



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

## **ÁREA BIOLÓGICA**

### **TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

Identificación, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y metabolitos secundarios a partir de las hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec (Chloranthaceae) en la provincia de Loja.

### **TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTOR:** Calvache Riofrío, Manuel Andrés

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

LOJA-ECUADOR

2016

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Identificación, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y metabolitos secundarios a partir de las hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec (Chloranthaceae) en la provincia de Loja, realizado por Manuel Andrés Calvache Riofrío; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre del 2016

f).....

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

CI: 110326907-0

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Manuel Andrés Calvache Riofrío declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Identificación, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y metabolitos secundarios a partir de las hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec (Chloranthaceae) en la provincia de Loja, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Segundo Vladimir Morocho Zaragocín director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente 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).....  
**Autor:** Manuel Andrés Calvache Riofrío  
**Cédula** 1104963796

## DEDICATORIA

Agradezco a Dios por haberme permitido llegar hasta esta etapa de mi vida, caminando de mi mano todo este tiempo y guiándome en cada uno de mis actos y de mis días.

A mis padres Manuel y Doris por darme ésa gran herencia de estudiar lo que me apasiona y estar ahí en mis ideales para forjar mi futuro, gracias por guiarme por buen camino y por el apoyo incondicional que siempre me brindaron, ya que todo este esfuerzo lo hice para que se sientan orgullosos de su hijo.

A mis hermanos Juan Diego, Pablo y Mathías por estar conmigo siempre y ser ese apoyo que cada día me motiva a seguir adelante, demostrando siempre el ejemplo para que ustedes puedan seguirlo.

A todos mis familiares y amigos que siempre creyeron en mí y que de una u otra manera estuvieron apoyándome y guiándome por el buen camino en todo momento.

En fin les dedico este gran logro a todos quienes creyeron en mí y que esto solo sea el inicio para una posterior meta.

*Manuel Andrés Calvache Riofrío*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios quien fue Él que me motivo a seguir adelante y a nunca decaer, a quién se le debo toda mi vida y por quien culmine este logro, además por protegerme, ayudarme y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades que la vida me presentó.

A mis padres por su apoyo y sustento, a mis hermanos y a toda mi familia y amigos por ser parte importante de mi vida, por su dedicación y empeño en hacerme una mejor persona.

A mi director de tesis PhD. Vladimir Morocho por su valiosa guía, asesoramiento, esfuerzo y dedicación en la realización de la misma y a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron con la realización de este proyecto.

Finalmente agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja y al Departamento de Química por la oportunidad de realizar mi tesis en este prestigioso laboratorio que me formo para ser un profesional.

*Manuel Andrés Calvache Riofrío*

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>PORTADA</b> -----	<b>i</b>
<b>APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b> -----	<b>ii</b>
<b>DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS</b> -----	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA</b> -----	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> -----	<b>v</b>
<b>INDICE DE CONTENIDOS</b> -----	<b>vi</b>
<b>RESUMEN</b> -----	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> -----	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I</b> -----	<b>5</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> -----	<b>5</b>
<b>1. Plantas medicinales</b> -----	<b>6</b>
<b>1.1. Familia Chloranthaceae.</b> -----	<b>7</b>
<b>1.2. Descripción del género <i>Hedyosmum</i>.</b> -----	<b>7</b>
<b>1.3. Descripción de la especie <i>Hedyosmum translucidum</i> Cuatrec</b> -----	<b>8</b>
1.3.1. Clasificación taxonómica -----	8
<b>1.4. Metabolitos secundarios de las plantas.</b> -----	<b>9</b>
1.4.1. Clasificación de los metabolitos secundarios.-----	9
1.4.1.1. <i>Terpenos.</i> -----	9
1.4.1.1.1. Ruta biosintética de los terpenos.-----	10
1.4.1.2. <i>Compuestos fenólicos.</i> -----	11
1.4.1.3. <i>Glicósidos</i> -----	12
1.4.1.3.1. Saponinas.-----	12
1.4.1.3.2. Glicósidos cardiacos o cardenólidos -----	13
1.4.1.3.3. Glicósidos cianogénicos-----	13
1.4.1.3.4. Glucosinolatos -----	13
1.4.1.4. <i>Alcaloides</i> -----	13
<b>1.5. Cromatografía.</b> -----	<b>14</b>
1.5.1. Cromatografía en capa fina.-----	14
1.5.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.-----	15
<b>1.6. Resonancia Magnética Nuclear.</b> -----	<b>15</b>
1.6.1. Espectro de <sup>1</sup> H-----	16
1.6.2. Espectro de <sup>13</sup> C-----	16
1.6.3. Espectro DEPT-----	16
1.6.4. Espectro HMBC-----	17
1.6.5. Espectro HSQC-----	17
<b>1.7. Enfermedades Bacterianas</b> -----	<b>17</b>
1.7.1. Bacterias Gram positivas-----	18
1.7.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> -----	18

1.7.1.2. <i>Salmonella enterica</i> -----	18
1.7.2. Bacterias gram negativas-----	19
1.7.2.1. <i>Escherichia coli</i> -----	19
1.7.2.2. <i>Proteus vulgaris</i> -----	19
1.7.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	20
1.7.2.4. <i>Salmonella typhimurium</i> -----	20
1.7.2.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> -----	21
<b>CAPÍTULO II</b> -----	<b>22</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	<b>22</b>
2.1. Esquema metodológico-----	23
2.2. Recolección del material vegetal-----	23
2.3. Obtención de extractos totales-----	24
2.4. Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Hexano. -----	24
2.5. Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Acetato de Etilo.-----	25
2.5.2. Purificación de la fracción HTAI-3-22-----	25
2.5.3. Purificación de la fracción HTAI-4-22-----	26
2.6. Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Metanol. -----	27
2.6.2. Purificación de la fracción HTM-1-----	28
2.7. Caracterización estructural-----	28
2.7.1. Resonancia Magnética Nuclear-----	28
2.7.2. Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM)-----	28
2.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)-----	29
2.8.1. Microorganismos de prueba-----	29
2.8.2. Preparación de las muestras-----	30
2.8.3. Preparación del cultivo overnight-----	30
2.8.4. Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias-----	30
2.8.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana-----	31
<b>CAPITULO III</b> -----	<b>32</b>
<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> -----	<b>32</b>
3.1. Extractos obtenidos de <i>Hedyosmum translucidum</i> -----	33
3.2. Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo-----	33
3.3. Fraccionamiento del extracto de Metanol-----	36
3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana-----	37
<b>CONCLUSIONES</b> -----	<b>38</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> -----	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> -----	<b>40</b>
<b>ANEXOS</b> -----	<b>43</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Hedyosmum translucidum</i> Cuatrec. ....	8
<b>Tabla 2.</b> Fracciones obtenidas del extracto total de Acetato de Etilo .....	25
<b>Tabla 3.</b> Fracciones obtenidas del extracto total de Metanol .....	27
<b>Tabla 4.</b> Características de la columna capilar .....	28
<b>Tabla 5.</b> Análisis de la columna utilizada .....	29
<b>Tabla 6.</b> Medios de cultivo y sus condiciones. ....	30
<b>Tabla 7.</b> Peso y rendimiento de extractos de <i>Hedyosmum translucidum</i> .....	33
<b>Tabla 8.</b> Comparación de <sup>13</sup> C NMR del Voleneol. ....	34
<b>Tabla 9.</b> Comparación de <sup>1</sup> H NMR del Voleneol acetato. ....	35
<b>Tabla 10.</b> Comparación de <sup>1</sup> H NMR de la Escoparona .....	36
<b>Tabla 11.</b> Concentración mínima inhibitoria .....	37



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Hedyosmum translucentum</i> .....	9
<b>Figura 2.</b> Ruta metabólica implicada en la síntesis de terpenoides. ....	11
<b>Figura 3.</b> Estructura química del fenol.....	12
<b>Figura 4.</b> Cromatografía ascendente en capa fina.....	15
<b>Figura 5.</b> <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	18
<b>Figura 6.</b> <i>Salmonella enterica</i> .....	18
<b>Figura 7.</b> <i>Escherichia coli</i> . ....	19
<b>Figura 8.</b> <i>Proteus vulgaris</i> . ....	19
<b>Figura 9.</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
<b>Figura 10.</b> <i>Salmonella typhimurium</i> . ....	20
<b>Figura 11.</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> . ....	21
<b>Figura 12.</b> Esquema metodológico de la investigación.....	23
<b>Figura 13.</b> Cromatografía en capa fina de extractos totales (Hex: AcOEt; 7:3).....	24
<b>Figura 14.</b> CCF de HTAI3-4-2 Hex: AcOEt 8:2.....	26
<b>Figura 15.</b> CCF de HTAI-V2 Hex: AcOEt 8.5:1.5.....	27
<b>Figura 16.</b> Estructura química del Voleneol.....	34
<b>Figura 17.</b> Estructura química del Voleneol Acetato.....	35
<b>Figura 18.</b> Cromatografía en capa fina de HTM1-2 Hex: AcOEt 9.5:0.5.....	36
<b>Figura 19.</b> Estructura química de la Escoparona.....	37

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción HTAI-3-40-45 ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ 400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	44
<b>Anexo 2:</b> Espectro de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases de la fracción HTAI-3-40-45.....	46
<b>Anexo 3:</b> Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción HTAI-4-80-87 ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ 400MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	47
<b>Anexo 4:</b> Espectro de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases de la fracción HTAI-4-80-87.....	49
<b>Anexo 5:</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción HTM-1-9-105 ( $^{13}\text{C}$ 400MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	50

## RESUMEN

En el presente estudio se analizó e identificó metabolitos secundarios a partir de las hojas de *Hedyosmum translucidum*, conocida comúnmente como guayusa o toronjil de cerro, mediante Resonancia magnética nuclear y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Se identificaron tres compuestos conocidos como Voleneol y Voleneol Acetate del extracto en Acetato de etilo y Escoparona del extracto metanólico.

La actividad antimicrobiana mediante concentración mínima inhibitoria de los extractos y moléculas fue inactiva, a pesar que el extracto total de Metanol presentó una actividad moderada de 500ug/ml frente *Klebsiella pneumoniae*.

**Palabras clave:** *Hedyosmum translucidum*, Chloranthaceae, *Klebsiella pneumoniae*, Voleneol, Voleneol Acetate, Escoparona.

## ABSTRACT

In the present study analyzed and identified secondary metabolites from the leaves of *Hedyosmum translucidum*, commonly known as guayusa or toronjil de cerro, by means of nuclear magnetic resonance and gas chromatography connected to spectrometry of masses.

There were identified three compounds known as Voleneol and Voleneol Acetate of the extract in Ethyl acetate and Escoparona of the extract metanólico.

The antimicrobial activity by minimum inhibitory concentration of extracts and molecules was inactive, although the total methanol extract showed a moderate activity 500ug/ml against *Klebsiella pneumoniae*.

**Palabras clave:** *Hedyosmum translucidum*, Chloranthaceae, *Klebsiella pneumoniae*, Voleneol, Voleneol Acetate, Escoparone.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas, desde la antigüedad, han sido un recurso natural al alcance del ser humano para su propio beneficio. Desde los albores de la historia el hombre ha utilizado las plantas para diversos usos, principalmente para su alimentación y la curación de enfermedades. Las plantas medicinales eran veneradas por las virtudes que poseían al ver los resultados tras su aplicación, transmitiéndose sus propiedades de generación en generación. En un inicio, nadie buscaba saber por qué o cómo actuaban, pero la capacidad que las plantas tenían para curar era un hecho que consideraban obvio y que creían mágico (Matilla, 2014).

Las plantas medicinales, se las puede definir como todas aquellas plantas que contienen en alguno de sus órganos principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes van a producir efectos curativos sobre el ser humano y animales en general. Se calcula que el 10% del total de plantas en el mundo son medicinales, y que están recogidas dentro de tratados médicos de fitoterapia en épocas pasadas o modernas. El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos. Los principios activos de las plantas van desde sustancias simples como alcaloides hasta mezclas complejas como aceites esenciales (Perez, 2008).

Chloranthaceae es una familia de plantas aromáticas con una distribución pantropical, en la actualidad se reconocen cuatro géneros con unas 75 especies distribuidas entre Asia y América. Las Chloranthaceae han sido consideradas desde la antigüedad como una de las familias más primitivas de las Angiospermas y su ubicación taxonómica ha sido sumamente controvertida, para ello la tendencia moderna la sitúa en un orden independiente denominado Chloranthales (Calderón, 1994). Presenta compuestos sesquiterpénicos como el dicarabrol y carabrol que son usados para tratar citotoxicidades in vitro contra una serie de líneas celulares y además presentan una actividad antimicrobiana significativa (L.-J. . Wang, Xiong, Lau, Pan, & Hu, 2015).

*Hedyosmum* es un género en la que prevalecen árboles o arbustos, rara vez plantas herbáceas, monoicas o más frecuentemente dioicas, a menudo fuertemente aromáticas. Se calculan que posee entre 40 a 45 especies distribuidas principalmente en América

intertropical. La infusión de las hojas de varios representantes de este género se consume en forma de té, o bien, como sustituto de café (Calderón, 1994).

La mayoría de especies del género *Hedyosmum* poseen en su mayoría terpenos como principales metabolitos secundarios presentes en su morfología. Algunas de las especies del género *Hedyosmum* poseen propiedades farmacológicas como es el caso de las hojas del arbusto dioico *Hedyosmum brasiliense* que se emplean popularmente como sedante, afrodisíaco y como sustituto del té verde (Matilla, 2014).

*Hedyosmum translucidum* es un arbusto o árbol conocido como guayusa o toronjil de cerro, comúnmente se lo utiliza para tratar los nervios, ya que mediante decocción de sus hojas y flores posee propiedades aromáticas (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008).

Por los antecedentes antes mencionados la presente investigación tiene como objetivo la identificación, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y metabolitos secundarios aislados a partir de las hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec en la provincia de Loja.

Este tema forma parte del programa de investigación del Estudio fitoquímico y actividad biológica de plantas, hongos y actinomicetos en la zona 7 del Ecuador.

## **CAPÍTULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

## 1. Plantas medicinales

Los restos arqueológicos y estudios históricos muestran que la utilización de plantas medicinales ha sido una constante importancia a lo largo de la historia, en donde la práctica empírica probablemente se basó en el desarrollo del instinto animal que señalaba la elección de determinada planta frente a una dolencia y, basándose en la observación de los resultados, la tradición oral y con la ayuda de los primeros libros, han venido constituyendo un elenco de información que muestra la actual ciencia (Roldan, 1997).

Si nos atenemos a considerar únicamente como medicinales las plantas que intervienen en las fórmulas de las farmacopeas vigentes, veremos que las especies medicinales varían de un país a otro, no sólo entre los que tienen climas y floras muy diferentes, sino también entre países que tienen esto en gran similitud. Por otra parte, hay muchas plantas que son de uso frecuente y, a veces, de actividad reconocida que un pueblo continúa empleándolas. Las virtudes medicinales de las plantas sólo pueden explicarse hoy por la existencia en ellas de determinados compuestos químicos, que son llamados principios activos (Lázaro, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) apoya el uso de la medicina tradicional y alternativa cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo (OMS, 2004). La pérdida de biodiversidad puede ejercer un importante efecto directo en la salud humana si los servicios de los ecosistemas ya no alcanzan a satisfacer las necesidades sociales. La medicina tradicional sigue desempeñando un papel esencial en la asistencia sanitaria, especialmente en el ámbito de la atención primaria de salud ya que se calcula que los medicamentos tradicionales son utilizados por el 60% de la población mundial y en algunos países están ampliamente incorporados al sistema público de salud (OMS, 2015).

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo, hasta el momento se reporta la presencia de más de 16000 especies de plantas de las cuales 5172 son especies útiles, en donde el 60% son medicinales, el 55% son fuente de materiales de construcción, 30% comestibles y el 20% para los llamados usos sociales (De la Torre, et al., 2008).

En el Ecuador las plantas medicinales son empleadas por nueve nacionalidades indígenas y una población de colonos mestizos, en donde a la misma planta la utilizan en



un bien común; las plantas más utilizadas son: *Chenopodium ambrosoides* (paico), *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), *Scoparia dulcis* (tía-tina), *Urera baccifera* (ortiga) y *Verbena litoralis* (Verbena). Un ejemplo de la similitud de usos que existe en el país, es el empleo de las familias *Aracaceae*, *Gesneriaceae* y *Piperaceae*, útiles en el tratamiento de la mordedura de serpiente, gracias a éstas analogías dan una pauta para proponer que se realicen análisis fitoquímicos en las especies, género y familias ya que poseen fines curativos muy reales (Ríos, et al., 2007).

### **1.1. Familia Chloranthaceae.**

La familia Chloranthaceae es una familia de cuatro géneros, *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Hedyosmum*, y *Ascarina*, posee 70 especies que están presentes en la zona tropical y zonas subtropicales. Las plantas enteras o raíces de las plantas de esta familia son ampliamente utilizadas en la medicina popular como antiespasmódicos, antisépticos, y medicamentos contra el cáncer o para aliviar el dolor. Estudios realizados en la familia *Chloranthaceae* han dado como resultado el aislamiento de 124 compuestos químicos de tipo terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas y esteroides (Cao, Peng, Shi, & Xiao, 2008).

*Chloranthaceae* reporta una serie de nuevas moléculas, como es el caso del descubrimiento de nuevos compuestos sesquiterpenoides diméricos de tipo lindenane denominados chlorasessilifols utilizados contra actividades anti-neuro inflamatorias (L.-J. Wang et al., 2015). *Chloranthaceae* posee una serie de metabolitos secundarios que son utilizados principalmente con actividades antitumorales, antifúngicas, y anti-inflamatorias (A.-R. Wang et al., 2015).

### **1.2. Descripción del género *Hedyosmum*.**

El género *Hedyosmum* consta de unas 40 especies propias de América tropical, empleadas en medicina popular por sus propiedades aromáticas y excitantes (Bernal & Correa, 1991).

En investigaciones realizadas de este género está *Hedyosmum basiliense* en la que se ha identificado lactonas sesquiterpénicas a partir de las hojas, incluyendo guaianolides, elemanolides y un lindenanolide utilizados para actividad contra micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis* (Amoah et al., 2013). En otro estudio de *H. brasiliense* se

aislaron lactonas sesquiterpénicas como 13-hidroxi-8,9-dehydroshizukanolide, podoandin, y elemanolide 15-acetoxi-isogermafurenolide, que inducen la relajación in vitro de la aorta de ratas y cuerpos cavernosos (Huong et al., 2014).

En un estudio de la corteza de *Hedyosmum angustifolium* se aislaron compuestos sesquiterpénicos como oxynoseriolide, onoseriolide y spathulenol con propiedades anti-Leishmánicas activos contra amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis* y *Leshmania infantum* (Acebey et al., 2010).

En estudios de aceites esenciales de *H. colombianum* se encontró compuestos mayoritarios presentes como es el caso de  $\beta$ -pineno y pinocarvona (Delgado, Quijano, Morales, & Pino, 2010).

### 1.3. Descripción de la especie *Hedyosmum translucidum* Cuatrec

*H. translucidum* puede ser un arbusto o un árbol conocido como guayusa o toronjil de cerro, se encuentra distribuida en las provincias de Azuay, Carchi, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Loja a una altura que oscila entre 1500-3500 msnm (Jorgensen & Yáñez, 1999). Por las comunidades indígenas del Ecuador es usada con fines alimenticios ya que las hojas se usan para preparar infusiones como aguas aromáticas; la flores en decocción, junto con las flores de begonia y toronjil se usan para tratar los nervios (De la Torre et al., 2008).

#### 1.3.1. Clasificación taxonómica

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec.

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Chloranthaceae
Género	<i>Hedyosmum</i>
Especie	<i>translucidum</i>

**Fuente:** Tropicos.org.



**Figura 1.** *Hedyosmum translucidum*.  
**Fuente:** Cumbicus et al., 2011.

#### **1.4. Metabolitos secundarios de las plantas.**

Las plantas van a destinar una gran cantidad del carbono asimilado y energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas, que se puede decir no tienen una interacción directa con procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, pero que se las conoce en el mundo de las plantas medicinales como metabolitos secundarios. Estos metabolitos secundarios no presentan una función definida en los procesos mencionados, así como los metabolitos primarios ya que ciertos grupos van a presentar una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies. Los metabolitos secundarios se agrupan en 4 clases principales como son: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (Ávalos & Elena, 2009).

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

###### **1.4.1.1. Terpenos.**

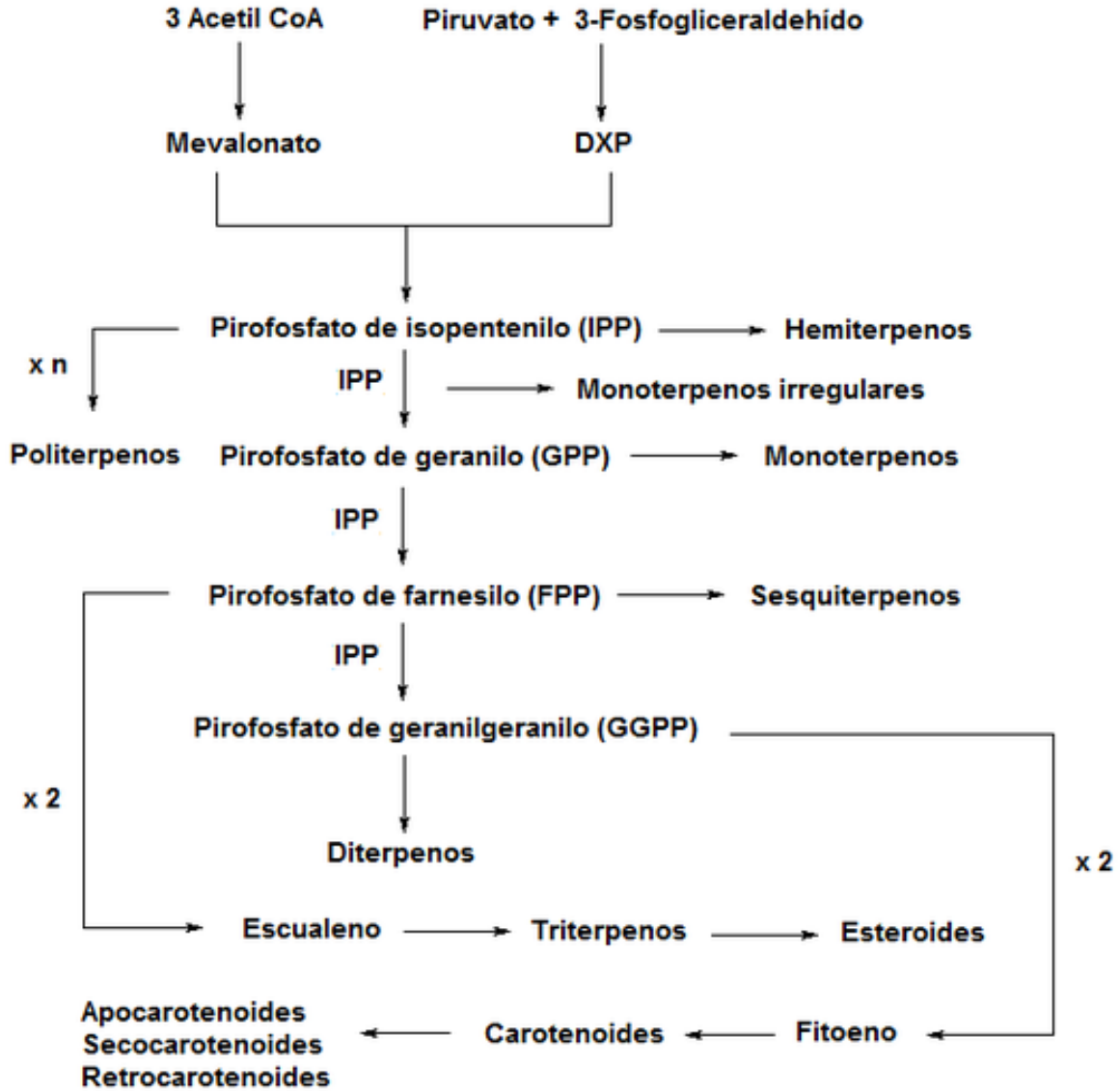
Los terpenos son compuestos orgánicos producidos por las plantas, caracterizados por esqueletos carbonados que contienen diez átomos de carbono o múltiplos de diez (Smith & Cristol, 1970). También se los denomina terpenoides y van a constituir el grupo más

numeroso y amplio de metabolitos secundarios contando con la presencia de más de 40.000 moléculas diferentes presentes en diferentes plantas. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas, carotenoides, clorofilas y plastoquinonas, ubiquinonas y esteroides (Ávalos & Elena, 2009).

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno que contienen y son: los monoterpenos que tienen esqueletos con diez átomos de carbono, los que poseen 15 átomos de carbono se denominan sesquiterpenos y poseen tres unidades de isopreno, y así sucesivamente los diterpenos y triterpenos con 20 y 30 átomos de carbono respectivamente (Bruneton, 2001). Los usos principales de los terpenos es la comercialización de productos cosméticos y alimenticios para el aroma y fragancia de los mismos, o en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc (Ávalos & Elena, 2009).

#### 1.4.1.1.1. Ruta biosintética de los terpenos.

Los terpenos se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico y la del isopentenil pirofosfato (IPP). El isopentenil pirofosfato junto con su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos, como es el caso de geranil difosfato (GPP) precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos (Bruneton, 2001). **(Figura 2)**



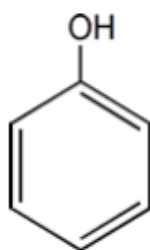
**Figura 2.** Ruta metabólica implicada en la síntesis de terpenoides.  
**Fuente:** Ávalos & Elena, 2009.

#### 1.4.1.2. Compuestos fenólicos.

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol (**Figura 3**), a éstas sustancias se las conoce con el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo

muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina (Bruneton, 2001).

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores (Bruneton, 2001), mientras que la ruta del ácido shiquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas, por lo que esta ruta se la encuentra en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Bruneton, 2001).



**Figura 3.** Estructura química del fenol.  
**Fuente:** Bruneton, 2001.

#### **1.4.1.3. Glicósidos**

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia, su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos (Ávalos & Elena, 2009).

##### **1.4.1.3.1. Saponinas.**

Las saponinas se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas como es el caso de la yuca, el ginseng y la quinua (Bruneton, 2001).

#### 1.4.1.3.2. Glicósidos cardiacos o cardenólidos

Son semejantes a las saponinas esteroideas, por lo que poseen propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas. Quizá el más conocido sea la digitoxina, o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva (Bruneton, 2001).

#### 1.4.1.3.3. Glicósidos cianogénicos

Son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN). Un ejemplo es la amigdalina que se encuentra en las semillas de almendra, albaricoque, cereza o melocotón (Bruneton, 2001).

#### 1.4.1.3.4. Glucosinolatos

También se los denomina glicósidos del aceite de mostaza, son compuestos que se degradan y a su vez desprenden sustancias volátiles responsables del aroma, el olor y el gusto de condimentos como la mostaza y de vegetales como el repollo, brócoli o coliflor (Bruneton, 2001).

#### **1.4.1.4. Alcaloides**

El término alcaloide fue propuesto por W. Meissner en 1819, siendo aplicado a compuestos básicos de origen natural que presentan nitrógeno en su estructura y a su vez que no presentan homogeneidad química, bioquímica o de efectos farmacológicos (Ávalos & Elena, 2009). Los alcaloides manifiestan la característica fisicoquímica de ser básicos, su biosíntesis generalmente es partir de aminoácidos y frecuentemente están provistos de una gran actividad farmacológica y toxicológica (Villar, 1999).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas, la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos, sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivo o analgésico (Ávalos & Elena, 2009).

## **1.5. Cromatografía.**

Cromatografía es una técnica de separación en la cual, los componentes de la muestra, se distribuyen entre dos fases de diferente naturaleza, como consecuencia de la variación de velocidad que se establece al ser arrastrados por una fase móvil, líquida o gaseosa, a través de una fase estacionaria, sólida o líquida. Las fases cromatográficas son dos: la fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria, arrastrando con ella a los compuestos de la mezcla y la fase estacionaria en la cual están retenidos los componentes de la muestra, y a través de la cual fluye la fase móvil arrastrando a los mismos (Unam, 2007).

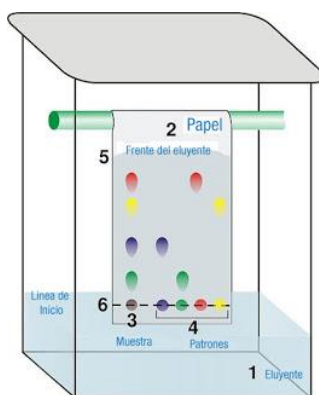
Las técnicas cromatográficas más importantes son la cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos (Connors, 1981).

### **1.5.1. Cromatografía en capa fina.**

La cromatografía en capa fina (CCF) se desarrolló, en principio, por la necesidad de separar lípidos. Ésta cromatografía tiene ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa) ya que el utillaje que precisa es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor, además puede usar reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos (Freifelder, 1991).

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido, es decir la fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares (Unam, 2007). **(ver Figura 4)**





**Figura 4.** Cromatografía ascendente en capa fina.  
**Fuente:** Freifelder, 1991.

### 1.5.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La cromatografía de gases (CG) es una técnica que permite el análisis rápido y exacto de gases, vapores líquidos y permite identificar los componentes individuales de las mezclas gaseosas. El método tiene las ventajas de ser sensible, rápido y sencillo, y se puede obtener información cuantitativa exacta con cantidades muy pequeñas de muestra. En GC la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de un fase móvil de un gas inerte a diferencia de los otros tipos de cromatografía, en que la fase móvil no interaccionan con la moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna (Unam, 2007).

El cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM) suministra un poderoso medio para identificar compuestos, pues la cromatografía de gases asegura que el compuesto se separe de especies estrechamente relacionadas, y el espectrómetro de masas da un espectro único de la sustancia, siendo este complejo de uso general ya que va a reconocer a todos los compuestos (Connors, 1981).

### 1.6. Resonancia Magnética Nuclear.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es otro de los métodos espectroscópicos capaces de proporcionar información acerca de la estructura de los polímeros biológicos, sobre las interacciones entre moléculas y sobre los movimientos moleculares. Sus ventajas especiales son que la teoría es lo suficientemente buena como para poder calcular la disposición detallada de los átomos a partir de los espectros de RMN, se puede localizar los átomos de hidrógeno que quedan fuera del alcance de los análisis de difracción con rayos X y por último que se puede examinar separadamente distintos átomos como H, N, C (Freifelder, 1991).

En el caso del hidrógeno el isotipo más abundante  $^1\text{H}$ , es el que se observa. Para el carbono, el isotipo observado es el  $^{13}\text{C}$ , mientras que el más abundante,  $^{12}\text{C}$  es magnéticamente inactivo. Otros isotopos magnéticamente activos que pueden observar son  $^{15}\text{N}$  y  $^{31}\text{P}$ , para los átomos más relevantes entre las biomoléulas (Unam, 2007).

### **1.6.1. Espectro de $^1\text{H}$**

El espectro de los núcleos de  $^1\text{H}$  es la espectroscopia más empleada ya que nos permite la determinación de la existencia de mezclas o impurezas presentes en una determinada muestra. Con un único espectro de  $^1\text{H}$  de 1D es posible decidir si las señales de otros compuestos o las impurezas presentes pueden ser un obstáculo para el estudio del compuesto principal y determinar posibles suposiciones, por lo que en caso de ser necesario se deberá efectuar una purificación adicional al compuesto (Freifelder, 1991).

### **1.6.2. Espectro de $^{13}\text{C}$**

La resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  es complementaria a la de  $^1\text{H}$ . La espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  determina el entorno magnético de los átomos de carbono. Aproximadamente el 99% de los átomos de carbono en una muestra natural son del isótopo  $^{12}\text{C}$  (Feliz & Molins, 2004). Los desplazamientos químicos del carbono son de 15 a 20 veces mayores que los del hidrógeno, debido a que el carbono está directamente unido a los átomos que resultan ser bien apantallantes o desapantallantes. Además, las señales en el espectro de  $^{13}\text{C}$  son líneas verticales, es decir, no hay desdoblamientos de espín-espín, esto se debe a que sólo el 1% de los átomos de carbono entran en resonancia, y por tanto, existe una probabilidad muy pequeña de que un núcleo de  $^{13}\text{C}$  esté adyacente a otro núcleo de  $^{13}\text{C}$  (Unam, 2007).

### **1.6.3. Espectro DEPT**

El DEPT es un experimento de RMN que requiere una serie de pulsos de radiofrecuencia programados para los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una muestra. El DEPT permite la diferenciación de los  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , así como la identificación de los carbonos cuaternarios. El experimento DEPT posee una sensibilidad superior hasta 4 veces mayor al experimento básico del  $^{13}\text{C}$ , debido a que implica transferencia de magnetización de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Feliz & Molins, 2004).

#### **1.6.4. Espectro HMBC**

Es un experimento de detección de protones que muestra los carbonos que se encuentran a 2 o 3 enlaces de distancia de los protones. El HMBC se modifica para detectar acoplamiento pequeños comenzando por las interacciones a larga distancia entre  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . La heterocorrelación a larga distancia nos va a permitir identificar los carbonos no protonados, mediante el establecimiento de relaciones con los protones situados a varios enlaces. De igual modo es posible determinar la conexión entre distintos fragmentos protonados que tienen entre sí un punto de discontinuidad (Freifelder, 1991).

#### **1.6.5. Espectro HSQC**

El HSQC es un experimento de detección de protones que muestra los carbonos directamente conectados, es decir en un solo enlace. Los picos CH y CH<sub>3</sub> se identifican en la parte superior y presenta un color rojo, mientras que los picos CH<sub>2</sub> están en la parte inferior y presentan un color azul. El HSQC se emplea también cuando el espectro de los protones se superpone, por lo que este experimento no permitirá separar los picos lo suficiente como para poder enumerarlos por convención de izquierda a derecha. Este experimento va a conectar cada protón con el carbono al que está directamente enlazado, encontrando posiblemente los pares metílenos que se necesitan para identificar la molécula (Feliz & Molins, 2004).

### **1.7. Enfermedades Bacterianas**

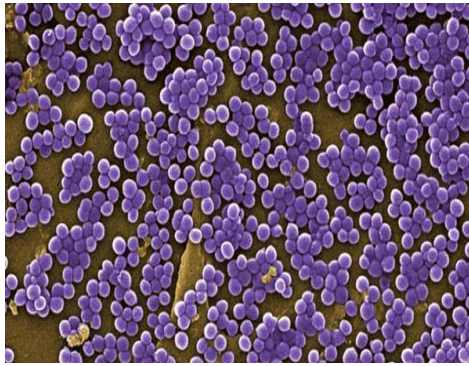
Se denominan enfermedades infecciosas a aquellas provocadas por microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoos o priones (Joklik, Willett, Amos, & Wilfert, 1994). Las enfermedades infecciosas se dividen en transmisibles (o contagiosas) y no transmisibles (o no contagiosas).

Las enfermedades infecciosas transmisibles se pueden propagar directamente desde el individuo infectado, a través de la piel o membranas mucosas o, indirectamente cuando la persona infectada contamina el aire por medio de su respiración, un objeto inanimado o un alimento. En las enfermedades infecciosas no transmisibles el microorganismo no se contagia de un individuo a otro, sino que requiere unas circunstancias especiales, sean medioambientales, accidentales, etc., para su transmisión (Joklik et al., 1994).

## 1.7.1. Bacterias Gram positivas

### 1.7.1.1. *Staphylococcus aureus*

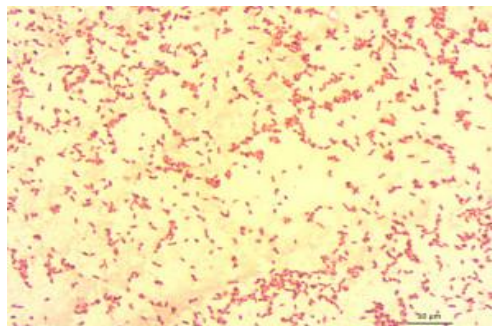
Es una bacteria que se encuentra frecuentemente en la piel y la mucosa de las fosas nasales (**Figura 5**). La mayoría de las personas que lo tienen son portadores sanos de este microorganismo, y la difusión se da, por contacto directo de las manos o por objetos contaminados como ropa o utensilios generales. Causa infecciones en la piel, como foliculitis, forúnculos, impétigo y celulitis (Mandell, Bennett, & Dolin, 1997).



**Figura 5.** *Staphylococcus aureus*.  
**Fuente:** Joklik et al., 1994.

### 1.7.1.2. *Salmonella enterica*

Es una bacteria en forma de barra, anaerobio facultativo que sólo infecta a los seres humanos, es una de las dos especies de *Salmonella* que habita en animales de sangre caliente (**Figura 6**). *S. enterica* entra en el cuerpo humano propagándose en el interior del tracto intestinal y a través del sistema linfático periférico, como la médula ósea y las placas de Peyer, causando la fiebre tifoidea (Mandell et al., 1997).

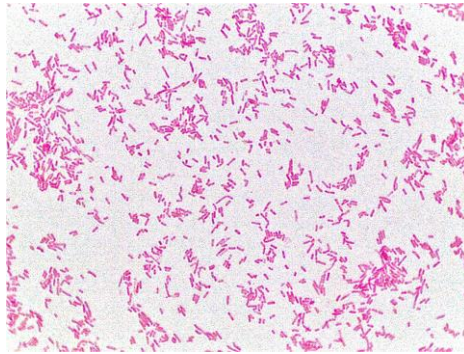


**Figura 6.** *Salmonella enterica*.  
**Fuente:** Mandell et al., 1997.

## 1.7.2. Bacterias gram negativas

### 1.7.2.1. *Escherichia coli*

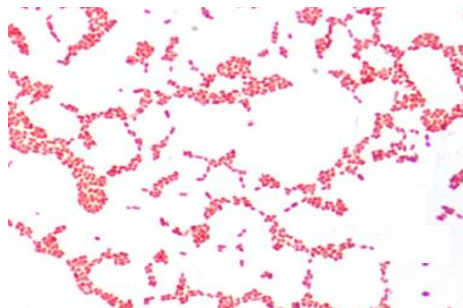
Es un bacilo habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente (**Figura 7**). La infección por *E. coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda. Esta bacteria es necesaria para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, sin embargo, algunas cepas por intercambio de material genético, han adquirido la capacidad de causar infecciones y provocar diarreas sanguinolentas (Joklik et al., 1994).



**Figura 7.** *Escherichia coli*.  
Fuente: Murray, 2014.

### 1.7.2.2. *Proteus vulgaris*

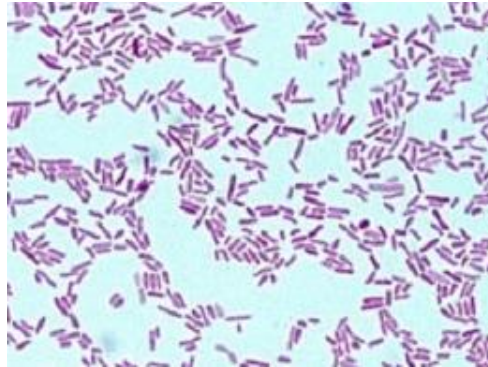
Son bacilos, aerobios y anaerobios facultativos móviles, que se encuentran en la flora normal del ser humano y en los animales en el tracto gastrointestinal (**Figura 8**). Están presentes en el suelo, la materia fecal y en el agua contaminada causando infecciones urinarias y abscesos hepáticos (Mandell et al., 1997).



**Figura 8.** *Proteus vulgaris*.  
Fuente: Romero, 2007.

### 1.7.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Es un bacilo aerobio, con un flagelo polar que puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves (**Figura 9**). Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos (Mandell et al., 1997).



**Figura 9.** *Pseudomonas aeruginosa*.  
**Fuente:** Ash, 2010.

### 1.7.2.4. *Salmonella typhimurium*

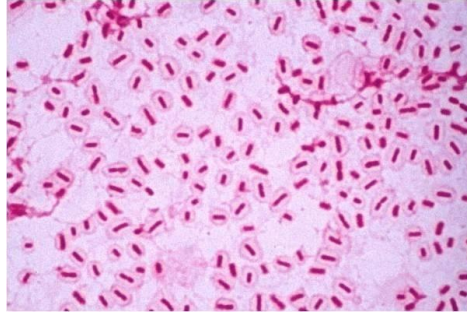
Es un patógeno que presenta una forma bacilar característica y se encuentran predominantemente en el lumen intestinal. Su toxicidad es debida a una membrana externa que consiste en gran parte de lipopolisacáridos que protegen a las bacterias del medio ambiente. Es la causa más común de intoxicación alimentaria por *Salmonella* y causa una enfermedad similar a la fiebre tifoidea en ratones (Mandell et al., 1997). (**ver Figura 10**)



**Figura 10.** *Salmonella typhimurium*.  
**Fuente:** Romero, 2007.

#### **1.7.2.5. *Klebsiella pneumoniae***

Es una bacteria de forma bacilar, no móvil y oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias (**Figura 11**). Está implicada principalmente en infecciones nosocomiales, ya que es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica (Mandell et al., 1997).



**Figura 11.** *Klebsiella pneumoniae*.  
**Fuente:** Murray, 2014.

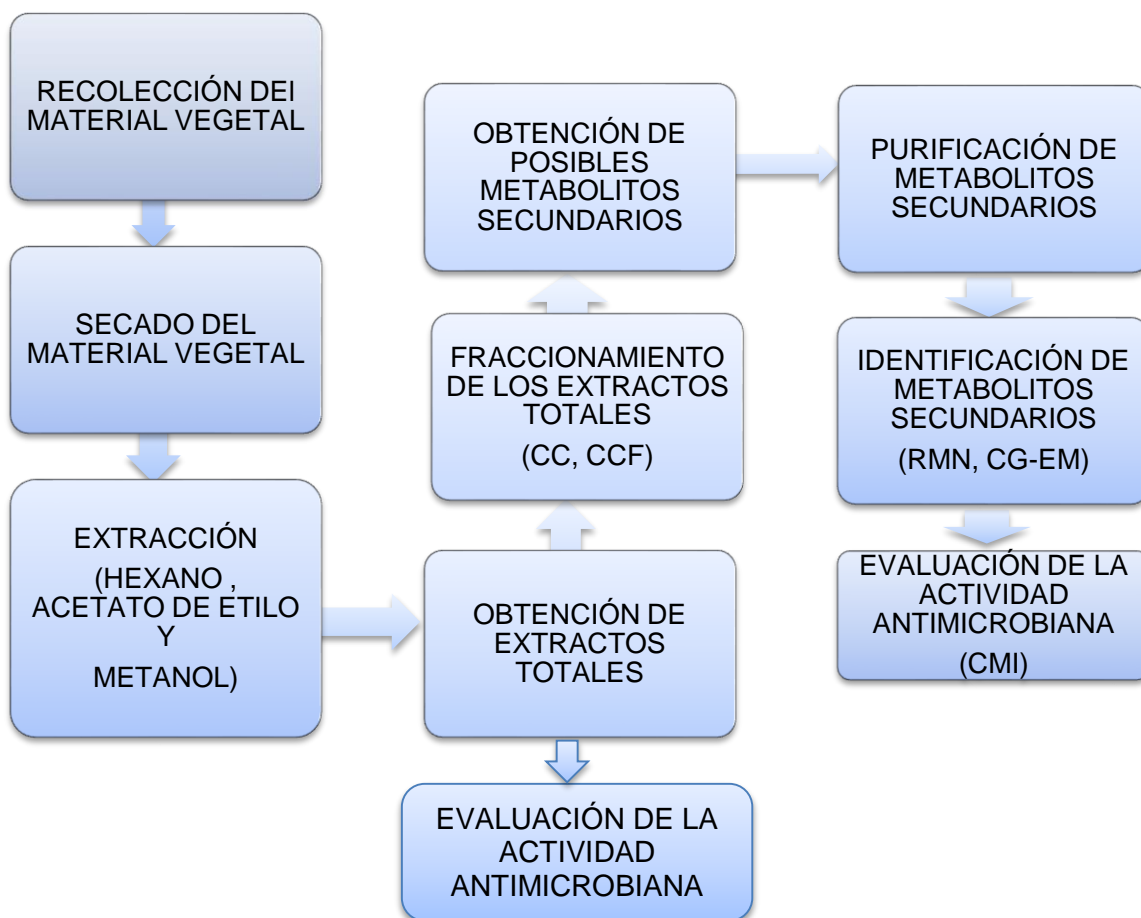
## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2.1. Esquema metodológico

Para el desarrollo de la siguiente investigación se realizó la presente metodología. (ver **Figura 12**)



**Figura 12.** Esquema metodológico de la investigación  
**Fuente:** El autor, 2016

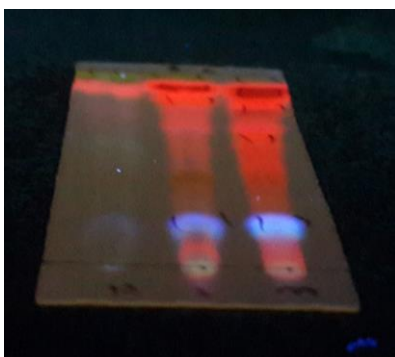
## 2.2. Recolección del material vegetal

Las hojas de *H. translucidum* en estado de fructificación se recolectaron en el sector Loma de Torre, cantón Saraguro, a una altitud de 3167 msnm con las siguientes coordenadas geográficas: N: 096765 - E: 9593558, en el mes de febrero del 2015. La muestra botánica fue identificada por Bolívar Merino del Herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja, y depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja, con voucher PPN-ct-004.

### 2.3. Obtención de extractos totales

Para la obtención de los extractos totales se utilizaron 500g de hojas secas trituradas. Se realizó mediante la técnica de maceración estática con disolventes en polaridad creciente Hexano (Hex), Acetato de Etilo (AcOEt) y Metanol (MeOH) en relación 1:10 planta: solvente, por un periodo de una hora con cada uno, este proceso se los repitió tres veces. Posteriormente se filtró al vacío y se concentró a presión reducida a una temperatura de 30°C.

Una vez obtenidos los extractos totales de Hexano, Acetato de Etilo y Metanol, se realizó CCF de cada extracto en diferentes polaridades para observar la riqueza y separación de metabolitos secundarios presentes en cada extracto, utilizando placas de sílica gel 60 F254, como se indica en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Cromatografía en capa fina de extractos totales (Hex: AcOEt; 7:3).  
**Fuente:** El autor, 2016.

### 2.4. Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Hexano.

Para el fraccionamiento del extracto de Hexano se procedió a realizar en una relación 1:55 extracto: sílica, tomando 2.70 g de extracto y 165 g de sílica gel (Merck 0.0015-00) fase directa. Se eluyó en polaridad creciente iniciando 9:1 Hex: AcOEt hasta AcOEt 100%. Una vez obtenidas las 13 fracciones se realizó CCF, para ello se utilizaron placas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> (fase directa) para la fase estacionaria y para la fase móvil se utilizaron disolventes Hex: AcOEt en diferentes relaciones que fueron desde 9.5:0.5 para las primeras fracciones hasta 5:5 para las últimas. Esto se lo realizó con la finalidad de observar cómo se separaron los compuestos en la columna y para ello se utilizó una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365 nm; para el revelado de las placas de TLC se

utilizó ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 12%. Se unió las fracciones de acuerdo a su *rf* y color de los compuestos.

## 2.5. Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Acetato de Etilo.

El fraccionamiento del extracto total de Acetato de Etilo se lo realizó en una relación 1:50 extracto: sílica, para ello se tomó 4 g de extracto y 200 g de sílica gel (RP-18) fase inversa. La columna se eluyó en polaridad Isocrática MeOH: H<sub>2</sub>O 9:1. Se obtuvieron 200 fracciones unidas en 9 fracciones (HTAI1-22 - HTAI9-22) (**Tabla 2**) las cuáles se les realizó CCF para observar los posibles compuestos presentes en la misma, para ello se utilizaron placas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> (fase directa) para la fase estacionaria y para la fase móvil se utilizaron disolventes Hex: AcOEt en diferentes relaciones que fueron desde 8:2 hasta 6:4 Hex: AcOEt. Se utilizó una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365 nm para su visualización y para el revelado de las placas de TLC se utilizó ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 12%. Posterior a ello se procedió a unir las fracciones por su *rf* y color.

**Tabla 2.** Fracciones obtenidas del extracto total de Acetato de Etilo

Fracción	Muestra	Peso (mg)
HTAI 1-22	1-8	6
HTAI 2-22	9-14	736
HTAI 3-22	15-18	236
HTAI 4-22	19-27	251
HTAI 5-22	28-45	249
HTAI 6-22	46-59	65
HTAI 7-22	60-100	82
HTAI 8-22	101-129	60
HTAI 9-22	130-200	113

Fuente: El autor, 2016

HT: *Hedyosmum translucentum*; A: Acetato de Etilo; I: Inversa

### 2.5.2. Purificación de la fracción HTAI-3-22

Para la purificación de la fracción HTAI-3-22, realizamos una columna cromatográfica con 236mg de muestra y 25g de sílica gel (Merck 0.0015-00) fase directa. La columna fue realizada en polaridad creciente desde 9.5:0.5 hasta 7:3 Hex: AcOEt, obteniendo un total de 190 fracciones, unidas posteriormente en 8 sub fracciones (HTAI3-1 - HTAI3-8). La

fracción utilizada para el aislamiento de nuestro compuesto fue la fracción HTAI3-4, con la que se realizó una columna cromatográfica con 24mg de muestra en proporciones de 9:1 y 8:2 Hex: AcOEt para su elución, se obtuvieron 150 fracciones unidas en 4 fracciones (HTAI3-4-1 - HTAI3-4-4) observando una similitud mediante CCF en la fracciones HTAI3-4-2 y HTAI3-4-3 de acuerdo a su color y  $r_f$  (**Figura 14**). Para corroborar la pureza de nuestro compuesto se realizaron  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en el equipo de RMN (**ver Anexo 1**).



**Figura 14.** CCF de HTAI3-4-2 Hex: AcOEt 8:2  
**Fuente:** El autor, 2016

### 2.5.3. Purificación de la fracción HTAI-4-22

Para la purificación de la fracción HTAI 4-22 se realizó una columna cromatográfica tomando 251mg de muestra con 50g de silica gel (Merck 0.0015-00) fase directa. Se eluyó la columna en proporciones crecientes desde 9.5:0.5 hasta 7:3 Hex: AcOEt, obteniéndose 240 fracciones, unidas en 9 sub fracciones (HTAI4-1 - HTAI4-9). La fracción tomada para el aislamiento de nuestro compuesto fue la unión de la sub fracción HTAI4-7 y HTAI4-8, la cual con 40mg de muestra se realizó una columna cromatográfica en una proporción 8,5:1,5 Hex: AcOEt donde se obtuvieron 196 fracciones unidas en 5 fracciones (HTAI V1- HTAI V5) observando similitud entre la fracción HTAI-V2 Y HTAI-V3, esto fue constatado realizando CCF ya que las mismas presentaron el mismo  $r_f$  y coloración (**Figura 15**). Para corroborar si nuestro compuesto se encontraba puro se procedió a realizar  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en el equipo NMR (**Anexo 3**) observando así la ausencia de impurezas en el mismo.



**Figura 15.** CCF de HTAI-V2 Hex: AcOEt 8.5:1.5  
**Fuente:** El autor, 2016

## 2.6. Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de Metanol.

El extracto total de Metanol se lo realizó en una relación 1:100 extracto: sílica, con 2 g de extracto y 200 g de sílica gel (Merck RP-18) fase inversa. La columna se eluyó desde una relación 8:2 hasta 9:1 MeOH: Agua. Se obtuvieron 74 fracciones unidas en 11 fracciones de acuerdo su color y  $r_f$  (**ver Tabla 3**), a la fracciones obtenidas se les realizó CCF para observar los posibles compuestos, donde se utilizó placas de Sílica gel 60  $F_{254}$  (fase directa) para la fase estacionaria y para la fase móvil disolventes Hex: AcOEt en proporciones 6:4 hasta 9:1 MeOH: Agua. Se utilizó una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365 nm para su visualización y para el revelado de las placas se utilizó ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 12%.

**Tabla 3.** Fracciones obtenidas del extracto total de Metanol

Fracción	Muestra	Peso (mg)
<b>HTM -1</b>	<b>2-6</b>	<b>980</b>
HTM -2	7-10	107
HTM -3	11-12	18
HTM -4	13-16	29
HTM -5	17-22	31
HTM -6	23-33	39
HTM -7	34-42	19
HTM -8	43-54	16
HTM -9	55-62	13

<b>HTM -10</b>	63-66	4
<b>HTM -11</b>	67-74	8

Fuente: El autor, 2016 HT: *Hedyosmum translucidum*; M: Metanol

### 2.6.2. Purificación de la fracción HTM-1

La fracción HTM-1 fue disuelta en Diclorometano obteniendo un precipitado de la misma, a este precipitado se le realizó una columna isocrática en proporción 9,5:0,5 Hex: AcOEt utilizando 15g de silica con 30mg de muestra. Se obtuvieron 165 fracciones unidas en 3 fracciones (HTM1-1 – HTM1-3), en su elución se observó similitud entre las fracciones HTM1-2 y HTM1-3, resultado que se constató en CCF ya que las fracciones presentaron el mismo  $r_f$  y coloración. Se procedió a unir las fracciones y se realizaron pruebas de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en el equipo NMR (**Anexo 5**), teniendo resultados factibles en cuanto a su pureza.

## 2.7. Caracterización estructural

### 2.7.1. Resonancia Magnética Nuclear

Los análisis se realizaron en un equipo marca Agilent N° de serie MRY0021953 operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , usando  $\text{CDCl}_3$ .

### 2.7.2. Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM)

Para la obtención del peso molecular de los compuestos aislados se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent serie 5973 inert acoplado a un espectrómetro de masas, dotado con un sistema de operación de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, que cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. Las características de la columna capilar utilizada se detallan en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Características de la columna capilar

Fracción	Columna	Temperatura (°C)	Película (um)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
<b>HTAI V3-V4</b>	DB-5MS	350	0.25	0.25	30

Fuente: El autor, 2016

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras para su posterior análisis mediante CG-EM se detallan en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Análisis de la columna utilizada

<b>INYECTOR</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Modo: Split</li><li>• Radio de partición: 1:1</li><li>• Temperatura inicial: 250°C</li><li>• Gas: Helio</li></ul>
<b>HORNO</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Temperatura inicial: 50°C</li><li>• Tiempo inicial: 3min</li><li>• Rampa de temperatura: 10°C /min</li><li>• Temperatura final: 270°C</li></ul>
<b>DETECTOR</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Espectrómetro de masas</li><li>• Temperatura del cuadrupolo: 200°C</li><li>• Temperatura de la fuente: 280°C</li><li>• Modo: Scan</li></ul>
<b>COLUMNA</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Columna Capilar DB-5MS, modelo Agilent 122-5532</li><li>• 0.25 mm*30m*0.25um</li><li>• Temperatura máxima: 350°C</li><li>• Flujo constante</li><li>• Flujo inicial: 1mL/min</li><li>• Presión nominal: 52.6 kpa</li><li>• Velocidad promedio: 36cm/seg</li><li>• Presión salida: Vacío</li></ul>

Fuente: El autor, 2016

## 2.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada mediante el método de micro dilución en caldo.

### 2.8.1. Microorganismos de prueba

En la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron 7 cepas bacterianas y 2 fúngicas.

#### Cepas bacterianas gram positivas:

*Salmonella enterica* (ATCC®10708) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923).

### Cepas bacterianas gram negativas:

*Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 9997), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Salmonella typhimurium* (LT2), *Escherichia coli* (ATCC® 25922) y *Proteus vulgaris* (ATCC® 8427).

#### 2.8.2. Preparación de las muestras

Se utilizaron 20mg de muestra para los extractos desclorofilados de AcOEt y MeOH, en 1ml de Dimetilsulfóxido (DMSO).

#### 2.8.3. Preparación del cultivo overnight

Los microorganismos utilizados se encuentran en reserva criogénica a -80°C. Los medios de cultivo y las condiciones de incubación para cada microorganismo se detallan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Medios de cultivo y sus condiciones.

<b><u>Bacterias</u></b>	<b><u>Medios de cultivo</u></b>	<b><u>Condiciones de incubación</u></b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Trypticase Soja	Temperatura: 37°C Horas: 14-16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Salmonella typhimurium</i>	Caldo Oxoid	
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Mueller Hinton (Difco)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Salmonella enterica</i>	Caldo nutritivo	

Fuente: El autor, 2016

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

#### 2.8.4. Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias

Se toman 10µl del cultivo overnight con la bacteria a utilizar y se colocan en 10 ml de caldo Mueller Hinton, de esta dilución se toman 100µl para completar un volumen final de 200µl en la placa de cultivo, ajustando la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL.



### **2.8.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana**

En placas de 96 pocillos se realizó el ensayo: Primero, se colocó 100µl de medio Mueller Hinton en todos los pocillos, luego en la primera fila (A-12) se añaden 80µl más del mismo medio. En la primera fila (A-9) se colocó 20µl de los extractos con los que se realizará la prueba. Para ello es necesario contar con un control de esterilidad en A10, donde se colocará 20µl más de medio, un control positivo en A11 colocando 20µl de DMSO y un control negativo en A12 donde se colocarán 20µl de antibiótico (Tetraciclina). Luego, se harán diluciones seriadas tomando 100µl de la primera fila (A-12) y diluyendo con 100µl de la fila siguiente (B-12), al llegar a la última fila (H-12) se eliminarán 100µl. Por último, se debe colocar 100µl de inóculo de bacteria en todas las filas exceptuando el control de esterilidad. La incubación se realizó a 37°C durante 24 horas.

## **CAPITULO III**

### **RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### 3.1. Extractos obtenidos de *Hedyosmum translucidum*

En la **Tabla 7** se detalla el rendimiento y peso de los extractos obtenidos de Hex, AcOEt y MeOH, obtenidos a partir de 500 g muestra vegetal.

**Tabla 7.** Peso y rendimiento de extractos de *Hedyosmum translucidum*

Extracto	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Hexano	500g	3,4294	0,68
Acetato de Etilo		8,5615	1,71
Metanol		25,6431	5,12

Fuente: El autor, 2016

Los rendimientos obtenidos en la presente investigación difieren con respecto a estudios realizados en *H. racemosum*, que obtuvo porcentajes con un doble de rendimiento en los extractos totales de Hex 1,95%, AcOEt 2,52% y MeOH 10,25 (Tinoco. D, 2013). Igualmente presenta similitud en el estudio de *H. purpuracens* que obtuvo los rendimientos de extractos totales siendo estos Hex 2,06%, AcOEt 1,69 y MeOH 7,82 (Zaruma. J, 2015).

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

Del fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo se obtuvieron dos compuestos puros HTAI3-22 Y HTAI4-22.

De la fracción HTAI-3-22 se obtuvo un compuesto cristalino, que eluyo en polaridad 8: 2 Hex: AcOEt con un  $r_f$  de 0.51. El compuesto aislado es un sesquiterpeno bi cíclico con un peso molecular de 238 g/mol (**Anexo 2**) y su fórmula química es  $C_{15}H_{26}O_2$ , y comparado con literatura nos da el nombre de Voleneol (Zeng et al., 2013).

Se realizó  $^1H$  NMR en cloroformo deuterado obteniendo los siguientes resultados: (400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ; ppm J/Hz): 0.70 (s, 3 H), 0.87 (d, J=7.2, 3H), 0.95 (d, J=7.2, 3H), 3.42 (dd, J=11.2, 4.4, 1H), 3.71 (t, J=9.2, 1H), 4.74 (s, 1H), 5.02 (s, 1H).

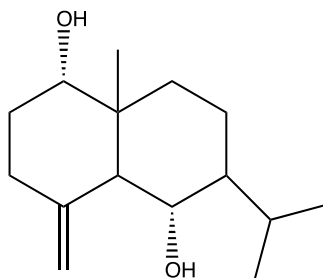
Los resultados obtenidos de  $^{13}C$  NMR se compararon con literatura. (**ver Tabla 8**)

**Tabla 8.** Comparación de  $^{13}\text{C}$  NMR del Voleneol.

Número de Carbonos	Voleneol- <i>Hedyosmum translucidum</i>	Voleneol(Zeng et al., 2013)
1	79.18	79.0
2	32.0	31.9
3	36.4	36.3
4	146.4	146.2
5	56.0	55.9
6	67.1	67.0
7	49.4	49.3
8	18.2	18.1
9	35.2	35.1
10	41.8	41.7
11	26.1	26.0
12	21.2	21.1
13	16.3	16.2
14	11.7	11.6
15	107.9	107.8

Fuente: El autor, 2016

A continuación se observa la estructura química del Voleneol.



**Figura 16.** Estructura química del Voleneol

Fuente: El autor, 2016

Este compuesto es el primer reporte en la familia Chloranthaceae, pero se ha identificado en otras especies de género *Senecio* de la familia *Asteraceae* (Bohlmann, et al. 1983). Así como también estudios nos indican su presencia en la familia Zingiberaceae (Huang et al., 2014) y (Tao, Li, Ji, Wang, & Qin, 2007).

De la fracción HTAI 4-22 se obtuvo un compuesto cristalino de color blanquecino, que eluyó en polaridad 8.5:1.5 Hex: AcOEt con un  $r_f$  de 0.41. El compuesto aislado es un sesquiterpeno con un peso molecular 280 g/mol (**Anexo 4**) y una fórmula química de  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3$ .

Se realizó  $^{13}\text{C}$  NMR en cloroformo deuterado obteniendo los siguientes resultados: (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ; ppm J/Hz): C1 (79.3), C2 (32.32), C3 (36.22), C4 (144.6), C5 (53.59), C6

(71.05), C7 (49.12), C8 (18.20), C9 (35.20), C10 (42.32), C11 (26.31), C12 (21.38), C13 (16.16), C14 (107.98), C15 (11.77), C16 (171.27), C17 (21.50).

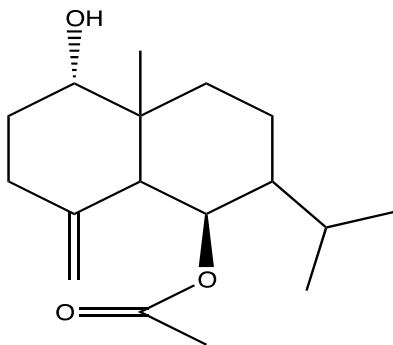
Los resultados obtenidos de  $^1\text{H}$  NMR se compararon con los reportados en (Hoffmann & Cole, 1977). **(ver Tabla 9)**

**Tabla 9.** Comparación de  $^1\text{H}$  NMR del Voleneol acetate.

<b>Voleneol Acetate-<i>Hedyosmum translucidum</i></b>	<b>Voleneol acetate (Hoffmann &amp; Cole, 1977)</b>
5.1 (t, J= 10Hz, 1H)	5.1 (br t, J = 10 Hz, 1 H)
4.8 (s, 1H)	4.8 (s, 1 H)
4.6 (s, 1H)	4.6 (s, 1 H)
3.43 (dd, J= 4.8, 11.6, 1 H)	3.43 (dd, J=5, 10, 1H)
2.0 (s, 3 H)	2.0 (s, 3 H)
0.92 (d, J= 7.2, 3H)	0.91 (d, J = 6 Hz, 3 H)
0.87 (d, J=6.8, 3 H)	0.86 (d, J = 6 Hz, 3 H)
0.73 (s, 3 H)	0.73 (s, 3 H)

Fuente: El autor, 2016

A continuación se observa la estructura química del Voleneol Acetato



**Figura 17.** Estructura química del Voleneol Acetato

Fuente: El autor, 2016

El Voleneol acetato en su primer reporte se ha aislado a partir del Voleneol diacetato mediante una hidrólisis en  $\text{KHC}\text{O}_3$  con metanol para su posterior cristalización en éter, el cual presenta señales características de  $^1\text{H}$  NMR 3,43 (dd, J = 5, 10 Hz, 1 H) y 2,0 (s, 3 H), a diferencia del diacetate que presenta señales en 4.7 (dd, J = 5, 10 Hz, 1 H) y 2.1 (s, 3 H) ausentes en el acetato; compuestos aislados de *Lepidotrichilia volensii* perteneciente a la familia Meliaceae (Hoffmann & Cole, 1977).

### 3.3. Fraccionamiento del extracto de Metanol

Del fraccionamiento del extracto en Metanol se obtuvo un compuesto puro HTM-1 el cual presento color blanquecino y que eluyó en polaridad 9.5:0.5 Hex: AcOEt con un  $r_f$  de 0.45 y que no se observaba al momento de su revelado, para ello se utilizó una lámpara de luz ultravioleta a 365 nm como se indica en la **Figura 18**. El compuesto aislado es una cumarina poli cíclica con un peso molecular de 206 g/mol y su fórmula química es  $C_{11}H_{10}O_4$ , y comparado con literatura nos da el nombre de Escoparona (El-Demerdash, Dawidar, Keshk, & Abdel-Mogib, 2009)



**Figura 18.** Cromatografía en capa fina de HTM1-2 Hex: AcOEt 9.5:0.5  
**Fuente:** El autor, 2016

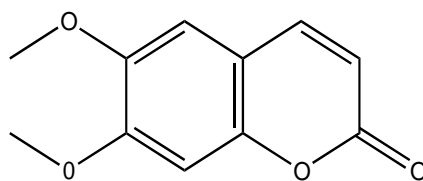
Los resultados obtenidos de  $^1H$  NMR se compararon con los reportados en (El-Demerdash et al., 2009). (ver **Tabla 10**)

**Tabla 10.** Comparación de  $^1H$  NMR de la Escoparona

<b>Escoparona-<i>Hedyosmum translucidum</i></b>	<b>Escoparona-(El-Demerdash et al., 2009)</b>
6.27 (d, J= 9.2, 1H)	6.28 (d, J= 9.6, 1H)
7.6 (d, J=9.2, 1H)	7.6 (d, J=9.6, 1H)
6.92 (s, 1H)	6.92 (s, 1H)
6.84 (s, 1 H)	6.86 (s, 1 H)
3.97 (s, 3 H)	3.94 (s, 3 H)
3.95 (s, 3H)	3.91 (s, 3H)

**Fuente:** El autor, 2016

A continuación se observa la estructura química de la Escoparona.



**Figura 19.** Estructura química de la Escoparona  
**Fuente:** El autor, 2016

Es el primer reporte de la Escoparona en el género *Hedyosmum*, sin embargo si se ha encontrado reportes en la familia Chloranthaceae como en el género Chloranthus (Xu, Hu, Yuan, & Yang, 2008). La escoparona ha tenido presencia también en la familia Asclepiadaceae (El-Demerdash et al., 2009), Apiaceae (Dridi, Laraoui, & Gasmi, 2016) y Rutaceae (Fomani et al., 2016).

### 3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se realizó por el método de micro dilución en caldo a partir de los extractos desclorofilados de AcOEt y MeOH y se detallan los resultados en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Concentración mínima inhibitoria

Concentración mínima inhibitoria	
Extracto	Bacterias
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MeOH	500ug/ml
AcOEt	-

**Fuente:** El autor, 2016

El extracto de MeOH presentó una actividad antimicrobiana de 500ug/ml contra *Klebsiella pneumoniae*, mientras que el extracto en AcOEt no presentó actividad contra ninguna bacteria.

En otros estudios relacionados con el género *Hedyosmum* en la provincia de Loja, extractos totales de Hexano, Acetato de Etilo y Metanol no muestran actividad antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo si presentan actividad contra otras bacterias como *S. aureus* y *E. faecalis* (62.5ug/ml) en el extracto de Hexano y AcOEt (125 ug/ml) en *H. strigosum* (Zaruma, 2015), en *H. racemosum* los extractos totales son inactivos frente a bacterias gram positivas y gram negativas (Tinoco, 2013), al igual que en *H. purpuracens* (Paredes, 2013).

## CONCLUSIONES

Mediante técnicas cromatográficas y análisis espectroscópicos de NMR y CG-EM se identificaron dos sesquiterpenos bi cíclicos con el nombre Voleneol y Voleneol Acetato del extracto de Acetato de Etilo, siendo este su primer reporte en la familia Chloranthaceae.

De igual manera del extracto total de Metanol se identificó una cumarina con el nombre de Escoparona siendo este su primer reporte en el género Hedyosmum.

El extracto total de AcOEt presentó una actividad antibacteriana moderada frente a *Klebsiella pneumoniae* con 500ug/ml.



## RECOMENDACIONES

Realizar la caracterización química del aceite esencial de *H. translucidum* por ser una planta aromática, ya que en otras especies como en *H. sprucei* presenta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y actividad citotóxica contra líneas celulares como A549 en el cáncer de mama y MCF-7 en el cáncer de mama (Guerrini et al., 2016)

## BIBLIOGRAFÍA

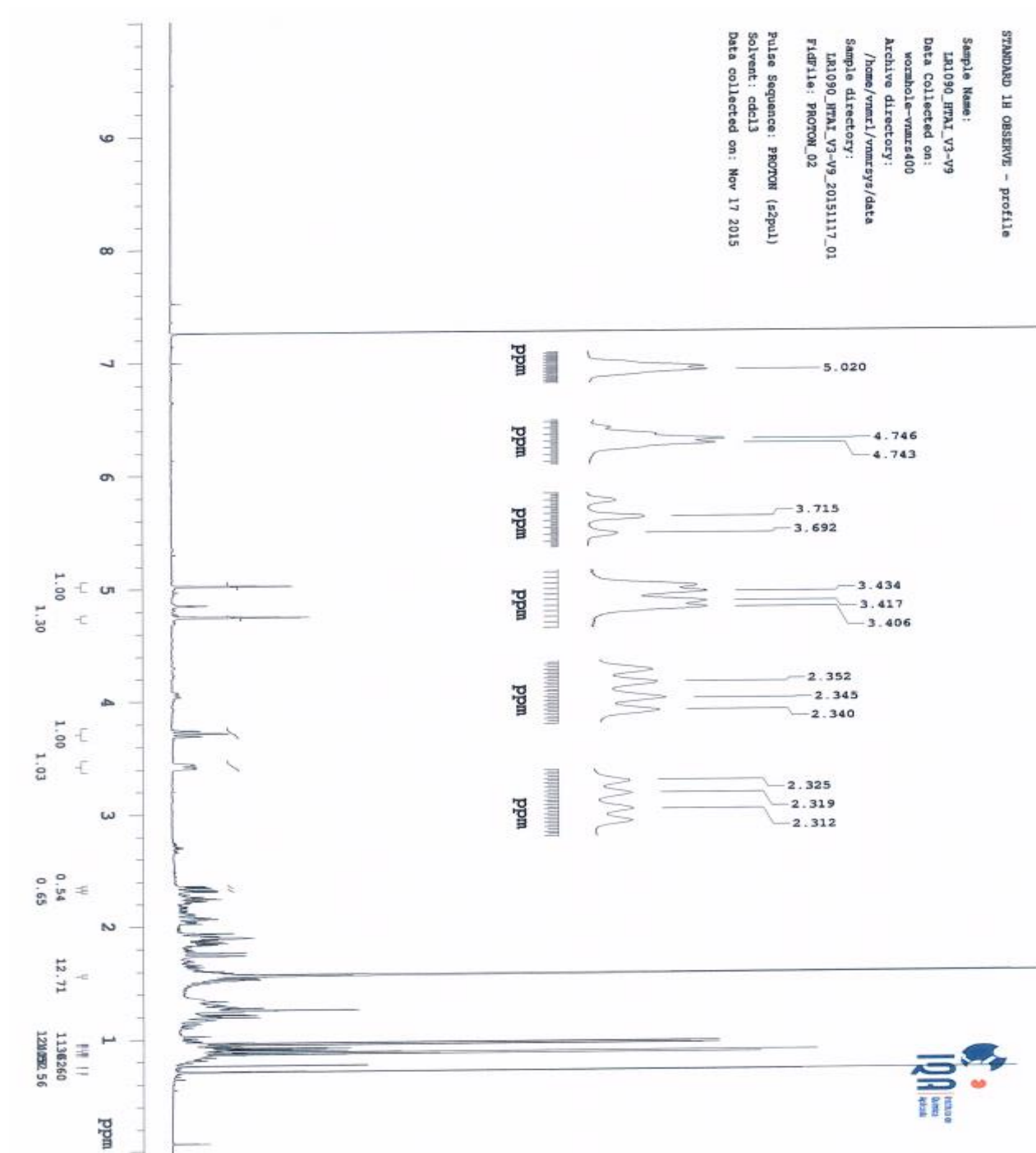
- Acebey, L. . b c, Jullian, V. . c, Sereno, D. ., Chevalley, S. . c, Estevez, Y. . c, Moulis, C. . c, ... Sauvain, M. . c. (2010). Anti-leishmanial lindenane sesquiterpenes from *hedyosmum angustifolium*. *Planta Medica*, 76(4), 365–368.
- Amoah, S. K. S. ., De Oliveira, F. L. ., Da Cruz, A. C. H. ., De Souza, N. M. ., Campos, F. R. ., Barison, A. ., & Biavatti, M. W. . (2013). Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). *Phytochemistry*, 87, 126–132.
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Bernal, Y., & Correa, J. (1991). *Especies vegetales promisorias* (Guadalupe). Santa Fe.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia* (Segunda Ed). Zaragoza.
- Calderón, G. (1994). Flora Del Bajío Y De Regiones Adyacentes Smilacaceae, 1–6.
- Cao, C. M., Peng, Y., Shi, Q. W., & Xiao, P. G. (2008). Chemical constituents and bioactivities of plants of chloranthaceae. *Chemistry and Biodiversity*, 5(2), 219–238.
- Connors, K. (1981). *Curso de Análisis Farmacéutico*. (Reverté, Ed.). España.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. (M. De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, Ed.). Quito.
- Delgado, P. A. ., Quijano, C. E. ., Morales, G. ., & Pino, J. A. . (2010). Composition of the essential oil from leaves and fruits of *hedyosmum colombianum* cuatrec. grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(3), 234–236.
- Dridi, S., Laraoui, H., & Gasmi, A. I. (2016). Phytochemical study of Algerian *Bupleurum atlanticum* Murb (Apiaceae). *Der Pharmacia Lettre*, 8(3), 246–248.
- El-Demerdash, A., Dawidar, A., Keshk, E., & Abdel-Mogib, M. (2009). Coumarins from *Cynanchum acutum*, 1(November 2008), 65–69.
- Feliz, M., & Molins, A. (2004). Determinación estructural - Utilización combinada de experimentos de RMN.

- Fomani, M., Ngeufa Happi, E., Nougba Bisoue, A., Ndom, J. C., Kamdem Waffo, A. F., Sewald, N., & Wansi, J. D. (2016). Oxidative burst inhibition, cytotoxicity and antibacterial acridinoline alkaloids from *Citrus reticulata* (Blanco). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(2), 306–309.
- Freifelder, D. (1991). *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular*. (Reverté, Ed.). México.
- Hoffmann, J., & Cole, J. (1977). Voleneol Diacetate: a New Sesquiterpenoid from *Lepidotrichilia volensii* Leroy (Meliaceae), 202(6), 1254–1256.
- Huang, Y., Chai, L., Jiang, X.-Z., Lai, M.-X., Lin, X., & Liu, B.-M. (2014). Chemical constituents in roots and rhizomes of *Curacuma aromatica*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 45(16), 2307–2311.
- Huong, T. T. ., Vab Thong, N. ., Minh, T. T. ., Tram, L. H. ., Anh, N. T. ., Cuong, H. D. ., ... Ca, D. V. . (2014). Chloranerectuslactone V, a new sesquiterpene from *Chloranthus erectus* Verdc. *Letters in Organic Chemistry*, 11(9), 639–642.
- Joklik, W., Willett, H., Amos, B., & Wilfert, C. (1994). *Micrbiología* (20° ed.). Buenos Aires-Argentina.
- Jorgensen, P., & Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Missouri.
- Lázaro, B. (2008). *Plantas medicinales* (Maxtor). Barcelona.
- Mandell, G., Bennett, J., & Dolin, R. (1997). *Enfermedades Infecciosas* (Cuarta). Buenos Aires-Argentina.
- Matilla, M. M. del C. (2014). Pervivencia de los remedios vegetales tradicionales americanos en la terapéutica española actual.
- OMS. (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. In *Organización Mundial de la Salud*. Ginebra.
- OMS. (2015). Diversidad biológica. In *Organización Mundial de la Salud*. Ginebra.
- Paredes, M. (2013). *Composición química y actividad antimicrobiana de Hedyosmum purpurascens (Chlorantaceae) de la provincia de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.

- Perez, I. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural*, 23–26.
- Ríos, M., Koziol, M., Borgtoft, H., Granda, G. (2007). *Plantas útiles del Ecuador* (Abya-Yala). Quito.
- Roldan, A. (1997). *100 Plantas medicinales escogidas* (EDAF). España.
- Smith, L. O., & Cristol, S. J. (1970). *Química Orgánica*. (Reverte, Ed.). Barcelona.
- Tao, Z.-M., Li, Y.-Y., Ji, P., Wang, Y.-B., & Qin, G.-W. (2007). Chemical constituents from aerial part of *Curcuma wenyujin*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 32(24), 2604–2606.
- Tinoco, D. (2013). *Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los extractos totales y metabolitos secundarios de Hedyosmum racemosum de Zamora, Ecuador*. Universidad Tecnica Particular de Loja.
- Unam. (2007). Técnicas Cromatográficas. *Quimica Analitica Instrumental II*, 1–123.
- Villar, Á. (1999). *Farmacognosia General* (Editorial ). Madrid-España.
- Wang, A.-R., Song, H.-C., An, H.-M., Huang, Q., Luo, X., & Dong, J.-Y. (2015). Secondary metabolites of plants from the genus *Chloranthus*: Chemistry and biological activities. *Chemistry and Biodiversity*, 12(4), 451–473.
- Wang, L.-J. ., Xiong, J. ., Lau, C. ., Pan, L.-L. ., & Hu, J.-F. . (2015). Sesquiterpenoids and further diterpenoids from the rare Chloranthaceae plant *Chloranthus sessilifolius*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17(12), 1220–1230.
- Xu, X., Hu, X., Yuan, J., & Yang, J. (2008). Studies o chemical constituents os *Sarcandra glabra*.
- Zaruma, D. (2015). *Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de hojas de plantas con flores femeninas de Hedyosmum strigosum en el cantón Saraguro provincia de Loja*. Universidad Tecnica Particular de Loja.
- Zeng, Q., Ye, J., Ren, J., Cheng, X.-R., Qin, J.-J., Jin, H.-Z., & Zhang, W.-D. (2013). Chemical constituents from *Aphanamixis grandifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49(3), 415–419.

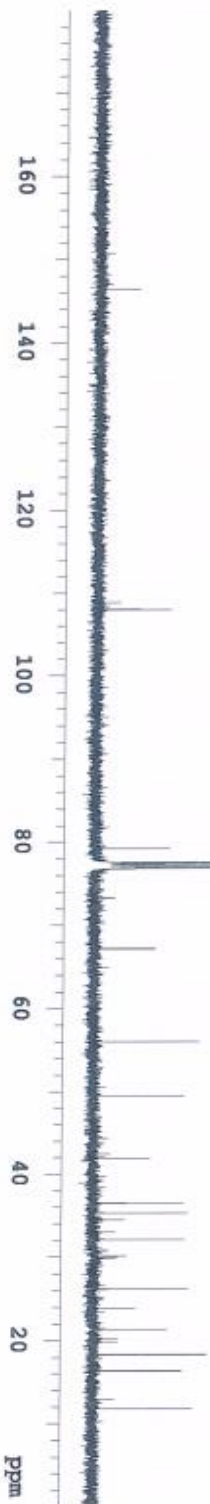
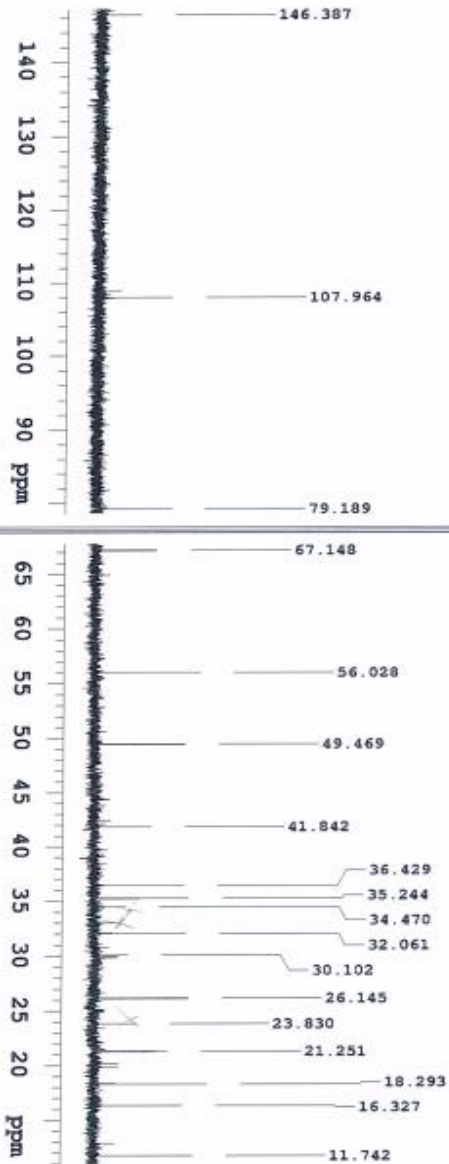
## **ANEXOS**

**Anexo 1:** Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción HTAI-3-40-45 ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



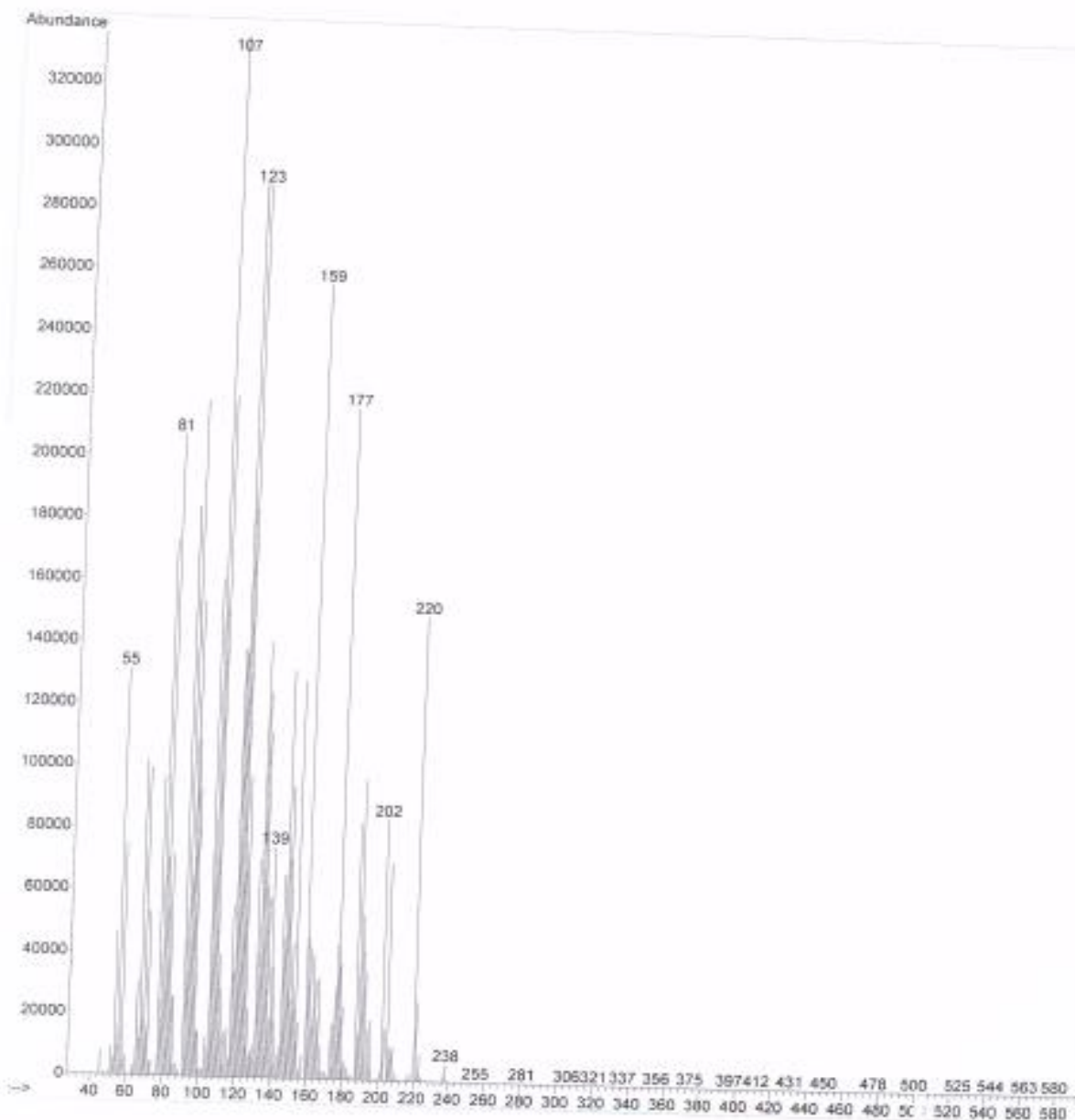
STANDARD IH OBSERVE - profile

Sample Name: IRL090\_HPAI\_V3-V9  
Data Collected on: wormhole-vmrzs400  
Archive directory: /home/vmrz1/vmrzys/data  
Sample directory: IRL090\_HPAI\_V3-V9\_20151117\_01  
Fidfile: CARBON\_01  
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)  
Solvent: cdcl3  
Data collected on: Nov 17 2015



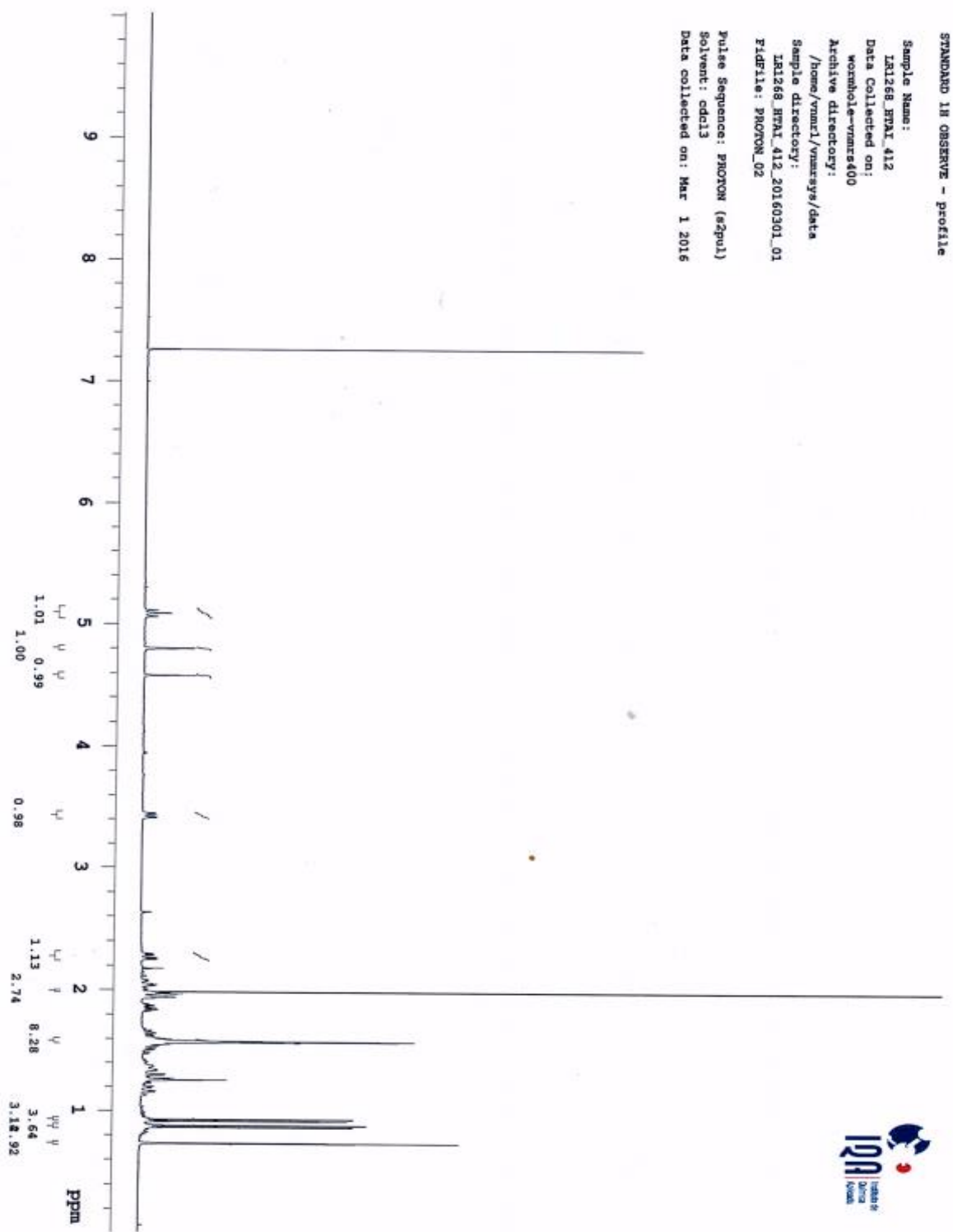
**Anexo 2:** Espectro de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases de la fracción HTAI-3-40-45.

File : D:\MSDCHEM\DATA\2015\Vladimir Morocho\MANUEL\HTAI\_V3V4.D  
Operator : NS  
Acquired : 20 Nov 2015 9:18 using AcqMethod METODO\_VLADIMIR  
Instrument : GCMSD CET  
Sample Name: HTAI\_V3V4  
Misc Info :  
Vial Number: 1



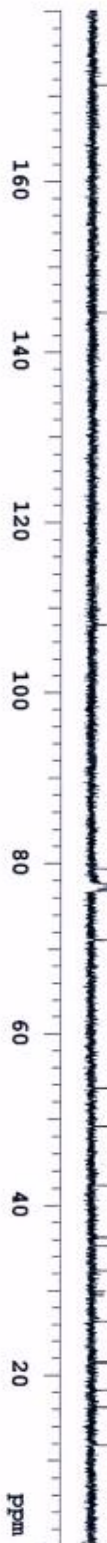
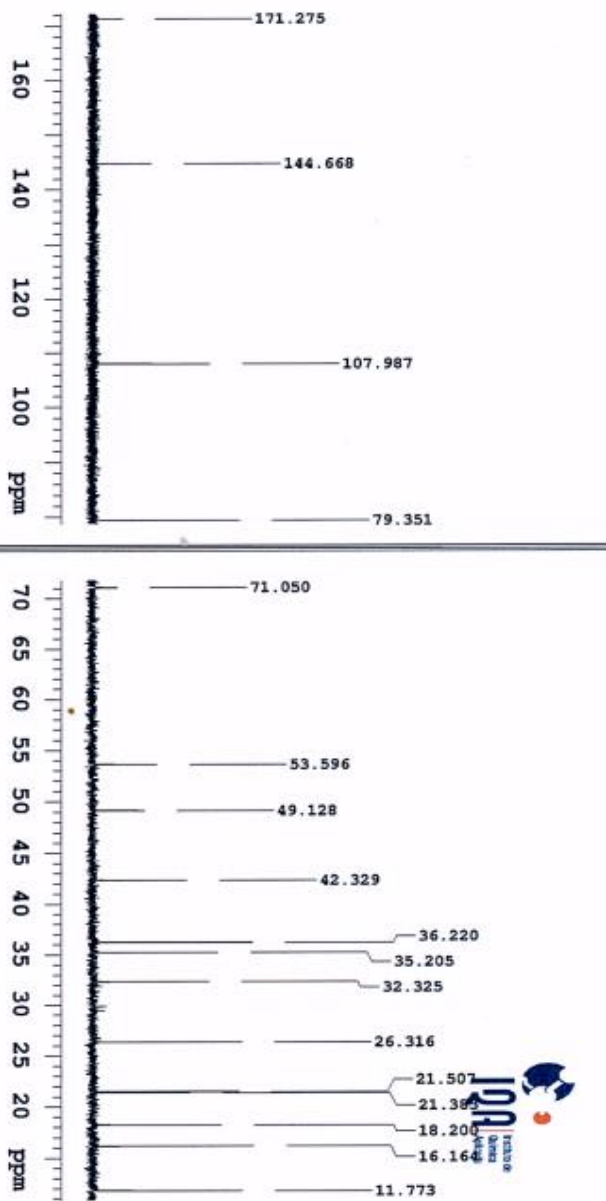


**Anexo 3:** Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción HTAI-4-80-87 ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



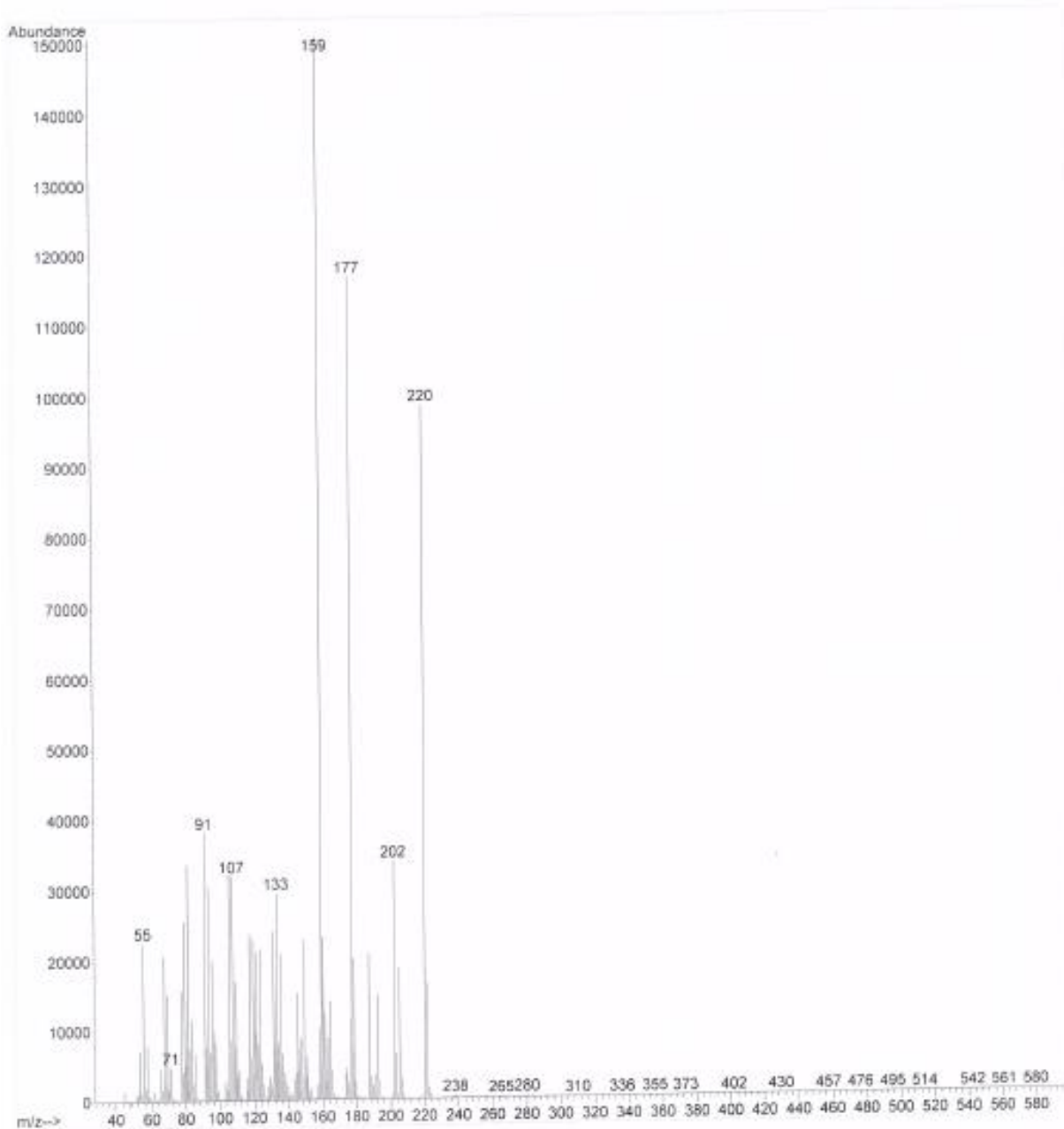
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:  
LR1268\_HPAI\_412  
Data Collected on:  
wormhole-vmrzs400  
Archive directory:  
/home/vmrz1/vmrzsys/data  
Sample directory:  
LR1268\_HPAI\_412\_20160301\_01  
FIDFile: CARBON\_01  
Pulse Sequence: CARBON (zgpg30)  
Solvent: cdcl3  
Data collected on: Mar 1 2016



**Anexo 4:** Espectro de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases de la fracción HTAI-4-80-87.

File : D:\MSDCHEM\DATA\2015\Vladimir Morocho\HTAI\_412.D  
Operator : JC  
Acquired : 4 Mar 2016 16:50 using AcqMethod METODO\_GENERAL  
Instrument : GCMSD CET  
Sample Name: HTAI\_412  
Misc Info :  
Vial Number: 3



**Anexo 5:** Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción HTM-1-9-105 ( $^{13}\text{C}$  400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

