



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACEUTICO

“Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios a partir de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.”

Trabajo de fin de titulación

AUTOR:

Riofrío Quezada Jimmy Ángel

DIRECTOR:

Ramírez Robles Jorge Yandry, M.Sc.

LOJA-ECUADOR

2012



CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Jimmy Ángel Riofrío Quezada, 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,

f).....

Jimmy A. Riofrío Quezada



CERTIFICACIÓN

M.Sc.

Jorge Yandry Ramírez Robles.

DIRECTOR DE TESIS DE GRADO

CERTIFICO:

Haber dirigido la investigación y la elaboración de la tesis: **“Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios a partir de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.”** la misma que ha sido revisada durante su ejecución, por lo tanto autorizo su presentación.

Loja,

f).....
Ramírez Robles Jorge Yandry, M.Sc.
DIRECTOR DE TESIS



AUTORÍA

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

f).....
Jimmy A. Riofrío Quezada



DEDICATORIA

A mis padres, por su esfuerzo, sacrificio diario y por darme las fuerzas suficientes para superar los obstáculos de mi vida, gracias a ellos y a mi Dios he sabido superarme y seguir adelante ante las vicisitudes del día a día.

Jimmy Riofrío



AGRADECIMIENTO

A Dios, por haberme dado la vida, por ser fuente de inspiración por acompañarme en cada momento de mi vida y en la realización de este trabajo.

A toda mi familia por su apoyo y lucha diaria; ellos aportaron mucho en el cumplimiento de mi sueño.

Al Departamento de Química, por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta investigación, y brindarme todos los medios a su disposición para la culminación de la misma, a todo el personal que labora en este Departamento, y en especial a Jorge Ramirez M.Sc., quién en calidad de Director de Tesis, ha sabido guiarme y ayudarme en todo momento.

Jimmy Riofrío



CONTENIDO	Pg
CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
AUTORIA.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
CONTENIDO.....	vii
RESUMEN.....	xii
ARTÍCULO.....	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. RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL.....	14
3.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.....	14
3.3. SEPARACIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	15
3.4. FRACCIONAMIENTO EN CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA.....	16
3.5. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC).....	16
3.6. UNIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRACCIONES	17
3.7. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE FRACCIONES.....	17



3.7.1. Punto de fusión.....	17
3.7.2. Factor de retención.....	18
3.8. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE FRACCIONES.....	18
3.8.1. Resonancia Magnética Nuclear.....	18
3.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA.....	19
3.9.1. Microorganismos de Prueba.....	19
3.9.2. Preparación del Extracto Orgánico y la Fracción 21-23.....	19
3.9.3. Preparación de la Solución de Inóculos.....	19
3.9.4. Microdilución en Caldo Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	20
IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS	
4.1. COMPUESTOS AISLADOS DE LA ESPECIE <i>Piper carpunya</i>	23
4.1.1. Fracción 21-23.....	24
4.1.2. Fracción 62-65.....	27
4.2. Determinación de Actividad Anti-fúngica.....	28
4.2.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	28
V. CONCLUSIONES	32
VI. RECOMENDACIONES	34
VII. ANEXOS	36



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo y condiciones de incubación para los hongos utilizados	20
Tabla 2. Resumen Cromatográfico del Extracto Orgánico de la <i>Piper carpunya</i>	23
Tabla 3. Resumen Cromatográfico de la Fracción 21-23.....	26
Tabla 4. Resultados de la caracterización de los compuestos obtenidos....	28
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	29



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.....	9
Figura 2. Dermatofitos: <i>T. rubrum</i> ; <i>T. mentagrophytes</i>	12
Figura 3. Esquema del procedimiento para la obtención del extracto.....	15
Figura 4. Esquema de separación liquido-líquido.....	16
Figura 5. Fotografía del equipo de fusión Fisher-Johns- meltingpoint Apparatus serial 40-22.....	17
Figura 6. Medida de los Rf en la placa de silica gel 60 F25.....	18
Figura 7. TLC (Hex:AcOEt 1:1) de la fracción 21-23 luego de ser revelada con Acido Sulfúrico y vainillina.....	25
Figura 8. TLC (AcOEt:MeOH 1:1) de la fracción 21-23 luego de ser revelada con ácido Sulfúrico vainillina.....	25
Figura 9. TLC (AcOEt:MeOH 1:1) de la fracción 21-23 luego de ser eluido en la columna.....	26
Figura 10. TLC (Hex:AcOEt 1:1) de la Fracción 62-65 luego de ser revelada con ácido Sulfúrico y vainillina.....	27



ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
DCM	Diclorometano
CC	Cromatografía en columna
TLC	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta
Pf	Punto de fusión
Rf	Factor de Retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
Tm	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Tr	<i>Trichophyton rubrum</i>



RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó la actividad antifúngica del extracto MeOH y de la fracción 21-23 aislada mediante Cromatografía en Columna a partir del extracto DCM de la planta medicinal *Piper carpunya* Ruiz & Pav. (Guabiduca Dulce). Dicha fracción se la obtuvo al eluir la columna con Hex/AcOEt en la proporción 9:1 v/v. Se aisló también un ácido graso a partir de la fracción 62-65 eluída con Hex/AcOEt en la proporción 75:25 v/v.

Las pruebas antifúngicas realizadas al extracto total y a la fracción fueron determinadas contra dos cepas de hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) y *Trichophyton rubrum* (Tr) el extracto total mostró un CMI de 500 µg/mL frente a *T. Mentagrophytes* y *T. rubrum* y la fracción 21-23 mostró un CMI de 250 µg/mL frente a *T. Mentagrophytes* y 125 µg/mL frente a *T. rubrum*.



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

"ISOLATION, CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITES ISOLATED FROM OF *Piper carpunya* Ruiz & Pav."

Jimmy Riofrio¹, Jorge Ramirez²

e-mail: jariofrio@utpl.edu.ec

¹ Titulación de Bioquímica y Farmacia/Universidad Técnica Particular de Loja,
San Cayetano Alto s/n, Postal Code 11-01-608, Loja, Ecuador

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

ABSTRACT

In the present research the antifungal activity the extract MeOH and the fraction 21-23 isolated through column chromatographic (CC) from DCM extract of the medicinal plant *Piper carpunya* Ruiz & Pav. (Guabiduca Dulce). This fraction was obtained to elute the column with Hex / AcOEt in the ratio 9:1 v/v. was also isolated a fatty acid from the fraction 62-65 eluted with Hex / AcOEt in the ratio 75:25 v/v.

Antifungal tests performed to the total extract and the fraction were determined against two strains of dermatophyte fungi *Trichophyton mentagrophytes* ATCC[®] 28185 and *Trichophyton rubrum* ATCC[®] 28188 the total extract showed a MIC of 500 µg/mL against *T. Mentagrophytes* and *T. rubrum* and the fraction 21-23 showed a MIC of 250 µg/mL against *T. Mentagrophytes* and 125 µg/mL against *T. rubrum*.

KEYWORDS: *Piper carpunya* Ruiz & Pav, secondary metabolites, antifungal activity, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton Mentagrophytes*.

INTRODUCTION

The family Piperaceae is comprised of 10 genus, the most representative *Piper* and *Peperomia* genus.^[1] The genus *Piper* contains over 700 species that distributed worldwide Many of these species have

application in traditional medicine as an antiseptic anti-infective.^[2] The chemistry of members of the family Piperaceae is of great interest owing to the variety of biological properties displayed.^[3] A survey of structural diversity and



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

bioactivity reveals that groups of this species specialize in the production of lignans, neolignans, terpenoids, chalcones, and flavones, which have an important biological activity.^[6,7]

Studies of the genus *Piper* at the Departamento de Química of the U.T.P.L. (Universidad Técnica Particular de Loja) have been isolated secondary metabolites which have shown antifungal activity.

P. carpunya is a bush 2 to 6 m. high that lives mainly in the Andes and the Amazon at an altitude of 1000 to 2000 m^[6]. It is usually used as intestinal constipation, inflammation, gastrointestinal protector.^[7] So far not been found reports about its chemical composition, the benefits of this genus are traditionally known by members of the areas near Loja and Zamora Chinchipe.^[7]

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

MATERIALS AND METHODS

The *P. carpunya* Ruiz & Pav were collected in the flowering stage in the sector Numbani province Zamora Chinchipe, the area of collection is

located at coordinates 728467W, 9542777 N, at a height of 975m.s.n.s.

The especie was identificate by Bolivar Merino. A voucher sample is conserved at H.U.T.P.L., with the identification number PPN-pi-010.

The extract was obtained from dried plant material (leaves) weighed 200g of the same. The plant sample was subjected to a process of dynamic maceration for 5 h at room temperature using methanol as an extraction solvent, vacuum filtered and then concentrated using the rotating evaporator moderate temperature of 30-35°C obtaining crude extract of 8.56gr.

The crude extract was subjected to liquid-liquid bipartition using a mixture: MeOH-H₂O 8:2 v/v, and an equal volume of DCM. The organic extract (5.24 gr) containing the polar metabolites of interest was subjected to chromatography separation, using as a technique, column chromatographic (CC) regarding 50-1 Silica gel, Merck 0015-0040 mm-extract, using a solvents ascending polarity (Hex, AcOEt, MeOH).

The eluted fractions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using a silica gel 60 F254. The solvents for the mobile phase using were: Hex-AcOEt (1:1) and AcOEt-MeOH (1:1) which allowed the separation and identification of compounds using the developer



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

(sulfuric acid 5% and vanillin) and UV light 254 and 366 nm.

Each isolated fraction was characterized using solubility tests, to determine the structures of 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).

Determination of antifungal activity Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

MIC values were determined by the microdilution broth using a final concentration of 5×10^4 espore/mL of *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 and *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188. The MIC was defined as the lowest concentration of substance that prevented growth, which was determined by the appearance of mycelial growth after 96 hours of incubation.^[8, 9]

Solutions of the organic extract were prepared in DMSO at a concentration of 20mg/mL. Solutions of the fraction were prepared in DMSO (1mg/200 μ L) the serial dilution was employed to get concentrations of 1000 μ g/mL to 7.81 μ g/mL. Incubation was at 30°C for 96

hours. Itraconazole was used a positive control.

The assay was carried out in 96-well microtiter plates in which is placed 180 μ L of broth from the first well, was added 20 μ L of test fraction solution was serial dilutions made procedure continued until 8 consecutive dilutions, and was adds 100 μ L of solution of inocule are used to complete to 200 μ L the final volume of the cultivation Finally the plates were incubated at 28 ° C by monitoring the growth to 96 hours.

RESULTS AND ANALYSIS

From the chromatography column were obtained 312 fractions, of which was crystallization in the fractions 21-23 and 62-65.

Isolated compounds

The Fraction 21-23 was obtained in the fractions eluted with Hex- AcOEt in ratio 90-10 v/v, and its was weight 35mg.

Physical characteristics: needle-like crystals whitish, soluble acetate, methanol and dichloromethane, with a melting point of 135-137 °C and a retention factor (Rf) of 0.82



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Interpretation of the spectrum of the fraction 21-23.

The spectroscopic data obtained suggest that the isolated compound is not pure. Antifungal Tests were performed as according (A. Ferrer 2002).^[10]

Fig.1. chromatogram revealed of fraction 21-23 cum in AcOEt-MeOH 1:1



The fraction 62-65 was obtained in the fractions eluted with Hex- AcOEt in ratio 75-25 and its was weight 15 mg.

Physical characteristics: Solid coffe, soluble ethyl acetate, methanol and dichloromethane, with a melting point of 45-47 °C and a retention factor (Rf) of 0.87.

Interpretation of the spectrum of the fraction 62-65.

The spectroscopic data obtained suggest that the isolated compound is compound is possibly a fatty acid however not tested antifungal.

Table1. Characterization of the obtained fraction.

<i>Piper carpunya</i>		
	fraction-21-23	fraction 62-65
W(g)	0.035	0.015
Mp	135-137	45-47
Rf	0.82	0.87
S	AcOEt-MeOH-Cl ₂ CH ₂	
UV.366nm	Fluorescent	
Dt	negative	

W: Weight, Mp: Melting point, Rf: Retention factor, S. Solubility: Dt: Test of Dragendorff.

Antifungal tests (MIC)

Minimum inhibitory concentration

The obtained results of the antifungal CMI are shown on the table 2. The CMI for organic extract and the fraction 21-23 for the fungi *T. Mentagrophytes* (ATCC 28185) is of 500 µg/mL for organic extract and 250 µg/mL for fraction 21-23. The CMI for *T. rubrum* (ATCC 28188) is of 500 µg/mL for organic extract and 125 µg/mL for fraction 21-23.

According to Holetz classification.^[11] the concentration that metabolite secondary inhibits the growth to is good.

But it not been possible to find investigations with the strains evaluated in this study, and these are responsible for various superficial mycoses worldwide.^[8]



UTPL

UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Table2. Minimal inhibitory concentration (MIC) for the evaluated fungi

Minimal Inhibitory concentration (µg/mL)		
Fraction	Tm	Tr
organic extract	500	500
fraction 21-23	250	125

Itraconazole; positive controls 100% inhibition (7,81µg/mL)

Tm: *T. Mentagrophytes* ATCC®28185.
Tr: *T. rubrum* ATCC®28185.)

CONCLUSIONS

By column chromatography of the total extract of the species was isolated two fractions that were crystallized, the first in the fraction 21-23 in ratio 90-10 (Hex-AcOEt) and the second in the fraction 62-65 in ratio 75-25 (Hex-AcOEt).

The fraction 21-23 showed activity with the fungi *T. Mentagrophytes* (ATCC 28185) and *T. rubrum* (ATCC 28188), this finding is important given that these fungi are responsible for various superficial mycoses^[8] Therefore we recommend continue the study of the specie *Piper carpunya* Ruiz & Pav

ACKNOWLEDGEMENT

To the Departamento de Química of the Universidad Técnica Particular de Loja for funding this research, all staff working in this department.

REFERENCES

1. De Oliveira, L. *et al.* (2004) Genetic Diversity of “*Pimenta longa*” Genotypes. *Mol. Biol.*
2. Flor d. María, John Peña, Luis B. Rojas, Alfredo Usubillaga, Pablo Meléndez. (2008). Composición química de los aceites esenciales de *Piper dilatatum* L.C. Rich. Y *Piper tuberculatum* Jacq. De Mérida, Universidad de los Andes Venezuela.
3. Massuo J. Kato, and Maysa Furlan, Chemistry and evolution of the Piperaceae, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 79, No. 4, pp. 529–538.
4. Flores, Esther N., Jimenéz, Antonio, Ravelo, Angel G., Bourdy, Genevieve, Giménez, Alberto (2000). Estudio Fitoquímico de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida *in vitro*.
5. Kunth, K. *Bemerkungenuber die Familie Piperaceae.* 1839, *Linnea*-13, 562-726.



UTPL

**UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA**

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

6. Jørgensen, P.M. & S. León-Yáñez (Eds.). 1999. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 75: i–viii, 1–1182.
7. Cerón, C. E. (2002). La etnobotánica en el Ecuador. Cinchona 3(2): 1-16.
8. Hernández Salazar A, Carbajal Pruneda P, Fernández Martínez R, Arenas R. (2007). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. Rev Iberoam Micol; 122(24): 122-124
9. Winn, Allen. Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger, Woods, (2008) Diagnóstico Microbiológico, Sexta edición, Editorial Médica Panamericana, pg.: 1140-14
10. Ferrer 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.
11. Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez D, Nakamura C, Filho B (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. MemInst Oswaldo Cruz.Vol: 97, p.p.1027–31.

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



I. FIN, PROPOSITO, Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. FIN DEL PROYECTO

Aportar al estudio de la bioprospección de metabolitos secundarios a partir de plantas medicinales de la flora del sur del Ecuador y contribuir con nuevas moléculas que actúen como principios activos para la fabricación de fármacos anti-fúngicos a través del estudio fitoquímico de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.

1.2. PROPÓSITO DEL PROYECTO

Aislar, identificar y determinar la actividad antifúngica de metabolitos secundarios a partir de la planta medicinal *Piper carpunya* Ruiz & Pav. frente a los hongos *T. mentagrophytes* ATCC® 2885y *T. rubrum* ATCC® 28188.

1.3. COMPONENTES DEL PROYECTO

- 1.- Recolectar y obtener el extracto total de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.
- 2.- Realizar el fraccionamiento de los metabolitos secundarios de *Piper carpunya* Ruiz & Pav, mediante técnicas cromatográficas (CC) y (TLC).
- 3.- Evaluar la actividad antifúngica del extracto total y de los metabolitos secundarios aislados de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. Frente a: *T. mentagrophytes* ATCC® 2885, *T. rubrum* ATCC® 28188.

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES



II. Introducción y Antecedentes

2.1 Introducción

El afán por conocer y dar a conocer las bondades de las plantas medicinales, así como las diferentes afecciones que curan ha sido un tema tratado desde que la humanidad existe.¹ Actualmente, los productos naturales gozan de amplia aceptación y reemplazan, cada vez más, a los productos sintéticos o materiales generados artificialmente.²

Ecuador es considerado un país mega diverso, cuenta con un clima tropical y subtropical que lo hace adecuado para el crecimiento de especies vegetales que son de interés para el estudio de su bioactividad con fines terapéuticos.³ Se ha demostrado además que los medicamentos naturales son muy complejos y actúan de manera combinada haciendo más difícil para los agentes infecciosos desarrollar resistencia frente a estos compuestos.⁴

Nuestro país cuenta con una riqueza abundante en especies vegetales en donde la aplicación de la medicina natural resuelve los problemas de salud, como es el caso de las comunidades indígenas, donde se aprovechan los recursos naturales del país que posee mayor biodiversidad por Km² alrededor del mundo.⁵ En detalle Loja y Zamora poseen el 36 % del total de las especies del Ecuador.⁶

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

² Nayive Pino Benítez, Erika Melendez, Elena E. Stashenko. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (4), 301 – 304.

³ Naranjo, P., Escaleras, R., (1995). La Medicina Tradicional en el Ecuador. Corporación Editora Nacional, Quito, p. 192

⁴ Evelyn Johanna Trejos Lopez. (2009) Evaluación de Parámetros Para Pruebas De Susceptibilidad Antifúngica En Hongos Filamentosos Mediante La Técnica de Difusión en Agar.

⁵ Cerón, C. E. (2002). La etnobotánica en el Ecuador. Cinchonia 3(2): 1-16.

⁶ Ordoñez, L., Ambrose, K., Borja, R., Cueva, K y Gonzales, L. (2006). Proyecto “La biodiversidad como sustento de vida en los bosques de ceja andina: uso sustentable de la agrobiodiversidad de los bosques de ceja de montaña del Carchi- Ecuador”, Anexos 1- 4 Informe final del Proyecto Ceja Andina.



La creciente incidencia y diversidad de las infecciones fúngicas, y el incremento de resistencia a los tratamientos convencionales, ha despertado el interés de la investigación por mejorar el conocimiento que se tiene acerca de las micosis y las posibilidades de nuevas terapias.⁷

La familia Piperaceae está comprendida por 10 géneros, siendo las más representativas el género *Piper* y *Peperomia*.⁸ El género *Piper* tiene más de 700 especies distribuidas en todo el planeta.⁹ La mayoría de estas especies son muy utilizadas en la medicina tradicional como antisépticos anti-infeccioso.¹⁰ Estudios fitoquímicos y biológicos realizados en esta familia han sido motivo de interés por sus numerosas aplicaciones farmacológicas. Entre las especies más estudiadas están *Piper nigrum* (pimienta negra), *Piper methysticum* (Kava), *Piper hispidum* (matico), *Piper tuberculatum* (matico), entre otras.^{11,12}

Investigación previa reporta que las hojas de *Piper carpunya* (Guabiduca dulce) son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional de los países tropicales y subtropicales de América del sur como anti-inflamatorio, anti-ulcera, anti-diarreico y anti-parasitario así como dolencias o irritaciones en la piel.¹³

Hoy en día se desarrollan y aplican metodologías para fraccionar y aislar metabolitos secundarios presentes en especies con antecedentes terapéuticos entre los cuales tenemos las técnicas: cromatografía en columna y de capa

⁷ Dabur R., H. Singh, A.K. Chhillar, M. Ali & G.L. Sharma. (2004). Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 75(3-4): 389-391.

⁸ De Oliveira, L. *et al.* (2004) Genetic Diversity of "*Pimenta longa* " Genotypes. *Mol. Biol.*

⁹ Flor d. María, John Peña, Luis B. Rojas, Alfredo Usubillaga, Pablo Meléndez. (2008) Composición química de los aceites esenciales de *Piper dilatatum* L.C. Rich. Y *Piper tuberculatum* Jacq. De Mérida, Universidad de los Andes Venezuela

¹⁰ Balladelli Pier Paolo. (1996). Entre lo Mágico y lo Natural. Quito

¹¹ Molina J., García A. (2001). Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva*, 20: 377-387.

¹² Delgado W., Cuca L. (2007). Chemical composition of essential oil from fruits of *piper hispidum* Kunth. *Revista Productos Naturales*, 1(1:5-8)

¹³ Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, de Mendonça S, Oliveira LF, Martín-Calero MJ, Vidari G. (2010). Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *J Ethnopharmacol.*



fina, que permiten separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas.¹⁴

2.2. Antecedentes

La existencia de las plantas medicinales no constituye una casualidad, sino que fueron puestas en la creación para el bien del hombre y que estos medios tan sencillos y naturales fueron usados con fe por nuestros antepasados desde hace miles de años.¹⁵

La naturaleza es una fuente inagotable de sustancias químicas, muchas de los cuales llegan a ser verdaderas herramientas farmacológicas.¹⁶ Las propiedades biológicas de estos compuestos son muy diversas: antitumoral, antibiótica, citostática, antifúngica, antioxidante, insecticida o antiinflamatoria.¹⁷ La variedad de estructuras carbonadas, las diferentes actividades terapéuticas mostradas y la elucidación de rutas biosintéticas hacen que el aislamiento, identificación, y ensayo de nuevas sustancias naturales siga teniendo un enorme interés.¹⁸

La región sur del Ecuador dentro de la cual se encuentran ubicadas las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe tiene una gran riqueza vegetal.¹⁹ De ahí la importancia de esta investigación como aporte al estudio de plantas medicinales del sur del Ecuador impulsado por el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, donde se investiga los metabolitos secundarios responsables de cierta actividad biológica a partir de especies

¹⁴ Skoog, D., Holler, J, Nieman T. (2003) Principios de análisis Instrumental España pag.730

¹⁵ Suley Pino-Rodriguez, Sylvia Prieto-González, Marta Elena Pérez-Rodriguez y Jorge Molina-Torres. (2004). Género *Erythrina*: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica. *Acta Farm. Bonaerense* 23 (2): 252-8

¹⁶ Esther N. Flores Quisbert (2007) Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género *Piper* de la flora boliviana. Tesis doctoral de la Universidad de la Laguna.

¹⁷ Oliveira M., Velázquez, D., Bermúdez. A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Revista de ciencia y tecnología de América*.30 (8): 453-459

¹⁸ M. Pilar López Gresa. (2006) Aislamiento, purificación y caracterización estructural de nuevos principios bioactivos a partir de extractos fúngicos. Departamento de Química Universitat Politècnica de Valencia.

¹⁹ Vicente Tene, Omar Malagón, Paola Vita Finzi, Giovanni Vidari, Chabaco Armijos, Tomas Zaragoza. (2007).An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador, *Journal of Ethnopharmacology* p.p. 63–81



vegetales nativas, y que además poseen antecedentes medicinales tradicionales aplicables.

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 flavonoides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas.²⁰

Los beneficios que ofrece esta familia son tradicionalmente conocidas por los integrantes de las zonas aledañas de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe utilizada comúnmente para combatir constipados intestinales, inflamación, antisépticos protector gastrointestinal.²¹ 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 especies.²²

En esta investigación se realizó un estudio fitoquímico del extracto metanólico obtenido de la especie; además se evaluó la actividad biológica frente a cepas fúngicas usando el método de CMI.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, así como el interés biológico de los metabolitos aislados en la fitoquímica del género *Piper*.

Características Botánicas

Familia Piperaceae.

Las principales características de la familia Piperaceae son las de ser arbustos y trepadoras leñosas de hojas alternas, simples, a menudo con glándulas de aceites aromáticos, en ocasiones algo carnosas. Flores pequeñas, bisexuales o

²⁰ Flores, Esther N.¹, Jimenez, Antonio ², Ravelo, Angel G.², Bourdy, Genevieve³, Gimenez, Alberto¹; (2000). Estudio Fitoquímico de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida *in vitro*.

²¹ Cerón, C. E. (2002). La etnobotánica en el Ecuador. *Cinchonia* 3(2): 1-16.

²² Garcia, B. H. (1974). "Flora Medicinal de Colombia: Botánica Médica". Tomo I, Imprenta Nacional, Bogotá, D. E.



unisexuales, dispuestas en espádices o espigas opuestas a las hojas por lo general. Tienen 1 a 10 estambres y carecen de pétalos y sépalos. Fruto en baya carnosa indehisciente, con una sola semilla.²³

La familia *Piperaceae* comprende diez géneros y unas 3.000 especies de distribución pantropical. Los géneros que incluye son: *Piper* (mayor 700 especies), *Peperomia* (mayor 500 especies), *Trianaeopiper* (44 especies), *Ottonia* (187 especies), *Arctotonia* (17 especies), *Macropiper* (30 especies), *Manekia* (9 especies), *Pothomorphea* (41 especies), *Sarcorachis* (15 especies), *Verhuellia* (8 especies) y *Zippelia* (6 especies).²⁴ Siendo las dos primeras las más estudiadas.

Genero *Piper*

Las *Piper* son arbustos, árboles pequeños o hierbas, erectos o escandentes, aromáticos, con tallos nudosos, hojas alternas, con nervaduras pinnadas, palmadas o paralelas y nervación secundaria conspicua, perfiles recubriendo las yemas axilares, inflorescencia, espigas carnosas, flores bisexuales, diminutas, axilares a brácteas peltadas, fruto una drupa.²⁵

Este género comprende más de 700 especies. Ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo, la gran mayoría de las cuales se encuentran en los trópicos de América (más 700 especies), seguido por el Sur de Asia (más 300 especies).²⁶ Los patrones de distribución de las especies de *Piper* varían desde especies endémicas hasta aquellas que presentan una amplia distribución geográfica.²⁷ Existen numerosas especies que se

²³ Esther N. Flores Quisbert (2007) Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género *Piper* de la flora boliviana. Tesis doctoral de la Universidad de la Laguna

²⁴ Kunth, K. *Bemerkungenuber die Familie Piperaceen*. 1839, Linnea-13, 562-726.

²⁵ De 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. 120-122

²⁶ Esther N. Flores Quisbert (2007) Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género *Piper* de la flora boliviana. Tesis doctoral de la Universidad de la Laguna

²⁷ Benigna Mamani Tincusi (2001). Metabolitos secundarios bioactivos de la flora medicinal iberoamericana: *piper elongatum*, *copaifera paupera*, *crossopetalum tonduzii* y *maytenus cuzcoina*. Tesis doctoral de la Universidad de la Laguna.



encuentran restringidas a centros específicos de diversidad, como por ejemplo los Andes o Centro América.²⁸

La química de especies de *Piper* ha sido ampliamente investigada y los estudios fitoquímicos han conducido al aislamiento de numerosos compuestos fisiológicamente activos. Los estudios fitoquímicos sobre especies de *Piper* han revelado una amplia variedad de constituyentes, destacando los alcaloides, lignanos, neolignanos y terpenos. Así, de un total de 592 metabolitos aislados, 145 resultaron ser alcaloides, 47 lignanos, 71 neolignanos y 89 terpenos. Recientemente se ha publicado una revisión de los compuestos aislados de especies del género *Piper*, donde se hace énfasis en la actividad biológica presentada por los diferentes metabolitos aislados.²⁹

Características botánicas de la especie *Piper carpunya* Ruiz & Pav



Figura.1. *Piper carpunya* Ruiz & Pav.
Fuente: Herbario "HUTPL"

²⁸ Esther N. Flores Quisbert (2007) Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género *Piper* de la flora boliviana. Tesis doctoral de la Universidad de la Laguna

²⁹ Virinder 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. and Per M.B., (1997) *Phytochemistry*, 46, 597-673.



División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: *Piper*

Especie: *Piper carpunya*

Piper carpunya Ruiz & Pav. Conocida comúnmente como Guabiduca Dulce es un arbusto de 2 a 6 metros de altura que habita principalmente en los Andes y en la Amazonía a una altitud de 1000 a 2000 msnm. Los beneficios que ofrece esta especie son tradicionalmente conocidas por los integrantes de las zonas aledañas de las provincias de Zamora Chinchipe y Loja utilizada comúnmente para combatir constipados intestinales, inflamación, y como protector gastrointestinal.³⁰

Enfermedades Infecciosas

La enfermedad infecciosa es un estado patológico, que surge como consecuencia de una agresión de patógenos al organismo humano y la respuesta inmune del mismo fundamentalmente relacionada con las características genéticas, propias del sujeto y del agente. Entre los microorganismos causantes se encuentran: bacterias, hongos, virus, y a veces, protozoos, etc.³¹

³⁰ Jørgensen, P.M. & S. León-Yáñez (eds.). (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 75: i–viii, 1–1182

³¹ Vaquer J, Domínguez A. (2001). Vigilancia epidemiológica. Investigación de brotes epidémicos. 10ª ed. Barcelona. 177-188



En los últimos años las enfermedades infecciosas ocasionan en conjunto en todo el mundo 13,3 millones de muertes al año, que representan el 25 % del total y son la segunda causa de muerte.³²

Las enfermedades infecciosas están determinadas por agresiones de microorganismos, que se multiplican en el sujeto y mecanismos inmunológicos que tratan de controlarlos. El organismo que es agredido reconoce y organiza su respuesta, actuando con todos sus mecanismos, para eliminar las noxas. Los agentes patógenos pueden ser reunidos, por sus características comunes y/o especiales en grupos y los mismos interactúan con el sujeto de diversas maneras.³³ La resistencia a múltiples sustancias es un problema de salud pública que se viene observando a nivel mundial después de la aparición de los antibióticos.³⁴

Dermatofitosis

La dermatofitosis es una micosis superficial de gran importancia y puede afectar a piel, cabellos y uñas. Estos hongos son patógenos primarios que poseen queratinasas lo que les permite utilizar la queratina de esas estructuras como fuente de nitrógeno. Existen tres géneros de dermatofitos: *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Trichophyton*, cada uno de ellos con varias especies. Las dermatofitosis son las micosis más comunes a nivel mundial, y son conocidas también como “tiñas”, y según la topografía se clasifican en tiña de la cabeza, tiña del cuerpo, tiña de la mano, tiña de los pies, tiña de la ingle, tiña del área del pañal y tiña de las uñas.³⁵

³² Anderson RM, May RM. (2004). Infectious diseases of humans. Dynamics and control, Oxford: Oxford University Press.

³³ Antoni S, Raimondo O. (2005). Clínica de enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina de la UNT, Tucumán Argentina.

³⁴ Cabrera C, Gómez R, Zúñiga A (2007), La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación, Colombia Medica; Vol: 38; p.p. 149-158

³⁵ Winn, Allen. Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger, Woods, (2008) Diagnóstico Microbiológico, Sexta edición, Editorial Médica Panamericana, pg.: 1140-141



Las dermatofitosis por *Trichophyton rubrum* se consideran las micosis superficiales más frecuentes en el mundo occidental. *T. rubrum* es un dermatofito antropófilo que ha sido frecuentemente encontrado en infecciones de pie, ingie y uñas principalmente.³⁶

Las dermatofitosis por *Trichophyton mentagrophytes* es otro de los agentes causales de dermatofitosis más frecuente. Se caracteriza por presentar un crecimiento relativamente rápido. Presentan dos tipos de colonias: algodonosas o granulares. Las variantes algodonosas son inicialmente blancas, pero pueden tornarse de color crema o acre con la madurez. Las variantes granulares producen colonias planas que se diseminan con una superficie granular gruesa. Al comienzo las colonias son blancas o amarillo intensas, pero después se tornan de color acre o castaño.^{37,38}

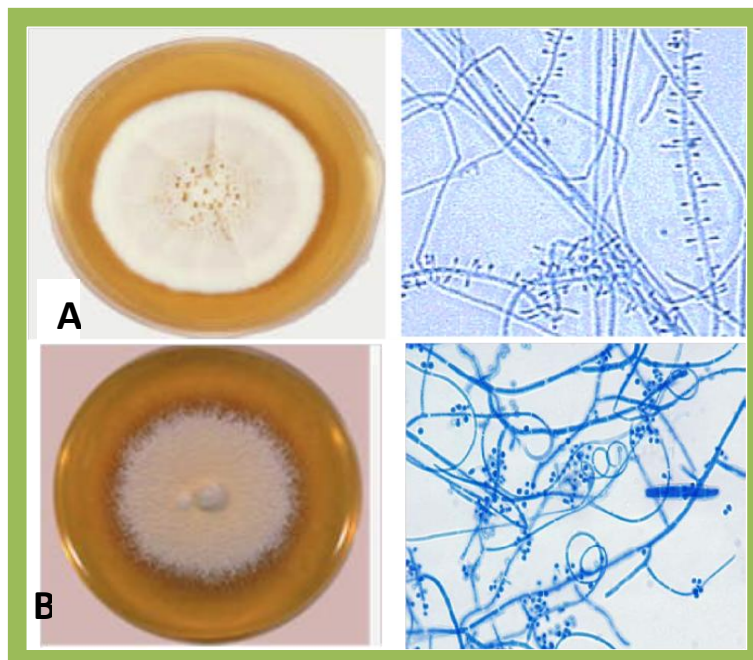


Fig.2. Dermatofitos: a) *T. rubrum*; b) *T. mentagrophytes*
Fuente: www.facmed.unam.mx: Agosto (2009)

³⁶ Hernández Salazar A, Carbajal Pruneda P, Fernández Martínez R, Arenas R. (2007). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. Rev Iberoam Micol; 122(24): 122-124

³⁷ Hernández A, Carbajal P, Fernández R, Arenas R, Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México, Rev. Iberoamericana de Micología 2007; 24: 122-12

³⁸ www.facmed.unam.mx: Agosto (2009)

III. MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección del Material vegetal

Las hojas en estado de floración de *P. carpunya* se recolectaron el 07 de agosto de 2007 en el barrio Numbani, perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe, el sector de recolección se encuentra ubicado en las coordenadas 728467 E, 9542777 N, a una altura de 975 m.s.n.m. Se preparó una muestra de herbario para su identificación; cuyo vaucher: PPN-pi-010; se encuentra depositado en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja. La caracterización botánica la realizó Bolivar Merino del herbario de la Universidad Nacional de Loja.

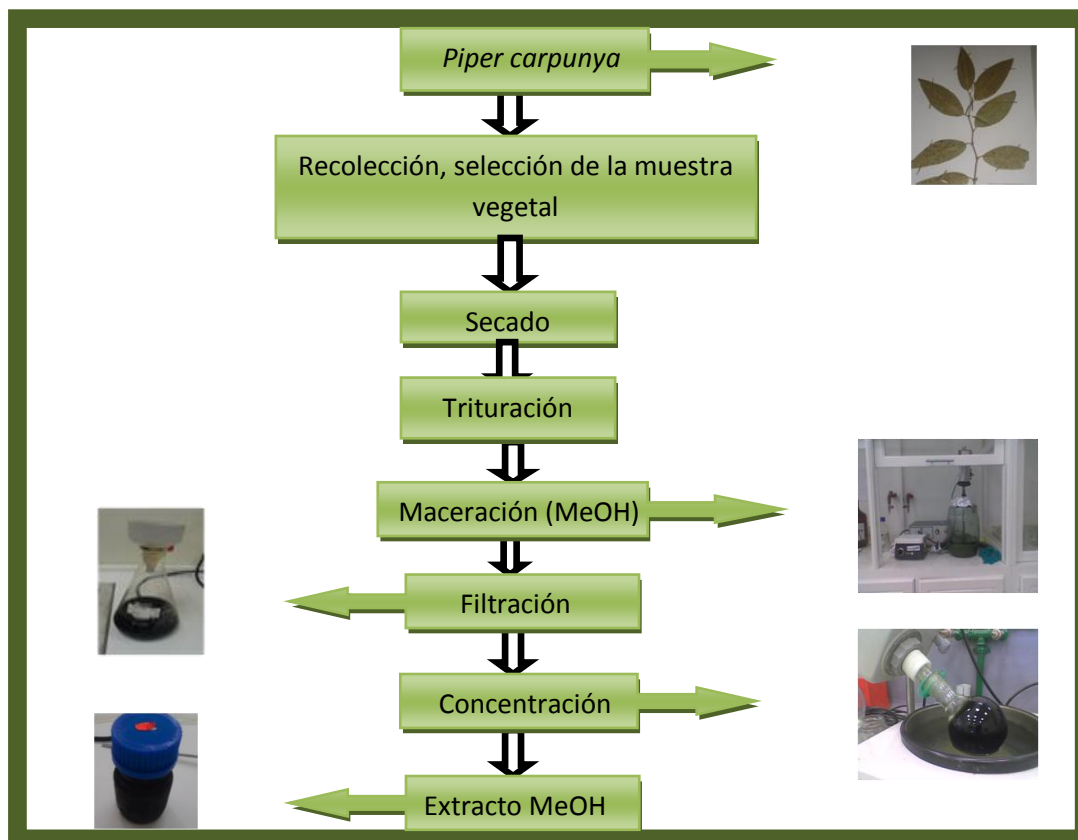
3.2. Obtención del Extracto

El material vegetal recolectado fue secado a una temperatura de 37 °C, durante dos días, posteriormente fue triturado y sometido a tres extracciones consecutivas con metanol en una relación 1:10 planta-solvente mediante el método de maceración dinámica por 5 h a temperatura ambiente.

La extracción se basa en la solubilidad de los diversos compuestos existentes en la materia vegetal, el solvente de alta polaridad (MeOH) nos permitió obtener un extracto que contenía la mayor parte de constituyentes químicos del material vegetal. El extracto fue filtrado y concentrado mediante rotaevaporación a 35 °C. A continuación se muestra el esquema del procedimiento para la obtención del extracto.



Figura 3: Esquema del procedimiento para la obtención del extracto



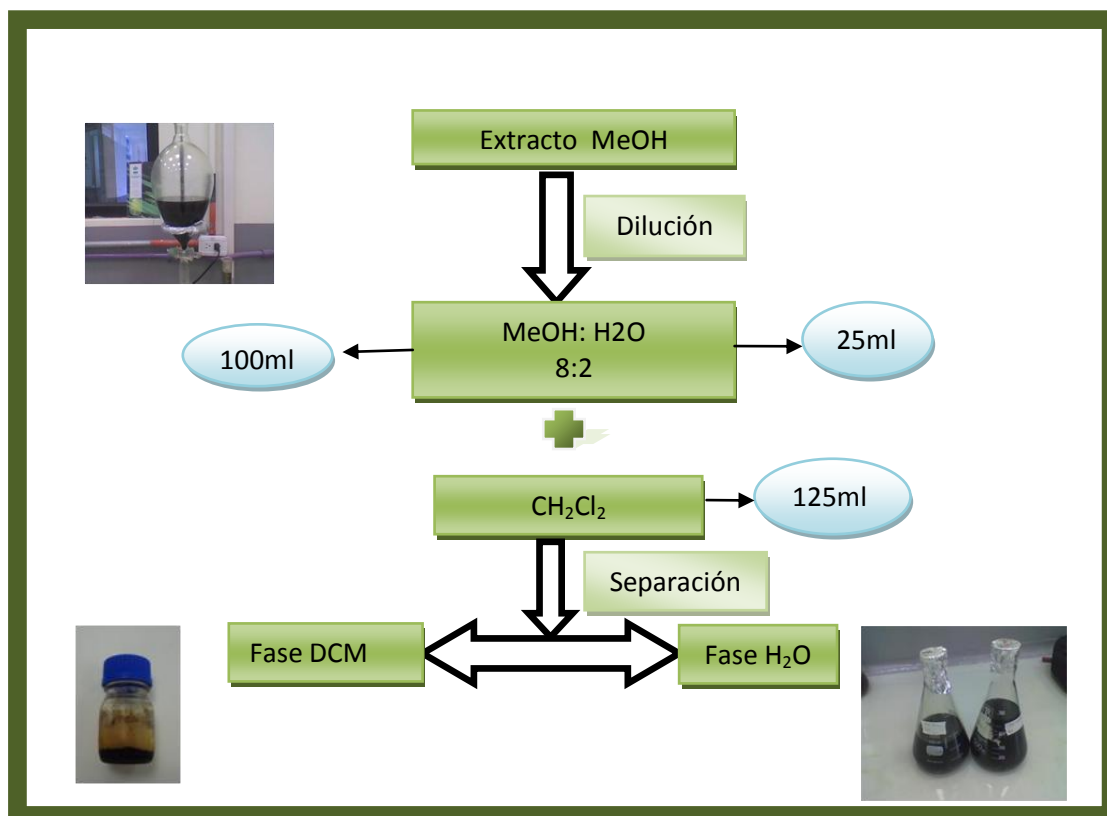
Elaboración: El Autor

3.3. Separación liquido- líquido

El extracto total seco se sometió a una separación liquido-liquido, utilizando una mezcla: MeOH-H₂O 8:2 v/v; e igual volumen de DCM. La fase orgánica se utilizó para la separación de metabolitos secundarios a través del uso de técnicas cromatográficas como CC. A continuación se muestra un esquema de separación liquido-liquido.



Figura 4: Esquema de separación líquido-líquido



Elaboración: El Autor

3.4. Fraccionamiento en Cromatografía en Columna

Esta técnica consiste en la separación de componentes de una mezcla, mediante una fase móvil, la misma que pasa a través de la fase estacionaria.³⁹

El extracto total orgánico (fase DCM 5.24 gr) fue sometido a fraccionamiento en cromatografía en columna (CC), (Silica Gel, Merck 0.015-0040 mm), en relación 1:50 la misma que fue eluída con solventes de polaridad ascendente (Hex, AcOEt y MeOH)

3.5. Cromatografía de Capa Fina

Continuamente se realizó ensayos en cromatografía de capa fina (TLC) donde se utilizó una placa de sílice gel 60 F₂₅₄ (fase directa). Los solventes utilizados

³⁹Sherma. Thin-Layer Chromatography. In R.A. Meyers. 2002. Encyclopedia of analytical Chemistry). Wiley, Chichester.



para la fase móvil fueron Hex:AcOEt (1:1) v/v, y AcOEt:MeOH (1:1) v/v los cuales permitieron la separación e identificación de los compuestos. La visualización posterior se realizó con luz ultravioleta 254 y 365 nm.

3.6. Unión, Purificación de Fracciones

La unión de las fracciones se efectuó en relación a la altura de las manchas y la similitud visual que estas reflejaron ante la luz ultravioleta de 254 y 365 nm y al revelador utilizado ácido sulfúrico al 5% y Vainillina (Anexo1).

3.7. Caracterización Química de Fracciones

La caracterización se efectuó a partir de las fracciones obtenidas con la ayuda de cromatografía de capa fina y UV (254 y 365 nm) con el punto de fusión de cada una de ellas, solubilidad y reveladores específicos.

3.7.1 Punto de Fusión

El punto de fusión se determinó calentando lentamente (aproximadamente un grado por minuto) una pequeña cantidad del material sólido, el equipo que se empleó fue Fisher-Johns- Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60Hz figura 5.

Figura 5: Equipo de fusión Fisher-Johns- Melting PointApparatus serial 40-22.



Elaboración: El Autor

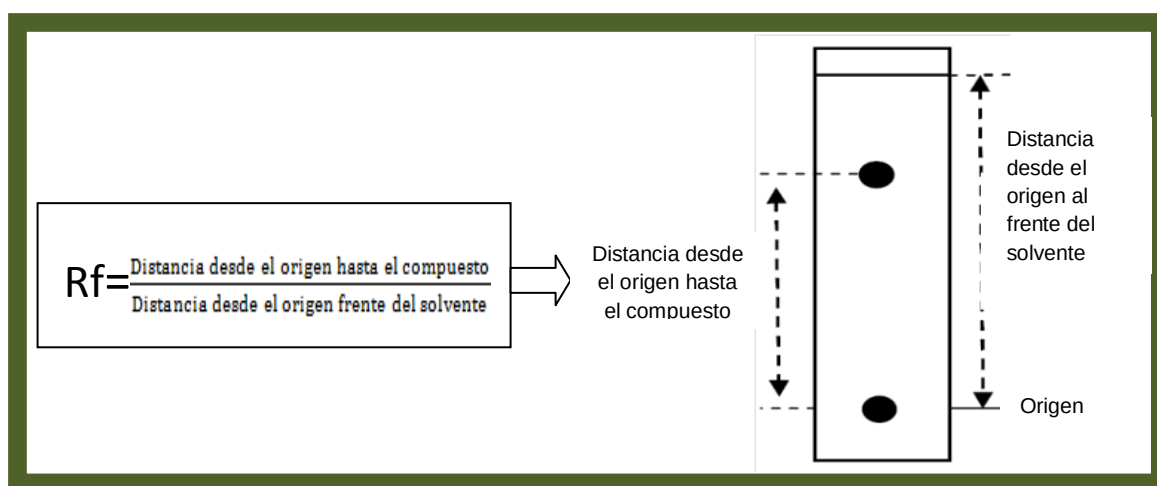


3.7.2 Factor de Retención

Se define como la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación / distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.⁴⁰

Los Rf de las fracciones se calcularon de acuerdo a la fórmula que se indica a continuación, considerando como referencia la figura 6.

Figura 6: Medida de los Rf en la placa de silica gel 60 F254.



Elaboración: El Autor

3.8. Caracterización Estructural de Fracciones

3.8.1 Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopia 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 un disolvente deuterado (CDCl₃) en un tubo de vidrio que se sitúa dentro del campo magnético del equipo. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical, el ordenador recoge la

⁴⁰ Choma I. 2005. The use of Thin Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. LCGC Europe



intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, generando finalmente las respectivas graficas.⁴¹

Los espectros de RMN fueron obtenidos en un equipo Varian N° de serie 21953 operando a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , usando CDCl_3 y DMSO.

3.9. Determinación de la Actividad Anti-fúngica

3.9.1. Microorganismos de Prueba

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

3.9.2. Preparación del Extracto Orgánico y Fracción 21-23

Para la disolución del extracto orgánico y la fracción 21-23 para las pruebas de Microdilución en Caldo se utilizó 20 mg del Extracto Orgánico diluido en 1000 μL de Dimetil sulfóxido (DMSO) y 1 mg de la Fracción se disolvió en 200 μL de Dimetil sulfóxido (DMSO).

3.9.3 Preparación de la Suspensión de Inóculos

Se preparó la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ tomando de estas 49 μL diluidos en 7mL de Caldo Sabouroud para el *T. mentagrophytes* ATCC® 28185 y 68 μL diluidos en 7mL de Caldo Sabouroud para el *T. rubrum* ATCC® 28188. Posteriormente se uso 100 μL de esta suspensión para completar 200 μL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL.

⁴¹ García L. A, 2001. Determinación de estructuras por métodos espectroscópicos. Memorias Curso UANL.



Tabla 1. Medios de cultivo y condiciones de incubación para 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

Elaboración: El Autor

3.9.4 Microdilución en Caldo Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Es un método que consiste en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo.⁴²

Las pruebas se realizaron en placas de 96 pocillos mediante dilución doble seriada de la siguiente manera: colocamos 180 µL de caldo Sabouraud al primer pocillo y 100 µL a todos los demás pocillos restantes, luego se adiciona 20µL de la disolución de prueba en el primer pocillo y mezclamos. Se realiza diluciones seriadas tomando 100 µL del primer pocillo y diluyendo con 100µL del pocillo siguiente y se continúa este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se sigue el mismo procedimiento para el control de esterilidad (200µL caldo), control negativo (180 µL caldo + 20 µL DMSO) y para el control positivo (180 µL caldo + 20µL Itraconazol a 1000 ppm).

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 un volumen final de 200 µL en la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población final del inóculo a 5×10^4 esporas/mL, y una concentración final de la disolución de prueba de 1000 a 0.5 µg/mL en las diluciones seriadas consecutivas el control positivo se emplea una solución de 1 mg/mL de Itraconazol. Se incuban las placas a 28 °C y se monitorea el crecimiento hasta las 96 horas.

⁴² Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2005 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).



La lectura de la CMI 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.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Compuestos aislados de la especie *Piper carpunya Ruiz & Pav.*

Los componentes del extracto orgánico se separaron en zonas o bandas localizadas a lo largo de toda la columna. El aislamiento de las especies separadas por su fase móvil permitió recoger las bandas individuales, obteniendo en total 312 fracciones. Todas las fracciones eluídas fueron analizadas por cromatografía de capa fina (TLC), usando placas de sílica gel 60F254 (fase directa).

En la Tabla 2 se exponen los disolventes empleados y las proporciones a las cuales las fracciones fueron eluídas así como también la apariencia física que presentaron.

Tabla 2: Resumen cromatografico del Extracto Orgánico de la *Piper carpunya Ruiz & Pav.*

Eluyente	Proporción %	Fracciones	Fracciones combinadas	Apariencia
Hex	100	1-5		Aceitosa
Hex:AcOEt	95-5	6-17	21-23	Aceitosa
	90-10	18-38		Sol. Cristalina
	85-15	39-51		Sólida
	80-20	52-61		Sólida
	75-25	62-67	62-65	Sol. Blanquecino
	70-30	68-76		Sólida
	65-35	77-100		Sólida
	60-40	101-118		Sólida
	50-50	119-130		Sólida
	40-60	131-144		Sólida
	30-70	145-163		Sólida
	20-80	164-175		Sólida
	10-90	176-189		Sólida
AcOEt	100	190-209		Sólida



	95-5	210-246	Sólida
	90-10	247-255	Sólida
	80-20	256-260	Sólida
	70-30	261-267	Sólida
	60-40	268-275	Sólida
	50-50	276-281	Sólida
AcOEt:MeOH	40-60	282-286	Sólida
	30-70	287-295	Sólida
	20-80	296-300	Sólida
	10-90	301-306	Sólida
MeOH	100	307-312	Sólida

Elaboración: El Autor

Como se observa en la Tabla 2 las fracciones 21-23 fueron unificadas al evaporarse el disolvente presentaron la formación de cristales así como también en las fracciones 62-65. Tuvo una apariencia solida blanquecina. Las fracciones que llegan a cristalizar son compuestos que presentan un alto grado de pureza.⁴³ Por ello se decidió realizar en los mismos las pruebas respectivas debido a que se facilita la identificación molecular de dichos compuestos.

4.1.1. Fracción 21-23

La Fracción fue eluída con Hex:AcOEt en proporción 90-10 v/v. El precipitado tuvo la apariencia de solido cristalino, luego de ser lavado sucesivamente con hexano, se obtuvieron 35 mg, su punto de fusión fue de 135-138 °C. La fracción fue soluble en AcOEt, MeOH y DCM e insoluble en Hex. Su cromatografía de capa fina figura 7, corrida con Hex:AcOEt en proporción 1:1 v/v, dio una mancha morada al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina dando un Rf de 0,82.

⁴³Cronquist A. 1999 On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms". *Plant Syst Evol.*, suppl 1: 179-189.



Figura.7. TLC (Hex:AcOEt) de la Fracción 21-23 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina y se muestra su Rf 0,82.



Elaboración: El Autor

Luego de analizar los espectros de RMN (Anexo 2) no se pudo llegar a su caracterización ya que los datos obtenidos para este compuesto no lo permitieron; pues los espectros de resonancia magnética nuclear indican que el compuesto no está totalmente puro y muy probablemente se trate de una mezcla de compuestos. En la figura 8 se muestra una TLC de la fracción corrida con AcOEt:MeOH en proporción 1:1 v/v en donde se puede apreciar la presencia de dos manchas. Por lo cual fue sometido a una mini columna para poder lograr la separación de estos dos compuestos y así poder determinar su caracterización.

Figura.8. TLC (AcOEt-MeOH 1:1) de la fracción 21-23 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina



Elaboración: El Autor



El montaje de la mini columna se realizó con una muestra total de 13 mg en una relación 1-100 muestra-silica. En la tabla 3 se exponen los disolventes empleados y las proporciones a las cuales las fracciones fueron eluidas así como también la apariencia que presentaron.

Tabla 3: Resumen Cromatográfico de la Fracción 21-23

Eluyente	Proporción %	Fracciones	Frac. combinadas	Apariencia
AcOEt	100	01-05	1-4	Escarcha Blanquecina
AcOEt:MeOH	75-25	05-11		Poco Visible
	70-30	12-14		Poco Visible
	65-35	15-19		Poco Visible
	60-40	20-26		Poco Visible
	55-45	27-31		Poco Visible
	50-50	32-36		Poco Visible
	45-55	37-41		Poco Visible
	40-60	42-46		Poco Visible

Elaboración: El Autor

Los resultados obtenidos de dicha mini columna no fueron nada alentadores no se logro separar las dos manchas presentes y no fue posible realizar la caracterización estructural del compuesto como se muestra en la figura 9 se observa una TLC realizada a la fracción 21-23 antes y después de la mini columna.

Figura.9. TLC (AcOEt:MeOH 1:1) de la fracción 21-23 luego de ser eluido en la columna.



Elaboración: El Autor



4.1.2. Fracción 62-65

Las fracciones fueron eluidas con Hex:AcOEt en proporción 75:25 v/v, el cual se lavó y purificó con hexano hasta obtener un polvo blanquecino. Al igual que el primer compuesto este también fue soluble en AcOEt, MeOH y DCM e insoluble en Hex.

El punto de fusión del compuesto fue de 45-47 °C, obteniéndose la cantidad de 15 mg, la cromatografía de capa fina figura 10, corrida con Hex:AcOEt en proporción 1:1 v/v dio como resultado una mancha color morada clara al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina dando un Rf de 0,87.

Figura.10. TLC (Hex:AcOEt) de la Fracción 62-65 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina y se muestra su Rf de 0,87.



Elaboración: El Autor

Luego de analizar los espectros de RMN (Anexo 3) se determinó que se trataba de un ácido graso. La caracterización estructural y pruebas de actividad antifúngica no fueron realizadas. En Investigaciones previas reportan que los ácidos grasos forman parte del metabolismo primario de las plantas.⁴⁴

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

⁴⁴ Suley P., Sylvia P., Marta E., Jorge M., (2004) Género *Erythrina*: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica *Acta Farm. Bonaerense* **23** (2): 252-8



Tabla 4: Resultados de la caracterización de los compuestos obtenidos

<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav		
	Fracción 21-23	Fracción 62-65
Peso(g)	0.035	0.015
Apariencia Física	Cristal Blanquecino	Sol. blanquecino
Punto de Fusión °C	135-137	45-47
Rf	0,82	0,87
Solubilidad	AcOEt-MeOH-Cl ₂ CH ₂	
Lámpara UV 254nm/366nm	Fluorescente	
Revelador	Acido Sulfúrico al 5% y vainillina	
Prueba de Dragendorf	negativa	
Color del Revelado	Mancha Morada	

Elaboración: El Autor

4.2. Determinación de Actividad Anti-fúngica

4.2.1. Concentración mínima Inhibitoria (CMI)

Hoy en día se ha venido observando un creciente desarrollo de mecanismos de resistencia a los antimicóticos sintéticos por algunas especies fúngicas, este hecho se explica en parte porque la mayoría de fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos en el tiempo, lo cual permite la aparición de clones resistentes. Por lo tanto ante éste aumento de infecciones por hongos, se lleva a cabo una constante búsqueda de alternativas terapéuticas; eficaces entre las plantas medicinales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos.⁴⁵

En la tabla 5 se indica los valores de CMI para los hongos evaluados, como se puede apreciar el extracto orgánico inhibe el crecimiento de los hongos *T. mentagrophytes* ATCC® 28185 y *T. rubrum* ATCC® 28188 a una concentración 500 µg/mL y la Fracción 21-23 inhiben el crecimiento del hongo *T.*

⁴⁵ Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez D, Nakamura C, Filho B (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. MemInst Oswaldo Cruz.Vol: 97, p.p.1027-31.



Mentagrophytes ATCC® 28185 a una concentración de 250 µg/mL y CMI para *T. rubrum* ATCC® 28188 es de 125µg/mL. Según la clasificación de Holetz⁴⁶ la concentración a la que el compuesto inhibe el crecimiento de los dos microorganismos evaluados es moderada (CMI entre 100 y 500 µg/mL). Hasta hoy no se han realizado estudios sobre la bioactividad de la especie en estudio con los microorganismos utilizados y estos son causantes de diversas micosis superficiales a nivel mundial.

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Concentración mínima Inhibitoria (µg/mL)		
Fracción	Tm	Tr
Extracto Orgánico	500	500
Fracción 21-23	250	125
Control positivo	Itraconazol 100% de inhibición (7,8µg/mL)	
Control negativo	mayor 1000 µg/mL	

Trichophyton mentagrophytes (Tm) y *Trichophyton rubrum* (Tr).

Elaboración: El Autor

La elección del extracto metanólico se basó en estudios ya realizados donde refieren que el metanol es capaz de extraer gran cantidad de: saponinas, triterpenoides, flavonoides, taninos, alcaloides y quinonas además de estar relacionado con aplicación tradicional en que la maceración se efectúa con agua o etanol, solventes de característica polar.⁴⁷ La presencia de estos metabolitos secundarios está relacionada con la actividad biológica que posee la familia Piperáceae, pues los terpenoides constituyen el más amplio conjunto conocido como metabolitos secundario de los vegetales, la investigación en estos compuestos ha tenido una gran expansión debido a sus diversas

⁴⁶ Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez D, Nakamura C, Filho B (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol: 97, p.p.1027–31.

⁴⁷ Parekh, J., Jadea, D., Chanda, S., (2005) Efficacy of aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity.



actividades biológicas, incluida la antitumoral *in vitro*, citotóxica, pesticida, antiparasitaria y de efecto inmunosupresor.⁴⁸

⁴⁸ Arroyo J., Prashad M., Vasquez Y., Li E., Tomas G., (2005) Actividad citotóxica *In vitro* de la mezcla de Annona y Krameria lappacea en células cancerosas Rev. Perú med Exp Salud Publica; 22(4): 247-57

V. CONCLUSIONES



V. CONCLUSIONES

Mediante la cromatografía en columna del extracto orgánico de la especie se recolectaron 312 fracciones en donde las fracciones que 21-23 proporción (Hex-AcOEt) 90:10 v/v cristalizaron al igual que la fracción 62-65 proporción (Hex-AcOEt) 75:25 v/v.

En la prueba de CMI los hongos dermatofitos demostraron ser sensibles al extracto orgánico de 500 µg/mL frente a *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* y la fracción 21-23 de 250 µg/mL frente a *T. mentagrophytes* y 125 µg/mL frente a *T. rubrum*.

Estos resultados hacen referencia al uso de la especie en la medicina tradicional, Investigación previa reporta que las hojas de *Piper carpunya* (Guabiduca dulce) son ampliamente utilizadas como anti-inflamatorio, anti-ulcera, anti-diarreico y anti-parasitario así como dolencias o irritaciones en la piel gracias a la presencia de flavonoides, Terpenoides, dihidrochalconas que constituyen un amplio grupo de heterósidos muy frecuentes en los vegetales.⁴⁹

⁴⁹ Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, de Mendonça S, Oliveira LF, Martín-Calero MJ, Vidari G.(2010). Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from Piper carpunya Ruiz & Pav. J Ethnopharmacol.

VI. RECOMENDACIONES



VI. RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. Realizando el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de otras partes de la especie ya sea tallos raíces u otros Con el fin de detectar cual son los componentes que le dan las propiedades curativas a la planta.

Se debe hacer estudios posteriores sobre los posibles factores externos que hacen que haya una variación en la composición química de metabolitos secundarios de una especie.

Realizar estudios fitoquímicos de mayor profundidad mediante técnicas modernas que permitan obtener compuestos más puros su identificación y evaluación de su actividad para profundizar nuestro conocimiento en la medicina natural.

Se debe realizar la purificación de las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna con objeto de identificar los compuestos aislados.

Finalmente continuar realizando estudios en especies vegetales con antecedentes etnobotánicas con el fin de respaldar la aplicación medicinal de las mismas.

VII. ANEXOS



Anexo 1

Acido Sulfúrico y Vainillina: Se emplea como revelador en los cromatogramas de aceites esenciales y la mayor parte de compuestos orgánicos.

Reactivos	Composición
acido sulfúrico	250ml de etanol
	12.5 gr de acido sulfúrico

Procedimiento:

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

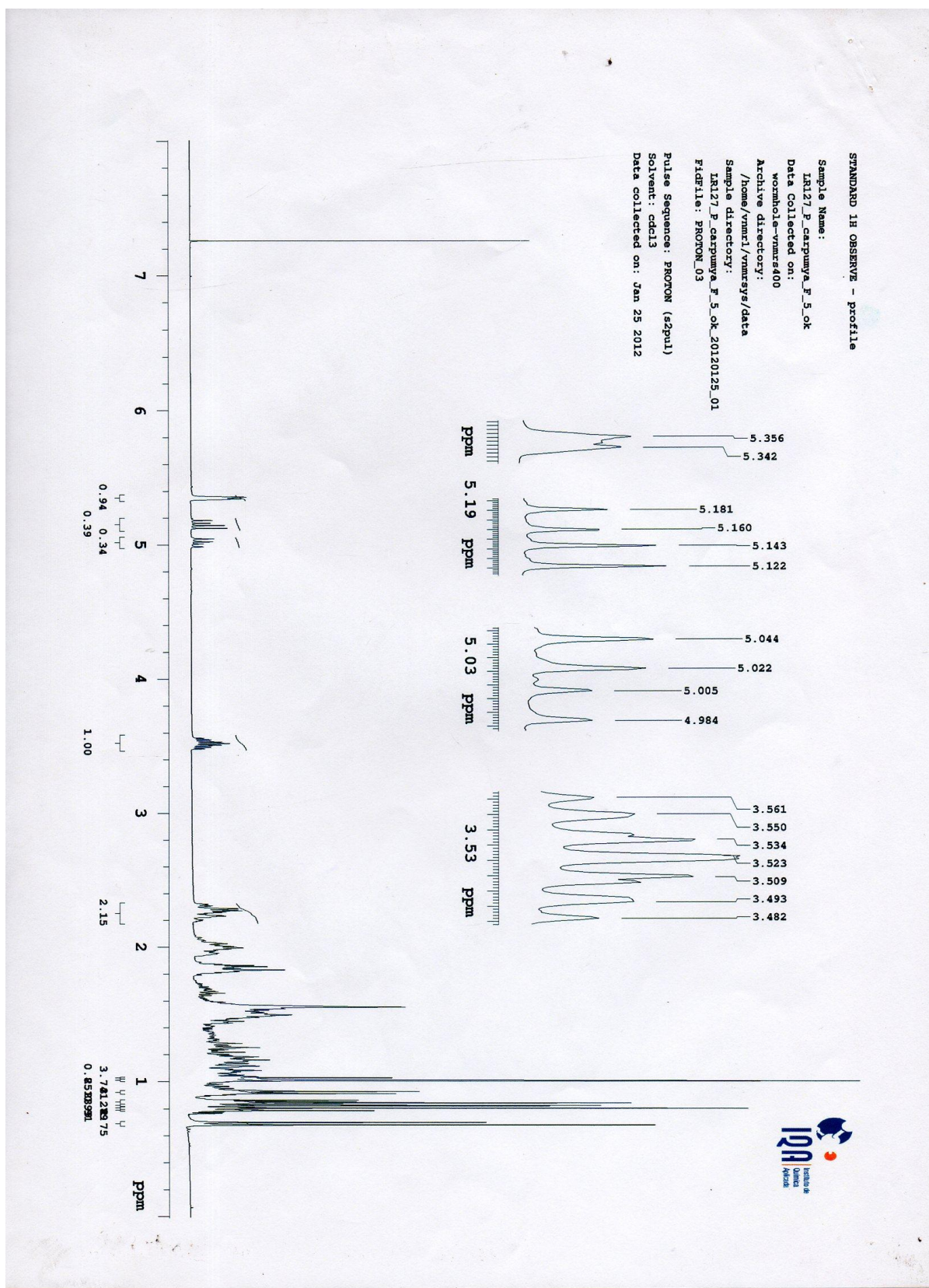
Reactivos	Composición
vainillina	250ml de etanol
	12.5 gr vainillina

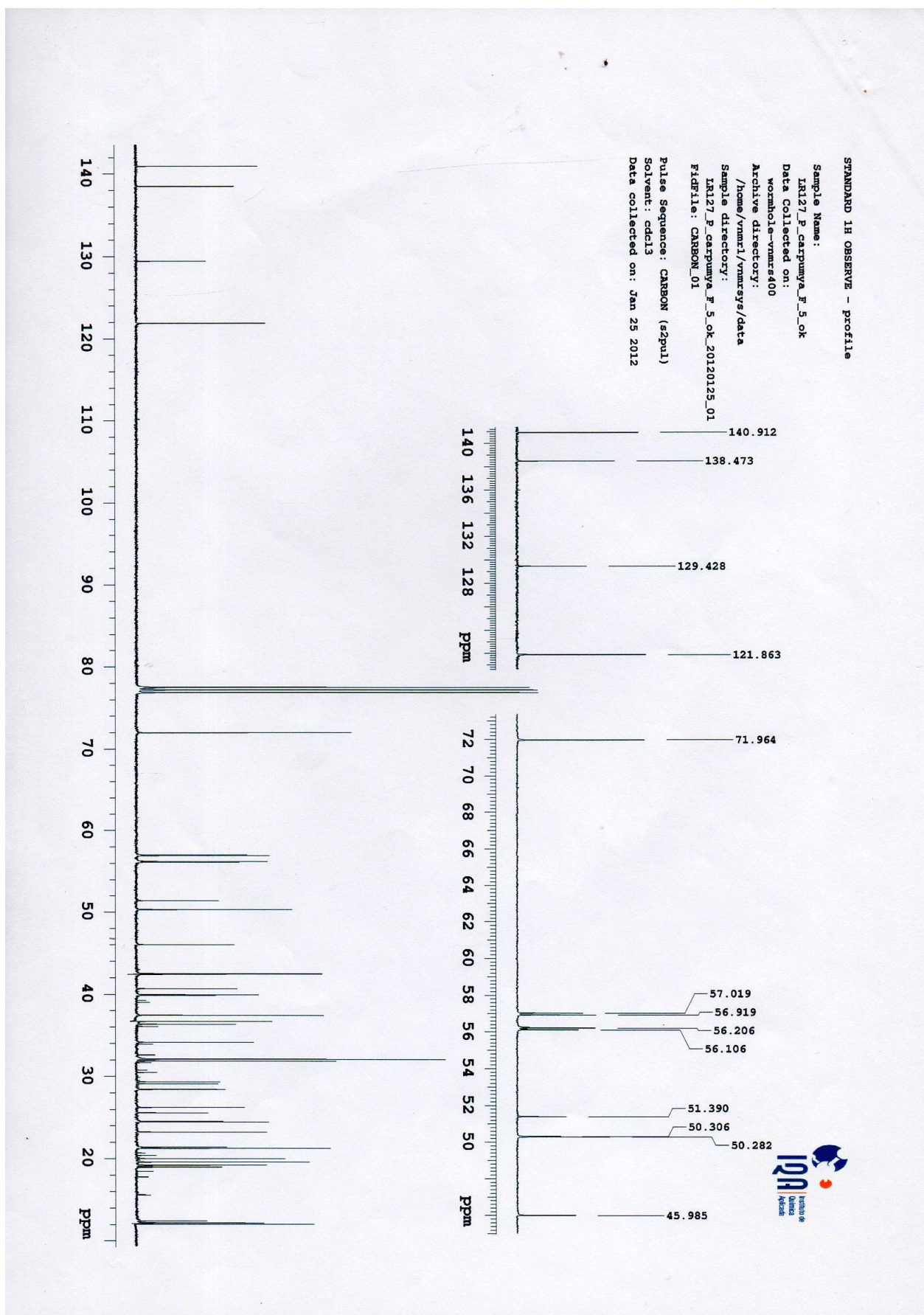
Procedimiento:

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



Anexo 2







Anexo 3

