



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper asperiusculum*, “matico-matapijo”, al Sur del Ecuador.

Trabajo de fin de titulación.

AUTOR:

Chuquimarca Tandazo, Lenin Daniel

TUTOR:

Ramirez Robles, Jorge Yandry, Msc.

CO-TUTOR:

Romero Benavides, Juan Carlos, Ing.

LOJA-ECUADOR

2013

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Lenin Daniel Chuquimarca Tandazo, 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, 20 de mayo de 2013

f).....

Lenin D. Chuquimarca T.

CERTIFICACIÓN

Ing.

Juan Carlos Romero

DIRECTOR DE TESIS DE GRADO (e)

CERTIFICO:

Haber dirigido la investigación y elaboración de la tesis: “**Actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper asperiusculum*, “matico-matapiujo”, al Sur del Ecuador**” la misma que ha sido revisada durante su ejecución, por lo tanto autorizo su presentación.

Loja, mayo de 2013

f).....

Ing. Juan Carlos Romero

DIRECTOR DE TESIS (e)

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios, por ser la luz que alumbra mi vida. Testigo y amigo fiel de mis triunfos y fracasos. A mis padres Rigoberto y Lena, que junto a mis hermanos Gabriela y Santiago, siempre me supieron apoyar y guiar para culminar de la mejor manera este trabajo investigativo.

Al Ing. Jorge Ramírez, por sus sabias y acertadas enseñanzas, consejos, comentarios y críticas, que fueron primordiales en la realización de esta tesis. De igual forma al Ing. Juan Carlos Romero, quien en calidad de Director de Tesis (e), me supo guiar y apoyar eficazmente.

Finalmente, a la Universidad Técnica Particular de Loja, por el apoyo académico, moral, espiritual y económico que me brindado a lo largo de toda mi carrera universitaria.

Lenin Chuquimarca

DEDICATORIA

Dedicado especialmente para Dios y mis padres Rigoberto y Lena, por su apoyo y amor incondicional. A mis hermanos Gabriela y Santiago, a quienes he admirado siempre.

A mi querido y muy extrañado abuelito Lautaro, mi constante e inagotable fuente de inspiración. Para mi amor Dianita por su colaboración no solo moral, sino también logística en mi trabajo de fin de carrera.

Lenin Chuquimarca

CONTENIDO	Pag.
CESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DEDICATORIA	v
CONTENIDO	vi
RESUMEN	x
ARTÍCULO	xi
I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	
1.1 FIN DEL PROYECTO.....	1
1.2 PROPÓSITO DEL PROYECTO.....	1
1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO.....	1
II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	
2.1 INTRODUCCIÓN.....	2
2.2 ANTECEDENTES.....	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	8
3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	8
3.3 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS.....	9
3.4 DESCLOROFILACIÓN.....	11
3.5 FRACCIONAMIENTO EN CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA.....	12
3.6 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.....	13
3.7 UNIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRACCIONES.....	13
3.8 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS FRACCIONES.....	13
3.8.1 Punto de fusión.....	13
3.8.2 Factor de retención.....	14
3.8.3 Solubilidad.....	14
3.9 IDENTIFICACIÓN DE LAS MOLÉCULAS AISLADAS.....	14
3.9.1 Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de masas.....	14
3.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	16
3.10.1 Microdilución en Caldo: CMI.....	16
3.10.2 Preparación de la suspensión de los inóculos.....	17
3.10.3 Ensayo.....	18

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA ESPECIE <i>P. asperiusculum</i>	20
4.2 COMPUESTOS AISLADOS DE LA ESPECIE <i>P. asperiusculum</i>	20
4.1.1 Fracciones 176-195(LF7).....	21
4.1.2 Fracciones 200-225(LF9).....	25
4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA: CMI	27
V. CONCLUSIONES	29
VI. RECOMENDACIONES	30
VII. BIBLIOGRAFÍA	31
VIII. ANEXOS	36

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de la columna capilar utilizada.....	15
Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación para las cepas de Hongos utilizadas.....	18
Tabla 3. Peso y rendimiento de los extractos y derivados obtenidos de <i>P. asperiusculum</i>	20
Tabla 4. Fraccionamiento Cromatográfico del extracto en AcEOt desclorofilado.....	21
Tabla 5. Caracterización de las fracciones y componentes identificados a partir de <i>Piper asperiusculum</i>	26
Tabla 6. Concentración mínima Inhibitoria (MIC) por método de Microdilución en Caldo.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía y muestra vegetal de <i>Piper asperiusculum</i>	5
Figura 2. Fotografía de caso clínico común dermatofitosis de pie. (Pie de atleta)..	6
Figura 3. <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	7
Figura 4. Obtención de los extractos.....	9
Figura 5. Placas de sílica gel TLC fase directa de los extractos de <i>Piper asperiusculum</i>	10
Figura 6. Placas de sílica gel TLC fase inversa de los extractos <i>Piper asperiusculum</i>	10
Figura 7. Esquema del procedimiento de extracción de los extractos de <i>Piper asperiusculum</i> en AcOEt, MeOH y MeOH-H ₂ O 7:3 (v/v).....	11
Figura 8. Esquema del proceso de desclorofilación del extracto total de acetato (LCH1), y evaluación de la actividad antimicótica de sus derivados, contra cepas de <i>Trichophyton rubrum</i> (Tr) y <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Tm).....	12
Figura 9. Equipo de fusión Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22.....	14
Figura 10. Condiciones de operación del CG-EM en la columna DB-5MS para el análisis de las fracciones LF7 y LF9	16
Figura 11.- Ilustración de la microplaca TC96 hecha con 12 columnas y 8 filas (A –H), con las concentraciones del extracto en µg/ml.....	19
Figura 12. Cromatograma revelado de las fracciones LF7, y su agua madre. Posterior al proceso de purificación.....	22
Figura 13. Estructura química de los compuestos identificados por CG-MS, en la fracción LF7.....	24
Figura 14. Cromatograma revelada de las fracciones LF9. Posterior al proceso de purificación.....	25
Figura 15. Estructura química del 6β-Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione.....	26

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
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada espectroscopía de masas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
Tm	<i>Trichophyton mentagraophytes</i>
Tr	<i>Trichophyton rubrum</i>
LCH1	Extracto total en acetato de etilo
LCH1.1	Extracto en acetato de etilo desclorofilado
LCH1.2	Residuo con clorofilas del extracto total en acetato de etilo
LCH2	Extracto total en metanol
LCH3	Extracto total en Metanol-Agua 7:3
LF7	Fracciones 176-196
LF8	Fracciones 196-205
LF9	Fracciones 200-226

RESUMEN

Se recolectó muestra vegetal en estado de floración de *Piper asperiusculum*. A partir de 500g de hojas y flores secas, se obtuvo tres extractos: en acetato de etilo (LCH1), metanol (LCH2) y metanol/agua 7:3 v/v (LCH3). Para observar la riqueza de los metabolitos secundarios se realizaron cromatografía de capa fina (TLC) en fase directa e inversa.

Mediante Cromatografía en Columna se fraccionó 1,2g de extracto en acetato de etilo desclorofilado (LCH1.1) y se recolectaron 367 fracciones. Las fracciones que cristalizaron y mostraron similitud entre ellas según el análisis TLC fueron agrupadas y posteriormente analizadas por CG-EM logrando identificar tres compuestos conocidos: β -sitosterol, Stigmasta-5,22-dien-3-ol y Campesterol en las fracciones 176-195 (LF7) y en las fracciones 206-226 (LF9) se encontró mayoritariamente el 6 β -Hydroxyestr-4-eno-3,17-diona.

Finalmente se determinó la actividad antifúngica mediante el método de Microdilución en Caldo que mide la Concentración Mínima Inhibitoria contra las cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 ® y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 ® resultando moderada (250 μ g/mL) para LCH1.1 y nula para LCH1, el residuo con clorofilas del extracto en AcEOt (LCH1.2) y para las fracciones LF7 y LF9.

PALABRAS CLAVE: *Piper asperiusculum* Kunth, CG-EM, actividad antifúngica, Cromatografía en columna (CC), *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*.



Antifungal activity of secondary metabolites isolated from *Piper asperiusculum* Kuntch, "matico-matapijo" to southern of Ecuador

Chuquimarca Lenin¹, Ramirez Jorge², Romero Juan Carlos²

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

e-mail: lenins1990@gmail.com

²Departamento de Química/Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto s/n, Postal Code 11-01-608, Loja, Ecuador.

ABSTRACT

The plant species *Piper asperiusculum* is traditionally used in the province of Zamora Chinchipe, south of Ecuador for the treatment of ringworm and removing lice. Previous phytochemical studies about species of the *Piper* genus have allowed the isolation of a wide variety of secondary metabolites with antifungal activity. From the total of fractions collected after column chromatography, some of them crystallized. Which were further analyzed by Gas chromatography coupled with mass spectroscopy (GC-MS), to afford three known compounds: β -sitosterol, Stigmasta-5,22-dien-3-ol and Campesterol in fractions 176-195 (LF7), while as in the fractions 206-226 (LF9) mostly found the 6 β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione. The antifungal activity was measured by the Microdilution broth method against *Trichophyton rubrum* ATCC 28188® and *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185®. The extracts (LCH1, LCH1.1 and LCH1.2) and fractions LF7 and LF9 showed no significant antifungal activity.

KEYWORDS: *Piper asperiusculum* Kunth, GC-MS, antifungal activity, Column chromatography (CC), *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

INTRODUCTION

Ecuador despite its relatively small land area is considered one of the richest countries in terms of diversity of plants and animals. With only 0.2% of the land area of the world it has in its territory 10% of all plant species on the planet, which 20% of vascular plants are endemic (Cerón, 2002).

The increase of fungal infections (Warnock, 1998), coupled with the development of mechanisms of primary and secondary resistance of some fungal species (Loeffler & Stevens, 2003) have led to a constant search for effective therapeutic alternatives that can provide more and better choices in

the current pharmacopoeia (Dabur et al, 2004).

Phytochemical studies conducted over the Piperaceae family have demonstrated the occurrence of several physiologically active products such as alkaloids, amides, pyrones, dihydrochalcones, flavonoids, phenylpropanoids, lignans and neolignans (Cantón, et al, 2000). The isobutilics amides, such as pyrrolidine, piperidine and dihiroxipirodone are of great interest because of their potent antifungal and insecticidal properties (Huamaní & Ruiz, 2005).



Many substances obtained from species of the genus *Piper*, traditionally have been used as insecticides, spices and phytomedicines (Arnason et al, 2005) for its antibacterial, antifungal, healing, antispasmodic, antipyretic properties, among others (Dyer et al, 2004) (Parra 2011). Also it has been evaluated their anticancer properties as noted Sanchez et al, 2011 in their study of the potential of using essential oils of *P. auritum* and *P. aduncum* for the development of products with antitumor activity and they obtained a 100% mortality of *Artemia salina* to concentrations of 250 and 1000 μ g/mL respectively in 24 hours.

P. asperiusculum, commonly known as "matico-matapiujo", belongs to the genus *Piper*, Piperaceae family. It is a shrub that grows between 1000 and 4000 m.a.s.l. (Jorgensen & León-Yáñez, 1999). It is used in infusion to treat fungal infections of the feet and to combat lice.

With this background the present investigation seeks to isolate, identify and evaluate the inhibitory effect on fungal strains of secondary metabolites obtained from *P. asperiusculum*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The plant material in flowering stage was collected in Piuntza, province of Zamora Chinchipe at 912 m.a.s.l. (729771W, 0551219N). Ethnobotany identification was made at the Herbario Nacional in Quito. A sample is preserved in the Herbario UTPL, with voucher id. Pi-010-10.

Preparation of extracts

The plant material was dried at 37 ° C for 48 hours. A total of 500g of dried leaves and flowers of *P. asperiusculum* was successively macerated with three solvents of ascending polarity, EtOAc, MeOH and MeOH-H₂O 7:3 (v/v), in a plant-solvent ratio 1:10 employing dynamic maceration for 5 minutes followed by a stationary one for 55 minutes.

The extracts were filtered and concentrated to reduced pressure and vacuo. They were labeled like: total extract in EtOAc (LCH1), total extract in MeOH (LCH2) and total extract in MeOH-H₂O (LCH3).

Comparative TLC G60 F₂₅₄ and RP 18 were used to differentiate the metabolic richness of every extract. After revealing, the LCH1 extract was selected for fractionation through previous elimination of chlorophylls by means of SPE (Discovery 18) using a mixture of MeOH-H₂O 8:2 (v/v). It was obtained 1,5g of extract without chlorophylls, labeled as LCH1.1.

Column chromatography (CC)

It was seeded 1,2g of LCH1.1 extract in a ratio 1:100, extract: silica gel. It was collected fractions of approximately 5mL; they were eluted with solvents of ascending polarity (Hex, EtOAc and MeOH).

The collected fractions were monitored by TLC using silica gel 60 F₂₅₄. The ideal mobile phase was Hex-EtOAc (1:1). The plates were visualized with UV light of 254 and 365nm, and developed with a solution of sulfuric acid/vanillin at 5%.



The fractions were pooled according to the results of the TLC. The partially crystallized fractions were subjected to a process of purification and crystallization using the technique of "solvent pair" (EtOAc-MeOH) and were characterized by their retention factor (Rf), melting point (MP) and Chromatography gases coupled to mass spectroscopy (GC-MS) with a DB-5MS capillary column.

Determination of antifungal activity: Extracts and fractions

The Microdilution broth Method is used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) defined by the lower concentration of extract required to inhibit the proliferation and production of visible growth of a microbial strain given in the test system (Oxford, 2005).

For dissolving the extracts LCH1, LCH1.1 and LCH1.2 it was used 20mg of sample diluted in 1000mL of dimethyl sulfoxide (DMSO). In the case of fractions LF7 and LF9 it was only used 2mg. The suspension was prepared from the strains at cryogenic reserve kept at -80°C. The Fungi were cultured in Sabouraud broth dextrose.

The essay was performed on microplates of 96 wells using the serial double dilution method to obtain concentrations of 1000 to 7µg/mL for fractions and pure compounds. DMSO was used as negative control at concentrations lower than 2,5% and Itraconazole was employed as positive controls. Fungi were cultured at 30°C for 96 hours the final concentration of inoculum for bacteria was 5×10^4 spores/mL.

RESULTS AND DISCUSSION

Since 500g of dry plant material it was obtained: 9,02g of total extract in EtOAc (LCH1), 20,44g of total extract in MeOH (LCH2) and 26,66g of total extract in MeOH-H₂O. From LCH1 extract it was achieved 1,52g of extract in EtOAc without chlorophylls (LCH1.1) and 3,1g of residue with chlorophylls of the EtOAc extract (LCH1.2).

Through Colum Chromatography (CC) were obtained 367 fractions of approximately 5mL employing a gradient of Hexane-Ethyl Acetate and Methanol. Fractions were grouped according to the direct TLC with mobile phase 1:1 Hex-EtOAc ratio. But the fractions in EtOAc and MeOH were analyzed with TLC indirect phase, with EtOAc-MeOH 1:1 ratio. All of them were developed with sulfuric acid/vanillin at 5%. Crystals were observed in the fractions LF7, LF8 and LF9. By the method of "pair of solvents" LF7 and LF9 fractions were purified (with hot EtOAc) and crystallized in MeOH. Fraction 196-205 (LF8) was no purified because of the low yield (15mg).

Compounds isolated

Fractions 176-195 (LF7)

They were obtained in Hex-EtOAc 80:20. Their original weight was of 33mg, but after purification and crystallization process it was reduced to 13mg.

Physical characters

In the fractions LF7 there were white crystals, frost type. They were soluble in



TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EtOAc and DCM and were not soluble in Hex and MeOH. They had a melting point of 135-138°C and a retention factor (Rf) of 0.80.

Interpretation of thin layer chromatography (TLC)

They were visible in UV light of 254 and 365nm. When it was revealed with sulfuric acid/vanillin solution, it was seen a purple stain (Figure 1).



Figure1. Chromatogram revealed the fraction LF7, and its mother liquor. Stationary phase: Silica gel. Mobile phase: Hex-EtOAc (1:1)

Elaboration: The author

Interpretation of GC-MS spectrum

Gas chromatography coupled to mass spectroscopy (GC-MS), indicates that in fractions LF7 with a probability of 95%, is the β -sitosterol. Likewise with 94% and lower concentration is the stigmasta-5,22-dien-3-ol. Finally with 94%, and as the minority compound Campesterol (Figure 2).

In the mass spectra obtained it was observed molecular ion peaks at 414, 412 and 400 m / z (Annex 1), which are compatible with the molecular formula $C_{29}H_{50}O$ of β -sitosterol, $C_{29}H_{48}O$ of

Stigmasta-5,22-dien-3-ol and $C_{28}H_{48}O$ of campesterol respectively. All these data were compared with the NIST database, (2010).

Campesterol was obtained for a retention time of 28.79 minutes with a relative area percentage of 1.24% and molecular ion peak of 400m/z. Then the Stigmasta-5,22-dien-3-ol, with a retention time of 29.58 minutes with a relative area of 2.62% and molecular ion peak of 412 m/z. And in the case of β -sitosterol, the retention time was 31.46 minutes, the relative area percentage of 3.09% and the molecular ion peak at 414 m / z (Annex 1).

In the upper plants there are mostly phytosterols: β -sitosterol, stigmasterol and campesterol Sterols as Stigmasterol have been isolated in the specie *Piper betle* (Parmar, et al, 1997). A study in the Department of Chemistry of UTPL, prior to this, identified the Stigmas-5,22-dien-3-ol (triterpene) in the vegetable specie *P. pseudochurumayu* (Chamba & Ramirez, 2012).

It should be noted that it is very difficult to identify the β -sitosterol, Stigmasta-5,22-dien-3-ol and campesterol when found together in a fraction by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), because all three compounds have the same steroid nucleus, type Δ^5-3-3 hidroxianosteno (Martinez, 2001). But if it is not possible to obtain them in a pure state, the gas chromatography coupled to Mass Spectroscopy (GC-MS) is a valid method to identify them (Parra, 2011).

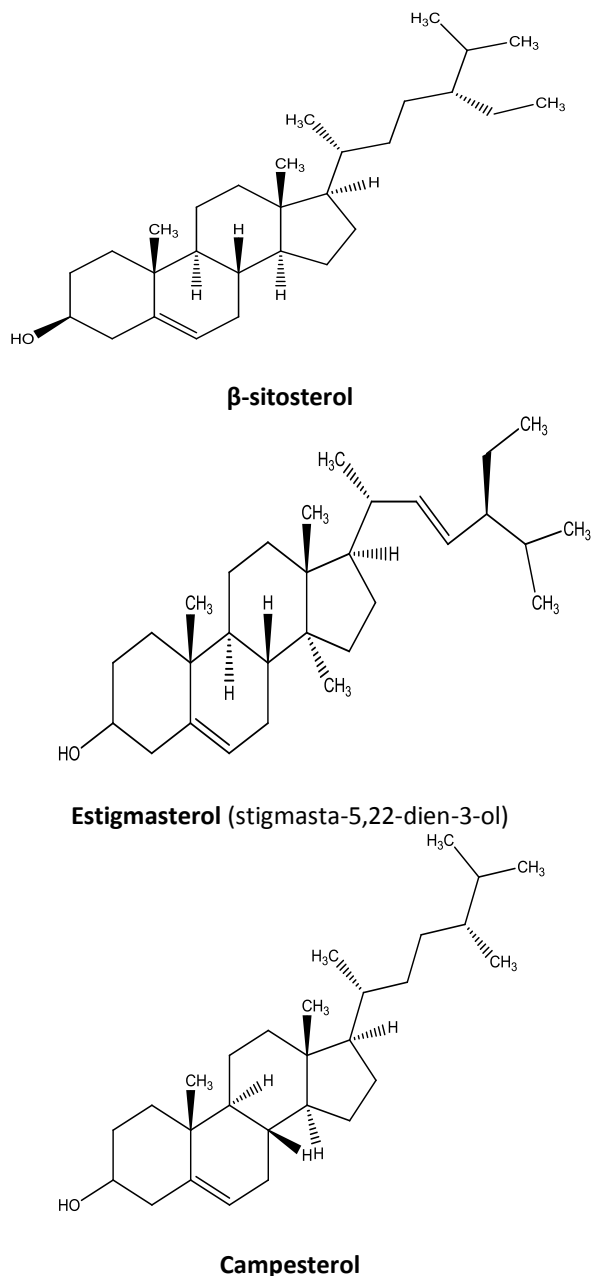


Figure2. Chemical structure of the compounds identified by GC-MS in fraction LF7.

Elaboration: The author

Fractions 206-226 (LF9)

They were obtained in Hex-EtOAc, ratio 80:20, with a weight of 95 mg. After purification it was obtained 14 mg.

Physical characters

The fractions showed rounded crystals with yellow oily particles, on their cover. Their melting point was 67-73° C. The R_f was 0.80. They were soluble in EtOAc and DCM, and were not soluble in Hex and MeOH.

Interpretation of thin layer chromatography (TLC)

There were no visible in UV light of 365 nm, but to 254nm UV light and to be revealed with sulfuric acid/vanillin at 5% (Figure 3).



Figure3. Chromatogram revealed the fraction LF9. Stationary phase: Silica gel. Mobile phase: Hex-EtOAc (1:1)

Elaboration: The author



Interpretation of GC-MS spectrum

Spectrophotometry identified that in the fractions LF9, with a probability of 90%, is the 6β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione (Figure 4).

For the 6β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione it had a retention time of 13.10 minutes with a relative area percentage of 11.66% and a molecular ion peak at 288m/z. It was the main compound and the only identified three detected.

To verify the purity of a crystalline organic substance is determined melting point, which is a constant important to identify new and known compounds. But if in a same substance are two or more compounds, the melting point varies as a result of their reciprocal impurities (Gray, 1976).

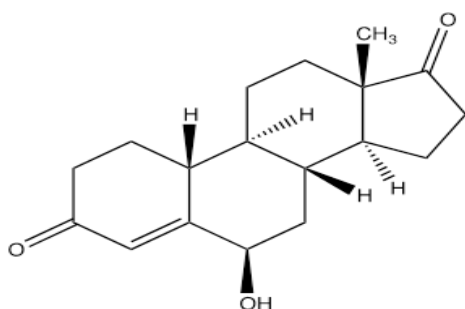


Figure 4. Chemical structure of 6β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione. $C_{18}H_{24}O_3$

Elaboration: The author

Evaluation of Antifungal Activity

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

It considered that an extract or compound shows a CMI $<100\mu\text{g/mL}$ the activity is good, from 100 until $500\mu\text{g/mL}$ moderate,

$500-1000\mu\text{g/mL}$ bad and $>1000\mu\text{g/mL}$ null (Holetz et al, 2002).

Species of the genus *Piper* contain various types of metabolites, the most important, amides, flavonoids, kavapirona, lignans, neolignans and terpenes. (Parmar et al, 1997) It has been reported antifungal and insecticidal activity of amines, coumarins and lignans (Huamaní & Ruiz, 2005).

Extract LCH1 showed a MIC of $500\mu\text{g/mL}$ for Tm and extract LCH1.1 $250\mu\text{g/mL}$ against Tm and Tr. But extract LCH1.2, fractions 176-195 (LF7) and 206-226 (LF9) did not show antifungal activity ($>1000\mu\text{g/mL}$) (Table 1).

Moderate activity ($250\mu\text{g/mL}$) of the extract LCH1.1 against Tr and Tm was probably the result of a synergism. Synergy is defined as the superior pharmacological response produced when two or more components act together so doing separately (Muñoz, 2011). This would explain why fractions LF7 and LF9 obtained from the extract LCH1.1 showed no antifungal activity.

Fractions 176-195 (LF7) containing β -sitosterol, Stigmasta-5,22-dien-3-ol and Campesterol. Although it is unknown specific biological activities in the phytosterols in nature except as components of cell membranes, it has been reported various therapeutic properties when ingested at certain doses, including the reduction of serum cholesterol, inhibition of growth in cancer cells, antiinflammatory, antipyretic, and immunomodulation insulin release (Garibello, 2010).



TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

It has been shown the anticancer effects of sterols in the laboratory, both in vitro (cultured cell lines) and in animals on some cancers most often mentioned in the population, such as colon, prostate and breast, with strong evidence of growth inhibition and apoptosis of tumor cells and metastasis. It reported a reduction of up to 80% of growth and up to 30% of metastasis, being the β -sitosterol, the phytosterol most effective (De Stefani et al, 2000).

In the reviewed literature it was not founded studies that describe the biological activity of 6 β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione, but according to the obtained results in this investigation it is inactive against fungal strains Tm and Tr

Table 1: Characterization of fractions and components identified from *Piper asperiusculum*.

<i>Piper asperiusculum</i>		
	Fractions LF7	Fractions LF9
CI	<ul style="list-style-type: none"> • β-sitosterol • Stigmasta-5,22-dien-3-ol • Campesterol 	<ul style="list-style-type: none"> • 6β-Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione
W(mg)	13	14
Mp (C°)	135-138	67-73
Rf	0.80	0.80
S	EtOAc-DCM	EtOAc-DCM
Ins	Hex-MeOH	Hex-MeOH
Uv 254 (nm)	Fluorescent	No fluorescent
Uv 365 (nm)	Fluorescent	No fluorescent
Developed color	Purple	Blue

CI (Compounds Identified), W (Weight), Mp (Melting point), Rf (Retention factor), S (solubility), Ins (Insolubility)

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) by Broth Microdilution Method

Minimum Inhibitory Concentration (μ g / mL)		
Extract / Fraction	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Tm)	<i>Trichophyton rubrum</i> (Tr)
LCH 1	500 μ g/mL	1000 μ g/mL
LCH 1.1	250 μ g/mL	250 μ g/mL
LCH 1.2	1000 μ g/mL	1000 μ g/mL
Fractions LF7	1000 μ g/mL	1000 μ g/mL
Fractions LF9	1000 μ g/mL	1000 μ g/mL
Positive Control	Itraconazole 100%, inhibition (7,8 μ g/mL)	
Negative Control	>1000 μ g/mL	

Tm: *T. mentagrophytes* (ATCC 28185®)

Tr: *T. rubrum* (ATCC 28188®)

CONCLUSIONS

Fractions 176-195 (LF7) and 206-226 (LF9) eluted in Hex-EtOAc 80:20 crystallized. By CG-MS it was determined in fractions LF7: β -sitosterol, stigmasta-5,22-dien-3-ol, and campesterol. In the case of the fractions LF9 with the same methodology it was identified 6 β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione.

Probably product of a synergism, LCH1.1 extract showed a MIC of 250 μ g/mL against *T. mentagrophytes* (ATCC 28185®) and *T. rubrum* (ATCC 28188®).

Fractions LF7 and LF9 obtained from LCH1.1 extract did not show antifungal activity against *T. mentagrophytes* (ATCC 28185®) and *T. rubrum* (ATCC 28188®)



ACKNOWLEDGEMENTS

I am really thankful with the Chemistry Department at UTPL, due to their financial and moral support that was given for this research.

REFERENCES

- Arnason, J., Dursty, & Philogene. (2005). Phytochemical discovery of new botanical insecticides. (R. Regnault, B. Philogene, & C. Vincent, Edits.) 37-46.
- Benevides, P., Sartorelli, P., & Kato, M. (1999). Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry*(52), 339-343.
- Cantón, R., García, J., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Metodos Básicos para el estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* (J. Picazo, Ed.)
- Cerón, C. (2002). La etnobotánica en el Ecuador. *Cinchonia*, 2(3), 1-16.
- Chamba, D., & Ramirez, J. (2012). *Aislamiento, caracterización y evaluación antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie Piper Pseudochurumayu (Matico).* Loja: Tesis de grado previa a la Obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico.
- Crespo, V. (2008). *Generalidades sobre los hongos. Dermatomicosis: saprofitias y dermatofitosis Piel* (Vol. 7).
- Dabur, R., Singh, H., Chhillar, A., & Sharma, G. (2004). Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia*, 3-4(75), 389-391.
- De Sagrera, J. (2006). *Historia de la Farmacia.* Barcelona, España: Litocenter, SL.
- De Stefani, E., Boffetta, P., Ronco, A., Brennan, P., Pellegrini-Deneo, H., Carzoglio, J., y otros. (2000). Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutrición y cáncer*(4), 140-144.
- Dyer, L., Richards, J., & Dodson, C. (2004). Isolation, Synthesis and Evolutionary Ecology of Piper Amides. *MRM/KJ*(7), 117-139.
- Ferrándiz, C., Bielsa, I., & Ferrándiz, L. (2006). Micosis cutáneas en la edad pediátrica. *Medicina Clínica*, 126(1), 37-42.



TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

- 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*, 109-116.
- Flores, E. (2006). Metabolitos bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana. *Tesis doctoral*. Bolivia: Universidad de la Laguna.
- 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* (Vol. 8). Biofarbo.
- Flores, N. (2001). Metabolitos Bioactivos aislados de cinco especies Piper con actividad antiparasitaria y/o keushmanicida. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.
- Garibello, C. F. (2010). *Estudio de hojas de Pentacalia vaccinioides (Kunth) Cuatr como nueva fuente natural de sustancias esteroideas y cumarinas*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.
- Gómez, C. J. (2005). *Páginas de Historia de la Farmacia*. Madrid, España: Nestlé S.A.
- Gray, G. (1976). *Molecular Structure and the Properties of Liquid Crystals*. New York: Academic Press.
- Harborne, J., & Williams, C. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 481-504.
- 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*, 97, 1027-31.
- Huamaní, A., & Ruiz, Q. (2005). *Determinación de la actividad antifúngica contra Candida albicans y Aspergillus niger de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú*. Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico.
- Introducción a la cromatografía*. (2011). Recuperado el 08 de Febrero de 2013, de [.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf](http://www.ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf)
- Jaramillo, M., & Manos, P. (2001). Phylogeny and the patterns of



TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

- floral diversity in the genus Piper (Piperaceae). *American Journal of Botany*(88), 706-716.
- Jones, P., MacDougall, D., Ntanios, F., & Vanstone, C. (1997). Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can J Physiol Pharmacol*(75), 217-227.
- Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. USA: Missouri Botanical Garden Press.*
- Jowa State University. (1 de Mayo de 2005). *Dermatofitosis: Tiña, Tinea, Dermatomicosis.* Recuperado el 4 de Enero de 2013, de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/dermatofitosis.pdf>
- Kubinyi, H. (2005). *Pharmazie* (Vol. 50).
- Lawrence, H. G. (1951). Taxonomy of vascular plants. 444. New York, USA: The Macmillan Company.
- Ling, W., & Jones, P. (1995). Dietary Phytosterols: A review of metabolims, benefits and side effects. *Life Sci*(57), 195-206.
- Loeffler, J., & Stevens, D. (2003). Antifungal drug resistance. *Clin. Infect Dis*, 36, 31-41.
- Martinez, A. (2001). *Esteroles.* Medellin: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.
- Méndez, L., López, R., & Hernández, F. (2004). *Micosis Superficiales. Dermatofitos* (Segunda ed.). Actualidades en Micología Médica. Facultad de Medicina. UNAM.
- Muñoz, H. (2011). Sinergia y adición en anestesiología. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 195-199.
- National Institute of Standards and Technology (NIST). (17 de Marzo de 2010). *Chemistry WebBook.* Recuperado el 06 de 01 de 2013, de <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Navarro, G., & Fabiola, R. (2006). *Comprobación del efecto cicatrizante de Peperomia scutellaefolia R, et P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico.* Recuperado el 04 de 02 de 2013, de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/guillermo_n_r/generalidades.htm
- Oxford. (2005). *Update Software Ltd.* . (T. d. Library, Ed.) Recuperado el 15 de Enero de 2013, de <http://www.update-software>



- Palacios, D. (2009). Aplicación de Métodos Bioautográficos para la identificación de compuestos antimicrobianos en extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper* sp., *Piper* ecuadorensis, *Lepechinia mutica* Benth y *Niphogenon* d. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., y otros. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*(46), 1866-1870.
- Parra, J. E. (2011). *CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA PARTE AÉREA DE Piper cf. cumanense Kunth (Piperaceae)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química.
- Pino, N., Meléndez, E., & Stashenko, E. (2009). *Comparación de la composición química de los aceites esenciales de Piper lanceifolium Kunth y P. hispidum del departamento del Chocó*. (Vol. 28).
- Quijano, M., Callejas, R., & Miranda, D. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*(33), 1266-1278.
- Rivera, G., & Malagón, O. (2010). *Elaboración de un fitopreparado antifúngico semisólido a partir del extracto fluido de la especie Piper Ecuadorensis (matico)*. Loja, Ecuador: Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Rueda, R. (2002). Micosis superficiales y dermatomicosis. *Colombia médica* 2002(33), 10-16.
- Sánchez, Y., Pino, O., Laza, F., Abreu, Y., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2011). *ACTIVIDAD PROMISORIA DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES PERTENECIENTES A LA TRIBU PIPERACEAE FRENTE A Artemia salina Y Xanthomonas albilineans*. *SciELO*, 26(1), 45-51.
- Schiwinn, A., Ebert, J., & Broccker, E. (2005). *Frecuency of Trychophyllum rubrum in Tenia capitis. Mycoses*.



UTPL
UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Soltis, P., Soltis, D., & Chase, M. (1999). *Nature*.

Universidad Nacional de Colombia. (2010). *Sistema de información sobre biodiversidad de Colombia*. Recuperado el 04 de 01 de 2013, de <http://data.sibcolombia.net/species/91245>

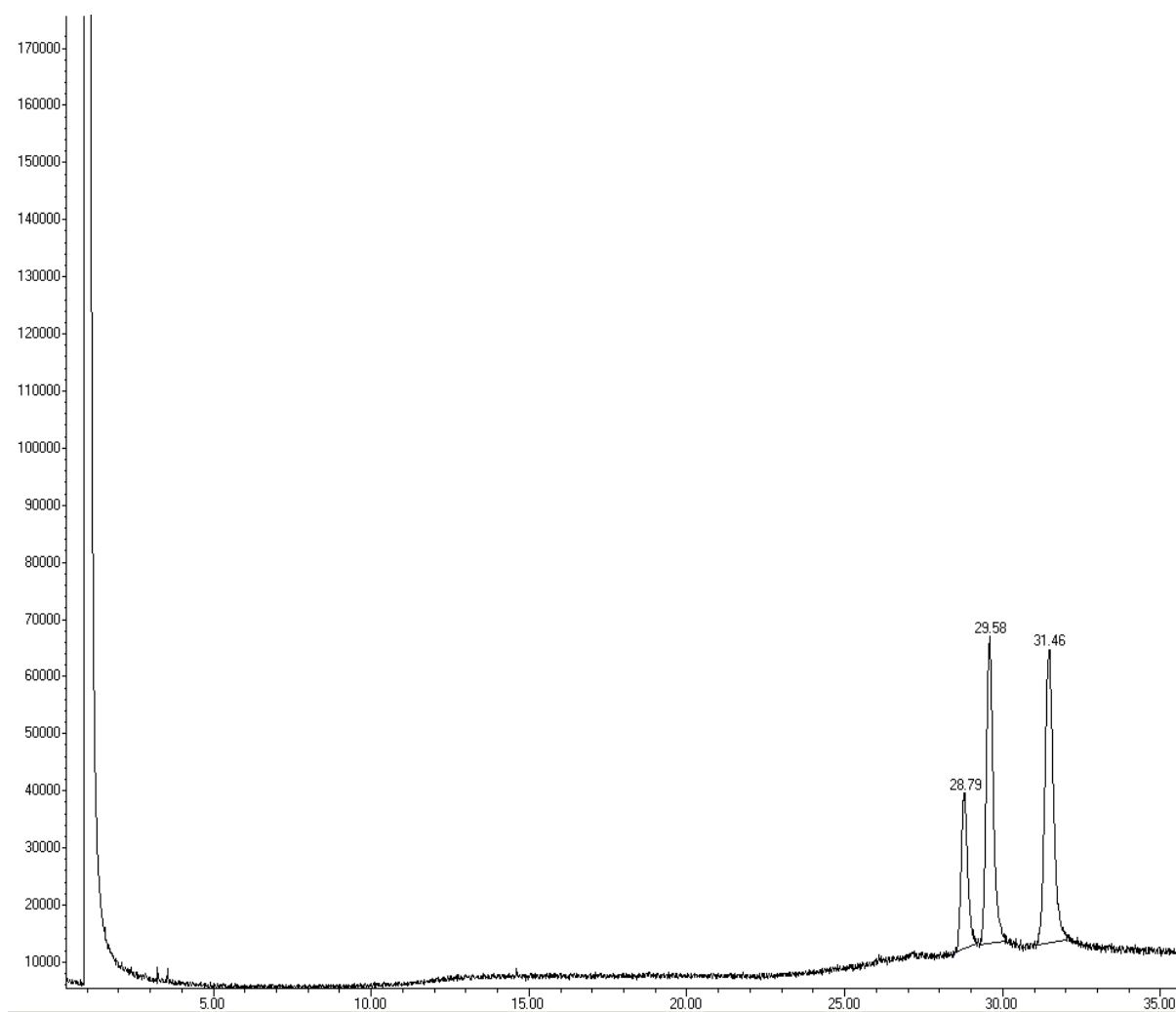
Warnock, D. (1998). Fungal infections in neutropenia: Current problems and chemotherapeutic control. *Antimicrob Chemother*, 41, 95-105.

Wiley, J., & Sons, L. (2005). *Oxford: Update Software Ltd*. Recuperado el 30 de Enero de 2013, de <http://www.update-software>



ANNEXES

Annex 1. Gas chromatography coupled to mass (CG-MS) fractions LF7

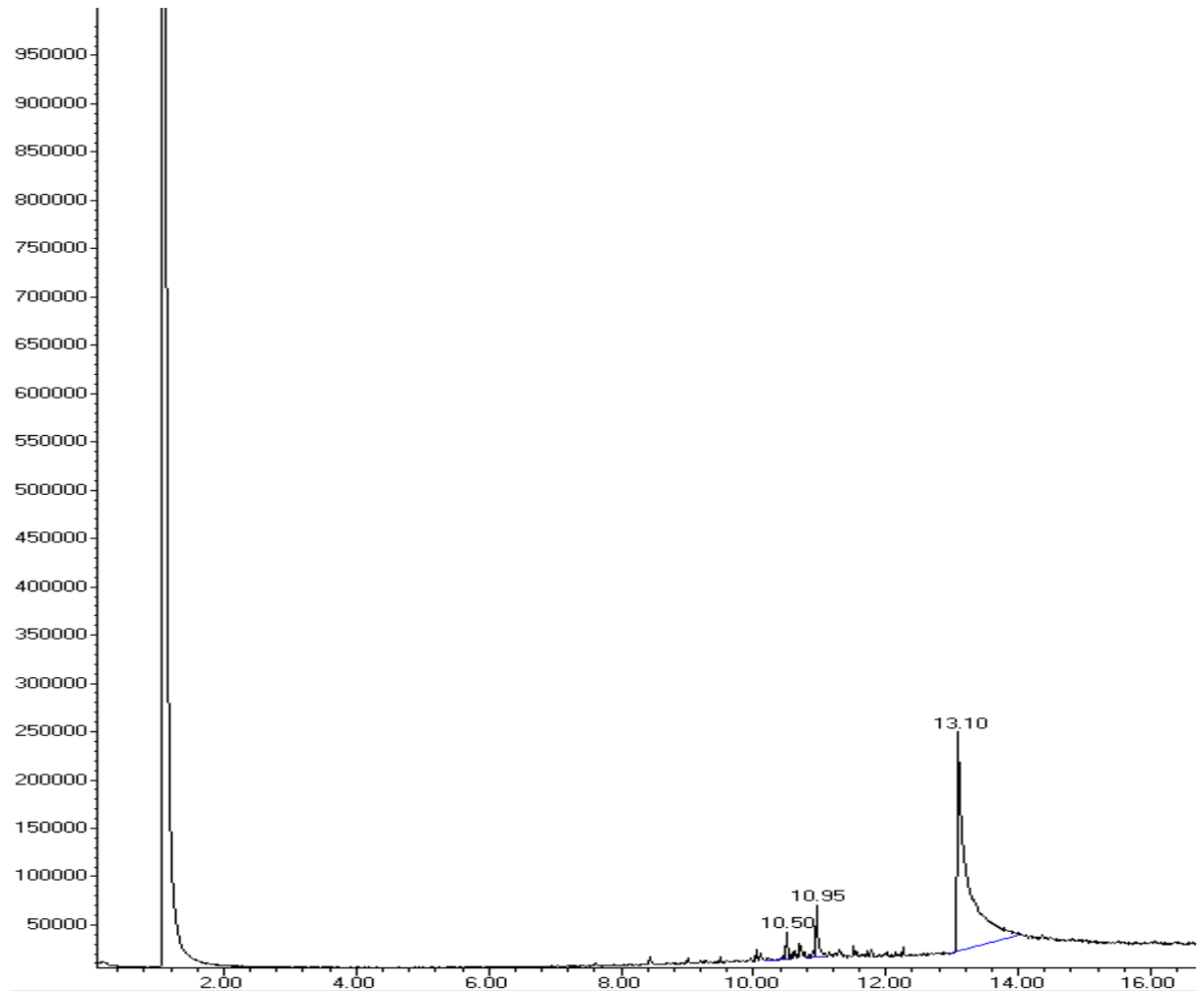


PK #	RT	Area%	Cas#	Qual%
β.-sitosterol,	31.46	3.09	00083-46-5	95
Stigmasta-5,22-dien-3-ol	29.58	2.62	00083-48-7	94
Campesterol	28.79	1.24	00474-62-4	94
Dichloromethane (solvent)	1.02	93.05	00075-09-2	86

DB-5MS capillary column



Annex 2. Gas chromatography coupled to mass (CG-MS) fractions LF9



PK #	RT	Area%	Cas#	Qual%
6β-Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione.	13.10	11.66	Not found	90
Not identified	10.95	0.98	Not found	>64
	10.50	0.34	Not found	>46
Dichloromethane (solvent)	1.02	93.05	00075-09-2	86

DB-5MS capillary column

I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO



I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 FIN DEL PROYECTO

Contribuir a la prospección de nuevos metabolitos secundarios a partir de la especie *Piper asperiusculum* Kunth al sur del Ecuador.

Brindar un estudio científico que apoye a la terapia empírica que utiliza esta especie vegetal en el tratamiento de la dermatofitosis.

Permitir el desarrollo de un producto farmacéutico, a partir de este estudio.

1.2 PROPÓSITO DEL PROYECTO

Aislar, identificar y evaluar la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios a partir de la especie vegetal *Piper asperiusculum* Kunth, frente a las cepas de hongos *T. mentagrophytes* ATCC ® 2885 y *T. rubrum* ATCC ® 28188.

1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO

1.- Recolectar una muestra vegetal y obtener los extractos en acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH) y metanol-agua (MeOH-H₂O) en proporción 7:3 de *P. asperiusculum* Kunth.

2.- Aislar y caracterizar metabolitos secundarios a partir de *P. asperiusculum* Kunth, mediante técnicas cromatográficas (Cromatografía en Columna y Cromatografía de capa fina) y Cromatografía de Gases acoplado Espectroscopía de Masas.

3.- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos obtenidos, y de los metabolitos secundarios aislados a partir de *P. asperiusculum* Kunth frente a las cepas de *T. mentagrophytes* ATCC 2885® y *T. rubrum* ATCC 28188®, por el método de Microdilución en Caldo.

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES



II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 INTRODUCCIÓN

A pesar de su extensión territorial relativamente pequeña, el Ecuador es considerado como uno de los países más ricos en cuanto a diversidad de plantas y animales, con sólo el 0,2% de la superficie terrestre del mundo tiene en su territorio el 10% de todas las especies de plantas del planeta. En base a los patrones de distribución local de flora, se ha calculado que en total posee entre 20 y 25 mil especies de plantas vasculares, estimándose que el 20% de estas son endémicas (Cerón, 2002).

Según De la Torre, et al, 2008 en el país existen al menos 3118 especies, pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales. El 75% de estas especies son plantas nativas y el 5% endémicas, mientras que el 11% son introducidas. Las partes de las plantas más utilizadas son las hojas (30%), la planta entera (10%) y las flores o inflorescencia (6%).

En la flora ecuatoriana la familia *Piperaceae* consta de cuatro géneros, 441 especies, de las cuales 134 son endémicas (Jorgensen & León-Yáñez, 1999). La distribución del género *Piper* va desde los 0 hasta los 2500 m.s.n.m., además está representada en el neotrópico y paleotrópico con 700 especies en los trópicos americanos y 300 en Asia (Jaramillo & Manos, 2001) (Soltis et al, 1999). Pueden ser arbustos, frútices, hierbas o con muy poca frecuencia como árboles (Quijano et al, 2006).

Muchas sustancias obtenidas de especies del género *Piper*, han sido utilizadas tradicionalmente como insecticidas, especias y fitomedicamentos (Arnason et al, 2005) por sus propiedades antibacteriana, antifúngica, cicatrizante, antiespasmódica, antipirética, entre otros (Dyer et al, 2004) (Parra, 2011). También se ha evaluado sus propiedades anticancerígenas como señala Sánchez et al, 2011 en su estudio sobre la potencialidad de utilizar los aceites esenciales de *P. auritum* y *P. aduncum* para el desarrollo de productos con actividad antitumoral donde obtuvo una mortalidad del 100% de *Artemia salina* a concentraciones de 250 y 1000µg/mL respectivamente a las 24 horas.



El aumento de las infecciones micóticas (Warnock, 1998), sumado al desarrollo de mecanismos de resistencia primaria y secundaria a los antimicóticos por algunas especies de hongos, debido en parte a que la mayoría de los fármacos son fungistáticos (inhiben el crecimiento de los hongos) y a la administración prolongada de los tratamientos que permite la selección de clones resistentes (Loeffler & Stevens, 2003) han llevado a una constante búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces que puedan brindar más y mejores opciones en las farmacopeas actuales (Dabur et al, 2004).

El papel de los productos naturales en la medicina moderna como fuente de nuevos fármacos ha sido discutido y recogido en diversas revisiones que podemos resumir en tres aspectos fundamentales:

- a) Proporcionan nuevas entidades químicas con una amplia diversidad estructural que pueden servir de modelo para realizar modificaciones semisintéticas o síntesis total.
- b) El gran número de enfermedades que pueden ser tratadas por sustancias de origen natural.
- c) La frecuencia de su uso en el tratamiento de las enfermedades (Flores, 2006).

2.2 ANTECEDENTES

Los hombres de todas las épocas han luchado contra las enfermedades, previniendo su aparición con actuaciones profilácticas y combatiéndolas con medidas terapéuticas, entre las que destaca el uso de los medicamentos; es decir, la administración de sustancias en el organismo a las que se atribuyen propiedades curativas. Históricamente cuatro han sido los medios de lucha contra la enfermedad: el empírico, el mágico, el religioso y el científico (De Sagrera, 2006).

Estudios fitoquímicos realizados en especies de la familia *Piperaceae* en Brasil han revelado la ocurrencia de diversos productos naturales fisiológicamente activos tales como alcaloides, amidas, pironas, dihidrochalconas, flavonoides, fenilpropanoides, lignanos y neolignanos. Varias amidas isobutílicas como la pirrolidina, dihidroxipiridona



y piperidina han sido aisladas a partir de especies de esta familia. Estas amidas son de gran interés debido a sus potentes propiedades insecticidas y antifúngicas (Flores, 2001).

El género *Piper* posee gran importancia comercial, económica y medicinal (Arnason et al, 2005). Como ejemplo de ello tenemos a *P. nigrum* que es utilizada en el mundo de las especerías para la producción de pimienta. Las especies *Piper* son reconocidas por el sistema Indio Ayurvesidic de medicina por sus propiedades medicinales, lo mismo ocurre en la medicina tradicional de Latino América (Flores et al, 2000).

El extracto clorofórmico de los tallos de *P. arborescens* ha mostrado tener actividad significativa contra un cultivo de células KB y sobre el sistema de leucemia linfocítica P-388. En Jamaica *P. aduncum* y *P. arborescens* son utilizadas como remedios para problemas estomacales y como repelentes de insectos. La *P. guineense* en sus frutos posee propiedades saborizantes, mientras que sus hojas, raíces y semillas se han utilizado internamente como agentes medicinales para el tratamiento de bronquitis, enfermedades gastrointestinales, venéreas y el reumatismo. Un extracto de la *P. nigrum* mostró carcinogénesis en ratones (Pino et al, 2009).

En trabajos previos se ha reportado el aislamiento, estructura química y actividad antifúngica de varias amidas como la piplartina, piperamina, piperina, pelitorina, entre otras, aisladas de semillas y hojas de *P. tuberculatum*. Los ensayos se realizaron con los hongos *Cladosporium sphaerospermum* y *Cladosporium cladosporioides* utilizando el método de bioautografía directa (Cantón et al, 2000) (Huamaní & Ruiz, 2005).

Los extractos de *P. regnelli* y los neolignanones aislados de esta especie, (Benavides et al, 1999) reportaron actividad contra los hongos patógenos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*, causantes de dermatofitosis en mamíferos (Ferrándiz et al, 2006).

La especie *P. asperiusculum*, es un arbusto nativo que crece entre los 1000 y 4000 m.s.n.m. (Jorgensen & León-Yáñez, 1999). Específicamente *P. asperiusculum* es utilizada en infusión para el tratamiento de infecciones micóticas de los pies y para combatir los piojos.



Con estos antecedentes en el Departamento de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, con la colaboración del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Pavía-Italia se está desarrollando un estudio fitoquímico en algunas especies del género *Piper* presentes en la región Sur del Ecuador. La presente investigación busca aislar, identificar, y evaluar microbiológicamente los metabolitos secundarios, que le otorgarían a la especie *P. asperiusculum*, comúnmente llamada “matico mata-piojo”, la actividad antifúngica. La especie en estudio se encuentra en el poblado de Piutnza, perteneciente al cantón Chinchipe, de la provincia de Zamora Chinchipe.

Para evaluar la actividad antifúngica se utilizó dos cepas de hongos, ambos son causantes de dermatofitosis, estos son: *T. mentagrophytes* ATCC 2885® y *T. rubrum* ATCC 28188®.

2.2.1 Características botánicas de la especie *Piper asperiusculum* Kunth

Piper asperiusculum pertenece a la familia *Piperaceae* que comprende más de 3610 especies agrupadas en 10 géneros. De los cuales el más importante y extenso es el género *Piper* (Lawrence, 1951). Las características morfológicas de esta especie vegetal se pueden apreciar en las figuras 1a y 1b.

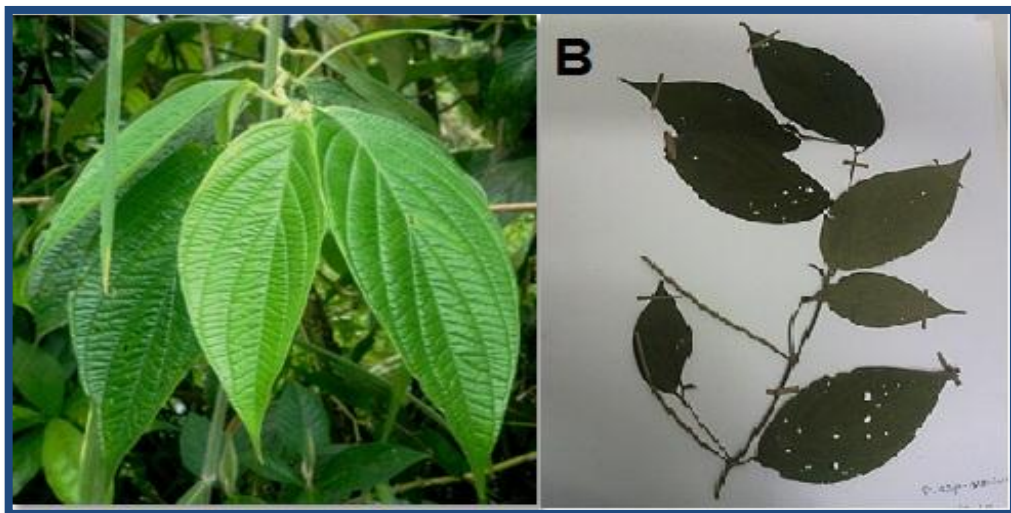


Figura 1. a. Fotografía de *P. asperiusculum* en el lugar de recolección. **b.** Muestra vegetal de *P. asperiusculum* conservada en el herbario UTPL.



2.2.2 Dermatofitosis

Las dermatofitosis son micosis superficiales causadas por hongos de los géneros *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, que tienen la capacidad de invadir tejido queratinizado como la piel, el pelo y las uñas del hombre y algunos animales. *Microsporum* y *Trichophyton* son patógenos humanos y animales, mientras que *Epidermophyton* es exclusivamente un patógeno humano (Jowa State University, 2005). Son las infecciones micóticas más comunes a nivel mundial, constituyen entre el 70 y el 80% de todas las micosis (Méndez et al, 2004). Se clasifican en tiña de la cabeza, tiña del cuerpo, tiña de la mano, tiña de los pies (Fig. 2), tiña de la ingle, tiña del área del pañal tiña de las uñas (Schiwinn et al, 2005).



Figura 2. Fotografía de caso clínico común dermatofitosis de pie. (Pie de atleta)

Fuente: www.ferato.com¹

Trichophytum rubrum es un hongo filamentoso con micronidios piroformes, sésiles sobre las hifas formando racimos. Posee macroconidios muy escasos, con varios tabiques, de formas irregulares, de pared fina y lisa, al final de la hifa. Abundan las clamidosporas intercalares, presentan hifas en raqueta, pero no filamentos espirales (Fig. 3a). Crece bien en la mayoría de los medios de cultivo comunes. Es el agente más común de dermatofitosis (tinea pedis, tinea corporis y onicomycosis) con lesiones eritematosas, poco inflamatorias, pruriginosas que pueden ser resistentes a los tratamientos convencionales (Crespo, 2008).

¹ Figura 2: http://www.ferato.com/wiki/index.php/Pie_de_atleta



Trichophyton mentagrophytes es el segundo agente causal de dermatofitosis luego de *Trichophyton rubrum*. Posee dos variedades *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* es un organismo zoofílico y *T. mentagrophytes* var. *interdigital* que es antropofílico. La variedad antropofílica produce mínima reacción inflamatoria usualmente en la piel interdigital de los pies, y la variedad zoofílica produce considerable inflamación y ampollas y se asocia con dermatofitides. Puede producir tinea capitis, tinea pedis, tinea corporis, tinea barbae y tinea unguium. Un rasgo único de esta especie es su capacidad de perforar pelo in vitro que ayuda a diferenciarlo de *T. rubrum* (Rueda, 2002). Sus características morfológicas se describen en la Fig. 3b.

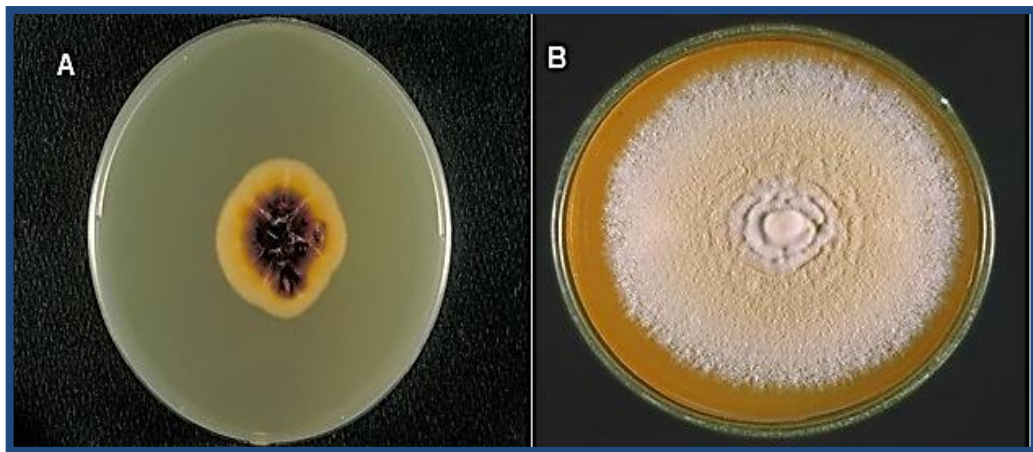


Figura 3. a. *Trichophyton rubrum*² b. *Trichophyton mentagrophytes*³

Fuente: <http://phil.cdc.gov>

² Figura 3a: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trichophyton_rubrum_var._rodhaini_PHIL_4248_lores.jpg

³ Figura 3b: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trichophyton_mentagrophytes_PHIL_2929_lores.jpg

III. MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se recolectó una muestra vegetal en estado de floración de *P. asperiusculum* el 16 de octubre de 2012 en el sector Piuntza, perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe. Las coordenadas del sitio de recolección son: 729771E, 0551219N, a una altura de 912 m.s.n.m. Se preparó una muestra de herbario para su identificación cuyo vaucher: Pi-010-10 se encuentra depositado en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja. La caracterización botánica se la realizó en el Herbario Nacional en la ciudad de Quito.

3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

El material vegetal recolectado fue secado a una temperatura de 37°C durante 48 horas. A partir de 500g de muestra seca se procedió a macerar con tres mezclas de solventes de polaridad ascendente, AcOEt, MeOH y MeOH-H₂O en proporción 7:3 (v/v) respectivamente. En una relación 1:10 planta: solvente.

La maceración fue combinada, es decir, dinámica por 5 minutos (Fig. 4a), y estacionaria 55 minutos (Fig. 4b). Seguidamente se filtró al vacío (Fig. 4c). Los procesos de maceración y filtrado al vacío se realizaron tres veces. Luego mediante rotaevaporación a presión reducida se obtuvo tres extractos. El AcOEt fue rotaevaporado mediante presión reducida a 35°C, el MeOH a 37°C y el MeOH-H₂O a 40°C (Fig. 4d).

Para facilitar la identificación y trabajo con los extractos obtenidos se los denominó como se muestra a continuación: Extracto total en AcOEt (LCH1), Extracto en MeOH (LCH2) y Extracto en MeOH-H₂O (LCH3).



Figura 4. Obtención de los extractos. **a.** Maceración dinámica (5min), **b.** Maceración estacionaria (55min), **c.** Filtración al vacío, **d.** Rotaevaporación.

3.3 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS

Luego de obtener los tres extractos en AcOEt, MeOH, y MeOH-H₂O 7:3 (v/v), utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄, se observó cuál de los tres extractos presentaba mayor riqueza y mejor separación de los compuestos. Cabe indicar que se realizó en fase directa e inversa, y a distintas polaridades (Fig. 5 y 6). Finalmente con los resultados obtenidos se decidió optar por desclorofilar el Extracto total en AcOEt (LCH1).

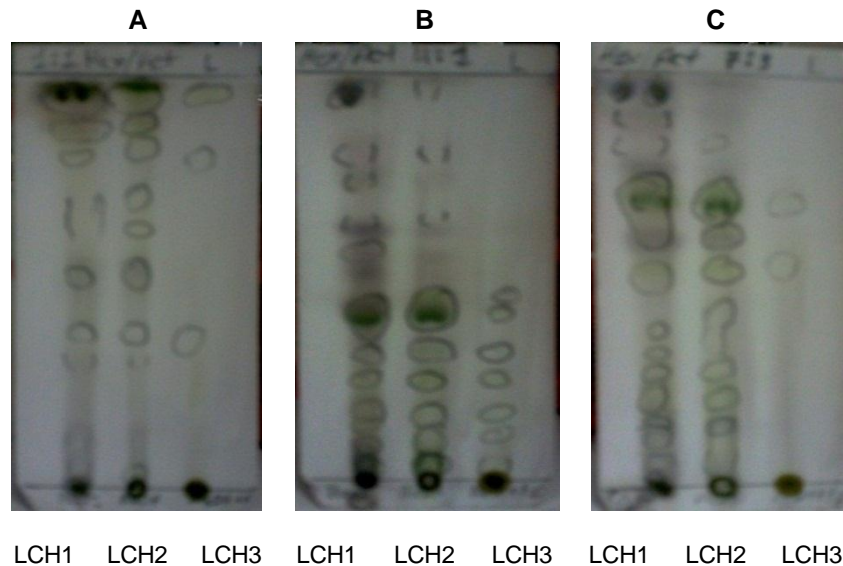


Figura 5. Placas de sílica gel TLC fase directa de los extractos de *P. asperiusculum*.
a) F. móvil: Hex-AcOEt 1:1 (v/v); b) F. móvil: Hex-AcOEt 4:1 (v/v); c) F. móvil: Hex-AcOEt 7: 3 (v/v)

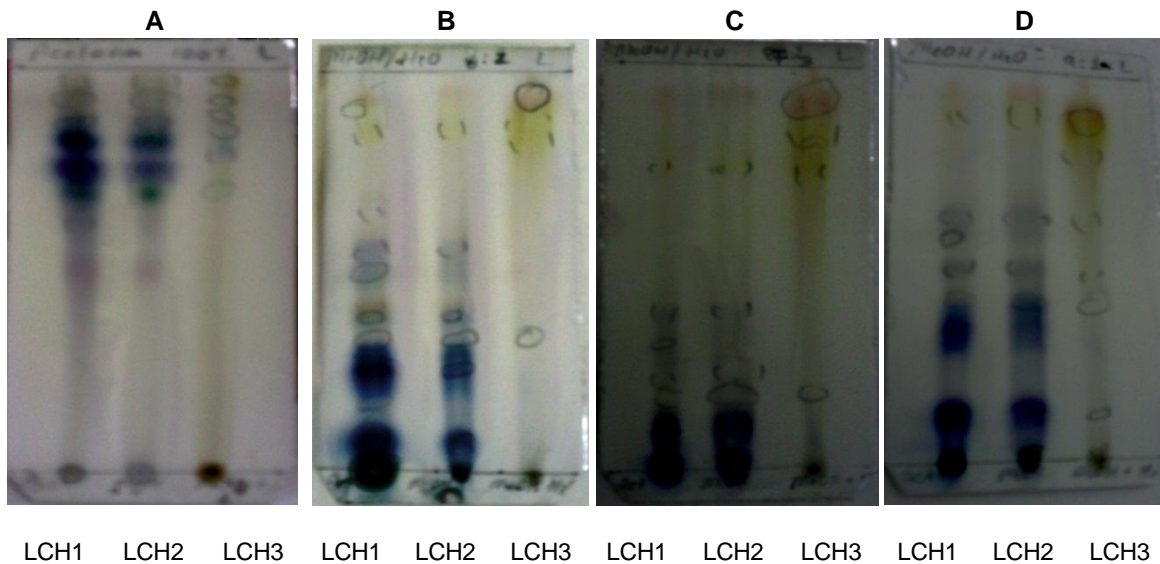


Figura 6. Placas de sílica gel TLC fase inversa de los extractos de *P. asperiusculum*.
a) F.móvil: acetona 100%; b) F. móvil: MeOH- H₂O 8:2 (v/v); c) F. móvil: MeOH-H₂O 7:3 (v/v); d) F. móvil: MeOH- H₂O 9:1 (v/v)⁴

⁴ Codificación de figuras 5 y 6:

3.4 DESCLOROFILACIÓN

Se pesó 5g del extracto total en AcOEt (LCH1) para proceder a eliminar las clorofilas mediante una columna SPE Discovery-18 60 mL de 10 gramos utilizando como eluyente una mezcla de MeOH-H₂O en proporción 8:2 (v), obteniéndose 1,52g de extracto desclorofilado (LCH1.1). El residuo del extracto de AcOEt con clorofilas (LCH1.2), fue recogido con Acetona al 100%. El proceso general de obtención y análisis cromatográfico de los extractos se resumen en el esquema de la Fig. 7.

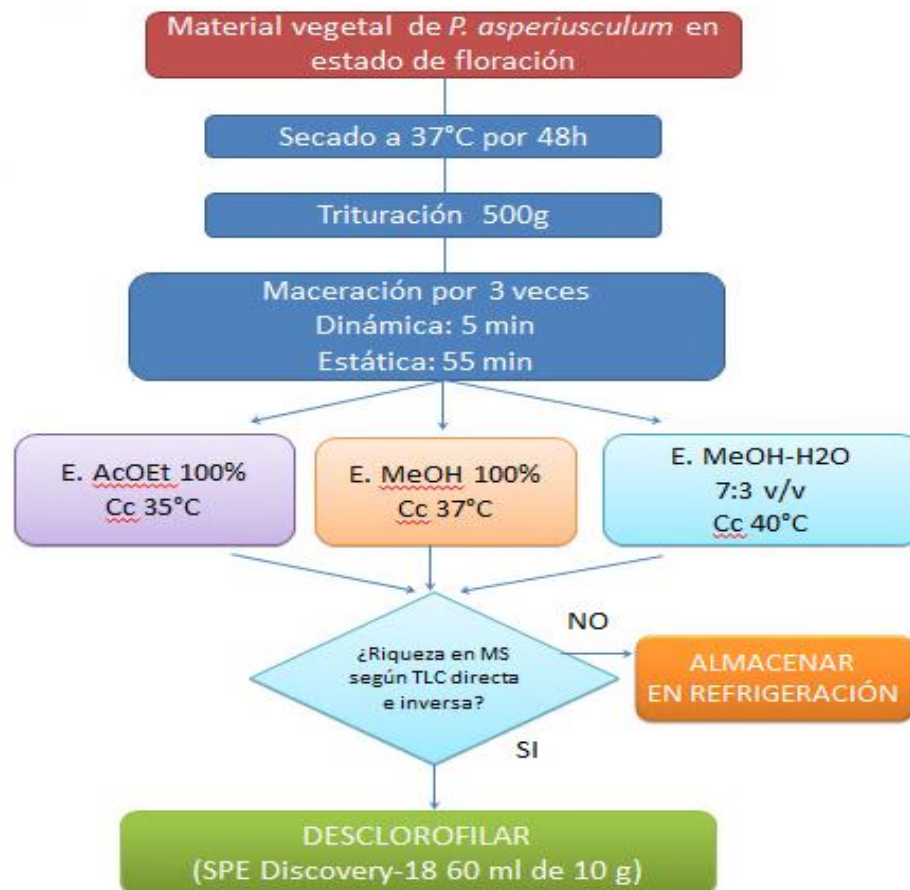


Figura 7. Esquema del procedimiento de extracción de los extractos de *Piper asperiusculum* en AcOEt, MeOH y MeOH-H₂O 7:3 (v/v).⁵

LCH1 (Extracto total en Acetato de etilo), **LCH2** (Extracto total en metanol) y **LCH3** (Extracto total en Metanol-Agua 7:3 v/v)

⁵ Cc: Temperatura a la que se concentró los extractos en el Rotaevaporador.

Finalmente se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), mediante el Método de Microdilución en caldo frente a *Trichophyton rubrum* (Tr) y *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) del Extracto total en acetato de etilo (LCH1), Extracto en acetato de etilo desclorofilado (LCH1.1) y residuo del extracto de AcOEt con clorofilas (LCH1.2). Esto para tener un conocimiento general de las propiedades antifúngicas del extracto en AcOEt desclorofilado (LCH1.1) y evaluar los resultados del proceso de eliminación de las clorofilas (Fig. 8).



Figura 8. Esquema del proceso de desclorofilación del extracto total de acetato (LCH1), y evaluación de la actividad antimicótica de sus derivados, contra cepas de *Trichophyton rubrum* (Tr) y *Trichophyton mentagrophytes* (Tm).

3.5 FRACCIONAMIENTO EN CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Se sembró 1,2g del Extracto acético desclorofilado (LCH1.1) para su fraccionamiento en cromatografía de columna (CC) en una relación 1:100 (extracto: sílica). Se eluyó con disolventes de polaridad ascendente (Hex, AcOEt y MeOH). La sílica gel empleada fue de marca Merck 0,0015-0040mm.



3.6 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Se realizó ensayos en cromatografía de capa fina (TLC) a las fracciones obtenidas, para ello se utilizó una placa de sílica gel 60 F₂₅₄ (fase directa). Los solventes utilizados para la fase móvil fueron Hex: AcOEt 1:1; 7:3; y 6:4 (v/v), los mismos que permitieron la separación e identificación de los compuestos. La visualización posterior se realizó con luz ultravioleta de 254 y 365nm. En el caso de las fracciones 366 (LF17) y 467 (LF18), se utilizó una placa de sílica gel en fase inversa, los solventes utilizados como fase móvil fueron AcOEt-MeOH en proporción 1:1 y 7:3.

3.7 UNIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRACCIONES

Se recolectó 365 fracciones de 5 mL cada una. Para su unión se relacionó la altura de las manchas características de cada fracción, y la similitud visual que estas reflejaron ante la luz ultravioleta a una longitud de 254 y 365nm; además se corroboró esta información con el agente revelador utilizado, el ácido sulfúrico al 5% y vainillina (Anexo 1).

Las fracciones 176-195 (LF7) y 206-226 (LF9) que cristalizaron, fueron sometidas a un proceso de purificación utilizando dos disolventes: AcOEt caliente para lavar las impurezas, y MeOH para inducir la cristalización. Finalmente con la ayuda de un equipo de filtrado al vacío se obtuvo los cristales más puros.

3.8 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS FRACCIONES

Esta caracterización se realizó solamente a las fracciones que cristalizaron. Se determinó el punto de fusión (Pf), factor de retención (Rf) y su solubilidad (s).

3.8.1 Punto de fusión

Para determinar el punto de fusión de las fracciones, se calentó lentamente una pequeña cantidad de la fracción a analizar en el equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60Hz (Fig. 9). A continuación se registró la temperatura a



la cual la muestra pasaba de estado sólido a líquido. Para evitar falsos resultados, el ensayo se realizó por duplicado.



Figura 9. Equipo de fusión Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22

3.8.2 Factor de Retención

Se lo calculó mediante la determinación de la relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen o lugar de siembra (Anexo 2).

3.8.3 Solubilidad

Para determinar la solubilidad de las fracciones obtenidas se utilizó CH_2Cl_2 , AcOEt, MeOH y Hex.

3.9 IDENTIFICACIÓN DE LAS MOLÉCULAS AISLADAS

3.9.1 Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de masas (CG-EM)

Los compuestos aislados de la especie *P. asperiusculum*, fueron identificados mediante Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de masas (CG-EM), utilizando un Cromatógrafo de gases Agilent, las respectivas inyecciones se realizaron en la columna capilar DB-5MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano).



El equipo empleado para el análisis de las fracciones LF7 y LF9 fue un cromatógrafo de gases serie 6890N, acoplado 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.

Las características de la columna capilar utilizada en este estudio se detallan en la tabla 1. Los parámetros operacionales bajo los cuales, se inyectaron las muestras para su posterior análisis mediante CG-EM se detallan en la Fig. 10.

Tabla 1. Características de la columna capilar utilizada

Características de la columna capilar					
Fracciones	Columna	Temperatura (°C)	Película (µm)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
LF7 y LF9	DB-5MS	350	0,25	0,25	30

Fuente: Fielquimec ®

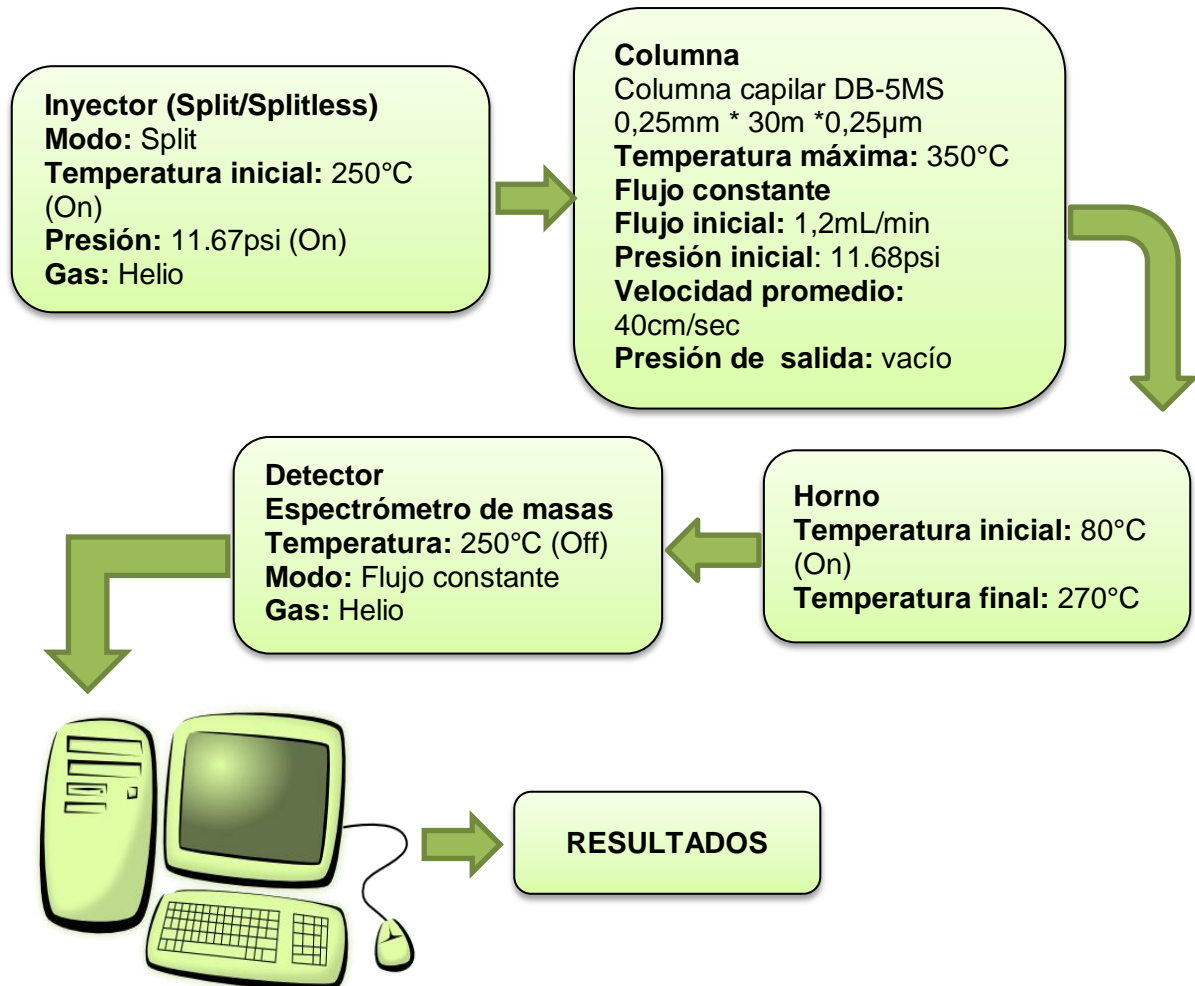


Figura 10. Condiciones de operación del CG-EM en la columna DB-5MS para el análisis de las fracciones LF7 y LF9

3.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

3.10.1 Microdilución en Caldo: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

a. Fundamento

Es un método de cultivo líquido al cual se le agrega un estándar bacteriano o fúngico y es inoculado dentro de los pocillos de una microplaca TC96, que contienen diferentes diluciones del extracto a ensayar para tener



concentraciones decrecientes inhibitorias en caldo. Este método define 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 (Willey & Sons, 2005).

b. Microorganismos de Prueba

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

c. Preparación de las muestras

Para disolver los extractos, se utilizó 20mg de muestra diluido en 1000µl de Dimetil-sulfoxido (DMSO). Con el fin de disolver completamente los extractos se utilizó el equipo de ultrasonido. En el caso de las fracciones LF7 y LF9, se utilizó únicamente 2mg de muestra en 100µl de DMSO.

3.10.2 Preparación de la suspensión de los inóculos

Se preparó la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C. De la cepa de *T. mentagrophytes* ATCC ® 28185 se tomó 49µl, y de la cepa de *T. rubrum* ATCC ® 28188 68µL. Esto fue diluido en 7mL de Caldo Sabouraud respectivamente. De esta suspensión se usan 100µL para completar a 200µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL. Las condiciones de cultivo de las cepas empleadas se detallan en la tabla 2.



Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación para las cepas de hongos utilizadas.

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

Fuente: (Willey & Sons, 2005)

3.10.3 Ensayo

El ensayo se realizó sobre microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución doble seriada del siguiente modo: colocamos 180µL de caldo Sabouroud al primer pocillo y 100µL a todos los demás pocillos restantes, luego se adicionó 20µL de la disolución del extracto o la fracción prueba según sea el caso, después se realizaron diluciones seriadas tomando 100µL del primer pocillo y diluyendo con 100µL del pocillo siguiente y se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se siguió el mismo procedimiento para el control de esterilidad (180µL caldo + 20µL extracto), control negativo (180µL caldo + 20µL DMSO) y para el control positivo (180µL caldo + 20µL Itraconazol) (Figura 11).

Después de preparada la placa se inocularon todas las columnas con 100µl de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando un volumen final de 200µl en la placa de cultivo, de esta manera se ajustó la población final del inóculo a 5×10^4 esporas/mL, y una concentración final de la disolución de prueba de 1000 a 0,5µg/mL en las diluciones seriadas consecutivas. El control positivo consiste en una solución de 1mg/mL de Itraconazol. Así mismo como control negativo se empleó DMSO. Se incubaron las placas a 28°C, y se registró los resultados por 96 horas.

La lectura e interpretación de la CMI se la realizó visualmente. Se define como la menor concentración del extracto prueba necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de evaluación (Willey & Sons, 2005).

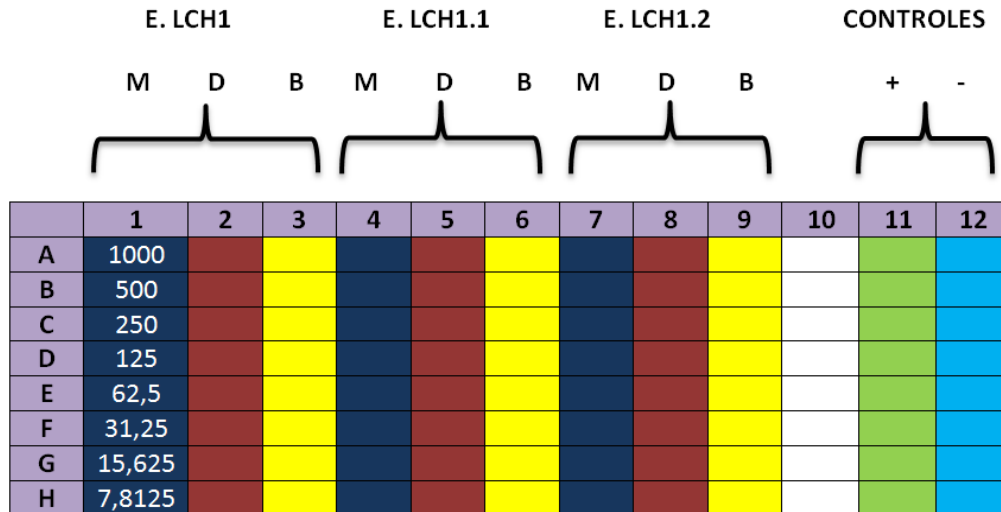


Figura 11.- Ilustración de la microplaca TC96 hecha con 12 columnas y 8 filas (A –H), con las concentraciones de los extractos evaluados en $\mu\text{g/mL}$.⁶

Adaptación de Chamba & Ramirez, 2012

⁶ Codificación figura 11:

M: Muestra; **D:** Duplicado; **B:** Blanco; **Control positivo:** Itraconazol 100% inhibición (7,8 $\mu\text{g/mL}$); **Control negativo:** DMSO

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA ESPECIE *P. asperiusculum*

En la tabla 3 se describe el peso y rendimiento de los extractos LCH1, LCH2 y LCH3 a partir de 500g de muestra vegetal seca. Así como los resultados del proceso de desclorofilación del extracto LCH1.

Tabla 3. Peso y rendimiento de los extractos y derivados obtenidos de *P. asperiusculum*

EXTRACTO	Peso Inicial (g)	PESO Final (g)	RENDIMIENTO (%)
Extracto total en AcOEt (LCH1)	500	9,02	1,80
Extracto total en MeOH (LCH2)		20,44	4,09
Extracto total en MeOH-H ₂ O 7:3(LCH3)		26,66	5,33
Extracto en AcOEt desclorofilado (LCH1.1)	5	1,52	30,4
Residuo con clorofilas del extracto total en AcOEt (LCH1.2)		3,2	64

4.2 COMPUESTOS AISLADOS DE LA ESPECIE *P. asperiusculum*

Del Extracto en AcOEt desclorofilado (LCH1.1) se obtuvo 367 fracciones con un volumen de aproximadamente 5mL, excepto las fracciones 366 (LF17) y 367 (LF18) que tuvieron 500mL.

Se puede apreciar que las fracciones LF7, LF8 Y LF9 presentaron formación de cristales, luego de que el disolvente en el que fueron eluidas se evaporara (Tabla 4).



Tabla 4: Fraccionamiento Cromatográfico del extracto en AcOEt desclorofilado (LCH1.1)

Fracciones	Denominación	Proporción	Mezclas de disolventes	Apariencia física	Peso (mg)
1-24	LF1	95:5	Hex-AcEOt	Grumos	8
25-39	LF2	95:5	Hex-AcEOt	Aceitosa	134
40-75	LF3	95:5	Hex-AcEOt	Aceitosa	83
76-95	LF4	95:5	Hex-AcEOt	Aceitosa	21
96-124	LF5	95:5	Hex-AcEOt	Grumos	27
125-175	LF6	80:20	Hex-AcEOt	Aceitosa	47
176-195	LF7	80:20	Hex-AcEOt	Cristales	33
196-205	LF8	80:20	Hex-AcEOt	Cristales	15
206-226	LF9	80:20	Hex-AcEOt	Cristales	95
227-247	LF10	70:30	Hex-AcEOt	Aceitosa	93
248-264	LF11	60:40	Hex-AcEOt	Aceitosa	48
265-270	LF12	50:50	Hex-AcEOt	Aceitosa	9
271-293	LF13	50:50	Hex-AcEOt	Aceitosa	87
294-340	LF14	50:50	Hex-AcEOt	Aceitosa	82
341	LF15	50:50	Hex-AcEOt	Sólido	1
342-365	LF16	50:50	Hex-AcEOt	Sólido	1
366	LF17	100	AcEOt	Sólido	56
367	LF18	100	MeOH	Sólido	39

4.2.1. Fracciones 176-195 (LF7)

Fueron obtenidas en Hex-AcOEt proporción 80:20. Su peso original fue de 33mg; pero luego del proceso de purificación y cristalización se redujo a 13mg.



Características físicas

Son cristales blanquecinos, tipo escarcha. Solubles en AcOEt y CH₂Cl₂, y no solubles en Hex y MeOH. Tienen un punto de fusión de 135°-138°C, y un factor de retención (Rf) de 0,80.

Interpretación de la cromatografía de capa fina (TLC)

No fue visible en la luz UV de 254 y 365nm; pero al ser revelada con Ácido sulfúrico/vainillina al 5%, se pudo apreciar una sola mancha violeta (Fig.12).



Figura 12. Cromatograma revelado de las fracciones LF7, y su agua madre posterior al proceso de purificación. Fase estacionaria: Sílica gel, y fase móvil Hex-AcOEt 1:1

Interpretación del espectro de CG-EM

Según la Base de Datos del equipo de Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM), que se utilizó en esta investigación, indica que en la fracción LF7, con una probabilidad del 95%, se encuentra el β -sitosterol. Así mismo con un 94%, y en menor concentración el Stigmasta-5,22-dien-3-ol. Finalmente con una certeza del 94%, y como compuesto minoritario el Campesterol (Anexo 3).

En los espectros de masa obtenidos se observaron los picos de ion molecular a 414, 412 y 400m/z (Anexos 4-6), que son compatibles con las fórmulas moleculares

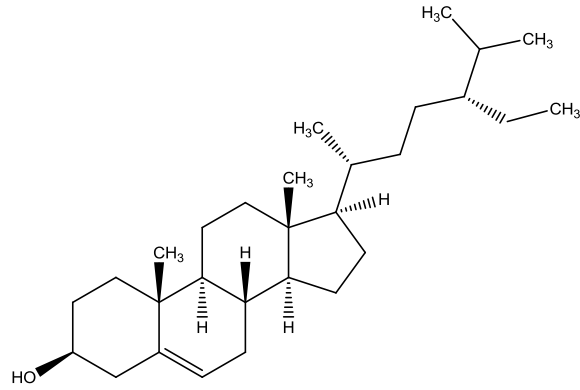


$C_{29}H_{50}O$ del β -sitosterol, $C_{29}H_{48}O$ del Stigmasta-5,22-dien-3-ol y $C_{28}H_{48}O$ del campesterol, respectivamente. Todos estos datos fueron comparados con la base de datos NIST, (2010).

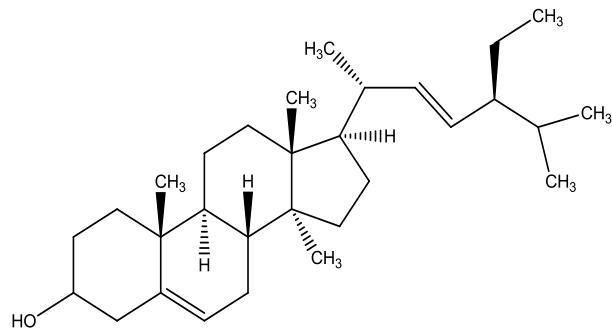
Para el campesterol se obtuvo un tiempo de retención de 28,79 minutos, con un porcentaje de área relativo de 1,24% y un pico de ion molecular de 400m/z (Anexo 4). Seguidamente el Stigmasta-5,22-dien-3-ol, con un tiempo de retención de 29,58 minutos, con un área relativa de 2,62% y un pico de ion molecular de 412 (Anexo 5). Y en el caso del β -sitosterol, el tiempo de retención fue de 31,46 minutos, el porcentaje de área relativa de 3,09 % y el pico de ion molecular de 414 m/z (Anexo 6).

En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroles: β -Sitosterol, Estigmasterol y Campesterol (Harborne & Williams, 2000). Los esteroides se derivan biogénicamente de la AcetilCoA vía mevalonato y escualeno. Se han aislado esteroides como el Estigmasterol en la *Piper betle* (Parmar, y otros, 1997). Así mismo en un estudio realizado en el Departamento de Química de la UTPL se aisló e identificó al Stigmasta-5,22-dien-3-ol en *Piper pseudochurumayu* (Chamba & Ramirez, 2012). Los estudios anteriormente descritos, indican que es frecuente encontrar resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

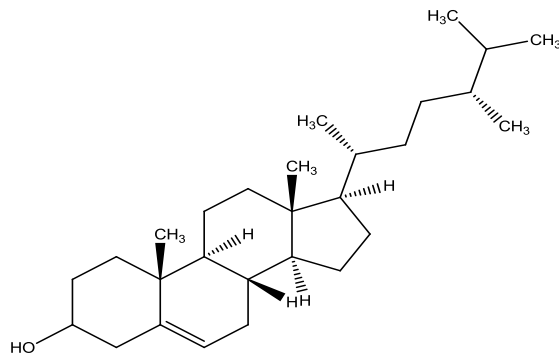
Cabe indicar que es muy difícil identificar al β -sitosterol, Stigmasta-5,22-dien-3-ol y al Campesterol, cuando se encuentran juntos en una misma fracción, mediante la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ya que los tres compuestos poseen el mismo núcleo esteroide, de tipo Δ^5 -3-3 hidroxianosteno (Fig. 13) (Martinez, 2001). Pero, en caso de no ser posible obtenerlos en estado puro, la Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de Masas (CG-EM) es un método válido para identificarlos (Parra, 2011).



A. β -sitosterol



B. Estigmasterol (stigma-5,22-dien-3-ol)



C. Campesterol

Figura 13. Estructura química de los compuestos identificados por CG-EM, en la fracción LF7.



4.2.2 Fracciones 206-226 (LF9)

Se obtuvieron en Hex-AcOEt, proporción 80:20. Su peso fue de 95mg. Luego de la purificación se redujo a 14mg.

Características físicas

Son cristales redondeados, cubiertos parcialmente con unas partículas amarillas aceitosas. Su punto de fusión fue de 67-73°C. El Rf es de 0,80. Solubles en AcOEt y CH₂Cl₂, y no solubles en Hex y MeOH.

Interpretación de la cromatografía de capa fina (TLC)

No fue visible en la luz UV de 365nm; pero a la luz UV de 254nm y al ser revelada con Ácido sulfúrico/vainillina al 5%, se puede apreciar una sola mancha azul (Fig. 14).



Figura 14. Cromatograma revelada de las fracciones LF9, luego del proceso de purificación. Fase estacionaria: Sílica gel, y fase móvil Hex-AcOEt 1:1

Interpretación del espectro de CG-EM

La CG-EM determinó que en la fracción LF9, con una probabilidad del 90%, se encuentra el 6 β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione (Fig.15 y Anexo 7).



Para el 6 β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione se tiene un tiempo de retención de 13,10 minutos, con un porcentaje de área relativo de 11,66%, con un pico de ion molecular en 288m/z. Fue el compuesto mayoritario, y él único identificado de tres detectados.

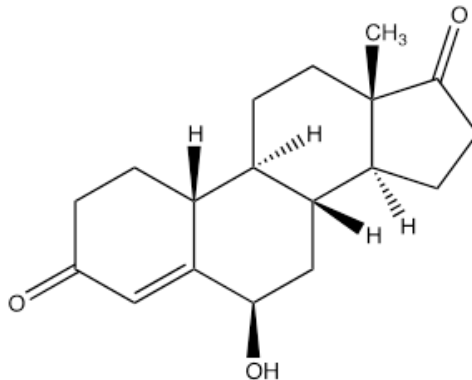


Figura 15. Estructura química del 6 β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione. C₁₈H₂₄O₃

Para comprobar el grado de pureza de una sustancia orgánica cristalina se determina el punto de fusión, que es una importante constante para identificar a nuevos y conocidos compuestos. Pero en caso de encontrarse en una misma sustancia más compuestos, el punto de fusión varía, como consecuencia de sus impurificaciones recíprocas (Gray, 1976). En la tabla 5 se describen las características de los compuestos identificados en las fracciones LF7 y LF9.

Tabla 5: Caracterización de las fracciones y componentes identificados a partir de *P. asperiusculum*.

<i>Piper asperiusculum</i>		
	Fracciones LF7	Fracciones LF9
Compuestos identificados	<ul style="list-style-type: none">• β-sitosterol• Stigmasta-5,22-dien-3-ol• Campesterol	<ul style="list-style-type: none">• 6β-Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione
Apariencia física	Cristales tipo escarcha	Cristales redondeados, cubiertos parcialmente por partículas aceitosas.
Peso(mg)	13	14
Punto de Fusión (C°)	135-138	67-73



Factor de retención (Rf)	0.80	0.80
Soluble	AcOEt- CH ₂ Cl ₂	AcOEt-CH ₂ Cl ₂
No soluble	Hex-MeOH	Hex-MeOH
Uv 254 (nm)	Fluorescente	No fluorescente
Uv 365 (nm)	Fluorescente	No fluorescente
Color revelado	Morada	Azul

4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Se considera que si un extracto o compuesto presenta una CMI <100µg/mL la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a 500µg/mL moderada, de 500 a 1000µg/mL mala, y >1000µg/mL nula (Holetz, Pessini, Sánchez, Cortez, Nakamura, & Filho, 2002).

Las especies del género *Piper* contienen diversos tipos de metabolitos, entre los más importantes tenemos las amidas, flavonoides, kavapirona, lignanos, neolignanos, piperolidos, propenilfenoles y terpenos (Parmar, y otros, 1997). Se ha reportado actividad insecticida y antifúngica en las amidas, cumarinas y lignanos (Huamaní & Ruiz, 2005). El extracto total en AcOEt (LCH1) mostró actividad antifúngica mala, es decir 500µg/mL contra Tm y nula contra Tr. El extracto en AcOEt desclorofilado (LCH1.1) tuvo una CMI de 250µg/mL, que se considera actividad antifúngica moderada frente a Tm y Tr. Mientras que el extracto residuo con clorofilas (LCH1.2) y las fracciones LF7 y LF9 no mostraron ser activas contra las dos cepas de hongos (Tabla 6).

Probablemente la actividad moderada (250µg/mL) del extracto LCH1.1, contra Tr y Tm, fue producto de un sinergismo. Sinergia se define como la respuesta farmacológica superior producida al actuar dos o más componentes juntos que al hacerlo por separado (Muñoz, 2011). Esto explicaría la razón por la cual las fracciones LF7 y LF9 obtenidas desde el extracto LCH1.1 no presentaron actividad antifúngica.



Las fracciones 176-195 (LF7) contienen β -sitosterol, Stigmasta-5,22-dien-3-ol y Campesterol. Aunque a la mayoría de los fitosteroles no se les conocen actividades biológicas específicas en la naturaleza excepto como componentes de las membranas celulares, se han reportado diversas propiedades terapéuticas al ser ingeridos en determinadas dosis, entre ellas, la reducción del colesterol sérico, inhibición del crecimiento en células de cáncer, actividad antiinflamatoria, antipirética, liberación de insulina e inmunomodulación (Garibello, 2010).

Se ha podido comprobar los efectos anticancerígenos de los esteroides en el laboratorio, tanto in vitro (cultivo de líneas celulares) como en animales, sobre algunos tipos de cáncer de mayor recurrencia en la población, como el de colon, próstata y mama, con fuertes evidencias de la inhibición del crecimiento y la apoptosis de células tumorales, así como de la metástasis. Se reportó una reducción de hasta un 80% del crecimiento y de hasta un 30% de metástasis, siendo el β -sitosterol, el fitosterol de mayor efectividad (De Stefani et al, 2000).

No existen estudios que describan la actividad biológica, menos aún antifúngica del 6β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione; pero según los resultados obtenidos en esta investigación es inactivo contra las cepas de hongos de Tm y Tr (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración mínima Inhibitoria (MIC) por método de Microdilución en Caldo

Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
Extracto/Fracción	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185® (Tm)	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188® (Tr)
LCH 1	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
LCH 1.1	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
LCH 1.2	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Fracción LF7	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Fracción LF9	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Control Positivo	Itraconazol 100% de inhibición (7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	
Control Negativo	Mayor 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	

V. CONCLUSIONES



V. CONCLUSIONES

- Las fracciones 176-195 (LF7) y 206-226 (LF9) eluidas en Hex-AcOEt 80:20 cristalizaron. Mediante Cromatografía de gases acoplado a Espectroscopía de masas (CG-EM) se determinó en las fracciones LF7: el β -sitosterol, stigmasta-5,22-dien-3-ol y el campesterol. En el caso de las fracciones LF9 utilizando la misma metodología se identificó el 6 β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione.
- Probablemente producto de un sinergismo, el extracto en AcOEt desclorofilado (LCH1.1), presentó una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 250 μ g/mL contra las cepas de hongos *T. mentragrophytes* ATCC 28185® y *T. rubrum* ATCC 28188®.
- Las fracciones LF7 y LF9 obtenidas a partir del extracto LCH1.1 no mostraron actividad antifúngica contra *T. mentragrophytes* ATCC 28185® y *T. rubrum* ATCC 28188®.

VI. RECOMENDACIONES



VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de la especie vegetal *Piper asperiusculum*, a partir del aislamiento e identificación de compuestos en las fracciones que no cristalizaron, con el fin de determinar cuáles son los responsables de las propiedades terapéuticas que se le atribuyen a la planta.
- Aislar los compuestos identificados, con el objetivo de establecer si poseen efectos antioxidantes, actividad biológica contra líneas celulares y/o bacterias.
- Desarrollar investigaciones como la presente, en otras especies del género *Piper*, ya que varios estudios avalan su riqueza en metabolitos secundarios, que se presentan como una alternativa a la medicina tradicional.

VII. BIBLIOGRAFÍA



VII. BIBLIOGRAFIA:

- Amason, J., Dursty, & Philogene. (2005). Phytochemical discovery of new botanical insecticides. (R. Regnault, B. Philogene, & C. Vincent, Edits.) 37-46.
- Benavides, P., Sartorelli, P., & Kato, M. (1999). Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnelli*. *Phytochemistry*(52), 339-343.
- Cantón, R., García, J., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Metodos Básicos para el estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* (J. Picazo, Ed.)
- Cerón, C. (2002). La etnobotánica en el Ecuador. *Cinchonia*, 2(3), 1-16.
- Chamba, D., & Ramirez, J. (2012). *Aislamiento, caracterización y evaluación antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie Piper Pseudochurumayu (Matico).* Loja: Tesis de grado previa a la Obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico.
- Crespo, V. (2008). *Generalidades sobre los hongos. Dermatomicosis: saprofitias y dermatofitosis Piel* (Vol. 7).
- Dabur, R., Singh, H., Chhillar, A., & Sharma, G. (2004). Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia*, 3-4(75), 389-391.
- De la Torre, L., Alarcon, D., Kvist, L., & Salazar, J. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas.* Quito&Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- De Sagrera, J. (2006). *Historia de la Farmacia.* Barcelona, España: Litocenter, SL.
- De Stefani, E., Boffetta, P., Ronco, A., Brennan, P., Pellegrini-Deneo, H., Carzoglio, J., y otros. (2000). Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutrición y cáncer*(4), 140-144.



- Dyer, L., Richards, J., & Dodson, C. (2004). Isolation, Synthesis and Evolutionary Ecology of Piper Amides. *MRM/KJ*(7), 117-139.
- Ferrándiz, C., Bielsa, I., & Ferrándiz, L. (2006). Micosis cutáneas en la edad pediátrica. *Medicina Clínica*, 126(1), 37-42.
- 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*, 109-116.
- Flores, E. (2006). Metabolitos bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana. *Tesis doctoral*. Bolivia: Universidad de la Laguna.
- 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* (Vol. 8). Biofarbo.
- Flores, N. (2001). Metabolitos Bioactivos aislados de cinco especies Piper con actividad antiparasitaria y/o keushmanicida. . La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.
- Garibello, C. F. (2010). *Estudio de hojas de Pentacalia vaccinioides (Kunth) Cuatr como nueva fuente natural de sustancias esteroideas y cumarinas*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.
- Gómez, C. J. (2005). *Paginas de Historia de la Farmacia*. Madrid, España: Nestlé S.A.
- Gray, G. (1976). *Molecular Structure and the Properties of Liquid Crystals*. New York: Academic Press.
- Harborne, J., & Williams, C. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 481-504.
- Holetz, F., Pessini, G., Sánchez, 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*, 97, 1027-31.



- Huamaní, A., & Ruiz, Q. (2005). *Determinación de la actividad antifúngica contra Candida albicans y Aspergillus niger de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú*. Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico.
- Introducción a la cromatografía*. (2011). Recuperado el 08 de Febrero de 2013, de [.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf](http://www.ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf)
- Jaramillo, M., & Manos, P. (2001). Phylogeny and the patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae). *American Journal of Botany*(88), 706-716.
- Jones, P., MacDougall, D., Ntanios, F., & Vanstone, C. (1997). Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can J Physiol Pharmacol*(75), 217-227.
- Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. USA: Missouri Botanical Garden Press*.
- Jowa State University. (1 de Mayo de 2005). *Dermatofitosis: Tiña, Tinea, Dermatomicosis*. Recuperado el 4 de Enero de 2013, de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/dermatofitosis.pdf>
- Kubinyi, H. (2005). *Pharmazie* (Vol. 50).
- Lawrence, H. G. (1951). *Taxonomy of vascular plants*. 444. New York, USA: The Macmillan Company.
- Ling, W., & Jones, P. (1995). Dietary Phytosterols: A review of metabolims, benefits and side effects. *Life Sci*(57), 195-206.
- Loeffler, J., & Stevens, D. (2003). Antifungal drug resistance. *Clin. Infect Dis*, 36, 31-41.
- Martinez, A. (2001). *Esteroles*. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.



- Méndez, L., López, R., & Hernández, F. (2004). *Micosis Superficiales. Dermatofitos* (Segunda ed.). Actualidades en Micología Médica. Facultad de Medicina. UNAM.
- Muñoz, H. (2011). Sinergia y adición en anestesiología. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 195-199.
- National Institute of Standards and Technology (NIST). (17 de Marzo de 2010). *Chemistry WebBook*. Recuperado el 06 de 01 de 2013, de <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Navarro, G., & Fabiola, R. (2006). *Comprobación del efecto cicatrizante de Peperomia scutellaefolia R, et P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico*. Recuperado el 04 de 02 de 2013, de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/guillermo_n_r/generalidades.htm
- Oxford. (2005). *Update Software Ltd.* . (T. d. Library, Ed.) Recuperado el 15 de Enero de 2013, de <http://www.update-software>
- Palacios, D. (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, Lepechinia mutica Benth y Niphogenon d. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., y otros. (1997). Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*(46), 1866-1870.
- Parra, J. E. (2011). *CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA PARTE AÉREA DE Piper cf. cumanense Kunth (Piperaceae)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química.



- Pino, N., Meléndez, E., & Stashenko, E. (2009). *Comparación de la composición química de los aceites esenciales de Piper lanceifolium Kunth y P. hispidum del departamento del Chocó*. (Vol. 28).
- Quijano, M., Callejas, R., & Miranda, D. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical Piper species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*(33), 1266-1278.
- Rivera, G., & Malagón, O. (2010). *Elaboración de un fitopreparado antifúngico semisólido a partir del extracto fluido de la especie Piper Ecuadorensis (matico)*. Loja, Ecuador: Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Rueda, R. (2002). Micosis superficiales y dermatomicosis. *Colombia médica* 2002(33), 10-16.
- Sánchez, Y., Pino, O., Laza, F., Abreu, Y., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2011). ACTIVIDAD PROMISORIA DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES PERTENECIENTES A LA TRIBU PIPERACEAE FRENTE A Artemia salina Y Xanthomonas albilineans. *Scielo*, 26(1), 45-51.
- Schiwinn, A., Ebert, J., & Broccker, E. (2005). *Frecuency of Trychophytum rubrum in Tenia capitis. Mycoses*.
- Soltis, P., Soltis, D., & Chase, M. (1999). *Nature*.
- Universidad Nacional de Colombia. (2010). *Sistema de información sobre biodiversidad de Colombia*. Recuperado el 04 de 01 de 2013, de <http://data.sibcolombia.net/species/91245>
- Warnock, D. (1998). Fungal infections in neutropenia: Current problems and chemotherapeutic control. *Antimicrob Chemother*, 41, 95-105.
- Wiley, J., & Sons, L. (2005). *Oxford: Update Software Ltd*. Recuperado el 30 de Enero de 2013, de <http://www.update-software>

VIII. ANEXOS



Anexo 1

Preparación de la solución de revelado (ácido sulfúrico/ vainillina 5%)

Ácido sulfúrico y vainillina: Se emplea como revelador en los cromatogramas de aceites esenciales y la mayor parte de compuestos orgánicos.

Reactivos	Composición
Ácido sulfúrico	250mL de etanol
	12,5mL de ácido sulfúrico

Procedimiento:

Se aforan los 12,5mL de ácido sulfúrico con los 250mL de etanol.

Reactivos	Composición
Vainillina	250mL de etanol
	12,5g vainillina

Procedimiento:

Se aforan los 12,5g de vainillina con los 250mL de etanol.



Anexo 2

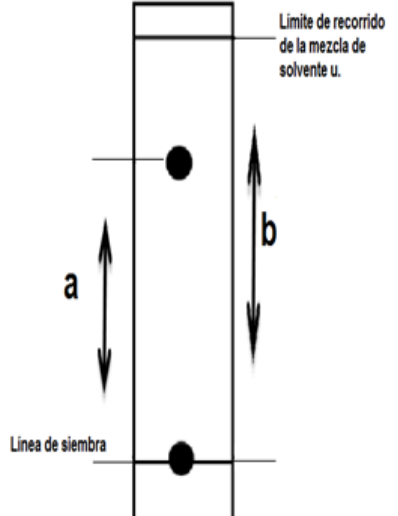
Cálculo del Rf en la placa de sílica gel marca Merck60 F₂₅₄

$$Rf = \frac{a}{b}$$

Donde:

a= Distancia que recorre el compuesto desde la línea de siembra.

b=Distancia que recorre la mezcla de solvente utilizada, desde la línea de siembra hasta el límite de recorrido superior.

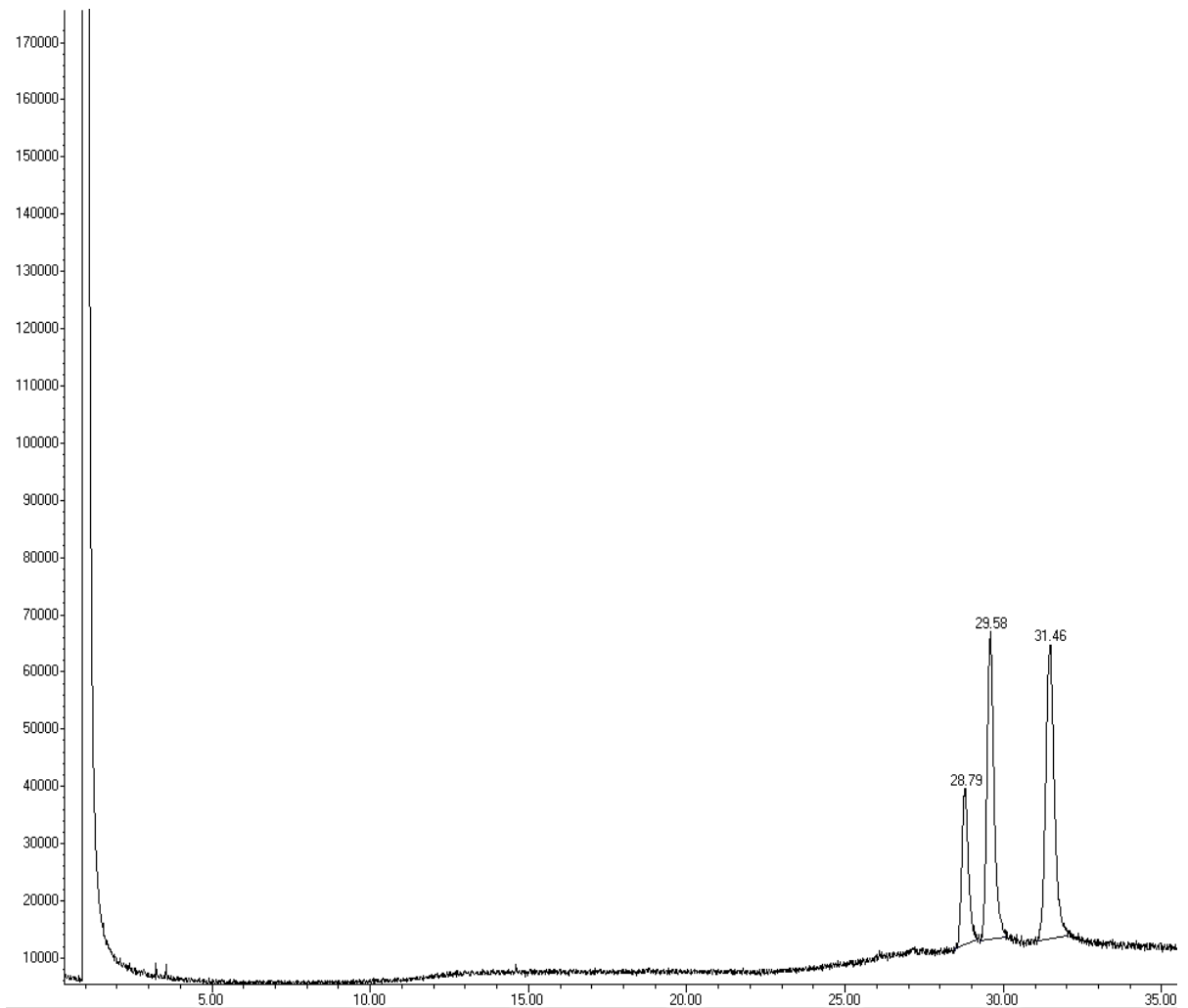


Fuente: http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf



Anexo 3

Espectros de masas (CG-EM) de la fracción LF7

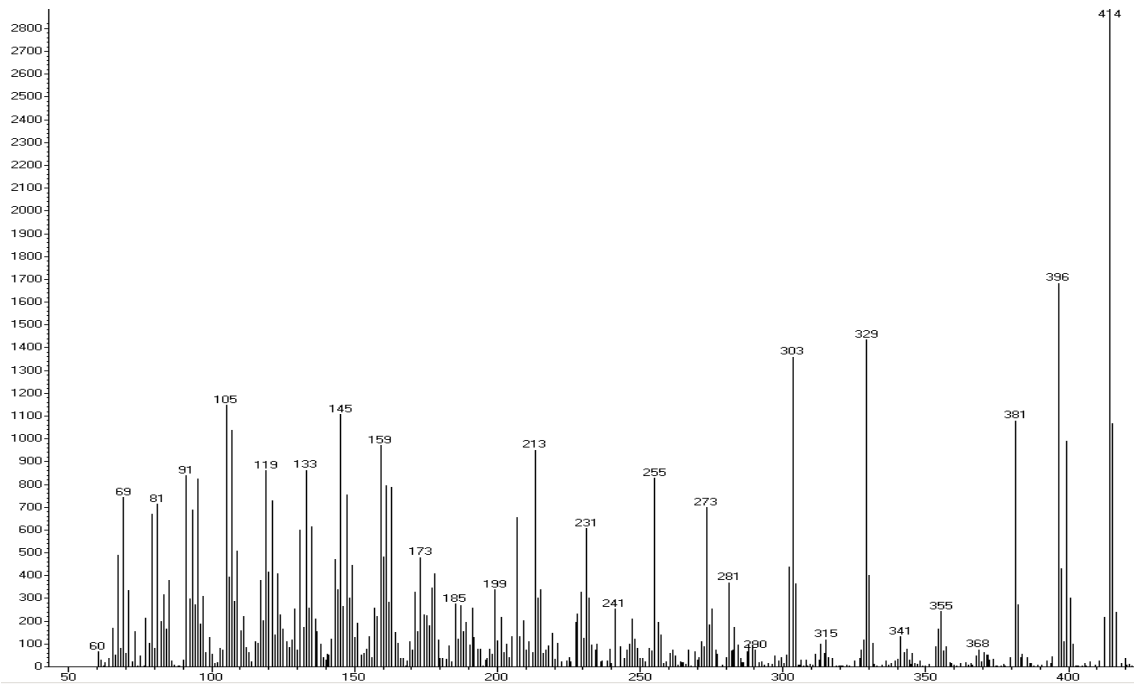


PK #	RT	Area%	Cas#	Qual%
β.-sitosterol,	31.46	3.09	00083-46-5	95
Stigmasta-5,22-dien-3-ol	29.58	2.62	00083-48-7	94
Campesterol	28.79	1.24	00474-62-4	94
Diclorometano (disolvente)	1.02	93.05	00075-09-2	86
				DB-5MS capillary column

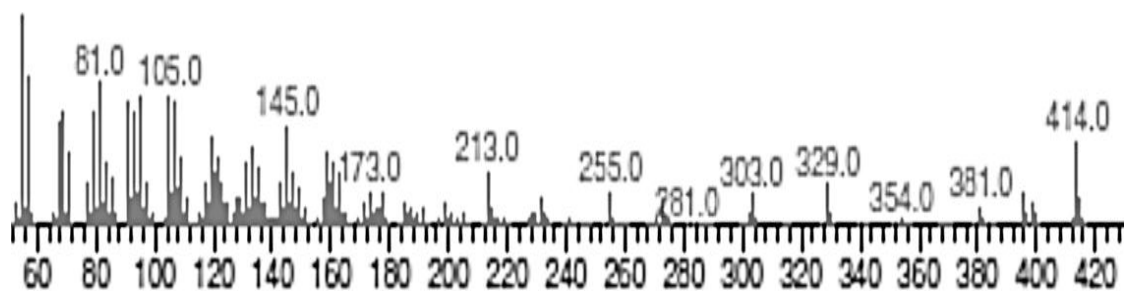


Anexo 4

Espectro de masas del β -sitosterol identificado por CG-EM, en la fracción LF7. (Anex. 4a) comparado con el espectro de la base de datos NIST 08 (Anex. 4b)



A.

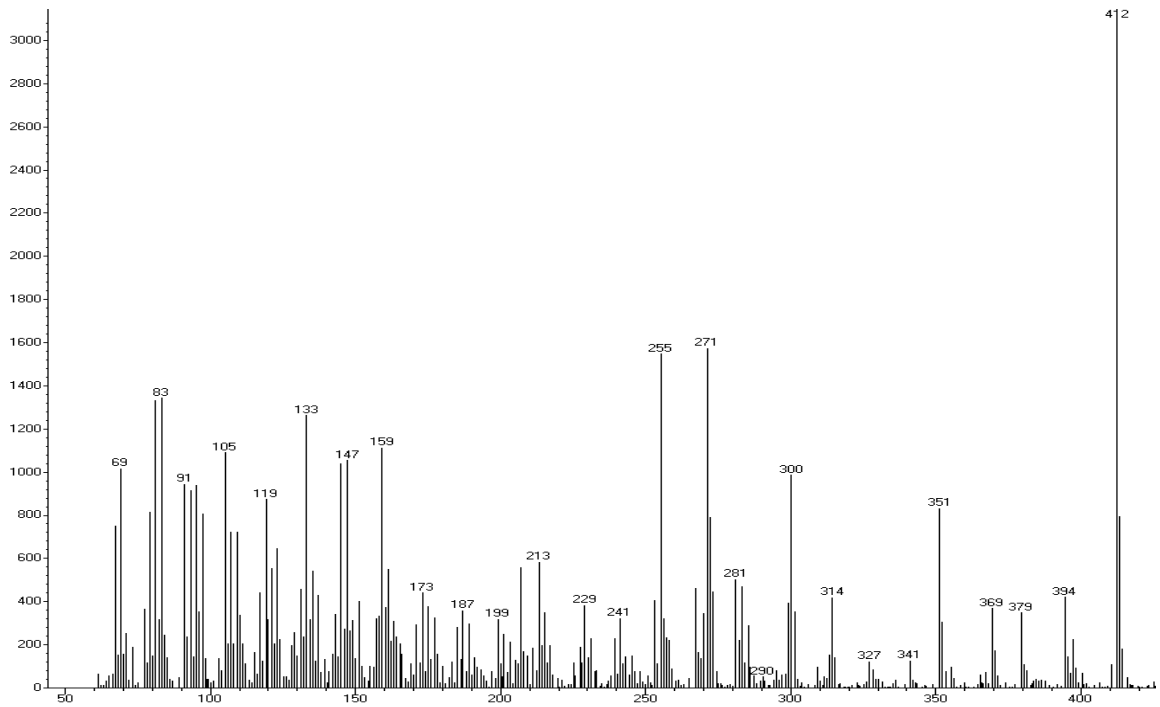


B.

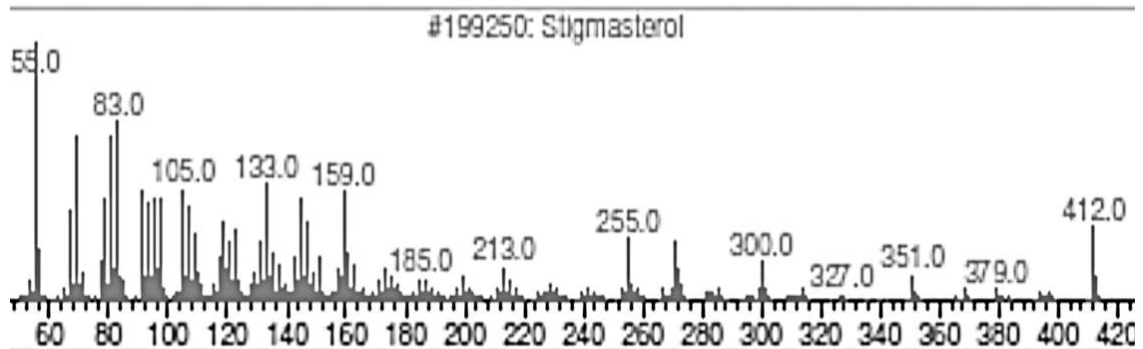


Anexo 5

Espectro de masas del Stigmasterol identificado por CG-EM, en la fracción LF7.
(Anex. 5a) comparado con el espectro de la base de datos NIST 08 (Anex. 5b)



A.

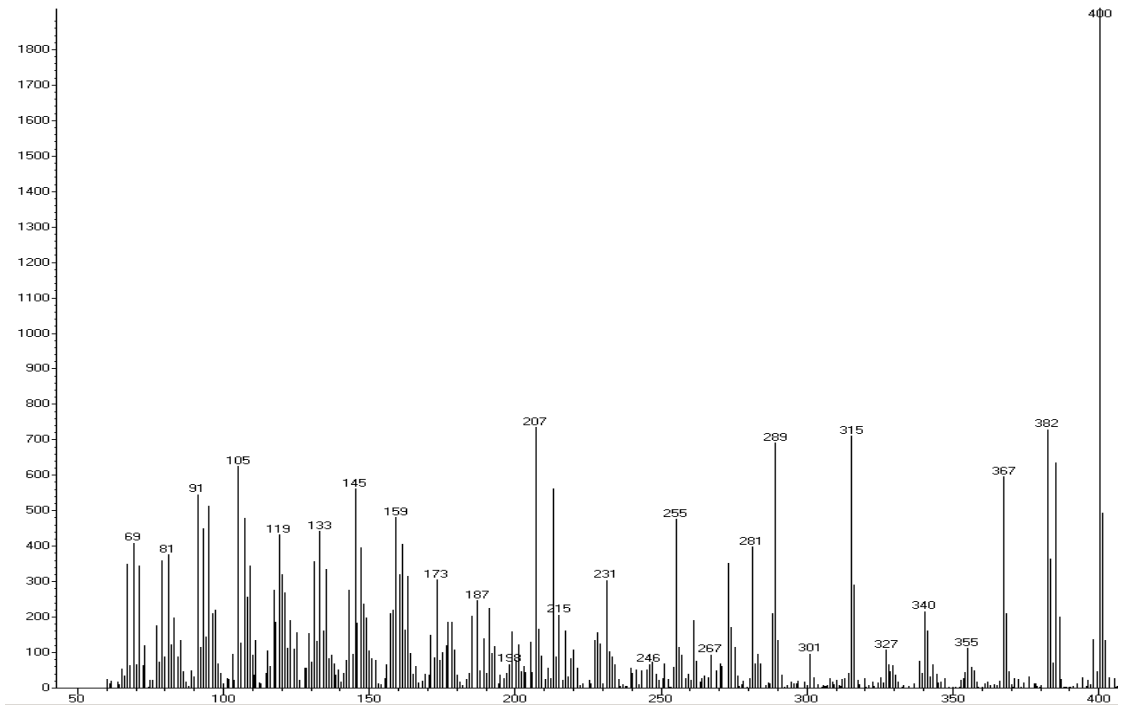


B.



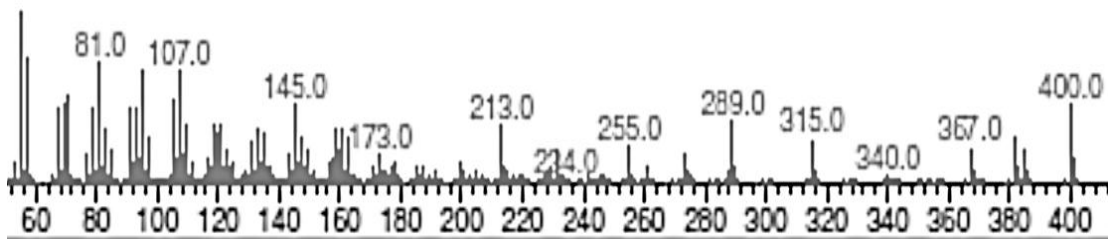
Anexo 6

Espectro de masas del campesterol identificado por CG-EM, en la fracción LF7. (Anex. 6a) comparado con el espectro de la base de datos NIST 08 (Anex. 6b)



A.

#195896: Campesterol

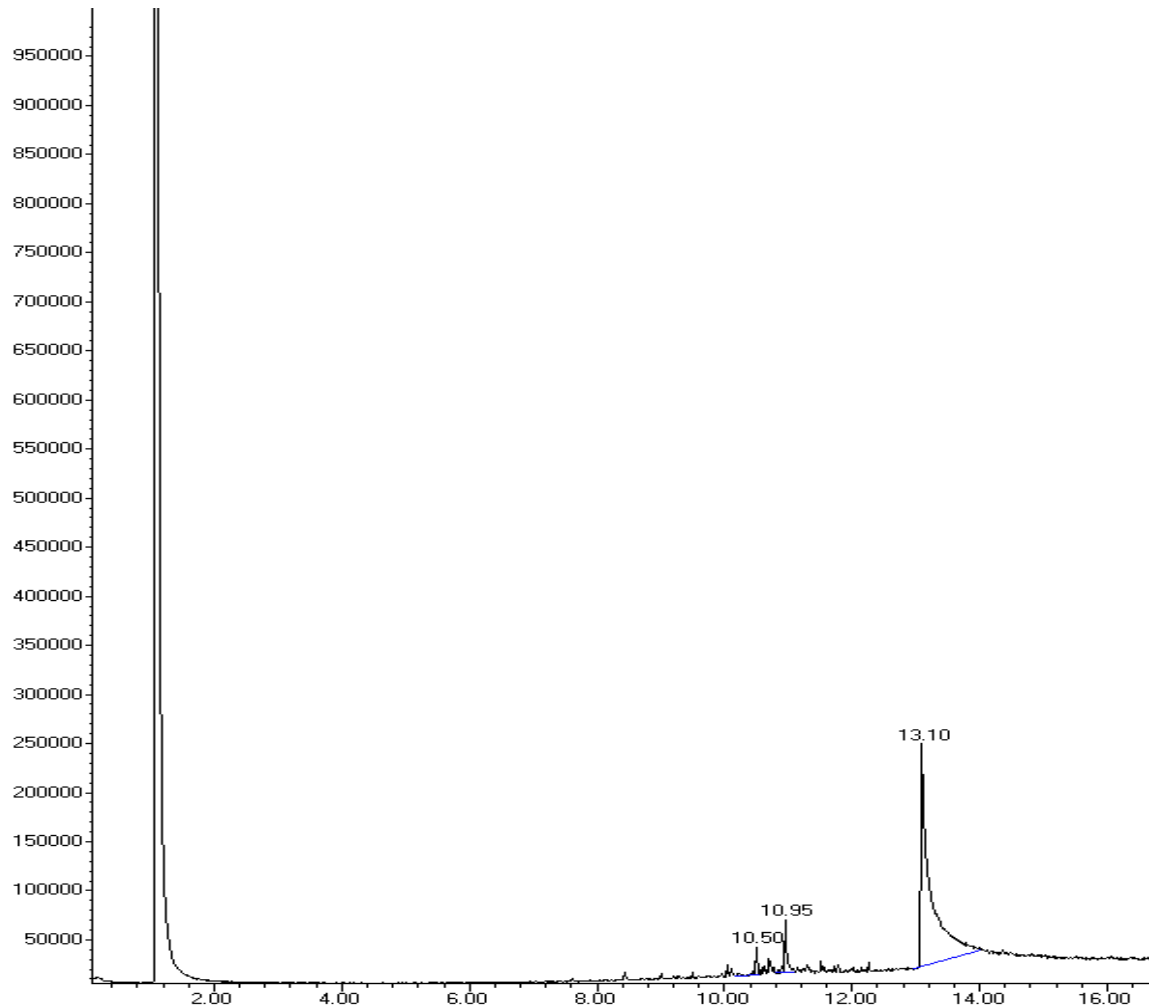


B.



Anexo 7

Espectros de masas (CG-EM) de la fracción LF9



PK #	RT	Area%	Cas#	Qual%
6β-Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione.	13.10	11.66	Not found	90
Not identified	10.95	0.98	Not found	>64
	10.50	0.34	Not found	>46
Diclorometano (disolvente)	1.11	87.03	00075-09-2	86
DB-5MS capillary column				



Anexo 8

Espectro de masas (CG-EM) del 6 β -Hydroxyestr-4-ene-3,17-dione

