



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA**

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACEUTICO

“Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Sarcorhachis sydowii* Trel”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.

AUTOR: Suescun Cueva, Viviana Alejandra

DIRECTOR: Ramírez Robles, Jorge Yandry, Msc.

CO-DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio, PhD.

Loja – Ecuador

2014

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Msc. Jorge Yandry Ramírez Robles

DIRECTOR DEL TRABAJO DE GRADO

PhD. Chabaco Patricio Armijos Riofrío

CO- DIRECTOR DEL TRABAJO DE GRADO

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Sarcorhachis sydowii* Trel”, realizado por Viviana Alejandra Suescun Cueva, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Diciembre de 2013

f).....

Msc. Ramírez Robles, Jorge Yandry

CI: 1103536311

f).....

PhD. Armijos Riofrío, Chabaco Riofrío

CI: 1102430509

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Suescun Cueva Viviana Alejandra declaro ser autor(a) del presente trabajo de fin de titulación: "Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Sarcorhachis sydowii* Trel" de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Msc. JORGE YANDRY RAMÍREZ ROBLES director y PhD. CHABACO PATRICIO ARMIJOS RIOFRÍO co-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 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".

f).....

Suescun Cueva Viviana Alejandra

CI: 1104735996

## DEDICATORIA

*Dedicado en primer lugar a Dios y a la Santísima Virgen María del Cisne, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.*

*A mí esposo Israel, que ha estado a mi lado dándome cariño, confianza y apoyo incondicional para seguir adelante para cumplir otra etapa en mi vida*

*A mis padres Oswaldo Agustín y Blankita Esperanza por su amor, modelo de perseverancia y de apoyo incondicional, este triunfo es nuestro. A mis hermanos Stalin, Alex, Jimmy y Xavier, por su inmenso cariño, quienes siempre supieron darme los mejores consejos y ánimos para alcanzar esta meta tan importante. A mis cuñadas Mary, Elizabeth, Mariuxi y Diana por el apoyo brindando en cada momento. A mis queridos sobrinos Stalin Xavier, Sofía Valentina y Isaac Efraín por llenarme de felicidad.*

Viviana Alejandra Suescun Cueva

## AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios y a la Santísima Virgen María del Cisne, ya que gracias a su intersección pude llegar a culminar con éxito todas y cada una de las metas planteadas

A mi esposo Israel, por su amor incondicional, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con él.

A mis padres Oswaldo y Blankita, por todo su amor y por sus palabras de aliento para seguir adelante en todo momento.

A mis hermanos Stalin-Mary, Alex-Elizabeth, Jimmy-Mariuxi y Xavier-Diana, por sus sabios consejos y por siempre estar ahí en los buenos y malos momentos. A mis sobrinitos Stalin Xavier, Sofía Valentina y Isaac Efraín, por llenarme de felicidad, amor y ternura.

Quiero agradecer enormemente al Ing. Jorge Ramírez, por sus orientaciones y enseñanzas durante el desarrollo de la presente investigación, de igual forma al PhD. Chabaco Armijos que estuvo al tanto de la tesis, de su revisión y de tratar de que las cosas salieran lo mejor posible.

A Maura, mi amiga y compañera, por el apoyo mutuo que siempre tuvimos en nuestras largas jornadas de trabajo y ante todo su gran amistad, ayuda y todos esos momentos de alegría vividos.

Finalmente, a la Universidad Técnica Particular de Loja, al Departamento de Química por el apoyo académico y económico que me brindó a lo largo de toda mi carrera universitaria

Y a todo aquel que de alguna manera haya colaborado para hacer esto posible.

Viviana Alejandra Suescun Cueva

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....</b>	<b>ii</b>
<b>DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
<b>CAPITULO I.....</b>	
1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Familia PIPERACEAE.....	7
1.2. Distribución geográfica de la familia Piperaceae.....	7
1.3. Genero <i>Piper</i> .....	8
1.4. Distribución geográfica del género <i>Piper</i> .....	8
1.5. Usos del Género <i>Piper</i> .....	8
1.6. Características botánicas de la especie <i>S. sydowii</i> .....	9
1.7. Estudio fitoquímico en el género <i>Piper</i> .....	9
1.7.1. Fitoesteroles.....	10
1.7.2. Terpenos.....	10
1.8. Dermatofitosis.....	11
1.8.1. <i>Trichophyton rubrum</i> .....	11
1.8.2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	11
<b>CAPITULO II.....</b>	
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. Recolección del material vegetal.....	15

2.2.	Obtención de los extractos.....	15
2.3.	Análisis de los extractos.....	16
2.4.	Fraccionamiento en cromatografía en columna.....	17
2.5.	Cromatografía de capa fina.....	17
2.6.	Unión y purificación de fracciones.....	17
2.7.	Caracterización química de fracciones.....	18
2.7.1.	Punto de fusión.....	18
2.7.2.	Factor de Retención.....	18
2.7.3.	Solubilidad.....	19
2.8.	Identificación de las moléculas aisladas.....	19
2.8.1.	Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM).....	19
2.9.	Determinación de la actividad antifúngica.....	21
2.9.1.	Microdilución en caldo: Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	21
2.9.2.	Preparación de la suspensión de los inóculos.....	21
2.9.3.	Ensayo de Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	22
<b>CAPITULO III .....</b>		
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	23
3.1.	Extractos obtenidos de la especie <i>S. sydowii</i> .....	24
3.2.	Compuestos aislados de la especie <i>S. sydowii</i> .....	24
3.2.1.	Fracciones 12-13.....	26
3.2.2.	Fracciones 38-39.....	28
3.3.	Evaluación de actividad antifúngica.....	31
3.3.1	Concentración mínima Inhibitoria (CMI).....	31
<b>CAPITULO IV .....</b>		
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>34</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>		<b>35</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>36</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>42</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de la columna capilar utilizada.....	19
<b>Tabla 2.</b> Medios de cultivo y condiciones de incubación para las cepas de hongos utilizadas.....	21
<b>Tabla 3.</b> Peso y rendimiento de los extractos de <i>S. sydowii</i> .....	24
<b>Tabla 4.</b> Fraccionamiento Cromatográfico del extracto en AcOEt.....	24

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de la familia Piperaceae .....	7
<b>Figura 2.</b> <i>Sarcorhachis Sydowii</i> Trel.....	9
<b>Figura 3.</b> Dermatofitos: a) <i>T. rubrum</i> ; b) <i>T. mentagrophytes</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> Esquema del desarrollo de la investigación.....	14
<b>Figura 5.</b> Obtención de los extractos de <i>S. sydowii</i> .....	15
<b>Figura 6.</b> Placas de silica gel TLC fase directa del extractos de Hexano.....	16
<b>Figura 7.</b> Placas de silica gel TLC fase directa de los extractos AcOEt y DCM .....	16
<b>Figura 8.</b> Cromatografía en columna.....	17
<b>Figura 9.</b> Equipo de fusion Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22.....	18
<b>Figura 10.</b> Medida de los Rf en la placa de silica gel 60 F254.....	19
<b>Figura 11.</b> Condiciones de operación del CG-EM en la columna DB-5MS para el análisis de las fracciones 12-13 y 38-39 .....	20
<b>Figura 12.</b> Ilustración de la microplaca TC96 hecha con 12 columnas y 8 filas. ....	22
<b>Figura 13.</b> TLC de la fracción 12-13 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina..	26
<b>Figura 14.</b> Estructura química del óxido de cariofileno. $C_{15}H_{24}O$ .....	26
<b>Figura 15.</b> Espectro de masas del óxido de carifileno identificado por CG-EM.....	27
<b>Figura 16.</b> Espectro de masas del óxido de cariofileno.....	27
<b>Figura 17.</b> TLC de la fracción 38-39 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina..	28
<b>Figura 18.</b> Perfil cromatográfico de la fracción 38-39.....	29

## ABREVIATURAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>Hex</b>	Hexano
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>CC</b>	Cromatografía en columna
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>U.V</b>	Ultravioleta
<b>Pf</b>	Punto de fusión
<b>Rf</b>	Factor de retención
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Tm</b>	<i>Trichophytum mentagrophytes</i>
<b>Tr</b>	<i>Trichophytum rubrum</i>
<b>VS1</b>	Extracto de hexano
<b>VS2</b>	Extracto de diclorometano
<b>VS3</b>	Extracto de acetato de etilo

## RESUMEN

*Sarcorhachis sydowii* Trel, es una liana que pertenece a la familia Piperaceae. La especie investigada fue recolectada en el barrio de Numbami del cantón Zamora de la provincia de Zamora Chinchipe.

El extracto total obtenido en acetato de etilo a partir de hojas secas *S. sydowii* fue sometido a cromatografía de columna, en relación 1:70 (extracto – silica), eluyendo con Hexano, Acetato de etilo y Metanol, identificando los compuestos  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol y óxido de cariofileno. La elucidación estructural de los compuestos aislados fue determinada, utilizando técnicas Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM) y por comparación con los datos reportados en la literatura.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de Hexano y Diclorometano no presentaron actividad antifúngica frente a las cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 ® y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 ®; en el extracto de acetato de etilo para *Trichophyton mentagrophytes* fue 250 $\mu$ g/mL y *Trichophyton rubrum* es de 150  $\mu$ g/mL, se obtuvo una actividad antifúngica moderada.

**PALABRAS CLAVE:** Piperaceae, *Sarcorhachis sydowii* Trel, actividad antifúngica, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, óxido de cariofileno.

## ABSTRACT

*Sarcorhachis sydowii* Trel is a liana belonging to the Piperaceae family. The species investigated was collected in the neighborhood of Numbami of Canton Zamora the Zamora Chinchipe Province.

The total extract obtained in ethyl acetate from leaves dry *Sarcorhachis sydowii* Trel was underwent to column chromatography, in relation 1:70 (extract - silica), eluent with hexane, ethyl acetate and methanol, identifying the compounds  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol and caryophyllene oxide. The structural elucidation of the isolated compounds was determined using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and by compared with information reported in the literature.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) the extracts of Hexane and dichloromethane not showed antifungal activity front the strain *Trichophyton rubrum* ATCC 28188® and *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 ®, in the ethyl acetate extract for *Trichophyton mentagrophytes* was 250 $\mu$ g/L and *Trichophyton rubrum* was 150 g / mL is obtained a moderate antifungal activity.

**KEYWORDS:** Piperaceae, *Sarcorhachis sydowii* Trel, antifungal activity, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, caryophyllene oxide.

## INTRODUCCIÓN

Ecuador cuenta con una inmensa y aún poco estudiada diversidad de especies vegetales, la cual ha sido sabiamente aprovechada por sus habitantes. Esto ha despertado el interés de la comunidad científica en la investigación fitoquímica con fines terapéuticos. A pesar de su extensión territorial relativamente pequeña, el Ecuador es considerado un país mega diverso, cuenta con un clima tropical y subtropical que lo hace adecuado para el crecimiento de especies vegetales que son de interés para el estudio de su bioactividad (Mongeli, 2002). Se estima que el 80% de la población ecuatoriana emplea la medicina tradicional, pues está comprobado que muchos de los principios activos en las plantas son una alternativa efectiva en el tratamiento de diversas enfermedades. Ecuador cuenta con centenares de plantas medicinales, de hecho existen alrededor de 3118 especies pertenecientes a 206 familias usadas con fines medicinales (De la Torre et al., 2008).

En las últimas décadas, la investigación fitoquímica y la purificación de extractos vegetales han rendido numerosos compuestos puros que han probado ser indispensables en la medicina moderna. La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que el 80% de los más de 7.000 millones de habitantes de la tierra confían en las plantas medicinales para suplir sus principales necesidades de salud (OMS, 2007).

Estudios de fitoquímica han demostrado que el género *Piper* tiene muchos componentes que incluyen amidas insaturadas, flavonoides, lignanos, ésteres de cadena larga y corta, terpenos, esteroides, y alcaloides (Facundo, 2004; Navickiene, 2010). Muchas sustancias obtenidas de especies de la familia Piperaceae, en especial las del género *Piper*, por ejemplo *P. nigrum* se utilizan como condimento por sus frutos aromáticos y picantes; otras son utilizadas como insecticidas o como medicinas naturales, razones por las que se les han determinado diferentes actividades biológicas, entre las que se destacan la antifúngica, insecticida y antiparasitaria (Celis et al., 2008).

La obtención de metabolitos secundarios de plantas es uno de los temas de mayor interés en la actualidad, esto con el fin de buscar y conocer de donde provienen los diferentes mecanismos de su producción (biosíntesis) y la utilización de estos en las plantas para los diferentes procesos que permitan su crecimiento (alimentación, mecanismos de defensa, interacción con el medio, entre otros) (Virinder et al., 1997).

El descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos solo puede satisfacer las necesidades de tratamientos terapéuticos, ya que muchos de estos se realizan con medicamentos que siguen siendo insuficientes ante enfermedades como la malaria, el cáncer, las infecciones virales, bacterianas y fúngicas (Parra, 2001).

Con el aislamiento y caracterización de estos metabolitos de *S. sydowii* se contribuye de buena manera al entendimiento de estos procesos y también de forma significativa al conocimiento fitoquímico y biológico.

Algunas de las técnicas más utilizadas para el aislamiento y purificación de estos metabolitos son las técnicas cromatográficas, las cuales comenzaron con la separación de compuestos de plantas con cromatografía en columna que permitía visualizar la purificación por diferentes bandas coloreadas y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Silverstein et al., 2005).

## **ANTECEDENTES**

Las plantas han sido empleadas desde el inicio de la humanidad en diversos usos; por esta razón, se han desarrollado un gran número de estudios para conocer las causas de diferentes actividades biológicas mostradas por varias especies de todo el mundo. La familia Piperaceae tiene una amplia distribución mundial y un gran número de especies vegetales que han reportado actividades biológicas importantes como insecticidas, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, entre otras (Celis et al., 2008).

El género *Piper* contiene alrededor de 2000 especies y es considerado como el más importante y estudiado de dicha familia, esto se debe principalmente a la presencia de metabolitos secundarios como amidas, alcaloides y compuestos fenólicos, característicos de cada especie (López et al., 2010). Como ejemplo de ello tenemos a *Piper carpunya* (Guabiduca dulce) que es utilizada en la medicina tradicional de los países tropicales y subtropicales de América del sur como anti-inflamatorio, anti-ulcera, anti-diarreico y anti-parasitario así como dolencias o irritaciones en la piel (Quílez et al., 2010).

El aislamiento y caracterización de este tipo de compuestos es de gran importancia ya que conociendo su estructura podemos entender su interacción con otras moléculas en el cuerpo humano y si en realidad la planta tiene las propiedades que popularmente se le adjudican (Virinder et al., 1997). De ahí la importancia de esta investigación como aporte al estudio de plantas medicinales del sur del Ecuador impulsado por el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, donde se investiga los metabolitos secundarios responsables de cierta actividad biológica a partir de especies vegetales nativas, y que además poseen antecedentes medicinales tradicionales aplicables.

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

## **CAPITULO I**

### **1. MARCO TEÓRICO**

### 1.1. Familia PIPERACEAE

La familia Piperaceae es conocida desde la antigüedad como una de las familias más grandes e importantes de Angiospermas del Orden Piperales; el género más representativo es el género *Piper*, el cual presenta gran diversidad de compuestos. Dada esta riqueza química y sus aplicaciones en la medicina tradicional, a muchos de los extractos y compuestos aislados en esta familia se les han realizado diversos ensayos de actividad biológica, obteniéndose resultados promisorios y que han permitido incluso confirmar sus usos etnobotánicos (Celis et al., 2008).

La familia Piperaceae comprende de 10 a 12 géneros y unas 3.000 especies de distribución pantropical. Entre ellos están el género *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe*, *Ottonia*, *Sarchorhachis* y *Trianaeopiper*. (López et al., 2010).

Las principales características de la familia Piperaceae son las de ser arbustos y trepadoras leñosas de hojas alternas, a menudo con glándulas de aceites aromáticos, en ocasiones algo carnosas. Flores pequeñas, bisexuales o unisexuales. Tienen de 1 a 10 estambres y carecen de pétalos y sépalos. Su fruto es carnoso, con una sola semilla. (Parmar et al., 1997; Flores, 2001).

### 1.2. Distribución geográfica de la familia Piperaceae

La familia Piperaceae, se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Distribución geográfica de la familia Piperaceae

**Fuente:** Tropicos.org.

### **1.3. Género *Piper***

El género *Piper* posee gran importancia comercial, económica y medicinal (Arnason et al., 2005). Este género comprende más de 700 especies. Las *Piper* son arbustos, árboles pequeños o hierbas, aromáticos, con tallos nudosos, hojas alternas, inflorescencias opuestas, raramente axilares, simples o compuestas; con nervaduras pinnadas, palmadas o paralelas y nervación secundaria conspicua, perfiles recubriendo las yemas axilares, inflorescencia, espigas carnosas, flores bisexuales, diminutas, axilares a brácteas peltadas, fruto una drupa (Parmar et al., 1997; Flores, 2001).

### **1.4. Distribución geográfica del género *Piper***

En este género se encuentran alrededor de 700 especies en el neotrópico, principalmente en 5 áreas del continente americano: la Costa Pacífica de Colombia y Ecuador, el oeste de la Amazonía del Perú y Ecuador, la Costa atlántica del Brasil, los Andes de Venezuela, Ecuador, Colombia y el norte del Perú, el sur de México y la península de Yucatán (Célis et al., 2008).

### **1.5. Usos del Género *Piper***

Diversas especies del género *Piper* han sido utilizadas en distintas partes del mundo especialmente en América, Asia y África para el tratamiento de un sinnúmero de afecciones en humanos, además de utilizarlas como insecticidas. Así por ejemplo, las hojas *Piper aduncum* en forma de decocción y en forma de tónico son usadas para controlar algunas infecciones (disentería, blenorragia, leucorrea, etc) (García, 1992). En Colombia se utilizan las hojas secas y trituradas de la especie *Piper tuberculatum* para eliminar los piojos, en América Latina, *P. amalago* es usada para aliviar dolores de pecho y como agente antiinflamatorio (Portet et al., 2007). En Ecuador *Piper carpunya*, conocida comúnmente como Guabiduca Dulce, es usada para combatir constipados intestinales, inflamación, y como protector gastrointestinal (Jørgensen, P.M. & S. 1999).

A muchas especies pertenecientes a este género se les han realizado diversos ensayos de actividad biológica de acuerdo al uso de éstas en medicina tradicional y a los reportes fitoquímicos. Por ejemplo, la especie *Piper hostmannianum* var. *berbicense*; que es utilizada en la medicina tradicional como antimalárico, se le ha determinado actividad contra *Plasmodium falciparum* y se han aislado los compuestos responsables de esa actividad, lo que ha permitido confirmar así su uso tradicional (Portet et al., 2007).

## 1.6. Características botánicas de la especie *S. sydownii* Trel



**Figura 2.** *Sarcorhachis sydownii* Trel

**Elaboración:** La autora.

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Piperales

**Familia:** Piperaceae

**Género:** *Sarcorhachis*

**Especie:** *S. Sydownii*

*Sarcorhachis sydownii* es una liana con axilar inflorescencias, flores bisexuales y frutas incrustadas en el raquis, muchas de las cuales son especies clave en su hábitat natural (Wanke et al., 2007).

## 1.7. Estudio fitoquímico en el género *Piper*

Las especies del género *Piper* han sido ampliamente investigadas y los estudios fitoquímicos han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios, destacando los flavonoides, lignanos, neolignanos, kavapironas, piperolidos, terpenos y fitoesteroles (Parmar et al., 1997). A continuación se presenta algunos ejemplos de los tipos de metabolitos aislados en el género.

**1.7.1. Fitoesteroles.-** Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal; y se les encuentra en forma libre (También llamados agliconasesteroides), como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5. En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroides:  $\beta$ -Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol. Dentro de las principales funciones que se atribuye a los fitosteroides está la de ser antiinflamatoria aunque limitada, también juega papeles importantes en enfermedades cardiovasculares gracias a su influencia en el nivel de colesterol en la sangre, ayudan a prevenir arterioesclerosis y enfermedades coronarias (Honey, 2012).

**1.7.2. Terpenos.-** Las especies del género *Piper* presentan terpenos en sus aceites esenciales, en su mayoría de tipo monoterpenos y sesquiterpenos de núcleos variados. Los terpenos son compuestos que se biosintetizan a partir de unidades de isopreno de cinco átomos de carbono. Su sistema de clasificación es muy sencillo y se agrupan según el número de átomos de carbono del esqueleto carbonado, siempre múltiplo de cinco. Los más sencillos son los monoterpenos (C10) que se caracterizan por tener dos unidades de isopreno, le siguen los sesquiterpenos (C15) con tres unidades de isopreno (Ruiz, 2002). Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalarías, antimicrobianas, etc.

La formación de estos productos comienza con la fotosíntesis a partir de precursores en determinadas rutas biosintéticas, así: el ácido acético sirve de precursor de los policétidos (alifáticos y aromáticos), y de los terpenoides a través del ácido mevalónico, los compuestos aromáticos también se sintetizan a partir del ácido shikímico, los compuestos nitrogenados, en particular los alcaloides, proceden de los aminoácidos (Castillo & Martínez, 2007).

## 1.8. Dermatofitosis

Las infecciones invasivas por hongos siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes que reciben trasplantes y en aquellos que presentan inmunocompromiso (Erjavec & Verweij, 2002). Este aspecto se explica en gran parte por el desarrollo de mecanismos de resistencia primaria y secundaria a los antimicóticos entre algunas especies de hongos, seguido de la problemática en la administración inadecuada de medicamentos fungistáticos que al prolongar el tratamiento por largos periodos de tiempo permiten la selección de clones resistentes (Schelz, et al., 2006).

La dermatofitosis constituye micosis superficiales causadas por hongos que tienen la capacidad de invadir tejido queratinizando como la piel, el pelo y las uñas, del hombre y de algunos animales (Méndez et. al., 2004). Esta enfermedad provoca a escala mundial entre 300 a 500 millones de casos clínicos cada año. Esto se debe a que la mayoría de la población mundial está distribuida en zonas altamente endémicas correspondientes a zonas subtropicales y tropicales. (CYTED, 2000). Existen tres géneros de dermatofitos: *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Trichophyton*, cada uno de ellos con varias especies. 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, tiña de la ingle, tiña del área del pañal tiña de las uñas (Schiwinn et al,2005).

**1.8.1. *Trichophyton rubrum*** se consideran las micosis superficiales más frecuentes en el mundo occidental. *T. rubrum* es un dermatofito antropófilo que ha sido frecuentemente encontrado en infecciones de pie, ingle y uñas principalmente. (Hernández et al., 2007).

**1.8.2. *Trichophyton mentagrophytes*** el segundo agente causal de dermatofitosis luego de *Trichophyton rubrum*, Se caracteriza por presentar un crecimiento relativamente rápido. Presentan dos tipos de colonias: algodonosas o granulares. 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).



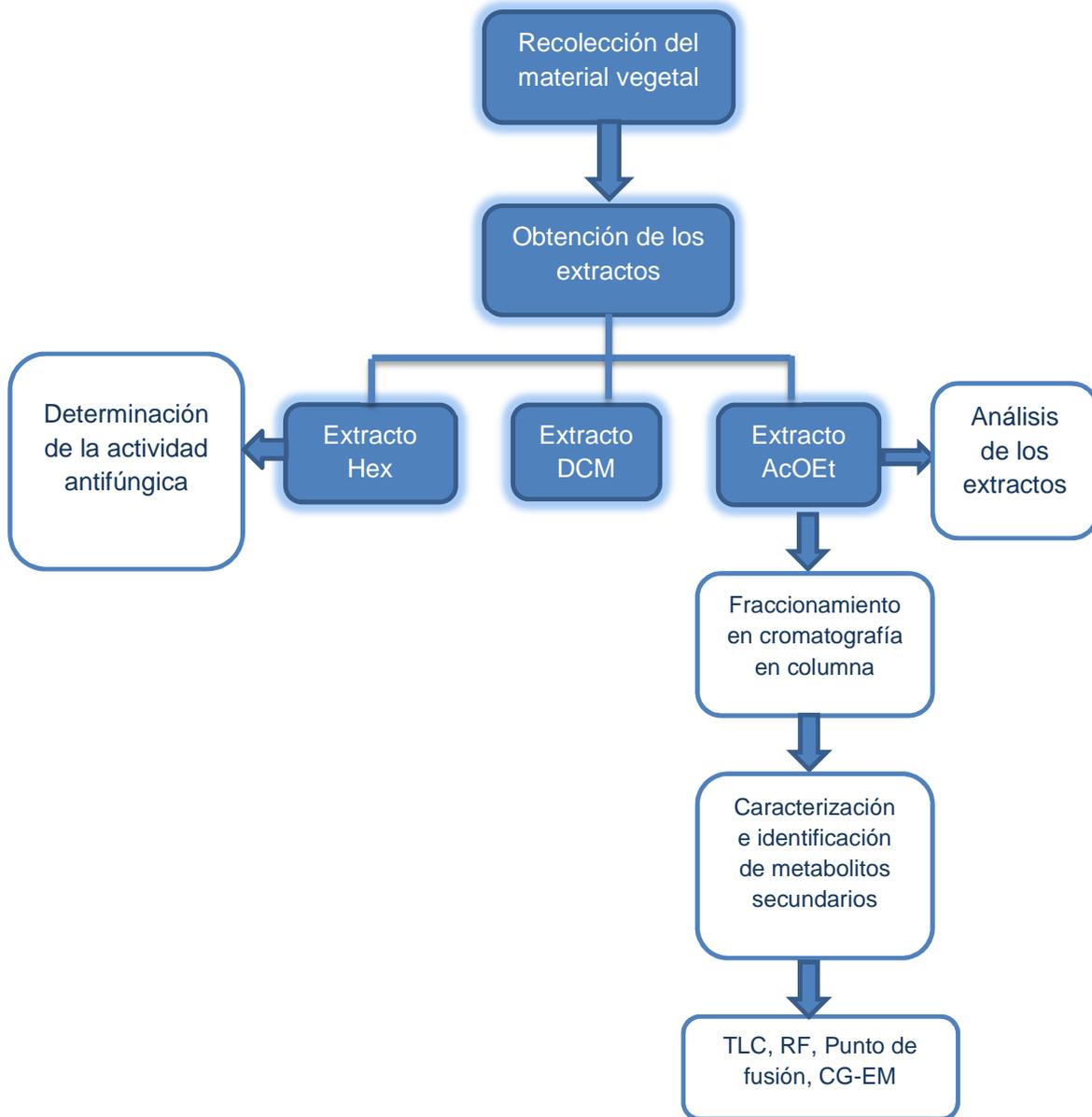
**Figura 3.** Dermatofitos: a) *T. rubrum*; b) *T. mentagrophytes*

Es importante mencionar que otro agente etiológico causante de micosis superficial, el *T. mentagrophytes*, presenta características macroscópicas que son semejantes a las que se observa en *T. rubrum*. La diferenciación de ellos se realiza mediante pruebas morfológicas y fisiológicas como la penetración del pelo in vitro, reducción de la urea, asimilación de aminoácidos y producción de pigmentos, que demandan mayor costo a los laboratorios. Una alternativa de identificación precoz del *T. rubrum* es el empleo de cultivos cuya composición incluye extractos de papa donde *T. rubrum* produce pigmento rojo vinoso y *T. mentagrophytes* no lo produce.

## **CAPITULO I**

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para llevar a cabo la presente investigación se siguió la siguiente metodología ver Figura 4.



**Figura 4. Esquema del desarrollo de la investigación**

Elaboración: La autora.

## 2.1. Recolección del material vegetal

Se recolectó material vegetal en estado de floración de *S. sydowii* Trel, en Febrero de 2013 en el sector Numbami, perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe. Las coordenadas del sitio de recolección son: 728041E, 9540124N a una altura de 1161 m s.n.m. Se preparó una muestra de herbario para su identificación cuyo vaucher: Pi-003-010 se encuentra depositado en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja. La caracterización botánica se la realizó en el Herbario de la Universidad Nacional de Loja por Bolívar Merino.

## 2.2. Obtención de los extractos

El material vegetal recolectado fue secado a una temperatura de 32°C por 8 días, se seleccionaron y pesaron 200g de las mismas, para posteriormente ser trituradas. Consecutivamente se procedió a macerar con tres disolventes de polaridad creciente, Hex, DCM y AcOEt. La maceración fue combinada, es decir, dinámica por 5 minutos, y estacionaria 55 minutos. Seguidamente se filtró al vacío. Los procesos de maceración y filtrado al vacío se realizaron 3 veces. Posteriormente se concentraron a presión reducida y a temperatura moderada de 30-35°C en el equipo rota evaporador (Figura 5). Para facilitar la identificación y trabajo con los extractos obtenidos se los denominó como se muestra a continuación: Extracto de Hex (VS1), Extracto de DCM (VS2) y Extracto de AcOEt (VS3).



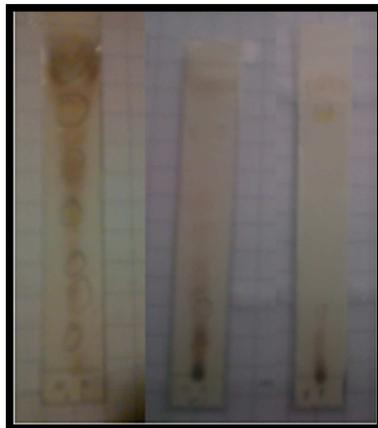
**Figura 5.** Obtención del extracto **a.** Maceración Dinamica **b.** Maceración Estacionaria **c.** Filtración al vacío **d.** Rotaevaporación.

**Elaboración:** La autora.

### 2.3. Análisis de los extractos

Luego de obtener los tres extractos en Hex, DCM y AcOEt, utilizando placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, se observó cuál de los tres extractos presentaba mayor riqueza en metabolitos secundarios. Cabe indicar que se realizó en fase directa, y a distintas polaridades. Finalmente con los resultados obtenidos se decidió optar por el Extracto de AcOEt (VS3).

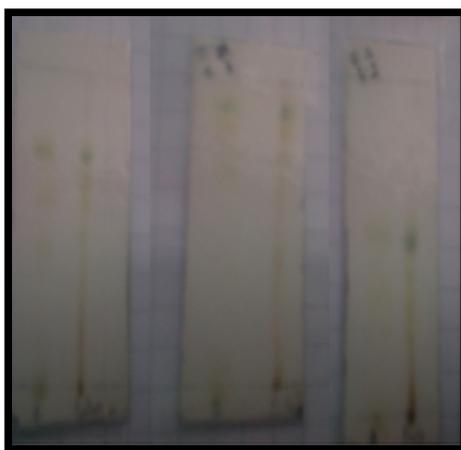
#### EXTRACTO DE HEXANO



a)                      b)                      c)

**Figura 6.** Placas de sílica gel TLC fase directa de los extractos de *S. sydowii*.  
a) Hex-AcOEt 15:1(v/v); b) Hex-AcOEt 25:1 (v/v); c) Hex-Puro(v/v).

#### EXTRACTO DE AcOEt y DCM



a)                      b)                      c)

**Figura 7.** Placas de sílica gel TLC fase directa de los extractos de *S. sydowii*.  
a) Hex-AcOEt 7:3(v/v); b) Hex-AcOEt 1:1 (v/v); c) Hex- AcOEt 8:2(v/v).

## 2.4. Fraccionamiento en cromatografía en columna

Esta técnica consiste en la separación de componentes de una mezcla, mediante una fase móvil, a través de una fase estacionaria (J.Sherma & Thin-Layer 2002).

Se sembró 4g de extracto obtenido con acetato de etilo (VS3) para su fraccionamiento en cromatografía de columna (CC) en una relación 1:70 (extracto: sílica). Se eluyó con disolventes de polaridad creciente (Hex, AcOEt y MeOH). La sílica gel empleada fue de marca Merck 0,0015-0040mm.



**Figura 8.** Cromatografía en columna

**Elaboración:** La autora

## 2.5. 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 F<sub>254</sub> (fase directa). Los disolventes utilizados para la fase móvil fueron Hex: AcOEt 1:1; 7:1; 7:3; y 3:7 (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.

## 2.6. Unión y purificación de fracciones

Se recolectaron 303 fracciones de 200ml 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 que cristalizaron, fueron sometidas a un proceso de purificación utilizando dos disolventes: acetona para lavar las impurezas, y MeOH para inducir la cristalización.

## 2.7. Caracterización química de 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).

### 2.7.1. Punto de fusión

El punto de fusión de un compuesto sólido cristalino es la temperatura a la cual se encuentran en equilibrio la fase sólida y la fase líquida y generalmente es informado dando el intervalo entre dos temperaturas: la primera es cuando aparece la primera gotita de líquido y la segunda es cuando la masa cristalina termina de fundir (Shriner et al., 1995). 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 (Figura 9.). A continuación se registró la temperatura a la cual la muestra pasaba de estado sólido a líquido.

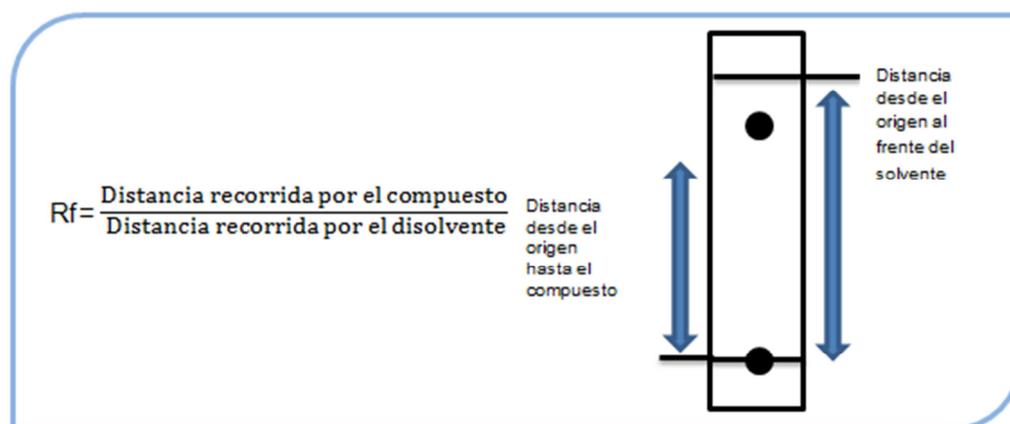


**Figura 9.** Equipo de fusión Fisher-Johns-Melting Point Apparatus serial 40-22.

**Elaboración:** La autora

### 2.7.2. Factor de Retención

Se define como la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación / distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente (Choma, 2005). Los Rf de los compuestos químicos se calcularon de acuerdo a la fórmula que se indica a continuación y considerando como referencia la (Figura 10).



**Figura 10.** Medida de los Rf en la placa de silica gel 60 F254

Fuente: Silva et al., 2008

### 2.7.3. Solubilidad

Es la propiedad de una sustancia para disolverse en otra (Fessenden & Fessenden 2000). Los disolventes empleados para determinar la solubilidad de los compuestos fueron: acetona, diclorometano, cloroformo y metanol.

## 2.8. Identificación de las moléculas aisladas

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

Los análisis de los compuestos aislados de la especie *S. sydowii*, por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM), se realizaron mediante un cromatógrafo de gases Agilent, las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano). El equipo que se utilizó para los respectivos análisis fue un cromatógrafo de gases serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. En la tabla 1 se detallan las características de las columnas capilares que se usaron para las inyecciones cromatográficas.

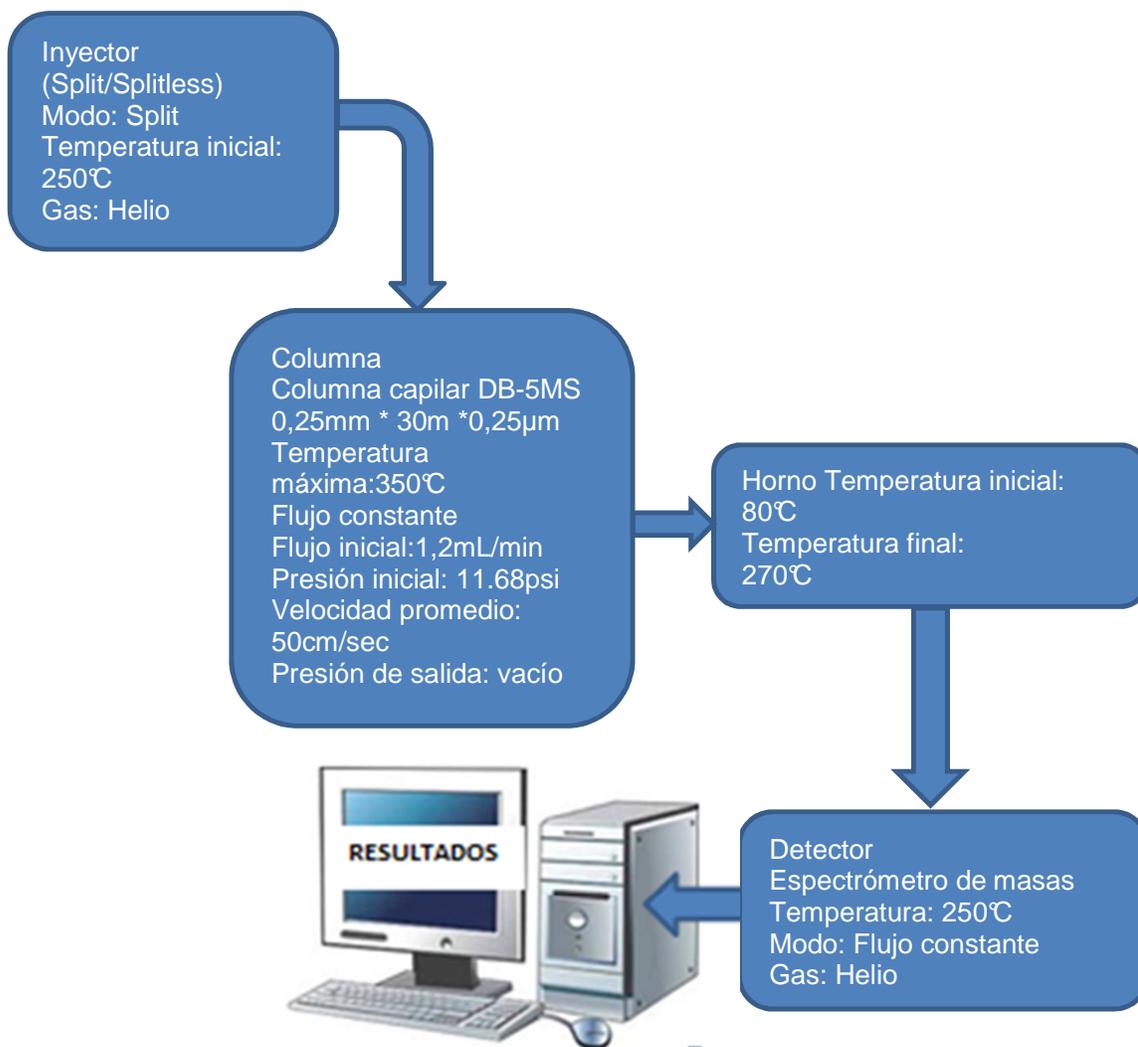
**Tabla 1.** Características de la columna capilar utilizada.

CARACTERÍSTICAS DE LA COLUMNA CAPILAR				
Columna	Temperatura (°C)	Película(μm)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
DB-5	350	0,25	0,25	30

Fuente: Proveedores

Elaboración: La autora

Para realizar las respectivas corridas cromatográficas se usaron algunos parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de los compuestos obtenidos de las fracciones 12-13 y 38-39. (Figuras 11).



**Figura 11.** Condiciones de operación del CG-EM en la columna DB-5MS para el análisis de las fracciones 12-13 y 38-39

**Elaboración:** La autora

## 2.9. Determinación de la actividad antifúngica

### 2.9.1. 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 17 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 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.

### 2.9.2. Preparación de la suspensión de los inóculos

Se preparó la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80 °C, se tomó de la suspensión 14µL diluido en 7 mL de Caldo Sabouraud. De esta suspensión se tomaron 100µL para completar a 200µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a  $5 \times 10^4$  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 24-72
<i>T. rubrum</i>	Caldo Sabouraud	28 °C por 24-72

Fuente: (Willey & Sons, 2005)

### 2.9.3. Ensayo de Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para este 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).

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  $5 \times 10^4$  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).



**Elaboración:** La autora.

**Figura 12.** Ilustración de la microplaca TC96 hecha con 12 columnas y 8 filas

## **CAPITULO III**

### **3. RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### 3.1. Extractos obtenidos de la especie *S. sydowii*

En la tabla 3 se describe el peso y rendimiento de los extractos VS1, VS2 y VS3 a partir de 200g de muestra vegetal seca.

**Tabla 3.** Peso y rendimiento de los extractos de *S. sydowii*

Extracto	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Rendimiento (%)
Extracto de HEX (VS1)	200	8.58	4.29
Extracto de DCM (VS2)		12.08	6.04
Extracto de AcOEt(VS3)		6.12	3.06

Elaboración: La autora.

### 3.2. Compuestos aislados de la especie *S. sydowii*

A partir de la cromatografía en columna se obtuvieron 303 fracciones. Todas las fracciones eluidas fueron analizadas por cromatografía de capa fina, usando placas de sílica gel 60F254 (fase directa).

En la Tabla 4 se exponen los disolventes empleados y las proporciones a las cuales las fracciones fueron eluidas así como también la apariencia que presentaron.

**Tabla 4.** Fraccionamiento Cromatográfico del extracto en AcOEt.

Fracciones	Proporción	Mezclas de disolventes	Apariencia
1-11	100	HEXANO	Aceitosa
12-13	100		Aceitosa
14-17	100		Aceitosa
18-24	95:5	Hex- AcOEt	Sólida
25-26	95:5	Hex- AcOEt	Aceitosa
27-37	90:10	Hex- AcOEt	Sólida
38-39	90:10	Hex- AcOEt	Sol. Blanquecino
40-41	90:10	Hex- AcOEt	Sólida
42-43	90:10	Hex- AcOEt	Sólida
44-46	90:10	Hex- AcOEt	Sólida
47-51	90:10	Hex- AcOEt	Sólida
52-58	85:15	Hex- AcOEt	Sólida
59-62	85:15	Hex- AcOEt	Sólida
63-65	80:20	Hex- AcOEt	Sólida
66-70	80:20	Hex- AcOEt	Sólida
71-73	80:20	Hex- AcOEt	Sólida
74-76	75:25	Hex- AcOEt	Sólida
77-78	75:25	Hex- AcOEt	Sólida
79-80	75:25	Hex- AcOEt	Sólida

<b>81-83</b>	75:25	Hex- AcOEt	Sólida
<b>84-86</b>	75:25	Hex- AcOEt	Sólida
<b>87-91</b>	75:25	Hex- AcOEt	Sólida
<b>92-96</b>	70:30	Hex- AcOEt	Sólida
<b>97-103</b>	70:30	Hex- AcOEt	Sólida
<b>104-113</b>	70:30	Hex- AcOEt	Sólida
<b>114-117</b>	65:35	Hex- AcOEt	Sólida
<b>118-121</b>	65:35	Hex- AcOEt	Sólida
<b>122-126</b>	60:40	Hex- AcOEt	Sólida
<b>127-131</b>	60:40	Hex- AcOEt	Sólida
<b>132-136</b>	55:45	Hex- AcOEt	Sólida
<b>137-140</b>	55:45	Hex- AcOEt	Sólida
<b>141-142</b>	50:50	Hex- AcOEt	Sólida
<b>143-146</b>	50:50	Hex- AcOEt	Sólida
<b>147-152</b>	45:50	Hex- AcOEt	Sólida
<b>153-156</b>	45:50	Hex- AcOEt	Sólida
<b>157-161</b>	40:60	Hex- AcOEt	Sólida
<b>162-166</b>	40:60	Hex- AcOEt	Sólida
<b>167-168</b>	35:65	Hex- AcOEt	Sólida
<b>169-171</b>	35:65	Hex- AcOEt	Sólida
<b>172-173</b>	30:70	Hex- AcOEt	Sólida
<b>174-180</b>	25:75	Hex- AcOEt	Sólida
<b>181-201</b>	20:80	Hex- AcOEt	Sólida
<b>202-215</b>	10:90	Hex- AcOEt	Sólida
<b>214-224</b>	5:95	Hex- AcOEt	Sólida
<b>225-235</b>	100	AcOEt	Sólida
<b>236-244</b>	95:5	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>245-253</b>	90:10	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>254-260</b>	80:20	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>261-268</b>	70:30	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>269-272</b>	60:40	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>273-275</b>	50:50	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>276-278</b>	40:60	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>279-281</b>	30:70	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>282-291</b>	20:80	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>293-298</b>	10:90	AcOEt – MeOH	Sólida
<b>299-303</b>	100	MeOH	Sólida

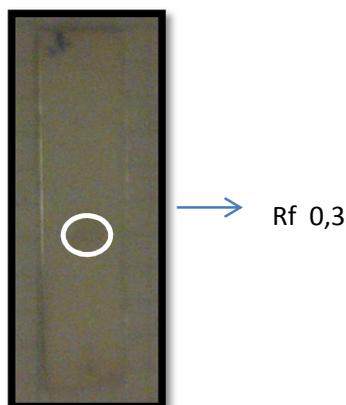
Elaboración: El Autor

Como se puede observar en la Tabla 4 las fracciones de la 12-13 presentaron la formación de partículas aceitosas amarillas, en las fracciones 38-39 se presentó un precipitado granuloso.

### 3.2.1. Fracciones 12-13

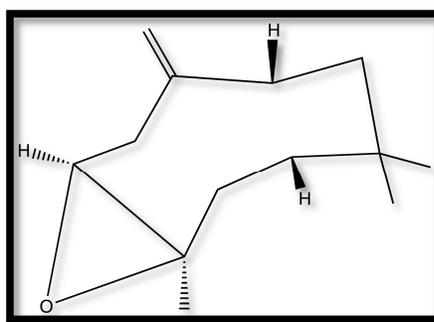
Este compuesto se obtuvo en las fracciones eluidas con Hexano Puro. La fracción fue soluble en Hex y DCM e insoluble en MeOH su punto de fusión es de 63-64 °C. Las fracciones mostraron partículas aceitosas amarillas.

Su cromatografía de capa fina Figura 13, corrida con Hex: AcOEt en proporción 1:1, dio una mancha de color morada al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina (Anexo 1) dando un Rf de 0,3. No fue visible en la luz UV de 254 y 365nm.



**Figura 13.** TLC de la fracción 12-13 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina  
**Elaboración:** La autora

La CG-EM determinó que en la fracción 12-13, con una probabilidad del 99%, se encuentra el óxido de cariofileno que corresponde al compuesto de tipo sesquiterpeno. (Figura 14)

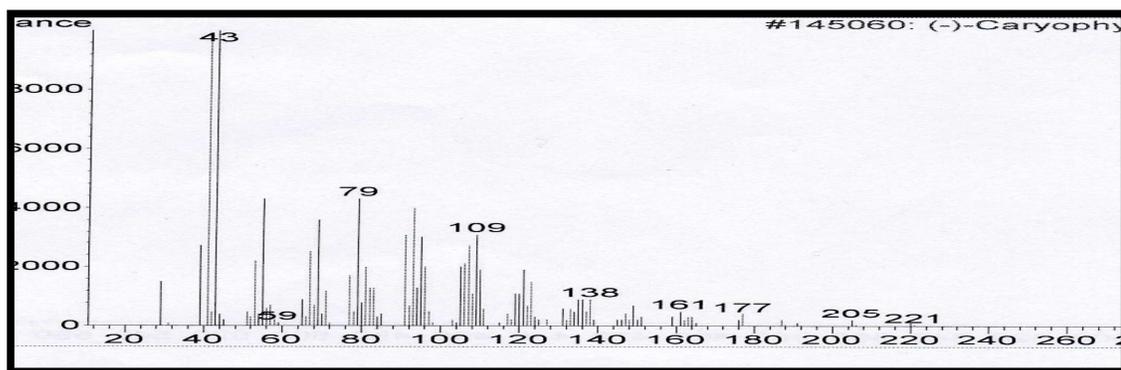


**Figura 14.** Estructura química del óxido de cariofileno.  $C_{15}H_{24}O$

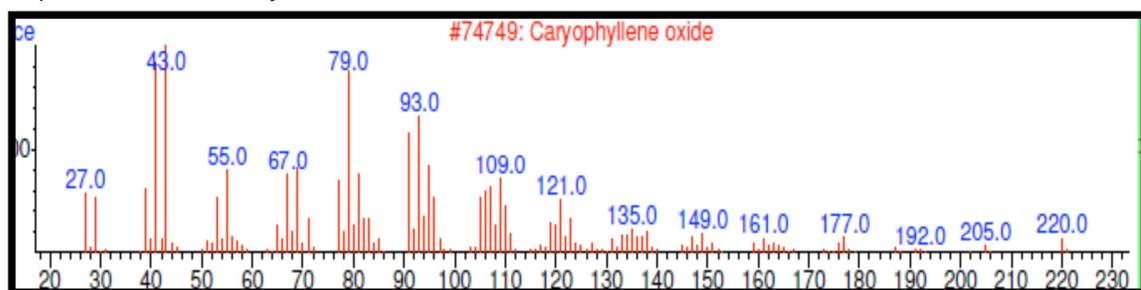
En los espectros de masas lo picos de iones moleculares observados, que son compatibles con la fórmula molecular  $C_{15}H_{24}O$  y su peso molecular 220g/mol de óxido de cariofileno, fueron corroboraron con la base de datos NIST (2010).

Al comparar el espectro de masas por impacto electrónico del compuesto de óxido de cariofileno con base de datos NIST 0.8 (usada por el equipo) (Figura 15) y corroborando en literatura (Adams, 1995; Choi, 2005) se pudo concluir que el compuesto es un sesquiterpenoide, llamado “óxido de cariofileno”. Óxido de cariofileno es un sesquiterpeno tricíclico natural que es un componente de muchos aceites esenciales, el mecanismo de acción de los terpenos no se entiende completamente, pero se especula que participa en la membrana de interrupción por los compuestos lipofílicos (Choi, 2005).

Se han aislado diversos terpenos de especies de *Piper*, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, siendo poco frecuentes los triterpenos. Así, entre los terpenos más frecuentes se encuentran el  $\beta$ -cariofileno, linalol y mirceno aislados de *P. regnellii*, *P. cernuum*, *P. auritum*, *P. guinense* y *P. cubeba* (Costantin, M.B et al., 2001), también el óxido cariofileno, presente en el aceite esencial de hojas de *Piper cf. cumanense* Kunth (Choi, 2005).



**Figura 15.** Espectro de masas del compuesto de óxido de cariofileno identificado por CG-EM. De la especie *Sarcorhachis sydownii*.

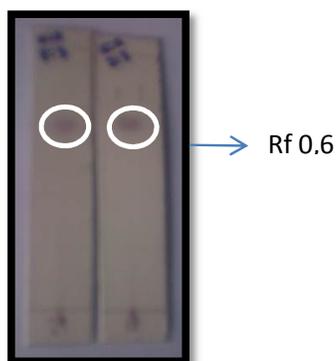


**Figura 16.** Espectro de masas del óxido de cariofileno extraído de la base de datos NIST 0.8.

### 3.2.2. Fracciones 38-39

El compuesto se lo obtuvo en las fracciones eluidas con Hex:AcOEt en proporción 90:10, el cual se purificó con acetato de etilo y se lavó con acetona, se obtuvo un precipitado granuloso de color blanco. La fracción fue soluble en Hex y DCM e insoluble en MeOH su punto de fusión fue de 123 - 125°C.

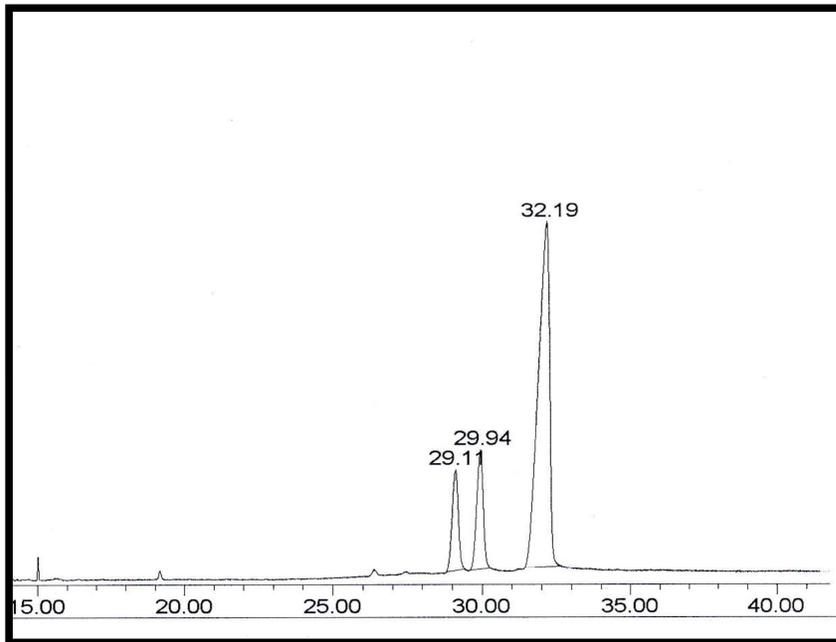
Su cromatografía de capa fina Figura. 17, corrida con Hex: AcOEt en proporción 1:1, dió una mancha de color violeta al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina (Anexo1), dando un Rf de 0,6. No fue visible en la luz UV de 254 y 365nm.



**Figura 17.** TLC de la fracción 38-39 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina

**Elaboración:** La autora

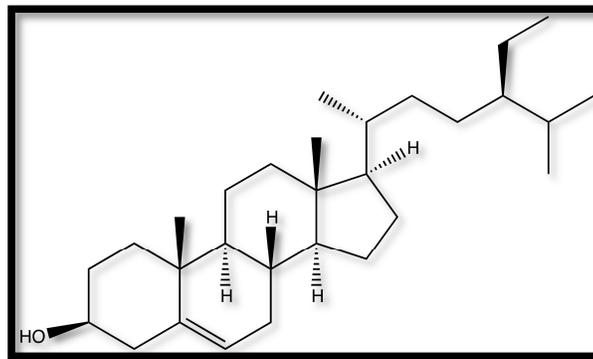
Según la Base de Datos del equipo de Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM), que se utilizó en esta investigación, indica que en la fracción 38-39, con una probabilidad del 99%, se encuentra el  $\beta$ -sitosterol. Así mismo con un 95%, el Stigmasta-5,22-dien-3-ol Stigmasterol. Finalmente un 99%, el Campesterol. En los espectros de masa obtenidos se observaron los picos de ion molecular a 414, 412 y 400m/z (Anexos 3, 4 y 5), que pertenecen a las fórmulas moleculares  $C_{29}H_{50}O$  del  $\beta$ -sitosterol,  $C_{29}H_{48}O$  del Stigmast a-5,22-dien-3-ol Stigmasterol y  $C_{28}H_{48}O$  del campesterol, respectivamente. Todos estos datos fueron corroborados con la base de datos NIST (2010) y se encuentran también acordes con los datos de mezcla de esteroides comúnmente encontrados en plantas ya conocidas en la literatura (Andrade, 2003).



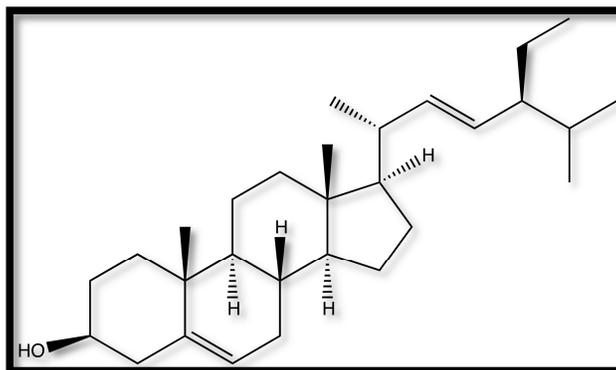
**Figura 18.** Perfil cromatográfico de la fracción 38-39.

Para el  $\beta$ -sitosterol se tiene un tiempo de retención de 32,19 minutos con un porcentaje de área relativo de 23,51% y un pico de ion molecular en  $m/z$  400(Anexo 2 y Anexo 3), Seguido el estigmasterol, con un tiempo de retención de 29,94 minutos con un porcentaje de área relativo de 4,68 % y un pico de ion molecular en  $m/z$  412(Anexo 2 y Anexo 4), Finalmente está el campesterol en un tiempo de retención de 29,11 minutos con un porcentaje de área relativo de 3,075 % y un pico de ion molecular en  $m/z$  414 (Anexo 2 y Anexo 5).

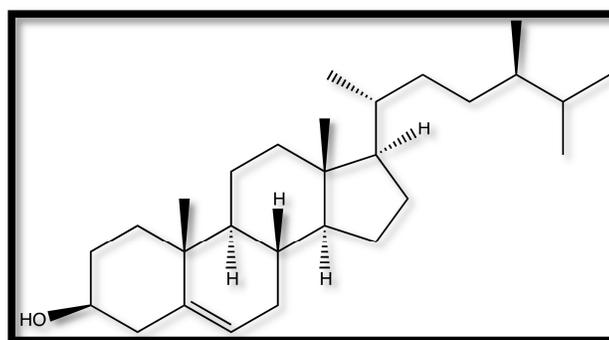
### $\beta$ -SITOSTEROL



## ESTIGMASTEROL



## CAMPESTEROL



Las fracciones 38-39 que contiene  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y campesterol. Aunque a la mayoría de los fitosteroles no se le conocen actividades biológicas específicas en la naturaleza, excepto como componentes de las membranas celulares, se ha informado de diversas propiedades terapéuticas cuando se ingiere en ciertas dosis, incluyendo la reducción de colesterol en suero, la inhibición del crecimiento en células de cáncer, antiinflamatorio, antipirético, e inmunomodulación liberación de insulina (Garibello 2010). Los fitosteroles están siendo investigados como componentes anticancerosos de la dieta. De Stefani et al., (2000) en un estudio epidemiológico encontraron una relación directa entre la reducción del riesgo de padecer cáncer del estómago y la presencia de un elevado contenido de fitosteroles en la dieta. Se han podido comprobar sus efectos en el laboratorio, tanto in vitro (cultivo de líneas celulares) como en animales, sobre algunos de los 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  $\beta$ -sitosterol el fitosterol de mayor efectividad.

Cabe indicar que es muy difícil identificar al  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y campesterol, cuando se encuentran juntos en una misma fracción, mediante la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ya que los 3 compuestos poseen el mismo núcleo esteroidal, de tipo  $\Delta^5$ -3- $\beta$ -hidroxiandosteno (Martinez, 2001). Pero, en caso de no ser posible obtenerlos en estado puro, la Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM) es un método válido para identificarlos (Parra, 2011).

Los esteroides se derivan biogénicamente de la AcetilCoa vía mevalonato y escualeno. Se han aislado esteroides como el estigmasterol en *P. betle* y *P. cumanesense* (Parmar et al., 1997). Así mismo entre las especies del género *Piper* al sur del Ecuador, se han reportado la misma mezcla esteroidal como es en *P. pseudochurumayu* (Chamba, 2012), *P. asperiusculum* (Chuquimarca, 2013) y *P. peltatum* L. (Vidal, 2013). Los estudios anteriormente descritos, indican que es frecuente encontrar resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

### **3.3. Evaluación de actividad antifúngica**

#### **3.3.1 Concentración mínima Inhibitoria (CMI)**

Según (Holetz et al., 2002) considera que si un extracto o compuesto presenta una CMI  $<100\mu\text{g/mL}$  la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a  $500\mu\text{g/mL}$  moderada, de 500 a  $1000\mu\text{g/mL}$  mala y  $>1000\mu\text{g/mL}$  nula.

Estudios químicos realizados en especies de la familia Piperaceae del Brasil han revelado la ocurrencia de diversos productos naturales fisiológicamente activos tales como alcaloides, amidas, pironas, dihidrochalconas, flavonoides, fenilpropanoides, lignanos y neolignanos (Orjala et al., 1994; Martins et al., 2000; Danelutte et al., 2003). Varias amidas isobutílicas, pirrolidina, dihidroxipiridona y piperidina (Alécio et al., 1998; Navickiene et al., 2000; Silva et al., 2002) han sido determinadas. Estas amidas han generado interés debido a sus potentes propiedades insecticidas y antifúngicas (Miyakado et al., 1989; Alécio et al., 1998; Navickiene et al., 2000; Silva et al., 2002; Soberón et al., 2006).

El extracto de Hex (VS1) mostró actividad antifúngica de  $1000\mu\text{g/mL}$  contra *Trichophyton mentagrophytes* y contra *Trichophyton rubrum*; el extracto de DCM (VS2) mostró actividad antifúngica de  $1000\mu\text{g/mL}$  contra *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* que se la clasifica como una actividad muy débil o nula, Mientras que el extracto de AcOEt (VS3) tuvo una CMI de  $250\mu\text{g/mL}$  contra *Trichophyton mentagrophytes* y  $150\mu\text{g/mL}$  contra *Trichophyton rubrum* que se considera actividad antifúngica moderada, de modo que

podemos indicar que no tiene ninguna actividad a la concentración mencionada. Se ha reportado actividad insecticida y antifúngica en las amidas, cumarinas y lignanos (Huamaní & Ruiz, 2005).

**Tabla 5.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a los hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*

Concentración mínima inhibitoria (ug/mL)		
Extracto	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185®(Tm)	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188®(Tr)
VS1	1000µg/mL	1000µg/mL
VS2	1000µg/mL	1000µg/mL
VS3	250µg/mL	150 µg/mL
Control positivo	itraconazol 100% de inhibición (7,8µg/mL)	
Control negativo	1000µg/mL	1000µg/mL

**Elaboración:** El Autor

Los extractos vegetales son mezclas muy complejas de cientos de compuestos en diversas cantidades; por eso se ensayan concentraciones relativamente altas de forma que es bastante posible que los metabolitos causantes de la actividad ejerzan su efecto en cantidades muy pequeñas (Ospina, 2012).

## **CAPITULO IV**

## CONCLUSIONES

- ✓ Se aisló por medio de cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM), el compuesto conocido como tipo sesquiterpeno óxido de cariofileno y una mezcla de esteroidal de  $\beta$ -sitosterol, stigmasta-5,22-dien-3-ol y campesterol, este es el primer reporte para la especie *Sarcorhachis sydowii*.
- ✓ La CMI determino que los extractos total en Hexano y Diclorometano no mostró actividad antifúngica contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.
- ✓ El extracto en acetato de etilo presento actividad antifúngica moderada contra las dos cepas de hongos *T. mentagrophytes* con un 250 $\mu$ g/mL y *T. rubrum* con un 150 $\mu$ g/mL.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar trabajos de investigación que contribuyan al estudio fitoquímico de la parte aérea de la especie en estudio y así mismo investigar técnicas modernas que permitan obtener compuestos más puros.
- ✓ Desarrollar investigaciones similares con otras especies del género *Piper*, ya que varios estudios confirman su riqueza en metabolitos secundarios, que se presentan como una alternativa a la medicina tradicional.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Arnason, J., Dursty, & Philogene. (2005). Phytochemical discovery of new botanical insecticides. (R. Regnault, B. Philogene, & C. Vincent, Edits.) 37-46.
- Cantón, R., Garcia, J., Gómez, L., Mártiz, L., Rodriguez, 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.).
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. En *Agronomía Colombiana* (págs. 97-106.). 26 .
- Cerón, C.(2002). La etnobotánica en el Ecuador. En *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). En *esis de grado previa a la Obtención del Título de Bioquímico Farmacéutica*. Loja.
- Chuquimarca, L., (2013). Actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper asperiusculum*, "matico-matapijo" al Sur del Ecuador. (Tesis Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja.
- Costantin, M., Sartorelli, P., Limberger, R., Henriques, A. T., Steppe, M., Ferreira, M. (2001). *Planta Med.*
- Crespo, V. (2008). Generalidades sobre los hongos. En *Dermatomicosis: saprofitias y dermatofitosis Piel*(pág. Vol. 7).
- De la Torre, L., Alarcon, D., Kvist, L., & Salazar, J. (2008). Enciclopedia de las Plantas Utiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas. Quito & Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Dyer, L., Richards, J., & Dodson, C. (2004). Isolation, Synthesis and Evolutionary Ecology of *Piper* Amides. *MRM/KJ*, (7), 117-139.
- Facundo, V., & Braz-Filho, R. (2004). C-metiled flavonoids from the roots of *Piper carniconnectivum* (Piperaceae). En *Biochemical Systematic and Ecology* 32 (págs. 1215-1217.).

- Flores, E.(2006). Metabolitos secundarios biactivos de la especie del género *Piper* de la flora boliviana. (Tesis Doctoral).Universidad Mayor de San Andrés.
- Flores, E., Jiménez,A., Ravelo, A., & Bourdy, G.(2000). Fitoquímico de catorce especies del Género *Piper* con actividad antifúngica y/o Leishmanicida in vitro. Revista Biofarbo, VIII: 9 -16.
- Flores, N. (2001). Metabolitos Biactivos aislados de cinco especies *Piper* con actividad antiparasitaria y/o leishmanicida. La Paz, Bolivia; Universidad Mayor de San Andrés . Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimica.
- Garcia, H. (1992). Flora medicinal de Colombia. Bogotá: Tercer Mundo Editores.
- Garibello, C. (2010). Estudio de hojas de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) cuatro como nueva fuente natural de sustancias esteroidales y cumarinas (Tesis Mestria). Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias .
- Gregori, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. Revista Biofarbo,4(5), 34-38.
- Harborne, J., & Willams, C. (2000). Advances in flavonoid reserch since 1992. *Phytochemistry*, 13(12), 481-504.Higdon, J. (30de Julio de 2012). Micronutrient Information Center: Phytosterols.Obtenido de Base de la alimentación humana: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/>.
- Holetz, F., Pessini, G., Sánchez, N., Cortez, D., Nakamuca, C., & Filho, B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious disease. *MemInst OswaldoCruz*.97, 1027-31.
- Honey, G. (2012).Estudios preclínicos yclínicos de los fitoesteroles. Enciclopedia de naturaceuticos.
- 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 doctoral).Universidad Nacional de Perú, Lima.
- 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.
- Kolak, U., & Hacibek, G. (2009). Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. *Journal Chemical Turkey*, 33(15), 813-823.
- Krolickaa, A., Szpitter, A., Gilgenest, E., Romanik, G., Kaminski, M., & Lojkowska. (2008). Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors. *Enzyme Microbial Technology*, 13(18, )216-221.
- López, S. (2010). Geranylation of benzoic acid derivates by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). *Bioresource Technology*, 101: 4251 – 4260.
- Martinez, A. (2001). *Esteroles*. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.
- Martini, N., Katerete, D., & Eloff, J. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Ethnopharmacology*, 93(12), 207-212.
- Méndez, L., López, R., & Hernández, F. (2004). *Micosis Superficiales. Dermatofitos (Segunda ed.)*. Actualidades en Micología Médica. Facultad de Medicina de la UNAM.
- Mongeli, E. (2002). Nuevos Medicamentos y etnomedicina del uso popular a la industria. *Revista de divulgación científica y tecnología de la asociación ciencia hoy*, 12: 2-3.
- Morrison, T., & Boyd, R. (1998). *Química orgánica*. Ed. Addison Wesley Longman. México S. A.: 5º Ed.
- Muñoz, D. (2008). *Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Actividad fungicida e insecticida de la especie Piper eridopon (Piperaceae)*. (Tesis inédita de maestría). Universidad Nacional de Colombia: Bogota.
- 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](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/guillermo_n_r/generalidades.htm).
- Navickiene, H. (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 55, 621-626.

- Oliveira, M. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales una revisión. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 30(8), 453-459.
- OMS. (2007). Asamblea Mundial de la Salud. s.l. Resolución WHA, 58, 27.
- Ospina, D. (2012). Actividad Antifúngica del Extracto Crudo de *Azadirachta indica* A. Juss De suspensión de células sobre hongos dermatofitos causantes de enfermedades patógenas al hombre. Tesis Doctorado. Universidad Nacional de Colombia.
- Oxford. (2005). Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
- Palacios, D. (2009). Aplicación de Métodos Bioautográficos para la identificación de compuestos antimicrobianos en extractos totales de cuatro especies vegetales e las Provincias, *Lepechinia mutica* Benth y *Niphogenon* d. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., & Jha, A. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Pytochemistry*,(46), 1866-1870.
- Parra, J. (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.
- Patiño, O. (2010). Aislamiento y caracterización de alcaloides presentes en dos especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae), síntesis de análogos benzofenantridínicos y evaluación de actividad antifúngica y antibacteriana. Universidad Nacional de Colombia,. Bogotá: pp. xv-xvii.
- Pino, N. (2009). Comparación de la composición química de los aceites esenciales de *Piper lanceifolium* Kunth y *P. hispidum* del departamento del Chocó.
- Plazas, E. (2008). Estudio fitoquímico y Evaluación de actividad leishmanicida de la especie *Piper hispidum* Kunth. Tesis de maestría. Bogotá: Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Quijano, M., Callejas, R., & Miranda, D. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*(33), 1266-1278.
- Quílez, A. (2010). Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *J Ethnopharmacol*.

- 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.
- Rueda, R. (2002). Micosis superficiales y dermatomicosis. Colombia médica.
- Santos, P. (2001). Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlanticforest. . En *Phytochemistry* (págs. 58, 547e551.).
- Santos, P., Moreira, D., Guimarães, E., & Kaplan, M. (2001). Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlanticforest. En *Phytochemistry* (pág. 547e551). 58.
- Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils, fitoterapia.
- Schiwinn, A., Ebert, J., & Broccker, E. (2005). Frequency of *Trychophyllum rubrum* in *Tenia capitis*. *Mycoses*.
- Shriner, R., Fuson, R., Curtin, D. (1995). Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos. Limusa, México.
- Torres-Santos, E. M., Meirelles, M., & Rossi-Begman, B. (1999). Selective Effect of 2'-6'-Dihydroxy-4'-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania*. En *Antimicrobial and Agents Chemotherapy* (págs. 43, 1234-1241).
- Vidal, D. (2013). Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de la *Piper peltatum* L. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Virinder, S. P., Subhash, C. J., Kirpal, S. B., Rajni, J., Poonam, T., Amitabh, J. (1997). *Phytochemistry*. 46, 597-673.
- Wanke, S. (2007). Evolution of Piperales—matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. . En *Molecular Phylogenetics and Evolution* (págs. 42, 477-497.).
- Willey, J., & Sons, L. (29 de Junio de 2005). Oxford; Update Software Ltd. Obtenido de <http://www.update-software>.

**ANEXOS**

## ANEXOS 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 12,5 de ácido sulfúrico con los 250ml de etanol

Reactivos	Composición
Vainillina	250ml de etanol 2,5mL de vainillina

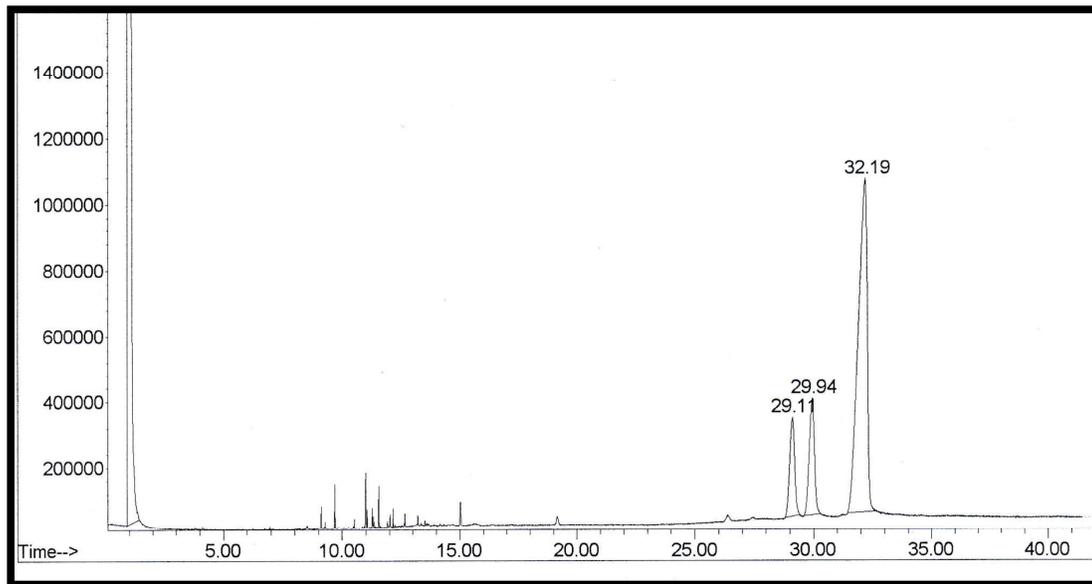
#### Procedimiento:

- Se aforan los 2,5g de vainillina con los 250ml de etanol

**Fuente:** Protocolo del Laboratorio de Fitoquímica (2013) del Departamento de Química de la UTPL

## ANEXOS 2.

Espectros de masas (CG-EM) de la fracción 38-39

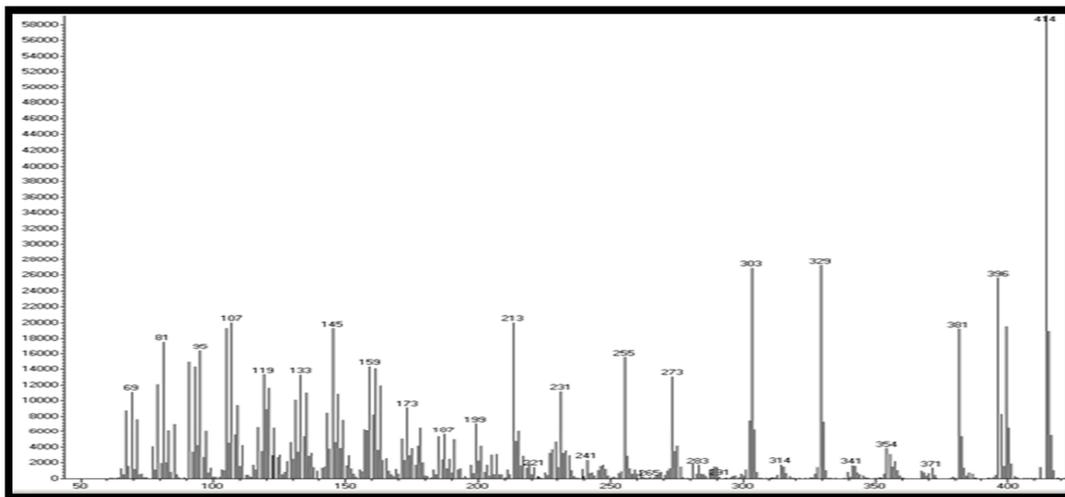


### Compuestos asignados por CG-EM

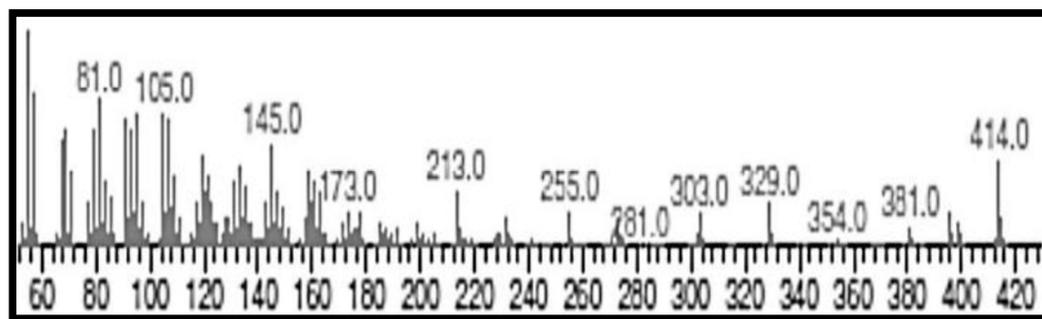
PK#	RT	Área%	Cas#	Qual%
<b>β-sitosterol</b>	32.19	23.51	000083-47-6	99
<b>Estigmasterol</b>	29.94	4.68	000083-48-7	95
<b>Campesterol</b>	29.11	3.75	000474-62-4	99
<b>Diclorometano (disolvente)</b>	1.06	68.06	000075-09-2	86
<b>DB-5MS capillary column</b>				

### Anexo 3.

Espectro de masas del  $\beta$ -sitosterol identificado por CG-EM, en la fracción 38-39. (Anex. 3a) comparado con el espectro de la base de datos NIST 08 (Anex. 3b)



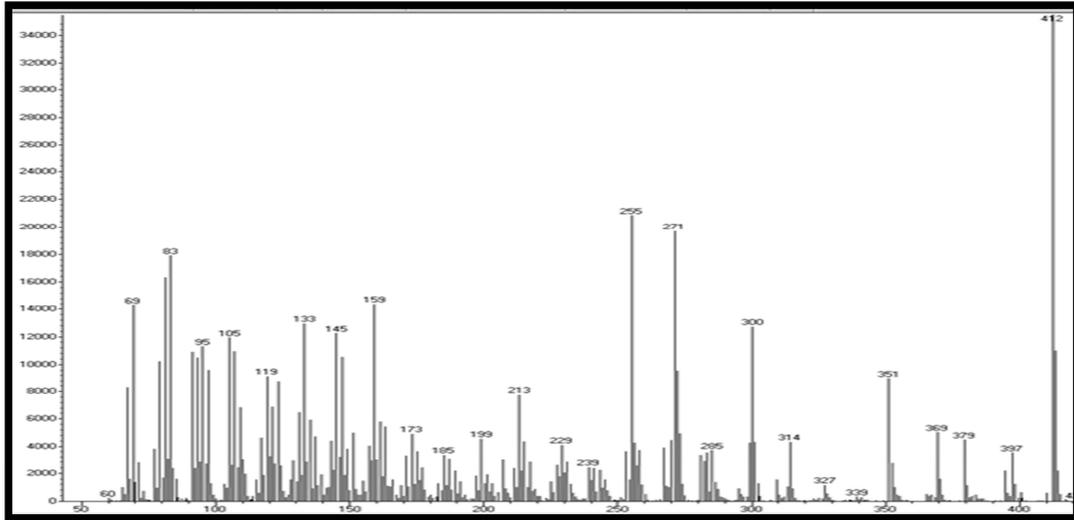
a.



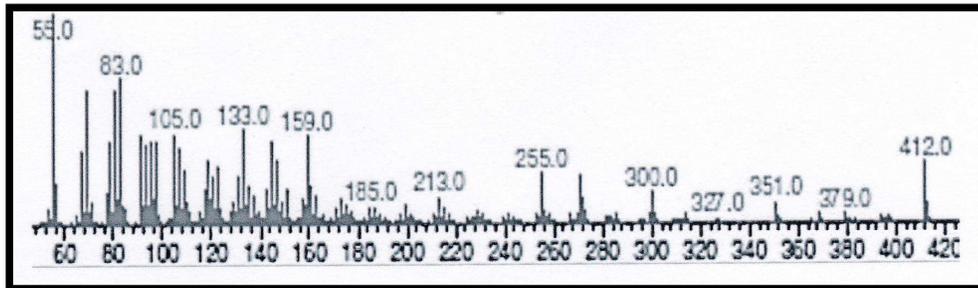
b.

**Anexo 4.**

Espectro de masas del Estigmasterol identificado por CG-EM, en la fracción 38-39. (Anex. 4a) comparado con el espectro de la base de datos NIST 08 (Anex. 4b)



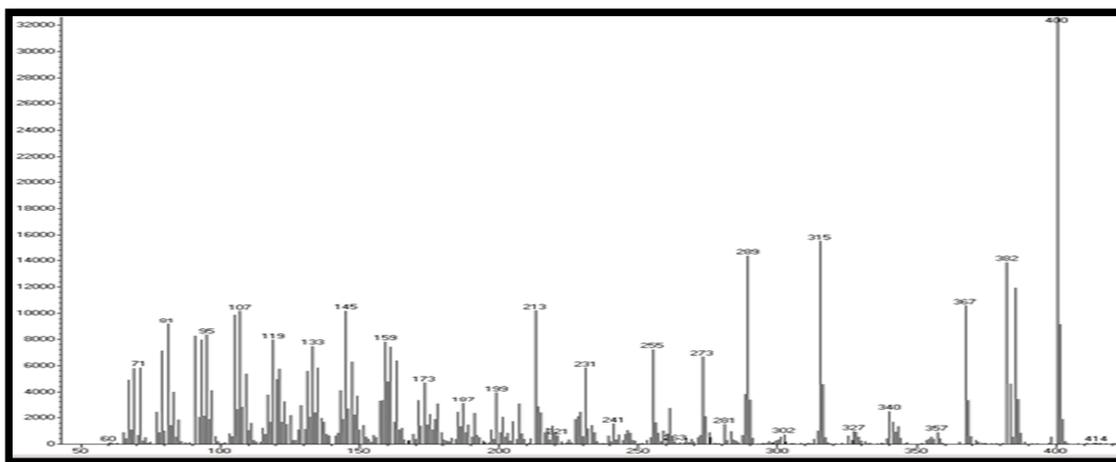
**a.**



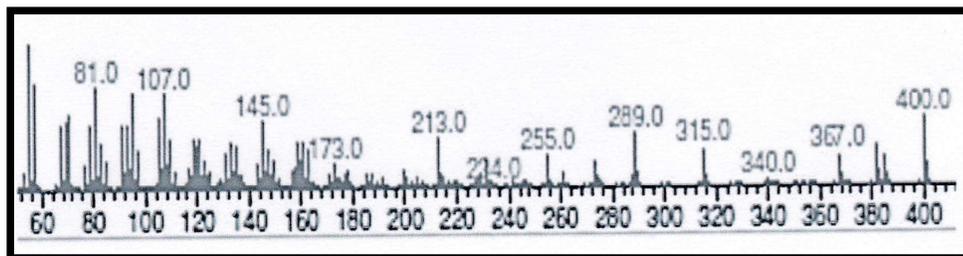
**b.**

**Anexo 5.**

Espectro de masas del Campesterol identificado por CG-EM, en la fracción 38-39. (Anex. 5a) comparado con el espectro de la base de datos NIST 08 (Anex. 5b)



**a.**



**b.**