UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Extracción, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios del extracto en diclorometano de la especie *Loricaria thuyoides* (Lam.) Sch. Bip.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Encalada Collahuazo, Karem Lizbeth

DIRECTOR: Gilardoni, Gianluca Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2016

Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Gianluca Gilardoni

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **"Extracción, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios del extracto en diclorometano de la especie *Loricaria thuyoides* (Lam.) Sch. Bip.*"*** realizado por **Encalada Collahuazo Karem Lizbeth**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, ……

f) ……..

Ph.D. Gianluca Gilardoni

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

"Yo **Encalada Collahuazo Karem Lizbeth,** declaro ser autora del presente trabajo de titulación: "Extracción, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios del extracto en diclorometano de la especie *Loricaria thuyoides* (Lam.) Sch. Bip.*",* de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo el Ph.D. Gianluca Gilardoni 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 de 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".

……

Encalada Collahuazo Karem Lizbeth

CI: 1104113467

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por darme la vida y haberme permitido llegar hasta éste momento tan importante en mi carrera profesional. A mi madre, por ser el pilar más importante, por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. A mi padre, por sus sabias enseñanzas y ejemplo a seguir, Tú me has demostrado que solo con el esfuerzo y sacrificio me conduciría al éxito. A mi hermano, por ser un ser sin igual, ya que a pesar de nuestras diferencias de ideas, siempre hemos estados unidos por el amor fraterno; estoy segura, que los tres sienten lo mismo que Yo, este júbilo de culminar mi carrera.

AGRADECIMIENTO

Al personal docente, que con sus místicas enseñanzas y sabiduría, me han ayudado a descubrir el camino hacia el conocimiento, hasta poseer ese haz del saber dentro de mí. Especialmente al Ph.D. Gianluca Gilardoni, Ph.D. Omar Malagón y al Ph.D. Vladimir Morocho, que me han guiado en el transcurso del proyecto; con sus consejos, ilustres aportes y sugerencias durante el desarrollo de la investigación, aún más, por su tiempo ofrecido en forma incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN 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 x

ABREVIATURAS xi

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

INTRODUCCIÓN 3

CAPÍTULO I 5

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 5

1.1 Antecedentes 6

1.2 Plantas medicinales 6

1.3 Plantas medicinales en la región sur del Ecuador 7

1.4 Familia Asteraceae 7

1.4.1 Descripción del género *Loricaria.* 8

1.4.2 Descripción de la especie *Loricaria thuyoides.* 9

1.4.3 Descripción botánica de la especie *Loricaria thuyoides.* 10

1.5 Metabolitos secundarios 10

1.5.1 Cumarinas. 11

1.5.2 Terpenos 13

1.6 Cromatografía 14

1.6.1 Cromatografía de partición o de reparto. 15

1.6.2 Cromatografía de adsorción. 15

1.6.3 Cromatografía en capa fina (CCF). 16

1.6.4 Cromatografía en columna (CC) 17

1.7 Resonancia magnética nuclear (RMN) 18
1.8 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) 18
1.9 Ensayos biológicos 19
1.9.1 Inhibición de las colinesterasas (AChE y BuChE) 19
CAPÍTULO II 21
MATERIALES Y MÉTODOS 21
2.1 Área de recolección 23
2.2 Tratamiento de la planta 23
2.3 Obtención de los extractos 23
2.4 Cromatografía de capa fina 24
2.5 Cromatografía en columna 24
2.6 Unión y purificación de fracciones 25
2.7 Purificación cromatográfica 25
2.7.1 Fraccionamiento de la fracción 16 (KE16-12, 170.0mg). 25
2.7.2 Fraccionamiento de la fracción 18 (KE18-12, 120.0mg). 26
2.7.3 Fraccionamiento de la fracción 8 (KE8-12, 345.1mg). 26
2.8 Identificación de los compuestos aislados 26
2.8.1 Resonancia magnética nuclear (RMN). 26
2.8.2 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. 26
2.9 Ensayos biológicos 27
CAPÍTULO III 29
RESULTADOS Y ANÁLISIS 29
3.1 Extractos de la especie *Loricaria thuyoides* 30
3.2 Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto en diclorometano 30
3.3 Identificación de la fracción KE154-60 31
3.4 Identificación de la fracción KE211-76 33
3.5 Identificación de la fracción KE43-27 35
3.6 Identificación de la fracción KE194-73 37
3.7 Identificación de la fracción KE174-68 38
3.8 Ensayos biológicos 40
CONCLUSIONES 42
RECOMENDACIONES 43

BIBLIOGRAFÍA 44

ANEXOS 49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de compuestos que presenta la familia Asteraceae. 8
Figura 2. Estructura de la siringina. 10
Figura 3. Fotografía de la especie *Loricaria thuyoides.* 10
Figura 4. Estructura de la cumarina 11
Figura 5. Ejemplos de cumarinas. 12
Figura 6. Formación biosintética de diversas cumarinas. 13
Figura 7. Determinación del factor de retención. 17
Figura 8. Diagrama de la metodología empleada. 22
Figura 9. Planta en el cuarto de secado. 23
Figura 10. Extractos A) Extracto en diclorometano. B) Extracto en metanol. C) Extracto en acetato de etilo. 24
Figura 11. Cromatografía en capa fina en hexano/acetato de etilo 6:4. A) Luz UV 360 nm. B) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. C) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador. 24
Figura 12. Cromatografía en columna del extracto total en diclorometano 25
Figura 13. Diagrama cromatográfico del extracto de diclorometano. 31
Figura 14. Estructura química de la escopoletina. 32
Figura 15. CCF en Hex/AcOEt 7:3. A) Luz UV 360 nm. B) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. C) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador. 33
Figura 16. Estructura química de la obliquina. 34
Figura 17. CCF en Hex/AcOEt 8:2. A) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. B) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador. 35
Figura 18. CCF en Hex/CH_2Cl_2 1:1. A) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. B) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador. 37
Figura 19. CCF en MeOH/H_2O 9:1. A) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. B) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador. 38
Figura 20. Espectro de ^{1}H-NMR de la fracción KE174-68 39
Figura 21. Estructura de un ácido graso libre. 39
Figura 22. CCF en Hex/2-propanol 99:01. A) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. B) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador. 40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica de la especie *Loricaria thuyoides* 10
Tabla 2. Clasificación de los terpenos. 14
Tabla 3. Características de las columnas capilares del GC-EM. 26
Tabla 4. Parámetros operacionales del GC-EM. 27
Tabla 5. Muestras y cantidades empleadas en los ensayos. 28
Tabla 6. Rendimiento de los extractos. 30
Tabla 7. Fracciones obtenidas. 30
Tabla 8. Resultados de la actividad inhibitoria de las colinesterasas. 40

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
CH_2Cl_2	Diclorometano
H_2O	Agua
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta
Rf	Factor de Retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
^{1}H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear Protón
^{13}C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13
$CDCl_3$	Cloroformo Deuterado
CD_3OD	Metanol Deuterado
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectometría de Masas
AChE	Acetilcolinesterasa
BuChE	Butirilcolinesterasa
DTNB	Dithiobisnitrobenzoate
PBS	Buffer fosfato salino
DMSO	Dimetilsulfóxido

RESUMEN

A partir de las hojas de la planta medicinal *Loricaria thuyoides* conocida como “Trencillo de cerro”, recolectada en el cantón Saraguro, se realizó la extracción, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios mediante técnicas espectroscópicas de RMN y CG-EM. Identificándose dos cumarinas conocidas como escopoletina y 5-hidroxi-obliquina. Adicionalmente, se llevó a cabo el aislamiento de dos compuestos de origen terpénico (denominados KE43-27 y KE194-73) y una mezcla de ácidos grasos. Se evaluó la actividad inhibitoria de las enzimas acetilcolinesteresa y butirilcolinesterasa de los aislados. Los resultados evidenciaron que el compuesto KE43-27 mostró una significante actividad inhibitoria frente a las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa con concentraciones de 3.06 y 3.42 mU/ml respectivamente. Mientras que el compuesto 5-hidroxi-obliquina solo presentó actividad inhibitoria a la enzima butirilcolinesterasa (18.4 mU/ml), en cambio el compuesto KE194-73 no mostró actividad inhibitoria para las enzimas ensayadas.

Palabras claves: *Loricaria thuyoides*, escopoletina, 5-hidroxi-obliquina, diterpeno, triterpeno, ácido graso.

ABSTRACT

The leaves of Loricaria thuyoides knowed as "Trencillo de cerro", were collected in Saraguro town and its extraction, isolation and characterization of secondary metabolites was performed by spectroscopic techniques NMR and GC-MS. Two coumarinic compounds were identified known as scopoletin and, 5-hydroxy obliquin. Additionally, the isolation of two compounds of terpenic origin (referred as KE43-27 and KE194-73) and a mixture of fatty acids was achieved. The cholinesterases inhibitory activity of the compounds were evaluated by the ability to inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. The results evidenced that compound KE43-27 showed a significant inhibitory activity against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with concentrations of 3.06 and 3.42 mU/ml respectively. While the compound 5-hydroxy-obliquin presented only inhibitory activity to butyrylcholinesterase (18.4 mU/ml) , and the compound KE194-73 resulted non active for enzymes tested.

Keywords: *Loricaria thuyoides*, scopoletin, 5-hydroxy-obliquin, diterpene, triterpene, fatty acid.

INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo el ser humano ha utilizado las plantas y los beneficios que éstas aportan como alimento y especialmente en el cuidado de su salud o tratamiento de algún mal, ya que se sabe que estas presentan diversas propiedades farmacológicas, por su gran contenido de principios activos importantes para el tratamiento de diversas enfermedades. De ésta relación han surgido conocimientos tradicionales sobre los usos de las plantas, formas de relacionarse con la biodiversidad del medio, e incluso han intervenido en la toponimia y vocabulario locales. Por lo que cabe decir, que la etnobotánica se ocupa de estudiar esta relación entre sociedades humanas y plantas (CONEC., 2012).

El 70% de la población mundial utiliza las plantas para solucionar problemas básicos de la salud, además el 30% de los productos farmacéuticos se han obtenido del reino vegetal, por lo que está en aumento el estudio de plantas útiles, para así buscar nuevas drogas que pueden ser empleadas por la industria farmacéutica (Zuluaga, G., 2015).

El Ecuador a pesar de tener una pequeña superficie, posee una gran cantidad de especies por área, que según reportes de estudios etnobotánicos entre 5.000 a 8.000 pueden ser útiles (Armijos, C., Lozano, M., Bracco, F., Vidari, G., & Malagón, O. 2012).

En 18 sitios del superpáramo en Ecuador, encontramos 388 especies de plantas vasculares pertenecientes a 146 géneros y 52 familias y la mayoría de estas especies son abundantes en estos lugares; tales como, Asteraceae 83 especies y Poaceae 49 especies (Sklénar, P., & Balslev, H., 2005).

La familia Asteraceae (o Compositae) cuenta aproximadamente con 1.620 géneros y 23.600 especies. Está distribuida en todos los continentes a excepción de la Antártida, pero se localiza especialmente en regiones tropicales y subtropicales de Norteamérica, los Andes, Brasil Oriental, el sur de África, Asia Central, y China del sudoeste (Garibello, C., 2010).

Esta familia es rica en metabolitos secundarios biológicamente activos y contienen: Absintol, glucósidos, ácido angélico, ácido antémico, alcohol cerílico, lacturecina, taninos, tacacerinas, saponinas, carotenos, flavonoides, alcoholes, ácidos salcílicos, mucílagos (Restrepo, M., Quintero, P., & Fraume, N. 2005), cinatina, ácido cafeíco, lactonas sesquiterpénicas, entre otros (Fonnegra, R., & Jiménez, S., 2007).

La especie *Loricaria thuyoides* conocida también como trencillo de cerro, se la utiliza medicinalmente para tratar afecciones indeterminadas (De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. 2008).

Las colinesterasas regulan la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis nerviosa y la unión neuromuscular (Pagana, K., & Pagana, T., 2008).

La finalidad de este Proyecto es: “Extracción, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios del extracto en diclorometano de la especie *Loricaria thuyoides”,* lo cual pretende aportar con la caracterización de los compuestos presentes en esta especie.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Antecedentes

En los bosques alto-andinos debido a las fuertes condiciones ambientales, tienen un dosel arbóreo bajo (DAP) que no sobrepasa los 10m de altura, con árboles torcidos con DAP menores a 20cm. Generalmente con una densidad alta de hasta 1.200 individuos/Ha. y un área basal considerable. Por la alta humedad hay una capa gruesa de briófitas en el piso, en los fustes y ramas de los árboles (Aguirre, N., Heerma, O., & Hofstede, R. 2001).

Actualmente, en sitios con buen drenaje o no tan expuestas al viento, se encuentran unas especies leñosas; tales como, los arbustos *Chuquiraga jussieui, Diplostephium spp., Pernettya prostrata, Gynoxyx buxifolia, Loricaria thuyoides, Hypericum spp., Lupinus spp., Brachyotum spp.* y *Valeriana multiflora* y unas especies de árboles *Escallonia myrtilloides y Hesperomeles obtusifolia* (Aguirre, N., et al., 2001).

En 18 sitios del superpáramo en Ecuador, encontramos 388 especies de plantas vasculares pertenecientes a 146 géneros y 52 familias, por lo que la flora del superpáramo ecuatoriano es más rico en especies que el de Venezuela y Colombia, que parece tener un menor número de especies, aunque el número sigue siendo incierto. La mayoría de las especies de las familias que son abundantes en este tipo de lugar son: Asteraceae 83 especies y Poaceae 49 especies. (Sklénar, P., & Balslev, H., 2005).

En el superpáramo la franja situada por encima de 4.100msnm., se caracteriza por la discontinuidad de la vegetación, obteniendo un crecimiento de pocas plantas aisladas y predominio del sustrato rocoso. Los matorrales con especies de *Loricaria* (*L. colombiana, L. complanata, L. thuyoides*) son muy frecuentes (Llorente, J., & Morrone, J., 2001).

1.2 Plantas medicinales

El 70% de la población mundial, utiliza las plantas para solucionar problemas básicos de la salud; además, el 30% de los productos farmacéuticos se han obtenido del reino vegetal, por lo que está en aumento el estudio de plantas útiles, para así buscar nuevas drogas que pueden ser empleadas por la industria farmacéutica (Zuluaga, G., 2015).

Las plantas contienen compuestos activos que las protegen de los insectos, mohos y otros parásitos, así como los rayos ultravioleta del sol. Muchos de estos compuestos combinados poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos (EUFIC., 2002), siendo así conocidas como plantas medicinales, las cuales utilizadas mediante infusiones, decocción, el extracto, la tintura, jugo fresco, polvo empleando varias partes de la planta como son la hoja, flor o una raíz dependiendo del método de preparación que se desea utilizar (Schauenberg, P., & Paris, F., 1980).

Los tratamientos fitoterapéuticos pueden no actuar sólo en función de un componente de su estructura o principio activo; por lo que la acción curativa se debe a la sumatoria de acciones de cada uno de los componentes, interaccionando con el organismo para proveer la cura. Llegando así al concepto de fitocomplejo, el cual se basa en que la acción farmacológica de una planta, es la unión de varias sustancias que actúan juntas y son interdependientes, para lograr el efecto deseado, siendo así de menor toxicidad que la terapia farmacológica tradicional (Restrepo, M., et al., 2005).

1.3 Plantas medicinales en la región sur del Ecuador

El Ecuador a pesar de tener un tamaño pequeño posee una gran cantidad de especies, por superficie área (alrededor del 10%), que según reportes de estudios etnobotánicos de 5.000 a 8.000 pueden ser útiles. Además posee gran riqueza cultural, debido a la presencia de diferentes grupos étnicos, los cuales mantienen una tradición etnobotánica transmitiéndola oralmente o de generación en generación (Armijos, C., et al., 2012).

La flora en el sur del Ecuador está entre las más ricas y diversas del mundo, presentando una amplia gama de diferentes tipos de vegetación según el piso cilmático (Aguirre, Z., Madsen, J., Cotton, E., & Balslev, H. 2002).

Varias investigaciones sobre el uso de las plantas medicinales han demostrado que las plantas utilizadas en Etnomedicina ancestral, tienen mayor probabilidad de presentar actividad farmacológica, que aquellas plantas seleccionadas por su quimiotaxonomía o al azar (Armijos, C., et al., 2012).

1.4 Familia Asteraceae

Conocida también como Compositae, es uno de los grupos más variados dentro de las plantas con flores (*Magnoliophyta*) (Rave, P., Evert, R., Eichhorn, S., 1992). Además cuenta aproximadamente con 1.620 géneros y 23.600 especies, las cuales en su mayoría no son comestibles. Está distribuida en todos los continentes a excepción de la Antártida, pero se localiza especialmente en regiones tropicales y subtropicales de Norteamérica, los Andes, Brasil Oriental, el sur de África, Asia Central, y el sudoeste de China (Garibello, C., 2010).

Las especies de la familia de las Asteraceae están ampliamente distribuidas en todo el mundo y se ha utilizado en la medicina tradicional desde tiempos antiguos. Los miembros de esta familia han sido utilizados tradicionalmente; como, astringente, antipiréticos, anti-inflamatorio, hepatoprotector, diaforético, relajante del músculo liso, tónicos nerviosas, laxantes y para el tratamiento de heridas, hemorragias, dolor de cabeza, dolores, enfermedades espasmódicas, flatulencia, dispepsia disentería, lumbago, leucorrea, las hemorroides, úlcera gangrenosa, trastornos que causan caquexia, antiviral, potencial

anticancerígeno, bacteriostático, dermatofílico, cicatrizante, entre otros (Achika, J., Arthur, D., Gerald, I., & Adedayo, A. 2014; Lavabre, M., 1990).

Esta familia presenta compuestos de tipo alcamidas olefínicas y acetilénicas, las cuales tienen propiedades insecticidas y antibacterianas (Molina, J., & García, A., 2001); lactonas sesquiterpénicas que tienen actividad antitumoral, antiulcerosa, cardiotónica, neurotóxica, contra la migraña y dermatitis alérgica; alcaloides que ayudan en el sistema nervioso central; poliacetilenos que son potentes citotóxicos y fungicidas; y flavonoides, que son antioxidantes (Heinrich, M., Robles, M., West, J., Ortiz, B. & Rodríguez, E. 1998). A continuación se observan varias estructuras de algunos compuestos que contiene esta familia (Figura 1):

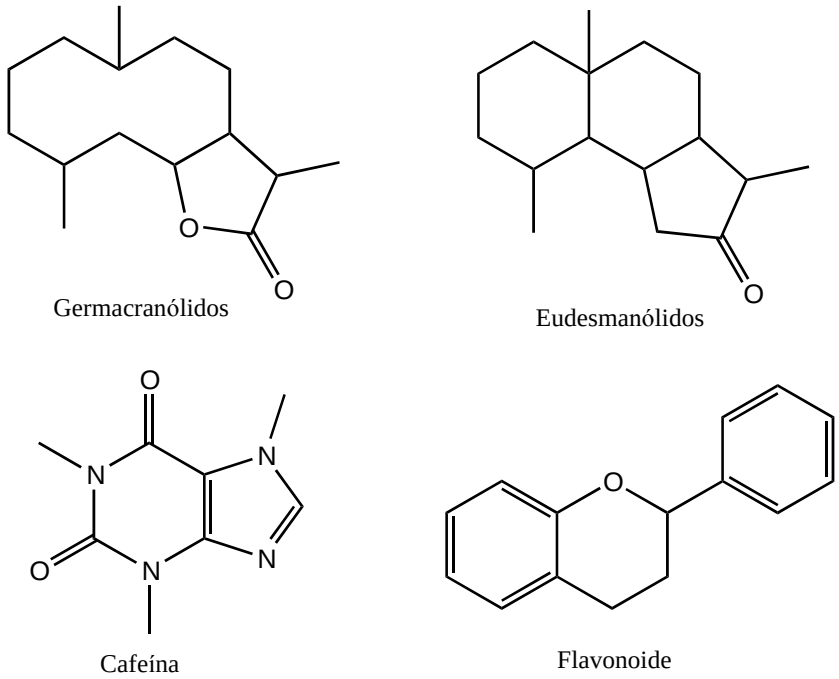


Figura 1. Estructuras de compuestos que presenta la familia Asteraceae.

Fuente: (Heinrich, M., et al., 1998)

Elaborado por: (Autora, 2016)

1.4.1 Descripción del género *Loricaria.*

Según la etimología la palabra *Loricari*a deriva del vocablo latino *lorica*, -ae = corza, cota de malla; en alusión a la apariencia de la disposición de los tallos y la forma y consistencia de las hojas (Kubitzki, K., Kadereit, J., & Jeffrey, C., 2007).

Este género se encuentra mayoritariamente en las partes altas de Los Andes tropicales, desde Colombia hasta Bolivia y se agrupa en diecinueve especies. Además de ser fácilmente diferenciable por su hábito arbustivo, por los tallos foliáceos comprimidos lateralmente y hojas imbricadas, involutas y coriáceas (Kubitzki, K., et al., 2007).

En el Ecuador el género *Loricaria* consta de 9 especies, de las cuales 6 son endémicas. Especies nativas: *L. complanata, L. ferruginae* y *L. thuyoides*. Especies endémicas: *L. antisanensis, L. azuayensis, L. ilinissae, L. ollgaardii, L. pauciflora* y *L. scolopendra* (Jørgensen, P., & León, S. 1999).

Hasta el momento no se han reportado estudios fitoquímicos realizados en este género, pero se reporta una investigación previa realizada en *L. thuyoides* (Espinoza, K., 2015).

1.4.2 Descripción de la especie *Loricaria thuyoides.*

Loricaria thuyoides es un arbusto de hasta de 1.5 mts., de alto que se encuentran desde la base muy ramificados con tallos blancolanosos erguidos dispuestos en un solo plano. Las hojas son alternas, simples, oblongas a estrechamente lanceoladas con abundantes pelos sedosos y blancos en la parte interior. Su inflorescencia presentan corola amarilla-rojiza y sus frutos son de cipselas cilíndricas (MECN-INB. 2015) (Figura 2).

Se encuentra distribuida en las provincias de Azuay, Bolívar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha, Tungurahua y Zamora, a una altitud de 2.000-4.500 msnm. (Jørgensen, P., & León, S. 1999).

Es conocido en las comunidades indígenas del Ecuador como Jata, trencillo del cerro (castellano) y atta (lengua no especificada) (De la Torre, L., et al., 2008).

Se utiliza en la medicina tradicional el extracto en alcohol de la planta con “ish-pinku”, para lavar o escupir sobre la persona que sufra “mal de aire” (Kichwa de la Sierra-Loja) además de tratar afecciones indeterminadas (Etnia no especificada-Pichincha y también se aprovecha en arreglos navideños (Mestiza-Pichincha) (De la Torre, L., et al., 2008).

Se conoce un estudio realizado a esta especie por Espinoza, K., (2015), en el extracto de acetato de etilo, en donde se obtuvo el compuesto conocido como siringina (4-(3-hidroxi-1-1profenil)-2,6-dimetoxifenil-β-D-glucopiranosido) (Figura 2).

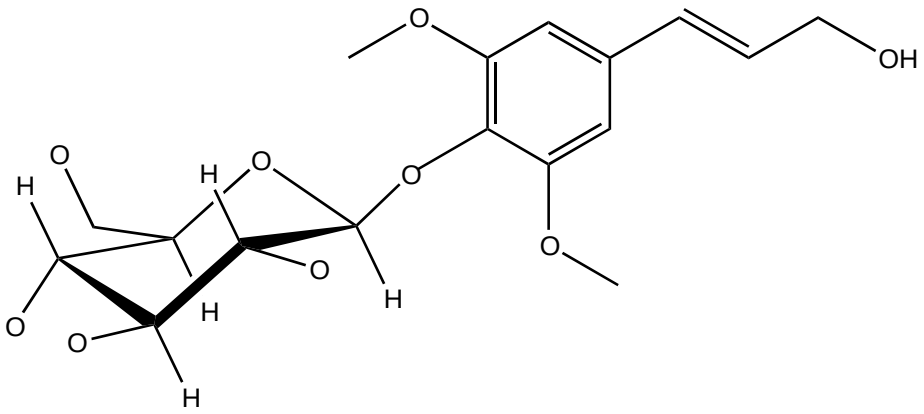


Figura 2. Estructura de la siringina.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

1.4.3 Descripción botánica de la especie *Loricaria thuyoides.*

Figura 3. Fotografía de la especie *Loricaria thuyoides.*

Fuente: (Jørgensen, P., & León S., 1999)

Tabla 1. Clasificación botánica de la especie *Loricaria thuyoides*

Reino	**Plantae**
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	*Loricaria*
Especie	*thuyoides*

Fuente: (Stancik, D., 1999)

Elaborado por: (Autora, 2016)

1.5 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos que no tienen función directa en el crecimiento y desarrollo de la planta, es decir no tienen función en los procesos de

fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, entre otros. Además los metabolitos secundarios se encuentran en determinadas especies vegetales o grupo de especies relacionadas siendo así diferentes en los tipos de plantas (Taiz, L., & Zeiger, E., 2006).

En general son responsables del olor, sabor y color de la planta, además de sus propiedades medicinales; todo esto depende de los ciclos metabólicos de la planta, formando así una gran variedad de tipos estructurales (Castillo, E., & Martínez, I., 2007).

1.5.1 Cumarinas.

Se encuentran en todo el reino vegetal, pero principalmente en las familias Asteraceae, Fabaceae, Apiaceae y Rutaceae; dependiendo de estas familias suelen tener estructuras más complejas (Ferraro, G., Martino, V., Barnoldi, A., & Nadinic, J. 2015).

Las cumarinas libres son solubles en solventes orgánicos, alcohol, éter etílico y solventes clorados pudiendo así extraerlos; pero si estos se encuentran en forma de heterósidos son más o menos solubles en agua (Ferraro, G., et al., 2015) (Figura 4).

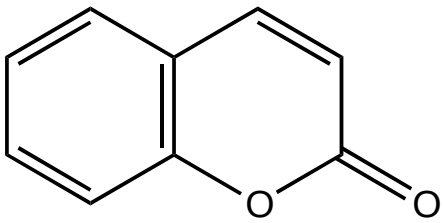


Figura 4. Estructura de la cumarina

Fuente: (Reija, B., 2007)

Elaborado por: (Autora, 2016)

Los metabolitos C_6C_3 son más característicos en las cumarinas, la cual es la cabeza de una amplia clase de compuestos (Figura 5). Químicamente su nombre sistemático es benzo[e]piran-2-ona o también 5,5-benzo-α-pirona (Marco, A., 2010).

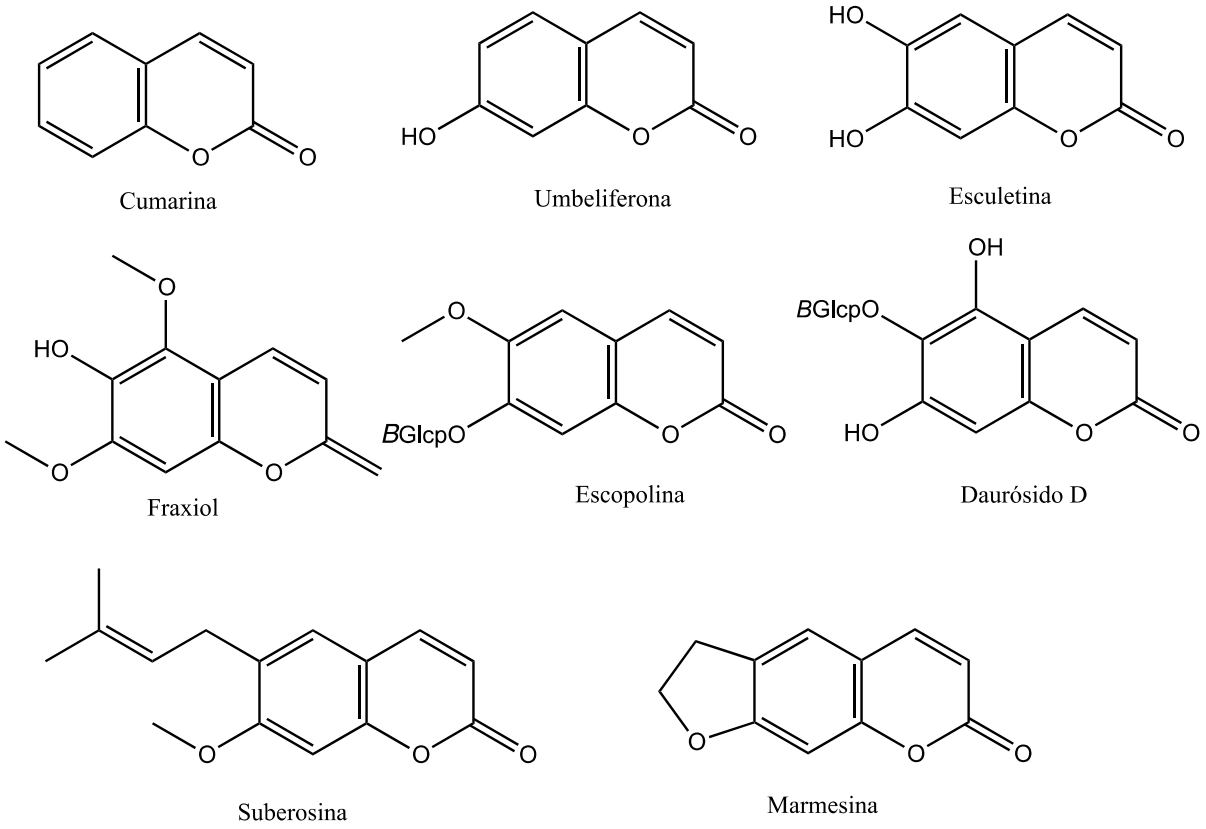


Figura 5. Ejemplos de cumarinas.

Fuente: (Marco, A., 2010)

Elaborado por: (Autora, 2016)

La ruta biosintética en las cumarinas se da por la vía de ácido shikímico, el cual se inicia con una hidroxilación enzimática del ácido *trans*-p-cumárico (en *meta* a un hidroxilo, que es algo poco frecuente), isomerización *trans-cis* y lactonización para dar umbeliferona. Las cumarinas con hidroxilos libres o con otros sustituyentes adicionales, surgen por modificaciones posteriores en la umbeliferona (Figura 6) (Marco, A., 2010).

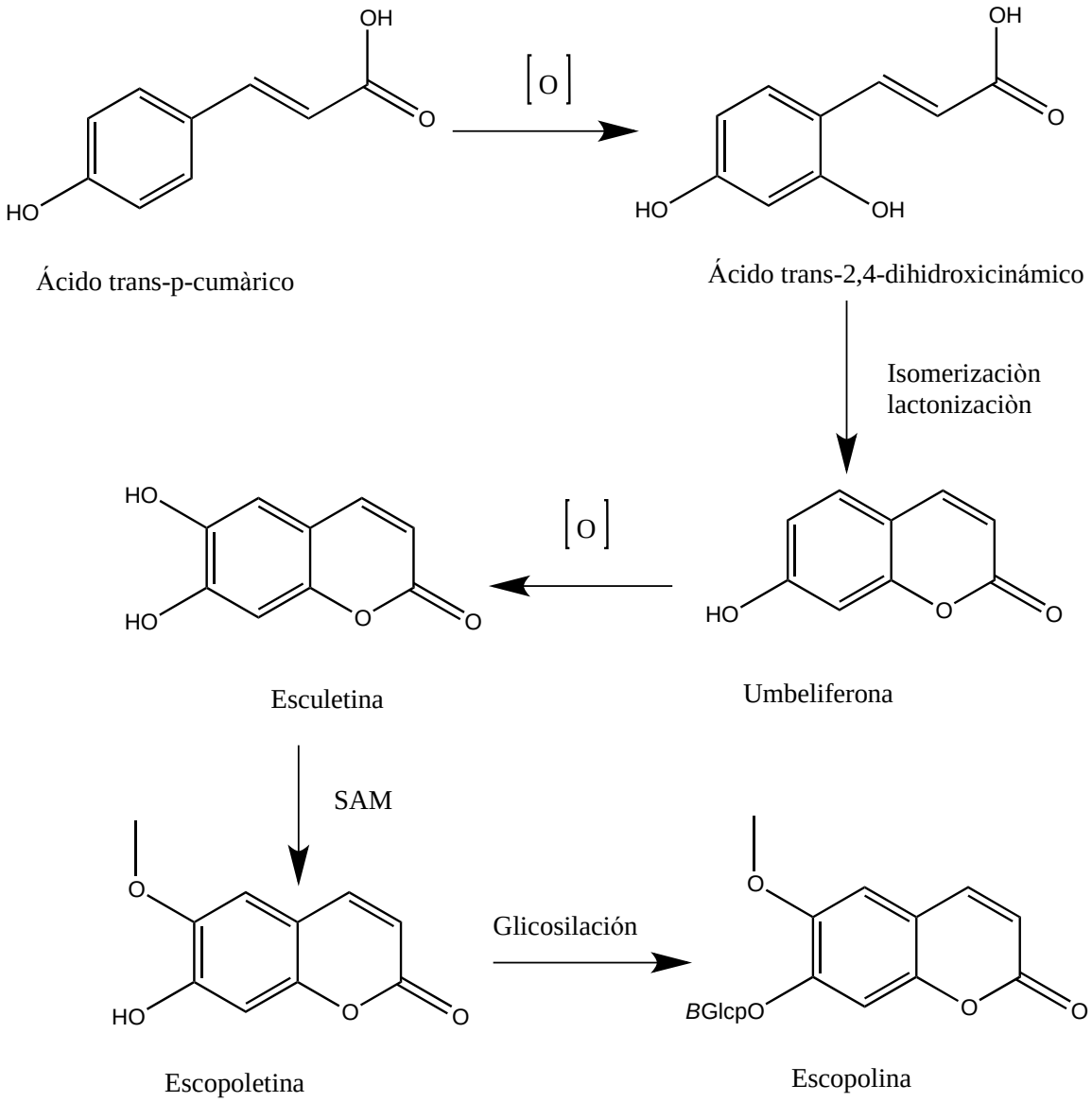


Figura 6. Formación biosintética de diversas cumarinas.

Fuente: (Marco, A., 2010)

Elaborado por: (Autora, 2016)

Estas cumarinas presentan varias acciones farmacológicas las cuales son: anticoagulante, estrogénica, antiproliferativa, diferenciante, fotosensibilizante, antinflamatoria, antimmicrobiana, antihelmíntica, vasodilatadora, molusquicida, sedativa, hiptónica, analgésica y antipirética (Barata, S., 2007).

1.5.2 Terpenos

Los terpenos o compuestos terpenoides son sustancias naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en los organismos vivos por lo que se han descrito más de 30.000 hasta la fecha. La denominación terpeno proviene del nombre trementina o aguarrás

(turpentine en inglés), cuando se sometieron a análisis elementales llamó la atención que casi siempre contenían un número de carbonos múltiplo de 5, por lo que debido a esto tuvieron varias denominaciones (Tabla 2) (Marco, A., 2010).

Tabla 2. Clasificación de los terpenos.

Número de carbonos	Nombre
10	Monoterpenos
15	Sesquiterpenos
20	Diterpenos
25	Sesterterpenos
30	Triterpenos
40	Tetraterpenos
>40	Politerpenos

Fuente: (Marco, A., 2010)

Elaborado por: (Autora, 2016)

Los monoterpenos y sesquiterpenos se los conoce como constituyentes de esencias vegetales, dado que algunos tienen una apreciable volatilidad. Los diterpenos y triterpenos suelen estar presentes en gomas, resinas y otros exudados vegetales. Los tetraterpenos se encuentran ampliamente en los carotenoides que son colorantes muy abundantes en el reino vegetal y en ciertos animales como los crustáceos. Los sesterterpenos se encuentran en ciertos tipos de esponjas, hongos e insectos y pocas plantas superiores. Finalmente, los politerpenos se encuentran en las membranas celulares de los organismos vivos (Marco, A., 2010).

Existen 2 rutas para la biosíntesis de los terpenos, las cuales son la ruta del ácido mevalónico y la ruta sin participación del ácido mevalónico (Marco, A., 2010).

Los terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial. Comercialmente se lo utiliza por su aroma y fragancias en alimentación y cosmética; además tiene importancia medicinal debido a sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. (Ávalos, A., & Pérez, E., 2009).

1.6 Cromatografía

La cromatografía es una técnica que consiste en que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos, lo cual es arrastrado por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de la fase estacionaria (líquida o sólida). Cabe indicar que el nombre de la técnica no consiste en escribir con colores, sino que esto se debe a que

en la primera experiencia cromatográfica se separaron pigmentos coloreados de plantas (Valcárcel, M., & Gómez, A., 1988).

Hay diferentes tipos de cromatografía pero en esta investigación se utilizaron las siguientes:

1.6.1 Cromatografía de partición o de reparto.

La partición tiene lugar entre una fase líquida que será adsorbida en un soporte sólido y una fase móvil, la cual puede ser líquida o gaseosa. La fase líquida va a cubrir la superficie del soporte sólido que constituye la fase estacionaria; si la partición se realiza entre líquidos, el más polar es la fase estacionaria (Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., & Maestri, D., 2008).

En la cromatografía de reparto los solutos se separan por su diferente distribución entre dos fases líquidas (cromatografía líquido/líquido) o entre un gas y una fase líquida (cromatografía gas/líquido). La fase estacionaria será siempre un líquido que esta soportada generalmente por un sólido adecuado, mientras que la fase móvil puede ser un líquido o gas. La cromatografía en papel tiene como fase estacionaria es una capa de agua fijada en una hoja de papel. Se lleva a cabo sobre tiras de papel de filtro, o capas finas de celulosa, gel de sílice húmeda o tierra de diatomeas, estos medios servirán de soporte para el agua que es el que actúa de fase estacionaria, y como fase móvil se utilizará un disolvente orgánico no miscible con el agua. El factor que influirá en el movimiento del componente, es la solubilidad que éste presente en la fase móvil y en la estacionaria (Silva, M., García, M., Castillo, L., Ania, J., & Gómez, D., 2006).

La cromatografía en fase inversa (CFR) es una forma de cromatografía de partición líquido-líquido, en la que la parte polar de las fases está invertida con respecto a la cromatografía en papel. La fase estacionaria presenta un líquido no polar inmovilizado sobre un sólido relativamente inerte, mientras que la fase móvil es un líquido más polar. La CFR en principio se la utilizaba para separar mezclas de sustancias no polares, como lípidos, pero también resultó efectiva para separar sustancias polares como oligonucleótidos y proteínas, siempre que éstos tengan áreas no polares expuestas (Voet, D., & Voet, J., 2006).

1.6.2 Cromatografía de adsorción.

La cromatografía de adsorción, desarrollado por Day, Engler y Tswett, es adecuada para la separación y aislamiento de productos naturales coloreados, como los carotenos y clorofilas, que no se pueden separar mediante cristalización fraccionada. Estas sustancias que son químicamente similares y generalmente de distinta coloración, poseen una adherencia distinta sobre determinados agentes de adsorción. Su separación se debe a la distinta velocidad de emigración de la sustancia disuelta en el sistema constituido por la fase

estacionaria (el agente de adsorción) y la fase móvil (el disolvente). Utilizando como adsorbentes óxido de aluminio, gel de sílice, carbonato y óxido de calcio, azúcar en polvo y polvo de celulosa, entre otros. Pudiendo mejorar la nitidez de la separación de una fase estacionaria, añadiendo al portador una sustancia que reaccione de forma específica, con un componente de la mezcla o que forme un complejo con él. Esto se conoce como cromatografía por afinidad, que resulta adecuada para el aislamiento de enzimas (Beyer, H., & Wolfgang, W., 1987).

En la práctica se hace pasar un disolvente orgánico a través de una columna rellena con uno o varios agentes de adsorción (cromatografía de columna). Luego de la separación mecánica, se disuelve la sustancia en un disolvente adecuado, con la que se puede aislar en estado de pureza; también se puede llevar a cabo por desplazamiento, utilizando un eluyente que tenga mayor afinidad por la fase sólida haciendo que las sustancias de la mezcla salgan por la parte inferior de la columna en orden decreciente a su adherencia, siendo posible separar mezclas de sustancias incoloras en distintas fracciones, ya sean en forma pura o con diversos componentes que pueden determinarse (Beyer, H., & Wolfgang, W., 1987).

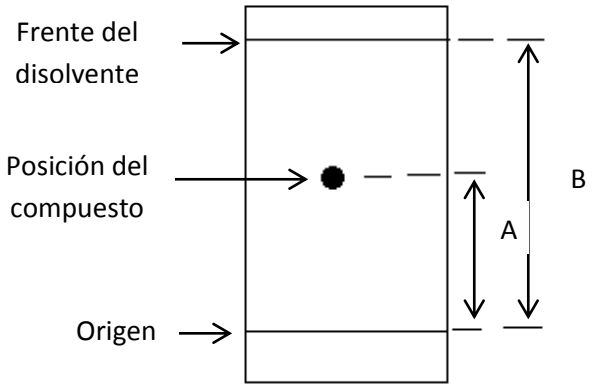
Esta técnica se utiliza en la purificación de muestras empleando óxido de aluminio granular muy poroso, disponible en rangos de pH ácido, neutro y básico, el cual se empaca en una columna llena con una sustancia absorbente al agua, sobre la cual se eluye la muestra con un disolvente adecuado. Después de la elución, la muestra se concentra, se intercambia con otro disolvente, si es necesario, para luego analizarla (Manahan, S., 2007).

1.6.3 Cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía en capa fina, fue establecida por Ismailow y Schraiber (1938), aunque no alcanzó una amplia aplicación práctica hasta que Stahl (1956) logró que este proceso de separación fuera un fiable trabajo en el laboratorio. En este método se utiliza una placa de vidrio o una lámina metálica, que se cubre con una película de unos 250um de espesor de un adsorbente (gel de sílice y óxido de aluminio, entre otros). Esto se lleva a cabo en una cubeta, la cual va a contener un agente eluyente hasta una altura de 0,5cm., detectando posteriormente de forma apropiada las sustancias que se han separado debido a la preparación adecuada de una mezcla de sustancias, tanto hidrófilas como lipófilas; obteniendo así, una gran capacidad de separación y rapidez en el proceso (10-30 minutos) (Beyer, H., & Wolfgang, W., 1987).

El grado de retención de cada compuesto depende de su hidrofilia, y la velocidad de desplazamiento depende del coeficiente de reparto entre el agua y el disolvente orgánico (Tomas, F., 1993).

El factor de retención (Rf) es la relación entre la longitud recorrida por la mancha de la sustancia (compuesto) y la longitud recorrida de la fase móvil por el frente (disolvente) como se observa en la figura 7 (Casas, J., 2004).



$$\mathrm{Rf} = \frac{\text{Longitud recorrida por el compuesto (A)}}{\text{Longitud recorrida por el disolvente (B)}}$$

Figura 7. Determinación del factor de retención.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

La cromatografía en capa fina es eficaz tanto para la separación de vitaminas, terpenos, esteroides y pigmentos como para la de aminoácidos, azúcares, nucleótidos, ácidos nucleicos, alcaloides, medicamentos e incluso para la de aniones y cationes inorgánicos (Beyer, H., & Wolfgang, W., 1987).

1.6.4 Cromatografía en columna (CC)

Se emplea para la separación de mezclas y para la purificación de sustancias a escala preparativa. La fase estacionaria (adsorbente) emplea generalmente sílice o alúmina contenida en una columna, en la cual el disolvente pasará a través de la misma por efecto de la gravedad o por aplicación de presión (percolación). El tamaño de la columna se determinará por la cantidad de mezcla a separar, usando relaciones de masa de muestra a masa de adsorbente de 1:100 a 1:500. La velocidad en la cual el disolvente fluye se denomina velocidad de elusión y esto es importante para que la separación sea efectiva (Lamarque, A., et al., 2008).

Se puede decir que el tiempo que la mezcla a separar, permanece en la columna es directamente proporcional a la magnitud del equilibrio entre la fase estacionaria y móvil. Por

lo que compuestos similares pueden separarse si permanece en la columna el tiempo suficiente, aunque esto también depende de la velocidad de flujo del disolvente, siendo esta afectada por el “empaquetamiento” de la fase estacionaria dentro de la columna y, en menor medida se ve afectada por la presión y la temperatura del sistema. Si el flujo es muy lento, las sustancias se mezclan, ya que se mueven hacia abajo muy rápido haciendo que las bandas se ensanchen, se hagan difusas teniendo como resultado una separación pobre (Lamarque, A., et al., 2008).

1.7 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Resonancia magnética nuclear (RMN) es un método, el cual se basa en la absorción de energía por cambio del espín nuclear de átomos sometidos a un campo magnético externo. El análisis del espectro de RMN ofrece evidencias sobre las características de los núcleos que conforman una molécula, y los más frecuentemente analizados son ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P, siendo los dos primeros análisis de rutina. Los desplazamientos químicos de las señales de RMN de ^{1}H (0-20ppm) y de ^{13}C (0-200ppm) dan información acerca de la naturaleza de hidrógenos (alifáticos, aromáticos, olefínicos, geminales y/o unidos a heteroátomos, etc.) y de carbonos (en doblas ligaduras, aromáticos, carbonílicos, oxigenados, etc.). Por la integración de las señales y el acoplamiento espín-espín (multiplicidad de la señal y magnitud de la constante de acoplamiento) que se observa en el espectro de protones, se deducen el número de hidrógenos y el modo de distribución en la molécula, mientras que las señales presentes en el espectro de carbono indica el número de carbonos presente en la estructura. En los espectros donde se preserva el acoplamiento C-H la multiplicidad de la señal evidencia el número de átomos de hidrógeno unidos al carbono responsable de la señal (Marcano, D. & Hasegawa, M., 2002).

En una dimensión (1D), pertenece el PND (Proton Noise Decoupled), el cual al irradiar zonas de protones para eliminar acoplamiento C-H se obtiene un espectro de ^{13}C en el cual cada señal (singlete) corresponde a uno de los carbonos presentes en la molécula, excepto por la existencia de simetría en la molécula o por solapamiento accidental de las señales (Marcano, D. & Hasegawa, M., 2002).

DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) se catalogan los carbonos según el número de hidrógenos enlazados a ellos, dando señales positivas, a excepción del C cuaternario que no se detecta (Marcano, D. & Hasegawa, M., 2002).

1.8 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases es una técnica que ayuda a la separación de mezclas muy complejas, pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los

componentes individuales de una muestra, el único dato de que disponemos para la identificación es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos; lo cual no es suficiente para una identificación correcta (Gutiérrez, M., & Droguet, M., 2002).

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla (Gutiérrez, M., & Droguet, M., 2002).

La asociación de las dos técnicas, CG (cromatografía de gases) y EM (espectrometría de masas), permite la separación e identificación de mezclas complejas con un alto grado de eficacia (Gutiérrez, M., & Droguet, M., 2002).

Una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan al espectrómetro de masas, registrando cada uno de estos componentes en forma de pico cromatográfico e identificándolo mediante su respectivo espectro de masas (Gutiérrez, M., & Droguet, M., 2002).

1.9 Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos nos ayudan a verificar si los compuestos encontrados experimentalmente en la presente investigación, contienen actividad biológica.

1.9.1 Inhibición de las colinesterasas (AChE y BuChE)

Las colinesterasas hidrolizan la acetilcolina y otros ésteres de la colina y, por tanto, regulan la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis nerviosa y la unión neuromuscular. Entre las colinesterasas se encuentra la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (Pagana, K., & Pagana, T., 2008).

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima esencial con un alto grado de especificidad en cuanto al sustrato, y que está presente unida a estructuras celulares en las regiones de las sinapsis colinérgicas, la sustancia gris del sistema nervioso central, los ganglios autonómicos, las sinapsis simpáticas pre y postganglionar y las terminaciones motoras de los músculos, así como en las sinapsis postganglionar parasimpáticas y los eritrocitos. Esta enzima tiene la función fisiológica de desdoblar rápidamente la acetilcolina neurotransmisora en colina y ácido acético, y, de esta manera, inactivarla (Ibarra, E., & Linares, T., 2012).

La AChE es una enzima muy importante en los seres vivos, por lo que es responsable de varios procesos nerviosos; su inhibición ha encontrado aplicaciones farmacológicas en

varias enfermedades, así como el control de insectos plaga; por lo que es de interés para las ciencias biomédicas y agroquímicas (Castellanos, A., 2014).

La inhibición de AChE ha encontrado varias aplicaciones en el nivel farmacológico, debido a que trata enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, enfermedades neuromusculares como la Miastenia Gravis y en trastornos oculares como el Glaucoma (Castellanos, A., 2014).

La butirilcolinesterasa (BuChE) es una enzima que puede hidrolizar la acetilcolina, para la cual el sustrato óptimo es la butirilcolina. Se encuentra presente en las células gliales y satélites del sistema nervioso central y los ganglios autónomos, el músculo liso, las glándulas exocrinas, algunos órganos y el plasma; la concentración en la que se encuentra en las neuronas colinérgicas por lo general es insignificante (Gennaro, A., 2003).

La inhibición de la BuChE afecta la formación y la maduración amiloide; hace que esta sea menor o, por lo menos, que no se transformen en dañinas las placas inertes, evitando que la placa amiloide se transforme en una inflamatoria (Alpízar, C., & Morales, C., 2003).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

El siguiente diagrama muestra la metodología empleada en la presente investigación (Figura 8):

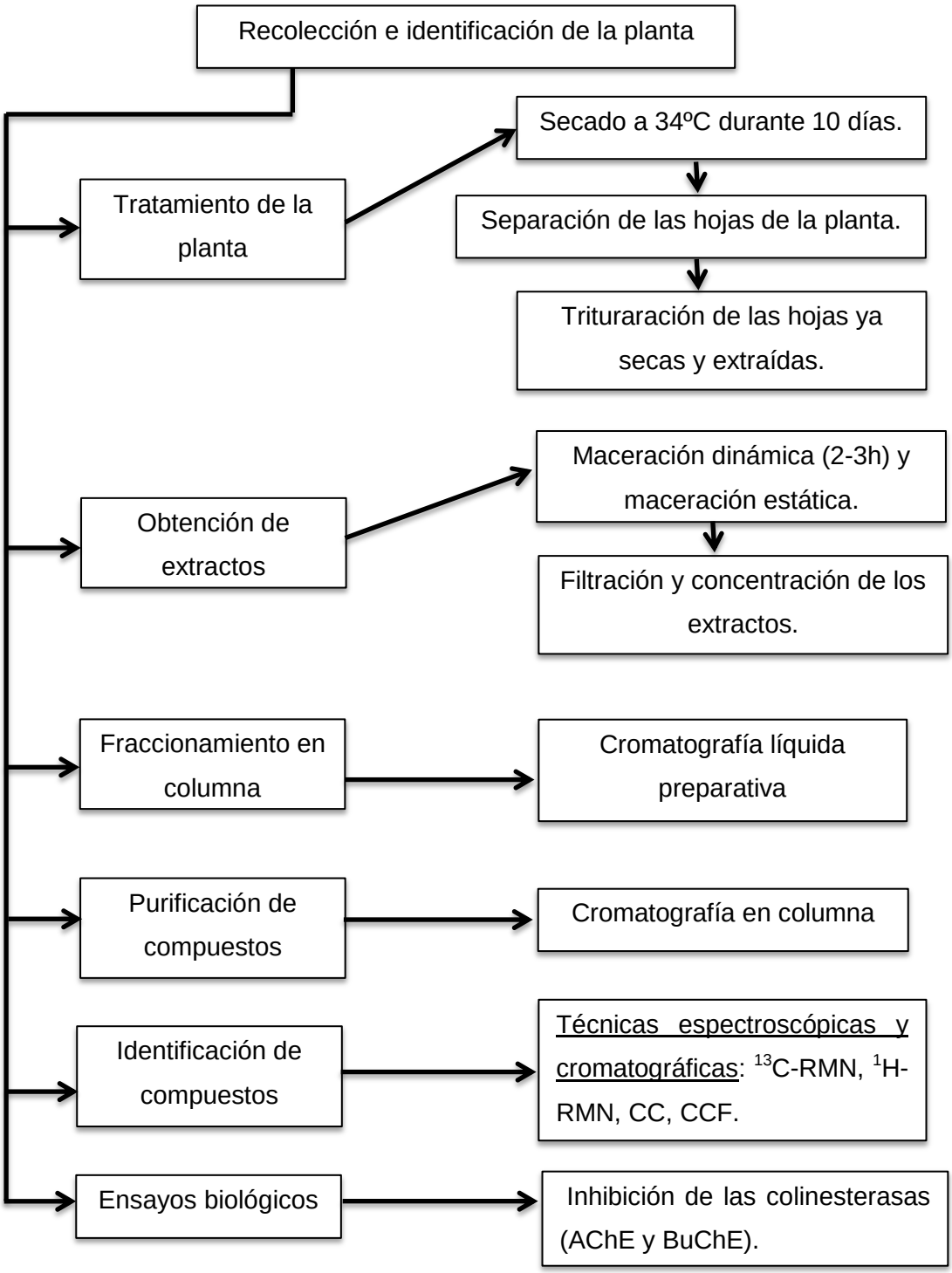


Figura 8. Diagrama de la metodología empleada.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

2.1 Área de recolección

Se recolectaron 6,5 kg de planta fresca en la comunidad de Saraguro, con coordenadas geográficas 17697649E - 9590439N a una altitud de 3.200 msnm. Con autorización N$^{o.}$ 001-IC-FLO-DBAP-VS-DRLZCH-MA concedido por el Ministerio de Ambiente del Ecuador (MAE).

La identificación taxonómica la realizó Bolívar Merino, curador oficial del Herbario-Loja de la Universidad Nacional de Loja (UNL), depositando un ejemplar de la muestra en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con el código voucher PPN-as-003º.

2.2 Tratamiento de la planta

La planta estudiada se secó por 10 días a 34º C moviéndola 2 veces al día (Figura 9). Se retiraron las impurezas que contenía para luego triturarla, obteniendo un peso final de 2,6 kg de planta seca.

Figura 9. Planta en el cuarto de secado.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

2.3 Obtención de los extractos

Se emplearon los 2,6 kg de hojas secas y trituradas para obtener los extractos totales. Se realizó maceración dinámica de 2-3 horas, luego maceración estática por 24 horas a temperatura ambiente, con los disolventes diclorometano, acetato de etilo y metanol en relación 1:10 planta: solvente, repitiendo este proceso por triplicado. Posteriormente se filtró al vacío y se concentró a presión reducida empleando el rota-evaporador a 32-34 ºC obteniendo así los extractos totales secos (Figura 10).

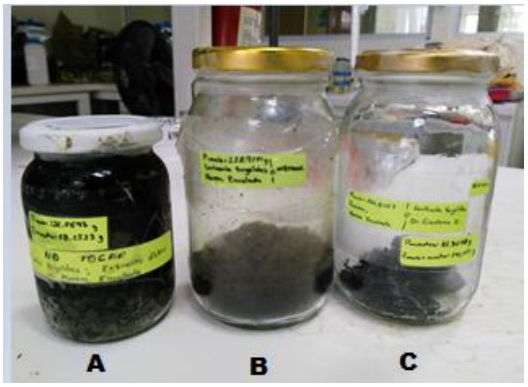


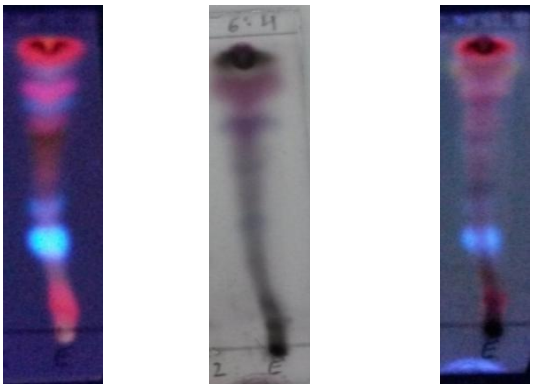
Figura 10. Extractos A) Extracto en diclorometano. B) Extracto en metanol. C) Extracto en acetato de etilo.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

2.4 Cromatografía de capa fina

Se realizaron cromatografías en capa fina en varias polaridades para observar la riqueza de compuestos que presenta, empleándose placas de sílica gel F_{254} y así se buscó la polaridad en la que se puede trabajar el extracto total en diclorometano.

Se observó que la mejor polaridad es en hexano/acetato de etilo 6:4 (Figura 11).



A B C

Figura 11. Cromatografía en capa fina en hexano/acetato de etilo 6:4. A) Luz UV 360 nm. B) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. C) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

2.5 Cromatografía en columna

Para realizar la cromatografía en columna del extracto total en diclorometano se utilizaron 5g de extracto en 500g de sílica gel (Merck 0.0015-00) fase directa, en una relación 1:100 de extracto-sílica gel (Figura 12). Se utilizó la polaridad hexano/acetato de etilo 6:4 y al final

acetato de etilo al 100%. En el fraccionamiento se obtuvieron 310 fracciones de 10ml cada una.

Figura 12. Cromatografía en columna del extracto total en diclorometano

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

2.6 Unión y purificación de fracciones

Después de haber obtenido las fracciones se realizó CCF para visualizar el grado de separación de las fracciones, utilizando placas de sílica gel 60 F_{254} (fase directa) para la fase estacionaria y para la fase móvil se utilizaron disolventes Hex: AcOEt en la polaridad 6:4, luego se las observó en la luz UV a 254 nm y 360 nm, empleando además agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina, teniendo en cuenta la semejanza de los compuestos presentes en las placas se realizó la respectiva unión de los mismos.

2.7 Purificación cromatográfica

2.7.1 Fraccionamiento de la fracción 16 (KE16-12, 170.0mg).

Se realizó una cromatografía en columna de esta fracción debido a que no se trataba de una fracción pura, sino que era la mezcla de varios compuestos. Para realizar la columna emplearon 60 gramos de sílica gel y 270mg de de la fracción, empleando de solvente ciclohexano/2-propanol 98:02.

Se obtuvieron 10 fracciones que se sometieron a purificación (mediante CC) obteniendo un compuesto puro.

Con el fin de obtener mayor cantidad del compuesto encontrado se procedió a purificar las siguientes fracciones: KE12-12, 185.3mg; KE13-12, 213.4mg; KE14-12, 250.6mg y KE15-12, 100.0mg.

2.7.2 Fraccionamiento de la fracción 18 (KE18-12, 120.0mg).

Mediante cromatografía en columna se purificaron los compuestos presentes en esta fracción, empleando 34 g de sílica gel en fase directa y 120.0 mg de la fracción en la polaridad Hex/CH_2Cl_2 95:05. Se obtuvieron 21 fracciones, de las cuales se consiguieron dos compuestos puros.

2.7.3 Fraccionamiento de la fracción 8 (KE8-12, 345.1mg).

Para purificar los compuestos presentes en esta fracción se realizó una cromatografía en columna con 200 g de sílica en fase inversa RP_{C18} y 353,4 mg de la fracción empleando la polaridad metanol/agua 85:15.

Se obtuvieron 16 fracciones de las cuales se las fue purificando obteniendo dos compuestos puros.

2.8 Identificación de los compuestos aislados

2.8.1 Resonancia magnética nuclear (RMN).

Se utilizó el equipo Varian N^o de serie 21956 operando a 400 MHz para ^{1}H y a 100MHz para ^{13}C con $CDCl_3$ para todas las muestras excepto la muestra KE194-73, 18,4mg en el cual se utilizó MeOH Deuterado.

2.8.2 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Se utilizó para la fracción KE154-60 el cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert que cuenta con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, un inyector automático split/splitles serie 7683. Las características que presentan las columnas capilares del equipo se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3. Características de las columnas capilares del GC-EM.

Columna	Temperatura máxima (^{o}C)	Grosor de la fase fija (um)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
MEGA DEX-DET QUIRAL	230	0.25	0.25	25

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

El equipo trabajó bajo los siguientes parámetros operacionales (tabla 4):

Tabla 4. Parámetros operacionales del GC-EM.

COLUMNA	
▪ **Número de modelo**	MEGA DEX-DET QUIRAL
▪ **Temperatura máxima**	230º C
▪ **Modo**	Presión constante
▪ **Flujo inicial**	1.2 ml/min
▪ **Presión inicial**	52.8 kPa
▪ **Promedio de velocidad**	44 cm/sec
INYECTOR	
▪ **Modo**	Split
▪ **Temperatura inicial**	250º C
▪ **Radio de partición**	50:1
▪ **Flujo de partición**	60.0 ml/min
▪ **Flujo total**	64.0 ml/min
▪ **Ahorro de gas**	Apagado
▪ **Tipo de gas**	Helio
DETECTOR	
▪ **Temperatura**	250º C
▪ **Tipo de gas**	Nitrógeno
HORNO	
▪ **Temperatura incial**	50º C
▪ **Temperatura máxima**	300º C

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

2.9 Ensayos biológicos

El ensayo de inhibición de las colinesterasas fue realizado por el Ph.D. Christian Larroque, en el Instituto de Cáncer de Montpellier, Francia.

La actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) se efectuó siguiendo un protocolo colorimétrico. La hidrólisis de la AChE produce un ion acetato y tiocolina. La tiocolina, en presencia del ión ditiobisnitrobenzoato altamente reactivo (DTNB), genera un color amarillo, que se puede controlar cuantitativamente mediante absorción espectrofotométrica a 412 nm. Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Se preparó un volumen típico para el ensayo (200ul), el cual contenía 73ul de PBS, 2ul de DMSO 1%, 100ul DTNB (3mM), muestra de ensayo en DMSO 1%, 5ul de acetilcolinesterasa o butirilcolinesterasa (dependiendo de la actividad inhibitoria que se pretenda saber) y 20ul de sustrato de yoduro de acetilcolina (15nM), con todo esto comienza la reacción después de la pre-incubación del yoduro de acetilcolina. Después de 1 h de incubación, se leyeron en un sistema de detección de Thermo Multiskan EX. Se utilizó el PBS en lugar de la enzima como un control negativo (tabla 5).

Tabla 5. Muestras y cantidades empleadas en los ensayos.

Muestra	Peso (mg)	Vol. DMSO por stock 10mg/ml	Soluble
KE43-27	0.5	50	MeOH y DMSO
KE194-73	0.4	40	MeOH y DMSO
KE211-76	0.3	30	MeOH y DMSO

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Extractos de la especie *Loricaria thuyoides*

En la tabla 6 se encuentra el rendimiento de los extractos obtenidos a partir de los 2,6kg de hojas secas.

Tabla 6. Rendimiento de los extractos.

EXTRACTOS	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Extracto CH_2Cl_2	2600.00	58.25	2.24
Extracto AcOEt		13.58	0.52
Extracto MeOH		141.10	5.42

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016).

3.2 Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto en diclorometano

De la cromatografía en columna se obtuvieron 353 fracciones, de las cuales de acuerdo a su similitud observada en la CCF, se reunieron formando 19 fracciones denominadas KE1-12, 840mg hasta KE19-12, 2350mg (Tabla 7). De estas fracciones de las que se obtuvieron compuestos se encuentran descritos en la tabla 5.

Tabla 7. Fracciones obtenidas.

Denominación	Muestras	Mezcla de disolventes
KE1-12, 278.9mg	1-6	Hex/AcOEt 6:4
KE2-12, 433.2mg	7-8	Hex/AcOEt 6:4
KE3-12, 101.5mg	9-11	Hex/AcOEt 6:4
KE4-12, 490.0mg	12-22	Hex/AcOEt 6:4
KE5-12, 215.0mg	23-29	Hex/AcOEt 6:4
KE6-12, 140.0mg	30-35	Hex/AcOEt 6:4
KE7-12, 180.3mg	36-43	Hex/AcOEt 6:4
KE8-12, 345.1mg	44-70	Hex/AcOEt 6:4
KE9-12, 208.0mg	71-95	Hex/AcOEt 6:4
KE10-12, 299.5mg	96-109	Hex/AcOEt 6:4
KE11-12, 170.0mg	110-115	Hex/AcOEt 6:4
KE12-12, 185.3mg	116-139	Hex/AcOEt 6:4
KE13-12, 213.4mg	140-146	Hex/AcOEt 6:4
KE14-12, 250.6mg	147-153	Hex/AcOEt 6:4
KE15-12, 100.0mg	154-156	Hex/AcOEt 6:4
KE16-12, 170.0mg	157-320	Hex/AcOEt 6:4

KE17-12, 110.0mg	321-351	Hex/AcOEt 6:4
KE18-12, 120.0mg	352	Hex/AcOEt 6:4
KE19-12, 980.0mg	353	Acetato

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016).

Las fracciones de las cuales se obtuvieron los compuestos se encuentran especificadas en el siguiente diagrama (Figura 13).

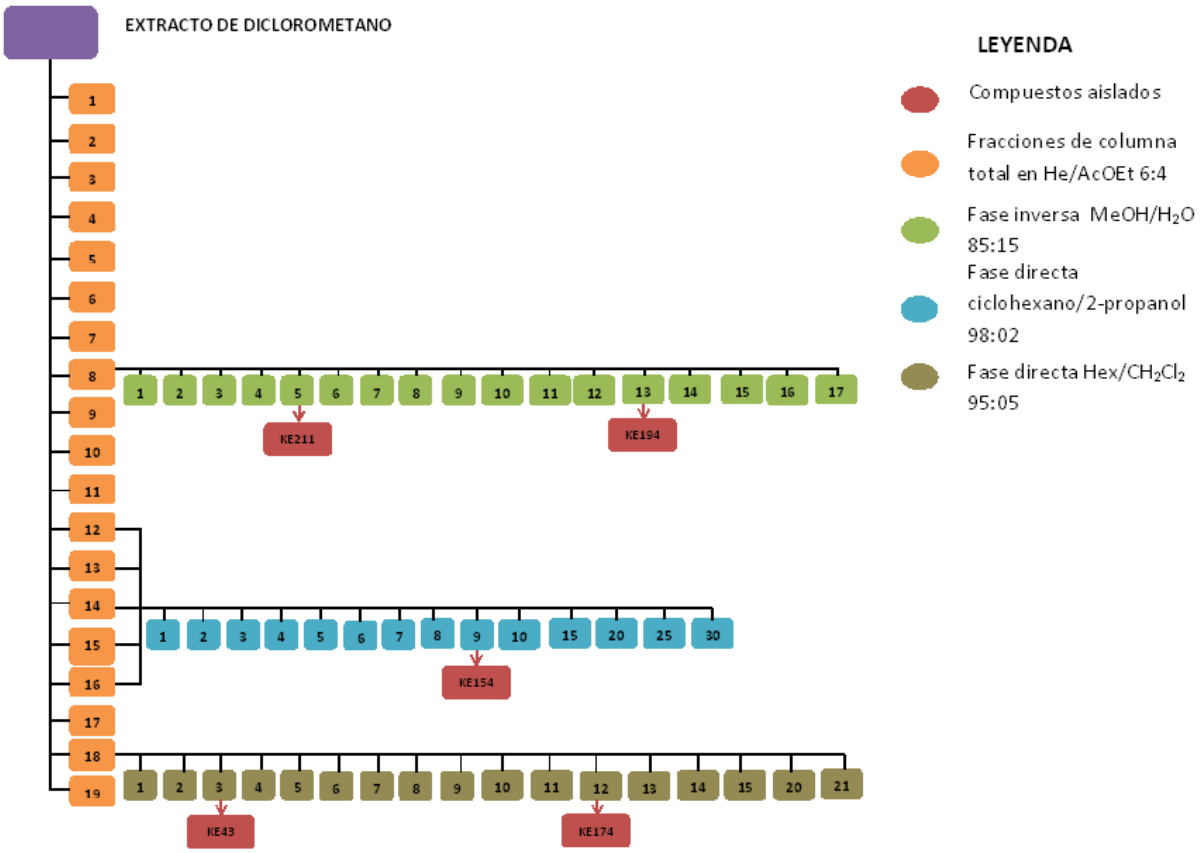


Figura 13. Diagrama cromatográfico del extracto de diclorometano.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016).

3.3 Identificación de la fracción KE154-60

Los espectros de ^{1}H-NMR y ^{13}C-NMR que se obtuvieron de la resonancia magnética nuclear, pueden ser observados en los anexos 1 y 2. A partir de su análisis, se estableció una estructura molecular, conocida como escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina) (Figura 14). Los datos que se obtuvieron como resultado de la parte experimental de esta investigación se observan a continuación:

Nombre: Escopoletina.

Fórmula molecular: $C_{10}H_8O_4$

Peso molecular: 192 g/mol

Aspecto físico: Polvo amorfo blanquecino.

Peso: 6 mg

Rf (fase directa: Hex/AcOEt 7:3)**:** 0.54

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$): 3.95 (3H, s, OCH3-6), 6.27 (1H, d, J=9.6 Hz, H-3), 6.84 (1H, s, H-8), 6.92 (1H, s, H-5), 7.60 (1H, d, J=9.3 Hz, H-4).

^{13}C-NMR (100MHz, $CDCl_3$): 157.3 (C-2), 113.4 (C-3), 143.2 (C-4), 107.4 (C-5), 150.2 (C-6), 143.9 (C-7), 103.2 (C-8), 149.6 (C-9), 111.4 (C-10), 56.4 (OCH_3-6).

EI-MS m/z (%):192 (M, 100), 177 (58), 149 (48), 164 (27), 69 (26), 121 (22), 79 (13), 51 (11), 65 (5), 92 (4), 105 (3), 74 (2), 46 (1). (Anexo 3)

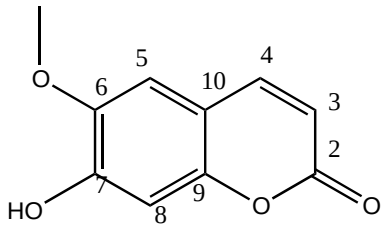


Figura 14. Estructura química de la escopoletina.

Fuente: (Kim, J., et al., 2006)

Elaborado por: (Autora, 2016)

El ^{1}H-NMR muestra dos dobletes en δ 6.27 ppm y δ 7.60 ppm que son característicos de los protones H-3 y H-4 respectivamente del anillo de pirona de la cumarina. Además, dos protones aromáticos singuletes a δ 6.84 y δ 6.92 ppm atribuidos a los protones H-5 y H-8 respectivamente, y un grupo metoxilo en singulete a δ 3.95 ppm.

Al comparar los espectros de la bibliografía con los datos del espectro de la muestra experimental coinciden con los que se observan en Kim, J., Kim, J., Shim, S., Lee, E., Jin, W., Bae, K., Kun, H., Kim, H., Kang, S., Chang, H. (2006), identificando así al compuesto como escopoletina.

En la figura 15 se muestra la CCF del compuesto Escopoletina.

A B C

Figura 15. CCF en Hex/AcOEt 7:3. A) Luz UV 360 nm. B) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. C) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

La escopoletina es una cumarina, que se reporta por primera vez en el género *Loricaria*, pero se encuentra en el género *Werneria* de la misma familia, además de encontrarse en otras familias como son la Apiaceae y Rutaceae.

También la escopoletina ha demostrado varios beneficios farmacológicos, como son: antifúngico, antitumoral, anti-inflamatorio, neurológicas, eliminación de radicales, actividad hepatoprotector y antialérgicas (Carneiro, K., Torres, L., Garcia, L., Garcia, S., Oliveira-neto, J., Marques, F., Garcia, T. A., Verly, R., Santos, W., & Gil, E. 2015).

3.4 Identificación de la fracción KE211-76

Mediante los espectros de ^{1}H-NMR y ^{13}C-NMR, se identificó el compuesto conocido como 5-hidroxi-obliquina (Figura 16). Los datos experimentales se observan a continuación:

Nombre: 5-hidroxi-obliquina

Fórmula molecular: $C_{14}H_{12}O_5$

Peso molecular: 260.242 g/mol

Aspecto físico: Polvo blanquecino.

Peso: 9 mg

Rf (fase directa: Hex/AcOEt 8:2)**:** 0.26

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$): 6.21 (1H, d, J=9.6 Hz, H-3), 7.98 (1H, d, J=9.6 Hz, H-4), 6.47 (1H, s, H-8), 4.38 (1H, dd, J=11.6 Hz, H-9), 4.06 (1H, dd, J=11.6 Hz, H-9'), 4.56 (1H, dd, J=7.8 Hz, H-10), 5.17 (1H, s, H-12), 5.20 (1H, s, H-12'), 1.87 (4H, s, H-13).

^{13}C-NMR (100MHz, $CDCl_3$): 161.6 (C-2), 115.5 (C-3), 141.2 (C-4), 112.2 (C-4a), 96.4 (C-5), 138.3 (C-6), 146.6 (C-7), 102.9 (C-8), 149.3 (C-8a), 68.0 (C-9), 76.5 (C-10), 138.9 (C-11), 127.4 (C-12), 18.9 (C-13).

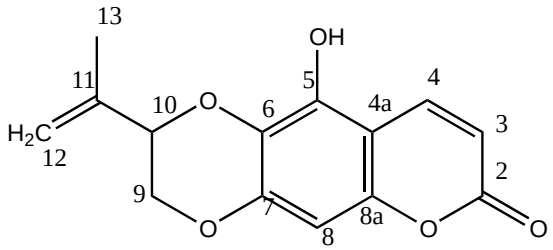


Figura 16. Estructura química de la obliquina.

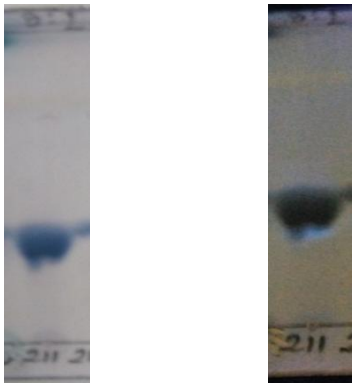
Fuente: (Bohlmann, F. & Zdero, C., 1979)

Elaborado por: (Autora, 2016)

El ^{1}H-NMR muestra dos dobletes en δ 6.21 ppm y δ 7.98 ppm que son característicos de los protones H-3 y H-4 respectivamente del anillo de pirona de la cumarina. Además de dos protones alquenos singuletes a δ 5.17 y δ 5.20 ppm atribuidos a los protones H-12 y H-12', con un protón aromático singulete a δ 6.47 ppm atribuido al protón H-8, y un grupo metilo en singulete a δ 1.87 ppm. También tiene tres protones a δ 4.38, δ 4.06 y δ 4.56 ppm atribuidos a los protones H-9, H-9' y H-10 correspondientemente.

Luego de realizar la comparación de los espectros de la muestra experimental con los espectros de la literatura (Bohlmann, F., & Zdero, C., 1980; Koorbanally, N., Randrianarivelojosia, M., Mulholland, D., Ufford, L., & Berg, A. 2002), se confirmó que se trata del compuesto conocido como 5-hidroxi-obliquina.

En la figura 17 se muestra la CCF del compuesto 5-hidroxi-obliquina.



A **B**

Figura 17. CCF en Hex/AcOEt 8:2. A) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. B) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

5-Hidroxi-obliquina es una cumarina, que se reporta por primera vez en el género *Loricaria*, pero se encuentra en el género *Helichrysum, Cassinia, Leontopodium, Myriocephalus* y *Actinobole* de la misma familia, además de encontrarse en otras familias como son la Rutaceae.

Al momento no se han reportado estudios biológicos de la 5-hidroxi-obliquina.

3.5 Identificación de la fracción KE43-27

A partir de la fracción KE18-12, 120.0mg, luego de ser sometida a una separación cromatográfica, se obtuvo la fracción KE43-27. Se procedió a la caracterización mediante resonancia magnética nuclear (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR). De acuerdo a los espectros se estima que la estructura del compuesto es un posible diterpeno. Los datos que se obtuvieron de la parte experimental se observan a continuación:

Compuesto: Posible diterpeno.

Fórmula molecular: No definida.

Peso molecular: No definido.

Aspecto físico: Polvo blanquecino.

Peso: 5 mg

Rf (fase directa: Hex/CH_2Cl_2 1:1)**:** 0.81

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$): 6.95 (2H, s), 6.30 – 6.45 (1H, m), 5.00 (1H, s), 2.23 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.20 (3H, s), 1.40 (3H, s).

^{13}C-NMR (100MHz, $CDCl_3$): 186.0, 149.2, 147.4, 145.6, 143.8, 135.8, 135.0, 133.8, 125.0, 42.5, 41.9, 37.5, 34.9, 34.6, 34.4, 30.5, 29.9, 29.7, 29.6, 23.7, 23.3

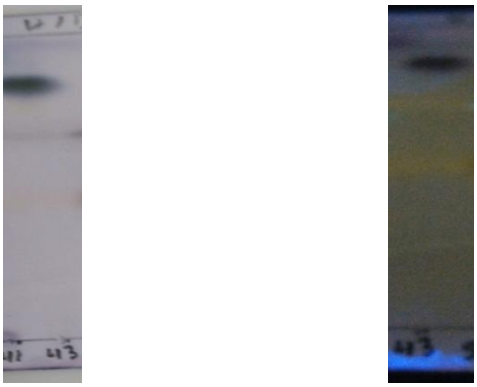
En el ^{1}H-NMR se observa la parte alifática en campos altos, los cuales corresponden a estructuras terpénicas, así como el número de metilos en campos altos del espectro protón es compatible con los terpenos. Además las señales en los campos bajos (7 ppm) son compatibles con sistemas aromáticos o dobles enlaces pobres en electrones (Anexo 6). De acuerdo con ^{13}C-NMR, por el número de carbonos se puede presumir que se trata de un diterpeno (20 carbonos).

En el ^{13}C-NMR a δ 186.0 ppm nos indican un grupo carbonilo probablemente un éster, δ 125.0-149.2 ppm nos indicarían los grupos aromáticos o protones de dobles enlaces y δ 23.3-42.5 ppm serían los CH_2 y CH_3 que faltan para el número de carbonos que se pueden observar en el espectro (20 carbonos) (Anexo 7).

Debido a la pequeña cantidad de compuesto no se pudieron realizar más pruebas para su debida identificación y tampoco se pudo obtener el peso molecular mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas debido a que la muestra no es volátil. Tiene apariencia de polvo blanquecino.

La hipótesis planteada, por lo tanto indicaría que se trata de un diterpeno con una parte aromática, lo que no es común en esta familia de compuestos o un compuesto aromático que pertenece a la vía del ácido shikímico, que es una molécula prenilada.

En la figura 18 se muestra la CCF del posible diterpeno.



A **B**

Figura 18. CCF en Hex/CH_2Cl_2 1:1. A) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. B) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

Los diterpenos han demostrado varios efectos farmacológicos como son: antinflamatorio, antimicrobiano, bactericida, relajante uterino, antitumoral y fungicida (Leandro, L., Vargas, F., Souza, P., Oliveira, J., Silva, J., & Florencio, V. 2012).

3.6 Identificación de la fracción KE194-73

A partir de la fracción KE8-12, 345.1mg y luego de ser sometida a separación cromatográfica se obtuvo la fracción KE194-73, a la cual se le realizó una caracterización mediante resonancia magnética nuclear (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR). De acuerdo con los espectros se presume que la molécula es un posible triterpeno. Los datos experimentales se observan a continuación:

Compuesto: Posible triterpeno.

Fórmula molecular: No definida.

Peso molecular: No definido.

Aspecto físico: Polvo blanquecino.

Peso: 7 mg

Rf (fase inversa: MeOH/H_2O 9:1)**:** 0.07

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$): 5.27 – 5.29 (1H, m), 3.13 – 3.17 (1H, m), 2.53 – 2.59 (1H, m), 2.50 (1H, s), 1.33 (5H, s), 1.19 (3H, s), 0.97 (4H, s), 0.93 – 0.94 (5H, d), 0.78 – 0.79 (6H, d).

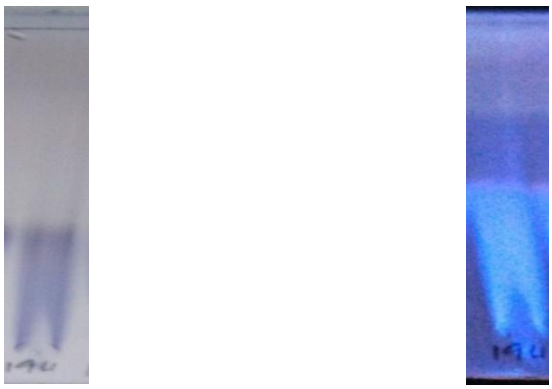
^{13}C-NMR (100MHz, $CDCl_3$): 182.4, 144.6, 139.9, 129.5, 129.4, 79.8, 73.6, 56.7, 55.0, 43.0, 42.6, 41.0, 39.9, 39.8, 39.0, 38.1, 34.1, 29.6, 28.7, 27.8, 27.2, 27.0, 26.6, 24.7, 19.6, 17.5, 16.6, 16.3, 15.8

En el ^{1}H-NMR se observa que este compuesto tiene sistemas de señales que corresponden a compuestos alifáticos, lo cual es compatible con la estructura de un compuesto terpénico (Anexo 8). Además el número de carbonos nos hace pensar que es un triterpeno (30 carbonos), así como el número de metilos que se encuentran en campos altos del espectro protón; siendo así la hipótesis sustentable.

En el ^{13}C-NMR a δ 182.6 ppm nos indican un grupo carbonilo probablemente un éster, δ 129.4-144.6 ppm nos indicarían los grupos aromáticos o protones de dobles enlaces, δ 55.0-79.8 ppm podrían ser señales de tipo éter o alcohol y δ 15.8-43.0 ppm serían los CH_2 y CH_3 que faltan para el número de carbonos que se pueden observar en el espectro (30 carbonos) (Anexo 9).

Al no tener suficiente cantidad de compuesto no se pudieron realizar más pruebas para su debida caracterización y tampoco se pudo obtener el peso molecular mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas debido a que la muestra no es volátil.

En la figura 19 se muestra la CCF del posible triterpeno.



A **B**

Figura 19. CCF en MeOH/H_2O 9:1. A) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. B) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

Los beneficios farmacológicos de los triterpenos son: potente actividad anti-VIH, anticancerígena, antinflamatoria, antimicrobial, anticonceptivo y antihelmíntico (Cichewicz, R., & Kouzi, S., 2003).

3.7 Identificación de la fracción KE174-68

Al tener el compuesto KE174-68 se realizaron pruebas de resonancia magnética nuclear (^{1}H-NMR) que se observan en la figura 20. Según los espectros se puede suponer que se trata de una mezcla de al menos dos ácidos grasos insaturados. Los datos experimentales se observan a continuación:

Compuesto: Posible ácido graso.

Fórmula molecular: No definida.

Peso molecular: No definido.

Aspecto físico: Sólido amorfo amarillento.

Peso: 5 mg

Rf (fase directa: Hex/2-propanol 99:01)**:** 0.14

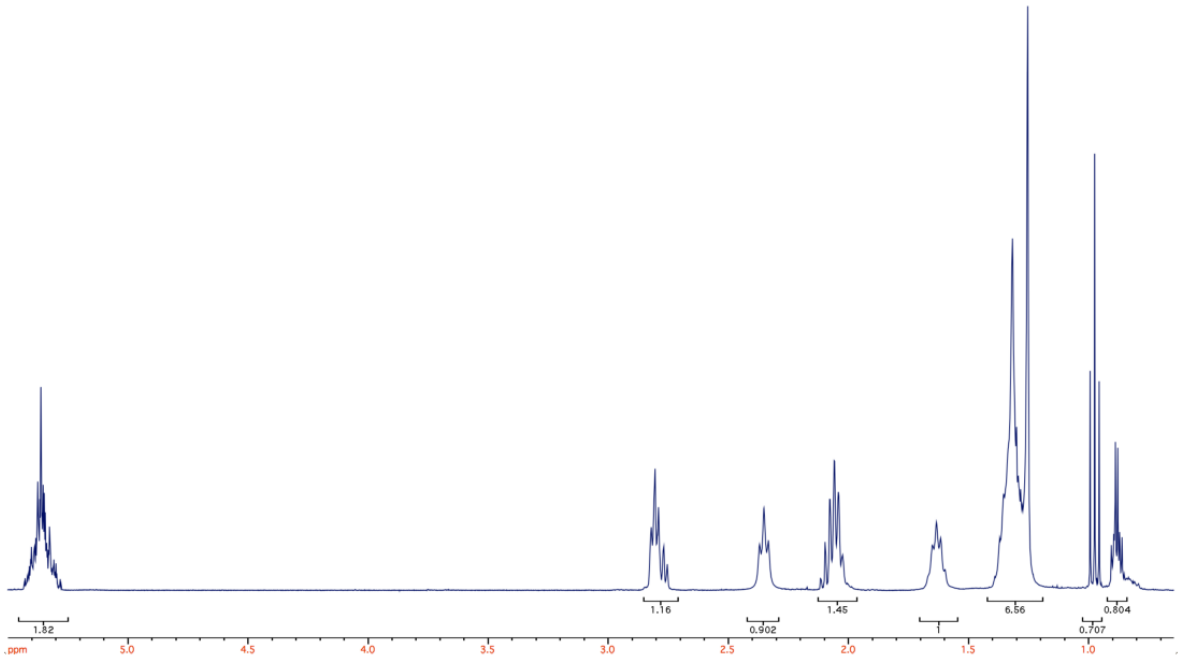


Figura 20. Espectro de ^{1}H-NMR de la fracción KE174-68

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

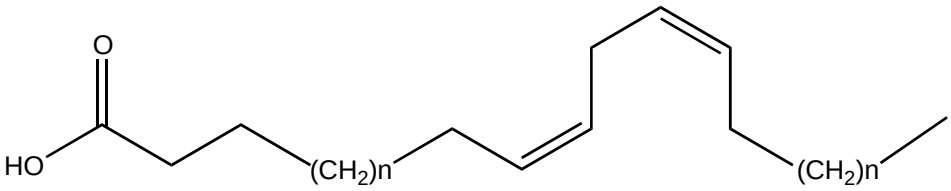


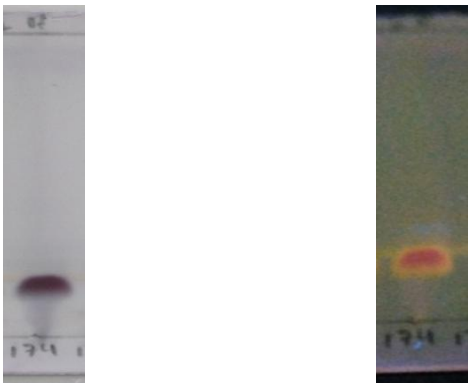
Figura 21. Estructura de un ácido graso libre.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

El espectro muestra una mezcla de dos ácidos grasos que no se han podido separar mediante CC, además al tener poca cantidad de compuesto no se pudo realizar más pruebas y debido a ese motivo no se puede saber cuantos carbonos contiene, pero se presume que al menos uno de los dos compuestos es el ácido linoleico, ya que se encuentra en mayor cantidad en la naturaleza.

En ^{1}H-NMR debido a la pequeña cantidad no se pudo caracterizar completamente la molécula, sin embargo por las señales que presenta se puede presumir que se trata de un ácido graso libre, debido a que en las señales del espectro no se observa ninguna señal de glicerina ni éster confirmando la hipótesis (Figura 21).

En la figura 22 se muestra la CCF de la mezcla de ácidos grasos.



A **B**

Figura 22. CCF en Hex/2-propanol 99:01. A) Luego de usar el agente revelador ácido sulfúrico 5% y vainillina. B) Luz UV 360 nm luego de usar el agente revelador.

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

3.8 Ensayos biológicos

Los ensayos se realizaron a las muestras KE43-27, KE194-73 y KE211-76, obteniendo los siguientes resultados (tabla 8):

Tabla 8. Resultados de la actividad inhibitoria de las colinesterasas.

Fracciones	AChE, 25mU/ml	BuChE, 25mU/ml
KE43-27	3.06+/-0.56	3.42+/-0.87
KE194-73	>50	>50
KE211-76	>50	18.45+/-15.83

Fuente y elaborado por: (Autora, 2016)

Los resultados obtenidos muestran que la fracción KE43-27 mostró una significativa actividad inhibitoria a la AChE y BuChE con concentración de 3.06 y 3.42 mU/ml respectivamente, mientras que la fracción KE211-76 (5-hidroxi-obliquina) sólo presenta actividad inhibitoria a la enzima BuChE con una concentración de 18.45 y la fracción KE194-73 no presenta ninguna actividad inhibitoria a las enzimas ensayadas.

La fracción KE211-76 presenta un mayor margen de error (15.83), debido a que la fracción no se disolvió totalmente en DMSO y se necesitaría mayor cantidad de DMSO para disolverla y eso provocaría alteraciones en los resultados.

Estos resultados nos indicarían que las fracciones que salieron positivas, son de gran importancia en el campo medicinal, debido a que la acetilcolinesterasa interviene en los impulsos nerviosos y la butirilcolinesterasa actúa evitando la inflamación de la placa amiloide.

CONCLUSIONES

- El extracto con mayor rendimiento fue el de metanol, con un rendimiento de 5.42% y los extractos que le siguen son el de diclorometano con 2.24% y el de acetato de etilo con 0.52%.

- A partir del fraccionamiento en columna del extracto en diclorometano, se aislaron cinco compuestos. Mediante técnicas espectroscópicas se identificaron dos compuestos que son la escopoletina y 5-hidroxi-obliquina; y tres compuestos que se presumen que son un posible diterpeno, un posible triterpeno y una mezcla de al menos 2 ácidos grasos insaturados.

- La fracción KE43-27 mostró actividad inhibitoria frente a las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, mientras que la fracción KE211-76sólo mostró actividad inhibitoria a la enzima butirilcolinesterasa. Las demás fracciones no presentaron actividad.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio fitoquímico de la especie *Loricaria thuyoides* en el extracto de metanol, el cual no se ha estudiado hasta el momento, pudiendo así determinar la presencia de compuestos que pueden contribuir en el aspecto farmacológico. Además se puede realizar estudios similares en las otras especies del género *Loricaria*, por lo que todavía no se han realizado estudios hasta la actualidad.

- Confirmar la estructura molecular de los compuestos que no fueron identificados en su totalidad, especialmente de la fracción KE43-27, debida a que presenta buenos resultados en el ensayo biológico.

BIBLIOGRAFÍA

Achika, J., Arthur, D., Gerald, I., & Adedayo, A. (2014). *A review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the asteraceae family*, *7*(8), 1–8.

Aguirre, N., Heerma, O., & Hofstede, R. (2001). *Sistemas Forestales integrales para la Sierra del Ecuador* (Primera ed). Quito: Editorial Abya Yala.

Aguirre, Z., Madsen, J., Cotton, E., & Balslev, H. (2002). *Botánica Austroecuatoriana* (Primera ed). Quito: Ediciones ABYA YALA.

Alpízar, C., & Morales, C. (2003). *La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa*. *45*. Retrieved from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022003000200005

Armijos, C., Lozano, M., Bracco, F., Vidari, G., & Malagón, O. (2012). *Plantas sagradas y psicoactivas usadas por los saraguros en la región sur del Ecuador* (Primera ed.). Loja: Ediloja.

Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, *2*(3), 119–145.

Barata, S. (2007). *Identificación de cumarinas en especies autóctonas del género pterocaulon ell. Carrera de Farmacia*. Universidad de Belgrano

Beyer, H., & Wolfgang, W. (1987). *Manual De Química Orgánica* (19 ed.). Barcelona: Editorial Reverté.

Bohlmann, F., & Zdero, C. (1980). *Neue obliquin-derivate aus Helichrysum serpyllifolium.* Vol 19, 331–332.

Carneiro, K., Torres, L., Garcia, L., Garcia, S., Oliveira-neto, J., Marques, F., Garcia, T. A., Verly, R., Santos, W., & Gil, E. (2015). *Eletrochemical characterization of Scopoletin, a 7-hydroxy-6-methoxy-coumarin*. *10*, 5714–5725.

Casas, J. (2004). *Producción de Lovastatina a partir de Aspergillus terreus en un reactor de lecho fluidizado*. Universidad de Almería, Almería.

Castellanos, F. (2014). *Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura - actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano*. Universidad Nacional de Colombia.

Castillo, E., & Martínez, I. (2007). *Manual de Fitoterapia* (Primera ed). Barcelona: Editorial Elsevier.

Cichewicz, R., & Kouzi, S. (2003). *Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection*, *24*(1), 90–114

CONEC. (2012). *Etnobotánica, una ciencia de personas y plantas*. Retrieved from http://www.conec.es/2012/01/etnobot%C3%A1nica-una-ciencia-de-personas-y-plantas/

De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador* (Primera ed). Quito: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicasde la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Espinoza, K. (2015). *Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie Loricaria thuyoides (Lam.) Sch. Bip. Loja-Ecuador*. Universidad Técnica Particular de Loja.

EUFIC. (2002). *Las plantas medicinales: sabiduría ancestral en el mundo de hoy.* Retrieved from http://www.eufic.org/article/es/artid/plantas-medicinales/

Ferraro, G., Martino, V., Barnoldi, A., & Nadinic, J. (2015). *Fitocosmética. Fitoingredientes y otros productos naturales* (Primera ed). Buenos Aires: Eudeba.

Fonnegra, R., & Jiménez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia* (Segunda ed). Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.

Garibello, C. (2010). *Estudio de hojas de Pentacalia vaccinioides (Kunth) como nueva fuente natural de sustancias esteroidales y cumarinas*, 103. Retrieved from http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/822/1/cien23.pdf

Gennaro, A. (2003). *Remington Farmacia* (20 edición). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Gutiérrez, M., & Droguet, M., (2002). *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas.* 35–41.

Heinrich, M., Robles, M., West, J., Ortiz, B. & Rodríguez, E. (1998). *Ethnopharmacology of mexican asteraceae (Compositae).*

Ibarra, E., & Linares, T. (2012). *La inhibición de la actividad colinesterásica sanguínea como biomarcador de exposición a compuestos organofosforados y carbamatos.* 59-65. Retrieved from http://bvs.sld.cu/revistas/rst/vol13_3_12/rst09312.htm

Kim, J., Kim, J., Shim, S., Lee, E., Jin, W., Bae, K., Kun, H., Kim, H., Kang, S., Chang, H. (2006). *Chemical constituents of the root of Dystaenia takeshimana and their anti-inflammatory activity. Archives of Pharmacal Research*, *29*(8), 617–623. http://doi.org/10.1007/bf02968244

Koorbanally, N., Randrianarivelojosia, M., Mulholland, D., Ufford, L., & Berg, A. (2002). Bioactive Constituents of Cedrelopsis microfoliata, 1349–1352.

Kubitzki, K., Kadereit, J., & Jeffrey, C. (2007). *The Families and Genera og Vascular Plants* (Volumen 8). Alemania: Editorial Springer.

Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., & Maestri, D. (2008). *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica* (Primera ed). Argentina: Editorial Encuentro.

Lavabre, M. (1990). *Aromaterapia. Libro práctico* (Primera ed). México: Editorial Lasser Press Mexicana, S.A.

Leandro, L., Vargas, F., Souza, P., Oliveira, J., Silva, J., & Florencio, V. (2012). *Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (Copaifera spp.) Oleoresins*, 3866–3889. http://doi.org/10.3390/molecules17043866

Llorente, J., & Morrone, J. (2001). *Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: Teorías, conceptos, métodos y aplicaciones* (Primera ed). México: Universidad Autónoma de México.

Manahan, S. (2007). *Introducción a la química ambiental* (Primera ed). México: Editorial Reverté

Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica* (Segunda ed). Caracas: Editorial Torino

Marco, A. (2010). *Química de los productos naturales* (Primera ed). Madrid: Editorial Síntesis.

MECN-INB. (2015). *Plantas de los Paramos del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador*.

Molina, J., & García, A. (2001). *Alcamidas en plantas: distribución e importancia*. *Avance Y Perspectiva*, *20*(Noviembre-Diciembre), 377–387.

Jørgensen, P., & León, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador.* Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 75: i–viii, 1–1182.

Pagana, K., & Pagana, T. (2008). *Guía de pruebas diagnósticas de laboratorio* (Octava edi). Barcelona: Editorial Elsevier.

Rave, P., Evert, R., & Eichhorn, S. (1992). *Biología de las plantas*. Barcelona: Editorial Reverté.

Reija, B. (2007). *Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes*. Universidad de Santiago de Compostela.

Restrepo, M., Quintero, P., & Fraume, N. (2005). *El milagro de las plantas: Aplicaciones medicinales y orofaríngeas*. Bogotá: Editorial San Pablo.

Schauenberg, P., & Paris, F. (1980). *Guía de las Plantas Medicinales* (Cuarta edi). Barcelona: Ediciones Omega.

Silva, M., García, M., Castillo, L., Ania, J., & Gómez, D. (2006). *Técnicos Especialistas de Laboratorio del Servicio Vasco de Salud-Osakidetza* (Segunda ed). España: Editorial Mad.

Sklénar, P., & Balslev, H. (2005). *Superpáramo plant species diversity and phytogeography in Ecuador. Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, *200*(5), 416–433. http://doi.org/10.1016/j.flora.2004.12.006

Stancik, D. (1999). *Loricaria thuyoides*. Instituto de Ciencias Naturales. Retrieved from http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=313349

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Primera ed). España: Universidad Jaume.

Tomas, F. (1993). *Química Orgánica Estructural* (Primera ed). Murcia: Universidad de Murcia.

Valcárcel, M., & Gómez, A. (1988). *Técnicas Analíticas de Separación* (Primera ed). España: Editorial Reverté.

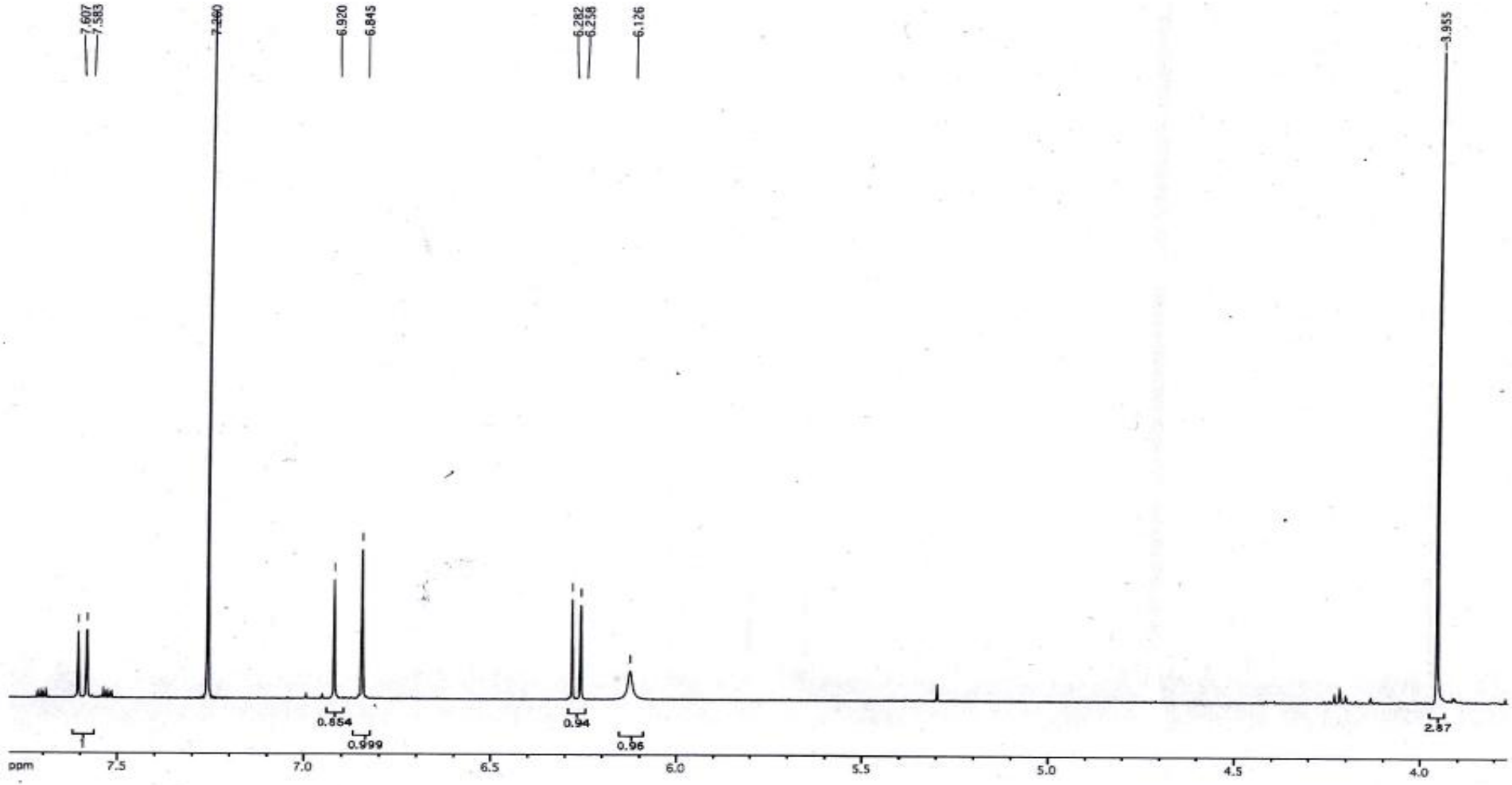
Voet, D., & Voet, J. (2006). *Bioquímica* (Tercera ed). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Zuluaga, G. (2015). *Plantas Medicinales en el Mundo Moderno*. Retrieved from http://www.wanamey.org/plantas-medicinales-2/plantas-medicinales-mundo.htm

ANEXOS

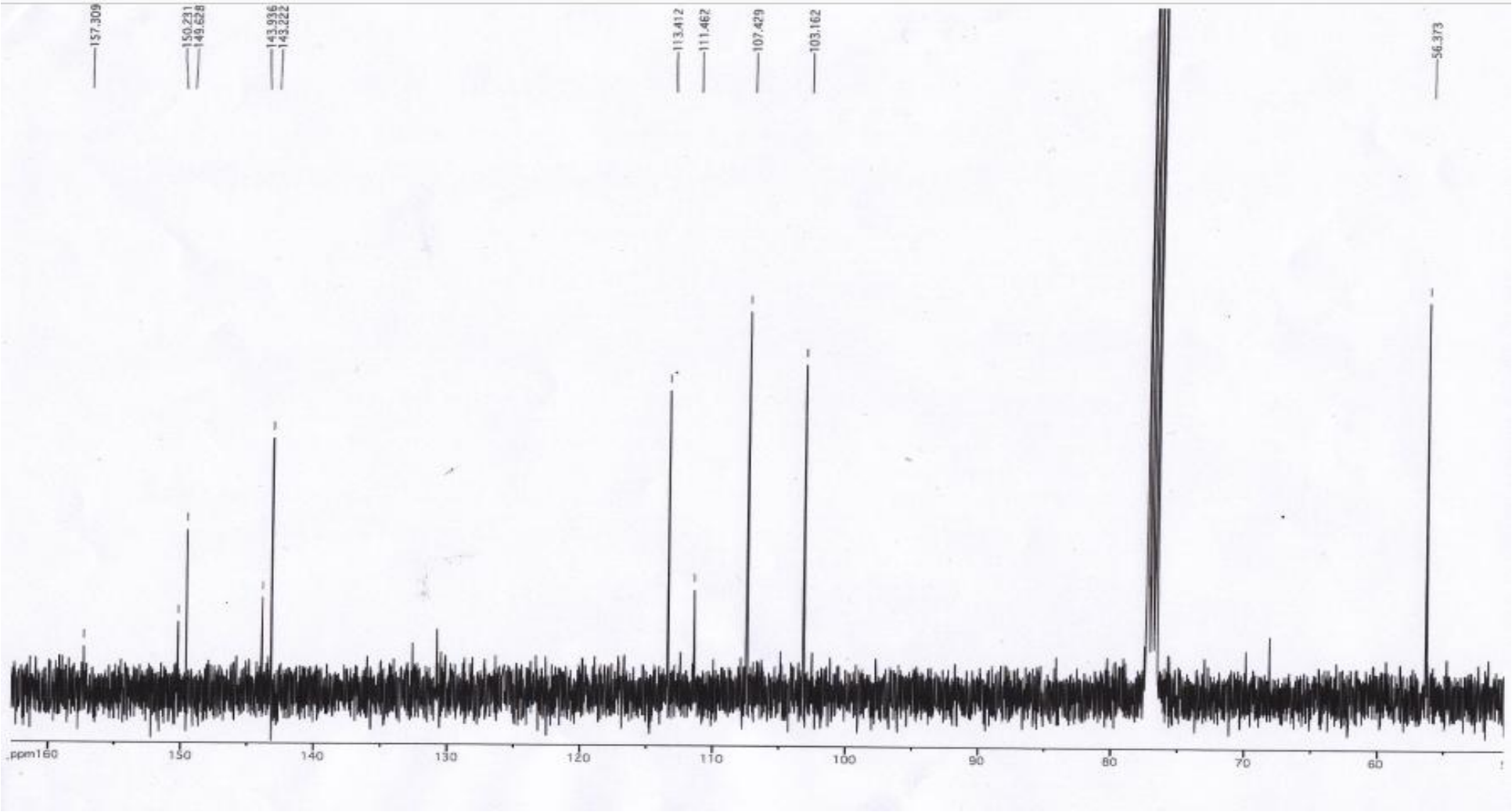
ANEXO 1.

Espectro de ^{1}H-NMR de la fracción KE154-60 (Escopoletina).



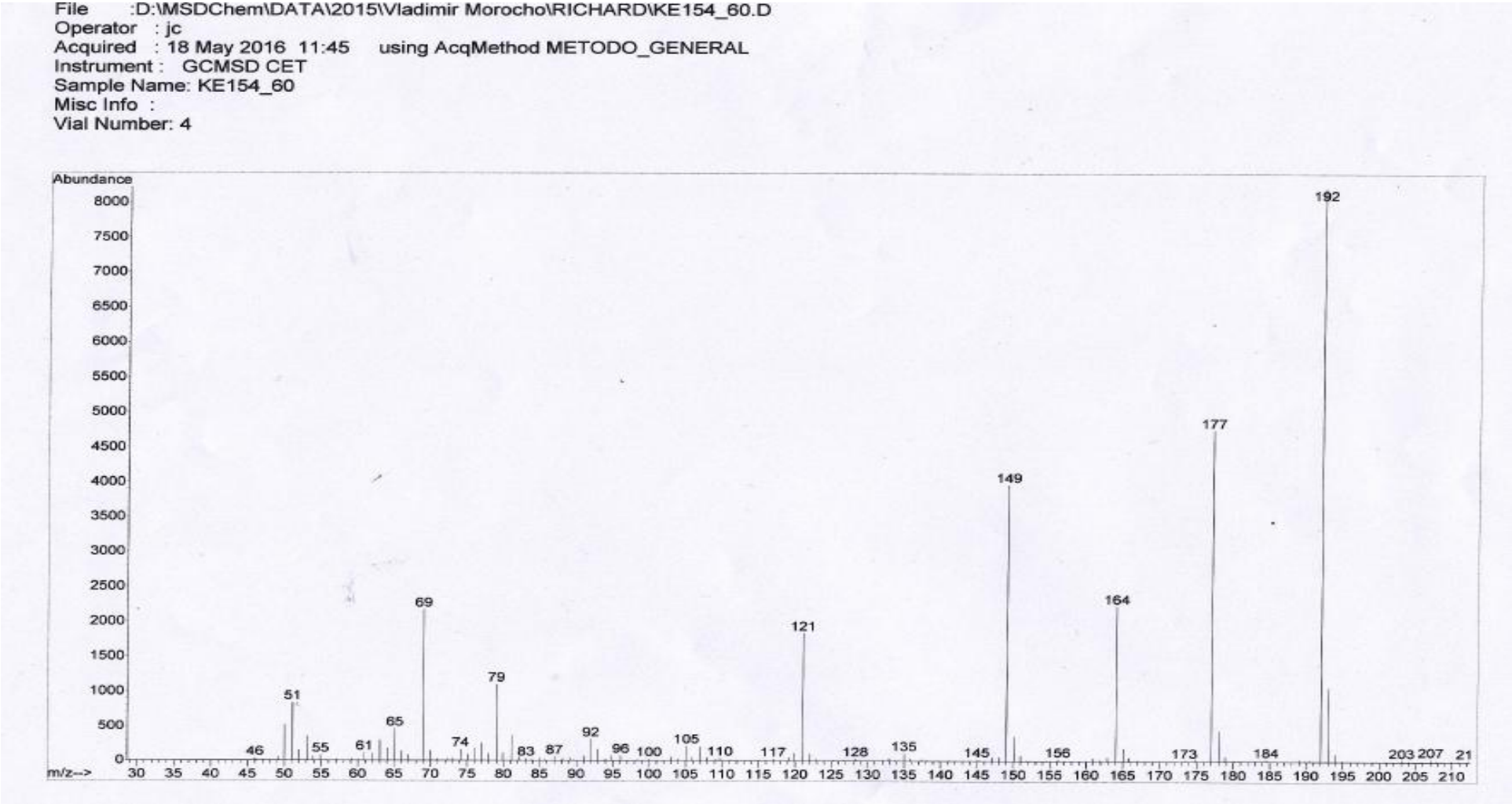
ANEXO 2.

Espectro de ^{13}C-NMR de la fracción KE154-60 (Escopoletina).



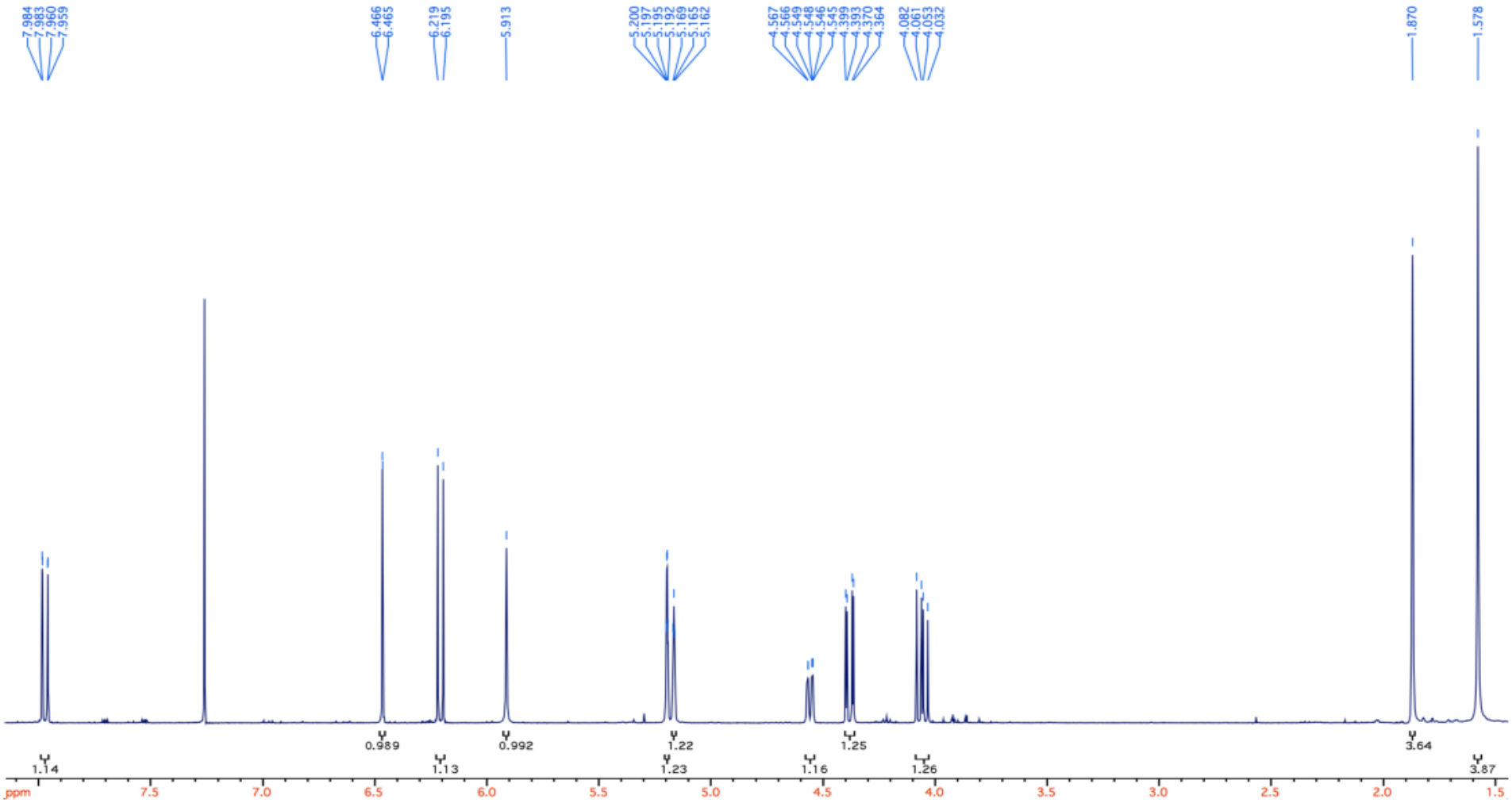
ANEXO 3.

Cromatografía de gases combinada a espectrometría de masas de la fracción KE154-60 (Escopoletina).



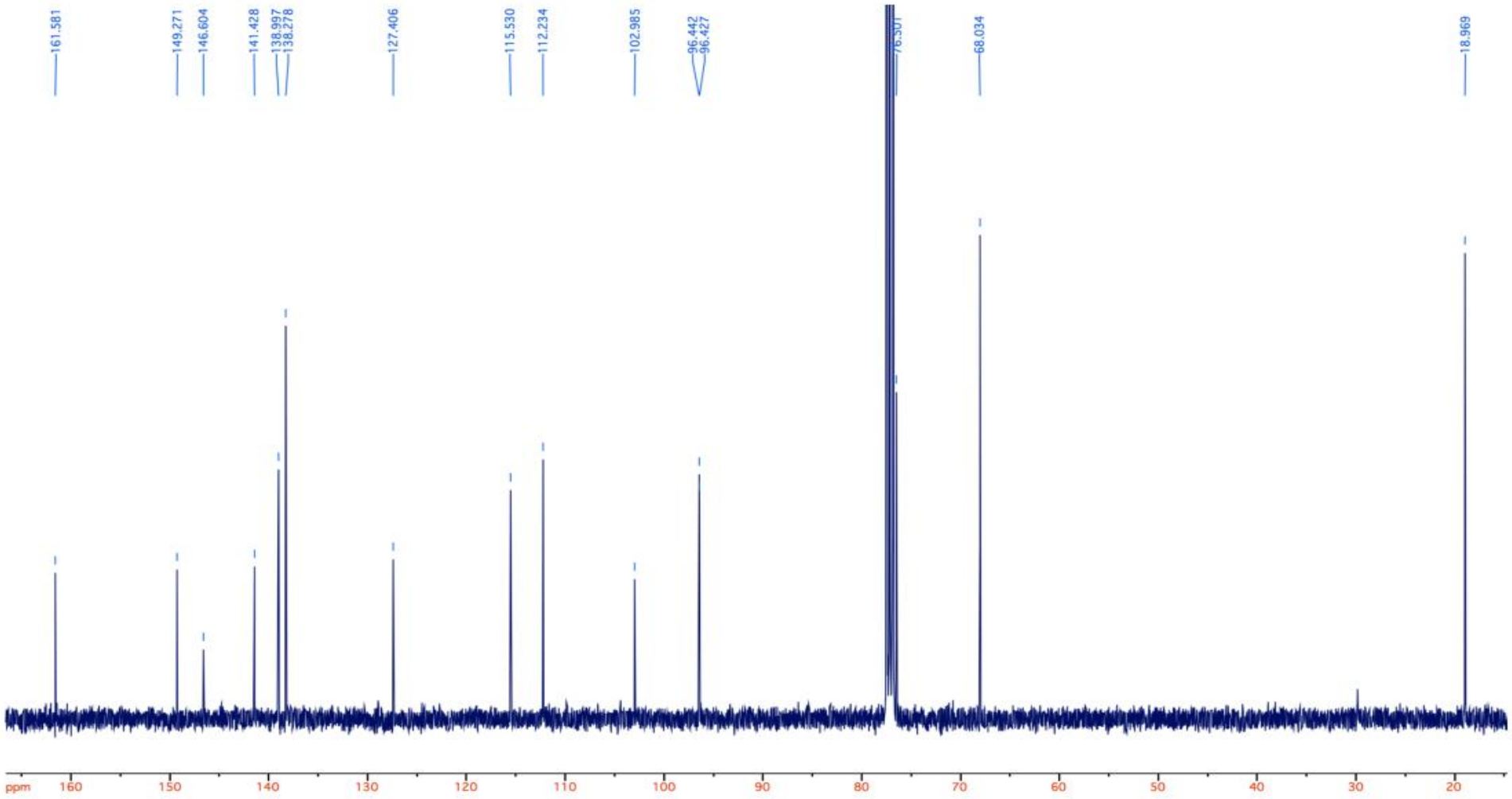
ANEXO 4.

Espectro de ^{1}H-NMR de la fracción KE211-76 (5-hidroxi-obliquina).



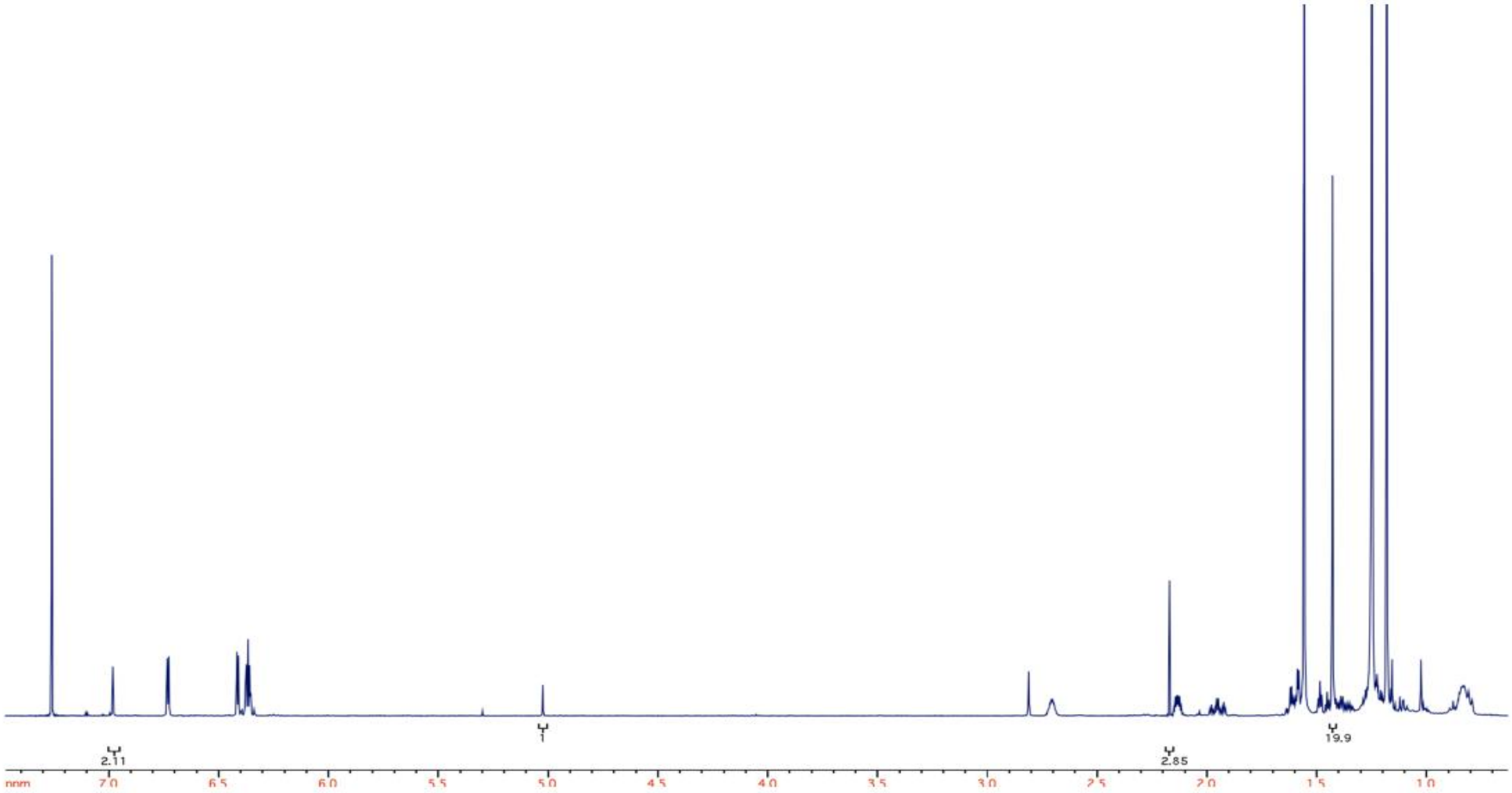
ANEXO 5.

Espectro de ^{13}C-NMR de la fracción KE211-76 (5-hidroxi-obliquina).



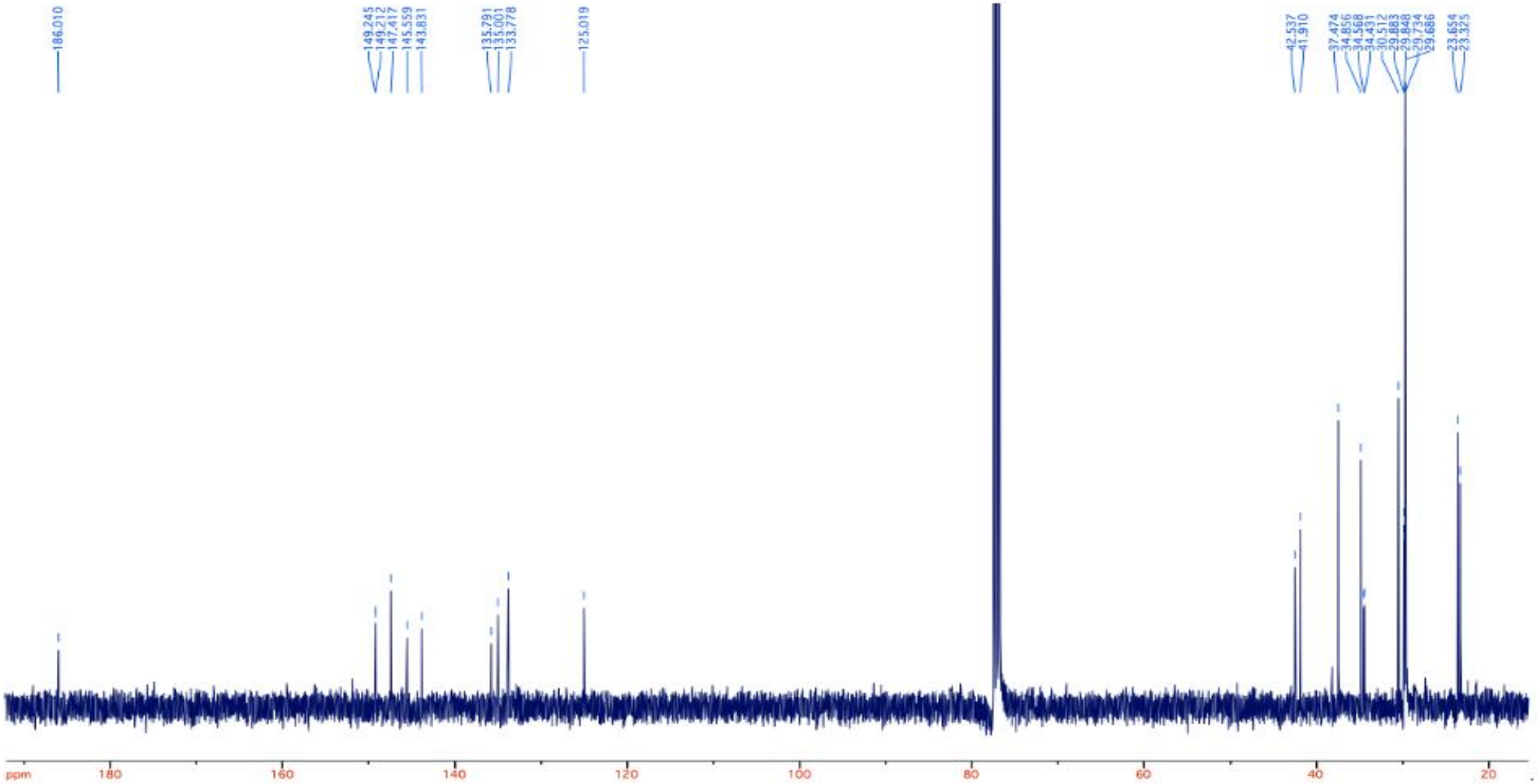
ANEXO 6.

Espectro de ^{1}H-NMR de la fracción KE43-27



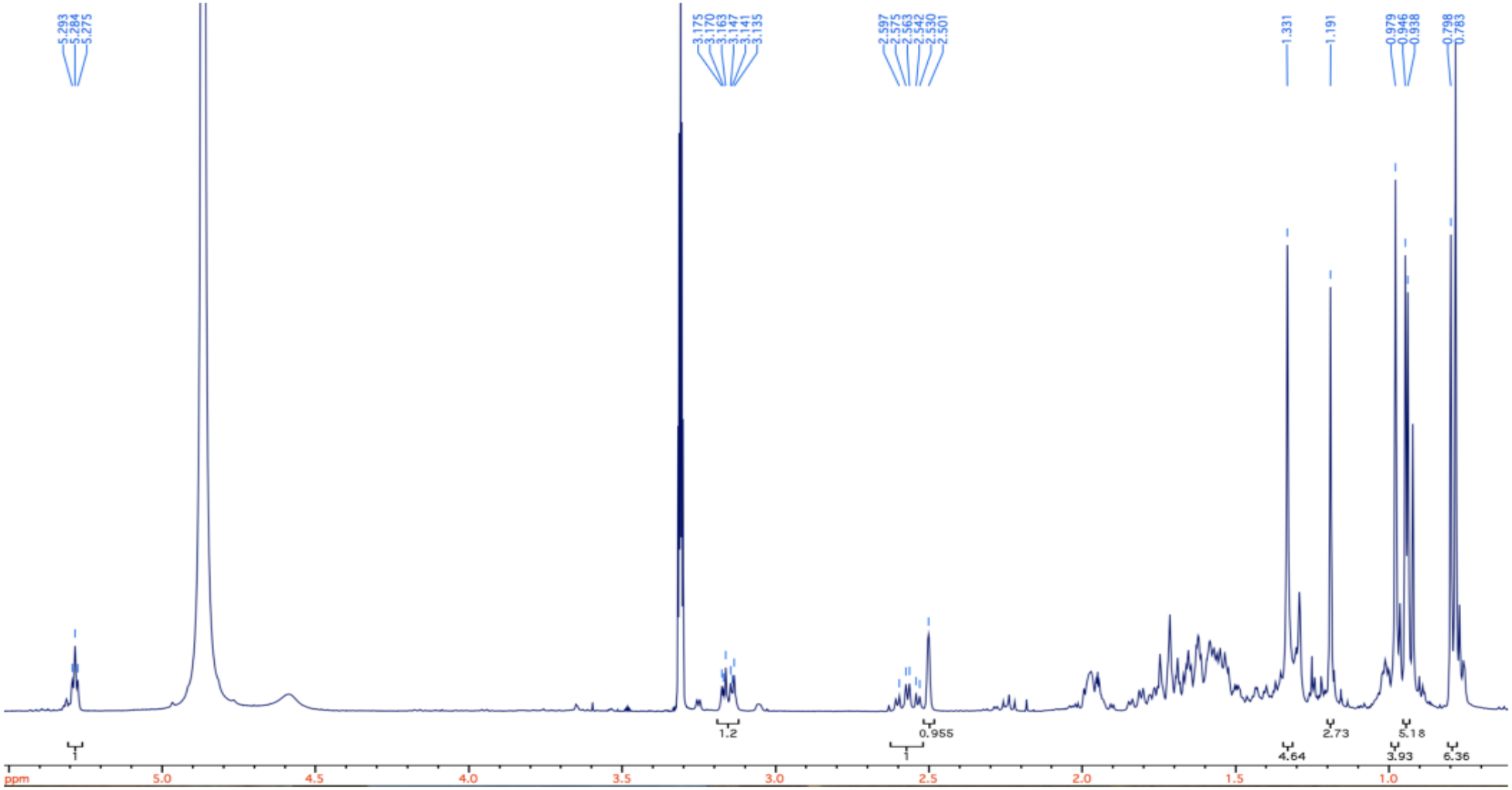
ANEXO 7.

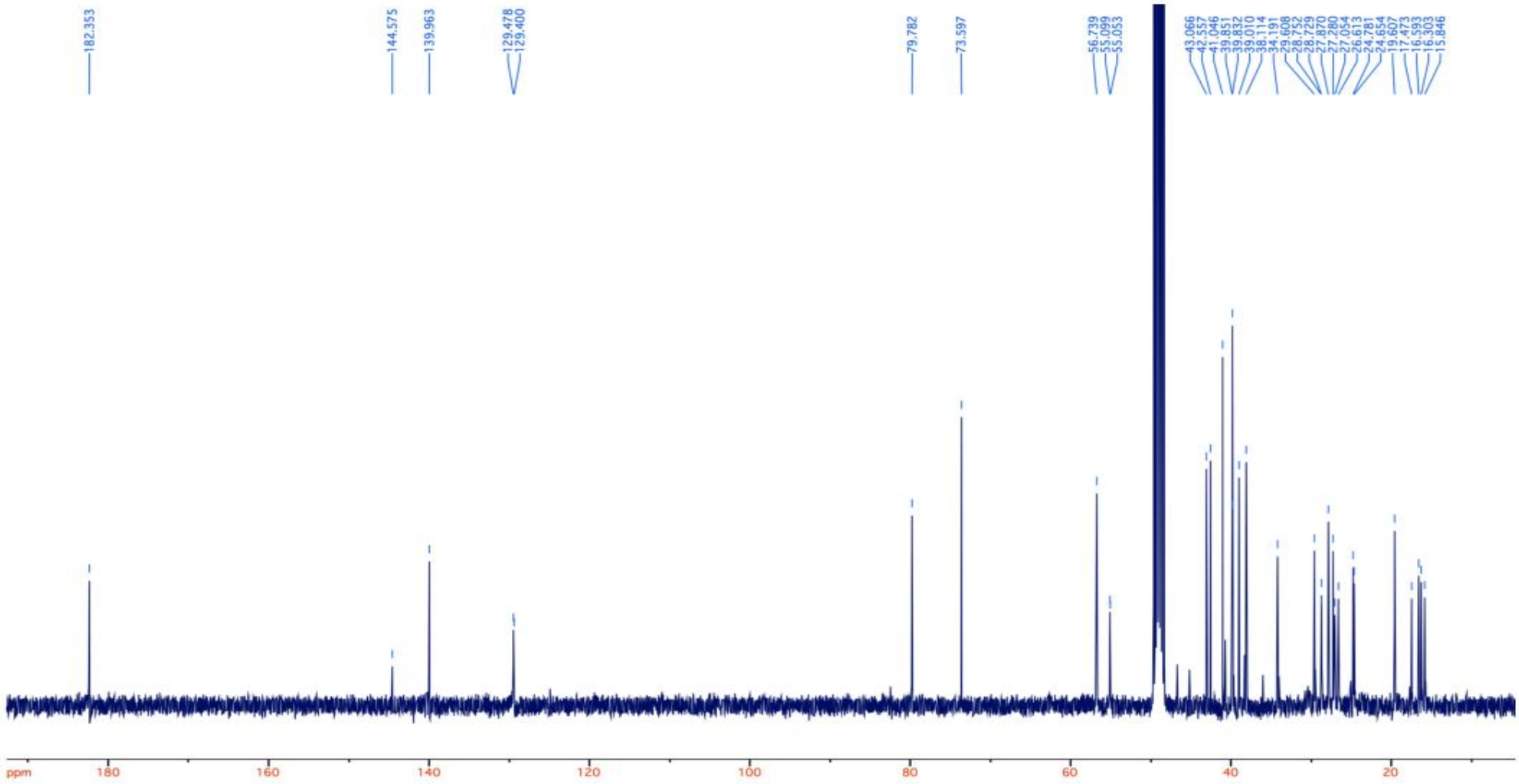
Espectro de ^{13}C-NMR de la fracción KE43-27



ANEXO 8.

Espectro de ^{1}H-NMR de la fracción KE194-73



ANEXO 9.

Espectro de ^{13}C-NMR de la fracción KE194-73