



# UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

## ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

### TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

**Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de la raíz de la especie *Monnina crassifolia* (Ivilán)**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**AUTOR:** Hidalgo Serrano, Paúl Andrés

**DIRECTOR:** Malagón Avilés, Omar Germán, Ph.D.

**COTUTORA:** Mera Aguas, Moraima Cristina, Dra.

LOJA – ECUADOR

**2017**



*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, 2017*

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Malagón Avilés, Omar Germán

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de la raíz de la especie *Monnina crassifolia* (Ivilán)”, realizado por Paúl Andrés Hidalgo Serrano, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2017

f) \_\_\_\_\_

Malagón Avilés Omar Germán

C.I:

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Paúl Andrés Hidalgo Serrano declaro ser autor del presente trabajo de titulación: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de la raíz de la especie *Monnina crassifolia* (Ivilán)”, de la titulación de Ingeniería Química, siendo el Ph.D. Malagón Avilés Omar Germán 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 que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f) \_\_\_\_\_

**Autor:** Paúl Andrés Hidalgo Serrano

**C.I.** 1104971393

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a Dios por permitirme cumplir uno de mis objetivos e iluminarme durante mi vida como estudiante, así mismo a mis padres Rosa, Humberto, y mi hermana Kathy por ser un pilar fundamental durante mi vida, y brindarme todo su apoyo para la culminación de mis estudios, y tener la dicha de compartir junto a ustedes este logro.

Paúl

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecer primeramente a Dios quien ha sido mi guía durante el trayecto de mi vida, por todas las bendiciones que me dado, y acompañarme durante el logro de esta meta.

A mi familia, especialmente a mis padres por todo su amor, confianza y sacrificio que han realizado para yo cumplir esta meta, les agradezco de todo corazón que ahora este cumpliendo unos mis sueños y les prometo no defraudarlos en mi vida profesional.

Al Ing. Paulo Cedeño quien con sus conocimientos y apoyo siempre estuvo dispuesto para ayudarme durante mi investigación en el laboratorio.

Me gustaría agradecer a mi tutor de tesis Dr. Omar Malagón por su paciencia, orientación y sus valiosos conocimientos para el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación, así mismo al PhD. Gianluca Gilardoni y al Dr. Jorge Ramírez por su guía y apoyo para la culminación de este proyecto.

Finalmente me gustaría agradecer al Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja por todos los recursos brindados para la culminación de este proyecto.

Paúl

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| PORTADA  | I   |
| APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN | I   |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS      | III |
| DEDICATORIA                                      | IV  |
| AGRADECIMIENTO                                   | V   |
| ÍNDICE DE TABLA                                  | IX  |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                | X   |
| ÍNDICE DE ANEXOS                                 | XII |
| RESUMEN  | 13  |
| ABSTRACT   | 13  |
| INTRODUCCIÓN                                     | 15  |
| CAPITULO 1                                       | 16  |
| FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO        | 17  |
| CAPITULO 2                                       | 18  |
| 1. FUNDAMENTO TEÓRICO                            | 18  |
| 1.1 Plantas medicinales                          | 19  |
| 1.2 Familia Polygalaceae                         | 20  |
| 1.3 Género <i>Monnina</i>                        | 20  |
| 1.4 <i>Monnina crassifolia</i>                   | 21  |
| 1.4.1 Taxonomía                                  | 21  |
| 1.5 Metabolitos de interés                       | 21  |

|       |  |           |
|-------|--|-----------|
| 1.5.1 | Saponinas  | 21        |
| 1.5.2 | Xantonas   | 23        |
| 1.6   | <b>Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</b>  | <b>23</b> |
| 1.7   | <b>Espectrometría de masas (CG-EM)</b>   | <b>24</b> |
|       | <b>CAPITULO 3</b>  | <b>25</b> |
| 2.    | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | <b>25</b> |
| 2.1   | Esquema de metodología   | 26        |
| 2.2   | Obtención de extractos   | 26        |
| 2.3   | Separación por decantación del extracto metanólico   | 27        |
| 2.4   | Fraccionamiento del extracto metanólico (fase butanólica)                                  | 27        |
| 2.5   | Cromatografía en capa fina   | 27        |
| 2.6   | Purificación de la fracción MC028  | 27        |
| 2.7   | Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI) de las fracciones obtenidas             | 27        |
| 2.8   | Ensayo de inhibición de monoamina oxidasa (MAO) de las fracciones obtenidas                | 28        |
|       | <b>CAPITULO 4</b>  | <b>29</b> |
| 3.    | <b>RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>   | <b>29</b> |
| 3.1   | Extractos obtenidos de la especie <i>Monnina crassifolia</i>                               | 30        |
|       | Fuente: El autor, 2017.  | 30        |
| 3.2   | Fraccionamiento del extracto de metanol  | 30        |
| 3.3   | Fracción MCO28   | 32        |
| 3.3.1 | Cromatografía preparativa de la fracción F28-4   | 33        |
| 3.4   | Interpretación de resultados por Resonancia Magnética Nuclear de las fracciones obtenidas. | 35        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.4.1      | Interpretación de resultados de Resonancia Magnética Nuclear del $^1\text{H}$   | 35        |
| 3.4.2      | Interpretación de resultados de Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$   | 38        |
| <b>3.5</b> | <b>Ensayo para la determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones MC028-03 y MC028-04.</b>                           | <b>41</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Ensayo para la determinación de la actividad de inhibición de monoamina oxidasa (MAO) en las fracciones MC028-03 y MC028-04.</b> | <b>42</b> |
|            | <b>CONCLUSIONES</b>   | <b>44</b> |
|            | <b>RECOMENDACIONES</b>  | <b>45</b> |
|            | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>46</b> |

## ÍNDICE DE TABLA

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1:</b> Rendimiento de los extractos .....                                    | 30 |
| <b>Tabla 2:</b> Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de metanol .....    | 31 |
| <b>Tabla 3:</b> Fraccionamiento cromatográfico de la fracción MC028 .....             | 33 |
| <b>Tabla 4:</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones F1 y F2..... | 42 |
| <b>Tabla 5:</b> Concentraciones inhibitoras de MAO-A y MAO-B .....                    | 42 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Esqueletos de aglicón (A) espirostano esteroideos, (B) furostano esteroideo, (C) saponinas triterpénicas. R=azúcar..... | 22 |
| <b>Figura 2:</b> Xantona.....  | 23 |
| <b>Figura 3:</b> Esquema de desarrollo de la investigación.....  | 26 |
| <b>Figura 4:</b> Esquema de desarrollo de la investigación.....  | 30 |
| <b>Figura 5:</b> TLC luz UV 254 nm.....  | 32 |
| <b>Figura 6:</b> TLC revelada en relación 8:1:0,25 acetato de etilo-metanol-agua.....  | 32 |
| <b>Figura 7:</b> TLC luz UV 254 nm.....  | 33 |
| <b>Figura 8:</b> TLC luz UV 365 nm.....  | 34 |
| <b>Figura 9:</b> TLC revelada MC028-03 y MC028-04.....   | 34 |
| <b>Figura 10:</b> Zona del espectro de 6.6-8.4 <sup>1</sup> H de RMN Fracción MC28-03 (400 MHz en CD3OD).....                            | 35 |
| <b>Figura 11:</b> Estructura molecular del Benzoato.....   | 36 |
| <b>Figura 12:</b> Zona del espectro de 4.55-5.60 de 1H de RMN Fracción MC28-03 (400 MHz en CD3OD).....                                   | 36 |
| <b>Figura 13:</b> Zona del espectro de 3.50-4.00 de 1H de RMN Fracción MC28-03 (400 MHz en CD3OD).....                                   | 37 |
| <b>Figura 14:</b> Zona del espectro de 0.8-2.30 de 1H de RMN Fracción MC28-03 (400 MHz en CD3OD).....                                    | 38 |
| <b>Figura 15:</b> Zona del espectro de 135-220 de <sup>13</sup> C de RMN de la Fracción MC28-03 (100 MHz en CD3OD).....                  | 39 |
| <b>Figura 16:</b> Zona del espectro de 94-134 de <sup>13</sup> C de RMN de la Fracción MC28-03 (100 MHz en CD3OD).....                   | 39 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 17:</b> Zona del espectro de 27-7 de $^{13}\text{C}$ de RMN de la Fracción MC28-03 (100 MHz en $\text{CD}_3\text{OD}$ )..... | 40 |
| <b>Figura 18:</b> Estructura symplocoside K.....   | 41 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexos 1:</b> Espectros de Resonancia Magnética y Nuclear del benzoato de metilo...                          | 51 |
| <b>Anexos 2:</b> Espectros de Resonancia Magnética de $^1\text{H}$ y Nuclear de las fracciones<br>MC028-03..... | 52 |
| <b>Anexos 3:</b> Espectros de Resonancia Magnética de $^1\text{H}$ y Nuclear de las fracciones<br>MC028-04..... | 54 |

## RESUMEN

En el presente estudio, a partir de la raíz de la especie *Monnina crassifolia*, se obtuvieron extractos en orden de polaridad creciente utilizando éter etílico, acetato de etilo, metanol y agua; siendo el extracto metanólico, con un 12,07%, el de mayor rendimiento. Este extracto se sometió a una partición con n-butano y agua destilada. A su vez, se utilizaron técnicas cromatográficas para el aislamiento e identificación del extracto metanólico (parte n-butanol), determinando la presencia de dos fracciones de peso 3,8 mg y 2,4 mg, con un color blanco, y solubles en metanol, por medio de técnicas espectroscópicas por RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), se identificó una posible estructura molecular que corresponde a una saponina triterpenoídica esterificada con ácido benzóico. Las sustancias aisladas fueron probadas frente a bacterias Gram + y Gram – sin mostrar una actividad significativa.

**Palabras clave:** *Monnina crassifolia*, cromatografía, purificación, aislamiento e identificación

## ABSTRACT

From the root of the species *Monnina crassifolia* were obtained extracts in order of increasing polarity using ethyl ether, ethyl acetate, methanol and water. The methanolic extract yield was 12.07%; the highest among the different solvent extracts. A solubility depending partition using n-butane and distilled water was performed. The n-butanol fraction was subjected to chromatographic separation techniques in order to isolate and identify the compounds present. The chromatographic work determined the presence of two solid fractions of weight 3.8 mg and 2.4 mg, white colored, and soluble in methanol. The use of spectroscopical methods (NMR-1H, 13C), revealed the possible presence of a benzoyl triterpenoid saponin. The fractions isolated were tested against Gram+ and Gram- bacteria without showing a significant activity.

**Keywords:** *Monnina crassifolia*, chromatography, purification, isolation and identification

## INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales como remedio para aliviar enfermedades se remonta a los orígenes de la humanidad y son un elemento importante de los sistemas médicos indígenas de los países de América del Sur, siendo estos recursos generalmente considerados como parte del conocimiento tradicional de estas culturas (Hernández & Jordá, 1981).

Las plantas medicinales y sus productos derivados, han sido utilizados durante siglos en la medicina tradicional y ahora son cada vez más valiosas como materia prima en la preparación de medicamentos modernos para la industria farmacéutica y herbal ((Buitrón, 1999).

La diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello se debe conservar el ambiente que las sustenta. Esta situación ha originado una preocupación creciente por la biodiversidad y por el estado natural de las plantas y árboles con propiedades curativas (Quezada, 2008).

El género *Monnina* pertenece a la familia Polygalaceae que comprende 21 géneros y alrededor de 800-1.000 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial (Eriksen & Persson, 2007). Existe una gran variedad de metabolitos secundarios presentes en la familia Polygalaceae. De acuerdo a investigaciones fitoquímicas realizadas los productos químicos predominantes son las saponinas, xantonas y oligosacáridos esterificados (Lepore et al., 2011).

En la actualidad el género *M. Crassifolia* no ha sido estudiado y no se han encontrado reportes sobre metabolitos secundarios aislados a partir de esta especie, sin embargo se ha tomado como referencia el estudio de otras especies del mismo género, principalmente de *M. sylvatica* en donde se ha comprobado la actividad antifúngica de bifenilos y xantonas en el extracto lipofílico de las raíces (Bashir, Hamburger, Gupta, Solis, & Hostettmann, 1992), además del género *M. obtusifolia* del extracto de n-BuOH se ha demostrado que de sus hojas inhiben los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF –A) o la interacción con el factor de crecimiento placentario con Flt- 1 (VEGF receptor 1) (Lepore et al., 2011)

Nuestro objetivo de investigación consistió en aislar e identificar metabolitos secundarios de la especie *Monnina crassifolia* por medio de técnicas cromatográficas, para contribuir con el estudio para la conservación y aprovechamiento de especies vegetales de interés medicinal en el Ecuador.

## **CAPITULO 1**

## **FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO**

### **Fin del proyecto**

- Contribuir con el estudio para la conservación y aprovechamiento de especies vegetales de interés medicinal.

### **Propósito del proyecto**

- Aislar e identificar metabolitos secundarios de la especie *Monnina crassifolia*

### **Componentes del proyecto**

- Obtener extractos con disolventes en orden de polaridad ascendente.
- Fraccionamiento de extracto mediante cromatografía en columna abierta.
- Aislar e identificar los compuestos obtenidos

**CAPITULO 2**  
**1. FUNDAMENTO TEÓRICO**

## 1.1 Plantas medicinales

Las plantas han sido la base de los sistemas de medicina tradicional que han existido desde hace miles de años. Incluso en los tiempos modernos, los sistemas basados en plantas siguen desempeñando un papel esencial en el cuidado de la salud (Chivian, 2002).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 11% de fármacos básicos y esenciales son exclusivamente de origen vegetal obtenidos a partir de precursores naturales (Rates, 2001).

Según la misma organización, alrededor del 65-80 % de la población mundial en los países en desarrollo, debido a la pobreza y la falta de acceso a la medicina moderna, depende esencialmente de las plantas para su atención primaria de salud. Sin embargo, algunas plantas han sido estudiadas científicamente para la evaluación de su calidad, seguridad y eficacia (Calixto, 2005).

América Latina ofrece una gran diversidad de plantas y cultivos estacionales únicos debido principalmente a la presencia de áreas naturales como la cordillera de los Andes, la selva amazónica y los bosques tropicales y subtropicales de América Central. Varios informes científicos han señalado el potencial terapéutico de ciertas plantas y alimentos de esta área (Ranilla, Kwon, Apostolidis, & Shetty, 2010).

Las plantas producen una gran variedad de compuestos bioactivos y metabolitos secundarios como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación a ambientes adverso (Akula & Ravishankar, 2011). Entiéndase por bioactivo, aquellos compuestos que tiene la capacidad de provocar efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos y/o animales (Vélez-Terranova, Gaona, & Sánchez-Guerrero, 2014). Los metabolitos secundarios tienen aplicaciones prácticas significativas en fines medicinales, nutritivos y cosméticos (Seigler, 2012).

La producción de estos compuestos a menudo es baja (menos de 1 % de peso seco) y depende mucho del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Rao & Ravishankar, 2002). El aislamiento dirigido a los principios activos de la planta se continúa realizando en muchas áreas académicas, gubernamentales, y laboratorios. A partir de extractos que presentan una actividad biológica particular de interés se purifican estos principios por cromatografía, guiados por evaluación periódica con uno o más sistemas de bioensayo, lo que resulta en el eventual aislamiento de uno o más constituyentes biológicamente activos (Kinghorn, 1992).

## 1.2 Familia Polygalaceae

La familia *Polygalaceae* comprende árboles, arbustos, lianas y plantas de tallos herbáceos. Esta familia se caracteriza por presentar pelos simples, unicelulares o a veces uniseriados con una superficie lisa o averrugada, las hojas son generalmente alternas, a veces opuestas o verticiladas, sésiles o pecioladas, simples, estipular; glándulas nectaríferas a veces se presentan en la base del pecíolo o en la lámina de la hoja. Las flores son bisexuales o en algunas especies de *Polygalaceae* son unisexuales y se presentan hermafroditas y zigomorfas, el ovario posee de 2 a 8 carpelos y un estilo único. El fruto es una cápsula, a veces seca e indehisciente, y ocasionalmente alados, drupas o bayas. La semilla pubescente y con arilo trilobado (Eriksen, 1993a; Kubitzki et al., 1990) . Presenta 4 subfamilias, 21 géneros y cerca de 800 -1000 especies distribuidas en todo el mundo, con mayor diversidad en las zonas tropicales y subtropicales (Eriksen & Persson, 2007).

Las 4 subfamilias más importantes se componen por: Xanthophylleae, Polygaleae, Moutabeae y Carpolobieae (Chodat, 1893; Eriksen, 1993b). Existe una gran diferencia de la Xanthophylleae con respecto a las otras por tener ovarios más o menos uniloculares y 4-40 óvulos(Eriksen & Persson, 2007).

La familia *Polygalaceae* es utilizada en la medicina herbal, como expectorante estimulante, diurético y diaforético. Debido a un alto contenido de saponinas y propiedades antifúngicas, varias especies de *Monnina* a menudo se han utilizado como champú anticasta en América tropical (Eriksen & Persson, 2007). Como ejemplo, la especie africana *Securidaca longepedunculata*, perteneciente a la familia *Polygalaceae*, tiene hasta 100 propiedades médicas, destacando principalmente la inhibición selectiva de la replicación del VIH (Mahmood et al., 1993).

## 1.3 Género *Monnina*

El género *Monnina* perteneciente a la subfamilia Polygaleae fue bautizado por los botánicos españoles Ruiz y Pavón sobre un grupo de plantas de Perú y Chile (Ruiz, López, & Pavón, 1798). Para la descripción del género *Monnina* se tomó como referencia a especies descritas por la revista del Instituto Botánico Darwinion en Argentina, detallando al género como plantas con hojas simples, alternas, brevemente pecioladas. Inflorescencia en racimo simple, espiciforme. Flores pequeñas, blanco-amarillentas, o rosado-verdosas, con cinco sépalos de prefloración quincuncial, dos externos, uno interno y dos laterales. Fruto una sámara 1-2 seminada, generalmente reticulada, a lada o sin alas, glabra o pubescente. Raíz generalmente perpendicular, ramificada y cilíndrica de color castaño oscuro o claro, marrón oscura y amarillo.

Semillas piriformes, comprimidas o no, con tegumento tenue y delgado rostro en el ápice (Grondona, 1945).

Este género es únicamente americano y se extiende desde el Sur de Estados Unidos hasta el centro de Chile y la Plata. En el Ecuador el género *Monnina* tiene especies arbustivas que comprende unas 150 especies. Se encuentran unas 32 variedades, mejor representadas en la zona andina; sobre los 2400 m se han registrado 24 especies arbustivas

Existe una gran variedad de usos en el género, dentro del cual cabe recalcar la especie *Monnina obtusifolia*, la cual se utiliza en la medicina tradicional de Ecuador como un antifúngico, antitumoral, antiséptico, antiperiodontitis y limpiador de piel (Pinto, Fuzzati, Chiriboga, & Hostettmann, 1994).

#### **1.4 *Monnina crassifolia***

*Monnina crassifolia* es un arbusto que mide hasta 1,5 m de alto. Las hojas son alternas, lanceoladas, miden hasta 6 cm de largo, siendo gruesas. La inflorescencia tiene numerosas flores, miden hasta 6 cm de largo, tienen la forma de mariposa, de color azul o azul-morado, uno de los pétalos llamado "quilla" tiene la punta amarilla. Los frutos son carnosos, con forma de elipse o de fréjol, miden hasta 8 mm de largo, de color vino morado y verde en la base cuando están inmaduros, de color negro-morado cuando están maduros (Eriksen, 1993c).

Tiene un uso en la medicinal como antibacteriano al utilizarse como jabón y medioambiental debido a que la planta se usa como cerca viva o para hacer leña.

##### **1.4.1 Taxonomía**

|                    |                            |
|--------------------|----------------------------|
| Reino:             | Plantae                    |
| División:          | Magnoliidae                |
| Clase:             | Equisetopsida              |
| Orden:             | Fabales                    |
| Familia:           | Polygalaceae               |
| Género:            | <i>Monnina</i>             |
| Nombre científico: | <i>Monnina crassifolia</i> |

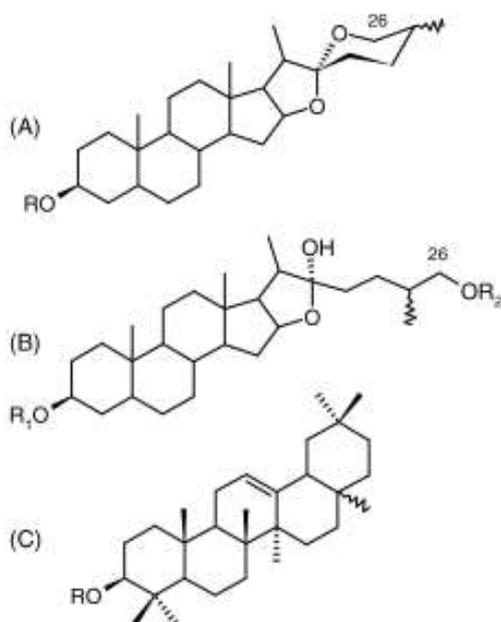
#### **1.5 Metabolitos de interés**

##### **1.5.1 Saponinas**

Las saponinas son un gran grupo de los glucósidos, ampliamente distribuidos en las plantas (Sparg, Light, & Van Staden, 2004). Por lo general se encuentran en las

raíces, tubérculos, hojas, flores o semillas. Sobre la base de los esqueletos de carbono, las saponinas se clasifican en triterpénicas y esteroideas (Man, Gao, Zhang, Huang, & Liu, 2010), algunos autores distinguen un tercer grupo llamado aminas esteroideas, los cuales se clasifican por otros como alcaloides esteroidales (Bruneton, 1995).

Los dos tipos de saponinas, se originan por la ruta de la acetil coenzima A vía ácido mevalónico, no mevalónico y escualeno (Martínez, 2001). La diferencia de los núcleos radica en el número de carbonos que hacen parte de la aglicona, siendo para la de tipo esteroide 27 átomos de carbono que forma un esteroide tetracíclico; y 30 átomos de carbono para la de tipo triterpenoide, que conforma un núcleo pentacíclico. (Gallego Londoño, Arango Villa, Ospina Medina, Arango Valencia, & Cardona Maya, 2014) (Sparg et al., 2004).



**Figura 1:** Esqueletos de aglicón (A) espirostano esteroideos, (B) furostano esteroideo, (C) saponinas triterpénicas.  
R=azúcar

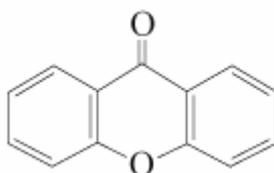
**Fuente:** (Sparg et al., 2004).

A las saponinas se les atribuye propiedades antiinflamatorias, fungicidas, antibacterianas, antimicrobianas, antiparasitarias, antitumorales, antivirales, citotóxicas, entre otras actividades biológicas (Mena Valdés et al., 2015; Sparg et al., 2004).

### 1.5.2 Xantonas

Las Xantonas se derivan de metabolitos de origen biogenético mixto debido a su unidad iniciadora, son compuestos aromáticos presentes en muchas familias vegetales de plantas superiores, hongos y líquenes. Su origen es únicamente policetídico, aunque en ciertas plantas aisladas proceden del ácido shikímico. Las xantonas se clasifican en 5 grupos: (a) xantonas simples oxigenadas, (b) glicósidos de xantonas, (c) xantonas preniladas y sus derivados, (d) xantonolignoides, y (e) xantonas misceláneas.(Jiang et al., 2003)

La estructura básica de una Xantona se presenta en la **fig 2**. que se basa en la simetría de los dos anillos bencénicos del sistema xantónico.



**Figura 2:** Xantona

**Fuente:** (Marco, 2006).

Las Xantonas poseen diversas actividades farmacológicas como antihipertensivas, antitumorales, citotoxicidad e inhibición de la agregación plaquetaria (Jiang et al., 2003; Rojas, Vizcaya, Morales, & Nuñez, 2012).

### 1.6 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las bases teóricas de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear fueron formuladas por W. Pauli en 1924, quien sugirió que ciertos núcleos atómicos tienen las propiedades de espín y momento magnético y que, como consecuencia, al exponerlos a un campo magnético se produciría una división de sus niveles de energía (Skoog et al., 2002).

Ha sido utilizado durante muchos años como un medio de análisis químico. RMN es un tipo de espectroscopía de frecuencia de radio que se basa en pequeñas diferencias de energía entre los núcleos atómicos con carga eléctrica que están girando paralela o antiparalelamente respecto a un campo magnético aplicado (Felder, Uggeri, Fumagalli, & Vittadini, 1990).

Un espectrómetro de alta resolución puede poner en evidencia dos tipos distintos de estructura en la absorción de la RMN debida a la resonancia del protón, conocidos respectivamente como desplazamiento químico y acoplamiento spin-spin (Ewing & Meza, 1978).

### **1.7 Espectrometría de masas (CG-EM)**

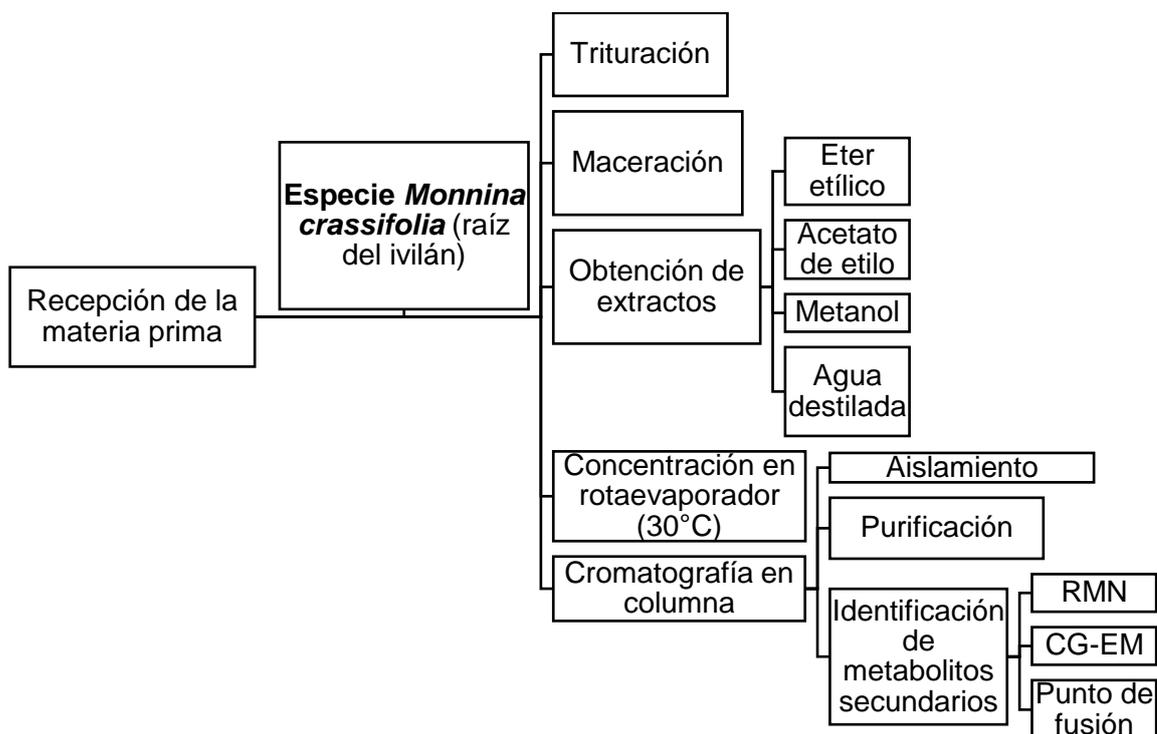
La espectrometría de masas está basada en el comportamiento diferente que presentan los iones que se forman por las diferentes técnicas de ionización, al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Así dichos iones son separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) y detectados posteriormente (Romero González, Fernández Moreno, Plaza Bolaños, Garrido Frenich, & Martínez Vidal, 2007).

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, CG (“Cromatografía de Gas”) y EM (“Espectrometría de masas”) da lugar a una técnica combinada CG-EM que permite la separación e identificación de mezclas complejas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (corriente iónica total) (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002).

**CAPITULO 3**  
**2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 Esquema de metodología

A continuación se detalla el esquema con la metodología utilizada:



**Figura 3:** Esquema de desarrollo de la investigación

**Fuente:** El autor, 2017

## 2.2 Obtención de extractos

A partir de 250 g de la especie *Monnina crassifolia* específicamente de la raíz, se procedió a realizar una maceración con disolventes de polaridad creciente iniciando con éter etílico durante 5 horas con 1000 ml de solvente, seguido de acetato de etilo, metanol y agua. Se efectuó una maceración por triplicado con 2500 ml en un lapso de 3 días a temperatura ambiente, renovando el disolvente cada 24 horas.

Transcurrido el tiempo establecido se filtró al vacío cada extracción y mediante concentración por rotaevaporación a presión reducida, se obtuvieron tres extractos, sin embargo al extracto de agua se realizó la concentración mediante el equipo de liofilización LABCONCO serie 77608.

Obtenidos los cuatro extractos de éter etílico, acetato de etilo, metanol y agua, se realizó cromatografía de capa fina con placa de sílica gel F<sub>254</sub>, para determinar que extracto presenta mayor riqueza en metabolitos secundarios de interés.

### **2.3 Separación por decantación del extracto metanólico**

A partir de 5g de extracto se efectuó la partición con n-butanol y agua destilada relación (1:1) efectuando tres lavados, que fueron concentrados en rotaevaporación a presión reducida, obteniendo la fase de n-butanol 3,84 g mientras que la fase de agua un total de 1,2 g.

### **2.4 Fraccionamiento del extracto metanólico (fase butanólica)**

Del extracto butanólico obtenido se efectuó el fraccionamiento en cromatografía en columna, en relación 1:100 tomando 3,84 g de extracto con 385 g de sílica gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm).

La fase móvil utilizada se preparó con disolventes en orden de polaridad creciente iniciando con acetato de etilo-metanol-agua 90:10:2,5, disminuyendo el acetato de etilo paulatinamente hasta llegar a 60:10:2,5 y finalmente metanol al 100%, obteniendo un total de 391 fracciones de 8 mL.

### **2.5 Cromatografía en capa fina**

Se realizó cromatografía en capa fina (TLC) de todas las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica, utilizando placas de sílica gel 60 F254 (fase directa). Los disolventes para la fase móvil fueron acetato de etilo-metanol-agua en relación 8:1:0,25 (v/v), para la unión de acuerdo a la separación y similitud de compuestos, la visualización se la realizó en luz UV 254 y 365 nm, y reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina. Posteriormente se unieron las fracciones con igual factor de retención (Rf).

### **2.6 Purificación de la fracción MC028**

La purificación de la fracción MCO28 fue a partir de 111,8 mg, en columna cromatográfica con 11 g de sílica gel 60 (Merck 0,0015-0040 mm) en relación 1:100, utilizando como disolvente en relación acetato de etilo-metanol-agua 7:1,3:1.

### **2.7 Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI) de las fracciones obtenidas**

Por medio de la técnica de microdilución en caldo, se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria de las dos fracciones obtenidas, utilizando cinco bacterias Gram-negativas: *Escehrichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella tiphymurium* (LT2), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 8427), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997), y una bacteria Gram-positivo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 28185).

## **2.8 Ensayo de inhibición de monoamina oxidasa (MAO) de las fracciones obtenidas**

El presente ensayo de inhibición de monoamina oxidasa se realizó con la ayuda del Ph.D. Christian Larroque en el Instituto de Cáncer de Montpellier, Francia. Preparado bajo soluciones de PBS y DMSO a diferentes concentraciones, y la suspensión de las mitocondrias (MAOA-MAOB) son divididas en pequeñas alícuotas y almacenadas a una temperatura de -80 ° C. Trabajo con 1mg en las dos muestras a una solución de 10mg/mL de DMSO.

El procedimiento para la medición de la actividad selectiva de MAO-A y MAO-B consiste en la adición de los siguientes soluciones:

Vehículo (DMSO + molécula) + Fracción mitocondrial (MAO-A y MAO-B) + Sustrato no selectivo (Kynuramine) + CLO (Inhibidor selectiva MAO-A) o DEP (Inhibidor selectiva MAO-B).

**CAPITULO 4**  
**3. RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### 3.1 Extractos obtenidos de la especie *Monnina crassifolia*

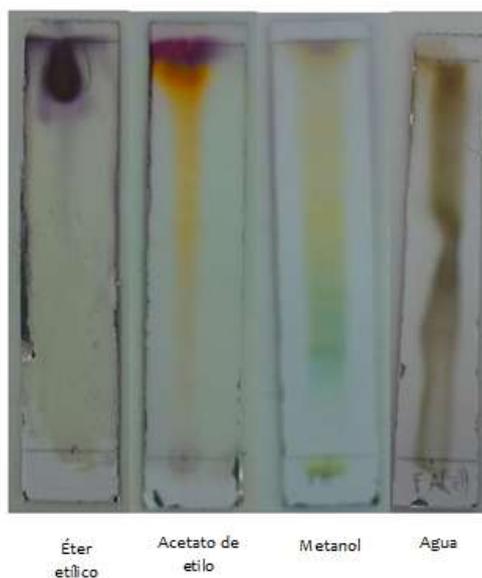
En la tabla 1. se describen los pesos y rendimientos obtenidos del extracto de la raíz con las distintas polaridades como fueron: éter etílico, acetato de etilo, metanol y agua.

**Tabla 1:** Rendimiento de los extractos

| EXTRACTO         | Peso inicial planta seca (g) | Peso final (g) | Rendimiento (%) |
|------------------|------------------------------|----------------|-----------------|
| Éter etílico     | 250                          | 0,663          | 0,27            |
| Acetato de etilo |                              | 2,328          | 0,94            |
| Metanol          |                              | 30,167         | 12,07           |
| Agua             |                              | 3,181          | 1,27            |

**Fuente:** El autor, 2017.

Mediante cromatografía en capa fina fase directa de los extractos obtenidos, representados en la Figura 4, se observó la abundancia de los diferentes compuestos presentes en la especie.



**Figura 4:** Esquema de desarrollo de la investigación

**Fuente:** El autor, 2017

### 3.2 Fraccionamiento del extracto de metanol

Se partió con 3,84g. del extracto de metanol. A partir de su fraccionamiento se obtuvieron 392 muestras y luego se unieron de acuerdo a las características presentes mediante cromatografía de capa fina y Rf dando un total de 32 fracciones (MC001-MC030) descritas en la Tabla 2.

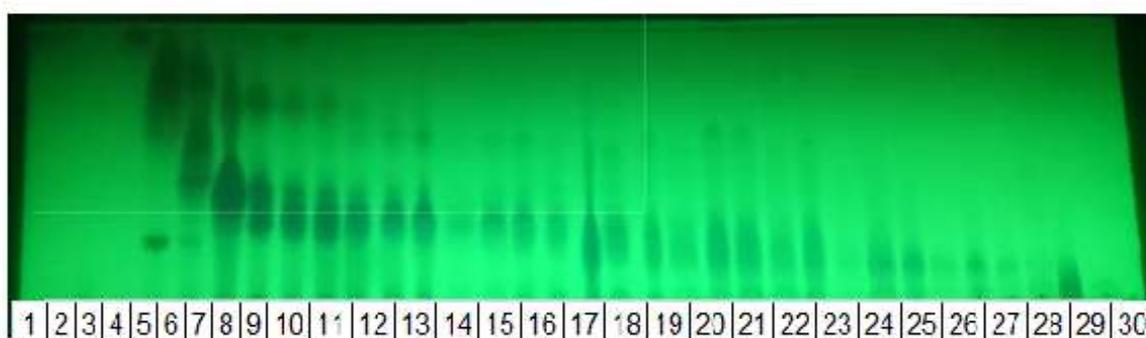
**Tabla 2:** Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de metanol

| Fracciones | Muestras  | Proporción | Mezcla de disolvente        | Peso (mg) |
|------------|-----------|------------|-----------------------------|-----------|
| MC001      | 0         | 9:1:0,25   | AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O | 8,3       |
| MC002      | 1 a 5     |            |                             | 5,8       |
| MC003      | 6 a 13    |            |                             | 40,80     |
| MC004      | 16 a 22   |            |                             | 41,40     |
| MC005      | 23 a 40   |            |                             | 59,10     |
| MC006      | 41 a 58   |            |                             | 386,10    |
| MC007      | 59 a 66   |            |                             | 25,40     |
| MC008      | 67 a 75   |            |                             | 33,10     |
| MC009      | 76 a 84   |            |                             | 34,10     |
| MC010      | 85 a 89   |            |                             | 26,40     |
| MC011      | 90 a 99   |            |                             | 63,70     |
| MC012      | 100,00    |            |                             | 5,90      |
| MC013      | 101 a 106 |            |                             | 35,80     |
| MC014      | 107 a 128 | 8:1:0,25   | AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O | 116,00    |
| MC015      | 129 a 136 |            |                             | 27,70     |
| MC016      | 137 a 164 |            |                             | 90,30     |
| MC017      | 165 a 181 |            |                             | 48,20     |
| MC018      | 182 a 213 | 7:1:0,25   | AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O | 84,3      |
| MC019      | 214 a 229 |            |                             | 12,30     |
| MC020      | 230 a 256 |            |                             | 18,00     |
| MC021      | 257 a 264 |            |                             | 44,40     |
| MC022      | 265 a 276 | 6:1:0,25   | AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O | 10,50     |
| MC023      | 277 a 284 |            |                             | 18,4      |
| MC024      | 285 a 328 |            |                             | 10,9      |
| MC025      | 329 a 337 |            |                             | 80,5      |
| MC026      | 338 a 363 |            |                             | 8,5       |
| MC027      | 364 a 372 |            |                             | 16,5      |
| MC028      | 373 a 379 |            |                             | 111,8     |

|       |           |   |      |      |
|-------|-----------|---|------|------|
| MC029 | 380 a 391 |   |      | 24,6 |
| MC030 | 392       | 1 | MeOH | 69,8 |

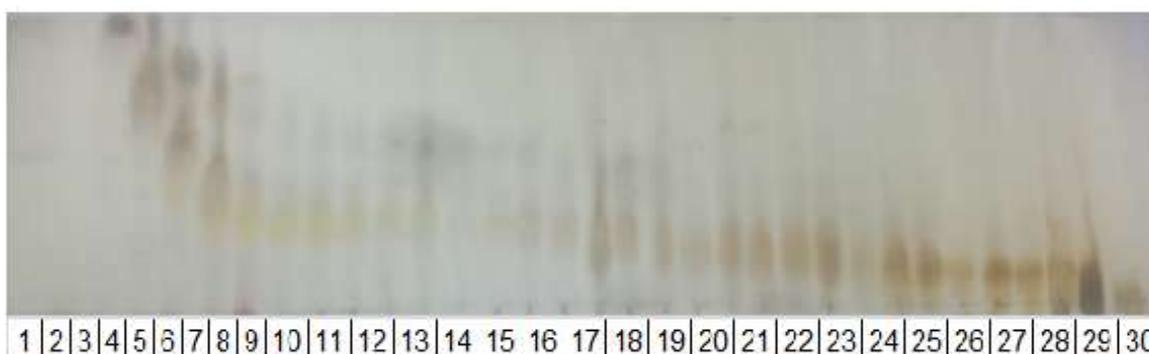
**Fuente:** El autor, 2017

Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas desde la MC001 a MC030 se realizó el sembrado de las fracciones en el orden descrito en la Tabla 2, utilizando como disolvente la polaridad de acetato de etilo-metanol-agua 8:1:1. Observando la riqueza de metabolitos secundarios de las 32 fracciones obtenidas (Figura 6), para su posterior purificación.



**Figura 5:** TLC luz UV 254 nm

**Fuente:** El autor, 2017



**Figura 6:** TLC revelada en relación 8:1:0,25 acetato de etilo-metanol-agua

**Fuente:** El autor, 2017

### 3.3 Fracción MCO28

Por medio de una microcolumna cromatográfica se efectuó la purificación de la fracción MC028, con 111,8 mg en 11 g de sílica gel en relación acetato de etilo-metanol-agua 7:1,3:1.

Del fraccionamiento se obtuvieron 49 muestras que luego se unieron de acuerdo al perfil cromatográfico en capa fina y Rf dando un total de 8 fracciones descritas a continuación:

**Tabla 3:** Fraccionamiento cromatográfico de la fracción MC028

| Fracciones | Muestras | Proporción | Mezcla de disolvente | Peso (mg) |
|------------|----------|------------|----------------------|-----------|
| F28-1      | 0-6      | 7:1,3:1    | AcOEt-MeOH-H2O       | 1,7       |
| F28-2      | 7        |            |                      | 1,4       |
| F28-3      | 8        |            |                      | 5,6       |
| F28-4      | 9-10     |            |                      | 15        |
| F28-5      | 11       |            |                      | 5,2       |
| F28-6      | 12-13    |            |                      | 6,4       |
| F28-7      | 14-48    |            |                      | 14,2      |
| F28-8      | 49       |            |                      | 6,3       |

**Fuente:** El autor, 2017

### 3.3.1 Cromatografía preparativa de la fracción F28-4

A través de la técnica de cromatografía en capa fina preparativa fase reversa, utilizando una placa con una dimensión de 20X10 cm, se realizó la siembra de la muestra F28-4 de 15mg, siendo la fase móvil metanol: agua 9:1. El revelado se realizó con la ayuda de la luz UV 254 nm y 360 nm, observando una mancha de color azul oscuro y un color morado (Figura 7 y 8), las cuales fueron raspadas y recuperado el metabolito adsorbido.



**Figura 7:** TLC luz UV 254 nm

**Fuente:** El autor, 2017



**Figura 8:** TLC luz UV 365 nm

**Fuente:** El autor, 2017

Se obtuvieron dos fracciones (MC028-03 y MC028-04) con peso de 3,8 mg y 2,4 mg, se procedió a realizar cromatografía en capa fina fase directa en relación 7:1,3;1 acetato de etilo-metanol-agua, en sílica gel de 9 cm de longitud.

Observando en la luz UV de 365 un color azul brillante, que luego al revelarla con ácido sulfúrico al 5% y vainillina, se observó un color amarillo intenso, presentando Rf de 0,38 y 0,35.



**Figura 9:** TLC revelada MC028-03 y MC028-04

**Fuente:** El autor, 2017

Posterior se efectuó el análisis por elucidación química de las fracciones MC028-03 y MC028-04 en RMN en un equipo Varian N° de serie 21953 operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Usando como disolvente metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

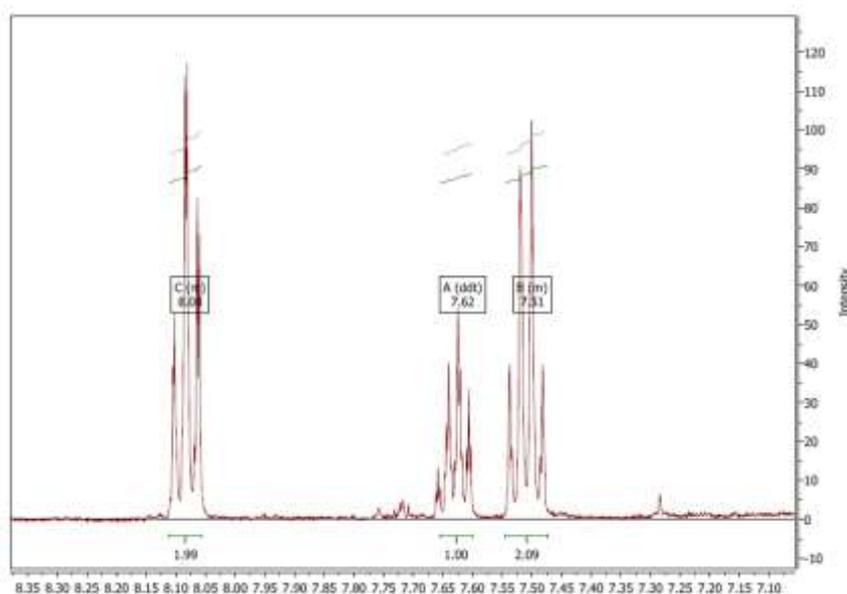
### 3.4 Interpretación de resultados por Resonancia Magnética Nuclear de las fracciones obtenidas.

#### 3.4.1 Interpretación de resultados de Resonancia Magnética Nuclear del $^1\text{H}$

Mediante microcolumna con polaridad acetato de etilo-metanol-agua (7:1,3:1) de la fracción 373 a 379 se obtuvieron 15 mg, por medio de cromatografía en capa fina preparativa fase reversa, se obtuvieron dos fracciones de peso 3,8 mg y 2,4 mg, con un color blanco, y solubles en metanol.

Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la fracción MC028-03 tienen similitud con la fracción MC028-04 Anexos 2 y Anexos 3, considerándose que la fracción MC028-04 está compuesta por una fracción de la sustancia presente en MC028-03 y otra sustancia desconocida. Por tal motivo, en el presente trabajo se analizó únicamente el espectro de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la fracción MC028-03, que asemeja una fracción más pura.

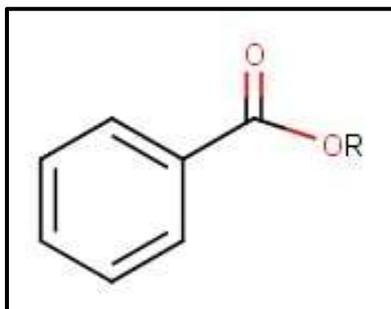
En la Figura 10 se observa la zona a campos más bajos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN a 400 MHz, de la fracción MC028-03 disuelto en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), presentándose señales con un desplazamiento químico de  $\delta$  8.05 (m, 8.05 Hz), 7.63 (dd, 7.65 Hz), y 7.50 (m, 7.51), con un valor de la integral de 2, 1, y 2. Por encontrarse en esta zona espectral, se trata de protones de tipo aromático. Se postula que corresponde a un benzoato, el cual fue comparado con el espectro  $^1\text{H}$ -NMR del benzoato de metilo disuelto en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), estableciéndose una correspondencia total.



**Figura 10:** Zona del espectro  $^1\text{H}$  de RMN entre 6.6-8.4 ppm de la fracción MC28-03 (400 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

**Fuente:** El autor, 2017

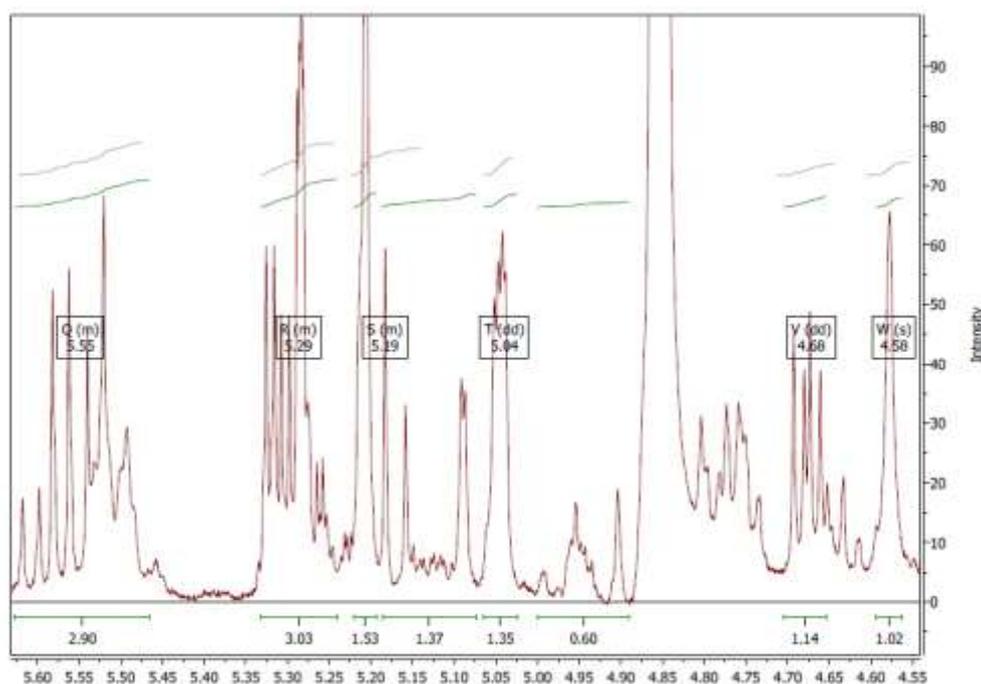
Por tanto se establece la presencia de un benzoato (Figura 11), en la estructura molecular de la fracción MC028-03.



**Figura 11:** Estructura molecular del Benzoato

**Fuente:** El autor, 2017

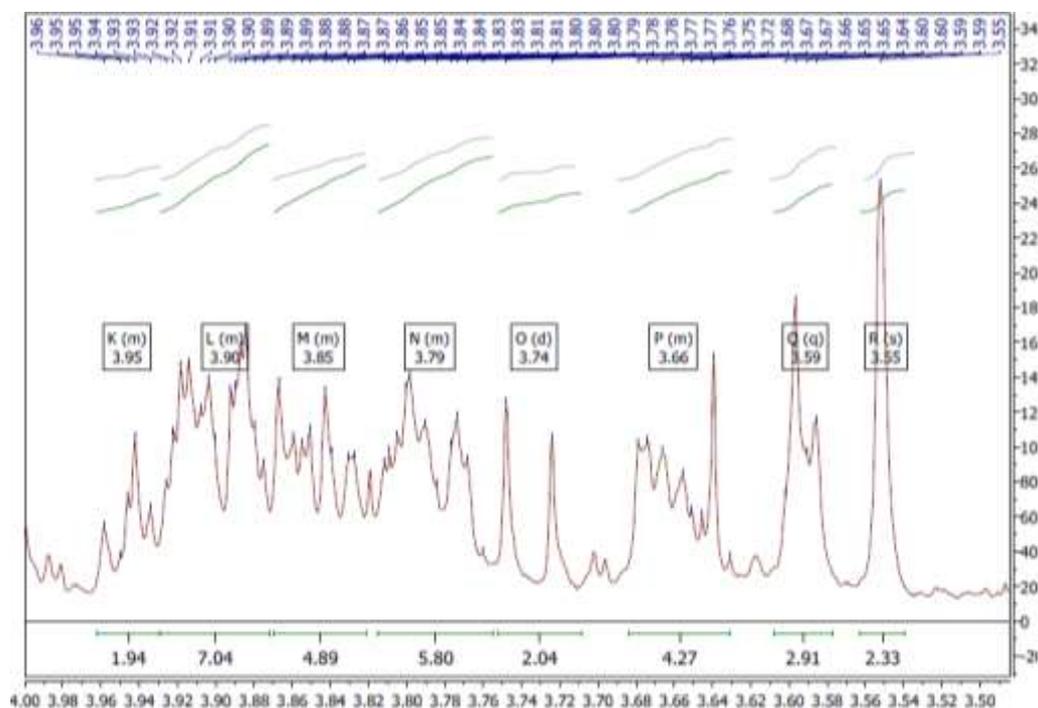
Continuando el análisis de la estructura molecular de acuerdo a la Figura 12 del  $^1\text{H}$ , se observa dos dobles tripletes en  $\delta$  5.55, y 5.30 ppm, que nos permite deducir la presencia de dos protones como dobles enlaces con un valor de integral de 2.90 y 3.03, además de la presencia de probablemente tres protones anoméricos en las zona de  $\delta$  5.20, 5.04 y 4.60, estableciendo la presencia de unidades de azúcar en la estructura molecular.



**Figura 12** Zona del espectro de 4.55-5.60 de  $^1\text{H}$  de RMN Fracción MC28-03 (400 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

**Fuente:** El autor, 2017

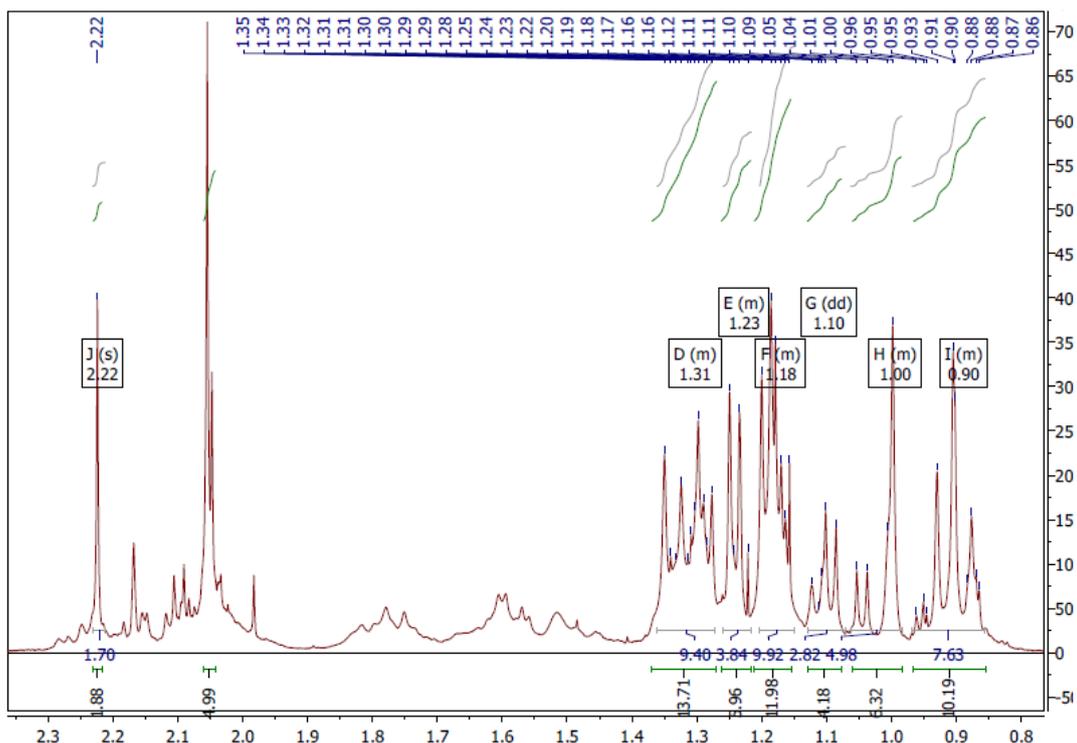
En la Figura 13 es posible observar los protones que se encuentran entre 3.96 y 3.52 ppm que corresponden presumiblemente a la estructura de los glúcidos que hacen parte de la estructura de la molécula. La existencia de una cantidad mínima de la fracción en estudio no permite establecer estudios posteriores para la identificación definitiva de los azúcares presentes en la estructura molecular.



**Figura 13:** Zona del espectro de 3.50-4.00 ppm de <sup>1</sup>H-RMN Fracción MC28-03 (400 MHz en CD3OD)

**Fuente:** El autor, 2017

Finalmente de acuerdo a la Figura 14 en donde el espectro de <sup>1</sup>H se aprecia la presencia de cerca de 7 grupos metilos entre las señales de  $\delta$  0.9 a 1.4 ppm, con integrales que van desde 7.6 a 9.4, así mismo se observa la posible presencia de un grupo acetato por la detección de la señal del protón en  $\delta$  2.2 (s, 2.22 Hz), finalmente que la estructura terminal de la molécula sería posiblemente un radical etil ( $\text{CH}_3\text{-H}_2$ ) en  $\delta$  0.90 con una integral de 7.6.



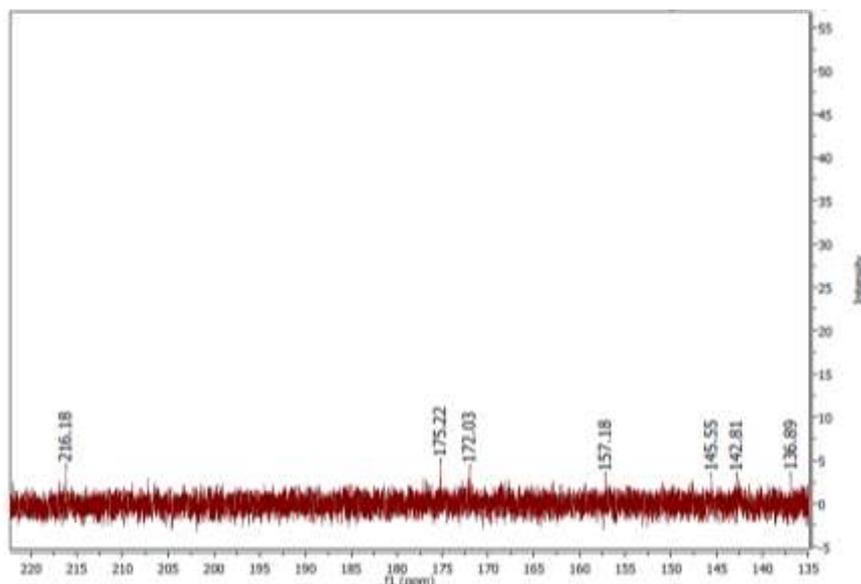
**Figura 14** Zona del espectro de 0.8-2.30 ppm de  $^1\text{H}$  de RMN Fracción MC28-03 (400 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

**Fuente:** El autor, 2017

### 3.4.2 Interpretación de resultados de Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$

Se realizó una interpretación del espectro obtenido de las fracciones MC028-03 por RMN en un equipo Varian N° de serie 21953 operando a 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  disuelta en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), identificando lo siguiente:

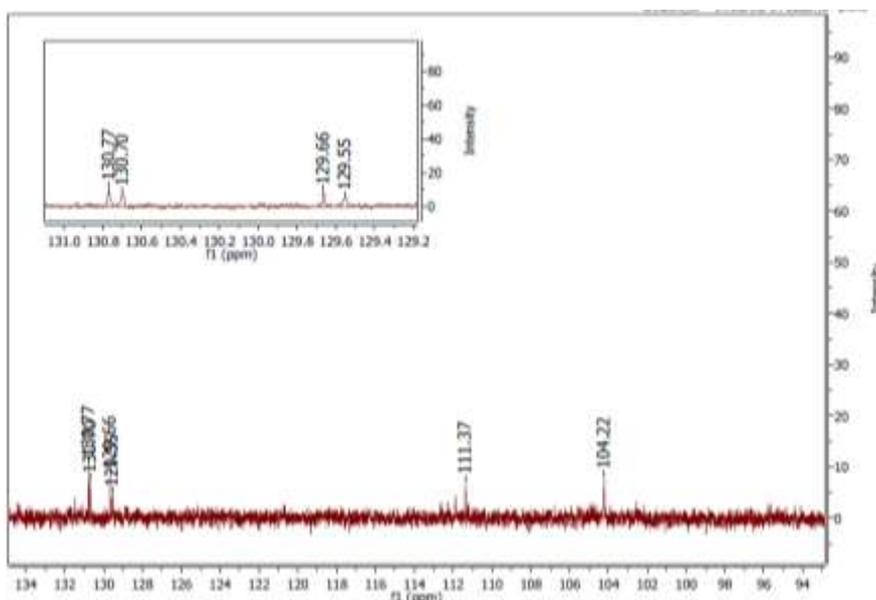
De acuerdo al análisis del espectro obtenido de  $^{13}\text{C}$ , de la Figura 15, se observa picos con valores altos correspondientes a la estructura carbonílica del benzoato y acetato en 175 y 172 ppm, así mismo la presencia de un grupo carbonilo en 216.18, que se ubica presumiblemente en el carbono 3 de un triterpeno.



**Figura 15:** Zona del espectro de 135-220 ppm de  $^{13}\text{C}$  de RMN de la Fracción MC28-03 (100 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

**Fuente:** El autor, 2017

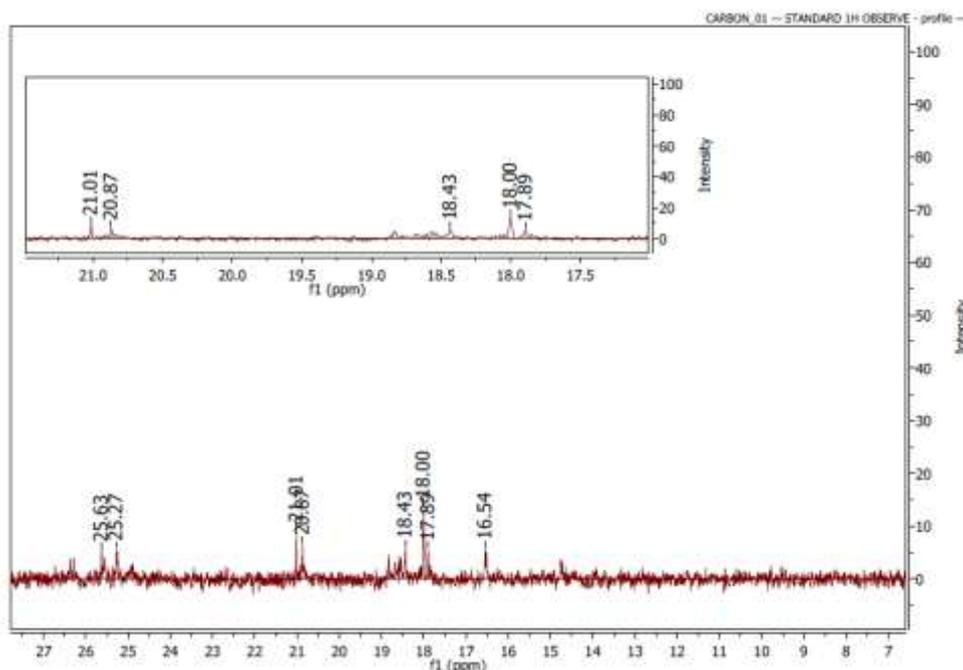
Al observar el espectro en un rango de 129.6 a 130.8, se aprecian los picos correspondientes a 4 de los carbonos aromáticos, que se identifican con los carbonos de la unidad de ácido benzoico (Figura 16). En el resto de la fracción estudiada se observan la posible presencia de los carbonos olefínicos y los carbonos aromáticos restantes.



**Figura 16:** Zona del espectro de 94-134ppm de  $^{13}\text{C}$  de RMN de la Fracción MC28-03 (100 MHz en  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

**Fuente:** El autor, 2017

Finalmente en el espectro observado en la Figura 17, que corresponden a los picos de los radicales metilos de una posible estructura terpénica.



**Figura 17:** Zona del espectro de 27-7 de <sup>13</sup>C de RMN de la Fracción MC28-03 (100 MHz en CD3OD)

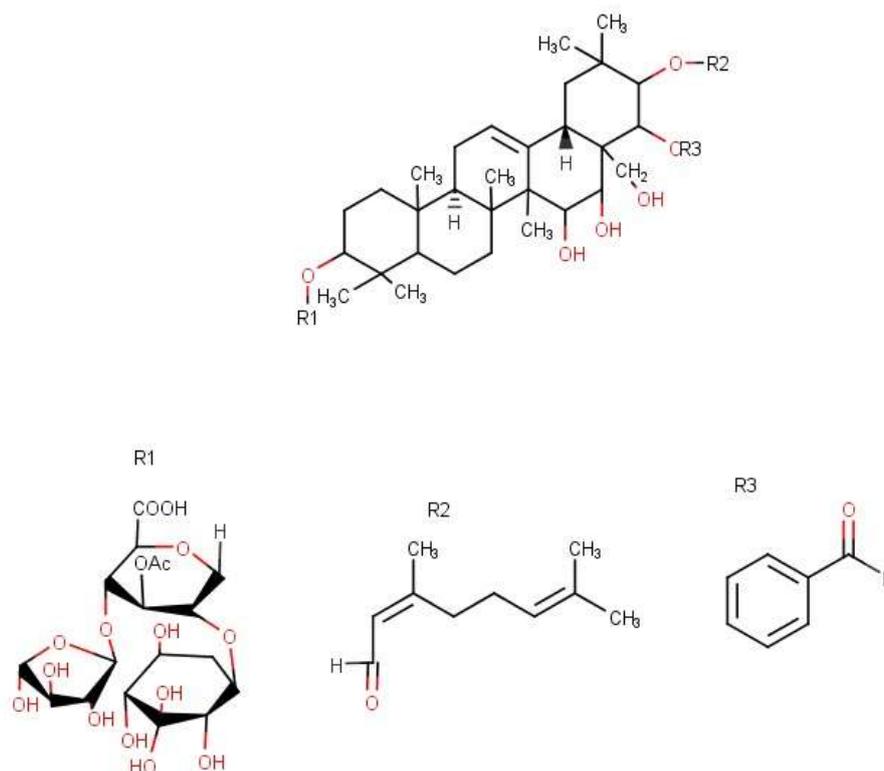
**Fuente:** El autor, 2017

Por la poca cantidad obtenida de la fracción MC028-03 únicamente se realizó el análisis en RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, describiendo las zonas más importantes para una identificación de la posible estructura molecular.

Como ejemplo, se pueden estudiar los reportes obtenidos sobre saponinas triterpénicas citotóxicas en las raíces de *Symplocos chinensis*, que han obtenido un compuesto denominado symplocoside K, 3 β-O- [(β-D-glucopyranosyl (1—2))[(α-L-arabinofuranosyl)(1—4)]-β-O-[(3-O-acetyl-6-methyl)-glucuronopyranosyl] -21 β-O- [(2Z)3,7-dimethyl-2,6-octadienoyl]-22α-O-benzoyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol Figura 18, este tipo de estructuras se caracterizan por la presencia de siete grupos metilos terciarios entre δ 0,90 y 1,51 ppm, y un doble enlace típicas por <sup>13</sup>C en RMN a δ 125,8 y 142,9 ppm, revelando olean-12-ene - triterpeno (Olugbade, Ogundaini, Birlirakis, País, & Martin, 2000), la parte azucarada corresponde a tres tipos: ácido glucurónico, glucosa y arabinosa, presentes como tres protones anoméricos en δ 4.89, 5.10 y 5.88 y con la relación de <sup>13</sup>C-RMN en δ 110.6, 104.9 y 104.8. Finalmente la unión de la unidad de benzoilo en C-22 de la aglicona que se representa entre el proton de δ 6.53 y el

espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN en  $\delta$  en 166.9 (Cioffi et al., 2006; Fu, Wang, Gao, Tang, & Yu, 2005).

Sin embargo por la poca cantidad obtenida no se puede efectuar un análisis completo de RMN tanto en  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HMBC y HSQC, que permita una identificación completa de la estructura molecular de mezcla MC028-03.



**Figura 18:** Estructura symplocoside K

**Fuente:** (Fu et al., 2005)

Dentro de la actividad biológica de algunas saponinas triterpénicas, se ha demostrado que ciertas presentan actividad citotóxica principalmente para tres líneas celulares tumorales, que comprenden J774.A1 (Monocíticas / macrófagos murinos), HEK - 293 (Células epiteliales humanas de riñón) y WEHI 164 (Células de fibrosarcoma murino) (Cioffi et al., 2006), además se le atribuye actividades antialérgicas, antibacterianas, anti-inflamatorias y anti-hepatotóxicas (Lu et al., 2000) .

### 3.5 Ensayo para la determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones MC028-03 y MC028-04.

Se emplearon las cinco bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, y

una bacteria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus*. Tomando como referencia el peso de las fracciones se trabajó con una disolución 10 veces la proporción con Dimetilsulfóxido (DMSO), 1mg/100uL DMSO, siendo la más alta en el ensayo de 250 ug/mL. Obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones F1 y F2

| Bacterias Gram - y Gram +   | CMI de las fracciones obtenidas |    |
|---|---------------------------------|----|
|   | F1                              | F2 |
| <b>ATB (Ec. S.t y S.a 3,906 µg/mL; P.v y P.a 15,625 µg/mL; K.p 1,953 µg/mL)</b> |                                 |    |
| Escehrichia coli (Ec.)  | NA                              | NA |
| Salmonella tiphyrium (S.t)  | NA                              | NA |
| Proteus vulgaris (P.v)  | NA                              | NA |
| Pseudomonas aeruginosa (P.a)  | NA                              | NA |
| Klebsiella pneumoniae (K.p)   | NA                              | NA |
| Staphylococcus aureus (S.a)   | NA                              | NA |

(NA): No activo, a la dosis más alta probada

**Fuente:** El autor, 2017

### 3.6 Ensayo para la determinación de la actividad de inhibición de monoamina oxidasa (MAO) en las fracciones MC028-03 y MC028-04.

Los compuestos ensayados fueron las fracciones MC028-03 y MC028-04 a una solución de DMSO de 10mg/ml, obteniendo los resultados mostrados Tabla 5

**Tabla 5.** Concentraciones inhibitoras de MAO-A y MAO-B

| Endpoint 316-357, 0-177.5min, 50ug/ml        | Promedio | Forma estándar | % residual activity MAO-B | % residual activity MAO-A |
|--|----------|----------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>DMSO vs MAO-A 0% -MAO-B 0% (+CLO+DEP)</b> | 1%       | 0%             | 0%                        | 0%                        |
| <b>DMSO vs MAO-A+B</b>                       | 100%     | 3%             | 100%                      | 100%                      |

|                                    |            |    |      |      |
|------------------------------------|------------|----|------|------|
| <b>DMSO vs MAO-B (+CLO 500nM)</b>  | 54%        | 2% | 100% | 0%   |
| <b>DMSO vs MAO-A (+DEP 1000nM)</b> | 42%        | 1% | 0%   | 100% |
| <b>MC28-03 vs MAO-A+B</b>          | <b>97%</b> | 3% |      |      |
| <b>MC28-03 vs MAO-B</b>            | 50%        | 1% | 93%  |      |
| <b>MC28-03 vs MAO-A</b>            | 39%        | 1% |      | 93%  |
| <b>MC28-04 vs MAO-A+B</b>          | <b>97%</b> | 3% |      |      |
| <b>MC28-04 vs MAO-B</b>            | 49%        | 1% | 90%  |      |
| <b>MC28-04 vs MAO-A</b>            | 38%        | 1% |      | 89%  |

**Fuente:** El autor, 2017

Siendo evaluada en su total (DMSO vs MAO-A+B) después la actividad específica de la MAO-B esta evaluada en presencia de Clogilyn (el inhibidor específico de la MAO-A) y MAO-A en presencia de Deprenyl, (el inhibidor selectivo de la MAO-B) por los productos, comprobando que no hay inhibición sobre la actividad total de las fracciones obtenidas MC28-03 y MC28-04.

## CONCLUSIONES

- Se obtuvo extractos en orden de polaridad ascendente de la raíz de la especie *Monnina crassifolia* a partir de 250 gramos de muestra, con un rendimiento del extracto metanólico del 12,07 %, seguido del extracto de agua de 1,27 %, acetato de etilo 0,94 % y finalmente 0,27 % de éter etílico.
- A partir del extracto de metanol, por medio de cromatografía en capa fina preparativa fase reversa, se obtuvieron dos fracciones de peso 3,8 mg y 2,4 mg, identificando por medio de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , que corresponden presumiblemente a una saponina triterpénica, con una fracción benzoato y otra acetato. Además, se presume que contenga un grupo carbonilo en el carbono 3, contenga al menos dos protones olefínicos, una unidad terminal  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  y por lo menos 7 unidades metílicas.
- Los ensayos para la actividad biológica en las fracciones MC028-03 y MC028-04, proporcionaron resultados negativos al no presentar actividad antimicrobiana ni antifúngica a la dosis más alta probada, así mismo no presento inhibición de la enzima monoamina oxidasa (MAO) .

## RECOMENDACIONES

- ✓ Efectuar trabajos similares para el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Monnina crassifolia*, debido a la gran riqueza de compuestos, y a la vez contribuir para el aprovechamiento de especies vegetales del Ecuador.
- ✓ Para el aislamiento de la raíz de la especie *Monnina crassifolia*, se debe partir de una mayor cantidad de materia prima, y obtener un mejor rendimiento en los extractos, que permita aislar metabolitos secundarios con mayor cantidad para su identificación.
- ✓ Al trabajar con el extracto metanólico se recomienda realizar una partición con n-butanol y agua destilada, por la gran cantidad de azúcares que posee esta especie.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Bashir, A., Hamburger, M., Gupta, M. P., Solis, P., & Hostettmann, K. (1992). Biphenyls and a xanthone from *Monnina sylvatica*. *Phytochemistry*, 31(9), 3203-3205.
- Bruneton, J. (1995). Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants Lavoisier Publishing Inc, c: o Springer Verlag, Secaucus, New Jersey, USA.
- Buitrón, X. (1999). *Ecuador: Uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación*: Traffic International.
- Calixto, J. B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1), 131-134.
- Cioffi, G., Dal Piaz, F., De Caprariis, P., Sanogo, R., Marzocco, S., Autore, G., & De Tommasi, N. (2006). Antiproliferative Triterpene Saponins from *Entada africana*. *Journal of Natural Products*, 69(9), 1323-1329.
- Chivian, E. (2002). Biodiversity: its importance to human health. *Center for Health and the Global Environment, Harvard Medical School, Cambridge, MA*.
- Chodat, R. (1893). *Monographia polygalacearum*: Aubert-Schuchardt.
- Eriksen, B. (1993a). Floral anatomy and morphology in the Polygalaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 186(1-2), 17-32.
- Eriksen, B. (1993b). Phylogeny of the Polygalaceae and its taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 186(1-2), 33-55.
- Eriksen, B. (1993c). A revision of *Monnina* subg. *Pterocarya* (Polygalaceae) in northwestern South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 191-207.
- Eriksen, B., & Persson, C. (2007). Polygalaceae. *Flowering Plants· Eudicots*, 345-363.
- Ewing, G. W., & Meza, E. E. (1978). Métodos instrumentales de análisis químicos: Libros McGraw-Hill de México.

- Felder, E., Uggeri, F., Fumagalli, L., & Vittadini, G. (1990). Nuclear magnetic resonance: Google Patents.
- Fu, G.-M., Wang, Y.-H., Gao, S., Tang, M.-J., & Yu, S.-S. (2005). Five new cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Symplocos chinensis*. *Planta medica*, 71(07), 666-672.
- Gallego Londoño, V., Arango Villa, S., Ospina Medina, L., Arango Valencia, V., & Cardona Maya, W. (2014). Actividad espermicida de saponinas esteroidales y triterpénicas extraídas de diferentes plantas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 76-84.
- Grondona, E. M. (1945). Las especies argentinas del género *Monnina* (Polygalaceae). *Darwiniana*, 7(1), 1-37.
- Gutiérrez Bouzán, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Gutiérrez, MC; Droguet, M." La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor". Boletín Intexter, juliol 2002, núm. 122, p. 35-41.*
- Hernández, R., & Jordá, M. G. (1981). *Plantas medicinales*: Editorial Pax México.
- Jiang, D.-J., Hu, G.-Y., Jiang, J.-L., Xiang, H.-L., Deng, H.-W., & Li, Y.-J. (2003). Relationship between protective effect of xanthone on endothelial cells and endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(23), 5171-5177.
- Kinghorn, A. D. (1992). Plants as sources of medicinally and pharmaceutically important compounds *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture* (pp. 75-95): Springer.
- Kubitzki, K., Rohwer, J., Bittrich, V., Bayer, C., Kadereit, J., Kramer, K., . . . Gotz, E. (1990). The families and genera of vascular plants.
- Lepore, L., Malafrente, N., Condero, F. B., Gualtieri, M. J., Abdo, S., Dal Piaz, F., & De Tommasi, N. (2011). Isolation and structural characterization of glycosides from an anti-angiogenic extract of *Monnina obtusifolia* HBK. *Fitoterapia*, 82(2), 178-183.

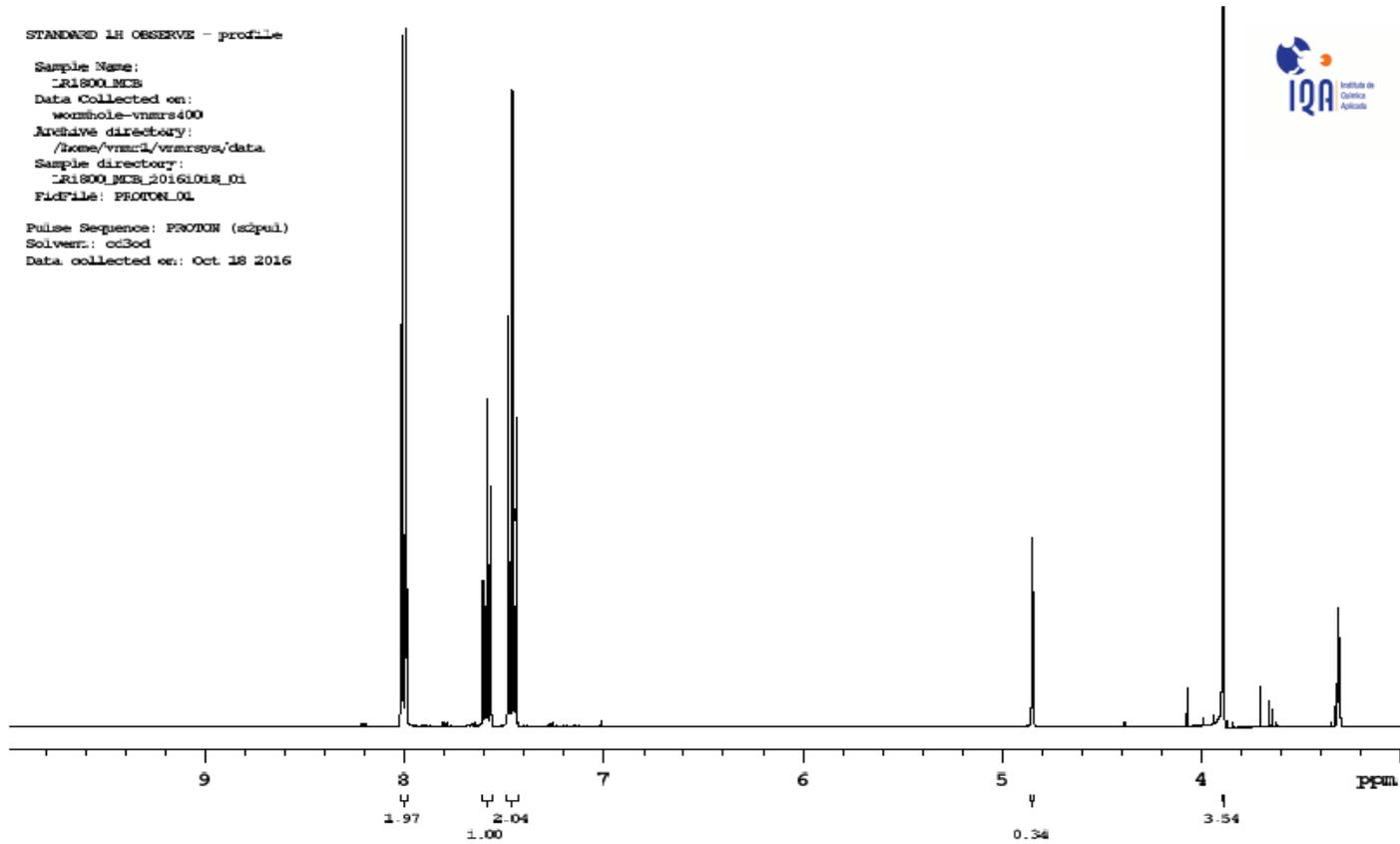
- Lu, Y., Umeda, T., Yagi, A., Sakata, K., Chaudhuri, T., Ganguly, D., & Sarma, S. (2000). Triterpenoid saponins from the roots of tea plant (*Camellia sinensis* var. *assamica*). *Phytochemistry*, *53*(8), 941-946.
- Mahmood, N., Moore, P., De Tommasi, N., De Simone, F., Colman, S., Hay, A., & Pizza, C. (1993). Inhibition of HIV infection by caffeoylquinic acid derivatives. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, *4*(4), 235-240.
- Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., & Liu, C. (2010). Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, *81*(7), 703-714.
- Marco, J. A. (2006). *Química de los productos naturales: aspectos fundamentales del metabolismo secundario: Síntesis*.
- Martínez, M. (2001). Saponinas esteroides. *Revista udea*, *3*, 2-19.
- Mena Valdés, L., Tamargo Santos, B., Salas Olivet, E., Plaza Paredes, L. E., Blanco Hernández, Y., Otero González, A., & Sierra González, G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L.(jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *20*(1), 106-116.
- Olugbade, T. A., Ogundaini, A., Birlirakis, N., Païs, M., & Martin, M.-T. (2000). Petersaponins III and IV, triterpenoid saponins from *Petersianthus macrocarpus*. *Journal of Natural Products*, *63*(5), 716-719.
- Pinto, D. C., Fuzzati, N., Chiriboga, X., & Hostettmann, K. (1994). Xanthone and antifungal constituents from *Monnina obtusifolia*. *Phytochemistry*, *37*(3), 875-878.
- Quezada, A. (2008). *Las Plantas Medicinales* Revista Biocenosis Vol. 21 (1-2).
- Ranilla, L. G., Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource technology*, *101*(12), 4676-4689.
- Rao, S. R., & Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, *20*(2), 101-153.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, *39*(5), 603-613.

- Rojas, J., Vizcaya, M., Morales, A., & Nuñez, R. (2012). Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(1).
- Romero González, R., Fernández Moreno, J. L., Plaza Bolaños, P., Garrido Frenich, A., & Martínez Vidal, J. L. (2007). Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. *Revista Española de salud pública*, 81(5), 461-474.
- Ruiz, H., López, H. R., & Pavón, J. (1798). *Systema vegetabilium florae peruvianaee et chilensis: Typis Gabrielis de Sancha*.
- Seigler, D. S. (2012). *Plant secondary metabolism*: Springer Science & Business Media.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T., Settle, F. A., Rubinson, K. A., Rubinson, J. F., & Chasteen, T. G. (2002). Principios de análisis instrumental. *México*2008.
- Sparg, S., Light, M., & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2), 219-243.
- Vélez-Terranova, M., Gaona, R. C., & Sánchez-Guerrero, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las Plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3), 489-499.

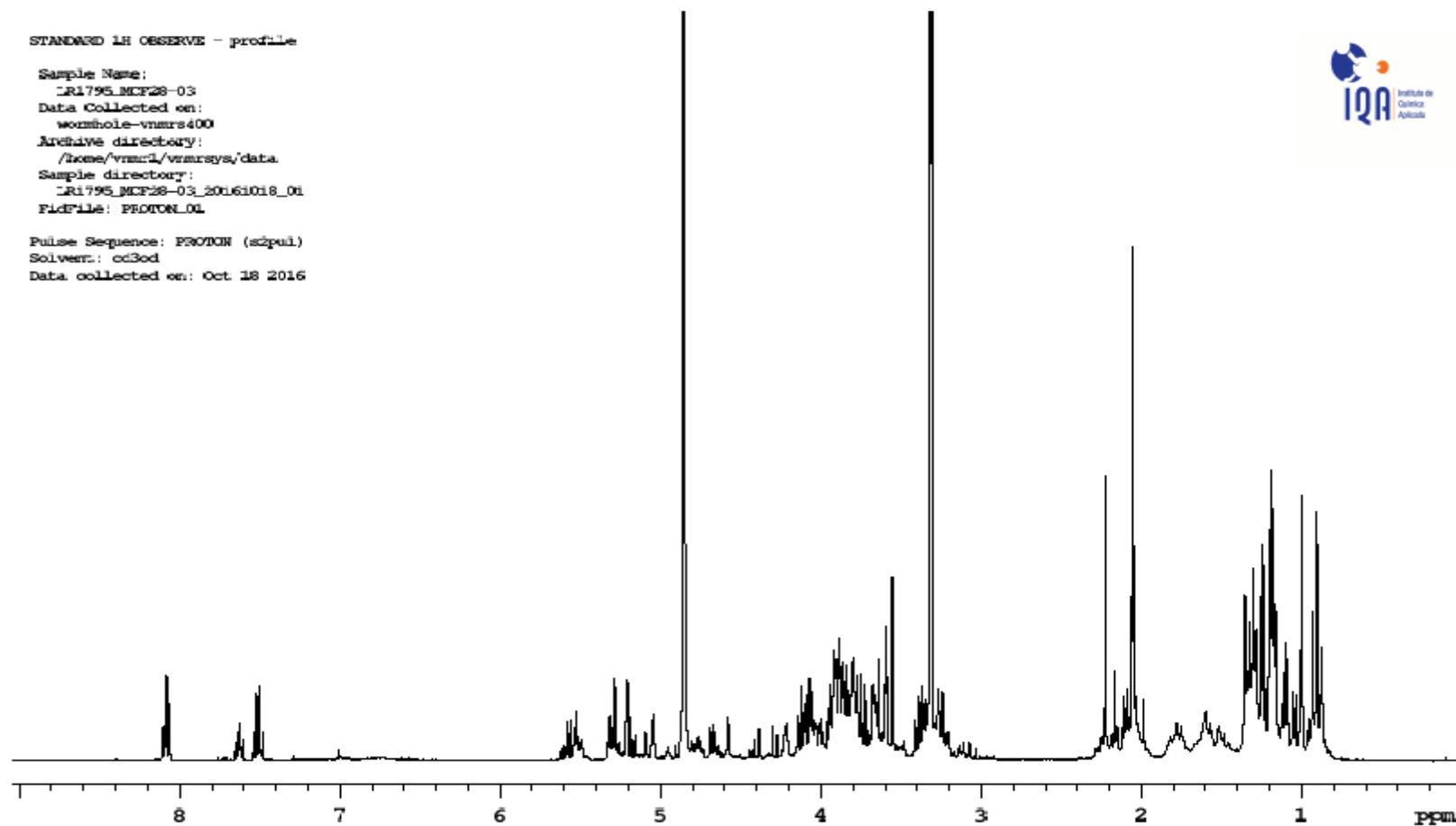
## **ANEXOS**

## Espectros de Resonancia Magnética y Nuclear

### Anexos 1: Espectros de Resonancia Magnética y Nuclear del benzoato de metilo



## Anexos 2: Espectros de Resonancia Magnética de $^1\text{H}$ y Nuclear de las fracciones MC028-03

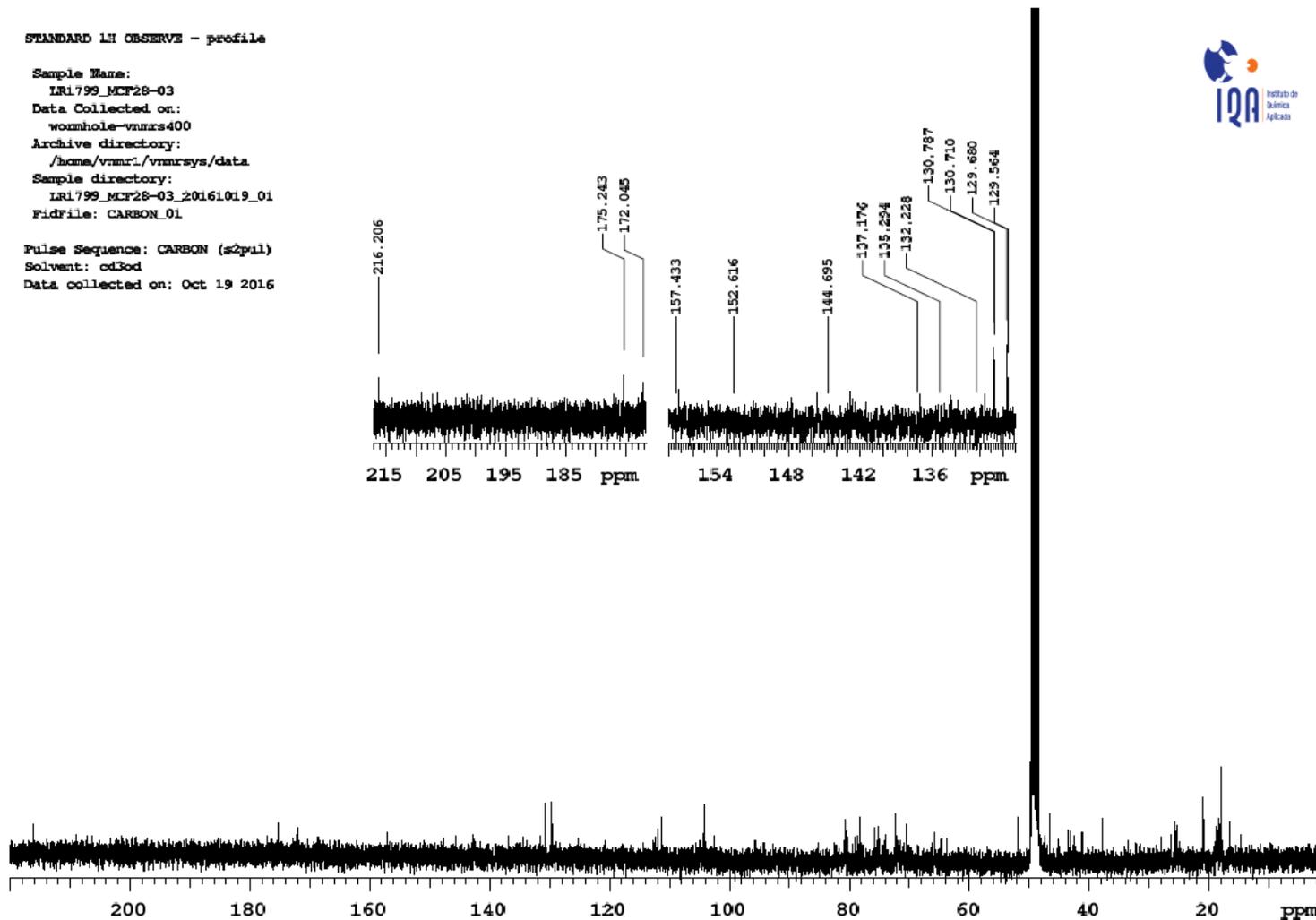


# Espectros de Resonancia Magnética de $^{13}\text{C}$ y Nuclear de las fracciones MC028-03

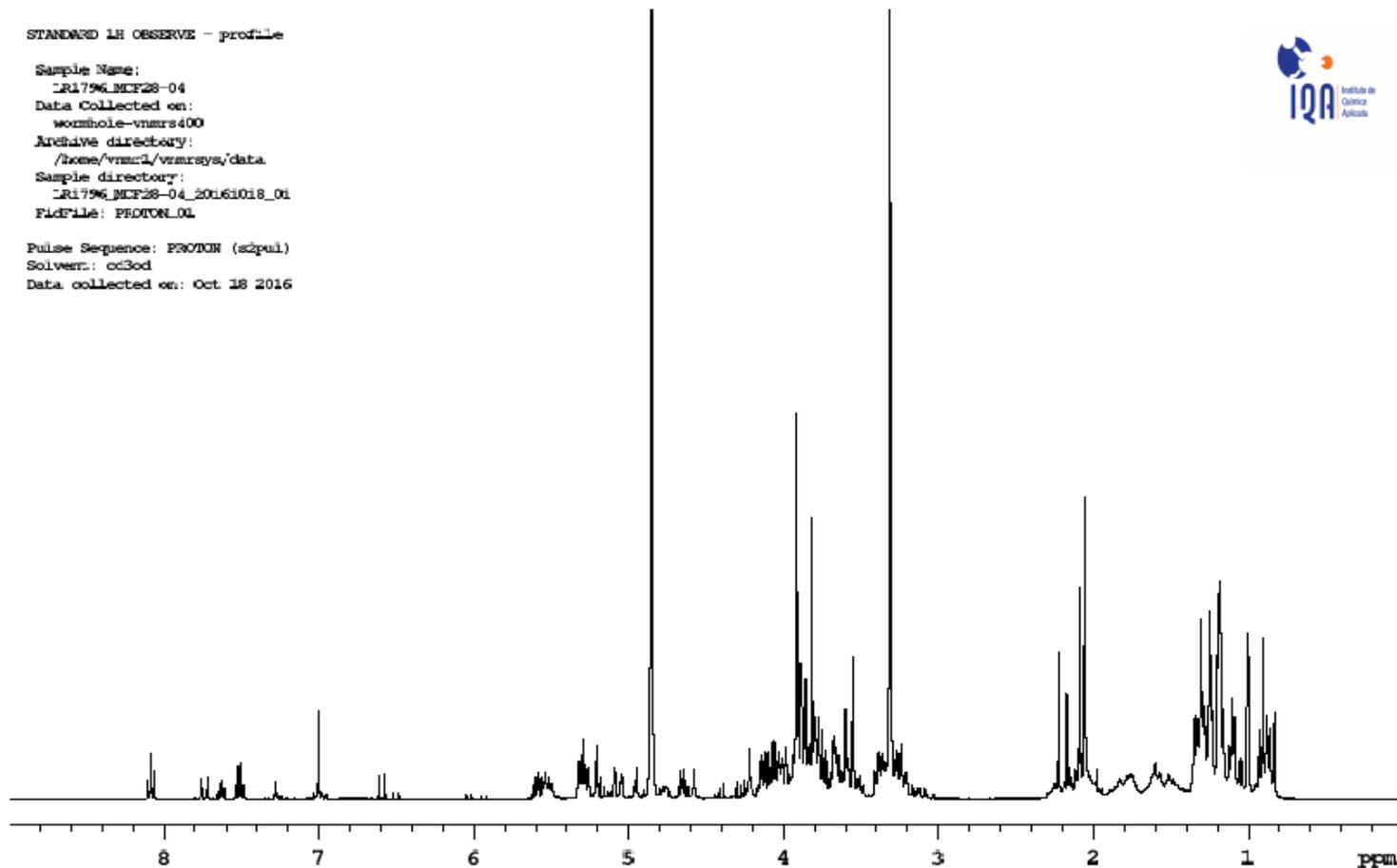
STANDARD LH OBSERVE - profile

Sample Name:  
LRI799\_MCF28-03  
Data Collected on:  
wormhole-vnmrs400  
Archive directory:  
/home/vnmr1/vnmrsys/data  
Sample directory:  
LRI799\_MCF28-03\_20161019\_01  
FidFile: CARBON\_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)  
Solvent: cd3od  
Data collected on: Oct 19 2016



### Anexos 3: Espectros de Resonancia Magnética de $^1\text{H}$ y Nuclear de las fracciones MC028-04



# Espectros de Resonancia Magnética de $^{13}\text{C}$ y Nuclear de las fracciones MC028-04

STANDARD LH OBSERVE - profile

Sample Name:  
LRI796\_MCF28-04  
Data Collected on:  
wormhole-vnmrs400  
Archive directory:  
/home/vnmr1/vnmrsys/data  
Sample directory:  
LRI796\_MCF28-04\_20161018\_01  
FidFile: CARBON\_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)  
Solvent: cd3od  
Data collected on: Oct 18 2016

