



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA FARMACEUTICA

“Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los extractos totales y metabolitos secundarios de *Hedyosmum racemosum* de Zamora, Ecuador.”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTORA: Tinoco Lara, Daniela Estefanía

DIRECTOR: Morocho Zaragocín, Segundo Vladimir, M.Sc.

LOJA-ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

M.Sc.

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

C E R T I F I C A:

Que el presente trabajo, denominado: "Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los extractos totales y metabolitos secundarios de *Hedyosmum racemosum* de Zamora, Ecuador " realizado por el profesional en formación: Tinoco Lara Daniela Estefanía; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, septiembre de 2013

F) _____

Segundo Vladimir Morocho Zaragocin

CI: 110326907-0

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Daniela Estefanía Tinoco Lara declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS TOTALES Y METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Hedyosmum racemosum* DE ZAMORA, ECUADOR, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Segundo Vladimir Morocho Zaragocín director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

F) _____

Daniela Estefanía Tinoco Lara
CI 1900745843

DEDICATORIA

Dedico mi tesis con todo mi amor.

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mis padres Graciela y César por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome, brindándome todo su amor y velando con esfuerzo por mí durante este camino para convertirme en una profesional.

A mis hermanos María Augusta y Mario César por estar conmigo siempre compartir mis alegrías y fracasos.

A mi abuelita Sulamita, mi tía Flor y mi tío Luis por sus valiosos consejos, su ayuda y cariño.

A mis amigos María del Cisne, Anita, Claudia, Karina, Katty, Patricio y Daniel, por acompañarme durante este camino, apoyarme, alentarme a seguir y estar conmigo cuando los necesitaba.

Por todos ustedes he llegado hasta aquí y les dedico este fruto de mi esfuerzo.

Daniela Estefanía Tinoco Lara

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por protegerme, ayudarme y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mis padres por su apoyo y sustento, a mis hermanos y a toda mi familia y amigos por ser parte importante de mi vida, por su dedicación y empeño en hacerme una mejor persona.

A mi director de tesis M.Sc. Vladimir Morocho por su valiosa guía, asesoramiento, esfuerzo y dedicación en la realización de la misma.

Gracias al M.Sc Luis Cartuche por su ayuda y colaboración, durante la elaboración de este proyecto, a la Ing. Mónica Vega y el Ing. James Calva, personas que de una u otra forma contribuyeron con la realización de este proyecto.

Finalmente agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja y al Departamento de Química por la oportunidad de realizar mis estudios, este proyecto y poder ser un profesional.

Daniela Estefanía Tinoco Lara

INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vi
RESUMEN.....	- 1 -
ABSTRACT.....	- 2 -
INTRODUCCIÓN.....	- 3 -
CAPITULO I.....	- 4 -
1. GENERALIDADES.....	- 4 -
1.1. Plantas medicinales	- 4 -
1.2. Familia Chloranthaceae.....	- 5 -
1.3. Descripción de la especie vegetal: <i>Hedyosmum racemosum</i>	- 7 -
1.3.1. Taxonomía.....	- 8 -
1.4. Terpenos.....	- 8 -
1.4.1. Ruta biosintética de los Terpenos.....	- 9 -
1.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)	- 10 -
1.5.1. Principios de espectroscopía RMN.....	- 10 -
1.6. Concentración mínima Inhibitoria (CMI)	- 12 -
1.6.1. Microdilución en caldo	- 13 -
1.7. Enfermedades infecciosas.....	- 13 -
1.7.1. Bacterias Gram positivas	- 13 -
1.7.2. Bacterias Gram negativas.....	- 14 -
1.7.3. Dermatófitos	- 14 -
CAPITULO II.....	- 16 -
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 16 -
2.1. Esquema de metodología utilizada	- 16 -
2.2. Recolección del materia vegetal	- 16 -
2.2.1. Selección del material vegetal	- 17 -
2.3. Obtención del Extracto	- 17 -
2.4. Fraccionamiento en cromatografía en columna	- 19 -

2.4.1.	Cromatografía de capa fina	- 19 -
2.4.2.	Purificación de la fracción DT005	- 20 -
2.4.3.	Caracterización química de las fracciones.....	- 20 -
2.4.4.	Punto de fusión.....	- 20 -
2.4.5.	Factor de retención.....	- 21 -
2.4.6.	Solubilidad.....	- 21 -
2.5.	Caracterización Estructural.....	- 22 -
2.5.1.	Resonancia Magnética Nuclear	- 22 -
2.5.2.	Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM)...	- 22 -
2.6.	Determinación de la actividad antimicrobiana	- 23 -
2.6.1.	Microorganismos de prueba	- 23 -
2.6.2.	Preparación de las muestras	- 24 -
2.6.3.	Preparación del cultivo overnight.....	- 24 -
2.6.4.	Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias	- 24 -
2.6.5.	Preparación de la suspensión del inóculo para hongos	- 25 -
2.6.6.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	- 25 -
2.6.7.	CMI antifúngico.....	- 26 -
CAPITULO III	- 27 -
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	- 27 -
3.1.	Extractos obtenidos de la especie <i>H. racemosum</i>	- 27 -
3.2.	Compuestos aislados de la especie <i>H. racemosum</i>	- 27 -
3.2.1.	Fracción DT005.....	- 27 -
3.2.2.	Fracción DT030.....	- 27 -
3.3.	Interpretacion de resultados de Resonancia Magnetica Nuclear.....	- 28 -
3.4.	Determinación de la Actividad Antimicrobiana	- 30 -
3.4.1.	Determinación de la actividad antifúngica.....	- 31 -
3.4.2.	Determinación de la actividad antibacteriana.....	- 31 -
CONCLUSIONES	- 33 -
RECOMENDACIONES	- 34 -
BIBLIOGRAFÍA	- 35 -
ANEXOS	- 39 -

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Características de la columna capilar utilizada -----	- 22 -
Tabla 2: Medios de cultivo y condiciones de incubación para bacterias -----	- 24 -
Tabla 3: Medios de cultivo para hongos-----	- 25 -
Tabla 4: Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de <i>H. racemosum</i> -----	- 27 -
Tabla 5: Datos de RMN del compuesto DT030 -----	- 30 -
Tabla 6: Concentración mínima inhibitoria (CMI) -----	- 31 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sesquiterpenos de tipo eudesmano. -----	7
Figura 2: Sesquiterpenos de tipo lindenano. -----	7
Figura 3: <i>H. racemosum</i> muestra de herbario -----	8
Figura 4: <i>H. racemosum</i> -----	8
Figura 5: Síntesis de terpenos -----	10
Figura 6: Esquema del desarrollo de la investigación. -----	17
Figura 7: Área de estudio de la especie <i>H. racemosum</i> -----	18
Figura 8: Esquema de obtención de extractos totales -----	19
Figura 9: Separación de fases en el proceso de bipartición -----	20
Figura 10: Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto de AcOEt ---	20
Figura 11: TLC total de las fracciones obtenidas observadas en lámpara UV -----	21
Figura 12: Equipo para determinación de punto de fusión -----	21
Figura 13: Calculo de factor de retención -----	22
Figura 14: Parámetros operacionales de la columna DB-5MS -----	24
Figura 15: Precipitado inicial de la fracción DT030 previo a la purificación -----	29
Figura 16: Compuesto DT030 visto en lámpara UV y revelado -----	29
Figura 17: Hedyosumin D (a) 7,10-Epoxy-1,5-guaia-3,11-dien-8,12-olide (b) -----	30
Figura 18: Fragmentos de la molécula DT030 -----	30

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Espectro de ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) -----	- 40 -
Anexo 2: Espectro de ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)-----	- 41 -
Anexo 3: Espectro de COSY -----	- 42 -
Anexo 4: Espectro de HMBC -----	- 43 -
Anexo 5: Espectro de HSQC -----	- 44 -
Anexo 6: Espectro de GC-masas-----	- 45 -
Anexo 7: Espectro de GC-masas-----	- 46 -

RESUMEN

Hedyosmum racemosum (Chloranthaceae) es un arbusto aromático de la región amazónica y de los Andes de Ecuador. Es conocida localmente como "Guayusa" y sus hojas son usadas en la medicina tradicional por sus efectos antisépticos, antiespasmódicos y anti-inflamatorios.

En el presente estudio fue aislado un sesquiterpeno ($C_{15}H_{16}O_3$) con peso molecular de 244g/mol del extracto total de Acetato de etilo y fue caracterizado usando diferentes técnicas espectroscópicas: TLC, CC y NMR.

La actividad antimicrobiana de los extractos totales y del compuesto fue evaluada contra siete especies de bacterias y dos especies de hongos usando el método de microdilución en caldo. Los valores de CMI del extracto de Acetato de etilo fueron de 62.5µg/mL para *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* y el sesquiterpeno (DT030) fue activo contra las bacteria Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con un CMI de 62.5µg/mL.

Palabras claves: *Hedyosmum racemosum*, Chloranthaceae, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, sesquiterpeno.

ABSTRACT

Hedyosmum racemosum (Chloranthaceae) is an aromatic shrub from the Amazon and the Andes region of Ecuador. It is locally known as "Guayusa" and its leaves are used in the folk medicine as antiseptic, antispasmodic and anti-inflammatory.

In the present study was isolated one sesquiterpene (C₁₅H₁₆O₃) with mw of 244g/mol from the total extract of Ethyl Acetate extract and characterized using different spectral techniques: TLC, CC and NMR.

The antimicrobial activity of the total extracts and the compound was tested against seven bacteria and two fungi species using the broth microdilution method. MIC values of the ethyl acetate extract were 62.5µg/mL for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* and the sesquiterpeno (DT030) was active against Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* at 62.5µg/mL.

Key words: *Hedyosmum racemosum*, Chloranthaceae, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, sesquiterpene.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales y aromáticas han sido un importante recurso para los cuidados de salud humana desde tiempos prehistóricos hasta hoy en día. Según la Organización Mundial de la Salud se conoce que el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para asistir problemas de salud, que implican el uso de extractos de plantas o de sus principios activos (OMS, 2005)

Ecuador cuenta con una riqueza abundante en especies vegetales en donde la aplicación de la medicina natural resuelve varios problemas de salud, esta medicina es practicada principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social y se puede encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía (De la Torre et al. 2008).

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo por ser inmensamente rica en plantas útiles por esta razón se han registrado 17058 plantas vasculares (Jorgensen & León, 1999). En Ecuador han sido reportadas 5172 especies útiles de las cuales el 60% son medicinales (Jorgensen & León, 1999).

Chloranthaceae es una familia compuesta por cuatro géneros: *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Ascarina*, distribuidas en 70 especies que crecen en regiones tropicales y subtropicales (Cao et al. 2008). Algunas especies (especialmente de *Chloranthus* y *Hedyosmum*) son usadas como plantas ornamentales, medicinales y con propósitos alimenticios, a manera de bebidas (Kawabata et al. 1981).

El género *Hedyosmum* está ampliamente distribuido en las áreas tropicales de América y consiste generalmente en árboles y arbustos aromáticos que crecen en áreas altas. El género está representado por aproximadamente 40 especies, de estas 16 han sido reportadas para el Ecuador y son ampliamente utilizadas en medicina tradicional por sus efectos antisépticos, antiespasmódicos y antiinflamatorios (Ulloa & Neill, 2004).

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 fina, que permiten separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas (Skoog et al. 2003).

CAPITULO I

1. GENERALIDADES

1.1. Plantas medicinales

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las plantas medicinales como: "la planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos" (Farnsworth et al. 1986).

Desde tiempos remotos hasta la actualidad se han utilizado las plantas para fines curativos, siendo una práctica común entre las poblaciones y en base a la experiencia, se ha encontrado que las plantas poseen propiedades medicinales para el tratamiento de múltiples enfermedades que van desde las infecciosas hasta el cáncer, pasando por los padecimientos autoinmunes, alergias, enfermedades metabólicas, etc. (Rates, 2001).

Ecuador a pesar de su extensión territorial relativamente pequeña, es considerado como uno de los países más ricos en cuanto a diversidad de plantas y animales, con solo el 0,2% de la superficie terrestre del mundo tiene en su territorio el 10% de todas las especies de plantas del planeta (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.

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes, la medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social (De la Torre et al. 2008).

En la región interandina se han realizado numerosos estudios sobre plantas útiles para los diferentes grupos que conforman la nacionalidad Kichwa de la Sierra y para los mestizos, en éstos la categoría de uso medicinal ha sido la más importante. En un estudio realizado con los Saraguro para rescatar el conocimiento etnobotánico y determinar de qué manera éste puede servir para identificar patrones de intercambio o de aculturación, se reportaron 370 especies útiles (Ellemann, 1990).

Las plantas medicinales son las que se han estudiado con mayor intensidad en la región andina ecuatoriana, muchas investigaciones acerca del uso medicinal de especies vegetales andinas se han llevado a cabo con la intención de que los ecuatorianos las incorporen en su cotidianidad y usen las plantas como sustitutas a las medicinas convencionales. De la torre

et al. 2008, menciona estudios realizados por Misael Acosta-Solís, sobre especies medicinales de uso tradicional milenario como la valeriana (*Valeriana sorbifolia*), el frailejón (*Espeletia pycnophylla*), la achicoria (*Hypochaeris sessiliflora*) y el kishwar (*Buddleja incana*).

Adicionalmente, se han efectuado análisis fotoquímicos de las Asteráceas andinas con propiedades medicinales (De la Torre et al. 2008).

Se han identificado algunas especies con propiedades medicinales que se han empleado tradicionalmente por los distintos grupos étnicos y que en la actualidad se comercializan. Entre ellas destacan las siguientes: la sangre de drago (*Croton lechleri*), usada principalmente por sus propiedades cicatrizantes y vigorizantes, la uña de gato (*Uncaria guianensis*, *U. tomentosa*), por sus propiedades antiinflamatorias y para combatir dolencias renales, y el chukchuwasu (*Maytenus krukovii*, *M. laevis*), por sus propiedades antirreumáticas, antidiarreicas y vermífugas plantas usadas como estimulantes como la guayusa (*Ilex guayusa*) (Buitrón, 1999).

Entre las plantas alucinógenas que tradicionalmente han tenido una enorme importancia cultural para todos los grupos indígenas hay varias especies que se han estudiado con más detalle en el Ecuador, en particular la ayahuasca o yaje (*Banisteriopsis caapi*) y sangre de toro (*Virola duckei*), mismas que podrían tener propiedades medicinales (Bennett & Alarcón 1994; Buitrón, 1999).

Actualmente, el deterioro del ambiente causado por la deforestación, el uso indiscriminado de agroquímicos, la contaminación del aire y del agua y otros factores están agravando las condiciones ecológicas donde crecen miles de especies con potencial medicinal, en última instancia muchas de estas especies desaparecen aún antes de haberlas identificado o haberlas estudiado (Núñez, 1982; COECOCEIBA, 2003).

1.2. Familia Chloranthaceae

Las Chloranthaceae son la única familia de angiospermas del orden Chloranthales. Es una pequeña familia de plantas aromáticas, principalmente arbóreas o arbustivas, con hojas opuestas connadas en la base y de variadas formas, presentan inflorescencias terminales o axilares y sus flores a menudo son individuales de tamaño muy reducido, hermafroditas o unisexuales (White, 1982)

Esta familia se compone por cuatro géneros: *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Hedyosmum* y *Ascarina*, distribuidas en 70 especies que crecen en regiones tropicales y subtropicales (Cao et al. 2008).

Las plantas de esta familia son ampliamente utilizadas en medicina popular por sus efectos antiespasmódicos, antisépticos y como medicamentos contra el cáncer o para aliviar el dolor, forúnculos y dermatopatías (Cao et al. 2008).

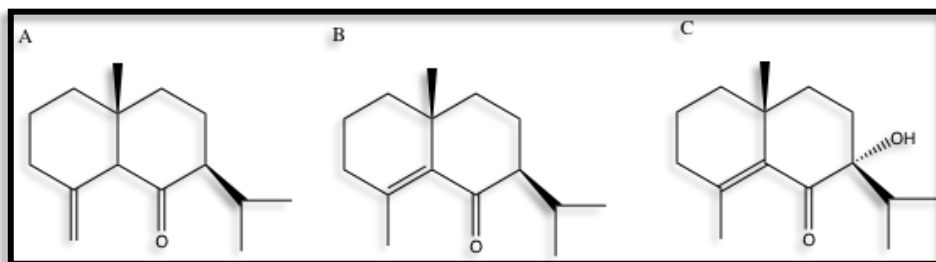
Estudios previos de esta familia han reportado el aislamiento de 124 compuestos como, terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, esteroides y la determinación de algunas bioactividades (Cao et al. 2008).

Varios extractos y algunos compuestos derivados de plantas de la familia Chloranthaceae, como flavonoides, lignanos, terpenos poseen una acción anti-inflamatoria y antimicrobiana, se ha observado que estos compuestos interfieren con algunos eventos del proceso inflamatorio como en la vía metabólica del ácido araquidónico, la vía del óxido nítrico o interfieren con el Factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), así como también inhiben la síntesis o activación de citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y quimiocinas (Calixto et al. 2004).

Se han encontrado 67 sesquiterpenos y derivados sesquiterpénicos como los principales componentes de la familia Chloranthaceae. Los tipos esqueléticos sesquiterpénicos que ocurren en Chloranthaceae fueron identificados como lindenane, eudesmano, germacrane, cadinane, y acorane (Cao et al. 2008).

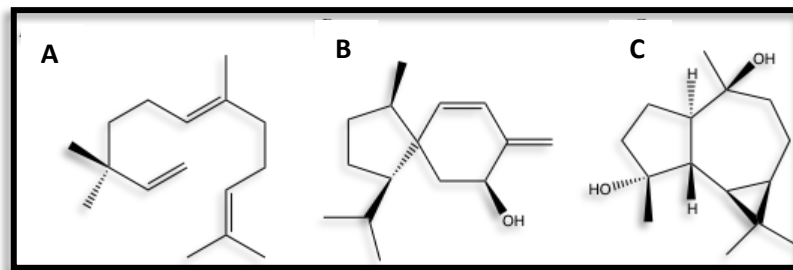
Se han aislado 34 sesquiterpenos de tipo Lindenano y sus derivados de las Chloranthaceae, incluyendo 18 sesquiterpenoides, 15 diméricos y un sesquiterpeno trimérico. Este tipo de esqueleto es diferente de el de eudesmano (Fig. 1) sólo en su anillo de tres miembros formado por C (1), C (2), y C (3). Los sesquiterpenos lindenano y sus derivados son los principales componentes de las plantas de esta familia y son reconocidos como un grupo de compuestos con una posible importancia taxonómica en Chloranthaceae (Fig. 2).

Figura 1: Sesquiterpenos de tipo eudesmano. A. Acolamone, B. Neoacolamone, C. 7a- hydroxyneoacolamone.



Fuente: Cao et al. 2008

Figura 2: Sesquiterpenos de tipo lindenano. A. Nerolidol, B. Skizukaacrodienol, C. 4b,7a-dihydroxyaromadendrane.



Fuente: Cao et al. 2008

1.3. Descripción de la especie vegetal: *Hedyosmum racemosum*

Hedyosmum racemosum es un arbusto nativo de los Andes y la Amazonía, que se encuentra entre 500-3000m.s.n.m., en las provincias de Cañar, Carchi, Loja, Morona Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Sucumbíos y Zamora Chinchipe (De la Torre et al. 2008).

Es comúnmente conocido por las comunidades Untuntup (Shuar Chicham) como guayusa, guayusa de monte y jicamilla grande, las hojas de esta especie se utiliza como infusión, junto con *Bixa orellana*, para reducir la inflamación y con *Cordia* para tratar mordeduras de serpiente (Ulloa & Neill, 2004)

La fitoquímica de algunas especies del género *Hedyosmum* (*H. brasiliense*, *H. bonplandianum*, *H. mexicanum* y *H. costaricensis*) ha sido estudiada previamente, las hojas de esta especie son utilizadas en la medicina popular como antirreumático, en el tratamiento de dolores inflamatorios y resfriados (Lorenzo et al. 2003).

Figura 3: *H. racemosum* muestra de herbario



Fuente: Herbario UTPL

1.3.1. Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Chloranthales

Familia: Chloranthaceae

Género: *Hedyosmum*

Nombre Científico: *Hedyosmum racemosum*

Sinónimos: *Tafalla racemosa* Ruiz & Pav.

Figura 4: *H. racemosum*



Fuente: La Autora

1.4. Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas (Kuklinski, 2000).

La inmensa mayoría de los terpenos son específicos del reino vegetal, pero se pueden encontrar en los animales: feromonas y hormonas juveniles sesquiterpénicas de los insectos, diterpenos de organismos marinos (Celentéreos, Espingiaros). Igualmente, los triterpenos son específicos del reino vegetal (Bruneton, 2001).

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C_5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C_5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C_5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Bruneton, 2001)

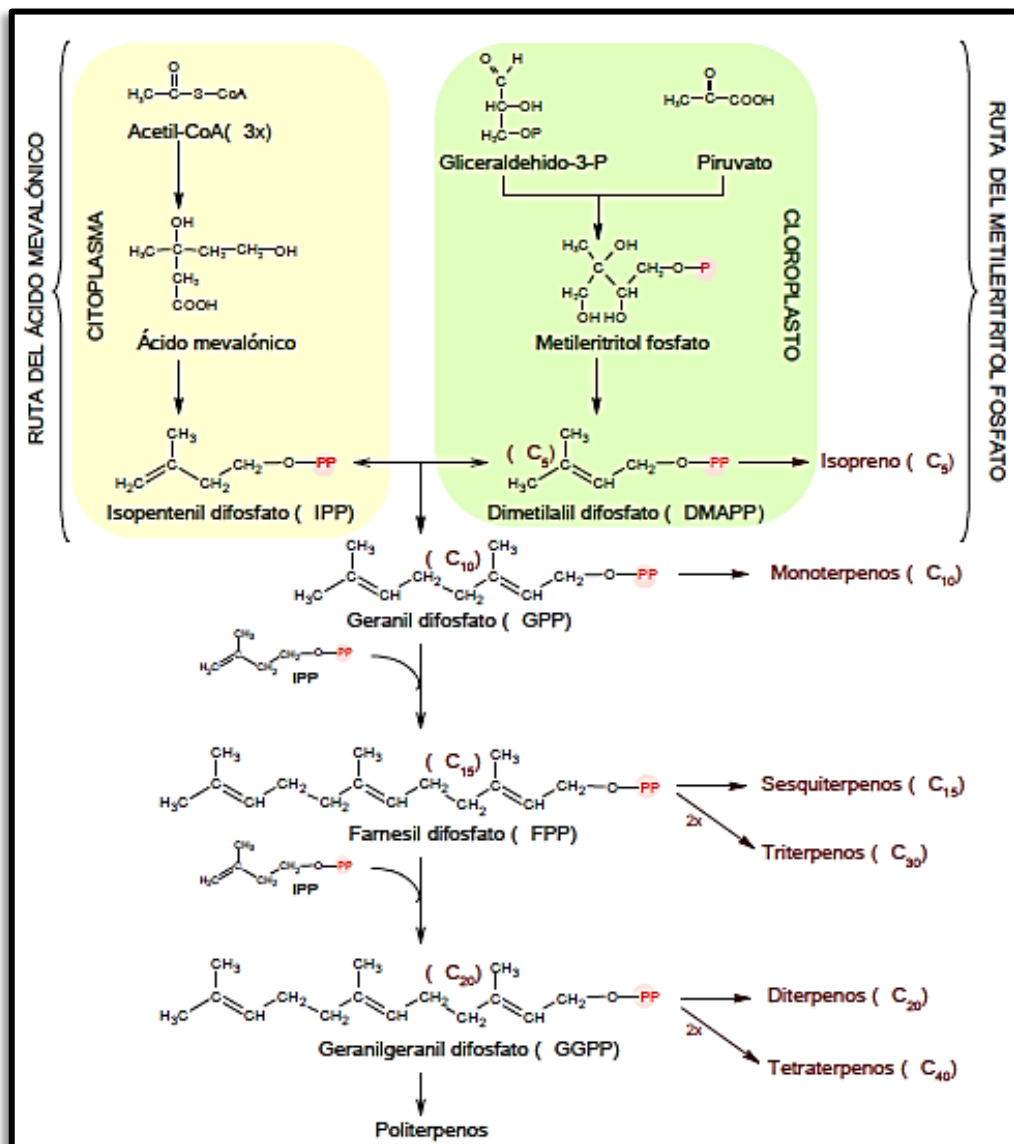
Todos los terpenos se pueden considerar formados por la unión de un número entero de unidades pentacarbonadas, ramificadas derivadas del 2-metilbutadieno. Cada grupo de

terpenos es el resultado de la condensación cabeza-cola de un número variable de unidades isoprenicas (Bruneton, 2001).

1.4.1. Ruta biosintética de los Terpenos

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP (Fig. 5).

Figura 5: Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen



Fuente: Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.

Los precursores de los principales tipos de terpenos, formados mediante reacciones catalizadas por enzimas son los ésteres pirofosfóricos de alcoholes en $(C_5)_n$, formados por la adición secuencial de una unidad en C_5 , el pirofosfato de isopentenilo (IPP) sobre una molécula éster, un pirofosfato de prenol alílico, siendo el primer término de la serie el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) (Bruneton, 2001).

El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos, geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos. La formación de triterpenos en C_{30} y de los carotenos en C_{40} no escapa totalmente a la regla provienen del escualeno y del fitoeno (Bruneton, 2001).

1.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear (RMN) es el método analítico más usado para elucidar la estructura de un compuesto. Esta técnica experimental está asociada al momento angular intrínseco de espín y a las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. Cuando situamos un núcleo en un campo magnético tiene lugar una interacción entre el momento magnético del núcleo y el campo, resultando en un desdoblamiento energético (es el llamado efecto Zeeman). Mediante la absorción y emisión de fotones electromagnéticos con la frecuencia adecuada pueden producirse transiciones entre esos nuevos estados energéticos (Lambert & Mazzola, 1999).

Los momentos magnéticos de los núcleos no solo interaccionan con el campo magnético aplicado sino también con los momentos magnéticos de los otros núcleos magnéticos y con los electrones. En consecuencia, el espectro NMR refleja el entorno magnético de los núcleos, revelando la estructura del material al que pertenecen (Lambert & Mazzola, 1999).

1.5.1. Principios de espectroscopía RMN

Todo átomo tiene asociado algunas propiedades susceptibles de ser medidas, como son el peso atómico, electronegatividad, configuración electrónica, momento magnético intrínseco o espín. Este momento magnético permite discriminar un átomo de otros y al igual que un imán, al acercarse a otro puede interactuar con otros espines y proveer así información sobre su vecindario. De esta manera, cuando varios átomos forman una molécula, cada espín tendría un entorno ligeramente diferente según la configuración espacial o estructura que

adopta la molécula. Este entorno determina la posición, la integral, el ancho de banda, y la multiplicidad de la señal que se observará en el espectro (Friebolin, 2005).

- La posición o desplazamiento químico es la frecuencia en la cual se observa una determinada señal con respecto a una referencia, por lo que esta frecuencia se expresa generalmente en partes por millón (ppm). Si se expresa en Hz. es necesario especificar la frecuencia de referencia.
- La integral de una señal hace referencia al área contenida bajo la señal y está relacionada con el número de espines que hacen parte de una misma señal.
- La multiplicidad representa la estructura fina de la señal que resulta de la interacción entre varios espines (acople).
- El ancho de banda a mitad de altura contiene información acerca de la relajación del espín y por tanto sobre su entorno.

Estas cuatro propiedades permiten describir cualquier señal y por tanto cualquier espectro. Además los espines pueden ser alterados de forma controlada con fotones de energía adecuada, es decir pulsos electromagnéticos. Según las secuencias de pulsos que se apliquen diferentes tipos de interacciones intra-moleculares serán observadas en los espectros (Friebolin, 2005).

Los experimentos unidimensionales como el ^1H -RMN y el ^{13}C – [^1H]-RMN solo miden las interacciones entre un mismo tipo de átomos, mientras que los experimentos multidimensionales permiten capturar las correlaciones entre diferentes tipos de átomos. Los experimentos bidimensionales descritos abajo son un caso especial de experimento multidimensional (Günther, 1995).

A continuación se hace una breve descripción de los tipos de espectros más utilizados y de la información estructural que proveen:

^1H -RMN: Este tipo de espectros es el más común. Se observan los diferentes tipos de protones que se encuentran en la molécula a sus correspondientes valores de desplazamiento químico. La multiplicidad de señales depende del número de vecinos.

^{13}C – [^1H]-RMN: Este espectro es casi obligatorio para la determinación de una estructura por RMN. Se observan los desplazamientos químicos de los carbonos que se encuentren en la molécula. No se observa multiplicidad pues la secuencia de pulsos cancela el efecto de los protones durante la adquisición de los datos.

COSY: Este es un experimento bidimensional homonuclear (RMN 2D) en donde se observan las correlaciones entre protones lo que permite establecer que protón se encuentra como vecino a otro (3 a 4 enlaces de distancia).

HSQC: Con este experimento bidimensional heteronuclear se puede determinar que protones están unidos a que carbonos en la molécula.

HMBC: Este experimento correlaciona los desplazamientos químicos de los dos tipos de núcleos separados entre sí con dos o más enlaces químicos.

NOESY: Este experimento bidimensional homonuclear utiliza el efecto NOE (Nuclear Overhauser Effect) mediante el cual se puede determinar la cercanía espacial de los protones en una molécula (Günther, 1995).

1.6. Concentración mínima Inhibitoria (CMI)

La actividad de un agente anti infeccioso está definida por su espectro antibacteriano, es decir, el conjunto de microorganismos patógenos que se ven afectados por las concentraciones del antibiótico sin causarle toxicidad (Franklin & Snow, 1981).

La actividad antibacteriana exige una normalización o cuantificación, que se consigue mediante los métodos utilizados in vitro para comprobar la susceptibilidad del microorganismo en relación con el antibiótico. Con estos métodos se define:

- La concentración mínima inhibitoria (CMI): Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.
- La concentración mínima bactericida (CMB): Es la menor concentración capaz de destruir o matar 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.
- El punto de corte de sensibilidad: Es la concentración de antibiótico por debajo de la cual se considera sensible una determinada especie bacteriana (Franklin & Snow, 1981).

Hoy en día se observa un creciente desarrollo de mecanismos de resistencia a los antibióticos y antimicóticos sintéticos por algunas especies, este hecho se explica en parte porque la mayoría de fármacos son fungistáticos o bacteriostáticos 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 y bacterias, se lleva a

cabo una constante búsqueda de alternativas terapéuticas; eficaces entre las plantas medicinales como fuente de nuevos y variados agentes antimicrobianos (Holetz et al. 2002).

1.6.1. Microdilución en caldo

Este método se denomina microdilución porque involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en multipocillos de plástico estériles de fondo cónico o redondo, cada pocillo debe contener 0,1 ml de caldo (Barry & Braun, 1981)

El método más conveniente para obtener las diluciones, consiste en prepararlas en un volumen de por lo menos 10 ml y colocar 0.1 (+/- 0.02) ml en cada uno de los 96 pocillos mediante un dispositivo mecánico (pipeta automática mono o multicanal). Si el inóculo se agrega con pipeta, la solución de antibiótico se debe preparar de una concentración tal, que duplique la deseada y los pocillos deben ser cargados con 0.05 ml en vez de 0.1 ml. Cada multipocillo debe incluir un pocillo de control de crecimiento (sin antibiótico), y un control negativo (caldo sin inocular) (Barry & Braun, 1981).

1.7. 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 (Peoples et al. 2008). Las enfermedades infecciosas causada por bacterias y hongos patógenos representan un desafío serio para la farmacología actual, pues así lo evidencian los millones de muertes prematuras que causan en el mundo (WHO, 2002).

1.7.1. Bacterias Gram positivas

Staphylococcus aureus: Es un coco Gram positivo, no móvil. Posee un alto grado de patogenicidad y es agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del SNC y del tracto génitourinario (Denegri & Droquilly, 1983).

Enterococcus faecalis: Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos, que se encuentran aislados, de a pares, o formando cadenas cortas. Los *enterococcus* son parte de la flora normal endógena humana, y tienen poco potencial patogénico en el huésped normal. Sin embargo, en el anciano o en el paciente inmunocomprometido, estos organismos se vuelven patógenos oportunistas (Guevara, Cásares & Valencia, 2000).

1.7.2. Bacterias Gram negativas

Escherichia coli: es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea o infecciones de las vías urinarias (Guevara et al. 2000).

Proteus vulgaris: Es una bacteria Gram negativa, facultativamente anaeróbica en forma de bacilo que habita en el tracto intestinal del hombre y varios animales. Se agrupa con las enterobacteriaceae y es un patógeno oportunista en humanos como agente etiológico de distintos procesos infecciosos, tales como infección urinaria, infección quirúrgica, neumonías, bacteriemias, septicemias e infecciones ópticas, asimismo, varios estudios mostraron la creciente implicancia del género en infecciones nosocomiales (Gómez, Baquero & Nombela, 1991).

Klebsiella pneumoniae: Es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas (Andrade & Silva, 2004).

Pseudomonas aeruginosa: pertenece a la familia Pseudomonadaceae y es un bacilo Gram negativo, aerobio con un flagelo polar, puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis (Bodey, Jadeja & Elting, 1985).

Salmonella typhimurium: Es un bacilo Gram negativo que se comporta como patógeno intracelular facultativo. Su hábitat es el aparato gastrointestinal de los animales y el hombre, nunca como microbiota normal. Se encuentra asociada a problemas gastrointestinales, septicémicos y aborto gracias a su capacidad de invasión celular y sobrevivencia intrafagocítica (Aabo et al. 200).

1.7.3. Dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo de hongos estrechamente relacionados que tienen la capacidad de invadir tejidos queratinizados (piel, pelos y uñas) produciendo infección en el hombre y en los animales, dermatofitosis, comúnmente llamadas tiñas. La infección es

generalmente cutánea y restringida a las capas cornificadas por su incapacidad de penetrar tejidos profundos u órganos de huéspedes inmunocompetentes (Fonseca, 1995).

Los dermatofitos corresponden a un grupo de hongos miceliares que se caracterizan por su queratinofilia, es decir, su apetencia por desarrollarse sobre la queratina, escleroproteína insoluble presente en la piel y sus anexos y por su actividad queratinolítica, capacidad de producir enzimas (queratinasas) que permiten la asimilación de la queratina como nutriente del hongo (Fonseca, 1995).

Trichophytum rubrum: Es un Hongo filamentoso, antropófilo que provoca lesiones, tanto endothrix como ectothrix, en el pelo. Agente más común de dermatofitosis: tinea pedis, tinea corporis y onicomicosis, con lesiones eritematosas, poco inflamatorias, pruriginosas que pueden ser rebeldes al tratamiento.

Se han descrito dos cepas diferentes de *T. rubrum*, la cepa granular se caracteriza por colonias planas que carecen de micelio aéreo y semejan polvo de azúcar. La cepa aterciopelada es la más común, con micelio aéreo algodonoso, blanco o beige, como “colas de conejo”. El reverso de la colonia suele tener un color rosado-rojo, pero en ocasiones puede ser amarillo-marrón, rojo-vino o violeta e, incluso, pueden carecer de pigmento (Graser et al. 1998).

Trichophytum mentagrophytes: Es un dermatofito zoofílico de roedores salvajes y domésticos que se transmite de vez en cuando para el hombre y otros animales por contacto directo con un animal infectado o portador asintomático o con material contaminado (pelo y escamas) desde el medio ambiente (HAJSIG et al, 1983). Los signos clínicos de la tricofitosis debido a *T. mentagrophytes* en diversos animales podrían ser variables y no se limita sólo lesiones clásicas. Las variaciones en el aspecto clínico y la evolución divergente de la enfermedad hacen muy difícil el diagnóstico precoz (HAJSIG et al, 1983).

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Esquema de metodología utilizada

El esquema de la metodología utilizada se detalla a continuación:

Figura 6: Esquema del desarrollo de la investigación.



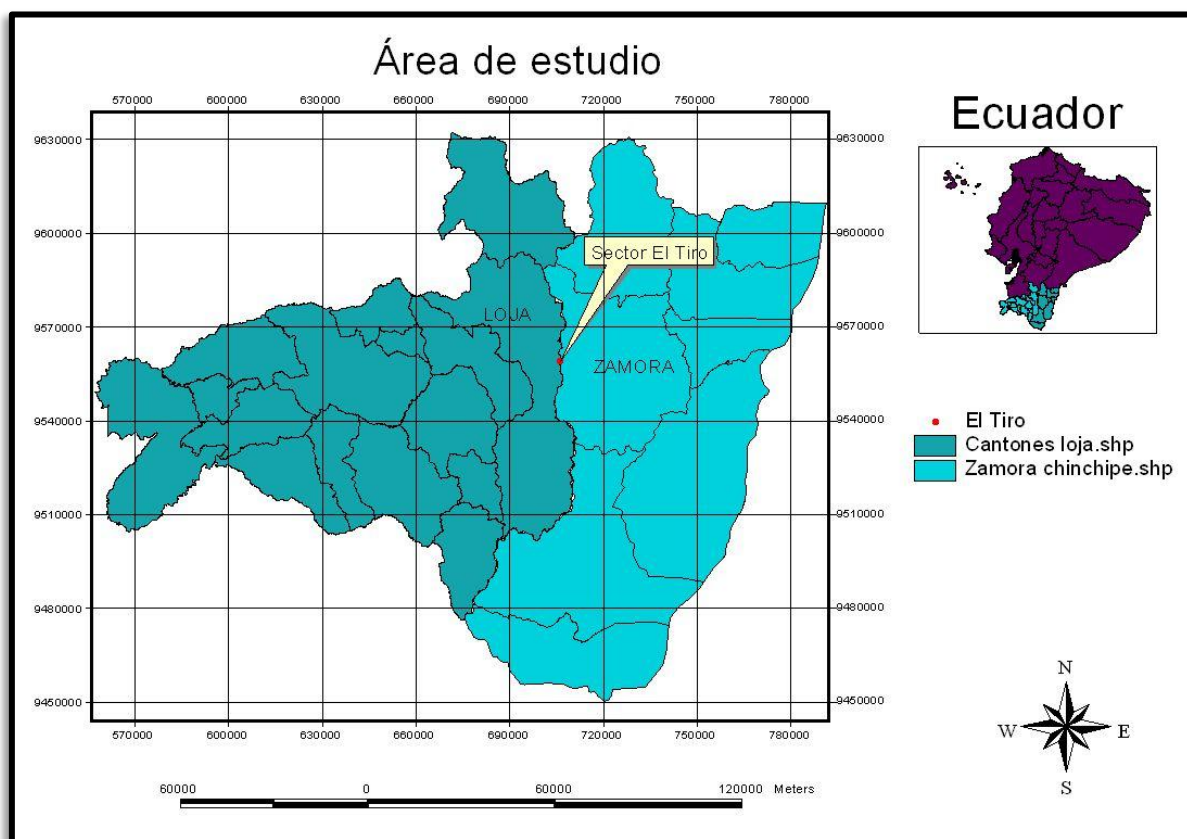
Fuente: La autora 2013

2.2.1. Recolección del materia vegetal

Se recolectaron las partes aéreas de *Hedyosmum racemosum* en estado de floración en el sector El Tiro, límite entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipe a una altitud de 2762m.s.n.m. con coordenadas 706220E, 955889N (Fig. 7). La muestra fue identificada por

Bolívar Merino del Herbario Loja y Fani Tinitana, del Herbario HUTPL con voucher PPN-ct-006, que reposa en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Figura 7: Área de estudio de la especie *H. racemosum*



Fuente: La autora 2013

2.2.2. Selección del material vegetal

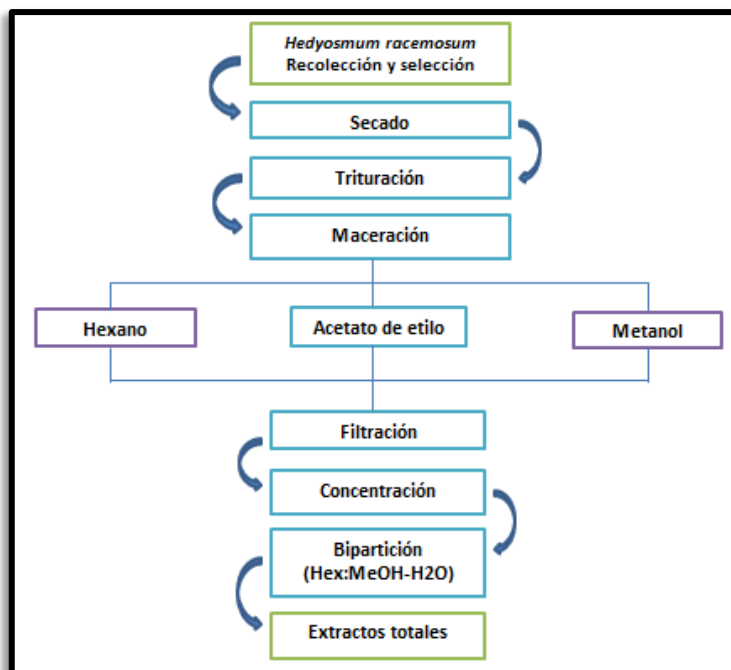
El material vegetal recolectado fue transportado al laboratorio de Ingeniería de Procesos del Departamento de Química para continuar con el manejo post cosecha, donde se eliminó impurezas, partes deterioradas y tallos, con la finalidad de evitar la mezcla con otras especies y variaciones en su composición química.

2.3. Obtención del Extracto

El material vegetal seleccionado fue secado a una temperatura de 35 °C, durante cinco días. A partir de 660g de muestra seca se procedió a macerar con disolventes de polaridad creciente, Hexano, Acetato de Etilo y Metanol, durante 24 horas con cada disolvente a temperatura ambiente. El proceso de maceración se realizó por tres veces con cada disolvente.

Posteriormente se filtró al vacío cada extracción y mediante rotaevaporación a presión reducida 50mbar y a 30 °C se obtuvieron tres extractos. A continuación se muestra en la Fig. 8 el esquema del procedimiento para la obtención del extracto.

Figura 8: esquema de obtención de extractos totales



Fuente: La autora 2013

Una vez obtenidos los tres extractos en Hexano, AcOEt y MeOH, se realizó TLC de cada extracto a distintas polaridades usando placas de sílica gel 60 F₂₅₄, con la finalidad de determinar cuál de los tres extractos presentaba mayor riqueza y mejor separación de los compuestos.

Posteriormente los tres extractos totales previamente obtenidos fueron procesados para remover las azúcares mediante una bipartición líquido-líquido con una solución de MeOH-H₂O (9:1) y hexano, en proporción 1:1.

El proceso de bipartición se realiza en un embudo de decantación, donde se realizó la mezcla agitando enérgicamente y se dejó en reposo por aproximadamente 1 hora para que se realice la separación de fases (Fig. 9).

Figura 9: Separación de fases en el proceso de bipartición



Fuente: La autora 2013

La fase orgánica fue separada y concentrada a 30 °C a presión reducida.

2.4. Fraccionamiento en cromatografía en columna

El extracto total de Acetato de Etilo (2g) fue sometido a fraccionamiento en cromatografía en columna (CC), con Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040mm). Se eluyó con disolventes de polaridad creciente iniciando con una mezcla de Hexano y AcOEt en relación 7:3, hasta llegar a AcOEt 100% (Fig. 10).

Figura 10: Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto de AcOEt



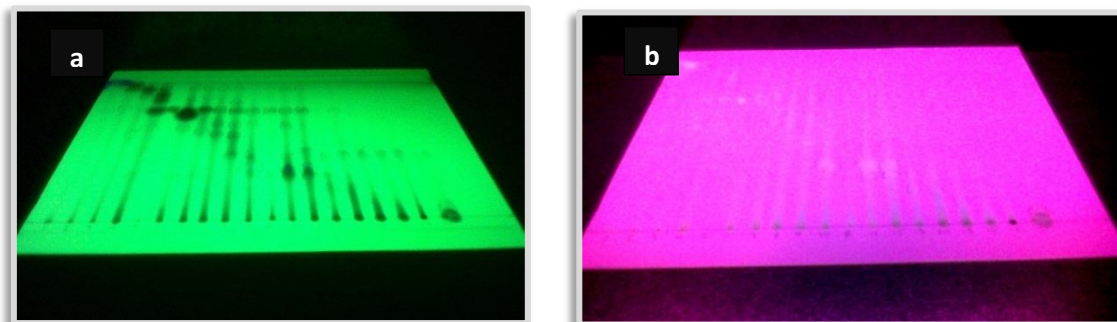
Fuente: La autora, 2013

2.4.1. Cromatografía de capa fina

Se realizó ensayos en cromatografía de capa fina (TLC) de todas las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica, para ello se utilizó placas de Sílica gel 60 F₂₅₄ (fase directa). Los disolventes utilizados para la fase móvil fueron Hex-AcOEt en relación 6:4 (v/v), con el

fin de que se produzca una separación de los compuestos, que puede ser visualizada mediante una lámpara de luz ultravioleta de 254 y 365nm (Fig. 11).

Figura 11: TLC total de las fracciones obtenidas observadas en lámpara UV de 254nm (a) y 365nm (b).



Fuente: La autora, 2013

2.4.2. Purificación de la fracción DT005

Para purificar la fracción número 5 (DT005) de 420mg, se realizó una columna cromatográfica, con Sílica Gel de fase reversa Rp18 usando como polaridad isocrática MeOH: H₂O en relación 8:2. Posteriormente se purificó la fracción mediante una columna cromatográfica usando 20g de Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) y una mezcla de Hex: AcOEt en relación 8:2 como eluyente.

2.4.3. Caracterización química de las fracciones

Esta caracterización fue realizada a la fracción que cristalizó (DT030). Se determinó el punto de fusión, factor de retención y solubilidad.

2.4.4. Punto de fusión

Para determinar el punto de fusión de la fracción DT030 se calentó una pequeña cantidad de dicha fracción en el equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60Hz (Fig. 12) a continuación se registró la temperatura a la cual la muestra pasó de estado sólido a líquido.

Figura 12: Equipo para determinación de punto de fusión

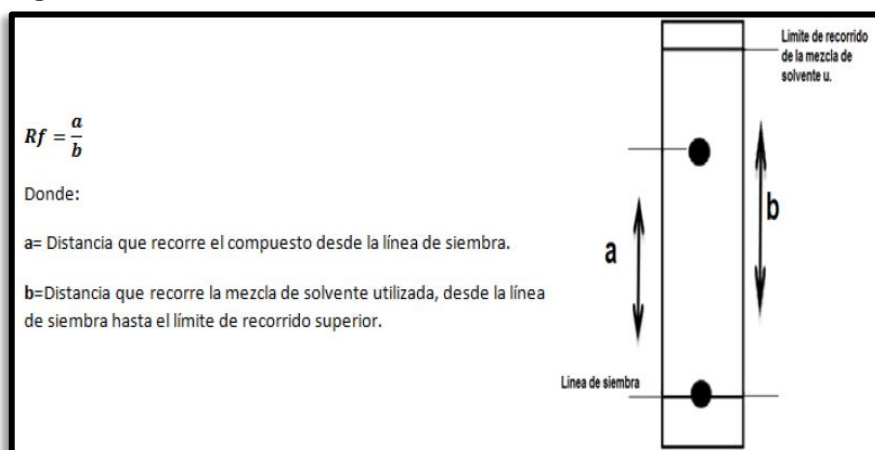


Fuente: La autora, 2013

2.4.5. 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 (Choma, 2005). El Rf de la fracción se calculó de acuerdo a la fórmula que se indica en la figura a continuación (Fig. 13).

Figura 13: Calculo de factor de retención



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

2.4.6. Solubilidad

Para determinar la solubilidad de la fracción se probó con disolventes de distinta polaridad: CH₂Cl₂, AcOEt, mezcla de Hex:AcOEt (1:9) y MeOH.

2.5. Caracterización Estructural

2.5.1. 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 (CDCl_3) 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 intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, generando finalmente las respectivas gráficas (García, 2001).

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 .

2.5.2. Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases es una técnica muy útil para la separación y determinación de compuestos orgánicos volátiles y semi volátiles que sean térmicamente estables y acoplada a la espectrometría de masas, permite una identificación inequívoca de los distintos componentes separados (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Para obtener el peso molecular del compuesto aislado del compuesto DT030, se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, dotado con un sistema de operación de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, que cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. Las características de la columna capilar utilizada se detallan en la Tabla 1.

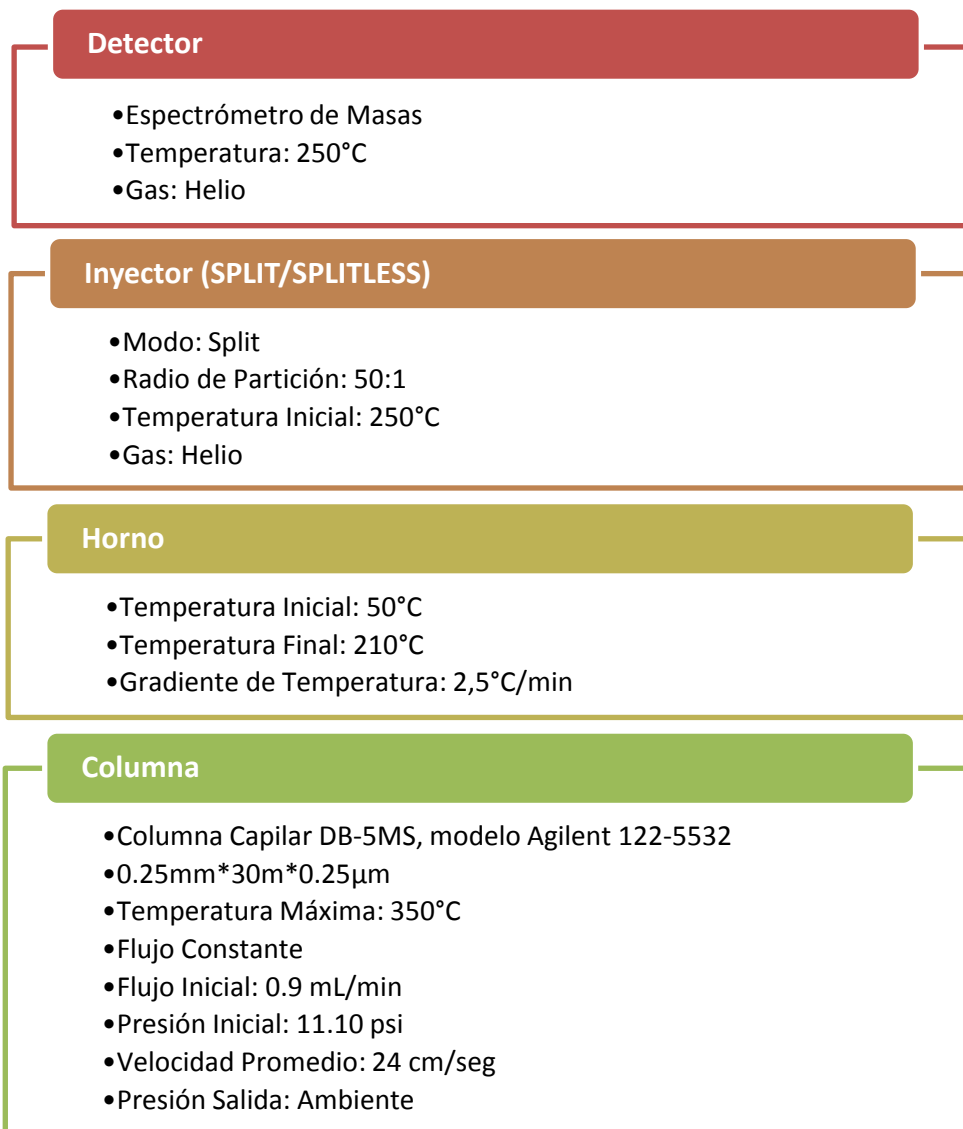
Tabla 1: Características de la columna capilar utilizada

Características de la columna capilar					
Fracciones	Columna	Temperatura (°C)	Película (um)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
DT030	DB-5MS	350	0,25	0,25	325

Fuente: La autora, 2013

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras para su posterior análisis mediante CG-EM se detallan en la figura a continuación (Fig. 14).

Figura 14: Parámetros operacionales de la columna DB-5MS.



Fuente: La autora, 2013

2.6. Determinación de la actividad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante el método de Microdilución en caldo.

2.6.1. Microorganismos de prueba

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se emplearon 9 microorganismos; 7 cepas bacterianas, 5 Gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 9997), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Salmonella typhimurium* (LT2), *Escherichia coli* (ATCC®

25922) y *Proteus vulgaris* (ATCC® 8427); 2 cepas Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), mientras que para la evaluación antifúngica se utilizaron 2 organismos: *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 28185), *Trichophyton rubrum* (ATCC® 28188).

2.6.2. Preparación de las muestras

Se realizó una dilución de 50µg de los extractos de AcOEt y MeOH en 980µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se la utilizó tanto para CMI antibacteriano como antifúngico.

Para determinar la actividad antimicrobiana de la fracción DT030 se realizó una dilución de 20µg en 980µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se la utilizó tanto para CMI antibacteriano como antifúngico.

2.6.3. Preparación del cultivo overnight

Los microorganismos utilizados se encuentran en reserva criogénica a -80°C. Los medios de cultivo y las condiciones de incubación para cada microorganismo se detallan en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Medios de cultivo y condiciones de incubación para bacterias

Microorganismos	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	37°C por 14-16 horas
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Mueller Hinton	37°C por 14-16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	37°C por 14-16 horas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C por 14-16 horas

Fuente: La autora, 2013

Una vez preparados los medios se los esterilizó y se procedió a realizar el inóculo de cada bacteria.

2.6.4. Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias

Del cultivo overnight preparado 24 horas antes de iniciar los test, se tomaron 150-300µL en 7mL de suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo a una concentración de 0,5 en la escala

de McFarland, de ésta dilución se tomó 140µL y se inoculó en 7mL de Caldo Mueller Hinton ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/mL. Se tomaron 100µL de ésta suspensión los cuales se usan para completar los 200µL del volumen final de la placa de cultivo, ajustando la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL.

2.6.5. Preparación de la suspensión del inóculo para hongos

Se preparó la suspensión de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C , tomando de ésta suspensión 14µL en 7 mL de Caldo Sabouraud; posteriormente se tomaron 100µL de ésta dilución los cuales se utilizaron para completar el volumen final de la placa de cultivo (200µL), ajustando a la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL.

Tabla 3: Medios de cultivo para hongos

Hongos esporulados	Medio de cultivo
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caldo Sabouraud
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caldo Sabouraud

Fuente: La autora, 2013

2.6.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana

Para la realización de las pruebas se utilizaron placas estériles de 96 pocillos, colocando la dilución de 180µL de caldo Mueller Hinton en la primea fila de pocillos, excepto en la columna 10, y 100µL a los pocillos restantes; posteriormente se adiciona 20µL del extracto diluído (20mg/mL) en estudio, en los pocillos de la fila A y mezclamos. Seguidamente realizamos diluciones seriadas tomando 100µL de los pocillos de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B, continuando con ésta dilución hasta llegar a los pocillos de la fila H y deseamos los 100µL sobrantes.

Se realiza las mismas diluciones en los pocillos de control de esterilidad (columna 3, 6, 9) (180µL de caldo + 20µL del extracto diluído), control negativo (columna 11) (180µL de caldo + 20µL de DMSO) y control positivo (columna 12) (180µL de caldo + 20µL de Gentamicina para *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*; y 20µL de Ampicilina para *Salmonella tiphymurium* y *Enterococcus faecalis* a 1000ppm).

Preparadas las placas se inoculan con 100µL de la suspensión del inóculo completando a su volumen final de 200µL, excepto los controles de esterilidad que se completan con 100µL de Caldo Mueller Hinton, ajustando así a la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL, y la concentración final del extracto de 1000 a 8µg/mL.

Finalmente se sellan las placas y se incuban a 37°C por un periodo de tiempo 18-24 horas.

2.6.7. CMI antifúngico

Se realizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas que la CMI antibacteriana, modificando algunos parámetros tales como: el medio de cultivo que fue Caldo Sabouraud, la concentración final del inóculo es de 5×10^4 esporas/mL, el control positivo donde se empleó Itraconazol de 1mg/mL. Se incuban las placas a 28°C por 72-96 horas.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Extractos obtenidos de la especie *H. racemosum*

En la Tabla 4 se describe el peso y rendimiento de los extractos de Hexano, AcOEt y MeOH, a partir de 660g de muestra vegetal seca.

Tabla 4: Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de *H. racemosum*

Extracto	Peso inicial de planta seca (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Extracto total de Hexano	660	12,88	1,95
Extracto total de AcOEt		16,69	2,52
Extracto total de MeOH		67,71	10,25

Fuente: La autora, 2013

3.2. Compuestos aislados de la especie *H. racemosum*

Los componentes del extracto orgánico de AcOEt se separaron en zonas o bandas localizadas a lo largo de toda la columna. De este extracto se obtuvieron 18 fracciones, de estas se tomó la fracción DT005 que presentó la formación de cristales, esta fracción fue decolorada en una micro columna de la cual se obtuvieron 9 fracciones, entre ellas la fracción número 8 que se trata de un compuesto con estructura sesquiterpénica (DT030).

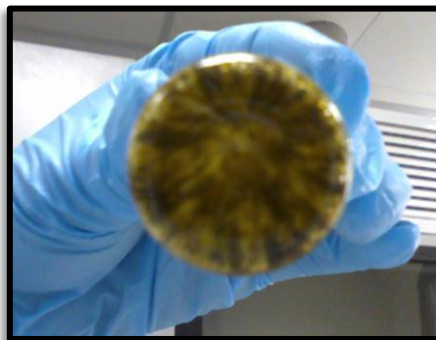
3.2.1. Fracción DT005

La fracción fue obtenida con Hex-AcOEt, en proporción 7:3 v/v. El precipitado tuvo la apariencia de sólido cristalino mezclado con partes verdosas (Fig. 15), con un peso de 420mg.

3.2.2. Fracción DT030

Posteriormente al proceso de purificación se obtuvo la fracción DT030 con un peso de 19mg, en forma de cristales amarillentos, solubles en AcOEt y CH₂Cl₂. El punto de fusión determinado fue de 165 -167°C y el factor de retención (Rf) es de 0,63.

Figura 15: precipitado inicial de la fracción DT030 previo a la purificación.

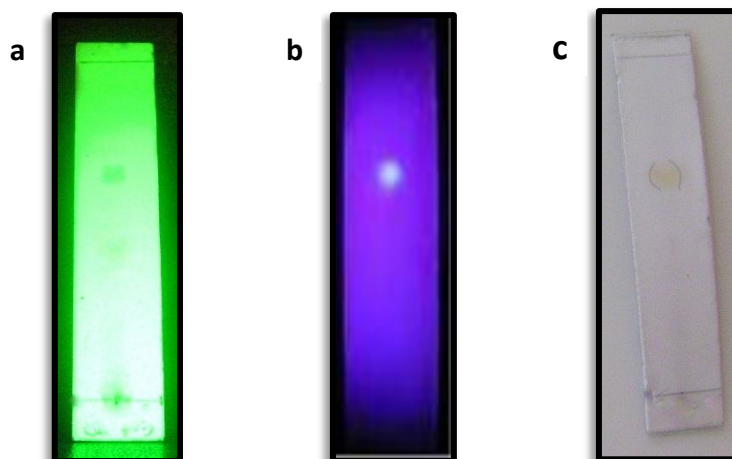


Fuente: La autora, 2013

Se realizó cromatografía de capa fina, utilizando como eluyentes Hex:AcOEt en proporción 1:1 v/v y una placa de Sílica gel de 7cm de longitud.

El compuesto fue visible en luz UV de 254 y 365nm, donde se observó una mancha oscura y una mancha brillante respectivamente (Fig. 16 a y b). Al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina al 5% se observó una mancha de color amarillo (Fig. 16 c), posteriormente se calculó el factor de retención (RF) que fue 0,82.

Figura 16: Compuesto DT030 visto en lampara UV a 254nm (a), 365nm (b) y revelado (c).



Fuente: La autora, 2013

3.3. Interpretación de resultados de Resonancia Magnética Nuclear

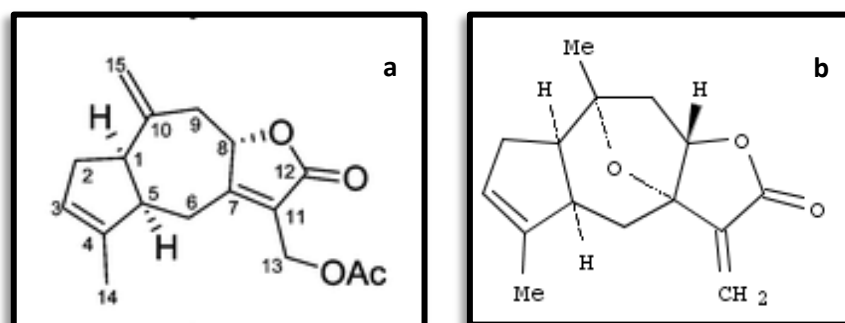
El compuesto DT030 fue identificado como un sesquiterpeno de fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_3$ y una masa de 244g/mol determinada mediante GC-MS.

Mediante el espectro de HMBC y COSY se deduce que en el fragmento 1 que corresponde a la figura 18(a) existe una correlación entre el C107 y C149.7 mediante un doble enlace y a

su vez el C107 se encuentra unido al proton 5.06 y 4.79, por otra parte el protón 5.06 esta correlacionado al C62.0 y el protón 4.79 esta correlacionado con el C22.5.

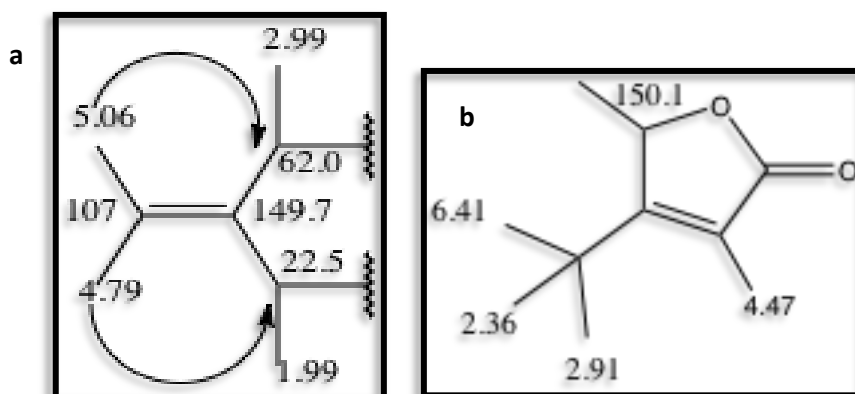
En el fragmento 2 que corresponde a la figura 18(b) se observa una estructura de anillo característico de las Lactonas, estas estructuras han sido identificadas en compuestos aislados de otras especies de este género como *H. orientale* y *H. arborescens*, donde se ha identificado el Hedyosumin D (Fig. 17a y el 7,10-Epoxy-1,5-guaia-3,11-dien-8,12-olide respectivamente Fig 17b) (Zu-Shang et al., 2008; Bercion et al., 2006).

Figura 17: Hedyosumin D (a) 7,10-Epoxy-1,5-guaia-3,11-dien-8,12-olide (b)



Fuente: a) Zu-Shang et al., 2008 b) Bercion et al., 2006.

Figura 18: Fragmentos de la molécula DT030.



Fuente: La autora, 2013

La configuración relativa de los fragmentos de la molécula presentados en la figura 17 a y b, se deduce mediante el análisis de los resultados obtenidos de los experimentos de HMBC y COSY donde se puede interpretar los acoplamientos entre Carbono e Hidrógeno existentes.

En la tabla 5 se indica la correlación entre los carbonos e hidrogenos presentes en la molécula DT030.

Tabla 5: Datos de RMN del compuesto DT030

	δC	δH	Mult. (<i>J</i> en Hz)		HMBC	COSY
1	17.1	0.91	M	CH ₂	4, 13	-
2a	21.6	2.36		CH ₂	6, 8, 11, 14	3
2b		2.91	Dd		6, 8, 11, 12, 14	2a
3	22.2	0.81	S	CH ₃	5, 6, 8, 10, 15	-
4	22.5	1.99	Td	CH	-	1, 5
5	26.5	1.67	Td	CH	6, 10	1
6	40.1	-	-	-	-	-
7	55.2	4.47	D	CH	6, 11, 14, 15	2a, 2b
8	62.0	2.99	M	CH	-	2a, 2b, 3,
9a	107.0	4.79	M	CH ₂	4, 8	4, 8, 1
9b		5.06	M (1H)		3, 8, 13	8, 4, 9a
10	123.1	6.41	S (1H)	CH	5, 6, 8, 12, 14	3, 2a, 2b, 8, 7, 9b
11	124.3	-	-	-	-	-
12	149.4	-	-	-	-	-
13	149.7	-	-	-	-	-
14	150.1	-	-	-	-	-
15	170.3	-	-	-	-	-

^a Espectros registrados a 400 MHz (CDCL₃) para ¹H y 100 MHz para ¹³C.

Fuente: La autora, 2013

DT 030: ¹H NMR (400 MHz, CDCL₃) δ 6.41 (s, 1H), 5.09 – 5.05 (m, 1H), 4.79 (t, *J*=20Hz, 1H), 4.47 (d, *J*=1.2 Hz, 2H) 3.03 – 2.96 (m, 1H), 2.94 – 2.88 (m, 1H) 2.42 – 2.31 (m, 2H), 2.03 – 1.95 (m, 1H), 1.67 (td, *J*=7.5, 3.8 Hz, 1H), 0.96 – 0.87 (m, 3H), 0.81 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCL₃) δ 170.34, 150.15, 149.75, 149.45, 124.32, 123.11, 106.99, 62.03, 55.28, 40.15, 26.52, 22.54, 22.19, 21.64, 17.19.

3.4. Determinación de la Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se realizó por el método de microdilución en caldo los resultados se muestran en la Tabla 5. Según Holetz et al. (2002) se considera que si un extracto o compuesto presenta una CMI <100µg/ml la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a 500µg/ml es moderada, de 800 a 1000µg/ml es mala y >1000µg/ml es nula.

Tabla 6: Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)				
Extracto / Fracción	Bacterias		Hongos	
	Sa	Ef	Tm	Tr
EtOAc	>1000	>1000	62,5	62,5
MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000
DT030	62,5	62,5	>1000	>1000

Tm: *T. mentagrophytes*

Tr: *T. rubrum*

Sa: *Staphylococcus aureus*

Ef: *Enterococcus faecalis*

Fuente: La autora, 2013

3.4.1. Determinación de la actividad antifúngica

El extracto de AcOEt presentó buena actividad antifúngica contra dos clases de hongos patógenos oportunistas *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* con un valor de 62.5µg/ml.

Esta actividad antifúngica de extractos ha sido reportada en otros estudios de actividad antimicrobiana de extractos de otras especies de *Hedyosmum* como *H. brasilense* y *H. arborescens*, donde se ha determinado que poseen una buena actividad contra dermatofitos (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, y *T. rubrum*) que son responsables de la invasión a la porción queratinizada de la piel, uñas y cabello, causando infección (Woodfolk, 2005).

La actividad antifúngica de este extracto puede deberse a un mecanismo de sinergia entre sus componentes, los cuales interactúan con la pared delgada e irregular de los hongos, el sinergismo se define como la respuesta farmacológica superior, producida cuando dos o más componentes actúan juntos, que cuando actúan por separado (Chakravarti, 1999).

3.4.2. Determinación de la actividad antibacteriana

El compuesto DT030 presentó actividad antibacteriana contra dos clases de bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con un valor de 62.5µg/ml. De acuerdo con Li et al. (1992), la mayoría de las plantas de la familia Chlorantaceae presentan

actividad antibacteriana, siendo responsables de esta actividad los sesquiterpenos, aceites esenciales y ácidos orgánicos.

La elevada sensibilidad de las bacterias Gram positivas con respecto a las Gram negativas al compuesto DT030, puede deberse a los mecanismos de daño de la membrana celular bacteriana, producida por el incremento de su permeabilidad y el efecto en su estructura, este daño es generado por la desestabilización la monocapa lipídica, producida por una interacción del sesquiterpeno con las moléculas de la membrana (Cox et al. 1998).

CONCLUSIONES

- El compuesto DT030 es un sesquiterpeno de tipo lactónico de fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_3$ con una masa de 244g/mol y punto de fusión 165 -167°C.
- El extracto total de AcOEt presentó actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* con un CMI de 62,5µg/mL para cada uno
- El sesquiterpeno DT030 presentó actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* con un CIM de 62,5µg/mL.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de la composición química de *Hedyosmum racemosum*, realizando un análisis completo de las flores masculinas y femeninas, debido a que se trata de una especie dioica, con el fin de determinar si existe diferencia en su composición química.
- Probar formulaciones farmacéuticas contra los hongos evaluados, puesto que según Cos et al. (2002), para todos los ensayos biológicos anti-infecciosos, valores de IC₅₀ deben estar por debajo de 100µg/mL para las mezclas y por debajo de 25µM para los compuestos puros.

BIBLIOGRAFÍA

- Aabo, S., Christensen, M., Chadfield, B., Carstensen, T., Jensen, M. & Olsen, J. (2000). Development of an in vivo model for study of intestinal invasion by Salmonella enteric in chickens. *Infection Immunology*, 68, 7122-7125.
- Andrade V, Silva J (2004). Caracterización de Klebsiella Pneumoniae productora de la β -lactamasa SHV en una unidad de cuidados intensivos. *Revista de Salud Pública México*, 46, 630.
- Antoni, S., Raimondo, O. (2005). *Clínica de enfermedades Infecciosas*, Tucumán: Facultad de Medicina de la UNT.
- Barry, A., Braun, L. (1981). Error de lectura en la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas con paneles de prueba de sensibilidad por microdilución. *Clinical Microbiology*, 3, 228-230.
- Bercion, S., Martin, M.A.C.K., Baltaze, J.P. & Bourgeois, P. (2005). A new α -methylene γ -lactone from *Hedyosmum arborecens*. *Fitoterapia*. 76: 620-624.
- Bodey, G., P., Jadeja, L., Elting, L. (1985). Pseudomona bacteriemia. Retrospective analysis of 410 episodes. *Arch Intern Med*; 145, 1621-1629.
- Breitmaier, E. (1994). Structure elucidation by nmr in organic chemistry a practical guide. *Concepts in Magnetic Resonance*, 6, 237 238.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Segunda Edición*. Zaragoza: Acribia.
- Buitron, C. X., (1999). Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. TRAFFIC International. Reino Unido: Edigraf.
- Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R.S. (2004). "Antiinflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Plantas Medicinales*. 70(2): 93-103.
- Cao, Cong-Mei., Peng, Y., Shi, Qing-Wen., Xiao, Pei-Gen. (2008). REVIEW. Chemical Constituents and Bioactivities of Plants of Chloranthaceae. *Chemistry & Biodiversity*. 5, 220-227.

Chakravarti, M. (1939). *Journal of Pharmacology y and Experimental Therapeutics*. 66, 153 p.

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

COECOCEIBA (2003). La diversidad de plantas y el conocimiento tradicional en nuestras comunidades-problemas en torno a la protección y conservación del conocimiento tradicional y ejemplos de usos de las plantas en el Cantón de Upala y áreas aledañas, Zona Norte, Costa Rica, *Publicaciones Iberia*, 56, 51-53.

Paul Cos, Arnold J. Vlietinck, Dirk Vanden Berghe, Louis Maes. 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*. 19; 106(3): 290–302. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.003

Cox, S., Gustafson, J., Mann, C., Markham, J., Liew, Y., Hartland, R. (1998). Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibition respiration in *Escherichia coli*. *Let Apply Microbial*. 65, 355-358 p.

Denegri, T., Droquilly, S. (1983). Infección intrahospitalaria y contaminación por vía aérea. *Revista Médica Chile*; 109, 1235-9.

De la Torre, L., Macía, MJ., Muriel, M., Balslev, H., Navarrete, H. (2008). *Enciclopedia de Las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito: Quito & Aarhus. 1–3.

De Lucca, DM., Zalles, AJ. (1992). *Flora Medicinal Boliviana*. *Diccionario Enciclopédico*. Los Amigos del Libro: La Paz-Cochabamba, 188p.

Ellemann, L. (1990). *Saraguroerne og deres planter- en gruppe hojlandsindianeres anvendelse af den naturlige vegetation*. (Tesis inédita de Candidato a Científico). Instituto de Botánica, Universidad de Aarhus, Dinamarca. 128pp.

Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. (1986). "Place des plantes médicinales dans la thérapeutique". *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Sante*. 64 (2) 159-175.

Fonseca, E. Tiñas. (1995) Infecciones por dermatófitos en la práctica diaria. *Salud Rural* 2(2):30-37.

Franklin, T., Snow, G. (1981). *Biochemistry of antimicrobial action*.. Londres: Chapman & Hall

- Friebolin, H. (2005). *Basic One-and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. VCH. 4ª Ed.
- García, L. (2001). *Determinación de estructuras por métodos espectroscópicos*. Memorias Curso UANL.
- Guevara J, Cásares A, Valencia E. (2000). Significado clínico de la presencia de *Enterococcus* en secreción vaginal, *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Marcos*, Vol.: 2000, 3: 223-226.
- Gómez, A., Baquero, F., Nombela, C. (1991). El género *Proteus*: aspectos microbiológicos y clínicos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica.*; 9, 567-75.
- Graser, Y., Presber, W., Sterry, W., Tietz, H. (1998). Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermopyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol*; 138, 576-582.
- Gutiérrez, M., Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter (U.P.C)*, 122, 35-41.
- Hajsig, M., Hajsig, D., Horvat, P. Lukman, A. (1983): Dermatopytoses in rodents. IV. *Trichophyton mentagrophytes* transmission from ringworm rabbits to swine. *Vet. arhiv* 53, 251-257.
- Günther, H. (1995). *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, Wiley. 2ª Ed.
- Holetz, F., Pessini, G., Sanchez, 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, 1027-31p.
- Kawabata, J., Tahara, S., Mizutani, J. (1981). Isolation and structural elucidation of four sesquiterpenes from *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae). *Agric Biol Chem* 45: 1447-1453.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.
- Lambert, J., Mazzola, E. (1999). *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*; Pearson Prentice Hall, New Jersey.

Lorenzo, D., Loayza, I. & Dellacassa, E. (2003). Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal*. 18: 32–35. DOI: 10.1002/ffj.1146

Malagón, O., Vila, R., Iglesias, J., Zaragoza, T., Cañigüeral, S. (2003). Composition of the essential oils of four medicinal plants from Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal*, 3, 527-531.

Núñez, M. (1982). *Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore*. Editorial Universidad de Costa Rica. 318p.

Organización Mundial de la Salud. (2005). Estrategia de la OMS de la Medicina Tradicional. 2004–2005. Ginebra.

Peoples, A., Zhang, Q., Millet, W., Rothfeder, M., Pescatore, B., Madden, A. (2008). Neocitreamicins I and II, Novel Antibiotics with activity Againsts Meticillin Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococci. *J. Antibiot (Tokyo)*. 61, 7,457-63.

Rates, S. (2001). *Plants as source of drugs*. *Toxicon*.39: 603-613p.

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

Ulloa, C., Neill, D., (2004). *Cinco años de adición a la flora del Ecuador, 1999-2004*, Missouri Botanical Garden, Ed. UTPL. 75 p

White, A. (1982). *Hierbas del Ecuador. Plantas medicinales. 2da. edición*, Quito Libri-Mundi,. 379 p.

World Health Organization. (2002). Global Strategy for containment of Antimicrobial Resistance.

Woodfolk, J.A. (2005). Allergy and dermatophytes. *Clinical Microbiology*. Review 18: 30-43p.

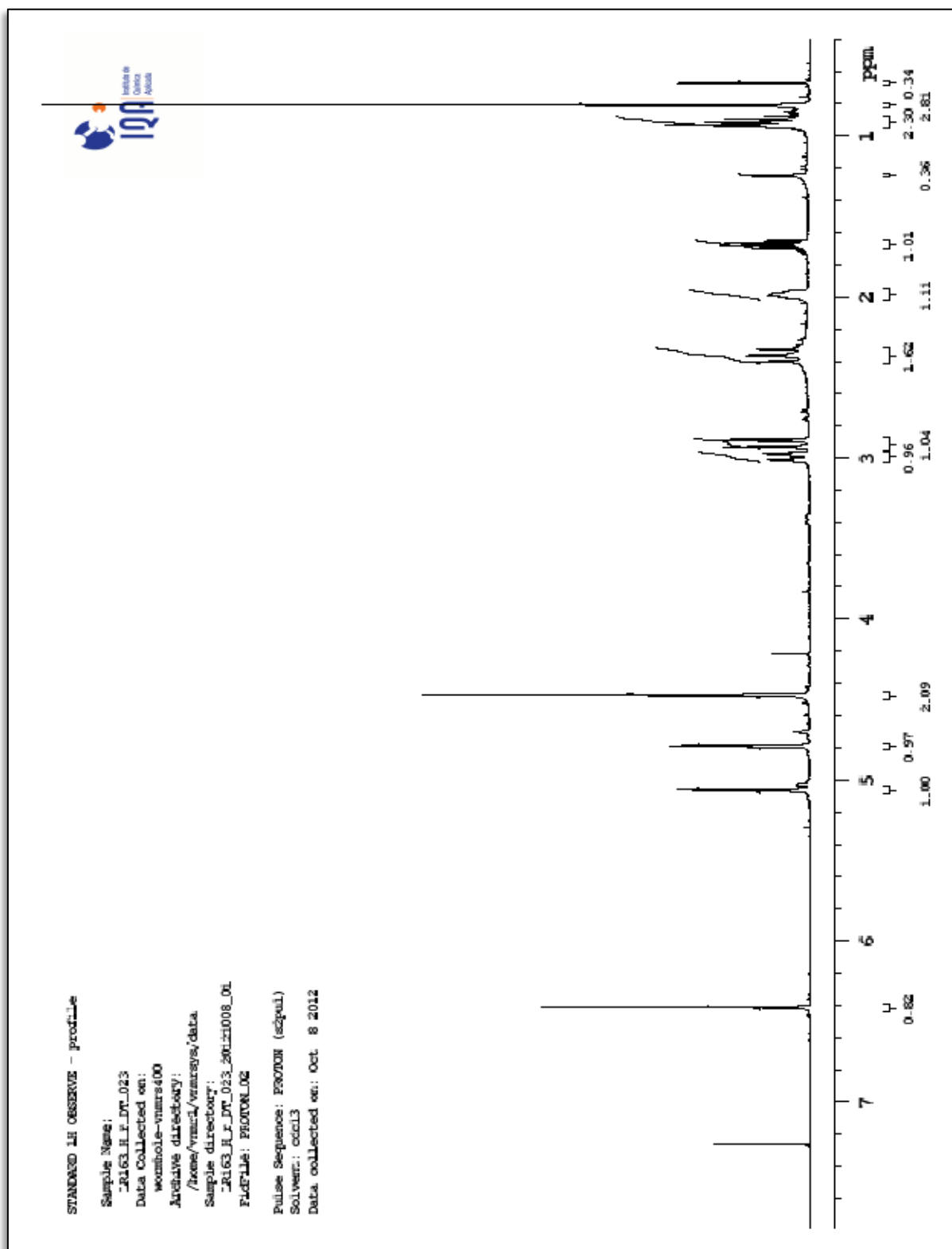
Zu-Shang Su, Sheng Yin, Zhi-Wang Zhou, Yan Wu, Jian Ding, and Jian-Min Yue. (2008). Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*. *Journal of Natural Products*. 71 (8), 1410-1413.

.

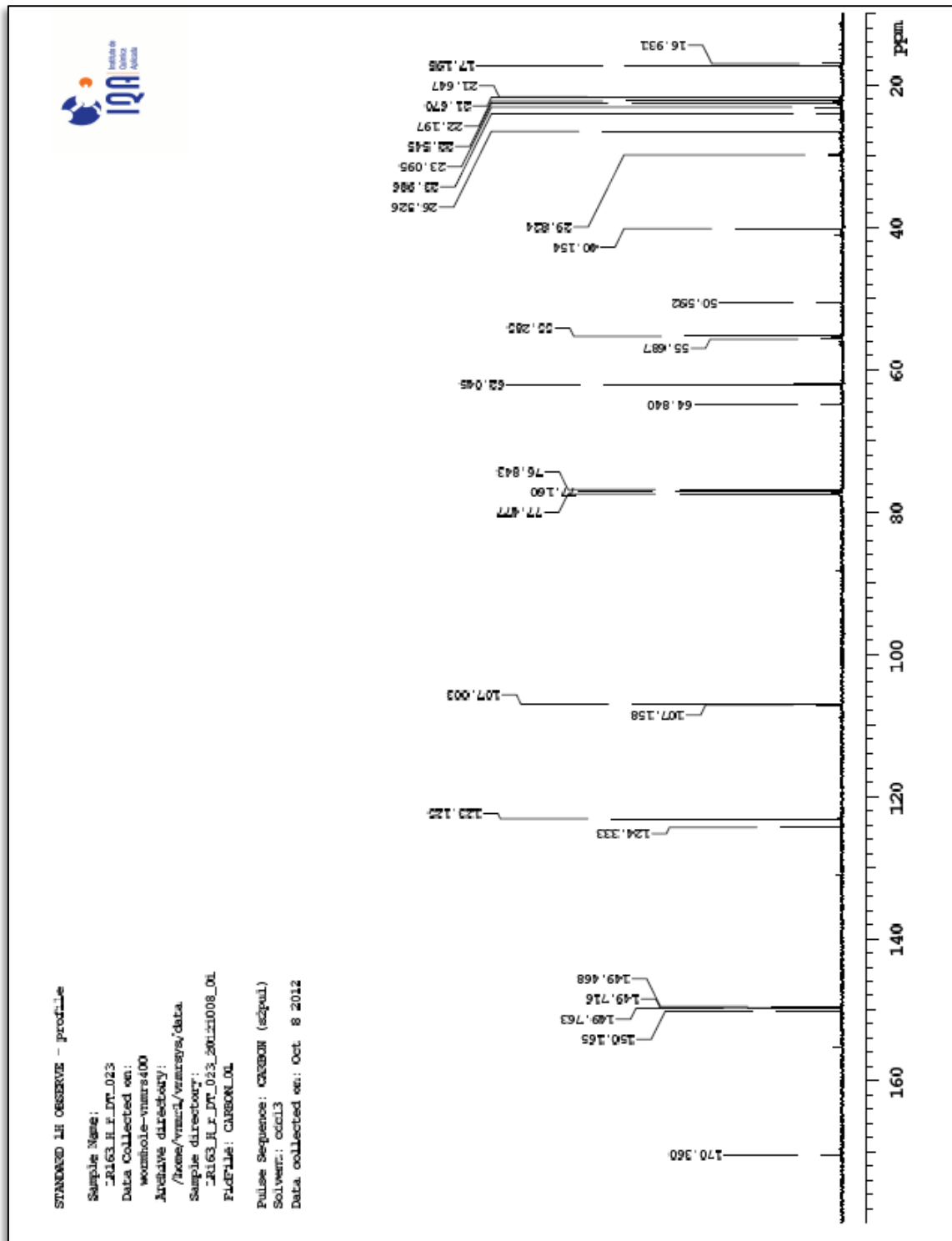
ANEXOS

Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de compuesto DT030

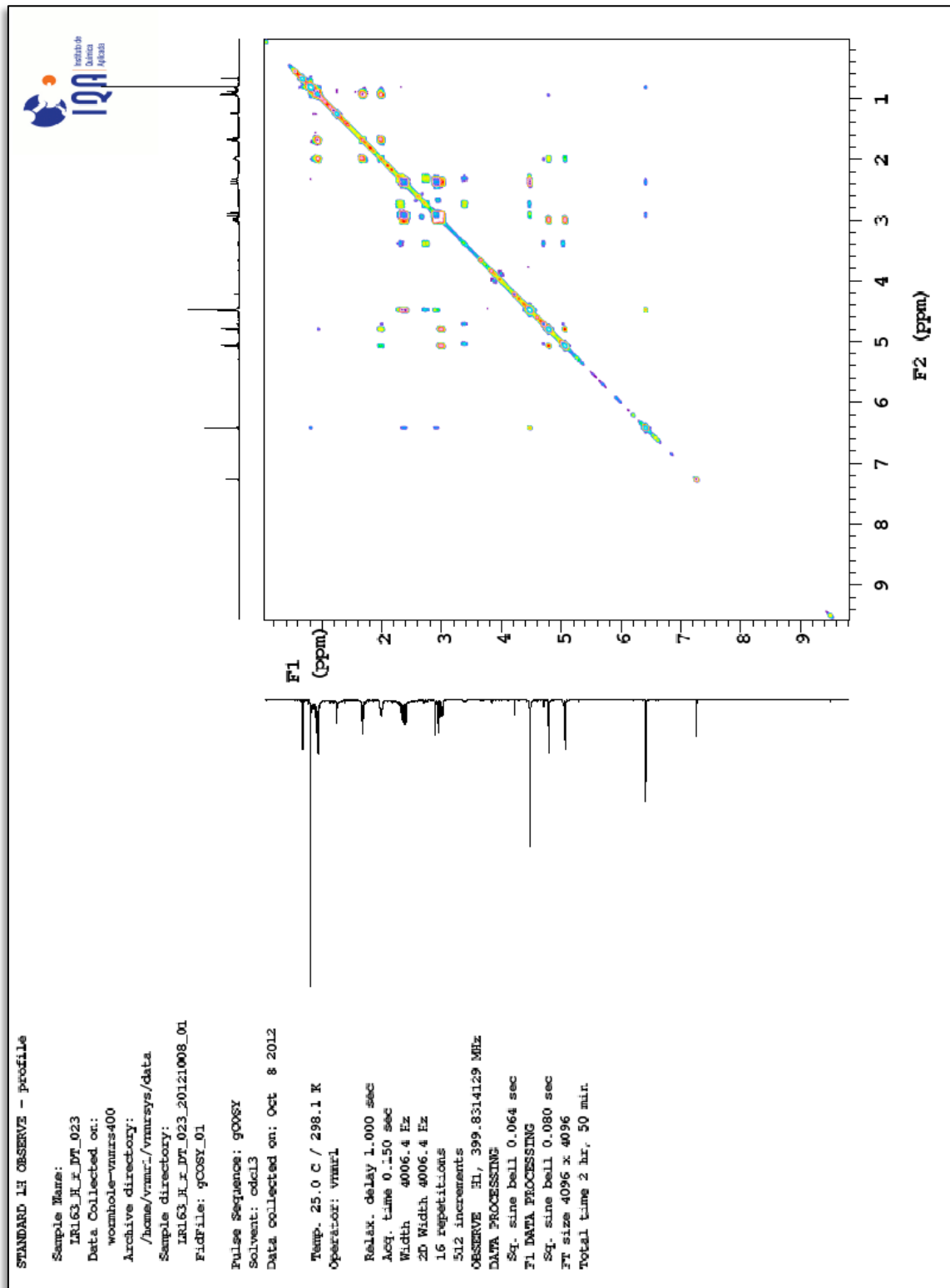
Anexo 1: Espectro de ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)



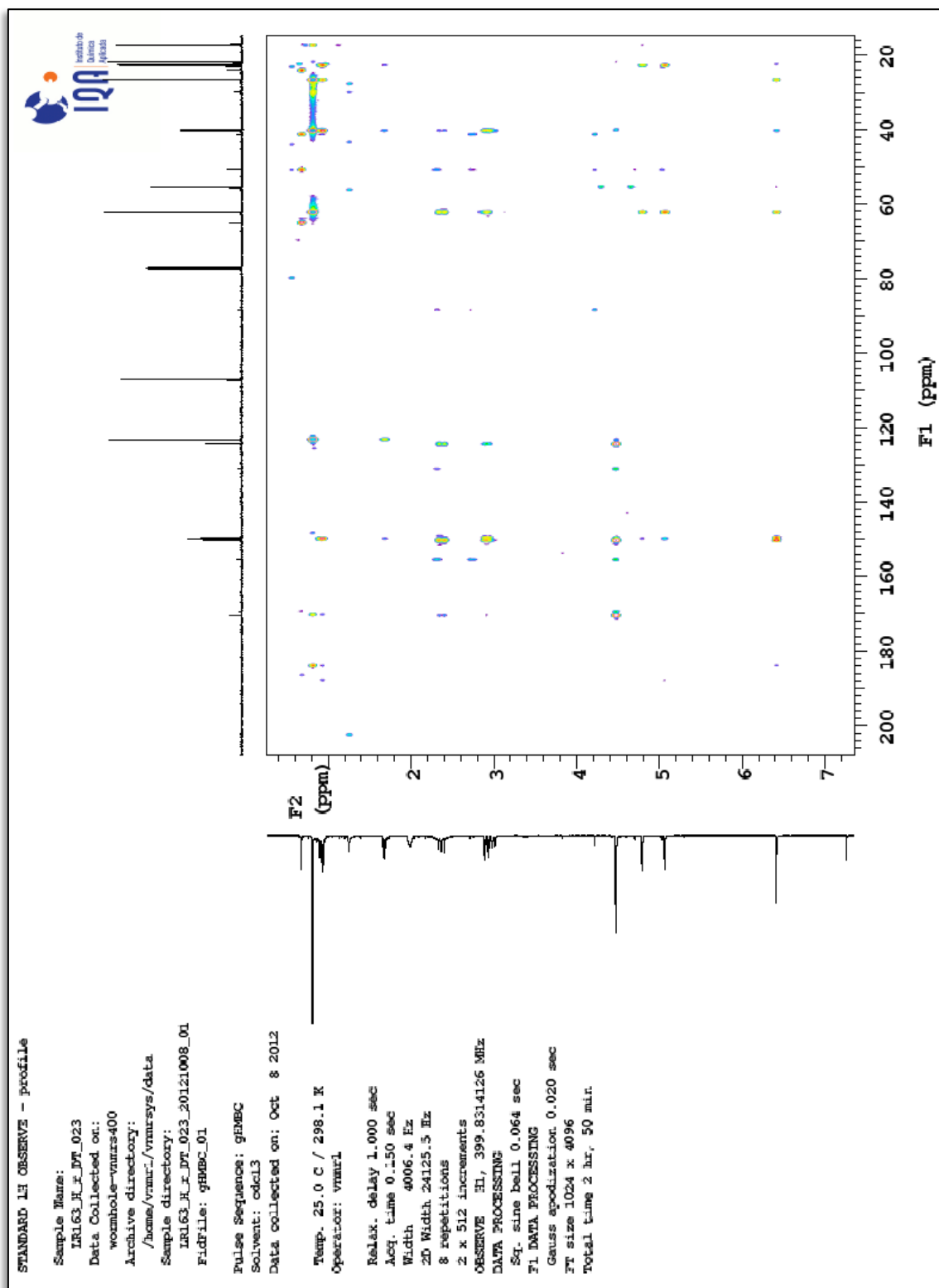
Anexo 2: Espectro de ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)



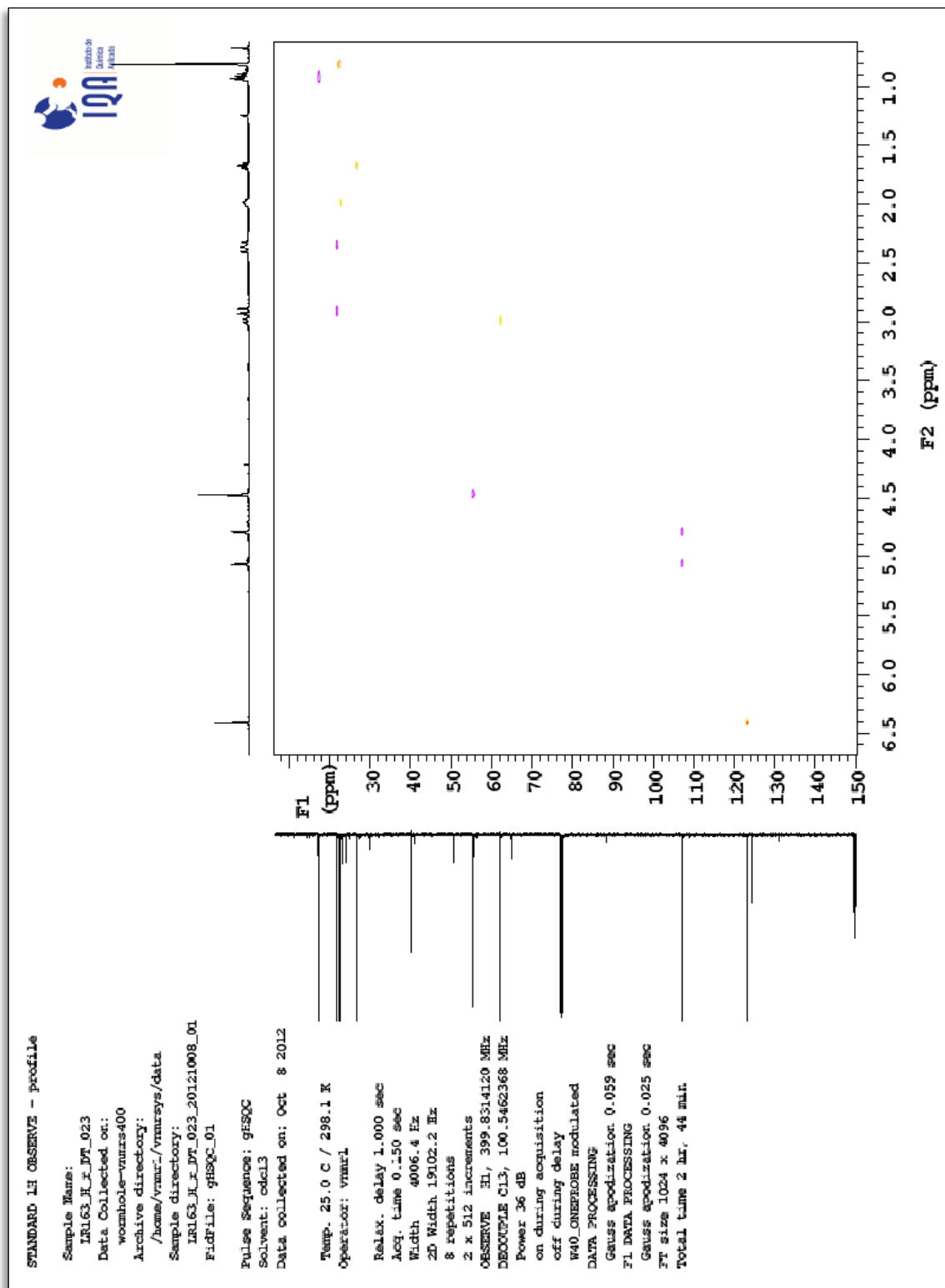
Anexo 3: Espectro de COSY



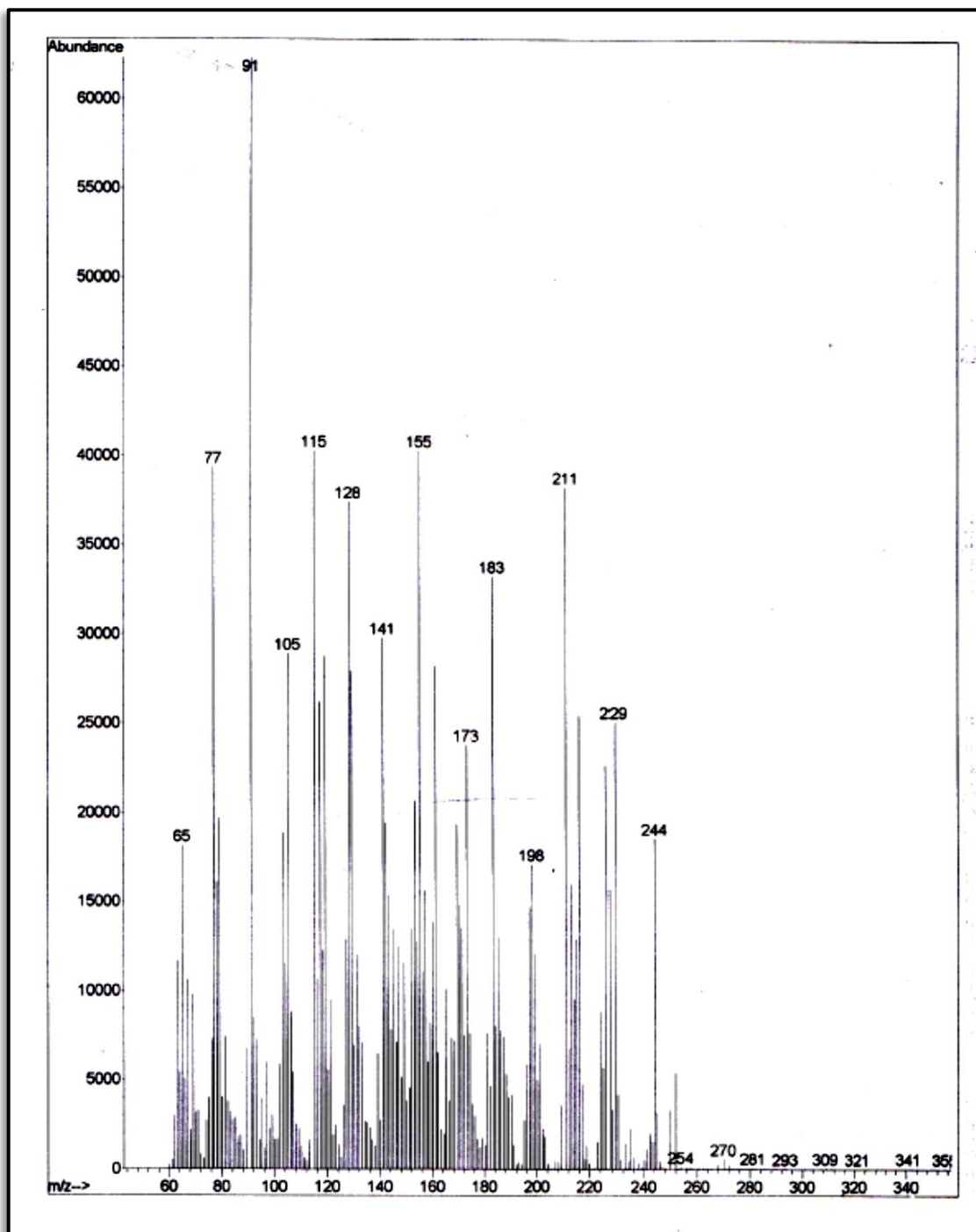
Anexo 4: Espectro de HMBC



Anexo 5: Espectro de HSQC



Anexo 6: Espectro de GC-masas



Anexo 7: Espectro de GC-masas

