



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

MODALIDAD PRESENCIAL

**Aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos de *Niphogeton dissecta*
(Benth.) J.F. Macbr. (Culantrillo del cerro)**

*Tesis de grado previa a la
obtención del Título de
Bioquímico Farmacéutico*

AUTORA:

Núñez García Lorena Geovana

DIRECTOR:

BQ.Cartuche Flores Luis Emilio

CENTRO UNIVERSITARIO LOJA

2012

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Lorena Geovana Núñez García, declaro conocer y aceptar la disposición del Artículo 67 del Estatuto Orgánico de La Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte de 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”.

Loja, mayo del 2012

f).....

Lorena G. Núñez García

CERTIFICACIÓN

Bioq Farm.

Luis E. Cartuche F.

DIRECTOR DE TESIS DE GRADO

CERTIFICO:

Haber dirigido la investigación y la elaboración de la tesis: “**Aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos de *Niphogeton dissecta* (Benth.) J.F. Macbr. (Culantrillo del cerro)**” la misma que ha sido revisada durante su ejecución, por lo tanto autorizo su presentación

Loja, mayo del 2012

f).....

Bioq Farm. Luis E. Cartuche F.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Las ideas y resultados vertidos en el presente trabajo de investigación son de exclusiva responsabilidad de la autora

f).....

Lorena G. Núñez García

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, de igual manera al Instituto de Química Aplicada (IQA) por prestarme sus instalaciones para el desarrollo del mismo, y de manera especial, al Bioquímico Farmacéutico Luis Cartuche, director de tesis, por su apoyo y orientación a lo largo del proceso investigativo.

A todos mis maestros por sus valiosos conocimientos impartidos durante mi formación profesional, y a mis compañeros y amigos que me supieron brindar su apoyo incondicional.

Lorena Geovana

DEDICATORIA

A mis padres, de manera especial a mi madre por su apoyo incondicional que me supo brindar y a toda mi familia por estar siempre ahí cuando los necesité, pero sobre todo a Dios por darme la sabiduría necesaria para cumplir con todos mis objetivos planteados a lo largo de la carrera.

Lorena Geovana

CONTENIDO

	Pág.
CESIÓN DE DERECHOS	I
CERTIFICACIÓN	II
CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA	III
AGRADECIMIENTO	IV
DEDICATORIA	V
CONTENIDO	VI
RESUMEN	XII
ARTÍCULO (Isolation of Bioactive Secondary Metabolites of <i>Niphogeton dissecta</i> , a medicinal plant of Loja-Ecuador)	XIII
I.FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	
1.1 FIN DEL PROYECTO	2
1.2 PROPÓSITO DEL PROYECTO	2
1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO	2
II.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	
2.1 INTRODUCCIÓN	4
2.2 ANTECEDENTES	6
III.MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 MATERIAL VEGETAL	10
3.2 MÉTODO DE EXTRACCIÓN	10
3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	10
3.4 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	11
3.5 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA	11
3.5.1 Purificación de los Compuestos de las Fracciones Obtenidas	12

3.5.2 Microcolumna	12
3.6 MÉTODOS FÍSICOS	12
3.6.1 Punto de Fusión (Pf)	12
3.6.2 Solubilidad	13
3.6.3 Factor de Retención (Rf)	13
3.7 MICROORGANISMOS DE PRUEBA	14
3.8 PRUEBAS ANTIFÚNGICAS	14
3.8.1 Bioautografía Agar Overlay	14
a) Principio	14
b) Preparación del extracto	14
c) Cromatografía de Capa Fina	14
d) Procedimiento	15
e) Controles	15
f) Interpretación de Resultados	15
3.8.2 Microdilución en Caldo (CMI)	15
a) Principio	15
b) Preparación del extracto	15
c) Procedimiento	15
d) Interpretación de Resultados	17
IV.RESULTADOS Y ANÁLISIS	
4.1 MICRODILUCIÓN EN CALDO DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO Y ACETATO DE ETILO	19
4.2 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS	19
4.3 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO	20

4.3.1 Purificación o Lavado de las Fracciones	21
4.3.2 Características Físico-Químicas de las Fracciones	22
4.4 PUNTO DE FUSIÓN: COMPUESTOS OBTENIDOS	23
4.5 BIOAUTOGRAMAS	24
4.5.1 Bioautograma Fracción Ocho	24
4.5.2 Bioautograma Fracción Nueve	25
4.5.3 Bioautograma Fracción Diez	26
4.5.4 Bioautograma Fracción Doce	27
4.5.5 Bioautograma Fracción Trece	28
4.5.5.1 Bioautograma Subfracción de la Fracción Trece (Ff3)	29
4.5.6 Bioautograma Fracción Catorce	30
4.5.7 Bioautograma Fracción Quince	31
4.5.8 Bioautograma Fracción Dieciséis	32
4.6 MICRODILUCIÓN EN CALDO DE LAS FRACCIONES	34
V.CONCLUSIONES	36
VI.RECOMENDACIONES	38
VII.ANEXOS	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. CMI de los extractos metanólico y acetato de etilo frente a los hongos dermatofitos <i>T. mentagrophytes</i> y <i>T. rubrum</i>	Pág. 19
Tabla 2. Disolventes y proporciones a las cuales las fracciones fueron eluidas	20
Tabla 3. Lavado de las fracciones empleadas; para la separación de compuestos según el grado de solubilidad	21
Tabla 4. Características Físico-Químicas de las fracciones empleadas.	22
Tabla 5. Punto de fusión de los compuestos obtenidos de las fracciones 11 y 13.	23
Tabla 6. Fracciones que resultaron activas frente a los dos dermatofitos	24
Tabla 7. CMI de las fracciones del extracto de acetato de etilo que presentaron actividad mediante bioautografía	34

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1 Fotografía de <i>Niphogeton dissecta</i> , tomada en el cantón Saraguro Provincia de Loja.	6
Fig. 2 Mapa de la Provincia de Loja, lugar de recolección de la especie vegetal.	10
Fig. 3 Medida de los Rf en la placa de silica gel 60 F254.	13
Fig. 4 Microplaca TC96 hecha con 12 columnas y 8 filas (A–H) utilizada para realizar la Microdilución en Caldo (CMI)	16
Fig. 5 Cromatografía de capa fina (TLC) con luz UV 360 nm de los extractos: (a) hexánico, (b) metanólico y (c) acetato de etilo	20
Fig. 6 Bioautograma de la fracción 8: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para <i>T. mentagrophytes</i> , d) Control de Itraconazol para <i>T. mentagrophytes</i> , e) Bioautograma para <i>T. rubrum</i> , f) Control de Itraconazol para <i>T. rubrum</i>	25
Fig. 7 Bioautograma de la fracción 9: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para <i>T. mentagrophytes</i> , d) Bioautograma para <i>T. rubrum</i>	26
Fig. 8 Bioautograma de la fracción 10: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para <i>T. mentagrophytes</i> , d) Bioautograma para <i>T. rubrum</i>	27
Fig. 9 Bioautograma de la fracción 12: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para <i>T. mentagrophytes</i> , d) Bioautograma para <i>T. rubrum</i>	28
Fig. 10 Bioautograma de la fracción 13: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para <i>T. mentagrophytes</i> , d) Bioautograma para <i>T. rubrum</i>	29

- Fig. 11** Bioautograma subfracción de la fracción 13 Ff3: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum* 30
- Fig. 12** Bioautograma de la fracción 14: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum* 31
- Fig. 13** Bioautograma de la fracción 15: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum* 32
- Fig. 14** Bioautograma de la fracción 16: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum* 33

RESUMEN

La presente investigación realizada en el año 2012 se basó en obtener compuestos o metabolitos secundarios bioactivos a partir de la especie *Niphogeton dissecta*, la misma que fue recolectada en la provincia de Loja cantón Saraguro; para lo cual a partir del extracto de acetato de etilo que fue el que presentó mayor actividad antifúngica frente a los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* (*Tm*) y *Trichophyton rubrum* (*Tr*) se realizó la cromatografía en columna utilizando disolventes orgánicos en diferentes proporciones, resultando 150 fracciones, de las cuales las primeras fracciones obtenidas fueron las evaluadas frente a los dermatofitos ya mencionados, obteniendo como resultado 8 de ellas con actividad antifúngica a una concentración de 200 ug/ml mediante la prueba de bioautografía; de las cuales sólo la 8,9,13 y 14 presentaron una CMI menor a 250 ug/ml. Los resultados obtenidos nos llevan a concluir que la especie evaluada tiene la capacidad de producir compuestos bioactivos antifúngicos.



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Isolation of Bioactive Secondary Metabolites of *Niphogeton dissecta*, a medicinal plant of Loja-Ecuador

Cartuche Luis E. ¹, Núñez Lorena G. ²

¹ Instituto de Química Aplicada -Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto s/n, Postal Code 11-01-608, Loja, Ecuador

e-mail: lecartuche@utpl.edu.ec

² Escuela de Bioquímica y Farmacia -Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto s/n, Postal Code 11-01-608, Loja, Ecuador

e-mail: lgnunez@utpl.edu.ec

ABSTRACT

Niphogeton dissecta, a medicinal plant used by the Saraguro's indigenous people was select for fractionation due to the antifungal activity demonstrated against *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* by means of the Microdilution broth method (MIC 250 ug/ml). Column chromatography of ethyl acetate extract resulted in 150 fractions. The first 16 fractions were evaluated against *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*. 8 fractions reported activity at a concentration of 200 ug/ ml in bioautography assay and just the fraction 8,9,13 and 14 had a MIC value less than 250 ug/ml.

Keywords: *Niphogeton dissecta*, secondary metabolites, column chromatography, Bioautography, MIC.

INTRODUCTION

In Ecuador, the use of medicinal plants is immersed in the daily lives of its inhabitants mainly due to ancient medical knowledge is immense, at present 3118 species belonging to 206 families of plants are reported useful for their medicinal properties in Ecuador; families who had a greater number of species were *Asteraceae*, *Fabaceae*, and *Rubiaceae*.¹

The secondary metabolites or natural products isolated from several sources have an important economical value, derived from their uses in cosmetics, food, and

pharmaceutical.² The recognition of properties of secondary metabolites has led to the search of new drugs, antibiotics, insecticides and herbicides.³

The specie *Niphogeton dissecta*, commonly known as Culantrillo del cerro (Community Saraguro-Loja Province) belongs to the Apiaceae family; is a herb of grass 5 to 10 cm tall, native to the Andes found from 2500-4500 m a. s. l. It is widely distributed in the provinces of Loja, Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Morona Santiago, Napo, Pichincha, Azuay, Zamora-Chinchipec.⁴ The plant is widely used to treat the diarrhea, vomiting, bloating, colds and rheumatism.⁵

The antimicrobial activity of plant extracts and natural products has revealed the potential of



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

higher plants as a source of anti-infective agents.⁶ For that reason, this research is focused in the isolation of compounds or secondary metabolites with antimicrobial from this specie.

MATERIALS AND METHODS

General

Fusion is called when a solid changes to a liquid at a determined pressure.⁷ Melting points were determined using a Fisher melting point apparatus.

Plant Material

The plant material was collected in Loja province- community Saraguro at 3295 m. a. s. l. 695954 E 9593112 N Coordinates

Extraction and Isolation

300 g of dried material was used to get the extracts. Hexane was used as the initial solvent to remove fatty components. The residue was extracted with acetate and finally the last residue after filtration was extracted with methanol. All the extracts were concentrated under reduced pressure and 30° C in a rotavapory equipment. Column chromatography is the separation of components of a mixture,⁸ was selected as the method to fractionate the acetate extract. Hexane, acetate and methanol and different proportions were used as mobile phase and fractions of 200 ml of volume were collected for each fraction.

Test Microorganisms

For the evaluation of antifungal susceptibility used two dermatophyte fungi, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC ®28185 and ATCC ®28188 *Trichophyton rubrum*.

Determination of antifungal activity

•Agar Overlay Bioautography

This technique is based on microbial growth inhibition by the diffusion of active substances through chromatographic plates previously made.⁹ Fractions 1 to 16 collected during the fractionating process were prepared in CHCl₃ at a concentration of 2 mg/100 µL. 10 µL of the solutions were applied to pre-coated TLC plates (6 x 1 cm). TLC plates were developed with Hex: EtOAc(1:1) and dried for complete removal of solvent. The inoculum was prepared seeding an aliquot from a cryogenic reserve (spores) of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* over Sabouraud agar (2.5x10⁴ spores). A maximum of 1 mL was spread over the developed TLC plate until to form a film of 1 mm of thickness to avoid dilution. After solidification of the media, the TLC plates were incubated inverted during 48 hours at 30° C. The bioautograms were stained with an aqueous solution of Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (25 mg/mL) (SIGMA). Itraconazole (10 µg) was used a positive control.

•Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination

MIC values were determined by the microdilution broth method using a final concentration of 5 x 10⁴ spores/mL of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*. The MIC was defined as the lowest concentration of substance that prevented growth,¹⁰ which



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

was determined by the appearance of mycelial growth after 96 hours of incubation. Solutions of the ethyl acetate and methanol were prepared in DMSO at a concentration of 20mg/mL. Solutions of the fractions were prepared in DMSO (2mg/100 μ L). The assay was carried out in 96-well microtiter plates and the two-fold serial dilution was employed

to get concentrations of 1000 ug/mL to 7.81 ug/mL. Incubation was at 3^o C for 96 hours. Itraconazole was used a positive control with a MIC value of 0.48 ug/ml

RESULTS AND DISCUSSION

MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF METHANOLIC AND ETHYL ACETATE EXTRACTS

Table 1. MIC of the methanolic and ethyl acetate extracts against *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*

EXTRACTS	DERMATOPHYTE FUNGI	
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (28185)	<i>Trichophyton rubrum</i> (28188)
METHANOLIC EXTRACT	1000 ug/ml	500 ug/ml
ETHYL ACETATE EXTRACT	250 ug/ml	250 ug/ml
HEXANE EXTRACT	Nd	Nd

*Nd: not determined by solubility problems

Source: The author 2012

The results shown in table 1 demonstrate that the ethyl acetate extract was the more active. Extract compared with the others extracts.

COLUMN CHROMATOGRAPHY: ETHYL ACETATE EXTRACT

150 fractions were obtained in total. The first fractions were those that were used to perform antifungal susceptibility tests because they had a higher degree of purity and weight, and fewer metabolites.



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Table 2. Physical and Chemical Characteristics of the selected fractions

Obtaining/Fractions	Solvents	Proportion	Appearance	Color	Amount Obtained g	Melting point
1	Hex.	100	Dust	Whitish	0,3799	-
3	Hex-AcOEt	99-1	Oil	Yellow Greenish	0,0429	-
7	Hex-AcOEt	98-2	Oily	Dimgreen	0,034	-
8	Hex-AcOEt	93-7	Greasy	Dimgreen	0,075	-
9	Hex-AcOEt	92-8	Oil	Yellow	0,1369	-
10	Hex-AcOEt	90-10	Granulous	Yellow	0,0285	-
11	Hex-AcOEt	90-10	Dust	White	0,0317	74-75
12	Hex-AcOEt	90-10	Dust	White	0,0961	-
13 (Ff3)	Hex-AcOEt	88-12	Crystalline	White Transparent	0,0714	90-91
14	Hex-AcOEt	88-12	Viscose	Yellowbrown	0,0979	-
15	Hex-AcOEt	88-12	Dust	Whitish	0,4499	-
16	Hex-AcOEt	86-14	Dust	Faintyellow	0,0821	-

*After washing of the fractions 11 and 13 with the solvents used according to the degree of solubility of these underwent the melting point of the compounds obtained because they had a higher degree of purity.

Source: The author 2012

Table 2 shows the proportions solvents which were eluted the fractions as well as the physicochemical characteristics that are appearance, color and amount obtained are important as a reference for analysis, just as the melting point of 2 compounds obtained

BIOAUTOGRAPHY

According to Symonds, N (1972)¹¹ and Verastegui, M (1998),¹² bioautography technique can detect very low concentrations of the compound responsible for biological activity and is seen at a glance the zone of

inhibition. Made each one bioautograms with the fractions described in Table 2, eight of them were active against dermatophyte fungi *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*. Table 3 shows the Rf value of which inhibited the compounds present in them. It is noteworthy that the inhibition occurred at a concentration of 200 µg (10 µL alicuot) in each of the fractions. Since this is the highest concentration and the only proven, in order to discriminate active fractions of the non-working, these results were compared with control Itraconazole that is an antifungal agent that inhibited the growth of microorganisms at the same concentration (10µL)



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Table 3. Antifungal Results: Concentration of the fractions required to inhibit fungal growth on plates of silica gel 60F₂₅₄.

Fractions	Compounds (Rf)	Inhibitory activity (10uL)	
		<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
8	0.8-0.9	10	10
9	0.8	10	10
10	0.9	10	10
12	0.6-0.8-0.9	10	10
13	0.5-0.6-0.7-0.8-0.9	10	10
14	0.5-0.6-0.7-0.8-0.9	10	10
15	0.4-0.5-0.7-0.8-0.9	10	10
16	0.4-0.5-0.6-0.7-0.8-0.9	10	10

Positive control: Itraconazol

Source: The author 2012

MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC)

Table 4. MIC acetate extract fractions that showed activity by bioautography

ACETATE EXTRACT FRACTIONS (2mg/100 uL DMSO)	DERMATOPHYTE FUNGI	
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (28185)	<i>Trichophyton rubrum</i> (28188)
8	250 ug/ml	125 ug/ml
9	250 ug/ml	125 ug/ml
10	500 ug/ml	500 ug/ml
12	500 ug/ml	500 ug/ml
13	500 ug/ml	125 ug/ml
14	250 ug/ml	125 ug/ml
15	1000 ug/ml	1000 ug/ml
16	1000 ug/ml	> 1000 ug/ml

Source: The author 2012



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Table 4 shown concentrations which inhibited MIC at each of the fractions above. Considering each of the concentrations obtained we can affirm that *Niphogeton dissecta* has considerable antifungal activity and to inhibit some of the fractions to a concentration of 125 µg/ml against *T. rubrum* considered by Cimanga, K *et al* (2001)¹³ as the concentration of effective degree of inhibition.

He X (1994)¹⁴ states that the concentration at which acts an antifungal MIC is due to the amount of active compounds in the extract.

According to Quindós, G *et al* (2002)¹⁵ and Torres, J *et al* (2002)¹⁶ interest in the in vitro susceptibility testing of antifungal agents has increased in recent years due to the increased number of resistant strains, and therefore which seeks to provide a good supply through the realization of these antifungal activity tests conducted on the test species.

CONCLUSIONS

The ethyl acetate extract had the highest antifungal activity against two dermatophyte fungi selected with a MIC value of 250 µg/mL. The hexane extract couldn't be tested because of solubility problems.

8 from the 16 fractions reported activity at a concentration of 200 µg/mL in bioautography assay, and just the fraction 8,9,13 and 14 had a MIC value less than 250 µg/mL.

RECOMMENDATIONS

To continue with the study of the specie *Niphogeton dissecta*, in order to identify the

chemical structure of the compounds responsible for fungal inhibition.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author want to thank the Universidad Técnica Particular de Loja, and to the Instituto de Química Aplicada (IQA) for allowing me to conduct this research project.

REFERENCES

1. De la Torre, L.; Alarcón, D.; Lars, P.; Lecaro, J. Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas; Ciencias Biológicas 2011. Available at <http://www.biologia.puce.edu.ec/natura.php?c=350>
2. Ávalos, A.; Pérez, E. Fisiología Vegetal. Reduca. Madrid 2009, 2, 119-145.
3. Croteau, R.; Kutchan, T.; Lewis, N. Natural products (secondary metabolites). In Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville 2000, p. 1250-1318.
4. Luteyn, J. 2002. A check list of plant diversity, geographical, distribution and botanical literature.
5. Cartuche, L.; Abad, X. (2009). "Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), *Fuschiaayavacensis* (Pena-Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial." Tesis de grado



UTPL

**UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA**

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

6. López, R.; Álvarez, M.; López, T.; González, J. Actividad antifúngica in vitro de Pinuscaribaea. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1997, 2, 25-29
7. De la Cruz, A. Química Orgánica vivencial. Ed., McGraw-Hill. México, 2004
8. Charles, M. Techniques and Experiments for Advanced Organic Laboratory. 1ª edición. 1997, pág 144
9. Nostro, A. Extraction Methods and Bioautography for evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity. Letter in Applied Microbiology. 2000, 30, 379-384.
10. Navarro, V., Gonzalez, A.; Fuentes, M.; Avilés, M.; Ríos, M.; Zepeda, G.; Rojas, M. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 2003, 87, 85-88
11. Symonds, N. La resistencia bacteriana. C. M. A. Journal. 1972, pp. 105, 587.
12. Verástegui, M. Bioautografía para detectar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas. Revista Sociedad Química de México. 1998, Vol. 42.
13. Cimanga, K., De Bruyne, T.; Lasure, A.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Claeys, M.; Van den Berghe, D.; Kambu, K.; Tobna, L.; Vlietinck, A. In Vitro biological activities of alkaloids from *Cryptolepissanguinolenta*. Plant Med. 2001, 62, 22- 27
14. He X. An Antifungal compound from *Solanum nigrescens*. J. Ethopharma. Jap, 1994, 43, 173-177.
15. Quindós, G.; Torres, M. Antifúngicos de uso sistémico: resistencias y fracasos terapéuticos. Rev Iberoam Micol. 2002, 11, 9-27.
16. Torres, J.; Madrenys, N.; Jiménez, J.; Saballs, P. Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución estandarizado y el E-test. Rev Iberoam Micol. 2002, 14, 8-115.

***I.FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES
DEL PROYECTO***

I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 FIN

Contribuir al descubrimiento de compuestos bioactivos de especies vegetales consideradas medicinales por la etnia Saraguro, para así aportar en el campo de la farmacoterapia con nuevos principios bioactivos de origen natural que puedan servir de base para la elaboración de fármacos antimicrobianos.

1.2 PROPÓSITO

Enriquecer el conocimiento en materia de identificación de entidades químicas biológicamente activas, a través del aislamiento de metabolitos secundarios mediante métodos cromatográficos y su evaluación frente a sistemas *in vitro* para comprobar actividad inhibitoria frente a dos dermatofitos.

1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO

De los estudios de Abad y Cartuche¹ y Palacios y Cartuche² conocemos que el extracto metanólico de la especie *Niphogeton dissecta* posee actividad inhibitoria frente a dos dermatofitos; *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, siendo más sensible el *T. rubrum* con una CMI de 31,25ug/ml y contra *T. mentagrophytes* una CMI de 125ug/ml; así mismo a un (Rf 0,6), se presentó activo hasta 5 uL frente a *T. mentagrophytes* y hasta 2 uL contra *T. rubrum*; por lo que con el presente estudio pretendemos:

- a) Establecer parámetros de aislamiento mediante cromatografía en columna
- b) Obtener compuestos o metabolitos secundarios a partir de la especie *Niphogeton dissecta*
- c) Determinar la actividad biológica relevante de estos metabolitos frente a los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.

1 Abad, X.; Cartuche, L (2009). "Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper* ecuatorense (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena-Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial." Tesis de grado

2 Palacios, D.; Cartuche, L (2009). "Aplicación de Métodos Bioautográficos para la identificación de compuestos antimicrobianos en extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper* sp., *Piper* ecuatorense (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante) y *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro)". Tesis de grado

II.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 INTRODUCCIÓN

Se estima que en el mundo existen entre 310000 y 422000 especies de plantas, encontrándose en los bosques tropicales cerca de 125000 especies.³ Dentro de esta vasta diversidad, existen especies vegetales con propiedades de interés para la investigación y el descubrimiento de nuevos productos.⁴ Sin embargo, se calcula que menos del 10 % de ellas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica.⁵

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes debido, principalmente, a que el conocimiento médico ancestral es inmenso. Se reportan 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales en el Ecuador. Las familias que tuvieron un mayor número de especies medicinales fueron Asteraceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Araceae. En Ecuador las afecciones causadas por organismos patógenos como bacterias, virus y hongos agruparon un importante grupo de plantas medicinales. Otras afecciones tratadas por un gran número de plantas en el Ecuador son las heridas, lesiones y desórdenes del sistema digestivo.⁶ La milenaria experiencia sobre su uso enseña que la efectividad no depende exclusivamente del producto; es decir, no solo de sus principios activos según la química, sino también, y con la misma importancia, de su preparación y posibles combinaciones.

Ha sido ampliamente reconocido que las plantas constituyen un inestimable reservorio de metabolitos secundarios biológicamente activos en el control de diversas enfermedades⁷⁸ y las provocadas por hongos en particular.⁹¹⁰ Los efectos secundarios adversos de algunas drogas, la resistencia frecuentemente inducida y los elevados costos en el

³Pitman, N.; Jorgensen, P. Estimating the size of the world's threatened flora. *Science*. 2002, 5595, 298- 989.

⁴Mendelsohn, R.; Balick, M.J. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Economic Botany*. 2000, 49, 223–228.

⁵Harvey, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. 2000, 5, 294-300. <http://www.ibmb.uni.wroc.pl/prace2/praca18.pdf> (Consultado el 13 de junio del 2006)

⁶De la Torre, L.; Alarcón, D.; Lars, P.; Lecaro, J. Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas; Ciencias Biológicas 2011. <http://www.biologia.puce.edu.ec/natura.php?c=350>

⁷Cos, P.; Maes, L.; Vlietinck, A.; Pieters, L. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med*. 2008, 1323-1337

⁸Gibbons, S. Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med*. 2008, 74, 594-602

⁹Grayer, R.; Harborne, J.A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*. 1994, 37, 19-42.

¹⁰Osborn, A. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*. 1996, 8, 1821-1831.

tratamiento,¹¹ han estimulado y orientado muy intensamente la investigación en la búsqueda y utilización de sustancias puras o extractos crudos de plantas en el control de diversas enfermedades fúngicas.¹²¹³¹⁴

Los metabolitos secundarios también denominados productos secundarios o productos naturales tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc.¹⁵

El reconocimiento de las propiedades de los metabolitos secundarios ha conducido a la búsqueda de nuevos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas.¹⁶ Por su lado, la industria farmacéutica muestra un éxito notable en el descubrimiento de medicamentos originados a partir de productos naturales, entre otros la aspirina, la digoxina, la morfina, la quinina y el taxol.¹⁷

En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos, todavía no se conocen mucho de los principios activos a los que deben sus extraordinarias cualidades.

¹¹ Davicino, R.; Mattar, M.; Casali, Y.; Correa, S.; Pettenati, E.; Micalizzi, B. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. Perú. Biol.* 2007, 14, 247-251.

¹² Dabur, R.; Singh, H.; Chhillar, A.; Ali, M.; Sharma, G. Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia*. 2004, 75, 389-391.

¹³ Fenner, R.; Sortino, M.; Rates, S.; Dall'Agnol, R.; Ferraz, A. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine*. 2005, 12, 236-240.

¹⁵ Zhang, J.; Cao, Y.; Xu, Z.; Sun, H.; An, M.; Yan, L.; Chen, H.; Gao, R.; Wang, Y.; Jia, X.; Jiang, Y. In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens. *Biol. Pharm. Bull.* 2005, 28, 2211-2215.

¹⁶ Avalos, A.; Pérez, E. *Fisiología Vegetal*. Reduca. Madrid 2009, 2, 119-145.

¹⁶ Croteau, R.; Kutchan, T.; Lewis, N. Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville 2000, p. 1250-1318.

¹⁷ Heinrich, M.; Bames, J.; Gibbons, S.; Williamson, E. *Phytotherapy and pharmacognosy*. In *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone. Edinburgh, GB. 2004, p. 4-21

La especie ***Niphogeton dissecta***, conocida con el nombre vulgar de Culantrillo del Cerro (Comunidad Saraguro- Provincia de Loja); perteneciente a la familia Apiaceae, es una hierba arrosetada de 5 a 10 cm de altura, presenta hojas compuestas, cada foliolo profundamente lobulado, pecíolos de 5 a 10 cm de largo, sus pétalos miden 0,8 mm de largo con una coloración de blancos a verde claro; es una hierba nativa de los Andes encontrada desde 2500-4500 m s. n. m.; la misma que se encuentra ampliamente distribuida en las provincias de Loja, Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Morona Santiago, Napo, Pichincha, Azuay, Zamora-Chinchipe.¹⁸ La planta es usada ampliamente para el tratamiento de diarrea, vómito, inflamación del vientre, resfríos y reumatismo.¹⁹



Figura 1 Fotografía de *Niphogeton dissecta*, tomada en el cantón Saraguro Provincia de Loja

Fuente: La autora

2.2 ANTECEDENTES

Cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales, de forma tal que la etnobotánica y la fitoterapia están tomando un gran auge en el mundo actual, tanto en la medicina aplicada como en la investigación experimental. El 80 % de la población mundial, aproximadamente unos cuatro mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal en muchas de sus dolencias. Llama la atención la creciente

¹⁸ Luteyn, J. 2002. A check list of plant diversity, geographical, distribution and botanical literatura.

¹⁹ Abad, X.; Cartuche, L (2009). "Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena-Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial." Tesis de grado

demanda de esta terapia sobre todo en los países de mayor desarrollo donde resurge la necesidad de lo natural y el rechazo a una medicina iatrogénica (enfermedad causada por medicamentos); por su parte en los países de menor desarrollo constituye un recurso ancestral transmitido de generación en generación como parte de las tradiciones enraizadas en cada uno de ellos.²⁰

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes anti-infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica.²¹

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrándose las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas.^{22,23}

Muchos principios activos se han aislado y purificado, y se ha dilucidado su estructura química. En algunos casos, esa estructura ha sido copiada o duplicada de manera artificial, obteniéndose compuestos sintéticos, muchos de los cuales constituyen la base de medicamentos comerciales. Otros compuestos son muy complejos y su estructura química no ha sido identificada, mucho menos duplicada mediante síntesis, En 1950 estaban caracterizados 5000 metabolitos secundarios de las plantas, en la actualidad se conocen más de 100000.²⁴

Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas. Ellas producen diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad

²⁰ Martínez, I. Las Plantas Medicinales. Rev. Cubana Oncol. 2000, 16(1):66

²¹ López, R.; Álvarez, M.; López, T.; González, J. Actividad antifúngica in vitro de Pinus caribaea. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1997, 2, 25-29

²² Redo, M.; Rios, J.; Villar, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants. Phytotherapy Research. 1989, 3, pp. 117.

²³ Silver, L.; Bostian, K. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance, Antimicrob. Agents Chemother. 1993, 37, pp. 377.

²⁴ Harborne, J.; Williams, C. Fitoquímica. 2000, 55, 481-504.

antifúngica. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc.²⁵

En Ecuador el número más alto de especies se encuentra en la región andina con 9865 especies (64,4% del total); Loja en particular cuenta con 3039 especies (19,9%);²⁶ es por eso que la Provincia de Loja cuenta con una gran riqueza vegetal. De ahí la importancia de esta investigación como aporte al estudio de plantas medicinales y desarrollo de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana.

Estudios realizados anteriormente en la UTPL en el Laboratorio de Química Aplicada (IQA) han demostrado que ésta especie presenta actividad antifúngica frente a los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*,^{27,28} por lo que surge el interés en el aislamiento de compuestos o metabolitos secundarios para la determinación de actividad biológica relevante frente a estos.

²⁵Grayer, R.; Harborne, J.A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*. 1994, 37, 19-42.

²⁶Paredes, A. Carácter Fitoquímico de varias especies medicinales del Ecuador. 2001 Ed. Universitaria

²⁷ Abad, X.; Cartuche, L (2009). "Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: Piper ecuadorensis (Matico), Lepechinia mutica Benth (Turuyante), Fuschia ayavacensis (Pena-Pena), Niphogeton dissecta (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial." Tesis de grado

²⁸Palacios, D.; Cartuche, L (2009). "Aplicación de Métodos Bioautográficos para la identificación de compuestos antimicrobianos en extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: Piper sp., Piper ecuadorensis (Matico), Lepechinia mutica Benth (Turuyante) y Niphogeton dissecta (Culantrillo del cerro)". Tesis de grado

III.MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal de *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro) se realizó en la provincia de Loja cantón Saraguro, a una altitud de 3295 m s. n. m. Coordenadas 695954 E 9593112 N

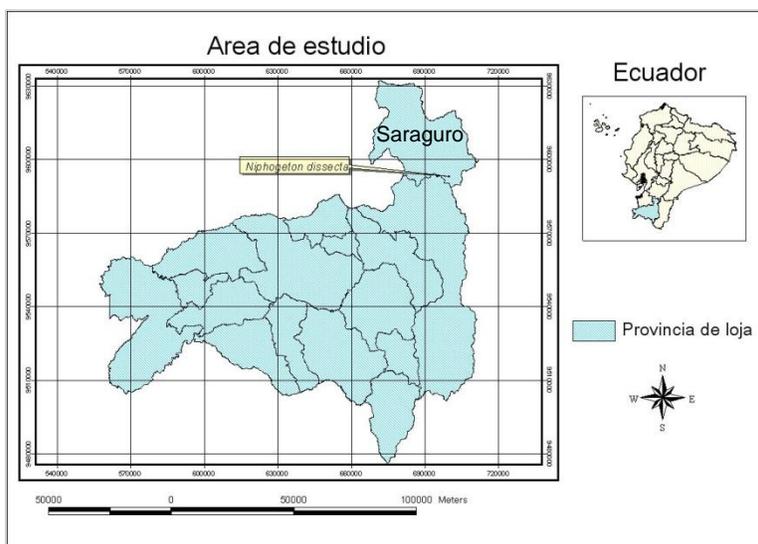


Figura 2 Mapa de la Provincia de Loja, lugar de recolección de la especie vegetal.

Fuente: La autora

3.2 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

El material recolectado se secó por 3 días a 30°C, luego se pesó 300 g los mismos que fueron triturados. La obtención de los extractos se realizó por maceración dinámica a temperatura ambiente por 7 a 8 horas, utilizando los solventes hexano, acetato de etilo, y metanol; luego se separó el residuo vegetal y el líquido extractivo empleando filtración al vacío. Se procedió a la concentración de cada uno de los extractos empleando un equipo rota-evaporador a temperatura moderada de 30-35°C, hasta obtener los 3 extractos secos.

3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Se determinó la actividad antifúngica de los extractos metanólico y de acetato de etilo; el extracto hexánico no fue evaluado por problemas de solubilidad con Dimetilsulfóxido (DMSO) y con el medio acuoso; utilizando las cepas de hongos dermatofitos *Trichophyton*

mentagrophytes ATCC® 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188 los cuales se encuentran como crioreservas a -80°C en el laboratorio de Bioensayos del Instituto de Química Aplicada de la UTPL. Se empleó el método de Microdilución en Caldo para determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), definida como la concentración más baja de extracto capaz de inhibir el crecimiento microbiano.²⁹ El ensayo consiste en preparar el extracto, el cual es reconstituido con Dimetilsulfóxido (DMSO) (20mg/1ml), luego ésta solución es sometida a una dilución seriada en los pocillos de una microplaca TC96, hasta obtener 8 diluciones consecutivas cuyas concentraciones fueron desde 1000 a 0,7ug/ml, luego se le agregó una concentración estándar fúngica (5×10^4 esporas/ml) y finalmente se incubaron las placas a 28°C controlando el crecimiento hasta las 96 horas.

3.4 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Los extractos hexánico, metanólico y de acetato de etilo obtenidos de la especie vegetal fueron sometidos a cromatografía de capa fina, que nos permite comparar y determinar el grado de pureza de una o varias muestras.³⁰ Esta se llevó a cabo en placas de aluminio cubiertas de sílica gel de 60 F₂₅₄ (0,2 mm de espesor, Merck) de 6 cm de largo por 1 cm de ancho. Para la siembra se tomaron pequeñas alícuotas de los extractos. La separación de compuestos se llevó a cabo usando la fase móvil hexano-acetato de etilo, proporción 1:1 que permitió una mejor separación e identificación de los compuestos. La visualización se realizó con luz UV 254 y 360 nm.

3.5 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

La cromatografía en columna consiste en la separación de componentes de una mezcla, mediante una fase móvil, que transporta las sustancias que se separan a través de una fase estacionaria. Como fase móvil se usa disolventes de polaridad creciente.^{31,32}

Para el montaje de la columna se utilizó el extracto de acetato de etilo. La preparación de ésta se llevó a cabo empleando una relación muestra-sílica gel 1:30 (5 gramos de extracto y 150 gramos de sílica). El fraccionamiento se realizó usando los solventes hexano,

²⁹ Navarro, V., Gonzalez, A.; Fuentes, M.; Avilés, M.; Ríos, M.; Zepeda, G.; Rojas, M. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 2003, 87, 85-88

³⁰ Abbott, D.; Andrews, R.; Alambra, E. Introducción a la Cromatografía. 3a edición. Ed. Alhambra. España, 1983

³¹ Charles, M. Techniques and Experiments for Advanced Organic Laboratory. 1a edición. 1997, pág 144

³² Galagovsky, L. Química Orgánica Fundamentos Teórico-Prácticos para el Laboratorio. 1ª edición. 2002, pág 245

acetato de etilo y metanol; tomando un volumen de 200 ml por cada fracción eluída, la concentración de éstas se llevó a cabo utilizando un rota-evaporador a temperatura 30-35°C.

3.5.1 Purificación de los Compuestos de las Fracciones Obtenidas

El conocimiento de los métodos de aislamiento y purificación de un compuesto es fundamental para poder determinar su estructura basándose en las diferencias que existen entre las propiedades físicas de los componentes de una mezcla como solubilidad.³³El lavado de los compuestos se realizó tomando en cuenta el grado de solubilidad de cada fracción, es decir, utilizando el disolvente más conveniente para separar los compuestos.

3.5.2 Microcolumna

La técnica cromatográfica de purificación consiste en separar mezclas de compuestos en función de su diferente afinidad entre una fase estacionaria y una móvil.³⁴

La microcolumna se llevó a cabo con la fracción 13 debido a que no se obtenía el compuesto puro en su totalidad. Para montarla se utilizó una relación muestra-sílica gel 1:10 (0,0714 gramos de la fracción y un gramo de sílica); los solventes empleados fueron: hexano, acetato de etilo y metanol

3.6 METODOS FISICOS

3.6.1 Punto de Fusión (Pf)

Se denomina fusión cuando un sólido cambia a líquido a una presión determinada. El rango de temperatura de fusión es una herramienta útil para establecer la pureza de las sustancias.³⁵La determinación del punto de fusión de los compuestos se realizó tomando

³³ Pasto, D. Jonson, C. Determinación de Estructuras Orgánicas. Ed. Reverté. 1984

³⁴ García, A. Del Castillo, B. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. 1ª edición. Ed. Limusa. México, 1988, pág 252.

³⁵ De la Cruz, A. Química Orgánica vivencial. Ed. Mc Graw-Hill. México, 2004.

pequeñas alícuotas de cada uno utilizando el equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus, serial 40-22 de 50-60 Hz.

3.6.2 Solubilidad

Es la propiedad de una sustancia para disolverse en otra. Los solventes empleados para determinar la solubilidad de los compuestos fueron: Hexano, Acetato de etilo, Metanol y Diclorometano.

3.6.3 Factor de Retención (Rf)

Se define como: $R_f = \frac{\text{distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{\text{distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente}}$. Los R_f de las fracciones se calcularon de acuerdo a la fórmula que se indica a continuación y considerando como referencia la figura N° 4

Fórmula

$$R_f = \frac{\text{Distancia desde el origen hasta el compuesto}}{\text{Distancia desde el origen frente del solvente}}$$

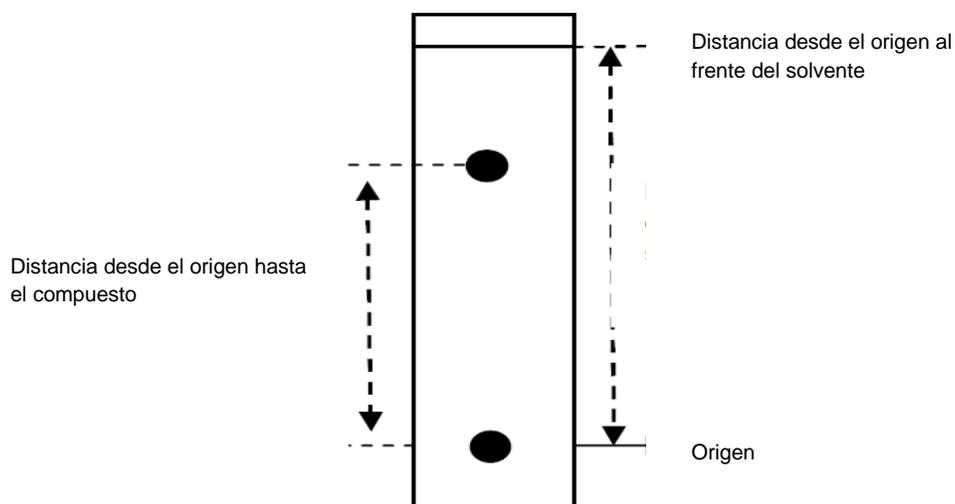


Figura 3 Medida de los R_f en la placa de silica gel 60 F₂₅₄.
Fuente: Silva et al 2008

3.7 MICROORGANISMOS DE PRUEBA

Para la evaluación de la susceptibilidad antifúngica se emplearon dos hongos dermatofitos: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC ® 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC ® 28188.

3.8 PRUEBAS ANTIFÚNGICAS

3.8.1 Bioautografía Agar Overlay

a) Principio:

Esta técnica se basa en la inhibición del crecimiento antimicrobiano, mediante la difusión de sustancias activas a través de placas cromatográficas previamente realizadas.³⁶

b) Preparación del extracto

Obtenidas las fracciones del extracto de acetato de etilo, se escogieron las que se utilizarían para realizar los métodos de susceptibilidad antifúngica. Para llevar a cabo la Bioautografía se preparó una disolución de 2mg de cada fracción por 100 uL de solvente en este caso diclorometano.

c) Cromatografía de Capa fina

Las fracciones a evaluar se las sometió a cromatografía de capa fina, utilizando placas de sílicaantes descritas (apartado 3.4). Para la siembra se tomó alícuotas de 10 uL de la muestra preparada con la fracción, la cual está a una concentración de 2mg/100uL de diclorometano. La fase móvil empleada para la separación de compuestos fue hexano-acetato de etilo proporción 1:1, permitiendo una mejor separación de los compuestos. Luego se realizó la visualización con luz UV 254 y 360 nm. Se utilizaron placas reveladas con ácido sulfúrico y vainillina para poder identificar los compuestos y medir el valor de R_f, los mismos que nos permitieron localizar los compuestos bioactivos.³⁷

³⁶Nostro, A. Extraction Methods and Bioautography for evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity. Letter in Applied Microbiology. 2000, 30, 379-384.

³⁷Choma, I. The use of Thin Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. LCGC Europe. 2005

d) Procedimiento

Se desarrollaron los cromatogramas en placas como se indicó anteriormente (apartado c). A partir de reservas criogénicas se tomó 10 uL de la cepa fúngica para *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* y se inoculó en el medio que contenía 2.5 ml de medio Emmons para obtener una concentración final de 2.5×10^4 esporas por ml. Se tomó 1 ml de medio inoculado con el hongo y se sembró sobre las placas (de 6 cm de largo x 1 cm de ancho) formando un grosor de 1mm sobre la placa. Posteriormente se incubó a una temperatura de 28°C por 24-48 horas.

e) Controles

Los controles se utilizaron con el mismo volumen que las fracciones el cual fue 10 uL para cada una. En este caso como control para los dos hongos dermatofitos se utilizó el Itraconazol a una concentración inicial de 1mg/ml.

f) Interpretación de Resultados

Antes de realizar los bioautogramas, se llevó a cabo la identificación de cada uno de los compuestos presentes en los cromatogramas mediante el valor de Rf. Una vez desarrollados los bioautogramas, la actividad antifúngica se detectará en base a la presencia de una zona de inhibición alrededor del compuesto bioactivo.

3.8.2 Microdilución en Caldo

a) Principio:

Es un método que consiste en determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo.

b) Preparación del extracto

Para este ensayo se preparó una disolución de cada fracción con Dimetilsulfóxido (DMSO) 2mg/100uL.

c) Procedimiento

El ensayo se realizó sobre microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución doble seriada: colocamos 180uL de caldo Sabouroud al primer pocillo y 100 uL a todos los demás pocillos restantes, luego se adiciona 20uL de la fracción (2mg/100uL) a probar, en el primer pocillo y mezclamos. Se realiza diluciones seriadas tomando 100uL del primer pocillo y diluyendo con 100uL del pocillo siguiente y se continúa este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se sigue el mismo procedimiento para el control de esterilidad (180uL caldo + 20 uL de la fracción) control negativo (180uL caldo + 20uL DMSO) como para el control positivo (180uL caldo + 20uL Itraconazol). En el control positivo se emplea una solución de 1 mg/ml de Itraconazol. Una vez preparada la placa se inocularon con 100 uL de la suspensión del inóculo, para todas las columnas a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200uL en la placa de cultivo la concentración final del inóculo 5×10^4 esporas/ml. Se incuban las placas a 28°C y se monitorió el crecimiento hasta las 96 horas.³⁸

	EXTRACTO 1				EXTRACTO 2				CONTROLES DMSO (C11), ANTIBIOTICO (C12)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000											
B	500											
C	250											
D	125											
E	62.5											
F	31.25											
G	15.625											
H	7.8125											

Figura 4 Microplaca TC₉₆ hecha con 12 columnas y 8 filas (A–H) utilizada para realizar la Microdilución en Caldo

Fuente: La autora

³⁸Abad, X.; Cartuche, L (2009). "Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena-Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial." Tesis de grado

d) Interpretación de Resultados

La lectura se realizó de manera visual y se reportará actividad relevante y selectiva cuando el valor de CMI esté por debajo de 200 ug/ml para extractos.³⁹

³⁹Ríos, J.; Recio, M.; Villar, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *Jornal of Ethnopharmacology*. 1988, 23,127-149.

IV.RESULTADOS Y ANÁLISIS

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En la presente investigación, los resultados de actividad antifúngica se expresan cuali y cuantitativamente, ya que una de las técnicas empleadas nos permitió visualizar zonas de inhibición alrededor de los compuestos activos, los cuales se iban localizando en base al valor de Rf que se midió directamente en los cromatogramas; y mediante la otra técnica se pudo apreciar en ug/ml el valor exacto de inhibición, con lo cual se logró obtener una idea más clara del valor al cual se inhibieron los compuestos.

4.1 MICRODILUCIÓN EN CALDO DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO Y ACETÁTICO

Tabla 1. CMI de los extractos metanólico y acetato de etilo frente a *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*

EXTRACTOS	HONGOS DERMATOFITOS	
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (28185)	<i>Trichophyton rubrum</i> (28188)
EXTRACTO METANÓLICO	1000 ug/ml	500 ug/ml
EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO	250 ug/ml	250 ug/ml
EXTRACTO HEXÁNICO	Nd	Nd

*Nd: No determinado por problemas de solubilidad

Elaboración: La autora

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de la prueba de CMI realizada a los extractos metanólico y acetato de etilo obtenidos de la especie *Niphogeton dissecta*, los cuales nos indican que el extracto de acetato de etilo presenta una mayor actividad.

Los resultados mostraron que el extracto de acetato de etilo de *Niphogeton dissecta* tiene actividad antifúngica con concentraciones mínimas inhibitorias menores frente a los dos dermatofitos evaluados a diferencia del extracto metanólico el cual llegó a obtener una CMI mayor; motivo por el cual se lo eligió éste extracto para llevar a cabo la cromatografía en columna.

4.2 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

En la figura 5 a través de la cromatografía de capa fina se pueden apreciar los compuestos presentes en los extractos obtenidos.

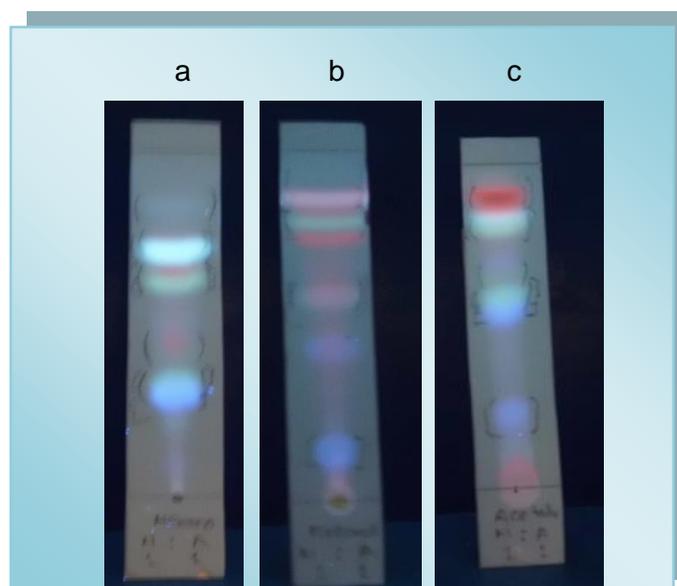


Figura 5 Cromatografía de capa fina (TLC) con luz UV 360 nm de los extractos: (a) hexánico, (b) metanólico y (c) acetato de etilo

Elaboración: La autora

4.3 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Se obtuvieron 150 fracciones en total. Las primeras 16 fracciones fueron las que se utilizaron para llevar a cabo los métodos de susceptibilidad antifúngica debido a que presentaron mayor grado de pureza y se obtuvieron en mayor proporción así como menor cantidad de metabolitos presentes en las fracciones. En la tabla 2 se exponen los disolventes empleados y las proporciones a las cuales las fracciones fueron eluidas.

Tabla 2. Disolventes y proporciones a las cuales las fracciones fueron eluidas

FRACCIONES	SOLVENTES	PROPORCIÓN
1-2	Hexano	100
3-6	Hex-AcOEt	99:1
7	Hex- AcOEt	98:2
8	Hex- AcOEt	93:7
9	Hex- AcOEt	92:8
10	Hex- AcOEt	90:10
11	Hex- AcOEt	90:10
12	Hex- AcOEt	90:10
13	Hex- AcOEt	88:12
14	Hex- AcOEt	88:12
15	Hex- AcOEt	88:12
16	Hex- AcOEt	86:14

Elaboración: La autora

4.3.1 Purificación o Lavado de las Fracciones

Tabla 3. Lavado de fracciones para la separación de compuestos según el grado de solubilidad

FRACCIONES	LAVADO (SOLVENTES)
10	Hexano
11	Hexano
12	Hexano
13*	Hexano, Acetato de Etilo
14*	Hexano, Acetato de Etilo
15*	Hexano, Metanol
16*	Hexano, Metanol

*En el caso de las fracciones 13, 14, 15 y 16 se utilizó más de un disolvente para su lavado debido a que no se logró gran purificación con el primer disolvente empleado; siendo en todos los casos el hexano.

Elaboración: La autora

En la tabla 3 se indican las fracciones a las cuales se les llevó a cabo el lavado empleando disolventes para la separación de los compuestos según el grado de solubilidad. En los compuestos que se utilizó más de un disolvente fue más difícil su separación. En el caso de la fracción 13 por su complicado proceso de purificación se le realizó una microcolumna. (Ver anexo 1)

Cuando se quiere conocer la composición de una sustancia orgánica es necesario separar o aislar cada una de las sustancias componentes de la mezcla para su posterior análisis.⁴⁰

⁴⁰García, A. Del Castillo, B. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. 1a edición. Ed. Limusa. México, 1988, pág 252.

4.3.2 Características Físico-químicas de las fracciones

Tabla 4. Características Físico-Químicas de las fracciones empleadas.

FRACCIONES EMPLEADAS	APARIENCIA	COLOR	CANT. OBT (g)	Rf	FASE MÓVIL
1	Polvo	Blanquecino	0,3799	0.9	Hex (100)
3	Aceite	Amarillo Verdoso	0,0429	0.9	Hex-AcOEt (99:1)
7	Aceitosa	Verde Tenue	0,034	0.8	Hex-AcOEt (98:2)
8	Grasosa	Verde Tenue	0,075	0.8 y 0.9	Hex-AcOEt (93:7)
9	Aceite	Amarillo	0,1369	0.8	Hex-AcOEt (92:8)
10	Granulosa	Amarillo Blanquecino	0,0285	0.9	Hex-AcOEt (90:10)
11	Polvo	Blanco	0,0317	0.9	Hex-AcOEt (90:10)
12	Polvo	Blanco	0,0961	0.6;0.8;0.9	Hex-AcOEt (90:10)
13	Cristalina	Blanco Transparente	0,0714	0.5;0.6;0.7;0.8; 0.9	Hex-AcOEt (88:12)
14	Viscosa	Amarillo Café	0,0979	0.5;0.6;0.7;0.8; 0.9	Hex-AcOEt (88:12)
15	Polvo	Blanquecino	0,4499	0.4;0.5;0.7;0.8; 0.9	Hex-AcOEt (88:12)
16	Polvo	Amarillo Tenue	0,0821	0.4;0.5;0.6;0.7; 0.8;0.9	Hex-AcOEt (86:14)

Elaboración: La autora

La tabla 4 expone las fracciones que se utilizaron para llevar a cabo los métodos de susceptibilidad antifúngica, señalando las características físicas de cada una, como apariencia, color y cantidad obtenida, importantes como referencia para su análisis, así como el valor de Rf de cada uno de los compuestos presentes en las fracciones de igual manera la fase móvil y proporción empleada.

4.4 PUNTO DE FUSIÓN: COMPUESTOS OBTENIDOS

Tabla 5. Punto de fusión de los compuestos obtenidos de las fracciones 11 y 13.

COMPUESTOS	PUNTO DE FUSIÓN
11	74-75
13 (Ff3)	90-91

Elaboración: La autora

En la tabla 5 se puede ver el punto de fusión de los compuestos que se obtuvieron de las fracciones 11 y 13 previo a su lavado; a la fracción 13 a demás se le realizó una microcolumna debido a su difícil purificación. Los dos compuestos se presentaron en estado sólido y de acuerdo a De la Cruz, A (2004)⁴¹ un sólido puro se funde a una temperatura exacta y precisa, en un corto rango de temperatura (aprox. 2°C); con lo que se puede afirmar que el compuesto 11 y 13 resultaron con un grado de pureza elevado, cabe recalcar que estos compuestos en la TLC se veían de manera limpia presentando una sola mancha; no hubiera sido este el caso si estos no se fundían en un corto rango de temperatura, el mismo autor menciona que el punto de fusión es muy sensible a la presencia de impurezas, que aún en pequeñas cantidades puede causar que la fusión ocurra en un intervalo de temperatura de varios grados centígrados, generalmente a una temperatura inferior al punto de fusión de la sustancia pura. El rango de temperatura de fusión de un sólido es, entonces, una herramienta útil para establecer la pureza de las sustancias.

Por otro lado Baum, S (2000)⁴² menciona que el punto de fusión de cualquier sustancia es la temperatura a la cual las fases sólida y líquida de aquella sustancia coexisten en equilibrio.

⁴¹De la Cruz, A. Química Orgánica vivencial. Ed. Mc Graw-Hill. México, 2004

⁴²Baum, S. Introducción a la Química Orgánica y Biológica. Ed. Editorial Continental, S.A., México, 2000

4.5 BIOAUTOGRAMAS

Para Symonds, N (1972) y Verástegui, M (1998)⁴³⁴⁴ la técnica de bioautografía, puede detectar concentraciones mínimas del compuesto responsable de la actividad biológica y se observa a simple vista la zona de inhibición.

Realizadas las pruebas de bioautografía con las fracciones; 8 de ellas resultaron activas frente a los dos hongos dermatofitos, las mismas que se indican a continuación en la siguiente tabla

Tabla 6. Fracciones que resultaron activas frente a los dos dermatofitos.

Fracciones Activas	8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16
---------------------------	-------------------------------------

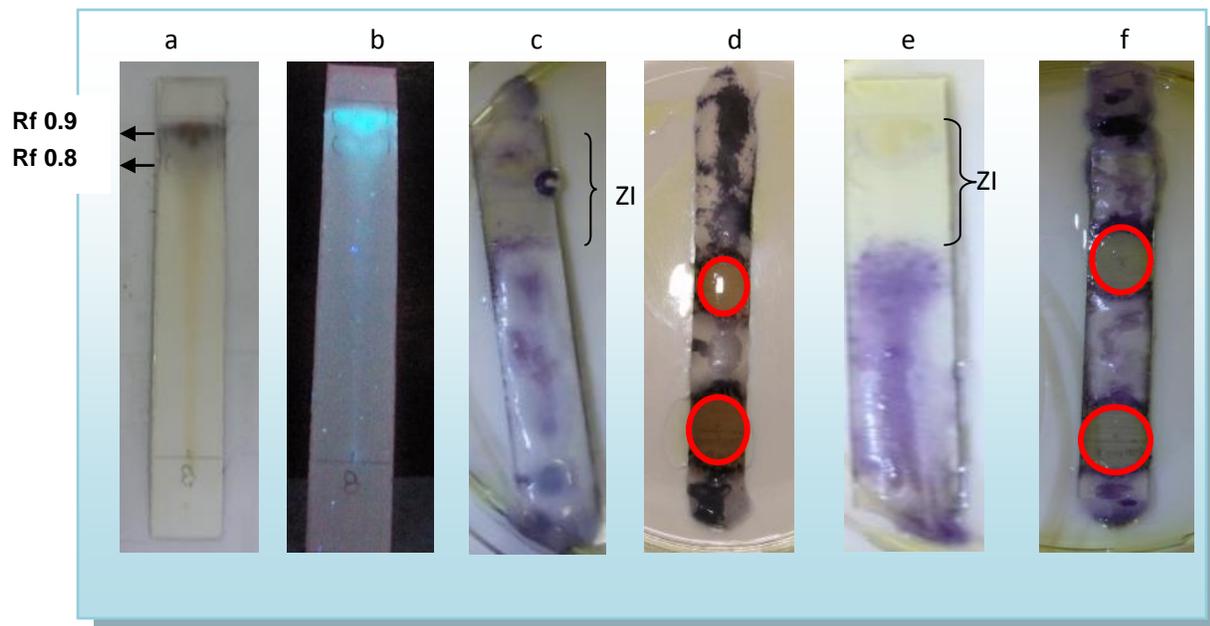
Elaboración: La autora

4.5.1 Bioautograma Fracción Ocho

Se determinó la actividad antifúngica de ésta fracción, frente a los hongos dermatofitos: *T. mentagrophytes*, y *T. rubrum*. Los resultados indicaron zonas de inhibición alrededor de los compuestos que presentaron un Rf de 0.8 y 0.9 comparados con los controles indicados en la figura 6. Es importante mencionar que la inhibición se dio a un volumen de 10 uL en cada una de las fracciones. Siendo ésta la concentración más alta y la única probada, con la finalidad de discriminar fracciones activas de las no activas.

⁴³Symonds, N. La resistencia bacteriana. C. M. A. Journal. 1972, pp. 105, 587.

⁴⁴Verástegui, M. Bioautografía para detectar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas. Revista Sociedad Química de México. 1998, Vol. 42.



*ZI: Zona de Inhibición

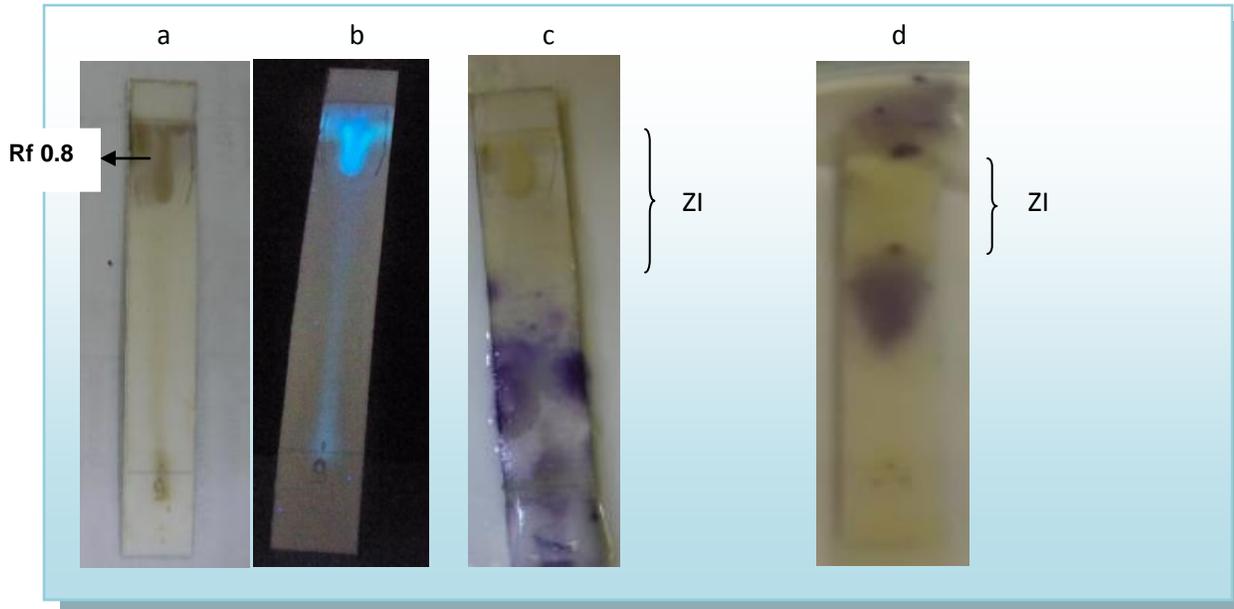
Elaboración: La autora

Figura 6 Bioautograma de la fracción 8: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Control de Itraconazol para *T. mentagrophytes*, e) Bioautograma para *T. rubrum*, f) Control de Itraconazol para *T. rubrum*

Como control positivo para los dos microorganismos evaluados se utilizó itraconazol que es un antifúngico triazólico muy utilizado en el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por hongos. Las zonas de inhibición se muestran en la figura 6. Cabe recalcar que estos fueron utilizados para todas las fracciones empleadas.

4.5.2 Bioautograma Fracción Nueve

Se evaluó la actividad antifúngica de la fracción 9, frente a los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes*, y *T. rubrum*. El resultado nos indicó actividad de la fracción mediante la visualización de una zona de inhibición alrededor del compuesto que presentó un Rf de 0.8 comparado con los controles indicados en la figura 7.



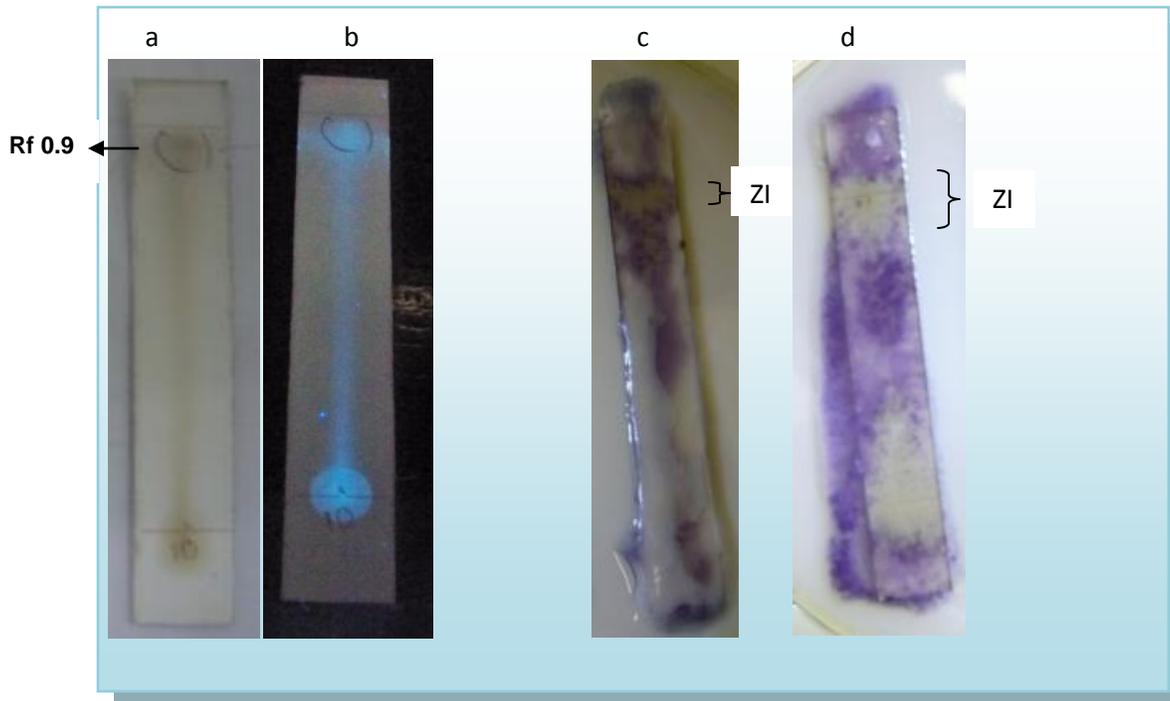
*ZI: Zona de Inhibición

Elaboración: La autora

Figura 7 Bioautograma de la fracción 9: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum*

4.5.3 Bioautograma Fracción Diez

Se determinó la actividad antifúngica de ésta fracción frente a los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. El resultado obtenido nos indicó la presencia de un compuesto bioactivo, mediante la visualización de una zona de inhibición alrededor de este compuesto el cual mide un Rf 0.9 comparado con los controles indicados en la figura 8.



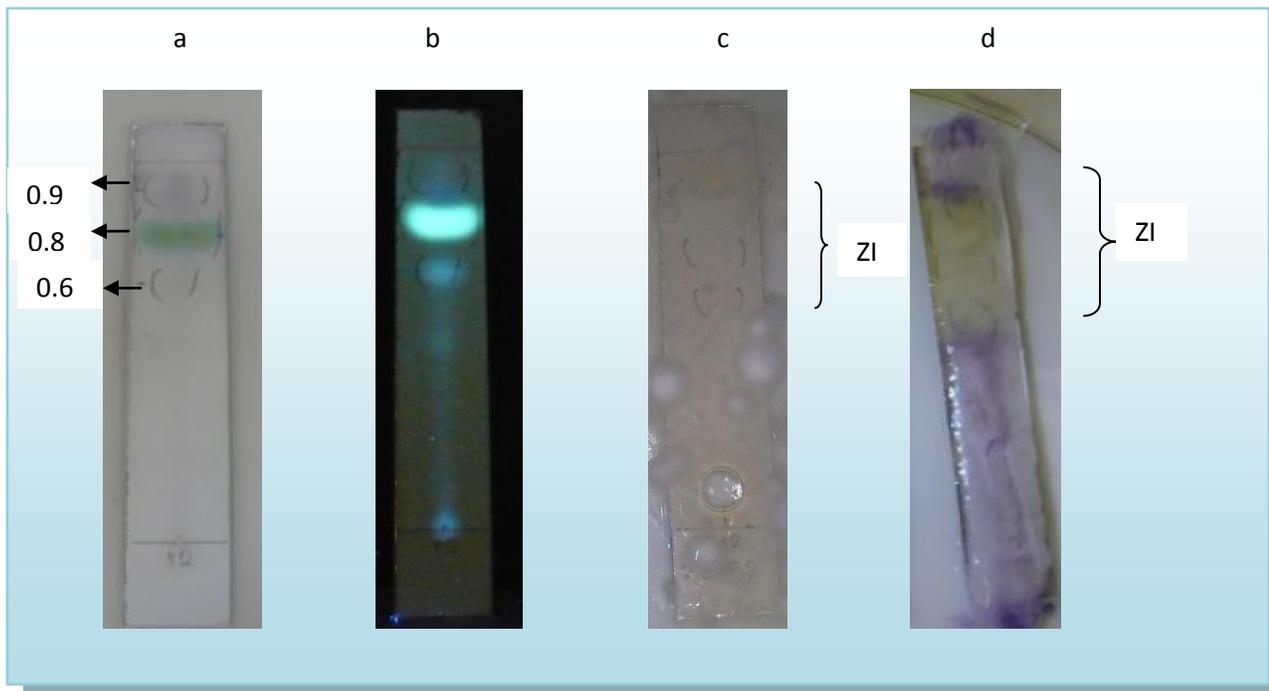
*ZI: Zona de Inhibición

Elaboración: La autora

Figura 8 Bioautograma de la fracción 10: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum*

4.5.4 Bioautograma Fracción Doce

Se determinó la actividad antifúngica de ésta fracción, frente a los hongos dermatofitos: *T. mentagrophytes*, y *T. rubrum*. Los resultados indicaron zonas de inhibición alrededor de los compuestos que presentaron un Rf de 0.6; 0.8; 0.9; comparados con los controles indicados en la figura 9.



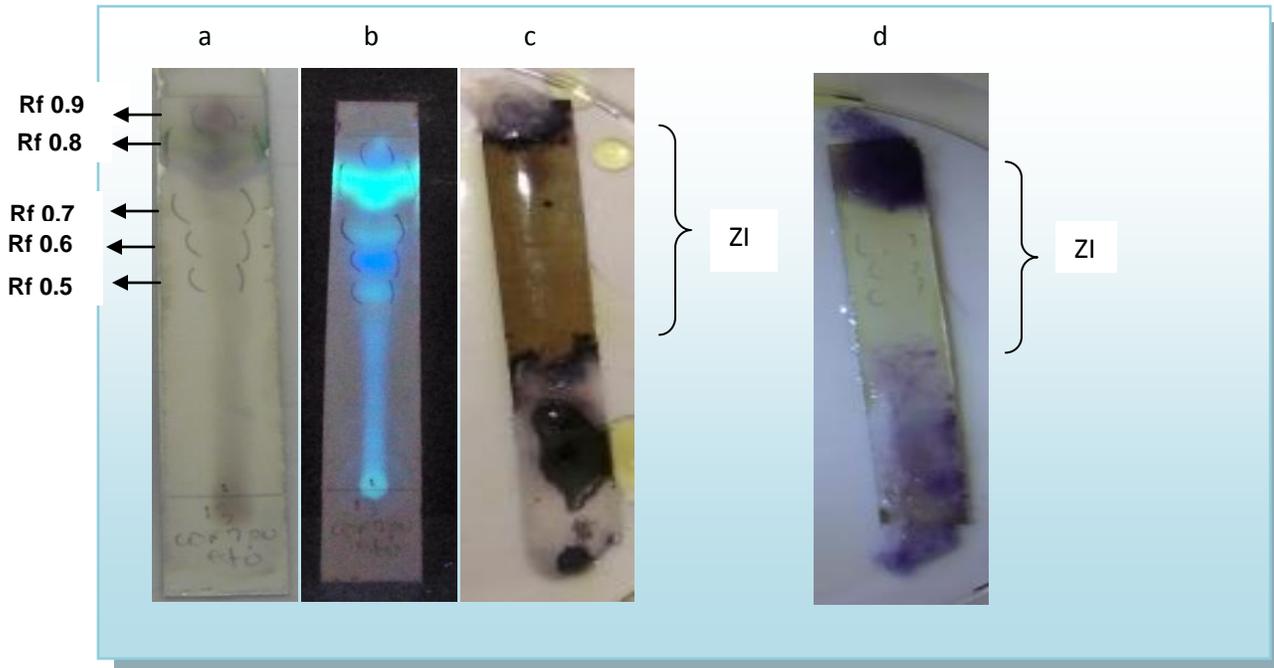
*ZI: Zona de Inhibición

Elaboración: La autora

Figura 9 Bioautograma de la fracción 12: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum*

4.5.5 Bioautograma Fracción Trece

Se evaluó la actividad antifúngica de ésta fracción frente a los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de compuestos bioactivos, mediante la visualización de zonas de inhibición alrededor de los compuestos que miden un Rf de 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; comparados con los controles indicados en la figura 10.



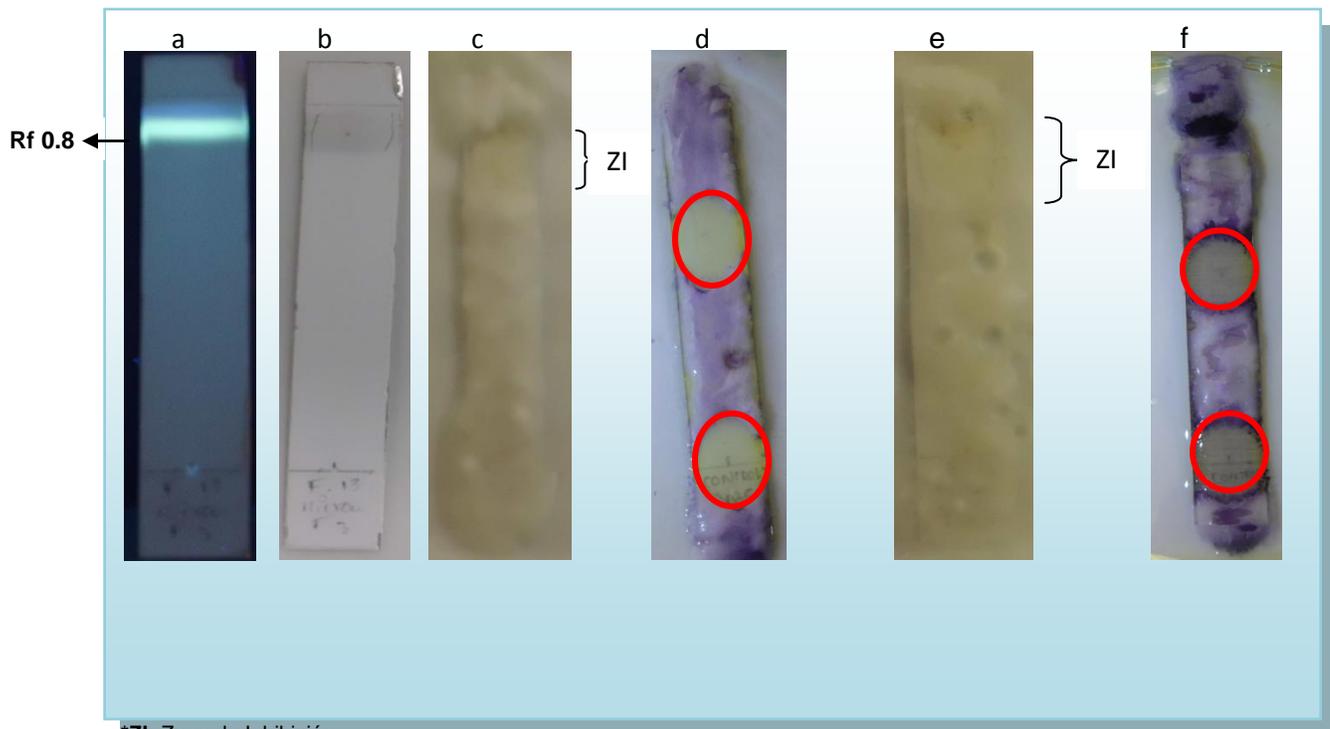
*ZI: Zona de Inhibición

Elaboración: La autora

Figura 10 Bioautograma de la fracción 13: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum*

4.5.5.1 Bioautograma Subfracción de la Fracción Trece (Ff3)

Se evaluó la actividad antifúngica de ésta subfracción obtenida de la microcolumna realizada a la fracción 13, la misma que fue la3 eluída a una fase móvil hexano-acetato de etilo 90-10 (volumen 20 ml); frente a los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de un compuesto bioactivo mediante la visualización de una zona de inhibición alrededor del compuesto que mide un Rf de 0.8 comparado con los controles indicados en la figura 11. Así mismo como control positivo para los dos microorganismos se utilizó Itraconazol



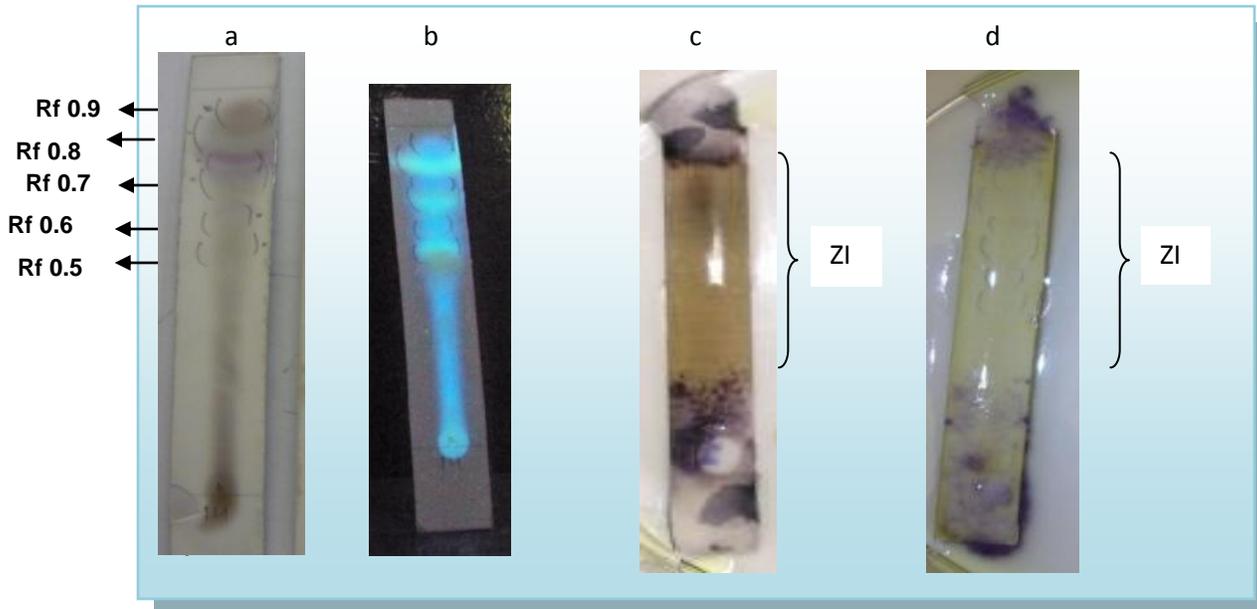
*ZI: Zona de Inhibición

Elaboración: La autora

Figura 11 Bioautograma subfracción de la fracción 13 Ff3: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Control de Itraconazol para *T. mentagrophytes*, e) Bioautograma para *T. rubrum*, f) Control de Itraconazol para *T. rubrum*

4.5.6 Bioautograma Fracción Catorce

Se evaluó la actividad antifúngica de ésta fracción frente a los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de compuestos bioactivos, mediante la visualización de zonas de inhibición alrededor de los compuestos que miden un Rf de 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; comparados con los controles indicados en la figura 12.



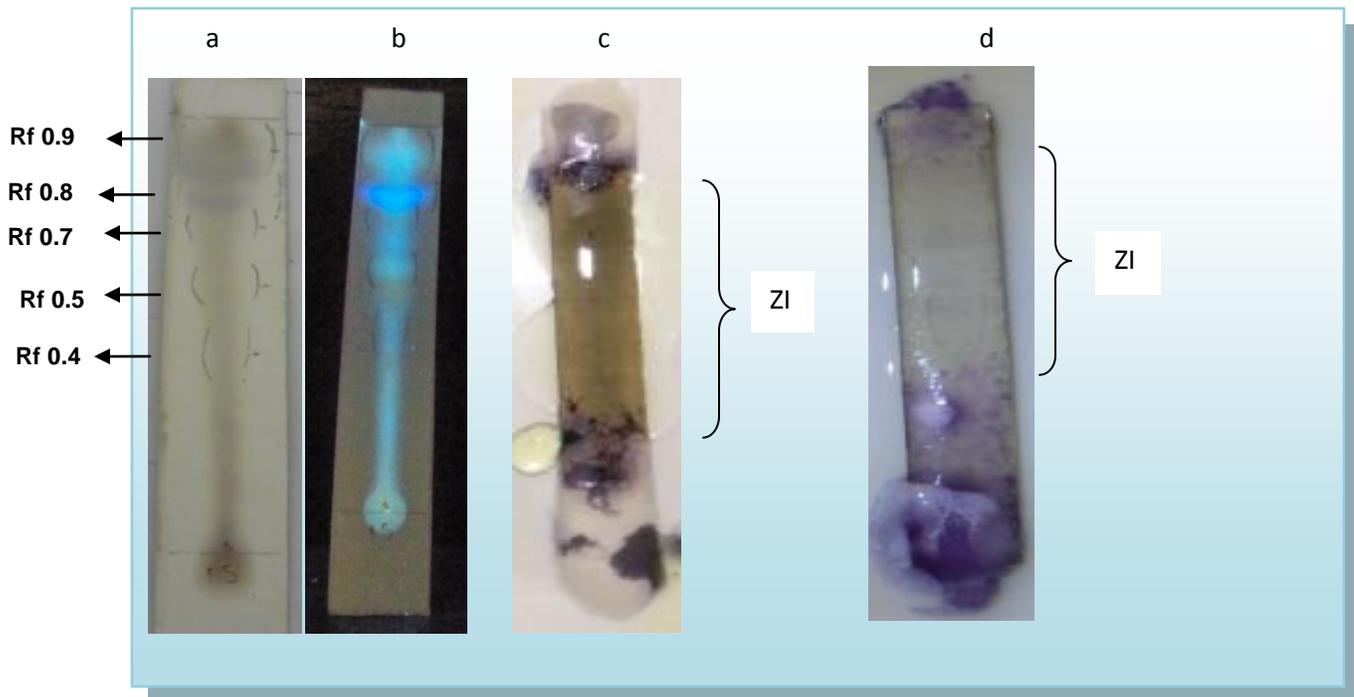
*ZI: Zona de Inhibición

Elaboración: La autora

Figura 12 Bioautograma de la fracción 14: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum*

4.5.7 Bioautograma Fracción Quince

Se evaluó la actividad antifúngica de ésta fracción frente a los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de compuestos bioactivos, mediante la visualización de zonas de inhibición alrededor de los compuestos que miden un Rf de 0.4; 0.5; 0.7; 0.8; 0.9; comparados con los controles indicados en la figura 13.



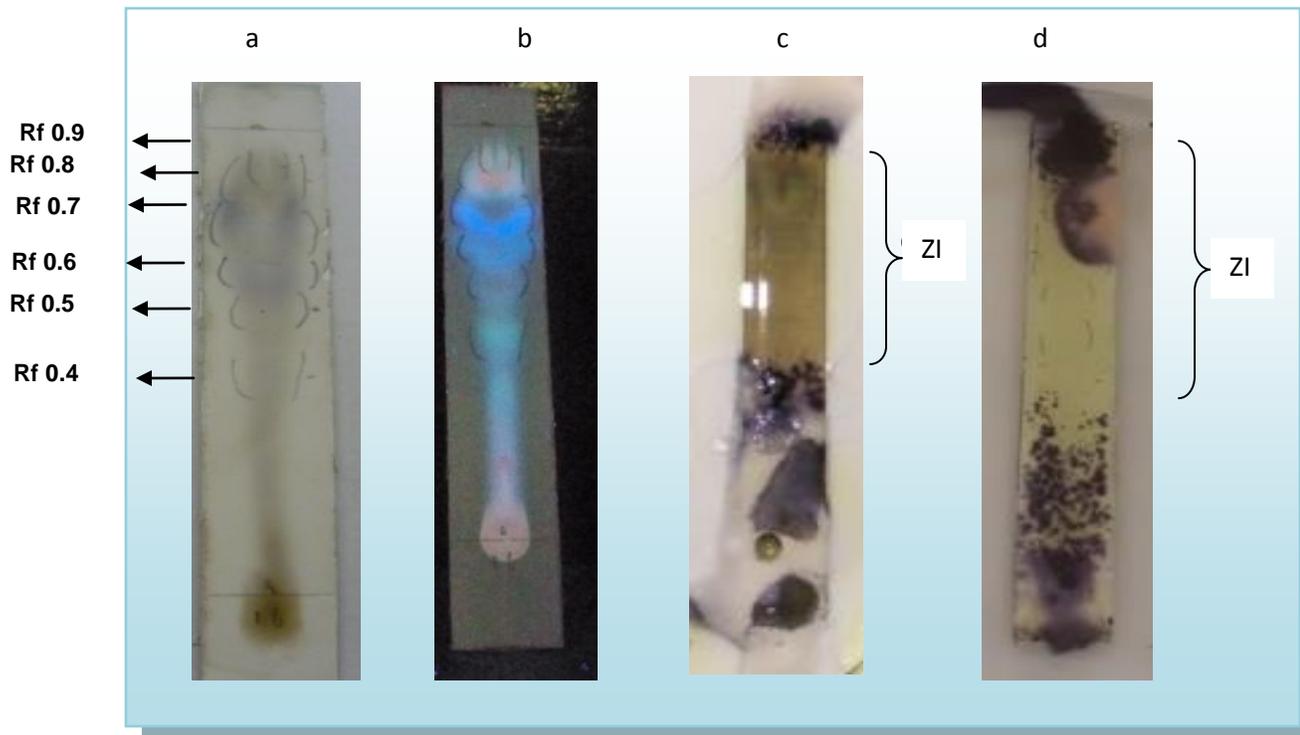
*ZI: Zona de Inhibición

Elaboración: La autora

Figura 13 Bioautograma de la fracción 15: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum*

4.5.8 Bioautograma Fracción Dieciséis

Se evaluó la actividad antifúngica de ésta fracción frente a los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de compuestos bioactivos, mediante la visualización de zonas de inhibición alrededor de los compuestos que miden un Rf de 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; comparados con los controles indicados en la figura 14.



*ZI: Zona de Inhibición

Elaboración: La autora

Figura 14 Bioautograma de la fracción 16: a) Cromatograma revelado con vainilina, b) TLC visualizada a una longitud de onda 360 nm, c) Bioautograma para *T. mentagrophytes*, d) Bioautograma para *T. rubrum*

Según Pasto, D *et al* (1984)⁴⁵ el cromatograma una vez revelado nos presenta mediante manchas el grado de pureza de la muestra o el número de compuestos presentes en ella. Skoog, L (1993)⁴⁶ afirma que los valores de Rf se pueden utilizar con fines comparativos para identificar sustancias al comparar con muestras auténticas de las mismas.

Después de la incubación, los cromatogramas son rociados con sales de tetrazolio (MTT) lo cual permite observar zonas de inhibición claras sobre un fondo coloreado. La técnica nos permite observar zonas de inhibición sobre las placas de sílica gel 60 F254, alrededor del compuesto bioactivo.

⁴⁵Pasto, D. Jonson, C. Determinación de Estructuras Orgánicas. Ed. Reverté. 1984

⁴⁶Skoog, L. Análisis Instrumental. Ed. McGraw – Hill. 1993

4.6 MICRODILUCIÓN EN CALDO DE LAS FRACCIONES

Tabla 7. CMI de las fracciones del extracto acetático que presentaron actividad mediante bioautografía

FRACCIONES EXTRACTO ACETÁTICO (2mg/100 ul DMSO)	HONGOS DERMATOFITOS	
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (28185)	<i>Trichophyton rubrum</i> (28188)
8	250 ug/ml	125 ug/ml
9	250 ug/ml	125 ug/ml
10	500 ug/ml	500 ug/ml
12	500 ug/ml	500 ug/ml
13	500 ug/ml	125 ug/ml
14	250 ug/ml	125 ug/ml
15	1000 ug/ml	1000 ug/ml
16	1000 ug/ml	Mayor 1000 ug/ml

Elaboración: La autora

En la tabla 7 se pueden apreciar la concentración mínima inhibitoria a la cual inhibió cada una de las fracciones citadas. Considerando cada una de las concentraciones obtenidas se puede afirmar que la especie *Niphogeton dissecta* tiene una actividad antifúngica considerable ya que algunas de las fracciones inhiben hasta una concentración de 125 ug/ml frente a *T. rubrum* considerada como concentración de eficiente grado de inhibición según Cimanga, K et al(2001).⁴⁷

La actividad antifúngica de sustancias frente a un microorganismo dado se puede evaluar a través de métodos cualitativos y cuantitativos, dentro de éstos últimos tenemos la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que de acuerdo a Ríos, J et al(2002)⁴⁸ consiste en establecer la menor concentración de un antifúngico, capaz de inhibir visiblemente el crecimiento de un microorganismo. Por otro lado He X (1994)⁴⁹ menciona que la concentración a la cual actúa un antifúngico a determinada CMI se debe a la cantidad de compuestos activos presentes en el extracto.

⁴⁷ Cimanga, K., De Bruyne, T.; Lasure, A.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Claeys, M.; Van den Berghe, D.; Kambu, K.; Tobna, L.; Vlietinck, A. In Vitro biological activities of alkaloids from *Cryptolepis sanguinolenta*. Plant Med. 2001, 62, 22- 27

⁴⁸ Ríos, J.; Recio, M.; Villar, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology. 1988, 23, 127-149.

⁴⁹ He X. An Antifungal compound from *Solanum nigrescens*. J. Ethnopharma. Jap, 1994, 43, 173-177.

V.CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- El extracto de acetato de etilo obtenido de la especie *Niphogeton dissecta* presentó la mayor actividad antifúngica contra los dos hongos dermatofitos seleccionados, confirmando así su efectividad para inhibir el crecimiento fúngico.
- Los hongos dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* resultaron sensibles frente al extracto de acetato de etilo en las primeras fracciones obtenidas, siendo escogidas por su mayor grado de pureza y presencia de menor número de metabolitos.
- Mediante la prueba de bioautografía; ocho de las fracciones empleadas resultaron activas a un volumen de 10uL (2mg/100ul) presentando una clara zona de inhibición alrededor de los compuestos.
- En la prueba de CMI los hongos dermatofitos demostraron ser sensibles a la inhibición de los compuestos hasta 250ug/ml frente a *T. mentagrophytes* y hasta 125ug/ml frente a *T. rubrum*.

VI.RECOMENDACIONES

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar el estudio de la especie *Niphogeton dissecta*, con el fin de poder identificar la estructura química de los compuestos responsables de la inhibición fúngica.
- A partir de plantas medicinales realizar investigaciones similares frente a los microorganismos fúngicos evaluados con el propósito de encontrar nuevos agentes activos.

VII.ANEXOS

VII. ANEXOS

ANEXO 1

MICROCOLUMNA DE LA FRACCIÓN TRECE

Microfraccionamiento

Para llevar a cabo el microfraccionamiento la microcolumna se montó empleando una relación muestra-sílica gel 1:10 (0,0714 gramos de la fracción más 1 gramo de sílica) utilizando los disolventes hexano, acetato de etilo y metanol.

Elución/Subfracciones	Solventes	Proporción	Volumen/ml
1	Hex-AcOEt	95:5	20
2	Hex-AcOEt	95:5	20
3	Hex-AcOEt	90:10	20
4	Hex-AcOEt	80:20	20
5	Hex-AcOEt	80:20	20
6	Hex-AcOEt	80:20	20
7	Hex-AcOEt	80:20	20
8	Hex-AcOEt	80:20	20
9	Hex-AcOEt	70:30	20
10	Hex-AcOEt	60:40	20
11	Hex-AcOEt	50:50	20
12	AcOEt	100	20
13	AcOEt-CH ₃ OH	90:10	20
14	AcOEt-CH ₃ OH	80:20	20
15	AcOEt-CH ₃ OH	80:20	20
16	AcOEt-CH ₃ OH	70:30	20
17	CH ₃ OH	100	20
18	CH ₃ OH	100	20

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
DCM	Diclorometano
C.C	Cromatografía en columna
TLC	Cromatografía de capa fina
U.V	Ultravioleta
Pf	Punto de fusión
Rf	Factor de Retención
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	Sales de tetrazolio
Tm	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Tr	<i>Trichophyton rubrum</i>