



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento, Identificación y Evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios aislados de la planta medicinal *Siparuna eggersii* y de sus extractos.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Vélez Ramírez, Vilma Elizabeth

DIRECTOR: Ramírez Robles, Jorge Yandry, PhD

LOJA-ECUADOR

2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D

Jorge Yandry Ramírez Robles

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación Aislamiento, Identificación y Evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios aislados de la planta medicinal *Siparuna eggersii* y de sus extractos realizado por Vélez Ramírez Vilma Elizabeth ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 22 de Septiembre del 2016

f) Jorge Yandry Ramírez Robles

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Vélez Ramírez Vilma Elizabeth declaro ser autora del presente trabajo de titulación Aislamiento, Identificación y Evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios aislados de la planta medicinal *Siparuna eggersii* y de sus extractos, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Jorge Yandry Ramírez Robles 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: Vélez Ramírez Vilma Elizabeth
Cédula: 1106039215

DEDICATORIA

A Dios porque he visto su infinito amor y gracia cada día de mi vida, por sus abundantes bendiciones y por darme un nuevo propósito para mi vida.

A mis padres Franklin y Esthela por su amor y apoyo incondicional, por guiarme con sabiduría y regalarme su confianza en cada etapa de mi vida.

A mis hermanos Diego y Jairo por compartir su vida y amistad conmigo y por su apoyo e interés durante mi carrera.

Vilma Elizabeth Vélez Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme vida y sabiduría para lograr con éxito mis metas, y por mover para mí cada obstáculo que se presentó durante mi carrera universitaria. A mis queridos padres por todo su amor, respeto, consejos y esfuerzo por darme siempre lo mejor y ser mi ejemplo a seguir. A mis amigas Maddie y Rachel así como a mi grupo alfa y omega por su interés y apoyo durante el desarrollo de este proyecto incluso más allá de las fronteras.

Al PhD Jorge Ramírez por compartir conmigo sus conocimientos, por su importante aporte, profesionalismo, y sabiduría al guiar este proyecto de investigación.

A mis amigos y compañeros que durante estos cinco años me han brindado su amistad y de una u otra forma han aportado en mi formación profesional y personal.

Vilma Elizabeth Vélez Ramírez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I	4
MARCO TEÓRICO	4
1.1 Antecedentes.....	5
1.2 Plantas Medicinales.....	5
1.3 Plantas Medicinales del Ecuador	5
1.3.1 Familia Siparunaceae.....	6
1.3.2 Genero <i>Siparuna</i>	6
1.3.3 <i>Siparuna eggertii</i>	7
1.3.4 Taxonomía de <i>Siparuna eggertii</i>	8
1.4 Metabolitos Secundarios	8
1.4.1 Terpenos.....	8
1.4.2 Flavonoides.....	9
1.5 Fitoquímica	10
1.6 Técnicas Cromatográficas	10
1.6.1 Cromatografía de Columna (CC).....	11
1.6.2 Cromatografía de capa fina (CCF).....	11
1.6.3 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	11
1.7 Resonancia magnética nuclear (RMN)	12
1.8 Actividad Antimicrobiana	12
1.8.1 Bacterias.....	12
CAPITULO II	14
MATERIALES Y METODOS	14
2.2 Recolección del Material Vegetal.....	16

2.3 Obtención de los Extractos	16
2.4 Análisis de los Extractos	16
2.5 Fraccionamiento en Cromatografía en Columna	16
2.6 Cromatografía de Capa Fina	16
2.7 Unión de Fracciones	17
2.8 Purificación de Compuestos	17
2.8.1 Fracción VV36/7	17
2.8.2 Fracción VV38/7	17
2.8.3 Fracción VV39/7	18
2.9 Factor de Retención (Rf)	18
2.10 Identificación de los Compuestos	18
2.10.1 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.....	18
2.10.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	19
2.11 Determinación de la Actividad Antimicrobiana.....	19
2.11.1 Microorganismos de Prueba	19
2.11.2 Preparación de la Muestra.....	19
2.11.3 Preparación del Cultivo Bacteriano.	19
2.11.4 Preparación de la suspensión de inóculos para bacterias.....	20
2.11.5 Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	20
CAPITULO III	21
RESULTADOS Y DISCUSION	21
3.1 Extractos de la especie vegetal <i>Siparuna eggersii</i>	22
3.2 Compuestos Aislados de la especie Vegetal <i>Siparuna Eggersii</i>	22
3.2.1 Análisis de la Fracción VV61/10	23
3.2.2 Aislamiento e identificación de la fracción VV83/15	27
3.3 Actividad Antimicrobiana	29
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXOS.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Siparuna eggerti</i>	7
Figura 2: Estructura química del Isopreno.....	9
Figura 3: Estructura química básica de diferentes clases de Flavonoides	10
Figura 4: Esquema de la Metodología Empleada	15
Figura 5: CCF de las Fracciones Iniciales.....	17
Figura 6: Cálculo del Factor de Retención.....	18
Figura 7: CCF de la fracción VV61/10	23
Figura 8: Estructura química de los componentes de la fracción VV61/10.....	24
Figura 9: Cromatograma de la fracción VV61/10.....	25
Figura 10: Estructura química de Phytol.....	26
Figura 11: Comparación entre los espectros de masas de Phytol.....	26
Figura 12: CCF de la fracción VV83/15.....	27
Figura 13: Estructura química de 5 hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy-flavone.....	28

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Descripción Taxonómica de <i>Siparuna eggersii</i>	8
Tabla 2: Características de la Columna Capilar	18
Tabla 3: Bacterias y Condiciones de Incubación.....	19
Tabla 4: Peso y rendimiento del extracto de AcOEt.....	22
Tabla 5: Peso y rendimiento del extracto de MeOH-H ₂ O y Hexano.....	22
Tabla 6: Fraccionamiento Cromatográfico del extracto de MeOH-H ₂ O	22
Tabla 7: Alcoholes Terpénicos identificados en la fracción VV61/10.....	24
Tabla 8: Comparación entre los datos espectrales de VV83/15	28

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
CC	Cromatografía de Columna
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
R _f	Factor de Retención
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
RI	Índice de Retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear Protón
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13

RESUMEN

En esta investigación se aisló e identificó metabolitos secundarios de las partes aéreas de la planta medicinal *Siparuna eggersii*, también se evaluó su actividad antimicrobiana.

El extracto total de Acetato de Etilo se obtuvo a partir de 500 g de muestra seca.

Mediante técnicas espectroscópicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se aisló y caracterizó los compuestos conocidos como Cubebol, Eudesmol β , Muurolene, Phytol y 5 hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy flavone.

El extracto total de Acetato de Etilo no resulto activo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

PALABRAS CLAVES: *Siparuna eggersii*, Cubebol, Eudesmol β , Muurolene, Phytol, 5 hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy flavone.

ABSTRACT

In this research was isolated and identified secondary metabolites of the aerial parts of the medicinal plant *Siparuna eggersii* also it was evaluated its antimicrobial activity. The total extract of Ethyl Acetate was obtained from 500 g dry sample.

Through spectroscopic techniques of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was isolated and characterized the compound known as Cubebol, Eudesmol β , Muurolene, Phytol; and 5 hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy flavone.

The total extract of Ethyl Acetate was not active against Gram positive and Gram negative bacteria.

KEYWORDS: *Siparuna eggersii*, Cubebol, Eudesmol β , Muurolene, Phytol, 5 hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy flavone.

INTRODUCCION

La interrelación del ser humano con la naturaleza en su deseo de conocer lo que lo rodea y conseguir los recursos necesarios para su supervivencia, se ve evidenciada a lo largo de la historia en varias actividades como la minería, la agricultura, la medicina tradicional, entre otras (Vargas, 2011). Las poblaciones de África, Asia y Latinoamérica emplean la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades sanitarias primarias (Organización Mundial de la Salud, 2002). La terapéutica tradicional se fundamenta en el empleo de extractos o principios activos de las plantas (WWF, OMS, & UICN, 1993). En el mundo se utilizan aproximadamente unas 10.000 especies de plantas medicinales, la gran mayoría integradas a sistemas de medicina tradicional (Cañigüeral, Dellacassa, & Bandoni, 2003). Las plantas medicinales tienen incontables utilidades sin embargo son usadas principalmente como droga o medicamentos para el alivio de las enfermedades o para restablecer la salud perdida (Muñoz, 2002). Las plantas a lo largo de su vida elaboran aproximadamente 100.000 metabolitos secundarios (Bhalla, Narasimhan, & Swarup, 2005). Estos tienen gran importancia comercial para las industrias farmacéutica, alimenticia, y de cosméticos (Karuppusamy, 2009). El Ecuador es un paraíso para los intereses de la industria farmacéutica debido a que posee gran biodiversidad y es un país multicultural (Ríos, de la Cruz, & Mora, 2008). Alrededor del 80% de la población ecuatoriana utiliza de la medicina tradicional y por ende las plantas o productos naturales, tanto para su bienestar como para el cuidado primario de la salud (Ansaloni et al., 2010). La familia Siparunaceae comprende 2 géneros entre los cuales el género *Siparuna* reúne un grupo de 235 especies vegetales ampliamente distribuidas en el hemisferio sur, principalmente en regiones tropicales de Centro y Suramérica. Este género se caracteriza por biosintetizar compuestos tales como sesquiterpenos, flavonoides y alcaloides isoquinolínicos, sobre todo del tipo aporfínicos (Tropicos, 2010). Estos compuestos se caracterizan por poseer importantes actividades biológicas tales como antitumorales, antimaláricas y antileishmaniasis, entre otras (Valadeau et al., 2009). *Siparuna eggersii*, es un arbusto grande o árbol pequeño con hojas grandes, brillantes y fruto rojizo. *Siparuna eggersii* es utilizada por los habitantes de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe en el sur de Ecuador como remedio natural para tratar accidentes cerebrovasculares, diabetes, huesos fracturados, reumatismo y problemas de riñón. La hoja es usada en infusión o triturada para su aplicación tópica (Tene et al., 2007). Por todo lo anterior con esta investigación se pretende aislar e identificar los metabolitos secundarios de la planta medicinal *Siparuna eggersii* así como evaluar la actividad antimicrobiana tanto de los metabolitos secundarios como de los extractos totales, para de esta forma contribuir con la prospección biológica e investigación fitoquímica de metabolitos secundarios, de forma puntual de la especie *Siparuna eggersii*.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

La medicina tradicional tiene una larga historia. Es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, utilizadas para conservar la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (OMS, 2013). Las poblaciones de África, Asia y Latinoamérica emplean la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades sanitarias primarias. Además de ser accesible y asequible económicamente, la medicina tradicional es también muy a menudo parte de un sistema más amplio de creencias y es considerada una parte integral de la vida diaria y del bienestar (OMS, 2002). En la actualidad el conocimiento tradicional de las plantas medicinales y la medicina tradicional ha recobrado un lugar importante en los países desarrollados y sobretodo en los países en vías de desarrollo, como una buena alternativa para la cura de enfermedades (Ponz, Carpio, & Meo, 2005). La terapéutica tradicional se fundamenta en el empleo de extractos o principios activos de las plantas (WWF et al., 1993).

1.2 Plantas Medicinales

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que fabrican unos productos llamados principios activos, que son sustancias que realizan una acción farmacológica, beneficiosa o dañina, sobre los organismos vivos. Tienen incontables utilidades sin embargo son usadas principalmente como droga o medicamentos para el alivio de las enfermedades o para restablecer la salud perdida. Se estima que las plantas medicinales constituyen la séptima parte de las especies vegetales existentes (Muñoz, 2002). En la actualidad el estudio de las plantas medicinales está adquiriendo una creciente importancia científica de forma que la etnobotánica, la fitoterapia y la fitoquímica están tomando un auge inigualable, tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico (Beyra et al., 2004). Pese a que el hombre a lo largo de la historia ha empleado las plantas como medicina, la presencia de los productos vegetales en la terapéutica ha variado con el paso de los años, conforme al progreso del conocimiento científico tanto sobre estos productos como sobre las demás herramientas terapéuticas. En el mundo se utilizan aproximadamente unas 10.000 especies de plantas como medicinales, la gran mayoría integradas a sistemas de medicina tradicional (Cañigüeral et al., 2003).

1.3 Plantas Medicinales del Ecuador

El Ecuador es un paraíso para los intereses de la industria farmacéutica debido a que posee

gran biodiversidad y es un país multicultural. Una de sus principales riquezas involucra el saber ancestral relacionado al mundo vegetal, aun cuando este es un patrimonio intangible (Ríos et al., 2008). Alrededor del 80% de la población ecuatoriana utiliza la medicina tradicional y por ende las plantas o productos naturales, tanto para su bienestar como para el cuidado primario de la salud (Ansaloni et al., 2010). En Ecuador se emplean aproximadamente 3000 especies de plantas medicinales, cuyas utilidades y acciones específicas son bien conocidas por la población, se usan para tratar cualquier tipo de enfermedades o síntomas que se puedan presentar, sin embargo aún se mantienen como parte de la medicina tradicional y rural (Balslev, Navarrete, Torres, & Macia, 2008).

1.3.1 Familia Siparunaceae.

La familia Monimiaceae que es una de las 19 familias que pertenecen al orden Magnoliales. Cubre unos 30 géneros y 400 especies. Las Monimiaceas incluyen dos subfamilias: Monimioideae y Atherospermoideae. En la actualidad la subfamilia Atherospermoideae es considerada como una familia aparte debido a los datos moleculares, esta nueva familia es denominada Siparunaceae. La familia Siparunaceae comprende dos géneros, el género de África Occidental monotípico *Glossocalyx* y el género tropical del Nuevo Mundo *Siparuna* (Renner & Hausner, 2005)

La presencia de grandes cantidades de un aceite volátil en la mayoría Monimiaceae y Siparunaceae, les da un olor agradable y valor medicinal. Tal olor, muy característico de estas especies, facilita su identificación en el campo (Simões & Soares Júnior, 2011) . Las comunidades populares utilizan las especies comprendidas en esta familia para tratar desórdenes gastrointestinales, enfermedades de la piel, en la terapia de resfriados, la fiebre, dolor de cabeza y reumatismo y en las mordeduras de serpientes. Estas plantas son consideradas como tónicos, estimulantes, digestivos y carminativos (Murillo & Lombo, 2011).

1.3.2 Genero *Siparuna*.

La familia Siparunaceae comprende 2 géneros, el género *Siparuna* reúne un diverso grupo de 235 especies vegetales ampliamente distribuidas en el hemisferio sur, principalmente en regiones tropicales de Centro y Suramérica. Este género se caracteriza por biosintetizar compuestos tales como sesquiterpenos, flavonoides y alcaloides isoquinolínicos, sobre todo del tipo aporfínicos (Tropicos, 2010). Estos compuestos se caracterizan por poseer importantes actividades biológicas tales como antitumorales, antimaláricas y antileishmaniasis, entre otras (Valadeau et al., 2009).

1.3.3 *Siparuna eggertii*.

Siparuna eggertii es endémica de Ecuador, se encuentra distribuida en las provincias de Azuay, Bolívar, Chimborazo, Guayas, Loja, Manabí, El Oro, Pichincha y la provincia de Zamora-Chinchipec. En las poblaciones de la costa se registraron en áreas secas cerca de la Cordillera de Chongón Colonche y en la vertiente occidental de los Andes. Aun cuando es ampliamente distribuida, la especie no ha sido registrada dentro de la red de áreas protegidas del Ecuador (Montúfar & Pitman, 2004).

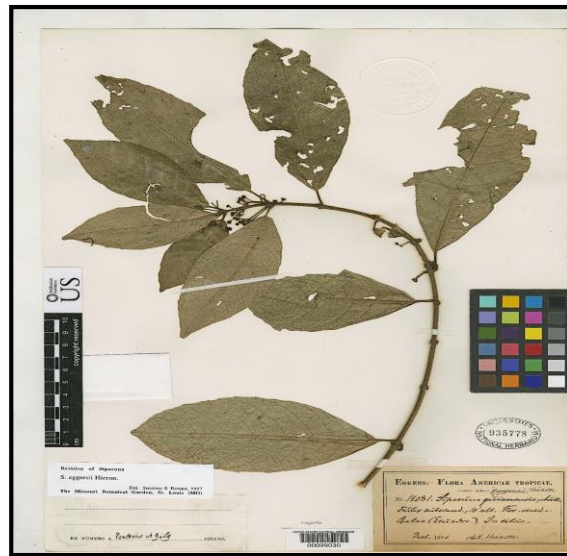


Figura 1: *Siparuna eggertii*
Fuente:(United States National Herbarium, 1891)

S. eggertii, es arbusto grande o árbol pequeño con hojas grandes, brillantes y fruto rojizo. Es utilizada por los habitantes de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe en el sur de Ecuador como remedio natural para tratar accidentes cerebrovasculares, diabetes, huesos fracturados, reumatismo y problemas de riñón. La hoja es usada en infusión o triturada para su aplicación tópica (Tene et al., 2007). Sus arbustos hojas y frutos son frecuentemente utilizadas por las comunidades Yuyu y Las Orquideas ubicadas en la zona alta del río Nangaritzza (Guerrero & Loja, 2004).

1.3.4 Taxonomía de *Siparuna eggersii*.

Tabla 1: Descripción Taxonómica de *Siparuna eggersii*

Clase:	Equisetopsida
Subclase:	Magnoliidae
Superorden:	Magnolianaes
Orden:	Laurales
Familia:	siparunaceae
Género:	Siparuna
Especie:	<i>Siparuna eggersii</i>

Fuente: (Hieronymus, Hans Georg Emmo, 2016)

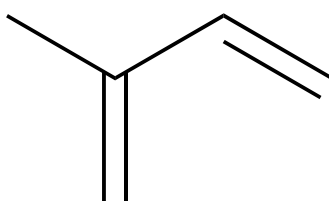
1.4 Metabolitos Secundarios

Las plantas reservan una cantidad considerable de carbono y de energía para la síntesis de una extensa variedad de moléculas orgánicas que se denominan metabolitos secundarios (Ávalos & Elena, 2009). Los metabolitos secundarios son compuestos que no tienen un papel fundamental en el mantenimiento de los procesos vitales de las plantas, pero son importantes en la interacción con su entorno, confiriéndoles protección y defensa contra el estrés ambiental, herbívoros y patógenos. También contribuyen en la elaboración de los olores, sabores y colores específicos de las plantas. (Ramakrishna, Akula & Gokare, 2011). Las plantas sintetizan una amplia variedad de metabolitos secundarios a partir de metabolitos primarios como hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos, a través de modificaciones, tales como metilación, hidroxilación y glicosilación. Se clasifican conforme a la estructura química, composición, solubilidad en disolventes o la vía sintética. Existen clases principales: Terpenos, Compuestos fenólicos, Glicósidos y Alcaloides (Shilpa, Varun, & Lakshmi, 2010). Las plantas a lo largo de su vida elaboran aproximadamente 100.000 metabolitos secundarios (Bhalla et al., 2005) Los metabolitos secundarios de las plantas tienen gran importancia comercial por lo tanto son empleados como materias primas en las industrias farmacéutica, alimenticia, y de cosméticos (Karuppusamy, 2009).

1.4.1 Terpenos.

Todos los compuestos naturales que se construyen a partir de subunidades de isopreno (Figura 2) y que en su mayor parte proceden de plantas se denominan terpenos. Estos compuestos se utilizan para crear perfumes finos, para refinar el sabor y el aroma de los alimentos y bebidas y también para producir medicamentos de origen vegetal. Las

funciones biológicas y químicas de los terpenos todavía no se han investigado a fondo. Muchas plantas producen terpenos volátiles con el fin de atraer insectos específicos para la polinización o para expulsar ciertos animales que utilizan estas plantas como alimento, también juegan un papel importante como reguladores del crecimiento (fitohormonas) de plantas. En la naturaleza, los terpenos se presentan predominantemente como hidrocarburos, alcoholes y sus glicósidos, éteres, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres. Dependiendo del número de unidades isopreno se diferencia entre hemí (C5), mono (C10), sesqui (C15), di (C20), sester (C25), tri (C30), tetraterpenos (C40) y politerpenos (C5)_n. La parte isopropílica del isopreno se define como la cabeza, y el residuo de etilo como la cola (Verlag & Weinheim, 2006).



Isopreno

Figura 2: Estructura química del Isopreno.
Fuente: La autora

1.4.2 Flavonoides.

Los flavonoides son una de las mayores clases de compuestos fenólicos en plantas. La estructura básica de los flavonoides contiene 15 átomos de carbono y está dotado con 2 anillos aromáticos unidos por un puente en el carbono 3. La formación de los flavonoides requiere la asistencia tanto de la vía del ácido malónico como del shikímato. Los flavonoides se subclasifican según en el grado de oxidación del puente del carbono 3 (Figura 3). Además, los grupos hidroxilo se encuentran normalmente en las posiciones de carbono 4, 5, y 7. La mayoría de los flavonoides de origen natural son en realidad glucósidos, lo que significa que está unido un resto de azúcar. La unión de grupos hidroxilo y azúcares aumentará las propiedades hidrófilas de la molécula de flavonoide, mientras que la unión de ésteres de metilo o unidades isopentilo modificados aumentará el carácter lipófilo (Wildman, 2007). Los flavonoides presentan extensos efectos farmacológicos y biológicos probados in vitro e in vivo que demuestran su actividad como antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos, antitumorales, antiasmáticos, y antidiarreicos (He et al., 2016).

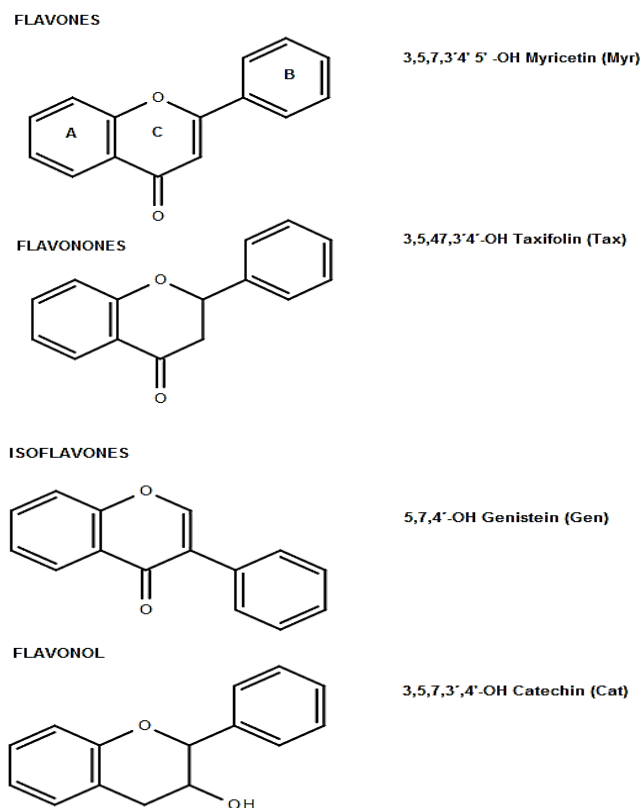


Figura 3 Estructura química básica de diferentes clases de Flavonoides
Fuente: La autora

1.5 Fitoquímica

La fitoquímica, o química de las plantas, se ha desarrollado en los últimos años como una disciplina entre la química orgánica y bioquímica de los productos naturales, y está estrechamente relacionada con ambas. Estudia la enorme variedad de sustancias orgánicas que elaboran y acumulan las plantas ocupándose de las estructuras químicas de estas sustancias, de su biosíntesis, renovación, metabolismo, distribución natural y su función biológica. Para lo cual utiliza métodos de separación, purificación e identificación de los diferentes componentes presentes en las plantas. El rápido progreso fitoquímico ha ayudado al desarrollo de métodos rápidos y precisos de la detección de los productos químicos particulares de las plantas (Harbone, 1998).

1.6 Técnicas Cromatográficas

La cromatografía es el término utilizado para describir todos los métodos de separación, basado en la distribución de los compuestos entre dos fases separadas, una móvil y otra estacionaria. La primera conocida como eluyente, encargado de arrastrar las sustancias a

través de la fase fija, en donde se verifica la separación de la mezcla. Son posibles diversos tipos de cromatografía, dependiendo de la naturaleza de las dos fases: líquido-sólido, líquido-líquido y líquido-gas. Todos los tipos de cromatografía funcionan con el mismo principio que es la extracción con disolventes. Básicamente, los métodos dependen de las solubilidades diferenciales de las sustancias a separar con respecto a las dos fases entre las que han de ser particionadas (Pavia, Lampman, & Kris, 2005).

1.6.1 Cromatografía de Columna (CC).

Es una técnica de separación en la que la fase estacionaria está encerrada dentro de un tubo de vidrio vertical. La muestra líquida o sólida se coloca en la fase estacionaria para su adsorción. Seguidamente se agrega la fase móvil o eluyente en la parte superior del tubo cromatográfico y se recogen volúmenes de eluato establecidos por el analista, donde la muestra está separada en sus componentes. (Martinez, Valencia, Mesa, Jimenez, & Galeando, 2008).

1.6.2 Cromatografía de capa fina (CCF).

Es una técnica de cuantificación ampliamente utilizada para fines educativos y análisis cualitativo. El estudio de plantas, en particular, se realiza a menudo por CCF debido a la separación simultánea de las diferentes muestras que facilitan su diferenciación a primera vista. En la CCF, una fase se fija sobre una placa (fase estacionaria) y la otra fase es móvil y migra a través de la fase estacionaria. Durante el proceso de desarrollo cromatográfico, la mezcla a separar se distribuye entre las fases estacionarias y móviles (Spangenberg, Poole, & Weins, 2011).

1.6.3 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

Es una poderosa herramienta para el análisis cuantitativo y cualitativo de una amplia variedad de compuestos relativamente volátiles. Muestra excelentes perspectivas en un variedad de áreas de aplicaciones. Es una combinación de cromatografía de gases, una potente técnica de análisis para la separación en fase gaseosa de los componentes de mezclas complejas altamente eficiente, y espectrometría de masas utilizada para la confirmación de la identidad de los componentes de una mezcla, para la identificación de compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, así como para determinar la estructura y propiedades químicas de las moléculas (Niessen, 2001).

1.7 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Es una técnica espectral fundamentada en las propiedades magnéticas de los núcleos, principalmente en las propiedades del núcleo de hidrógeno, donde los electrones producen pequeñas modificaciones, que dan lugar a desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento, lo que permite el estudio minucioso de la estructura electrónica de las moléculas (Elguero, Alkorta, Pardo, Claramunt, & Santa María, 2008). La RMN se ha establecido como una fuerte alternativa para estudios estructurales, determinación de identidad y cuantificación de principios farmacéuticos activos. En las últimas décadas la aplicación de RMN cuantitativa tuvo un progresivo impacto en la cuantificación de compuestos, principalmente orgánicos (Garrido, Vélez, & Vérez, 2013).

1.8 Actividad Antimicrobiana

El uso de extractos de plantas y preparaciones fitoquímicas, tiene gran importancia en los tratamientos terapéuticos. Los efectos de los extractos de plantas sobre las bacterias han sido investigados por un elevado número de científicos en todo el mundo, especialmente en América Latina. Muchas plantas son utilizadas debido a sus rasgos antimicrobianos, que se deben a compuestos sintetizados en el metabolismo secundario de la planta (Nascimento, Locatelli, Freitas, & Silva, 2000). La amplia variedad de metabolitos secundarios presentes en las plantas superiores, tales como taninos, terpenoides, alcaloides, flavonoides, glucósidos, etc., han demostrado in vitro que tienen importantes propiedades antimicrobianas con nuevos mecanismos de acción (Bhalodia & Shukla, 2011).

1.8.1 Bacterias.

Las bacterias son organismos unicelulares muy pequeños y relativamente sencillos cuyo material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial, por ello se denominan Procariotas, y se clasifican en bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas (Granados & Villaverde, 2003).

1.8.1.1 Bacterias Gram Positivas.

Staphylococcus aureus: Es conocida por ser responsable de un elevado porcentaje de infecciones en el ser humano tanto en la comunidad como en el hospital. Es considerada como la especie más virulenta, y aunque existen gran cantidad de antibióticos efectivos frente a este microorganismo, se le atribuye una considerable morbimortalidad (Pahissa, 2009).

1.8.1.2 Bacterias Gram Negativas.

Echerichia coli: Son bacterias anaerobias facultativas con un metabolismo tanto fermentativo como respiratorio. Se encuentran ampliamente distribuidos en el intestino grueso de humanos y animales de sangre caliente, es parte de la microbiota esencial que mantiene la fisiología del huésped sano. Sin embargo pueden ser patógenos oportunistas causando enfermedad en inmunocomprometidos (Torres, 2010).

Proteus vulgaris: Son enterobacterias que expresan largos flagelos. Causan infección del tracto urinario, de modo ocasional en huéspedes sanos y con mucha frecuencia en aquellos con catéteres, anomalías anatómicas o funcionales del tracto urinario. Representan la inmensa mayoría de los aislados clínicos (Puerta García & Mateos Rodríguez, 2010)

Salmonella enteritidis: Comúnmente conocida como *Salmonella enterica*, se caracteriza por ser anaerobia facultativa intracelular. Es un importante patógeno zoonótico, por lo que se ha convertido en una significativa fuente de intoxicación alimentaria en humanos denominada salmonelosis. Se transmiten tanto vertical como horizontalmente (Lamont, Kaiser, & Liu, 2002).

Pseudomonas aeruginosa: Es causa de enfermedades infecciosas en personas inmunocomprometidas, quemados, personas con fibrosis quística y pacientes de la unidad de cuidados intensivos (Ossa et al., 2014). Produce una mortalidad del 30% al 40%, principalmente en las primeras 24 a 48 horas relación con el foco pulmonar y el tratamiento antimicrobiano inadecuado (Gómez et al., 2002).

Klebsiella pneumoniae: Son enterobacterias asociadas a infecciones no específicas de sitios, órganos o tejidos. La mayoría de infecciones son infecciones sistémicas, que ocurren en pacientes con múltiples dispositivos invasivos o infecciones de las vías urinarias sin un catéter permanente, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Nordmann, Cuzon, & Naas, 2009).

Salmonella typhimurium: Es una de las principales causas de infecciones de origen alimentario en los países industrializados. Se han descrito brotes por en distintos países, transmitidos a través de alimentos procesados, como huevos y leche pasteurizada, alimentos crudos como leche, lechugas o se transmiten por medio de operadores de alimentos (Barroso, Lucerna, Parrón, & Gullón, 2008)

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

En la figura 4 se muestra el esquema de la metodología empleada

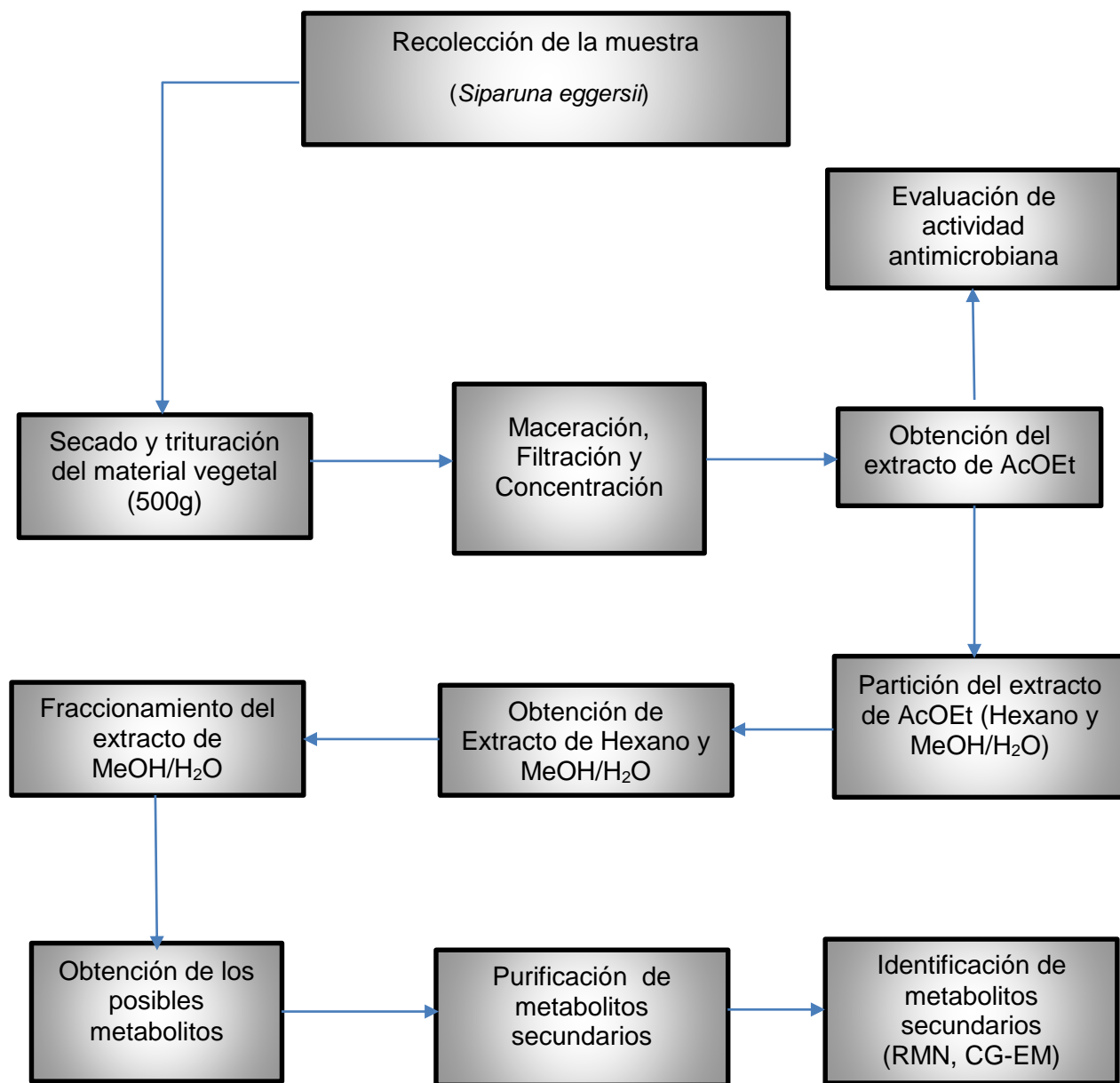


Figura 4: Esquema de la Metodología Empleada

Fuente: La autora

2.2 Recolección del Material Vegetal

Las partes aéreas de *Siparuna eggertii* en estado de foliación fueron recolectadas en el barrio Villanueva, del cantón Sozoranga, de la provincia de Loja, cuyas coordenadas geográficas son: 042125S y 794538.

La muestra fue caracterizada e identificada botánicamente por el PhD. Vladimir Morocho, en comparación con la muestra botánica depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja, con registro número: HUTPL 535.

2.3 Obtención de los Extractos

La muestra vegetal recolectada se secó durante tres días a una temperatura de 34 °C, se trituró y pesó 500g de muestra seca.

Para la obtención del extracto se realizó maceración dinámica durante 10 minutos y estática por 50 minutos utilizando como disolvente 4.5 L de AcOEt. El proceso de maceración se realizó por tres veces consecutivas. El macerado se filtró y luego se concentró mediante rota-evaporación a presión reducida a una temperatura de 35 °C hasta obtener el extracto seco que pesó 12.56 g.

Para el fraccionamiento por partición líquido-líquido se empleó un embudo de decantación en el que se colocó 5g del extracto de AcOEt y se repartió en Hexano y Me/H₂O (95:5) en proporción 1:1 (v/v), se dejó reposar durante 1 hora y se recogió las fases separadas, estas se concentraron mediante rota-evaporación a presión reducida hasta obtener los extractos secos de Hexano y MeOH/H₂O que tuvieron un peso 2.2 g y 2.7 g respectivamente.

2.4 Análisis de los Extractos

Los extractos de Hexano y MeOH/H₂O fueron analizados mediante Cromatografía de Capa Fina (CCF), se empleó placas de sílica gel 60 F254 (fase directa), utilizando como fase móvil Hex/AcOEt en proporción 8:2 (v/v) y visualizados con luz UV 254 y 365 nm. Luego de observar los resultados de la CCF se decidió trabajar con el extracto de MeOH/H₂O.

2.5 Fraccionamiento en Cromatografía en Columna

Para la Cromatografía en Columna (CC) se utilizó 2.8g de extracto en una relación 1:100 (muestra: sílica), se eluyó con solventes en polaridad creciente iniciando con Hexano 100%, y finalizando con AcOEt 100%.

2.6 Cromatografía de Capa Fina

Se realizó cromatografía de capa fina (CCF) a las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna (CC), utilizando placas de sílica gel 60 F254 (fase directa) y como fase móvil Hex/AcOEt en proporciones 8:2 y 7:3 (v/v). Para la visualización se utilizó luz UV a una

longitud de onda de 254 y 365nm. Las placas fueron reveladas con una solución de Ácido Sulfúrico al 5% y Vainillina.

2.7 Unión de Fracciones

Se obtuvieron 16 fracciones (Figura 5) las cuales se unieron al relacionar la altura de las manchas características de cada fracción y la similitud visual que reflejaron en la luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 y 365nm, además se corroboró con el agente revelador que se utilizó.

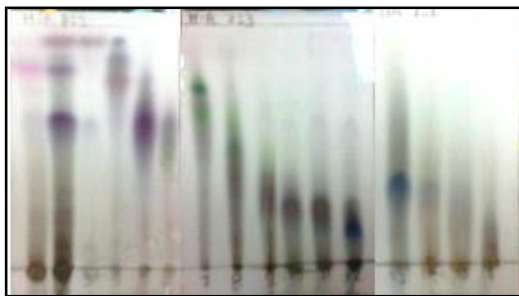


Figura 5 CCF de las Fracciones Iniciales
Fuente: La autora

2.8 Purificación de Compuestos

2.8.1 Fracción VV36/7.

Se realizó cromatografía en columna (CC) en una relación 1:100 (muestra: sílica), utilizando como eluyente Hex-AcOEt en proporción 92:8, la misma que fue eluída de manera isocrática. Se obtuvieron 12 fracciones que fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF), la fracción VV52/9 fue sometida a una sucesiva purificación a través de una microcolumna en las mismas condiciones de la cromatografía en columna (CC) anterior, de la cual se obtuvieron 4 fracciones diferentes, la fracción VV61/10 fue analizada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría masas.

2.8.2 Fracción VV38/7.

Se realizó cromatografía en columna (CC) en una relación 1:100 (muestra: sílica), utilizando como eluyente Hex-AcOEt en proporción 88:12, la misma que fue eluída de manera isocrática. Se obtuvieron 10 fracciones que fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF). La fracción VV129/26 fue purificada a través de una microcolumna fase inversa, utilizando como eluyente MeOH-H₂O en proporción 8:2. Las fracciones VV133/27 y VV134/27 fueron analizadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

2.8.3 Fracción VV39/7.

Se realizó cromatografía en columna (CC) en una relación 1:100 (muestra: sílica), utilizando como eluyente Hex-AcOEt en proporción 88:12, la misma que fue eluída de manera isocrática. Se obtuvieron 13 fracciones que fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF). Las fracciones VV82/15 y VV83/15 fueron analizadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

2.9 Factor de Retención (Rf)

El factor de retención de los compuestos se calculó entre la distancia recorrida por el compuesto desde el origen y la distancia recorrida por el eluyente desde el origen (Figura 6).

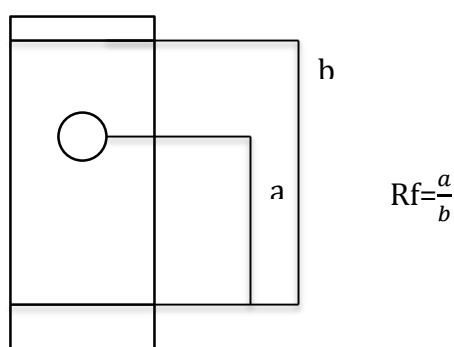


Figura 6: Cálculo del Factor de Retención
Fuente: La autora

2.10 Identificación de los Compuestos

2.10.1 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.

Los compuestos se identificaron mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), se empleó un cromatógrafo de gases serie 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973, que cuenta con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1. Se utilizó Helio como gas portador. Las características de la columna capilar se detallan en la tabla 2.

Tabla 2: Características de la Columna Capilar

Características de la Columna Capilar					
Columna	Modelo	Temperatura	Diámetro interno	Longitud	Película
DB.5MS	Agilent 122-5532	350 °C	0.25 mm	30 m	0.25 µm

Fuente: La Autora

2.10.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN se obtuvieron en un equipo Varian serie 21953, operando a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN usando como disolvente CDCl₃.

2.11 Determinación de la Actividad Antimicrobiana

2.11.1 Microorganismos de Prueba.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizaron *Staphylococcus aureus* (Sa) ATCC® 25923, *Proteus vulgaris* (Pv) ATCC® 8427, *Escherichia coli* (Ec) ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* (Wt) LT2, *Pseudomona aeruginosa* (Pa) ATCC® 27853 *Klebsiella pneumoniae* (Kp) ATCC® 9997.

2.11.2 Preparación de la Muestra.

Para la prueba de Microdilución en Caldo se utilizó 10 mg del extracto total de AcOEt diluido en 1000 ul de Dimetilsulfóxido (DMCO).

2.11.3 Preparación del Cultivo Bacteriano.

Se utilizó el cultivo overnight que fue preparado 24 horas antes de realizar el ensayo. Las cepas de las bacterias utilizadas para el cultivo overnight se encuentran en conservación criogénica a -80 °C. Las Bacterias utilizadas y las condiciones de incubación se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Bacterias y Condiciones de Incubación

Bacterias	Medio de Cultivo	Temperatura de Incubación	Tiempo de incubación
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C	14-16 horas
<i>Echerichia coli</i>	Caldo Tripticasa Soya		
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Muller Hinton		
<i>Salmonella enteritidis</i>	Caldo Nutritivo Oxoid		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Tripticasa Soya		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Tripticasa Soya		
<i>Salmonella typhimurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid		

Fuente: La autora

2.11.4 Preparación de la suspensión de inóculos para bacterias.

Se tomó 150-300 µl del cultivo overnight y se colocó en 7 ml de suero fisiológico estéril para ajustar el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland, de esta suspensión se tomó 140 µl y se colocó en 7mL de caldo Muller Hinton para ajustar la población bacteriana a 2×10^6 UFC/ ml. Luego se tomó 100 µl de y se colocó en la placa de cultivo para completar un volumen final de 200 µl, ajustando la población bacteriana a 5×10^5 UFC/ml.

2.11.5 Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se utilizó el procedimiento de dilución doble seriada para ello se empleó microplacas de 96 pocillos, en el primer pocillo se colocó 190µl de caldo Muller Hinton y 100 µl en los pocillos restantes, seguidamente se adicionó 10 µl del extracto diluido en los pocillos de la fila A, luego del primer pocillo de esta fila se tomó 100µl y se lo adicionó a los pocillos de la fila B y se repitió el proceso hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Para el control de esterilidad se utilizó 190µl de caldo y 10µl de extracto, para el control negativo 190µl de caldo más 10 µl de DMSO y para el control positivo 190µl de caldo y 10 µl de Gentamicina o Ampicilina a 1000 ppm. Para estos controles se utilizó el mismo procedimiento del ensayo. Una vez preparada la placa se colocó 100µl de la suspensión del inóculo en todas las columnas para completar un volumen final de 200µl ajustando la población bacteriana a 5×10^5 UFC/ml y la concentración del extracto a 8µg/ml. Finalmente se selló las placas y se incubó a 37°C durante 16 horas.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Extractos de la especie vegetal *Siparuna eggersii*

En la tabla 4 se muestra el rendimiento del extracto de AcOEt obtenido a partir de 500g de muestra seca.

Tabla 4: Peso y rendimiento del extracto de AcOEt.

Extracto de la especie vegetal <i>Siparuna eggersii</i>			
Extracto	Peso de Planta Seca(g)	Peso final del Extracto (g)	Rendimiento (%)
Extracto en AcOEt	500	12.5	2.5

Fuente: La autora

El rendimiento de los extractos obtenidos por fraccionamiento por partición líquido-líquido se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Peso y rendimiento del extracto de MeOH-H₂O y Hexano.

Extractos Obtenidos mediante Fraccionamiento por Partición líquido-líquido			
Extracto	Peso del Extracto de AcOEt(g)	Peso final del Extracto (g)	Rendimiento (%)
Extracto en MeOH-H ₂ O	5	2.7	54
Extracto en Hexano		2.2	44

Fuente: La autora

3.2 Compuestos Aislados de la especie Vegetal *Siparuna Eggersii*

De la cromatografía de columna (CC) del extracto de MeOH-H₂O se obtuvieron 16 fracciones cuyos pesos se detallan en la tabla 6, especificando las fracciones de donde se obtuvieron compuestos.

Tabla 6: Fraccionamiento Cromatográfico del extracto de MeOH-H₂O

Fracción	Denominación	Peso (mg)
1-7	VV32/7	11.8
8-27	VV33/7	102.3
28-47	VV34/7	9.1
48-67	VV35/7	245.1
68-96	VV36/7	262.7
97-103	VV37/7	109.2

104-126	VV38/7	237.3
127-158	VV39/7	288.7
159-172	VV40/7	95.1
173-217	VV41/7	90.3
218-257	VV42/7	53.2
258-340	VV43/7	123.5
341-376	VV44/7	37.1
377-395	VV45/7	28.7
396-446	VV46/7	118.3
447-485	VV47/7	125.1

Fuente: La autora

3.2.1 Análisis de la Fracción VV61/10.

La fracción VV 61/10 se obtuvo de la fracción inicial VV36/7, se purificó mediante cromatografía de columna (CC) usando como eluyente Hex-AcOEt en proporción 92:8, presentó un peso de 23.3 mg. En cromatografía de capa fina (CCF) se observó como una mancha color morado (Figura 7).



Figura 7: CCF de la fracción VV61/10

Fuente: La autora

La fracción VV61/10 fue volátil por lo que se analizó mediante CG-EM (Anexo1), se identificaron tres alcoholes sesquiterpénicos: Cubebol, Eudesmol β y Muurolene (Figura 8), además de un compuesto no determinado.

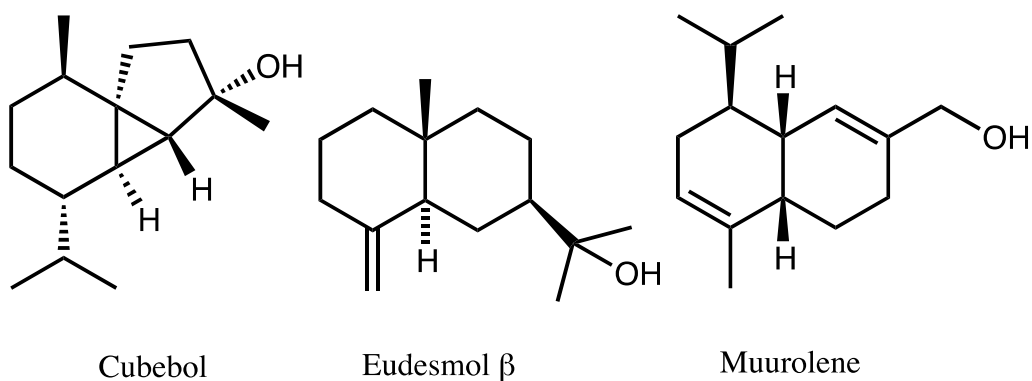


Figura 8: Estructura química de los componentes de la fracción VV61/10
Fuente: La autora.

El índice de retención de estos compuestos se determinó en base al tiempo de retención de una mezcla estándar de hidrocarburos de C10-C25, inyectada después de la fracción VV61/10 en las mismas condiciones. Para la confirmación de los compuestos se comparó el índice de retención de los alcoholes terpénicos de la fracción VV61/10 con los reportados en libro de Adams 2007.

En la tabla 7 se presenta el análisis cualitativo de la fracción VV61/10, los compuestos se muestran en orden de elución en la columna DB-5MS. El cromatograma de la fracción se presenta en la figura 9.

Tabla 7: Alcoholes Terpénicos identificados en la fracción VV61/10

Compuesto	TR	IR	^a IR	Diferencia
Cubebol	13,16	1517,89	1514	3,89
Eudesmol β	14,87	1663,25	1649	14,25
Nd.	15,49	1719,00	-	-
Muurolene	16,16	1781,04	1779	2,04

^a(Adams, 2007)

Fuente: La autora

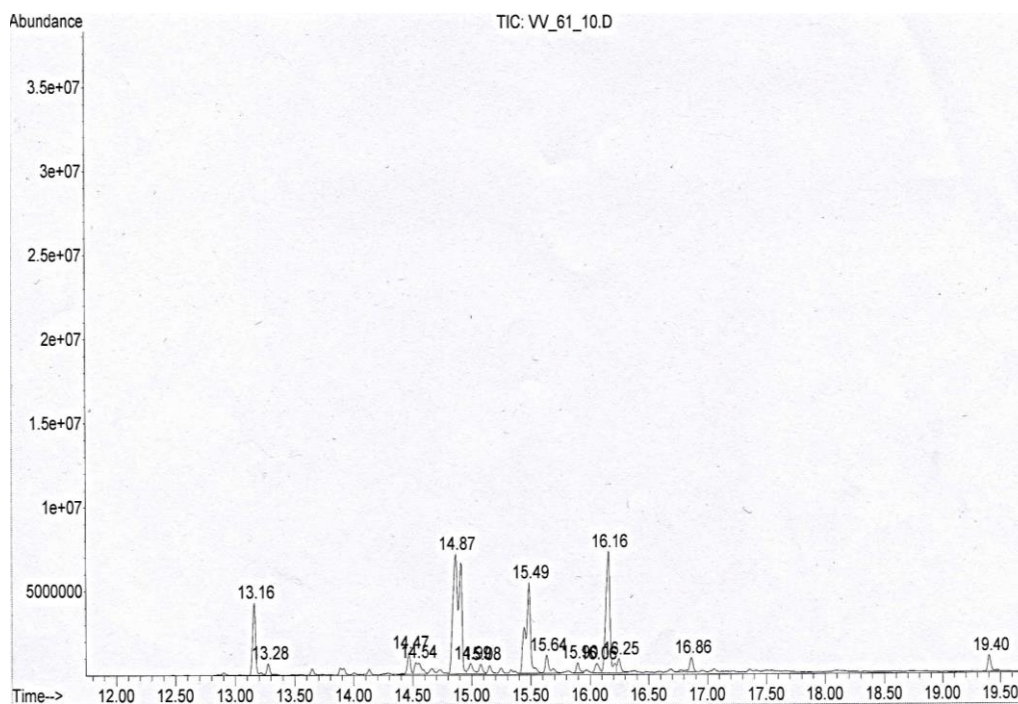


Figura 9: Cromatograma de la fracción VV61/10
Fuente: Equipo de CG-EM

El estudio del aceite esencial de *Siparuna eggersii*, presenta a Muurolene como uno de sus componentes (Ruiz, Malagón, Zaragoza, & Valarezo, 2013), sin embargo Cubebol y Eudesmol β no se reportan. Muurolene también se encuentra en el aceite esencial de *Siparuna guianensis* (Viana et al., 2002) y *Siparuna schimpffii* (Noriega, Guerrini, & Tsamaraint, 2014). Muurolene, Cubebol y Eudesmol β se reportan como constituyentes del aceite esencial de *Siparuna thecaphora* (Ciccio & Gómez, 2002).

Eudesmol β es un agente antiangiogénico potente y actúa inhibiendo la proliferación, migración y diferenciación de las endotelial células tanto in vitro como in vivo. Eudesmol β es más potente que la Talidomida, un compuesto antiangiogénico bien establecido, Por lo que Eudesmol puede ayudar al desarrollo de fármacos terapéuticos para enfermedades angiogénicas (Tsuneki, Ma, Kobayashi, Sekizaki, & Maekawa, 2005). En la actualidad no se han reportado estudios de la actividad biológica de Muurolene y Cubebol.

En la misma fracción VV61/10 también se identificó un diterpeno denominado Phytol (Figura10), con un tiempo de retención de 19,40 minutos. El espectro de masas correspondiente a Phytol fue comparado con el espectro de la base de datos MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.I (Figura 11).

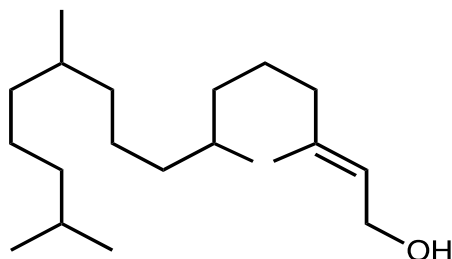


Figura 10: Estructura química de Phytol
Fuente: La Autora.

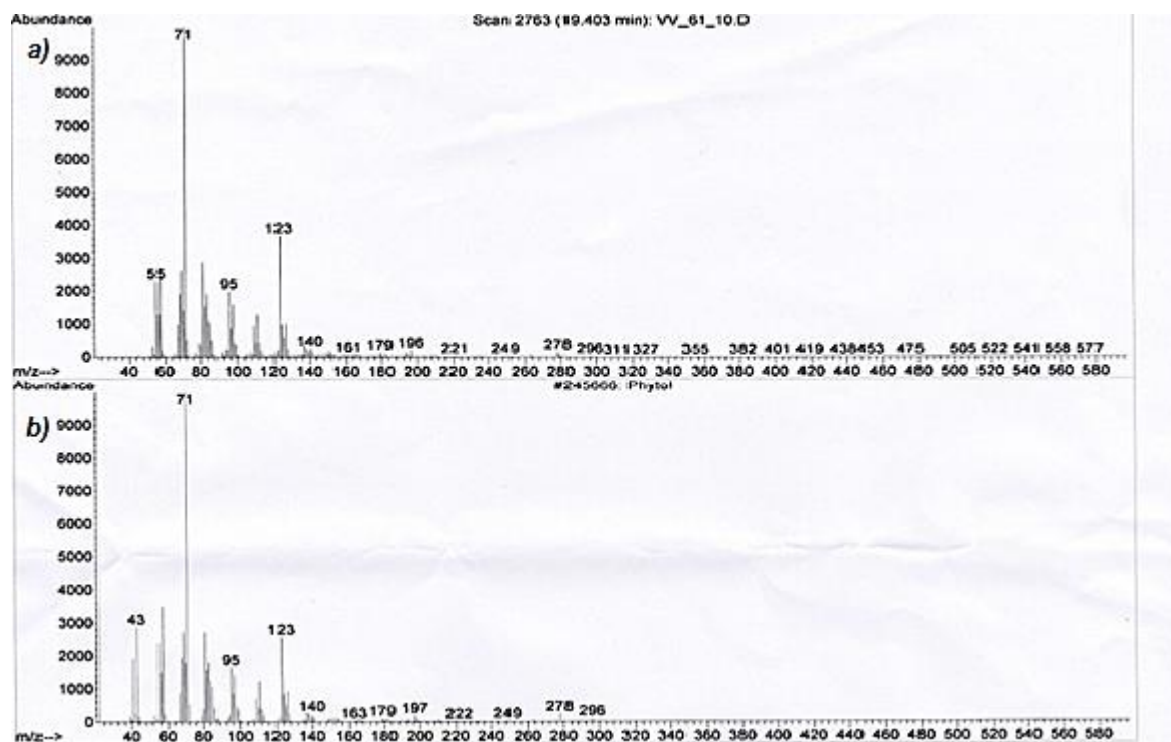


Figura 11: Comparación entre los espectros de masas de Phytol. a) Espectro de masas de VV61/10. b) Espectro de masas de base de datos MSD-Chemstation 0.01.00 SP1, Wiley 7n.I
Fuente: Equipo de CG-EM.

Phytol es un alcohol diterpénico caracterizado por ser es un agente antimicrobiano, antiinflamatorio, diurético y anticancerígeno (Sermakkani & Thangapandian, 2012). Es un potente inhibidor de la aromatasa en células de ovario humano, lo que garantiza una nueva herramienta farmacéutica para la prevención y tratamiento del cáncer dependiente de estrógenos (Guo et al., 2014). Phytol es un compuesto incoloro, de olor agradable

caracterizado por su baja toxicidad, por esta razón es utilizado como ingrediente de fragancia en cosméticos, champús, fragancias finas y jabones de tocador, así como en productos no cosméticos tales como productos de limpieza y detergentes (McGinty, Letizia, & Api, 2010). Algunos análogos semisintéticos del Phytol realizados para mejorar la lipofilia de la molécula, presentan potente actividad antituberculosa (Saikia et al., 2010). No se ha reportado la presencia de este compuesto en otras especies del género *Siparuna*.

3.2.2 Aislamiento e identificación de la fracción VV83/15.

La fracción VV83/15 fue aislada a partir de la fracción inicial VV39/7, se purificó mediante cromatografía de columna (CC) usando como eluyente Hex-AcOEt en proporción 88:12, este compuesto presentó un peso de 4.3 mg. En cromatografía de capa fina (CCF) se observó como una mancha amarilla (Figura 12). Su R_f es de 0.40 en Hex-AcOEt 88:12.



Figura 12: CCF de la fracción VV83/15
Fuente: La autora

Resonancia Magnética Nuclear: Se realizó RMN ^1H (Anexo 2) y se obtuvo los siguientes datos espectrales:

^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ ppm 3,859 (6H,s), 3,887(3H,s), 6,359(1H,d), 6,448(1H,d), 7,026(2H,d), 8,080(2H,d), 12,657(1H,s).

Al comparar los datos espectrales de la fracción VV83/15 con los datos espectrales publicados por Sutthanuta, Sripanidkulchaia, Yenjaic, & Jayd, en 2007 (tabla 8), se identificó la fracción VV83/15 como 5-hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy flavone (Figura 13).

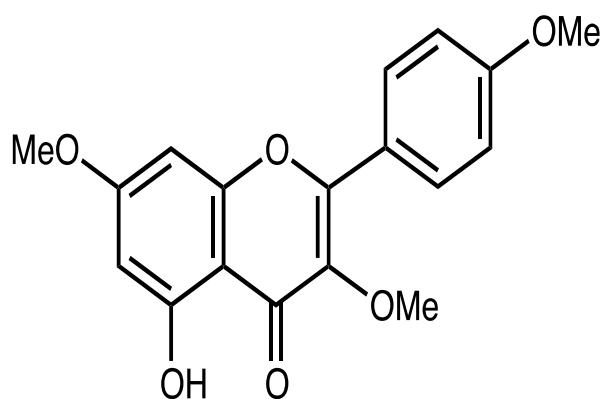


Figura 13: Estructura química de 5 hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy-flavone
Fuente: La Autora

Tabla 8: Comparación entre los datos espectrales de VV83/15 y (Sutthanuta et al., 2007)

VV83/15 400MHz	(Sutthanuta et al., 2007) 400MHz	1_
3,86	3,86	6H,s
3,89	3,89	3H,s
6,36	6,32	1H,d,J=2,4Hz
6,45	6,42	1H,d,J=2,4Hz
7,03	7,01	2H,d,J=9,2Hz
8,08	8,06	2H,d,J=9,2Hz
12,65	12,65	1H,s

Fuente: La autora

Este compuesto también fue aislado e identificado en la fracción VV133/27 y VV134/27 obtenidas a partir de la fracción inicial VV38/7.

Este compuesto también está presente de la especie *Siparuna apiosyce* perteneciente al mismo género (Leita, Soares, Barros, & Brito, 2000).

5 hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy-flavone ha demostrado ser un activo antioxidante (Abdoihossein et al., 2011). Sin embargo este compuesto carece de actividad antimicrobiana probada frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, aparentemente debido a la extensa metoxilación (Teffo, Aderogba, & Eloff, 2010). 5 hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy-flavone no presenta actividad antiplasmodial, antifúngica y antimycobacterial. Tampoco posee ninguna citotoxicidad contra líneas de células, esta información citotóxica sugiere que este flavonoide pueden ser seguro cuando se utiliza como ingrediente en la medicina tradicional (Yenjai, Prasanphen, & Daodee, 2004).

3.3 Actividad Antimicrobiana

El análisis antimicrobiano del extracto total de AcOEt fue negativo. En la actualidad no se ha reportado otros estudios sobre la actividad antimicrobiana de la especie *Siparuna eggersii*. Sin embargo en un estudio realizado por Andrade et al., 2015 del aceite esencial de la especie *Siparuna guianensis* perteneciente al mismo género mostró efecto inhibidor débil con altos valores de CMI para las bacterias gram-positivas *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, con ningún efecto inhibidor sobre las bacterias Gram-negativas. Del mismo modo Nelita et al., 2015 reportan que la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Siparuna guianensis* frente a *Staphylococcus aureus* mostró una pequeña inhibición de 12 mm, 11 mm y 10 mm, frente a 30 mm del control positivo, no se observó eficacia contra los otros microorganismos estudiados.

CONCLUSIONES

En la especie vegetal *Siparuna eggersii* se identificó, mediante técnicas espectrométricas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), a Cubebol, Eudesmol β , Muurolene, Phytol y 5 hydroxy-3, 7,4'-trimethoxy flavone.

La actividad antimicrobiana evaluada mediante el método de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue negativa.

RECOMENDACIONES

Continuar con el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Siparuna eggersii* en particular de los extractos de Hexano y Metanol ya que no existen otros estudios fitoquímicos de ésta especie.

Realizar pruebas de actividad biológica y antioxidante de los extractos totales y metabolitos secundarios aislados de *Siparuna eggersii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdoihosseini, M., Hamid, M., Mohsen, A., Yaghoub, A., Abbas, H., & Reza, H. (2011). Determination of Phenolics and Flavonoid Contents, Antioxidant Capacity and Major Flavonoids Structure in *Teucrium persicum* Boiss. Iran.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition*. (A. C. Kozlowski, Ed.). USA.
- Andrade, M. A., Cardoso, M. D. G., Gomes, M. de S., de Azeredo, C. M. O., Batista, L. R., Soares, M. J., Figueiredo, A. C. S. (2015). Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 189–194.
- 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.
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Balslev, H., Navarrete, H., Torres, L., & Macia, M. J. (2008). Enciclopedia De Plantas Útiles Del Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU*, 1, 1–3.
- Barroso, P., Lucerna, M., Parrón, T., & Gullón, A. (2008). Toxiinfección alimentaria por *Salmonella typhimurium* serotipo 4, 5, 12: 1: 1, 2 en un establecimiento público, 9, 18–25.
- Beyra, A., León, M. C., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G., Álvarez, R. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 61(2), 185–204.
- Bhalla, R., Narasimhan, K., & Swarup, S. (2005). Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Reports*, 24(10), 562–571.
- Cañigueral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. L. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22(3), 265–277.
- Ciccio, J. F., & Gómez, J. (2002). Volatile constituents of the leaves of *Siparuna thecaphora* (*Siparunaceae*) from Turrialba, Costa Rica, 50, 963–967.
- Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R. M., & Santa María, M. D. (2008). Resonancia Magnética Nuclear De Protón: *Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense*, (Madrid, España), 1–47.
- Garrido, R., Vélez, H., & Vélez, V. (2013). Resonancia magnética nuclear: Nuevas aplicaciones en la cuantificación y la evaluación de intermediarios de vacunas basadas en polisacáridos. *VacciMonitor*, 22(1), 35–42.
- Gómez, J., Alcántara, M., Simarro, E., Martínez, B., Ruiz, J., Guerra, B., Valdés, M. (2002). Original Bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa*: 15(Nº 4), 360.
- Guerrero, L., & Loja, R. (2004). Ethnobotany of the Communities of the upper Rio Nangaritza. *Lyonia*, 7(December), 1–19.
- Guo, J., Yuan, Y., Lu, D., Du, B., Xiong, L., Shi, J., Wang, F. (2014). Two natural products, trans-phytol and (22E)-ergosta-6,9,22-triene-3 β ,5 α ,8 α -triol, inhibit the biosynthesis of estrogen in human ovarian granulosa cells by aromatase (CYP19). *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- Harbone, J. (1998). *Phytochemical Methods A guide to modern techniques of plant analysis*

(Third edit). London.

- He, L., Wang, Z., Wang, Y., Liu, X., Yang, Y., Gao, Y., Wang, X. (2016). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Studies on the interaction between promethazine and human serum albumin in the presence of flavonoids by spectroscopic and molecular modeling techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 820–829.
- Hieronymus, Hans Georg Emmo, W. (2016). Tropicos.org. Retrieved June 30, 2016.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue , organ and cell cultures, 3(13), 1222–1239.
- Lamont, S. J., Kaiser, M. G., & Liu, W. (2002). Candidate genes for resistance to *Salmonella enteritidis* colonization in chickens as detected in a novel genetic cross. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 87(3-4), 423–428.
- Leita, G. G., Soares, S. S. V, Barros, T. De, & Brito, M. (2000). Kaempferol glycosides from *Siparuna apiosyce*, 55, 679–682.
- Martinez, A., Valencia, G. A., Mesa, M., Jimenez, N., & Galeando, E. (2008). Universidad de antioquia facultad de química farmacéutica departamento de farmacia, 1–96.
- Mcginty, D., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2010). Fragrance material review on phytol. *Food and Chemical Toxicology*, 48, S59–S63.
- Montúfar, R., & Pitman, N. (2004). *Siparuna eggertii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004., 8235.
- Muñoz, F. (2002). *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado*. Madrid.
- Murillo, E., & Lombo, O. (2011). Química y Funcionalidad Biológica de *Mollinedia racemosa* (Monimiaceae) Chemical and Biological Functionality of *Mollinedia racemosa* (Monimiaceae), 22(2), 3–14.
- Nelita, G. ccedil alves F. de B., Mir eacute ia, A. B. P., Vany, F., Karine, Q. P., Alo iacute sio, F. C. J. uacute nior, & Artur, A. (2015). Antimicrobial activity and medicinal biomass of *Siparuna guianensis* in Brazilian Cerrado forest, a global hotspot. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(37), 968–980.
- Niessen, W. M. (2001). *Current practice of gas chromatography-mass spectrometry*. CRC Press. New York.
- Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(4), 228–236.
- Noriega, F., Guerrini, A., & Tsamaraint, A. (2014). Chemical composition of leaf essential oil of *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo), 19(2), 128–137.
- Oms. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023, 72.
- Organización Mundial de la Salud. (2002). Perspectivas Políticas sobre medicamentos de la OMS - Medicina Tradicional – Necesidades Crecientes y Potencial, (2), 1–6.
- Ossa, A. C., Echeverri, L. M., Santos, Z. M., García, M. G., Agudelo, Y., Ramírez, F., & Ospina, S. (2014). [Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection, in a tertiary hospital in Colombia]. *Revista Chilena de Infectología : Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 31(4), 393–9.
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones Producidas por Staphylococcus aureus* (1.a ed.). España.
- Pavia, D., Lampman, G., & Kris, G. (2005). *Introduction To Organic Laboratory Techniques*. USA.
- Ponz, E., Carpio, C., & Meo, S. (2005). *La medicina tradicional de los Tacana y Machineri*. La Paz, Bolivia.
- Puerta García, A., & Mateos Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3326–

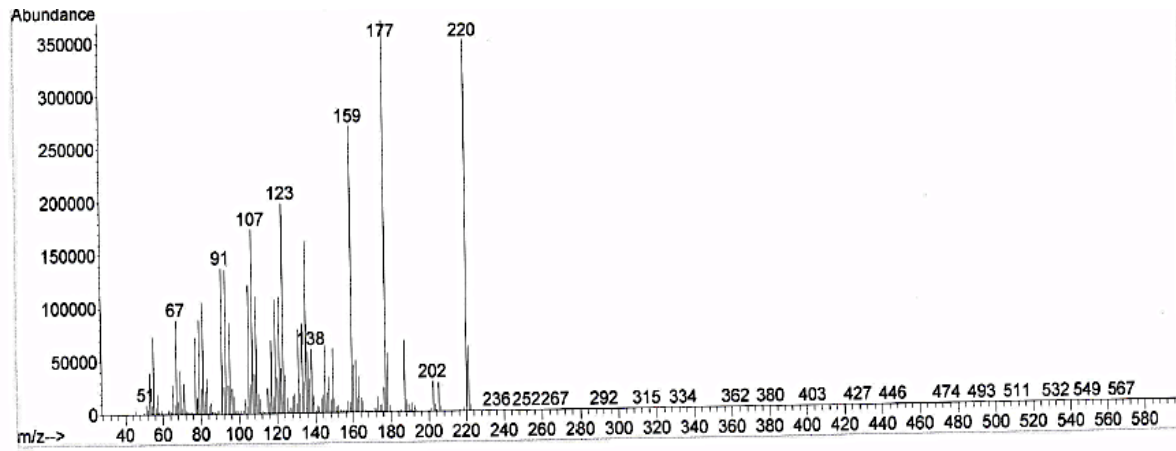
- Ramakrishna, Akula & Gokare, A. R. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, 2324.
- Renner, S. S., & Hausner, G. (2005). Monograph of Siparunaceae: flora neotropica 95. New York Botanical Garden, 256.
- Ríos, M., de la Cruz, R., & Mora, A. (2008). *Conocimiento tradicional y plantas útiles del Ecuador: saberes y prácticas*. Quito.
- Ruiz, S., Malagón, O., Zaragoza, T., & Valarezo, E. (2013). Journal of Essential Oil Bearing Plants Composition of the Essential Oils of *Artemisia sodiroi* Hieron ., *Siparuna eggersii* Hieron ., *Tagetes filifolia* Lag . and *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze from Loja Ecuador, (December 2014), 37–41.
- Saikia, D., Parihar, S., Chanda, D., Ojha, S., Kumar, J. K., Chanotiya, C. S., Negi, A. S. (2010). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(2), 508–512.
- Sermakkani, M., & Thangapandian, V. (2012). GC-MS Analysis of *Cassia italica* Leaf Methanol Extract Sermakkani, 5(2).
- Shilpa, K., Varun, K., & Lakshmi, B. S. (2010). An alternate method of natural drug production: Elciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, , 5(3), 222–247.
- Simões, M., & Soares Júnior, F. (2011). Anatomia foliar de *Siparuna apiosyce*, (2008), 371–380.
- Spangenberg, B., Poole, C. F., & Weins, C. (2011). Quantitative Thin-Layer Chromatography A Practical Survey.
- Sutthanuta, K., Sripanidkulchaia, B., Yenjaic, C., & Jayd, M. (2007). Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1143,(1–2), 227–233.
- Teffo, L. S., Aderogba, M. A., & Eloff, J. N. (2010). Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq . var . *angustifolia* leaf extracts. *South African Journal of Botany*, 76(1), 25–29.
- Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81.
- Torres, A. (Ed.). (2010). *Pathgenic Escherichia coli in Latin America*. USA.
- Tropicos.org. (2010). Missouri Botanical Garden. *Siparuna eggersii* Hieron.
- Tsuneki, H., Ma, E., Kobayashi, S., Sekizaki, N., & Maekawa, K. (2005). Antiangiogenic activity of Eudesmol β in in vitro and in vivo, 512, 105–115.
- United States National Herbarium. (1891). United States National Herbarium. Retrieved June 20, 2006.
- Valadeau, C., Pabon, A., Deharo, E., Joaquina, A., Yannik, E., Lores, A., Geneviève, B. (2009). Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 413–422.
- Vargas, J. (2011). Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en hojas de *Wigandia urens*.
- Verlag, G., & Weinheim, C. Kg. (2006). 1 Terpenes : Importance , General Structure , and Biosynthesis 1 . 2 General Structure : The Isoprene Rule, 1–9.

- Viana, F. A., Andrade-neto, M., Pouliquen, Y. B. M., Daniel, E. A., Sobral, M. M. S. Z., Morais, S. M. De, Uchoa, D. E. A. (2002). Essential Oil of *Siparuna guianensis* Aublet from the Amazon Region of Brazil, (August 2014).
- Wildman, R. (ED). (2007). *Nutraceuticals and Functional Foods* (Second). USA.
- WWF, OMS, & UICN. (1993). *Directrices sobre conservación de plantas medicinales*.
- Yenjai, C., Prasanphen, K., & Daodee, S. (2004). Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*, 75, 89–92.

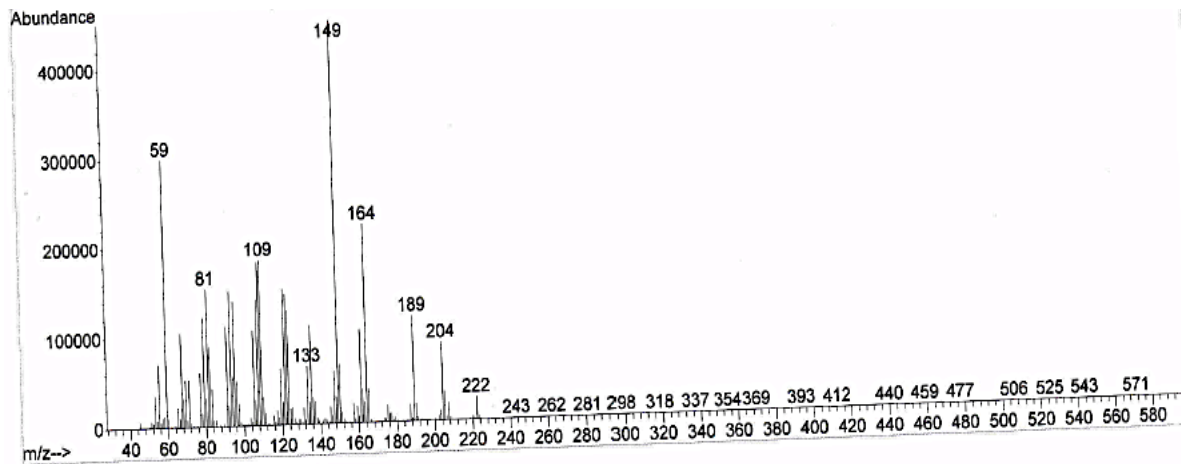
ANEXOS

Anexo 1

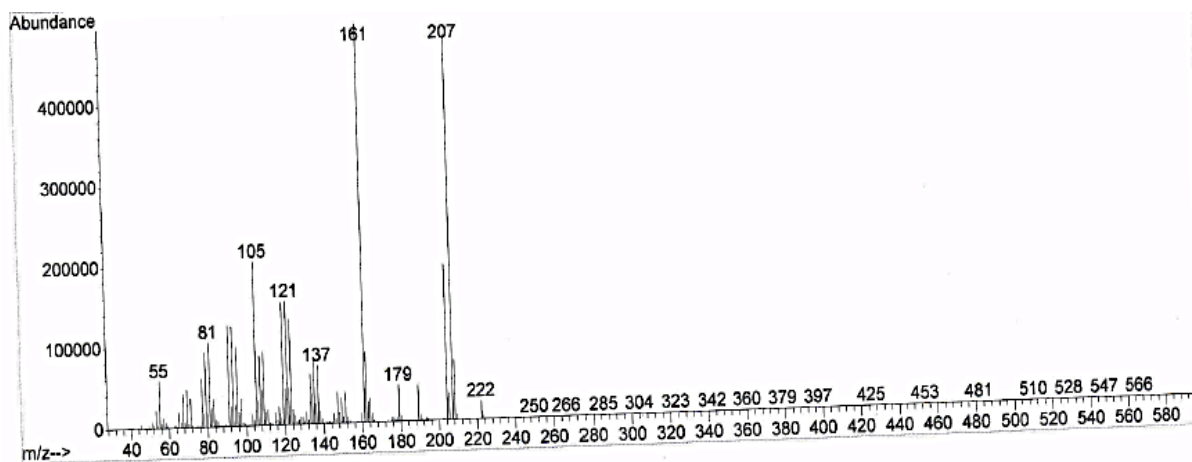
Espectro de Masas de Cubebol



Espectro de Masas de Eudesmol β



Espectro de Masas de Muurolene



Anexo2

Espectro ^1H de 5 hydroxy-3, 7, 4'-trimethoxy-flavone

