi Ashihara, (2006) *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* by Blackwell Publishing Ltd Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products; A Biosynthetic Approach*. New York: John Wiley & Sons Ltd.
- Gannon M.C., Khan M.A.y. Nuttall F.Q; (2001); Glucose Appearance Rate After the Ingestion of Galactose; *Metabolism*; 50 (1), 93-98.
- Gehrke, C. W., Wixom, R. L., & Bayer, E. (2001). chromatography a century of discovery 1900–2000; the bridge to the sciences=technology. *Journal of chromatography library* , 64.
- González, N., Martínez, M., León, G., & Bahsas, A. (2001). Estudio químico y espectroscópico del polisacárido de la goma de *Cedrela odorata*. *Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences* , 285-293.

Grayer, R., & Harborne, J. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry In The International Journal of Plant Biochemistry* , 37 (1), 19-42.

Gropper, S. S., & Smith, J. L. (2012). *Advanced Nutrition and Human Metabolism*.

Guaman, A. (2010). Aislamiento de alcaloides de cinco especies alucinógenas de la familia Lycopodiaceae usadas en medicina ancestral por los Rikuyhampiyachak (visionarios) de la étnica Saraguro - Ecuador. *UTPL* .

Harborne, J.B. (1993) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London

Hosmer Caffall, K., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall. *Carbohydrate Research* , 1879–1900.

Hsu YL, Hou MF, Tsai EM, Kuo PL. (2010) Tricetin, a dietary flavonoid, induces apoptosis through the reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase pathway in human liver cancer cells. *J Agric Food Chem*. 58(23):12547-56

James, T. L. (1998). *Fundamentals of NMR. Department of Pharmaceutical Chemistry; University of California* .

Jorgensen, P., & Leon-Yanez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Missouri Botanical Garden.

Koes, R.E., Quattrocchio, F. and Mol, J.N.M. (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16, 123–132

Ntie-Kang, F., Lifongo, L. L., Mbaze, L. M., Ekwelle, N., Owono, L. C., Megnassan, E., y otros. (2013). Cameroonian medicinal plants: a bioactivity versus ethnobotanical survey and chemotaxonomic classification. *BMC Complementary and Alternative Medicine* .

OMS. (1991). Pautas para la evaluación de Medicamentos Herbarios: Programa de medicina tradicional. *Organizacion Mundial de la Salud* .

Ortega, M. G., Agnese, A. M., Barboza, G. E., & Cabrera, J. (2007). Seasonal study of the alkaloid pattern of *huperzia saururus* with habitat in Córdoba province (Argentina). *The Journal of the Argentine Chemical Society* , 95 (1), 1-9.

Osborn, A. E. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense. *The Plant Cell* , 8, 1821-1831.

Pierpoint, W.S. (2000) Why do plants make medicines. *Biochemist*, 22, 37–40

Popper Z., Sadler I., Fry S. (2001) 3-O-Methyl-d-galactose residues in lycophyte primary cell walls. *Pergamon* 57, 711-719.

Pryer, K. M., Schneider, H., Smit, A. R., Cranfill, R., Wolf, P. G., Hunt, J. S., y otros. (2001). Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature*, 618-622.

Rios, M., De la Cruz, R., & Mora, A. (2008). En *Conocimiento Tradicional y Plantas Útiles del Ecuador: Saberes y Prácticas*. Quito, Ecuador: Abya-Yala.

Roze, L. V., Chanda, A., & Linz, J. E. (2012). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genet Biol*, 48, 35-48.

Sajca, L., Grubisicb, D., & Vunjak-Novakovicc, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 4 (2), 89-99.

Sanchez, A., Fonseca, G., Capiro, N., & Fernandez, D. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en CUBA. *Rev Cubana Farm*, 34 (1), 34-43.

Strack, D. (1997) Phenolic metabolism. In P.M. Dey and J.B. Harborne (eds), *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 387–416.

Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., y otros. (2004). Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, 2206-2211.

Vailaya, A., & Horváth, C. (1998). Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption? *Journal of Chromatography A*, 829 (1-2), 1–27.

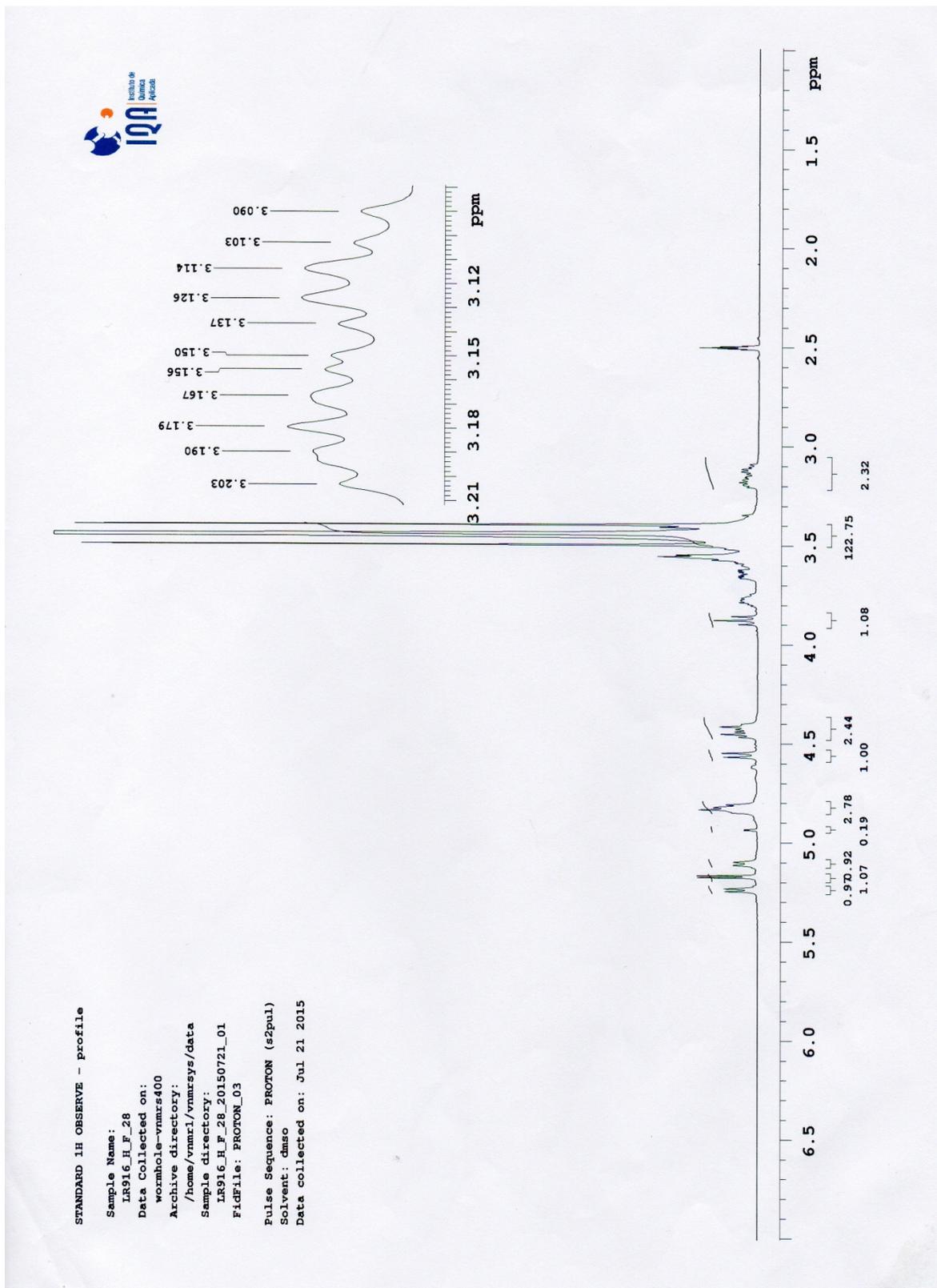
Xu, Z., & Howard, L. (2012). *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. Somerset: Wiley-Blackwell

Yao L, Jiang Y, D'Arcy B, Singanusong R, Datta N, Caffin N, Raymont K.(2004) Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian Eucalyptus honeys. *J Agric Food Chem*. 52(2):210-4.

Zahir A, Jossang A, Bodo B, Provost J, Cosson JP, Sévenet T.(1996). DNA topoisomerase I inhibitors: cytotoxic flavones from *Lethedon tannaensis*. *Journal of natural products*. 59(7):701-3.

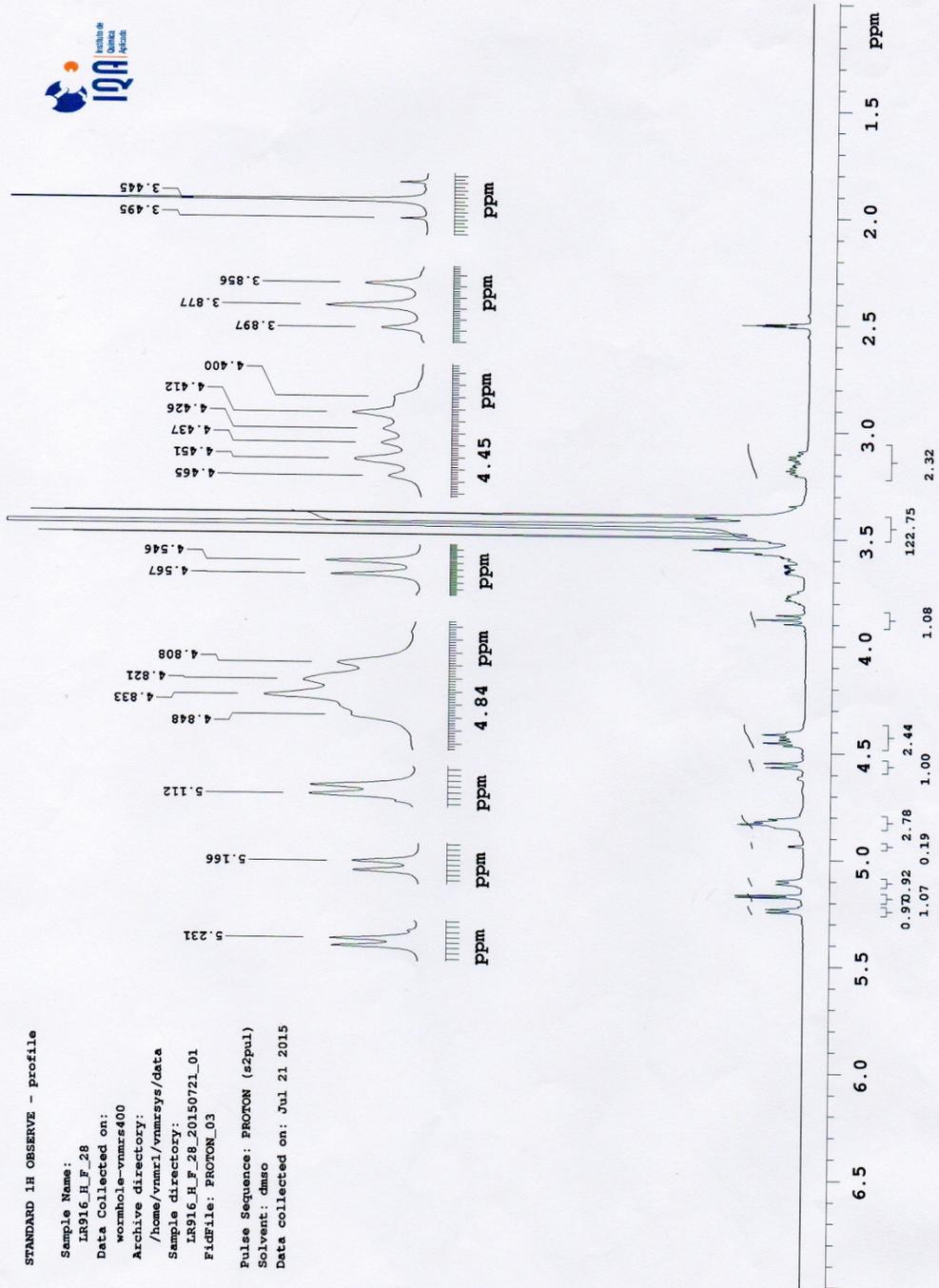
ANEXOS

Anexo 1: ¹H-NMR B-galactosa

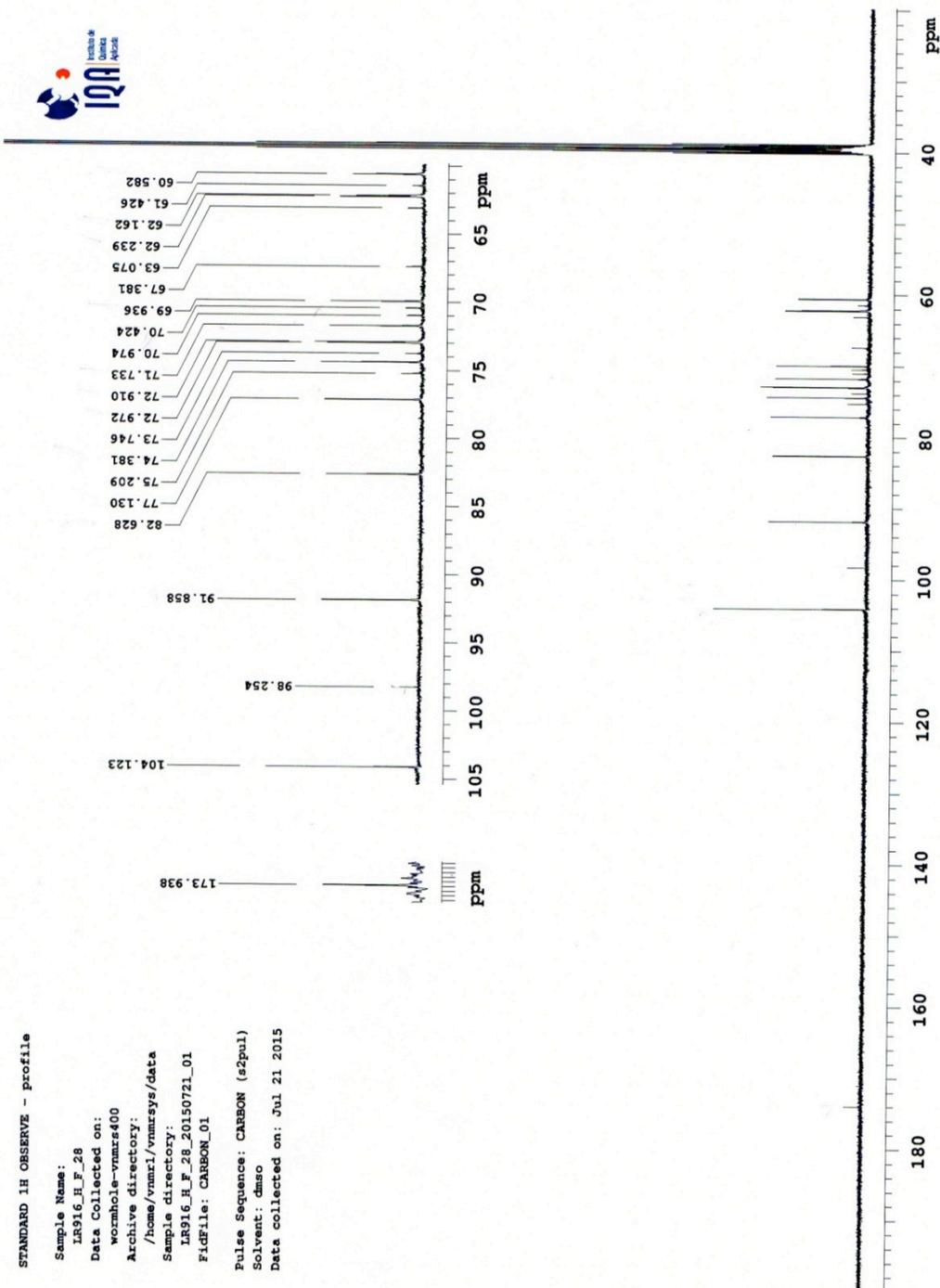


STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name: IR916_H_F_28
Data Collected on: wormhole-vnmrs400
Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: IR916_H_F_28_20150721_01
FIDfile: PROTON_03
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul 21 2015



Anexo 2: ¹³C-NMR B-galactosa



Anexo 3: DEPT B-galactosa



STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
IR916_H_F_28
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsyz/data
Sample directory:
IR916_H_F_28_20150721_01
FidFile: DEPT_01

Pulse Sequence: DEPT
Solvent: dmsd
Data collected on: Jul 21 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.285 sec
Width 25510.2 Hz
1024 repetitions

OBSERVE C13, 100.5381682 MHz
DECOUPLE H1, 399.8353187 MHz

Power 38 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated

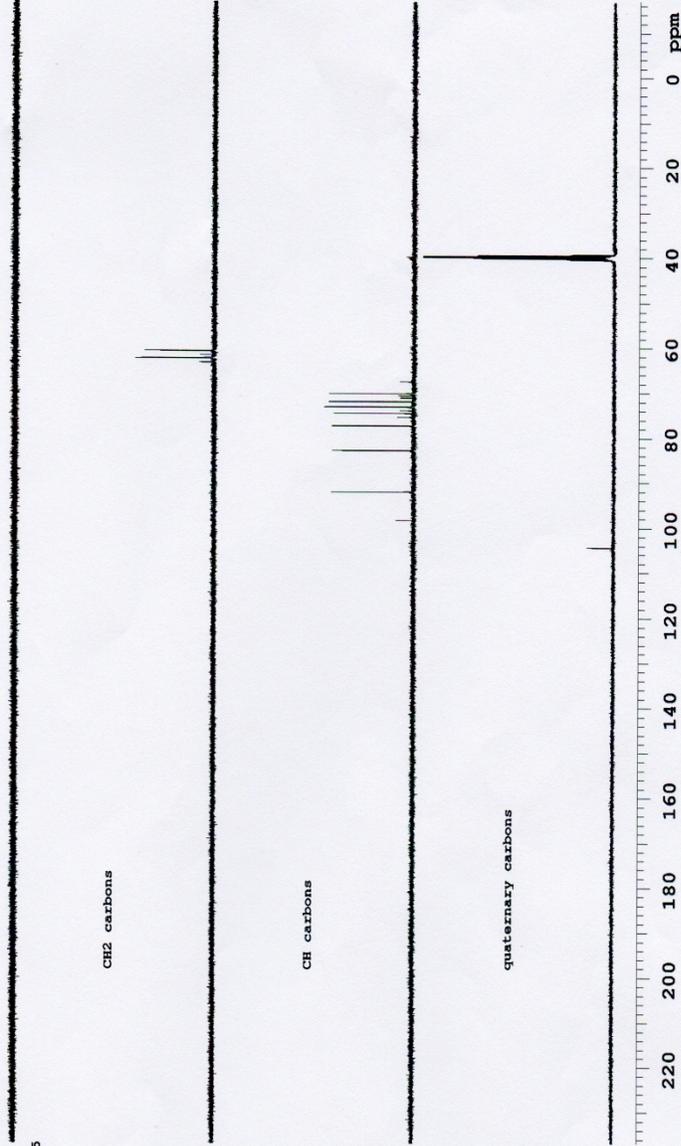
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 7 hr, 30 min

CH3 carbons

CH2 carbons

CH carbons

quaternary carbons



Anexo 5: ¹³C flavona Tricetina

