



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA
MODALIDAD PRESENCIAL

Aislamiento, caracterización y evaluación antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper pseudochurumayu* (Matico)

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

AUTORA:
Chamba Briceño Diana Janeth

DIRECTOR:
Ing. Ramírez Robles Jorge Yandry

CENTRO UNIVERSITARIO LOJA

2012

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Diana Janeth Chamba Briceño, 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).....

Diana J. Chamba Briceño

CERTIFICACIÓN

Ing.

Silvio Aguilar

DIRECTOR DE TESIS DE GRADO (E)

CERTIFICO:

Haber dirigido la investigación y la elaboración de la tesis: **“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS A PARTIR DE LA ESPECIE *Piper pseudochurumayu* (MATICO)”** la misma que ha sido revisada durante su ejecución, por lo tanto autorizo su presentación.

Loja, Mayo del 2012

f).....

Ing. Silvio Aguilar

DIRECTOR DE TESIS (E)

AUTORÍA

La presentación, procedimientos y conceptos, así como, los resultados y conclusiones vertidos en el presente trabajo de tesis son de responsabilidad absoluta de la autora.

f).....

Diana J. Chamba Briceño

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios por haberme guiado por el camino de la felicidad hasta ahora; en segundo lugar a cada uno de los que son parte de mi familia a mi PADRE Licenciado Ramiro Chamba, mi MADRE, Licenciada Rosa Elena Briceño; a mis hermanos; por siempre haberme dado su fuerza y apoyo, ya que sin su colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura tarea.

Al ingeniero Jorge Ramírez, por sus sabios consejos por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad la cual abre sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

Diana Janeth Chamba Briceño

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ellos que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

CONTENIDO

	Pág.
CESIÓN DE DERECHOS.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
AUTORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
DEDICATORIA.....	V
RESUMEN.....	XI
ARTÍCULO.....	XII
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.....	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. ÁREA DE RECOLECCIÓN.....	12
3.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	13
3.3. PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	13

3.4. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.....	14
3.5. PURIFICACIÓN Y CRISTALIZACIÓN DE COMPUESTOS.....	15
3.6. PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN	15
3.6.1. Punto de fusión.....	15
3.6.2. Solubilidad.....	16
3.6.3. Factor de retención.....	16
3.6.4. Identificación de los compuestos aislados.....	17
3.6.4.1. Resonancia Magnética Nuclear.....	17
3.6.4.2. Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CGMS).....	18
3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA.....	21
3.7.1. Microorganismos de prueba.....	21
3.7.2. Bioautografía en agar overlay.....	21
3.7.3. Microdilución en caldo.....	22
 IV. RESULTADOS Y ANALISIS	
4.1. COMPUESTOS AISLADOS DE LA ESPECIE <i>Piper pseudochurumayu</i>	
4.1.1. Compuesto 1 fracción 21-23.....	26
4.1.2. Compuesto 2 fracción 37-42.....	27
4.2. PRUEBAS ANTIFÚNGICAS.....	31
4.2.1. Concentración mínima inhibitoria.....	31

4.2.2. Bioautografía en agar Overlay.....	32
4.2.2.1. Bioautogramas del compuesto obtenido de las fracciones 37-42.....	33
V. CONCLUSIONES.....	35
VI. RECOMENDACIONES.....	37
VII. ANEXOS.....	39

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación científica de la especie <i>Piper pseudochurumayu</i> ...	6
Tabla 2. Lugar de recolección de la especie vegetal.....	12
Tabla 3. Características de las columnas capilares.....	18
Tabla 4. Medios de cultivo y condiciones de incubación para el CMI con los hongos utilizados.....	23
Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano...	25
Tabla 6. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C	29
Tabla 7. Resultados generales: valores y características obtenidas de los compuestos aislados.....	30
Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a los hongos <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Trichophyton rubrum</i>	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Piper pseudochurumayu</i>	6
Figura 2. Esquema del desarrollo de la investigación.....	11
Figura 3. Mapa del lugar de recolección de la especie vegetal en la Provincia de Zamora Chinchipe.....	12
Figura 4. Obtención del extracto A) Maceración B) Filtración C) Rota evaporación.....	13
Figura 5. Partición líquido-líquido.....	14

Figura 6. Cromatografía en columna.....	15
Figura 7. Fotografía del equipo de fusión Fisher-Johns- meltingpoint	
Apparatus serial40-22.....	16
Figura 8. Medida de los Rf en la placa de silica gel 60 F ₂₅₄	16
Figura 9. Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5	
compuesto 21-23.....	19
Figura 10. Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5	
compuesto 37-42.....	20
Figura 11. TLC de la fracción 21-23 luego de ser revelada con ácido	
sulfúrico y vainillina.....	27
Figura 12. TLC de la fracción 37-42 luego de ser revelada con Sulfato	
cérico.....	28
Figura 13. Estructura química del lignano obtenida mediante RMN.....	28
Figura 14. A) Cromatograma revelado con sulfato cérico B) Bioautogramas	
para <i>T.mentagrophytes</i> C) Control de itraconazol.....	32
Figura 15. A) Cromatograma revelado con sulfato cérico B) Bioautogramas	
para <i>T.rubrum</i> B) Control de itraconazol	33

RESUMEN

En el presente trabajo fue analizada mediante un estudio fitoquímico la planta *Piper pseudochurumayu* (matico), teniendo como objetivo principal el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios con actividad biológica. El aislamiento de dichos compuestos se realizó a partir del extracto de diclorometano mediante cromatografía en columna, para ello se utilizó diversos disolventes en proporciones con polaridad ascendente, logrando aislar dos metabolitos secundarios.

La identificación de los compuestos aislados fue obtenida mediante técnicas espectroscópicas de RMN, y de CG-MS llegando a identificar a un 3, 4-dimetil -2,5-bis(3,4,5-trimethoxifenil) tetrahidrofurano(lignano) y a un stigmasta-5,22-dien-3-ol (triterpeno).

Las pruebas antifúngicas realizadas al lignano fueron determinadas contra dos cepas de hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) y *Trichophyton rubrum* (Tr) sin embargo no se logró evidenciar actividad alguna.



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**"ISOLATION, CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF
SECONDARY METABOLITES ISOLATED FROM OF THE
Piper pseudochurumayu SPECIE (Matico)"**

Chamba Diana¹, Ramirez Jorge²

e-mail: djchamba@utpl.edu.ec

¹ Biochemistry and Pharmacy School/Universidad Técnica Particular de Loja,
San Cayetano Alto s/n, Postal Code 11-01-608, Loja, Ecuador

² Institute of Applied Chemistry/Universidad Técnica Particular de Loja,
San Cayetano Alto s/n, Postal Code 11-01-608, Loja, Ecuador
e-mail: jyramirez@utpl.edu.ec

ABSTRACT

The search for secondary metabolites, of biological, clinical or pharmaceutical interest from *Piper pseudochurumayu* led us to the isolation and identification of a lignan and a triterpene. The structures of the metabolites were determined based on NMR spectroscopic techniques and GC-MS. Biological activity tests performed to lignan found that the compound does not possess antifungal activity.

KEYWORDS: *Piper pseudochurumayu*, *Piperaceae*, secondary metabolites, antifungal activity

INTRODUCTION

The genus *Piper* belongs to the family Piperaceae and composed of trees, shrubs, and herbs¹. They have alternate leaves, opposite or whorled while its flowers are grouped in inflorescences spade type.² This genus contains over 700 species that are distributed in tropical and subtropical regions, many of these species have application in traditional medicine as an antiseptic and anti-

infectives.³ Their pharmacological properties have been extensively studied and some are used for health primary care.⁴ In fact phytochemical and biological studies conducted in this family have been motivated by numerous ethnobotanical applications this leads to the isolation of a wide variety of secondary metabolites, highlighting the lignans, neolignans, terpenoids, kavapirons, piperolids, chalcones, flavones and



UTPL

**UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA**

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

flavanones, which have a wide range of biological activity.⁵⁻⁶

Studies of the genus *Piper* at the Institute of Applied Chemistry (IQA) of the Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) have been isolated secondary metabolites, which have shown antifungal activity.

Piper pseudochurumayu, specie covered by this study is a shrub of 1.3 - 4 m tall with erect inflorescence, can be found in the forests and tropical montane Loja, Zamora Chinchipe and Morona Santiago⁷ so far not been found reports about its chemical composition, however, is widely used in traditional medicine as a healing, anti-inflammatory and antiseptic wounds.⁸

That is why due to such traditional background and references of this family; this research focuses on the isolation, characterization and antifungal activity of the compounds of *Piper pseudochurumayu* specie and so determine their properties.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The plant was collected in the province of Zamora Chinchipe sector Numbani, at an altitude of 1000 msm. Coordinates 04°05'S 078°57'W

Extraction and Isolation

The *Piper pseudochurumayu* leaves were dried at 37 °C for 8 days, and weighed 200g of the same. The plant sample was subjected to a process of maceration using methanol as an extraction solvent, vacuum filtered and then concentrated using the rotating evaporator moderate temperature of 30-35° C, obtaining a crude extract of 18.9 g which

was dissolved in a mix methanol / water which it is made partition with dichloromethane. The dichloromethane extract was subjected to chromatographic separation, using as a separation technique, column chromatography on silica gel normal phase, using a solvent gradient. The eluted fractions were monitored by thin layer chromatography (TLC). Each isolated compound was characterized using solubility tests, to determine the structures of the isolated metabolites were taken into consider the following physical constants and spectroscopic methods: retention factor (Rf), melting point (mp), UV, and Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

NMR spectra were obtained on a Varian Operating at 400MHz for ¹H and ¹³C 100 Mz to Serial No. 21953, using CDCl₃ and DMSO at 25 °C.

The identification of compounds isolated from *Piper pseudochurumayu* specie by gas chromatography coupled to mass spectroscopy (CGMS) was done using agas chromatograph Agilent, the respective injections were performed in the capillary column DB-5MS

Determination of antifungal activity

For the evaluation of antifungal susceptibility were used two sporulated fungi: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC ® 28185 and ATCC ® 28188 *Trichophyton rubrum*.

Broth microdilution assay

For this assay, was prepared a solution of 20mg/mL in 1 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) of the compound of interest. This solution was used in culture plates of 96 wells, in which is placed 180µL of broth from the first well,



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

was added 20 μ L of test compound solution was serial dilutions made taking 100 μ L the first well and diluted with 100 μ L of the well following this procedure continued until 8 consecutive dilutions. Finally the plates were incubated at 28 ° C by monitoring the growth to 96 hours.

Bioautography assay

To carry out Bioautography was prepared, a solution of 2 mg of the compound per 100 μ L of solvent (dichloromethane). For cultivation was took aliquots of 10 μ L of the prepared sample with the compound, which was at a concentration of 2mg/100 μ L of dichloromethane.

Starting from cryogenic stocks, was took 10ul of the fungal strain *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*, and were inoculated into the medium that contained 2.5 mL of Emmons medium. Then it took 1 mL of medium inoculated with the fungus and was seeded on the plates. Subsequently incubated at 28 °C for 24-48 hours.

RESULTS AND DISCUSSION

From the chromatography column were obtained 146fractions, of which was crystallization in the fractions 21-23 and 37 - 42.

Isolated compounds

The 21-23 compound was obtained in the fractions eluted with hexane-acetate in ratio 90-10, and its was weight 60mg.

Physical characteristics:crystal white frost-like, soluble as acetate, methanol and dichloromethane, with a melting point of 132-137 ° C and a retention factor (Rf) of 0.88.

Interpretation of the spectrum of NMR and GC-MS of the compound 21-23

The spectroscopic data obtained suggest that the isolated compound is a triterpene (stigmasta-5,22-dien-3-ol), however the amount of the compound was not enough for testing antifungal , so that could not determine whether the compounds in question had such activity.

Compound 37-42 was obtained in the fractions eluted with hexane-acetate in ratio 80:20 and its weight was 1g

Physical characteristics: needle-like

crystals whitish, soluble as acetate, methanol and dichloromethane, with a melting point of 121-122 ° C and a retention factor (Rf) of 0.77.

Interpretation of the spectrum of NMR and GC-MSof the compound 37-42

The spectroscopic data suggest that probably the isolated compound is a 3,4-dimetil -2,5-bis(3,4,5-trimethoxifenil) tetrahidrofurano (lignan); however stereo chemical studies are needed to determine which type it belongs. Antifungal Tests were performed as according (A. Ferrer 2002)¹⁰ Lignans have numerous biological properties including antimitosis, fungicide and an antioxidant. The structure of the compound in question is shown below. (**Fig 1**)

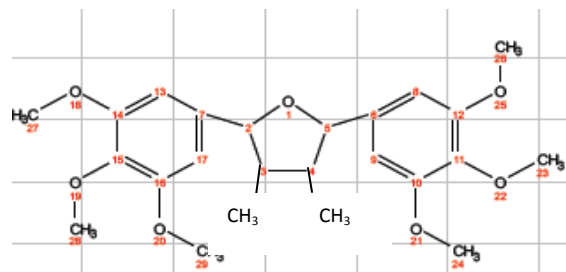


Figure 1. Chemical structure of lignan obtained by NMR



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Antifungal tests

Minimum inhibitory concentration (MIC)

Table shows the MIC values obtained from the compound 37-42, as you can see the results reflected a MIC of > 1000 ug / ml. According to (Holetz et al, 2002)¹¹, a MIC > 1000 ug / ml was classified as a weak or no activity, so that we can indicate that the isolate compound has not activity at the concentration mentioned.

Minimum Inhibitory Concentration (ug / mL)		
Compound	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 28185	<i>Trichophyton rubrum</i> 28188
Fraction 37-42	>1000ug/ml	>1000ug/ml

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against fungi *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*.

Bioautograms

Fraction of the compound Bioautograms 37-42

Antifungal activity results are expressed semi quantitatively. According to (Symonds, N 1972 and Verastegui, M 1998)¹² ¹³ this technique can detect minimum concentrations of the compound responsible for biological activity observed with the naked eye the area inhibition, for this reason was considered as an activity to the presence of inhibition zones and inactive in the absence of them.

The results indicate that the compound in question has no activity since as shown in Figures 2 and 3 there is no zone of inhibition around the compound.

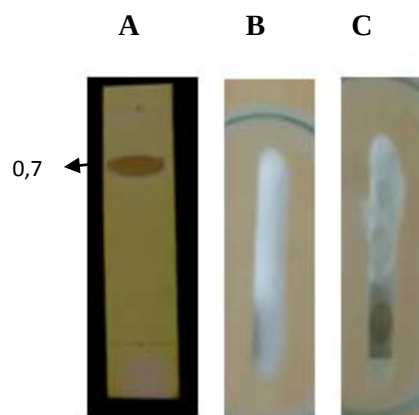


Figure 2. A) chromatogram revealed serum sulfate B) Bioautograms *T. mentagrophytes* C) Control of itraconazole

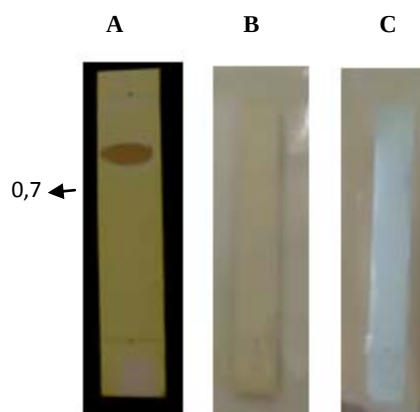


Figure 3. A) chromatogram revealed serum sulfate B) Bioautograms *T. rubrum* C) Control of itraconazole

CONCLUSIONS

By column chromatography of the pure extract of the species was isolated two compounds that were crystallized, the first in



UTPL

**UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA**

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

the fractions 21-23 in ratio 90-10 (Hex-AcOEt), and the other in fractions 37-42 ratio 80 -20 (Hex-AcOEt).

By nuclear magnetic resonance spectroscopy and by gas chromatography coupled to mass spectroscopy (CGMS) we identified the two compounds, the first was of a triterpene and the second corresponded to a lignan.

The MIC for fungi determined that the compound of the fraction 37-42 showed a MIC > 1000 ug / mL, indicating that the compound has no antifungal activity.

The Bioautography assay made to the compound of the fraction 37-42 against fungi *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* resulted in the absence of inhibition zones around the compound, which allowed us to confirm that the compound in question has no antifungal activity.

RECOMMENDATIONS

continue the study of the species *Piper pseudochurumayu* by the isolation and identification of the other fractions that not crystallized to detect which are the components that give the healing properties of the plant.

Perform other tests on the compounds identified in order to determine which properties have (biological, antimutagenic, antibacterial and antioxidant properties.)

Conducting similar research, mainly in the ethnobotanical field in different regions of the country in search of new anti fungal compounds

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Institute of Applied Chemistry of the Universidad Técnica Particular de Loja for giving me the academic support.

REFERENCES

1. **PEREZ, A. E.** 2000 "Plantas útiles de Colombia". Quinta edición. Cargrafics S.A. Colombia.
2. **Ulloa Carmen and Moller Jorgensen Piter** 2009 Árboles y Arbustos de los Andes Ecuatorianos. Disponible en: <http://d=125531>
3. **Flores E., Jiménez A., Ravelo A., Bourdy G., Giménez A.** 2000. Estudio Fitoquímica de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida in vitro. Biofarbo, VIII: 9-16.
4. **Mesa A., Montiel J., Martínez C., Zapata N., Bueno J., Stashenko E** 2007. Actividad in vitro anticancerígena y anti-aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia piperaceae. Rev. Scientia et Technica Año XII.
5. **Navarro G., Fabiola R.** 2002. Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R. et P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. Tesis (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, p 104.
6. **De la Torre, L; Navarrete, H; Muriel, P; Macía, M; Balsle, H** 2008. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

- &Herbario AAU. Quito & Aarhus, p.p. 120-122
7. **SHARAPIN, N.**, En 2000. "*Fundamentos de Tecnología de Productos, Fitoterapéuticos*". Editor Pinzon R. Publicacion del convenio Andres Bello (CAB) y el programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia (CYTED), Santafe de Bogota, D. C., Colombia Leishmanicida in vitro. Biofarbo, VIII: 9-16.
 8. **Tebbs, M. C.** 1998. Revision of Piper (Piperaceae) in the New World 2. The taxonomy of Piper section . (Nat. Hist.), Bot. 20(2): 193–198.
 9. **Ferrer A.** 2002. Biosintesis de isoprenoides en plantas: caracterización molecular de los genes de la HMG-CoA reductasa I Reunión de biología molecular de plantas. Salamanca.109-116.
 10. **Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP.** Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:1027–31
 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.

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

I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. Fin del Proyecto

La presente investigación pretende contribuir al estudio fitoquímico de la especie *Piper pseudochurumayu* mediante el aislamiento de metabolitos secundarios, con el propósito de encontrar compuestos bioactivos los cuales podrán ser empleados como base en la elaboración de fármacos u otros productos, así como también se espera que dicha información generada pueda ser aprovechada por diferentes sectores como pueden ser académicos y población en general.

1.2. Propósito del Proyecto

Este estudio determinará la presencia de metabolitos secundarios con actividad antifúngica ya que algunas investigaciones previas la citan a la familia *piperaceae* con un gran poder antifúngico.

Los estudios en bioactividad determinaran el poder antifúngico de los metabolitos aislados contra dos especies de hongos *Tricophyton mentagrophytes* y *Tricophyton rubrum*.

1.3. Componentes del Proyecto

- Aislar los metabolitos secundarios mediante las técnicas cromatográficas: cromatografía en columna y cromatografía de capa fina (TLC).
- Caracterizar los compuestos aislados presentes en la especie.
- Determinar la actividad antifúngica de los metabolitos aislados a través del empleo de las técnicas de Bioautografía en agar overlay y Concentración Mínima Inhibitoria. (CMI)

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. INTRODUCCIÓN

La utilización de plantas, a nivel mundial, constituye la aplicación primaria en la atención de la salud por sus propiedades farmacológicas, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos para el tratamiento de diversas enfermedades¹. De hecho ha sido ampliamente reconocido que las plantas constituyen un inestimable reservorio de metabolitos secundarios biológicamente activos en el control de diversas enfermedades y las provocadas por hongos en particular².

Los efectos secundarios adversos de algunas drogas, la resistencia frecuentemente inducida y los elevados costos en el tratamiento³, 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 fúngicas⁴.

Ecuador cuenta con centenares de plantas medicinales, de hecho existen alrededor de 3118 especies pertenecientes a 206 familias usadas con fines medicinales⁵, esto debido a su alta diversidad biológica por unidad de superficie la cual debe principalmente a la Cordillera de los Andes, la posición geográfica, las

¹Cos P., Maes L., Vlietinck A., Pieters L., 2008. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection – an update (1998 – 2007). *Planta Med.* 2008: 1323-1337.

²Grayer R., Harborne J. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants. 1982-1993. *Phytochemistry* 37(1): 19-35.

³Davicino R., M.A. Mattar, Y.A. Casali, S.G. Correa, E.M. Pettenati & B. Micalizzi. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. Perú. biol.* 14(2): 247-251.

⁴Dabur R., H. Singh, A.K. Chhillar, M. Ali & G.L. Sharma. 2004. Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 75(3-4): 389-391.

⁵De la Torre, L; Navarrete, H; Muriel, P; Macía, M; Balsle, H (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus, p.p. 105–114.

corrientes marinas, el endemismo, y las Islas Galápagos entre las más mencionadas⁶. Constituyendo de esta manera una fuente natural importante para la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacológicas.

La familia *Piperaceae* está comprendida por 10 géneros, siendo las más representativas el género *Piper* y *Peperomia*. El género *Piper* tiene más de 700 especies que están distribuidas en regiones tropicales y subtropicales; muchas de estas especies tienen aplicación en la medicina tradicional como antisépticos y anti-infecciosos⁷, sus propiedades farmacológicas han sido ampliamente estudiadas y algunas de ellas utilizadas para la atención primaria en la salud⁸, de hecho los estudios fitoquímicos y biológicos realizados en esta familia han sido motivados por sus numerosas aplicaciones etnobotánicas.

Entre las especies más estudiadas están *Piper nigrum* (pimienta negra), *Piper methysticum* (Kava), *Piper hispidum* (matico), *Pipertuberculatum* (matico), entre otras^{9,10}.

Piper pseudochurumayu especie objeto de este estudio es un arbusto de 1,3 - 4 m de altura, con inflorecencias erguidas, se puede encontrar, en los boques montanos y tropicales de las provincias de Loja, Zamora Chinchipe y Morona Santiago¹¹.

⁶León L., Cueva P., Aguirre Z, Kvist L.2006. Floristic composition, structure, endemic and ethnobotany in the native forest "El Colorado", in Puyango, Province of Loja.

⁷Flores E., Jiménez A., Ravelo A., Bourdy G., Giménez A. 2000. Estudio Fitoquímica de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida in vitro. Biofarbo, VIII: 9-16.

⁸Mesa A., Montiel J., Martínez C., Zapata N., Bueno J., Stashenko E. 2007. Actividad in vitro anticandida y antiaspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia *piperaceae*. Rev. Scientia et Technica Año XIII, Nº 33: 247-249.

⁹Molina J., García A.2001. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. Avance y Perspectiva, 20: 377-387.

¹⁰Delgado W., Cuca L. 2007. Chemical composition of esencial oil from fruits of *piper hispidum* Kunth. Revista Productos Naturales, 1(1):5-8

¹¹Tebbs, M. C. 1998. Revision of *Piper* (*Piperaceae*) in the New World 2.The taxonomy of *Piper* section. (Nat. Hist.), Bot. 20(2): 193–198.



Figura 1. *Piper pseudochurumayu*
Fuente: Herbario "PPN-UTPL"

Tabla 1. Clasificación científica de la especie *Piper Pseudochurumayu*

División:	Magnolioa
Clase:	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	Piper
Especie	<i>Piper</i> <i>Pseudochurumayu</i>

Fuente: Tebbs, M. C. 1998. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 2. The taxonomy of *Piper* section. (Nat. Hist.). Bot. 20(2): 193–198.

Hasta el momento no se han encontrado reportes acerca de su composición química; no obstante, es ampliamente empleada en medicina tradicional para tratar afecciones respiratorias, luxaciones, trastornos digestivos, malaria, antiinflamatorio, diarreas sanguinolentas, etc.¹².

¹²Robayo, D. y Y. Rodríguez. 2006. Determinación de la actividad alelopática de extractos de *Swinqlia glutinosa* Murray y *Piperaduncum* L., sobre germinación de semillas de arvenses. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cundinamarca, Fusagasuga. 84 p.

Es por ello que debido a tales antecedentes y referencias tradicionales de esta familia, la presente investigación se enfoca en el aislamiento de los metabolitos secundarios de la especie *Piper pseudochurumayu* ya que al no contar con datos relevantes acerca de su composición química, sería importante conocer mediante el aislamiento, los compuestos que posee esta especie, así como también la realización de pruebas antifúngicas a los mismos, las cuales nos permitirán comprobar las propiedades que posee esta especie, y de esta manera contribuir al campo de la medicina desde una fuente natural.

2.2. ANTECEDENTES

Piper pseudochurumayu pertenece a la familia de las *Piperaceas* la cual consiste en aproximadamente en 10 géneros, encontrados principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, la gran mayoría de las cuales se encuentran en los trópicos de América¹³.

Las especies del género *Piper* han sido ampliamente investigadas y los estudios fitoquímicos han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios, destacando los lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas¹⁴.

El aislamiento y caracterización de este tipo de compuestos es de gran importancia ya que conociendo su estructura podemos entender su interacción con otras moléculas en el cuerpo humano y si en realidad la planta tiene las propiedades que popularmente se le adjudican. Es indispensable realizar este tipo de estudios ya que podrá validar científicamente las propiedades medicinales de la planta y descubrir sustancias activas a partir de plantas no estudiadas previamente.

Estudios realizados en el Instituto de Química Aplicada (IQA) de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) han demostrado el poder antifúngico de especies del género *Piper*^{15,16} así como también estudios realizados en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas en la Universidad Mayor de San Andrés

¹³Danelutte A.P., M. Costantin, G.E. Delgado, R. Braz-Filho & M.J. Kato. 2005. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. J. Braz. Chem. Soc. 16 No 6B: 1425-1430.

¹⁴Virinder S. P.; Subhash, C. J.; Kirpal, S. B.; Rajni, J.; Poonam, T.; Amitabh, J.; Om, D. T.; Ashok, K. P.; Jesper, W.; Carl, E. O.; Per, M. B. *Phytochemistry*. 1997, 46, 597-673.

¹⁵Rivera G; Ojeda S.2010."Elaboración de un fitopreparado antifúngico de semisólido a partir del extracto fluido de la especie *piper ecuatorense* (mático)". Tesis de grado.

¹⁶Palacios 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 de cerro)". Tesis de grado.

en Bolivia en donde se demostró la actividad antifúngica de 14 especies del género *Piper*¹⁷ es por ello que de ahí surge el propósito de realizar esta investigación y demostrar si la especie *Piper pseudochurumayu* posee compuestos con actividad antifúngica.

Cabe destacar que de las especies del género *Piper* distribuidas por todo el mundo, solo el 12% de ellas han sido sometidas a estudios fitoquímicos, lo que corresponde a 84 especies¹⁸.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, así como el interés biológico de los metabolitos aislados, no cabe duda que aún queda mucho por investigar en la fitoquímica del género *Piper*.

¹⁷ Flores E; Jiménez A; Ravelo A; Bourdy G; Giménez A.2000. Estudio Fitoquímico de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida in vitro. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz- Bolivia.

¹⁸ García, B. H. 1998. "*Flora Medicinal de Colombia: Botánica Médica*". Tomo I, Imprenta Nacional, (primera edición 1974), Bogotá, D. E.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo la presente investigación hemos seguido la siguiente metodología:

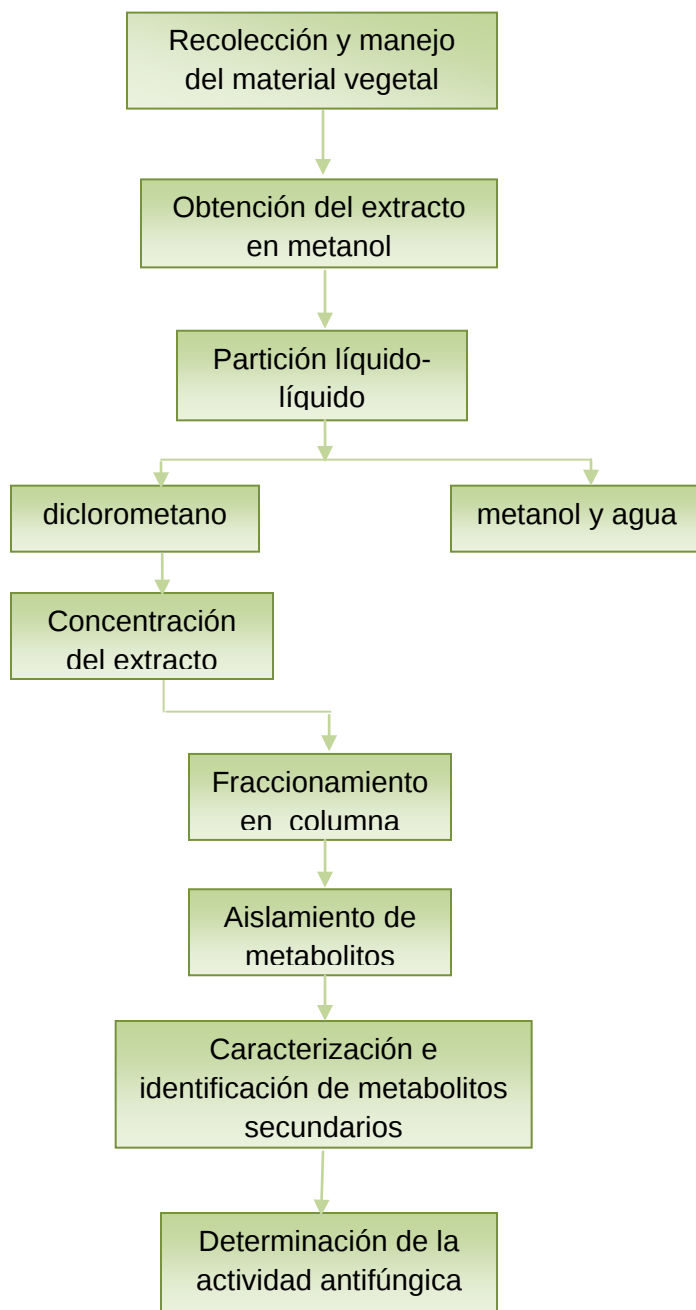


Figura 2: Esquema del desarrollo de la investigación.

Elaboración: La autora.

3.1. Área de recolección

Tabla 2. Lugar de recolección de la especie vegetal

Nombre científico	Nombre Común	Lugar de recolección	Provincia
<i>Piper pseudochurumayu</i>	Matico	Numbani	Zamora Chinchipe

Fuente: La autora

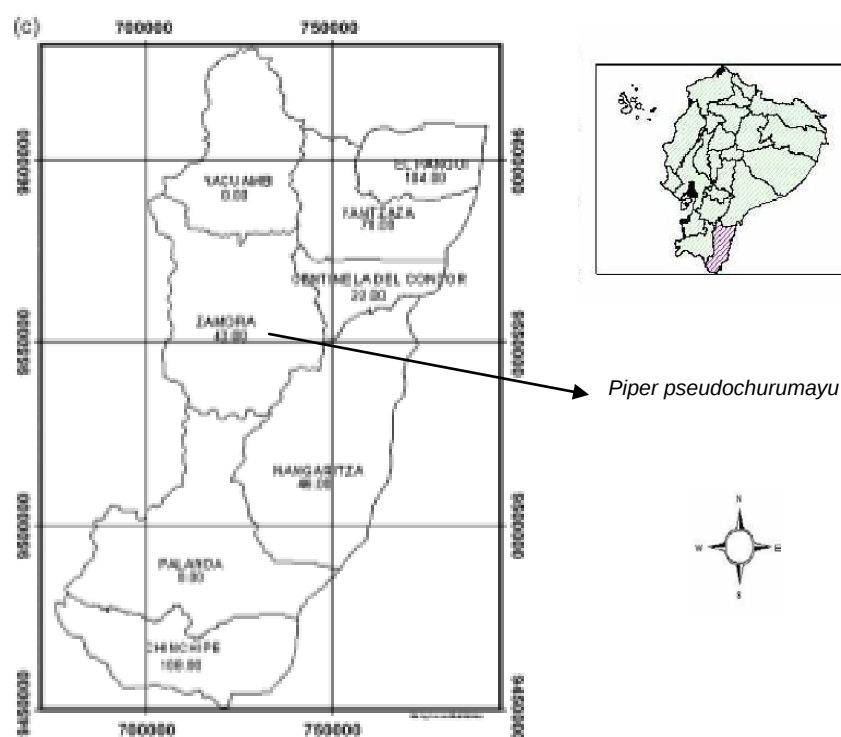


Figura 3. Mapa del lugar de recolección de la especie vegetal en la Provincia de Zamora Chinchipe.

Fuente: La autora

El sector de recolección se encuentra ubicado en las coordenadas 04°05'00"S, 078°57'00"O, a una altura de 1000msns.

3.2. Obtención del extracto

Las hojas de *Piper pseudochurumayu* se secaron a 37°C por 8 días, se seleccionaron y se pesaron 200g de las mismas para posteriormente ser trituradas. Seguidamente la muestra vegetal fue sometida a un proceso de maceración por 5 horas empleando metanol como disolvente de extracción, en una relación metanol planta 10:1, el cual debido a su polaridad nos permitió obtener un extracto que contenía la mayor parte de constituyentes químicos del material vegetal, este procedimiento se lo realizó por 3 veces, luego se separó el residuo vegetal y el líquido extractivo empleando una filtración al vacío, una vez obtenido el extracto fluído fue rotaevaporado a temperatura moderada de 30-35°C para así evitar la degradación de compuestos termolábiles, hasta obtener un extracto seco.

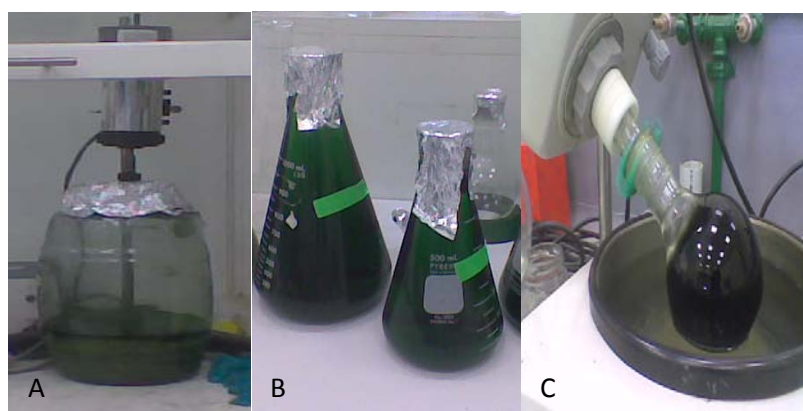


Figura 4. Obtención del extracto **A)** Maceración **B)** Filtración **C)** Rota evaporación
Elaboración: La autora

3.3. Partición líquido- líquido.

El extracto se sometió a una partición líquido-líquido con el fin de eliminar los azúcares y pigmentos, para ello se empleó metanol-agua (80:20) con diclorometano en una relación 1:1, obteniendo de esta manera dos fases las mismas que fueron concentradas. La fase acuosa compuesta por metanol y agua

se congeló a -50°C , mientras que la fase orgánica compuesta por diclorometano se empleó para el montaje de la columna.



Figura 5. Partición líquido-líquido
Elaboración: La autora

3.4. Cromatografía en columna

Esta técnica consiste en la separación de componentes de una mezcla, mediante una fase móvil, a través de una fase estacionaria¹⁹.

Para el montaje de la columna se empleó el extracto obtenido con diclorometano. La preparación de ésta se llevó a cabo utilizando una relación muestra-sílica gel 1:35 (4 gramos de extracto y 140 gramos de sílica), para el fraccionamiento se utilizó los disolventes hexano-acetato de etilo y metanol en polaridad creciente; tomando un volumen de 200 ml por cada fracción.

¹⁹J.Sherma. Thin-Layer Chromatography. In R.A. Meyers. 2002. Encyclopedia of analytical Chemistry). Wiley, Chichester.



Figura 6. Cromatografía en columna
Elaboración: La autora

3.5. Purificación y cristalización de compuestos

Se puede efectuar con disolventes puros o mezclas, en este caso se empleó el acetato de etilo como disolvente para la purificación de los cristales, mientras que para el lavado de los mismos se aplicó hexano.

3.6. Pruebas de caracterización

3.6.1. Punto de fusión

El punto de fusión de un compuesto sólido cristalino es la temperatura a la cual se encuentran en equilibrio la fase sólida y la fase líquida y generalmente es informado dando el intervalo entre dos temperaturas: la primera es cuando aparece la primera gotita de líquido y la segunda es cuando la masa cristalina termina de fundir²⁰. Para esta investigación el punto de fusión se determinó calentando lentamente (aproximadamente un grado por minuto) una pequeña cantidad del material sólido, el equipo que se empleo fue Fisher-Johns- Melting Point Apparatus serial 40-22.(Figura 7).

²⁰ Shriner, R. L., Fuson, R. C., Curtin, D.Y. 1995. Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos. Limusa, México.



Figura 7. Fotografía de equipo de fusión Fisher-Johns- Melting Point Apparatus serial 40-22.

Elaboración: La autora

3.6.2. Solubilidad

Es la propiedad de una sustancia para disolverse en otra²¹. Los disolventes 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 la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación / distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente²². Los Rf de los compuestos químicos se calcularon de acuerdo a la fórmula que se indica a continuación y considerando como referencia la (Figura 8).

Fórmula

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

²¹ Fessenden and Fessenden. 2000 Química orgánica. Grupo editorial iberoamericano. México

²² Choma I. 2005. The use of Thin Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. LCGC Europe.

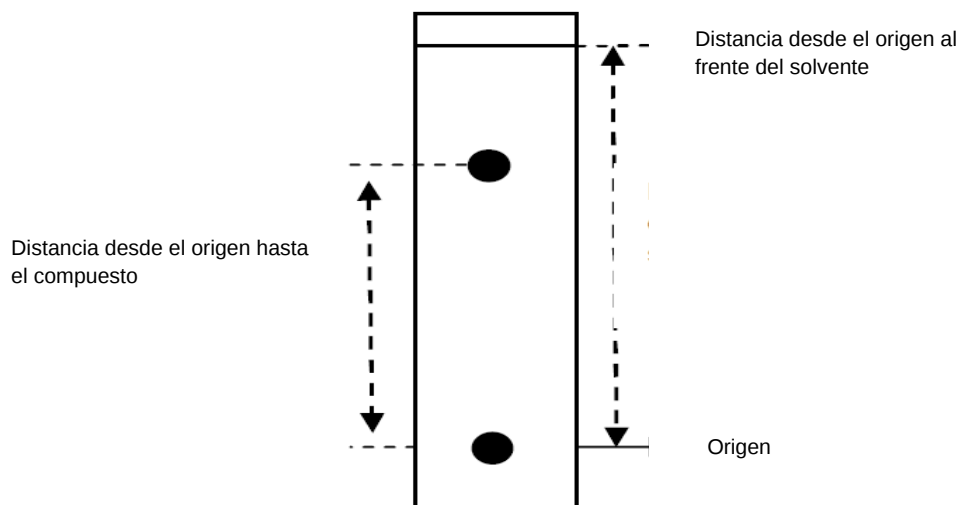


Figura 8. Medida de los Rf en la placa de silica gel 60 F₂₅₄.
Fuente: Silva et al 2008

3.6.4. Identificación de los compuestos aislados

3.6.4.1. Resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es un fenómeno que se produce cuando los núcleos de ciertos átomos se encuentran inmersos en un campo magnético estático y se expande a un segundo campo magnético oscilante.

Para obtener un espectro de RMN, se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en medio mililitro de disolvente deuterado en un tubo de vidrio largo que se sitúa dentro del campo magnético del aparato. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical, el ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, generando finalmente las respectivas graficas²³.

Los espectros de NMR fueron obtenidos en un equipo Varian N° de serie 21953 operando a 400MHz para ¹H y 100 Mz para ¹³C, usando CDCl₃ y DMSO a 25°C.

²³García L. A, 2001. Determinación de estructuras por métodos espectroscópicos. Memorias Curso UANL.

3.6.4.2. Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de masas (CGMS)

La identificación de los compuestos aislados de la especie *Piper pseudochurumayu* por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CGMS) se hizo mediante un cromatógrafo de gases Agilent, las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil –metilpolisiloxano).

El equipo que se utilizó para los respectivos análisis fue un cromatógrafo de gases serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683.

En la tabla 3 se detallan las características de las columnas capilares que se usaron para las inyecciones cromatográficas.

Tabla 3. Características de las columnas capilares

Características de la columna capilar					
Compuesto	Columna	Temperatura (°C)	Película (µm)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
21-23	DB-5	350	0,25	0,25	30
37-42	DB-5	350	0.25	0.25	60

Fuente: Proveedores

Elaboración: La autora

Para realizar las respectivas corridas cromatográficas se usaron algunos parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de los compuestos obtenidos de las fracciones 21-23 y 37-42. (Figuras 9 y 10).

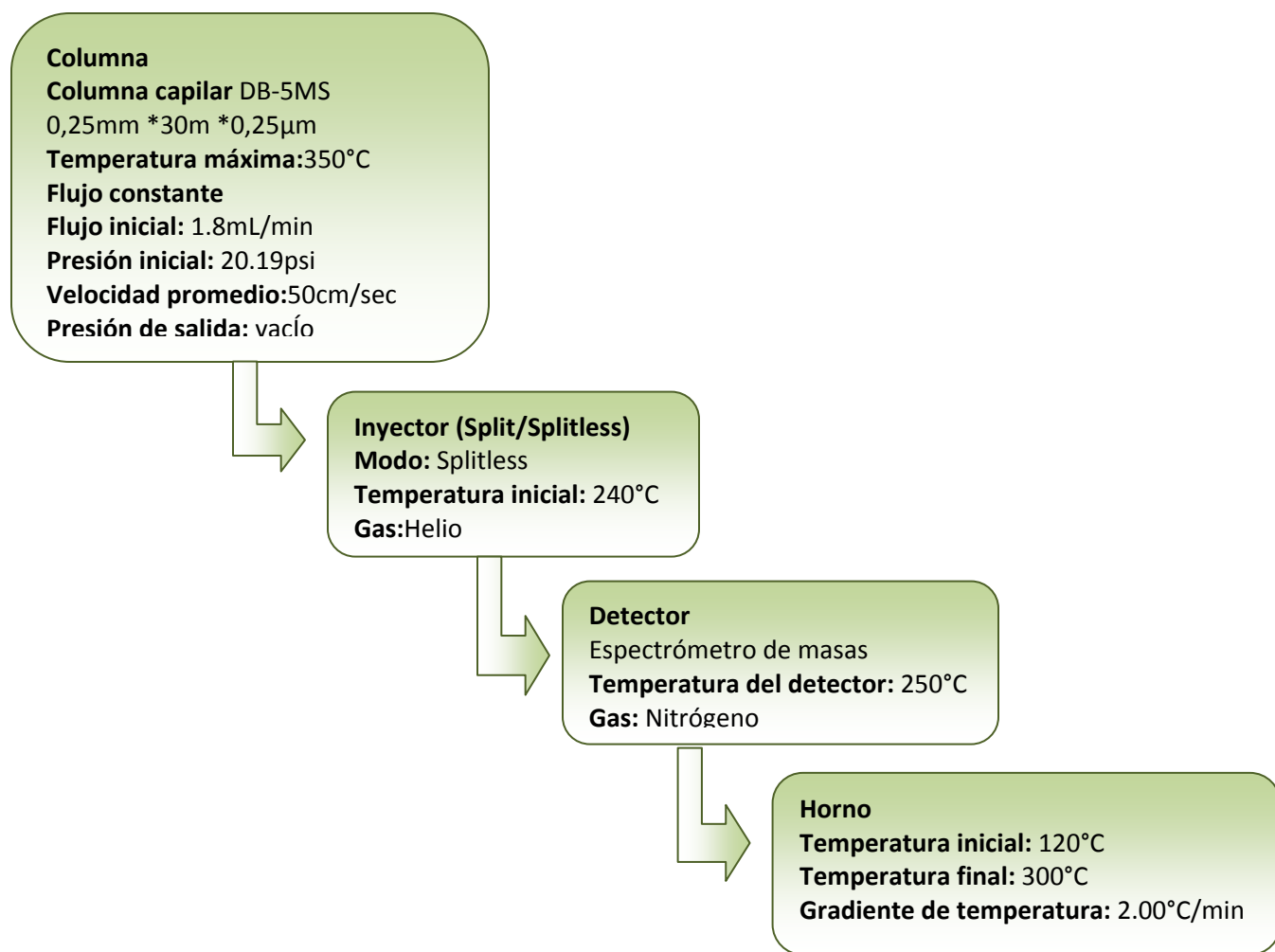


Figura 9. Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5 compuesto 21-23
Elaboración: La autora

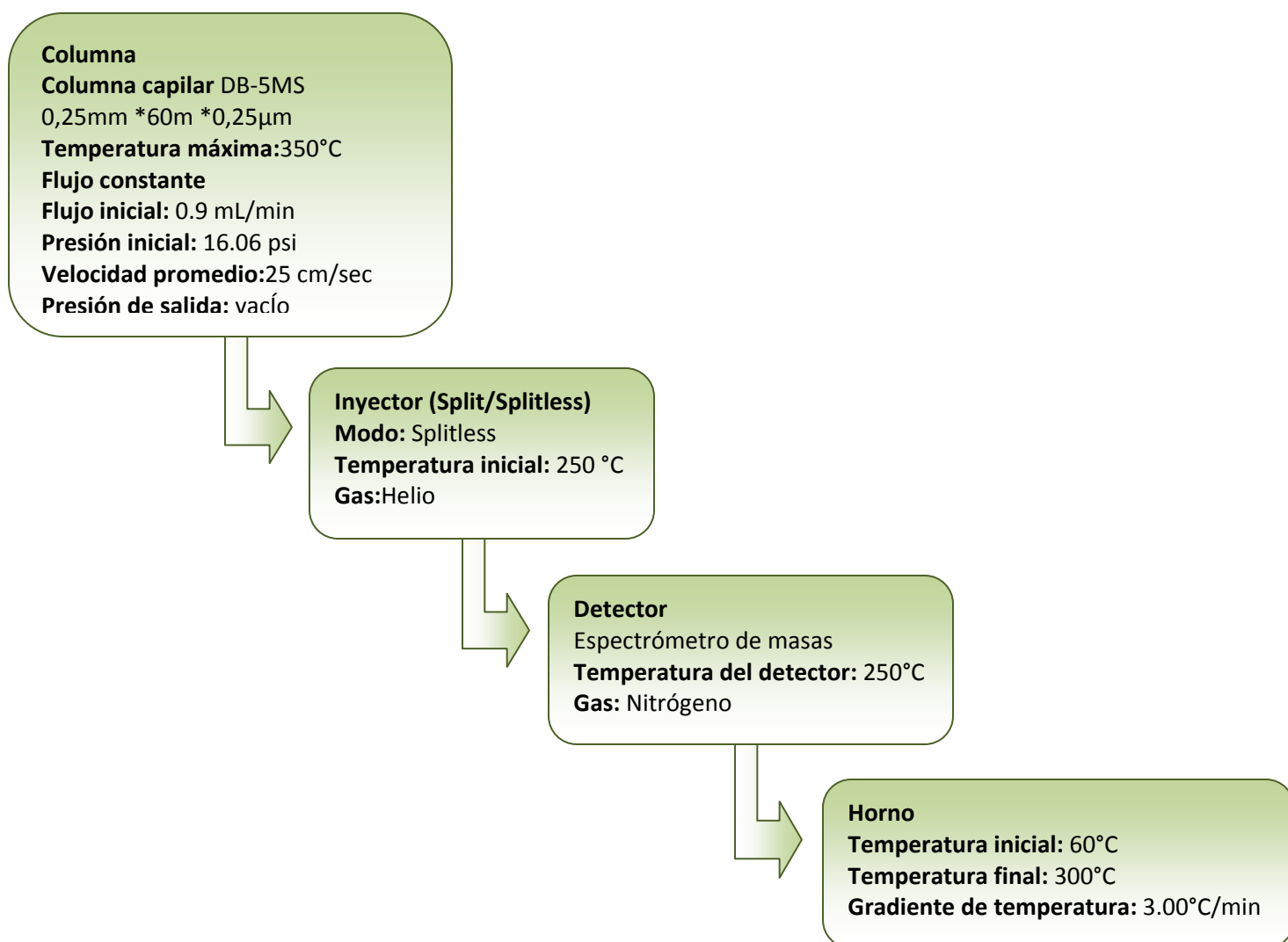


Figura 10. Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5 compuesto 37-42
Elaboración: La autora

3.7. Determinación de la actividad antifúngica

3.7.1. Microorganismos de prueba

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

3.7.2. Bioautografía en agar overlay

Esta técnica se basa en la inhibición del crecimiento antimicrobiano, mediante la difusión de sustancias activas a través de placas cromatográficas previamente realizadas²⁴.

Para llevar a cabo la Bioautografía se preparó una disolución de 2mg del compuesto por 100 µL de disolvente (diclorometano).

Se desarrollaron los cromatogramas utilizando placas de sílica gel, la fase móvil empleada para la separación de compuestos fue hexano-acetato de etilo en proporción 1:1. La visualización posterior se realizó con luz UV 254nm - 360 nm. Se utilizó una placa revelada con sulfato cérico para poder identificar al compuesto y medir el valor de Rf.

Para la siembra se tomó alícuotas de 10 µL de la muestra preparada con el compuesto, el cual estuvo a un volumen de 2mg/100µL de diclorometano.

A partir de reservas criogénicas, se tomó 10 µL 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 un volumen 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. (6 cm de largo x 1cm de ancho) formando un grosor de 1mm sobre la placa. Posteriormente se incubó a una temperatura de 28°C por 24-48 horas

²⁴Nostro A. 2000. Extraction Methods and Bioautography for evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity. Letters in Applied Microbiology 30:379-384

Controles: Los controles se utilizaron en la misma concentración que las fracciones la cual fue 10 µL para cada una. En este caso como control para los dos hongos dermatofitos se utilizó el itraconazol a una concentración inicial de 1mg/mL.

Después de la incubación las cromatogramas se suelen rociar con sales de Tetrazolio (MTT), lo cual permite observar zonas de inhibición claras sobre un fondo coloreado.

3.7.3. Microdilución en caldo

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es un método que consiste en la concentración mínima inhibitoria (MIC), definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo²⁵.

Para este ensayo se preparó una disolución de 2mg del compuesto de interés por 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), una vez preparada esta solución se empleó las placas de cultivo de 96 pocillos y a continuación se procedió de la siguiente manera: Se colocó 180µL de caldo Sabouroudal primer pocillo, y 100µL al resto de pocillos restantes, posteriormente se adicionó 20µL de la solución del compuesto en el primer pocillo y se mezcló, luego se realizó diluciones seriadas tomando 100 µL del primer pocillo y diluyendo con 100µL del pocillo siguiente, se continuo este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas.

De la misma manera se realizó para el control de esterilidad (180 µL caldo + 20 µL del compuesto) para el control negativo (180 µL caldo + 20 µL DMSO) y para el control positivo (180 µL caldo + 20µL itraconazol).

Luego de preparada la placa se inocularon todas las columnas con 100 µL de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando a

²⁵Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2005 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).

un volumen final de 200 µL en la placa de cultivo, de esta manera se ajusta tanto la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL. Se selló las placas y se incubó a 28°C y se monitoreó el crecimiento hasta 96 horas después.

La lectura de la CIM se realizó de manera visual y se define como la menor concentración del extracto necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de prueba.

Los medios de cultivo y las condiciones de incubación para cada microorganismo utilizado se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Medios de cultivo y condiciones de incubación para el CMI con los hongos utilizados

Hongos esporulados	Medio de cultivo	Condiciones de Incubación
<i>T. mentagrophytes</i>	Caldo Sabouraud	28 °C por 24-72
<i>T. rubrum</i>	Caldo Sabouraud	28 °C por 24-72

Fuente: Proveedores

Elaboración: La autora

IV. RESULTADOS YANÁLISIS

IV. RESULTADOS YANÁLISIS

4.1. Compuestos aislados de la especie *Piper pseudochurumayu*

A partir de la cromatografía en columna se obtuvieron 146 fracciones. Todas las fracciones eluídas fueron analizadas por cromatografía de capa fina, usando placas de sílica gel 60F254 (fase directa).

En la Tabla 5 se exponen los disolventes empleados y las proporciones a las cuales las fracciones fueron eluídas así como también la apariencia que presentaron.

Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano

Fracciones	Proporción	Mezclas de disolventes	Apariencia
1-12	100	Hex	Aceitosa
13-20	95-5	Hex- AcOEt	Aceitosa
21-23	90-10	Hex- AcOEt	Cristales
24-36	85-15	Hex- AcOEt	Sólida
37-42	80-20	Hex- AcOEt	Cristales
43-47	75-25	Hex- AcOEt	Sólida
48-52	70-30	Hex- AcOEt	Sólida
53-57	65-35	Hex- AcOEt	Sólida
58-62	60-40	Hex- AcOEt	Sólida
63-67	55-45	Hex- AcOEt	Sólida
68-72	50-50	Hex- AcOEt	Sólida
73-77	45-55	Hex- AcOEt	Sólida
78-81	40-60	Hex- AcOEt	Sólida
82-85	35-65	Hex- AcOEt	Sólida
86-90	30-70	Hex- AcOEt	Sólida
91-95	25-75	Hex- AcOEt	Sólida
96-100	20-80	Hex- AcOEt	Sólida
101-104	15-85	Hex- AcOEt	Sólida
105-109	10-90	Hex- AcOEt	Sólida
110-114	100	AcOEt	Sólida
115-119	90-10	AcOEt – MeOH	Sólida
120-124	80-20	AcOEt – MeOH	Sólida
125-129	70-30	AcOEt – MeOH	Sólida
130-134	60-40	AcOEt – MeOH	Sólida

135-139	50-50	AcOEt – MeOH	Sólida
140-142	40-60	AcOEt – MeOH	Sólida
143	30-70	AcOEt – MeOH	Sólida
144	20-80	AcOEt – MeOH	Sólida
145	10-90	AcOEt – MeOH	Sólida
146	100	MeOH	Sólida

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora

Como se puede observar en la Tabla 5 las fracciones de la 21-23 presentaron la formación de cristales luego de evaporarse el disolvente, así como también en las fracciones de la 37-42. Las fracciones que llegan a cristalizar son compuestos que presentan un alto grado de pureza, según (Cronquist A. 1999)²⁶, por ello se decidió realizar en los mismos las pruebas respectivas debido a su peso, pureza y debido a que se facilita la identificación molecular de dichos compuestos.

4.1.1. Compuesto 1 fracción 21-23

Este compuesto se obtuvo en las fracciones eluidas con hexano- acetato de etilo en proporción 90-10.

El precipitado tuvo la apariencia de escarcha blanquecina, luego de ser lavado sucesivamente con hexano, se obtuvieron 60 mg, su punto de fusión fue de 132-137°C.

El compuesto fue soluble con acetato de etilo, metanol y diclorometano e insoluble con hexano.

Su cromatografía de capa fina Figura. 11, corrida con Hex: AcOEt en proporción 1:1, dió una mancha morada al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina. **(Anexo A)** dando un Rf de 0,88.

²⁶Cronquist A. 1999 On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms". *Plant Syst Evol.*, suppl 1: 179-189.

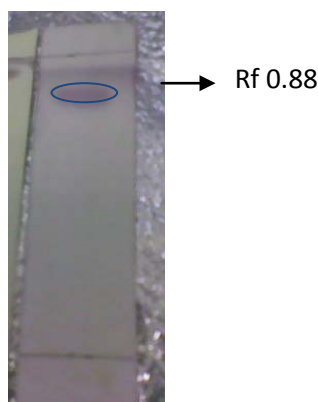


Figura 11. TLC de la fracción 21-23 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina
Elaboración: La autora

Luego de analizar los espectros de RMN (**Anexo B**) y de masas (**Anexo C**) se determinó que se trataba de unstigmasta-5,22-dien-3-ol que corresponde al compuesto de tipo estigmasterol el cual al ser comparado con la base de datos del equipo, (cromatógrafo de gases acoplada a un espectrómetro de masas) se verificó una coincidencia del 98%. Presentando un peso molecular de 549.

Las pruebas de actividad antifúngica no fueron realizadas debido a que la cantidad del compuesto no fue suficiente, motivo por el cual no se pudo comprobar si el compuesto en mención presenta dicha actividad.

4.1.2. Compuesto 2 fracción 37-42

El compuesto se lo obtuvo en las fracciones eluidas con Hex:AcOEt en proporción 80:20, el cual se purificó con acetato de etilo y se lavó con hexano hasta obtener unos cristales con apariencia de agujas blanquecinas.

Al igual que el primer compuesto este también fue soluble con acetato de etilo, metanol y diclorometano e insoluble con hexano.

El punto de fusión del compuesto fue de 121-122°C, obteniéndose la cantidad de 1g, la cromatografía de capa fina Figura 12, corrida con Hex: AcOEt en proporción

1:1 dio como resultado una mancha color café al ser revelada con sulfato cérico. (**Anexo A**) dando un Rf de 0,77.

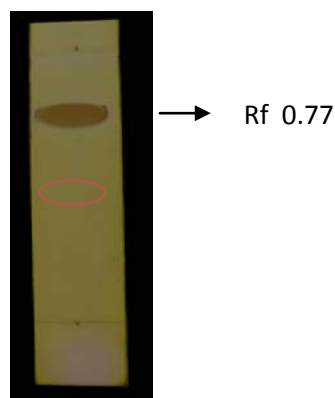


Figura 12: TLC de la fracción 37-42 luego de ser revelada con sulfato cérico
Elaboración: La autora

Mediante el análisis de RMN de ^1H y ^{13}C (**Anexo B**) así como también de su espectro de masas, (**Anexo C**) se determinó que se trata de 3,4-dimetil -2,5-bis(3,4,5-trimetoxifenil)tetrahidrofurano que corresponde al compuesto de tipo lignano, siendo su peso molecular de 432. La estructura del compuesto en mención se muestra a continuación.

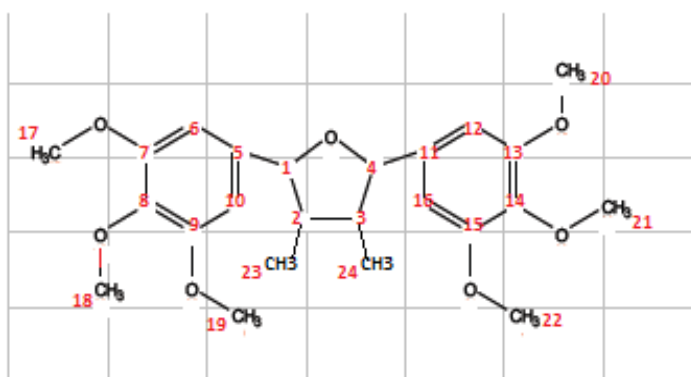


Figura 13. Estructura química del lignano obtenida mediante RMN

Con respecto a la estructura de la molécula esta presentó una simetría ya que con el análisis del protón y carbono (espectros NMR) según las tablas nos arroja la estructura general de $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_3$ si esto es así el peso da:

C: $12 \times 12 = 144$

H: $16 \times 1 = 16$

O: $16 \times 3 = 48$

208

Pero el espectro de masas da 432 por lo tanto esto indica que la molécula es simétrica, puesto que $208 \times 2 = 416$ y para que coincida con la masa se le suma un oxígeno pues la simetría esta compartida por el oxígeno (16), entonces $416 + 16 = 432$.

Los datos espectroscópicos se muestran en la Tabla 6 donde se indica los desplazamientos químicos para ^1H y ^{13}C .

Tabla 6. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C

Espectrometría		
Posición	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	5.02	89.6
2	2.39	47.5
3	2.39	47.5
4	5.02	89.6
5	-	136.1
6	6.59	102.7
7	-	152.7
8	-	136.4
9	-	152.7
10	6.59	102.7
11	-	136.1
12	6.59	102.7

13	-	152.7
14	-	136.4
15	-	152.7
16	6.59	102.7
17	3.83	56.1
18	3.83	60.8
19	3.83	56.1
20	3.83	56.1
21	3.83	60.8
22	3.83	56.1
23	0.96	13.3
24	0.96	13.3

Datos obtenidos a 400 MHz en CDCl₃.

Según (Ferrer A. 2002)²⁷, los lignanos tienen numerosas propiedades biológicas que incluyen antimitosis, fungicida y antioxidante por ello se le realizaron las pruebas antifúngicas respectivas.

En la siguiente tabla se resume las características y valores obtenidos de los compuestos aislados.

Tabla7. Resultados generales: valores y características obtenidas de los compuestos aislados

<i>Piper pseudochurumayu</i>		
	Fracción 21-23	Fracción 37-42
Peso(g) de cristales obtenidos/fracción	0,06g/21-23	1g/37-42
Proporción de solventes	90:10	80:20
Apariencia física	escarcha blanquecina	agujas blanquecinas
Coloración UV	Mancha oscura	Mancha oscura

²⁷Ferrer A. 2002. Biosíntesis de isoprenoides en plantas: caracterización molecular de los genes de la HMG-CoA reductasa I Reunión de biología molecular de plantas. Salamanca.109-116.

Coloración Revelado	Mancha morada	Mancha café
Rf	0,8	0,7
Punto de fusión	132-137 °C	121-122 °C
RMN	triterpeno	lignano
CG-MS	stigmasta-5,22-dien-3-ol	3,4-dimetil -2,5-bis(3,4,5-trimethoxifenil) tetrahydrofurano

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora

4.2. Pruebas antifúngicas

4.2.1. Concentración mínima Inhibitoria (CMI)

En la tabla 8 se muestran los valores obtenidos de CMI del compuesto aislado, como se puede observar los resultados obtenidos para los hongos con las cuales se ha evaluado la actividad del compuesto aislado de las fracciones 37-42 muestran una CMI de >1000 µg/mL. Según (Holetz FB *et al*, 2002)²⁸, una CMI >1000 µg/mL se la clasifica como una actividad muy débil o nula, de modo que podemos indicar que el compuesto aislado no tiene ninguna actividad a la concentración mencionada.

²⁸Holetz FB, Pessini GL, Sánchez NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz.; 97:1027–31.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a los hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*

Concentración mínima inhibitoria (ug/mL)		
Compuesto	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 28185	<i>Trichophyton rubrum</i> 28188
Fracción 37-42	>1000µg/ml	>1000µg/ml
Control positivo	itraconazol 100% de inhibición (7,8µg/mL)	
Control negativo	>1000µg/ml	>1000µg/ml

Fuente: Investigación directa
Elaboración: La autora

4.2.2. Bioautografía en agar overlay

Los resultados de actividad antifúngica se expresan semi cuantitativamente ya que la técnica empleada según (Symonds N. 1972 y Verástegui M., 1998)^{29,30} puede detectar concentraciones mínimas del compuesto responsable de la actividad biológica y se observa a simple vista la zona de inhibición por tal razón se considero como actividad a la presencia de zonas de inhibición y de no activo a la ausencia de las mismas.

Basados en las especificaciones anteriormente mencionadas se describe a continuación los resultados obtenidos en el compuesto aislado.

²⁷Symonds, N. La resistencia bacteriana. C. M. A. Journal. 1972, pp. 105, 587.

³⁰ Verástegui, M. Bioautografía para detectar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas. Revista Sociedad Química de México. 1998, Vol. 42.

4.2.2.1. Bioautogramas del compuesto obtenido de las fracciones 37-42

Se determino la actividad antifúngica del compuesto frente a los hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*. Los resultados indican que el compuesto en mención no posee actividad ya que como se observa en las Figuras 14 y 15 no existe ninguna zona de inhibición alrededor del compuesto.

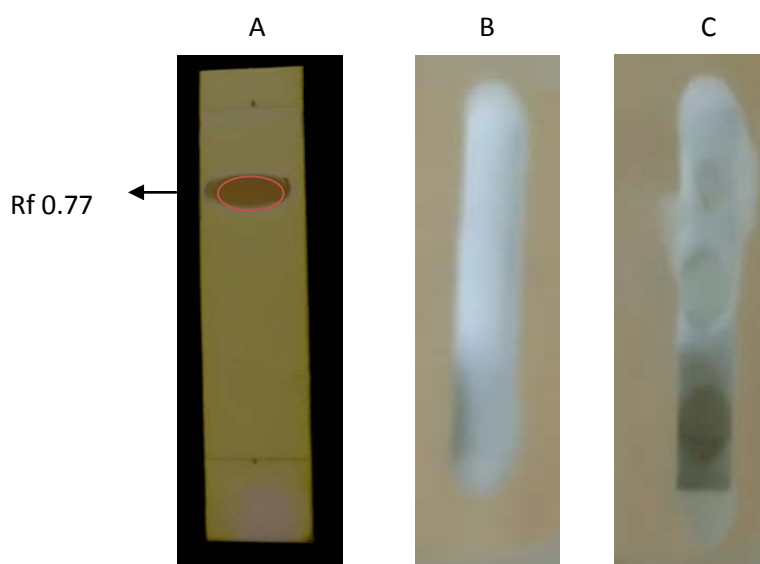


Figura 14. A) Cromatograma revelado con sulfato cérico B) Bioautograma para *T. mentagrophytes* C) Control de itraconazol

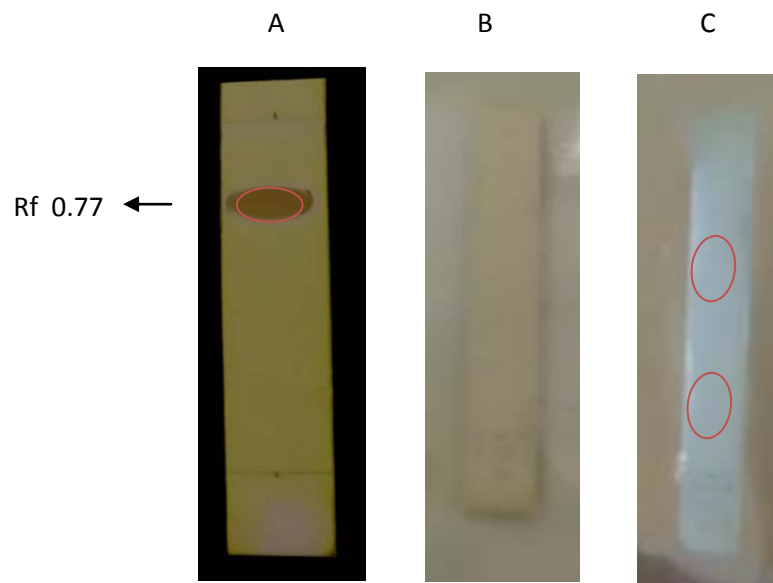


Figura 15. A) Cromatograma revelado con sulfato cérico **B)** Bioautograma para *T. rubrum* **C)** Control de itraconazol
Elaboración: La autora

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- Mediante la cromatografía en columna del extracto crudo de la especie se lograron aislar dos compuestos los mismos que cristalizaron, el primero en las fracciones 21-23 proporción 90:10 (Hex-AcOEt), y el otro en las fracciones 37-42 proporción 80:20(Hex-AcOEt).
- Mediante la espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CGMS) se logró identificar los dos compuestos, el primero se trató de unstigmasta-5,22-dien-3-ol(estigmasterol), y el segundo correspondió al 3,4-dimetil -2,5-bis (3, 4,5-trimethoxifenil) tetrahidrofurano (lignano).
- La CMI para hongos determinó que el compuesto de la fracción 37-42 muestran una CMI >1000 µg/ml, lo cual indica que el compuesto no presenta actividad.
- La Bioautografía en agar Overlay realizada al compuesto de la fracción 37-42 frente a los hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* dio como resultado la ausencia de zonas de inhibición alrededor del compuesto, lo cual nos permitió corroborar que el compuesto en mención no presenta actividad antifúngica.

VI. RECOMENDACIONES

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de *Piper pseudochurumayu* realizando el aislamiento e identificación de las demás fracciones que no cristalizaron con el fin de detectar cual son los componentes que le dan las propiedades curativas a la planta.
- Realizar otras pruebas a los compuestos identificados, con el fin de determinar que propiedades poseen (biológicas, antimitosis, antibacterianas y antioxidantes.)
- Realizar trabajos de investigación similares con otras especies del género *Piper*, en la búsqueda de nuevos compuestos anti fúngicos.

VII. ANEXOS

ANEXO A

Reveladores

- **Sulfato cérico:** Se emplea para revelar la mayor parte de componentes orgánicos.

Preparación:

Reactivo	Composición
Sulfato cérico	12g Sulfato cérico
	22ml ácido sulfúrico concentrado
	350g de hielo

Procedimiento:

- Pesar el hielo y agregar el sulfato cérico
 - Disolver bien y agregar el ácido sulfúrico concentrado
 - Calentar para que se disuelva bien
-
- **Ácido Sulfúrico y Vainillina:** Se emplea como revelador en los cromatogramas de aceites esenciales y la mayor parte de compuestos orgánicos.

Reactivo	Composición
Ácido sulfúrico	250ml Etanol
	12,5g Ácido sulfúrico

Procedimiento:

- Se aforan los 12,5 de ácido sulfúrico con los 250ml de etanol

Reactivo	Composición
Vainillina	250ml Etanol
	12,5g

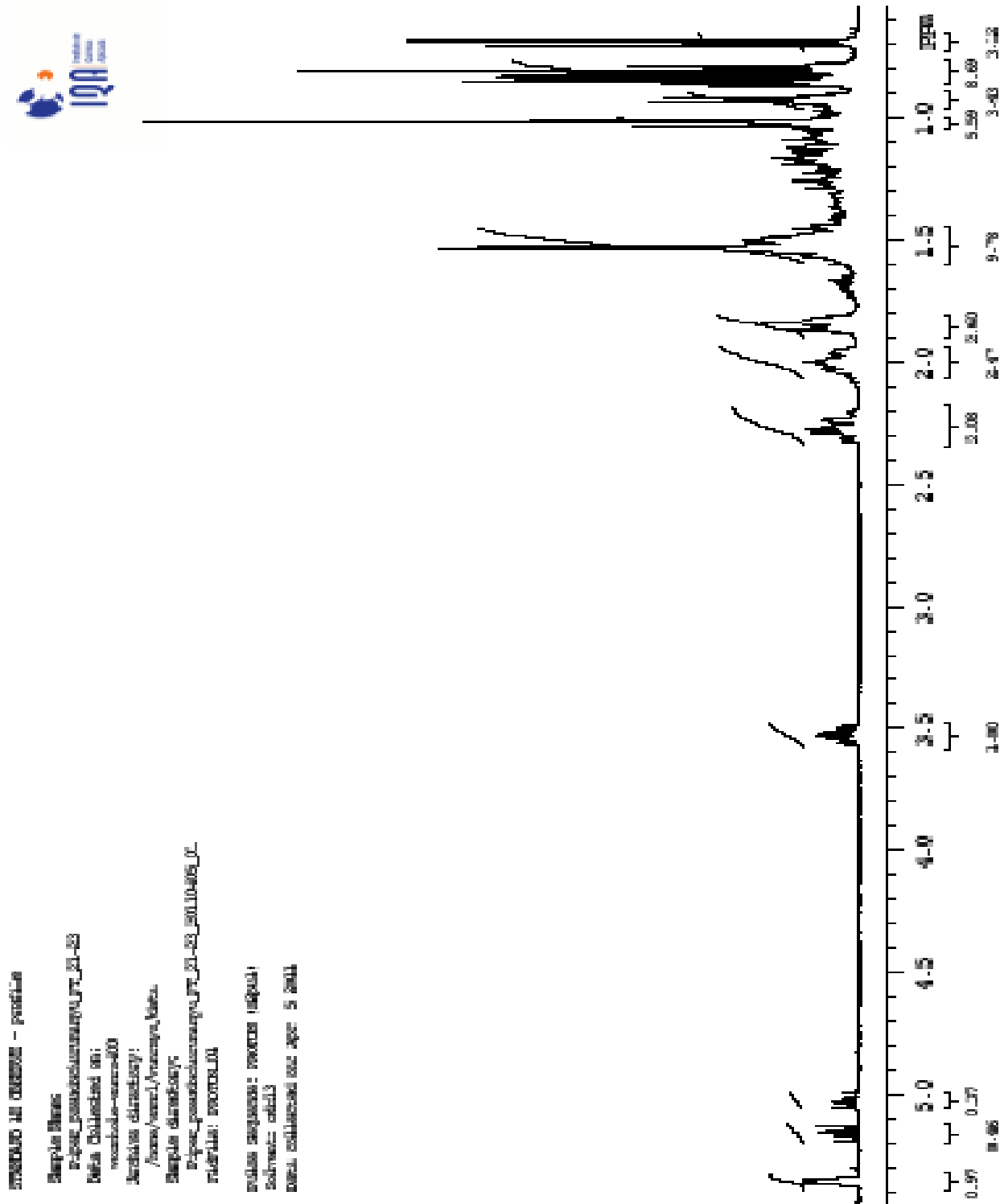
Procedimiento:

- Se aforan los 12,5g de vainillina con los 250ml de etanol

STANDARD 101 CHROMA - profile

Sample Name:
E:\pcr_gonadobacteriophage_21-23
Data Collected on:
monobio-mer-000
Acquisition directory:
/Acq/monobio/monobio_000
Sample directory:
E:\pcr_gonadobacteriophage_21-23\20101016_01
File(s): monobio.01

pcr sequence: monobio (189pb)
solvent: ddH₂O
data collected on: Apr 5 2011



ANEXO B

1H NMR

CDCl₃

Experiments: 1D, 2D, 3D

Processing: 1D, 2D, 3D

Acquisition: 1D, 2D, 3D

Reference: 1D, 2D, 3D

Integration: 1D, 2D, 3D

Phase: 1D, 2D, 3D

Chemical shift: 1D, 2D, 3D

Temperature: 1D, 2D, 3D

Pressure: 1D, 2D, 3D

Time: 1D, 2D, 3D

Location: 1D, 2D, 3D

Height: 1D, 2D, 3D

Width: 1D, 2D, 3D

Depth: 1D, 2D, 3D

Area: 1D, 2D, 3D

Volume: 1D, 2D, 3D

Mass: 1D, 2D, 3D

Charge: 1D, 2D, 3D

Spin: 1D, 2D, 3D

Relaxation: 1D, 2D, 3D

Diffusion: 1D, 2D, 3D

Permeability: 1D, 2D, 3D

Conductivity: 1D, 2D, 3D

Viscosity: 1D, 2D, 3D

Refractive index: 1D, 2D, 3D

Density: 1D, 2D, 3D

Surface tension: 1D, 2D, 3D

Interfacial energy: 1D, 2D, 3D

Adsorption: 1D, 2D, 3D

Desorption: 1D, 2D, 3D

Stability: 1D, 2D, 3D

Reactivity: 1D, 2D, 3D

Toxicity: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

Biocompatibility: 1D, 2D, 3D

Biodegradability: 1D, 2D, 3D

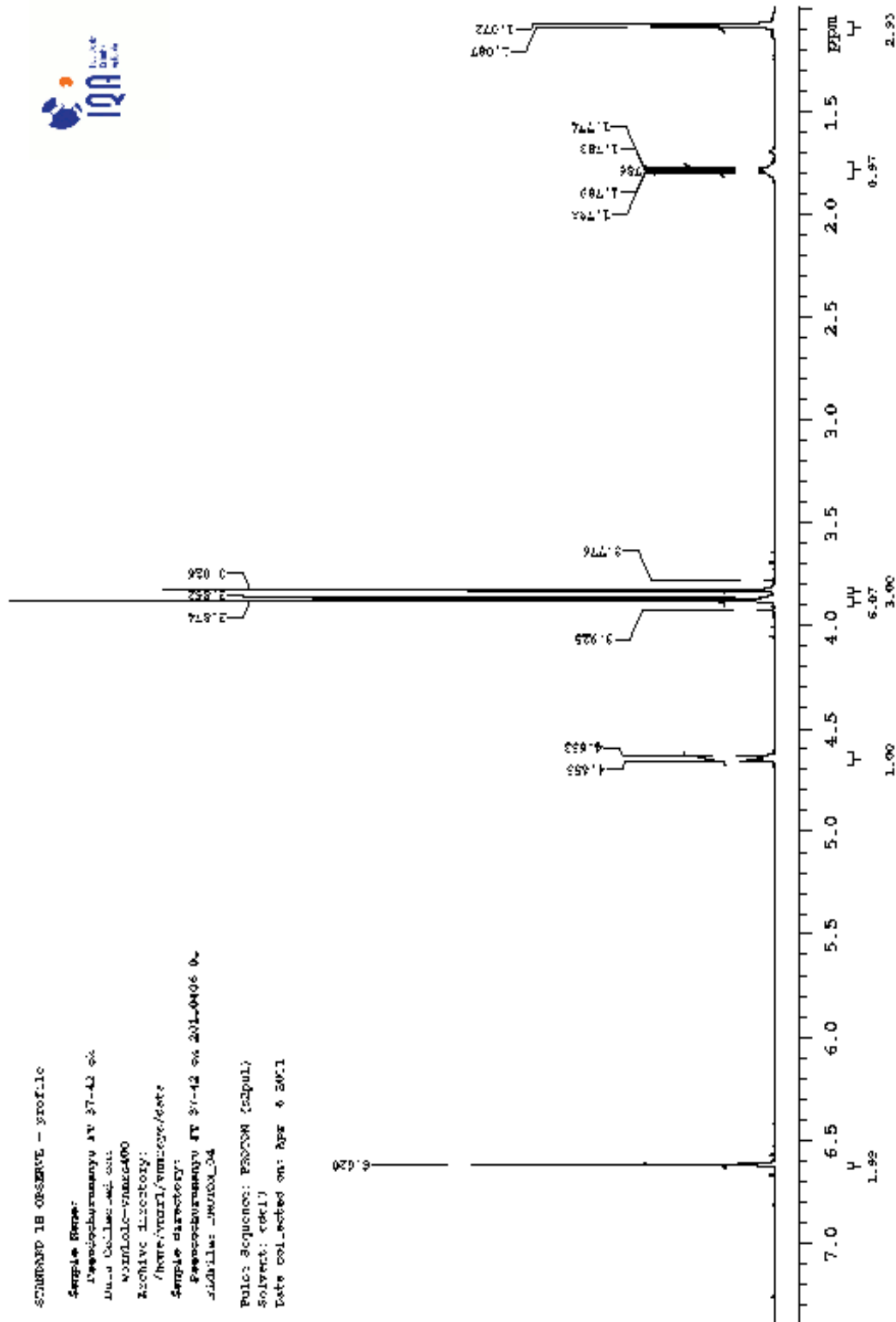
Biocompatibility: 1D, 2D, 3D



STANDARD 1B OBSERVE - profile

Sample Name:
 Pseudechneumayn JV 37-42 oia
 Du-Li College and
 Wundolo-vnanc400
 Acquire directory:
 /home/vmuri/vmuri/vnanc400
 Sample directory:
 Pseudechneumayn JV 37-42 on 201-0406 0
 Filename: JV1004_04

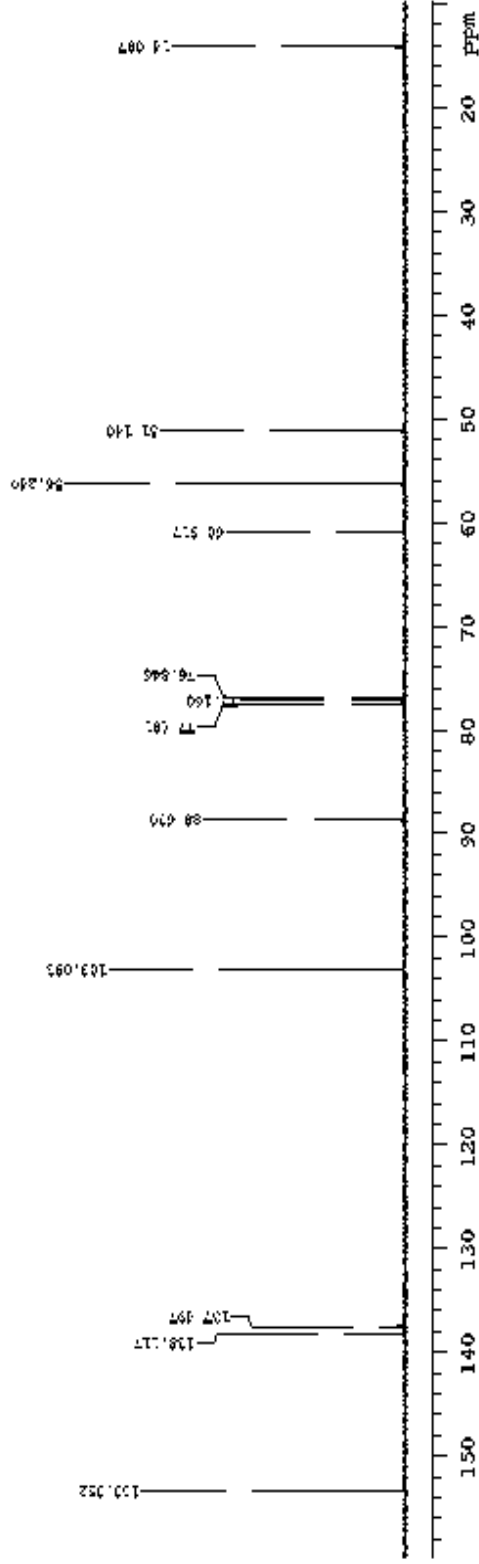
Pulse Sequence: PSEUDON (2dpu)
 Solvent: ccd1
 Date collected on: Apr 6 2001



STANDARD 1B OBSERVE - profile

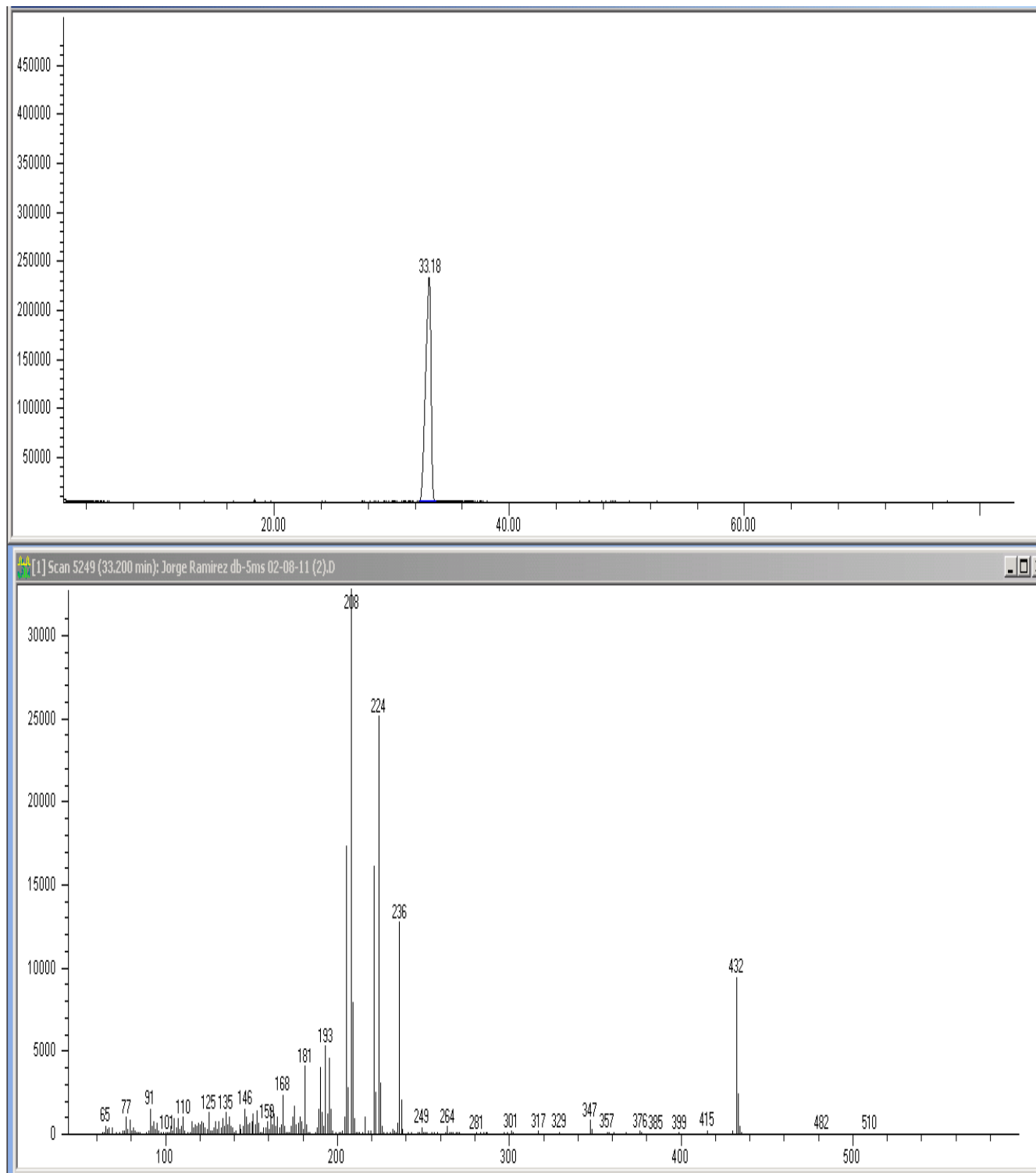
Sample Name:
 Panchacharamanyu AT 37-42 04
 Data Collection Date:
 NMRJOLC-VNMR400
 Archive Directory:
 /home/vnmr1/vnmrjv400
 Sample directory:
 Panchacharamanyu AT 37-42 on 201-0406 0-
 Jidvillu: CAMEX_01

Pulse Sequence: CPMAS (zgpg3)
 Solvent: ccd1
 Date collected on: Apr 6 2011

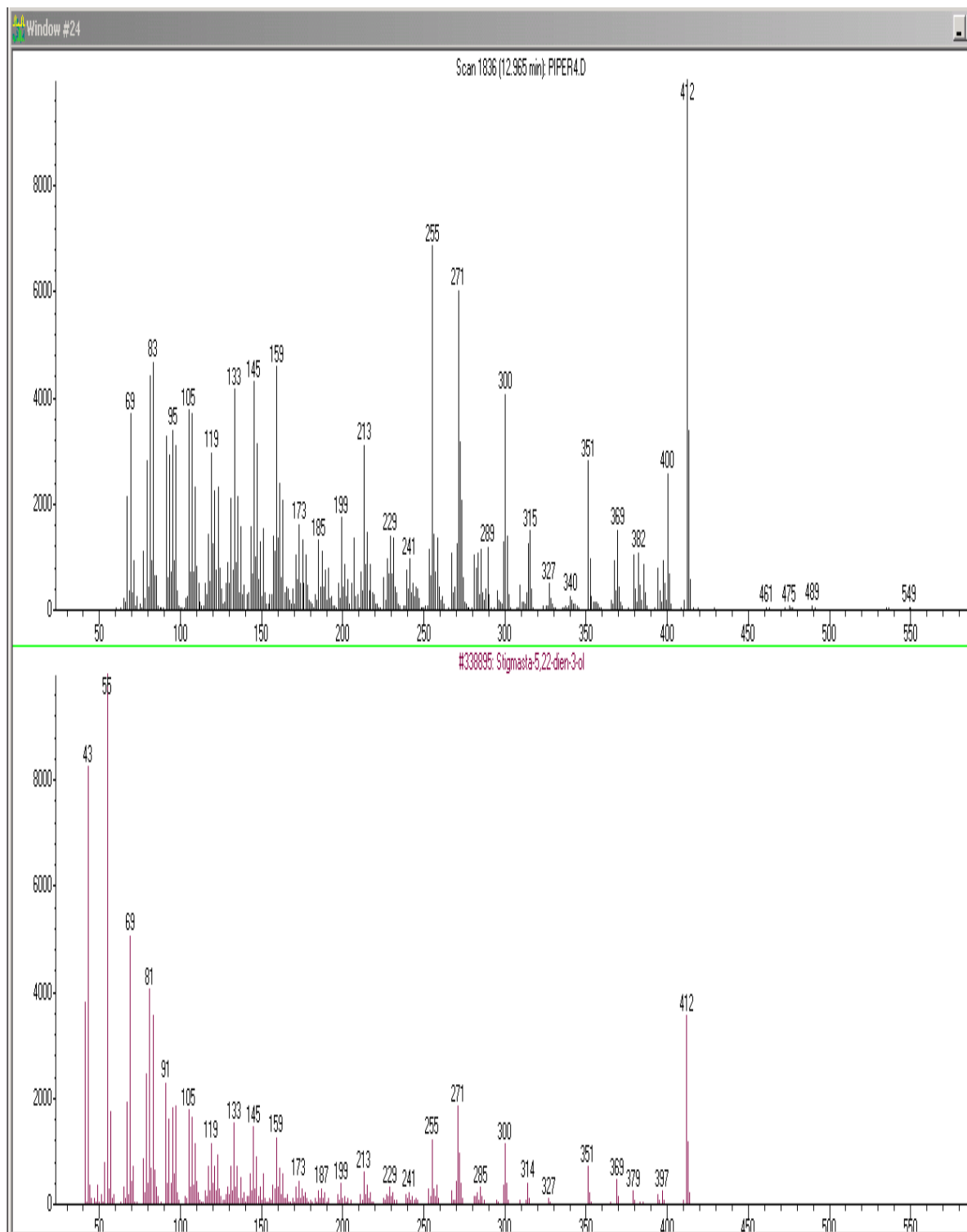


ANEXO C

Espectro de masas correspondiente al Lignano



Espectro de masas correspondiente al Estigmasterol



ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
DCM	Diclorometano
C.C	Cromatografía en columna
TLC	Cromatografía en capa fina
U.V	Ultravioleta
Pf	Punto de fusión
Rf	Factor de Retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹HRMN	Resonancia Magnética Nuclear del Protón
¹³CRMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
Tm	<i>Trichophytummentagrophytes</i>
Tr	<i>Trichophytumrubrum</i>