



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg. “árbol de fruta de pan” de la provincia de Zamora Chinchipe.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Medina Medina, Mirian Carmen.

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

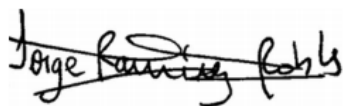
MSc. Jorge Yandry Ramírez Robles.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de Titulación: **“Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie *Artocarpus altilis* “Árbol de fruta de pan” de la Provincia de Zamora Chinchipe”**, realizado por: Medina Medina Mirian Carmen, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2014



MSc. Jorge Yandry Ramírez Robles

C.I: 1103536311

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Medina Medina Mirian Carmen, declaro ser autora del presente trabajo de fin de Titulación: “Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg. “Árbol de fruta de pan” de la provincia de Zamora Chinchipe”, de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo MSc. Jorge Yandry Ramírez Robles 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”

Autora: Medina Medina Mirian Carmen
C.I. 1104812324

DEDICATORIA

A **Manuel y Lucecita**, los seres maravillosos que Dios me dio, quienes me han sabido inculcar los valores que hoy tengo; me han dado la confianza y el apoyo incondicional que necesitaba para terminar con este reto, a ellos lo debo todo; simplemente gracias, los adoro papitos. De igual manera a mis dos compañías de vida, mis hermanitos **Eli y Lenin**, que sin su alegría no sería nada, los quiero.

A mis dos amores **Dominique y Michael**, que llegaron a mi vida para darme las fuerzas que día a día he necesitado para superar los desafíos y obstáculos de mi camino, a ellos este logro con todo mi amor, que es el primero pero con su amor podré superar cualquier adversidad que la vida me apueste. Los amo.

Mirian

AGRADECIMIENTO

A Dios, por haberme dado la oportunidad de tener cuanto hay a mí alrededor, y darme así la fuerza necesaria para lograr los retos y adversidades de la vida.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en especial al Departamento de Química por financiar esta investigación.

Al MSc. Jorge Ramírez y PhD. Chabaco Armijos, director y co-director, respectivamente, por su paciencia, dedicación, enseñanzas y sabios consejos que he necesitado durante la realización de esta investigación.

A cada uno de los Docentes, que desde el inicio de mi carrera han sabido fomentar en mí la educación, los valores y la alegría de sentir que los sueños se cumplen con esfuerzo y dedicación.

A toda mi familia, porque me han dado su cariño y comprensión, porque me han enseñado que a pesar de las dificultades siempre se llega a la meta trazada.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Diana, Dosi, Luis, Ronald y Cristina, por las experiencias, enseñanzas y alegrías compartidas.

Mirian

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	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.....	viii
LISTA DE FOTOGRAFÍAS	viii
LISTA DE GRÁFICAS.....	ix
LISTA DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Plantas medicinales.....	15
1.2 Familia Moraceae.....	16
1.2.1 Género <i>Artocarpus</i>	16
1.3 Descripción botánica de <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg.....	17
1.4 Utilidad de <i>Artocarpus altilis</i>	19
1.4.1 Corteza interna (<i>líber</i>).....	20
1.4.2 Hojas y flores.....	20
1.4.3 Látex.....	20
1.4.4 Usos medicinales.....	21
1.5 Antioxidantes.....	23
1.5.1 Beneficios de los antioxidantes.....	23
1.6 Metabolismo primario y secundario.....	24
1.6.1 Terpenos.....	25
1.6.2 Sesquiterpenos.....	25
1.6.3 Ácidos Grasos.....	25
1.7 Cromatografía.....	26
1.7.1 Cromatografía en capa fina (CCF).....	27
1.7.1.1 Factor de retención (<i>R_f</i>).....	28
1.7.2 Cromatografía en columna (CC).....	28
1.7.3 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas.....	28
1.8 Resonancia Magnética Nuclear.....	29
CAPITULO II: METODOLOGÍA.....	30
2.1 Tratamiento de la muestra vegetal.....	32
2.1.1 Selección y recolección de material vegetal.....	32
2.1.2 Obtención de extractos.....	33
2.1.2.1 Desclorofilación del extracto de AcOEt.....	33
2.2 Aislamiento de metabolitos secundarios.....	34
2.2.1 Determinación de extractos.....	34
2.2.2 Pruebas microbiológicas. Microdilución en caldo (CMI).....	34
2.2.2.1 Determinación de actividad antifúngica.....	34
2.2.2.2 Determinación de actividad antibacteriana.....	34

2.2.3 Determinación de actividad antioxidante.....	35
2.2.3.1 Método DPPH.	36
2.2.3.2 Método ABTS.	36
2.2.4 Preparación de columna.....	37
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.1 Deshidratación del material vegetal.	40
3.2 Obtención de extractos.	40
3.3 Aislamiento de metabolitos secundarios.	41
3.3.1 Compuestos aislados a partir de la CC del Látex.	42
3.3.1.1 Fracción 28 (mezcla de triterpenos).....	42
3.3.1.2 Fracción 33 (ácido hexadecanoico).	45
3.3.1.3 Fracción 35 (mezcla de sesquiterpenos).	48
3.3.1.4 Fracción 39 (ácido hexanodioico, éster de dioctilo).	50
3.3.2 Compuestos aislados a partir de CC del extracto de Hojas AcOEt desclorofilado... 52	
3.3.2.1 Fracción 43-49 (Heptacosano).	52
3.3.3 Compuestos aislados a partir de la CC del extracto de hojas CH ₂ CL ₂	54
3.3.3.1 Fracción 10 (mezcla de hidrocarburos alifáticos).	54
3.4 Pruebas microbiológicas. Microdilución en caldo (CMI).	56
3.4.1 Determinación de actividad antifúngica.....	56
3.4.2 Determinación de actividad antibacteriana.	57
3.5 Determinación de actividad antioxidante.....	59
3.5.1 Método DPPH.....	60
3.5.2 Método ABTS.	61
CONCLUSIONES	64
RECOMENDACIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66
ANEXOS	71
1. Fracción 28: Espectros de masa de los compuestos de la mezcla.	72
2. Fracción 33. Espectros CG-EM; RMN ¹ H, ¹³ C	77
3. Fracción 35. Espectros de masas de los compuestos de la mezcla.	81
4. Fracción 39: Espectros CG-EM; RMN ¹ H, ¹³ C	83
5. Fracción 43-49. Espectro de masa.	86
6. Esquema de determinación de actividad antioxidante (DPPH).	87
7. Esquema de determinación de actividad antioxidante (ABTS).....	88
8. Actividad Antioxidante: Curva de Calibración DPPH.....	89
9. Actividad Antioxidante: Curva de Calibración ABTS.	90
10. Valores en μMolEqTrolox/gplantaseca de cada extracto (DPPH).....	91
11. Valores en μMolEqTrolox/gplantaseca de cada extracto (ABTS).	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Enfermedad de la ciática es tratada tradicionalmente con látex de <i>A. altilis</i>	21
Figura 2: Hojas de <i>A. altilis</i> han mostrado actividad anticancerígena.....	22
Figura 3: Función de los antioxidantes.....	23
Figura 4: Estructura lineal de un ácido (palmítico).	26
Figura 5: Esquema representativo de la metodología empleada.....	31
Figura 6: Mapa e información de lugar de recolección.	32
Figura 7: Cromatograma de la fracción 28.	43
Figura 8: Estructura química de los compuestos identificados en la fracción 28.	44
Figura 9: Estructura química de los compuestos identificados en la fracción 28.	44
Figura 10: Cromatograma de la fracción 33.	46
Figura 11: Estructura química del ácido hexadecanoico	47
Figura 12: Cromatograma de la fracción 33.	48
Figura 13: Estructura química de los compuestos identificados en la fracción 35.	49
Figura 14: Cromatograma de la fracción 39.	50
Figura 15: Estructura química del Ácido Hexanodioico, éster de dioctilo.....	51
Figura 16: Cromatograma de la fracción 43-49.	53
Figura 17: Estructura Química del Heptacosano.....	53
Figura 18: Cromatograma de la fracción 10.	55
Figura 19: Estructura química de los compuestos encontrados en la fracción 10.....	56

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1: Árbol <i>A. altilis</i> , descripción botánica.....	18
Fotografía 2: (a) Árbol (15-20m altura), y (b) corte de <i>A. altilis</i> (látex).....	18
Fotografía 3: Hojas <i>A. altilis</i>	19
Fotografía 4: Fruto <i>A. altilis</i>	19
Fotografía 5: CCF látex, Hex-AcOEt 6:4 (v/v).....	27
Fotografía 6: (a) Maceración dinámica, (b) Filtrado, (c) Extractos, (d) Evaporación de disolvente.	33
Fotografía 7: Espectrofotómetro de UV visible Helios β UVB091602.....	37
Fotografía 8: Proceso montaje y fraccionamiento en columna.....	38
Fotografía 9: CCF:Hex 100:00, Hex-AcOEt 8:2 y AcOEt de la fracción 28.	42
Fotografía 10: CCF fracción 33.....	45
Fotografía 11: CCF fracción 35.....	48
Fotografía 12: CCF fracción 39.....	50

Fotografía 13: CCF fracción 43-49.	53
Fotografía 14: CCF fracción 10.....	54

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Extractos con los valores respectivos expresados en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ (DPPH).	60
Gráfica 2: Extractos con los valores respectivos expresados en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ (ABTS).....	61
Gráfica 3: Gráfica representativa de la actividad antioxidante de los extractos con los dos métodos.....	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Concentración de extractos para cada método de actividad antioxidante.	36
Tabla 2: Datos para preparación de columna cromatográfica.....	38
Tabla 3: Rendimiento del secado del material vegetal.....	40
Tabla 4: Peso y rendimiento de cada extracto obtenido de la maceración de hojas de <i>A. atilis</i>	40
Tabla 5: Peso y rendimiento de cada extracto obtenido de la maceración de raíces de <i>A. atilis</i>	41
Tabla 6: Peso y rendimiento del látex liofilizado a partir de <i>A. atilis</i>	41
Tabla 7: Número de fracciones obtenidas en el fraccionamiento en cromatografía en columna de los cuatro extractos.....	41
Tabla 8. Datos CG de la fracción 28.....	43
Tabla 9: Datos RMN ^1H de los obtenidos en (400 MHz, CHLOROFORM- <i>d</i>) y los de ácido hexadecanoico (ChemBioDraw Ultra).	47
Tabla 10: Datos CG de la fracción 35.....	49
Tabla 11: Datos RMN ^1H de los obtenidos en (400 MHz, CHLOROFORM- <i>d</i>) y los de ácido hexanodioico, éster de dioctilo (ChemBioDraw Ultra 2009).....	52
Tabla 12: Datos CG fracción 10.	55
Tabla 13: CMI de los extractos de raíces y hojas expuestas a los hongos <i>Trichophyton mentagrophytes</i> y <i>Trichophyton rubrum</i>	57
Tabla 14: CMI de los extractos de raíces y hojas expuestas a bacterias gram positivas y negativas.	58
Tabla 15: Resumen de la actividad antioxidante de los extractos con los dos métodos.	62

ABREVIATURAS

ABTS	Compuesto químico: 2,2'-azino-bis (6-sulfónico 3-etilbenzotiazolina ácido). Pruebas de oxidación.
AcOEt	Acetato de Etilo.
<i>C. difteria</i>	<i>Corinebacteria difteria</i> .
<i>C. tropicalis</i>	<i>Cándida tropicalis</i> .
CC	Cromatografía en columna.
CCF	Cromatografía en Capa Fina.
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas.
CHCl₃	Cloroformo.
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
CH₂CL₂	Diclorometano.
DMSO	Dimetil-sulfoxido
DPPH	Compuesto químico orgánico: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (pruebas de Oxidación).
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i> .
EtOH	Etanol.
Ext.	Extracto.
H₂O	Agua.
Hex	Hexano.
Min.	Minutos.
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar.
MeOH	Metanol.
Mg.	Miligramos.
Ppm	Partes por millón.
Rf.	Factor de retención.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
¹HRMN	Resonancia Magnética Nuclear del Protón.
¹³CRMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i> .
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .
<i>Tm</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Tr</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
Tr.	Tiempo de retención.
UNL	Universidad Nacional de Loja.
UV	Luz Ultra Violeta.
v/v	Volumen/Volumen.
µL	Micro litros.
µMoIET/g MS	Micro moles equivalentes de Trólox por cada gramo de materia seca.

RESUMEN

Se recolectó hojas, raíces y látex de *Artocarpus altilis*. De los extractos se determinó actividad antimicrobiana: los extractos de raíces AcOEt y MeOH presentaron CMI 62,5µg/mL y 15,62µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* (Sa); para *Enterococcus faecalis* (Ef) 125µg/mL y 15,62µg/mL, respectivamente. Los extractos de hojas CH₂CL₂, AcOEt y MeOH presentaron 62,5µg/mL, 500µg/mL y 125 µg/mL para Sa, para Ef 125µg/mL; 500µg/mL y 125µg/mL, respectivamente. En la actividad antifúngica los extractos de hojas CH₂CL₂, AcOEt desclorofilado y raíces AcOEt mostraron CMI de 62,5µg/mL; 31,25µg/mL y 500µg/mL para *Trichophyton mentagrophytes* (Tm); y 125µg/mL, 31,25µg/mL y 500µg/mL para *Trichophyton rubrum* (Tr); respectivamente.

Se determinó la actividad antioxidante, los más significativos fueron los extractos de hojas y raíces en MeOH (47,27 y 88,71 µMolEqTrolox/gplantaseca), para DPPH y ABTS, respectivamente.

Se identificó mediante RMN ¹H, ¹³C, CG-EM, a partir del látex a: ácido hexadecanoico; ácido hexanodioico, éster de dioctilo; y a partir de hojas AcOEt desclorofilado a Heptacosano.

Palabras claves: ABTS, *Artocarpus altilis*, DPPH, Ef., Sa., Tm., Tr.

ABSTRACT

Leaves, roots and latex of *Artocarpus altilis* were collected. Antimicrobial activity of the extracts was determined: root extracts EtOAc and MeOH showed CMI 62.5µg/mL and 15.62µg/mL against *Staphylococcus aureus* (Sa), for *Enterococcus faecalis* (Ef) 125µg/mL and 15.62µg/mL, respectively. Leaf extract CH₂CL₂, EtOAc and MeOH showed 62.5µg/mL, 500µg/mL and 125µg/mL for Sa, for Ef 125µg/mL; 500µg/mL and 125µg/mL respectively. The antifungal activity extracts of leaves CH₂CL₂, EtOAc without chlorophylls and roots EtOAc showed MIC of 62.5µg/mL, 31.25µg/mL and 500µg/mL for *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) and 125µg/mL, 31.25µg/mL and 500µg/mL to *Trichophyton rubrum* (Tr), respectively.

The antioxidant activity was determined; the most significant were the extracts of leaves and roots in MeOH (47.27 and 88.71 µMolEqTrolox/gplantaseca) for DPPH and ABTS, respectively.

Was identified by NMR ¹H, ¹³C, GC-MS, from the latex to: hexadecanoic acid, hexanedioic acid, dioctyl ester; and from leaves EtOAc without chlorophylls to Heptacosane.

Keywords: ABTS, *Artocarpus altilis*, DPPH, Ef., Sa., Tm., Tr.

INTRODUCCIÓN

Actualmente el problema de la resistencia de muchos patógenos a los medicamentos comunes (de origen biológico o sintético) y las enfermedades indeseables (diabetes, cáncer, daños oxidativos) es el principal incentivo para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. La industria farmacéutica ha sintetizado millones de productos químicos activos farmacológicamente, empleando como modelos, productos naturales provenientes de plantas. Se ha aislado un buen número de metabolitos secundarios con gran interés científico dadas las actividades biológicas y medicinales que han presentado (Benavides Calvache, 2004).

El consumo de medicamentos derivados de plantas es amplio y ha ido creciendo de forma significativa tanto en la medicina tradicional y la moderna. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, más del 80 % de la población mundial en los países en desarrollo depende, sobre todo, de las medicinas a base de plantas para las necesidades básicas de salud (Jagtap & Bapat, 2010).

Los beneficios que *A. attilis* presenta, son tradicionalmente conocidos por los habitantes del oriente ecuatoriano; las hojas, raíces, tallo y látex se utiliza para tratar enfermedades como la cirrosis hepática, ciática, diarrea, la hipertensión y la diabetes, además tiene actividad antifúngica, antibacteriana, anticancerígena y antioxidante. En países asiáticos ha sido estudiada ampliamente y ha corroborado estos tratamientos científicamente (Vasugi *et al.*, 2012).

CAPITULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Plantas medicinales.

Las plantas medicinales tienen su propia participación histórica en todos los principios de la civilización, por ejemplo, la medicina China y Ayurvédica (India). Las plantas medicinales se han utilizado durante siglos tradicionalmente para tratar varios tipos de enfermedades, tales como las infecciosas y cáncer (Vasugi *et al.*, 2012)

El uso de plantas medicinales se remonta por lo menos a 5000 años. Hoy en día, más de 85.000 especies de plantas se han documentado para uso médico a nivel mundial (Enos *et al.*, 2009). Se calcula que los medicamentos tradicionales son utilizados por el 60% de la población mundial y en algunos países están ampliamente incorporados al sistema público de salud. El uso de plantas medicinales es el medio de tratamiento más común en la medicina tradicional y la medicina complementaria en todo el mundo (OMS, 2014).

Éstos medicamentos a base de hierbas se prescriben ampliamente incluso cuando sus compuestos biológicamente activos son desconocidos, debido a su eficacia, menos efectos secundarios, y de costo relativamente bajos (Sudha & Asna, 2012).

Las plantas medicinales representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados; en los países en desarrollo el uso de las plantas medicinales representa el 80% del arsenal terapéutico. Las plantas medicinales utilizadas como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias naturales puras, representan un área en franca expansión. Estas sustancias naturales puras y los extractos purificados o estandarizados adquieren una importancia cada vez mayor pues permiten una mejor caracterización analítica permitiendo así que sean cumplidos de una manera más eficaz los requisitos de calidad, efectividad y seguridad, exigidos a cualquier medicamento moderno, sea él natural o sintético (Sharapin *et al.*, 2000).

Entre las razones que justifican el interés creciente por las plantas medicinales, en los países industrializados, se puede citar: la falta de nuevos descubrimientos por los procesos tradicionales de síntesis química, de moléculas farmacológicamente activas y posible uso terapéutico, los efectos secundarios producto del uso correcto o abusivo de algunos fármacos sintéticos y el cambio de perfil del consumidor que, desde finales de la década de 1980, está prefiriendo los productos naturales en detrimento de los productos sintéticos en todos los segmentos del mercado, abarcando de esta manera los sectores de salud, alimentación, vestuario o higiene; y además que, las plantas producen una amplia gama de productos naturales con actividades valiosas como productos farmacéuticos, nutracéuticos,

agentes de protección de cultivos, ingredientes alimentarios y productos para el cuidado personal (Ehsan *et al.*, 2012).

Los países en desarrollo, donde el 75% de la población mundial vive, consumen menos del 15% del mercado total de medicamentos. La mayor parte de esta población no tiene acceso a los medicamentos industrializados, constituyendo por esta razón, el uso de las plantas medicinales el único recurso terapéutico disponible para los pueblos más pobres de la población. Considerando el crecimiento constante de la población en estos países en vía de desarrollo, la importancia de las plantas medicinales y su uso, es cada vez mayor (Sharapin *et al.*, 2000).

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

1.2 Familia Moraceae.

La familia se distribuye en las regiones tropicales y templadas de todo el mundo, siendo originaria de Indonesia y Polinesia, pero su diversidad se centra en los trópicos. La familia está fuertemente apoyada como monofilético, pero una asombrosa diversidad de estructuras inflorescencias complejas, síndromes de polinización, los sistemas de cría y formas de crecimiento en la familia ha complicado su taxonomía a nivel tribal y por debajo (Nyree J. *et al.*, 2010).

La familia comprende aproximadamente 37 géneros y 1050 especies, incluyendo varias especies económica y ecológicamente importantes, como árbol de fruta de pan (*A. altilis*), mora Turca (*Broussonetia papyrifera* Vent.), y los higos (*Ficus* L.) (Ehsan *et al.*, 2012).

En Ecuador, de la familia Moraceae se conocen 19 géneros, 126 especies de las cuales 5 son endémicas. Del género *Artocarpus* únicamente se conocen dos especies la *A. altilis* (Parkinson) Fosberg y la *A. heterophyllus* Lam. (Jorgensen & León-Yáñez, 1999).

1.2.1 Género Artocarpus.

En 1776, en el barco Bounty, a cargo del capitán William Blight, los ingleses llevaban a las Antillas el “árbol de fruta de pan”, que traían desde Polinesia. Este barco naufragó y el “árbol del pan” no pudo llegar a América. En un segundo intento, en 1793, las plantas llegaron al

fin a las Antillas donde se aclimataron y desde donde se extendieron a todas las regiones tropicales incluyendo parte del Ecuador (Gómez, 2009).

Artocarpus es un género pantropical con numerosas especies nativas del bosque húmedo de Malasia, Indonesia, las Filipinas y Melanesia. Mientras que solamente *A. altilis* y *A. heterophyllus* son ampliamente cultivadas fuera de sus áreas de distribución natural, muchas otras especies producen frutos comestibles y no maderables; y otros, maderables de alta calidad (Parrotta, 1994).

El género *Artocarpus* se conoce por producir un gran número de metabolitos secundarios, y es específicamente rica en fenilpropanoides tales como flavonoides y flavonas. *A. altilis* (árbol de fruta de pan) no es una excepción, tiene más de 130 compuestos identificados en varios órganos del árbol, más de 70 de los cuales se derivan de la ruta de fenilpropanoides (Tara Kamal *et al.*, 2012).

Varios estudios han sugerido que las plantas son fuentes potenciales de agente antioxidante natural que juegan un papel importante en la salud humana, tales como la prevención de los daños oxidativos y reducir los riesgos de enfermedades crónicas (Tara Kamal *et al.*, 2012).

La especie *A. altilis* “árbol de fruta de pan”, deriva su nombre por su sabor semejante al pan, y porque en algunos países tropicales es usado como sustituto de este producto. Es un alimento energético con un porcentaje alto de carbohidratos (20 a 35%), rico en calcio, hierro, fósforo y vitaminas C y B. Cuando se hace relación a los árboles que son una verdadera fuente de vida, se tiene que incluir, necesariamente al árbol del pan, por su utilidad e importancia como: alimento humano y animal, planta ornamental, medicinal, protectora de aguas y suelos, maderable, fuente de fibra, y como origen de tantos otros beneficios que le han dado visa de residente en muchos de los países tropicales del mundo (Gómez, 2009).

1.3 Descripción botánica de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg.

En general, los árboles de fruta de pan son grandes entre 15 y 20 metros de altura, de hojas perennes, (Fotografía 1 y 2a). El árbol tiene una corteza lisa, de color claro, pudiendo volverse oscuro por la exposición al aire; y el tronco puede ser de hasta 1,2 m de diámetro, a veces crece hasta una altura de 4 m antes de ramificar. El látex está presente en todas las partes del árbol (Fotografía 2b). Dos estípulas grandes encierran la yema terminal (Ragone, 1997).



Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Moraceae
Género	<i>Artocarpus</i>
Especie	<i>Artocarpus altilis</i>

Fotografía 1: Árbol *A. altilis*, descripción botánica.

Fuente: Autora

(Ragone, 1997)



(a)



(b)

Fotografía 2: (a) Árbol (15-20m altura), y (b) corte de *A. altilis* (látex).

Fuente: Autora.

Las hojas son gruesas y coriáceas con una parte superior de color verde oscuro brillante. La parte inferior es oscura con un nervio central elevado y venas principales. Las hojas varían en tamaño y forma incluso en el mismo árbol, mayoritariamente van de ovaladas a obovadas. Las hojas son a veces suaves, pero a menudo están cubiertas de unos pocos a muchos pelos de color rojizo pálido, especialmente en el nervio central y las venas (Ver fotografía 3) (Ragone, 1997).



Fotografía 3: Hojas *A. altilis*.
Fuente: Autora.

El fruto es una estructura altamente especializada, un sincarpo, están unidas al eje de la fruta o núcleo de 1500-2000 flores. El núcleo contiene numerosos tubos del látex y haces vasculares grandes que se decoloran rápidamente en un pequeño corte, debido a la actividad enzimática oxidativa. La mayor parte de la fruta se forma a partir del perianto persistente de cada flor (Ragone & Cavaletto, 2006). A medida que el fruto se desarrolla, el perianto crece vigorosamente y se convierte en carnoso en la madurez, que forma la porción comestible de la fruta. La corteza dura de la fruta se compone de cinco discos de siete lados, cada uno de la superficie de una flor individual. La corteza es generalmente teñida con exudaciones del látex en la madurez. Presenta pequeñas espinas en toda la corteza (Ragone, 1997) (Fotografía 4).



Fotografía 4: Fruto *A. altilis*.
Fuente: Autora.

1.4 Utilidad de *Artocarpus altilis*.

A. altilis es una especie de árbol de usos múltiples que proporcionan alimentos, medicinas, materiales para elaboración de ropa, materiales de construcción y alimentos para animales. Es un componente importante de los sistemas agroforestales tradicionales en las Islas del

Pacífico; ellos dependen en gran medida de las materias primas del árbol del pan, pero en los últimos 100 años los materiales fabricados han suplantado el uso de materiales tradicionales. La madera de los árboles de fruta de pan es ligero y duradero, en general, se utiliza para la construcción de casas y canoas debido a su resistencia a las termitas y gusanos marinos. Además la madera se utiliza para hacer vasijas, esculturas, muebles y otros artículos. Los troncos secos son una fuente importante de leña en las islas (Ragone & Cavaletto, 2006).

1.4.1 Corteza interna (líber).

Esta capa interior de la corteza, en la antigüedad se la ha utilizado para hacer tela, que era conocida como “*tapa*”. Esta tela tradicionalmente tenía usos ceremoniales y rituales, además se utilizaba para elaboración de ropa de cama y otras prendas de vestir, tales como capas, taparrabos y túnicas (Ragone & Cavaletto, 2006).

En la actualidad todavía se utiliza la “*tapa*” en algunas zonas de Melanesia y las Marquesas, como arneses para las presas de agua y redes para capturar tiburones (Ragone & Cavaletto, 2006).

1.4.2 Hojas y flores.

Las hojas son ampliamente utilizadas para envolver alimentos para cocinar o servir. Las hojas se utilizan incluso para fabricar redes de pesca para atrapar peces en los arrecifes. Las hojas han servido como alimento para el ganado doméstico, y pueden ser alimentados, además, bovinos, caprinos, cerdos y caballos. Los caballos también se comen la corteza, ramas y brotes de árboles jóvenes (Ragone & Cavaletto, 2006).

En algunos países Asiáticos, a las flores las tuestan para frotarlas en las encías para aliviar el dolor de muelas. En Vanuatu y Hawai, las flores duras y secas son quemadas para utilizarlas como repelente de mosquitos (Ragone & Cavaletto, 2006).

1.4.3 Látex.

El “*pegajoso*” látex tiene muchos usos. Se utiliza como goma de mascar en el Caribe y en otros lugares. El látex de los árboles del pan se utiliza para recubrir canoas para hacerlas herméticas y se puede utilizar para sellar y preparar las superficies de madera cuando vayan a ser pintadas. La savia se utiliza ampliamente en todo el Pacífico y otras áreas como liga para la captura de aves para la alimentación (Ragone & Cavaletto, 2006).

1.4.4 Usos medicinales.

La investigación sobre la eficacia de los extractos de fruta de pan de varias partes de la planta ha mostrado resultados prometedores (Ragone, 1997).

El látex y la corteza, tienen varios usos medicinales tradicionales. El látex es utilizado para dar masajes en la piel para tratar los dolores de huesos y esguinces, además se coloca y se venda la columna para aliviar la ciática (Figura 1). Se utiliza comúnmente para tratar enfermedades de la piel y enfermedades de hongos como la candidiasis, además se trata con hojas machacadas. El látex diluido se toma para el tratamiento de la diarrea, dolores de estómago y la disentería. El látex y el jugo de las hojas trituradas son utilizadas tradicionalmente para tratar infecciones del oído en las islas del Pacífico (Ragone, 1997).

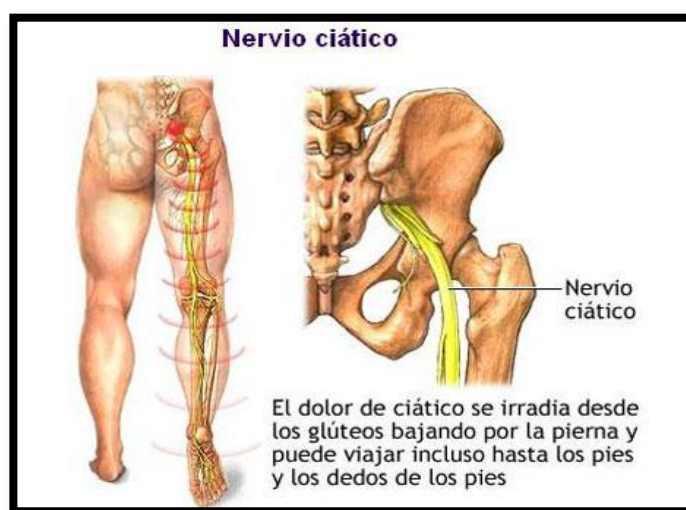


Figura 1: Enfermedad de la ciática.
Fuente: Diaria, 2014.

Tradicionalmente, las hojas se utilizan para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades como la cirrosis hepática, la hipertensión y la diabetes, además tiene actividad antifúngica y antibacteriana. Científicamente, se han notificado algunas de las actividades biológicas del extracto de esta planta. El extracto de hojas en MeOH-CH₂CL₂ ha demostrado tener actividad en un ensayo de inhibición de la catepsina K, siendo una opción potencial de tratamiento para la osteoporosis. El extracto de acetona de las hojas mostró un efecto inhibitor sobre la actividad 5 α -reductasa que podría hacerlo útil para el tratamiento selectivo de la hiperplasia benigna de próstata y cáncer de próstata (Enos *et al.*, 2009).

También se ha demostrado que alivia los síntomas de la diabetes mellitus y problemas urinarios. Recientemente, un estudio mostró que el extracto de AcOEt de las hojas tiene efectos citotóxicos en algunas líneas celulares de cáncer humano, incluyendo

adenocarcinoma de pulmón humano (células SPC-A-1), carcinoma de colon humano (células SW-480), y carcinoma hepatocelular humano (células SMMC -7.721), lo que indica que el extracto puede ser un agente potencial contra el cáncer (Enos *et al.*, 2009).

En un estudio realizado en Malasia sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de hojas de *A. altilis*, demostró que las hojas siendo maceradas con éter de petróleo, CHCl₃, EtOH, MeOH y utilizando bacterias gram positivas, gram negativas y hongos, y para control utilizaron amoxicilina y fluconazol demostró que los extractos metanólico y etanólico son un gran potencial antibacteriano y antifúngico para la mayor parte de microorganismos a excepción de *C. difteria*, *S. epidermidis*, *C. tropicalis* (Vasugi *et al.*, 2012).

En Indonesia de igual manera se trabajó con *A. altilis*, siendo el propósito en este caso, evaluar las propiedades anticancerígenas del extracto de éter dietílico, obtenido de la madera (Figura 2). En donde el extracto fue ensayado en células de cáncer de mama humano T47D y se examinó su efecto sobre la viabilidad celular, la morfología nuclear y la formación de sub-G1. Los datos obtenidos demostraron que el extracto de la madera de *A. altilis* induce apoptosis y formación de la fase sub-G1 en las células del cáncer de mama (T47D), y por lo tanto, tiene un potencial agente anti-cancerígeno (Enos *et al.*, 2009).



Figura 2: Hojas de *A. altilis* han mostrado actividad anticancerígena.
Fuente: Enos *et al.*, 2009.

La raíz es astringente y se utiliza como un purgante; también se las macera y elabora una cataplasma para tratar enfermedades de la piel. En varias islas del Pacífico la corteza se utiliza para tratar los dolores de cabeza (Ragone, 1997).

1.5 Antioxidantes.

Un antioxidante biológico se ha definido como “cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidable, previene significativamente o retrasa la oxidación de dicho sustrato” (Benzie & Strain, 1996). Es un ingrediente que protege la calidad de los alimentos (Abdalla *et al.*, 2007) y neutraliza la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre (Finkel & Holbrook, 2000).

Hay evidencias que sustentan el papel patogénico de los radicales libres en procesos biológicos, mostrando la relación entre la incidencia de enfermedades inflamatorias y degenerativas y las bajas concentraciones de antioxidantes en la sangre (Sohal & Weindruch, 1996), los que pueden ser modificados al aumentar su ingesta (Avello & Suwalsky, 2006).

1.5.1 Beneficios de los antioxidantes.

Entre las actividades fisiológicas de los antioxidantes naturales se encuentra: actividad antibacteriana, antiviral, antimutagénica, antialérgica, anticarcinogénica, inhibidora del incremento de la presión arterial, anti úlcera, anticariogénica, y antifúngica, todas derivadas del estrés oxidativo (Conde, 2009). En la Figura 3 se aprecia la manera de actuar de los antioxidantes, en dónde éstos neutralizan la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones.

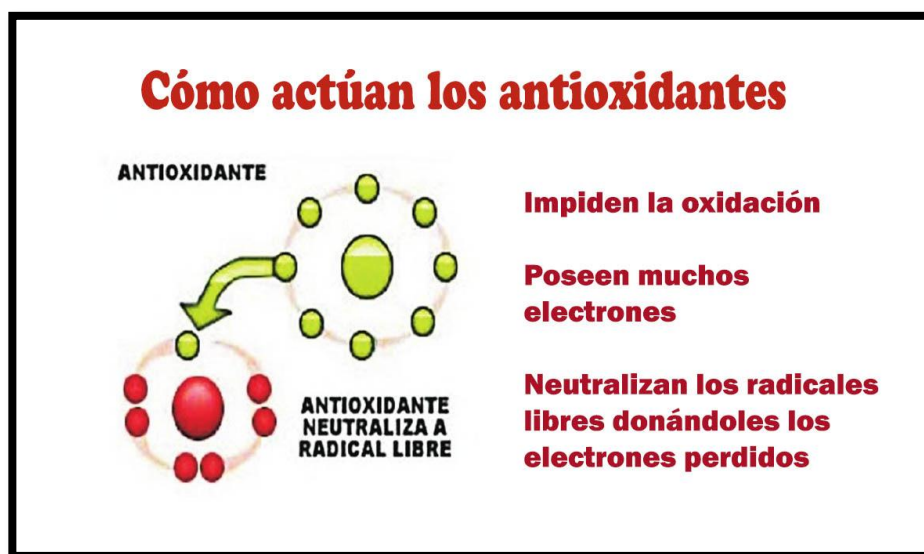


Figura 3: Función de los antioxidantes.
Fuente: Verástegui, 2013.

Los métodos que se utilizaron en esta investigación son:

- ✓ **ABTS:** llamado así por el reactivo 2,2-azinobis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), mide la capacidad de los antioxidantes naturales de eliminar radicales libres. Este ensayo se basa en la activación de metmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir el radical catiónico, cuando hayan o no antioxidantes. El ABTS en sistemas lipofílicos, puede ser utilizado para estudiar los efectos de protección de antioxidantes liposolubles en lípidos, simplificando así el ensayo. Se han encontrado que algunos compuestos que tienen actividad captadora con ABTS, no muestran la misma actividad con el radical DPPH (Vintimilla, 2013).
- ✓ **DPPH:** llamado así por el reactivo 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl. Es un método rápido y sencillo, se basa en la medición de eliminación de radicales libres de los compuestos antioxidantes con DPPH. Es adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos y extractos vegetales, en este método el radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade al contenido de la muestra sustancias antioxidantes. El DPPH puede obtenerse directamente a diferencia del ABTS, que es generado tras una reacción química, enzimática o electroquímica y mientras más antioxidante sea la muestra, menor será su valor (Vintimilla, 2013).

1.6 Metabolismo primario y secundario.

Los compuestos orgánicos que se encuentran en los organismos vivos se pueden dividir a grandes rasgos, aunque no de manera absoluta y excluyente, en dos tipos principales: metabolitos primarios y secundarios. Los primeros son, con mucho, los más abundantes y se denominan así por constituir la base fundamental y común de los procesos vitales: son las proteínas, los ácidos nucleicos y los tipos más frecuentes de carbohidratos y lípidos, y se encuentran sin excepción en todo tipo de organismo viviente. Por el contrario, los metabolitos secundarios se dan de manera restringida, generalmente en pequeñas cantidades, en ciertos tipos concretos de organismos y no en otros. Como su nombre indica, no son esenciales para la vida como tal, aunque eso no excluye la posibilidad de que pueda ser de gran utilidad para el organismo particular que los produce (Marco, 2006).

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos

polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas (Bruneton, 2001).

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Bruneton, 2001).

Es importante destacar que también reciben la denominación de *productos naturales* y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (Marco, 2006).

1.6.1 Terpenos.

Los terpenos son una clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno (o 2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. Constituyen el mayor grupo de metabolitos secundarios insolubles en agua y biosintetizados a partir del acetil Co A. Son toxinas y repelentes para un gran número de insectos y microorganismos patógenos que se alimentan de las plantas, de forma que desempeñan un importante papel defensivo en el reino vegetal (Llerena, 2011).

1.6.2 Sesquiterpenos.

El número de esqueletos carbonados sesquiterpénicos conocidos hasta la fecha (>200) es el más elevado de entre los terpenos (Marco, 2006). Gran número de sesquiterpenos son constituyentes habituales de los aceites esenciales de vegetales superiores y, en calidad de tales, pueden intervenir en las propiedades farmacológicas atribuidas a estas fracciones volátiles (Bruneton, 2001).

1.6.3 Ácidos Grasos.

Los ácidos grasos naturales son, en la mayor parte de los casos, ácidos carboxílicos saturados lineales de número par de átomos de carbono (Figura 4). También los hay de número impar, si bien en menor abundancia relativa. Un cierto porcentaje de ellos contiene uno o varios enlaces múltiples carbono-carbono, generalmente de tipo C=C o, menos frecuentemente, C≡C. No es rara tampoco la presencia de funciones hidroxilo, carbonilo o

epóxido en la mitad de la cadena carbonada. Se conocen también ácidos grasos de cadena ramificada, pero su abundancia relativa es comparativamente menor. Muchos ácidos carboxílicos saturados lineales y algunos insaturados lineales y algunos insaturados son compuestos aislados y conocidos desde hace bastante tiempo, por lo que es corriente conocerlos aun hoy en día por sus nombres “triviales” (sin nomenclatura IUPAC) (Marco, 2006).

Los ácidos grasos saturados son líquidos o bien, para cadenas de 12 o más carbonos, sólidos de aspecto céreo y bajo punto de fusión, que solamente se disuelven bien en disolventes orgánicos, particularmente los de baja polaridad (hexano, tolueno, éter, etc.). La hidrofobia de las cadenas alifáticas proviene del hecho de que éstas interactúan con otras moléculas fundamentalmente mediante fuerzas de tipo London-Van der Waals, mientras que las moléculas de agua interactúan con fuerzas de tipo iónico dipolar o por puentes de hidrógeno. Como consecuencia, la interacción recíproca de las moléculas de tipo alifático, por un lado, y de las de agua, por otro, es más fuerte que las de las moléculas de un tipo con las del otro, por lo que unas y otras no se mezclan. Ni siquiera el efecto entrópico favorable que acompaña a la formación de toda mezcla es capaz de compensar en este caso el efecto entálpico desfavorable (Marco, 2006).

La introducción de enlaces C=C en la cadena suele ir asociada a un marcado descenso en el punto de fusión, con lo cual muchos ácidos insaturados, incluso de 18 carbonos, son líquidos (aceites) a temperatura ambiente. Por el contrario, la introducción de enlaces C≡C o de grupos funcionales suele dar lugar a aumentos en el punto de fusión (Marco, 2006).

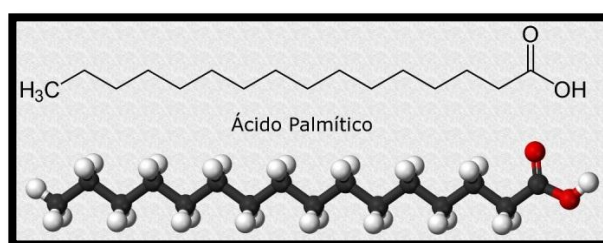


Figura 4: Estructura lineal de un ácido (palmítico).
Fuente: Porto, 2013.

1.7 Cromatografía.

La cromatografía es un método de separación de diferentes componentes de una muestra, este método logra la separación de los mismos a través del paso de una muestra por una fase estacionaria con la ayuda de la fase móvil, cada componente de la muestra tiene propiedades particulares que permitirá su interacción en forma diferente entre la fase

estacionaria y móvil, de esta forma cada componente se retrasa en forma particular, las características de la fase estacionaria y móvil y la longitud de la columna son las adecuadas se lograra la separación completa de todos los componentes de la muestra (Harris, 2007).

El objetivo principal de un estudio cromatográfico es lograr la separación de todos los componentes en una muestra, para ello es necesario jugar con una serie de factores cromatográficos, es por ello que es necesario conocer cómo están relacionados los diferentes factores experimentales con las ecuaciones cromatográficas (Harris, 2007).

1.7.1 Cromatografía en capa fina (CCF).

Consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de absorbente, retenida sobre una superficie plana. En ésta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílice, alúmina, etc.) distribuido uniformemente sobre una placa de vidrio o de aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente va a migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después de que ha ocurrido, se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada (Sharapin, 2000). En la fotografía 5 podemos apreciar una CCF corrida en Hex-AcOEt 6:4 (v/v) y revelada con ácido sulfúrico 5% y vainillina, de una muestra del látex, disuelta en EtOH.



Fotografía 5:
CCF látex, Hex-AcOEt 6:4 (v/v).
Fuente: Autora.

1.7.1.1 Factor de retención (R_f).

El factor de retención es la medida de la migración de una sustancia determinada en un solvente dado (Sharapin, 2000).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

1.7.2 Cromatografía en columna (CC).

La cromatografía en columna se usa para separar grandes cantidades de material: >100 mg. El proceso de cromatografía consta de una fase móvil (eluyente) y una fase estacionaria (adsorbente), los cuales dependen de las sustancias que se desee separar, los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones, los más polares quedan más retenidos y para que salgan generalmente hace falta aumentar la polaridad del disolvente. El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna se llama tiempo de retención (Clement, 2002).

1.7.3 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas.

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando se analiza muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, CG (“Cromatografía de Gases”) y EM (“Espectrometría de Masas”) da lugar a una técnica combinada CG-EM que permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez & Droguet, 2002).

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 (Gutiérrez & Droguet, 2002).

1.8 Resonancia Magnética Nuclear.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos. La resonancia magnética nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno y carbono. Los electrones van a producir modificaciones, débiles pero observables, siendo esos efectos electrónicos los que darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento, permitiendo así el estudio detallado de la estructura electrónica de las moléculas, razón del éxito de la RMN en química orgánica. Un espectrómetro de RMN consiste esencialmente en un imán, un emisor de radiofrecuencia y un detector de radiofrecuencia (Elguero *et al.*, 2011).

Por lo anteriormente dicho, ésta es 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 (Elguero *et al.*, 2011).

CAPITULO II
METODOLOGÍA

El desarrollo de esta investigación se la realizó en los Laboratorios del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja. En la Figura 5 se puede observar la metodología empleada.

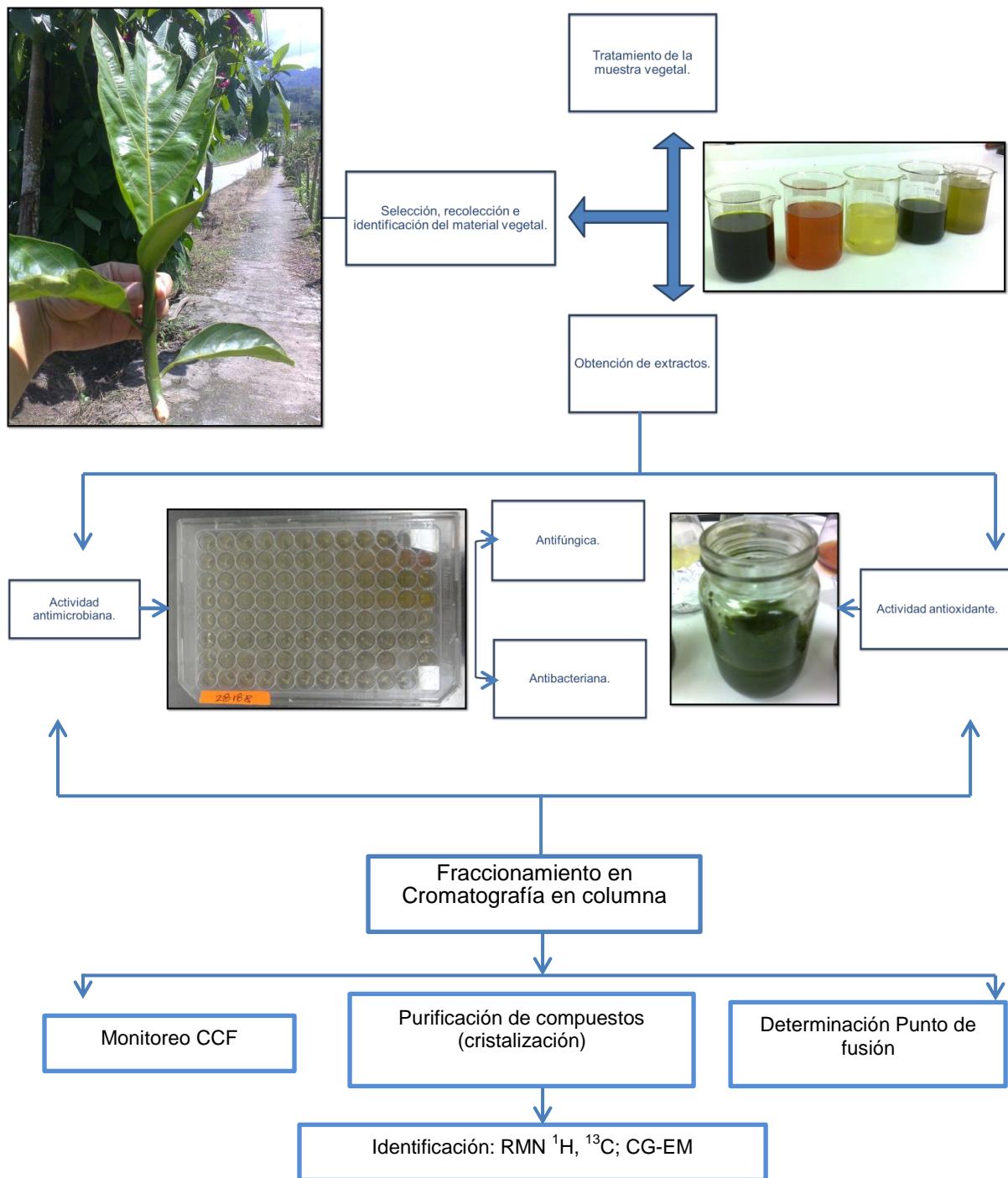


Figura 5. Esquema representativo de la metodología empleada.
Fuente: Autora.

2.1 Tratamiento de la muestra vegetal.

2.1.1 Selección y recolección de material vegetal.

Se recolectó hojas, raíces y látex de *A. atilis* en enero de 2013 en el Hostal Sol y Selva del barrio Rancho Alegre perteneciente a la parroquia Cumbaratza de la Provincia de Zamora Chinchipe, con coordenadas geográficas 3°58' 9.56" S - 78°51' 38.52" O a 970 m.s.n.m. En la Figura 6 se aprecia los datos de ubicación.

La caracterización botánica se la realizó en el Herbario Loja de la Universidad Nacional de Loja (UNL), con el curador Bolívar Merino. Y la muestra se almacenó en el herbario de la UTPL con voucher número PPN-MO-003.

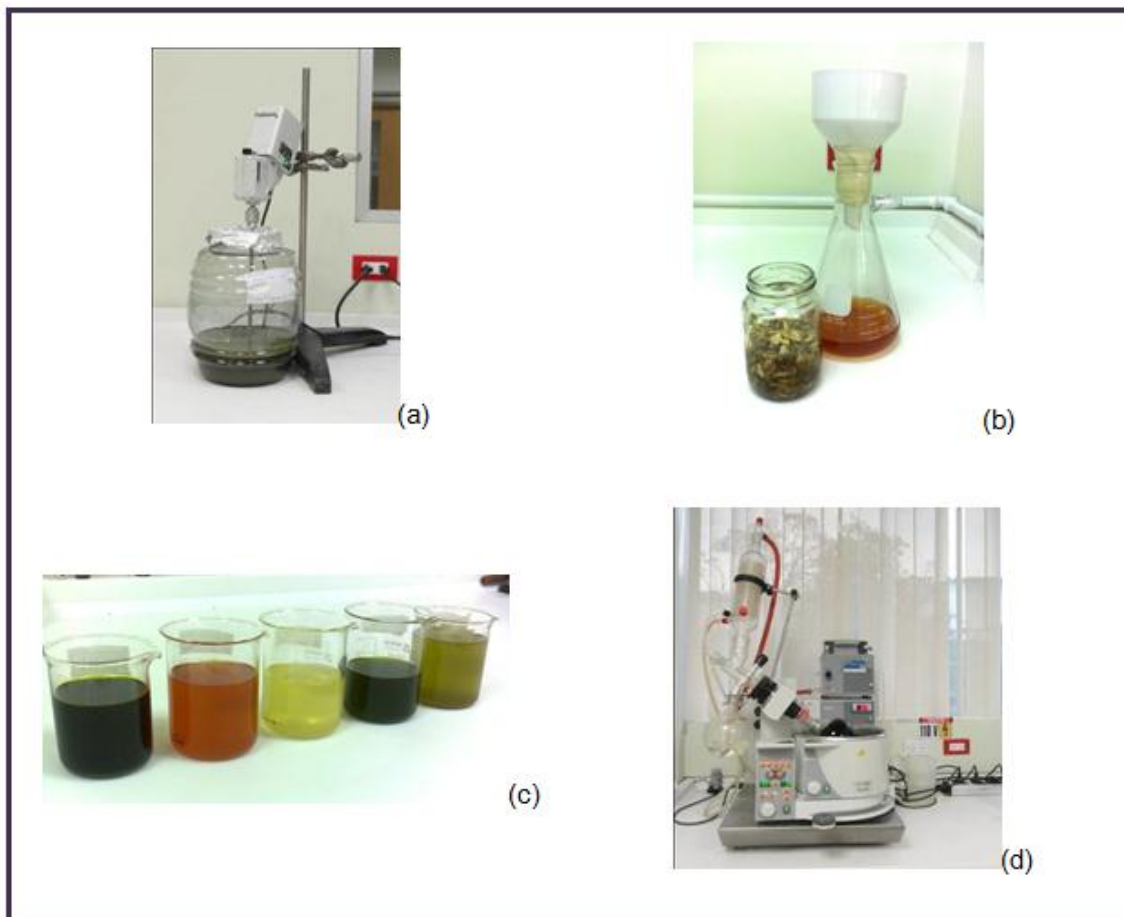
El material vegetal obtenido fue colocado en un cuarto de secado durante 5 días a 32°C; se eliminaron las impurezas, y se obtuvo un total 1770.66 g de hojas y 100 g de raíz.



Figura 6. Mapa e información de lugar de recolección.
Fuente: Gobierno Provincial de Zamora Chinchipe, 2014.

2.1.2 Obtención de extractos.

El material seco fue triturado; y a partir de 750 g (hojas) y 100 g (raíces), se procedió a extraer los extractos mediante maceración dinámica durante 3-4 horas, se filtró al vacío y con ayuda de un rotaevaporador a presión reducida y temperatura moderada (30-35°C), se obtuvieron los extractos de Hex, CH₂CL₂, AcOEt y MeOH, para las hojas mientras que para las raíces se utilizaron los solventes: Hex, AcOEt y MeOH (Fotografía 6).



Fotografía 6: (a) Maceración dinámica, (b) Filtrado, (c) Extractos, (d) Evaporación de disolvente.
Fuente: Autora.

El látex (30 g) fue sometido a liofilización por su alto contenido de agua, obteniéndose 7.5 g.

2.1.2.1 Desclorofilación del extracto de AcOEt.

El extracto de AcOEt (21 g) fue sometido a un proceso de desclorofilado. Se utilizó placas de CCF para determinar la mejor relación de fraccionamiento. El extracto fue disuelto en mezclas de MeOH-H₂O en proporción 8:2 (v/v); y, se pasó a través de una columna SPE

Discovery-18 60 mL de 10 g, el solvente se eliminó por rota evaporación y se obtuvo 12,694 g de extracto de AcOEt desclorofilado.

2.2 Aislamiento de metabolitos secundarios.

2.2.1 Determinación de extractos.

Cada extracto fue monitoreado mediante cromatografía de capa fina, con la finalidad de escoger el mejor extracto para aislar los metabolitos secundarios, además se realizó pruebas microbiológicas y antioxidantes (DPPH y ABTS).

2.2.2 Pruebas microbiológicas. Microdilución en caldo (CMI).

2.2.2.1 Determinación de actividad antifúngica.

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

Para disolver los extractos, se diluyeron 20 mg de muestra en 1000 µL de Dimetil-sulfoxido (DMSO). Se utilizó el ultrasonido para disolver completamente las muestras.

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos, utilizando el procedimiento de dilución doble seriado, así:

Se colocaron 180 µL de caldo Sabouraud al primer pocillo y 100 µL a todos los pocillos restantes, luego se adicionó 20 µL de la dilución de los extractos: Hojas (Hex, CH₂CL₂, AcOEt total, AcOEt desclorofilado, MeOH) Raíces (Hex, AcOEt, MeOH); seguidamente se realizaron diluciones seriadas, tomando 100 µL del primer pocillo y diluyendo con 100 µL del pocillo siguiente, se continuó diluyendo hasta la obtención de 8 diluciones consecutivas (al finalizar se desechó 100 µL de la dilución). El procedimiento fue el mismo para el control de esterilidad (200 µL de caldo Sabouraud), control negativo (180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL DMSO), y control positivo (180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de Itraconazol). Se incubó a 30°C durante 72 horas.

2.2.2.2 Determinación de actividad antibacteriana.

Para la evaluación de la susceptibilidad antibacteriana se emplearon 6 tipos de bacterias: Gram positivas: *Staphylococcus aureus (Sa)* ATCC® 25923 y *Enterococcus faecalis (Ef)*

ATCC® 29212; Gram negativas: *Proteus vulgaris* (Pv) ATCC® 8427, *Escherichia coli* (Ec) ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* (St) LT2 y *Klebsiella pneumonia* (Kp) ATCC® 9997.

Para disolver los extractos, se diluyeron 20 mg de muestra en 1000 µL de Dimetil-sulfoxido (DMSO). Se utilizó el ultrasonido para disolver completamente las muestras.

Preparación del cultivo bacteriano (overnight).

El cultivo overnight se preparó 24 horas antes iniciar el análisis correspondiente, esto a partir de los microorganismos que se encontraban en reserva criogénica a -80°C.

Del cultivo overnight se tomaron 150-300 µL en 7 mL de suero fisiológico, de esta suspensión se tomó 140 µL y se inoculó en 7 mL de caldo Müller-Hinton ajustado a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/mL. Se utilizó 100 µL de esta suspensión para completar a 200 µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajustó la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL.

Ensayo.

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución de doble seriada: así:

Se colocaron 180 µL de caldo Müller Hinton al primer pocillo y 100 µL a los pocillos restantes, luego se adicionó 20 µL de extracto diluido en DMSO en los pocillos de la fila A, después se realizó diluciones seriadas tomando 100 µL del primer pocillo de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B y se continúa hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se siguió el mismo proceso para el control de esterilidad (180 µL de caldo Müller Hinton + 10 µL de extracto diluido), control negativo (DMSO), y para el control positivo (180 µL de caldo Müller Hinton + 20 µL de Gentamicina® (1 mg/mL para Gram -) (4 mg/mL para Gram +)).

Después de preparada la placa se inocularon todos los pocillos con 100 µL de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200 µL en la placa de cultivo. Se sellaron las placas y se incubó a 37°C durante 24 horas.

2.2.3 Determinación de actividad antioxidante.

Para la realización de la actividad antioxidante, mediante los dos métodos, se requirió llevar a los extractos a una concentración de 1000 ppm cada uno; sin embargo se diluyó, a algunos, a 500 ppm para el método ABTS, ya que su absorbancia fue negativa en 1000 ppm. Las concentraciones se observan en la tabla siguiente:

Tabla 1: Concentración de extractos para cada método de actividad antioxidante.

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN	
	DPPH	ABTS
Hojas MeOH	1000 ppm	1000 ppm
Raíces Hex	1000 ppm	1000 ppm
Hojas Hex	1000 ppm	1000 ppm
Hojas CH ₂ CL ₂	1000 ppm	500 ppm
Hojas AcOEt	1000 ppm	500 ppm
Hojas AcOEt des	1000 ppm	500 ppm
Raíces AcOEt	1000 ppm	500 ppm
Raíces MeOH	1000 ppm	500 ppm

Fuente: Autora

El trólox es el estándar de referencia que se utilizó para hacer reaccionar a la muestra en ambos métodos (Prakash, 2001).

2.2.3.1 Método DPPH.

El ensayo de DPPH se realizó basándose en la técnica de Bran-Williams *et al.* (1995), con algunas modificaciones descritas por Thaipong *et al.* (2006). Se preparó una solución patrón disolviendo 24 mg de DPPH en 100 mL de metanol, la misma que fue almacenada a -4 °C hasta su uso. La solución de trabajo se preparó mezclando 10 mL de solución patrón con 45 mL de metanol hasta obtener una lectura en absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ unidades a una longitud de onda de 515 nm en un espectrómetro UV. Se emplearon curvas estándar de trólox con concentraciones entre 25 – 800 μ Moles. De cada concentración así como de cada muestra de extracto se tomó 150 μ L en un vial, se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo de DPPH y se dejó reaccionar por 24 horas en la obscuridad a temperatura ambiente (Fotografía 7), para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados en μ Moles equivalentes de trólox por gramo de muestra seca (μ MolET/g MS). En el Anexo 6 se muestra un esquema detallado de la experimentación.

2.2.3.2 Método ABTS.

Se empleó la técnica de Arnao *et al.* (2001) con algunos ajustes descritos por Thaipong *et al.* (2006).

Se prepararon dos soluciones: 5 mL de ABTS (0,0074 Molar) y 5 mL persulfato de potasio (0,0026 Molar), la mezcla de estas se dejó reposar por 12 horas de tal forma que se obtuvo la solución patrón de ABTS, la solución de trabajo se preparó mezclando 1 mL de solución patrón con 60 mL de MeOH hasta obtener una lectura en absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ unidades a una longitud de onda de 734 nm en un espectrómetro UV. Se emplearon curvas estándar de trólox en concentraciones entre: 25 y 800 μM . De cada concentración así como de cada muestra de extracto se tomó 150 μL en un vial, se adicionó 2,85 mL de la solución trabajo de ABTS y se dejó reaccionar por 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Los resultados fueron expresados en μMoles equivalentes de trólox por gramo de muestra seca ($\mu\text{MolET/g MS}$). Las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro de UV visible Helios β UVB091602 (Fotografía 7). En el Anexo 8 se muestra un esquema detallado de la experimentación.



Fotografía 7: Espectrofotómetro de UV visible Helios β UVB091602.
Fuente: Experimentación.

2.2.4 Preparación de columna.

Después de revisadas las placas de CCF de los respectivos extractos y los resultados de las pruebas microbiológicas se fraccionaron 4 columnas cromatográficas (húmedas); esto con los siguientes datos:

Tabla 2: Datos para preparación de columna cromatográfica.

Columnas/Extractos	Peso de la muestra (g)	Peso sílica gel (g)	Relación muestra/sílica gel	Polaridad inicial	Polaridad Final
Látex	7	315	1:45	Hex 100:0	MeOH 100:0
Hojas: AcOEt desclorofilado	3.5	350	1:100	Hex-AcOEt 90:10	MeOH 100:0
Hojas: CH ₂ CL ₂	3.5	350	1:100	Hex 100:0	MeOH 100:0
Raíces: MeOH	3.5	350	1:100	Hex 100:0	MeOH 100:0

Fuente: Autora.

Las columnas cromatográficas (húmedas) se las fraccionó con sílica gel Merck 0.015-0040 nm de diámetro, en columnas de vidrio de 55 mm de diámetro por 60 cm de altura (Fotografía 8). Las columnas húmedas se fraccionaron con sílica gel suspendida en disolvente, con compactación por presión.



Fotografía 8: Proceso montaje y fraccionamiento en columna.

Fuente: Experimentación.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Deshidratación del material vegetal.

El material vegetal recolectado fue secado a 32°C por 5 días, y se obtuvo un total de 1770.6 g de hojas y 100 g de raíz, secos. De éste material se utilizaron 750 g de hojas y los 100 g de raíces para obtener los extractos.

Los resultados del secado del material vegetal y el rendimiento se encuentran en la tabla 3, en la que se puede apreciar que la parte de *A. altilis* que mejor rendimiento ofreció fueron las raíces en comparación a las hojas y látex.

Tabla 3: Rendimiento del secado del material vegetal.

Parte de la planta	Peso inicial húmedo (g)	Peso final seco (g)	Rendimiento (%)
Hojas	7800	1770,66	22.70
Raíces	319	100	31.35
Látex	30	7.5 (liofilizado)	25

Fuente: Autora.

3.2 Obtención de extractos.

Se obtuvieron los extractos de Hex, CH₂CL₂, AcOEt y MeOH de hojas, y Hex, AcOEt y MeOH de raíces, esto a partir de 750 g y 100 g de material vegetal seco, respectivamente.

En la tabla 4 se puede observar que el extracto con mayor rendimiento, con respecto a las hojas, fue el de MeOH con 8.65 % frente a los extractos de Hex, CH₂CL₂, AcOEt; y, un 59.61% de rendimiento del extracto de AcOEt desclorofilado.

Tabla 4: Peso y rendimiento de cada extracto obtenido de la maceración de hojas de *A. altilis*.

Extracto	Color y consistencia del extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hex	Verde oscuro/sólido	23.58	3.14
CH₂CL₂	Verde oscuro/sólido	14.62	1.95
AcOEt	Verde oscuro/sólido	21.29	2.84
MeOH	Verde-amarillento/sólido	64.89	8.65
Extracto de AcOEt desclorofilado de la especie <i>A. altilis</i>.			
Extracto	Color y consistencia del extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
AcOEt desclorofilado	Marrón/sólido	12.69	59.61

Fuente: Autora.

En la tabla 5 se observa que de los extractos de las raíces, el que mejor rendimiento mostró fue el de MeOH con 5.8 % con respecto al de Hex y AcOEt.

Tabla 5: Peso y rendimiento de cada extracto obtenido de la maceración de raíces de *A. altilis*.

Extracto	Color y consistencia del extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hex	Café/semisólido	1.10	1.1
AcOEt	Ladrillo/sólido	3	3
MeOH	Rojizo/sólido	5.78	5.8

Fuente: Autora

Como se puede apreciar en la tabla 6, el rendimiento del látex fue de un 25 %, señalando de esta manera que en su composición se encuentra un 75 % de agua, el que fue eliminado gracias al proceso de liofilización.

Tabla 6: Peso y rendimiento del látex liofilizado a partir de *A. altilis*.

Látex	Peso seco liofilizado (g)	Rendimiento (%)	Color y consistencia
30 g (líquido)	7.5	25	Beige/sólido-pegajoso

Fuente: Autora

3.3 Aislamiento de metabolitos secundarios.

Se fraccionó cuatro columnas cromatográficas, con las especificaciones nombradas en la tabla 2, en la que se observa el peso de la muestra, peso de la sílica, la relación sílica-muestra y finalmente la polaridad en la que se inició la elución.

En la tabla 7 se indica el número de fracciones obtenidas en cada columna cromatográfica, eluidas en el presente trabajo de investigación; cabe señalar que se eluyó con tres solventes de polaridad ascendente: Hex, AcOEt y MeOH.

Tabla 7: Número de fracciones obtenidas en el fraccionamiento en cromatografía en columna de los cuatro extractos.

Parte de <i>A. altilis</i>	Disolvente utilizado para maceración	Número de fracciones obtenidas
Látex	---	389
Hojas	AcOEt	267
Hojas	CH ₂ CL ₂	448
Raíces	MeOH	364

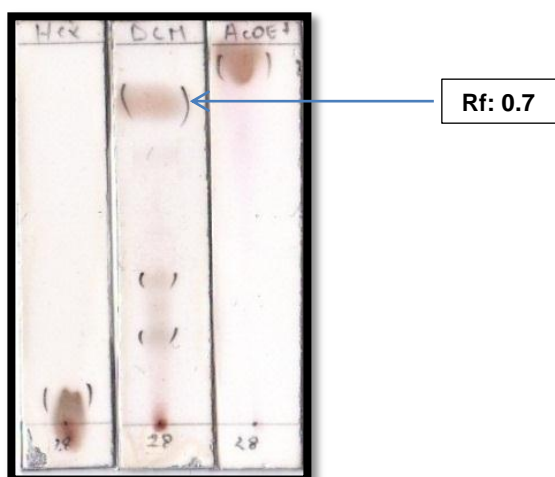
Fuente: Autora.

3.3.1 Compuestos aislados a partir de la columna cromatográfica del Látex.

A partir de la columna cromatográfica del látex se obtuvieron 389 fracciones; de éstas las fracciones: 28, 33, 35 y 39, presentaron características sólidas blanquecinas.

3.3.1.1 Fracción 28 (mezcla de triterpenos).

Esta fracción eluyó en Hex-AcOEt proporción 95:5, fue purificado con par-disolventes, se disolvió con CHCl_3 , se calentó y precipitó con MeOH frío, el precipitado se presentó en forma de gel. Éste precipitado se disolvió en CHCl_3 y en CCF se observó en luz UV una mancha de color violeta a 365 nm y oscura a 254 nm, en la fotografía 9 se observa al ser revelada con H_2SO_4 5% y vainillina en donde se presencié tres manchas de color anaranjadas-azules y Rf de mancha mayoritaria de 0.7.



Fotografía 9: CCF:Hex 100:00, Hex-AcOEt 8:2 y AcOEt de la fracción 28.
Fuente: Autora

Análisis de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) de la fracción 28.

El cromatograma de la fracción 28, indica la presencia de 5 compuestos, los cuales los podemos apreciar en la Figura 7.

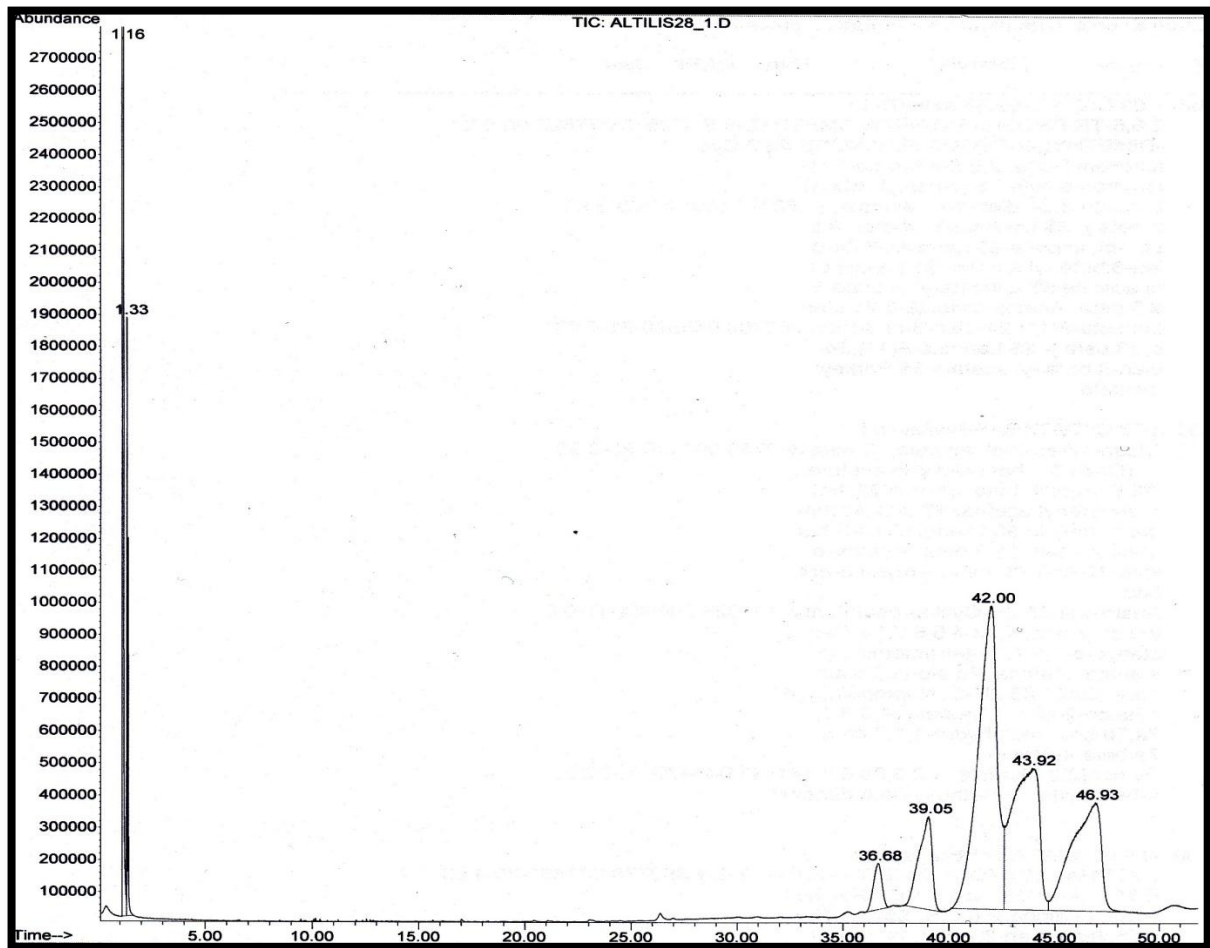


Figura 7: Cromatograma de la fracción 28.
Fuente: Cromatógrafo de gases serie 6890N.

Los datos sobre tiempo de retención, porcentaje de área relativo, porcentaje de probabilidad, e ión molecular para cada compuesto de esta mezcla se puede observar en la Tabla 8 a continuación:

Tabla 8. Datos CG de la fracción 28.

Compuesto	Tr	Área %	Qual %	Ión molecular (m/z)
Lanosterol acetato	36.68	2.69	94	468 [M] ⁺
β-Amirin acetato	39.05	8.38	93	468 [M] ⁺
Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester	42.00	39.93	92	468 [M] ⁺
Parkeol acetato	43.92	26.83	90	468 [M] ⁺
9,19-Cyclolanostan-3-ol, 24-methylene-, acetate, (3β)-	46.93	22.17	86	482 [M] ⁺

Fuente: Autora.

Se realizó la identificación preliminar de los compuestos mediante la comparación de los espectros de masas de cada compuesto con los espectros de masas de la base de Datos Wiley 7n.l, perteneciente al espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert; base de datos del NIST 2011 y bibliografía. Esto se puede apreciar en el Anexo 1. Se puede observar sus estructuras químicas en la Figura 8.

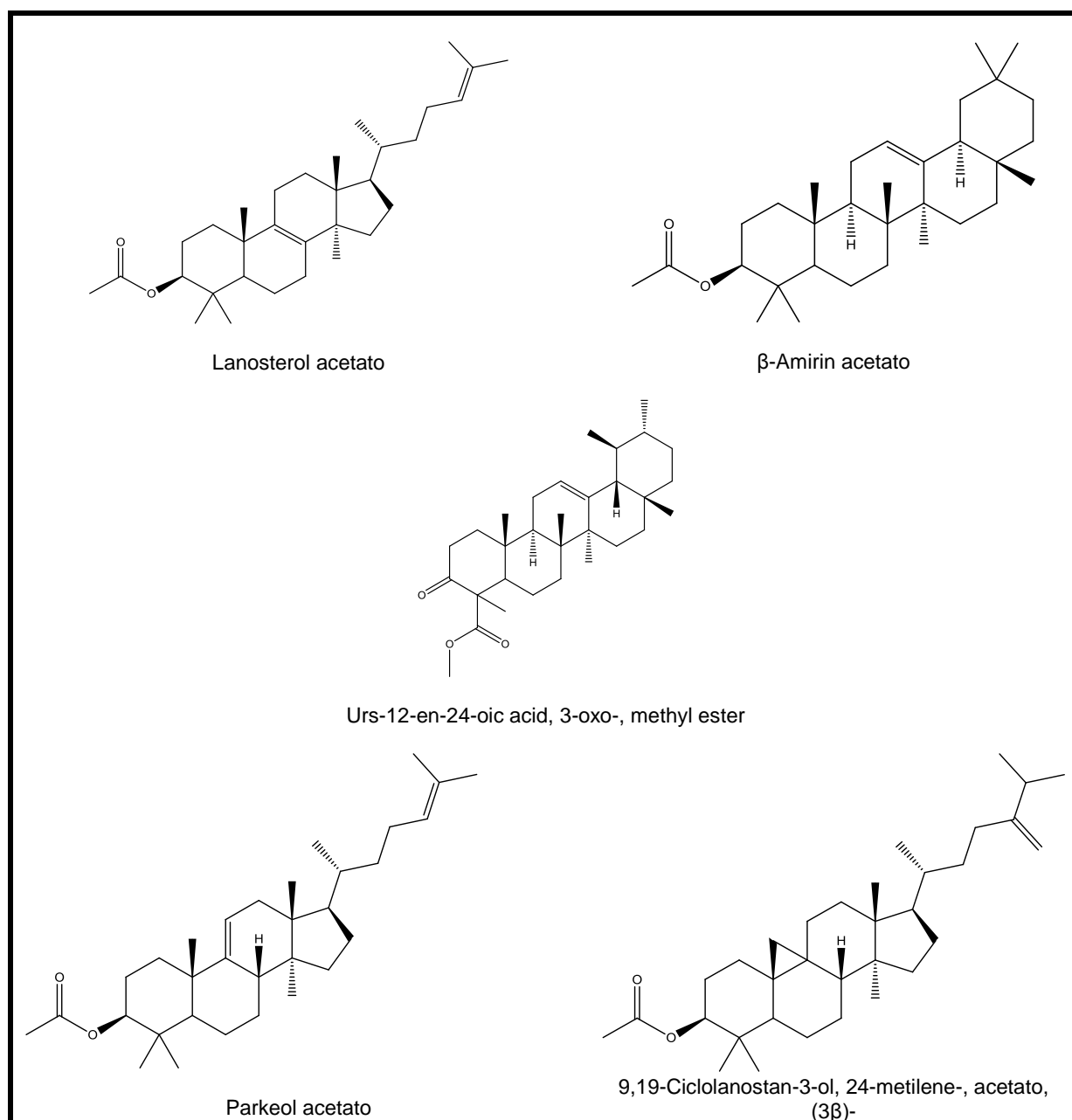


Figura 8: Estructura química de los compuestos identificados en la fracción 28.

Fuente: Autora. **Elaboración:** Programa ChemBioDraw Ultra 2009.

Sureshkumar (2013), pudo identificar mezclas de compuestos de la especie *Calotropis gigantea*, mediante CG-EM, entre ellos a los triterpenos: β -Amirin acetato, y 9,19-Ciclolano-3-ol, 24-metileno-, acetato, (3 β), a partir del extracto de cloroformo; y del

extracto de alcohol metílico a Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester; y Lanosterol acetato; todos estos compuestos le dan a esta especie la acción de anti inflamatoria, antioxidante y antidiarreica.

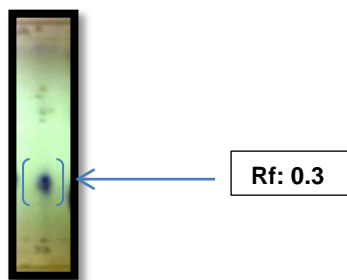
En la investigación realizada por Fabiyi *et al.*,(2012), Oyo-Ita *et al.*, (2010) se identifica al compuesto β -Amirin acetato que fue aislado de *Bridelia ferruginea* y *Elaeis guineensis*, respectivamente; además da resultados favorables como antidiabético, antiinflamatorio y antioxidante. De la misma manera Paterson (2006) consiguió caracterizar el compuesto 9,19-Ciclolanostan-3-ol, 24-metilene-, acetato, (3β)- que lo obtuvo del extracto de hojas de *Ganoderma sugae*, siendo su actividad primordial anticancerígena. El Parkeol acetato fue aislado de *Saccharomyces cereviceae* siendo bueno como antioxidante (Patiño *et al.*, 2011)

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias, además tienen importancia medicinal por sus propiedades anti carcinogénicas, anti ulcerosas, anti malariales, antimicrobianas, etc. (Robles, 2010).

Para la caracterización exacta de los compuestos aquí indicados se tiene que revisar el análisis de CG-EM obtenido y comparar con datos de estándares.

3.3.1.2 Fracción 33 (ácido hexadecanoico).

Este compuesto eluyó en Hex-AcOEt proporción 95:5, fue purificado con par-disolventes, se disolvió con CHCl_3 , se calentó y precipitó con MeOH frio, el precipitado fue de color blanco en forma de polvo fino granulado. Su punto de fusión fue 68-69 °C. En CCF se observó en luz UV una mancha de color violeta a 365 nm y oscura a 254 nm, y al ser revelada con H_2SO_4 5% y vainillina se presenció la mancha color púrpura con Rf 0.3 eluída en Hex-AcOEt (90:10) (Fotografía 10).



Fotografía 10:
CCF fracción 33.
Fuente: Autora

Análisis de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) de la fracción 33.

Los datos de **CG-EM** se observan en la Figura 9: tiempo de retención de 11.53 min, % área relativo de 0.35 y un pico de ión molecular de 256 m/z [M]⁺. La caracterización se realizó por medio de la comparación con datos bibliográficos (Benavides Calvache, 2004) y base de datos NIST 2011.

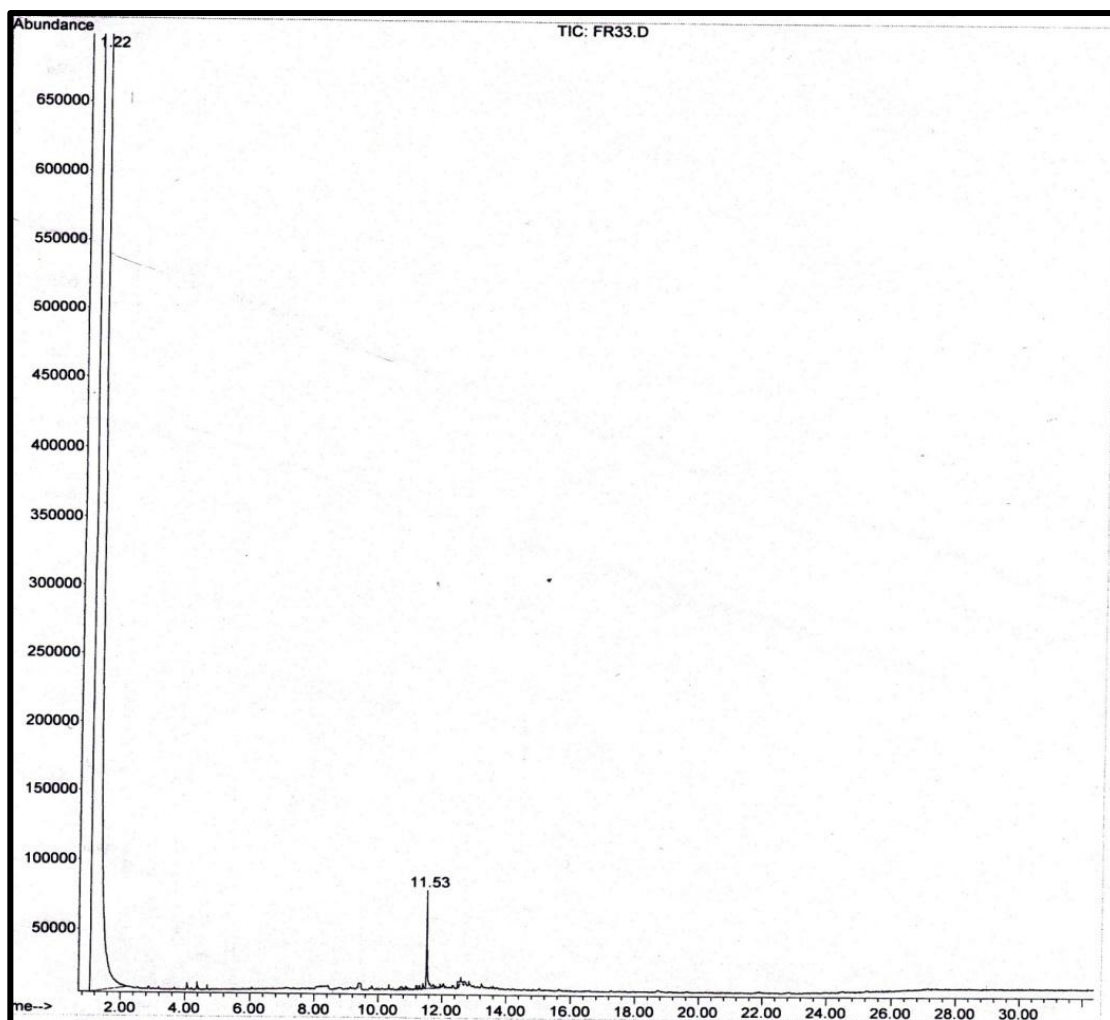


Figura 9: Cromatograma de la fracción 33.
Fuente: Cromatógrafo de gases serie 6890N.

Los dos átomos de oxígeno de la fórmula molecular pueden ser indicativo de la existencia de funciones alcohol, éter, ácido carboxílico, éster, entre otras. Debido a la alta intensidad del ion molecular (100%), se deduce que el espectro de masas corresponde a un ácido graso de cadena larga o un éster de ácido graso.

Según Benavides (2004), los iones de mayor estabilidad corresponden a los fragmentos oxigenados, los cuales además presentan una periodicidad consecuente con la fragmentación de la cadena debido a la eliminación de grupos metilenos, como es el caso de los picos a m/z 213, 129 y 73, los que indican una pérdida de 4, 10 y 14 metilenos respectivamente. Del anterior análisis se concluye que el compuesto es saturado y

corresponde al *ácido hexadecanoico (ácido palmítico)*; que concuerda con la base de datos del equipo del espectro CG-EM (Anexo 2.1), su estructura química se puede observar en la Figura 10.

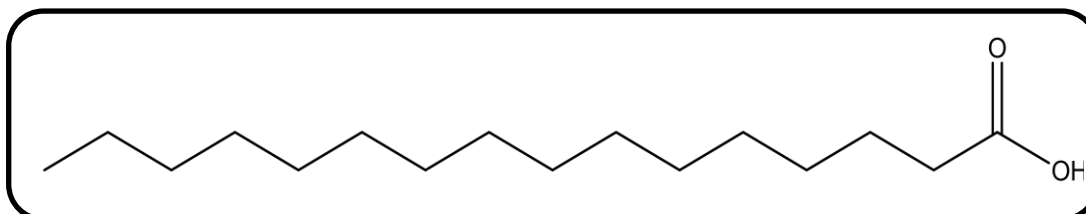


Figura 10: Estructura química del ácido hexadecanoico
Fuente: Autora. **Elaboración:** Programa ChemBioDraw Ultra 2009.

Análisis de RMN ¹H y ¹³C para la identificación del ácido hexadecanoico de la fracción 33.

Datos obtenidos: **RMN ¹H** (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.73-0.93 (m, 3H) 1.10-1.30 (m, 23H) 1.36 (br. S, 2H) 1.53 (dd, $J= 14.28, 6.85$ Hz, 3H) 2.22 (t, $J=7.43$ Hz, 1H) 2.31 (s, 1H).

RMN ¹³C (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 14.10 (s, 1C) 22.68 (s, 1C) 23.85 (s, 1C) 23.88 (s, 1C) 25.01 (s, 1C) 29.22 (s, 1C) 29.34 (s, 1C) 29.40 (s, 1C) 29.47 (s, 1C) 29.68 (s, 1C) 31.91 (s, 1C) 34.40 (s, 1C) 174.01 (s, 1C).

En el Anexo 2.2 se observan los desplazamientos de **RMN ¹H** (400 MHz, CHLOROFORM-*d*), en el cual se observa la señal del protón del grupo metileno (δ_H 0.88 ppm); además se observa una posible contaminación a δ_H 3.98 ppm que no corresponde al compuesto. El espectro de RMN ¹³C (101 MHz, CHLOROFORM-*d*), presenta señales en δ_C 174.19 ppm correspondiente al grupo carbonil (Anexo 2.3). En la tabla 9 se puede apreciar la comparación de los datos teóricos obtenidos con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2009.

Tabla 9: Datos RMN ¹H de los obtenidos en (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) y los de ácido hexadecanoico (ChemBioDraw Ultra).

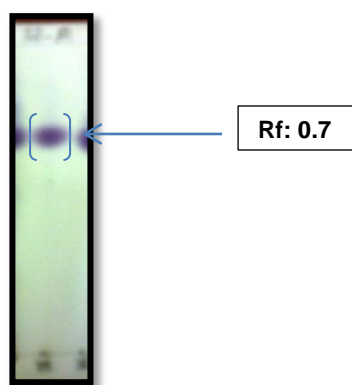
F: 33	Ácido hexadecanoico (ChemBioDraw Ultra)
0.73-093 (3H, m)	0.88 (3H, m)
1.10-1.30 (23H, m)	1.26 (23H, m)
1.36 (2H, s)	1.31 (2H, s)
1.53 (3H, dd)	1.52 (3H, dd)
2.22 (1H, t)	2.30 (2H, s)
2.31 (1H, s)	
3.98	11.0 (1H, s)

Fuente: Autora

Del anterior análisis se puede determinar con certeza que el compuesto aislado de la fracción 33 corresponde al ácido hexadecanoico.

3.3.1.3 Fracción 35 (mezcla de sesquiterpenos).

Esta fracción eluyó en Hex-AcOEt proporción 95:5, fue purificado con par-disolventes, se disolvió con CHCl_3 , se calentó y precipitó con MeOH frío, el precipitado fue de color blanco en forma de cristales amorfos. Su punto de fusión fue 60-65 °C. En CCF no se observó en luz UV, al ser revelada con H_2SO_4 5% y vainillina se presenció una mancha color morado y Rf de 0.7 en Hex-AcOEt (70:30) (Fotografía 11).



Fotografía 11:
CCF fracción 35.
Fuente: Autora.

Análisis de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) de la fracción 35.

El cromatograma de la fracción 35, indica la presencia de 2 compuestos mayoritarios, los cuales los podemos apreciar en la Figura 11.

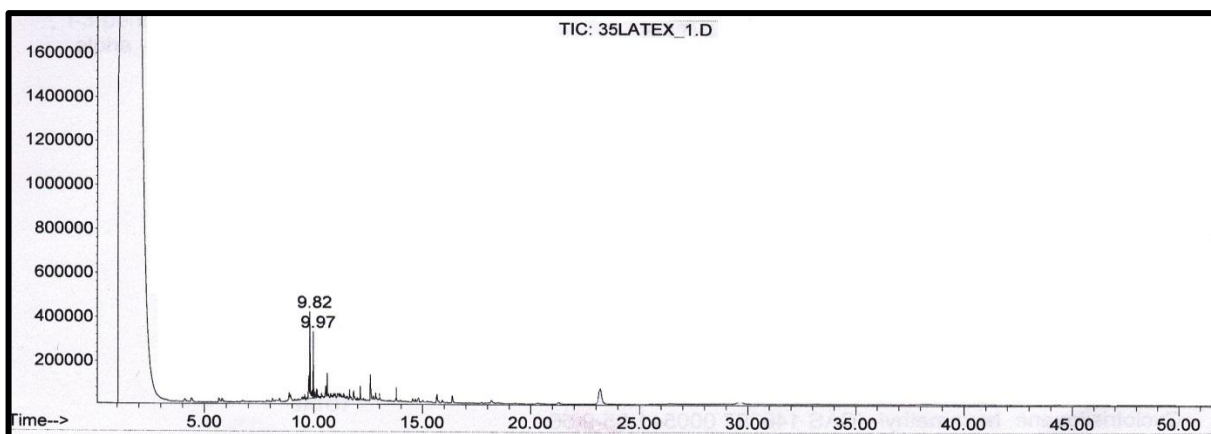


Figura 11: Cromatograma de la fracción 33.
Fuente: Cromatógrafo de gases serie 6890N.

Los datos sobre tiempo de retención, porcentaje de área relativo, porcentaje de probabilidad e ión molecular para cada compuesto de esta mezcla se puede observar en la Tabla 10 a continuación:

Tabla 10: Datos CG de la fracción 35.

Compuesto	Tr	Área %	Qual %	Ión molecular (m/z)
α - Muurolene	9.82	70.08	93%	204 [M] ⁺
Levomenol	9.98	29.92	90%	204 [M] ⁺

Fuente: Autora

Se realizó la identificación de los compuestos mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos de cada compuesto con los espectros de masas de la base de Datos Wiley 7n.l y NIST 2011, por lo tanto se puede indicar que los compuestos identificados de la fracción 35 corresponden al α -Muurolene y Levomenol, esto se puede apreciar en el Anexo 3. Se puede observar sus estructuras químicas en la Figura 12.

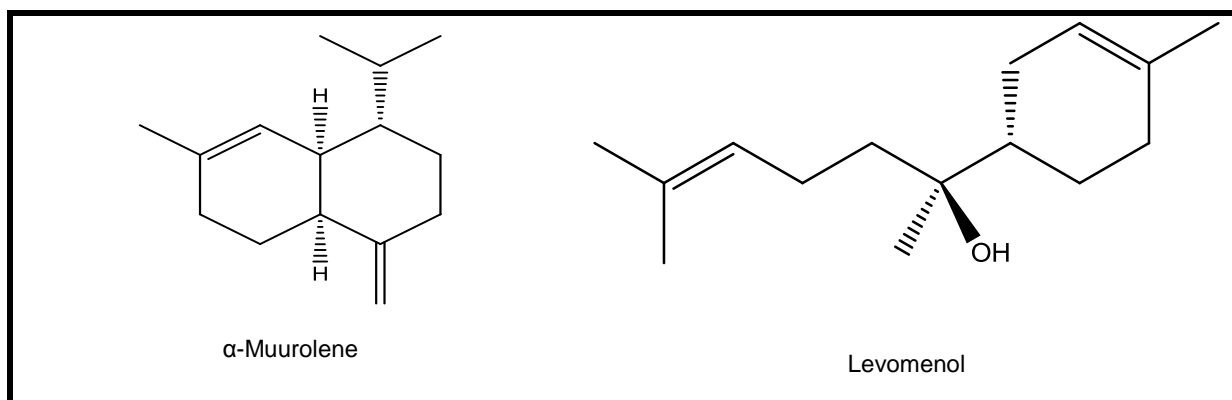


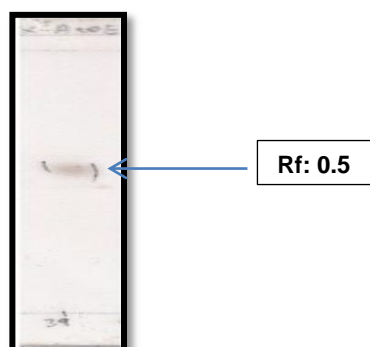
Figura 12: Estructura química de los compuestos identificados en la fracción 35.

Fuente: Autora. Elaboración: Programa ChemBioDraw Ultra 2009.

El α -Muurolene y el Levomenol son un tipo de sesquiterpenos que no han sido reportados antes en ninguna especie del género *Artocarpus*, sin embargo el Levomenol es el constituyente principal del aceite esencial de manzanilla alemana *Matricaria recutita* (Thornfeldt, 2005), (Jiménez *et al.*, 2009) y *Myoporum crassifolium* (Hames-Kocabas *et al.*, 2013). Los sesquiterpenos son un amplio grupo de sustancias presentes en diferentes organismos, y estos son compuestos de la larga clase de terpenoides. Los beneficios que se otorgan a este tipo de compuestos son: bactericidas, anti-irritante, anti-inflamatorio, anti – microbiano, además se han utilizado durante cientos de años en cosméticos debido a sus propiedades curativas de la piel (Reyes, 2007).

3.3.1.4 Fracción 39 (ácido hexanodioico, éster de dioctilo).

Este compuesto eluyó en Hex-AcOEt proporción 95:5, fue purificado con par-disolventes, se disolvió con CHCl_3 , se calentó y precipitó con MeOH frío, el precipitado fue un polvo fino granulado blanco. Su punto de fusión fue 69-70°C. En CCF se observó en luz UV una mancha de color morada a 365 nm y oscura a 254 nm, y al ser revelada con H_2SO_4 5% y vainillina se presenció la mancha color púrpura y Rf de 0.5 en Hex-AcOEt (90:10) (Fotografía 12).



Fotografía 12:
CCF fracción 39.
Fuente: Autora

Análisis de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) de la fracción 39.

Los datos de **CG-EM** se observan en la Figura 13 se observa el tiempo de retención de 14.24 min, % área relativo de 100 y un pico de ión molecular de 370 m/z $[\text{M}]^+$. La caracterización se realizó por medio de la comparación con datos bibliográficos (Modupe *et al.*, 2009).

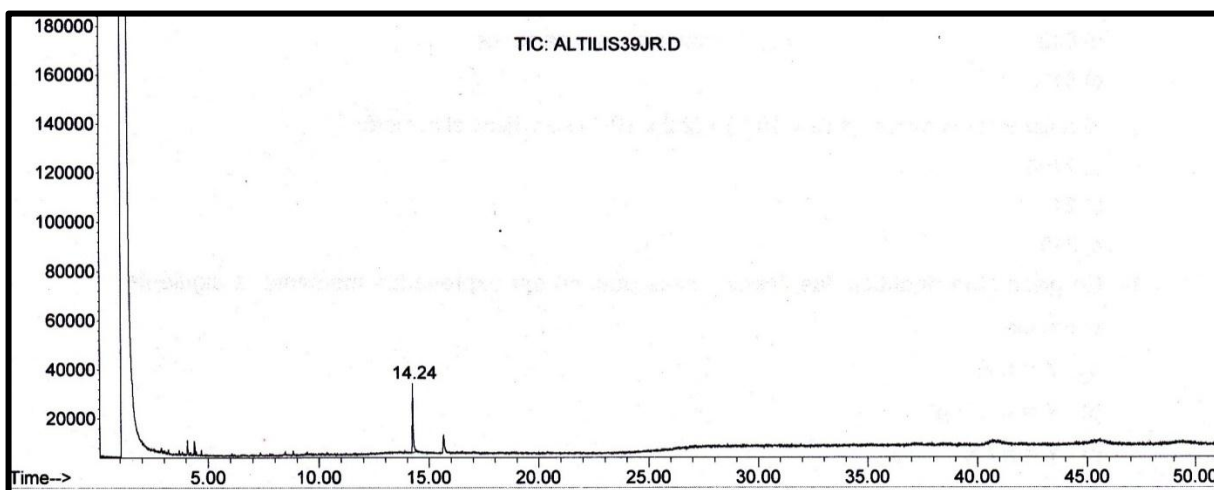


Figura 13: Cromatograma de la fracción 39.
Fuente: Cromatógrafo de gases serie 6890N.

El espectro de masas presentó un pico de ión molecular a 370 m/z [M]⁺ (C₂₂H₄₂O₄) (Anexo 4.1), que corresponde al ácido hexanodioico, éster de dioctilo o conocido como Ácido Adípico, éster de dioctilo que así lo indicó la base de datos del equipo del espectro CG-EM, su estructura química se puede observar en la Figura 14.

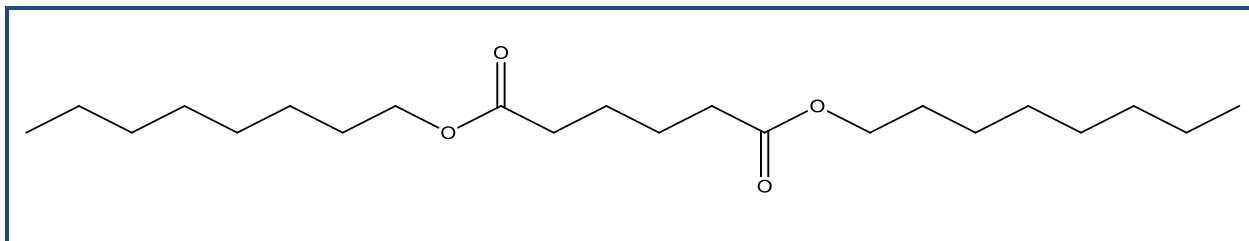


Figura 14: Estructura química del Ácido Hexanodioico, éster de dioctilo.

Fuente: Autora. **Elaboración:** Programa ChemBioDraw Ultra 2009.

Este ácido ha sido identificado en las principales partes de *Euphorbia hirta*, tuvo actividad repelente contra las especies de *Anopheles* siendo beneficioso para la prevención de la malaria (Modupe *et al.*, 2009), también ha sido aislado en el extracto de alcohol de las hojas de *Kigelia pinnata* (Grace *et al.*, 2002) y *Melissa officinalis* (Sharafzadeh *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Romeh (2013) en la discusión de sus resultados menciona que este ácido puede actuar como antioxidante, hipo colesterolémico, nematocida, pesticida, lubricante, antibacteriano y antifúngico. En *A. altilis* no se lo ha reportado.

Análisis de RMN ¹H y ¹³C para la identificación del ácido hexanodioico, éster de dioctilo de la fracción 39.

Datos obtenidos: **RMN ¹H (400 MHz, CHLOROFORM-*d*)**; δ ppm 0.81 (t, J=6.84 Hz, 3H) 1.10 - 1.29 (m, 28H) 1.36 (br. s., 2H) 1.53 (dd, J=14.62, 7.31 Hz, 4H) 2.10 (s, 1H) 2.22 (t, J=7.63 Hz, 1H) 2.31 (s, 1H) 3.89 - 4.07 (m, 1H).

RMN ¹³C (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 14.27 (s, 1C) 22.85 (s, 1C) 24.06 (s, 1C) 25.82 (s, 1C) 26.08 (s, 1C) 28.81 (s, 1C) 29.33 (s, 1C) 29.40 (s, 1C) 29.52 (s, 1C) 29.58 (s, 1C) 29.64 (s, 1C) 29.71 (s, 1C) 29.77 (s, 1C) 29.81 (s, 1C) 29.86 (s, 1C) 32.08 (s, 1C) 34.58 (s, 1C) 37.64 (s, 1C) 42.99 (s, 1C) 64.55 (s, 1C) 76.84 (s, 1C), 174.19 (s, 1C).

En el Anexo 4 se observan los desplazamientos de RMN ¹H (400 MHz, CHLOROFORM-*d*), en el cual se observa la señal de los protones del grupo metileno (δ_H 0.81, ppm); El espectro de RMN ¹³C (101 MHz, CHLOROFORM-*d*), presenta un señal en δ_C 174.19 ppm correspondiente al grupo carbonil. En la tabla 11 se puede apreciar la comparación de los datos teóricos obtenidos con el programa Predictor del ChemBioDraw Ultra 2009.

Tabla 11: Datos RMN ¹H de los obtenidos en (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) y los de ácido hexanodioico, éster de dioctilo (ChemBioDraw Ultra 2009).

F: 39	Ácido hexanodioico, éster de dioctilo (ChemBioDraw Ultra 2009)
0.81 (3H, t)	0.88 (3H, t)
1.10-1.29 (28H, m)	1.29 (28H, m)
1.36 (2H, s)	1.31 (2H, s)
1.53 (4H, dd)	1.62 (4H, dd)
2.10 (1H, s)	1.64 (1H, s)
2.22 (1H, t)	2.32 (1H, t)
2.31 (1H, s)	2.32 (1H, s)
3.89-4.07 (1H, m)	4.13 (1H, m)

Fuente: Autora

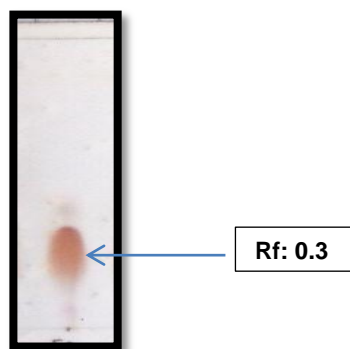
Del análisis anterior se puede concluir que el compuesto identificado de la fracción 39 corresponde al ácido hexanodioico, éster de dioctilo.

3.3.2 Compuestos aislados a partir de la columna cromatográfica del extracto de Hojas AcOEt desclorofilado.

De la elución de la columna cromatográfica del extracto de hojas AcOEt desclorofilado se obtuvieron 267 fracciones, de las cuales a la que se caracterizó fue la fracción 43-49; además se fraccionó en micro columna la unión de fracciones 108-119 con peso de 25 mg y 5 g de sílica gel con proporción 1:200; de la micro columna eluyeron 218 fracciones, encontrándose según CCF aptas para identificar y caracterizar las fracciones 8-13 (0,3 mg), 169-177 (0,2 mg), sin embargo el peso obtenido no fue el suficiente para realizar pruebas de CG-EM y/o RMN.

3.3.2.1 Fracción 43-49 (Heptacosano).

Este compuesto eluyó en Hex-AcOEt proporción 80:20, se obtuvo un total de 68 mg, se lavó con MeOH obteniéndose agua madre amarilla, el resultado fue 1,5 mg de una sustancia blanquecina y grasosa, en CCF en la luz UV se observó mancha de color azul a 365 nm y oscura a 254 nm, al ser revelada con H₂SO₄ 5% y vainillina se presentó una mancha de color tomate-amarilla con factor de retención de 0.3 eluída en Hex-AcOEt (70:30).



Fotografía 13:
CCF fracción 43-49.
Fuente: Autora.

Análisis de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) de la fracción 43-49.

Los datos espectroscópicos de **CG-EM** son: tiempo de retención de 18.20 min, % área relativo de 100 y un pico de ión molecular de 380 m/z [M]⁺, se puede observar en la Figura 15. La caracterización se realizó por medio de la comparación con datos bibliográficos.

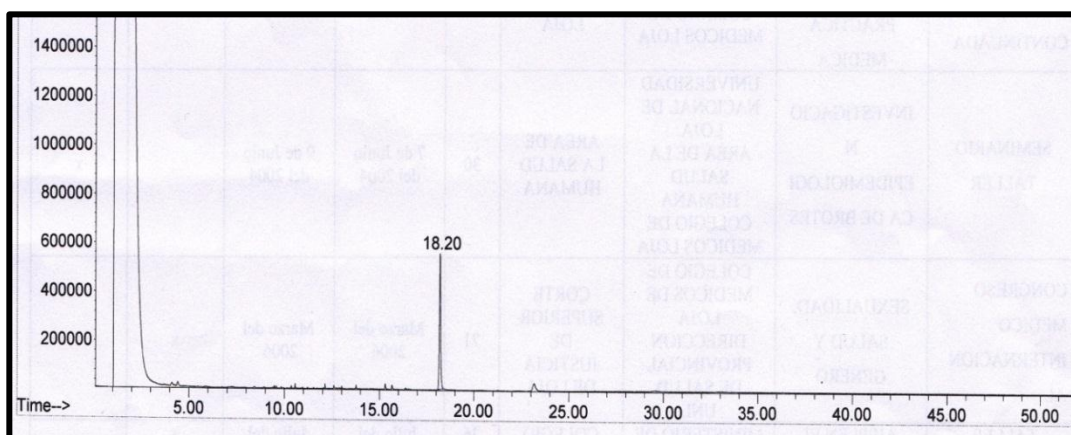


Figura 15: Cromatograma de la fracción 43-49.
Fuente: Cromatógrafo de gases serie 6890N.

Se realizó la identificación del compuesto mediante la comparación del espectro de masas del compuesto con el espectro de masas de la base de Datos Wiley 7n.I y NIST 2011 (Anexo 5); señalando que se trata del Heptacosano. Se puede observar su estructura química en la Figura 16.



Figura 16: Estructura Química del Heptacosano.
Fuente: Autora. **Elaboración:** Programa ChemBioDraw Ultra 2009.

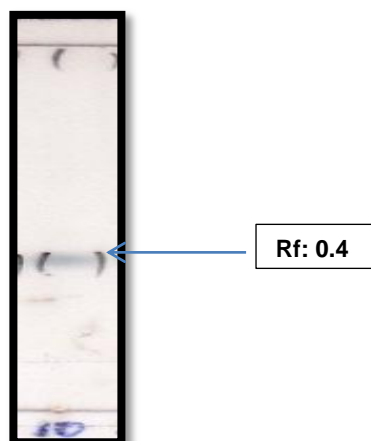
El Heptacosano es un hidrocarburo alifático que tiene muchas aplicaciones: es la base para la fabricación de medicinas, plásticos y materiales de grado biológico (S. N. M. P. E., 2012). No ha sido caracterizado en especies de *Artocarpus*.

3.3.3 Compuestos aislados a partir de la columna cromatográfica del extracto de hojas CH_2CL_2 .

A partir de la columna cromatográfica del extracto de hojas CH_2CL_2 se obtuvieron 448 fracciones; de éstas la fracción 10, cristalizó con CH_2CL_2 , presentó características sólidas blanquecinas.

3.3.3.1 Fracción 10 (mezcla de hidrocarburos alifáticos).

Esta fracción eluyó en Hex 100:00, cristalizó con CH_2CL_2 , fueron lavadas con MeOH, el precipitado presentó forma de grumos blancos, viscoso al tacto. En CCF se observó en luz UV una mancha oscura, al ser revelada con H_2SO_4 5% y vainillina se presencié de color azul. Rf de 0.4 eluída en Hex-AcOEt (90:10) (Fotografía 14).



Fotografía 14:
CCF fracción 10.
Fuente: Autora.

Análisis de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) de la fracción 10.

El cromatograma de la fracción 10, indica la presencia de 5 compuestos, los cuales los podemos apreciar en la Figura 17.

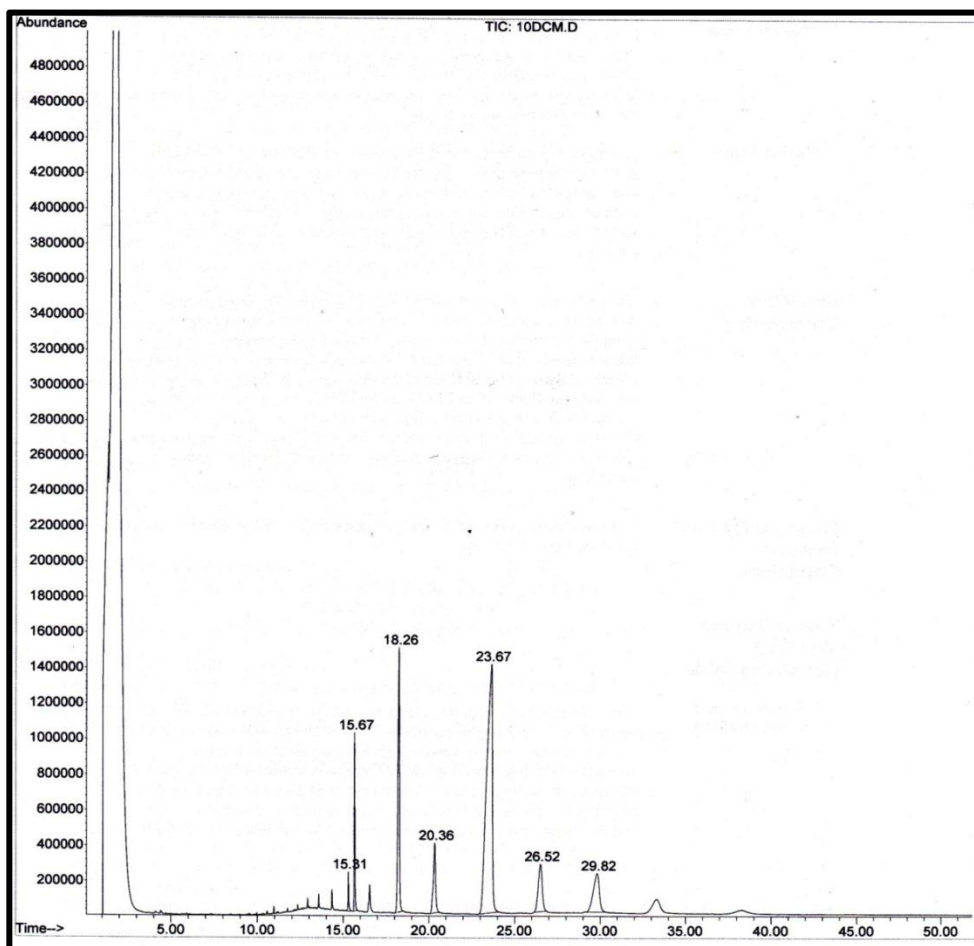


Figura 17: Cromatograma de la fracción 10.
Fuente: Cromatógrafo de gases serie 6890N.

Los datos sobre tiempo de retención, porcentaje de área relativo, porcentaje de probabilidad, ión molecular y fórmula química para cada compuesto de esta mezcla se puede observar en la Tabla 12 a continuación:

Tabla 12: Datos CG fracción 10.

Compuesto	Tr	Área %	Qual %	ión molecular (m/z)
Pentacosano	15.31	1.06	98	352
Octacosano	18.26	15.90	93	394
	20.36	6.18	96	
Nonacosano	23.67	55.38	98	408
1-nonadeceno	26.52	7.46	97	266
Hentriacontano	29.82	9.07	96	436

Fuente: Autora.

La identificación preliminar se realizó exclusivamente por los datos otorgados por CG-EM, se puede observar sus estructuras químicas en la Figura 18.

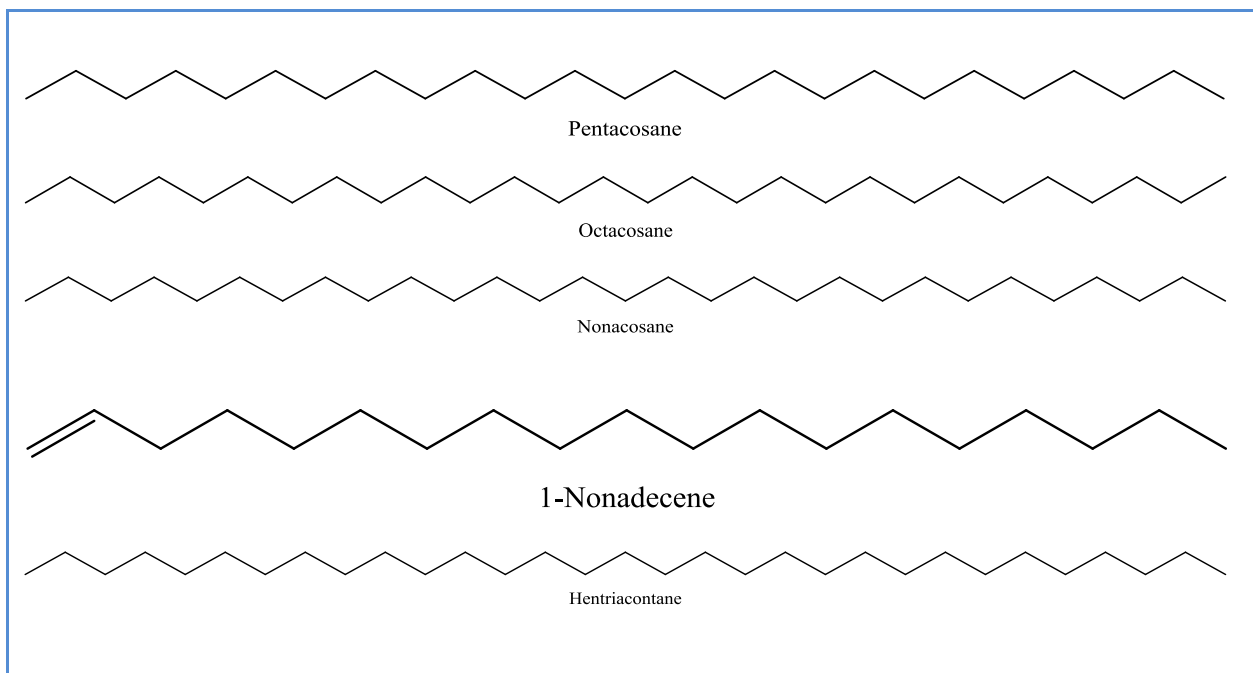


Figura 18: Estructura química de los compuestos encontrados en la fracción 10.

Fuente: Autora. **Elaboración:** Programa ChemBioDraw Ultra 2009.

Estas mezclas corresponden a hidrocarburos alifáticos ya que presentan todos en su estructura una formación de carbono e hidrógeno únicamente, siendo alcanos los de unión C-C mientras que el 1-Nonadeceno por presentar una unión C=C se denomina alqueno (Vega, 2011), las mismas han sido encontradas en la mayoría de especies de la familia Euphorbiaceae (Rojas *et al.*, 2008), *Ganoderma applanatum* (Paterson, 2006), *Ficus sycomorus* en donde se ha comprobado su actividad antibacteriana y antifúngica (Romeh, 2013).

3.4 Pruebas microbiológicas. Microdilución en caldo (CMI).

Según Meyer *et al.* (1982) y Holetz *et al.* (2002) los extractos que presenten una CMI <100µg/mL la actividad antimicrobiana es buena, de 100 µg/mL a 500 µg/mL es moderada, de >500 µg/mL a 1000 µg/mL mala, y >1000 µg/mL nula.

3.4.1 Determinación de actividad antifúngica.

En la tabla 12 se muestra las CMI de cada uno de los extractos, tanto de raíces como hojas; de las raíces, los extractos de Hex y MeOH no muestran actividad para *Tm* y *Tr* (>1000

µg/mL), mientras que el extracto de AcOEt indica una actividad moderada de 500 µg/mL para los dos hongos.

Los extractos de hojas: Hex, AcOEt y MeOH no muestran actividad (>1000 µg/mL), sin embargo el extracto de CH₂CL₂ muestra 62,5 µg/mL frente a *Tm* siendo una actividad buena, y a *Tr* 125 µg/mL siendo moderada. El extracto que tuvo una actividad muy buena con 31,25 µg/mL frente a los dos hongos fue el de AcOEt desclorofilado.

Tabla 13: CMI de los extractos de raíces y hojas expuestas a los hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*.

EXTRACTOS	<i>A. altilis</i>							
	Raíces			Hojas				
	Hex	AcOEt	MeOH	Hex	CH ₂ CL ₂	AcOEt	AcOEt (descl)	MeOH
<i>Trichophyton mentagrophytes (Tm)</i>	>1000 µg/mL	500 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	62.5 µg/mL	>1000 µg/mL	31.25 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Trichophyton rubrum (Tr)</i>	>1000 µg/mL	500 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	125 µg/mL	>1000 µg/mL	31.25 µg/mL	>1000 µg/mL
Control de esterilidad: (200 µL de caldo Sabouraud)								
Control negativo: (180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL DMSO)								
Control positivo: (180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de Itraconazol).								

Fuente: Autora.

3.4.2 Determinación de actividad antibacteriana.

En la tabla 14 se muestra las CMI de cada uno de los extractos, tanto de raíces como hojas; en presencia de bacterias gram negativas ningún extracto mostró actividad, de igual manera se observó en el extracto de Hex de raíces y Hex y AcOEt desclorofilado de hojas, en presencia de las bacterias gram positivas.

Sin embargo los extractos de AcOEt y MeOH de raíces manifiestan actividad frente a las bacterias gram positivas, así: para *Sa* la actividad es buena, con 62,5 µg/mL para AcOEt, y muy buena para MeOH con 15,62 µg/mL; para *Ef* la actividad es moderada, con 125 µg/mL para AcOEt, y muy buena para MeOH con una CMI de 15,62 µg/mL.

Los extractos de hojas: CH₂CL₂, AcOEt y MeOH muestran actividad para los dos tipos de bacterias gram positivas, para *Sa* la actividad es buena (62,5 µg/mL), y moderada (500 µg/mL y 125 µg/mL), respectivamente; y, para *Ef* la actividad es moderada en los tres extractos con CMI de 125 µg/mL, 500 µg/mL y 125 µg/mL, respectivamente.

Tabla 14: CMI de los extractos de raíces y hojas expuestas a bacterias gram positivas y negativas.

EXTRACTOS	<i>A. atilis</i>							
	Raíces			Hojas				
	Hex	AcOEt	MeOH	Hex	CH ₂ CL ₂	AcOEt	AcOEt (descl)	MeOH
BACTERIAS Gram -								
<i>Proteus Vulgaris</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Klebsiella pneumonia</i>	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
BACTERIAS Gram +								
<i>Staphylococcus aureus (Sa)</i>	>1000 µg/mL	62,5 µg/mL	15,62 µg/mL	>1000 µg/mL	62,5 µg/mL	500 µg/mL	>1000 µg/mL	125 µg/mL
<i>Enterococcus faecalis (Ef)</i>	>1000 µg/mL	125 µg/mL	15,62 µg/mL	>1000 µg/mL	125 µg/mL	500 µg/mL	>1000 µg/mL	125 µg/mL
Control de esterilidad: 180 µL de caldo Müller Hinton + 10 µL de extracto diluido								
Control negativo: DMSO								
Control positivo: 180 µL de caldo Müller Hinton + 20 µL de Gentamicina® (1mg/ml para Gram -) (4mg/ml para Gram +)								

Fuente: Autora.

Según (Jagtap & Bapat, 2010) los extractos metanólicos obtenidos de tallos, raíces, hojas, frutos y semillas de *A. heterophyllum* mostraron un amplio espectro de actividad antibacteriana contra 25 especies de bacterias gram positivas y negativas; en éstos extractos se caracterizaron dos flavonas isopreniladas: artocarpin y artocarpesin, los que demostraron ser los responsables de la inhibición del crecimiento bacteriano; además el artocarpin mostró actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* dándole

la posibilidad de ser utilizado como un antibiótico (Suhartati *et al.*, 2001); en *A. altilis* se observa algo similar ya que los extractos metanólicos de raíces y cortezas mostró actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas y positivas pudiendo tener uso potencial en el tratamiento de tumores (Ragone, 1997), y aunque en esta investigación no se hayan obtenido estos compuestos, la actividad antibacteriana está mayoritariamente en el extracto de MeOH tanto para hojas como para las raíces.

Vasugi *et al.*, (2012) al finalizar su estudio menciona que el extracto de hojas MeOH de *A. altilis* mostró altas actividades antibacterianas y antifúngicas con respecto al extracto acuoso seguido por el extracto de EtOH frente a la mayoría de los microbios seleccionados. Los resultados revelaron que la presencia de componentes químicos, tales como flavonoides y taninos son los responsables, esto lo confirma Pradhan *et al.* (2013).

3.5 Determinación de actividad antioxidante.

Estudios epidemiológicos han mostrado que dietas ricas en alimentos vegetales reducen de forma significativa la incidencia y tasas de mortalidad de enfermedades degenerativas causadas por el estrés oxidativo. Este efecto protector ha sido atribuido principalmente a los compuestos fenólicos y a la actividad antioxidante presentes en dichos alimentos vegetales. Según Burneo P., (2009) *A. altilis* ha sido objeto de estudios sobre actividad antidiabética y ha sido evaluada para verificar si su potencial terapéutico en el tratamiento de la diabetes está relacionada con efectos antioxidantes, ya que se ha comprobado en los últimos años la implicación que han tenido las especies reactivas de oxígeno en la patogénesis de la diabetes mellitus, debido a que destruyen las células β -pancreáticas, y éstas presentan un potencial secuestrador muy bajo, lo que puede conllevar a la disminución de las defensas antioxidantes, de tal manera que lo que se desea es ayudar a los pacientes que padecen esta enfermedad a disminuir complicaciones como nefropatía, gangrena, ceguera, etc.

En este estudio se determinó la actividad antioxidante de los diferentes extractos; a continuación se muestran los resultados. Los dos métodos utilizados se realizaron por triplicado, los análisis y cálculos realizados se obtuvieron con ayuda del programa Microsoft Excel. La obtención de la concentración de los extractos se obtuvo con la fórmula:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

En donde:

x= Concentración.

y= Absorbancia obtenida de la muestra.

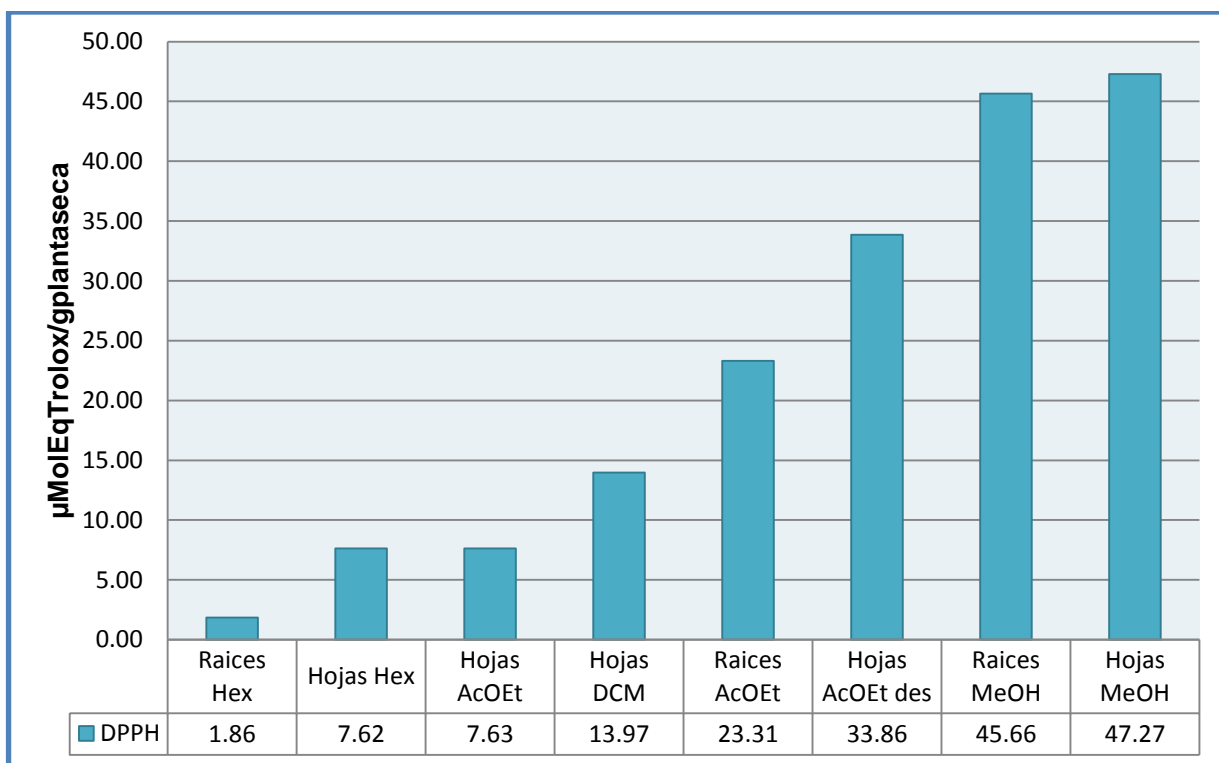
b= Intersección en la recta.

m= Pendiente.

En los anexos 8 y 9 constan los datos y la respectiva gráfica de la curva de calibración, elaborada con las absorbancias de cada concentración que van desde 25 hasta 800 μ Moles para DPPH y para ABTS; además, se encuentra la pendiente (-0.0012), intersección (1.0786) y el valor R^2 (coeficiente de determinación), datos utilizados para la obtención de la concentración final de los extractos; según Burneo P. (2009), se debe destacar el valor R^2 , ya que permite evaluar la proporción de variabilidad de la variable dependiente, este coeficiente puede presentar valores entre 0 y 1, y mientras más se acerque a 1 los datos se ajustan de mejor manera al modelo de ecuación propuesto.

3.5.1 Método DPPH.

En el anexo 10 se encuentra la tabla completa con las absorbancias de cada extracto y las transformaciones que se realizó para llegar a presentar los resultados en μ MolEqTrolox/gplantaseca.



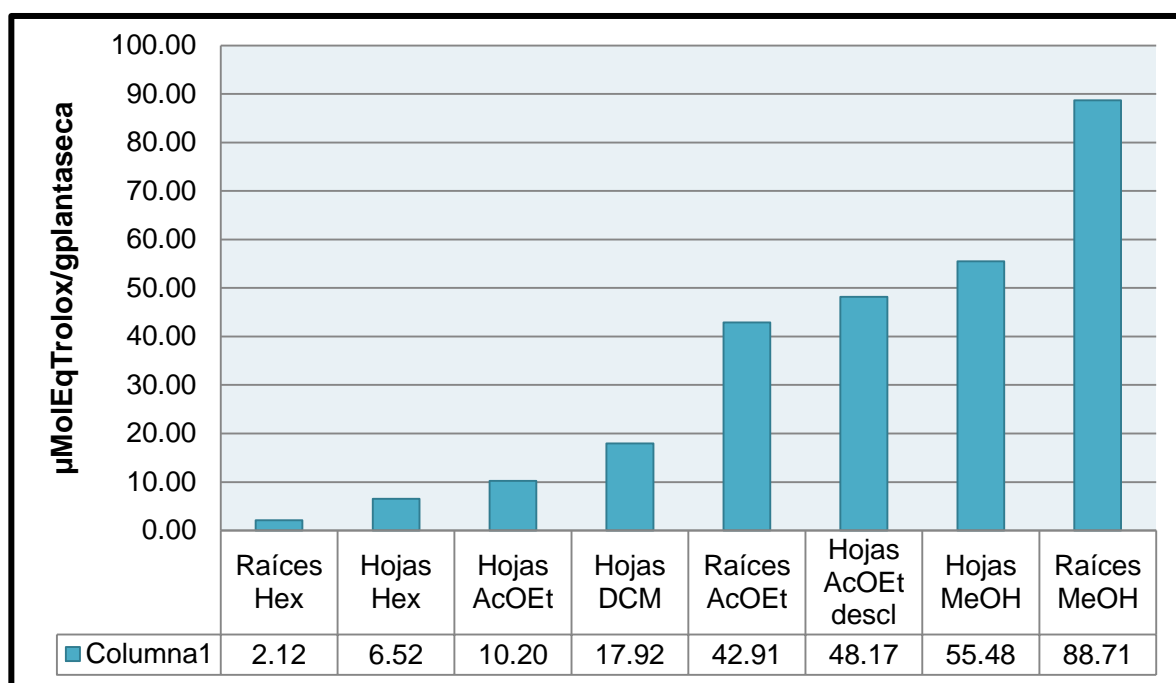
Gráfica 1: Extractos con los valores respectivos expresados en μ MolEqTrolox/gplantaseca (DPPH).
Fuente: Autora.

En la Gráfica 1 se puede apreciar que el extracto que mayor actividad antioxidante posee, mediante éste método, es el de Hojas maceradas en MeOH con un valor de 47.27 $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$, y el de menor actividad antioxidante es el de Raíces maceradas en Hex, con un valor de 1.86 $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$, los demás extractos indican una actividad antioxidante dentro de los valores mencionados.

3.5.2 Método ABTS.

En el anexo 11 se encuentra la tabla completa con las absorbancias de cada extracto y las transformaciones que se realizó para llegar a presentar los resultados en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$.

En la Gráfica 2 se puede apreciar que el extracto que mayor actividad antioxidante posee, mediante éste método, es el de Raíces maceradas en MeOH con un valor de 88.71 $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$, y el de menor actividad antioxidante es el de Raíces maceradas en Hex, con un valor de 2.12 $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$, los demás extractos indican una actividad antioxidante dentro de los valores mencionados.



Gráfica 2: Extractos con los valores respectivos expresados en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ (ABTS).
Fuente: Autora.

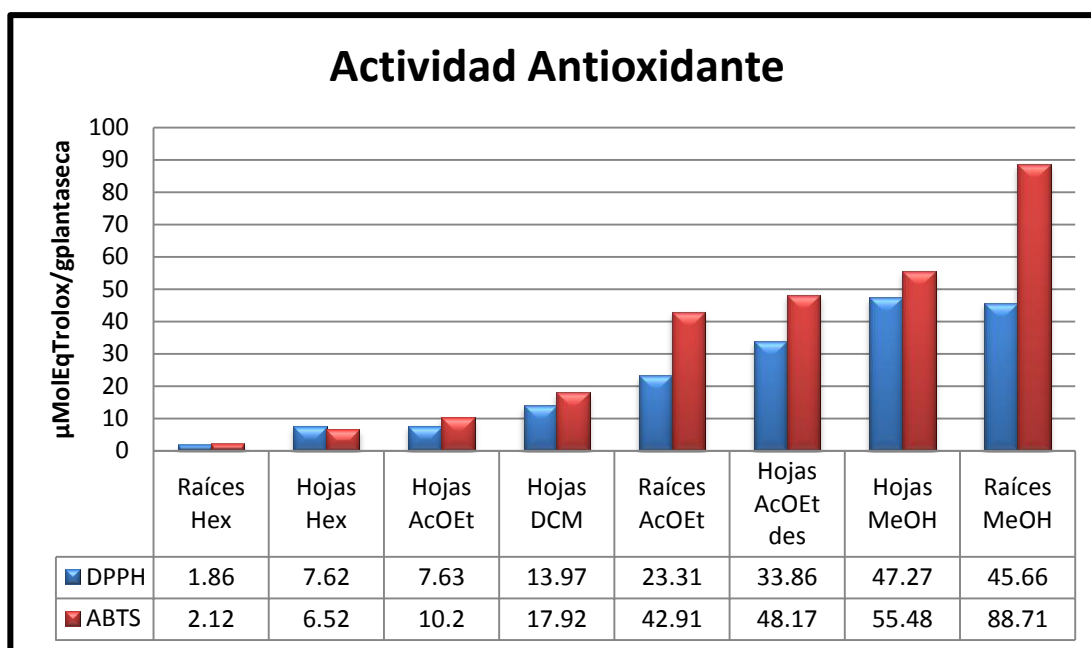
En la Tabla 15 podemos apreciar un resumen detallado de los valores de actividad antioxidante expresados en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ con los dos métodos realizados (DPPH y ABTS).

Tabla 15: Resumen de la actividad antioxidante de los extractos con los dos métodos.

EXTRACTO	DPPH	ABTS
	μMolEqTrolox/gplantaseca	
Raíces Hex	1.86 ± 0.01	2.12 ± 0.01
Hojas Hex	7.62 ± 0.02	6.52 ± 0.03
Hojas AcOEt	7.63 ± 0.00	10.20 ± 0.03
Hojas CH ₂ CL ₂	13.97 ± 0.01	17.92 ± 0.05
Raíces AcOEt	23.31 ± 0.00	42.91 ± 0.05
Hojas AcOEt des	33.86 ± 0.02	48.17 ± 0.04
Hojas MeOH	47.27 ± 0.04	55.48 ± 0.00
Raíces MeOH	45.66 ± 0.03	88.71 ± 0.05

Fuente: Autora.

En la Gráfica 3 podemos apreciar el resumen en el cual muestran una similitud; siendo el extracto de Raíces maceradas con Hex, 1.86 y 2.12 μMolEqTrolox/gplantaseca, respectivamente, el que menor valor de actividad posee; y el mayor valor de actividad antioxidante se observa en el extracto de Hojas maceradas con MeOH (47.27 μMolEqTrolox/gplantaseca), para DPPH; y el extracto de Raíces maceradas en MeOH (88.71 μMolEqTrolox/gplantaseca), para ABTS, similar al obtenido por Mesa-Vanegas *et al.* (2009) con 47±2,9 μMolEqTrolox/gplantaseca en los extractos de hojas en Hex y 80±6,5 μMolEqTrolox/gplantaseca de tallos en Hex de *C. brasiliense*; teniendo en cuenta que en DPPH los valores de los extractos Hojas y Raíces maceradas en MeOH, son muy cercanos, con lo que podemos decir que tienen una muy buena actividad antioxidante, conociendo que 1 μM de compuesto es equivalente a 1 μM de Trólox (Mercader, 2010).



Gráfica 3: Gráfica representativa de la actividad antioxidante de los extractos con los dos métodos.

Fuente: Autora.

Se ha reportado una excelente actividad antioxidante en varias especies del género *Artocarpus*, como es el caso de *A. integrifolia* L., *A. heterophyllus* Lam y *A. elasticus*, en donde existe actividad gracias a compuestos de tipo flavonoide prenilado, esto medido por método DPPH. Los extractos de frutos y semillas de *A. odoratissimus* también han sido evaluados, siendo en este caso el extracto de semillas el que presentó mayor actividad (Jagtap & Bapat, 2010). *A. altilis*, objeto de este estudio, muestra excelente actividad mediante el método de DPPH para el extracto de hojas CH₂CL₂, seguido por el extracto de hojas AcOEt y finalmente el extracto de hojas MeOH (Tara *et al.*, 2012).

Cabe recalcar que no se puede realizar una comparación cuantitativa, puesto que las unidades en las que se representa cada resultado varían de estudio a estudio, así lo menciona Vintimilla (2013): el contenido de compuestos antioxidantes se ve influenciado por las condiciones de extracción, variedad de la materia prima, ubicación geográfica de la misma, tipo de solvente utilizado, concentración de dicho solvente y debido a que hay muchos ensayos con diferentes sustratos, cinética de reacción y métodos analíticos para evaluar la actividad antioxidante, por lo cual las comparaciones entre resultados de capacidad antioxidante sólo pueden hacerse para un mismo método y para muestras obtenidas con los mismos disolventes.

Las especies *Artocarpus* son fuente de compuestos que brindan oportunidades para el desarrollo de productos de valor agregado a partir de frutos comestibles, nutracéuticos y aplicaciones alimentarias para mejorar los beneficios de salud en el tratamiento de la enfermedad inducida por radicales libres sirviendo como antiinflamatorio, anticancerígeno, antigluceante (Jagtap & Bapat, 2010).

CONCLUSIONES

Los extractos de las raíces (Hex y MeOH) y hojas (Hex, AcOEt y MeOH) no muestran actividad para *Tm* y *Tr* (>1000 µg/mL), mientras que el extracto de raíces de AcOEt indica una actividad moderada de 500 µg/mL para los dos hongos; el extracto de hojas CH₂CL₂ muestra una buena actividad (CMI de 62,5 µg/mL) frente a *Tm*, y moderada para *Tr* (125 µg/mL), y el extracto de hojas AcOEt desclorofilado mostró una actividad muy buena con una CMI de 31,25 µg/mL frente a los dos hongos.

Todos los extractos de raíces y hojas no presentan actividad antibacteriana frente a gram negativos, mientras que los extractos de raíces (Hex) y hojas (Hex, AcOEt desclorofilado) no muestran actividad en gram positivas. Por el contrario los extractos de raíces (AcOEt, MeOH) manifiestan buena actividad (62,5 µg/mL; 15,62 µg/mL) frente a *Staphylococcus aureus* y para *Enterococcus faecalis* la actividad es moderada 125 µg/mL para AcOEt, y muy buena para MeOH con una CMI de 15,62 µg/mL. Los extractos de hojas muestran para *Staphylococcus aureus* una actividad: buena (CH₂CL₂: 62,5 µg/mL), moderada (AcOEt: 500 µg/mL) y moderada (MeOH: 125 µg/mL); y, para *Enterococcus faecalis* la actividad es moderada en los tres extractos con CMI de 125 µg/mL, 500 µg/mL y 125 µg/mL, respectivamente.

El extracto de raíces maceradas con Hex presentó el menor valor de actividad antioxidante (1.86 y 2.12 µMolEqTrolox/gplantaseca) para DPPH y ABTS; y la mejor actividad antioxidante se observó en el extracto de Hojas MeOH (47.27 µMolEqTrolox/gplantaseca) para DPPH, y raíces MeOH (88.71 µMolEqTrolox/gplantaseca) para ABTS.

De la CC del látex se identificaron: dos metabolitos secundarios: ácido hexadecanoico y ácido hexanodioico, éster de dioctilo; una mezcla de triterpenos y una de sesquiterpenos. Del extracto de hojas de AcOEt desclorofilado se aisló el Heptacosano, y del extracto de CH₂CL₂ una mezcla de hidrocarburos alifáticos. Todos los compuestos han sido identificados por primera vez en esta especie.

Este estudio refuerza la potencialidad que tiene el árbol de fruta de pan en Ecuador, corroborando sus usos tradicionales como alimento funcional y tratamiento medicinal coincidiendo así con los estudios científicos desarrollados en países asiáticos, destacando sus actividades antimicrobianas y antioxidantes a pesar de no contener los mismos metabolitos secundarios.

4.2 RECOMENDACIONES

- ✓ Continuar con el estudio de otras especies del género *Artocarpus* presentes en el Ecuador, aislando e identificando compuestos que dan a esta especie las propiedades curativas que se aplican en el uso tradicional.
- ✓ Determinar actividades: antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antigluceante, a los extractos y metabolitos aislados, ya que son otras de las propiedades que se otorga a *Artocarpus*.
- ✓ Obtener mayor cantidad de muestra para en un futuro tratar de aislar nuevos metabolitos e identificar a algunos que en este estudio no se pudo realizar debido al poco peso obtenido de los mismos.
- ✓ Para el desarrollo de actividad antioxidante, es recomendable que las muestras y estándares sean leídas considerando el tiempo de reacción establecido por la técnica y de esta forma evitar resultados equívocos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, A., Darwish, S., Ayad, E., & El-Hamahmy, R. (2007). Egyptian mango byproduct 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103(4): 1141-1152 .
- Arnao, M., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(1): 239-244.
- Ávalos, G. A., & Pérez-Urria, C. E. (2009). "Metabolismo secundario de plantas". *Reduca (Biología). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Serie Fisiología Vegetal.*, 2 (3): 119-145.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 161-172 .
- Benavides Calvache, O. L. (2004, 05). Estudio Químico de la Fracción Insaponificable del Hongo *Lentinula edodes* (Shiitake) . *Tesis como requisito parcial para optar al título de Magíster en Ciencias - Química* . Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá .
- Benfatti, C., Mendes de Cordova, S., Guedes, A., Alberton, M., & Mendes de Cordova, C. (2010). Actividad antibacteriana in vitro de extractos brutos de especies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 33-39.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferricreducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power " The FRAP assay". *Analytical Biochemistry*, 239(292): 70-76 .
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1995): 25-30.
- Bruneton, J. (2001). "*Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales*". Zaragoza: Editorial Acribia. 2ª. Ed. español.
- Burneo P., Z. L. (2009, Mayo). Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y Actividad antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del Sur del Ecuador. *Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniería Química*. Loja, Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Clement, B. (2002). "*Organic Chemistry Laboratory Manual*". USA: Texas A&M University.
- Conde, E. (2009). Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. . *Ourense. Universidad de Vigo.*, 3-118.
- De la Torre, L., Alarcón, D., Kvist, L., & Salazar, J. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas*. Quito: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Departamento de Ingeniería Química . (2010). Punto de fusión. Trabajo Práctico. Universidad Regional Rosario.
- Diaria, S. (2014, Enero 15). *Pisos.com*. Recuperado el Enero 18, 2014, de Salud: <http://www.saluddiaria.com/>
- Ehsan, S. N., Hossein, A., & Sattar, S. (2012). Regulatory TGACG-motif may elicit the secondary metabolite production through inhibition of active Cyclin-dependent

- kinase/Cyclin complex. *Plant Omics Journal*. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies Engineering, Shahid Beheshti University, 315-318.
- Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R., & Santa, M. D. (2011). “*Resonancia magnética nuclear de protón: Aplicaciones en Química Orgánica*”. Madrid-España: Instituto de Química Médica.
- Enos Tangke, A., Britanto Dani, W., Yohana Ayupriyanti, H., Irawan Wijaya, K., Dina, Y., & Ferry, S. (2009). Anti-Cancer Properties of Diethylether Extract of Wood from Sukun (*Artocarpus altilis*) in Human Breast Cancer (T47D) Cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (4): 317-324.
- Fabiyi, O., Atolani, O., Adeyemi, O., & Olatunji, G. (2012). Antioxidant and Cytotoxicity of β -Amyrin acetate fraction from *Bridelia ferruginea* Leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 981-984.
- Finkel, T., & Holbrook, J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 108(2000): 239.
- Gobierno Provincial de Zamora Chinchipe. (2014). *Zamora Chinchipe*. Recuperado el 02 24, 2014, de http://www.zamora-chinchipe.gob.ec/index.php?option=com_content&task=view&id=66
- Gómez, J. (2009). Estudio y análisis de la fruta de pan y Propuesta gastronómica. *Universidad Tecnológica Equinoccial*. Quito: Facultad De Turismo y Preservación Ambiental Hotelería Y Gastronomía.
- Gutiérrez, B. M., & Droguet, M. (2002). “*La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor*”. Barcelona, España: Universidad Politécnica de Catalunya. Laboratorio de Control de la Contaminación Ambiental.
- Hames-Kocabas, E., Betul, D., Atac, U., & Fatih, D. (2013). Volatile composition of Anatolian propolis by headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME), antimicrobial activity against food contaminants and antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2140-2149.
- Harris, D. C. (2007). “*Análisis Químico Cuantitativo*”. Barcelona. España: Editorial Reverté. 3ra edición.
- Holetz, F., Pessini, L., Sanches, N., Garcia Cortez, D., Nakamura, C., & Dias Filho, B. (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1027-1031.
- Jagtap, U. B., & Bapat, V. A. (2010). *Artocarpus* : A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 142–166.
- Jiménez, J., Madrigal, J., & Salazar, S. (2009). Tratamiento con Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), para reducción de las ojeras. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, 1-5.
- Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Quito-Ecuador: Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.
- Llerena, Á. (2011, 08). Importancia de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Metabolitos Secundarios*. OAXTEPEC, MORELOS, MÉXICO: Tercer Congreso Latinoamericano de Agroecología.

- Marco, A. (2006). *“Química de los Productos Naturales”*. Madrid: Editorial Síntesis. 1ª. Ed. Español, ISBN 8497564030, 9788497564038.
- Mercader, M. (2010). Encapsulación de flavonoles en ciclodextrinas. Efecto en su actividad antioxidante . *Facultad de Ciencias de la Salud, de la actividad física y del deporte*. Murcia, España: Universidad Católica San Antonio.
- Mesa-Vanegas, A., & otros, e. (2009). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Journal tradicional medicine*.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 31-34.
- Modupe, O., Wesley, O., Edith, O., & Osibote, A. E. (2009). Analysis of the essential oil from the dried leaves of *Euphorbia hirta* Linn, a pontencial mediation for asthma. *African Journal Biotechnology*, 7042-7050.
- Nyree J., C., Zerega, M. N., Nur, S., & and Timothy J., M. (2010). Phylogeny and Recircumscription of Artocarpeae (Moraceae) with a Focus on *Artocarpus*. *The American Society of Plant Taxonomists. Systematic Botany*, 35(4):766-782.
- Organización Mundial de la Salud. (2014). OMS. Recuperado el 02 24, 2014, de <http://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/es/>
- Oyo-Ita, O., Bassey, E., Oros, D., & Simoneit, B. (2010). Occurrence and sources of triterpenoid methyl ethers and acetates in sediments of the cross-river system, southeast Nigeria. *International Journal of analytical chemistry*.
- Parrotta, J. A. (1994). *Artocarpus altilis* (S. Park.) Fosb. Mulberry family. *International Institute of Tropical Forestry*. Puerto Rico.: Department of Agriculture, Forest Service.
- Paterson, R. (2006). Ganoderma: Atherapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 1985-2001.
- Patiño, G., Ortiz, A., Salcedo, M., Perez, C., Sierra, N., Hernández, A., y otros. (2011). *Identificación Química de Moléculas Bioactivas en hongos de la familia Ganodermataceace de Córdoba*. España: Universidad de Córdoba.
- Porto, A. (2013, 06 01). *Curso de Biología*. Recuperado el 01 03, 2014, de Departamento de Biología-Geología - IES María Casares - Oleiros - A Coruña: <http://www.bionova.org.es/>
- Pradhan, C., Mohanty, M., Rout, A., Bandhu Das, A., Bihari, K., & Kumar, H. (2013). Phytoconstituent Screening and comparative assessment of antimicrobial potentiality of *Artocarpus altilis* fruit extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 840-843.
- Prakash, A. (2001). *Antioxidant activity*. Analytical Progress Press. 19(2001): 1-6.
- Ragone, D. (1997). *Breadfruit. Artocarpus altilis* (Parkinson) Forsberg. *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. Roma, Italia: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute.

- Ragone, D., & Cavaletto, C. G. (2006). Sensory Evaluation of Fruit Quality and Nutritional Composition of 20 Breadfruit (*Artocarpus*, Moraceae) Cultivars. *The New York Botanical Garden. Economic Botany*, 60(4):335-346.
- Reyes, F. J. (2007). Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural. *Tesis Doctoral. Univesidad de Granada*. Granada: Editorial de la Universidad de Granada.
- Robles, J. (2010). *Aislamiento de principios biológicamente activos presente en especies colombianas de la familia Burseraceae*. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Grupo de Investigación Fitoquímica.
- Rojas, J., Morales, A., Meccia, G., & Rondón, M. (2008). *Análisis por CG-EM de Hidrocarburos y Compuestos Terpénicos en las especies Euphorbia caracasana Boiss y Euphorbia cotinifolia L. (Euphorbiaceae)*. Mérida, Venezuela. : Grupo Biomoléculas Orgánicas, Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes.
- Romeh, A. A. (2013). Phytochemicals from *Ficus sycomorus* L. leaves act as insecticides and acaricides. *African Journal of Agricultural Research*, 3571-3579.
- S. N. M. P. E. (2012). *Sociedad Nacional de Minería Petróleo y Energía*. Recuperado el 01 20, 2014, de Sumando Esfuerzos. Exploradores: SNMPE-Educacion@snmpe.org.pe
- Sharapin, N., Leandro, M. R., Eliane, S. C., Elisabeth María, R. d., Elizabeth, V. d., & José María, L. d. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Santa Fé de Bogotá, D.C.: Convenio Andrés Bello (CAB) y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Sohal, R., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction and aging. . *National Institutes of Health*. , 273(1996): 59-63 .
- Sudha, S., & Asna, U. (2012). Effect of *Artocarpus altilis* on Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes and Glucose Uptake by Yeast Cells: An Ex-vivo Study. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 18:2, 140-151.
- Suhartati, T., Achmad, S. A., Aimi, N., Hakim, E. H., Kitajima, M., Takayama, H., y otros. (2001). Artoindonesianin L, a new prenylated flavone with cytotoxicity activity from *Artocarpus rotunda*. *Fitoterapia*, 912-918.
- Sureshkumar, P. (2013). Phytochemical assessment on various extracts of *Calotropis gigantea* (L.) R.BR. Through GC-MS. *International Journal of Pharma and Bio Science*, 803-810.
- Tara Kamal, A. M., Raji Akintunde, A., & Muhammad, N. (2012). Investigation of antioxidant activity and phytochemical constituents of *Artocarpus altilis*. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(26)*, 4354-4357.
- Tenorio López, F. A., Del Valle, M. L., & Pastelin Hernandez, G. (2013, 11 06). *Archivo. Cardiol. México [online]*. Recuperado el 01 15, 2014, de <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402006000800004&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1405-9940.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-zevallos, L., & Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. . *Journal of food composition and analysis*, 19(2006): 669-675 .

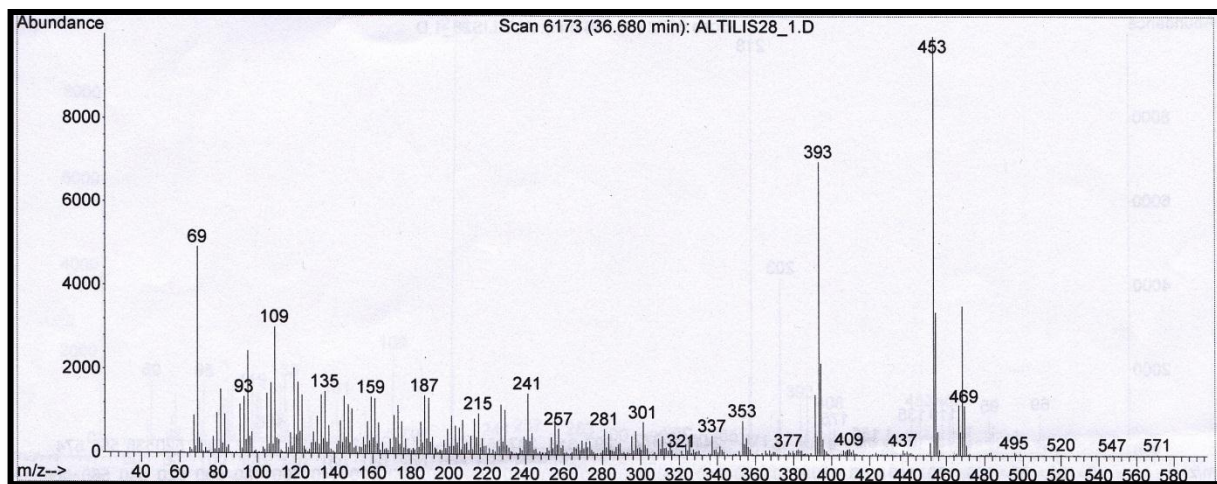
- Thornfeldt, C. (2005). Cosmeceuticals Containing Herbs: Fact, Fiction, and Future. *Dermatol Surg*, 873–880.
- Valverde, E. (2000). Extracción de materias primas vegetales. En N. Sharapin, *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos* (págs. 27-60). Colombia: Convenio Andrés Bello y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Vasugi, R., Sudhahar, D., & Anandarajagopal, K. (2012). Preliminary phytochemical investigation and screening of antimicrobial activity of leaf extracts of *Artocarpus altilis*. *Asian Journal of Biological and life Sciences*, 15-20.
- Vega, E. B. (2011). *Hidrocarburos alifáticos: "Alcanos, alquenos y alquilos, Introducción y Nomenclatura"*. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Verástegui, R. (2013). Radicales Libres, ¿Qué son y como afectan a la visión? *Blog: Mirada Completa*, 1-3.
- Vintimilla, M. G. (2013, Enero). Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones lipofílicas e hidrofílicas de los subproductos agroindustriales de. *Trabajo de fin de Titulación de Ingeniero en Industrias Agropecuarias*. Loja, Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.

ANEXOS

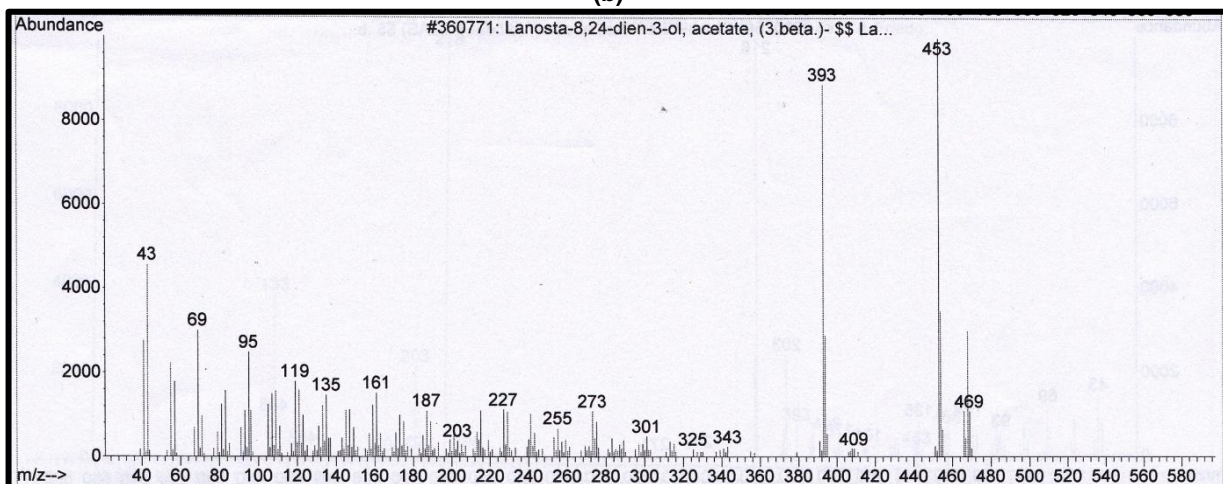
1. Fracción 28: Espectros de masa de los compuestos de la mezcla.

1.1 Espectro de masas del Lanosterol acetato: Espectro de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro de Lanosterol acetato (468 g/mol ($C_{32}H_{52}O_2$)) de la base de datos Wiley 7n.l (b) y NIST 2011 (c).

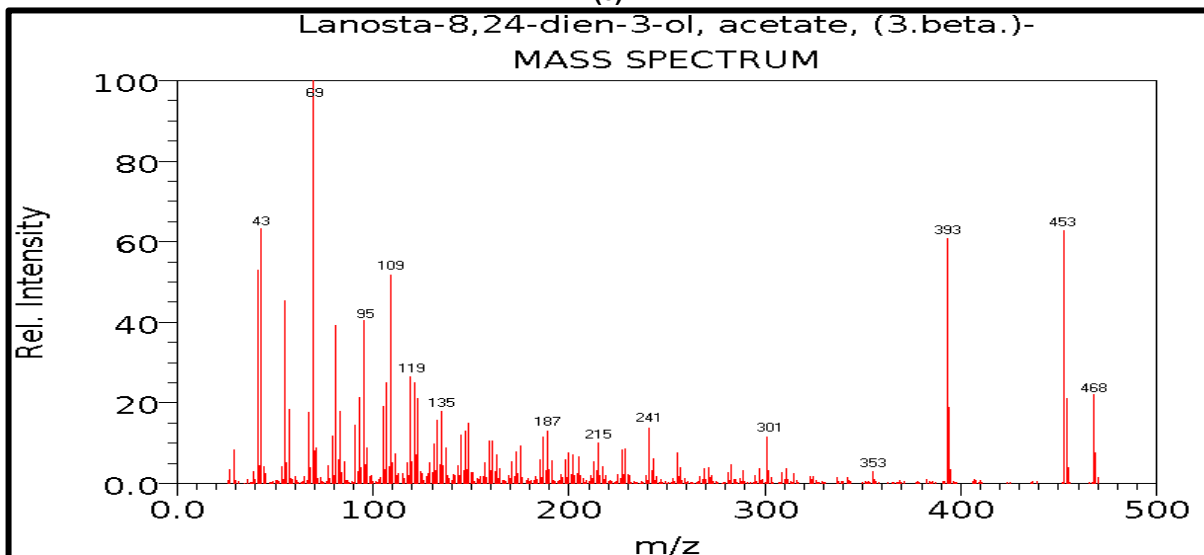
(a)



(b)



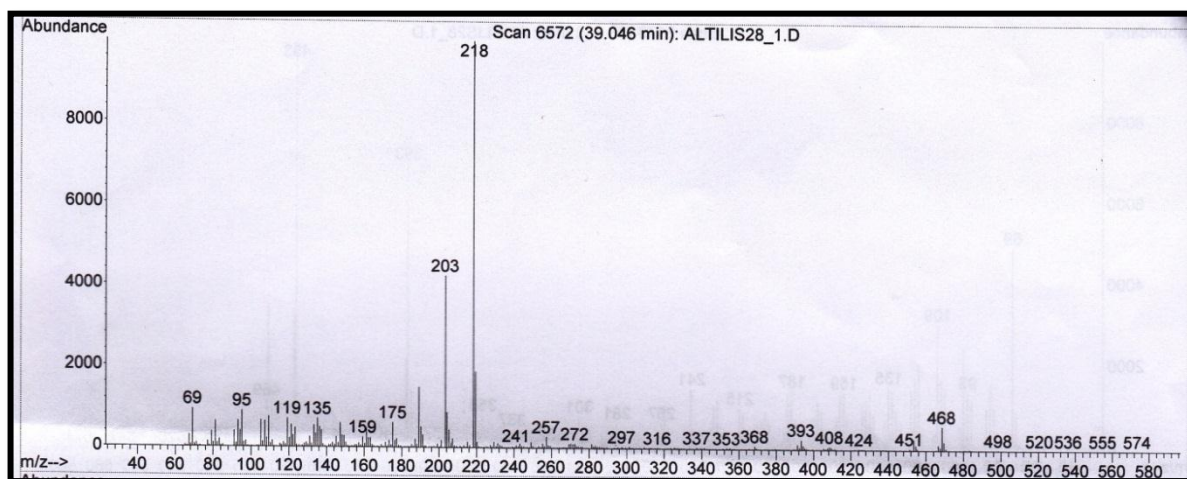
(c)



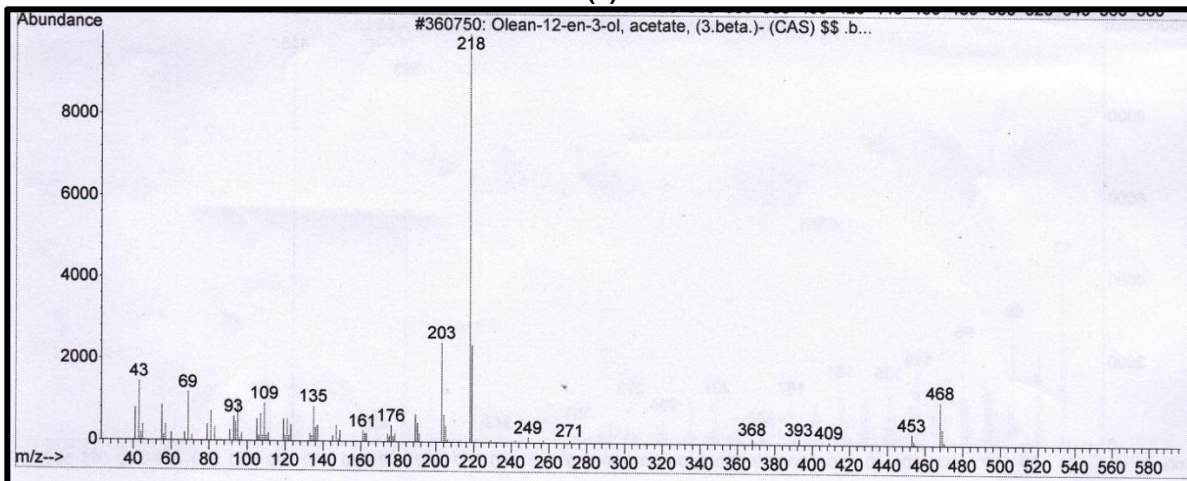
1.2 Espectro de masas del β -Amirin acetato

Espectro de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro de β -Amyrin acetato (468 g/mol ($C_{32}H_{52}O_2$)) de la base de datos Wiley 7n.l (b) y el obtenido por Oyo-Ita *et al.*, (2010) (c).

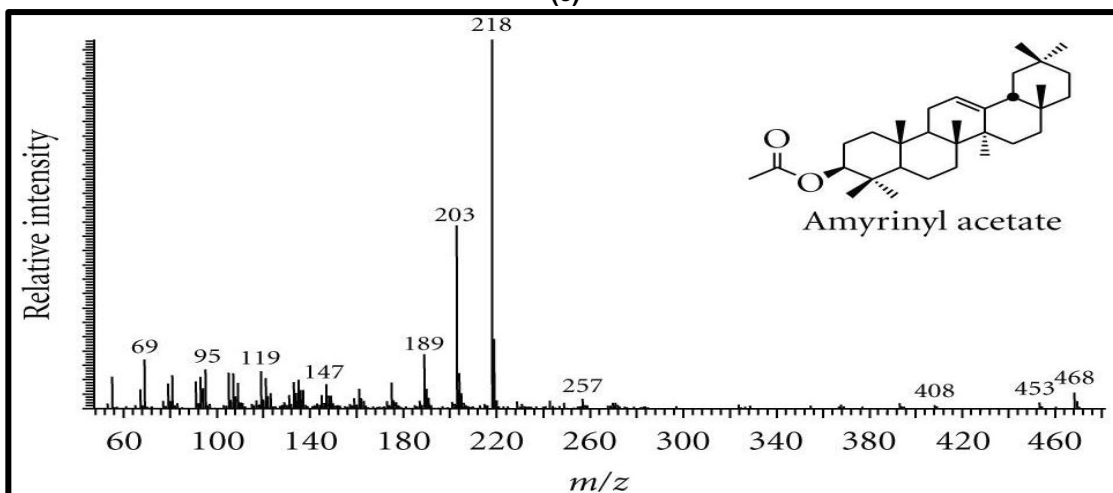
(a)



(b)



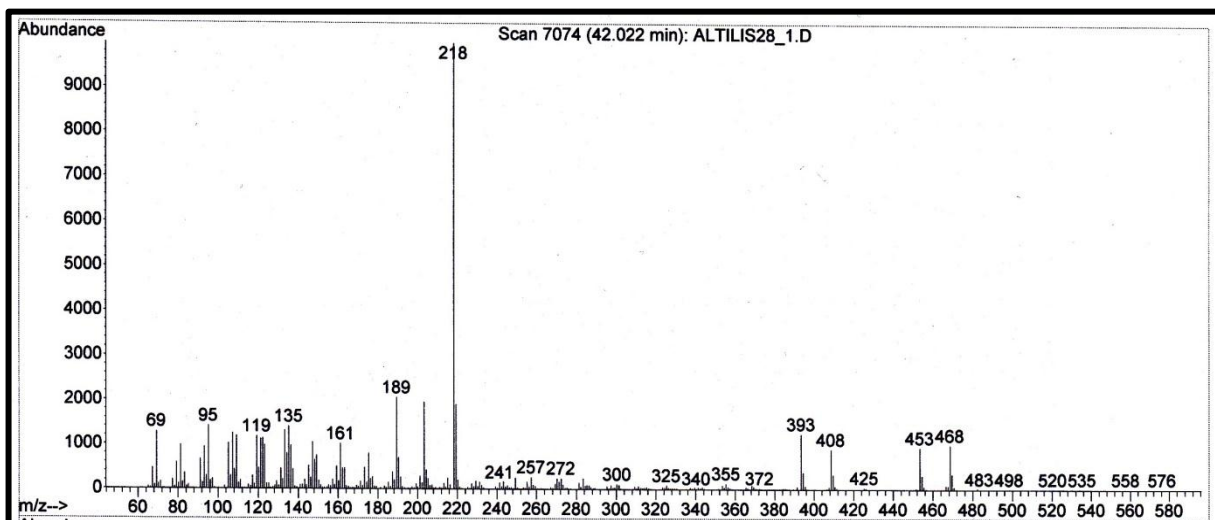
(c)



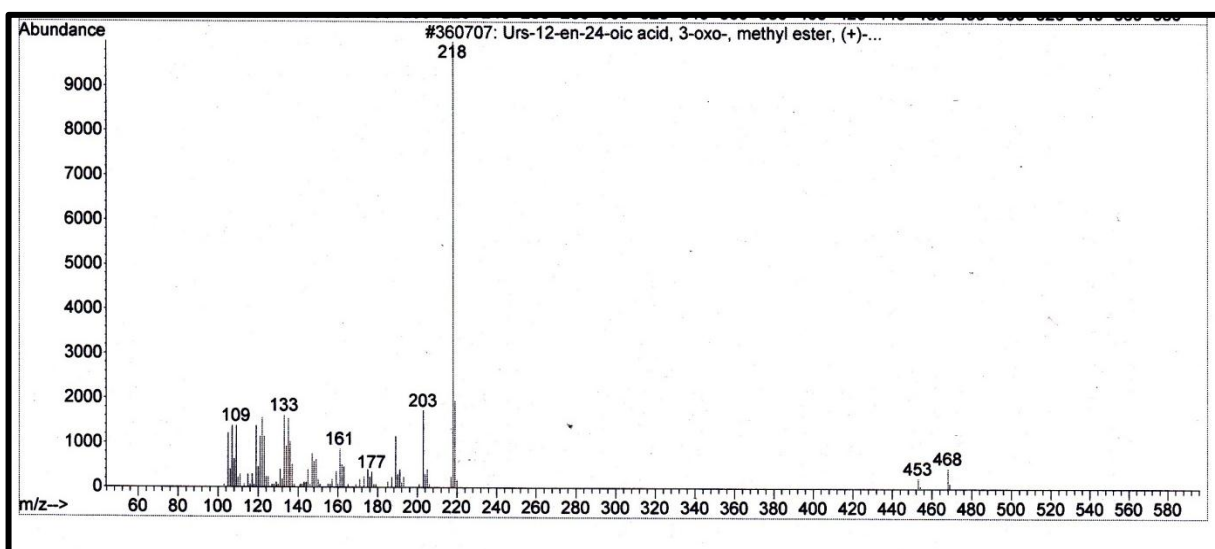
1.3 Espectro de masas Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester

Espectro de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro de Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl éster (468 g/mol ($C_{31}H_{48}O_3$)) de la base de datos Wiley 7n.l (b)

(a)

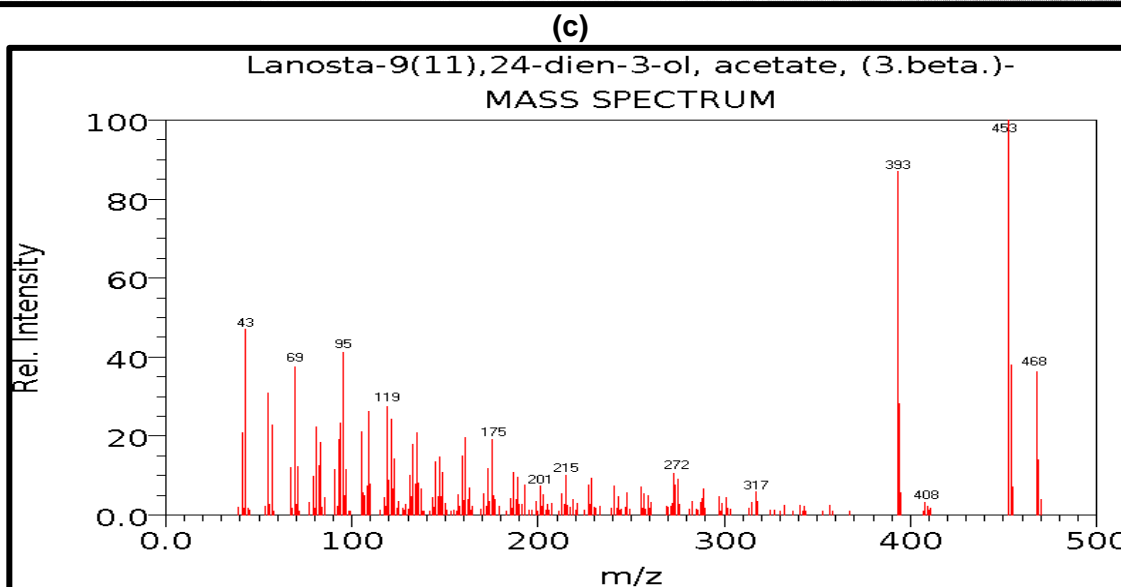
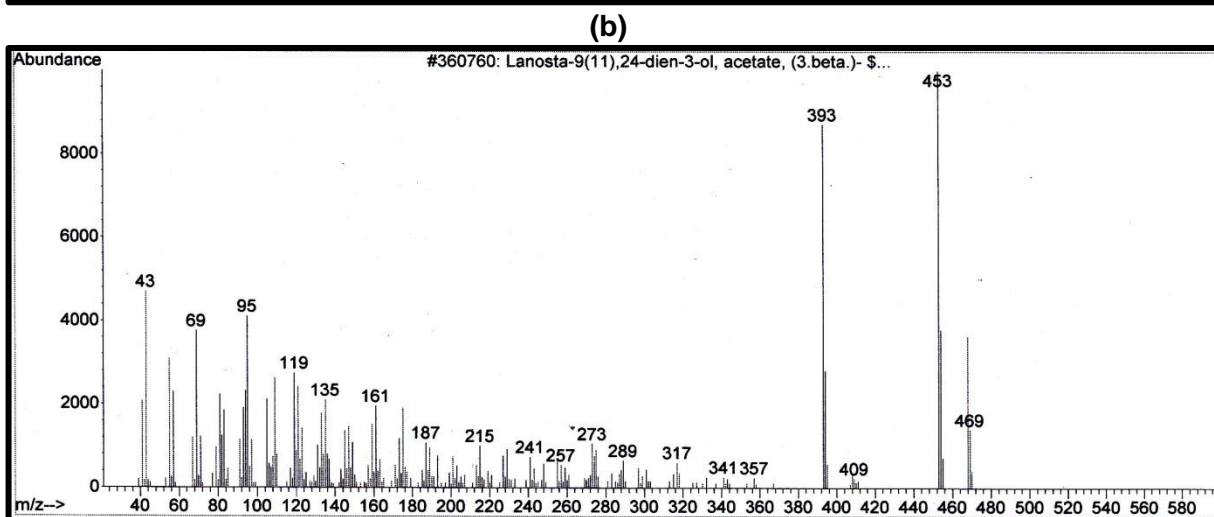
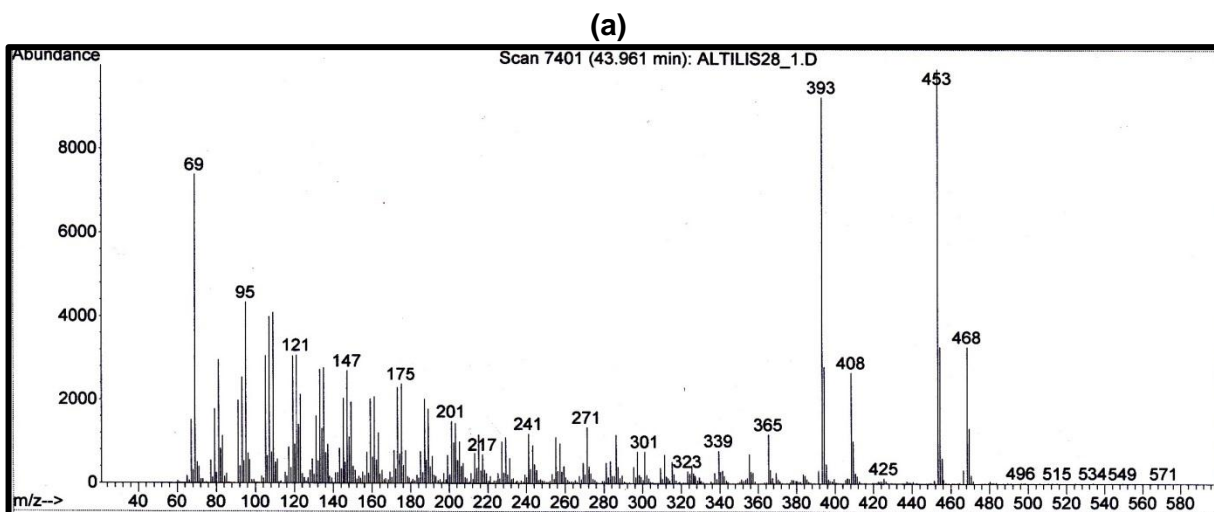


(b)



1.4 Espectro de masas del Parkeol acetato.

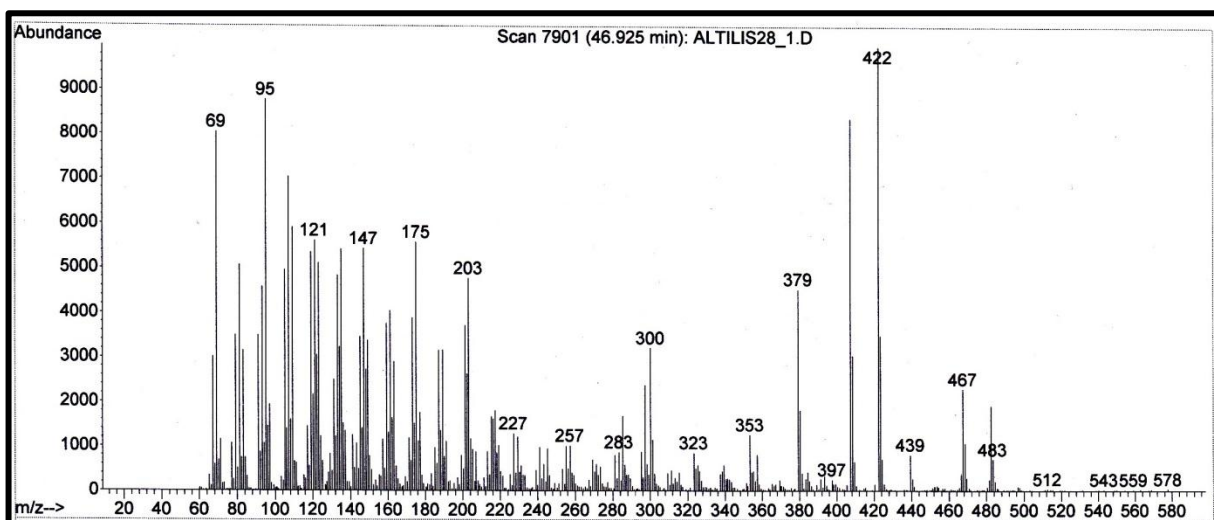
Espectrometría de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro de Parkeol acetato (468 g/mol ($C_{32}H_{52}O_2$)) de la base de datos Wiley 7n.l (b) y NIST 2011 (c).



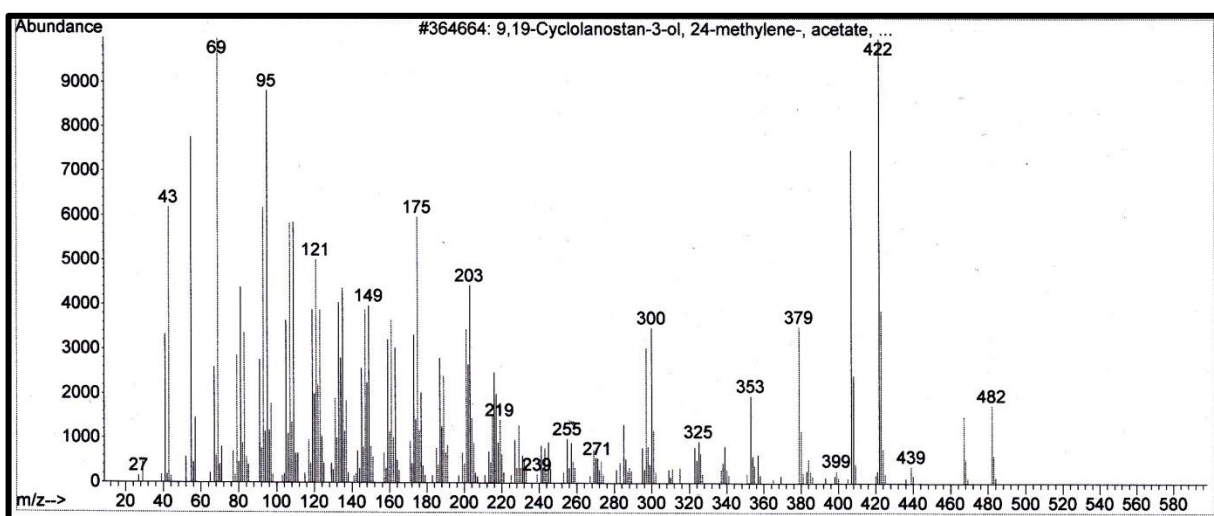
1.5 Espectro de masas del 9,19-Ciclolanostan-3-ol, 24-metilene-, acetato, (3 β)-

Espectro de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro de 9,19-Ciclolanostan-3-ol, 24-metilene-, acetato, (3 β)- (482 g/mol (C₃₃H₅₄O₂)) de la base de datos Wiley 7n.I (b)

(a)



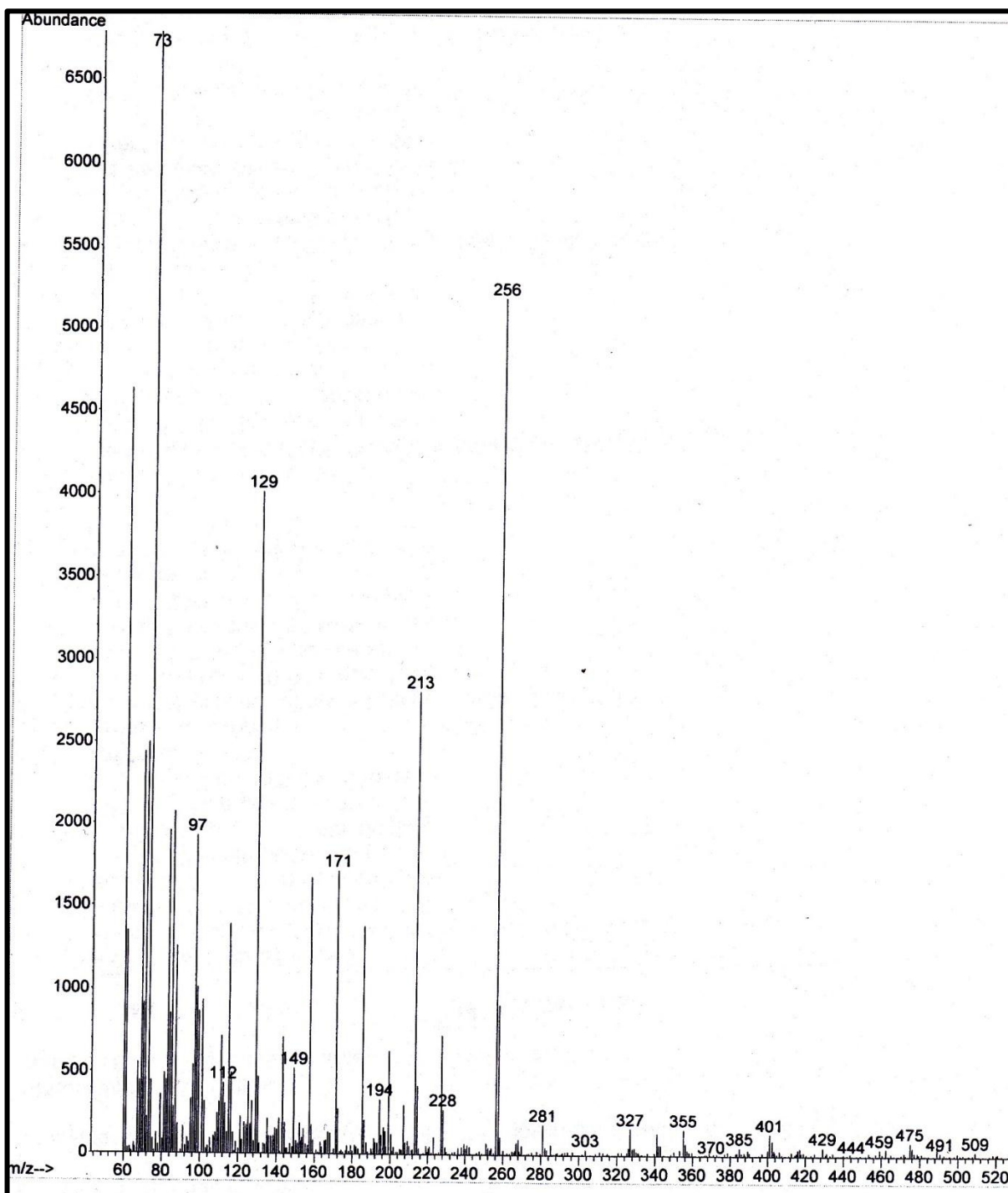
(b)



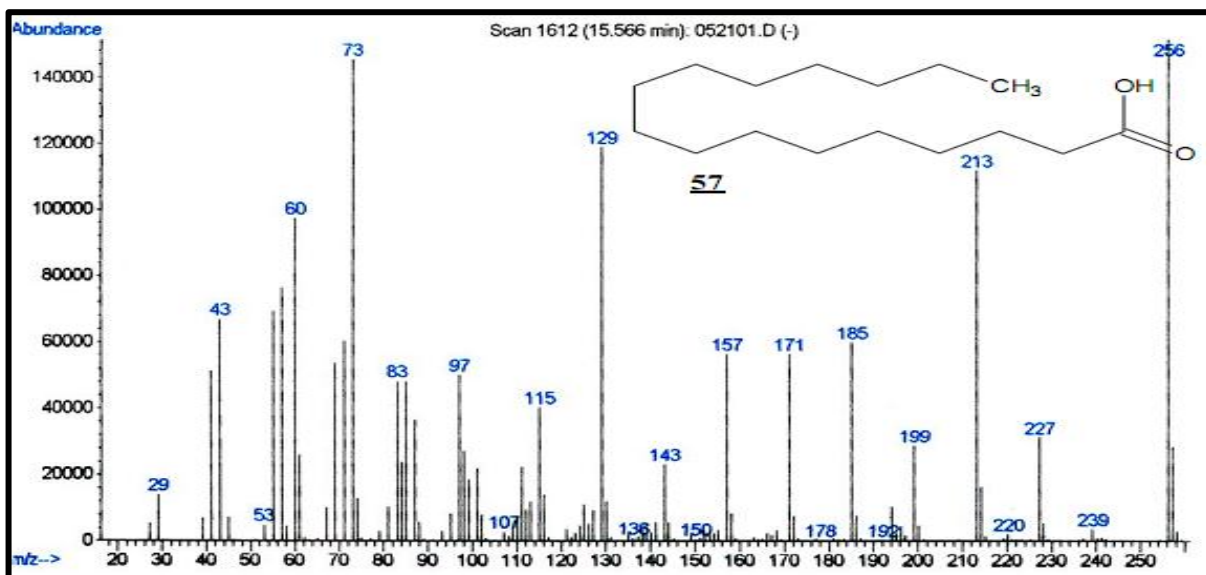
2. Fracción 33. Espectros CG-EM; RMN ^1H , ^{13}C

2.1 Espectro de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro obtenido por (Benavides Calvache, 2004) de ácido hexadecanoico (256 g/mol ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$)) (b) y NIST 2011 (c).

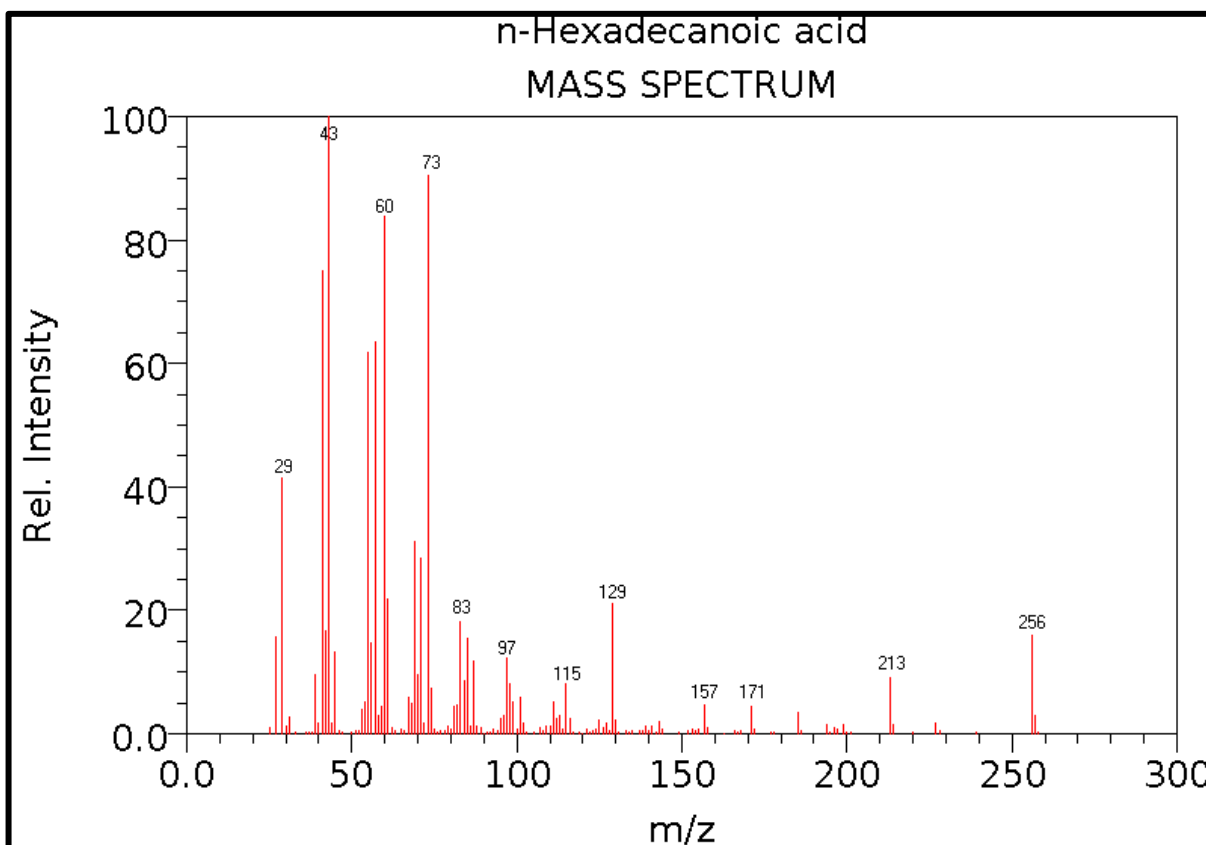
(a)



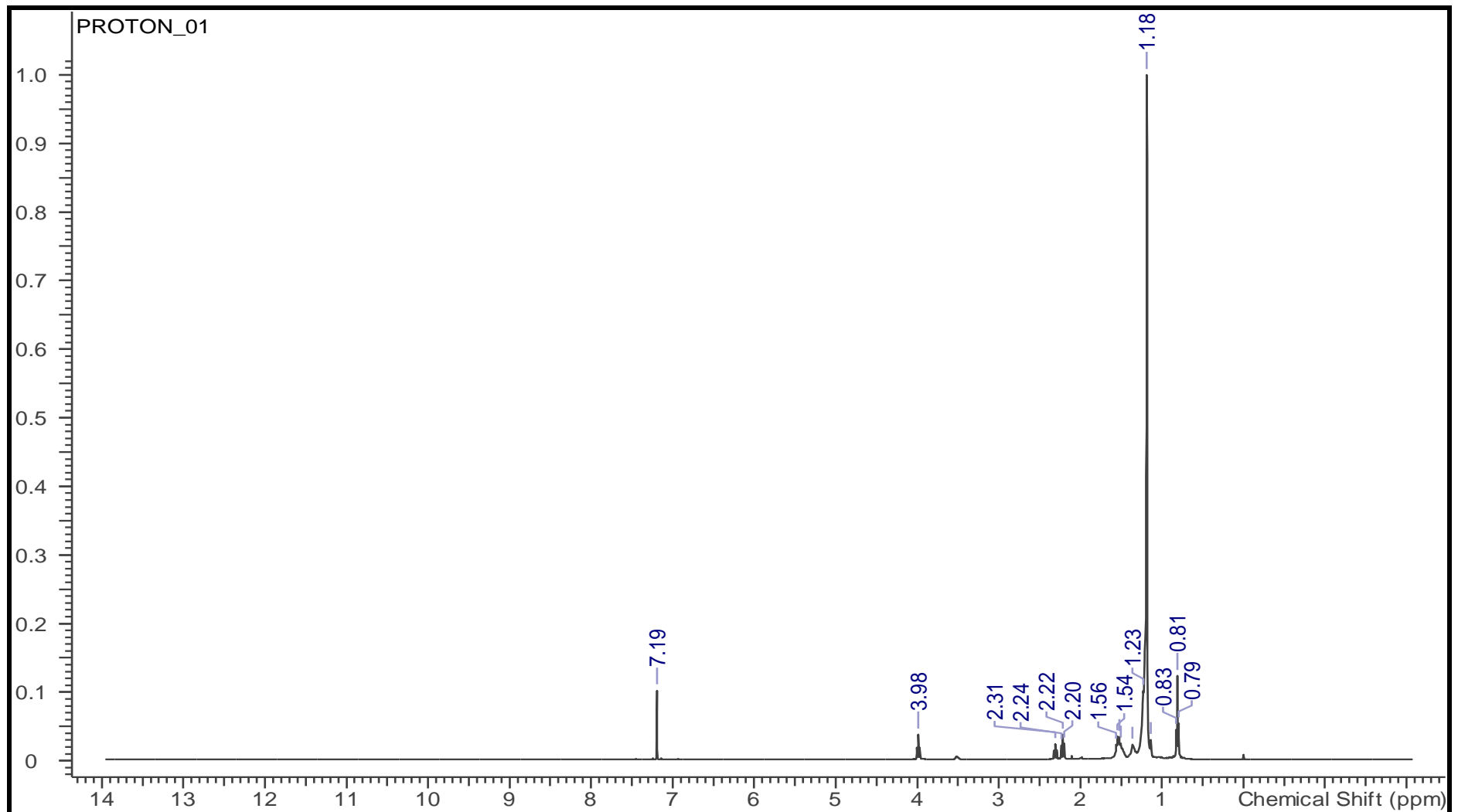
(b)



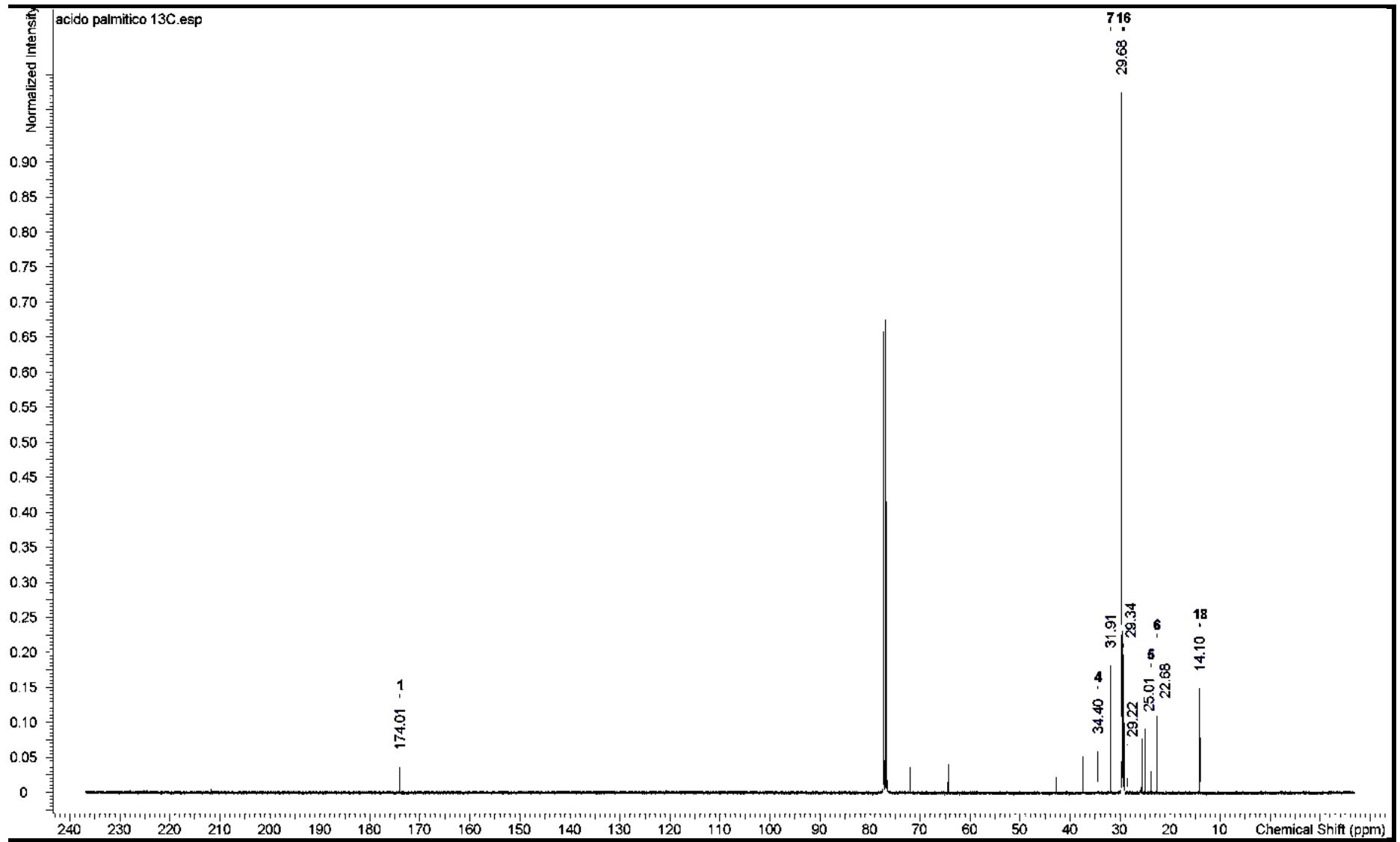
(c)



2.2 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H :



2.3 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C :

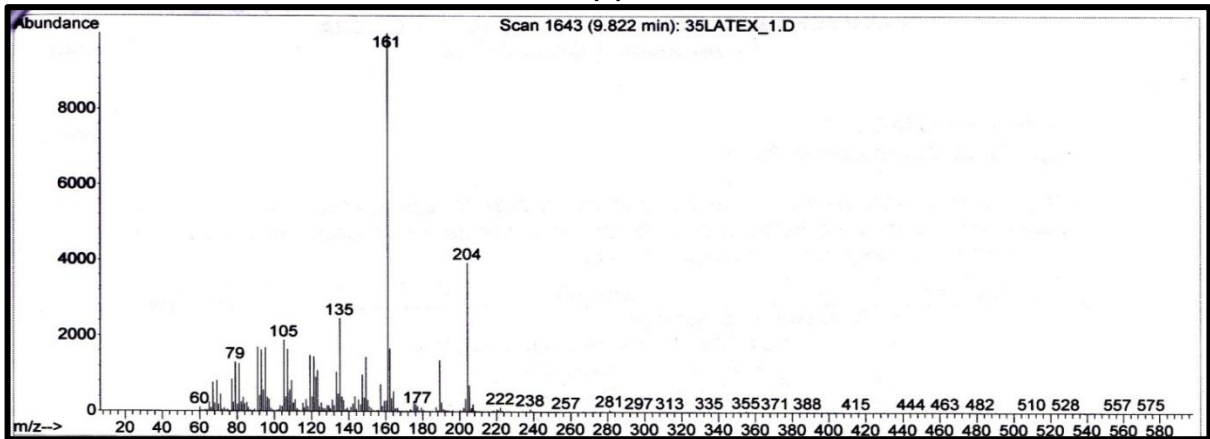


3. Fracción 35. Espectros de masas de los compuestos de la mezcla.

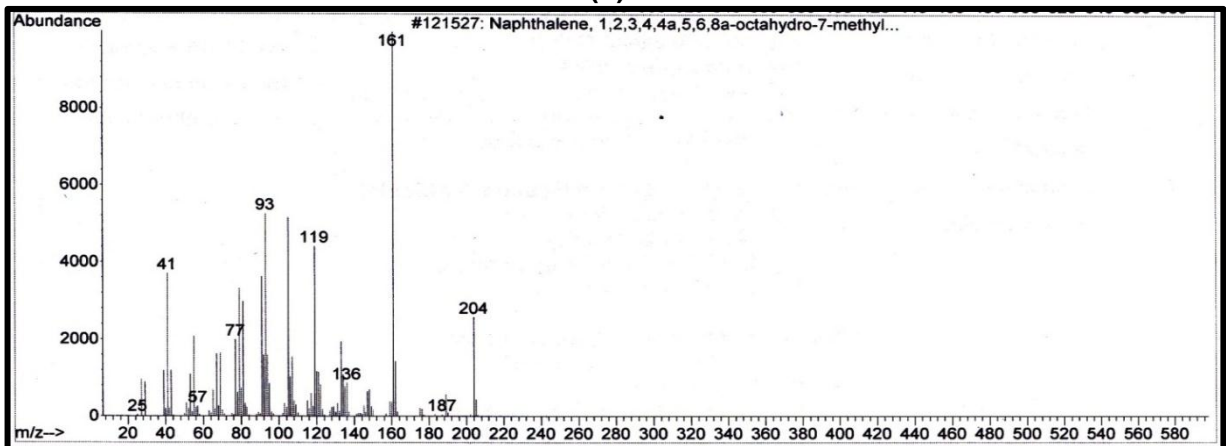
3.1 Espectro de masas del α -Muurolene.

Espectro de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro de α -Muurolene (204 g/mol ($C_{15}H_{24}$)) de la base de datos Wiley 7n.l (b) y NIST 2011 (c).

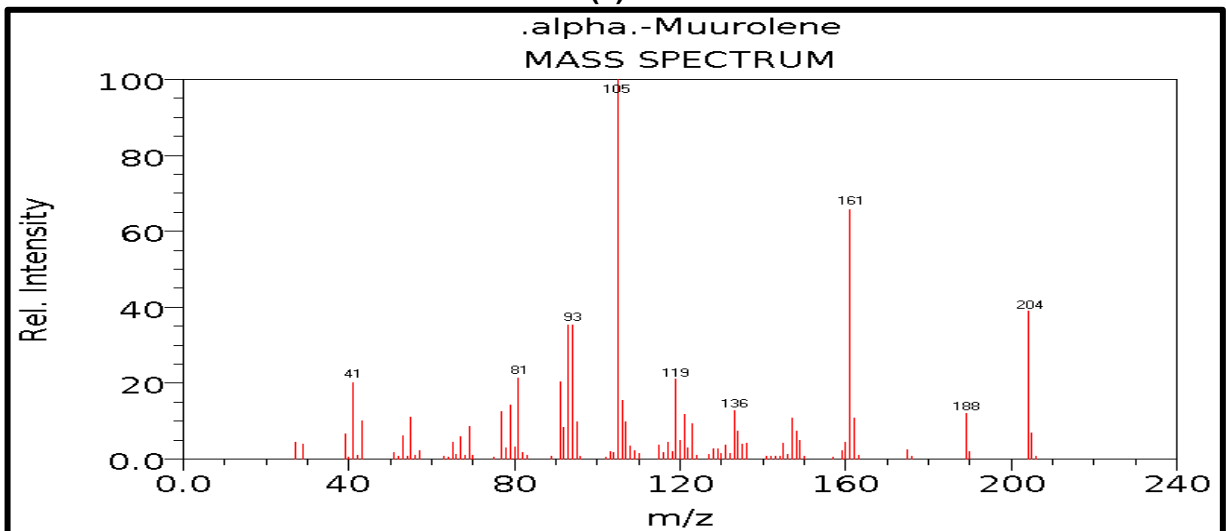
(a)



(b)



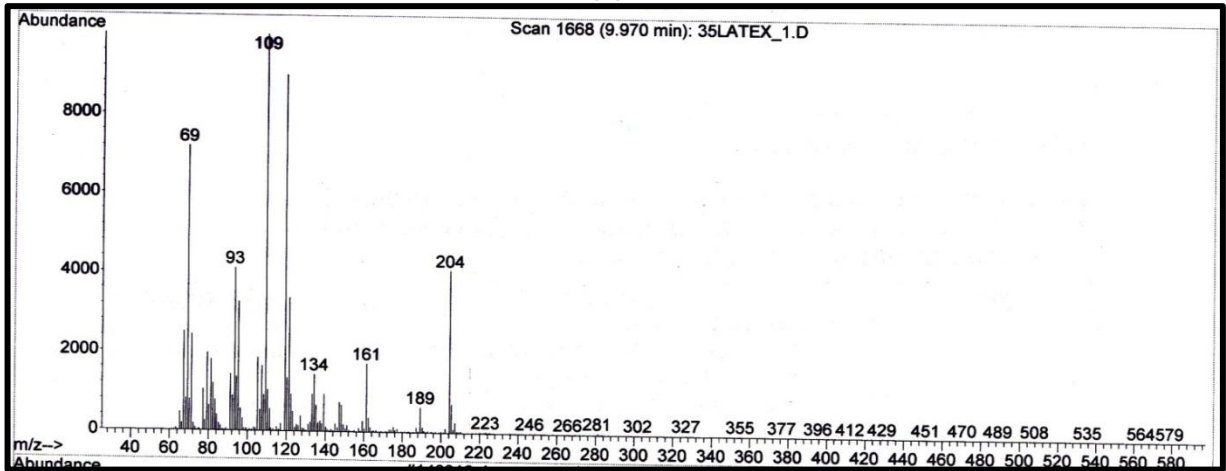
(c)



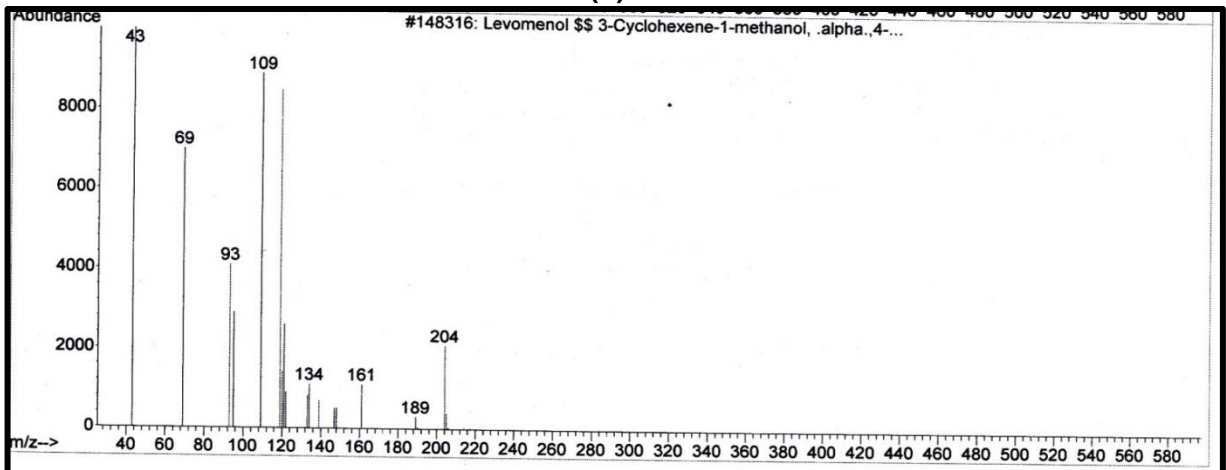
3.2 Espectro de masas del Levomenol

Espectro de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro de compuesto Levomenol (222 g/mol ($C_{15}H_{26}O$)) de la base de datos Wiley 7n.l (b) y NIST 2011 (c).

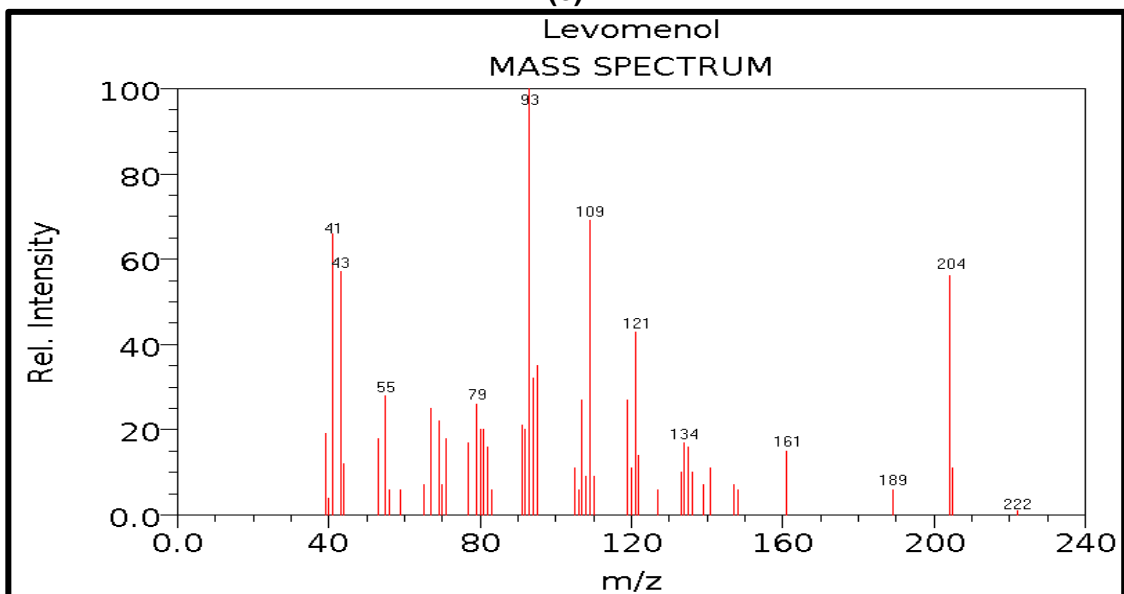
(a)



(b)



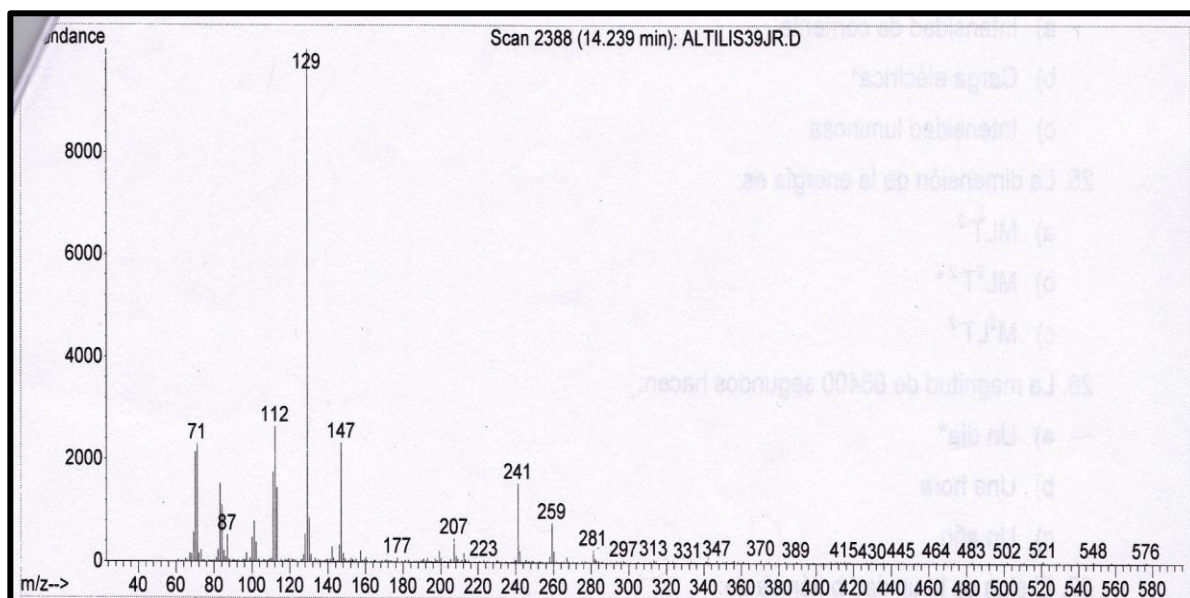
(c)



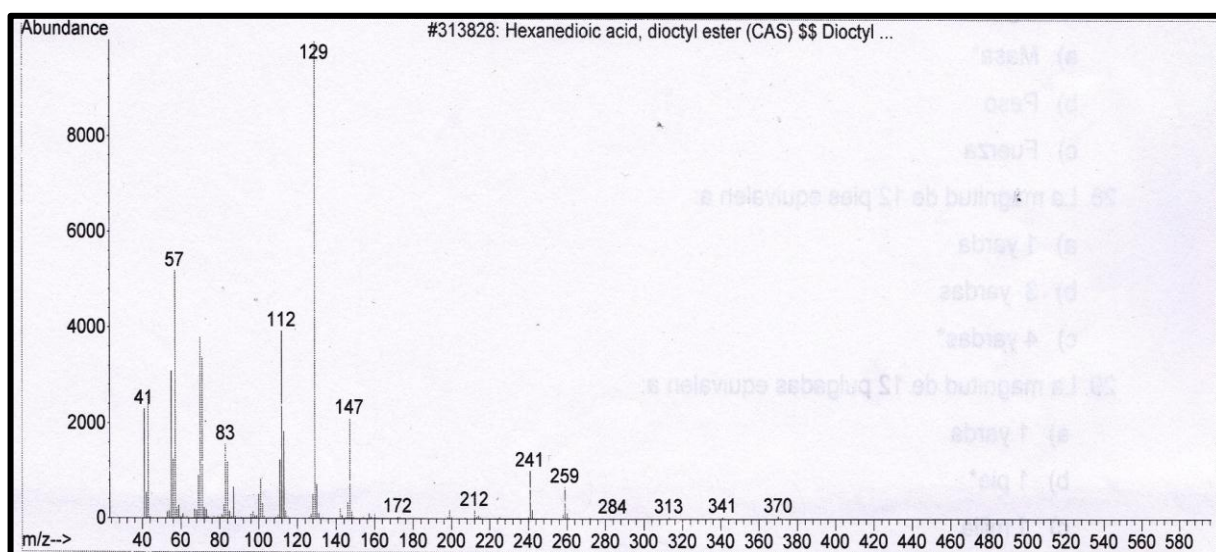
4. Fracción 39: Espectros CG-EM; RMN ^1H , ^{13}C

4.1 Espectro de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro de la base de datos Wiley 7.n.l de ácido hexanodioico, éster de dioctilo (370 g/mol ($\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_4$)) (b).

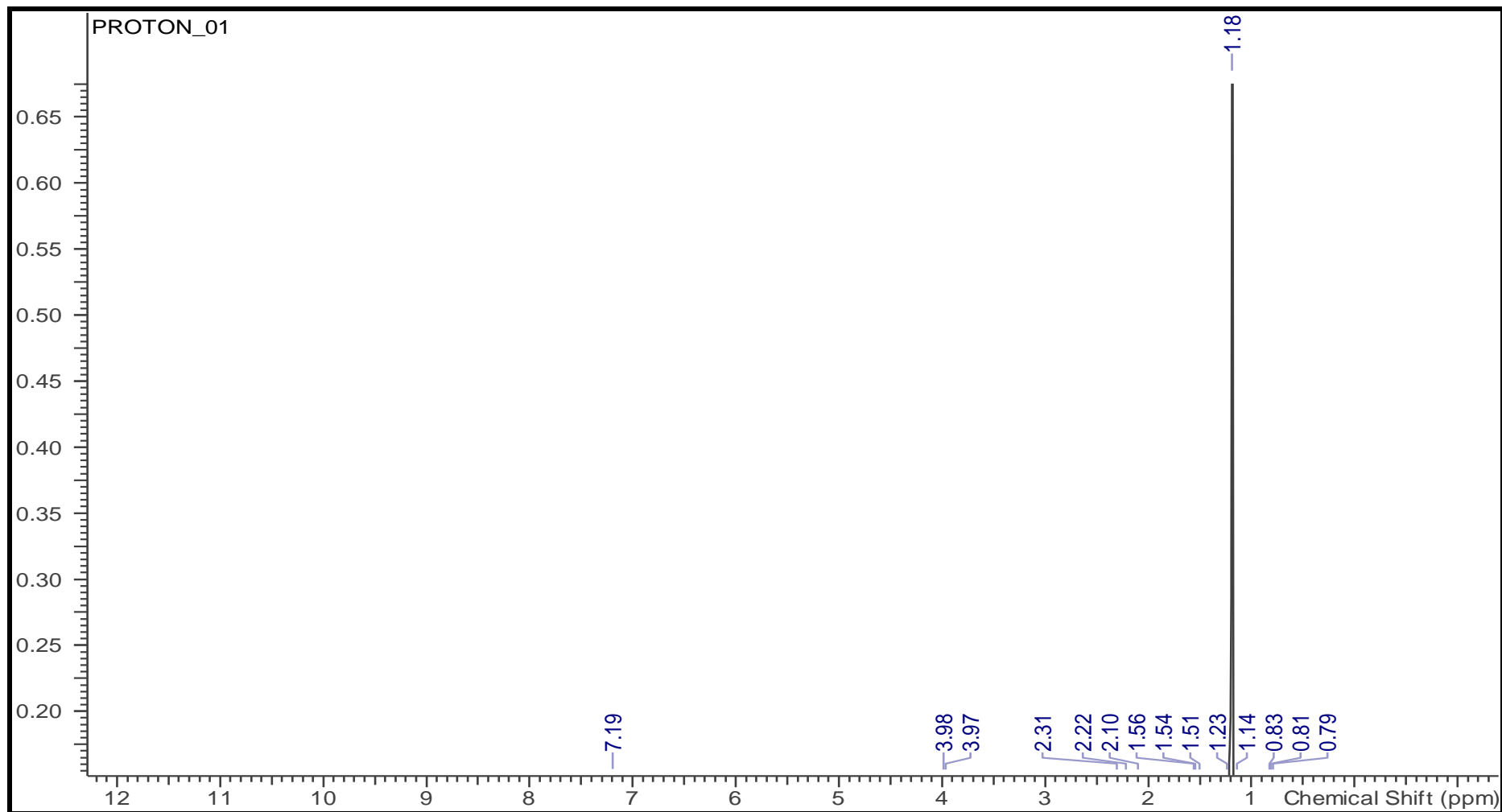
(a)



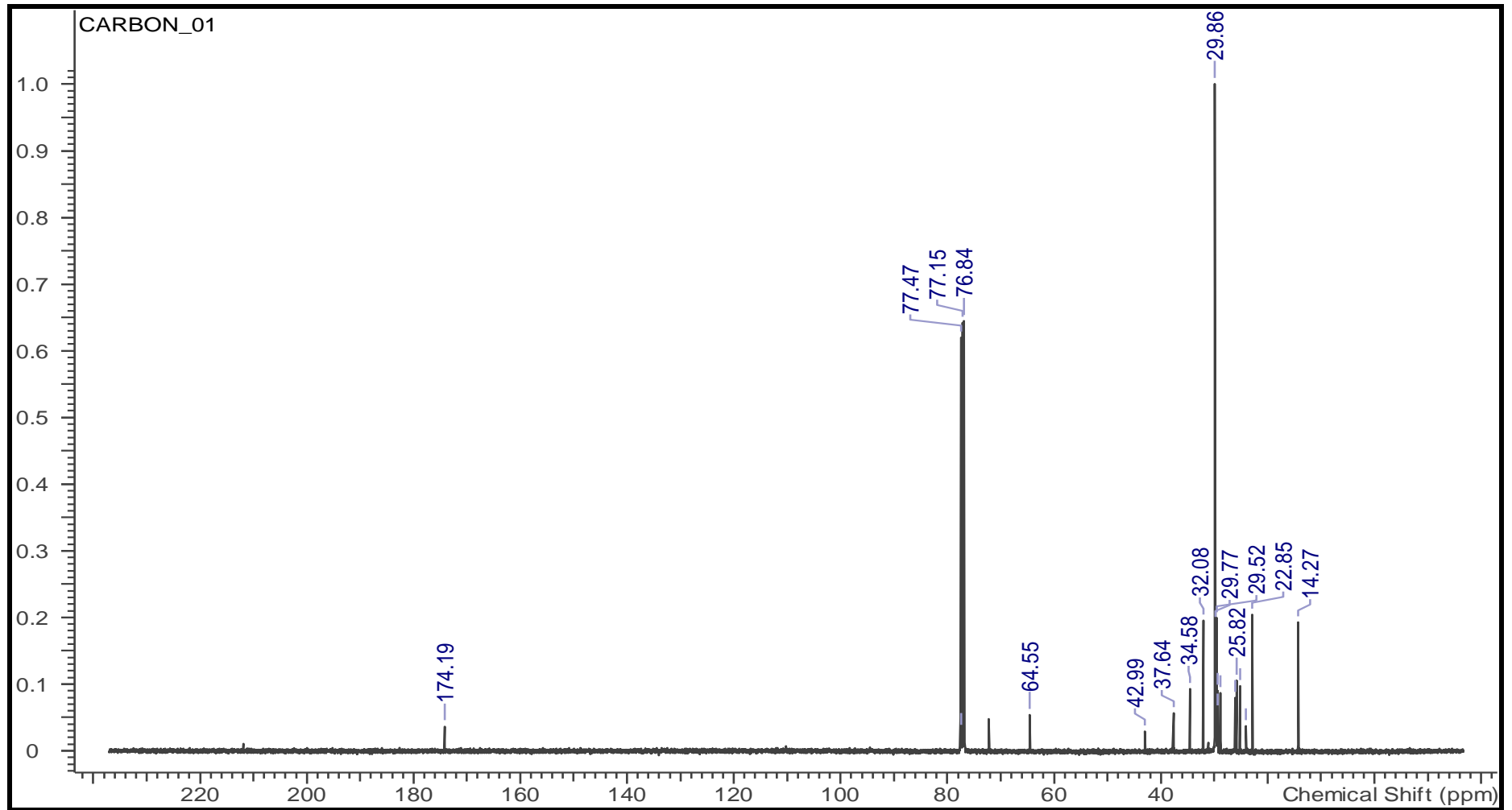
(b)



4.2 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H :



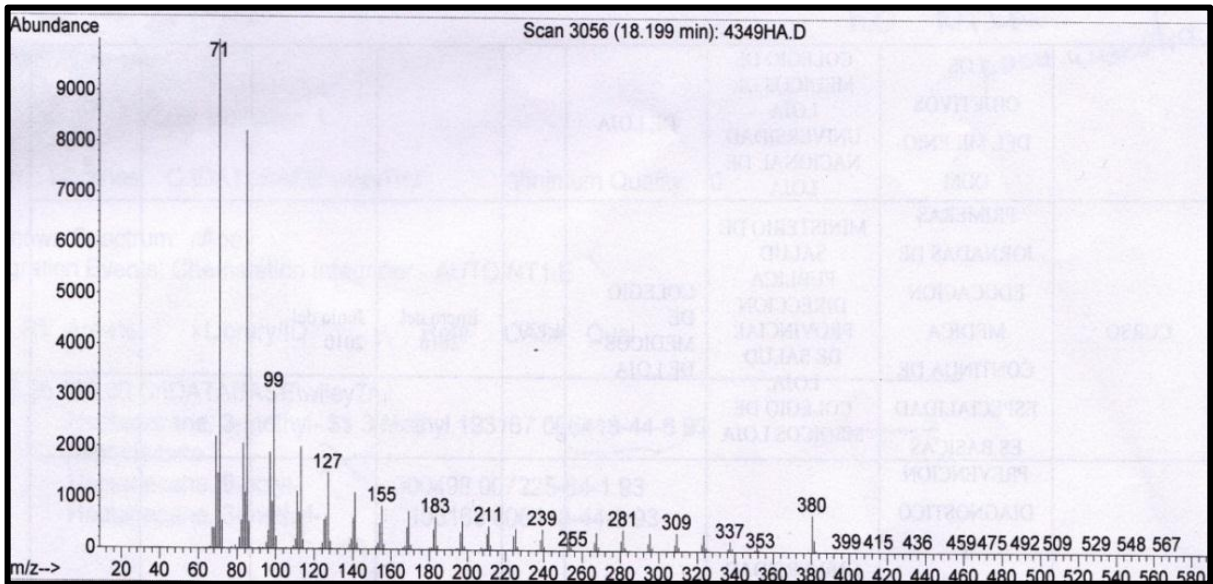
4.3 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C :



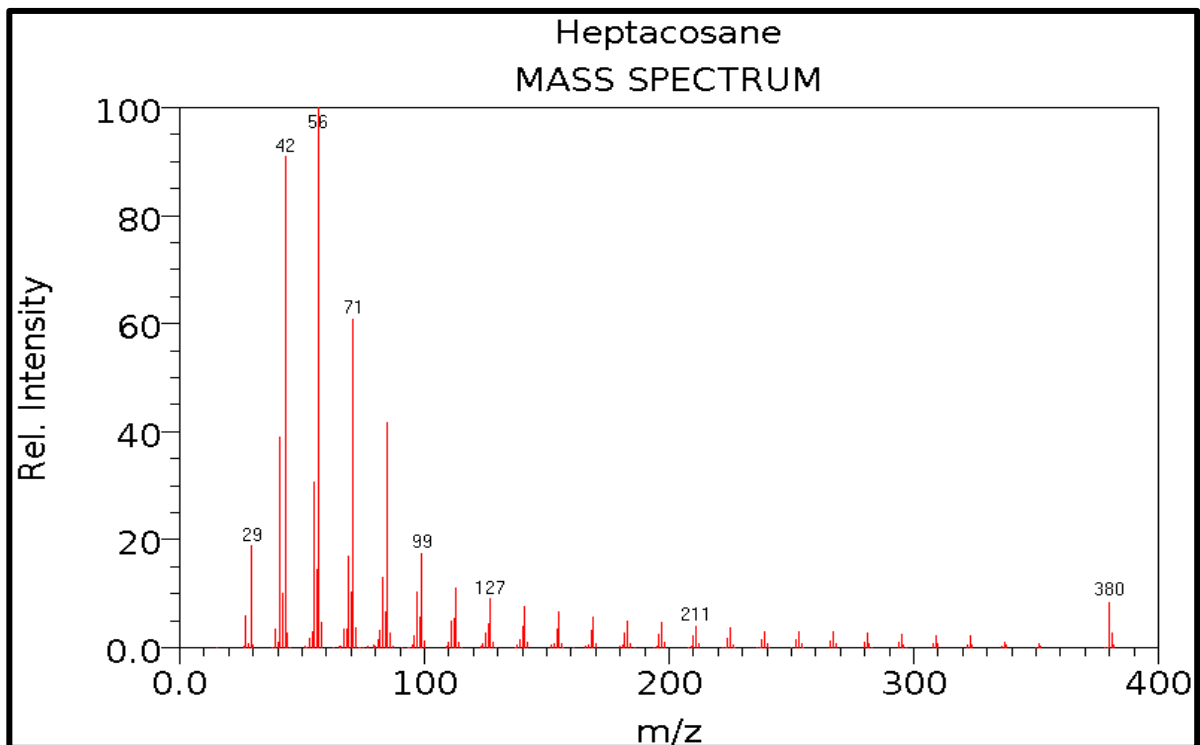
5. Fracción 43-49. Espectro de masa.

Espectro de masas del compuesto obtenido (a), comparado con el espectro de la base de datos Wiley 7.n.l de Heptacosano (380 g/mol ($C_{27}H_{56}$)) b).

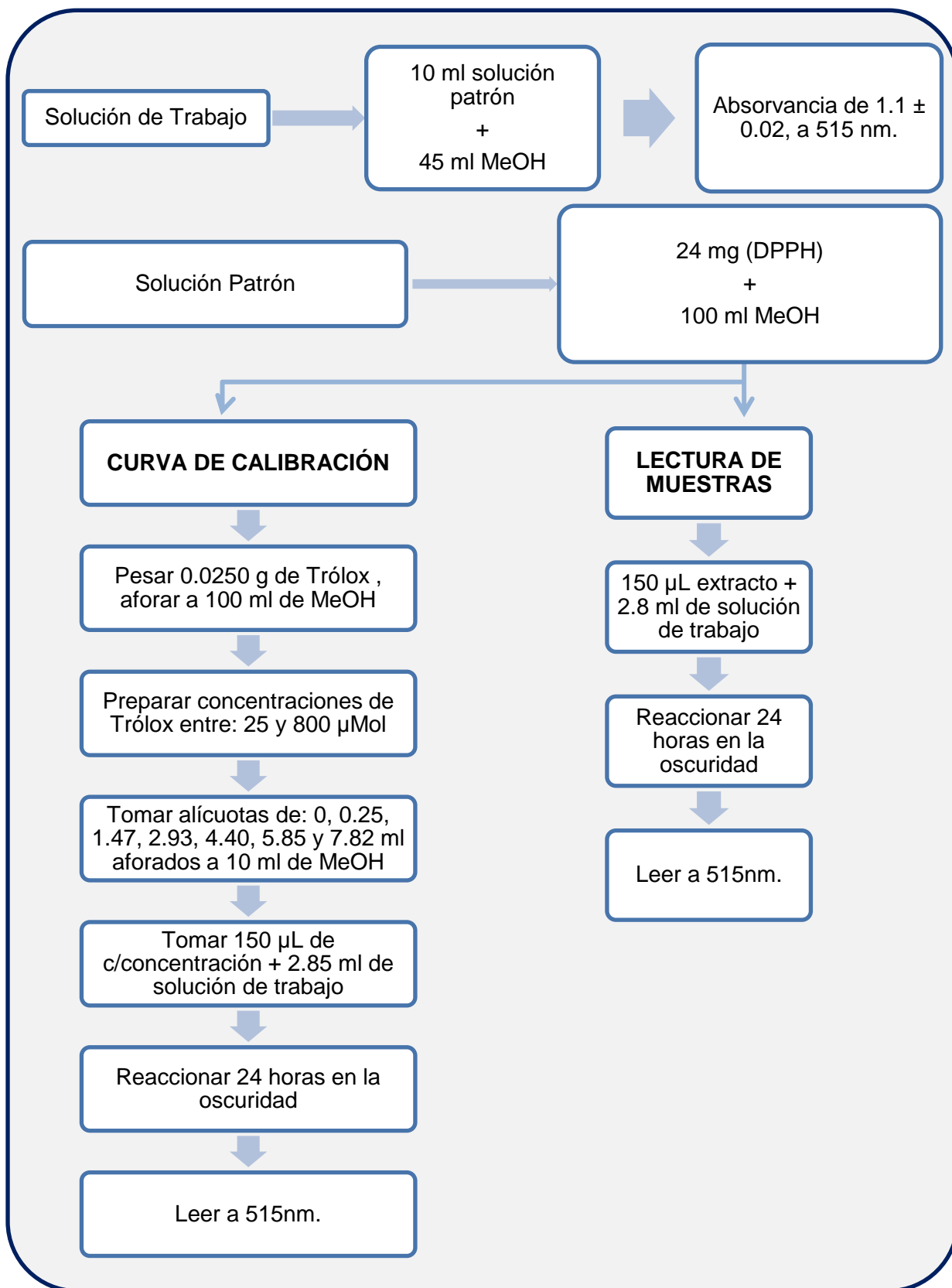
(a)



(b)

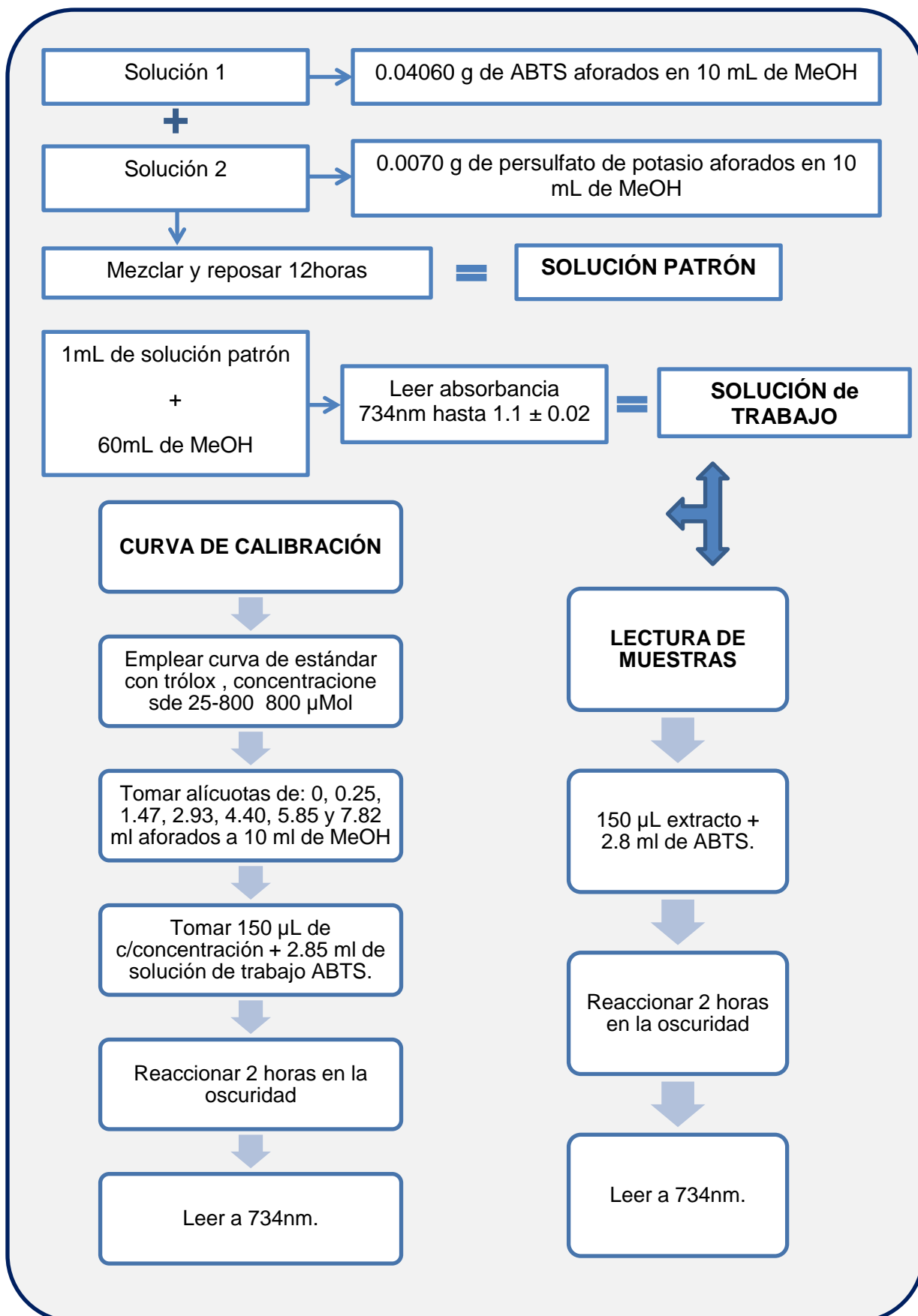


6. Esquema de determinación de actividad antioxidante (DPPH).



Fuente: Vintimilla G., 2013.

7. Esquema de determinación de actividad antioxidante (ABTS).

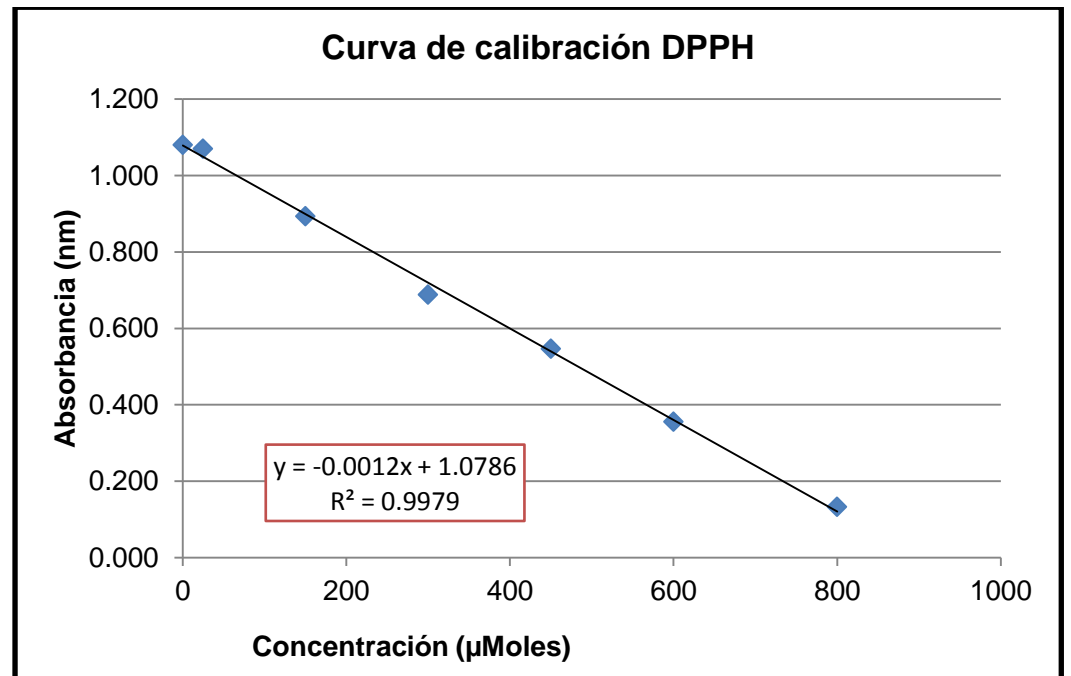


Fuente: Vintimilla G., 2013.

8. Actividad Antioxidante: Curva de Calibración DPPH.

Datos de curva de calibración DPPH

CONCENT. (µM)	ABSORBANCIA (515 nm)			PROMEDIO
0	1.08	1.08	1.081	1.080
25	1.07	1.07	1.07	1.070
150	0.89	0.893	0.896	0.893
300	0.689	0.688	0.688	0.688
450	0.545	0.546	0.548	0.546
600	0.354	0.356	0.357	0.356
800	0.132	0.133	0.132	0.132



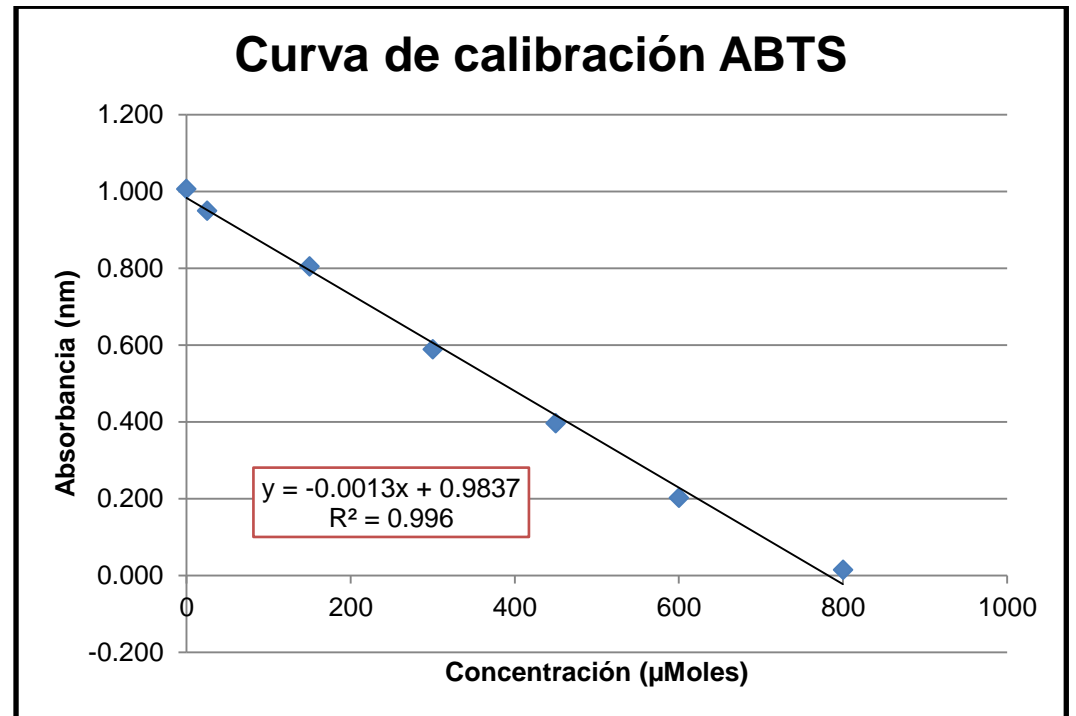
Fuente: Experimentación

Fuente: Autora.

9. Actividad Antioxidante: Curva de Calibración ABTS.

Datos de curva de calibración ABTS

CONCENT. (µM)	ABSORBANCIA (734nm)			PROMEDIO
0	1.006	1.005	1.007	1.006
25	0.947	0.948	0.953	0.949
150	0.804	0.803	0.806	0.804
300	0.589	0.588	0.589	0.589
450	0.395	0.397	0.397	0.396
600	0.203	0.201	0.202	0.202
800	0.014	0.015	0.014	0.014



Fuente: Experimentación
Fuente: Autora.

10. Valores en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ de cada extracto (DPPH).

Extracto (1000 ppm)	ABSORBANCIA (515 nm)	X		$\mu\text{MolEqTrolox/mgExtracto}$	peso extracto (mg)	peso planta seca (g)	$\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$	Promedio $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$	Desviación estándar
Hojas DCM	0.221	716.18	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.72	14620	750	13.961	13.97	0.01
	0.221	716.18	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.72	14620	750	13.961		
	0.22	717.01	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.72	14620	750	13.977		
Hojas AcOEt	0.193	739.56	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.74	7730	750	7.622	7.63	0.00
	0.193	739.56	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.74	7730	750	7.622		
	0.192	740.40	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.74	7730	750	7.631		
Hojas Hex	0.788	242.67	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.24	23580	750	7.629	7.62	0.02
	0.788	242.67	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.24	23580	750	7.629		
	0.789	241.83	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.24	23580	750	7.603		
Hojas MeOH	0.424	546.65	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.55	64892	750	47.298	47.27	0.04
	0.425	545.81	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.55	64892	750	47.225		
	0.424	546.65	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.55	64892	750	47.298		
Hojas AcOEt des	0.121	799.69	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.80	12694	300	33.838	33.86	0.02
	0.12	800.53	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.80	12694	300	33.873		
	0.12	800.53	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.80	12694	300	33.873		
Raices Hex	0.875	170.01	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.17	1100	100	1.870	1.86	0.01
	0.877	168.34	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.17	1100	100	1.852		
	0.876	169.18	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.17	1100	100	1.861		
Raices AcOEt	0.148	777.14	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.78	3000	100	23.314	23.31	0.00
	0.148	777.14	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.78	3000	100	23.314		
	0.148	777.14	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.78	3000	100	23.314		
Raices MeOH	0.133	789.67	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.79	5780	100	45.643	45.66	0.03
	0.132	790.50	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.79	5780	100	45.691		
	0.133	789.67	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.79	5780	100	45.643		

11. Valores en $\mu\text{MolEqTrolox/gplantaseca}$ de cada extracto (ABTS).

Extracto (1000 ppm)	ABSORBAN CIA (734nm)	X		$\mu\text{MolEqTrolox}$ /mgExtracto	peso extracto (mg)	peso planta seca (g)	$\mu\text{MolEqTrolox}/$ gplantaseca	Promedio $\mu\text{MolEqTrolox}/$ gplantaseca	Desviación Estándar
			$\mu\text{MolEqTrolox}$						
Hojas DCM	0.405	460.00	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.92	14620	750	17.934	17.92	0.05
	0.407	458.41	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.92	14620	750	17.872		
	0.404	460.80	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.92	14620	750	17.965		
Hojas AcOEt	0.363	493.39	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.99	7730	750	10.170	10.20	0.03
	0.361	494.98	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.99	7730	750	10.203		
	0.359	496.57	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.99	7730	750	10.236		
Hojas Hex	0.724	206.44	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.21	23580	750	6.490	6.52	0.03
	0.722	208.03	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.21	23580	750	6.540		
	0.722	208.03	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.21	23580	750	6.540		
Hojas MeOH	0.177	641.24	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.64	64892	750	55.482	55.48	0.00
	0.177	641.24	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.64	64892	750	55.482		
	0.177	641.24	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.64	64892	750	55.482		
Hojas AcOEt des	0.268	568.90	$\mu\text{MolEqTrolox}$	1.14	12694	300	48.144	48.17	0.04
	0.267	569.70	$\mu\text{MolEqTrolox}$	1.14	12694	300	48.212		
	0.268	568.90	$\mu\text{MolEqTrolox}$	1.14	12694	300	48.144		
Raices Hex	0.742	192.13	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.19	1100	100	2.113	2.12	0.01
	0.742	192.13	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.19	1100	100	2.113		
	0.741	192.93	$\mu\text{MolEqTrolox}$	0.19	1100	100	2.122		
Raices AcOEt	0.085	714.37	$\mu\text{MolEqTrolox}$	1.43	3000	100	42.862	42.91	0.05
	0.084	715.16	$\mu\text{MolEqTrolox}$	1.43	3000	100	42.910		
	0.083	715.96	$\mu\text{MolEqTrolox}$	1.43	3000	100	42.957		
Raices MeOH	0.019	766.83	$\mu\text{MolEqTrolox}$	1.53	5780	100	88.645	88.71	0.05
	0.018	767.62	$\mu\text{MolEqTrolox}$	1.54	5780	100	88.737		
	0.018	767.62	$\mu\text{MolEqTrolox}$	1.54	5780	100	88.737		

*Los extractos azules fueron diluidos a 500ppm.