



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper umbellatum* L.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.

AUTORA: Pullaguari Ochoa, Maura Judith

DIRECTOR: Ramírez Robles, Jorge Yandry, M.Sc.

CO-DIRECTOR: Armijos Riofrío Chabaco Patricio, PhD.

LOJA - ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

M.Sc. Jorge Yandry Ramírez Robles.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

PhD. Chabaco Patricio Armijos Riofrío

CO- DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: “**Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper umbellatum* L.**” realizado por la profesional en formación: Pullaguari Ochoa Maura Judith; 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, enero de 2014

f)

M.Sc. Ramírez Robles Jorge Yandry.

f)

PhD. Armijos Riofrío Chabaco Patricio

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Maura Judith Pullaguari Ochoa, declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper umbellatum* L. de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Jorge Yandry Ramírez Robles y Chabaco Patricio Armijos Riofrío; director y 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 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.

Maura Judith Pullaguari Ochoa

CI. 1900403062

DEDICATORIA

Primeramente a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para seguir adelante. A mis amados padres Mauro y Yolanda, quienes a lo largo de mi vida me han brindado todo su apoyo y comprensión, a mis hermanas Deisi, Diana y Mayra quienes siempre supieron darme los mejores consejos, ánimos y apoyo incondicional en todo momento.

Maura Judith Pullaguari Ochoa

AGRADECIMIENTO

A Dios, por acompañarme en cada momento de mi vida y en cada paso que doy. A mis amados padres Mauro y Yolanda por su amor, apoyo, sacrificio y lucha diaria; a mis hermanas Deisi , Diana y Mayra por siempre haberme dado apoyo, consejos y fortaleza, para seguir adelante .

Al Ing. Jorge Ramírez y de igual manera al PhD. Chabaco Armijos por sus enseñanzas, paciencia, sugerencias y comentarios durante el desarrollo de la presente investigación. Gracias por todo su apoyo brindado.

A Viviana un gran amiga y excelente calidad de persona por su amistad incondicional y apoyo en todo momento.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, al Departamento de Química, Sección Química Básica y Aplicada, además a todos nuestros profesores por brindarnos la oportunidad de prepararnos y terminar nuestra carrera profesional.

Finalmente agradezco a aquellas personas que supieron motivarme para culminar con éxito esta etapa de mi vida.

Maura Judith Pullaguari Ochoa

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Antecedentes.	6
1.2. Generalidades de la Familia Piperaceae.....	7
1.2.1. Descripción del género <i>Piper</i>	7
1.2.2. Descripción botánica de la especie <i>Piper umbellatum</i> L.....	8
1.2.3. Usos medicinales.	9
1.3. Los metabolitos secundarios.....	10
1.3.1. Lignanos y Neolignanos.	10
1.4. Cromatografía.	11
1.4.1. Cromatografía de Capa Fina.	12
1.4.2. Cromatografía en Columna.....	12
1.4.3. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas.	12
1.5. Resonancia Magnética Nuclear.....	13

1.6. Actividad antifúngica.	13
1.6.1. Dermatofitosis	14
1.6.1.1. <i>Trichophyton rubrum</i>	14
1.6.1.2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	14
CAPITULO II	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Recolección del material vegetal.....	16
2.2. Obtención de los extractos.....	166
2.3. Análisis de los extractos.....	17
2.4. Fraccionamiento en Cromatografía en Columna.....	18
2.5. Cromatografía de Capa Fina.....	19
2.6. Unión y purificación de fracciones.....	19
2.7. Caracterización química de las fracciones.....	19
2.7.1. Factor de retención (Rf).....	19
2.7.2. Punto de fusión (Pf).....	20
2.7.3. Solubilidad.....	20
2.8. Identificación de los compuestos aislados.....	21
2.8.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	21
2.8.2. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.....	21
2.9. Determinación de la actividad antifúngica.....	21
2.9.1. Método de Microdilución en Caldo: Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	21
2.9.2. Microorganismos de prueba.....	22
2.9.3. Preparación de las muestras.....	22
2.9.4. Preparación de la suspensión de los inóculos para hongos.....	22
2.9.5. Ensayo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en hongos.....	23

CAPITULO III	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1. Extractos obtenidos de la especie <i>Piper umbellatum</i> L.	25
3.2. Compuestos aislados de la especie <i>Piper umbellatum</i> L.	25
3.3. Compuesto 1: Fracción 27, fitosteroles.	27
3.3.1. Interpretación del espectro de Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM).	28
3.4. Compuesto 2: fracción 30; (3-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol.	29
3.4.1. Resultados de CG-EM y RMN de la fracción 30.	30
3.5. Determinación de la actividad antifúngica de los extractos totales y compuestos.	311
CAPITULO IV	33
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
CONCLUSIONES.....	34
RECOMENDACIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Piper umbellatum</i> L.	9
Figura 2. Ruta biosintética de lignanos y neolignanos.	11
Figura 3. Dermatofitos: a) <i>Trichophyton rubrum</i> ; b) <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	144
Figura 4. Esquema del desarrollo de la investigación.	166
Figura 5. Procedimiento para la obtención de los extractos.	177
Figura 6. Placas de silica gel TLC fase directa de los extractos totales de <i>P. umbellatum</i> L. a) hexano; b) diclorometano; c) acetato de etilo.	188
Figura 7. Cromatografía en columna del extracto de hexano.	18
Figura 8. Medidas del factor de retención (Rf).	200
Figura 9. Equipo de fusión Fisher-Johns- Melting Point Apparatus serial 40-22.	200
Figura 10. Microplaca TC96, con 12 columnas y 8 filas (A-H).	233
Figura 11. TLC de la fracción 27 en Hex-AcOEt 1:1 y 7:3 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina.	277
Figura 12. Estructura química de los compuestos identificados en la fracción 27.	29..29
Figura 13. TLC de la fracción 30 en Hex-AcOEt 8:2 y 7:3 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina.	300
Figura 14. Estructura química del compuesto de tipo Neolignano (3 - (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol.	311

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la especie <i>Piper umbellatum</i> L.	8
Tabla 2. Características de las columnas capilares que se usaron para las inyecciones cromatográficas.	21
Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación para las cepas de hongos.....	22
Tabla 4. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos del la <i>P. umbellatum</i> L.....	25
Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de Hexano.	25
Tabla 6. Propiedades físicas de la fracción 27.	27
Tabla 7. Propiedades físicas de la fracción 30.....	30..30
Tabla 8. Actividad antifúngica de los extractos totales en Hex, CH ₂ Cl ₂ , ACOEt y compuestos frente a los hongos <i>T. mentagrophytes</i> y <i>T. rubrum</i>	32

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
CH₂Cl₂	Diclorometano (DCM)
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
Rf	Factor de retención
Pf	Punto de fusión
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹HRMN	Resonancia Magnética Nuclear Protón
¹³CRMN	Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.
Tm	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Tr	<i>Trichophyton rubrum</i>
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Para la presente investigación se recolectó muestra vegetal en estado de floración de *Piper umbellatum* L. A partir de 300g de hojas y flores secas, se obtuvo tres extractos en: Hexano, Diclorometano y Acetato de etilo. Para observar la riqueza de los metabolitos secundarios se realizó cromatografía de capa fina directa e inversa. Mediante cromatografía en columna se fraccionó 5g de extracto de hexano y se recolectaron 195 fracciones. Las fracciones que cristalizaron y mostraron similitud entre ellas según el análisis de TLC fueron agrupadas y posteriormente analizadas por CG-EM y RMN logrando identificar tres fitosteroles conocidos como: β -sitosterol, campesterol y stigmasta-5,22-dien-3-ol, además se hipotizó un compuesto (3 - (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol, perteneciente a los neolignanos.

Finalmente se determinó la actividad antifúngica mediante el método de Microdilución en Caldo (CMI), que mide la Concentración Mínima Inhibitoria contra las cepas de hongos *Trichophyton rubrum* ATCC 28188® y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 18185® siendo el extracto de hexano el que presentó buena actividad antifúngica con un valor de CMI de 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra las dos cepas de hongos, mientras que los extractos de DCM y AcOEt tuvieron una actividad antifúngica moderada de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se realizaron pruebas antifúngicas a los compuestos obtenidos, sin embargo fueron inactivos para las dos cepas de hongos.

PALABRAS CLAVES: *Piper umbellatum* L, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, (3 - (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol.

ABSTRACT

In this research plant sample was collected in the flowering of *Piper umbellatum* L. From 300g of dried leaves and flowers, three extracts were obtained: in Hexane, dichloromethane and ethyl acetate. To observe the richness of secondary metabolites direct and inverse chromatography was performed thin layer. Column chromatography using fractionated 5g hexane extract and 195 fractions were collected. Fractions were crystallized and showed similarity between them according to TLC analysis were pooled and then analyzed by GC-MS and NMR phytosterols succeeded in identifying three known as: β -sitosterol, campesterol and stigmasta-5,22-dien-3-ol, also a compound belonging to the neolignans are hypothesized (3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)oxirane-2-yl)methanol.

Finally antifungal activity was determined by the method of Broth Microdilution (MIC), which measures the minimum inhibitory concentration against ATCC strains of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* 28188 ATCC® 18185® being the hexane extract which presented good antifungal activity with MIC value of 62.5 g/mL against the two fungal strains, whereas DCM and AcOEt extracts were moderate antifungal activity of 500 ug/mL. Antifungal compounds obtained the evidence were also however, were inactive for two strains of fungi.

KEYWORDS: *Piper umbellatum* L, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, (3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)oxirane-2-yl)methanol, antifungal activity.

INTRODUCCIÓN

La utilización de plantas, a nivel mundial, constituye la aplicación primaria en la atención de la salud por sus propiedades farmacológicas, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos para el tratamiento de diversas enfermedades (Cos et al., 2008). De hecho ha sido ampliamente reconocido que las plantas constituyen un inmenso reservorio de metabolitos secundarios biológicamente activos para el control de diversas enfermedades (Graye & Harborne, 1994). En general, los principios activos son metabolitos secundarios que no tienen un papel esencial en los fenómenos vitales de las plantas (Gómez et al., 1999).

La investigación química y la purificación de extractos vegetales han rendido numerosos compuestos puros que han probado ser indispensables en la medicina moderna. La mayoría de los productos naturales usados actualmente en Medicina proceden de plantas medicinales usadas tradicionalmente (Morrison & Boyd, 1998).

Ecuador es considerado un país mega diverso, cuenta con un clima tropical y subtropical que lo hace adecuado para el crecimiento de especies vegetales que son de interés para el estudio de su bioactividad con fines terapéuticos (Naranjo & Escaleras, 1995). Además cuenta con una variedad de plantas medicinales, de hecho existen alrededor de 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines curativos, el 75% de estas especies son nativas y el 5% endémicas, mientras que el 11% son introducidas. Las partes de las plantas más utilizadas son las hojas (30%), la planta entera (10%) y las flores o inflorescencia (6%).

Los usos de las plantas medicinales en Ecuador son numerosos, principalmente son utilizadas para aliviar diferentes patologías como: dolores de cabeza, estómago, músculos, fiebre, tos, hemorragias, además de otras afecciones como heridas, infecciones, entre otros (De la Torre et al., 2008).

Para el desarrollo de la presente investigación se ha tomado en cuenta la familia Piperaceae que comprende 14 géneros y 3600 especies siendo las más representativas los géneros *Piper* y *Peperomia*. El género *Piper* tiene más de 700 especies que están distribuidas en regiones tropicales y subtropicales; muchas de estas especies tienen aplicación en la

medicina tradicional como antisépticos y anti-infecciosos (Quijano, Callejas & Miranda, 2006; Flores, 2006).

Los beneficios que ofrece esta familia son tradicionalmente conocidas por los habitantes de las zonas aledañas a Zamora Chinchipe y Loja que es utilizada comúnmente contra diversas molestias digestivas, como constipados intestinales, inflamación, además actúa como calmante y purgante (Cerón, 2002).

Por tales razones y basándonos en este contexto, el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja está desarrollando un estudio fitoquímico de algunas especies del género *Piper* que se encuentran en la región Sur de Ecuador, principalmente en Loja y Zamora Chinchipe.

Es por esto que la finalidad del proyecto: “Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios de la especie *Piper umbellatum* L”, consiste en extraer e identificar compuestos con posible actividad terapéutica que permitan el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. 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 (Célis et al., 2008).

Hoy en día, Ecuador es considerado uno de los países poseedores de la más alta biodiversidad en el mundo y donde la población mantiene sus costumbres ancestrales en el uso de remedios ancestrales. Loja y Zamora Chinchipe son dos provincias del sur del Ecuador con una biodiversidad abundante y una tradición etnobotánica rica (Tene et al., 2007).

Una revisión de la composición química del género *Piper*, agrupa en general a sus metabolitos secundarios, en siete clases: amidas, lignanos, neolignanos, flavonoides, alcaloides y aceites esenciales entre otros. La investigación de los metabolitos secundarios del género *Piper* ha sido intensificada en los últimos años porque fitoquímicamente varias especies han mostrado una interesante actividad biológica (Sengupta & Ray, 1987; Parmar et al., 1997; Delgado et al., 2007; Ninoska, 2009).

Anteriores estudios fitoquímicos de *Piper umbellatum* L. han demostrado la presencia de terpenos, alcaloides, flavonoides, esteroides y otras clases de metabolitos secundarios. (Parmar et al., 1997). Los extractos y compuestos puros derivados de *P. umbellatum* L. muestran un amplio espectro de actividades farmacológicas incluyendo anti-inflamatorio, analgésico, antioxidante y citotóxica (Tchoumboungang et al., 2009).

La *Piper umbellatum* L. conocida en la amazonia brasileña como “Caapeba” forma parte de un grupo de plantas medicinales que la “Central de Medicamentos” (CEME) de Brasil, está validando mediante pruebas farmacológicas preclínicas y clínicas, por su importante acción antiinflamatorio, antimálaricas, antiálgico, diurético, emético, febrífugo, además también para dolores musculares, cefaleas y dolores gastrointestinales (Vega, 2001).

1.2. Generalidades de la Familia Piperaceae.

Se conoce la familia Piperaceae desde la antigüedad como una de las familias más grandes e importantes, comprende 14 géneros y cerca de 3600 especies, de las cuales 700 corresponden al género *Piper* y 600 al género *Peperomia* (Quijano, Callejas & Miranda, 2006; Wanke et al., 2007).

La importancia de los compuestos químicos aislados en Piperaceae es notable, por ejemplo, el interés de los lignoides (lignanós, neolignanós y sustancias relacionadas) se debe a su amplia diversidad de actividades biológicas: antitumorales, antifúngicas, bactericidas, anti HIV (Ayres & Loike, 1990), así como las amidas, con destacado potencial como agentes insecticidas y fungicidas (Dyer & Palmer, 2004).

1.2.1. Descripción del género *Piper*.

Las especies del género *Piper*, se caracterizan por tener hojas alternas; inflorescencias opuestas, raramente axilares, simples o compuestas; bráctea floral deltoide, triangular, ocasionalmente lisa, brillante; flores densamente agrupadas sobre el eje vertical; anteras dehiscentes en un plano vertical, horizontal u oblicuo; pistilo de 3-5 carpelos, fruto liso, estiloso, deprimido o truncado (Calle, 1999).

La química de las especies de este género ha sido ampliamente investigada a nivel mundial. Los resultados encontrados han permitido reconocer al género *Piper* como el más bioactivo de la familia Piperaceae por haber identificado una serie de compuestos biológicamente activos como: alcaloides, amidas, lignanos, neolignanós, terpenos, esteroides, chalconas, flavonas y flavanonas (Parmar et al., 1997; López et al., 2010).

Las especies del género *Piper* tienen importancia comercial, económica y medicinal. Por ejemplo las semillas de *Piper nigrum* constituyen la conocida "pimienta negra", utilizada como condimento en la preparación de alimentos. Otras especies son consideradas remedios para el dolor de estómago, para aliviar dolores de pecho, fiebre y afecciones hemorroides, como antiinflamatorio, en el tratamiento del asma, bronquitis; igualmente se les reconocen actividad insecticida y fungicida (Keller et al., 1963; Morton, 1981; De la Rúa, 1999; Parmar et al., 1997).

Las especies del género *Piper* presentan 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 (García, 1992; Celis et al., 2008).

1.2.2. Descripción botánica de la especie *Piper umbellatum* L.

Comúnmente conocida como Santa María o Cordoncillo habita principalmente en bosques de tierras bajas y matorrales húmedos. Es un arbusto de un metro de alto, con hojas anchas acorazonadas de 20 a 30 cm en la base abierta y cordiforme. Las inflorescencias son como espigas carnosas y blandas, posición axilar con numerosas flores blanquecinas, la cual habita principalmente en la Amazonía a una altitud de 1000 a 2000 msnm. La planta es ligeramente aromática, es perenne además florece y fructifica durante todo el año. Los beneficios que ofrece esta especie son tradicionalmente conocidas por los habitantes de Zamora Chinchipe y Loja (Standley & Steyermark, 1952; De la Torre et al., 2008).

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la especie *Piper umbellatum* L.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	<i>Piper</i>
Especie	<i>umbellatum</i>
Nombre Científico	<i>Piper umbellatum</i> L.

Fuente: Instituto de Biología (UNAM), 2013.

En la **figura 1** se indica la especie vegetal de *P. umbellatum* L. en el lugar de recolección.



Figura 1. *Piper umbellatum* L.

Fuente: La autora

1.2.3. Usos medicinales.

Es usado en trastornos del aparato digestivo como dolor de estómago o espasmo, falta de apetito y estreñimiento. Las hojas son la parte de la planta más empleada. En el caso de quemaduras, se hierven las hojas se moja un lienzo para colocar en la parte doliente. Para bajar la fiebre se da un baño con el agua donde se hirvieron las hojas. Para las diarreas, dolor e inflamación de estómago, las hojas soasadas con aceite se colocan sobre el vientre. En problemas de bronquitis y tos, se da el jugo de las hojas y cogollos soasados. Para el espanto se da una ramedada a la persona que lo tiene, se utiliza también en ceremonias. Su uso también se indica en enfermedades como asma, laringitis, reumatismo (reumas), en llagas, riñones, inflamaciones, dolores musculares y cólicos (Vasilev,1969; Barrera,1971; Alejandre,1988; Calatayud,1990; Villamil & Avendaño, 1992; Noumi & Yomi, 2001; Roersch, 2010).

En algunos países la *P. umbellatum* L. se utiliza como un vegetal o condimentos (hojas jóvenes e inflorescencias se comen crudos, cocidos o vapor) en la dieta diaria de las personas. En Asia tropical, los frutos se comen como un manjar (Schmelzer, 2001). En Ecuador los Shuar utilizan como condimentos o en ceremonias (Pohle y Reinhardt, 2004). El valor nutricional y contenido de minerales de *P. umbellatum* L. (hojas) son los siguientes: ácido ascórbico 181mg/100g MS, hidratos de carbono 3,8 g/100g MS, proteína 3,9 g/100g MS, humedad 80 %, fibra 2,2 g/100g MS y minerales como: calcio 2,36; potasio 4,1; Magnesio 0,88; sodio 0,12; hierro 0,05 mg/100 g (Mensah et al., 2008).

1.3. Los metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas están involucrados en una multitud de interacciones ecológicas, entre ellas las interacciones planta-planta, planta-microorganismos, planta-animales y planta-insectos, los metabolitos secundarios proveen protección contra condiciones abióticas adversas (Kutchan, 1995).

Los metabolitos secundarios también ayudan a las plantas a protegerlas de algunos patógenos. Dadas sus características medicinales e industriales, dichos metabolitos también son de gran importancia para el ser humano. Sin embargo, el estudio de estos compuestos en plantas tropicales a nivel bioquímico, molecular y genético, es aún limitado. Los metabolitos secundarios son compuestos que, sin ser esenciales para la supervivencia de células individuales, tienen un papel importante en la vida y supervivencia del organismo en su entorno ecológico (Walton et al., 1999). Las plantas han desarrollado vías complejas para la biosíntesis de metabolitos secundarios. En la actualidad se conocen más de 100.000 compuestos secundarios (Goossens et al., 2003).

1.3.1. Lignanos y Neolignanos.

Los lignanos y neolignanos hacen parte de los metabolitos secundarios representativos del género *Piper*. Se derivan de la ruta biosintética del ácido shikímico (Figura 2) y relacionados con la formación de la lignina en las plantas. La diferencia entre lignanos y neolignanos es que los primeros se constituyen por la unión de dos o más unidades fenilpropánicas a través de los carbonos β y β' de la cadena lateral, mientras que los neolignanos poseen estas mismas unidades fenilpropánicas (C6-C3) provenientes de alil y/o propenilfenoles pero con una unión distinta a β y β' (García, 2006). En ambos casos es característico que tanto los anillos aromáticos como las cadenas propánicas presenten funciones oxigenadas. Estas moléculas se pueden encontrar en cualquier parte de la planta desde las raíces o la corteza hasta las hojas, flores, frutos o semillas. Son abundantes en las semillas de soya, aceitunas, algas secas, legumbres, cereales, verduras y frutas.

La importancia de este tipo de compuestos se debe a su acción sobre microorganismos, plantas, animales y en el hombre en los aspectos ecológico, farmacológico, celular y molecular, siendo de especial relevancia su actividad citotóxica y antitumoral (Rukachaisirikul et al., 2004).

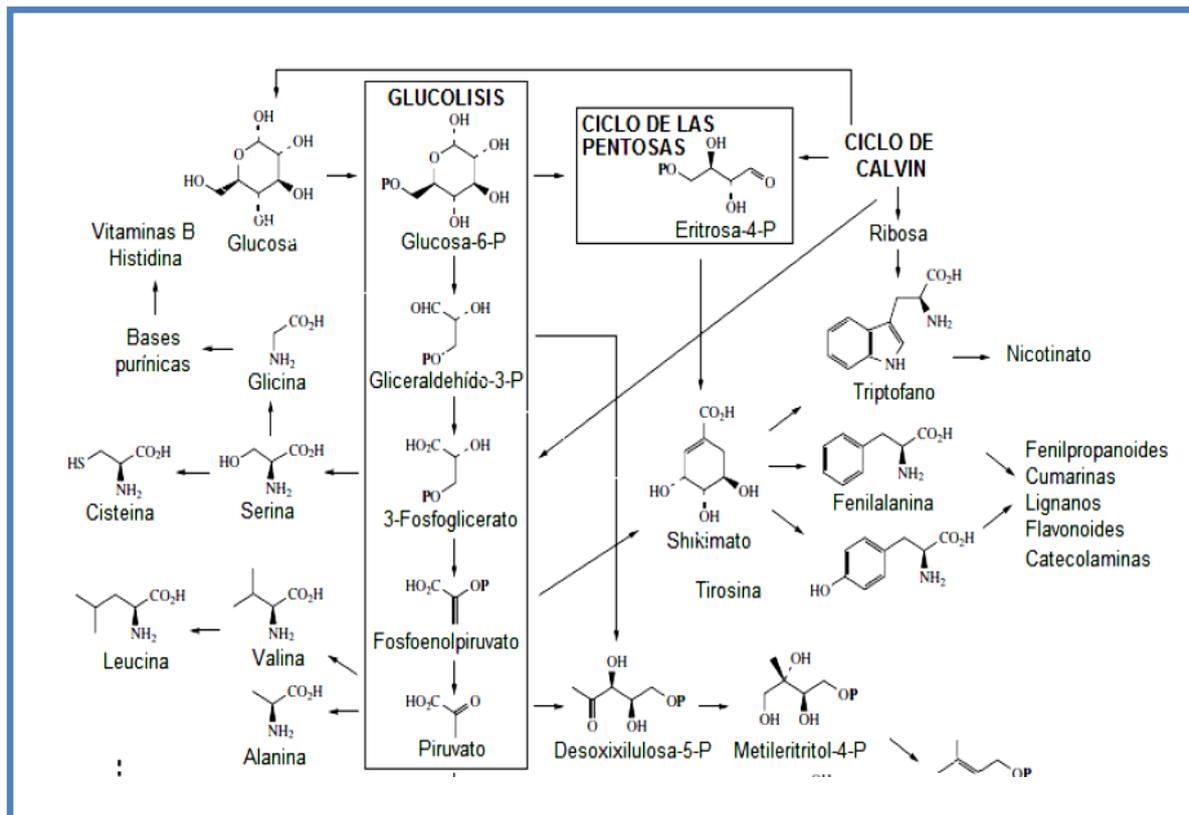


Figura 2. Ruta de formación de lignanos y neolignanos.

Fuente: Dewick, 2001.

1.4. Cromatografía.

La cromatografía es uno de los principales métodos para la separación de compuestos estrechamente relacionados en mezclas complejas. La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil, esta separación se puede realizar en función de sus cargas, masas, tamaños moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox.

En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve en una fase móvil, que puede ser un gas un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmiscible, la cual se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con más fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo; por el contrario los componentes que unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez (Jhonson & Pasto, 1977).

1.4.1. Cromatografía de Capa Fina.

Es una forma fácil, rápida y ampliamente utilizada para el análisis y aislamiento de compuestos. Se aplica la muestra sobre un soporte activado que recubre una lámina de aluminio o plástica. La placa se eluye dentro de una cámara de elución, que asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades lo que provoca su separación, luego se seca completamente y se observan las manchas separadas, con luz ultravioleta (UV) a diferentes longitudes de onda y también se emplean reveladores específicos que reaccionan con los compuestos dando coloraciones características. La relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen se conoce como R_f el cual es un factor de cuantificación (Jhonson & Pasto, 1977; Douglas, 2001).

1.4.2. Cromatografía en Columna.

La cromatografía en columna es quizás el método más general, utilizado para la separación, a la vez que para la purificación, de diferentes compuestos orgánicos que se encuentren en estado sólido o líquido.

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria utilizada, es decir, el absorbente, se coloca en el interior de una columna de vidrio, la cual finaliza con una llave para controlar el paso de sustancias al exterior de la columna. La fase estacionaria se impregna con el eluyente o fase móvil. Seguidamente la mezcla orgánica que nos interesa separar la depositamos por la parte superior de la fase estacionaria, y así la fase móvil podrá ir atravesando el sistema. Los compuestos que se encuentran disueltos en la fase móvil, poco a poco saldrán de la columna cromatografía, y se recogen en fracciones. Las fracciones menos polares, que son por lo general las que se retienen poco o nada en el absorbente, serán las primeras en salir de la columna. En cambio, las sustancias más polares, quedan retenidas por más tiempo en el absorbente, y a menudo es necesario el uso de diferentes disolventes con la finalidad de incrementar su polaridad para que sean arrastradas por estos. El adsorbente más utilizado para cromatografía de columna es gel de sílice (Méndez, 2011).

1.4.3. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas.

Se describe la cromatografía de gases y su acoplamiento con la espectrometría de masas, técnicas que constituyen una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas (Gutiérrez, 2000).

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual (Gutiérrez, 2000).

1.5. Resonancia Magnética Nuclear.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es un fenómeno físico por el que núcleos atómicos situados bajo la influencia de un campo magnético exterior de intensidad determinada absorben selectivamente energía del rango de radiofrecuencias pasando a un estado excitado. Al cesar el aporte energético externo, estos mismos núcleos devuelven la energía absorbida para regresar a su situación de equilibrio termodinámico, en un proceso de relajación que puede ser captado, medido y cuantificado permitiendo la identificación de la molécula donde se ubican pues la liberación ocurre de forma característica según el tipo de átomos que los rodean y los enlaces establecidos con esos átomos.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es, por lo tanto, una técnica instrumental no destructiva que permite el análisis de compuestos orgánicos y algunos inorgánicos. Por medio de ella se puede deducir la identidad de la gran mayoría de compuestos orgánicos conocidos y desconocidos. Tan sólo se necesitan unos cuantos miligramos de sustancia para realizar un análisis. Por su versatilidad y la riqueza de la información que produce, es la técnica más usada en la identificación de nuevos compuestos orgánicos (James, 1998).

1.6. Actividad antifúngica.

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de alterar las estructuras de una célula fúngica, modificando su viabilidad o capacidad de supervivencia y por lo tanto inhibiendo su desarrollo directa o indirectamente (Gregori, 2005).

1.6.1. Dermatofitosis

La dermatofitosis o tiñas (*Tinea*) son micosis superficiales de gran importancia y pueden afectar a la piel, cabello y uñas. Estos hongos son patógenos primarios que poseen queratinasas lo que les permite utilizar la queratina de esas estructuras como fuente de nitrógeno. Existen tres géneros que se distinguen por las características morfológicas de sus macroconidios: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* (Nistal & Del Pozo.,2005). Las dermatofitosis son las micosis más comunes a nivel mundial, y según la topografía se clasifican en tiña de la cabeza, tiña del cuerpo, tiña de la mano, tiña de los pies, tiña de la ingle, tiña del área del pañal y tiña de las uñas (Winn et al.,2008). Las dermatofitosis son infecciones superficiales muy frecuentes, actualmente constituyen del 70 al 80% de todas las micosis (Arenas, 2001).

1.6.1.1. *Trichophyton rubrum*.

Es un hongo filamentoso con microconidios piriformes, sésiles sobre las hifas formando racimos, se caracteriza por que forman colonias planas que carecen de micelio aéreo, y semejan polvo de azúcar (Crespo, 2008). 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, 2007). (Figura 3 a)

1.6.1.2. *Trichophyton mentagrophytes*.

Se caracteriza por presentar un crecimiento relativamente rápido. Presentan dos tipos de colonias: algodonosas o granulares. Las variantes algodonosas son inicialmente blancas, pero pueden tornarse de color crema o acre con la madurez. Las variantes granulares producen colonias planas que se diseminan con una superficie granular gruesa (Hernández, 2005). (Figura 3 b).

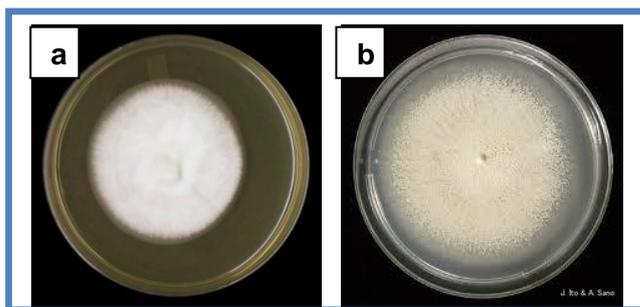


Figura 3. Dermatofitos: **a)** *Trichophyton rubrum*; **b)** *Trichophyton mentagrophytes*.

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo la presente investigación se realizó la siguiente metodología:

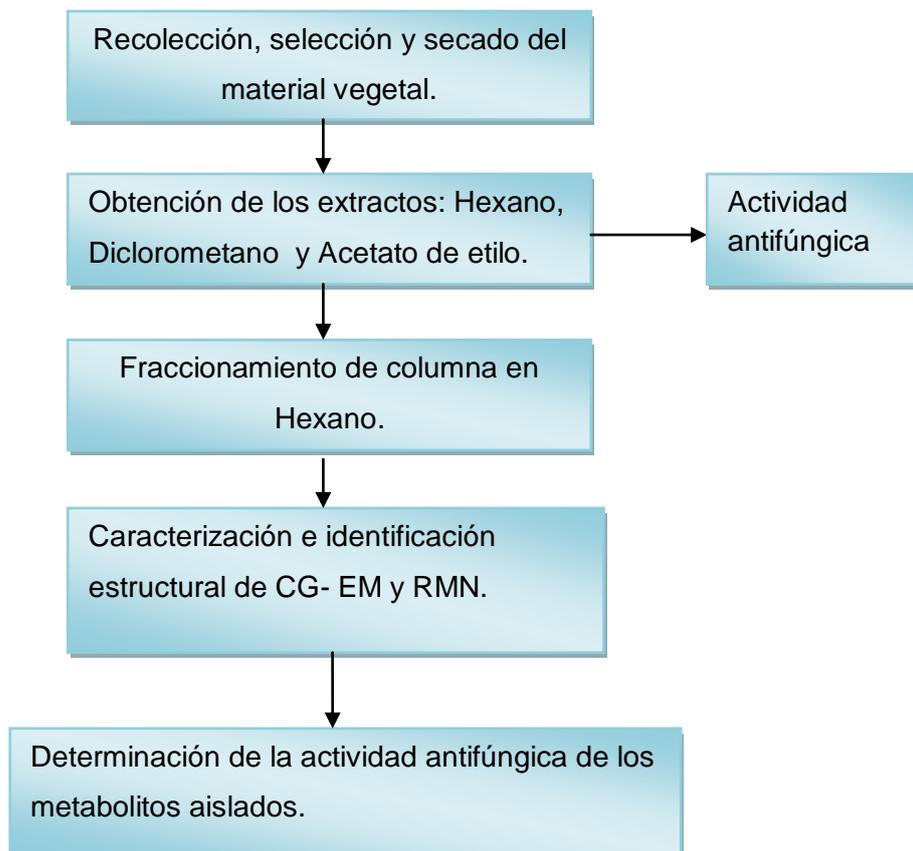


Figura 4. Esquema del desarrollo de la investigación.

Elaboración: La autora.

2.1. Recolección del material vegetal.

Se recolectó la muestra vegetal en estado de floración de *P. umbellatum* L, en octubre 2012 en la Provincia de Zamora Chinchipe, en el lugar conocido como la “Y” del Barrio Numbami. El sector de recolección se encuentra ubicado en las coordenadas 728041E, 9540124N a 1161 m s.n.m. Su identificación taxonómica la realizó Fanny Tinitana curadora del Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2. Obtención de los extractos.

El material vegetal recolectado fue seleccionado y secado a 32°C por 8 días. A partir de 300g de material seco y triturado se procedió a realizar maceración dinámica por 5 minutos y maceración estática por 55 minutos, por tres veces consecutivas en disolventes diferentes tales como: Hex, CH₂Cl₂, AcOEt. Posteriormente los extractos se filtraron al vacío, se

concentraron a presión reducida y a temperatura moderada de 30 a 35°C en el equipo rota-
evaporador hasta obtener un extracto completamente seco libre de disolvente.

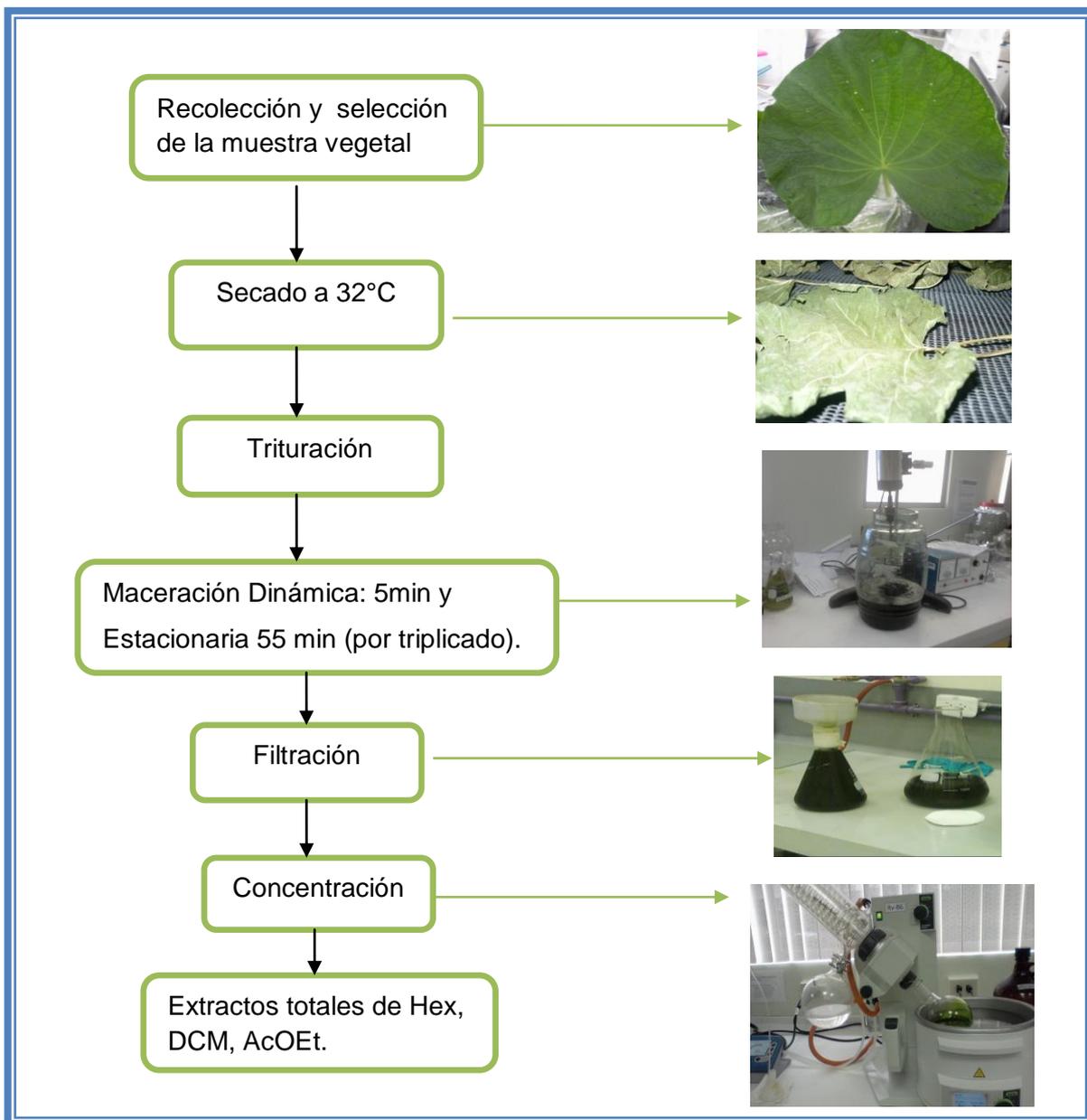


Figura 5. Procedimiento para la obtención de los extractos.

Elaboración: La autora

2.3. Análisis de los extractos.

Luego de obtener los tres extractos en Hex, DCM y AcOEt, se realizó TLC de cada extracto utilizando placas de sílice gel 60 F₂₅₄ fase directa y sílice gel RP₁₈ fase inversa, en

diferentes polaridades. Luego se observó cual de los tres extractos presentaba mayor riqueza y mejor separación de los compuestos. Finalmente con los resultados obtenidos se decidió optar por el extracto de hexano, ya que este presento a más de una gran riqueza en compuestos también buena actividad antifúngica.

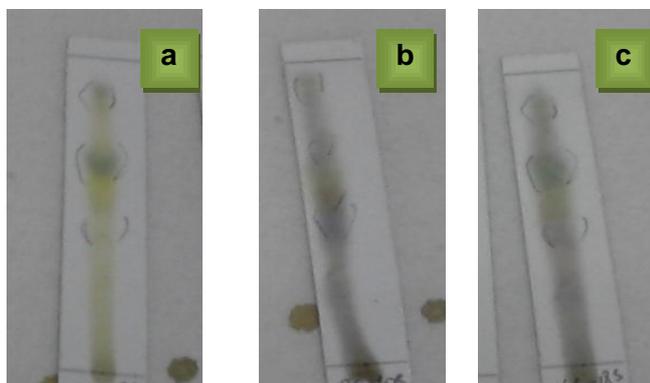


Figura 6. Placas de silica gel TLC fase directa de los extractos totales de *P. umbellatum* L. **a)** hexano; **b)** diclorometano; **c)** acetato de etilo.

Elaboración: La autora

2.4. Fraccionamiento en Cromatografía en Columna.

Para el fraccionamiento de la columna se utilizo 5g del extracto total de hexano, empleando como fase estacionaria silica gel fase directa (Merck 0.015-0040 mm), en una relación extracto-silica gel 1:50 (5g de extracto y 250g de silica gel) y como fase móvil disolventes de polaridades crecientes como lo es: Hexano 100%, Hex – AcOEt, AcOEt – MeOH, hasta llegar a MeOH 100%. Se tomó un volumen de 200ml por cada fracción eluída, la concentración de estas se llevo a cabo en una cabina de flujo laminar.

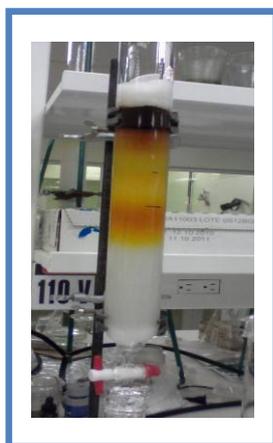


Figura 7. Cromatografía en columna del extracto de hexano.

Elaboración: La autora

2.5. Cromatografía de Capa Fina.

El análisis de las fracciones obtenidas se realizó mediante ensayos en cromatografía de capa fina (TLC), donde se utilizó placas de sílice gel 60 F₂₅₄. Los disolventes utilizados para la fase móvil fueron Hex-AcOEt relación 1:1; 4:1 y 7:3 mientras que AcOEt-MeOH relación 1:1 y 7:3 los cuales permitieron la separación e identificación de los compuestos. La visualización posterior se la realizó con una lámpara de luz ultravioleta 254 y 365 nm.

2.6. Unión y Purificación de fracciones.

Se obtuvo un total de 195 fracciones. La unión de estas se efectuó en relación a la altura de las manchas y la similitud visual que estas reflejaron ante la luz ultravioleta a una longitud de 254 y 365 nm, además se confirmó estos resultados utilizando un revelador como lo es el ácido sulfúrico al 5% y Vainillina. (Anexo1).

Las fracciones que cristalizaron, fueron sometidas a un proceso de purificación: fracción 27 fue lavada con MeOH y AcOEt, fracción 30 fue purificada con Hexano y AcOEt.

2.7. Caracterización Química de las fracciones.

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

2.7.1. Factor de retención (Rf).

Se utiliza para determinar la migración del soluto, se establece por la distancia que recorre un compuesto desde el punto de aplicación y la distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente (Figura 8), se hace la relación distancia recorrida por el compuesto/distancia recorrida por el disolvente a lo largo de la placa.

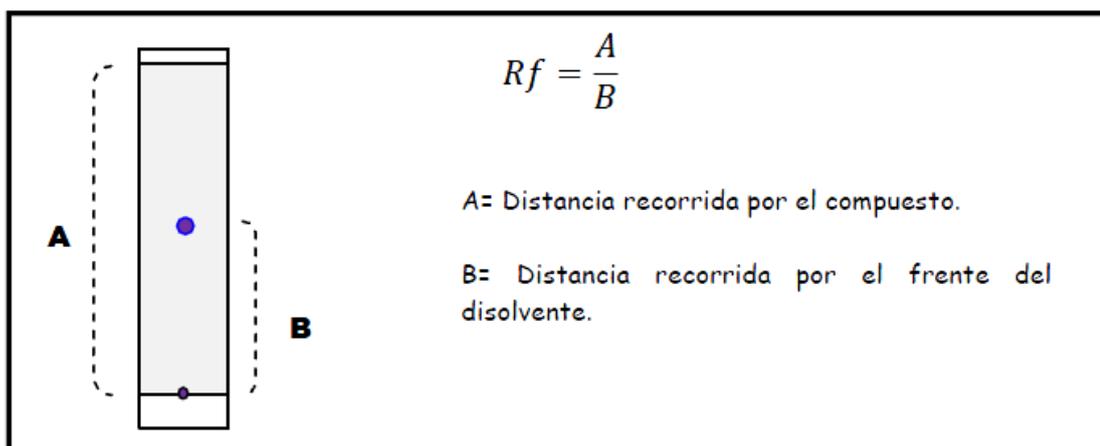


Figura 8. Medidas del Factor de retención (Rf).

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

2.7.2. Punto de fusión (Pf).

Para determinar el punto de fusión se calentó lentamente una pequeña cantidad de las fracciones, el equipo que se empleo fue Fisher-Johns- Melting Point Apparatus serial 40-22 de 50-60Hz (figura 9), seguidamente se registro los intervalos de 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.

2.7.3. Solubilidad.

Los disolventes empleados para determinar la solubilidad de los compuestos fueron: hexano, acetato de etilo, acetona, metanol y diclorometano.

2.8. Identificación de los compuestos aislados.

2.8.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C fueron obtenidos en un equipo Varian N° de serie 400-54 ASC operando a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , usando cloroformo deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm (δ), y las constantes de acoplamiento se expresaron en Hz.

2.8.2. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.

La identificación de los compuestos aislados de la especie *P. umbellatum* L. por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM) se hizo mediante 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. Las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil –metilpolisiloxano).

Tabla 2. Características de las columnas capilares que se usaron para las inyecciones cromatográficas.

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

Fuente: Fielquimec©, 2012.

2.9. Determinación de la actividad antifúngica.

2.9.1. Método de Microdilución en Caldo: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Fundamento:

Es un método de cultivo líquido al cual se le agrega un estándar fúngico y es inoculado dentro de los pocillos de una microplaca (llamada TC96, porque contiene 96 pocillos) que contienen diferentes diluciones del extracto o muestra a ensayar para determinar concentraciones decrecientes inhibitorias en caldo.

Este método define la menor concentración del extracto o muestra necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de prueba (Willey & Sons, 2005).

2.9.2. Microorganismos de prueba.

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

2.9.3. Preparación de las muestras.

Para disolver los extractos orgánicos (Hex, DCM, AcOEt) y las fracciones (27 y 30) para las pruebas de Microdilución en Caldo se utilizó 20 mg del extracto orgánico diluido en 1000 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). En el caso de las fracciones, se utilizó únicamente 1mg de muestra diluido en 500µL de Dimetilsulfóxido (DMSO).

2.9.4. Preparación de la suspensión de los inóculos para hongos.

Se preparó la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80 °C. Para *T. mentagrophytes* ATCC® 28185 tomamos 49µL diluidos en 7mL de Caldo Sabouraud y de *T. rubrum* se tomó 68µL diluidos en 7mL de Caldo Sabouraud respectivamente. De esta suspensión se usó 100 µL para completar a 200 µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL. Las condiciones de cultivo de las cepas empleadas se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación para las cepas de hongos.

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

Fuente: Willey & Sons, 2005.

2.9.5. Ensayo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en hongos.

Para este ensayo se preparó una disolución de 20mg de extracto por 1000 μL de DMSO y 1mg compuesto de interés por 500 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO), una vez preparada esta solución se empleo en las microplacas de 96 pocillos (figura 10) utilizando el procedimiento doble seriado del siguiente modo: colocamos 180 μL de caldo Sabouraud al primer pocillo y 100 μL a todos los demás pocillos restantes, luego se adicionó 20 μL de la disolución del extracto o compuesto según sea el caso y se mezcló, luego se realizan diluciones seriadas tomando 100 μL del primer pocillo y diluyendo con 100 μL del pocillo siguiente, este procedimiento se realiza hasta obtener 8 diluciones consecutivas y los 100 μL restantes se desechan. Se siguió el mismo procedimiento para el control negativo (180 μL caldo sabouraud + 20 μL DMSO) y para el control positivo (180 μL caldo + 20 μL itraconazol), menos para el control de esterilidad (200 μL caldo sabouraud).

Luego de preparada la placa se inocularon todas las columnas con 100 μL de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando un volumen final de 200 μL en la placa de cultivo, de esta manera se ajustó la población fúngica final del inóculo a 5×10^4 esporas/mL. Luego se sellaron las placas y se incubaron a 30°C, se registraron los resultados luego de 72 horas.

La lectura de la CIM se realizó de manera visual y microscópicamente. Se define como la menor concentración del extracto o compuesto prueba necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de prueba (Willey & Sons, 2005).

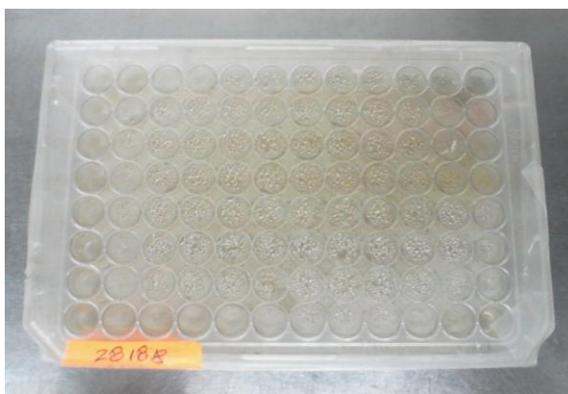


Figura 10. Microplaca TC96, con 12 columnas y 8 filas (A-H).

Elaboración: La autora.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extractos obtenidos de la especie *Piper umbellatum* L.

En la tabla 4 se describe el peso y rendimiento de los extractos de Hex, DCM y AcOEt a partir de 300g de muestra vegetal seca.

Tabla 4. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de la *P. umbellatum* L.

Extracto	Peso final (g)	Rendimiento (%)
Extracto total de Hexano	19.41	6.47
Extracto total de CH ₂ Cl ₂	22.5	7.5
Extracto total de AcOEt	14.48	4.82

Elaboración: La autora

3.2. Compuestos aislados de la especie *Piper umbellatum* L.

A partir de la cromatografía en columna del extracto total de Hexano se obtuvieron 195 fracciones. De estas, las fracciones 26-28 y 30-31 presentan formación de cristales.

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

Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de Hexano.

Fracciones	Proporciones	Mezcla de disolventes	Apariencia física
1-12	100	HEx-AcEOt	Aceitosa
13-19	95:5	HEx-AcEOt	Aceitosa
20-25	90:10	HEx-AcEOt	Aceitosa
26-28	90:10	HEx-AcEOt	Cristales
29	90:10	HEx-AcEOt	Aceitosa
30-31	85:15	HEx-AcEOt	Cristales
32-41	85:15	HEx-AcEOt	Sólido
42-51	80:20	HEx-AcEOt	Sólido

52-60	75:25	HEx-AcEOt	Sólido
61-70	70:30	HEx-AcEOt	Sólido
71-79	65:35	HEx-AcEOt	Sólido
80-86	60:40	HEx-AcEOt	Sólido
87-90	55:45	HEx-AcEOt	Sólido
91-97	50:50	HEx-AcEOt	Sólido
98-103	45:55	HEx-AcEOt	Sólido
104-109	40:60	HEx-AcEOt	Sólido
110-114	35:65	HEx-AcEOt	Sólido
115-119	30:70	HEx-AcEOt	Sólido
120-125	25:75	HEx-AcEOt	Sólido
126-129	20:80	HEx-AcEOt	Sólido
130-135	15:85	HEx-AcEOt	Sólido
136-139	10:90	HEx-AcEOt	Sólido
140-145	5:95	HEx-AcEOt	Sólido
146-150	100	AcEOt	Sólido
151-152	95:5	AcEOt-MeOH	Sólido
153-157	90:10	AcEOt-MeOH	Sólido
158-161	85:15	AcEOt-MeOH	Sólido
162-165	80:20	AcEOt-MeOH	Sólido
166-168	75:25	AcEOt-MeOH	Sólido
169-171	70:30	AcEOt-MeOH	Sólido
172-174	65:35	AcEOt-MeOH	Sólido
175-176	60:40	AcEOt-MeOH	Sólido
177-178	55:45	AcEOt-MeOH	Sólido
179-181	50:50	AcEOt-MeOH	Sólido
182-183	45:55	AcEOt-MeOH	Sólido
184-185	40:60	AcEOt-MeOH	Sólido
186-187	35:65	AcEOt-MeOH	Sólido
188-189	30:70	AcEOt-MeOH	Sólido
190	25:75	AcEOt-MeOH	Sólido
191	20:80	AcEOt-MeOH	Sólido
192	15:85	AcEOt-MeOH	Sólido

193	10:90	AcEOt-MeOH	Sólido
194	5:95	AcEOt-MeOH	Sólido
195	100	MeOH	Sólido

Elaboración: La autora.

3.3. Compuesto 1: Fracción 27, fitosteroles.

Fue obtenido en Hex-AcOEt proporción 90:10 luego fue purificado con metanol único disolvente que no los disuelve, tiene un factor de retención (Rf) de 0,7. En cromatografía de capa fina no fue visible en la luz UV de 254 y 365nm, pero al ser revelada con ácido sulfúrico 5% y vainillina presentaba una sola mancha de color violeta (figura 11). Su peso total fue de 15mg. Sus características físicas se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Propiedades físicas de la fracción 27.

Propiedades físicas	
Aspecto	Cristales
Color	Blancos
Punto de fusión	135 - 138°C
No soluble	Metanol
Soluble	AcOEt, Hex, CH ₂ Cl ₂ .

Elaboración: La autora.

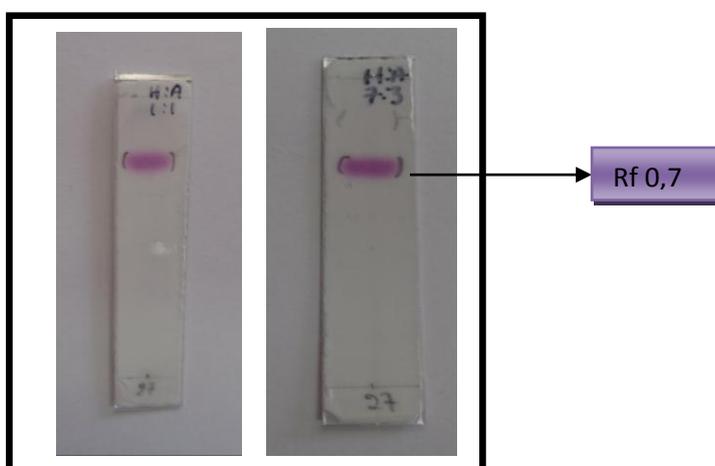


Figura 11. TLC de la fracción 27 en Hex - AcOEt 1:1 y 7:3 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina.

Elaboración: La autora.

3.3.1. Interpretación del espectro de Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM).

Según la base de datos del equipo del espectro CG-EM, indica que en la fracción 27, con una probabilidad del 95% se encuentra el β -sitosterol, el 99% campesterol y el 97% stigmasta-5,22-dien-3-ol (Figura 12).

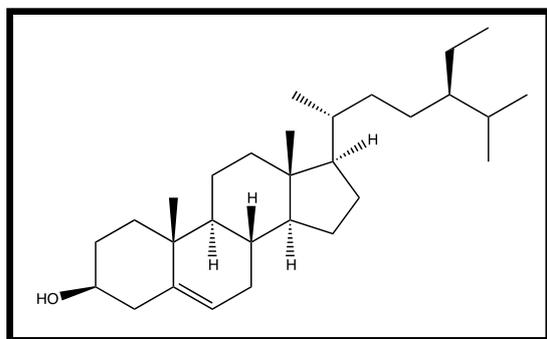
Para el campesterol se obtuvo un tiempo de retención de 29,32 minutos, con un porcentaje de área relativo de 3,50% y un pico de ion molecular de 400m/z. Seguidamente el stigmasta-5,22-dien-3-ol, con un tiempo de retención de 30,21 minutos, con un área relativo de 3,00% y un pico de ion molecular de 412. En el caso del β -sitosterol, el tiempo de retención fue de 32,45 minutos, el porcentaje de área relativa de 13,01% y el pico de ion molecular de 414m/z (Anexo 2).

Los espectros de masas presentaron picos de ion molecular a 414, 412 y 400m/z, que son compatibles con las fórmulas moleculares, $C_{28}H_{48}O$ del campesterol (Anexo 3), $C_{29}H_{48}O$ del stigmasta-5,22-dien-3-ol (Anexo 4) y $C_{29}H_{50}O$ del β -sitosterol (Anexo 5). Todos estos datos fueron comparados con la base de datos NIST (2010) y se encuentra acordes con los datos de mezclas de esteroides comúnmente encontradas en plantas ya conocidas en la literatura (Andrade, 2003).

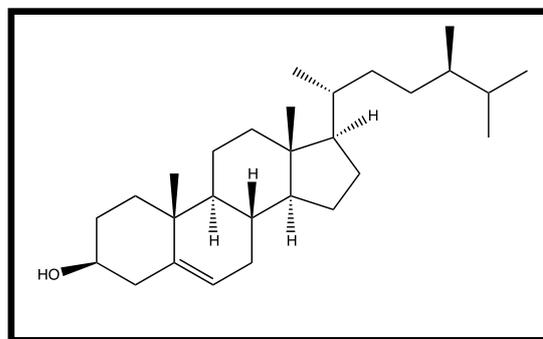
Es importante mencionar que es muy difícil identificar al stigmasta-5,22-dien-3-ol, β -sitosterol, y campesterol, cuando se encuentran juntos en una misma fracción, mediante la Resonancia Magnética Nuclear ya que los tres compuestos poseen el mismo núcleo esferoidal, de tipo 5-3-3 hidroxianosteno (Martinez,2001). Pero al no ser posible obtenerlos en estado puro, la Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de Masas es un método válido para identificarlos (Parra, 2011).

En las plantas superiores se encuentran principalmente los denominados fitosteroles: β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Harborne & Willams, 2000). Los esteroides se derivan biogenéticamente 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 en un estudio realizado en el Departamento de Química de la UTPL se aisló e identificó la misma mezcla esteroideal en *P. pseudochurumayu* (Chamba, 2012), *P. asperiusculum* (Chuquimarca, 2013), *P. peltatum* (Vidal, 2013). Los estudios anteriores descritos indican que es frecuente encontrar resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

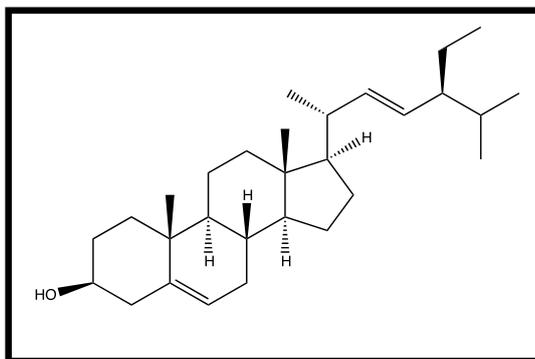
La mayoría de los fitosteroles no se les conocen actividad biológicas específicas en la naturaleza excepto como componentes de las membranas celulares. Se han reportado diversas propiedades terapéuticas al ser ingeridos en determinadas dosis, entre ellas la reducción del colesterol sérico, inhibición del crecimiento en células de cáncer, actividad antiinflamatoria, antipirética, liberación de insulina (Garibello, 2010).



a) β -sitosterol



b) Campesterol



c) Estigmasterol (Stigmasta-5,22-dien-3-ol).

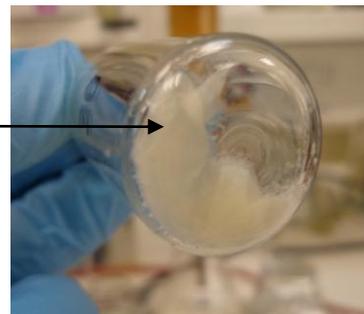
Figura 12. Estructura química de los compuestos identificados en la fracción 27.

3.4. Compuesto 2: fracción 30; (3-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol.

Fue obtenido en Hex-AcOEt proporción 85:15 luego fue purificado con Hexano único disolvente que no los disuelve, tiene un factor de retención (R_f) de 0,5. En cromatografía de capa fina se observó en la luz UV de 254 y 365nm una sola mancha sin color, pero luego al ser revelada con ácido sulfúrico 5% y vainillina presentaba una mancha de color anaranjado (figura 13). Su peso total es de 32.9mg. Sus características físicas se presentan a continuación en la tabla 7.

Tabla 7. Propiedades físicas de la fracción 30.

Propiedades físicas	
Aspecto	Cristales, apariencia de agujas.
Color	Blancos
Punto de fusión	118 - 119°C
No soluble	Hexano
Soluble	AcOEt, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ .



Elaboración: La autora

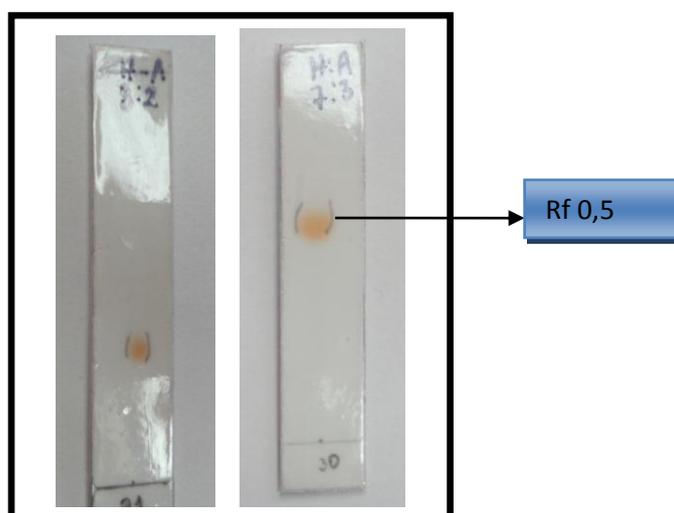


Figura 13. TLC de la fracción 30 en Hex - AcOEt 8:2 y 7:3 luego de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina.

Elaboración: La autora.

3.4.1. Resultados de CG-EM y RMN de la fracción 30.

Según la base de datos del equipo de Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas, indica que la fracción 30 tuvo un tiempo de retención de 28.38 minutos (Anexo 6).

El análisis de RMN de ¹³C fue realizado a 100 MHz, indicó la presencia de 10 átomos de carbono incluyendo un grupo hidroxilo. Hipotizamos un compuesto de tipo neolignano que tiene una fórmula molecular de C₁₀H₁₀O₄ y peso molecular 194g/mol.

Los datos espectrales de RMN de ¹³C y ¹H se muestran a continuación (Anexo 7, 8).

¹H-RMN: (400 MHz, Chloroform-d): δ ppm 6.92-6.69 (m, 3H) 5.85 (s, 2H) 4.79-4.62 (m, 1H) 4.31-4.16 (m, 2H) 3.98-3.78 (m, 1H) 3.11-2.99 (dddd, J=60.47, 39.30 Hz, 1H) ppm.

¹³C-RMN: (100 MHz, Chloroform-d): δ ppm 148.11, 147.25, 135.19, 119.50, 108.33, 106.63, 101.21, 85.93, 71.85, 54.47 ppm.

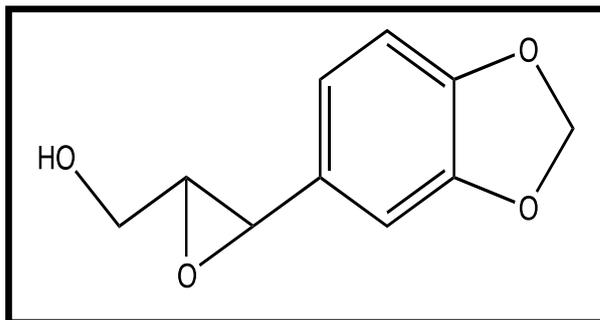


Figura 14. Estructura química del compuesto de tipo Neolignano (3 - (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol.

Elaboración: La autora.

Es la primera vez que se obtiene el aislamiento de este compuesto de tipo neolignano en *P. umbellatum* L. no se reporta en literatura.

Referencias bibliográficas mencionan que en *P. kadsura* se encontró un neolignano benzofurano con actividad antineuroinflamatoria (Hyun et al., 2010; Dong Kug Choi et al., 2011).

Se reportan actividades citotóxicas en neolignanos del tipo arilpropanoides y compuestos estructuralmente relacionados. Aquellos compuestos que poseen una fuerte actividad antifúngica presentaran paralelamente una importante actividad citotóxica, ambas comparables a las que mostraron anfotericina B y ketoconazol. Los resultados indican que el verdadero rol de los arilpropanoides actuando como compuestos antifúngicos podría estar limitado a un uso tópico. La fuerte actividad antifúngica y el novedoso mecanismo de acción de estos neolignanos fenilpropanoides abren la posibilidad de una promisorio utilización en el campo farmacéutico (Carrasco et al., 2013).

3.5. Determinación de la actividad antifúngica de los extractos totales y compuestos.

Los valores del Método de Microdilución en Caldo (CMI) obtenidos de los extractos y compuestos se encuentran en la tabla 8. Se considera que si los extractos o compuestos presenta una CMI <100µg/mL la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a 500µg/mL moderada, de 500 a 1000µg/mL mala, y >1000µg/mL nula. (Holetz et al., 2002).

Los resultados indicaron que los extractos de AcOEt y diclorometano (CH₂Cl₂) mostraron actividad antifúngica de 500µg/mL contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* que se la considera como una actividad moderada o mala, mientras que el extracto de Hexano tuvo un CMI de 62.5 µg/mL contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* que se considera actividad antifúngica buena. Las fracciones 27 y 30 tuvieron actividad antifúngica de 1000µg/mL es decir mostrando ser inactivas contra las dos cepas de hongos.

Tabla 8. Actividad antifúngica de los extractos totales en Hex, CH₂Cl₂, ACOEt y compuestos frente a los hongos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.

Concentración mínima inhibitoria					
Hongos	Hex	DCM	AcOEt	FR 27	FR 30
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	62.5µg/mL	500µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL	1000µg/mL
<i>Trichophyton rubrum</i>	62.5µg/mL	500µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL	1000µg/mL
Esterilidad	Caldo Sabouraud (200µg/mL)				
Control positivo	Itraconazol inhibición (7,8µg/mL)				
Control negativo	DMSO				

Elaboración: La autora

Probablemente la actividad buena (62.5µg/mL) del extracto de Hexano, contra *T.mentagrophytes* y *T. rubrum*, fue producto de un sinergismo. Sinergia se define como la presencia farmacológica superior producida al actuar dos o más componentes juntos que al hacerlo por separado (Muñoz, 2011). Esto explica la razón por la cual las fracciones 27 y 30 obtenidas del extracto Hexánico no presentaron actividad antifúngica.

Se ha realizado estudios sobre las especies de *P. crassinervium* y *P. pesaresanum*, en donde su extracto total hexánico presento metabolitos secundarios como: alcaloides, esteroides, triterpenos, fenoles, neolignanos y aminos. En la *P. pesaresanum*, el extracto de hexano mostro un 100% de inhibición en el crecimiento radial de la fase asexual del hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*. Siendo así una especie con actividad biológica promisoriosa en el control de *M. fijiensis* (Riveros et al., 2003; Giraldo, 2012).

CAPITULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Mediante RMN y CG-EM, se determinó preliminarmente un neolignano denominado (3 - (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol, es la primera vez que se reporta el aislamiento de este compuesto en la *Piper umbellatum* L. Además se determinó la presencia de una mezcla de fitosteroles como: β - sitosterol, campesterol y estigmasterol (stigmasta-5,22-dien-3-ol).
- El extracto total de hexano presentó actividad antifúngica contra las dos cepas de hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* con un CMI de 62.5 μ g/mL, para el compuesto (3 - (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol y la mezcla de fitosteroles: β - sitosterol, campesterol y estigmasterol (stigmasta-5,22-dien-3-ol) mostraron ser inactivos contra las dos cepas de hongos.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de la especie *Piper umbellatum* L. realizando el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de los extractos totales de acetato de etilo y diclorometano además realizar estudios de otras partes de la especie ya sea tallos, raíces u otros, ya que en estudios anteriores han demostrado tener compuestos secundarios importantes; con el fin de detectar cual son los componentes que le dan las propiedades curativas a la planta.
- Efectuar más pruebas al compuesto de tipo neolignano tales como: IR y HPLC para determinar cuáles son sus características y propiedades tanto químicas y biológicas.
- Finalmente continuar realizando estudios de investigación con otras especies del género *Piper* o con especies vegetales con antecedentes etnobotánicos en la búsqueda de nuevos compuestos farmacológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alejandro, V., & Cols, N. (1988). "Cómo nos curamos: Remedios y Plantas Medicinales de la región Isleña", INI Subdirección de Salud y Bienestar Social. México, D.F.
- Andrade, M. (2003). Alcaloides de Rutaceae: Química e Actividad Biológica. Centro de Ciencias Exactas y de Tecnología, Universidad Federal de Sao Carlos. Brazil. 77-79.
- APG II. The Angiosperm Phylogenetic Group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society 141: 399-436.
- Arenas, R. (2001). Revisión del 1er Consenso Nacional de Prevención, diagnóstico y tratamiento de micosis superficiales. 1-64.
- Ayres, C., & Loike, D. (1990). Lignans-chemical, biological and clinical properties. Cambridge University Press. 424.
- Barrera, A., & Nereyda, P. (1971). Plantas medicinales utilizadas en las comunidades de San Juan Guichicovi, Oax., Oaxaca, Centro Coordinador Indigenista-San Juan Guichicovi, Oax., Oaxaca, México. 1-16
- Browner, C., (1985). Plants used for reproductive health in Oaxaca, México, Economic Botany, vol. 39, núm., 4, 482-504.
- Calatayud, A. (1990). Estudio etnobotánico de Plantas Medicinales en una comunidad Nahua de la Sierra de Sta. Martha, Veracruz; Xalapa, Veracruz, Facultad de Biología, UV, 132.
- Calle, J. (2011). Contribución al estudio de algunas especies de la familia Piperaceae. <<http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/datafile/farmacia/revista/V4N1P47-57.pdf>>.
- Carrasco, M., Giannini, F., Furlan, R., Zacchino, S., & Enriz, R. (2013). Universidad Nacional de La Plata Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires Acta Farmacéutica Bonaerense vol. 20, no. 3.
- Castillo, E., & Martínez, I. (2007). Manual de Fitoterapia. Editorial ,España. Elsevier.
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Agronomía Colombiana 26, 97-106.
- Cerón, C. (2002). La etnobotánica en el Ecuador. Cinchonía 3(2): 1-16.
- Chamba, D. (2012). Aislamiento, caracterización y evaluación antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper pseudochurumayu* (matico). Tesis de (Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja.

- Chuquimarca, L. (2013). Actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper asperiusculum*, matico-matapiujo al Sur de Ecuador. Tesis de (Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja.
- Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A., & Pieters L. (2008). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection – an update. *Planta Med.* 1323-1337.
- Crespo, V. (2008). Generalidades sobre hongos. *Dermatomicosis: saprofitas y dermatofitosis Piel.* (Vol.7).
- Dabur, R., Singh, H., Chhillar, M., & Sharma, G. (2004). Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 75(3-4): 389-391.
- De la Rúa, A. (1999). El poder curativo de las hierbas. *Círculo de lectores, Bogotá, Colombia* 145-146.
- De la Torre, L., Alarcón, D., Lars, P., & Salazar, J. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito: Aarhus, p.p. 105–114. <http://www.biologia.puce.edu.ec/natura.php?c=350>.
- Delgado, W., Pachón, A., Celis, C., Mendoza, O., Cardona, M., Bustamante, M., & Daza, E. (2007). Informe técnico de avance proyecto "Bioprospección participativa de comunidades vegetales asociados a la familia Piperaceae en la región del Sumapaz medio bajo occidental". *Colciencias-Universidad Nacional de Colombia-Universidad de Cundinamarca*.
- Dewick, P. (2001). *Medicinal Natural Products, Second Edition*. Editorial, John Wiley and Sons. England.
- Dong Kug Choi., Sushruta Koppula., & Kyoungho, Suk. (2011). Department of Pharmacology, Brain Science and Engineering Institute, CMRI, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu 700-422, Korea.
- Douglas, A., Skoog, J., Holler, A., & Nieman, P. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. 5^{ta} Edición. MC Graw-Hill Interamericana.
- Dyer, A., Palmer, A. (2004). *Piper*. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 214.
- Felipe, F., Días, F., Nakamura, V., Franco, L., & García, D. (2006). Analysis of neolignans compounds of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck by HPLC. *Pharm Biomed Anal*; 41:1371-5.
- Fielquimec©. (2012). Distribuidora Autorizada en Ecuador de equipos analíticos de Agilent Technologies.
- Flor, M., Peña, J., Rojas, L., Usubillaga, A., & Meléndez, P. (2008). Composición química de los aceites esenciales de *Piper dilatatum* L. y *Piper tuberculatum* de Mérida, Universidad de los Andes Venezuela.

- Flores, E. (2006). Tesis sobre: Metabolitos secundarios bioactivos de especie del género *Piper* de la flora boliviana. Serie Tesis Doctorales.
- García, H. (1992). Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica, vol. Tomo 1. Tercer Mundo Editores, Bogotá, 222 – 232.
- García, S. (2006). Síntesis de neolignanitos dihidrobenzo (b) Furánicos. Área de química orgánica. Editorial. Universidad de Almería. España.
- Garibello, C. (2010). Estudio de las hojas de *Pentacalia vaccinioides* (Kunth) como nueva fuente natural de sustancias esteroideas y cumarinas (Tesis Maestría). Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Giraldo, A. (2012). Estudio Fitoquímico de *Piper pesaresanum* y *Piper crassinervium*. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de tecnología, Escuela de tecnología química. Trabajo de grado. Colombia.
- Gómez, G., Villamarino, T., & Rodríguez, J. (1999). Las plantas de extractos, bases para un plan de desarrollo del sector. Editorial Mundi-Prensa Libros, S.A. Madrid.
- Goossenes, A., Häkkinen, S., Laakso, I., Seppanen, T., Biodi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A., Söderlund, H., Zabeau, M., & Oksman-Caldentay, K. (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10:8595-8600.
- Grayer, R., & Harborne, J. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants. 1982-1993. *Phytochemistry* 37(1): 19-35.
- Gregori, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Biofarbo*, 4(5), 34-38.
- Gutiérrez, C. (2000). Droguet identification de compuestos volátiles por CG-MS, *Boletín Intexter (U.P.C)* N.122.
- Harborne, J., & Williams, C. (2000). Advances in flavoid reserch since. *Phytochemistry*, 13(12), 481-504.
- Hernández, A., Carbajal, P., Fernández, R., & Arenas, R. (2007). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México, *Rev. Iberoamericana de Micología*; 24: 122-12
- Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Cortez, D., Nakamura, C., & Filho, B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027-31
- Hyun, K., Wook, J., Keun, S., Yeou, S., & Lee, K. (2010). Neolignans from *Piper kadsura* and their anti-neuroinflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20: 409–412

- Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. (2013). "*Piper umbellatum* IBUNAM:MEXU:TUXsn03272". UNIBIO
Disponible: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:TUXsn03272>
- James, T. (1998). Fundamentos of NMR. Objectives de Department of Pharmaceutical Chemistry University of California San Francisco.
- Jhonson, C., & Pasto, D. (1977). Determinación de estructuras orgánicas. España: Editorial Reverté, S.A.
- Keller, F., & Klohs, W. (1963). A review of the chemistry and pharmacology of constituents of *Piper methistycum*. *Lloydia* 26, 1-15.
- Kutchan, T. (1995). Alkaloid biosynthesis: the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell*. 7: 1059-1070.
- López, N., Aparecida, A., Batista, J., Flausino, O., Bolzano, V., Kato, M., & Furlan, M. (2010). Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). *Bioresource Technology*. 101: 4251 – 4260.
- Manzano, P. (2013). Laboratorio de Micología Médica. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México.
- Martínez, A. (2001). Esteroles. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Méndez, A. (2011). La Guía de Química. Cromatografía en columna. <http://quimica.laguia2000.com/general/cromatografia-en-columna>
- Mensah, K., Okoli, I., Ohaju-Obodo, O., & Eifediyi, K. (2008). Phytochemical, nutritional and medicinal properties of some leafy vegetables consumed by Edo people of Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 7, 2304–2309.
- Morrison, R., & Boyd, R. (1998). Química orgánica. Edición Addison Wesley Longman. México S. A. 5º Ed. 1474.
- Morton, F. (1981). Atlas of medicinal plants of Middle America. Charles C. Thomas. Springfield, Illinois. 1420.
- Muñoz, H. (2011). Sinergia y adición en anestesiología. *Revista mexicana de Anestesiología*, 195-199.
- Naranjo, P., & Escaleras, R. (1995). La Medicina Tradicional en el Ecuador. Corporación Editora Nacional, Quito, 192.
- Nistal, B., & Del Pozo J. (2005). Complejo Hospitalario Universitario "Juan Canalejo"-Marítimo de Oza-Sergas. España.

- Noumi, E., & Yomi, A. (2001). Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo región, Central Province, Cameroon, *Fitoterapia* 72:246-254.
- Parmar, V., Subhash, J., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, D., Prasad, A., Wengel, J., Olsen, C., & Boll, M. (1997). Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry*. 46: 591-673.
- Parra, E. (2011). Contribución al Estudio Fitoquímico de la Parte aérea de *Piper* cf. *Cumanense Kunth* (Piperaceae). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Bogotá, Colombia.
- Pohle, P., & Reinhardt, S. (2004). Indigenous knowledge of plants and their utilization among the Shuar of the lower tropical mountain forest in southern Ecuador. *Lyonia* 7, 133–149.
- Quijano, M., Callejas, M., & Miranda, D. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*, 5(33), 1266-1278.
- Riveros, S., & Arciniegas, M. (2003). Productos naturales como biofungicidas e inductores de resistencia para el manejo de la Sigatoka negra. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos Actas del Taller “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas celebrado en Guayaquil, Ecuador Agosto. Rivas y Rosales, Editorial. 11- 13. Inibap. 31-32
- Roersch, C. (2010). *Piper umbellatum* L. A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(3), 522-537.
- Rukachaisirikul, T., Siriwattanakit, P., Sukcharoenphol, K., Wongvein, C., Ruttanaweang, P., Wongwattanavuch, P., & Suksamrarn, A. (2004). Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 173-176.
- Schmelzer, H. (2001). *Piper umbellatum* L. In: Van Valkenburg, unyapraphatsara, N. (Eds.), *Plant Resources of South-East Asia, Medicinal and Poisonous Plants 2*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. No. 12(2).
- Sengupta, S., & Ray, B. (1987). The chemistry of *Piper* species: Review. *Fitoterapia* 58, 147-166.
- Standley, C., & Steyermark, A. (1952). *Flora of Guatemala*. Fieldiana: Botany, 24(3).
- Tabopda, K., Ngoupayo, J., Liu, J., Tanoli, A., & Khan, N. (2008). Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum* L. *Phytochemistry*. 69:1726-31.
- Tchoumboungang, F., Jazet, P., Sameza, L., Amvam, P., & Menut, C. (2009). Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of *Piper capense*

- L., *Piper guineense* Schum. Thonn, *Piper nigrum* L. and *Piper umbellatum* L. grown in Cameroon. African Journal of Biotechnology, Vol. 8 (3), 424-431.
- Tene, V., Malagón, O., Vita-Finzi, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. 63-81.
- Vasilev, A. (1969). Plantas medicinales de Guinea. Conakry, Republic de Guinea. Ediciones Hispano- Guineano. pag. 252.
- Vega, M. (2001). Etnobotánica de la Amazonía Peruana. Ediciones Abya-Yala. Quito – Ecuador. Primera edición.
- Vidal, D. (2013). Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper peltatum* L. Tesis de (Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja.
- Villamil, C., & Avendaño, S. (1992). Aspectos generales del uso de las plantas en Xico, Veracruz, Documento Interno, Xalapa, Veracruz, Instituto de Ecología, A.C, Mexico.
- Walton, N., Rhodes, M., Michael, A., & Parra, A. (1999). Characterisation and control of plant secondary metabolism. Edition Walton y Brown, Chemicals from plants. London: Imperial College Press, 27-90.
- Wanke, S., Jaramillo, A., Borsch, T., Samain, S., Quandt, D., & Neinhuis, C. (2007). Evolution of Piperales - matk gene intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. Molecular Phylogenetics and Evolution 42, 477-497.
- Willey, J., & Sons, L. (2005). Oxford, Update Software Ltd. Obtenido de <http://www.update-software>.
- Winn, A., Janda, K., & Procop, S. (2008). Diagnóstico Microbiológico, Sexta edición, Editorial Médica Panamericana, España, pg.: 1140-141.

ANEXOS

ANEXOS 1

Preparación del Revelador

Ácido sulfúrico 5 % y vainillina:

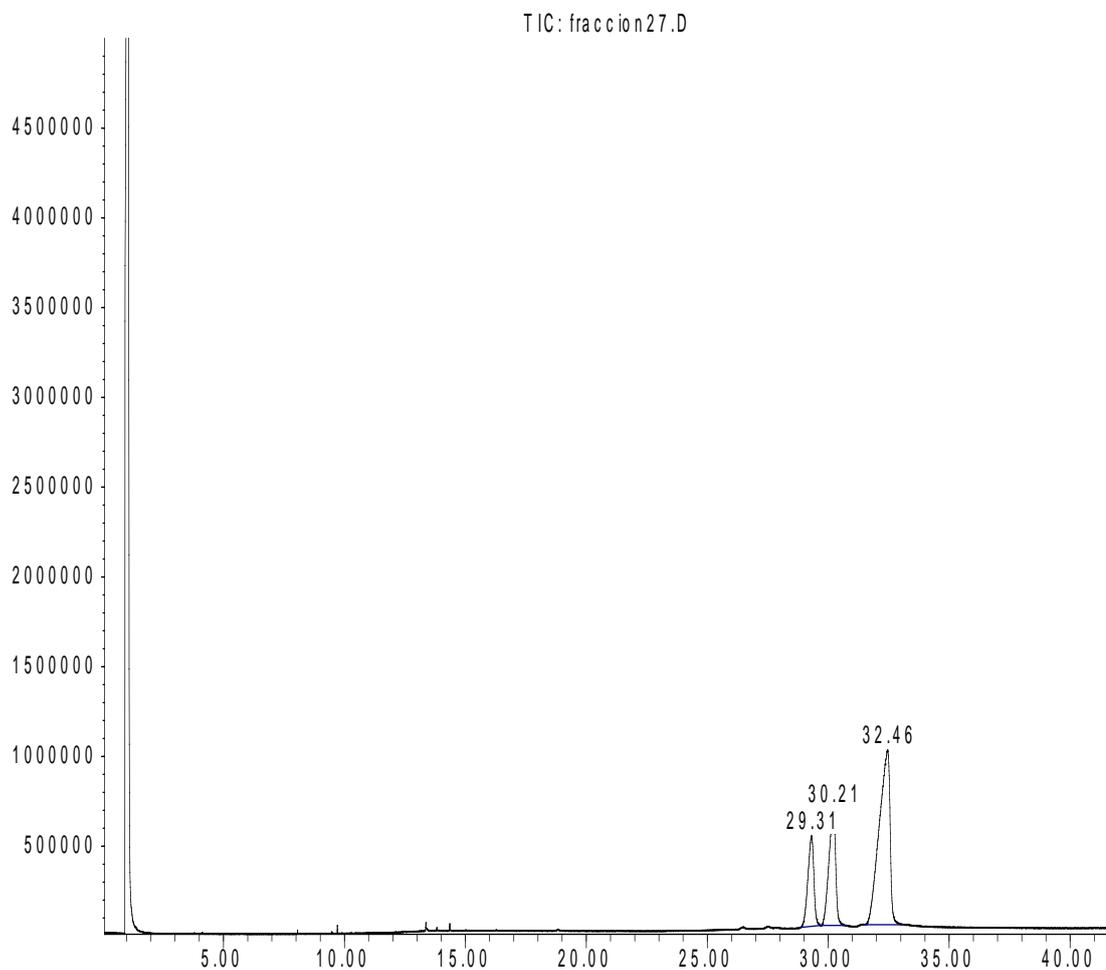
Reactivos	Composición
Ácido sulfúrico	250ml de etanol
	12,5ml de ácido sulfúrico
Preparación : Se afora los 12.5ml de ácido sulfúrico con los 250ml de etanol.	

Reactivos	Composición
Vainillina	250ml de etanol
	2,5mL de vainillina
Preparación : Se afora los 2.5ml de vainillina con los 250ml de etanol.	

ANEXOS 2

Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM), de la fracción 27. Mezcla de esteroides: campesterol 29.31min tiempo de retención, stigmasta-5,22-dien-3-ol. 30.21 min tiempo de retención y β -sitosterol 32.46 tiempo de retención.

Abundance

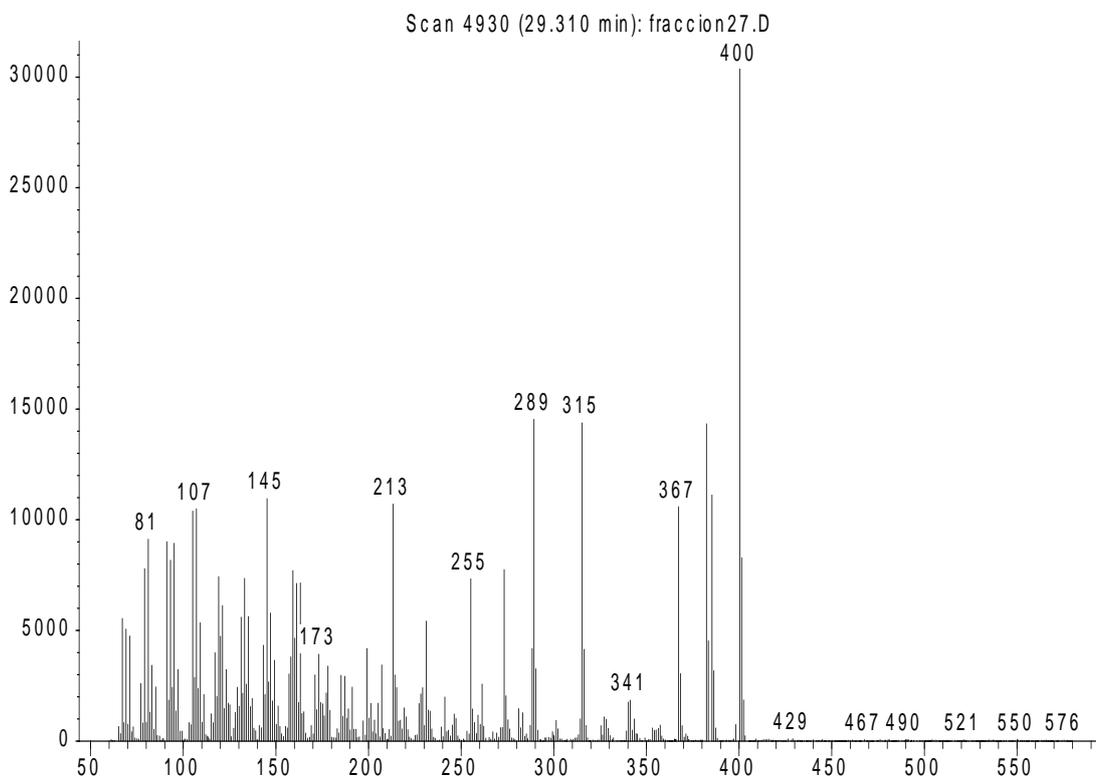


Compuestos	RT	Área %	Cas #	Qual%
β -sitosterol	32.46	3.02	00083-46-5	95
Stigmasta-5,22-dien-3-ol.	30.21	3.50	00083-48-7	97
campesterol	29.31	3.00	000474-09-2	99
DB-5MS capillary column				

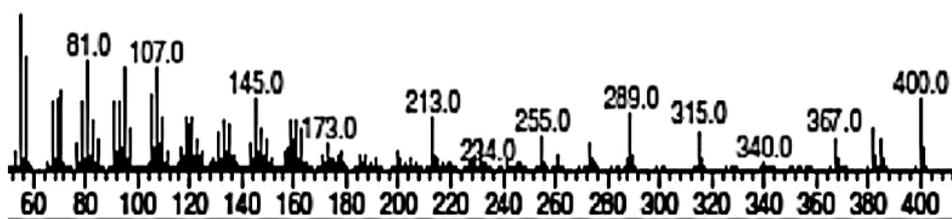
ANEXOS 3

Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM) del Campesterol, con una masa moléculas de 400 m/z, comparado con la base de datos NIST 2010.

Abundance



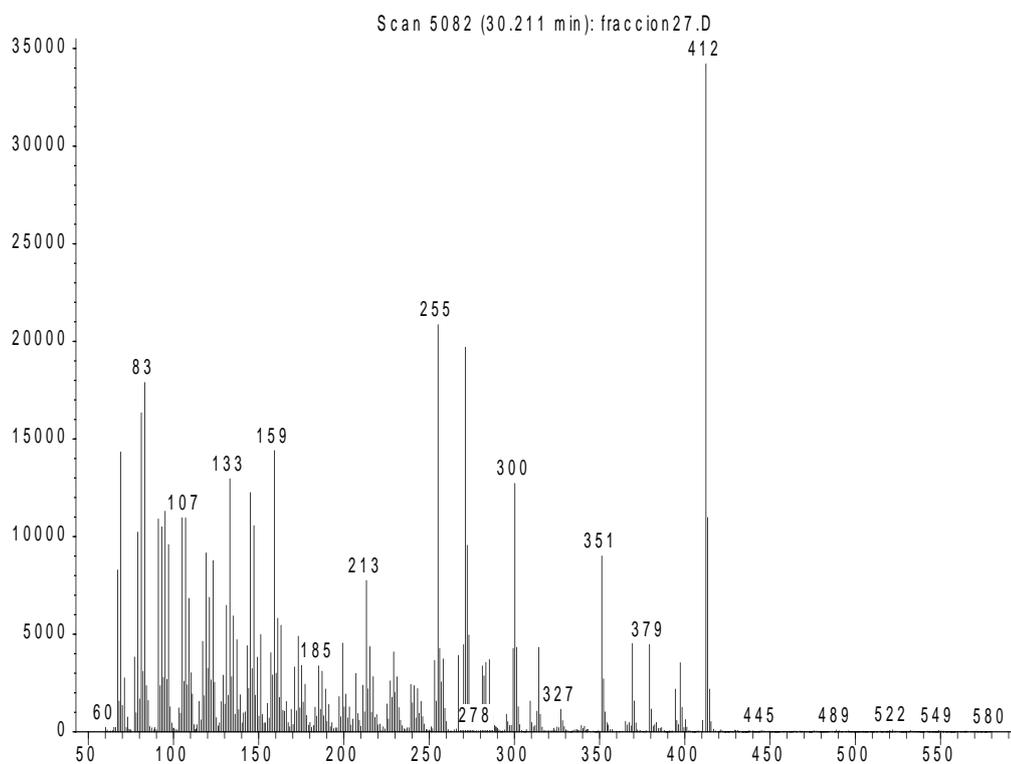
m/z-->



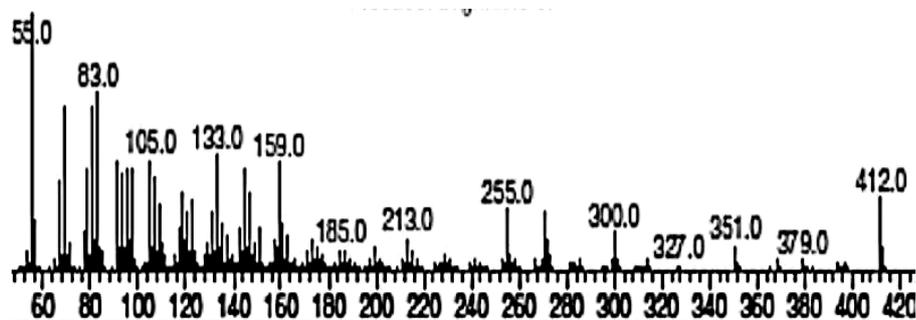
ANEXOS 4

Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM), del stigmasta-5,22-dien-3-ol, con una masa moléculas de 412 m/z, comparado con la base de datos NIST 2010.

Abundance



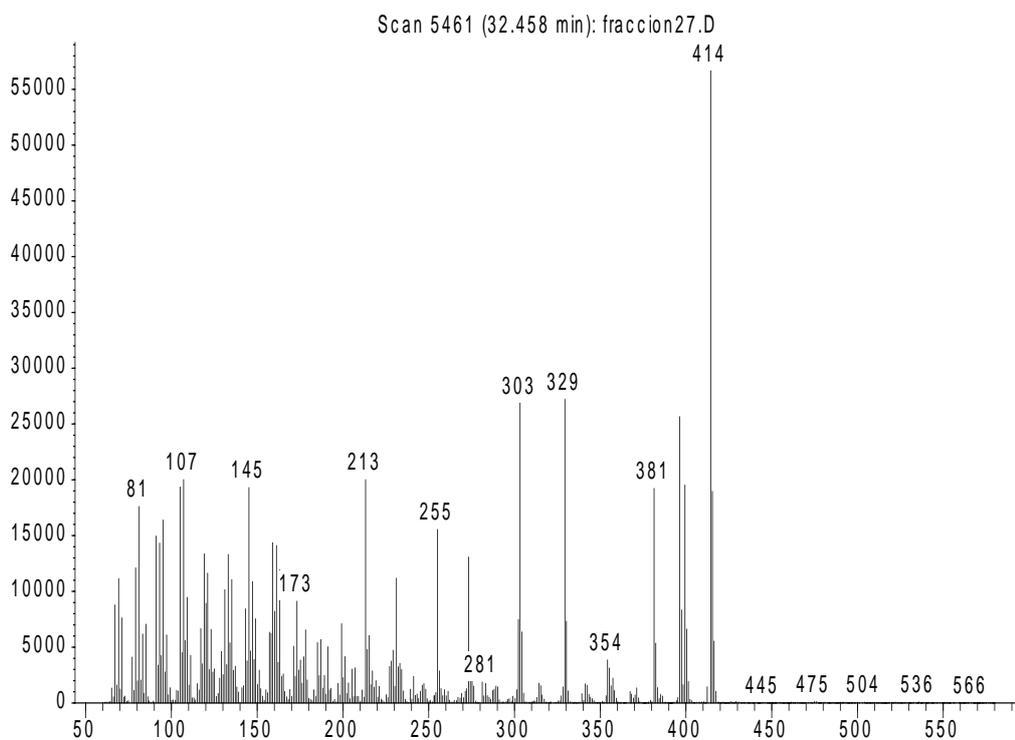
m/z-->



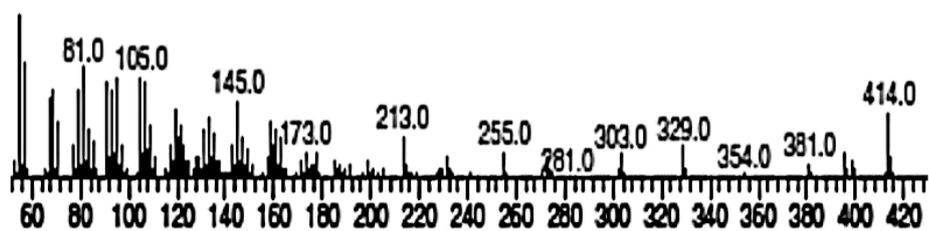
ANEXOS 5

Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM), del β -sitosterol, con una masa moléculas de 414 m/z, comparado con la base de datos NIST 2010.

Abundance



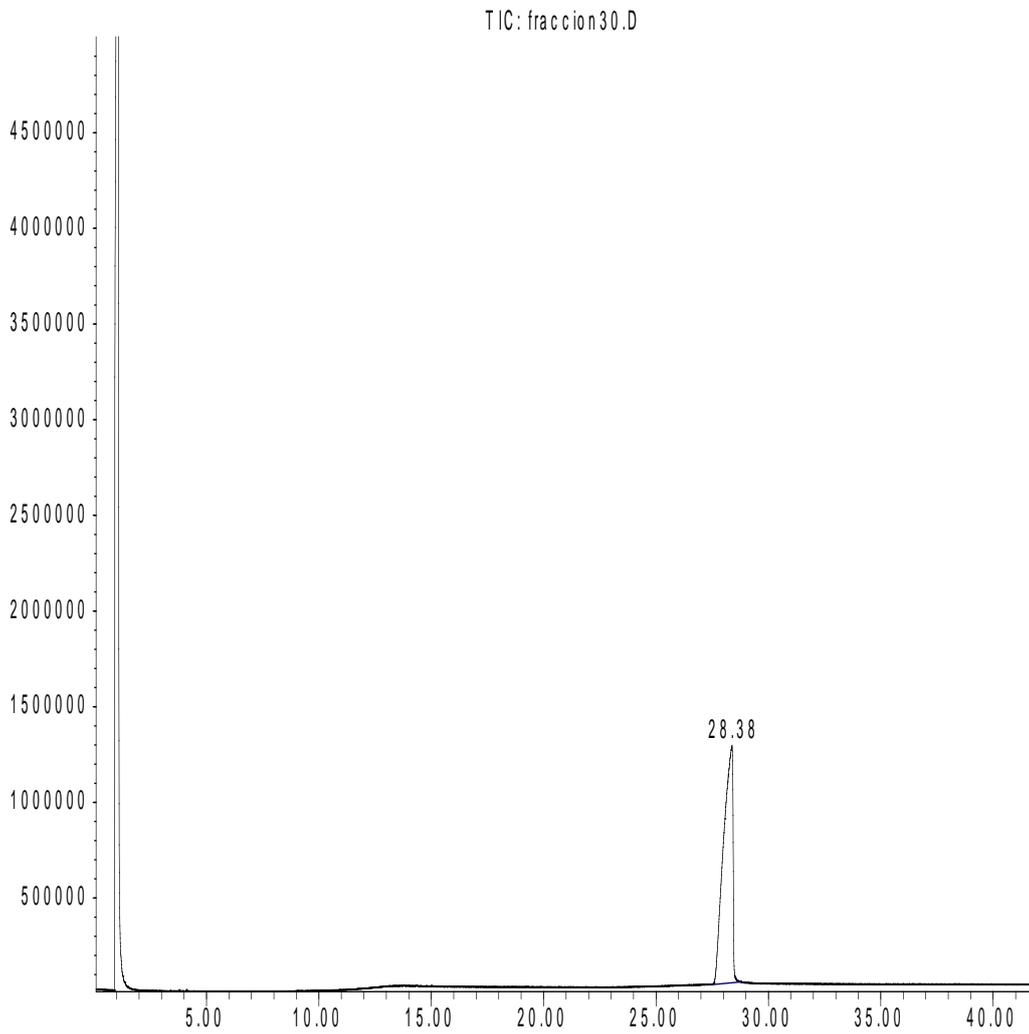
m/z-->



ANEXOS 6

Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de masas (CG-EM), del neolignano (3 - (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol, con un tiempo de retención de 28.38min.

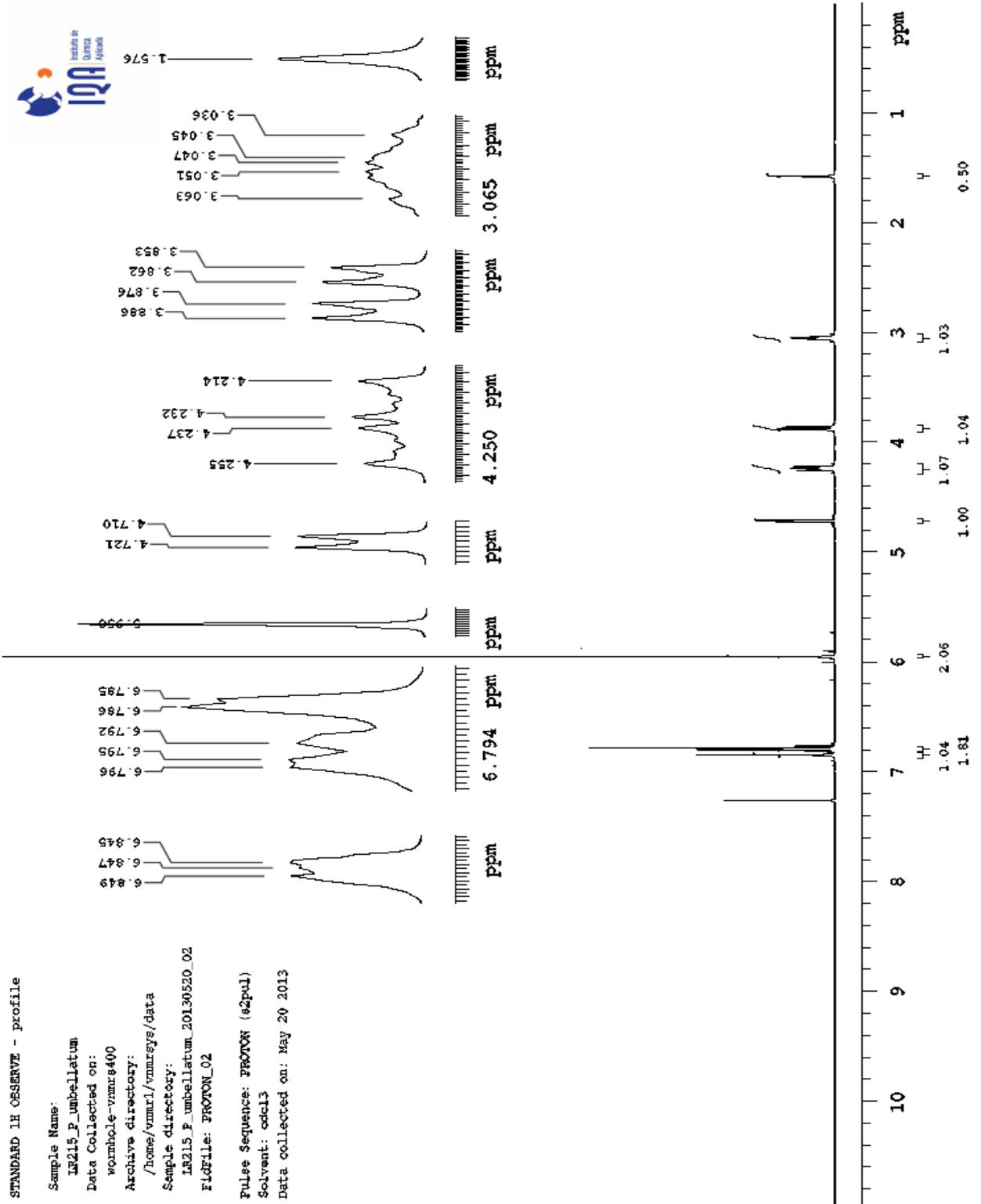
Abundance



Time-->

ANEXOS 7

Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , del neolignano: (3 - (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol.



ANEXOS 8

Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C , del neolignano: (3 - (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) oxirano-2-yl) metanol.



STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
IR215_P_umbellatum
Data Collected on:
wormhole-vmmr6400
Archive directory:
/home/vmmr1/vmmrSYS/data
Sample directory:
IR215_P_umbellatum_20130520_02
File: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: May 20 2013

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vmmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.285 sec
Width 25510.2 Hz
10000 repetitions

OBSERVE CH3, 100.5376743 MHz
DECONVLE RL, 399.8334195 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
Ft size 65536
Total time 6 hr, 20 min

