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: *Hypericum lancioides* Cuatrec.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Espinoza Alberca, Jenniffer Astrid.

DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio, PhD.

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

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

PhD.

Chabaco Patricio Armijos Riofrío.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie: *Hypericum lancioides* Cuatrec*.,* realizado por: Jenniffer Astrid Espinoza Alberca ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 2016

……..

PhD. Chabaco P. Armijos Riofrío.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

"Yo Jenniffer Astrid Espinoza Alberca, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de las especie *Hypericum lancioides* Cuatrec*.,* de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, 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. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f.)……
Jenniffer Astrid Espinoza Alberca
CI. 1900369792

DEDICATORIA

Con amor y cariño:

A Dios, por ser el Señor de mi vida, mi refugio y mi fortaleza.

A mi madre Gloria Alberca Troya, que con su amor y apoyo incondicional me ha sabido guiar y motivado en mis constantes sacrificios.

A la razón de mi vida e inspiración y por el cual siempre lucharé a mi hijo Jhosue David.

A Marco Eduardo Jiménez Azuero, mi hermano de corazón por su apoyo incondicional por animarme a seguir adelante y darme palabras de aliento. A mi familia por todo y cada uno de sus consejos y a mis amig@s porque siempre estuvieron a mi lado apoyándome he hicieron que esta experiencia sea muy amena y enriquecedora

Jenniffer Astrid Espinoza Alberca

AGRADECIMIENTO

Agradezco principalmente a Dios por su misericordia, amor y fortaleza que me ha dado en mi diario caminar y sobre todo la grandiosa familia que me ha regalado.

A mi madre por su amor, apoyo y esfuerzo para hacer de mí una persona de bien, gracias por el sacrificio y la dedicación, a mi hijo Jhosue David por ser mi inspiración y mi aliento a seguir adelante

De manera muy especial agradezco al PhD. Gianluca Gilardoni y PhD. Chabaco Armijos, por su valiosa guía, paciencia y tiempo dedicado a la realización de este trabajo.

A mis amig@s por la gran calidad humana que me han demostrado con su amistad.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, Departamento de Química, Sección de Química Básica y Aplicada, a todos los docentes que a lo largo de mi carrera me han brindado sus conocimientos y consejos.

ÌNDICE

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS iii
DEDICATORIA iv
AGRADECIMIENTO v
ÌNDICE vi
TABLA DE FIGURAS. ix
LISTA DE TABLAS x
ABREVIATURAS xi
RESUMEN 1
ABSTRACT 2
INTRODUCCIÓN 3
CAPITULO I 5
FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO 5
1.1. Fin del Proyecto. 6
1.2. Propósito del Proyecto. 6
1.3. Componentes del Proyecto. 6
CAPITULO II 7
MARCO TEÓRICO 7
2.1. Antecedentes. 8
2.2. Plantas Medicinales. 8
2.2.2 Formas de uso de plantas medicinales. 9
2.2.1. Ecuador y las plantas medicinales. 10
2.3. Descripción Botánica. 11
2.3.1. Familia Hypericaceae 11
2.3.2. Género *Hypericum*. 12
2.3.2. Especie *Hypericum lancioides* Cuatrec. 17
2.4 Metabolitos Secundarios 18
2.4.1. Importancia de los metabolitos secundarios. 19

2.4.2. Clasificación de los Metabolitos Secundarios. 19
2.5. Métodos Cromatográficos. 20
2.5.1. Cromatografía en columna. 21
2.5.2. Cromatografía de capa fina. 21
2.5.3. Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) 22
2.5.4. Factor de retención (Rf) 22
2.6. Identificación de metabolitos secundarios. 23
2.6.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN). 23
2.7. Actividad Antioxidante. 24
CAPITULO III 25
METODOLOGÍA 25
3.1 Recolección del material vegetal. 27
3.2. Tratamiento de la materia vegetal *Hypericum lancioides* Cuatrec. 27
3.3. Obtención de extractos de *Hypericum lancioides* Cuatrec. 28
3.4. Fraccionamientos en Cromatografía de columna (CC) de extracto de Acetato de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec. 28
3.5. Cromatografía en capa fina (CCF). 29
3.6. Unión y purificación de fracciones. 29
3.7. Caracterización física de las fracciones. 30
3.7.1. Factor de retención. 30
3.7.2. Solubilidad. 30
3.8. Identificación de compuestos. 30
3.8.1. Resonancia magnética nuclear (RMN). 30
3.9 Determinación de la Actividad antioxidante del compuesto. 30
3.9.1. Método DPPH. 30
CAPITULO IV 32
DISCUSIÓN Y RESULTADOS 32
4.1. Obtención de extractos. 33
4.2. Fraccionamiento en Cromatografía de columna (CC) del extracto de Acetato de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec. 33
4.2.1. Purificación Fracción HL-26. 35

4.2.2. Purificación de la fracción HL- 28. 40
CONCLUSIONES 42
RECOMENDACIONES. 43
BIBLIOGRAFÍA. 44
ANEXOS 49
ANEXO 1 50
Espectro de 1H RMN quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido. 50
ANEXO 2 50
ANEXO 3 52
Espectro de 1H RMN del posible compuesto ácido cinámico. 52
ANEXO 4 53
Actividad Antioxidante: Curva de Calibración DPPH. 53

TABLA DE FIGURAS.

Figura 1. Distribución mundial de la fmilia Hypericaeae (color verde indica ubicación de la familia Hypericaeae) 11
Figura 2. Especies género Hypericum. 12
Figura 3. Naftodiantronas comunes en el género Hypericum. 13
Figura 4. Floroglucinoles Hiperforina y Adhiperforina. 14
Figura 5. Flavonoides más comunes aislados en el género Hypericum. 15
Figura 6. Estructura Amentoflavona. 15
Figura 7. Äcido clorogénico aislado de Hypercum perforatum. 16
Figura 8. Estructura de la xantona. 17
Figura 9. Imagen especie *Hypericum lancioides* Cuatrec 17
Figura 10. Vías del metabolismo secundario de las plantas que producen los tres tipos 20
Figura 11. Montaje típico para cromatografía en capa fina TLC. Cámara cromatográfica, placa cromatográfica, fase móvil y fase estacionaria colocada sobre la placa de vidrio que actúa como soporte. 22
Figura 12. Fórmula para determinar el factor de retención. 23
Figura 13. *Esquema de la metodología utilizada.* 26
Figura 14. Mapa físico de Loja. 27
Figura 15. Obtención de extractos: a. Maceración dinámica, b. Maceración estática, c. Filtración, d. Rotaevaporación. 28
Figura 16. Cromatografía en Columna (CC), extracto de Acetato. 29
Figura 17. Perfiles cromatográficos de las fracciones de la cuales se aislaron compuestos de la columna de extracto de acetato de la especie Hypericum lancioides Cuatrec 35
Figura 18. Placa fase directa del compuesto purificado de la fracción HL-26 corrida en solvente AcOEt: MeOH:H_2O 200:13:10; a)Luz Uv 254 nm; b) B4 (banda 4)Luz UV 365 nm. 36
Figura 19. Quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido. 39
Figura 20. Placa fase directa del compuesto purificado de la fracción HL-28 en un sistema de elución AcOEt: MeOH:H2O 50:13:10; a) Luz Uv 254 nm; b) Placa revelada con ácido súlfurico al 5% y vainillina. 40
Figura 21. Posibles estructuras compatibles con el espectro presentado. 42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción Taxonómica de la Especie *H. lancioides* Cuatrec 18
Tabla 2. Rendimiento de los extractos vegetales. 33
Tabla 3. Unión de fracciones de la CC de extracto de AcOEt 33
Tabla 4. Comparación de los datos obtenidos de 13C RMN Quercetina 3-O-β-D galactopiranosido. 37
Tabla 5. Resultado de la actividad antioxidante. 39

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AcOEt MeOH-H_2O	Acetato de etilo- Metanol- agua
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CCFP	Cromatografía de capa fina preparativa
cm	centímetros
Cl_2H_2	Diclorometano
DMSO	Dimertil-sulfoxido
DPPH	Compuesto químico orgánico: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (pruebas de oxidación)
g	gramos
HL-26	Fracción de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec código 26
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar.
MeOH	Metanol
MeOH-H_2O	Metanol- Agua
ml	mililitros
mm	milímetros
mg	miligramos
Nm	nanómetros
Ppm	Partes por millón.
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UV	Ultravioleta
µg	Micro gramos

µL	Micro litros.
µMolET/mg Ex	micromoles equivalentes de Trolox por miligramo de extracto
^{13}C RMN	Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13
^{1}H RMN	Resonancia Magnética Nuclear del Protón

RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio es el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec. El aislamiento de dichos compuestos se realizó a partir del extracto de Acetato de etilo, el cual presentó en cromatografía de capa fina (CCF) mejor separación de compuestos, se utilizaron diversos disolventes en proporciones con polaridad ascendente, las fracciones resultantes fueron purificadas mediante Cromatografía en columna y usando cromatografía de capa fina preparativa.

La elucidación de la estructura de los compuestos aislados se realizó por medio de técnicas espectroscópicas de RMN (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR), llegando a identificar un flavonoide glicosilado conocido como quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido con fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{12}$, y un posible compuesto derivado del ácido cinámico cuya identidad aún no ha sido establecida completamente.

Se determinó la actividad antioxidante del compuesto aislado quercetina 3-O-β-Dgalactopiranosido, usando el método DPPH. A partir de este resultado, se puede sugerir que este compuesto puede ser un antioxidante potencial.

PALABRAS CLAVES: *Hypericum lancioides* Cuatrec, metabolitos secundarios, quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The main objective of this study is the isolation and identification of secondary metabolites of *Hypericum lancioides* Cuatrec species. The isolation of these compounds was performed from ethyl acetate extract, which occurs in thin layer chromatography (CCF) better separation of compounds, various solvents were used in proportions with ascending polarity, the resulting fractions were purified by using micro columns and preparative chromatography.

The elucidation of the structure of the isolated compounds was performed by NMR spectroscopic techniques (^{1} H-NMR, ^{13}C-NMR), Identifying a flavonoid glycosylated known as quercetin 3-O-β-D-galactopyranoside with molecular formula $C_{21}H_{20}O_{12}$, and a possible cinnamic acid compound whose identity has not yet been fully established.

The antioxidant activity of the compound isolated is determined quercetin 3-O-β-Dgalactopyranoside, using the DPPH method. From this result, it may suggest that this compound may be a potential antioxidant.

KEYWORDS: Hypericum lancioides Cuatrec, β-D-galactopyranoside 3-O-secondary metabolites, quercetin, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales y sus productos derivados, han sido utilizados en la medicina tradicional desde tiempos antiguos. En la actualidad son cada vez más valiosos como materia prima, por ejemplo en la preparación de medicamentos modernos, para la industria farmacéutica y herbal, cuyo mercado igualmente significativo, sigue una tendencia hacia un aumento importante (Buitrón, 1999). 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 emplean el uso de extractos de plantas o sus principios activos. (Shrestha y Dhillion, 2003; Katewa, Chaudhary & Jain, 2004).

En la medicina moderna gran parte de especies medicinales y sus productos derivados, juegan un papel importante, por lo que la ciencia moderna analiza y estudia los efectos terapéuticos de las plantas, con el objetivo de comparar, precisar y clasificar las diversas propiedades de las mismas, no para repercutir en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares o mediante un marcador químico común, para conocer los principios activos responsables de las curas de enfermedades, de esta forma determinar sus estructuras químicas y procurar su síntesis (Lock, 1994).

El origen de la biotecnología, la bioingeniería y la aparición de nuevas demandas en la terapia humana, han promovido el surgimiento del desarrollo de técnicas de separación y aislamiento (técnicas cromatografías) e identificación. El desarrollo alcanzado en las técnicas de aislamiento e identificación de productos y el nivel de las investigaciones mundiales hacen que el área de los productos naturales sea de mayor crecimiento dentro del campo de la química orgánica (Brizuela, García, Pérez, & Mansur, 1998).

En el Ecuador las plantas se emplean en diferentes usos, destacando que muchas de las especies tienen mútiples usos. En el libro “Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador” se registran 3000 especies de plantas medicinales (De la Torre, Balslev, Navarrete, & Macía, 2008).

Basados en este contexto el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja se ha enfocado en el estudio fitoquímico de la especie ***Hypericum lancioides*** **Cuatrec** de la familia Hypericaceae distribuidas en la región Sur del Ecuador.

La presente investigación “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec” pretende aislar e identificar metabolitos secundarios para ampliar nuevos conocimientos, los mismos que sirvan para el avance tanto de la medicina tradicional y moderna.

CAPITULO I
FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. Fin del Proyecto.

Contribuir con la valorización fitoquímica de la especie vegetal ***Hypericum lancioides* Cuatrec** por medio de aislamiento de metabolitos secundarios, que poseen actividad biológica y que ayude a ampliar las fuentes de información de la familia Hypericaceae con resultados comprobados, cuyos principios activos puedan servir de precursores para síntesis de nuevos fármacos.

1.2. Propósito del Proyecto.

Aislar e identificar metabolitos secundarios de la especie ***Hypericum lancioides* Cuatrec** por medio de métodos cromatográficos y espectrométricos.

1.3. Componentes del Proyecto.

En la presente investigación se pretende obtener los siguientes resultados:

- Aislamiento de metabolitos secundarios usando cromatografía en columna y posteriormente la purificación de los compuestos obtenidos mediante técnicas de microcolumnas.

- Identificar los metabolitos aislados mediante técnicas espectroscópicas: RMN (Resonancia Magnética Nuclear) o MS (Espectroscopia de Masas).

- Evaluar la actividad antioxidante del extracto de estudio o metabolitos aislados

CAPITULO II
MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes.

Es importante reconocer que las culturas ancestrales han aportado a las ciencias médicas durante décadas, con conocimientos aplicados durante siglos en el tratamiento de enfermedades, es por ello que no se puede desconocer que la medicina tradicional tiene su razón de existir, que es la vida misma de la humanidad, convirtiéndose entonces en el punto de partida para que la conjugación de Ciencia y Tecnología pueda ayudar a descubrir las propiedades terapéuticas de las plantas y atesorar cognoscitivamente a las ciencias de la salud (Salas, 2012)

Las plantas siempre han sido un recurso para la supervivencia del hombre ya sea como alimento o para mitigar dolencias, convirtiéndose las plantas entonces en un elemento primordial en la vida del ser humano, toda vez que cada planta tiene propiedades que son utilizadas por las personas, es por ello que el hombre ha logrado identificar estas características, conocimiento que ha sido trasmitido de generación en generación a través de la historia de la humanidad (Hernández & Gally Jordá, 1981)

Se utilizan aproximadamente en el mundo diez mil especies vegetales con fines medicinales (García & Díaz, 2012). La OMS estima que casi el 80% de todos los habitantes de la tierra, confían en medicinas tradicionales para resolver sus principales necesidades de salud ya que en ellas han encontrado propiedades curativas que les han permitido el alivio de sus dolencias y malestares (Villar & Villavicencio, 1992).

Tanto la medicina tradicional, complementaria y alternativa están recibiendo interés en cuanto a la provisión de atención sanitaria y la reforma del sector salud. Entre las formas de medicina tradicional se destacan la medicina tradicional china, el ayurveda, hindú, la medicina unani árabe y la medicina indígena (Oms, 2002).

2.2. Plantas Medicinales.

La Organización Mundial de la salud (OMS), define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contienen sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para síntesis de nuevos fármacos (Farnsworth, Akerele, Bingel, Soejarto, & Guo, 1985).

Las plantas medicinales se caracterizan por contener principios activos, las mismas que son sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre los seres vivos, su estructura química puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas (Oliveira,

Velázquez, & Bermúdez, 2005). Los principios activos de las plantas según su estructura pueden ser:

- Heterósidos: Antraquinónicos, Cardiotónicos, Cianogénicos, Cumarínicos, Fenólicos, Flavónicos, Ranunculósidos, Saponósidos, Sulfurados.
- Polifenoles: Ácidos fenólicos, Cumarinas, Flavonoides, Lignanos, Taninos, Quinonas.
- Terpenoides: Aceites esenciales, Iridoides, Lactonas, Diterpenos, Saponinas Alcaloides. (Pérez, 2008).

2.2.2 Formas de uso de plantas medicinales.

Las plantas medicinales se pueden preparar de varias maneras dependiendo de los usos que se les vaya a dar ya sea de manera interna o externa, del padecimiento que se vaya a curar y de las particularidades de las plantas, puesto que cada parte que la conforman reúnen principios activos únicos (Hogesteger, 1994).

Las formas de uso pueden ser:

- **Infusión.-** Consiste en verter la parte de la planta fresca o seca que se va a utilizar en agua caliente, dejar reposar de 5 a 20 minutos, pudiendo agregarle dulce al gusto.
- **Decocción.-** Se hierbe el agua conjuntamente con la planta por un período de 5 a 10 minutos a fuego lento.
- ***Maceración.-*** Se pone en una taza de agua fría las hierbas a utilizarse y se deja reposar de 8 a 12 horas, a la temperatura ambiente, se la puede tomar fría o ligeramente tibia.
- ***Compresas.-*** Se hierbe las hierbas secas o frescas, en esta agua se moja un trozo de tela preferible de algodón, se escurre lo suficiente y se coloca en la parte afectada, el proceso se puede repetir varias veces.
- ***Cataplasmas***.- Es un tratamiento tópico de consistencia blanda y, normalmente, caliente Consiste en obtener una pasta de hierbas que es colocada en una tela que se aplica sobre la parte del cuerpo afectada, tiene varios efectos medicinales; especialmente como calmante, antiinflamatorio o emoliente, así como también en tratamientos de estética.

- Si la hierba es fresca se la puede triturar directamente, o puede hervirse en agua para luego ser machacada con un mortero o algún instrumento que permita hacerlo.
- Si la planta es seca se tritura hasta obtener polvo, a este se lo mezcla con agua hasta formar la pasta requerida (Hogesteger, 1994).

2.2.1. Ecuador y las plantas medicinales.

Ecuador es un país mega diverso ya que posee una marcada riqueza biológica, debido a que se encuentra en la línea ecuatorial, la presencia de los Andes y el hecho de que sus costas den hacia el océano Pacífico y reciban la influencia de dos corrientes: corrientes marinas fría de Humbolt al sur del país y cálida del Niño al norte, así como de los vientos que combinados generan una gran variedad de regímenes climáticos (Varea, 2004). Así como también diversidad de especies vegetales con acción terapéutica (Ordoñez et. al., 2006). El 30 % de la población ecuatoriana pertenece a grupos indígenas, que ha mantenido sus tradiciones ancestrales especialmente en el uso de plantas medicinales, conocimiento que se ha trasmitido de generación en generación (Tene et al., 2007).

Por la existencia en diversidad de ecosistemas, Ecuador se considera uno de los países de alta variación biogeográfica en el concierto mundial, razón por la cual determina que el país mantenga el mayor número de plantas por unidad de área (Barrantes, Chávez & Vinueza, 2001). Actualmente existen más de 17 000 plantas vasculares, de las cuales hasta el año 2000 se han registrado 4011 especies endémicas, lo cual representa aproximadamente un 26% de su flora nativa (Ulloa Ulloa & Neill 2005, Jørgensen et al. 2006, Aguirre, 2002). También 148 familias y 744 géneros de plantas vasculares que incluyen especies endémicas, lo que representa el 58,3% de todas las familias y el 35,3% de todos los géneros nativos del país (Valencia et al., 2000).

En cuanto a las especies endémicas representativas en el país, el número más alto de especies lo ostenta Pleurothallis, seguido por Lepanthes, Anthurium, Masdevallia, Epidendrum, Miconia, Piper, Peperomia, Elaphoglossum y Maxillaria. Es notorio que el género de helechos Elaphoglossum esté entre los géneros con más alto nivel de endemismo; el alto endemismo es una característica qu{e normalmente no se observa en las pteridofitas. De acuerdo a investigaciones la flora Ecuatoriana, se encuentra distribuida en las tres regiones geográfica de la siguiente manera: en la Región Sierra se encuentra la mayor diversidad de especie vegetal con 64,4% del total de flora en el país, mientras que en la Región Amazónica con el 31,7% y la Región de la Costa el 29,2%. En Galápagos solamente representa el 4,6% (Jorgensen y León, 1999).

De las especies de plantas que se utilizan en nuestro país, el 60% son medicinales, el 55% son fuente de materiales como los usados para construcción, el 30% son comestibles y el 20% son utilizadas en ritos religiosos y prácticas similares. La suma de estos porcentajes sobrepasa el 100%, lo que expresa que muchas de las especies tienen una infinidad de usos (De la Torre et al., 2008).

2.3. Descripción Botánica.

2.3.1. Familia Hypericaceae.

La familia Hypericaceae consta de 9 géneros con 560 especies (Plazas, 2012). La distribución de esta familia es cosmopolita, se distribuye principalmente en zonas tropicales y templadas del mundo, mejor representada en los páramos, montañas de neotrópico y zonas templadas (Ortega, 2000).

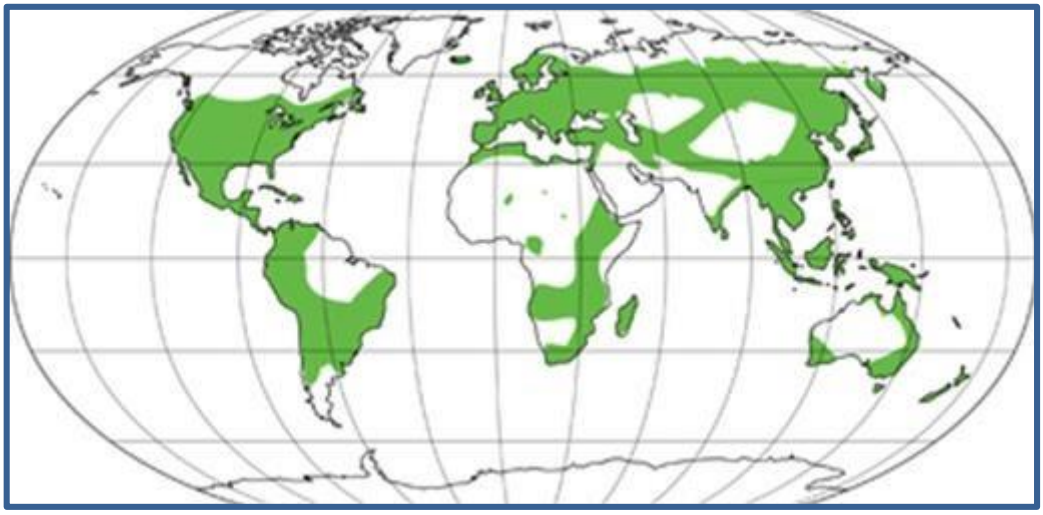


Figura 1. Distribución mundial de la familia Hypericaeae (color verde indica ubicación de la familia Hypericaeae)
Fuente: (Bonifacino & Rossado, 2015).

La familia Hypericeae anteriormente era conocida como Guttifereae, la cual fue segregada de la familia Clusiaceae. Los caracteres que la diferencian de Clusiaceae son principalmente la presencia de androceo fasciculado, anteras pequeñas y estilos libres (J. L. Martínez & Castillo, 2008).

Generalmente son arbustos, hierbas anuales, perennes o arbolitos de mediano tamaño y lianas, poseen aceites y resinas de color amarillo intenso; sus hojas pueden ser opuestas, simples, verticiladas con márgenes enteros y puntos glandulares; sus flores reunidas en inflorescencias terminales, en panículos, umbelas y cimas, dispuestas en cimas dicasiales o solitarias, pétalos amarillos; con estambres numerosos, libres o unidos en la base, a

menudo fasciculados en 4-5 haces; su fruto se puede presentar en cápsula septicida, baya o drupa; y presenta numerosas semillas (FACENA, 2001).

Los géneros más representativos de la familia son: *Hypericum, Vismia, Harungana.* El género más extenso es el género *Hypericum* (Plazas, 2012).

2.3.2. Género *Hypericum*.

El género *Hypericum* consta de 400 especies, presentando un amplio rango de hábitos desde arbóreos a herbáceos. Tiene una distribución cosmopolita, pero es más diverso en las regiones templadas y en las montañas tropicales (González, 1995). En el Ecuador En el Catálogo de plantas vasculares de Ecuador, estudio realizado por Jorgensen Moller & León- Yánez (1999), en el Ecuador existen 22 especies de este género, de las cuales 8 son endémicas.

Figura 2. Especies género *Hypericum.*

Fuente: (Nicholls, 2015).

Según Plazas (2012), explica que este género presenta hojas opuestas, ovales, de 1 - 8 cm de longitud. Las flores varían de amarillo pálido a intenso, con un diámetro de 0.5 - 6cm, y el fruto generalmente presenta una cápsula seca con semillas numerosas y pequeñas.

El género *Hypericum* son hierbas o arbustos cuyas flores son hermafroditas o unisexuales con cáliz y corola formados por 4 o 5 piezas. Las semillas, más o menos numerosas frecuentemente llevan un arilo (López, 2007).

Plazas, 2012, puntualiza que de acuerdo a estudios fitoquímicos realizados, del género *Hypericum* se han identificado mayoritariamente seis tipos de compuestos entre ellos: naftodiantronas, floroglucinoles, flavonoides, biflavonas, fenilpropanos y proantocianidinas.

Adicionalmente, en menor cantidad taninos, xantonas y aceites esenciales.

2.3.2.1. Compuestos del género Hypericum.

Los compuestos comunes del género *Hypericum* son:

Naftodiantronas.- Estos compuestos pueden biosintetizarse por la ruta de la malonilCoa o por la ruta del ácido shikímico conjugada con la de ácido mevalónico (Martinez, 2012). Las Naftodiantronas son característicos del género *Hypericum* ejercen su acción antidepresiva sobre el sistema nervioso. Las naftodiantronas más destacados esta la seudohipericina e hipericina (Vallejo, 2009).

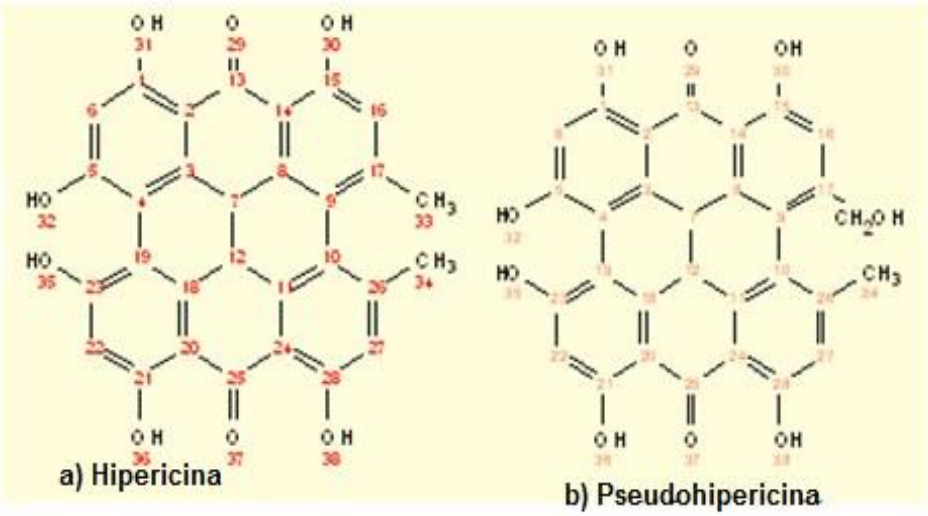


Figura 3. Naftodiantronas comunes en el género *Hypericum.*
Fuente: (Plazas, 2012).
Elaboración: Autora.

En el género *Hypericum* se destacan la seudohipericina e hipericina, sustancias que se acumulan especialmente en las flores. Así como también se encuentran sus precursores protohipericina y protoseudohipericina sustancias que se transforman en hipericina y seudohipericina en presencia de la luz solar, y en pequeñas cantidades de ciclohipericina (Salazar, Peralta, & Pastor, 2009). Estudios comprobados indican que la hipericina posee actividad antidepresiva, además es un fotosensibilizador natural, carácter que le atribuye eficacia para la terapia antitumoral (Amores Sánchez, 2009).

Floroglucinoles.- Debido a que son compuestos poco estables. En el género *Hypericum* se encuentran sus derivados oxidados como la hiperforina y adhiperforina (Salazar, Peralta, & Pastor, 2009).

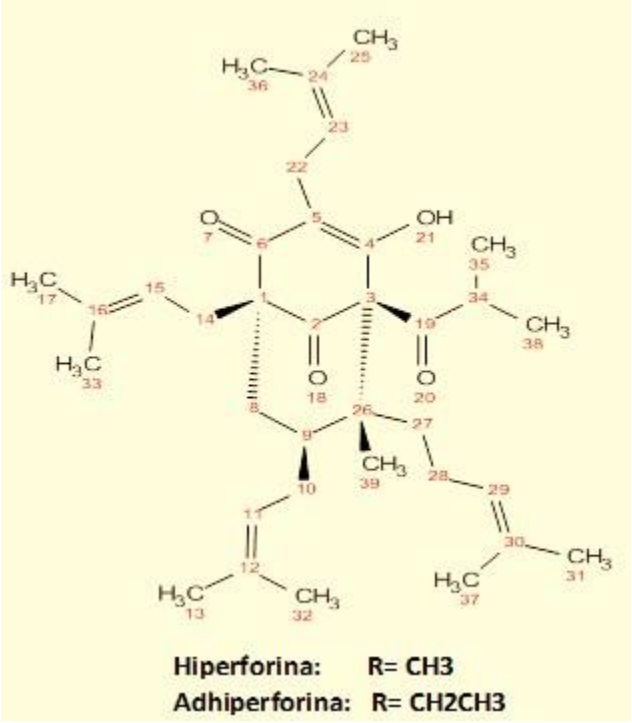


Figura 4. Floroglucinoles Hiperforina y Adhiperforina.
Fuente: (Plazas, 2012).
Elaboración: Autora.

Estudios indican que la hiperforina es uno de los principales compuestos causantes de los efectos antidepresivos de la especie *Hypericum perforatum.* Es un compuesto antidepresivo que inhibe la recaptación de los neurotransmisores como serotonina, y de los aminoácidos neurotransmisores GABA y glutamato. Diferentes grupos de investigación han demostrado recientemente que la hiperforina constituye un potente inhibidor de la angiogénesis, la linfangiogénesis y las metástasis (B. Martínez, Amores, & Medina, 2006)

Flanovoides.- Son compuestos abundantes en la naturaleza, que sirven para atraer a los polinizadores y como co-pigmentos de antocianidinas. Tienen varias actividades biológicas, especialmente el anti-inflamatoria, antibiótico, antitumoral y antioxidante, caracterizados por tener dos núcleos fenólicos unidos por una cadena de tres carbonos (Dourado & Ladeira, 2008).

En la especie más característica del género; *Hypericum cordatum* se han identificado flavonoides como: quercitrina, rutina y kaempferol. Entre los flavonoides más abundantes en este género se encuentran: los glicósidos, hyperósido y ruteina. Según estudios los glucósidos de flavonoide presentaron actividad espasmolítica y también mostraron inhibición de la enzima monoamina oxidasa A, responsable del catabolismo de aminas (Plazas, 2012, Dourado & Ladeira, 2008).

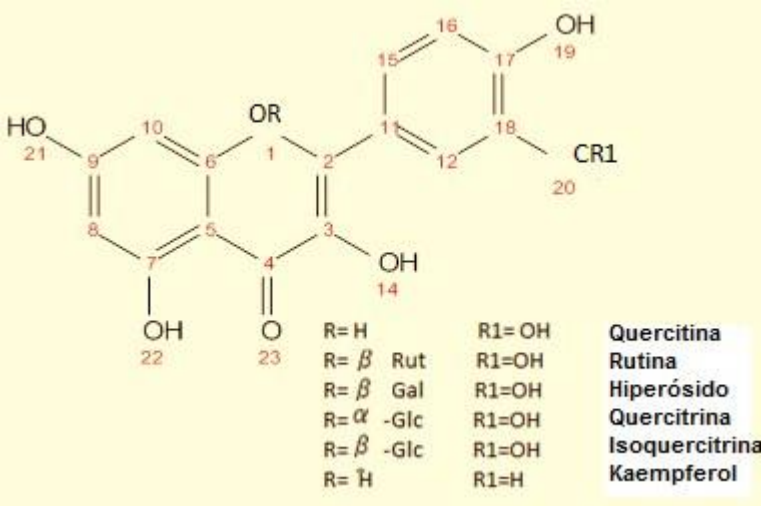


Figura 5. Flavonoides más comunes aislados en el género *Hypericum.*
Fuente: (Plazas, 2012)**.**
Elaboración: Autora

Biflavonas.- Son un grupo poco común de dímeros de flavona, se encuentra en algunas fuentes vegetales. En el género *Hypericum* se aislaron e identificaron tres biflavonas: amentoflavona (0,01-0,05%), I3, II8-biapigenina (0,1-0,5%), diquercetina. Se ha demostrado que poseen actividad anti-inflamatoria (Saddiqe, Naeem, & Maimoona, 2010).

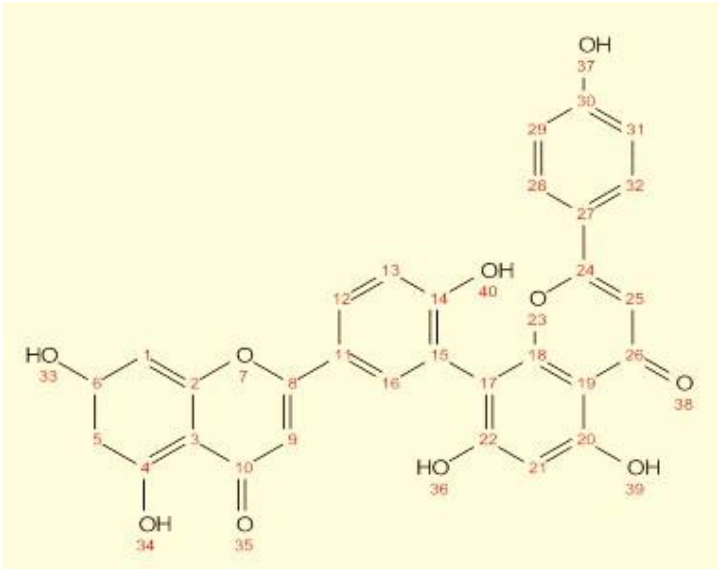


Figura 6. Estructura Amentoflavona.
Fuente: (Plazas, 2012). Elaboración: Autora.

Fenilpropanos.- Estos compuestos se producen principalmente en forma de ésteres de ácidos hidroxicinámico como ácido p-cumárico y ácido cafeico. En el extracto de *H. perforatum* se ha detectado el ácido clorogénico en concentraciones por debajo de 1% (Saddiqe et al., 2010).

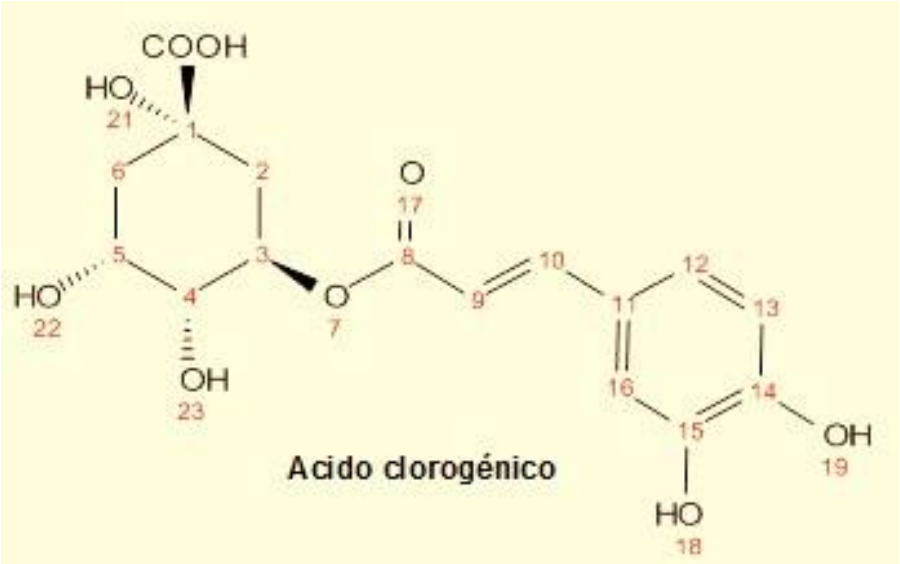


Figura 7. Ácido clorogénico aislado de *Hypercum perforatum.*
Fuente: (Plazas, 2012).
Elaboración: Autora.

Xantonas.- A partir de algunas especies del género se ha logrado aislar en baja cantidad algunas xantonas como manguiferina y kielcorina C con rendimientos de 0,01% (Plazas, 2012).

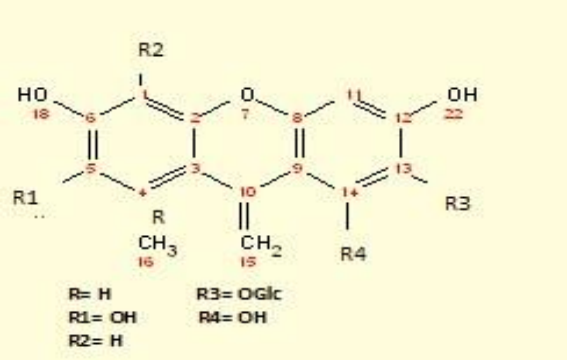


Figura 8. Estructura de la xantona.
Fuente: (Plazas, 2012).
Elaboración: Autora.

2.3.2. Especie *Hypericum lancioides* Cuatrec*.*

La especie *Hypericum lancioides* Cuatrec pertenece a la familia Hypericaceae, género *Hypericum.* En Ecuador se encuentra en la provincia de Carchi, Cotopaxi Imbabura, Loja, Napo, Pichincha. Es un arbusto nativo que se encuentra a una altitud entre 2500 – 4500 m.s.n.m., su hábitat comprende paramos, pajonal, suelos arenosos y con bastantes líquenes (Moller, Peter, & Yánez, 1999).

Esta especie es utilizada comúnmente por la etnia kichwa de la sierra. Su nombre común es Bura bura, bura bura killu, es utilizada como leña. La etnia kichwa de la Sierra - Loja además de usar como leña, utizan la flor para teñir la ropa (De la Torre et al., 2008).

Figura 9. Imagen especie *Hypericum lancioides* Cuatrec
Fuente: (Romero, 2013)

Robson (1987) citado por (Vivas, 1999) indica que esta especie son arbustos ramificados apicalmente generalmente de color verde, aproximadamente mide de 40-50 cm, los tallos

varía de color marrón rojizo a naranja; presenta hojas opuestas, lineares, sésiles, con puntuaciones translúcidas su ápice acuminado. Sépalos 5, lanceolados; pétalos 5.

A continuación en la tabla 1 se describe la taxonomía de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec.

Tabla 1. Descripción Taxonómica de la Especie *Hypericum* **L** *ancioides* Cuatrec,

Reino	Hypericaceae
División	**Magnoliophyta**
Clase	**Magnoliopsida**
Orden	Malpighiales
Familia	Hypericaceae
Género	***Hypericum***
Especie	***Hypericum lancioides* Cuatrec.**

Fuente: (SIB, 2015)

Elaboración: Autora.

2.3.2.1. Estudio de la especie Hypericum lancioides Cuatrec.

Según estudios en cromatografía de gases, el aceite esencial del *Hypericum lancioides* Cuatrec está compuesto principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos y terpenoides. En el estudio realizado a partir del aceite esencial se identificaron 31 compuestos. Entre los compuestos mayoritarios fueron: limoneno, nonano, óxido de cariofileno, alfa pineno, undecano (Romero, 2013).

2.4 Metabolitos Secundarios.

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas para la síntesis de sustancias complejas a partir de otras más simples. Las plantas que son organismos autótrofos, presentan dos tipos de metabolismo que son; el metabolismo primario presente en todos los seres vivos y el metabolismo secundario que les permite producir y acumular

compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios (Ávalos & Elena, 2009)

La síntesis activa de los metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microrganismos: virus, bacterias y hongos, la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepulveda, Porta, & Rocha, 2003).

Se conocen aproximadamente 20.000 estructuras de metabolitos secundarios. De acuerdo a su estructura se pueden clasificar en dos grandes grupos: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. La diferencia estructural de un mismo grupo está determinada por modificaciones químicas a una estructura básica (Sepulveda et al., 2003).

2.4.1. Importancia de los metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios de las plantas, a lo largo de la historia siguen siendo utilizados por la humanidad siendo una fuente ilimitada de compuestos químicos, que desde hace muchos años han sido explotados por el hombre (Torres, 2004).

Hoy en la actualidad pocos metabolitos son utilizados para la industria, por lo que se ha originado la necesidad de generar opciones y alternativas de producción enfocadas al uso sostenible de todos aquellos recursos vegetales disponibles en el entorno, trabajando activamente en la identificación y caracterización de sustancias producidas por diferentes especies promisorias que puedan tener aplicación en la industria tanto cosmética, farmacéutica, textilera y agroalimentaria (Torres, 2004).

2.4.2. Clasificación de los Metabolitos Secundarios.

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o no de nitrógeno en su composición, no obstante, los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides, fenilpropanoides (o compuestos fenólicos) y los alcaloides (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura) (Sepulveda et al., 2003).

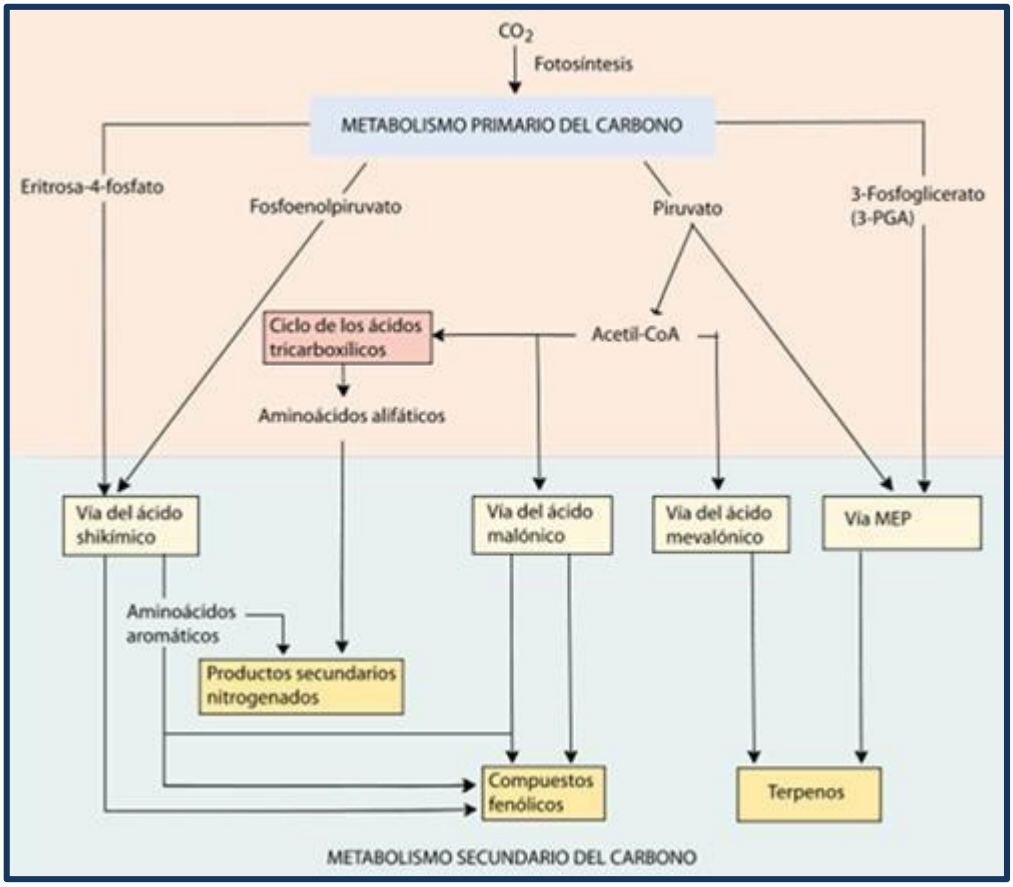


Figura 10. Vías del metabolismo secundario de las plantas que producen los tres tipos generales de compuestos secundarios: productos nitrogenados, productos fenólicos, y terpenoides.
Fuente: (Taiz & Zeiger, 2010)

2.5. Métodos Cromatográficos.

La palabra cromatografía se debe al botánico Miguel Tswet quien en 1906 separó una mezcla de colorantes vegetales, disuelta en hexano, mediante una columna de carbonato cálcico; debido a que aparecieron varios anillos de colores llamó al método cromagrafía. Actualmente los métodos cromatográficos son técnicas que se usan comúnmente en los laboratorios de Química (Primo, 2007).

La cromatografía permite separar los compuestos de una mezcla por sus diferencias de retención en una fase fija y de elución por un fluido que la atraviesa. Las diferencias de retención se deben a afinidades de adsorción, de solubilidad en un medio fijo o de fijación por enlaces iónicos; las diferencias de elución se deben, principalmente, a la mayor o menor solubilidad en el disolvente que circula, o en su volatilidad si se pasa un fluido gaseoso. Las fases cromatográficas comprende: la fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria, arrastrando con ella a los compuestos de la mezcla; la fase estacionaria

en la cual están retenidos los componentes de la muestra, y a través de la cual fluye la fase móvil (Primo, 2007).

Entre los diversos tipos de clasificación de cromatografía, uno de ellos se basa en la forma en que las fases, móvil y estacionaria, se ponen en contacto, de modo que podemos distinguir dos tipos de cromatografía, plana, cuando la fase estacionaria se deposita sobre una superficie abierta, que puede ser papel, lámina den plástico, vidrio o metal; y en columna, cuando la fase estacionaria se deposita en el inferior de un tubo estrecho o columna que puede ser de vidrio, acero, sílice fundida, etc. (Gómez, Sierra, & Peréz, 2009).

2.5.1. Cromatografía en columna.

La cromatografía en columna es una técnica de separación de compuestos que consta de la fase estacionaria y fase móvil. Donde la fase estacionaria es por lo general pequeñas partículas de sílice, SiO_2, o alúmina, Al_2O_3. Estas sustancias no son muy reactivas y tienen superficies especialmente preparadas para incrementar su capacidad de absorber solventes

La columna está saturada con solvente y se vierte un pequeño volumen de solución que contiene solutos sobre la parte superior. Los solutos se desplazan hacia abajo lentamente a lo largo de la columna y se eluyen en la parte inferior. Se debe tomar en cuenta si la fase móvil es menos polar que la estacionaria, los solutos menos polares serán eluidos primero y los más polares en último lugar (William & Jones, 2006).

2.5.2. Cromatografía de capa fina.

Esta consta de un sistema de dos fases, una sólida o fase estacionaria que se emplea en forma de capa delgada, absorbente, comúnmente de entre 0.10 a 0.25 mm para fines analíticos y en los casos que se necesite aislar un compuestos, el grosor puede ser entre 0.5- 2.0 mm. Esta capa es adherida a una placa o lámina firme de vidrio, aluminio o plástico que funciona como soporte. A través de la fase estacionaria transita un líquido o solvente que actúa como fase (Guarnizo & Martínez, 2009).

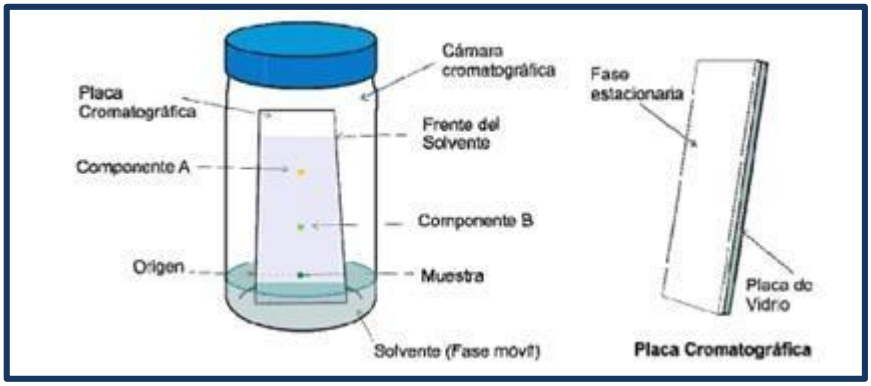


Figura 11. Montaje típico para cromatografía en capa fina TLC. Cámara cromatográfica, placa cromatográfica, fase móvil y fase estacionaria colocada sobre la placa de vidrio que actúa como soporte.
Fuente: (Guarnizo & Martínez, 2009).

2.5.3. Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP)

La cromatografía de capa fina preparativa se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1- 2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio. Se utiliza para la separación y aislamiento de los componentes de una mezcla en cantidades comprendidas entre 10-15 mg. En la superficie del adsorbente (gel de sílice), mediante una pipeta Pasteur, se traza una línea continua con la muestra disuelta y se introduce la placa en posición vertical en una cubeta. Durante la elución debe permanecer tapada para evitar la evaporación del disolvente, y para que todo el ambiente sea semejante (Hernández Pérez, 2005).

Una vez que se han separado los productos que componen la muestra, se marca con una cuchilla el contorno del compuesto a aislar y con ayuda de una espátula se desprende del soporte de vidrio el gel de sílice con el compuesto adsorbido. Una vez transferido a un erlenmeyer se añade un disolvente en el cual sea soluble el producto, se filtra el gel de sílice y una vez eliminado el disolvente tenemos el producto puro (Hernández Pérez, 2005).

2.5.4. Factor de retención (Rf)

El factor de retención es el cociente de dividir el recorrido de la sustancia por el disolvente, que representa, la distancia media desde el origen hasta el centro de la mancha dividido para la distancia media desde el origen hasta el frente del disolvente. El Rf es constante para un componente dado y se determina de la siguiente fórmula (Gallego, Garcinuño, & Morcillo, 2015).

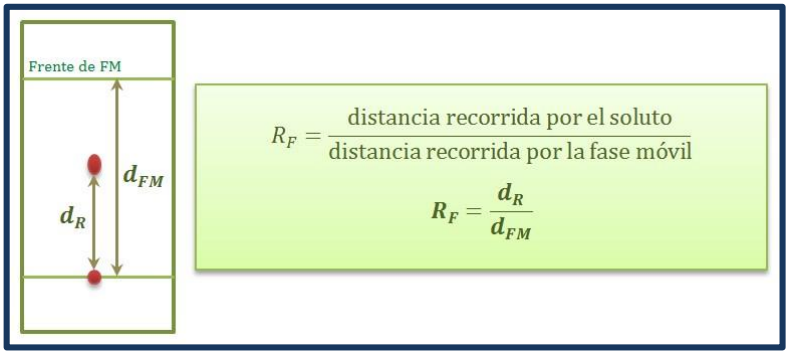


Figura 12. Fórmula para determinar el factor de retención.
Fuente: (Gallego et al., 2015).

2.6. Identificación de metabolitos secundarios.

2.6.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La espectrometría de resonancia Magnética Nuclear (RMN), junto con la espectrometría de masa y la espectrometría de infrarrojo, son de gran importancia en la determinación de la estructura molecular de compuestos orgánicos y macromoléculas tanto bioquímico como sintéticas (Valcárcel Cases & Gómez Hens, 1988).

La técnica espectroscópica más valiosa es la Resonancia Magnética Nuclear. Las espectroscopias RMN del protón (RMN ^{1}H) y del carbono (RMN ^{13}C) son las primeras técnicas de búsqueda a la cual es sometida la muestra. Las pruebas NOESY, COSY y DEPT, brindan más información estructural (Sotomayor, 2015).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) consiste en medir la absorción de radiación de radiofrecuencia que experimenta una muestra situada en un campo magnético fuerte. Los campos magnéticos son altos; los instrumentos más sofisticados utilizan algunos de los campos magnéticos estables más altos que se pueden generar. Actualmente los espectrómetros de RMN trabajan a 200,300, 400, 500 y 600 Hz (Rubinson & Rubinson, 2001). Las espectroscopias RMN del protón (RMN ^{1}H) tiene un número de señales equivalente a los diferentes tipos de átomos de hidrógeno de la molécula, mientras que el espectro de carbono (RMN ^{13}C), nos proporciona información sobre los diferentes tipos de átomos de carbono de la molécula. Los dos espectros juntos nos permiten determinar la conectividad de una molécula (Ege, 2008).

El comportamiento de los núcleos en el campo magnético puede verse influido por distintas maneras, para dar diverso tipo de información, pero la información básica que se obtiene es:

- Desplazamiento: que se define como la frecuencia a la que sale cada núcleo en concreto
- Integral: Es el número de núcleos de cada tipo
- Multiplicidad: Número y disposición de los núcleos próximos (Medarde, Peláez, & Álvarez, 2010).

2.7. Actividad Antioxidante.

Los Antioxidantes son compuestos que retrasa o previene el deterioro, daño o destrucción provocados por una oxidación. Por otro lado, los prooxidantes son especies muy reactivas de radicales libres o especies reactivas de oxígeno que se hallan en los sistemas biológicos y provienen de una extensa variedad de fuentes (Carocho & Ferreira, 2013; Youngson, 2003).

Los antioxidantes se dividen en dos clases que son: sintéticos y naturales. Los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides así como el ácido ascórbico. Muchos antioxidantes naturales, en especial los flavonoides, muestran un amplio rango de efectos biológicos incluyendo funciones antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialergénicas, antitrombóticas y vasodilatadores (Muñoz Juárez & Gutiérrez, 2004)

La actividad antioxidante y su relación con la propiedad curativa de una gran cantidad de plantas medicinales han sido obtenidas en diversas investigaciones (Carocho & Ferreira, 2013). Para dichas investigaciones existe muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, un método muy utilizado se fundamente en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm (Molyneux, 2004).

CAPITULO III
METODOLOGÍA

La parte experimental de la presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja. El esquema general de trabajo "Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec." se muestra a continuación.

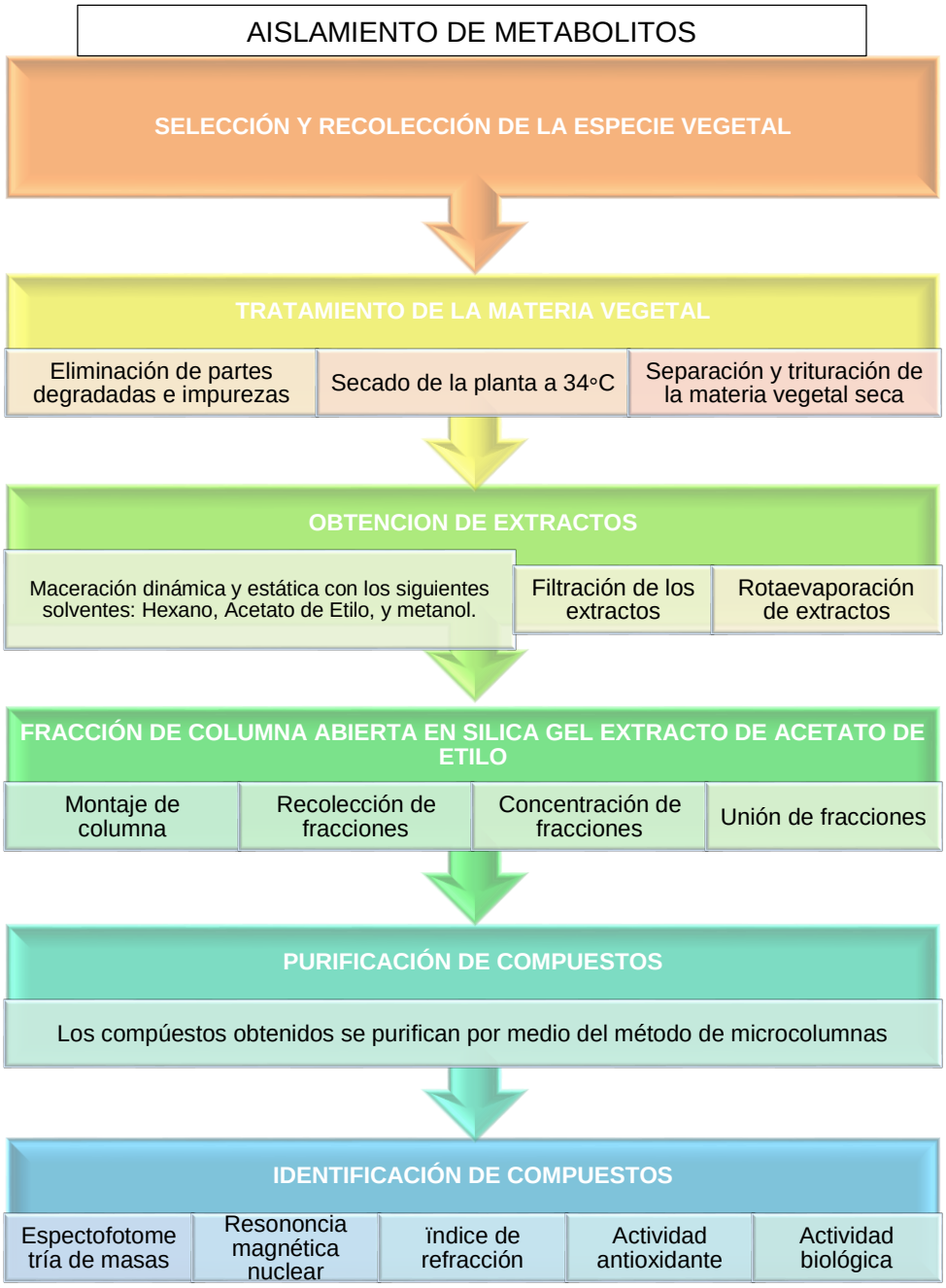


Figura 13. Esquema de la metodología utilizada.

Fuente y elaboración: Autora

3.1 Recolección del material vegetal.

La materia vegetal (hojas) de *Hypericum lancioides* Cuatrec se recolectó en el sector perteneciente al cantón Saraguro, provincia de Loja, con las siguientes coordenadas 17697649E-9590439N y una altitud de 3200 m.s.n.m. Un ejemplar de la muestra se encuentra depositado en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con el código de voucher PP-hy-001.

Figura 14. Mapa físico de Loja.
Fuente: Dirección de Planificación, 2009

3.2. Tratamiento de la materia vegetal *Hypericum lancioides* Cuatrec.

Posteriormente de la recolección de la materia vegetal, se procedió a la selección de la planta en buen estado, eliminando partes deterioradas e impurezas no pertenecientes a la especie, que pudieran interferir con el análisis. Subsiguientemente la material vegetal fue sometida a la cámara de secado a una temperatura aproximada de 34 °C durante 7 días, con el objetivo de eliminar la mayor parte de agua contenida en las hojas. El siguiente paso una vez obtenido el material vegetal seco es la trituración uniforme de las hojas.

3.3. Obtención de extractos de *Hypericum lancioides* Cuatrec*.*

Para la obtención de los extractos se procedió a la maceración tanto dinámica y estática con un peso de 372.73 g de muestra seca, este proceso se realizó de 2-4 horas en maceración dinámica varias veces hasta obtener una extracción completa. Para la extracción se emplearon tres disolventes, los mismos que fueron de acuerdo al orden creciente de polaridad: (diclorometano CH_2Cl_2, acetato de etilo AcOEt, y metanol MeOH).

Posteriormente se filtró al vacío, para separar el residuo vegetal del líquido extraído y luego con ayuda de un rotaevaporador de marca BUCHI modelo R 210, a temperatura de 30 °C a presión reducida se concentró el extracto hasta total eliminación del disolvente.

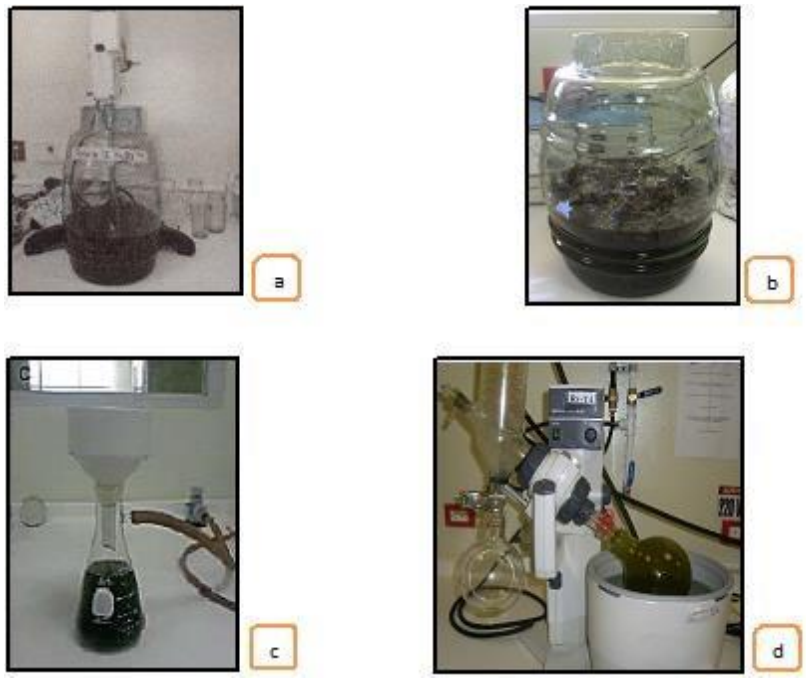


Figura 15. Obtención de extractos: a. Maceración dinámica, b. Maceración estática, c. Filtración, d. Rotaevaporación.
Fuente y elaboración: Autora.

3.4. Fraccionamientos en Cromatografía de columna (CC) de extracto de Acetato de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec*.*

El Fraccionamiento en CC se trabajó con el extracto de AcOEt de la especie en estudio, ya que presentó en cromatografía de capa fina (CCF) una mayor riqueza de metabolitos y mejor separación de los mismos. Las columnas húmedas se montaron con sílica gel la cual se suspendió en disolvente, a presión constante hasta alcanzar una compactación óptima. Para lo cual se utilizó sílica gel (Merck 0.015-0040 mm de diámetro), en una columna de vidrio de 55 mm de diámetro por 60 cm de altura.

El extracto a sembrar fue mezclado con una pequeña cantidad de sílica gel, suspendida en Hexano hasta formar una matriz homogénea. Se sembró 5 g de extracto de AcOEt para su fraccionamiento en cromatografía de columna (CC), esto en una relación extracto- sílice (1:50). Para la elución se utilizó sistemas de disolventes de polaridad creciente Hexano 100%, Hexano-AcOet (95:5), cambiando cada 5 de polaridad hasta llegar a AcOet (100%), AcOet-MeOH (95:5) hasta llegar a MeOH (100%).

Figura 16. Cromatografía en Columna (CC), extracto de Acetato.
Figura: Autora

3.5. Cromatografía en capa fina (CCF).

Las fracciones obtenidas de la cromatografía se recolectaron en volúmenes de 200 ml, a los cuales se etiquetó tomando en cuenta la elución en los diferentes solventes; subsiguientemente se evaporó el solvente de las fracciones con ayuda del rota evaporador y se realizó placas de cromatografía de capa fina CCF, para lo cual se utilizó placas de aluminio cubiertas de sílice gel 60 $_{F254}$ (fase directa), con el fin de observar la separación de los compuestos, que puede ser visualizada mediante una lámpara de luz UV de 254 y 365 nm y reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

3.6. Unión y purificación de fracciones.

Para la unión de las fracciones se tomó en cuenta la similitud del perfil cromatográfico y la similitud visual que estas reflejaron ante la luz UV de 254 y 360 nm y reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina. Se procedió a purificar mediante columnas cromatográficas, con

Sílica gel 60 (Merck 0.0015- 0040 mm), y sílica fase inversa RP-18, con el mismo procedimiento de la CC. Así mismo se purificaron mediante la técnica de cromatografía de capa fina preparativa, para la cual, se utilizó placas de aluminio de sílica gel 60 $_{F254}$ (fase directa) de 20 cm de ancho y 10 de longitud.

3.7. Caracterización física de las fracciones.

La caracterización física se determinó mediante: Factor de retención (Rf) y solubilidad.

3.7.1. Factor de retención.

Se calculó el R_f con el fin de localizar los compuestos. Por medio de esta medida se calcula la distancia recorrida de la muestra y por el disolvente desde el lugar de siembra, se calcula de acuerdo a la fórmula descrita anteriormente.

3.7.2. Solubilidad.

Los disolventes empleados para determinar la solubilidad del compuesto aislado fueron: MeOH, DMSO y H_2O.

3.8. Identificación de compuestos.

3.8.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).

El compuesto se disolvió en metanol deuterado (CD_3OD), y se colocó en un tubo de vidrio, para luego ser llevados al equipo. Los espectros de RMN se registraron en un equipo Varian Unity Número de serie 21953, que opera a 400 MHz para RMN ^{1}H y a 100 MHz para RMN ^{13}C. a temperatura 25 °C. Las constantes de acoplamiento se expresan (J) en Hz y el desplazamiento químico en ppm.

3.9 Determinación de la Actividad antioxidante del compuesto.

En este ensayo se evaluó la actividad antioxidante del compuesto aislado, a través del método DPPH, donde se utilizó Trolox como estándar de referencia, el mismo que se desarrolló en el Laboratorio de alimentos, del departamento de química de la Universidad Técnica Particular de Loja; ejecutado por el Ing. Miguel Ángel Meneses.

3.9.1. Método DPPH.

Este método consiste en la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), mismo que tiene un electrón desapareado en solución es de color azul-violeta, tornándose de color amarillo pálido por reacción con una sustancia capturadora de radicales libres. La

actividad antioxidante se cuantifica midiendo la absorbancia a 515 nm. (Bran-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

La presente investigación se realizó basándose en la técnica de Brans- Williams et al., (1995). Se pesó 1 mg de muestra y se disolvió en 10 ml de Metanol G.R. para obtener una concentración de 100 ppm peso/ volumen (p/v), posteriormente a la muestra se la etiquetó con su respectivo código.

Se preparó una solución patrón disolviendo 24 mg de DPPH en 100 mL de metanol, la misma que fue almacenada a -4 °C hasta su uso. La solución de trabajo se preparó mezclando 10 mL de solución patrón con 45mL de metanol hasta obtener una lectura en absorbancia de 1,1 ± 0,02 unidades a una longitud de onda de 515 nm en un espectrómetro UV. Se emplearon curvas estándar de trólox con concentraciones entre 25, 50, 100, 200, 400, 600 y 800 µMoles. De cada concentración de la curva estándar, así como de la muestra HL-26 se tomó 150 µL en un vial, se adicionó 2850 µL de la solución trabajo de DPPH y se dejó reaccionar por 24 horas en la obscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados en µMoles equivalentes de trólox por gramo de muestra seca (µMolET/g Ex). En el Anexo 3 se muestra un esquema detallado de la experimentación.

CAPITULO IV
DISCUSIÓN Y RESULTADOS

De acuerdo a la metodología descrita anteriormente, a continuación se detallan los resultados obtenidos durante el proceso de aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec.

4.1. Obtención de extractos.

A partir de la materia vegetal seca se obtuvieron los siguientes extractos: CH_2CL_2, AcOEt, MeOH, los mismos que presentaron una consistencia semi-solida, con un color verde oscuro, los porcentajes de rendimiento ponderal oscilan entre 0.92, 1.34 y 2.47 respectivamente, siendo el extracto de MeOH el que presenta un mayor rendimiento.

En la tabla 2 se muestra el rendimiento de los extractos obtenidos del proceso de la maceración dinámica y estática con los diferentes disolventes de polaridad ascendente partiendo de la materia vegetal seca.

Tabla 2. Rendimiento de los extractos vegetales.

Muestra Vegetal		Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
Peso muestra vegetal inicial (g)	372.73	CH_2CL_2	3.42	0.92
		AcOEt	5.00	1.34
		MeOH	9.42	2.47

Fuente y elaboración: Autora.

4.2. Fraccionamiento en Cromatografía de columna (CC) del extracto de Acetato de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec.

Del fraccionamiento en CC del extracto de AcOet de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec se obtuvieron 300 muestras, las cuales se agruparon en 29 fracciones, de acuerdo al perfil cromatográfico que presentaron en la cromatografía de capa fina (CCF) (Tabla 3).

Tabla 3. Unión de fracciones de la CC de extracto de AcOEt

Unión de muestras	Fracciones
1-8	HL-1
9-10	HL-2
12-15	HL-3
16-18	HL-4

19-20	HL-5
21-24	HL-6
25	HL-7
26-32	HL-8
33	HL-9
34-37	HL-10
38-46	HL-11
49-51	HL-12
52-69	HL13
70-102	HL-14
103-105	HL-15
106-108	HL-16
109	HL-17
110	HL-18
11-117	HL.19
118-124	HL-20
125-142	HL-21
143-174	HL-22
175-178	HL-23
179-193	HL-24
194-202	HL-25
203-220	HL-26
221-255	HL-27
256-278	HL-28
279-300	HL-29

Fuente y elaboración: Autora.

Las 2 fracciones más representativas de la columna del extracto de AcOEt según su cantidad y facilidad de purificación fueron HL-26 que corresponde a la fracción (203-220) y HL-28 que corresponde a la fracción (256-278). La placa en CCF puede observarse en la figura 17.

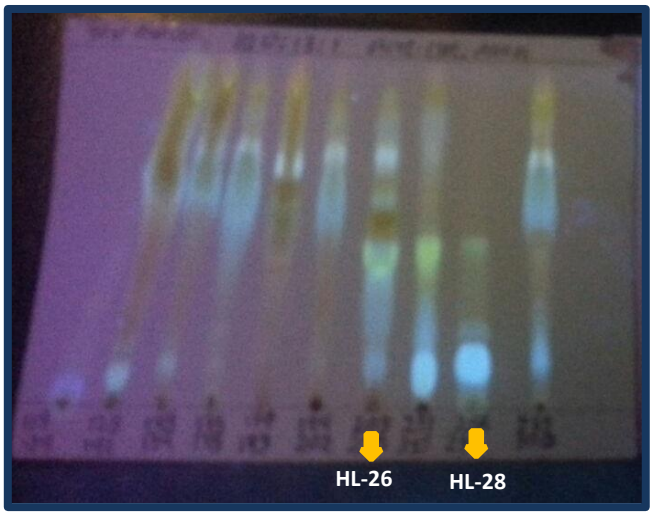


Figura 17. Perfiles cromatográficos de las fracciones de la cuales se aislaron compuestos de la columna de extracto de acetato de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec
Fuente: Autora.

4.2.1. Purificación Fracción HL-26.

La fracción HL-26 (1.2 g), se purificó en columna cromatográfica CC con Sílica gel 60 (Merck 0.0015- 0040 mm). Se eluyó según un gradiente creciente de fuerza eloutrópica: AcOEt:MeOH:H_2O (500:13:10), AcOEt:MeOH:H_2O (200:13:10), AcOEt:MeOH:H_2O (100:13:10), AcOEt:MeOH:H_2O (80:13:10) y AcOEt:MeOH:H_2O (50:13:10), de esta purificación se obtuvieron 15 fracciones.

Posteriormente, se tomó la fracción 12 (130 mg) que presentó mayor separación y por su cantidad se purificó en columna cromatográfica CC en sílica fase inversa RP-18. Se eluyó en condición isocrática MeOH:H_2O (3:2), obteniendose 12 fracciones. La fracción 9 (10 mg), finalmente se purificó en cromatografía de capa fina preparativa (CCFP), para ello se sembró toda la fracción a lo largo de la línea de siembra, en una placa de aluminio de sílica gel (fase directa), como fase móvil se utilizó en AcOEt:MeOH:H_2O (200:13:10). En la luz UV 254 y 365 nm se observó la separación de los compuestos en 4 bandas, cada una de

ellas con ayuda de una espátula fue desprendida del soporte de aluminio adsorbida al sílice; luego se transfirió a un embudo de vidrio con algodón en la parte inferior y se lavó con MeOH para obtener los compuestos presentes en cada banda. Posteriormente, se realizó CCF a los compuestos provenientes de cada banda, usando como eluyente AcOEt: MeOH:H_2O (200:13:10). Se observó en la luz UV 254 y 365 nm., como sustancia pura al compuesto proveniente de la banda 4 (figura 18.), con un peso de 8 mg, sustancia de color amarillo, soluble en metanol y en Dimetil sulfóxido y un R_f de 0.76.

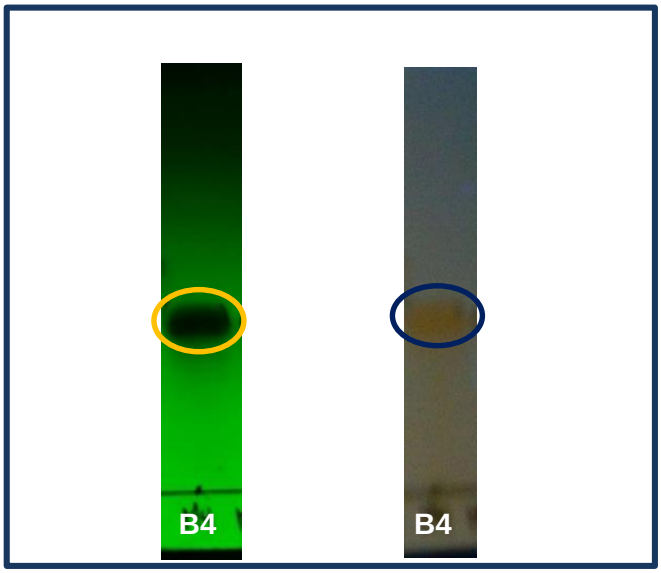


Figura 18. Placa fase directa del compuesto purificado de la fracción HL-26 corrida en solvente AcOEt: MeOH:H4)Luz UV 365 nm.$_2$O 200:13:10; a) Luz Uv 254 nm; b) B4 (banda
Fuente: Autora.
B4: banda 4

4.2.1.1. Interpretación espectral.

Mediante el análisis de RMN ^{1}H (Anexo 1) y ^{13}C (Anexo 2) los datos espectrales se muestran a continuación:

^{1}H-RMN: (400 MHz, CD_3OD): ppm: 6.20 (1H, d, J= 2.0, H-6), 6.40 (1H, d, J= 2, H-8), 7.84 (1H, d, J= 2, H-2'), 7.59 (1H, dd, J= 8.4, 2, H-6'), 5.15 (1H,d, J= 8, H-1''), 3.65 (d), 3.253.26 (m), 3.10 (m)

^{13}C- RMN: (400 MHz, CD_3OD): δ ppm: 158.7(C-2), 135.7 (C-3), 179.4 (C-4), 162.9(C-5), 100.1 (C-6), 164.3 (C-7), 94.8 (C-8), 158.7 (C-9), 105.4 (C-10), 122.9 (C-1'), 116 (C-2'), 145.8 (C-3'), 149.9 (C-4'), 117.2 (C-5'), 122.8 (C-6'), 102.5 (C-1"), 73.1 (C-2"), 75 (C-3"), 70 (C-4"), 77.1 (C-5"), 61.9 (C-6").

La comparación con los datos espectrales de publicaciones anteriores (Atay, Kirmizibekmez, Ahmet, & Yesiilada, 2015) y la muestra analizada se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Comparación de los datos obtenidos de 13C RMN Quercetina 3-O-β-D galactopiranosido.

	Quercetina 3-O-β-D galactopiranosido *Hypericum lancioides* Cuatrec.				**Quercetina 3-O-β-D galactopiranosido *Sambucus ebulus* (Atay et al. 2015)**		
C	**^{13}C(ppm)**	**^{1}H(ppm)**	**MULT (*J*,Hz)**	**∫**	**^{13}C(ppm)**	**^{1}H(ppm)**	**MULT (*J*,Hz)**
2	158.7	-	-	-	158.5	-	-
3	135.7	-	-	-	136.0	-	-
4	179.4	-	-	-	179.5	-	-
5	162.9	-	-	-	163.1	-	-
6	100.1	6.20	d (2)	1	99.9	6.20	d (2.1)
7	164.3	-	-	-	164.1	-	-
8	94.8	6.39	d (2)	1	94.8	6.39	d (2.1)
9	158.7	-	-	-	156.3	-	-
10	105.4	-	-	-	103.9	-	-
1'	122.9	-	-	-	123.1	-	-
2'	116	7.84	d (2)	1	116.0	7.84	d (2.3)
3'	145.8	-	-	-	145.9	-	-
4'	149.9	-	-	-	149.9	-	-

5'	117.2	6.87	d (8.4)	-	117.8	6.86	d (8.8)
6'	122.8	7.59	dd (8.7, 2)	1	121.8	7.59	dd (8.8, 2.3)
1''	102.5	5.15	d (8)	1	102.3	5.15	d (8.2)
2''	73.1	3.56	dd (8, 9)	-	73.2	3.53	dd (8.2, 9.3)
3''	75	3.10	m	-	75.1	3.22	m
4''	70	3.65	d	-	70.1	3.61	d (3.2)
5''	77.1	3.25	m	-	77.2	3.22-3.34	
6''	61.9	3.63	dd (11, 2.4)	-	61.9	3.60	dd (12, 2.5)

(-): no asignado

Fuente y elaboración**:** Autora

La fracción HL-26 fue identificada como quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido, basándose en los datos espectrales de ^{1}H y ^{13}C, los mismos que fueron comparados con los reportados en la bibliografía (Atay, Kirmizibekmez, Ahmet, & Yesiilada, 2015).

El compuesto quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido, es un metabolito secundario producido durante una reacción metabólica en las plantas con flores, coníferas y otras gimnospermas. La quercetina está ligado con un residuo de β-D-glicosilo unido en la posición 3. Este compuesto fue aislado por primera vez en el extracto etanólico de la especie *Artemisia capillaris* del género *Artemisia.* Este compuesto exhibe actividad hepatoprotectora (ChEBI, 2015). Experimentos con ratas sometidas a radiación indican que quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido tiene una gran actividad radioprotectora contra el estrés oxidativo inducido por radiación (Chawla et al., 2005).

En la figura 19 se puede apreciar la estructura del compuesto aislado.

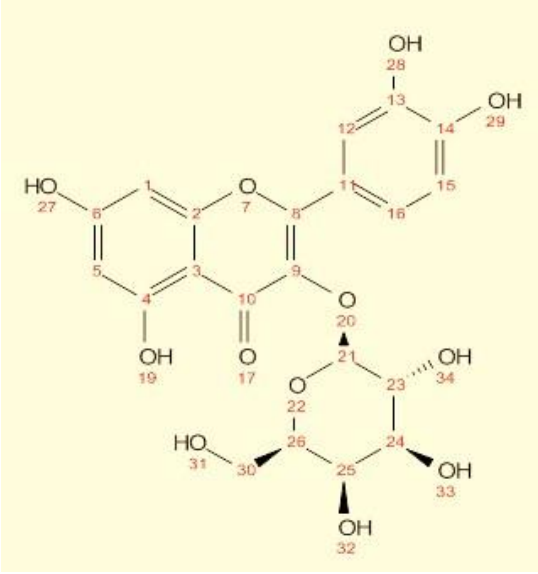


Figura 19. Quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido.
Fuente: ChEBI, 2015
Elaboración: Autora

4.2.1.2. Actividad antioxidante del compuesto quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido.

Los resultados obtenidos en el presente estudio para actividad antioxidante se expresa en micromoles equivalentes de Trolox por miligramo de extracto (µMET/mgEx). El método descrito se realizó por duplicado y se realizó un promedio de las absorbancias.

A continuación en la Tabla 5 se muestra el resultado obtenido de la evaluación antioxidante por el método: DPPH.

Tabla 5. Resultado de la actividad antioxidante.

Nombre científico	Nombre Común	Solvente	Capacidad antioxidante DPPH µMolEqTrolox/L muestra		
Hypericum lancioides Cuatrec	Bura-Bura	Metanol	416.36	±	0.004

Fuente y Elaboración: Autora.

En el estudio "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar Actividad antioxidante en pulpa de frutos" (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005), la actividad antioxidante de flavonoides de la pulpa de frutos varían entre máximo y mínimo 959,1 y 43,1 para los ensayos con DPPH, mientras el valor de la capacidad antioxidante

del compuesto quercetina 3-O-β-D galactopiranosido de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec es de 416.36 µMolEqTrolox/L muestra; constatando con los valores del estudio de referencia se puede determinar que la capacidad antioxidante del compuesto en el presente estudio es muy significativa.

En el anexo 4 se encuentra los datos de absorbancia, los mismos utilizados para la obtención del resultado de DPPH del compuesto.

4.2.2. Purificación de la fracción HL- 28.

La fracción HL-28 que corresponde a la fracción 256- 278 (128.5 mg), se purificó mediante columna cromatográfica, utilizando un gradiente creciente de fuerza eloutrópica AcOEt:MeOH:H_2O (100:13:10), se obtuvieron 100 fracciones, se aisló 1mg de la fracción 56, una sustancia de color amarillo, soluble en MeOH y H_20. Se realizó la cromatografía de capa fina en polaridad AcOEt: MeOH:H_2O (50:13:10). El compuesto fue visible en luz UV de 254 y 365 nm, en donde se observó una mancha color amarilla al ser revelada con ácido súlfurico al 5% y vainillina y un Rf de 0.71 (Figura 20).

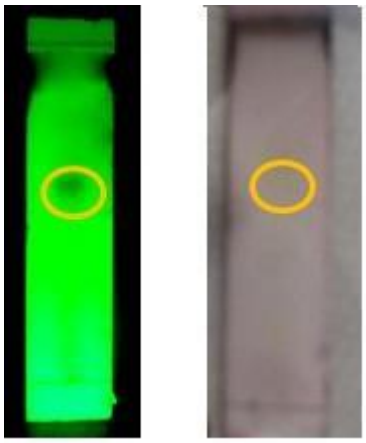


Figura 20. Placa fase directa del compuesto purificfracción HL-28 en un sistema ado de la de elución AcOEt: MeOH:H2O 50:13:10; a) Luz Uv 254 nm; b) Placa revelada con ácido súlfurico al 5% y vainillina.
Fuente: Autora

4.2.2.1. Análisis espectroscópico.

La estructura del compuesto aislado de la fracción HL-28, se estudió por RMN ^{1}H. El espectro de ^{1}H-RMN muestra las siguientes señales: (400 MHz, CD_3OD): ppm 2.00 (3H, s), 1.90-2.10 (3H, m), 4.03-4.05 (1H- m), 5.15-5.17 (1H, m), 6.29 (1H, d, J= 15.6 Hz,), 6.78

(1H, d, J= 8.4 Hz), 6.97 (1H, dd, J= 8.4, 2.0 Hz), 7.06 (1H, d, J= 2,0 Hz), 7.58 (1H, d, J= 15.6 Hz). Con los datos espectrales de ^{1}H-RMN, se puede hipotetizar una estructura parcial derivada del ácido cinámico (Figura 21).

Las tres señales de 6.78, 6.97 y 7.06 ppm son coherentes con un anillo aromático sustituido en las posiciones 1,3,4. El doble doblete en 6.97 ppm presenta un acoplamiento con la señal en 6.78 ppm y 7.06 ppm con unas constantes de acoplamiento orto y meta respectivamente.

Las señales de 6.29 ppm y 7. 58 ppm, corresponden a un sistema AB típico de los protones olefínicos en posición α-β respecto a un grupo carboxílico o carbonílico. El valor de la constante de acoplamiento entre estos dos protones es compatible con la configuración E del doble enlace.

El singulete que integra por tres protones en 2,00 ppm es característico del metilo de un grupo acetilo. Podemos por lo tanto suponer una posición acetilada, por ejemplo en un átomo de Oxígeno fenólico o en la parte no identificada de la molécula.

Todas las demás señales corresponden a una parte alifática de molécula y posiblemente oxigenada que no ha sido posible identificar por la insuficiente cantidad de muestra. Sin embargo falta de protones anoméricos visibles entre 4.5 y 5.5 ppm nos permite suponer que no se trate ni de una aldosa o una cetosa.

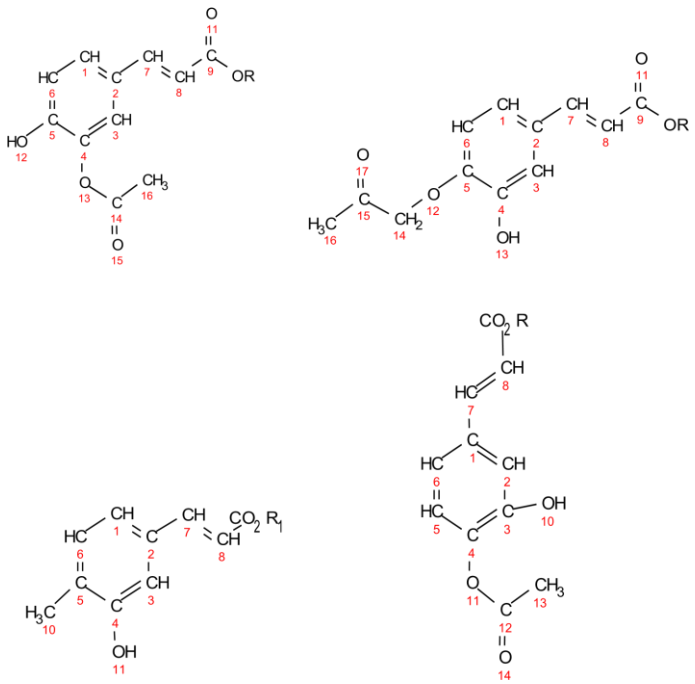


Figura 21. Posibles estructuras compatibles con el espectro presentado.
Fuente: Autora

CONCLUSIONES

- A partir del material vegetal seco de *Hypericum lancioides* Cuatrec*,* se obtuvo los extractos de diclorometano, acetato de etilo y metanol respectivamente, resultando el extracto metanólico con mayor rendimiento

- Las técnicas cromatográficas y espectoscópicas permitieron aislar e identificar el compuesto quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido, su estructura química se determinó por el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear.

- El compuesto quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido, presentó actividad antioxidante frente a DPPH.

- La fracción HL-28, según los datos espectrales, se puede hipotetizar una estructura parcial derivada del ácido cinámico

RECOMENDACIONES.

- Continuar con el estudio de la especie *Hypericum lancioides* Cuatrec, con la finalidad de obtener una validación química completa de la especie.

- Realizar trabajos de investigación similares en la búsqueda de nuevos compuestos, con otras especies del género presentes en el Ecuador.

- Lograr obtener mayor cantidad de extracto para lograr una plena identificación de los metabolitos aislados.

- Elucidar la estructura del compuesto de la fracción HL-28 en base a los datos espectrales obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA.

Atay, I., Kirmizibekmez, H., Ahmet, C. G., & Yesiilada, E. (2015). Secondary metabolites from Sambucus ebulus. *Turkish Journal of Chemistry*, *39*(1), 34–41. http://doi.org/10.3906/kim-1403-47

Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, *2*(3), 119–145. Retrieved from http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814

Bonifacino, M., & Rossado, A. (2015). Sistemas de plantas Vasculares. Retrieved from http://www.thecompositaehut.com/www_tch/Integrantes.html

Bran-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.Wiss.*, *22*, 25–30.

Brizuela, M., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol*, 69–74. Retrieved from http://sites.google.com/site/microbiologytec/hongos/BASIDIOMICETOS.pdf

Buitrón, X. (1999). *Ecuador: Uso y Comercio de Plantas Medicinales: Situación Actual y Aspectos Importantes Para su Conservación*. Ecuador.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*(1), 15–25. http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021

Chawla, R., Arora, R., Sagar, R. K., Singh, S., Puri, S. C., Kumar, R., … Qazi, G. N. (2005). 3-O-??-D-galactopyranoside of quercetin as an active principle from high altitude Podophyllum hexandrum and evaluation of its radioprotective properties. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *60*(9-10), 728–738.

De la Torre, L., Balslev, H., Navarrete, H., & Macía, M. (eds). (2008). *Enciclopedia De Plantas Utiles del Ecuador*. Quito- Ecuador.

Dourado, R. S., & Ladeira, A. M. (2008). Identificación de flavonóides en Hypericum cordatum (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). *Revista Scielo*, *31*(4), 611–620. http://doi.org/10.1590/S0100-84042008000400007

Ege, S. (2008). *Química Orgánica* (Reverté). Barcelona- España. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=a0q3bMk5UrgC&redir_esc=y

FACENA, G. de C. D. V. (2001). EUDICOTILEDONEAS ESCENCIALES. Retrieved from http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Rosideas/Eurosides I/2-Subclado de la Celastrales, Malpighiales y Oxalidales/2Malpighiales/3-Hypericaceae.pdf

Farnsworth, N., Akerele, O., Bingel, A., Soejarto, D., & Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ.*, *63*(6), 965. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3879679

Gallego, A., Garcinuño, R., & Morcillo, M. (2015). *Experimentación en química analitica* (Editorial). España. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=Eg4CgAAQBAJ&pg=PT165&dq=factor+de+retenci%C3%B3n&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=factor de retenci%C3%B3n&f=false

García, M., & Díaz, G. (2012). Efectividad de la fitoterapia en pacientes con asma bronquial. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar Del Río*, *16*(1). Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1561-31942012000100014&script=sci_arttext

Gómez, S., Sierra, M. I., & Peréz, D. (2009). *Analisis Instrumental*. (L. Bello, Ed.) (Netbiblo). Netbiblo.

Guarnizo, A., & Martínez, P. (2009). *Experimentos de Química orgánica: Con enfoque en ciancias de la vida* (Editorial). Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=Otm5wsEeKYEC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Hernández Pérez, J. M. (2005). CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA. *SEQS*, *8*, 49–62. Retrieved from file:///D:/HP/Documents/Downloads/2004-2005-Edu08-Tema.pdf

Hernández, R., & Gally Jordá, M. (1981). *Plantas Medicinales* (Árbol Edit). México.

Hogesteger, C. (1994). Uso de plantas medicinales|| (Editorial , pp. 19–25). Mexico.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, *25*(4), 726–732. http://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016

López, G. (2007). *Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares: (especies silvestres y las cultivadas más comunes)* (Ediones Mu). España. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=CLaMWyMMbPsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Martínez, B., Amores, M., & Medina, M. (2006). El hipérico: fuente de compuestos bioactivos. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, *72*(4), 35–36. Retrieved from http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/171

Martínez, J. L., & Castillo, G. (2008). *Flora de Veracruz*. (Editorial Cromocolor, Ed.)*Resedaceae* (Vol. 48). Xalapa, Veracruz, México. Retrieved from http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOVER/5-Nash.pdf

Medarde, R., Peláez, R., & Álvarez, R. (2010). Química Oragánica: Resonancia Magnética Nuclear. Retrieved from

http://ocw.usal.es/eduCommons/cienciasbiosanitarias/quimica-organica-ii/contenido/QO_II_Tema02_ocw.pdf

Moller, J., Peter, L., & Yánez, S. (1999). *Catálogo de plantas vasculares del Ecuador* (Missouri B). Quito- Ecuador.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radicaldiphenylpicrilhydrayl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin , Vol. 26 No. 2, 2004, 211-219. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *26*(2), 211–219.

Muñoz Juárez, M. a, & Gutiérrez, D. M. (2004). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol Nicotiana Glauca. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *26*(2), 1–4. Retrieved from http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/7VeranoUAQ/14MunozJuarez.pdf

Nicholls, D. (2015). Hypericum perforatum. Retrieved from http://www.naturespot.org.uk/species/perforate-st-johns-wort Oliveira, M., Velázquez, D., & Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, *30*, 453–459. Retrieved from http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1373833

Oms. (2002). Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional. Retrieved from http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf

Plazas, E. (2012). Análisis fitoquímicos preliminares y de actividad biológica de cuatro especies nativas de las areas rurales del distrito capital, 17. Retrieved from https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi6yIn4wvXMAhXKWz4KHQj2B-cQFggfMAE&url=http://jbbrepositorio.metabiblioteca.org/bitstream/001/286/1/Info 758-2012.pdf&usg=AFQjCNFaieqiLxhfFoXoBva3sUj_T7xraQ&bvm

Primo, E. (2007). *Química básica y aplicada de la molécula a la Industria.* (Editorial). Barcelona- España. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=aU_aBXvAB3MC&pg=PA1223&dq=cromatografia&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=cromatografia&f=false

Romero, D. M. (2013). *"Caracterización físico – química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Hypericum lancioides (Hypericaceae) de la provincia de Loja."* UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.

Saddiqe, Z., Naeem, I., & Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L. *Elsevier Journal of Ethnopharmacology*, *131*(3). http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.034

Salas, D. (2012). Revisión de Hypericum. Retrieved from http// elimperdible.ec/web/medioambiente/el-universo-de-la-medicina-natural-enecuador.html

Sepulveda, G., Porta, H., & Rocha, M. (2003). La Participación de los Metabolitos

Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitoterapia Sociedad Mexicana de Fitoterapia, A.C.*, *21*, 355–363. Retrieved from http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30165/Material_de_soporte/La_participacion_de_los_metabolitos_secundarios_en_la_defensa_de_las_plantas.pdf

SIB, P. de datos C. (2015). Hypericum Lancioides. Retrieved from http://data.sibcolombia.net/inicio.htm

Sotomayor, C. (2015). *Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de dos especies de la familia Lycopodiaceae: huperzia brevifolia y licopodium vestitum.* Universidad Técnica Particular de Loja.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Secondary Metabolites and Plant Defense. Plant Physiology* (Cuarta Edi). Sunderland. Retrieved from http://mcd.ucsc.edu/faculty/taiz.html

Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, *111*(1), 63–81. http://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032

Torres, C. (2004). *Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores. Hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe Técnico.* Bogotá - Colombia.

Valcárcel Cases, M., & Gómez Hens, A. (1988). *Técnicas ASnaliticas de separación* (Edotorial). Bacelona. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=WPYYF75dejsC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Vallejo, M. (2009). *Tratado de Psicofarmacología* (Editorial). Madrid- España. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=ugBvQChj4JAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Varea, A. (2004). Iniciativas para conservar la biodiversidad, 9. Retrieved from http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8463/1/Iniciativas para conservar la biodiversidad.pdf

Villar, M., & Villavicencio, O. (1992). USO DE PLANTAS MEDICINALES EN EL TRATAMIENTO DEL ASMA BRONQUIA. *Boletín de La Sociedad Peruana de Medicina Interna*, *4*, 61–65. Retrieved from http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/spmi/v05n4/trabajos originales4.htm

Vivas, Y. (1999). *Flora vasscular del valle morrénico de Mucubaji, Mérida*. Universidad de los Andes. Retrieved from http://tesis.ula.ve/pregrado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=256

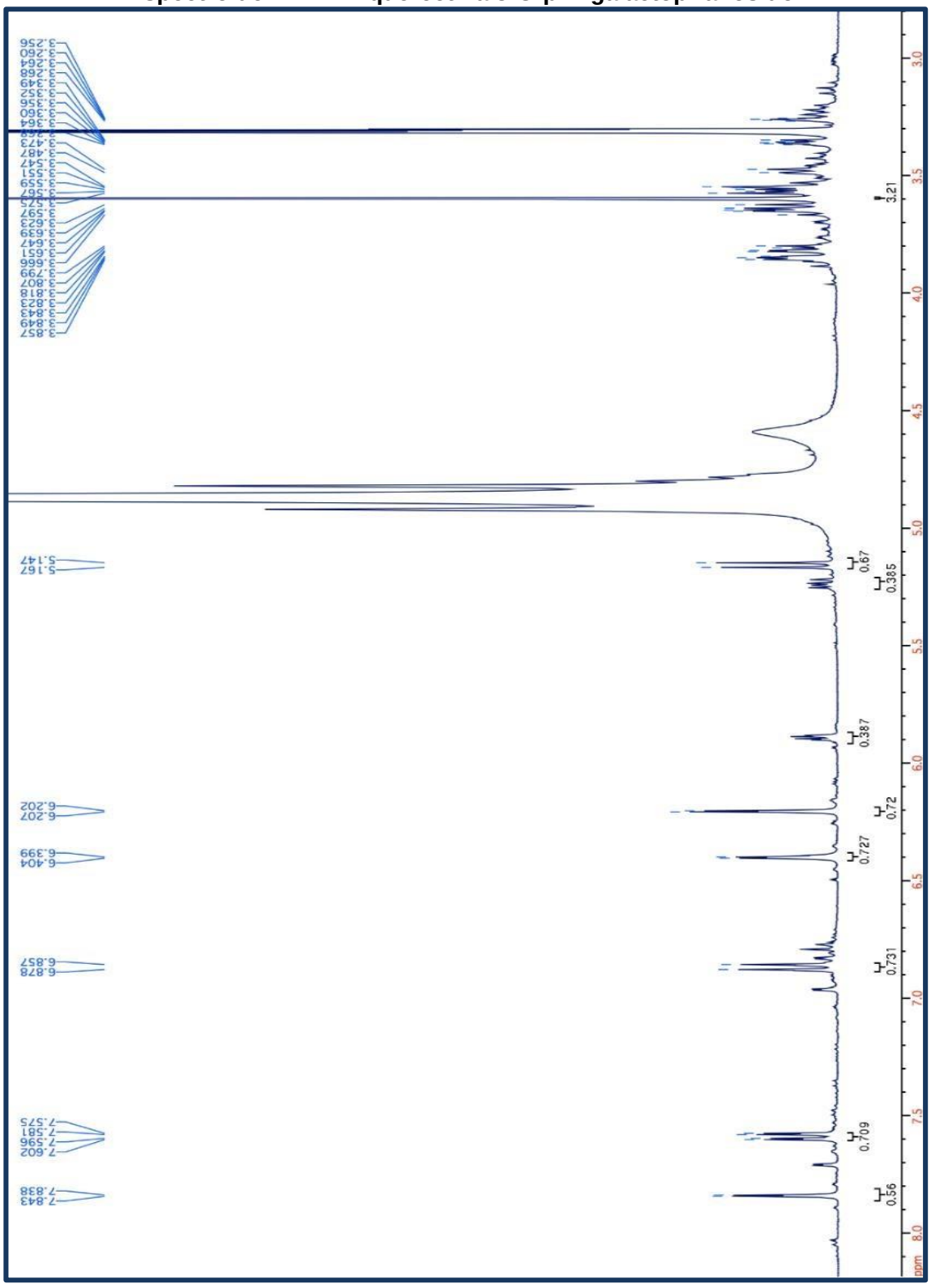
William, P., & Jones, L. (2006). *Principios de química: los caminos del descubrimiento* (Ed. Médica). España.

Youngson, R. (2003). *Antioxidantes y raicales libres* (Editorial). Madrid- España. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=SNthxQBeHkUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

ANEXOS

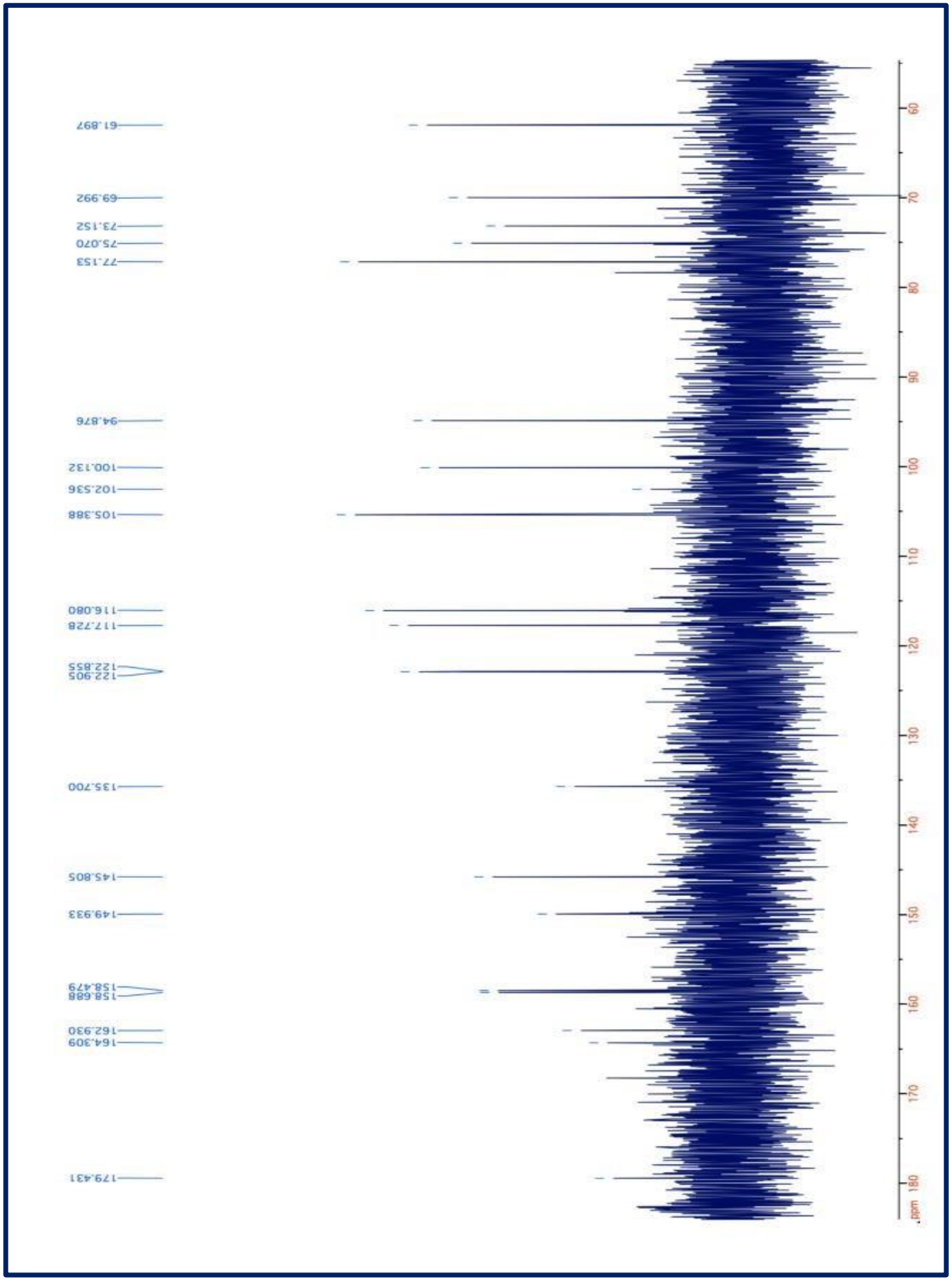
ANEXO 1

Espectro de 1H RMN quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido.



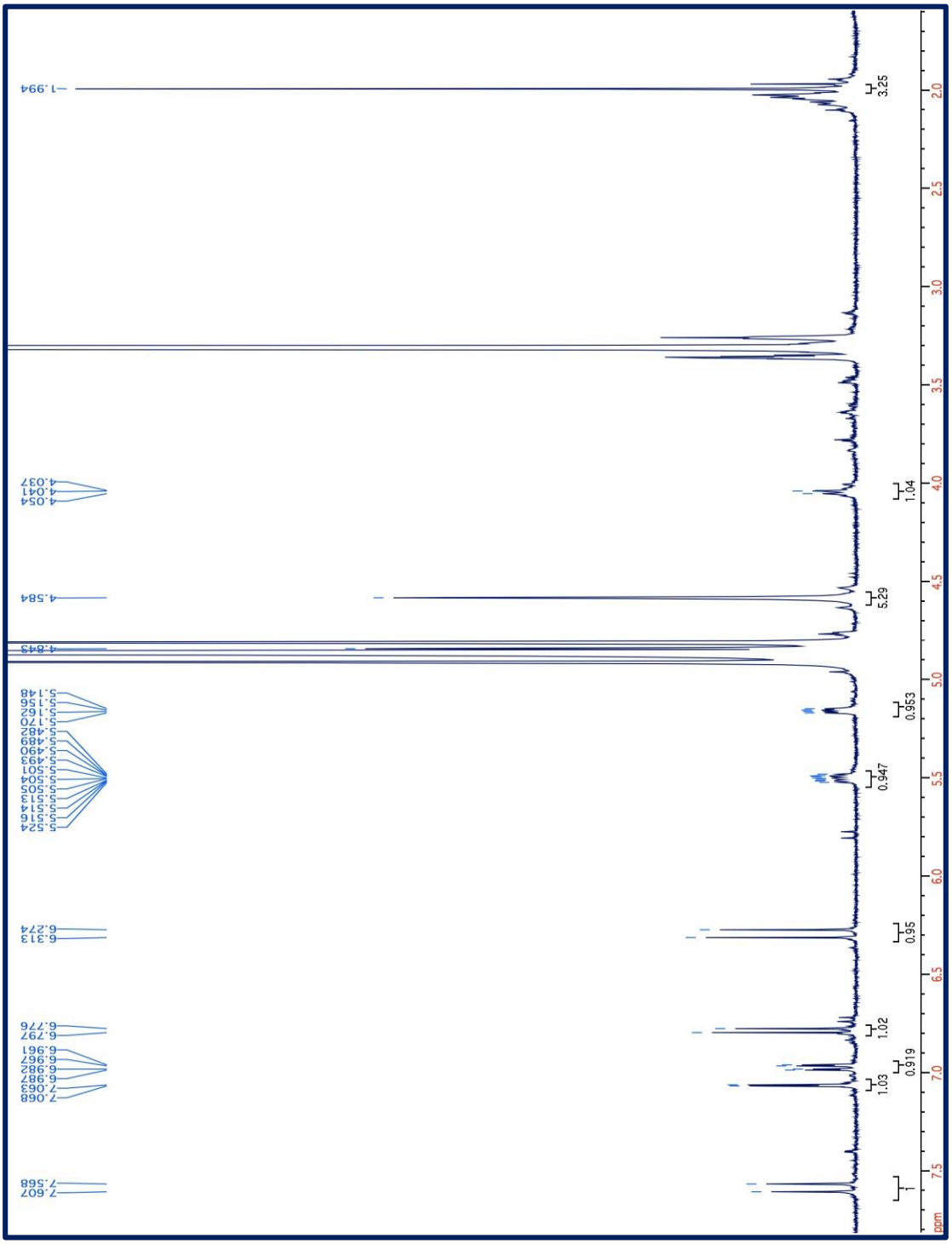
ANEXO 2

Espectro de RMN -^{13}C quercetina 3-O-β-D-galactopiranosido.


61.897
69.992
73.152
75.070
77.153
94.876
100.132
102.536
105.388
116.080
117.728
122.905
122.855
135.700
145.805
149.933
158.688
158.479
162.930
164.309
179.431
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
ppm

ANEXO 3

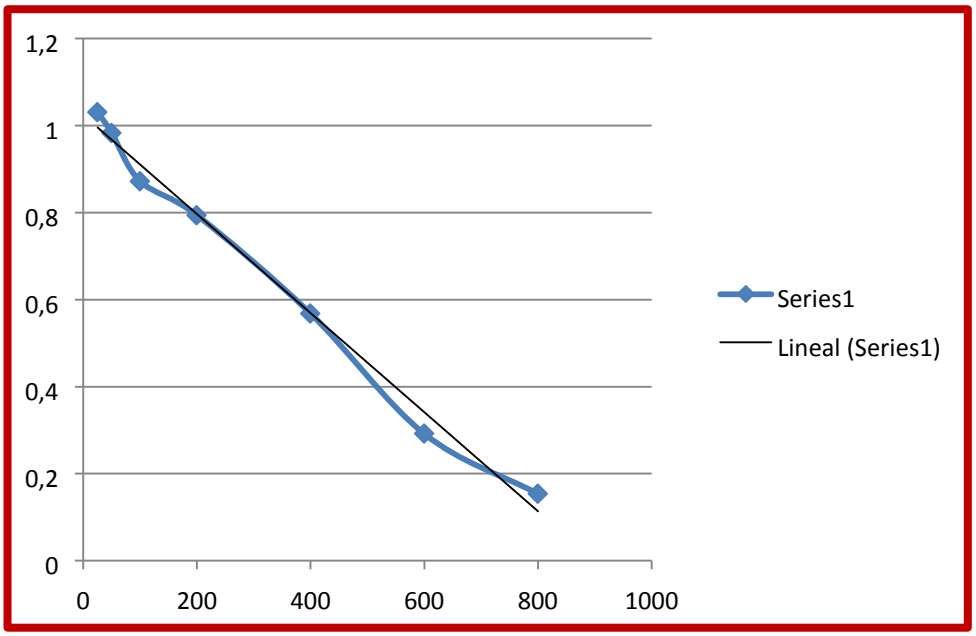
Espectro de 1H RMN del posible compuesto ácido cinámico.



ANEXO 4

Actividad Antioxidante: Curva de Calibración DPPH.

CURVA TROLOX	
800	0,154
600	0,292
400	0,568
200	0,794
100	0,872
50	0,983
25	1,031



Fuente: Autora