



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

Identificación, caracterización y evaluación de la actividad citotóxica de extractos y metabolitos secundarios a partir de la parte aérea de *Bejaria resinosa* mutis ex LF en la ciudad de Loja cantón Saraguro.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Quisatagsi Pazán, Enrique Vinicio

DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio, Ph.D.

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 DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph. D

Chabaco Patricio Armijos Riofrio

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración

El presente trabajo de titulación: Identificación, caracterización y evaluación de la actividad citotóxica de extractos y metabolitos secundarios a partir de la parte aérea de *Bejaria resinosa* mutis ex LF en la ciudad de Loja cantón Saraguro realizado por Enrique Vinicio Quisatagsi Pazán ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuánto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2017

Chabaco Patricio Armijos Riofrio

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Enrique Vinicio Quisatagsi Pazán declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Identificación, caracterización y evaluación de la actividad citotóxica de extractos y metabolitos secundarios a partir de la parte aérea de *Bejaria resinosa* mutis ex LF en la ciudad de Loja cantón Saraguro, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Chabaco Patricio Armijos Riofrío director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la universidad".

Quisatagsi Pazán Enrique Vinicio

1105165250

DEDICATORIA

Dedico esta tesis primeramente a Dios, a la Virgen María quienes me dieron fuerza e inspiración para la conclusión de esta tesis.

A Mis padres quienes me dieron la vida, educación, apoyo ante muchas adversidades y muchos consejos.

La Dr. Alirica Suárez y el Ing. Vladimir Morocho quienes me educaron para poder realizar esta tesis tanto en el campo práctico como teórico.

A mis amigos y compañeros de estudio, quienes acompañaron el transcurso de mi camino estudiantil ya que sin su ayuda nunca hubiera podido culminar la tesis.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de tesis me gustaría agradecerle a Dios por bendecirme y ayudarme alcanzar una meta más en mi vida

A mis padres ya que ellos fueron la columna para que yo siga adelante sin importar los problemas o adversidades que se presentan en la vida diaria.

A la Dra. Alirica quien gracias a su esfuerzo, experiencia, conocimiento y motivación ha obtenido en mí todo mi esfuerzo para que yo pueda terminar mi tesis con éxito.

Además me gustaría agradecer a mis profesores ya que todos han aportado muchos conocimientos, y en especial al Ing. Vladimir Morocho por sus consejos, enseñanzas y más que todo por su amistad.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida a las que me encantaría agradecerles su amistad y compañía en los momentos más difíciles de mi vida, quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por sus bendiciones.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO 1	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Antecedentes.....	6
1.2. Biodiversidad en el Ecuador.....	6
1.3. <i>Ericaceae</i>	7
1.4. Género <i>Bejaria</i>	7
1.5. <i>Bejaria resinosa</i> Mutis.....	8
1.6. Descripción botánica de la especie <i>Bejaria resinosa</i> Mutis	9
1.7. Técnicas de separación, purificación, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios	9
1.7.1. Extracción.....	9
1.7.2. Filtración.....	10
1.7.3. Concentración por vacío.....	10
1.7.4. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	10
1.7.5. Cromatografía de capa fina y columna	11
1.7.6. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	12

1.8.	Metabolitos secundarios y su clasificación.....	13
1.8.1.	Terpenos.....	13
1.8.1.1.	<i>Compuestos triterpénicos</i>	13
1.8.2.	Flavonoides.....	14
1.9.	Estudio de toxicidad y tipos de líneas celulares usadas.....	15
1.9.1.	Cultivos celulares.....	15
1.9.3.	Carcinoma de colon (línea RKO).....	16
1.9.4.	Cáncer de mama (línea MCF-7).....	17
1.9.5.	Carcinoma de próstata (línea PC-3).....	17
1.9.6.	Viabilidad celular.....	18
CAPITULO 2.....		19
MATERIALES Y MÉTODOS.....		19
2.2.	Área de Recolección de la Muestra.....	20
2.3.	Obtención de extracto metanólico.....	21
2.3.1.	Partición líquido - líquido (ASBSM).....	21
2.4.	Cromatografía de Capa Fina.....	21
2.5.	Fraccionamiento del extracto de diclorometano (ASBSD).....	22
2.5.1.	Prueba de disolución del extracto de diclorometano (ASBSD).....	23
2.6.	Fraccionamiento del extracto de Hexano (ASBSH).....	23
2.7.	Fraccionamiento del extracto metanólico ASBSM.....	24
2.8.	Ensayo de viabilidad celular.....	24
CAPITULO 3.....		25
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....		25
3.1.	Extractos totales obtenidos de <i>Bejaria resinosa</i>	26
3.2.	Fraccionamiento del extracto de diclorometano (ASBSD).....	26
3.2.1.	Compuesto 1.....	26
3.2.2.	Compuesto 2.....	30
3.1.	Fraccionamiento del extracto metanólico (ASBSM).....	32
3.2.	Evaluación de la actividad biológica.....	34

CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
ANEXOS COMPUESTO 1	38
ANEXOS COMPUESTO 2	40
ANEXOS COMPUESTO 2	43
BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. FOTOGRAFÍA DE BEJARIA RESINOSA MUTIS.....	9
GRÁFICA 2. EQUIPO DE RMN 400 MHZ.....	11
GRÁFICA 3. FOTOGRAFÍA DE BEJARIA RESINOSA MUTIS.....	14
GRÁFICA 4. ESTRCUTURA QUERCETINA-3-O-RAMNOSA.....	15
GRÁFICA 5. TIPOS DE CULTIVO CELULAR.....	16
GRÁFICA 6. ASTROCITOMA.....	17
GRÁFICA 7. CARCINOMA DE COLON.....	17
GRÁFICA 8. CÁNCER DE SENO.....	18
GRÁFICA 9. CARCINOMA DE PRÓSTATA.....	19
GRÁFICA 10. ESQUEMA DEL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.....	20
GRÁFICA 11. ÁCIDO URSÓLICO.....	28
GRÁFICA 12: A –AMIRINA.....	31
GRÁFICA 13: B –AMIRINA.....	31
GRÁFICA 14: QUERCETINA-3-O-RAHMNOSA.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE BEJARIARESINOSA MUTIS	9
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS TERPENOS	13
TABLA 3. CLASIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES	14
TABLA 4. EXTRACTOS OBTENIDOS	21
TABLA 5. FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO	22
TABLA 6. ESTUDIO EXTRACTO HEXÁNICO	23
TABLA 7. ESTUDIO DEL EXTRACTO METANÓLICO	24
TABLA 8. PESO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS	26
TABLA 9. COMPARACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES CON BIBLIOGRAFÍA DEL ÁCIDO URSÓLICO	29
TABLA 10. COMPARACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES CON LA LITERATURA DE LA MEZCLA DE A Y B -AMIRINA, CORROBORADOS MEDIANTE ¹³C-RMN	31
TABLA 11. COMPARACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES CON LA LITERATURA DE QUERCITRIN O QUERCETINA-3-O-RAHMNOSA	33
TABLA 12. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	35

RESUMEN

A partir de los extractos en hexano, diclorometano y metanol de la Especie *Bejaria resinosa*, se aislaron e identificaron mediante técnicas espectrográficas los siguientes compuestos (1) ácido ursólico, (2) mezcla de α y β amirina y (3) quercetrin. Se evaluó la actividad citotóxica del extracto acuoso y del ácido ursólico frente a distintas líneas celulares cancerosas que corresponden a: Cáncer de seno, Cáncer de próstata, Astrocitoma y cáncer de colon. Los resultados indican la siguiente valoración, concluyen que el ácido ursólico tiene actividad contra las líneas celulares tumorales: Cáncer de seno, Astrocitoma y cáncer de próstata.

PALABRAS CLAVES: *Bejaria resinosa*, *Ericaceae*, ácidos triterpénicos, flavonoides, citotoxicidad, Ecuador, Líneas celulares.

ABSTRACT

The following compounds (1) ursolic acid, (2) mixture of α and β amirine and (3) quercetin were isolated and identified by spectrophotometric techniques from hexane, dichloromethane, methane extracts. The cytotoxic activity of aqueous extract and ursolic acid was evaluated against different cancer cell lines corresponding to: Breast cancer, Prostate cancer, Astrocytoma and colon cancer. The results indicate the following assessment, concluding that ursolic acid has activity against tumor cell lines: Breast cancer, Astrocytoma and prostate cancer.

KEYWORDS: Bejaria resin, Ericaceae, triterpenic acids , flavonoids, cytotoxicity , Ecuador , Cell Lines .

INTRODUCCIÓN

Ecuador está dentro de los países con mayor diversidad en el mundo y es uno de los países con mayor práctica en el campo de la medicina tradicional (Ponz E, Carpio G, 2005). La población utiliza muchas especies de flora en el tratamiento de muchas dolencias y enfermedades (Tene et al., 2007), entre ellas se encuentran varias especies de la familia Ericaceae (Suárez et al., 2015).

Las Ericáceae se caracterizan por ser árboles pequeños, arbustos o hierbas de hábito erecto, poseen hojas alternas o algunas veces opuestas, simples o coriáceas. Presentan una distribución característica de regiones templadas y montañas tropicales. De éstas especies existen 110 géneros y 4000 especies (Willian, 2002). El género *Bejaria* a su vez tiene 15 especies, distribuidas desde el sur este de Estados Unidos, Cuba y México hasta Bolivia. En Ecuador, existen 5 especies típicas de la zona alta entre los 2000 m s.n.m, en especial de los sub-páramos andinos: *B. aestuans* Mutis ex L., *B. mathewsii* Fielding & Gardner, *B. resinosa* Mutis ex LF, and *B. subsessilis* Benth

Sobre los usos tradicionales de plantas del género *Bejaria* se reporta que, *B. aestuans* es usada en Perú para tratar infecciones y enfermedades gastrointestinales, y *B. cinnamomea* ha sido utilizada como un antiséptico vaginal y en problemas de la menstruación.

En lo que respecta a estudios del tipo fitoquímico, las Ericaceae son fuente de triterpenos. Sin embargo, estudios de tipo fitoquímico y farmacológico del género *Bejaria* son escasos, por ejemplo en Colombia se usa para tratamiento de heridas, purgante y para prevenir los ataques al corazón, los principales metabolitos que se reportan son: triterpenos (taraxerol, α y β amirina, lupeol, ácido ursólico) y flavonoides (quercetina)

B. resinosa se distribuye ampliamente en la provincia de Loja del Sur de Ecuador, los habitantes del cantón Saraguro la llaman pena de cerro y payama. Dicha etnia es la que más usos terapéuticos le da, se usa en problemas del sistema nervioso, en particular se utiliza las flores, hojas y tallos para realizar infusiones para tratar enfermedades hepáticas. Hasta el momento en literatura se ha demostrado que existen metabolitos secundarios de tipo flavonoide, triterpénico. Debido a la importancia medicinal de esta especie para los saraguros se realizó la presente

investigación para medir la composición química de la especie y su evaluación toxicológica o antiproliferativa en células cancerosas (Suárez et al., 2015).

Es de gran importancia indicar que el estudio realizado presenta resultados en cultivos celulares para la determinación de la viabilidad celular y toxicidad, los métodos usados fueron MTT (Coll Julio, 1993).

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Se puede afirmar que con el hombre nació el uso de las plantas medicinales, desde los tiempos prehistóricos hasta comienzos del siglo XIX ya sea por algún ensayo o simplemente por error, en si el hombre usaba estos elementos para curar sus enfermedades y la de sus animales. Con cada generación se perfeccionaba la práctica médica y se la denominó medicina tradicional. Todas las culturas han adquirido un conocimiento de plantas y órganos de estas usados en medicina tradicional (Fonnegra R, 2007), desde la antigüedad, varias sociedades han recurrido al uso de las plantas para hacer uso de necesidades primarias (Tene et al., 2007)

La medicina tradicional es un conjunto de conocimientos y prácticas que tiene como fundamento el saber médico ancestral, prehispánico, modificado a lo largo de los siglos por muchas culturas indígenas e incluso de la medicina occidental. (Ponz E, Carpio G, 2005)

El estudio de la medicina tradicional sabe reconocer que ninguna cultura en ninguna parte del mundo es superior a otra, ya que sus títulos como curanderos o chamanes adquieren su legitimidad cuando son aprobados como tales por dicho grupo y son los que rigen el comportamiento de esa colectividad. Hace aproximadamente 700 años existían una gran diversidad de grupos poblacionales aborígenes, quienes para solucionar sus problemas de salud recurrían al conocimiento de ciertos agentes de salud nativos de cada comunidad o cacicazgo, quienes eran encargados de la tradición médica de sus tribus o clanes específicos. (Serrano et al., 1997)

1.2. Biodiversidad en el Ecuador

Ecuador está dentro de los países con mayor diversidad en el mundo y es uno de los países con mayor práctica en el campo de la medicina tradicional. La población las utiliza en el manejo de muchas dolencias y enfermedades. (Suárez et al., 2015). Dentro de los países privilegiados en términos de biodiversidad tenemos a Ecuador, que posee muchos lugares interesantes en cuanto a la cultura y ambiente donde podemos encontrar manglares, páramos, bosques, en fin muchos tipos de ecosistemas, a pesar de su tamaño es un país que brinda muchos servicios y es lo que lo hace un país maravilloso. Una de las razones para que se de este fenómeno es la posición tropical. Se ha utilizado la cobertura vegetal medir el nivel de ecosistemas. (Mena, 2005)

Gracias a la publicación del monumental Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador se ha documentado la presencia de más de 16000 especies, la misma que ha incrementado un 6% en los últimos años hasta sobrepasar las 17000. De acuerdo a una publicación del libro rojo de las plantas vasculares del Ecuador se documentó la existencia de 4011 especies conocidas solamente en Ecuador. Un ejemplo de plantas introducidas tenemos la de la familia Rutaceae, las mismas que presentan una característica muy importante y es la poseer olores muy agradables (Balslev, H; Navarrete, H; Torres, L; Marcia, 2008)

1.3. Ericaceae

Son árboles pequeños, arbustos o hierbas de hábito erecto, poseen hojas alternas o algunas veces opuestas, simples o coriáceas. Tiene distribución en regiones templadas y montañas tropicales, consiste en 110 géneros y 4000 especies, los géneros más ricos en especies son *Rhododendron* con 850 especies y *Erica* con 600 seguidos por *Vaccinium* con 300, *Cavendishia* 155 y *Gaultheria* con 115 especies. (Willian, 2002)

Ericaceae se ha generalizado en todo el mundo ya que existen en zonas templadas, zonas frías de la montaña y el neotrópico. (Suárez et al., 2015)

1.4. Género *Bejaria*

Tiene 15 especies, se distribuye en el sureste de EEUU, Cuba, México y Bolivia. En Ecuador existen 5 especies ubicadas al sur de los Andes, cuatro especies son típicas de las zonas de mayor vegetación, especialmente en el subpáramo existen las siguientes: *B. aestuans*, *B. mathewsii*, *B. resinosa* Mutis ex LF y *B. subsessilis*, esta última especie se encuentra en el libro rojo de plantas medicinales en Ecuador. (Suárez et al., 2015).

Las plantas de este género son ampliamente utilizados en la medicina tradicional de algunos países como: Colombia, Perú, Brasil, etc. En la comunidad Saraguro al Sur del Ecuador *Bejaria resinosa* es recurrida para tratar artritis, dolor de riñón y relajante, en Perú la especie *B. aestuans* se usa para tratar las infecciones y enfermedades gastrointestinales y al especie *B. cinnamomea* ha sido usada por muchos años como antiséptico vaginal y para anomalías menstruales. En cuanto al estudio toxicológico-

molecular se dice que posee efectos tóxicos en distintas especies animales como *Pieris*, *Rhododendro*, *Leucothoe*, *Lyenis* y *Kalmia* (Suárez et al., 2015)

1.5. ***Bejaria resinosa* Mutis.**

Bejaria resinosa Mutis crece en el páramo con hojas de envés blanco y flores rojas muy vistosas, algunas veces las hojas rojas contiene pétalos pegajosos en su cara externa, la misma que sirve de trampa a mosquitos e insectos pequeños. (Willian, 2002)

Existen pocos datos o investigaciones de estudios fitoquímicos y farmacológicos de la especie de *Bejaria resinosa*, se encontraron muchos usos en distintas partes del mundo, por ejemplo en Colombia se usa para tratamiento de heridas, purgante y para prevenir los ataques al corazón, se reportan la existencia de metabolitos dentro de los cuales tenemos los principales: triterpenos y flavonoides (Suárez et al., 2015)

B. resinosa se distribuye ampliamente en la provincia de Loja del Sur de Ecuador, los habitantes del cantón Saraguro lo llaman pena de cerro y payama. La etnia que más uso le da es la Saraguro y lo usa en problemas del sistema nervioso, en particular se usa las flores, hojas y tallos para realizar infusiones para tratar enfermedades hepáticas. Hasta el momento en literatura se ha demostrado que existen metabolitos secundarios de tipo flavonoide (Quercetina-3-O-rahmnosa), triterpénico (ácido ursólico y mezclas de α y β amirina). Debido a la importancia medicinal de esta especie se aprobó el proyecto donde se usará esta especie para medir el alcance fitoquímico y farmacológico en la evaluación toxicológica o antiproliferativa en células cancerosas (Suárez et al., 2015).

1.6. Descripción botánica de la especie *Bejaria resinosa* Mutis



Gráfica 1. Fotografía de *Bejaria resinosa* Mutis

Fuente: Autor, 2017

Tabla 1. Clasificación botánica de la especie *Bejaria resinosa* Mutis

REINO	Plantae
PHYLUM	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Ericales
FAMILIA	Ericaceae
GÉNERO	<i>Bejaria</i> Mutis
ESPECIE	<i>Bejaria resinosa</i> Mutis

Fuente: Autor

1.7. Técnicas de separación, purificación, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios

1.7.1. Extracción

El proceso de maceración consiste en poner en contacto la droga y el solvente durante varios días. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente, depende de factores, como por ejemplo, su naturaleza, el tamaño de partícula, su contenido de humedad y cantidad, y constituyentes que están relacionadas con el solvente. El proceso clásico de maceración consiste en dejar la muestra en contacto con el solvente durante varios días, con agitación ocasional. Tanto la maceración simple como la maceración dinámica pueden ser ejecutadas a una temperatura ambiente o a temperaturas más elevadas. Las grandes desventajas del proceso de maceración son lentitud del proceso y el hecho de no ser posible alcanzar la extracción completa de la muestra. Los equipos para la maceración estática son grandes y cerrados, en ellos está en contacto la muestra con el solvente durante el tiempo necesario(Nikolai, 2000)

1.7.2. Filtración

Es una técnica que produce la separación de partículas sólidas o gotas de líquidos o gases a través de un medio filtrante, el líquido separado se denomina filtrado.

Las ímpetus que provocan la filtración serían la gravedad o la presión hidrostática, ya que si no hay fuerza que impulse la presión no habría caudal de filtrado.

1.7.3. Concentración por vacío

Es el método más efectivo para garantizar un concentrado del producto que se va a estudiar. De un lado permite evaporar el solvente o extractante y por otra parte, permite concentrar el principio activo hasta prácticamente sequedad. La concentración al vacío reduce hasta 15 veces el volumen del residuo a tratar mediante una simple concentración, reduce la demanda del consumo de agua y una de las más importantes es de poder recuperar productos valiosos (Tobergte & Curtis, 2013)

1.7.4. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética de ^{13}C se presenta normalmente como un complemento a la de protón. El espectro de RMN de ^{13}C aporta una idea del entorno magnético de los átomos de carbono que existen en la molécula. Los espectros de RMN de ^{13}C son bastantes complicados de analizar si solo se dispone de los mismos. Sin embargo, como complemento los espectros de RMN de ^1H , son mucho más sencillos de analizar, en este caso solo hay que correlacionar el espectro de carbono con el de protón y determinar los distintos tipos de carbono magnéticamente distintos que posee la molécula (Sierra I, Quintanilla D, Ruíz S, 2010)

Los espectros de ^{13}C -RMN se registran habitualmente con desacoplamiento protónico de banda ancha, de esta forma se consigue un aumento significativo de la relación señal/ruido, ya que las señales del núcleo de ^{13}C , poco sensibles, aparecen como singuletes agudos sin desdoblamiento alguno debido al acoplamiento ^{13}C , ^1H (Duddeck, Dietrich W, 2010)



Gráfica 2. Equipo de RMN 400 MHz

Fuente: Autor, 2017

1.7.5. Cromatografía de capa fina y columna

Consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de un traslado diferencial que va sobre una capa fina de adsorbente. El uso de la cromatografía en el año 1987 era cualitativo o semi-preparativo. Dentro de las ventajas tenemos las siguientes:

- No se necesita de equipos costosos o complejos.
- Es fácil su comprensión y realización
- Rapidez, reproducibilidad y ligereza en el análisis

- Solo necesita una pequeña cantidad de solvente y de muestra para que se realice el procedimiento.
- Se puede analizar varias muestras en una sola placa cromatográfica.
- Se puede efectuar separaciones en escalas semi-preparativas (Nikolai, 2000)

La cromatografía de columna se caracteriza por poseer una fase estacionaria que se encuentra dentro de una columna, por la que se hace pasar una fase móvil líquida o gaseosa que estará en permanente movimiento, existen varios tipos de cromatografía de columna: intercambio iónico, exclusión, afinidad, adsorción, partición y fase reversa.

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

La espectrometría de masas es una técnica analítica que proporciona información sobre la estructura de una determinada molécula y para conocer la composición cualitativa y cuantitativa de moléculas. Una de las más importantes es la identificación de compuestos puros, con la obtención de su peso y su fórmula molecular (Maria, 2008)

Esta es una de las técnicas analíticas más completas que existen, está ya no es usada solamente en la parte investigativa sino también en análisis de rutina de muchos procesos industriales e incluso en método de control de calidad.

Sus principales condiciones son:

- Capacidad de no equivocarse con la identificación ya que nos proporciona datos específicos de cada molécula.
- Mide la concentración de las sustancias.
- Es universal y específica.
- Nos brinda información de la estructura de la molécula en análisis.
- Nos brinda resultados en cuestión de segundos.

La espectrometría de masas no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin antes haber realizado una separación de sus componentes, resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar (Gutiérrez & Droguet, 2002)

1.8. Metabolitos secundarios y su clasificación

Para sintetizar sustancias complejas a partir de sustancias más simples, los seres humanos poseen células que aplican una serie de reacciones químicas, que constituyen al metabolismo. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se clasifican de acuerdo a un grupo taxonómico, presentan propiedades biológicas y se caracterizan por poseer distintos usos y aplicaciones, también reciben el nombre de productos naturales (Ávalos & Elena, 2009)

1.8.1. Terpenos

Se inician a partir de Acetil-CoA, producen tanto metabolitos primarios como secundarios. Todos los terpenoides, son derivados del compuesto Isopentenil difosfato que se forma en la vía del ácido mevalónico (Piñol et al., 1996)

La clasificación de los terpenos se detalla a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los terpenos

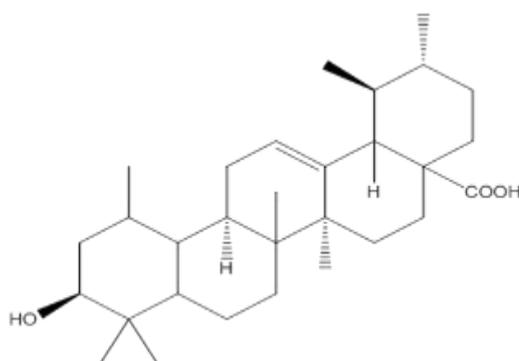
CLASE	CARACTERÍSTICAS
Monoterpeno	Resultan de la unión de dos unidades de isopreno
Sesquiterpeno	Poseen 15 átomos de C y derivan del ácido mevalónico
Diterpenos	Poseen 20 átomos de C y derivan de la unión de 4 unidades de isopreno.
Triterpenos	Se pueden considerar como un tipo de especial de compuestos terpenoides que contienen el esqueleto ciclopentano-perhidrofenantreno.
Fitostanoles	Son los fitosteroles reducidos

1.8.1.1. *Compuestos triterpénicos*

Estos derivan del escualeno que consta de dos cadenas de farnesilo unidas cola a cola. Casi todos los triterpenos tienen esqueletos de carbono irregulares pentacíclicos,

pero algunos como el eufol, poseen un núcleo tetracíclico, que es característico de los esteroides (Davies, Giovanelli, & Rees, 1969)

A continuación, se detallan algunos de los compuestos que forman parte del grupo de triterpenos: ácido ursólico (gráfico 3), alfa-amirina, beta-amirina, taraxerol.



Gráfica 3. Estructura ácido ursólico
Fuente: Autor, 2016

1.8.2. Flavonoides.

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos, los mismo que están ligados a un anillo pirano, y de acuerdo a las variaciones del pirano se clasifican los flavonoides. La síntesis de los flavonoides tiene lugar en las plantas a partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. Los flavonoides se encuentran en numerosas partes de las plantas y semillas, logrando más de 5,000 distintos flavonoides que los clasificamos de la siguiente manera: ácido elágico, antocianidinas, catequinas, citroflavonoides, isoflavonoides, kaemferol y proantocianidinas (Jiménez et al., 2009) En la tabla 3 se da a conocer la clasificación de los flavonoides.

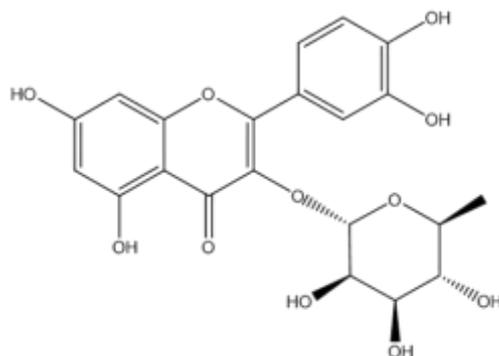
Tabla 3. Clasificación de los flavonoides

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
Antocianidinas	Posee un OH unido en la posición 3 poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4	Antocianidina
Flavanos	Cuenta con OH en posición 3	Catequina
Flavonas	carecen del grupo hidroxilo en posición C3.	Diosmetina

Flavonoles	OH en posición 3 y Carbonilo en posición	Quercetina
-------------------	--	------------

Fuente: Autor, 2017

La estructura de quercetina-3-O-ramnosa se puede observar en el gráfico 4.

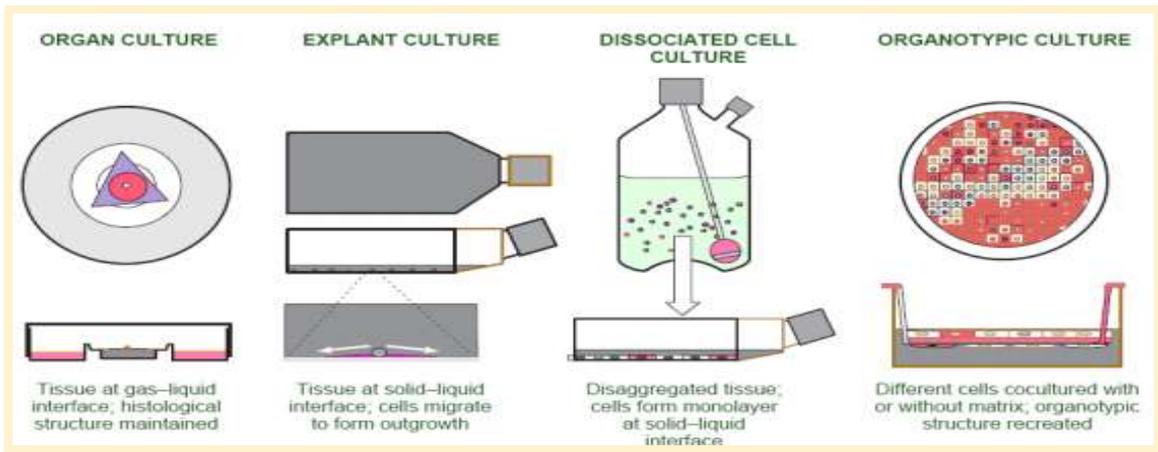


Gráfica 4. Estructura Quercetina-3-O-ramnosa
Fuente: Autor, 2017

1.9. Estudio de toxicidad y tipos de líneas celulares usadas

1.9.1. Cultivos celulares

Se utilizan células de origen animal o humano que se han adaptado a vivir en cultivo, esto se da por un proceso denominado transformación, que puede ocurrir espontáneamente o inducido por compuestos químicos, radiaciones o virus, las células pasan a tener la vida infinita convirtiéndose en una línea celular establecida, las líneas celulares continuas o establecidas presentan la ventaja en comparación con los cultivos primarios, de suministrar grandes cantidades homogéneas de un solo tipo celular siendo muy adecuadas para estudios bioquímicos cuantitativos, su mantenimiento es sencillo y los resultados son muy reproducibles. Los inconvenientes de las líneas celulares son la pérdida de la arquitectura tisular normal; además algunas líneas celulares pueden o no reflejar las funciones de las células de procedencia. Para el estudio *in vitro* de los efectos tóxicos de los compuestos químicos, hemos de considerar dos tipos de mecanismos, referidos como citotoxicidad general y citotoxicidad órgano-específica (M., 1995). En el gráfico 5 se pueden observar los tipos de cultivos celulares.

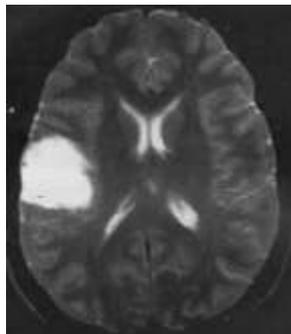


Gráfica 5. Tipos de Cultivo Celular

Fuente:(Gonzalez Mañas & Sanchez Marino, 2015).

1.9.2. Astrocitomas (línea D-384)

Son tumores que surgen de los gliomas que son tumores neuroepiteliales, los astrocitomas de alto grado de malignidad están constituidos por el astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme constituyen entre el 35-45% de todos los tumores cerebrales primarios, el tratamiento es estrictamente paliativo ya que no existe la posibilidad de curación (Díaz E, 2000). Ilustración de un astrocytoma en el gráfico 6.



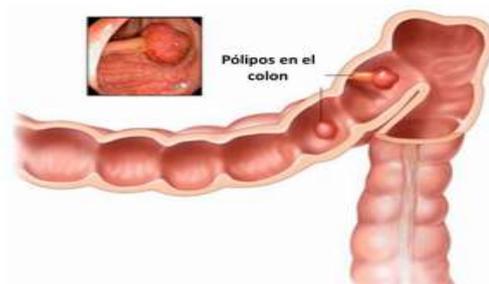
Gráfica 6. Astrocitoma

Fuente: (Adn, 2016)

1.9.3. Carcinoma de colon (línea RKO).

La mayoría de estos cánceres comienza con un crecimiento en el revestimiento interno del colon denominado pólipo, la probabilidad de transformarse en un cáncer depende del tipo de pólipo. Estos cánceres se originan de las células glandulares que producen

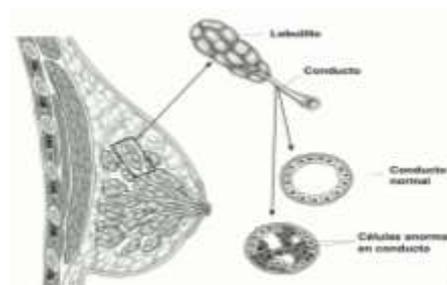
mucosidad para lubricar el interior del colon y del recto. La línea celular RKO-e6 es una de las más usada, ya que estas células poseen el oncogén e6 del HPV integrado de forma estable de citomegalovirus, este oncogén produce una disminución en los niveles y funciones de p53 (Instituto Nacional de Cáncer, 2015). Ilustración de un carcinoma de colon (gráfico 7).



Gráfica 7. Carcinoma de colon
Fuente: (Instituto Nacional de Cáncer, 2015)

1.9.4. Cáncer de mama (línea MCF-7)

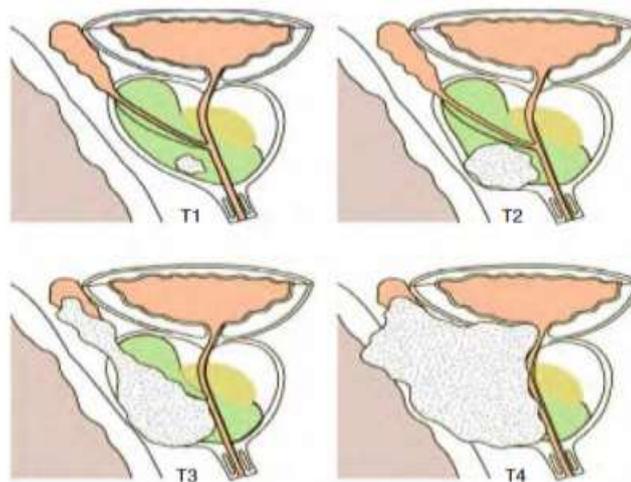
Es un grave problema médico-social y, por tanto, un reto para el colectivo médico en la lucha contra esta enfermedad. Podemos observar varios síntomas: prurito mamario, dolor mamario, y en cuanto a los síntomas objetivos tenemos los siguientes: tumor mamario, la forma del mismo, tamaño, consistencia, movilidad, número de tumores, localización, alteraciones de tamaño, de la piel, derrames mamilares y alteraciones del pezón o mamila. Este tipo de línea celular se aplica en tumorigenicidad y en estudios de virus de tipo B y C, este tipo de células exhiben algunas características de epitelio mamario, deben manejarse bajo nivel de contención en el laboratorio de tipo 2. Ilustración de cáncer de seno en la gráfica 8 (E, 1988).



Gráfica 8. Cáncer de seno
Fuente:(Learn et al., 2016)

1.9.5. Carcinoma de próstata (línea PC-3)

El carcinoma de próstata es la presencia de un grupo de células diferentes a las normales de la glándula y que comienzan a desarrollarse de forma anárquica y veloz, pudiendo reproducirse, si el diagnóstico es tardío, la extensión hacia otros órganos vecinos como la vejiga o el recto y/o posibilidad de que las células cancerosas migren por vía sanguínea o linfática produciéndose metástasis en los ganglios linfáticos o en órganos distantes, este se determina en la orina y cuanto mayor sea su valor mayor es la probabilidad de que una biopsia muestre cáncer. Este tipo de línea celular es específica para estudios de carcinogénesis. Ilustración de cáncer de próstata en la gráfica 9 (López M, 2010).



Gráfica 9. Cáncer de próstata
Fuente: (Ma & Pm, 2008)

1.9.6. Viabilidad celular

Es de gran importancia la determinación de viabilidad celular y toxicidad tras la exposición en un ambiente exógeno concreto, Existen 5 métodos principales para determinar la viabilidad celular, tres de ellos se basan en la exclusión de pigmentos por las células vivas y se pueden evaluar con el microscopio óptico, los pigmentos usados son el azul de tripano, eosina y la nigrosina.

Los otros dos métodos se basan en el acetato de fluoresceína, la naranja de acridina y se valoran con un microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo. (Coll Julio, 1993)

CAPITULO 2.
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología empleada

Para llevar a cabo esta investigación se realizó la siguiente metodología



Gráfica 10. Esquema del desarrollo de la investigación

Fuente: Autor, 2017

2.2. Área de Recolección de la Muestra

La recolección de la especie *Bejaria resinosa* Mutis, se realizó en la provincia de Loja, cantón Saraguro en las siguientes coordenadas 335226 S, W a 79.155.822 y 2870 m s.n.m. La identificación taxonómica fue realizada por el Señor Bolívar Merino curador oficial del Herbario-Loja de la Universidad Nacional De Loja (UNL). Una muestra fue depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular De Loja (UTPL) con el código voucher PPN-er-007.

Para el siguiente proyecto se usó la parte aérea de la planta que corresponde a hojas y flores (627 g). Para el proceso de deshidratación sometimos tanto hojas como flores a una temperatura de 37°C por aproximadamente 3 días hay que tomar en cuenta que el material vegetal se encuentre completamente deshidratado.

2.3. Obtención de extracto metanólico

La obtención del extracto se realizó por maceración dinámica a temperatura ambiente por 48 horas, utilizando como solvente de extracción metanol 100%, luego usando filtración al vacío se separaron los residuos vegetales y el líquido extractivo. Para proceder a la concentración del extracto se empleó el uso de un equipo rota-evaporador a temperatura ambiente moderada de 30-34°C, hasta poder obtener un extracto seco: 97.271g.

2.3.1. Partición líquido - líquido (ASBSM)

La mitad del extracto total (48.63g) se los suspendió en agua/MeOH (3:7) y ésta secuencialmente fue suspendiendo en: n-hexano (3x100ml), diclorometano (3x100ml) y acetato de etilo (3x100ml).

Luego de este proceso cada extracto fue secado usando sulfato de sodio (Na_2SO_4) para eliminar el H_2O presente en c/u de los extractos, luego se evaporó el solvente a presión reducida utilizando un rota-evaporador se obtuvieron finalmente 4 extractos que denominaremos de la siguiente manera:

Tabla 4. Extractos obtenidos

Nombre del Extracto	Siglas del Extracto	Peso del Extracto
Extracto Hexánico	ASBSH	6.74g
Extracto de Diclorometano	ASBSD	16.7769g
Extracto de Acetato de Etilo	ASBSE	3.4338g
Extracto Hidrometanólico	ASBSH ₂ O/MeOH	18.67g

Fuente: Autor, 2017

2.4. Cromatografía de Capa Fina

Cada una de los extractos fueron sometidos a cromatografía de capa fina, esto se llevó a cabo usando placas de aluminio que están cubiertas de sílice gel 60 F₂₅₄ Merck y se procedió a visualizarlas con luz UV 254 y 360 nm.

2.5. Fraccionamiento del extracto de diclorometano (ASBSD)

Se tomaron 4g del extracto (ASBSD) y se colocaron en una columna con sílice gel (250g), la misma que se empaquetó con hexano, se eluyó con hexano y se incrementó el gradiente de polaridad a Acetato de etilo 100%, para dar 40 fracciones las mismas que se combinaron de acuerdo con la similitud de su Rf observada en la TLC obteniéndose 11 fracciones (FI-FXI) que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Fracciones obtenidas del extracto de Diclorometano

EXTRACTO DE DICLOROMETANO (ASBSD)		
ASBSDFI	F1-F3	96.5mg
ASBSDFII	F4-F7	176mg
ASBSDFIII	F8-F9	341.1mg
ASBSDFIV	F10-F13	-----
ASBSDFV	F15-F17	183mg
ASBSDVI	F18-F22	312mg
ASBSDVII	F23-F27	68.4mg
ASBSDVIII	F28-F30	94mg
ASBSDIX	F31-F34	692mg
ASBSVX	35-37	101.7mg
ASBSXI	F38-F40	-----

Fuente: Autor, 2017

La fracción ASBSDFIII se cristalizó y se formó un sólido amarillento, el mismo que se formó mientras lo dejamos en la campana para que se seque completamente para seguidamente realizarles los estudios respectivos.

El estudio de la subfracción ASBSDFV se la realizó mediante cromatografía de columna usando gel sílice y eluida con diclorometano/acetato de etilo (3:1) y se esperó que se evapore el solvente que aún contenía la muestra para su respectivo análisis. Se usó el mismo procedimiento para ASBSDFVI.

La subfracción ASBSDFX se realizó un procedimiento de lavados continuos usando MeOH, luego se formaron pequeños cristales de color transparente-blanquecino los mismos que se estudiarán posteriormente.

Las demás subfracciones se estudiaron, pero al momento de comenzar a purificarlas se obtenían valores de peso muy bajos y además poseían mezclas muy impuras por lo tanto no se continuó con su estudio.

2.5.1. Prueba de disolución del extracto de diclorometano (ASBSD)

Se tomó una pequeña cantidad del extracto ASBSD, se la lavo varias veces usando Hexano/Acetato de etilo hasta obtener un sólido amarillento (486mg) este fue disuelto en DMSO (Dimetil Sulfoxido) para el respectivo análisis en cultivos celulares.

2.6. Fraccionamiento del extracto de Hexano (ASBSH)

Para el estudio de este extracto se cargó 3g de ASBSH en una columna con gel sílice, esta columna se empaquetó y se eluyó con hexano 100% y se fue aumentando gradualmente la concentración o su polaridad hasta usar 100% de acetato de etilo, en cada fracción se tomó 250ml, se obtuvieron 26 subfracciones que luego se las unió de acuerdo a su similitud en la CCF, obteniéndose 6 subfracciones que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Estudio Extracto Hexánico

EXTRACCIÓN DE ASBSH	
ASBSHFA	F1-F3
ASBSHFB	F4-F6
ASBSHFC	F7-F11
ASBSHFD	F12-F14
ASBSHFE	F15-F19
ASBSHFF	F20-26

Fuente: Autor, 2017.

Las fracciones ASBSHFA se las eluyó con Acetato de etilo 10%, y los compuestos se agruparon sobre la base de la TLC, por lo que se usó otro tipo de combinación de polaridades.

Del mismo modo se aplicó para ASBSHFB, en estas se eluyó con Acetato de etilo 20%, la misma que en la placa de TLC dio como resultado dos compuestos, se le realizará los estudios respectivos.

Las demás fracciones no se pudieron estudiar debido a una contaminación en los solventes.

2.7. Fraccionamiento del extracto metanólico ASBSM.

En este extracto se formó un precipitado, se decantó la solución y se logró precipitar un sólido amarillo, se practicaron varias lavadas usando metanol y algunas gotas de diclorometano, este precipitado se procedió a elucidar y a realizar técnicas espectroscópicas.

A este mismo precipitado se le realizaron estudios de cromatografía en capa fina y se observa por lo menos 3 compuestos que aparentemente serían de tipo flavonoide. El peso de la formación del precipitado se describe en la tabla 7.

Tabla 7. Estudio Del Extracto Metanólico

ESTUDIO ASBSM	
Descripción	Peso (g)
PRECIPITADO	1.22

Fuente: Autor, 2017

2.8. Ensayo de viabilidad celular.

Se utilizaron 4 tipos celulares de tipo cancerígeno los mismos que se obtuvieron in vitro en el laboratorio de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).

Estas células se analizaron mediante el método MTS screening que se usa especialmente para calcular la viabilidad y el metabolismo de las células cancerosas basadas en la respiración mitocondrial.

Se utilizó una placa o plato con 96 pocillos, usando la concentración (1-100 ug/mL) para el extracto total y otra diferente para el control positivo, el control negativo se lo usó en una concentración 0.01% v/v.

Este método se realizó por triplicado. La absorbancia se la realizó a 570 nm.

Los porcentajes de viabilidad se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{viabilidad (\%)} = \frac{\text{absorbancia de células tratadas}}{\text{absorbancia de células control}} * 100$$

CAPITULO 3
RESULTADOS Y ANÁLISIS

Al finalizar este proyecto obtuvimos la publicación de un artículo científico que evidencia científicamente la existencia de los metabolitos: ácido ursólico, mezclas de α y β amirina y taraxerol, el tema del mismo es: The cytotoxic principle of *Bejaria resinosa* from Ecuador in the revista Journal of pharmacognosy and phytochemistry (2015, volumen 4, pág. 268-272).

3.1. Extractos totales obtenidos de *Bejaria resinosa*.

En la tabla 8 muestra el peso con los rendimientos de todos los extractos.

Tabla 8. Peso de los extractos obtenidos

EXTRACTOS	PESO SECO	PESO FINAL DEL EXTRACTO (g)	RENDIMIENTO (%)
Hexano	627g	6.74	1.07
Diclorometano		16.78	2.67
Acetato de Etilo		3.43	0.55
Metanol/H ₂ O		18.67	2.98

Fuente: Autor, 2017.

3.2. Fraccionamiento del extracto de diclorometano (ASBSD)

3.2.1. Compuesto 1

A partir de 1 gramo del extracto de ASBSD, se procedió a lavar varias veces usando una mezcla de Hexano y Acetato de Etilo (7:3), hasta obtener un sólido amarillento que peso (145 mg) el mismo que fue disuelto en DMSO para realizarle un RMN dando como resultado ácido ursólico.

Para la fracción 3 se formó un sólido cristal de color amarillo que pesó (486 mg) y el mismo fue identificado como ácido ursólico, este compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas y fueron corroborados con estudios previos (Taketa, Breitmaier, & Schenkel, 2004). Los valores obtenidos de RMN ¹H y ¹³C se muestran a continuación y la comparación de los mismos con bibliografía se encuentra en la tabla 9.

¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ (ppm): 5.12 (t, J = 2.8, 1H); 3.00 (dd, 1H); 2.10 (d, J = 11.2, 1H); 1.22 (m, 1H); 1.03 (s, 3H); 0.89 (d, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.80 (d, 3H); 0.74 (s, 3H); 0.67 (s, 3H).

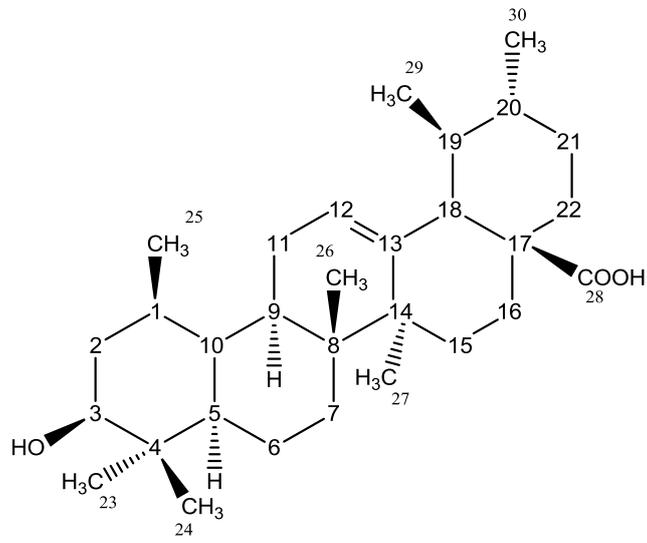
¹³C-RMN(CDCl₃, 100MHz): δ (ppm): 36.59 (C-1), 27.03 (C-2), 76.92 (C-3), 41.70 (C-4), 54.85 (C-5), 18.06 (C-6), 32.77 (C-7), 41.71 (C-8), 47.09 (C-9), 36.59 (C-10), 23.33 (C-11), 124.65 (C-12), 138.25 (C-13), 41.71 (C-14), 29.12 (C-15), 23.87 (C-16), 47.09 (C-17), 52.45 (C-18), 36.59 (C-19), 36.59 (C-20), 30.26 (C-21), 36.39 (C-22), 27.60 (C-23), 15.29 (C-24), 16.13 (C-25), 16.98 (C-26), 23.33 (C-27), 178.37 (C-28), 17.08 (C-29) 21.14 (C-30).

Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco. Se caracterizó por espectroscopia de RMN. Su espectro de ¹H tomado en DMSO, mostró señales características: la presencia de siete señales singletes en la zona alifática, sugiriendo la presencia de siete metilos ubicados en una estructura triterpénica. A 4.31 ppm se observó un singlete ancho probablemente perteneciente al protón unido al carbono de la posición 3 donde se encuentra un grupo hidroxilo. Una señal pseudo-triplete que apareció en 5,12 ppm con una constante de acoplamiento de J = 2.8 Hz señaló la presencia de un protón olefinico en la estructura.

El espectro de ¹³C mostró 30 señales, las cuales de acuerdo al experimento DEPT se clasificaron en 7 carbonos cuaternarios, siete metinos, nueve metilenos y siete metilos. El carbono cuaternario a 179 se atribuyó a un ácido carboxílico y las señales de un doble enlace con carbonos a 125. Y 138 indicaron que la estructura correspondía a un triterpeno pentacíclico cuyos grupos funcionales más importantes son un alcohol en la posición 3, una olefina y un ácido carboxílico. La comparación de los datos de RMN con la literatura indicó que el compuesto es el ácido ursólico.

El ácido ursólico es un compuesto que se encuentra en la mayoría de plantas que pertenecen a la familia Ericaceae, este compuesto se reporta en otras especies del género *Bejaria* como en *B. aestuans*, *B. resinosa*, *B. sprucei*, *B. mathewsii*, siendo el ácido ursólico el compuesto mayoritario. (Javier Andrés Matulevich Peláez, 2013)

El ácido ursólico demuestra que inhibe el crecimiento del tumor de varios tipos, además de que al ser parte este compuesto de los triterpenos posee una acción antiinflamatoria por excelencia (Dermofarmacia, 2004), la estructura del ácido ursólico se representa en la gráfica 11.



Gráfica 11. Ácido ursólico
Fuente: Autor, 2017

Tabla 9 Comparación de los datos experimentales con bibliografía del ácido ursólico

δ_H (Taketa et al., 2004)	δ_H EXPERIMENTAL	N° CARBON	δ_C (Taketa et al., 2004)	δ_C EXPERIMENTAL
-	-	1	38.57	36.59
-	-	2	26.67	27.03
3.43-	3.00	3	78.70	76.92
-	-	4	39.09	41.70
-	-	5	55.15	54.85
-	-	6	18.20	18.06
-	-	7	32.93	32.77
-	-	8	39.35	41.71
-	-	9	47.45	47.09
-	-	10	36.81	36.59
-	-	11	23.15	23.33
5.50	5.12	12	125.40	124.65
-	-	13	138.08	138.25
-	-	14	41.95	41.71
-	-	15	29.55	29.12
-	-	16	24.09	23.87
-	-	17	47.70	47.09
2.52	2.10	18	52.72	52.45
-	-	19	38.98	36.59
-	-	20	38.80	36.59
-	-	21	30.56	30.26
-	-	22	36.71	36.39
1.24	1.24	23	27.88	27.60
1.02	1.03	24	15.25	15.29
0.93	0.67	25	15.45	16.13
1.05	0.86	26	16.73	16.98
1.22	1.22	27	23.37	23.33
-	-	28	180.61	178.37
0.97	0.74	29	16.85	17.08
0.99	0.80	30	20.98	21.14

Fuente: Autor, 2017.

3.2.2 Compuesto 2

La fracción FV fue eluída con diclorometano y acetato de etilo (3:1), fue analizada bajo técnicas espectroscópicas y fueron corroborado (Bandeira, Lemos, Costa, & Santos, 2007), dándonos como resultado una mezcla de α y β amirina. Los valores obtenidos de RMN ^1H y ^{13}C se muestran a continuación y la comparación de los mismos con bibliografía se encuentra en la tabla 10, mientras que sus estructuras se muestran en la gráfica 12 para α -amirina y gráfica 13 para β -amirina.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ (ppm): 5.18 (t, j = 3.6, 1H); 5.12 (t, j = 3.6, 1H); 3.15 (dd, 1H), 1.13-0.78 (s, 6 CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (α -amirina) (CDCl_3 , 100MHz): 39.12 (C-1), 79.19 (C-3), 55.32 (C-5), 18.53 (C-6), 32.64 (C-7), 39.37 (C-8), 47.80 (C-9), 36.47 (C-10), 23.68 (C-11), 121.87 (C-12), 139.74 (C-13), 41.87 (C-14), 26.14 (C-15), 26.77 (C-16), 32.64 (C-17), 59.21 (C-18), 46.98 (C-19), 35.26 (C-20), 34.54 (C-21), 37.05 (C-22), 15.65 (C-24), 15.83 (C-25), 17.02 (C-26), 23.42 (C-27), 28.90 (C-28), 17.63 (C-29), 21.55 (C-30).

$^{13}\text{C-RMN}$ (β -amirina) (CDCl_3 , 100MHz): 38.73 (C-1), 27.39 (C-2), 79.19 (C-3), 38.93 (C-4), 55.32 (C-5), 18.50 (C-6), 32.78 (C-7), 39.81 (C-8), 47.78 (C-9), 36.82 (C-10), 23.52 (C-11), 121.87 (C-12), 145.34 (C-13), 41.67 (C-14), 26.30 (C-15), 27.08 (C-16), 32.64 (C-17), 47.38 (C-18), 46.98 (C-19), 31.24 (C-20), 34.88 (C-21), 37.10 (C-22), 28.25 (C-23), 15.74 (C-24), 15.78 (C-25), 16.96 (C-26), 26.14 (C-27), 28.55 (C-28), 33.50 (C-29), 23.42 (C-30).

Esta mezcla de compuestos se mostró como sólido blanco, caracterizado por RMN y por GC/MS. El espectro de protones tomado en DMSO mostró gran cantidad de señales en la zona alifática, muchas de ellas singletes bien intensos, sugiriendo la presencia de metilos posiblemente en estructuras triterpenicas. Un multiplete complejo se observó a un desplazamiento de 3,21 ppm y finalmente dos claros tripletes con diferentes intensidades pero la misma constante de $J = 3.6$ hz se observaron a 5.12 ppm y 5,18 ppm; estas dos señales sugirieron la mezcla de dos triterpenos con olefinas en su estructura.

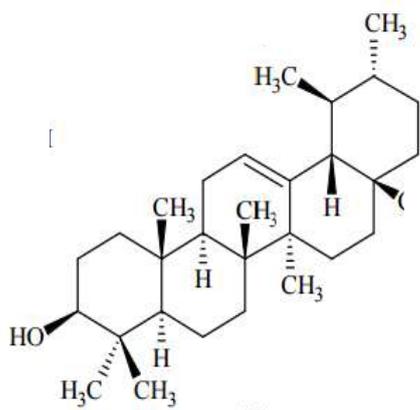
El espectro de ^{13}C claramente mostró las dos olefinas a 145.3 y 124.56 y el otro par a 139.7 y 121.8. Igualmente dos señales fueron observadas a 79.19 y

79.13 correspondientes a los carbonos oxigenados de la posición 3 de las estructuras que conformaban esta mezcla. Se hizo un poco difícil asignar individualmente el resto de las otras señales alifáticas presentes en el espectro.

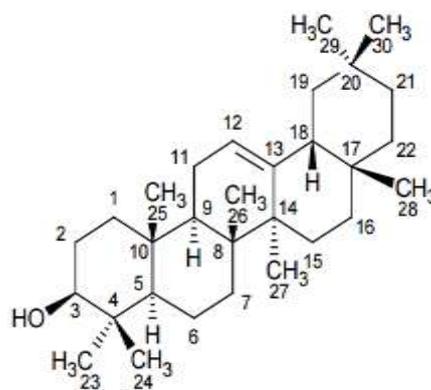
Con la ayuda de un análisis de GC/MS se verificó la mezcla de los dos triterpenos resultando ser α y β amirina donde el β resultó ser el mayoritario. Se compararon los datos de RMN con la literatura y se corroboró lo ya concluido con el espectro de masas.

α y β -amirina se encuentra presente en el 60% de las especies estudiadas del género *Rhododendron* que pertenece a la familia Ericaceae y en diferentes especies de *Bejaria* (Matulevich, 2013).

Las moléculas α y β -amirina actúan de manera biológica y es por eso que esta gente usa este tipo de plantas para tratar varias enfermedades ya que actúa como: antiséptico, antibacteriano, antimicrobiano, antiinflamatorio, insecticida, etc. (Robles, 2000)



Gráfica 12: α -amirina
Fuente: Autor, 2017



Gráfica 13: β -amirina
Fuente: Autor, 2017

Tabla 10 Comparación de los datos experimentales con la literatura de la mezcla de α y β -amirina, corroborados mediante ^{13}C -RMN

N° CARBON	δc (α -amirina) (Bandeira et al., 2007)	δc E(α -amirina)	δc (β -amirina) (Bandeira et al., 2007)	δc E(β -amirina)
1	39.02	39.12	38.6	38.73
2	-	-	27.3	27.39
3	79.1	79.19	79.1	79.19
4	-	-	38.8	38.93
5	55.2	55.32	55.2	55.32
6	19.6	18.53	18.4	18.50
7	32.4	32.64	32.6	32.78
8	39.3	39.37	39.8	39.81
9	47.1	47.80	47.6	47.78
10	36.6	36.47	36.9	36.82
11	23.6	23.68	23.5	23.52
12	121.2	121.87	121.7	121.87
13	145.2	139.74	145.2	145.34
14	41.8	41.87	41.7	41.67
15	26.0	26.14	26.1	26.30
16	26.8	26.77	26.9	27.08
17	32.1	32.64	32.5	32.64
18	46.8	59.21	47.2	47.38
19	46.7	46.98	46.8	46.98
20	35.0	35.26	31.1	31.24
21	34.6	34.54	34.7	34.88
22	37.0	37.05	37.1	37.10
23	-	-	28.1	28.25
24	15.1	15.65	15.5	15.74
25	15.7	15.83	15.6	15.78
26	16.9	17.02	16.8	16.96
27	23.3	23.42	26.0	26.14
28	28.8	28.90	28.4	28.55
29	17.5	17.63	33.4	33.50
30	21.4	21.55	23.7	23.42

Fuente: Autor, 2017.

3.1. Fraccionamiento del extracto metanólico (ASBSM)

Luego de que se formara un precipitado, se le realizaron distintos lavados usando metanol y algunas gotas de diclorometano obteniendo (1.22 mg) la misma que al realizarle técnicas espectroscópicas dio como resultado el compuesto Quercetina-3-O-rahmnoside además estos datos fueron corroborados (Torres et al., 2016). Los valores obtenidos de RMN ^1H y ^{13}C se muestran a continuación y la comparación de los resultados obtenidos con los de bibliografía se encuentra en la tabla 11 y su estructura en la gráfica 14

¹H-RMN(CDL₃, 400MHz): δ (ppm): 7.33 (d, J = 2.4), 7.31 (d, J = 2), 6.91 (d, J = 8.4), 6.19 (d, J = 2.4), 5.34 (d, j = 1.6), 5.32 (d, j = 1.6), 4.24 (dd, J = 2, 3.6), 3.79 (dd, J = 3.6, 9.2), 3.43 (m), 0.96 (d, J = 6)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100MHz): δ (ppm): 122.9 (C-1'), 103.6 (C-1''), 158.45 (C-2), 116.35 (C-2'), 72.0 (C-2''), 136.27 (C-3), 146.77 (C-3'), 72.08 (C-3''), 179.60 (C-4), 158.43 (C-4'), 73.31 (C-4''), 163.1 (C-5), 116.93 (C-5'), 71.84 (C-5''), 99.77 (C-6), 122.9 (C-6'), 17.65 (C-6''), 165.8 (C-7), 94.71 (C-8), 159.4 (C-9), 105.83 (C-10).

Este compuesto resultó ser un sólido amarillo el cual fue caracterizado a través de RMN. Su espectro de ¹H tomado en metanol deuterado mostró señales aromáticas entre 6.16 y 7.33 ppm aparentemente podían ser de un flavonoide. Se observó también un grupo de señales multipletes en la zona comprendida entre 3.22 y 4.23 ppm que indican la presencia de un glicosido. Un doblete perteneciente a un metilo en 0.96 ppm con J = 6.0 Hz, indicó que posiblemente el glicosido presente es la ramnosa.

El espectro de ¹³C claramente señaló la presencia de un flavonoide glicosilado. Siendo las más características la de un carbonilo a 179.53 y las del glucósido entre 71.84 a 73.30 ppm, presentándose el grupo metilo a 17.65 ppm, corroborando ser la ramnosa que se había sugerido con el espectro de protones. Nuevamente la comparación con algunos flavonoides en la literatura señalaron que el flavonoide aislado es Quercetina-3-ramnosa. La tabla... muestra la asignación de cada una de las señales.

En la mayoría de las especies del género *Bejaria* se reporta este compuesto tanto en su tallo y hojas (Males, Plazibat, Vundać, & Zuntar, 2006).

En otro estudio realizado de *Bejaria resinosa* se ha logrado identificar el mismo compuesto (MATULEVICH, 2013).

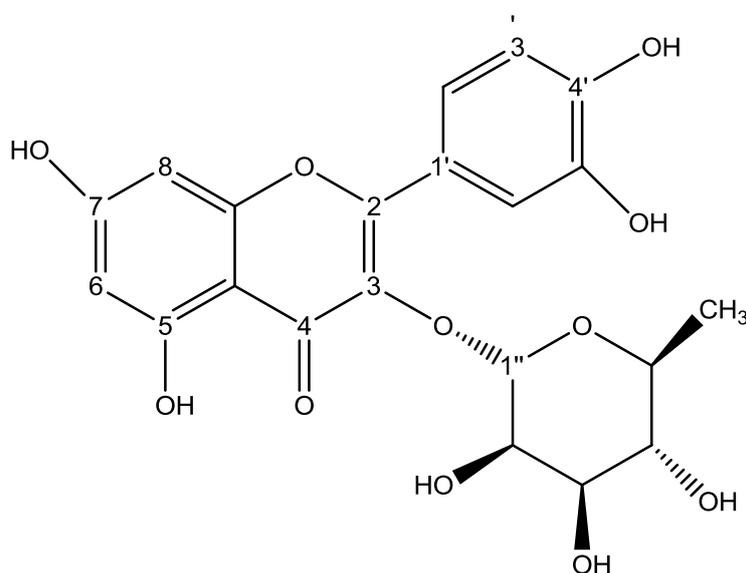
Dentro de las propiedades que posee este principio activo se encuentra como antioxidante que la mayoría de la población es como más la usa y en conjunto con α y β –*amirina* realizan un perfecto proceso antiinflamatorio, además se ha registrado los usos de este principio activo como antitumoral, coadyuvante inmunológico, antiviral y además en trastornos gástricos (S.A., 2000)

Tabla 11 comparación de los datos experimentales con la literatura de quercitrin o Quercetina-3-O-rahmnosa.

δ _H (Torres et al., 2016)	δ _H EXPERIMENTAL	δ _C EXPERIMENTAL	δ _C (Torres et al., 2016)	δ _C EXPERIMENTAL	δ _C (Torres et al., 2016)
7.33	7.33	122.9 (C-1')	121.3	163.1 (C-5)	161.4

7.29	7.31	103.6 (C-1'')	102.2	116.93 (C-5')	116.1
6.89	6.91	158.45 (C-2)	157.5	71.84 (C-5'')	70.3
6.41	6.19	116.35 (C-2')	115.6	99.77 (C-6)	99.3
6.21	5.34	72.0 (C-2'')	70.9	122.9 (C-6')	121.4
5.29	5.32	136.27 (C-3)	134.9	17.65 (C-6'')	18.0
3.98	4.24	146.77 (C-3')	145.8	165.8 (C-7)	164.5
3.53	3.79	72.08 (C-3'')	70.8	94.71 (C-8)	94.2
3.4-3.1	3.43	179.60 (C-4)	178.3	159.4 (C-9)	156.5
0.88	0.96	158.43 (C-4')	148.7	105.83 (C-10)	104.3
		73.31 (C-4'')	71.9		

Fuente: Autor, 2017.



Gráfica 14: Quercetina-3-O-rahnrosa

Fuente: Autor, 2017

3.2. Evaluación de la actividad biológica

Usando las cuatro células tumorales humanas y empelando la dexorrubicina como control positivo se obtuvieron resultados positivos, donde el ácido ursólico fue el compuesto con el mejor efecto toxico frente a las líneas celulares cáncer de mama, de cáncer de cerebro, cáncer de próstata y cáncer de colon. Además que en sí el extracto acuoso tiene una actividad moderada frente a D384 y PC-3 y contra la línea MCF-7 mostró una actividad muy baja o nula. Los resultados de la evaluación se encuentran en la tabla 12.

Tabla 12 Resultados de la actividad biológica

TRATAMIENTO	IC ₅₀ ± SEM			
	HUMAN CANCER CELL LINES			
	Astrocitoma	Cáncer de colon	Cáncer de seno	Cáncer de próstata
Extracto Total B. resinosa	12.19 ± 0.24	71.49 ± 23.27	>100	11.22 ± 0.3
Ácido ursólico	10.39 ± 1.46	17.16 ± 8.99	7.43 ± 0.64	12.11 ± 0.52
Doxorrubicina	2.45 ± 0.68	1.93 ± 0.09	5.28 ± 0.11	3.83 ± 0.15

Fuente: Autor, 2017

En esta tabla indicamos que el ácido ursólico fue el compuesto que demostró tener actividad citotóxica frente a todas las líneas celulares, sin embargo el extracto total no mostró las mismas características en cuanto a la actividad citotóxica, ya que contra el cáncer de seno mostró una actividad muy pobre y puede deberse a que el extracto se encontraba en muy bajas concentraciones o que los otros metabolitos interfieran en la actividad de este. El ácido ursólico ha demostrado tener propiedades tales como: antioxidante, analgésico, antiinflamatorio, antitumoral, angiogénico, apoptótico e inmunomodulador etc. Este grupo de compuestos han demostrado ser los responsables de la actividad atribuida a esta especie y que por lo tanto estos resultados validan el uso de esta planta para el tratamiento de ciertas enfermedades (Suárez et al., 2015)

CONCLUSIONES

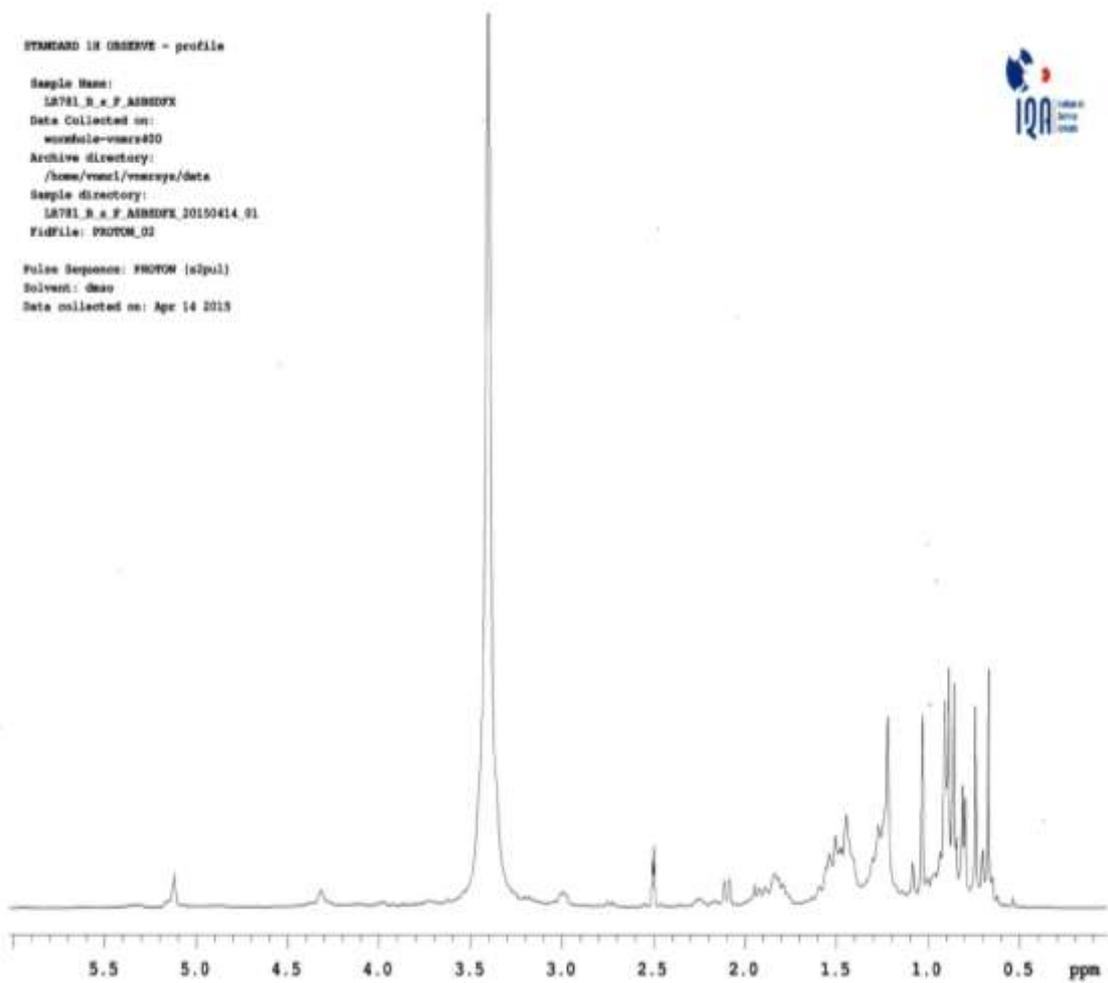
- A partir del material vegetal seco de *Bejaria resinosa* se obtuvo los extractos totales de diclorometano, hexano, acetato y metanol/agua, siendo el extracto metanol/agua el que mayor rendimiento presentó.
- Del extracto de Diclorometano se identificó el ácido ursólico y una mezcla de α y β –*amirina*, mientras que del extracto metanólico se pudo aislar la *Quercetina-3-O-rahmrosa*.
- El extracto acuoso posee una actividad citotóxica moderada contra las líneas tumorales humanas D384 y PC-3, en cambio el ácido ursólico demostró tener un efecto citotóxico, apoptótico y con actividad angiogénica.
- Los resultados aquí demostrados indican que el ácido ursólico es el principal compuesto obtenido y es el responsable de tener actividad desinflamatoria, antibacteriana, relajante, etc. Y por lo tanto valida el uso de esta especie en cuanto a la medicina natural del grupo étnico Saraguro.

RECOMENDACIONES

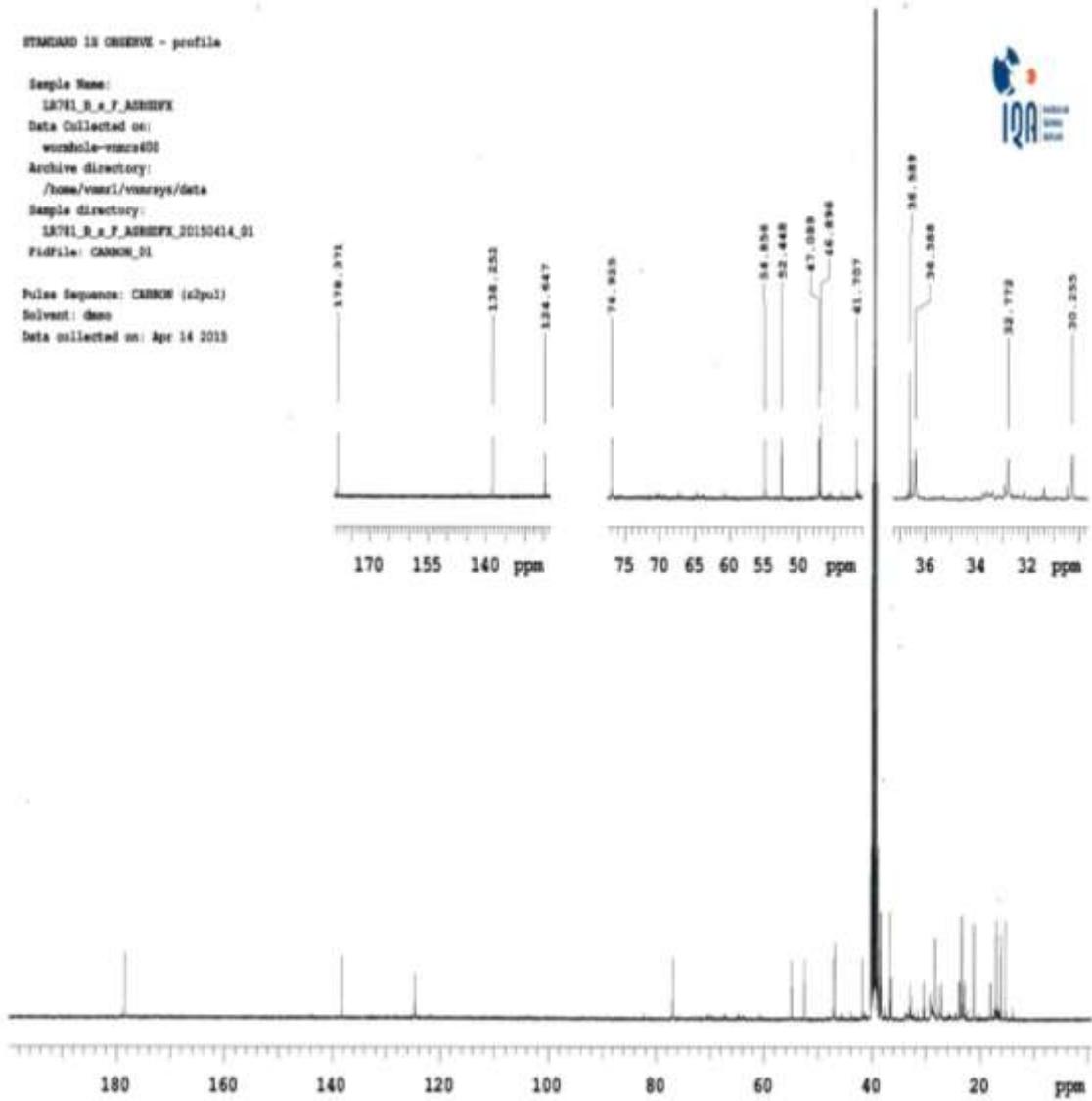
- Se recomienda que se realicen más estudios con otras especies del genero *Bejaria*, ya que pueden brindar muchos beneficios y se evalúen ciertas actividades biológicas como; antioxidante antimicrobiano, antiviral, hipoglucemiante y anticancerígena.

ANEXOS COMPUESTO 1

ESPECTRO ^1H DEL ÁCIDO URSÓLICO

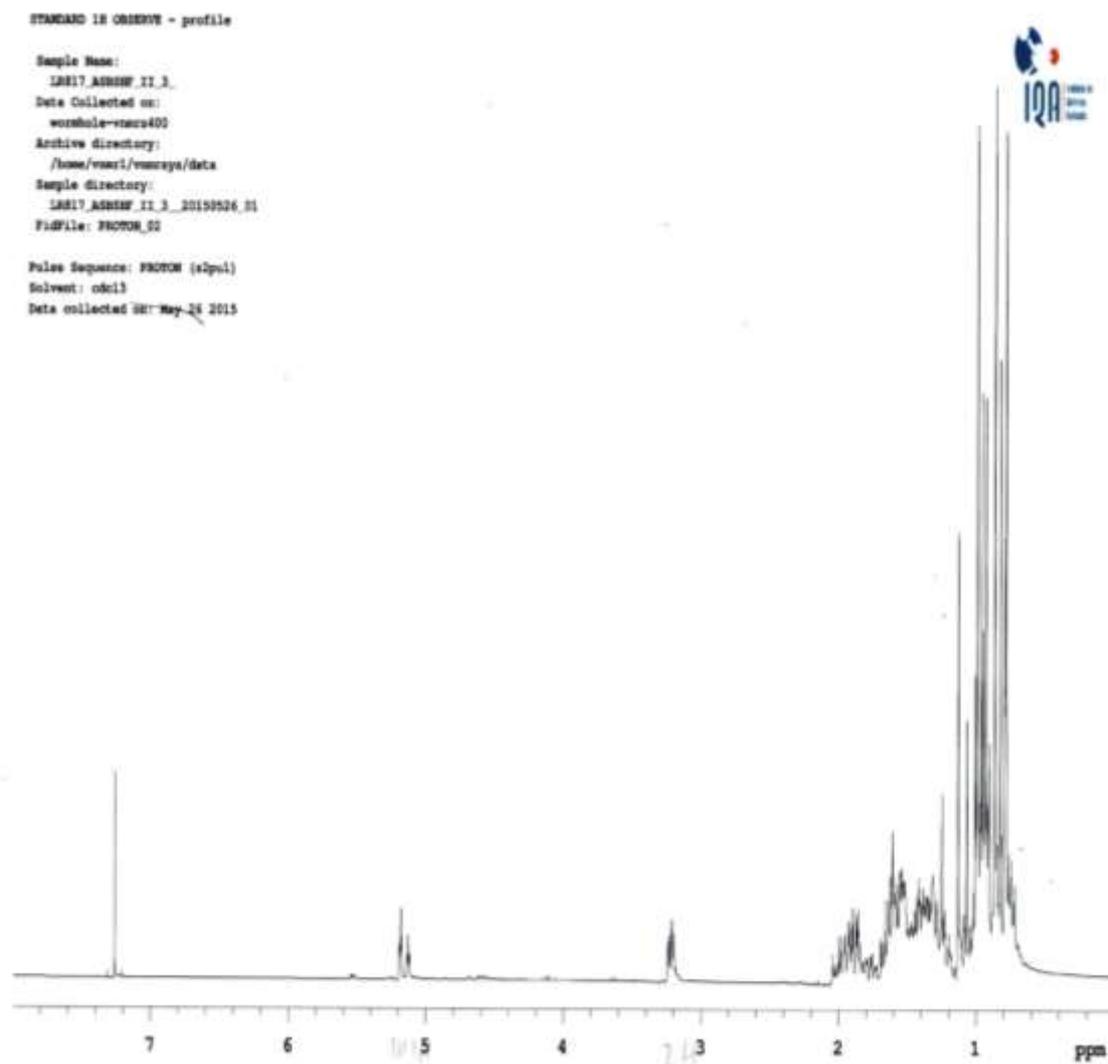


ESPECTRO ¹³C DEL ÁCIDO URSÓLICO



ANEXOS COMPUESTO 2

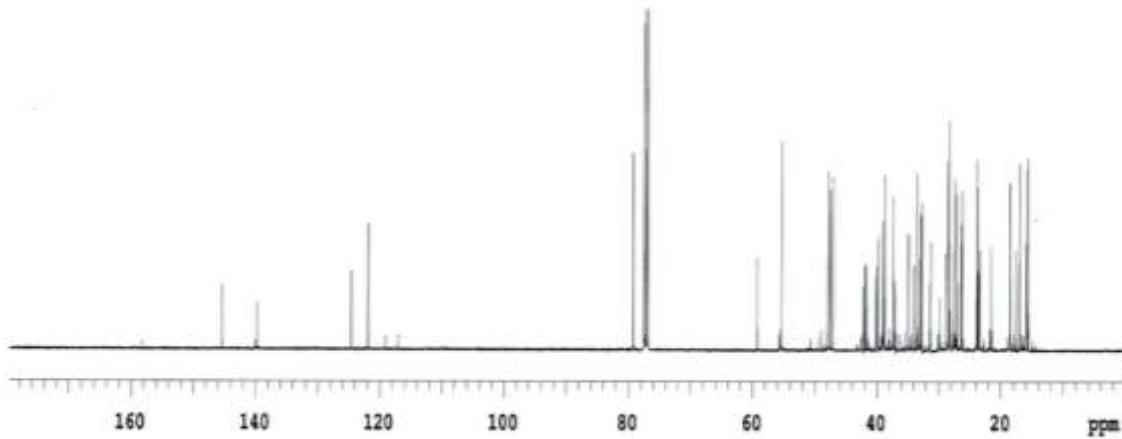
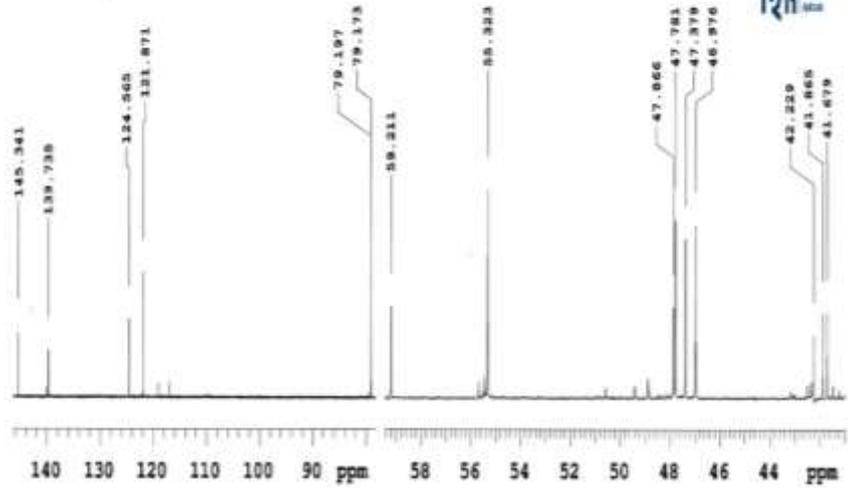
ESPECTRO ^1H DE LA MESCLA DE α y β -AMIRINA



ESPECTRO ^{13}C DE LA MESCLA DE α y β -AMIRINA

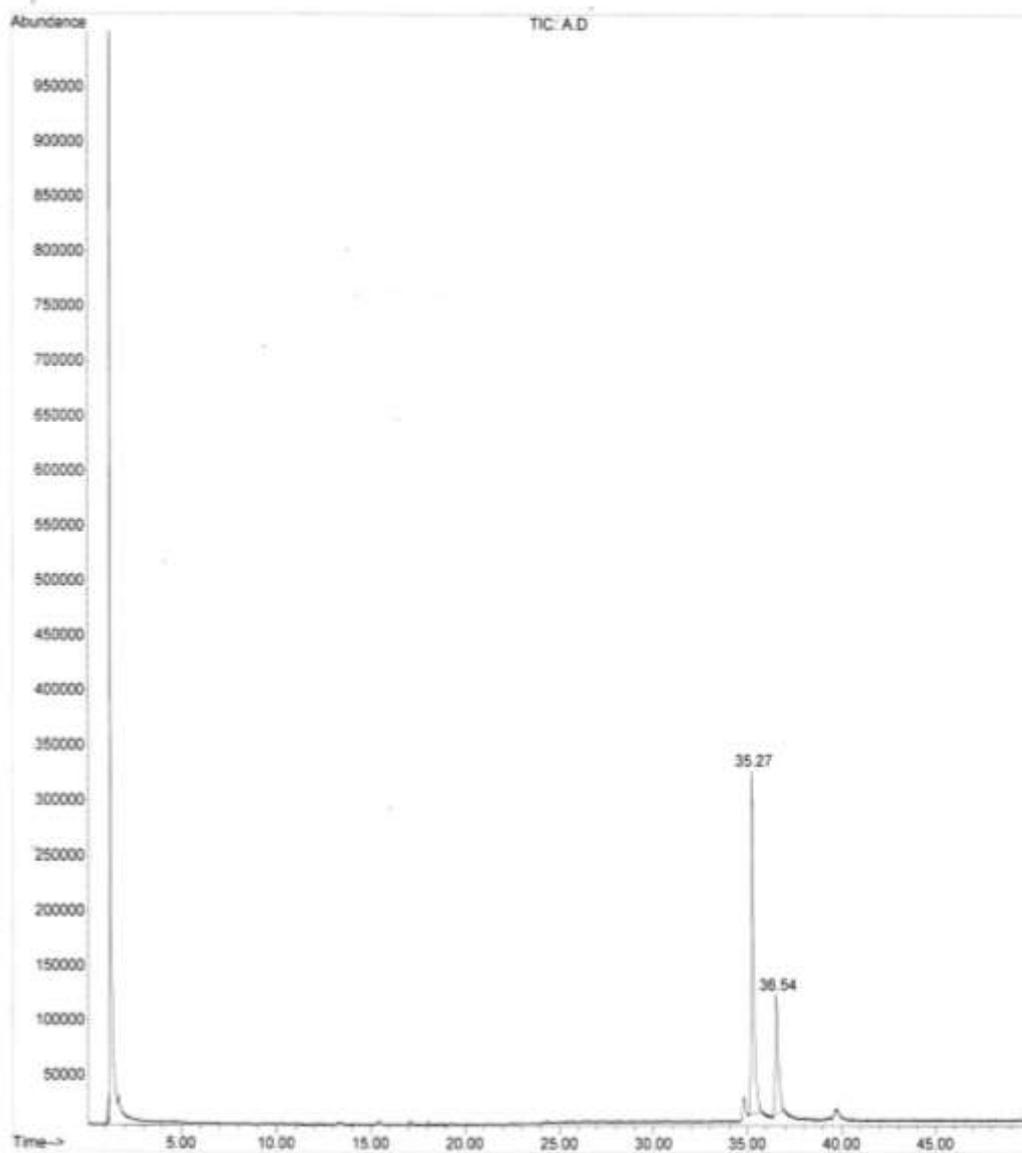
STANDARD IN OBSERVE - profile

Sample Name:
LR817_A08887_II_3
Data Collected on:
voca-hola-vmsr403
Archive directory:
/home/vmscl/vmsrays/data
Sample directory:
LR817_A08887_II_3_20150526_01
FidFile: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (zgpg1)
Solvent: cdcl3
Data collected on: May 26 2015



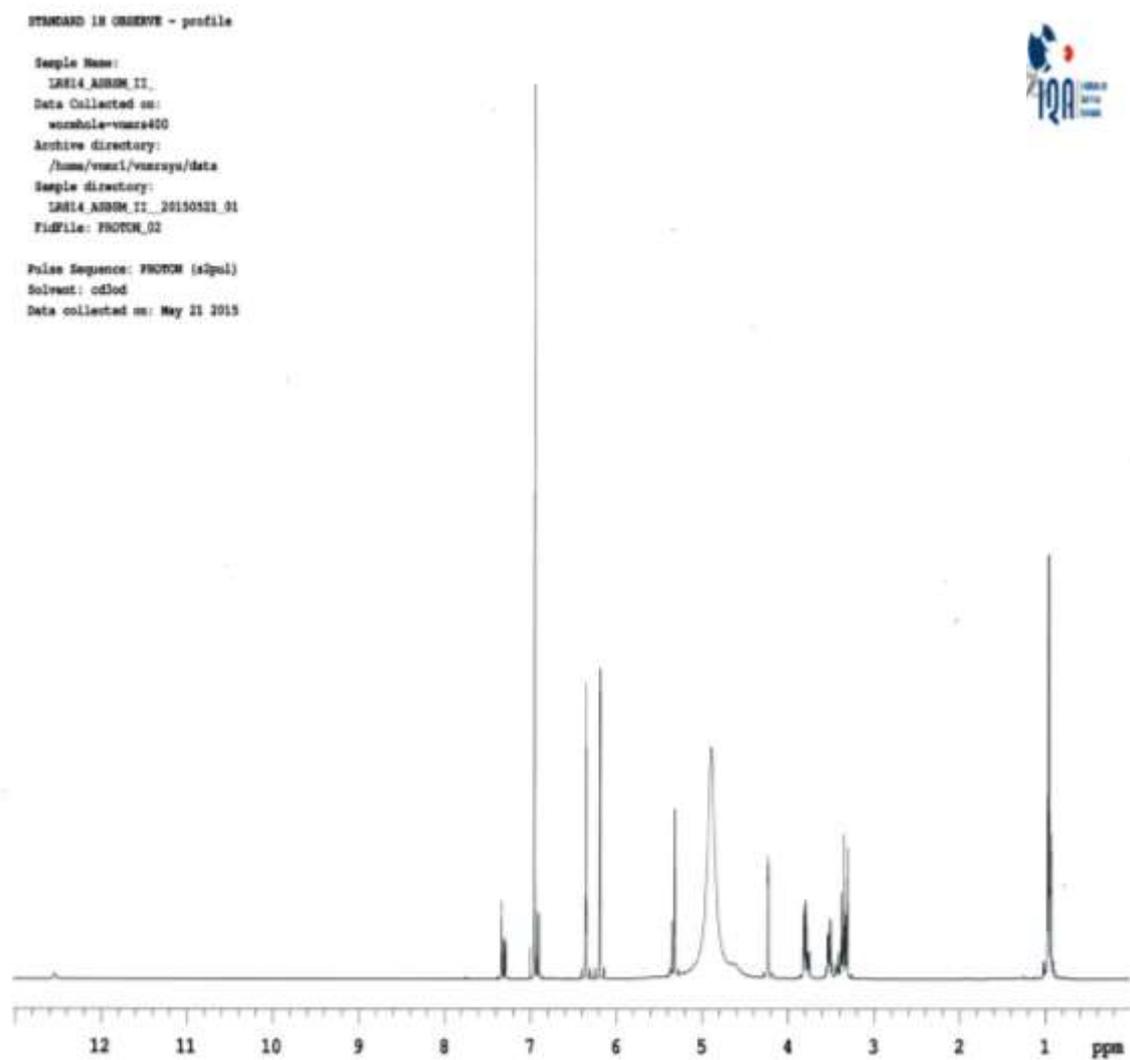
CROMATOGRAMA DE LA MEZCLA DE α y β -AMIRINA

File :D:\MSDCHEM\DATA\2015\ALIRICA SUAREZA.D
Operator : jc
Acquired : 26 May 2015 12:52 using AcqMethod METODO_GENERAL
Instrument : GCMSD CET
Sample Name: A
Misc Info :
Vial Number: 1

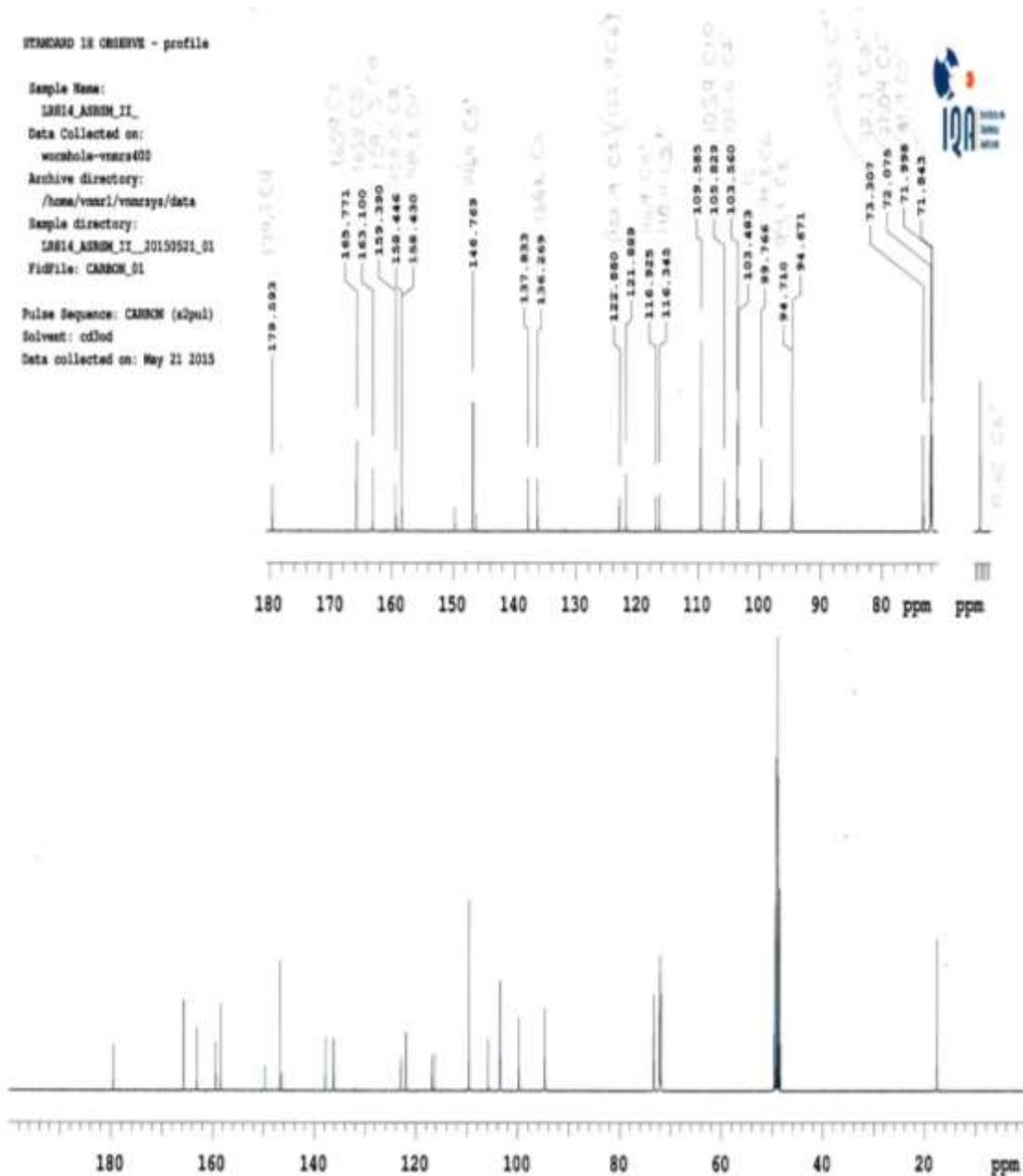


ANEXOS COMPUESTO 2

ESPECTRO ^1H DE QUERCITRIN



ESPECTRO ^{13}C DE QUERCITRIN



BIBLIOGRAFÍA

- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Balslev, H; Navarrete, H; Torres, L; Marcia, M. J. (2008). Enciclopedia De Plantas Útiles Del Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU*, 1, 1–3.
- Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G., Costa, S. M. O., & Santos, H. S. (2007). Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α - e β -amirina, 17(2), 204–208.
- Coll Julio. (1993). *Técnicas De Diagnóstico En Virología*. (D. De Santos, Ed.). Madrid.
- Davies, D., Giovanelli, J., & Rees, T. (1969). *Bioquímica vegetal*. (S. A. Omega, Ed.). Barcelona.
- Dermofarmacia, P. E. N. (2004). Ácido ursólico, 23, 153–155.
- Díaz E, G. J. (2000). *Oncología Clínica Básica* (Aran Edici). Madrid.
- E, J. (1988). *Cáncer de Mama*. (LiderGraf, Ed.). España.
- Escamilla Jiménez, C. I., Cuevas Martínez, Y. E., & Guevara Fonseca, J. (2009). Artemisa Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Fac Med UNAM*, 52(2), 73–75.
- Gonzalez Mañas, J. M., & Sanchez Marino, A. (2015). Introducción al cultivo celular. *Universidad Del País Vasco*, 1–12.
- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigacion Textil Y de Cooperacion Industrial*, (122), 35–41.
- H, Duddeck, Dietrich W, T. G. (2010). *Elucidación Estructural Por RMN*. (F. A, Ed.) (Tercera Ed). Hungría.
- Instituto Nacional de Cáncer. (2015). ¿ Qué es el cáncer? *Tipos de Cáncer [Última Actualización: 9 de Febrero 2015, Acceso 11 de Diciembre 2015]*, 1–6.
- JAVIER ANDRÉS MATULEVICH PELÁEZ. (2013). ESTUDIO FITOQUÍMICO DE HOJAS, FLORES Y FRUTOS DE *Bejaria resinosa* Mutis ex Linné filius (Ericaceae) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53, 1689–1699.

<http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Learn, H., Cancer, A., Healthy, S., Support, F., Explore, T., Find, I., ... Adn, E. (2016). ¿Cómo podemos ayudarlo? ¿Qué es el cáncer de seno? Cáncer de seno ¿Qué es el cáncer?, 1–82.
- López M, B. E. (2010). *Cáncer De Próstata*. (A. S.L, Ed.). Barcelona.
- M., R. (1995). *Toxicología Avanzada*. (Repetto M, Ed.). Madrid.
- Ma, Á., & Pm, E. L. R. (2008). Cáncer de próstata. *Revista Mexicana de Urología*, 68(4), 250–259.
- Males, Z., Plazibat, M., Vundać, V. B., & Zuntar, I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree - *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 56(2), 245–250.
- Maria, M. (2008). *Desarrollo De Métodos Para El Aislamiento y La Detección De Toxinas Marinas En Productos de la Pesca Y Productos De La Acuicultura*. Santiago.
- Mena, P. (2005). La biodiversidad del Ecuador. *Aprendiendo Sobre La Biodiversidad*.
- Nikolai, S. (2000). *Fundamentos de Tecnología De Productos Fitoterapéuticos*. (R. Pinzón, Ed.) (Primera Ed). Santa Fé De Bogota.
- Piñol, M., Palazón, J., Bieto-Azcon, J., & Talon, M. (1996). Metabolismo secundario. *Bieto-Azcon, J.; Talon, M.*, 448–471.
- Ponz E, Carpio G, M. S. (2005). *El Uso De Plantas En La Medicina Tradicional*. (P. Jimenez, Ed.). La Paz.
- Robles, J. (2000). Aislamiento de principios biológicamente activos presente en especies colombianas de la familia Burseraceae, 695.
- S.A., M. (2000). La Quercetina. *Gentileza S.A.*, 1, 5–8.
- Serrano V, Gordillo R, Guerra S, Naranjo M, Costales P; Paredes I, Astudillo L, Carrera L, Ortega F, Lalama T, R. J. (1997). *Ciencia Andina*. (Abya-Yala, Ed.) (Segunda). Quito.
- Sierra I, Quintanilla D, Ruíz S, Z. S. (2010). *Análisis Instrumental*. (B. Lorena, Ed.) (Primera Ei). España.
- Suárez A, Armijos C, Andrade J, Quisatagsi E, Cuenca M, Cuenca S, M. B. (2015). El

Principio Citotóxico de Bejaria Resinosa De Ecuador. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4.

Taketa, A. T. C., Breitmaier, E., & Schenkel, E. P. (2004). Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mat??). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(2), 205–211. <http://doi.org/10.1590/S0103-50532004000200008>

Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>

Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). PROCESOS DE SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE SUSTANCIAS EN MEZCLAS DE LÍQUIDO Y SÓLIDO. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Torres, M., Suárez, A., Gilardoni, G., Cartuche, L., Flores, P., & Morocho, V. (2016). Chemical Constituents of *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn (Polygonaceae) and Its In Vitro α -Amilase and α -Glucosidase Inhibitory Activities. *Molecules*, 21(11), 1461. <http://doi.org/10.3390/molecules21111461>

Willian, V. (2002). *Guía Ilustrada De Las Plantas De Las Montañas Del Quindío Y Los Andes Centrales*. (L. Escobar, Ed.) (Primera Ed). Manizales.