



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de las hojas con flores femeninas de *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) en la provincia de Zamora Chinchipe**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTOR:** Ojeda Herrera Richard Andrés

**DIRECTOR:** Morocho Zaragocín, Segundo Vladimir, Ph. D.

**LOJA – ECUADOR**

**2016**

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph. D.

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

**DIRECTOR DE TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de las hojas con flores femeninas de *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) en la provincia de Zamora Chinchipe**” realizado por Ojeda Herrera Richard Andrés; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2016

f).

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

**CI: 110326907-0**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Richard Andrés Ojeda Herrera declaro ser autor (a) del presente trabajo de titulación: **“Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de las hojas con flores femeninas de *hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) en la provincia de Zamora Chinchipe”**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Ph. D. 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:** Richard Andrés Ojeda Herrera

**CI:** 0706273612

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de investigación lo dedico principalmente a Dios, el cual estuvo presente y me ayudo a no dejarme vencer por las adversidades de la vida y así culminar con éxito cada una de mis metas planteadas.

A mis padres y a mi madrina por todo el amor y apoyo incondicional que me brindaban, a mis hermanos los cuales me daban ánimos para no desmayar en los objetivos que me había planteado; y a mis amigos que de una u otra forma me apoyaron en la culminación de este trabajo de investigación.

Richard Andrés Ojeda Herrera

## **AGRADECIMIENTO**

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

Al Departamento de Química Básica y Aplicada y a todos los que laboran en el por brindarme el asesoramiento en la realización de este proyecto de investigación. En especial a mi tutor de tesis Ph. D. Vladimir Morocho Zaragocín por los conocimientos impartidos, a su dedicación, esfuerzo y constancia los ayudaron a formarme y así poder terminar este proceso con éxito.

Richard Andrés Ojeda Herrera

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA .....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO 1.....	5
MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Medicina Tradicional.....	6
1.2. Plantas Medicinales.....	7
1.3. Familia Chloranthaceae.....	7
1.4. Género <i>Hedyosmum</i> .....	8
1.4.1. <i>Hedyosmum racemosum</i> (Ruiz & Pav.).....	8
1.4.1.1. <i>Taxonomía Hedyosmum racemosum</i> .....	9
1.5. Técnicas Espectroscópicas .....	10
1.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) .....	10
1.5.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	11
1.6. Metabolitos Secundarios .....	12
1.6.1. Terpenos .....	13
1.6.2. Cumarinas.....	14
1.7. Actividad antimicrobiana.....	15
1.7.1. Bacterias Gram Positivas .....	16
1.7.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
1.7.2. Bacterias Gram Negativas.....	16
1.7.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	17
1.7.2.2. <i>Proteus vulgaris</i> .....	17
1.7.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
1.7.2.4. <i>Salmonella typhimurium</i> .....	18

1.7.2.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	19
1.8. Diabetes mellitus .....	19
CAPÍTULO 2.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1. Metodología empleada .....	22
2.2. Recolección de la materia vegetal .....	23
2.3. Secado del material vegetal .....	23
2.4. Obtención de extractos totales .....	24
2.5. Cromatografía de capa fina (CCF).....	24
2.6. Fraccionamiento del extracto Acetato de Etilo .....	25
2.7. Purificación de metabolitos secundarios.....	26
2.7.1. Purificación de la fracción RA105-25.....	26
2.7.2. Purificación de la fracción RA111-35.....	26
2.7.3. Purificación de la fracción RA106-35.....	27
2.8. Fraccionamiento del extracto de Metanol .....	27
2.8.1 Purificación de la fracción RA41-43.....	27
2.9. Elucidación química de los compuestos aislados .....	28
2.10. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).....	28
2.11. Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI) .....	29
2.12. Microorganismo de prueba .....	29
2.13. Preparación de las muestras .....	29
2.14. Preparación del cultivo overnight.....	30
2.15. Preparación de la suspensión del inóculo para las bacterias.....	30
2.16. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	30
2.17. Actividad Enzimática .....	31
2.17.1. Ensayo de $\alpha$ -glucosidasa .....	31
CAPÍTULO 3.....	33
RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	33
3.1. Extractos obtenidos de la especie <i>Hedyosmum racemosum</i> .....	34
3.2. Compuesto 1 (Fracción RA105-35/18-25) .....	34
3.2.1. Identificación y caracterización de RA105-35/18-25 .....	35
3.3. Compuesto 2 (Fracción RA111-35/1.1) .....	36
3.3.1 Identificación y caracterización de RA111-35/1.1 .....	37
3.4. Compuesto 3 (Fracción RA106-35/95-120) .....	38
3.4.1. Caracterización química del cicloartenol.....	39
3.4.2. Caracterización química del ácido linolénico .....	41

3.5.	Fraccionamiento del extracto de Metanol .....	42
3.5.1.	Compuesto 4 (Fracción RA41-43/1-1) .....	43
3.5.2.	Identificación y caracterización de RA41-43/1-1 .....	43
3.6.	Actividad antimicrobiana de los extractos totales de <i>H. racemosum</i> .....	46
3.7.	Actividad enzimática de extractos totales y compuestos aislados.....	46
	CONCLUSIONES .....	48
	RECOMENDACIONES.....	49
	BIBLIOGRAFÍA.....	50
	ANEXOS.....	56



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Medicina tradicional en América Latina.....	6
<b>Fig. 2.</b> Uso de variedad de Plantas Medicinales .....	7
<b>Fig. 3.</b> <i>Hedyosmum racemosum</i> .....	9
<b>Fig. 4.</b> Muestra de herbario de <i>H. racemosum</i> .....	9
<b>Fig. 5.</b> Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas .....	10
<b>Fig. 6.</b> Equipo de Resonancia Magnética Nuclear.....	12
Fig. 7. Clasificación de Metabolitos Secundarios.....	12
Fig. 8. Estructura química de terpenos. a) limoneno, b) camazuleno.....	14
Fig. 9. Clasificación de las Cumarinas .....	15
Fig. 10. Estructura química de cumarinas. a) psoraleno, b) xantiletina .....	15
Fig. 11. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
Fig. 12. <i>Escherichia coli</i> .....	17
Fig. 13. <i>Proteus vulgaris</i> .....	18
Fig. 14. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
Fig. 15. <i>Salmonella typhimurium</i> .....	19
Fig. 16. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	19
Fig. 17. Esquema del desarrollo de la investigación.....	22
Fig. 18. Área de estudio de la especie <i>H. racemosum</i> .....	23
Fig. 19. Secado de material vegetal .....	23
Fig. 20. Obtención de extractos totales, a) Maceración dinámica, b) Filtración al vacío, c) Rotavaporación a presión reducida .....	24
Fig. 21. Fraccionamiento de extractos totales. a) Hexano, b) Acetato de etilo, c) Metanol.....	24
Fig. 22. Columna cromatográfica del extracto de Acetato de etilo .....	25
Fig. 23. CCF de las fracciones obtenidas en la columna del extracto total de Acetato de etilo. a) Luz UV 254 nm, b) Luz UV 365 nm.....	25
Fig. 24. Columna cromatográfica del extracto de Metanol .....	27
Fig. 25. Esquema de microdilución en caldo de bacterias.....	31
Fig. 26. CCF 9:1 Hexano-Acetato de Etilo; a) Luz UV 254 nm, b) Luz UV 365 nm, c) CCF revelada .....	34
Fig. 27. Estructura química del Escualeno.....	35
Fig. 28. CCF preparativa compuesto 2 .....	37
Fig. 29. Estructura química de Escopoletina.....	38

Fig. 30. CCF de la fracción RA106-35/95-120.....	39
Fig. 31 Estructura química del cicloartenol .....	39
Fig. 32. Estructura química del ácido linolénico .....	41
Fig. 33. CCF de las fracciones obtenidas en la columna del extracto total de Metanol. a) Luz UV 254 nm, b) CCF revelada.....	42
Fig. 34. CCF preparativa 8:2 en Hexano: Acetato de etilo. a) Luz UV 254 nm, b) Luz UV 365 nm.....	43
Fig. 35. Estructura química de bolivianine.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía <i>H. racemosum</i> .....	9
Tabla 2. Clasificación de los terpenos .....	13
Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de Acetato de Etilo .....	26
Tabla 4. Características de la columna capilar utilizada .....	28
Tabla 5. Método de análisis de la columna DB-5MS .....	28
Tabla 6. Medios de cultivo y condiciones de incubación .....	30
Tabla 7. Rendimiento de extractos obtenidos de <i>Hedyosmum racemosum</i> .....	34
Tabla 8 Datos espectroscópicos de <sup>1</sup> H RMN del escualeno en CDCl <sub>3</sub> .....	35
Tabla 9 Datos espectroscópicos de <sup>1</sup> H RMN CDCl <sub>3</sub> de la escopoletina.....	37
Tabla 10 Datos espectroscópicos de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C RMN del cicloartenol en CDCl <sub>3</sub> .....	39
Tabla 11. Datos espectroscópicos de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C RMN del ácido linolénico en CDCl <sub>3</sub> .....	41
Tabla 12. Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de Metanol .....	42
Tabla 13. . Datos espectroscópicos de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C RMN de bolivianine en CDCl <sub>3</sub> .....	43
Tabla 14. CMI antibacteriana de los extractos totales desclorofilados de <i>H. racemosum</i> .....	46
Tabla 15. Efecto inhibidor de α-glucosidasa en extractos totales de <i>H. racemosum</i> ...	46

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	57
Anexo 2. Espectro de CG-EM .....	58
Anexo 3. Espectro de CG-EM .....	59
Anexo 4. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	60
Anexo 5. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	61
Anexo 6. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	62
Anexo 7. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	63
Anexo 8. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	64
Anexo 9. Espectro de CG-EM .....	65
Anexo 10. Espectro de CG-EM.....	66

## RESUMEN

A partir de las hojas de *Hedyosmum racemosum* recolectada en Zamora Chinchipe, se identificó y caracterizó mediante técnicas espectroscópicas RMN y CG-EM y la comparación con datos reportados en literatura. Se aisló un total de 5 compuestos conocidos como escualeno, escopoletina, una mezcla de cicloartenol con ácido linolénico y bolivianine. La actividad antimicrobiana se determinó mediante concentración mínima inhibitoria (CMI). Los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol fueron inactivos contra las bacterias utilizadas en el ensayo. La actividad hipoglucemiante de los extractos se evaluó por la capacidad inhibitoria en  $\alpha$ -glucosidasa. Los extractos de Hexano y Metanol presentan una actividad inhibitoria media con un valor de  $IC_{50}$  de 154,97  $\mu$ g/mL y 170,16  $\mu$ g/mL respectivamente, mientras que el extracto de Acetato de etilo presenta una actividad baja con un valor de  $IC_{50}$  de 424,44  $\mu$ g/mL.

**Palabras claves:** *Hedyosmum racemosum*, escualeno, escopoletina, cicloartenol, ácido linolénico, bolivianine,  $\alpha$ -glucosidasa.

## ABSTRACT

The leaves of *Hedyosmum racemosum* were collected in Zamora Chinchipe province and its chemical composition was determined by of NMR, GC-MS and these data was compared with the reported literature. Phytochemical investigation allowed the isolation and characterization of five known compounds: squalene, scopoletin, a mixture of linolenic acid with cycloartenol and bolivianine. The antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC), the extracts in hexane, ethyl acetate and methanol were inactive against the tested bacteria strains. The hypoglycemic activity of the extracts was also evaluated by the inhibitory capacity in  $\alpha$ -glucosidase, the extracts in hexane and methanol were active with an IC<sub>50</sub> average of 154.97 mg / mL and 170.16 mg / mL, respectively, while the ethyl acetate extract showed low activity with an IC<sub>50</sub> of 424.44 ug / mL.

**Keywords:** *Hedyosmum racemosum*, squalene, scopoletin, linolenic acid, cycloartenol, bolivianine,  $\alpha$ -glucosidase.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente la medicina tradicional es un recurso fundamental para la salud humana. Las plantas y árboles empleados son la base para el desarrollo de la medicina moderna (Montes, Wilkomirsky, & Valenzuela, 2015).

Las plantas contienen elementos activos que las protegen de los insectos, mohos y otros parásitos, así como de los rayos ultravioletas del sol. Muchos de estos componentes ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos (Barnes & Anderson, 2007).

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo por ser inmensamente rica en plantas útiles por esta razón se han registrado 17058 plantas vasculares, de estas han sido reportadas 5172 especies útiles de las cuales el 60% son medicinales (de la Torre, Navarrete, M., Macía, & Balslev, 2008; Jørgensen, Neill, & León-Yáñez, 1999).

*Chloranthaceae* es una familia de distribución pantropical, se reconocen en la actualidad cuatro géneros *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Ascarina* con alrededor de 75 especies. A esta familia se le atribuyen propiedades medicinales contra variadas afecciones antiespasmódicas, antisépticas, y medicamentos contra el cáncer o para aliviar el dolor (Cao Cong M, Yong Peng, Shi Qing W., & Xiao Pei G., 2008).

El género *Hedyosmum* abarca entre 40 a 45 especies distribuidas principalmente en América intertropical, una sola habita en el sureste de Asia (Rzedowski & Rzedowski, 1923) . La infusión de las hojas de varios representantes de este género se consume en forma de té y son ampliamente utilizadas por sus efectos antisépticos, antiespasmódicos y antiinflamatorios (Jørgensen et al., 1999).

*Hedyosmum racemosum* es un arbusto dioico nativo de los Andes y la Amazonía, que se encuentra entre 500-3000m.s.n.m., en las provincias de Cañar, Carchi, Loja, Morona Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Sucumbíos y Zamora Chinchipe. (Jørgensen et al., 1999). Es comúnmente conocido por las comunidades Untuntup (Shuar Chicham) como guayusa, guayusa de monte y jicamilla grande, las hojas de esta especie se utiliza como infusión, junto con *Bixa orellana*, para reducir la inflamación y con *Cordia* para tratar mordeduras de serpiente (de la Torre et al., 2008)

Por los antecedentes mencionados anteriormente es objetivo de este trabajo es el Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de las hojas con flores femeninas de *Hedyosmum racemosum* el mismo que forma parte del programa de investigación “Estudio fitoquímico y actividad biológica de plantas, hongos y actinomicetos en la zona 7 del Ecuador” (PROY\_QUI\_1144), que lleva a cabo en la sección de química aplicada del departamento de Química.



## **CAPÍTULO 1.**

### **MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Medicina Tradicional.

La utilización de la medicina tradicional ha entrado en una nueva etapa, con el impresionante incremento de la demanda de alternativas terapéuticas ajenas en conceptos y prácticas al modelo científico biomédico. La medicina tradicional se encuentra enmarcada hoy en día en un contexto que hace algunos años no existía, prueba de ello es el notable crecimiento de algunos de sus recursos en países industrializados el mismo que ha venido acompañado por cambios en la composición de la oferta de servicios terapéuticos, formas distintas de entender la salud y la enfermedad así como la utilización combinada de muchas de estas formas terapéuticas (Nigenda, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la medicina tradicional como los conocimientos, enfoques, creencias sanitarias y las prácticas basadas en plantas, animales y minerales los cuales son utilizados en terapias mentales, físicas y espirituales y que pueden ser aplicadas de forma colectiva e individual para mantener un bienestar (OMS, 2013). La medicina tradicional se ve enfocada a dar procedimientos de diagnóstico, pronóstico, curación, prevención de las enfermedades para dar una solución alternativa para la recuperación de la salud (Saúde, 2007).

Según la OMS y OPS en América Latina la medicina tradicional representa una buena alternativa ante las distintas necesidades de atención a la salud, a pesar de su presencia subordinada en los sistemas oficiales de salud y de la situación de ilegalidad que comúnmente guardan distintos países con algunas especies de plantas (Nigenda, 2016). (Fig.1)



**Fig. 1.** Medicina tradicional en América Latina

**Fuente:** Secretaria Buen Vivir 2016

## 1.2. Plantas Medicinales.

Las plantas han sido un recurso fundamental para las comunidades campesinas e indígenas de nuestro país. Se estima que el 80% de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas o productos naturales, para la atención primaria de la salud y bienestar. En las ciudades el uso directo de plantas medicinales es menor y principalmente relegado a personas que viven en zonas urbano-marginales y de condición socioeconómica baja (Ansaloni et al., 2010).

Las plantas han cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ellas poseen por esta razón en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales (Torres & Vergara, 2009).

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía (de la Torre et al., 2008). (Fig. 2)



**Fig. 2.** Uso de variedad de Plantas Medicinales

**Fuente:** Autor 2016

## 1.3. Familia Chloranthaceae.

Chloranthaceae es una familia constituida principalmente por arbustos o arboles con hojas simples opuestas, unidas entre sí por una especie de lengüeta, fuertemente aromáticas al estrujarlas, con estípulas, inflorescencia unisexual, las flores

estaminadas en espigas y frutos en drupas (Grijalva, 2006). Está compuesta por cuatro géneros: *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Ascarina*, distribuidas en 70 especies que crecen en regiones tropicales y subtropicales, Algunas especies especialmente de *Chloranthus* son usadas como plantas ornamentales, medicinales y con propósitos alimenticios, a manera de bebidas (Kawabata, Tahara, & Mizutani, 1981).

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 anteriores de la familia Chloranthaceae han dado como resultado el aislamiento de varios compuestos. Se ha obtenido 124 compuestos químicos de las especies de Chloranthaceae de tipo terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas y esteroides (Cao Cong M et al., 2008).

#### **1.4. Género *Hedyosmum*.**

El género *Hedyosmum* comprende alrededor de 45 especies de arbustos y árboles pequeños. La mayoría de las especies tienen una distribución bastante amplia, solo 14 especies son endémicas y más del 50% de las especies se encuentran en los andes de sudamerica. De estas 16 han sido reportadas para el Ecuador y son ampliamente utilizadas en medicina tradicional por sus efectos antisépticos, antiespasmódicos y antiinflamatorios (Jørgensen et al., 1999).

*Hedyosmum* se encuentra principalmente del centro de Mexico hasta el centro de Bolivia a lo largo de la cordillera de los andes, su crecimiento favorece en hábitats húmedos o en lugares montañosos de entre los 600 y 3000 metros sobre el nivel del mar aunque muy pocas especies se encuentran a nivel del mar. En investigaciones químicas de algunas especies de *Hedyosmum* como *H. basiliense* se han identificado lactonas sesquiterpénicas de sus hojas (Amoah et al., 2013). En *H. angustifolium* se han aislado 5 sesquiterpenos con actividad Anti-leishmaniosis (Acebey et al., 2010).

##### **1.4.1. *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.).**

*Hedyosmum racemosum* es un arbusto dioico nativo de los Andes y la Amazonía, que se encuentra entre 500-3000m.s.n.m., en las provincias de Cañar, Carchi, Loja,

Morona Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Sucumbíos y Zamora Chinchipe. (Jørgensen et al., 1999). Es comúnmente conocido por las comunidades Untuntup (Shuar Chicham) como guayusa, guayusa de monte y jicamilla grande, se utiliza como infusión, junto con *Bixa orellana*, para reducir la inflamación y con *Cordia* para tratar mordeduras de serpiente (de la Torre et al., 2008). (Fig. 3)



**Fig. 3.** *Hedyosmum racemosum*

Fuente: Autor 2016

#### 1.4.1.1. Taxonomía *Hedyosmum racemosum*.

**Tabla 1.** Taxonomía *H. racemosum*

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Chloranthales
<b>Familia</b>	Chloranthaceae
<b>Género</b>	<i>Hedyosmum</i>
<b>Especie</b>	<i>racemosum</i>
<b>Nombre Científico</b>	<i>Hedyosmum racemosum</i>

Fuente: Autor 2016



**Fig. 4.** Muestra de herbario de *H. racemosum*

Fuente: Autor 2016

## 1.5. Técnicas Espectroscópicas.

### 1.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

La cromatografía de gases acoplada a espectro de masas (CG-EM) da lugar a una de las técnicas espectroscópicas combinadas que nos permiten separar e identificar mezclas complejas lo que la hace una técnica muy sensible y selectiva (Kitson, Larsen, & McEwen, 2002). (Fig. 5)

La utilización de gases acoplada a un espectro de masas requiere sistemas especiales de conexión, en principio se tratan de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una pequeña cantidad de muestra para su análisis por esta razón estas dos técnicas son muy compatibles. El único obstáculo sería que cuando se realiza el acoplamiento es que el efluente que sale de la columna cromatografía lo realiza a presión atmosférica y este tiene que introducirse al interior del espectrómetro de masas que trabaja con un alto vacío (Gutiérrez, Droguet, & Odeur, 2002).

En si cuando existe una mezcla de compuestos y es inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados pasan inmediatamente al espectro de masas, cabe recalcar que el espectrómetro de masas además de proporcionar los espectros actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o "TIC" (Gutiérrez et al., 2002).



**Fig. 5.** Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas

**Fuente:** Autor 2016

### 1.5.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La RMN es un método relativamente moderno en comparación a otras espectroscopias pues data de 1946, año en el que Purcell de la Universidad de Harvard y Bloch y Packard de la Universidad de Stanford obtuvieron los primeros resultados y elaboraron la teoría, el primer espectro con señales separadas para una molécula orgánica data de 1951 (Elguero, Alkorta, Pardo, Claramunt, & María, 2008).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una técnica no destructiva basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno (Shoolery, 1972). Los electrones van a producir modificaciones, débiles pero observables, a través de algunos procesos siendo esos efectos electrónicos los que darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento lo que va a permitir obtener una estructura electrónica de las moléculas, por este motivo este método espectral de RMN tiene mucho éxito en química orgánica (Elguero et al., 2008). (Fig. 6)

Existen algunos experimentos empleados para la elucidación mediante RMN tales como:

**<sup>1</sup>H:** este experimento nos permite determinar el número de protones con sus desplazamientos químicos y acoplamientos H-H (Fina. 2009).

**<sup>13</sup>C:** este experimento nos permite determinar el número de carbonos equivalentes (Fina.2009).

**HMBC:** este experimento da las correlaciones entre los carbonos y los protones que están separados por dos, tres, y, a veces en los sistemas conjugados, cuatro enlaces (Decatur, 2011).

**HSQC:** este experimento 2D correlaciona el desplazamiento químico del protón con el desplazamiento químico del carbono directamente unido. En el eje inferior es un espectro de protones y por el otro es un carbono (Decatur, 2011).

**COSY:** En este experimento la magnetización se transfiere mediante el acoplamiento escalar. Los protones que son más de tres enlaces químicos, aparte no dan ninguna señal de cruz, porque las constantes de acoplamiento están cerca de 0.



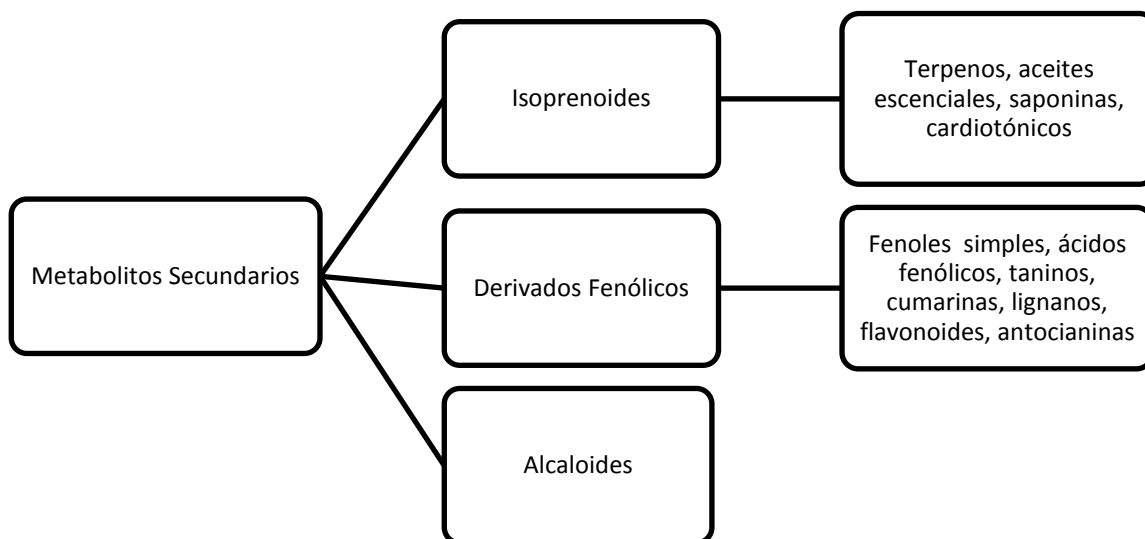
**Fig. 6.** Equipo de Resonancia Magnética Nuclear

**Fuente:** Autor 2016

### 1.6. Metabolitos Secundarios.

El metabolismo secundario en los vegetales es muy importante puesto que da lugar a productos que resultan de gran interés principalmente desde el punto de vista farmacológico ya que los principales principios activos que se utilizan en los medicamentos son los metabolitos secundarios que se obtienen de plantas medicinales (Kuklinski, 2000).

En la figura 7 se muestra la clasificación de los metabolitos secundarios



**Fig. 7.** Clasificación de Metabolitos Secundarios

**Fuente:** Autor 2016



### 1.6.1. Terpenos.

Los isoprenoides, más conocidos como terpenoides o terpenos, son un grupo de productos naturales que incluyen todas aquellas sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico y que origina el isopentenil pirofosfato (Porter & Spurgeon, 1981).

(Wallach, 1887), propuso la clasificación de este grupo de compuestos atendiendo al número de átomos de carbono de los mismos, actualmente esa clasificación es reconocida a nivel mundial y seguida por cuantos trabajan con terpenoides (Tabla 2). La etimología de esta palabra también se debe a Otto Wallach que originariamente diferenció entre “terpene” y “campher” por sus fórmulas empíricas  $C_{10}H_{16}$  y  $C_{10}H_{16}O$  ó  $C_{10}H_{18}O$  respectivamente.

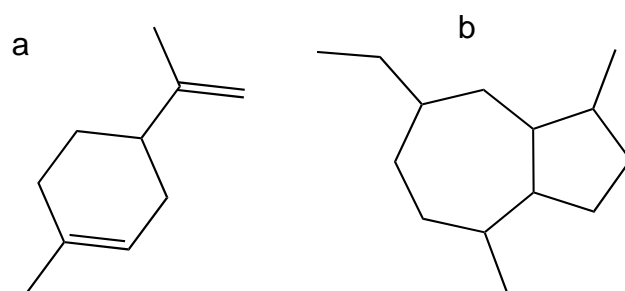
Esta palabra inglesa, “terpene”, deriva de la palabra alemana “terpentin”, de la inglesa “terpentine” y la francesa “térebenthine” que en español equivaldría a “trementina”. Se cree que este nombre fue tomado al ser precisamente el aceite de trementina el primero del cual se tiene testimonio escrito (Guenther, 1972).

**Tabla 2.** Clasificación de los terpenos

Grupo	N° de átomos de carbono	N° de unidades de isopreno
Hemiterpenos	5	1
Monoterpenos	10	2
Sesquiterpenos	15	3
Diterpenos	20	4
Sesterterpenos	25	5
Triterpenos	30	6
Tetraterpenos	40	8
Politerpenos	5n	N

Fuente: Autor 2016

En la figura 8 se muestra la estructura química de terpenos conocidos



**Fig. 8.** Estructura química de terpenos. a) limoneno, b) camazuleno  
**Fuente:** Autor 2016

### 1.6.2. Cumarinas.

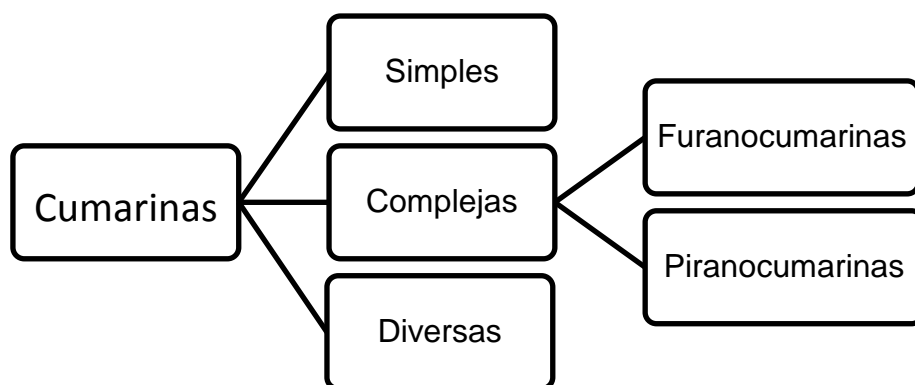
El nombre cumarina viene de “Coumarou” nombre común de la haba tonca (*Dipteryx odorata* Willd., *Coumarouna odorata* Aubl). Son metabolitos típicos de plantas superiores y algunos pocos microorganismos, su núcleo es benzo 2 pirona o benzo  $\alpha$  pirona (Lock de Ugaz, 1994).

En general son lactonas insaturadas y comprenden otra clase de compuestos  $C_6C_3$ , prácticamente todas las cumarinas, a excepción de la cumarina propiamente dicha, poseen un sustituyente oxigenado en posición 7, ya sea hidroxilado como sucede en la umbeliferona, o combinado. Se han aislado unas 1000 cumarinas naturales en unas 150 especies distribuidas en aproximadamente 30 familias, principalmente en Apiaceae, Rutaceae, Leguminosae, Fabaceae, Papilionaceae, Rubiaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Solanaceae, Gramineae en forma libre o como glicósidos (Murray & Mendez, 1994).

La propiedad física más importante de estos compuestos es la fluorescencia generada con la luz ultravioleta (365 nm), propiedad ampliamente usada para su detección (Lock de Ugaz, 1994).

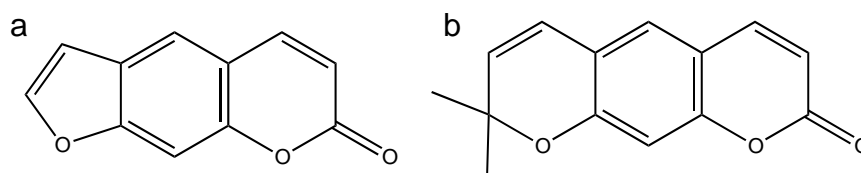
Estos compuestos presentan un amplio rango de actividad biológica como la acción anticoagulante y antibacteriana del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, la acción estrogénica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de ciertas furanocumarinas, se destaca además el uso de cumarinas como saborizantes y en perfumería (Murray & Mendez, 1994).

En la figura 9 se muestra la clasificación de las cumarinas.



**Fig. 9.** Clasificación de las Cumarinas

**Fuente:** Autor 2016



**Fig. 10.** Estructura química de cumarinas. a) psoraleno, b) xantiletina

**Fuente:** Autor 2016

### 1.7. Actividad antimicrobiana.

Las enfermedades infecciosas siguen siendo agentes clave de la pobreza debilitante que afecta a gran parte del mundo en la actualidad. Cada año, estas enfermedades matan a casi 9 millones de personas, muchos de ellos niños menores de cinco años, y que también causan enormes cargas a través de discapacidad de por vida. Intensificar la investigación sobre sus causas y la manera de tratar con eficacia y evitar que se propague podría tener un enorme impacto en los esfuerzos para sacar a las personas de la pobreza y para construir un mundo mejor para las generaciones futuras (OMS, 2012)

### 1.7.1. Bacterias Gram Positivas.

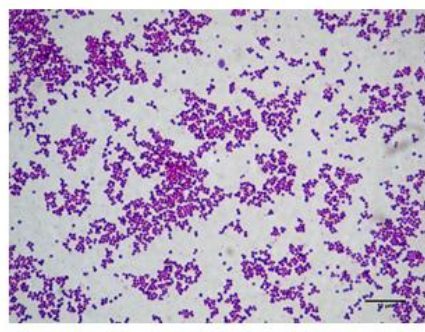
Se conoce como bacterias Gram Positivas al grupo de bacterias al grupo de bacterias que no tienen una membrana externa que les permita proteger el citoplasma bacteriano, estas bacterias poseen una gruesa capa de peptidoglicanos los cuales presentan ácidos teicoicos en su superficie (Pahissa, 2009).

Estas bacterias se distinguen particularmente por teñirse de color azul oscuro o violeta al realizar una tinción Gram, entre las enfermedades más comunes que producen estas bacterias tenemos la listeriosis y el ántrax (Díaz, Martínez, & Zhurbenko, 2010).

#### 1.7.1.1. *Staphylococcus aureus*.

Son cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas (E. Cervantes, García, & Salazar, 2014).

Es el agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de la piel y tejidos blandos, bacteriemia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genital urinario (Denegri & Droquilly, 1983). Y son los agentes principales de infecciones intrahospitalarias desplazando a los estreptococos (Gil, 2000). (Fig. 11)



**Fig. 11.** *Staphylococcus aureus*

Fuente: G. Parts

### 1.7.2. Bacterias Gram Negativas.

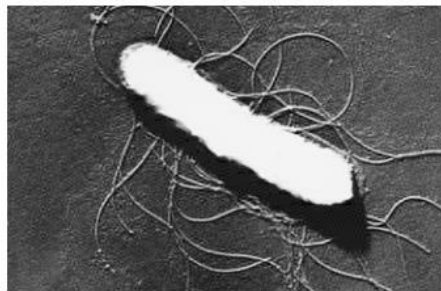
Se conoce a todas las bacterias que se tiñen de un color rosado tenue al momento de realizar la tinción Gram a diferencia de las bacterias Gram positivas que se tiñen de un color azul o un violeta oscuro (Romero Cabello, 2007).

Estas bacterias presentan una doble membrana celular una citoplasmática y otra externa, esto viene a reflejar un tipo de organización bacteriana natural. La mayoría de las especies de bacterias Gram negativas causan enfermedades, los cocos Gram negativos causan enfermedades como gonorrea, meningitis entre otras, mientras los bacilos Gram negativos producen enfermedades de tipo respiratorio y gastrointestinal (Pozo, Silva, Valencia, Soto, & Riveros, 2006).

#### **1.7.2.1. *Escherichia coli*.**

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Eslava & Cravioto, 1994).

Las *E. coli* patógenas se distingue de otras *E. coli* por su capacidad de provocar enfermedades mediante mecanismos genéticamente controlados, como la producción de toxinas, la adhesión e invasión de células huéspedes, la interferencia con el metabolismo celular y la destrucción de tejidos (OMS, 2006). (Fig. 12)

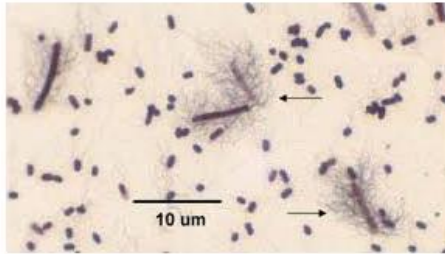


**Fig. 12.** *Escherichia coli*

**Fuente:** G. Parts

#### **1.7.2.2. *Proteus vulgaris*.**

Es una bacteria que produce infecciones en el ser humano solo cuando las bacterias salen del tubo digestivo. Se encuentran presentes en las infecciones urinarias y producen bacteriemia, neumonía y lesiones focales en los pacientes débiles o en los que reciben infusiones intravenosas (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011). (Fig. 13)

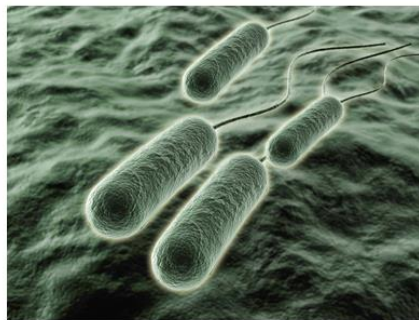


**Fig. 13.** *Proteus vulgaris*

Fuente: G. Parts

#### **1.7.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*.**

Es un bacilo móvil, a menudo está presente en pequeñas cantidades en la microflora intestinal normal y en la piel del ser humano y es el principal microorganismo patógeno del grupo *Pseudomona*. Tiene una amplia distribución en la naturaleza y suele estar presente en medios húmedos en los hospitales. Puede colonizar al ser humano normal en quien es un saprófito, causa enfermedades en personas con defensas anormales (Jawetz et al., 2011). (Fig. 14)

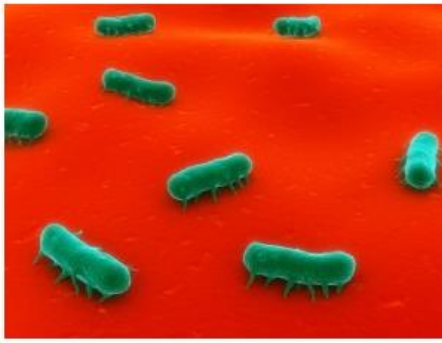


**Fig. 14.** *Pseudomonas aeruginosa*

Fuente: G. Parts

#### **1.7.2.4. *Salmonella typhimurium*.**

Es un bacilo que se encuentra predominantemente en el lumen intestinal. Su toxicidad es debida a una membrana externa que consiste en gran parte de lipopolisacáridos (LPS) que protegen a las bacterias desde el entorno, aunque la principal causa de enfermedad es una infección intestinal por ingerir alimentos contaminados también puede producir artritis, meningitis y algunos abscesos en algunos órganos (Jawetz et al., 2011). (Fig. 15)

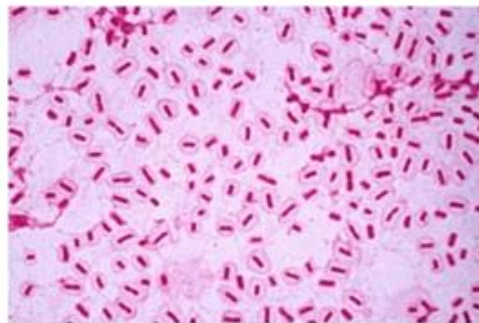


**Fig. 15.** *Salmonella typhimurium*

**Fuente:** G. Parts

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

Está presente en el sistema respiratorio y en las heces de casi 5% de las personas sanas. Produce una pequeña proporción de las neumonías bacterianas. Puede producir una consolidación pulmonar necrosante por hemorragia extensa. Produce infecciones urinarias y bacteriemia con lesiones focales en pacientes débiles (Jawetz et al., 2011). (Fig. 16)



**Fig. 16.** *Klebsiella pneumoniae*

**Fuente:** G. Parts

#### **1.8. Diabetes mellitus.**

La diabetes mellitus representa un grave problema de salud pública. Su incidencia oscila entre el 1-2% de la población mundial (R. Cervantes & Presno, 2013). Actualmente es considerada como un síndrome metabólico crónico de base genética, ocasionado por una deficiencia parcial o total de insulina que cursa con una disminución de la tolerancia a los hidratos de carbono, hiperglucemia, glucosuria, polidipsia, polifagia, poliuria y alteración del metabolismo intermedio de lípidos y proteínas. Debido a que la gravedad de la misma puede ir cambiando con el tiempo,

se considera que la hiperglucemia es un marcador de severidad del estado metabólico subyacente más que la naturaleza del proceso en si misma (Sanz & Bascones, 2007).

El tipo más frecuente es la diabetes no insulino dependiente (DMNID), o tipo 2, se debe a una combinación de resistencia periférica a la acción de la insulina y una respuesta secretora inadecuada de las células  $\beta$  pancreáticas. Constituye aproximadamente el 80-90% de los casos de diabetes (Sanz & Bascones, 2007).

Los inhibidores de las alfa-glucosidasas actúan indirectamente, enlenteciendo y disminuyendo la absorción de hidratos de carbono. Pero la diabetes es una enfermedad progresiva, con el tiempo la monoterapia con fármacos se conoce que deja de ser efectiva, por lo que hay que ir adaptando el tratamiento de forma continuada y paralela al deterioro del control. La terapia combinada de fármacos, al obtener un efecto sinérgico de fármacos con distintos mecanismos de acción, se ha mostrado como una alternativa eficaz y útil para la prolongación del periodo de control (Fernández, 2011).



## **CAPÍTULO 2.**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Metodología empleada.

En la figura 17 se muestra la metodología utilizada

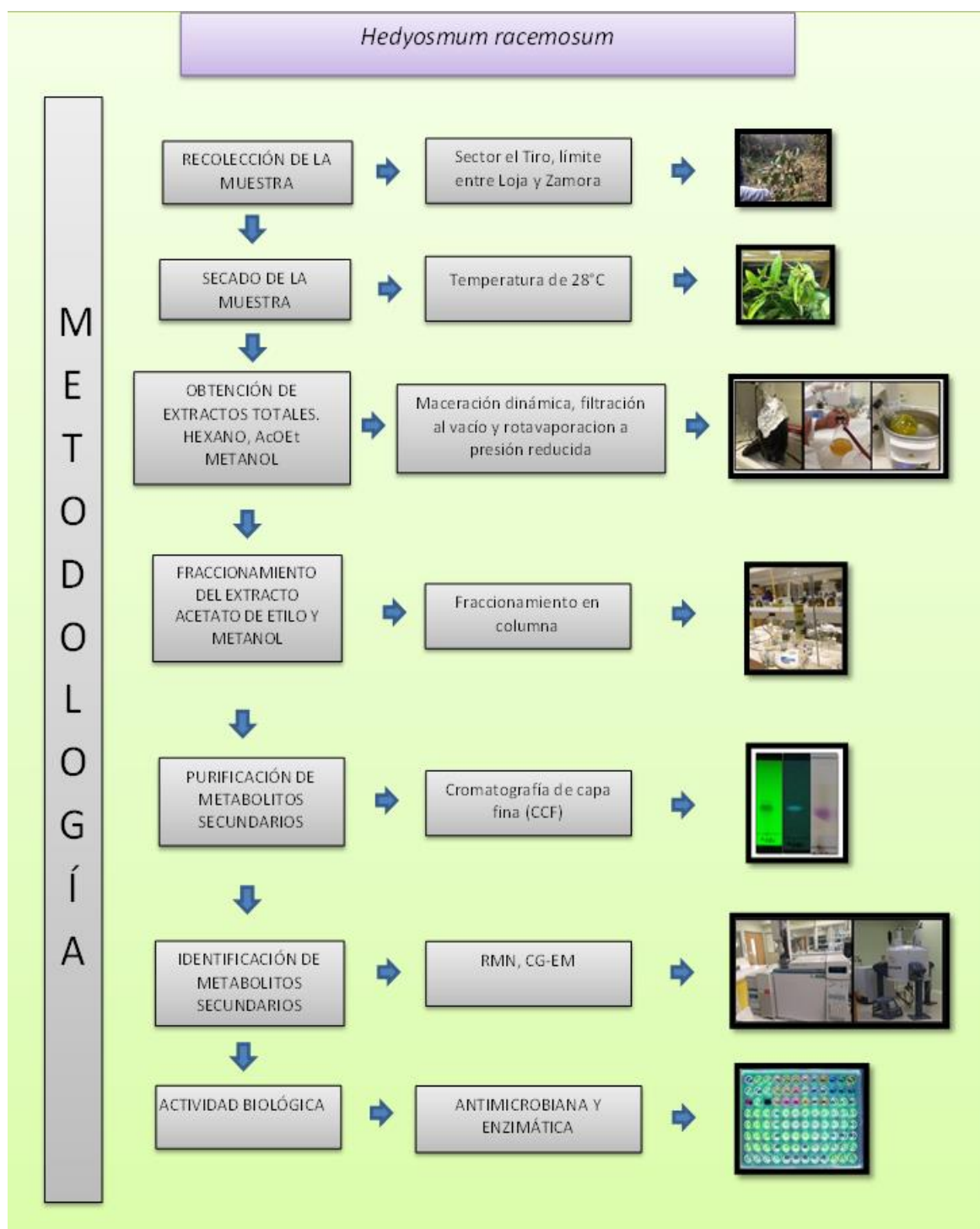
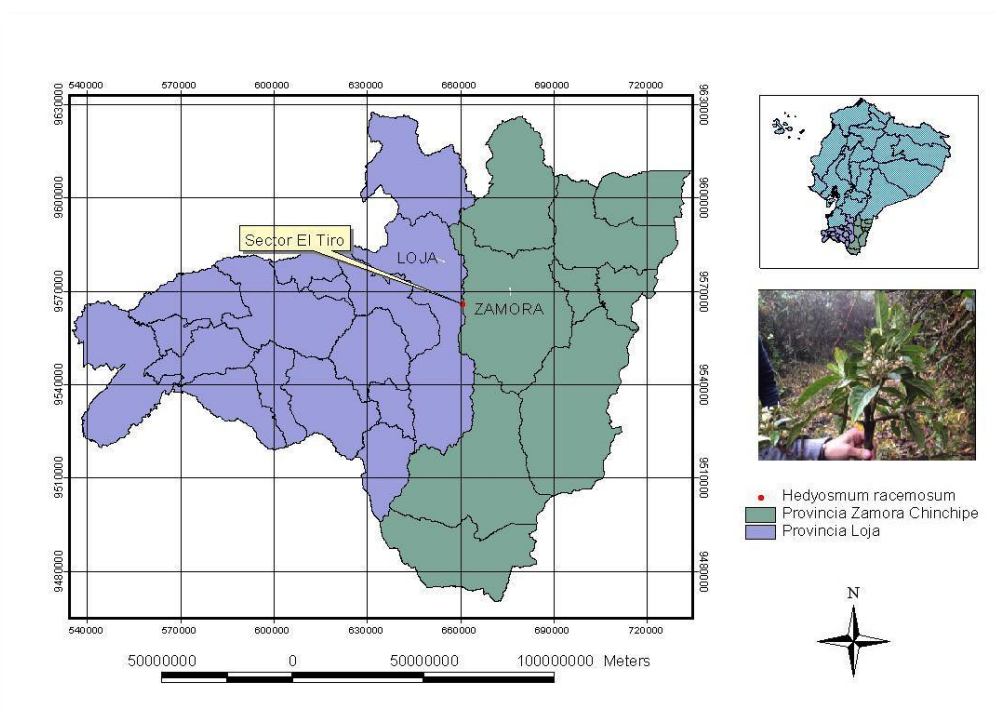


Fig. 17. Esquema del desarrollo de la investigación

Fuente: Autor 2016

## 2.2. Recolección de la materia vegetal.

Se recolectaron las hojas de *Hedyosmum racemosum* con flores femeninas en estado de fructificación en el sector El Tiro que limita entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe a una altitud de 2762 m s.n.m. con coordenadas 3°59'21" S, 79°08'34"O (Fig. 18). La muestra botánica reposa en el herbario UTPL con un voucher PPN-ct-006.



**Fig. 18.** Área de estudio de la especie *H. racemosum*

Fuente: Autor 2016

## 2.3. Secado del material vegetal.

Una vez recolectado el material vegetal fue trasladado al cuarto de secado para eliminar la mayor cantidad de agua y evitar que se contamine con algún tipo de microorganismo, este proceso llevo a cabo durante cuatro días a una temperatura de 28 °C. (Fig. 19)



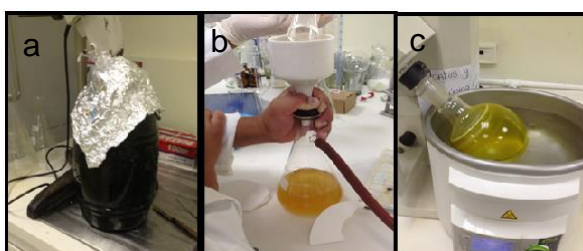
**Fig. 19.** Secado de material vegetal

Fuente: Autor 2016

## 2.4. Obtención de extractos totales.

A partir de 500 g de muestra seca se trituraron las hojas y se procedió a la extracción mediante la técnica de maceración dinámica repitiendo por tres veces cada maceración con diferentes disolventes Hexano, Acetato de Etilo y Metanol durante 2 horas a temperatura ambiente.

Luego se procedió a filtrar a vacío cada extracto y mediante rotaevaporación a presión reducida se concentró y se obtuvieron los extractos totales de los diferentes disolventes Hexano, Acetato de Etilo y Metanol. (Fig. 20)

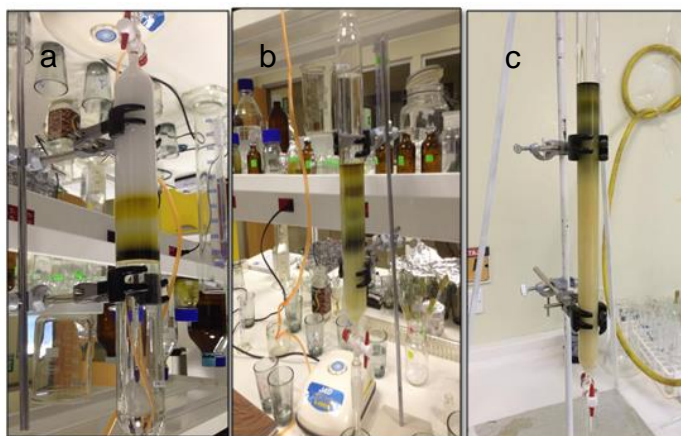


**Fig. 20.** Obtención de extractos totales, a) Maceración dinámica, b) Filtración al vacío, c) Rotavaporación a presión reducida

**Fuente:** Autor 2016

## 2.5. Cromatografía de capa fina (CCF).

Para el análisis de los extractos totales previo el fraccionamiento se realizó mediante CCF (cromatografía de capa fina) en distintas polaridades de disolventes y así determinar que extracto presenta una mejor separación de compuestos y mayor riqueza de metabolitos. (Fig. 21)



**Fig. 21.** Fraccionamiento de extractos totales. a) Hexano, b) Acetato de etilo, c) Metanol

**Fuente:** Autor 2016

## 2.6. Fraccionamiento del extracto Acetato de Etilo.

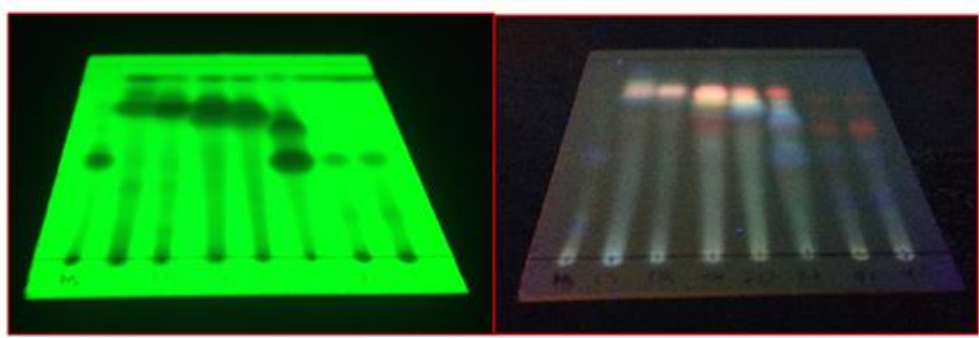
El extracto total de Acetato de Etilo fue el que presentó mejor separación y riqueza de compuestos por lo que se procedió a pesar 2g de extracto y fue sometido a fraccionamiento en cromatografía en columna con 200g de Sílica Gel 60 F254 (fase directa), se eluyó con polaridad creciente comenzado con Hexano y AcOEt en relación 9:1, hasta AcOEt 100% (Fig. 22). Al haber culminado todo el proceso del fraccionamiento del extracto total de AcOEt se realizó CCF con todas las fracciones obtenidas utilizando placa de Sílica gel 60 F254 y utilizando como fase móvil una mezcla de Hex-AcOEt en relación 8:2 (v/v), para observar mediante una lámpara de luz ultravioleta de 254 y 365nm, posteriormente se unieron las fracciones de acuerdo a su Rf y color de las manchas.



**Fig. 22.** Columna cromatográfica del extracto de Acetato de etilo

**Fuente:** Autor 2016

Del fraccionamiento del extracto de AcOEt se obtuvieron 320 muestras y se unieron de acuerdo a las características presentadas mediante cromatografía de capa fina y Rf se unieron obteniendo como resultado 16 fracciones. (Fig. 23) (Tabla 3)



**Fig. 23.** CCF de las fracciones obtenidas en la columna del extracto total de Acetato de etilo. a) Luz UV 254 nm, b) Luz UV 365 nm

**Fuente:** Autor 2016

**Tabla 3.** Fraccionamiento cromatográfico del extracto de Acetato de Etilo

<b>Fracciones</b>	<b>Muestra</b>	<b>Mezcla de disolventes</b>	<b>Peso (mg)</b>
RA105-35	50-60	Hex-AcOEt	782
RA106-35	73-84	Hex-AcOEt	204.9
RA107-35	85-90	Hex-AcOEt	86.7
RA108-35	91-106	Hex-AcOEt	173
RA109-35	107-118	Hex-AcOEt	95.9
RA110-35	119-136	Hex-AcOEt	234.1
RA111-35	188-216	Hex-AcOEt	83.3
RA112-35	217-229	Hex-AcOEt	16.9
RA113-35	230-253	Hex-AcOEt	24.6
RA114-35	254-280	Hex-AcOEt	24.4
RA115-35	281-294	Hex-AcOEt	74.4
RA116-35	295-301	Hex-AcOEt	139.8
RA117-35	302-320	Hex-AcOEt	130.7
RA118-35	41-49	Hex-AcOEt	24.6
RA119-35	61-72	Hex-AcOEt	235.4
RA120-35	137-187	Hex-AcOEt	

Fuente: Autor 2016

De estas se tomó las fracciones RA105-35, RA106-35, RA111-35 y se procedió a purificarlas mediante fraccionamiento en columna

## **2.7. Purificación de metabolitos secundarios.**

### **2.7.1. Purificación de la fracción RA105-25**

La fracción se purificó a través de una columna cromatográfica a partir de 782 mg en 80 g de Sílica Gel 60 F254 fase directa, eluyendo con polaridad creciente comenzando con Hexano y AcOEt en relación 95:05 hasta Hexano y AcOEt relación 8:2. Obteniendo la fracción purificada RA105-35/18-35

### **2.7.2. Purificación de la fracción RA111-35.**

La fracción se purificó a través de una columna cromatográfica a partir de 83 mg en 20 g de Sílica Gel 60 Rp18, eluyendo con polaridad isocrática MeOH: H<sub>2</sub>O en relación 9:1 obteniendo la fracción purificada RA111-35/1.1

### 2.7.3. Purificación de la fracción RA106-35.

La fracción se purificó a través de una columna cromatográfica a partir de 204 mg en 80 g de Sílica Gel 60 F254 fase directa, eluyendo con polaridad isocrática Ciclohexano: Diclorometano en relación 7:3. Obteniendo la fracción purificada RA106-35/95-120

### 2.8. Fraccionamiento del extracto de Metanol.

Para el extracto total de Metanol se procedió a pesar 2g de extracto y fue sometido a fraccionamiento en cromatografía en columna con 200g de Sílica Gel Rp18 para esto se eluyó con polaridad creciente comenzado con Metanol: Agua 8:2 hasta Metanol: Agua en relación 9:1. Al haber culminado todo el proceso del fraccionamiento del extracto total de Metanol se realizó CCF con todas las fracciones obtenidas utilizando placa de Sílica Gel Rp18, como fase móvil una mezcla de Metanol: Agua en relación 9:1 (v/v) (Fig. 24), para observar mediante una lámpara de luz ultravioleta de 254 y 365 nm; posteriormente se unieron las fracciones de acuerdo a su Rf y color de las manchas



**Fig. 24.** Columna cromatográfica del extracto de Metanol  
**Fuente:** Autor 2016

#### 2.8.1 Purificación de la fracción RA41-43.

Para purificar esta fracción se realizó una CCF preparativa utilizando 10 mg, eluyendo en Hexano – acetato de etilo en una proporción de 8:2 y como fase estacionaria Sílica Gel 60 F254 fase directa. Obteniendo la fracción purificada RA41-43/1-1 con un Rf de 0.72.



## 2.9. Elucidación química de los compuestos aislados.

La elucidación química de las sustancias aisladas se realizó mediante análisis de RMN en un equipo Varian N° de serie 21953 el cual está operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  usando como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y CG-EM

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

Para obtener el peso molecular de las fracciones aisladas RA105-35/18-35 y RA41-43/1-1 se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, dotado con un sistema de operación de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, que cuenta con inyector automático Split/splitless serie 7683, biblioteca Wiley 7n.1. Las características de la columna capilar utilizada se detallan en la tabla 4

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

Fracción	Columna	Temperatura (C°)	Película ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
RA105-35/18-35	DB-5MS	300	0,25	0,25	30

Fuente: Autor 2016

Los parámetros utilizados bajo los cuales se inyectaron las muestras para su análisis por CG-EM se detallan en la tabla 5

**Tabla 5.** Método de análisis de la columna DB-5MS

	<b>RA105-35/18-35</b>
<b>COLUMNA</b>	Columna capilar DB 5MS Modelo Agilent 122-5532 0,25mm; 30 m; 0,25 $\mu\text{m}$
	<b>Temperatura máxima:</b> 350°C
	<b>Flujo:</b> Constante
	<b>Flujo Inicial:</b> 0,9 mL/min



	<b>Presión Inicial:</b> 48.3 KPa
	<b>Velocidad Promedio:</b> 35 cm/s
<b>INYECTOR</b>	<b>Modo:</b> Split
	<b>Radio de Partición:</b> 25.1
	<b>Temperatura Inicial:</b> 250 °C
	<b>Gas de Arrastre:</b> Helio
<b>DETECTOR</b>	Espectro de Masas
	<b>Temperatura de la fuente:</b> 280 °C
	<b>Temperatura de Cuadrupolo:</b> 200°C
<b>HORNO</b>	<b>Temperatura Inicial:</b> 60°C
	<b>Temperatura Final:</b> 270 °C
	<b>Gradiente de Temperatura:</b> 10°C/min

Fuente: Autor 2016

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

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante la técnica de microdilución en caldo.

### 2.12. Microorganismo de prueba.

Se emplearon 6 microorganismos:

6 cepas bacterianas: 1 cepa Gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); 5 cepas Gram negativas: *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT 2), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997).

### 2.13. Preparación de las muestras.

Se realizó una dilución de 20mg de los extractos desclorofilados de Hexano, Acetato de Etilo y Metanol en 1000µL de Dimetilsulfóxido (DMSO)

## 2.14. Preparación del cultivo overnight.

Los microorganismos empleados 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 condiciones de incubación

MICROORGANISMOS	MEDIOS DE CULTIVO	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Trypticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Mueller Hinton	37°C por 14-16 horas
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Trypticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Caldo Nutritivo Oxiod	37°C por 14-16 horas
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Caldo Trypticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Trypticasa Soya	37°C por 14-16 horas

Fuente: Autor 2016

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

## 2.15. Preparación de la suspensión del inóculo para las bacterias.

Del cultivo overnight con la bacteria respectiva se toman 10 µL y se colocan en 10mL de caldo Mueller Hinton, de esta dilución se toman 100 µL los cuales se utilizaron para completar en volumen final de la placa de cultivo (200 µL).

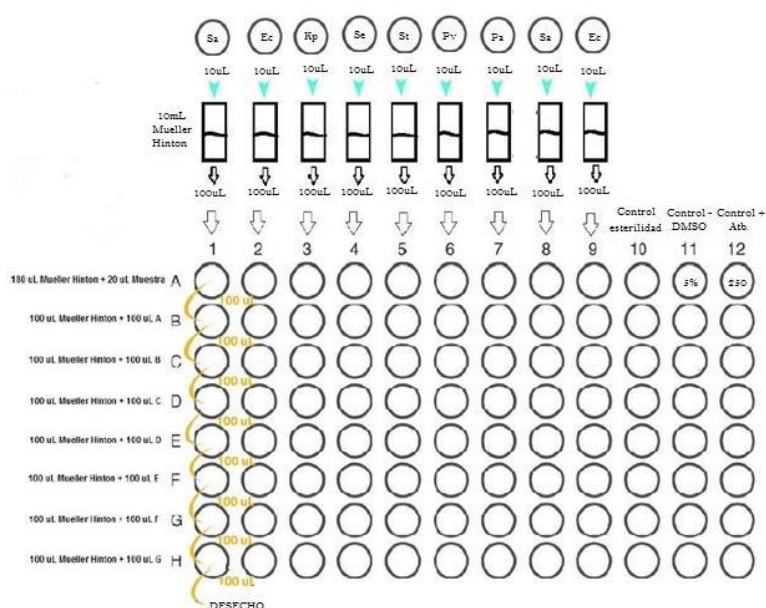
## 2.16. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

Para las pruebas se realizaron placas estériles de 96 pocillo, colocando la dilución de 180 µL de caldo Mueller Hinton en la primera fila de pocillos, excepto en la columna 10; y 100 µL a los pocillos restantes, posteriormente se le adiciona 20 µL del extracto diluido (20 mg/ml disueltos en 1000 mL de DMSO) en estudio, en los pocillos de la fila A y se mezcla. Seguidamente realizamos diluciones seriadas tomando 100 µL de los pocillos de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B, continuando con esta dilución hasta llegar a los pocillos de la fila H y desechamos los 100 µL sobrantes.

Para los controles de la prueba, en la Columna A10-H10 se colocan 200µL de caldo Mueller Hinton. Como control negativo en el pocillo A11 se coloca 180µL de caldo +

20µL DMSO y se realiza el procedimiento de dilución doble seriada (Columna A10-H10). En el pocillo A12 se coloca 180µL de caldo + 20µL de una solución de tetraciclina de 5mg/mL y se realiza el procedimiento de dilución doble seriada (columna A12-H12). Ya preparadas las placas se inoculan con 100µL de la suspensión de cada inóculo bacteriano para completar a un volumen final de 200µL, con lo que ajustamos la población bacteriana a 5x10<sup>5</sup>UFC/mL y la concentración final del extracto de 1000 a 7,81µg/mL.

Terminando con el proceso se sellan las placas con parafilm y se incuban a 37°C por un periodo de tiempo de 18 – 24 horas. (Fig. 25)



Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*; Kp: *Klebsiella pneumonia*; Sa: *Salmonella enteritica*; St: *Salmonella tiphyrium*; Pv: *Preoteus vulgaris*; Pa: *Pseudomonas aeruainosa*

**Fig. 25.** Esquema de microdilución en caldo de bacterias

Fuente: Autor 2016

## 2.17. Actividad Enzimática.

### 2.17.1. Ensayo de α-glucosidasa.

Se determinó la actividad inhibitora de α-glucosidasa usando una placa de microtitulación de 96 pocillos con *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranosido (PNPG, SIGMA N1377) como sustrato, basados en el método descrito por Tao, Zhang, Cheng, & Wang, (2013), con ligeras modificaciones.

Las soluciones del extracto se prepararon disolviendo 10mg del extracto en 1mL de una mezcla MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1). Se realizaron varias diluciones de las muestras de estudio en PBS (SIGMA-P4417), cuando se obtuvo una inhibición enzimática se mezcló la solución de PBS (75µl), la solución de extracto (5µL) y solución de la enzima (SIGMA G5003, 0,15UI/mL en PBS Ph 7,4) (20µL) en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La mezcla se preincubó a 37°C por 5min.

Posteriormente se añadió 20µl de una solución de PNPG (tampón fosfato 5mM, pH7,4) a cada pocillo y la placa se incubó durante 15min a 37°C. La cantidad de *p*-Nitrofenol liberado se midió mediante absorbancia en un lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK®) a 405nm durante 60min, registrando la absorbancia cada 5min.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición por medio de la fórmula descrita por Chi, Lee & Kim, 2015:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(A_o - A_s) / (A_o)] \times 100$$

Siendo:

**A<sub>o</sub>**: Absorbancia registrado para la actividad enzimática sin inhibidor (control).

**A<sub>s</sub>**: Absorbancia registrada para la actividad enzimática en presencia del inhibidor (muestra)

## **CAPÍTULO 3.**

### **RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### 3.1. Extractos obtenidos de la especie *Hedyosmum racemosum*.

En la tabla 7 se describe el peso y el rendimiento de los extractos de Hexano, AcOEt y MeOH utilizando 500 gramos de muestra vegetal seca

**Tabla 7.** Rendimiento de extractos obtenidos de *Hedyosmum racemosum*

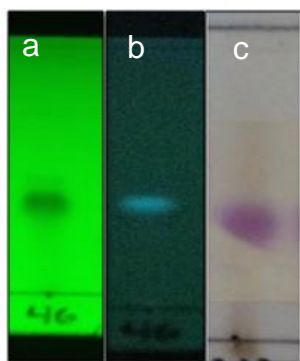
Extracto	Peso inicial de Planta seca (g)	Peso Final (g)	Rendimiento %
Hexano	500	4.51	0.90
Acetato de Etilo		9.47	1.89
Metanol		15.62	3.12

Fuente: Autor 2016

Al obtener el rendimiento de los extractos totales de Hexano, Acetato de Etilo y Metanol se ven bajos con respecto a anteriores trabajos realizados en otros estudios con la misma especie, esto se da ya que en el momento que se recolecto la planta estuvo en un estado de fructificación (Tinoco, 2013).

### 3.2. Compuesto 1 (Fracción RA105-35/18-25).

Del fraccionamiento se obtuvieron 5 fracciones en la que **RA105-35/18-25** se visualizó como sustancia pura con un peso de 2 mg. Se realizó cromatografía en capa fina (CCF) eluyendo en Hexano: AcOEt en relación 9:1 v/v. El compuesto es visible en luz UV 254 nm, donde se observó una mancha oscura y en 365 nm una mancha brillante celeste, al ser revelada con ácido sulfúrico al 5% y vainillina se observó una mancha color morado con un Rf de 0.47 (Fig.26).



**Fig. 26.** CCF 9:1 Hexano-Acetato de Etilo; a) Luz UV 254 nm, b) Luz UV 365 nm, c) CCF revelada

Fuente: Autor 2016

### 3.2.1. Identificación y caracterización de RA105-35/18-25.

El compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas, RMN y CG-EM y corroborado con literatura. (Tabla 8)

**Tabla 8** Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN del escualeno en  $\text{CDCl}_3$

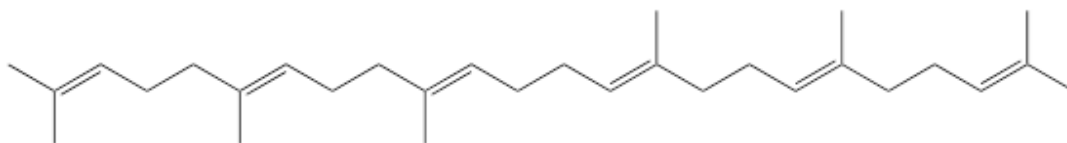
DATOS EXPERIMENTALES $^1\text{H}$ NMR (400Mz)	(Srisurichan & Pornpakakul, 2015) $^1\text{H}$ NMR (400Mz)
5.07-5.14 (3H, m, H3, H7, H11)	5.21-5.04(3H, m, H3, H7, H11)
2.01-2.07(4H, m, CH2-4, CH2-8)	2.13-2.04(4H, m, CH2-4, CH2-8)
1.95-2.00(6H, m, CH2-5, CH2-9, CH2-12)	2.04-1.94(6H, m, CH2-5, CH2-9, CH2-12)
1.67 (3H, s, CH3-1)	1.68(3H, s, CH3-1)
1.60 (9H, s, CH3-13, CH3-14, CH3-15)	1.61(9H, s, CH3-13, CH3-14, CH3-15)

Fuente: Autor 2016

El compuesto es identificado como escualeno, triterpeno acíclico de fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$ , con peso molecular de 410 g/mol. (Anexo 2 y 3)

En el espectro de  $^1\text{H}$  NMR se observaron señales entre 5.07-5.14 ppm correspondientes a los protones vinílicos 3, 7, 11, 14, 18 y 22, un conjunto de señales múltiples en 1.9-2.1 ppm para los protones 4, 5, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 20 y 21, señales simples de los metilos 1 y 24 en 1.67 ppm y las señales respectivas para los metilos 25-30 en 1.60 ppm. (Fig.27). (Anexo 1)

El espectro de masas fue corroborado con la base de datos Willey 7n.I



**Fig. 27.** Estructura química del Escualeno

Fuente: Autor 2016

El escualeno es un triterpeno poliinsaturado que contiene seis unidades de isopreno y es un precursor bioquímico de colesterol y otros esteroides (Kelly, 1999). Gracias a las propiedades físicas y químicas que posee el escualeno sus acciones in vivo garantizan múltiples campos de aplicación en diferentes sectores de la actividad humana como

son: alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos de prevención y tratamiento médico (Newmark, 1997).

En la industria farmacéutica al escualeno se lo utiliza con frecuencia en la preparación de emulsiones estables ya sea como ingrediente principal o secundario (Moroti et al., 2012). También es empleado como adyuvante en las vacunas ya que estimula la respuesta inmune y aumenta la respuesta del paciente a la vacuna (Fox, 2009), actúa como protector de la piel expuesta a radiación UV ya que el escualeno no es susceptible a la peroxidación y es estable frente a ataques de los radicales de peróxido (Wefers et al., 1991).

En estudios anteriores se ha demostrado que el escualeno es un antioxidante natural eficaz, no tóxico, agente citoprotector y muy bien tolerado mientras que los antioxidantes que se usan hoy en día para el tratamiento del cáncer tienen muchos efectos secundarios graves (Das et al., 2003).

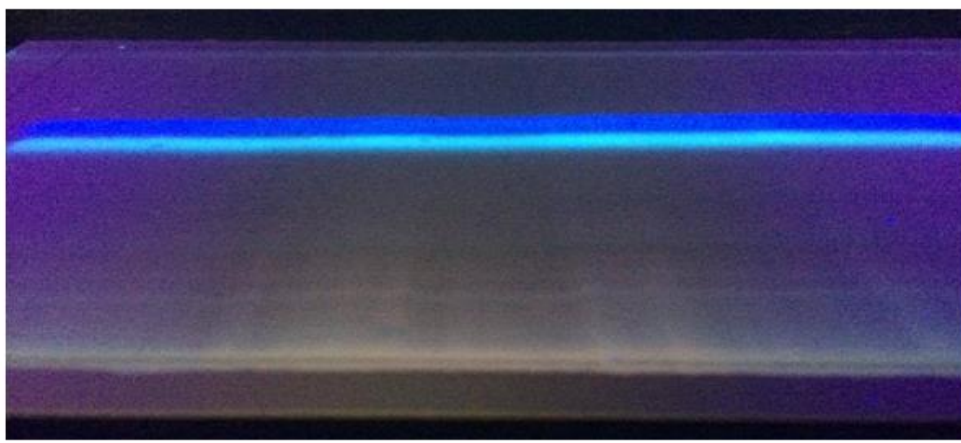
La principal aplicación del escualeno en la terapia del cáncer es de actuar como un agente potenciador para los fármacos utilizados durante la quimioterapia. Hay informes de resultados obtenidos por las pruebas en modelos animales de escualeno en combinación con agentes anti-tumorales como ACNU (3 - [(4-amino-2-metil-5-pirimidinil) metil] -1- (2- cloroetil) -1-nitrosourea) contra la leucemia linfocítica (Yamaguchi et al., 1985). Los datos experimentales existentes hasta ahora podría indicar que el escualeno está implicado en el camino bioquímico por el cual los fármacos contra el cáncer tengan una mejor acción, ya que parece que el escualeno puede detener el desarrollo de las células tumorales, o prevenir algunas formas de cáncer inducido químicamente (Reddy & Couvreur, 2009).

### **3.3. Compuesto 2 (Fracción RA111-35/1.1).**

Del fraccionamiento se obtuvieron 3 fracciones, de estas la **RA111-35/1.1** se realizó una CCF preparativa utilizando 18 mg, eluyendo en diclorometano – acetato de etilo en una proporción de 8:2 y como fase estacionaria Sílica Gel 60 F254 fase directa. (Fig.28). Obteniendo como resultado 3mg de compuesto.

El compuesto se pudo observar a una longitud de onda 365 nm el mismo que presenta una mancha azul brillante. Al ser revelada con ácido sulfúrico al 5% y vainillina no se observó ninguna mancha.





**Fig. 28.** CCF preparativa compuesto 2

**Fuente:** Autor 2016

### 3.3.1 Identificación y caracterización de RA111-35/1.1.

El compuesto fue identificado mediante resonancia magnética nuclear y corroborada con literatura como se muestra en la tabla 9

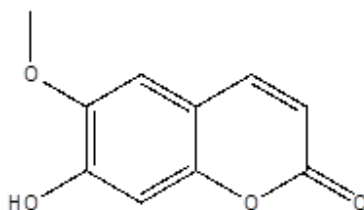
**Tabla 9** Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN  $\text{CDCl}_3$  de la escopoletina

<b>DATOS EXPERIMENTALES <math>^1\text{H}</math> NMR (400Mz)</b>	<b>(Mofiz &amp; Hossain, 2015) <math>^1\text{H}</math> NMR (400Mz)</b>
3.9 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )	3.8 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )
6.3 /1H, d J= 9.2Hz, H-3)	6.2 /1H, d J= 9.2Hz, H-3)
6.8 (1H, s, H-5)	6.8 (1H, s)
6.9 (1H, s, H-8)	6.9 (1H, s)
7.6 (1H, d, J= 9.2 Hz. H-4)	7.7(1H, d, J= 9.2 Hz. H-4)

**Fuente:** Autor 2016

El compuesto fue identificado como escopoletina, cumarina de fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$ , con un peso molecular de 192,16 g/mol.

En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) se muestra dos dobletes a  $\delta$  6.3 y  $\delta$  7.6 característico de H-3 y H-4 del anillo de pirona de una cumarina. La presencia de dos singuletes de protones aromáticos en  $\delta$  6.9 y  $\delta$  6.8 son atribuidos a H-5 y H-8, respectivamente. En la posición  $\delta$  3.9 muestra un singulete característico del grupo metoxi. (Fig.29). (Anexo 4)



**Fig. 29.** Estructura química de Escopoletina  
**Fuente:** Autor 2016

Según literatura esta molécula ha sido reportada en *Hedyosmum brasiliense*, se utiliza comúnmente en la medicina tradicional china para el tratamiento de diversas enfermedades reumatoideas (Pan et al., 2009).

Estudios recientes indican que la escopoletina es un potente hepatoprotector, antioxidante y espasmódico y también posee actividad antiangiogénica (Oliveira, Romero, Silva, Silva, & Medeiros, 2010; Shaw, Chen, Hsu, Chen, & Tsai, 2003). Se ha reportado que la escopoletina inhibe la proliferación celular mediante la inducción de la detención del ciclo celular y el aumento de la apoptosis en células de tumor de próstata, así como inhibir en las propiedades de proliferación, migración y la formación de tubos in vitro de células endoteliales humanas (Pan et al., 2009).

La escopoletina induce la detención del ciclo celular y aumenta la apoptosis en las células tumorales de próstata humano y la línea celular de leucemia humana a través de la activación de la caspasa-3 y la angiogénesis bloqueando el crecimiento de células endoteliales (Xu et al., 2014).

#### **3.4. Compuesto 3 (Fracción RA106-35/95-120).**

En la figura 30 se observa la CCF de la fracción RA106-35/95-120 en la cual se distingue una sola mancha de color morado. Una vez realizado el RMN se detecta que es una mezcla de dos compuestos; según los valores de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se estima que es un ácido graso tipo linolénico con un triterpeno conocido como cicloartenol. (Anexo 5 y 6)

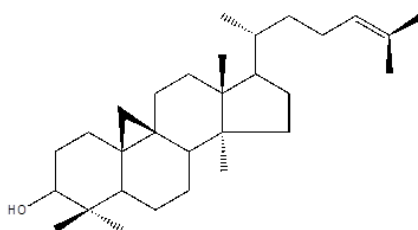


**Fig. 30.** CCF de la fracción RA106-35/95-120

**Fuente:** Autor 2016

### 3.4.1. Caracterización química del cicloartenol

En la figura 31 se muestra la estructura química del cicloartenol



**Fig. 31** Estructura química del cicloartenol

**Fuente:** Autor 2016

En la tabla 10 se muestra los datos comparativos de  $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  obtenidos experimentalmente con reportados en literatura del cicloartenol.

**Tabla 10** Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN del cicloartenol en  $\text{CDCl}_3$

DATOS EXPERIMENTALES $^1\text{H}$ NMR (400Mz)	DATOS EXPERIMENTALES $^{13}\text{C}$ (100Mz)	(Melorose, Perroy, & Careas, 2015a) $^{13}\text{C}$ (100Mz)	(Melorose et al., 2015a) $^1\text{H}$ NMR (400Mz)
0.34(2H-19, d)	<b>C-1:</b> 32.0	<b>C-1:</b> 32.0	0.33(2H-19, d)
0.57(2H-19, d)	<b>C-2:</b> 29.9	<b>C-2:</b> 30.5	0.55(2H-19, d)
0.80(CH3, s)	<b>C-3:</b> 80.5	<b>C-3:</b> 78.9	0.81(CH3, s)
0.87(CH3, s)	<b>C-4:</b> 39.9	<b>C-4:</b> 40.6	0.89(CH3, s)
0.96(CH3, s)	<b>C-5:</b> 47.3	<b>C-5:</b> 47.2	0.96(CH3, s)
0.96(CH3, s)	<b>C-6:</b> 21.2	<b>C-6:</b> 21.2	0.96(CH3, s)

1.60(CH3, s)	C-7: 26.1	C-7: 26.1	1.60(CH3, s)
1.67(CH3, s)	C-8: 48.0	C-8: 48.0	1.68(CH3, s)
0.87(CH3-21,d)	C-9: 20.3	C-9: 20.1	0.88(CH3-21,d)
5.10(H-24, t)	C-10: 26.2	C-10: 26.3	5.10(H-24, t)
	C-11: 26.6	C-11: 26.6	
	C-12: 33.0	C-12: 33.0	
	C-13: 45.4	C-13: 45.4	
	C-14: 48.9	C-14: 48.9	
	C-15: 35.7	C-15: 35.6	
	C-16: 28.3	C-16: 28.1	
	C-17: 52.3	C-17: 52.4	
	C-18: 18.1	C-18: 18.1	
	C-19: 29.8	C-19: 29.9	
	C-20: 36.1	C-20: 35.9	
	C-21: 18.4	C-21: 18.3	
	C-22: 36.5	C-22: 36.4	
	C-23: 25.1	C-23: 25.0	
	C-24: 125.4	C-24: 125.4	
	C-25: 130.4	C-25: 130.8	
	C-26: 17.8	C-26: 17.6	
	C-27: 25.8	C-27: 25.7	
	C-28: 19.4	C-28: 19.4	
	C-29: 29.6	C-29: 25.5	
	C-30: 14.2	C-30: 14.0	

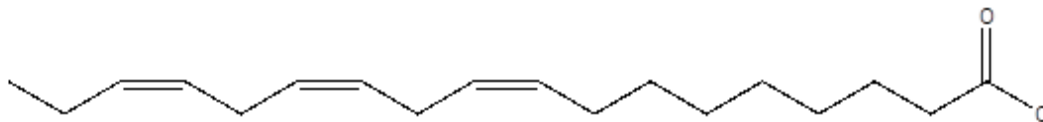
**Fuente:** Autor 2016

Los compuestos de tipo cicloartano son compuestos interesantes principalmente por la biosíntesis de fito esteroides, estos compuestos presentan una baja polaridad especialmente el cicloartenol que juega un papel de precursor o producto intermedio en la biogénesis de los esteroides vegetales. Esta clase de compuestos tienen actividad hipolipídica, hipotensora, diurética, anti-inflamatoria, sedante, analgésica, inmunoestimulante y actividad cardiotónica (Melrose et al., 2015a).

En estudios realizados muestran que el cicloartenol posee una potente actividad inmunosupresora ya que se realizó un ensayo alogénico de linfocitos mixtos de ratón obteniendo buenos resultados. Por lo tanto este compuesto puede ser un excelente candidato para el tratamiento de enfermedades inmunosupresoras tales como psoriasis, osteoporosis, y miastenia grave, así como algunos tipos de inflamación (Wu, Chen, Su, Wang, & Kuang, 2015).

### 3.4.2. Caracterización química del ácido linolénico

En la figura 32 se muestra la estructura química del ácido linolénico.



**Fig. 32.** Estructura química del ácido linolénico

Fuente: Autor 2016

En la tabla 11 se muestra los datos comparativos de  $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  del experimental con reportados en literatura del ácido linolénico.

**Tabla 11.** Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN del ácido linolénico en  $\text{CDCl}_3$

DATOS EXPERIMENTALES $^1\text{H}$ NMR (400Mz)	(Ragasa et al., n.d.) $^1\text{H}$ NMR (600Mz)	DATOS EXPERIMENTALES $^{13}\text{C}$ (100Mz)	(Ragasa, Ebajo, & Chang, n.d.) $^{13}\text{C}$ (100Mz)
5.31-5.35(m, CH =CH)	5.35(m, CH=CH)	C-1: 21.1	C-1: 20.6
2.75, 2.29 (t, J = 7.2 Hz, $\alpha$ -CH <sub>2</sub> )	2.79, 2.33 (t, J = 7.2 Hz, $\alpha$ -CH <sub>2</sub> )	C-2: 24.5	C-2: 24.8
1.99-2.07 (m, CH <sub>2</sub> )	1.99-2.07 (m, CH <sub>2</sub> )	C-3: 25.9	C-3: 25.7
1.60-1.62(m, $\beta$ -CH <sub>2</sub> )	1.59-1.64 (m, $\beta$ -CH <sub>2</sub> )	C-4: 29.2	C-4: 29.1
1.25-1.30 (CH <sub>2</sub> )	1.23-1.34 (CH <sub>2</sub> )	C-5: 29.3	C-5: 29.9
0.95(t, J = 7.8 Hz)	0.96 (t, J = 7.8 Hz)	C-6: 29.3	C-6: 29.4
		C-7: 29.5	C-7: 29.5
		C-8: 29.5	C-8: 29.5
		C-9: 29.6	C-9: 29.6
		C-10: 29.7	C-10: 29.7
		C-11: 29.8	C-11: 29.78
		C-12: 127.9	C-12: 127.2
		C-13: 128.0	C-13: 127.8
		C-14: 128.2	C-14: 128.3
		C-15: 128.4	C-15: 128.4
		C-16: 130.4	C-16: 130.5
		C-17: 131.0	C-17: 131.9
		C-18: 173.4	C-18: 173.2

Fuente: Autor 2016

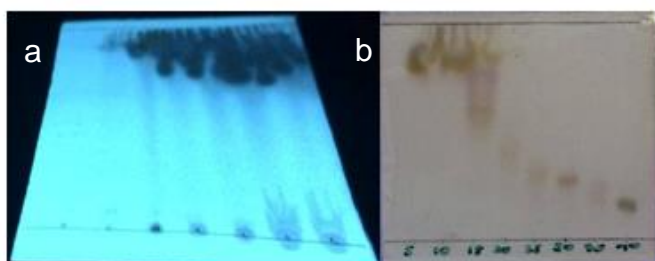
El ácido linolénico es un ácido graso, poliinsaturado esencial en la dieta humana y es el más abundante en dieta occidental. En estudios realizados indican que el ácido linolénico tiene un efecto protector hacia las enfermedades cardiovasculares ya que en ensayos realizados en Costa Rica indicaron que el consumo de ácido linolénico en la

dieta de estas personas se asocia significativamente con un menor riesgo de infarto de miocardio (Baylin, 2003).

También se le atribuyen propiedades antiinflamatorias ya que estimula la acción de los neutrófilos y monocitos lo que daría lugar a la disminución de la inflamación (Lewis, Austen, & Soberman, 1990; Tilley, Coffman, & Koller, 2001).

### 3.5. Fraccionamiento del extracto de Metanol.

Del fraccionamiento del extracto de Metanol se obtuvieron 45 muestras y se unieron de acuerdo a las características presentadas mediante cromatografía de capa fina y Rf obteniendo como resultado 5 fracciones. (Fig.33) tabla 12



**Fig. 33.** CCF de las fracciones obtenidas en la columna del extracto total de Metanol. a) Luz UV 254 nm, b) CCF revelada

**Fuente:** Autor 2016

**Tabla 12.** Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de Metanol

Fracciones	Muestra	Mezcla de disolventes	Peso (mg)
RA1-12	1-12	MeOH: H <sub>2</sub> O	60.3
RA13-20	13-20	MeOH: H <sub>2</sub> O	210.6
RA21-35	21-35	MeOH: H <sub>2</sub> O	154.1
RA36-40	36-40	MeOH: H <sub>2</sub> O	23.8
RA41-43	41-43	MeOH: H <sub>2</sub> O	10.4

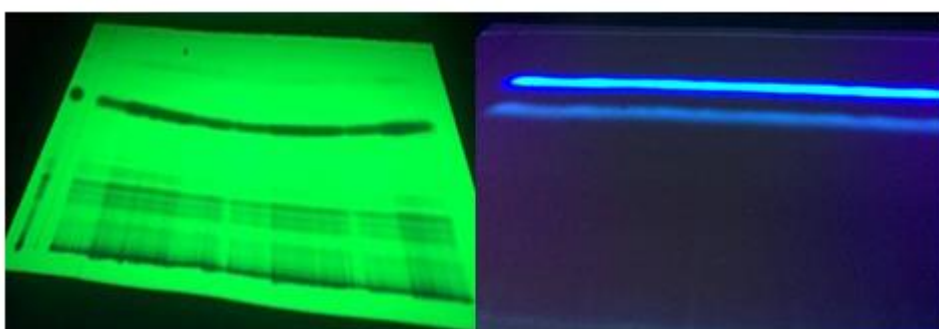
**Fuente:** Autor 2016

De estas se tomó la fracción RA41-43 y se procedió a purificarla mediante cromatografía en capa fina preparativa.

### 3.5.1. Compuesto 4 (Fracción RA41-43/1-1).

Para purificar esta fracción se realizó una CCF preparativa utilizando 10 mg, eluyendo en Hexano – acetato de etilo en una proporción de 8:2 y como fase estacionaria Sílica Gel 60 F254 fase directa. Obteniendo como resultado 4mg de compuesto **RA41-43/1-1**

El compuesto es visible en luz UV 254 nm, donde se observó una mancha oscura y en 365 nm una mancha brillante celeste, al ser revelada con ácido sulfúrico al 5% y vainillina se observó una mancha color oscura (Fig. 34).



**Fig. 34.** CCF preparativa 8:2 en Hexano: Acetato de etilo. a) Luz UV 254 nm, b) Luz UV 365 nm

Fuente: Autor 2016

### 3.5.2. Identificación y caracterización de RA41-43/1-1.

En la tabla 13 se muestra los datos comparativos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y corroborado con literatura (Acebey et al., 2007).

El compuesto es identificado como bolivianine, lactona sesquiterpénica de fórmula molecular  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_3$ , con peso molecular 378 g/mol. (Anexo 9 y 10).

**Tabla 13.** Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN de bolivianine en  $\text{CDCl}_3$

DATOS EXPERIMENTALES $^1\text{H}$ NMR (400Mz)	DATOS EXPERIMENTALES $^{13}\text{C}$ (100Mz)	(Acebey et al., 2007) $^{13}\text{C}$ (100Mz)	(Acebey et al., 2007) $^1\text{H}$ NMR (400Mz)
1.48 (m)	C-1: 26.1	C-1: 26.1	1.46(m)
0.77(ddd)	C-2a: 16.4	C-2a: 16.3	0.70(ddd)
0.83(m)	C-2b:	C-2b:	0.91(m)
1.93(m)	C-3: 23.6	C-3: 23.5	1.94(m)
	C-4: 152.8	C-4: 152.8	
2.55(bdd)	C-5: 52.1	C-5: 52.1	2.55(bdd)
1.40(dd)	C-6a: 26.1	C-6a: 26.2	1.35(dd)
1.93(dd)	C-6b:	C-6b:	1.94(dd)

	<b>C-7:</b> 53.1	<b>C-7:</b> 52.5	
	<b>C-8:</b> 98.4	<b>C-8:</b> 96.9	
2.31(m)	<b>C-9:</b> 46.6	<b>C-9:</b> 46.5	2.30(m)
	<b>C-10:</b> 39.8	<b>C-10:</b> 39.8	
	<b>C-11:</b> 109.9	<b>C-11:</b> 110.3	
	<b>C-12:</b> 170.3	<b>C-12:</b> 168.5	
7.38(s)	<b>C-13:</b> 150.6	<b>C-13:</b> 149.4	7.39(s)
1.25(s)	<b>C-14:</b> 20.7	<b>C-14:</b> 20.5	1.00(s)
4.62(bs)	<b>C-15a:</b> 105.6	<b>C-15a:</b> 105.4	4.74(bs)
5.29(bs)	<b>C-15b:</b>	<b>C-15b:</b>	5.18(bs)
1.70(m)	<b>C-16a:</b> 23.6	<b>C-16a:</b> 23.4	1.73(m)
2.88 (m)	<b>C-16b:</b>	<b>C-16b:</b>	2.28(m)
5.63(m)	<b>C-17:</b> 120.7	<b>C-17:</b> 120.5	5.63(m)
	<b>C-18:</b> 139.8	<b>C-18:</b> 140.0	
2.70(dd)	<b>C-19:</b> 51.5	<b>C-19:</b> 51.6	2.63(dd)
---	<b>C-20a:</b> 35.6	<b>C-20a:</b> 35.3	1.10(m)
(ddd)	<b>C-20b:</b>	<b>C-20b:</b>	2.07(ddd)
1.69(dd)	<b>C-21:</b> 44.9	<b>C-21:</b> 44.3	1.69(dd)
	<b>C-22:</b> 79.4	<b>C-22:</b> 78.4	
1.33(s)	<b>C-23:</b> 26.5	<b>C-23:</b> 27.2	1.16(s)
1.25(s)	<b>C-24:</b> 27.8	<b>C-24:</b> 27.3	1.01(s)
1.48(bt)	<b>C-25:</b> 22.8	<b>C-25:</b> 22.5	1.62(bt)

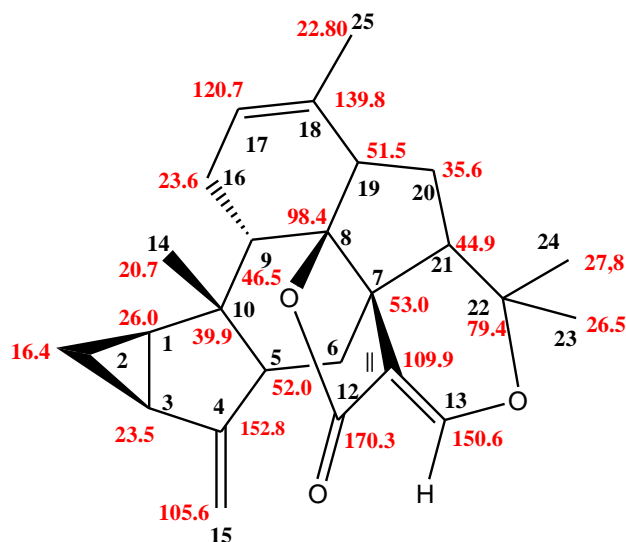
Fuente: Autor 2016

En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se muestran 4 singuletes situados a un desplazamiento químico de 1.25, 1.25, 1.33, 1.48 ppm que corresponden a los cuatro grupos metilos, un multiplete en 5,63 ppm que corresponde a un protón etilénico, dos singuletes a 4.62 y 5.29 ppm que corresponden a los protones geminales etilénicos y un singulete a 7.38. (Anexo 7)

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  se muestran 25 señales de carbono en el cual el carbono característico de la lactona se encuentra a un desplazamiento químico de 170.3 ppm, también se puede observar los desplazamientos químicos de 16.3, 26.0 y 23.5 que corresponden al anillo ciclo propano. (Anexo 8)

En la figura 35 se muestra la estructura química de la molécula de bolivianine





**Fig. 35.** Estructura química de bolivianine

**Fuente:** Autor 2016

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un grupo grande y diverso de productos químicos de plantas biológicamente activas que se han identificado en varias familias de plantas tales como Acanthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Rutaceae, Winteraceae y Hepatideae (Melorose, Perroy, & Careas, 2015b).

Las lactonas sesquiterpénicas son una clase de origen natural terpenoides de plantas que representan una clase diversa y única de productos naturales y son importantes constituyentes de aceites esenciales. Tienen una diversidad estructural y actividad biológica potencial, tales como anticancerígeno, antiinflamatorio, antitumoral, contra la malaria, antivirales, antibacterianos, antifúngicos, esto ha dado aún más interés entre los químicos a la investigación para el descubrimiento de fármacos (Skaltsa et al., 2000).

Aunque el mecanismo exacto de acción de las lactonas sesquiterpénicas no es bien conocido se ha documentado a través de los diversos informes publicados que la actividad biológica mostrada por la mayoría de las lactonas sesquiterpénicas es debido a la presencia de  $\alpha$ -metileno-gamma-lactonas y alfa, beta anillo de ciclopentenona insaturado. También las diferencias en la actividad entre las lactonas sesquiterpénicas individuales pueden ser explicadas por las diferencias en los números de elementos alquilantes, lipofilia, la geometría molecular, y el ambiente químico del grupo sulfhidrido (Chaturvedi, 2011).

### 3.6. Actividad antimicrobiana de los extractos totales de *H. racemosum*.

De los extractos desclorofilados (Hexano, Acetato de Etilo, Metanol) de *Hedyosmum racemosum*, no presentaron actividad antimicrobiana para ninguna de las cepas empleadas en el ensayo como se muestra en la tabla 14.

**Tabla 14.** CMI antibacteriana de los extractos totales desclorofilados de *H. racemosum*.

Microorganismos	HEX ( $\mu\text{g/mL}$ )	AcOEt ( $\mu\text{g/mL}$ )	MeOH ( $\mu\text{g/mL}$ )	ATB ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Escherichia coli</i>	NA	NA	NA	3,90
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA	NA	3,90
<i>Salmonella tiphymurium</i>	NA	NA	NA	3,90
<i>Proteus vulgaris</i>	NA	NA	NA	15,62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA	NA	NA	15,62
<i>Salonella enterítica</i>	NA	NA	NA	7,81
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NA	NA	NA	1,95

Fuente: Autor 2016

### 3.7. Actividad enzimática de extractos totales y compuestos aislados.

La actividad inhibitoria en  $\alpha$ -glucosidasa in vitro de los extractos totales desclorofilados (Hexano, AcOEt, MeOH) de *C. taxifolium*, se presentan en la tabla 15.

**Tabla 15.** Efecto inhibitor de  $\alpha$ -glucosidasa en extractos totales de *H. racemosum*

Ex. totales	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g/mL}$
Hexano	154,97
AcOEt	424,44
MeOH	170,16

Fuente: Autor 2016

En el ensayo realizado de  $\alpha$ -glucosidasa los extractos de Hexano y Metanol presentan una actividad inhibitoria media con un valor de IC<sub>50</sub> de 154,97  $\mu\text{g/mL}$  y 170,16  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, mientras que el extracto de Acetato de etilo presenta una actividad baja con un valor de IC<sub>50</sub> de 424,44  $\mu\text{g/mL}$ .

Este es el primer estudio de la actividad hipoglucemiante reportado en especies de la familia Chloranthaceae.

No se realizó actividad hipoglucemiante en el compuesto escopoletina ya que según estudios realizados este compuesto aislado de *Uncaria cordata* muestra una inhibición débil con un 34,5% frente a la enzima, esto se apoya con otros estudios realizados anteriormente en los que se reporta que la mayoría de las cumarinas no presentan una fuerte actividad enzimática (Abdullah, Salim, & Ahmad, 2016).

## CONCLUSIONES

- Del extracto total de Acetato de Etilo se identificaron 4 compuestos conocidos como escualeno, escopoletina y una mezcla de cicloartenol con ácido linolénico, del extracto de Metanol se identificó y caracterizo un compuesto conocido como bolivianine.
- Los extractos desclorofilados de hexano, acetato de etilo y metanol de *Hedyosmum racemosum*, no presentaron actividad antimicrobiana para ninguna de las cepas empleadas en el ensayo.
- En el ensayo realizado de  $\alpha$ -glucosidasa los extractos de Hexano y Metanol presentan una actividad inhibitoria media con un valor de  $IC_{50}$  de 154,97  $\mu\text{g/mL}$  y 170,16  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, mientras que el extracto de Acetato de etilo presenta una actividad baja con un valor de  $IC_{50}$  de 424,44  $\mu\text{g/mL}$

## RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones de actividad biológica de bolivianine, lactona sesquiterpénica ya que no existe mucha información científica sobre esta molécula.
- Se recomienda realizar hemisíntesis de la lactona sesquiterpénica ya que este tipo de moléculas presentan actividad antiinflamatoria.

## BIBLIOGRAFÍA

Abdullah, N. H., Salim, F., & Ahmad, R. (2016). Chemical constituents of malaysian *U. cordata* var. *ferruginea* and their in Vitro  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities. *Molecules*, 21(5), 1–11.

Acebey, L. . b c, Jullian, V. . c, Sereno, D. ., Chevalley, S. . c, Estevez, Y. . c, Moulis, C. Sauvain, M. . c. (2010). Anti-leishmanial lindenane sesquiterpenes from *hedyosmum angustifolium*. *Planta Medica*, 76(4), 365–368.

Acebey, L., Sauvain, M., Beck, S., Moulis, C., Gimenez, A., & Jullian. (2007). Bolivianine, a new sesterpene with an unusual skeleton from *Hedyosmum angustifolium*, and its isomer, isobolivianine. *Organic Letters*, 9(23), 4693–4696.

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.

Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, a, Tobar, V., Witte, P. De, & Leuven, U. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1), 89–97.

Barnes, J., & Anderson, L. a. (2007). Herbal medicines : Third edition. *Pharmaceutical Press*, 195–196.

Baylin, A. (2003). Adipose Tissue alpha-Linolenic Acid and Nonfatal Acute Myocardial Infarction in Costa Rica. *Circulation*, 107(12), 1586–1591.

Cao Cong M, Yong Peng, Shi Qing W., & Xiao Pei G. (2008). Chemical constituents and bioactivities of plants of chloranthaceae. *Chemistry and Biodiversity*, 5(2), 219–238.

Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 61(1), 30–32.

Cervantes, R., & Presno, J. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. *Revista de Endocrinología Y Nutrición*, 21(3), 98–106.

Chaturvedi, D. (2011). Sesquiterpene lactones : Structural diversity and their biological

activities. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 661(2), 313–334.

Das, B., Yeager, H., Baruchel, H., Freedman, M. H., Koren, G., & Baruchel, S. (2003). In vitro cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity: Implications in cancer chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 39(17), 2556–2565.

de la Torre, L., Navarrete, H., M., P. M., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). ENCICLOPEDIA DE PLANTAS UTILES DEL ECUADOR, 1–3.

Decatur, J. (2011). HSQC and HMBC for Topspin, 1–10.

Denegri, T., & Droquilly, S. (1983). Infección intrahospitalaria e infección por vía aérea. *Revista Médica Chile*, 109.

Díaz, M., Martínez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Fundamental features on the *Enterococcus* genus as a very important pathogen at present time. *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*, 48(2), 147–161.

Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R. M., & María, M. D. S. (2008). Resonancia Magnética Nuclear De Protón. *Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense*, (Madrid, España), 1–47.

Eslava, M., & Cravioto, A. (1994). Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. *Secretaría de Salud*, 251.

Fernández, I. (2011). Actualización en antidiabéticos orales. *Información Terapéutica Del Sistema Nacional de Salud*, 25(2), 33–45.

Fox, C. B. (2009). Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules*, 14(9), 3286–3312.

Gil, M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infectología*, 17(2), 145–152.

Grijalva, A. (2006). *Flora Util - Etnobotánica de Nicaragua*.

Guenther, E. (1972). *The essential oils- Vol 1*. New York: Read Books.

Gutiérrez, M. C., Droguet, M., & Odeur, U. N. E. M. (2002). LA CROMATOGRAFÍA DE

GASES Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS : Résumé :, 35–41.

Jawetz, E., Melnick, J., & Adelberg, E. (2011). *Microbiologia medica* (25th ed.). Piccin-Nuova Libreria.

Jørgensen, P., Neill, D., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. St. Louis: Missouri Botanical Garden.

Kawabata, J., Tahara, S., & Mizutani, J. (1981). Isolation and Structural Elucidation of Four Sesquiterpenes from *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae) 1", 45(6).

Kelly, G. S. (1999). Squalene and its potential clinical uses. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, 4(1), 29–36.

Kitson, F., Larsen, B., & McEwen, C. (2002). *GAS CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY A PRACTICAL GUIDE*. (ACADEMIC PRESS, Ed.).

Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. (Omega, Ed.). España.

Lewis, A., Austen, F., & Soberman, M. (1990). The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at HEBREW UNIVERSITY on September 1, 2014. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1990 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales*. (F. E. de la P. U. C. del Perú, Ed.) (segunda ed). Perú.

Melrose, J., Perroy, R., & Careas, S. (2015a). *Natural Compounds. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (Vol. 1).

Melrose, J., Perroy, R., & Careas, S. (2015b). Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactone. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, 1.004

Mofiz, K., & Hossain, S. (2015). Scopoletin and  $\beta$ -sitosterol glucoside from roots of *Ipomoea digitata*, 4(2), 5–7.

Montes, M., Wilkomirsky, T., & Valenzuela, L. (2015). *Plantas Medicinales*. Retrieved from [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=260728&pid=S0365-2807200400030000800013&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=260728&pid=S0365-2807200400030000800013&lng=es)

Moroti, R., Petre, R., Niculescu, I., Pigulea, I., Molagic, V., Hristea, A., & Porojnicu, A.



(2012). VITAMIN D AN ANTIMICROBIAL WEAPON AGAINST ACUTE RESPIRATORY TRACT INFECTIONS . A SYSTEMATIC REVIEW ( 2006- MARCH 2011 ) Introduction Recent studies have demonstrated that vitamin D has immunomodulator and antimicrobial functions . It acts like a hormone, 60.

Murray, R. D., & Mendez, J. (1994). *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. (B. on Demand, Ed.).

Newmark, L. (1997). and Cancer Risk: Hypothesis group. *Carcinogenesis*, 6(December), 1101–1103.

Nigenda, G. (2016). Nigenda, Gustavo. La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. México, D.F., MX: Red Salud Pública de México, 2006. ProQuest ebrary. Web. 25 July 2016. Copyright © 2006. Red Salud Pública d, (July), 13.

Oliveira, J., Romero, A., Silva, S., Silva, A., & Medeiros, A. (2010). Intracellular Calcium Mobilization as a Target for the Spasmolytic Action of Scopoletin. *Bioinformatics*, 26(18), 2259–2265.

OMS. (2006). Hojas de información microbiológica. *Guías Para La Calidad Del Agua*, 191–241. Retrieved from [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3rev/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/)

OMS. (2012). Global report for research on infectious diseases of poverty., 1–184.

OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023, 72.

Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Barcelona: BOOKS, MARGE.

Pan, R., Dai, Y., Yang, J., Li, Y., Yao, X., & Xia, Y. (2009). Anti-angiogenic potential of scopoletin is associated with the inhibition of ERK1/2 activation. *Drug Development Research*, 70(3), 214–219.

Porter, J. W., & Spurgeon, S. L. (1981). *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* (vol 1). New York: Wiley- Interscience Publication.

Pozo, L. Del, Silva, N., Valencia, A., Soto, J., & Riveros, J. C. (2006). Estudio de un brote intrahospitalario por Salmonella typhimurium productora de beta-lactamasa de espectro extendido SHV-5, 67(4), 318–326.

Ragasa, Y., Ebajo, V., & Chang, S. (n.d.). Research Journal of Pharmaceutical ,

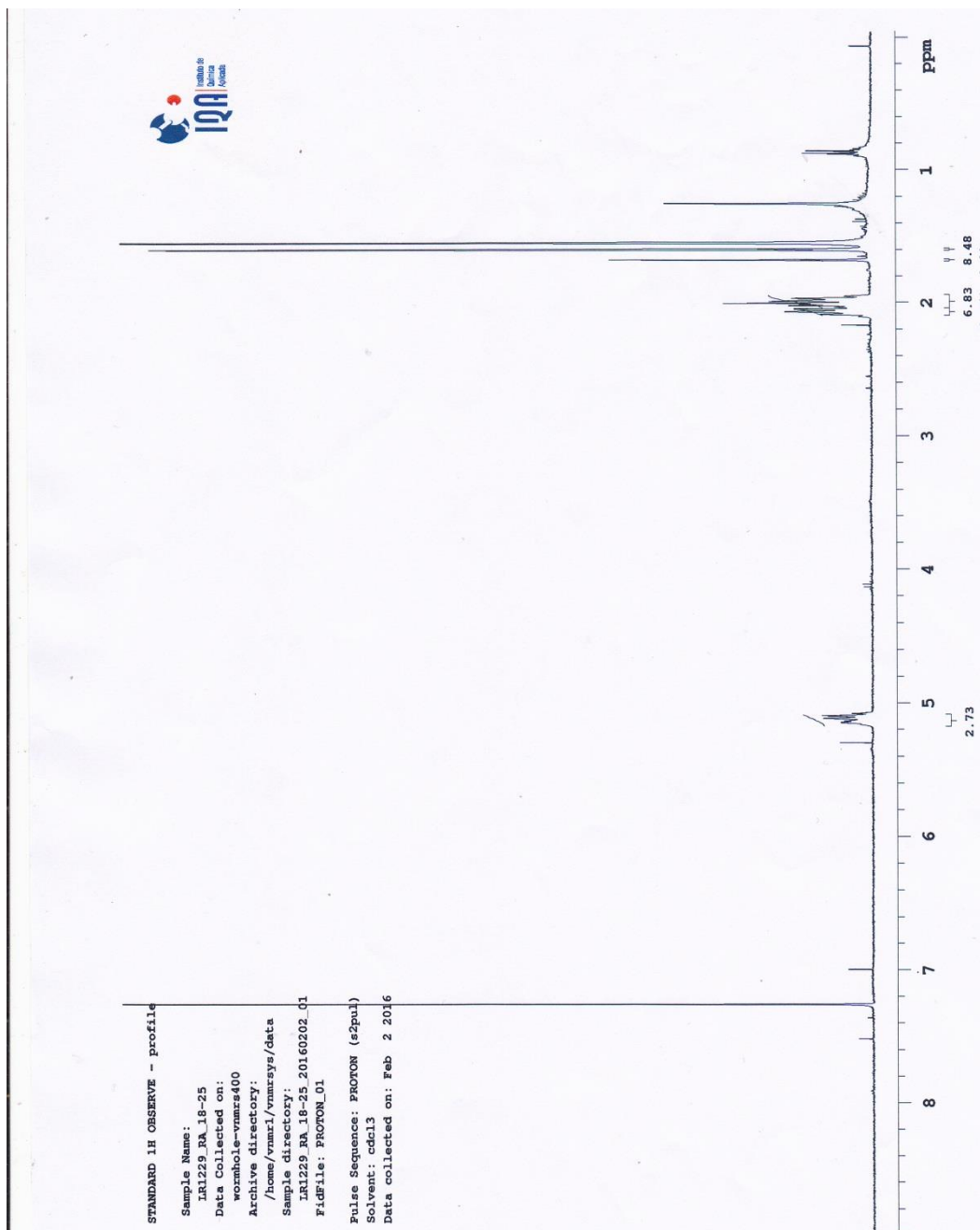
- Biological and Chemical Sciences. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(388), 388–396.
- Reddy, L. H., & Couvreur, P. (2009). Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(15), 1412–1426.
- Romero Cabello, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. (E. M. Panamericana, Ed.). México.
- Rzedowski, J., & Rzedowski, G. De. (1923). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Commelinaceae. *Trabajo*, 1187–1198.
- Sanz, I., & Bascones, A. (2007). Diabetes mellitus: Su implicación en la patología oral y periodontal. *Universidad Militar Nueva Granada*, 25(5), Unpublished Work.
- Saúde, M. da. (2007). Medicina tradicional indígena em contextos.
- Shaw, C., Chen, C., Hsu, C., Chen, C., & Tsai, Y. (2003). Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. *Phytotherapy Research*, 17(7), 823–825.
- Shoolery, J. (1972). A basic guide to NMR.
- Skaltsa, H., Lazari, D., Panagouleas, C., Georgiadou, E., Garcia, B., & Sokovic, M. (2000). Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry*, 55(8), 903–908.
- Srisurichan, S., & Pornpakakul, S. (2015). Triterpenoids from the seedpods of *Holarrhena curtisii* King and Gamble. *Phytochemistry Letters*, 12, 282–286.
- Tilley, S. L., Coffman, T. M., & Koller, B. H. (2001). Mixed messages: Modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *Journal of Clinical Investigation*, 108(1), 15–23.
- Tinoco, D. (2013). *Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los extractos totales y metabolitos secundarios de Hedyosmum racemosum de Zamora, Ecuador*.
- Torres, M., & Vergara, J. (2009). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos, 163–187.
- Wallach, O. (1887). *Zur kenntnis der terpepe und ätherischen öle*. Liebigs Annalen der Chemie.

- Wefers, H., Melnik, B. C., Flur, M., Bluhm, C., Lehmann, P., & Plewig, G. (1991). Influence of UV irradiation on the composition of human stratum corneum lipids. *J. Invest Dermatol.*, 96(0022-202X (Print)), 959–962.
- Wu, L., Chen, Z. L., Su, Y., Wang, Q. H., & Kuang, H. X. (2015). Cycloartenol triterpenoid saponins from *Cimicifuga simplex* (Ranunculaceae) and their biological effects. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(2), 0081–0089.
- Xu, B., Yang, Y. J., Han, Y. L., Lu, S. Z., Li, B., Liu, Q., ... Kirtane, A. J. (2014). Validation of residual SYNTAX score with second-generation drug-eluting stents: One-year results from the prospective multicentre SEEDS study. *EuroIntervention*, 10(1), 65–73.
- Yamaguchi, T., Nakagawa, M., Hidaka, K., Yoshida, T., Sasaki, T., Akiyama, S., & Kuwano, M. (1985). Potentiation by squalene of antitumor effect of 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-1-(2-chloroethyl)-nitrosourea in a murine tumor system. *Japanese Journal of Cancer Research*.

## **ANEXOS**

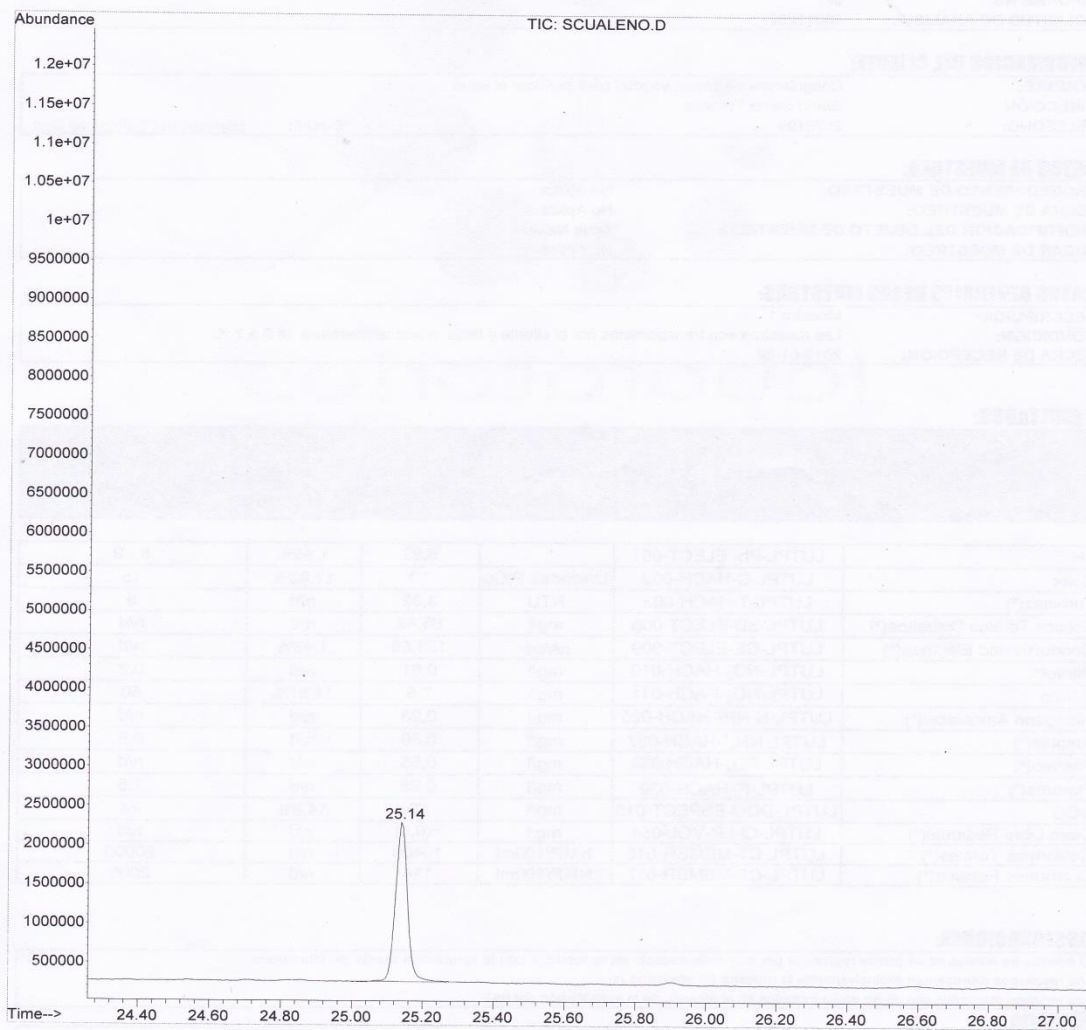
# Espectros de Resonancia Magnética Nuclear y CG-EM de Escualeno

## Anexo 1. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ )



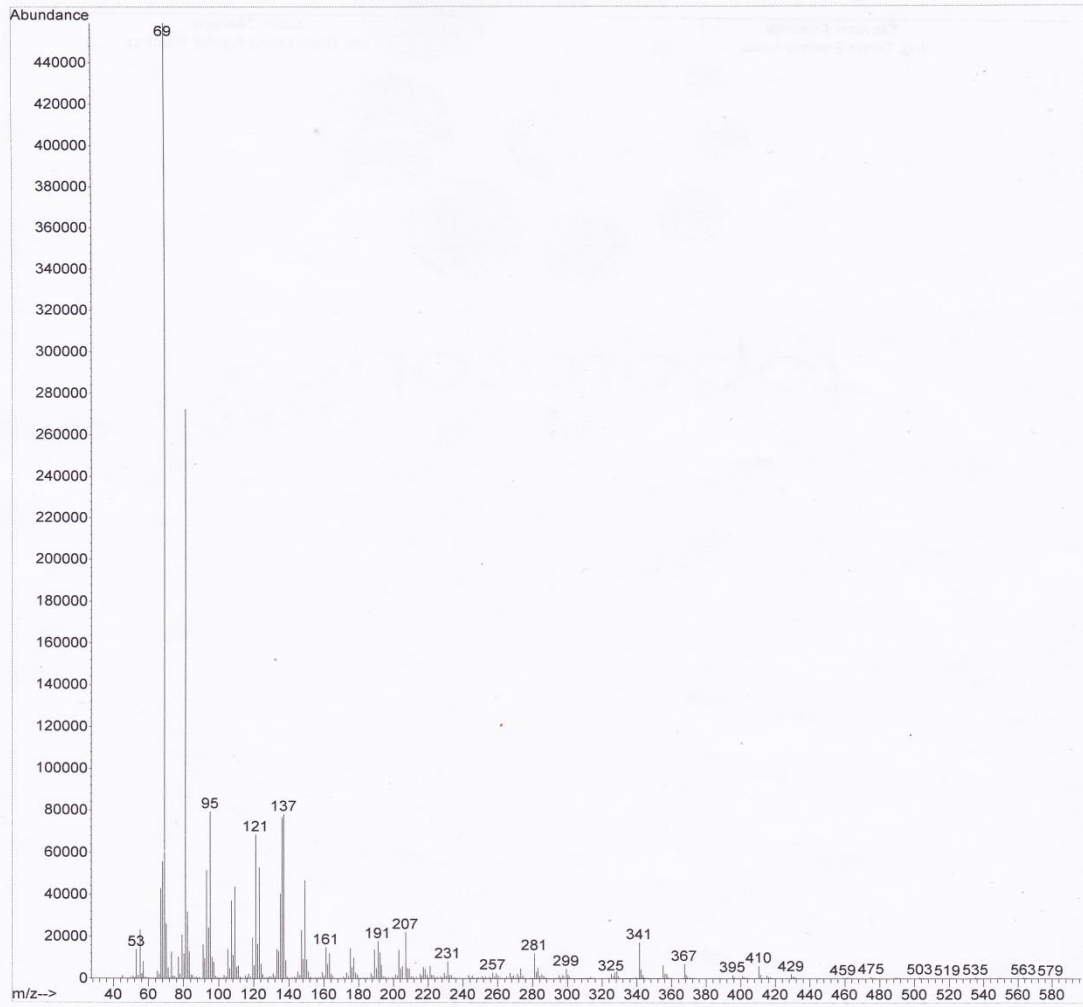
## Anexo 2. Espectro de CG-EM

File :D:\MSDCHEM\DATA\2015\Vladimir Morocho\RICHARD\SCUALENO.D  
Operator : JC  
Acquired : 24 Feb 2016 15:39 using AcqMethod METODO\_GENERAL  
Instrument : GCMSD CET  
Sample Name: SCUALENO  
Misc Info :  
Vial Number: 1



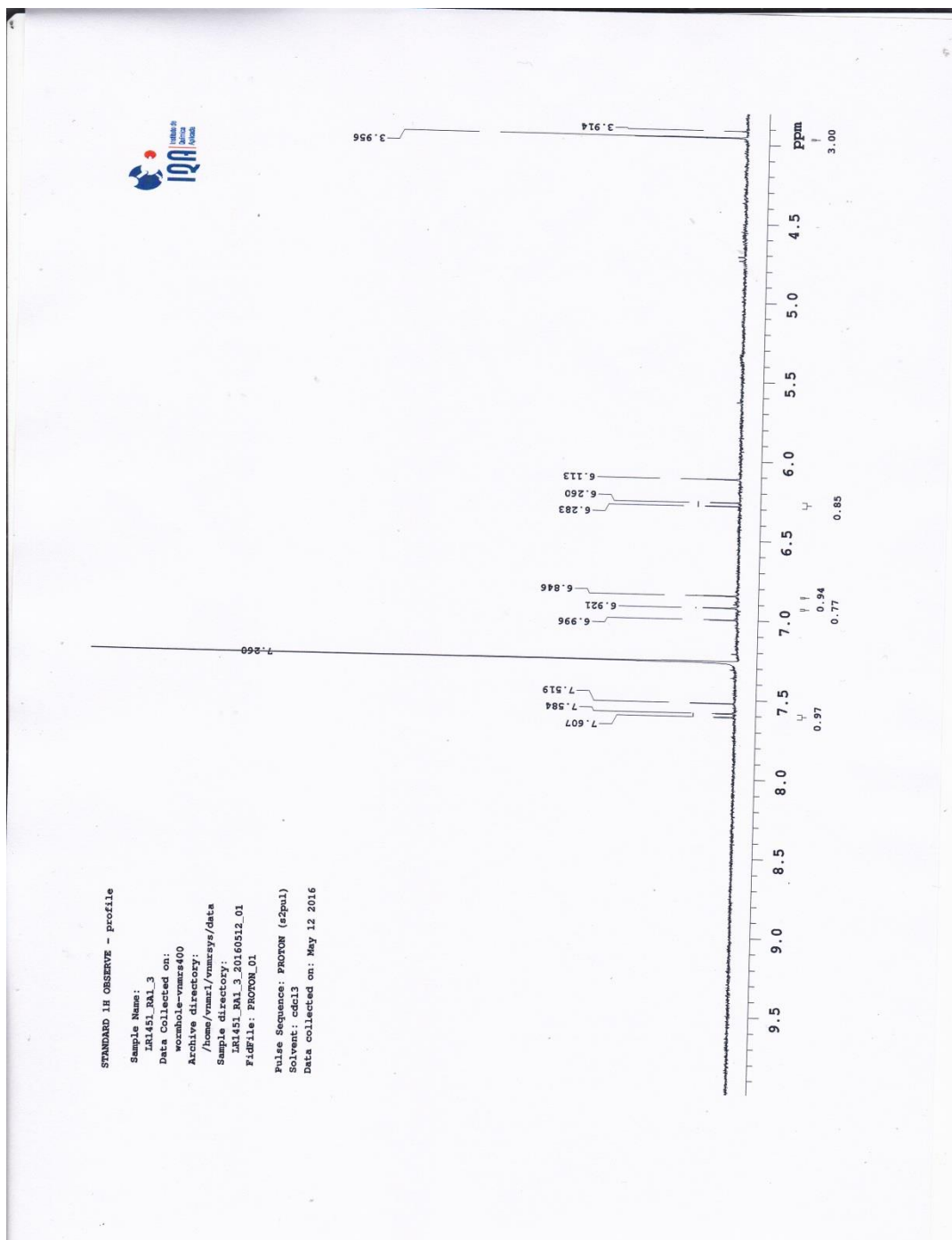
### Anexo 3. Espectro de CG-EM

File :D:\MSDCHEM\DATA\2015\Vladimir Morocho\RICHARD\SCUALENO.D  
Operator : JC  
Acquired : 24 Feb 2016 15:39 using AcqMethod METODO\_GENERAL  
Instrument : GCMSD CET  
Sample Name: SCUALENO  
Misc Info :  
Vial Number: 1



# Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Escopoletina

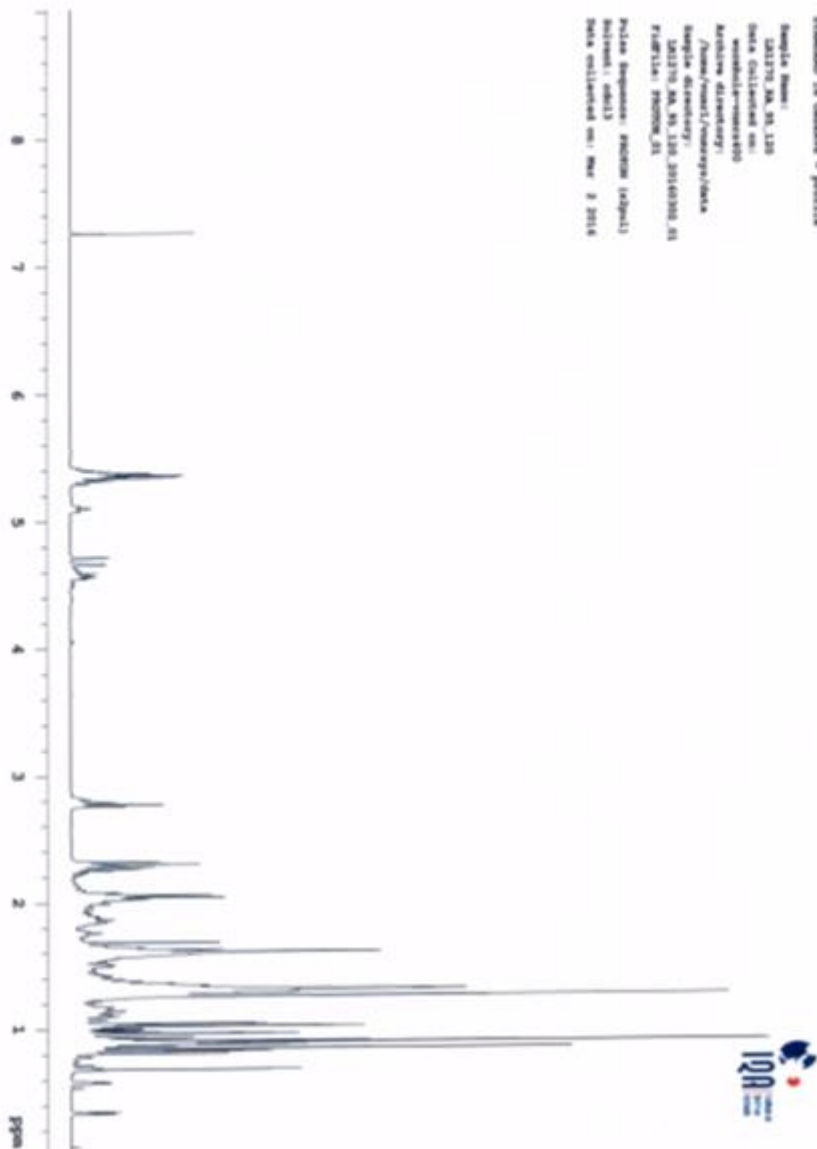
## Anexo 4. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ )



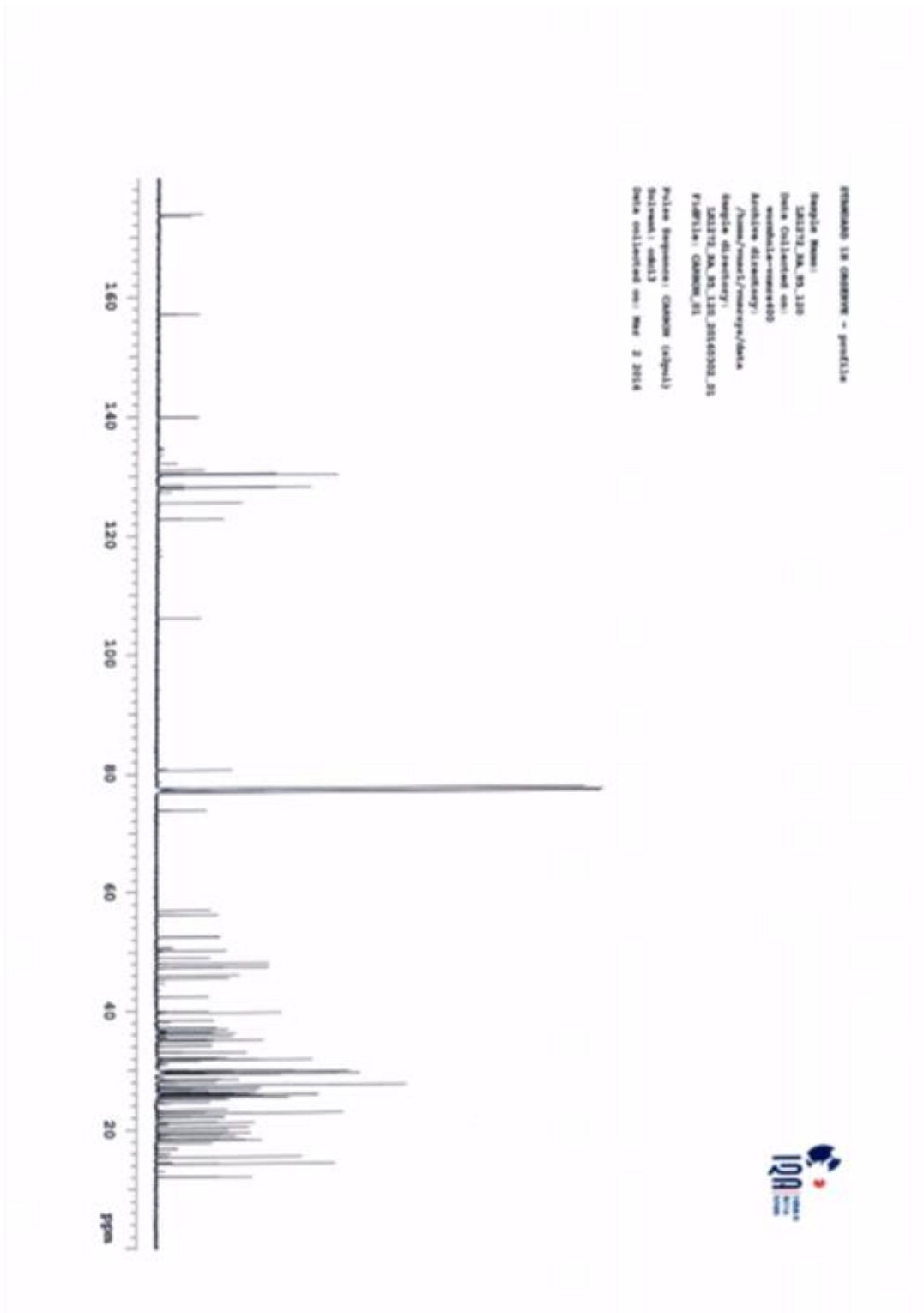


# Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la mezcla de Cicloartanol y Ácido Linolénico

## Anexo 5. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ )

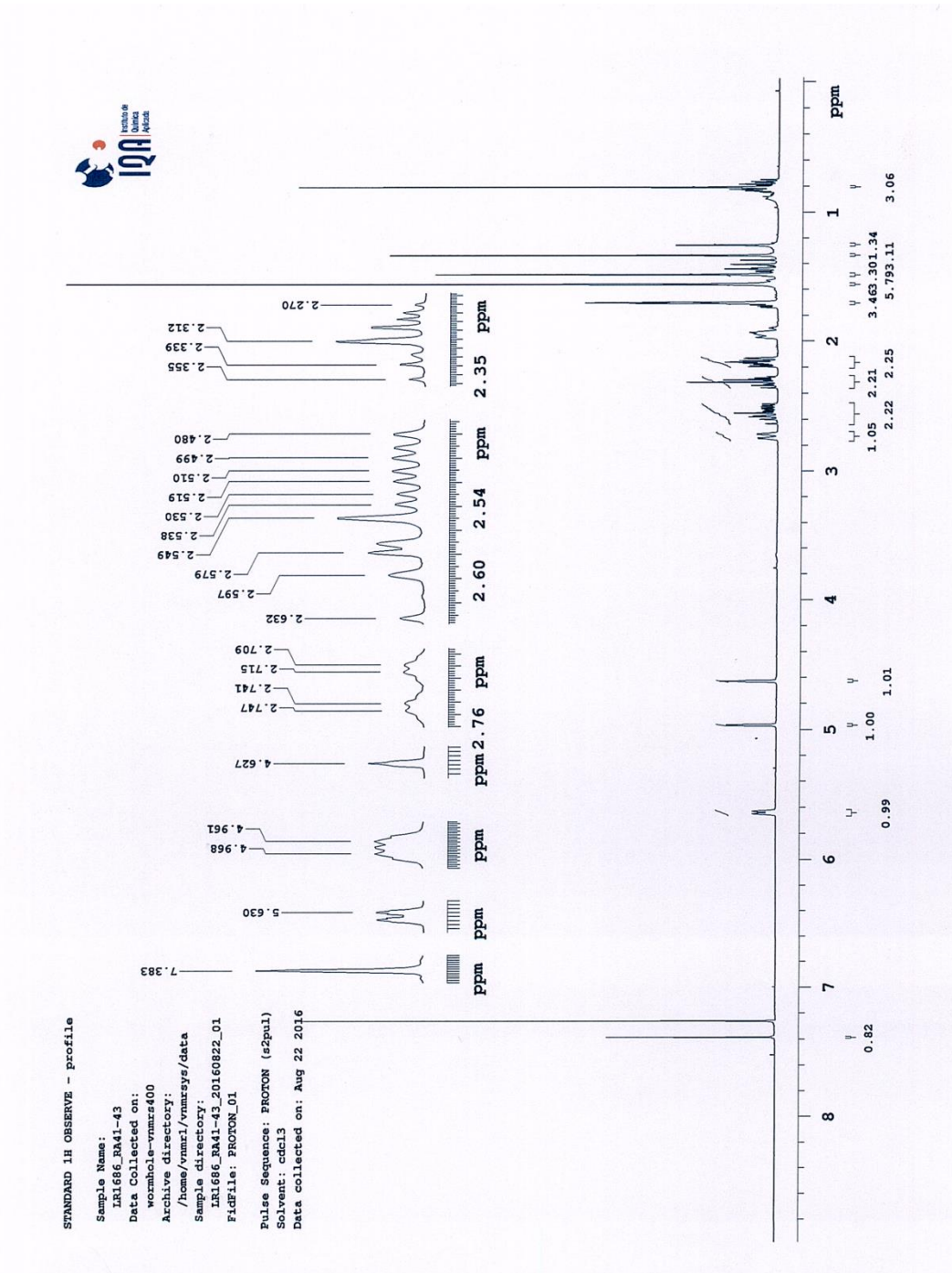


Anexo 6. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

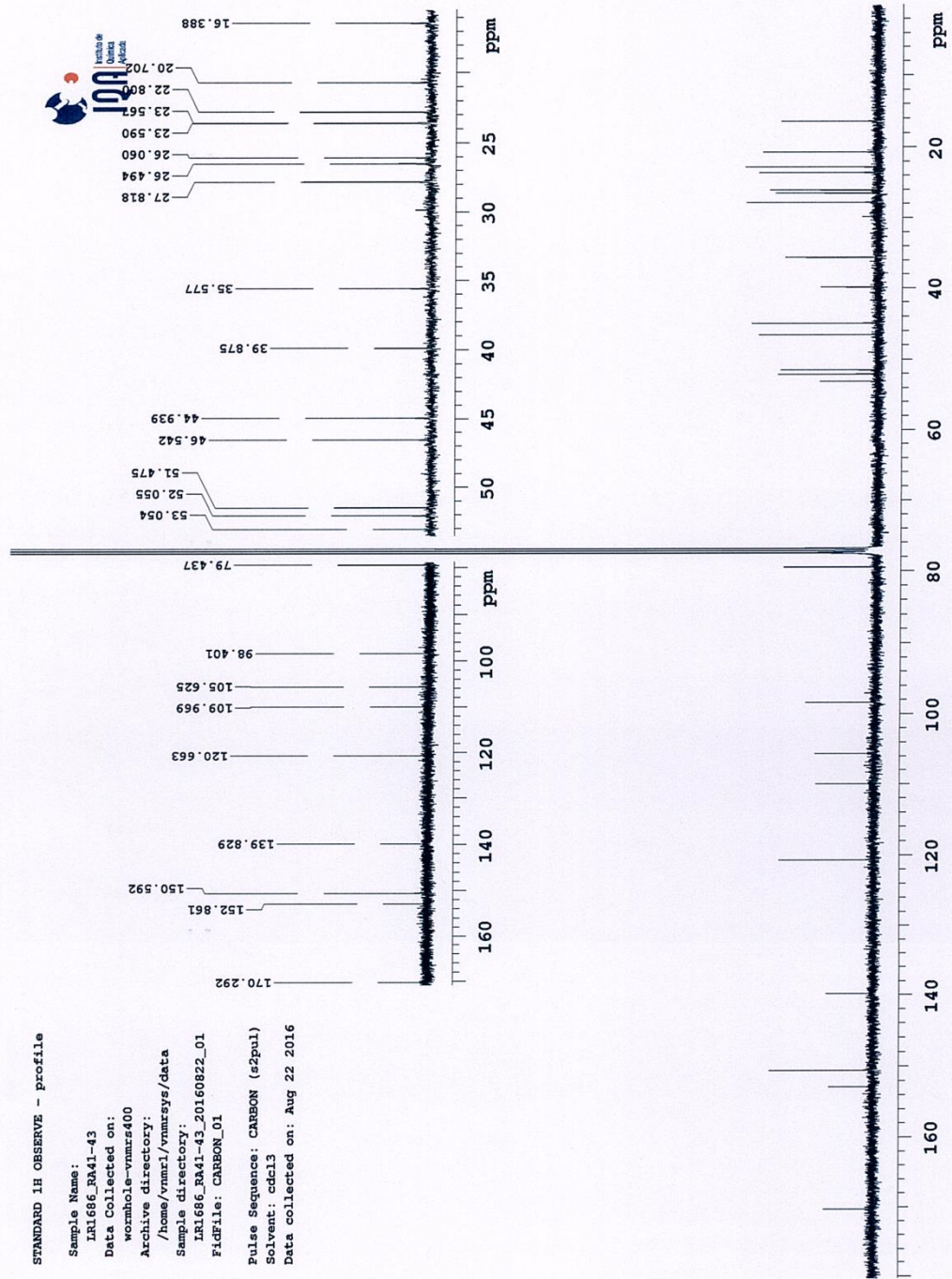


# Espectros de Resonancia Magnética Nuclear y CG-EM de Bolivianine

## Anexo 7. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ )



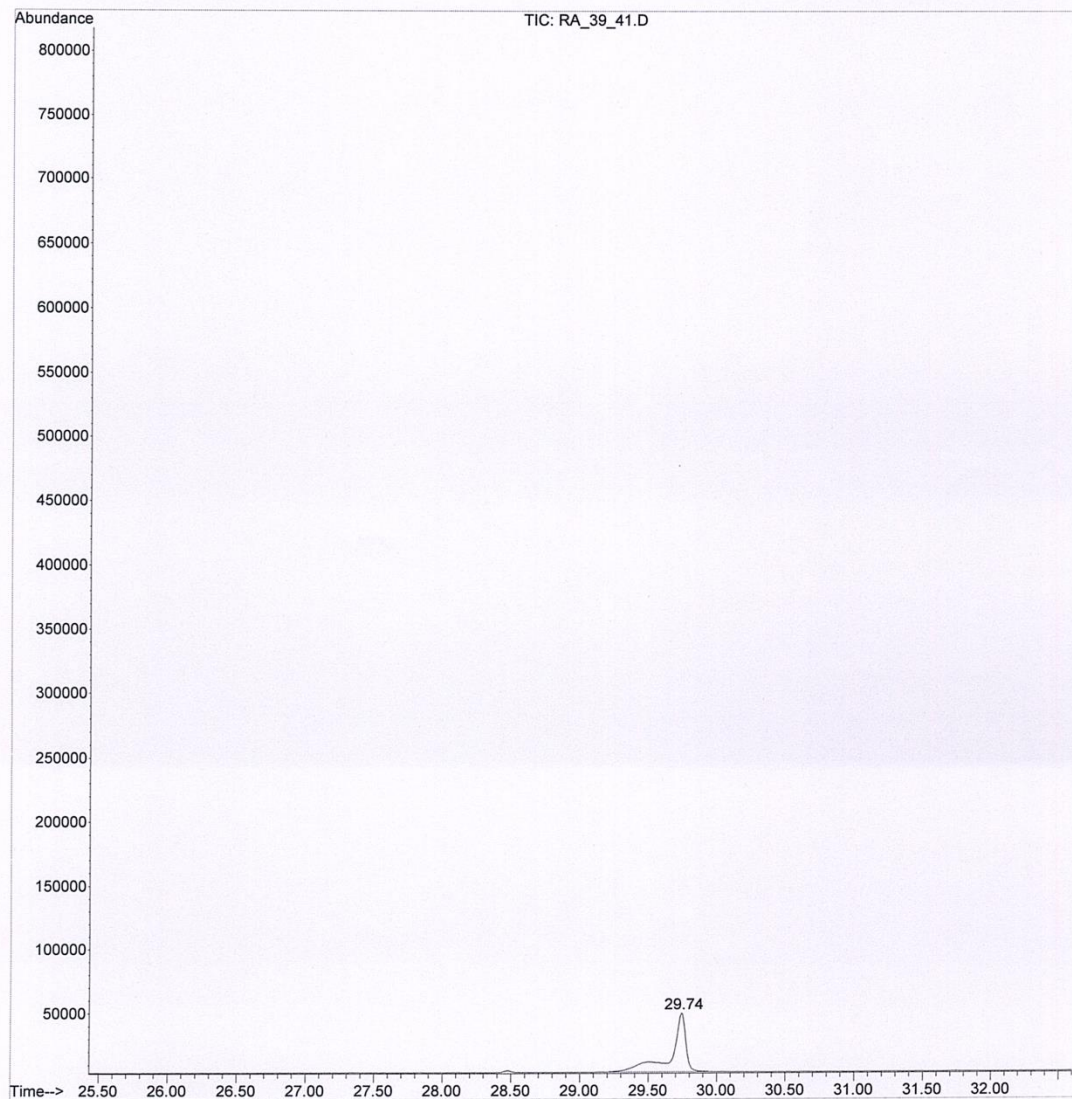
### Anexo 8. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )





### Anexo 9. Espectro de CG-EM

File :D:\MSDCHEM\DATA\2015\Vladimir Morocho\RICARD\RA\_39\_41.D  
Operator : JC  
Acquired : 2 Aug 2016 11:36 using AcqMethod METODO\_GENERAL  
Instrument : GCMSD CET  
Sample Name: RA\_39\_41  
Misc Info :  
Vial Number: 2



## Anexo 10. Espectro de CG-EM

File :D:\MSDCHEM\DATA\2015\Vladimir Morocho\RICARD\RA\_39\_41.D  
Operator : JC  
Acquired : 2 Aug 2016 11:36 using AcqMethod METODO\_GENERAL  
Instrument : GCMSD CET  
Sample Name: RA\_39\_41  
Misc Info :  
Vial Number: 2

