



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios a partir de las especies *Lepechinia paniculata* (Kunth) Epling y *Piper lanceifolium* Kunth.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Benítez Vivar, Lita Silvana.

DIRECTOR: Ramírez Robles, Jorge Yandry, Ph.D.

LOJA-ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Jorge Yandry Ramírez Robles.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios a partir de las especies *Lepechinia paniculata* (Kunth) Epling y *Piper lanceifolium* Kunth. realizado por Benítez Vivar Lita Silvana, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Febrero de 2018

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Benítez Vivar Lita Silvana declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios a partir de las especies *Lepechinia paniculata* (Kunth) Epling y *Piper lanceifolium* Kunth de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo el Ph.D. 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. 88 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 o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....
Autora: Benítez Vivar Lita Silva
Cédula: 1105656845

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía día a día y permitirme cumplir una etapa más en la vida. A mis adorados padres que con su amor incondicional, paciencia y sabiduría me han enseñado que todo lo que deseas se puede hacer realidad, a mis hermanos que me brindaron su apoyo en cada etapa hasta llegar al final de este trabajo y a mis amigos que siempre creyeron en mí y que supieron apoyarme en todo momento.

Para todos ustedes mi esfuerzo y dedicación.

Lita Silvana Benítez Vivar

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por regalarme sabiduría y fortaleza para seguir en este largo caminar. A mis padres, hermanos y amigos; ellos son quienes me motivan a seguir creciendo.

A mi director de tesis Ph.D. Jorge Yandry Ramírez Robles por su valioso conocimiento, guía y dedicación que me permitieron culminar este trabajo con éxito.

Finalmente agradezco a la Universidad Técnica particular de Loja y al Departamento de Química y Ciencias Exactas por permitirme el uso de las instalaciones y recursos para la realización de esta investigación y poder culminar mi formación profesional.

Lita Silvana Benítez Vivar

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Medicina tradicional.....	6
1.2 Plantas medicinales en el Ecuador.....	6
1.3 Familia Lamiaceae	7
1.3.1 Género <i>Lepechinia</i>	7
1.3.2 Compuestos fitoquímicos aislados del genero <i>Lepechinia</i>	7
1.3.3 <i>Lepechinia paniculata</i> (Kunth) Epling.....	7
1.3.4 Descripción botánica de la especie <i>Lepechinia paniculata</i> (Kunth) Epling.....	8
1.4 Familia Piperaceae.....	8
1.4.1 Genero <i>Piper</i>	9
1.4.2 Compuestos fitoquímicos aislados del genero <i>Piper</i>	9
1.4.3 <i>Piper lanceifolium</i> Kunth.....	9
1.4.4 Descripción botánica de la especie <i>Piper lanceifolium</i> Kunth.....	10
1.5 Metabolitos secundarios.....	11
1.6 Cromatografía	11
1.6.1 Cromatografía en capa fina (CCF).	12

1.6.2	Cromatografía en columna (CC).....	12
1.7	Resonancia magnética nuclear (RMN)	12
1.8	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	12
1.9	Actividad antimicrobiana.....	13
1.9.1	Bacterias.....	13
1.9.2	Hongos.....	15
CAPÍTULO II		16
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1	Esquema metodológico	17
2.2	Recolección del material vegetal	17
2.3	Obtención de los extractos totales.....	18
2.4	Desclorofilación de extractos totales.....	18
2.5	Aislamiento y purificación de compuestos de <i>L. paniculata</i>	19
2.6	Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo.....	19
2.6.1	Purificación de la fracción LB 6/4.....	19
2.6.2	Fracción LB 7/4.....	19
2.6.3	Purificación de la fracción LB 20/4.	19
2.7	Fraccionamiento del extracto de metanol.....	20
2.8	Aislamiento y purificación de compuesto de <i>P. lanceifolium</i>	20
2.9	Fraccionamiento del extracto de metanol.....	20
2.9.1	Purificación de la fracción PL2.	20
2.9.2	Purificación de la fracción PL3.	21
2.10	Identificación de compuestos obtenidos.....	21
2.10.1	Resonancia magnética nuclear (RMN).	21
2.10.2	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). ...	21
2.11	Determinación de la actividad antimicrobiana	21
2.11.1	Microrganismos de prueba.....	21
2.11.2	Preparación de las muestras.....	22
2.11.3	Preparación del cultivo overnight.....	22
2.11.4	Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias.....	22
2.11.5	Preparación de la suspensión del inóculo para levaduras.	23
2.11.6	Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.	23

2.12	Determinación de la actividad enzimática	23
2.12.1	Ensayo de α -glucosidasa	23
CAPÍTULO III		24
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	24
3.1	Extractos obtenidos de las especies	25
3.2	Compuestos aislados del extracto de acetato de etilo de la especie <i>Lepechinia paniculata</i>	25
3.2.1	Fracción LB 88/13.	25
3.2.2	Fracción LB 7/4.....	27
3.2.3	Fracción LB 239/34.	29
3.3	Compuestos aislados del extracto de metanol de la especie <i>Piper lanceifolium</i>	31
3.3.1	Fracción PL9.	31
3.3.2	Fracción PL3.	32
3.4	Determinación de la actividad antimicrobiana	33
3.5	Determinación de la actividad enzimática	35
CONCLUSIONES.....		36
RECOMENDACIONES.....		37
BIBLIOGRAFÍA.....		38
ANEXOS.....		47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Lepechinia paniculata</i>	8
Figura 2: <i>Piper lanceifolium</i>	10
Figura 3: Esquema metodológico de la investigación.....	17
Figura 4: Desclorofilación de extracto de metanol. a) Extracto total de metanol, b) Extracto desclorofilado, c) Clorofilas	18
Figura 5: CCF de las fracciones obtenidas en la columna de extracto de acetato de etilo	19
Figura 6: CCF de las fracciones obtenidas en la columna de extracto de metanol.....	20
Figura 7: CCF de la fracción LB 88/13	26
Figura 8: Estructura química del Ledol.....	27
Figura 9: CCF de la fracción LB 7/4	28
Figura 10: Estructura química del Guaiol y Ledol.....	28
Figura 11: CCF de la fracción LB 239/34	29
Figura 12: Estructura química del Carnosol	30
Figura 13: CCF de la fracción PL9	31
Figura 14: Estructura química del éster metílico del ácido lanceaefolico.....	32
Figura 15: CCF de la fracción PL3.....	32
Figura 16: Estructura química del éster metílico del ciclolanceaefolico	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía <i>L. paniculata</i>	8
Tabla 2: Taxonomía <i>P. lanceifolium</i>	10
Tabla 3: Características de la columna capilar	21
Tabla 4: Microorganismos y condiciones de incubación para <i>L. paniculata</i>	22
Tabla 5: Microorganismos y condiciones de incubación para <i>P. lanceifolium</i>	22
Tabla 6: Peso y rendimiento de extractos totales.	25
Tabla 7: Peso y rendimiento de extractos desclorofilados.	25
Tabla 8: Datos espectroscópicos de ¹³ C y ¹ H RMN del Ledol.....	26
Tabla 9: Sesquiterpenos oxigenados identificados en la fracción LB 7/4.....	28
Tabla 10: Datos espectroscópicos de ¹ H RMN del Carnosol	29
Tabla 11: Datos espectroscópicos de ¹ H RMN del éster metílico del ácido lanceaefólico.31	
Tabla 12: Datos espectroscópicos de ¹ H RMN del éster metílico del ácido ciclolancaefólico.....	33
Tabla 13: Concentración mínima inhibitoria.....	34
Tabla 14: Actividad inhibitoria de α-glucosidasa en extracto total y compuestos de <i>P.</i> <i>lanceifolium</i>	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción LB 88/13 (^1H , ^{13}C 400MHz, CDCl_3).....	48
Anexo 2: Espectro de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases de la fracción LB 7/4.....	50
Anexo 3: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción LB 239/34 (^1H 400MHz, CDCl_3).....	51
Anexo 4: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción PL9 (^1H 400MHz, CDCl_3).....	52
Anexo 5: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción PL3 (^1H 400MHz, CDCl_3).....	53

RESUMEN

La presente investigación se basó en el estudio fitoquímico de las especies *Lepechinia paniculata* y *Piper lanceifolium*, se obtuvieron extractos de Acetato de etilo y Metanol a partir de las hojas. Los compuestos fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas RMN y CG-EM y comparados con reportes en literatura. Se aislaron 3 compuestos de *L. paniculata* conocidos como Ledol, Guaiol y Carnosol, y dos compuestos de *P. lanceifolium*, éster metílico del ácido lanceaefólico y éster metílico del ácido ciclanceaefólico. Se determinó la actividad antimicrobiana mediante concentración mínima inhibitoria (CMI). De *L. paniculata* el extracto de acetato de etilo presentó actividad frente a *Proteus vulgaris* (62,5ug/ml), el extracto de metanol actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* (500ug/ml) y el compuesto Ledol actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* (125ug/ml) y *Staphylococcus aureus* (500ug/ml). El extracto metanólico de *P. lanceifolium* fue inactivo frente a las cepas utilizadas en el ensayo. La actividad hipoglucemiante del extracto y compuestos de *P. lanceifolium* se evaluó por la capacidad inhibitoria en α -glucosidasa con valores de IC₅₀ de 114,73 μ g/ml, 143,80 μ g/ml, 147,94 μ g/ml respectivamente.

Palabras clave: *Lepechinia paniculata*, *Piper lanceifolium*, Ledol, Guaiol, Carnosol, éster metílico del ácido lanceaefólico, éster metílico del ácido ciclanceaefólico.

ABSTRACT

The present investigation was based on the phytochemical study of the species *Lepechinia paniculata* and *Piper lanceifolium*, extracts of ethyl acetate and methanol were obtained from the leaves. The compounds were identified by NMR and GC-MS spectroscopic techniques and compared with reports in the literature. Three compounds of *L. paniculata* known as Ledol, Guaiol and Carnosol were isolated, and two compounds of *P. lanceifolium*, lanceaeolic acid methyl ester and cyclolanceaeolic acid methyl ester. Antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC). From *L. paniculata* the ethyl acetate extract exhibited activity against *Proteus vulgaris* (62.5ug/ml), the methanol extract activity against *Klebsiella pneumoniae* (500ug/ml) and the compound Ledol activity against *Klebsiella pneumoniae* (125ug/ml) and *Staphylococcus aureus* (500ug/ml). The methanolic extract of *P. lanceifolium* was inactive against the strains used in the assay. The hypoglycemic activity of the extract and compounds of *P. lanceifolium* was also evaluated by the inhibitory capacity in α -glucosidase with an IC₅₀ average of 114.73 μ g / ml, 143.80 μ g / ml, 147.94 μ g / ml respectively.

Keywords: *Lepechinia paniculata*, *Piper lanceifolium*, Ledol, Guaiol, Carnosol, lanceaeolic acid methyl ester, cyclolanceaeolic acid methyl ester.

INTRODUCCIÓN

Desde su origen el ser humano ha buscado su bienestar encontrándolo en la naturaleza desde una perspectiva “mágico-religiosa” o científica. El uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos ha sido sin duda tan antiguo como otras ciencias. Es evidente que esta tendencia está presente en todo momento y en donde ha existido alguna sociedad. Estas sociedades han practicado de manera empírica y a base de prueba y error muchas de las disciplinas científicas. Fueron “médicos” al curar los males que les aquejaban. Este aspecto fue fundamental para el desarrollo de otras disciplinas como la farmacia, la farmacología, la farmacognosia e innegablemente la medicina actual (Cortez, Macedo, & Arteaga, 2004).

En el mundo se ha usado la medicina tradicional con base en las hierbas, materiales elaborados con hierbas, preparados con base de hierbas y productos acabados a base de hierbas, que contienen ingredientes activos de plantas u otros materiales de plantas o combinaciones de las mismas (OMS, 2013).

Ecuador está dentro de los países con mayor diversidad en el mundo. Se estima que el 80% de la población recurre a la medicina tradicional (Ansaloni et al., 2010) con el uso de por lo menos 273 especies de plantas medicinales y productos naturales, empleados para tratar más de 70 dolencias buscando el bienestar y atención de la salud (Cerón, 2006).

El género *Lepechinia*, pertenece a la familia Lamiaceae, en este género encontramos una variedad de compuestos volátiles como diterpenos tricíclicos, flavonoides y triterpenos pentacíclicos (Valarezo, Castillo, Guaya, Morocho, & Malagón, 2012), caracterizados por poseer significativa actividad antimicrobiana, citotóxica, antioxidante y muchas más (Esteves, Kuster, Barbi, & De Menezes, 2010; Parejo et al., 2004; Pellegrini et al., 2014). *Lepechinia paniculata* es un arbusto de color verde, encontrado por lo general en las montañas a una altura de 1500-3000 metros sobre el nivel del mar. Se utiliza ampliamente en la medicina tradicional en el Ecuador (Aguirre, Merino, & Gutierrez, 2013).

Piper es un género perteneciente a la familia Piperaceae, en el que se ha encontrado mayoritariamente compuestos derivados del ácido benzoico, que presentan actividad antifúngica contra *Candida albicans* y actividad antioxidante (López, Ming, & Towers, 2002; Yamaguchi, Lago, Tanizaki, Mascio, & Kato, 2006). La especie *Piper lanceifolium* se encuentra a una altura de 1000-4000 metros sobre el nivel del mar, ha sido ampliamente estudiada en el campo de la fitoquímica obteniendo aceite esencial y extractos con diferentes solventes (Lopez, Hudson, & Towers, 2001; Mundina et al., 2001).

Basados en la información bibliográfica con esta investigación, se llevara a cabo el estudio fitoquímico de las especies *Lepechinia paniculata* y *Piper lanceifolium*, aislando e identificando metabolitos secundarios además del análisis de la actividad antimicrobiana de los mismos y extractos desclorofilados. Contribuyendo significativamente con la composición química de las especies.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Medicina tradicional

Nuestros ancestros desde la antigüedad usaban plantas a las que se les atribuía propiedades medicinales para la prevención, diagnóstico y eliminación de dolencias que padecía el ser humano, es así que a través de errores y aciertos diferenciaron las que curaban de las que mataban, impartiendo este conocimiento de forma oral generación tras generación. Con la tradición oral y con la ayuda de los primeros escritos como el papiro se comenzó a recoger información que fue aprovechada por la sociedad hasta la actual ciencia en lo que hoy se conoce como medicina tradicional (Marinoff, 1994).

La medicina tradicional se define según la OMS como los enfoques, conocimientos, prácticas y creencias sanitarias basadas en plantas, animales y minerales aplicados a diferentes terapias espirituales, mentales y corporales enfocadas a mantener el bienestar individual o grupal. Además la Organización Mundial de la Salud apoya el uso de la medicina tradicional y alternativa cuando está demostrado el beneficio y la existencia de mínimo riesgo para el paciente (OMS, 2013).

Muchas poblaciones de los países en vías de desarrollo utilizan la medicina tradicional por ser más accesible y formar parte de un sistema de creencias utilizados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (WHO, 2002).

1.2 Plantas medicinales en el Ecuador

El uso de las plantas medicinales por el hombre con fines benéficos se ha usado desde hace años, he incluso fueron el principal y único recurso que disponían los médicos en antiguas civilizaciones. Muchas de estas plantas pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que se vio beneficiado por el aporte del conocimiento del Nuevo Mundo (Cano, Ortiz, Carmen, Lombardo, & Cobos, 2009). En la actualidad el consumo de plantas con propiedades y usos terapéuticos ha sido alto, teniendo una gran demanda entre la población, que ha provocado un incremento en la investigación fitoquímica con la finalidad de mejorar el conocimiento de los principios activos encontrados en cada planta (Cano & Martínez, 2007).

Las diversas poblaciones del Ecuador usan las plantas medicinales de forma intrínseca ligadas a las tradiciones culturales, en las terapias para curar enfermedades de origen espiritual, emocional, mental y físico (Rios et al., 2007). En el Ecuador la diversidad de la flora ha sido estudiada desde hace mucho tiempo, documentándose más de 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, Alarcón, Kvist, & Salazar, 2008).

1.3 Familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae está compuesta aproximadamente de 224 géneros y 5600 especies distribuidas en todo el mundo (Delgado et al., 1994). Se presentan como arbustos o pequeños árboles. Las plantas de esta familia se usan generalmente como relajante y para tratar la tos, el dolor de estómago, cefalea, malaria, influenza y "espanto" (Tene et al., 2007). El consumo de estas plantas en infusiones o té, es generalmente reportado en literatura, confirmando el uso como relajante y para tratar el dolor de estómago (Pardo, Blanco, & Morales, 2005).

1.3.1 Género *Lepechinia*.

Lepechinia es un género muy diverso y ampliamente distribuido desde el norte de California hasta Argentina central en Sudamérica, consta aproximadamente de 43 especies (Drew & Sytsma, 2013). Ciertas investigaciones realizadas mostraron que los compuestos encontrados en este género presenta actividad hipoglucémica, vasodilatadora, antimicrobiana, citotóxica y antioxidante (Esteves et al., 2010; Parejo et al., 2004; Pellegrini et al., 2014). Además existen estudios realizados hasta el momento de los compuestos presentes en el aceite esencial de algunas especies como *L. paniculata*, *L. radula*, *L. mutica*, *L. conferta* entre otras (Borges, Rojas, Cegarra, & Usubillaga, 2006; Malagón, Vila, Iglesias, Zaragoza, & Cañigüeral, 2003; Morocho et al., 2017; Valarezo et al., 2012).

1.3.2 Compuestos fitoquímicos aislados del genero *Lepechinia*.

El análisis fitoquímico ha revelado la presencia de diterpenos tricíclicos, flavonoides y triterpenos pentacíclicos, en ciertas especies de este género importantes por presentar compuestos volátiles. Los principales componentes presentes en el aceite esencial de *L. paniculata* han sido el β -phellandrene en 7.7% y aromadendrene en 24.6%; los mismos que han sido encontrados en las flores y hojas de *L. conferta* aromadendrene en 28.9% y 24.2% y β -phellandrene en 11.7% y 9.7% respectivamente, en *L. radula* únicamente se ha encontrado β -phellandrene en 8.6%, al igual que en *L. mutica* el β -phellandrene en un 30%. Otros compuestos de relevancia encontrados en estas plantas son el ledol, carnosol, β -pinene, valencene, β -silenene, limonene, camphene en porcentajes más bajos. (Borges et al., 2006; Morocho et al., 2017; Valarezo et al., 2012).

1.3.3 *Lepechinia paniculata* (Kunth) Epling.

Lepechinia paniculata, es un arbusto aromático, que se encuentra en las provincias de Azuay, Bolívar, Loja y Pichincha a una altura de 1500-3000 metros sobre el nivel del mar. Se

utiliza ampliamente en la medicina tradicional en el Ecuador para tratar el dolor de cabeza por aplicación directa de sus brotes y sus flores se utilizan para el tratamiento del sistema nervioso (De la Torre, *et al*, 2008) y para el mal de aire, que es un ritual de la limpieza del cuerpo en la etnia Saraguro (Andrade, Armijos, Malagón, & Lucero, 2009). Los estudios realizados sobre esta especie aportan conocimiento del aceite esencial en los que se describen la composición química y propiedades físicas (Valarezo et al., 2012).

1.3.4 Descripción botánica de la especie *Lepechinia paniculata* (Kunth) Epling.



Figura 1: *Lepechinia paniculata*
Fuente: plants.jstor.org
Elaboración: plants.jstor.org

Tabla 1: Taxonomía *L. paniculata*

División:	Magnoliophita
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Magnoliidae
Superorden:	Asteranae
Orden:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Género:	<i>Lepechinia</i>
Especie:	<i>Lepechinia paniculata</i>

Fuente: Autora 2018
Elaboración: Autora 2018

1.4 Familia Piperaceae

Piperaceae comprende arbustos, bejucos y hierbas distribuida en los trópicos húmedos americanos, se caracteriza por presentar frutos, flores, hojas y tallos aromáticos (Aguirre et al., 2013), tiene 4 géneros y más de 2000 especies, muchas de las cuales son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades como

reumáticas, dolores molares y de estómago (Pino, Meléndez, & Stashenko, 2009); además el análisis de los componentes volátiles de las partes aéreas (hojas y tallos) en muchas de las plantas de esta familia presentan propiedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidante, citotóxica, acción anticolinesterasa y anticancerígena (Costantin et al., 2001; Da Silva et al., 2014).

1.4.1 Genero *Piper*.

El género *Piper* tienen una distribución amplia en la región tropical y subtropical de ambos hemisferios y se lo ha investigado considerablemente como fuente de productos naturales nuevos con propiedades medicinales (Lago et al., 2009). Las plantas de este género se presentan como arbustos o árboles leñosos con hojas no carnosas (Pino, 2008). Aproximadamente 30 especies son consideradas medicinales, incluidas en el sistema de medicina tradicional en Asia-Pacífico, que se usan para tratar fiebre, ictericia, reumatismo y neuralgia (Wiart, 2006).

1.4.2 Compuestos fitoquímicos aislados del genero *Piper*.

El género ha sido objeto de un extenso estudio en el campo de la fitoquímica, que ha llevado al aislamiento de múltiples compuestos activos fisiológicamente como alcaloides, amidas, monoterpenos, sesquiterpenos esteroides, arilpropanoides, flavonas y flavonoides (Parmar et al., 1997). Se ha obtenido compuestos en el aceite esencial de algunas plantas de este género, *P. lanceaefolium* presenta componentes mayoritarios como trans- β -cariofileno (11,6%) y germacreno-D (10,7%), en menores porcentajes α -selineno (7,8%), β -pineno (5,4%), β -selineno (4,8%) y α -cubebeno (4,3%) (Pino, Melendez, & Stashenko, 2009); en *P. anonifolium* se ha encontrado β -selinene (12,7%), α -selinene (11,9%), y α -pinene (8,8%). Al igual que en el aceite de *P. hispidum* está presente β -caryophyllene (10,5%), α -humulene (9,5%), α -copaene (7,3%), limonene (6,9%), y β -selinene (5,1%). En *P. acutisleginum*, *P. aduncum*, *P. attenuatum*, *P. brachystachyum*, *P. thomsoni*, *P. peepuloides* se ha encontrado el compuesto β -sitosterol que ha sido aislado de diferentes partes de la planta y en extractos de diferentes solventes (Da Silva et al., 2014; Parmar et al., 1998).

1.4.3 *Piper lanceifolium* Kunth.

Esta especie se encuentra a una altura de 1000-4000 m.s.n.m. en las provincias de Azuay, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Morona Santiago, Pastaza, Pichincha, Tungurahua y Zamora Chinchipe, ha sido estudiada en el campo de la fitoquímica con la obtención de aceite esencial y extractos con diferentes solventes. En bibliografía se la ha encontrado con el nombre de "*Piper lanceaefolium*" refiriéndose a la misma especie. Análisis del aceite volátil de las hojas han revelado la presencia de hidrocarburos sesquiterpénicos (β -aryophyllene y germacrene D) y fenilpropanoides; mientras que en el aceite de las

espigas se ha encontrado hidrocarburos monoterpénicos como el α y β -pinene. La decocción de las hojas sirve para tratar infecciones de la piel, que en medicina tradicional se conoce como “manifestaciones cutáneas maligna”. Se ha analizado el extracto metanólico de las hojas que ha mostrado actividad contra el hongo *Candida albicans*, además del aislamiento de cuatro derivados benzoicos prenilados (López et al., 2002; Mundina et al., 2001; Pino, Melendez, et al., 2009).

1.4.4 Descripción botánica de la especie *Piper lanceifolium* Kunth.



Figura 2: *Piper lanceifolium*

Fuente: plants.jstor.org

Elaboración: plants.jstor.org

Tabla 2: Taxonomía *P. lanceifolium*

División:	Magnoliophita
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Magnoliidae
Superorden:	Magnolianaes
Orden:	Piperales
Familia:	Piperaceae
Género:	<i>Piper</i>
Especie:	<i>Piper lanceifolium</i>

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

1.5 Metabolitos secundarios

Las plantas predestinan una cantidad importante de energía y carbono asimilado para la síntesis de metabolitos secundarios que no tienen participación directa en procesos de asimilación de nutrientes, fotosintéticos, respiratorios y síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. No todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Son sintetizados en cantidades pequeñas y tiene producción restringida dependiendo del género de planta, familia, o en ocasiones de la especie (Ávalos & García, 2009). Se ha descrito hasta la fecha más de 100000 metabolitos secundarios encontrados en plantas, presentando un gran número de ellos actividad biológica. Haciendo que el estudio de estos metabolitos se convierta en un reto, siendo necesaria la utilización de nuevas tecnologías para su producción, caracterización e identificación (Bhalla, Narasimhan, & Swarup, 2005; Fiehn, 2002; N. Pérez & Jiménez, 2011).

De acuerdo a la ruta biosintética se los ha clasificado en cuatro grupos:

- Terpenos, formados por la polimerización de unidades de esteroides e isoprenos. Agrupan a los monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos, y esteroides.
- Compuestos fenólicos, aquí encontramos las cumarinas, taninos, flavonoides y ácidos fenólicos son muy útiles en el campo farmacéutico.
- Glicósidos, constituidos por glicósidos cianogénicos, glicósidos cardiacos, glucosinolatos y saponinas.
- Alcaloides, familia de compuestos con más o menos 4 000 estructuras reconocidas, presentan tres características contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, tienen actividad biológica y son solubles en agua (Gurib-Fakim, 2006; Sajc, Grusbisic, & Novakovic, 2000; Sarin, 2005).

1.6 Cromatografía

La cromatografía es un proceso físico que consiste en la separación de mezclas complejas por medio de dos fases; en donde la muestra se desplaza con una fase móvil (gas, líquido o fluido supercrítico), que pasa a través de la fase estacionaria (líquida o sólida) que es inmisible y que puede estar fija a una columna o a una superficie sólida. Los componentes que son retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente, mientras que los componentes que tienen menos afinidad a la fase estacionaria se mueven con rapidez (Skoog, Holler, & Nieman, 2001; Unam, 2007).

1.6.1 Cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica basada en el reparto entre dos fases, una fase móvil que es líquida y la fase estacionaria compuesta por un sólido. Por lo general la fase estacionaria será polar y la móvil será menos polar, de forma que los componentes menos polares se desplazarán con mayor velocidad (UNAM, 2007).

Este método es simple haciendo que los resultados sean fácilmente reproducibles, presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa) ya que el tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor, determinando de manera preliminar los componentes presentes en una mezcla o la pureza de una muestra (Del Castillo, González, González, Prieto, & Urquiola, 2004; Spangenberg, Poole, & Weins, 2011).

1.6.2 Cromatografía en columna (CC).

Esta técnica consiste en la separación y purificación de mezclas o sustancias a nivel preparativa. La fase estacionaria usada comúnmente es la sílica gel, poliamida, celulosa y sephadex contenida en un tubo de vidrio, mientras que la fase móvil (disolvente) pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o aplicación de presión, recogiendo volúmenes de eluato determinados por el analista experto, para obtener la muestra separada en sus componentes (Lamarque, 2008).

1.7 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica no destructiva, basada en las propiedades magnéticas de los núcleos, especialmente en las propiedades del núcleo de hidrógeno, donde electrones van a producir modificaciones débiles, que darán lugar a desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento, dando como resultado el estudio de la estructura electrónica de las moléculas. Esta técnica se aplica a cualquier sustancia química que se presente en estado líquido o sólido y tenga núcleos con espines nucleares, permitiendo así resolver diferentes problemas de la investigación química y de cuantificación de principios farmacéuticos activos (Elguero, Alkorta, Pardo, Claramunt, & Santa, 2008).

1.8 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases acoplada a espectro de masas (CG-EM) se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa, por un lado tenemos la cromatografía de gases que es una técnica separativa en la que se consigue el análisis rápido de mezclas complejas cuantificando los componentes individuales y obteniendo como resultado para la identificación de cada uno de ellos el tiempo de retención de los picos cromatográficos.

Mientras que la espectrometría de masas identifica de manera casi exacta cualquier sustancia pura, pero por lo general no identifica los componentes individuales de una mezcla sin haberlos separado previamente debido a la complejidad del espectro obtenido (Gutiérrez & Droguet, 2002).

La asociación de estas dos técnicas nos permite el análisis cuantitativo y cualitativo con un alto grado de eficacia de mezclas volátiles complejas. La utilización de la CG-EM requiere un sistema de operación específico, que utiliza una pequeña cantidad de muestra para el análisis, consiguiendo resultados confiables con un elevado poder resolución (Gutiérrez & Droguet, 2002; López, 2008).

1.9 Actividad antimicrobiana

Los principales problemas de resistencia detectados en América latina lo producen las bacterias gram negativas, principalmente *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Citrobacter* sp. Debido al mal uso de antibióticos comerciales usados en general para tratar las enfermedades infecciosas, la multiresistencia se ha desarrollado. Esta situación, ha llevado a los científicos a investigar nuevas sustancias antimicrobianas que presentan metabolitos secundarios como terpenoides, alcaloides, flavonoides, taninos, etc., presentes en extractos y aceites esenciales obtenidos de plantas medicinales usadas popularmente (Kelmanson, Jäger, & Van Staden, 2000; Nostro, Germano, D'Angelo, Marino, & Cannatelli, 2000; Zampini, Cudmani, & Isla, 2007).

1.9.1 Bacterias.

Las bacterias son organismos unicelulares que contienen DNA y RNA, no tienen núcleo y citoplasma diferenciado y se reproducen por fisión binaria. Desde el punto de vista médico se las clasifica en dos tipos generales bacterias gram positivas y bacterias gram negativas (Koneman & Allen, 2008).

1.9.1.1 Bacterias Gram Positivas.

Staphylococcus aureus: esta bacteria es una causa importante de trastornos de la piel, del tejido blando, óseo, articular, respiratorio y endovascular. La mayoría de estas infecciones ocurren en personas con múltiples factores de riesgo de infección. El tratamiento de las infecciones provocadas por este microorganismo se ha vuelto más difícil debido a la aparición de cepas multiresistentes (Lowy, 1998).

Enterococcus faecalis: patógeno oportunista resistente a los antibióticos. Se encuentra en pacientes que han sido hospitalizados por períodos prolongados de tiempo y han recibido

múltiples ciclos de antibióticos. Son causantes de infecciones del tracto urinario, infecciones nosocomiales y endocarditis (Murray, 2000).

Micrococcus luteus: considerado como un patógeno nosocomial emergente en pacientes inmunocomprometidos, resistente al tratamiento con ciertos antibióticos. Es causante de neumonía, artritis séptica, abscesos intracraneales y meningitis. Ha sido asociada a infecciones asociadas con líneas intravenosas permanentes, fluidos de diálisis peritoneal ambulatorios continuos y shunts ventriculares (Altuntas et al., 2004).

1.9.1.2 Bacterias Gram Negativas.

Escherichia coli: bacterias anaerobias facultativas con metabolismo fermentativo y respiratorio. Residen de forma permanente en la flora microbiana del colon humano, estableciendo una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida. Sin embargo existen grupos patógenos que causan daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos la diarrea principalmente en niños (Vidal, Canizález, Gutiérrez, & Navarro, 2007).

Proteus vulgaris: estas enterobacterias presenta movilidad gracias a sus largos flagelos, son aerobios y anaerobios facultativos. Son encontrados con mayor frecuencia en pacientes que sufren de enfermedades entéricas, trastornos intestinales y casos de diarrea grave. Llevando a la mayoría de pacientes al aislamiento clínico (Nanclares, 2016).

Salmonella enteritidis: es un patógeno de transmisión alimentaria comúnmente asociado a alimentos de origen aviar, frutas, verduras y alimentos listos para el consumo. Es causa importante de salmonelosis humana, las manifestaciones clínicas más comunes son diarrea, fiebre y dolor abdominal (Ferrario et al., 2017).

Pseudomonas aeruginosa: es un microorganismo patógeno intrahospitalario, que afecta principalmente a pacientes con infecciones de heridas y quemaduras, meningitis, afecciones del sistema respiratorio e infecciones urinarias. En la mayor parte de las infecciones por esta bacteria, los signos y síntomas son inespecíficos y se relacionan con el órgano afectado. No se deben tratar con una sola clase de fármaco, ya que presenta resistencia a muchos antimicrobianos (Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner, 2010).

Klebsiella pneumoniae: es uno de los principales patógenos aislados en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, tomando gran importancia como causante de infecciones asociadas al cuidado de la salud. Es resistente a los antimicrobianos, resistencia dada por la producción de β -lactamasas (Echeverri, Rueda, Maya, Agudelo, & Ospina, 2012).

Salmonella typhimurium: es el más común del grupo de los serotipos causante de infecciones transmitidas por alimentos como la gastroenteritis, especialmente por el consumo de huevos, leche pasteurizada y alimentos crudos entre ellos verduras frescas y leche (Fu, Octavia, Tanaka, Sintchenko, & Lan, 2015).

1.9.2 Hongos.

Son organismos eucarióticos caracterizados por la formación de hifas, que son estructuras filamentosas constituidas por una sucesión de células intercomunicadas, que en conjunto constituyen un micelio que representan la forma invasiva de los hongos patógenos. Aunque existe un grupo importante de hongos patógenos que se caracterizan por presentar únicamente estructuras unicelulares (levaduras) (Guarro, 2012).

Candida albicans: es un patógeno oportunista común, causante de infecciones tanto superficiales como sistémicas. En infecciones mucocutáneas se manifiesta como candidiasis bucal o vaginal, se encuentran comúnmente en la práctica médica y dental. Además de ser causante de infecciones nosocomiales en pacientes hospitalarios (Ashman et al., 2004).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Esquema metodológico

En la figura 3 se muestra el esquema de la metodología empleada en la siguiente investigación.



Figura 3: Esquema metodológico de la investigación

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

2.2 Recolección del material vegetal

Las hojas frescas de *L. paniculata* se recolectaron en la provincia de Loja, en el cantón Saraguro. La identificación de la muestra fue realizada por Bolívar Merino del Herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja, encontrando un ejemplar de la planta en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja con número de voucher PPN-LA-020.

Mientras que la especie vegetal *P. lanceifolium* fue recolectada en el sector Numbani en la provincia de Zamora Chinchipe. La muestra fue identificada y caracterizada por Bolívar Merino del Herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja. Una muestra botánica de la planta se encuentra depositada en el herbario de UTPL con voucher número PPN-pi-008.

2.3 Obtención de los extractos totales

El material recolectado fue depositado en una cámara de secado a una temperatura de 34°C durante dos días con la finalidad de eliminar el agua presente en las hojas. Para la obtención de los extractos totales de *L. paniculata* se utilizaron 300 g de hojas secas trituradas y se procedió a la extracción mediante técnica de maceración estática durante una hora, con 7.5 litros de los disolvente Acetato de Etilo (AcOEt) y Metanol (MeOH), repitiendo el proceso tres veces. El extracto total de *P. lanceifolium* se obtuvo a partir de 200 g de hojas secas usando MeOH como solvente por tres veces consecutivas. Posteriormente se usó el método de filtración al vacío y concentración a presión reducida utilizando un rotaevaporador a una temperatura de 30-35°C obteniendo de esta manera los extractos totales secos en los diferentes disolventes.

2.4 Desclorofilación de extractos totales

Los extractos totales de *L. paniculata* fueron sometidos a desclorofilación usando columnas SPE marca Discovery DSC-18, tubos de 60 ml (10 g). Para el extracto de AcOEt se utilizó 3 g de extracto y 200 ml de disolvente MeOH/H₂O en relación 97:3. Con el extracto de MeOH se usó 4,5 g de extracto con 300 ml de disolvente MeOH/H₂O en relación 8:2 (figura 3).

Una vez obtenido los extractos desclorofilados se procedió a realizar cromatografía en capa fina en diferentes polaridades para confirmar la ausencia de clorofilas y evaluar la riqueza y separación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos.

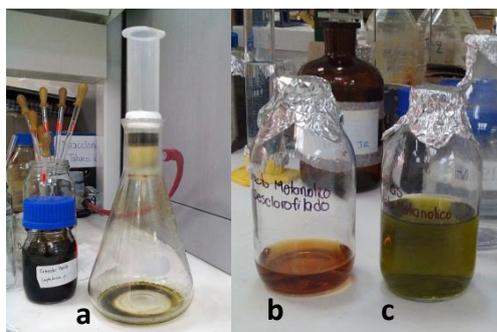


Figura 4: Desclorofilación de extracto de metanol. a) Extracto total de metanol, b) Extracto desclorofilado, c) Clorofilas

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

El extracto de *P. lanceifolium* se trabajó directamente en cromatografía en columna sin ser desclorofilado previamente, solo se evaluó mediante CCF para apreciar la separación de compuestos y riqueza de metabolitos.

2.5 Aislamiento y purificación de compuestos de *L. paniculata*

2.6 Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo

Para realizar la cromatografía en columna del extracto de AcOEt se utilizó 1,6 g de extracto desclorofilado en 160g de Sílica gel fase directa en relación 1:100. Para realizar la elución se utilizó Hex/AcOEt en polaridad creciente, iniciando con 95:5 hasta llegar a AcOEt 100%. Lavando la sílica gel al finalizar con MeOH 100%. Se obtuvieron 297 muestras que se unieron en 18 fracciones de acuerdo a su RF y color de las manchas (Figura 5). De estas fracciones se realizó CCF utilizando placa de Sílica gel y como fase móvil una mezcla de Hex/AcOEt en relación 8:2 para las 13 primeras fracciones y 7:4 para las fracciones restantes. Para su visualización se utilizó una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365 nm y para el revelado de las placas de TLC se utilizó ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 12%.

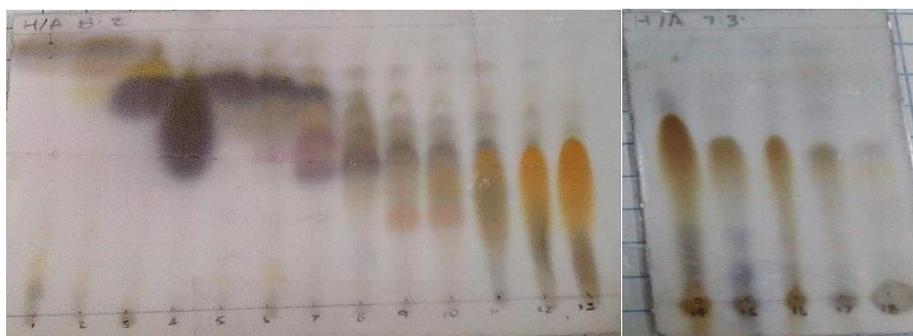


Figura 5: CCF de las fracciones obtenidas en la columna de extracto de acetato de etilo

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

2.6.1 Purificación de la fracción LB 6/4.

La fracción LB 6/4 (20 mg) se realizó cromatografía en columna utilizando 2g de sílica gel directa en relación 1:100 (muestra:sílica), usando como eluyente Hex/AcOEt, 95:5 de manera isocrática. Se obtuvieron 12 fracciones que fueron analizadas mediante CCF. De estas la fracción LB 88/13 se analizó mediante RMN.

2.6.2 Fracción LB 7/4.

Esta fracción se presentó como un polvo ligeramente amarillento, que se analizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) y al estar aparentemente pura se procedió a realizar cromatografía de gases acoplada a espectro de masas (CG-EM) para identificar el compuesto presente.

2.6.3 Purificación de la fracción LB 20/4.

Se tomó la fracción LB 20/4 (8 mg) y se purificó mediante cromatografía en columna usando 3g de sílica gel directa, eluyendo con polaridad isocrática Hex/AcOEt en relación 8:2. Se

obtuvieron 10 fracciones analizadas por CCF, de las cuales la fracción LB 239/44 se analizó mediante RMN.

2.7 Fraccionamiento del extracto de metanol

Para el fraccionamiento del extracto desclorofilado de metanol se pesó 2 g de extracto y 150 g de sílica gel fase directa y se eluyo con polaridad creciente, comenzando con Hex/AcOEt, 95:5 y finalizando con AcOEt 100%. Se obtuvieron 9 fracciones que se analizaron mediante CCF, se observó mediante lámpara de luz ultra violeta de 254 y 365 nm, y se procedió a la respectiva purificación de fracciones.

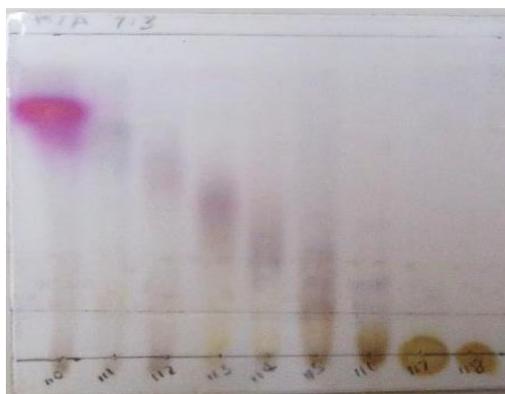


Figura 6: CCF de las fracciones obtenidas en la columna de extracto de metanol

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

2.8 Aislamiento y purificación de compuesto de *P. lanceifolium*

2.9 Fraccionamiento del extracto de metanol

El extracto total de metanol (4g) se fraccionó mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel fase directa (200g) en una proporción aproximadamente de 1:50. Se inició utilizando la mezcla de disolventes Hex/AcOEt, 9:1 incrementando la polaridad hasta llegar a Hex/AcOEt, 1:1. Se obtuvieron 96 muestras que se unieron en 4 fracciones de acuerdo al color de mancha y su RF. Se procedió a realizar CCF utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel y como fase móvil una mezcla de Hex/AcOEt en proporción 1:1. Para visualizar la placa se utilizó una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365 nm y para el revelado de las placas de CCF se utilizó ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 12%.

2.9.1 Purificación de la fracción PL2.

La fracción PL2 (225,2 mg) se purificó mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel fase directa (25 g), y como fase móvil una mezcla de Hex/AcOEt en proporción 8:2 de manera isocrática. Se obtuvieron 12 fracciones de las cuales PL9 se presentó como cristales y se analizó mediante RMN: ^1H y ^{13}C .

2.9.2 Purificación de la fracción PL3.

La fracción PL3 se obtuvo como un polvo de color amarillento que se lavó varias veces con una mezcla de solventes Hex/AcOEt en proporción 7:3 hasta obtener un polvo ligeramente blanco, y se procedió a realizar RMN: ^1H y ^{13}C .

2.10 Identificación de compuestos obtenidos

2.10.1 Resonancia magnética nuclear (RMN).

Para la obtención de los espectros de RMN se utilizó el equipo Varian N° de serie 21953, operando a 400 MHz para ^1H y a 100 MHz para ^{13}C usando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) para todas las muestras.

2.10.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Con la fracción LB 7/4 se utilizó el cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, que cuenta con un sistema de operación de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, y un inyector automático split/splitless serie 7683. Las características de la columna capilar empleada se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Características de la columna capilar

Fracción	Columna	Temperatura (°C)	Película (μm)	Diámetro interno (mm)	Longitud (m)
LB 7/4	DB.5MS	350 °C	0.25 μm	0.25 mm	30 m

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

2.11 Determinación de la actividad antimicrobiana

Para las especies *L. paniculata* y *P. lanceifolium* la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada mediante la técnica de microdilución en caldo.

2.11.1 Microorganismos de prueba.

Se emplearon 7 cepas bacterianas para la especie *L. paniculata*:

- **1 Cepa Gram positivas:** *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923)
- **6 Cepas Gram negativas:** *Echerichia coli* (ATCC® 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC® 8427), *Salmonella enteritidis* (ATCC® 10708), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC® 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 9997), *Salmonella typhimurium* (LT 2).

Para la especie *P. lanceifolium* se emplearon 4 cepas bacterianas y 1 cepa fúngica:

- **3 Cepas bacterianas Gram Positivas:** *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433) y *Micrococcus luteus* (ATCC® 10240).
- **1 Cepa bacteriana Gram Negativa:** *Escherichia coli* (ATCC® 43888).
- **1 Cepa fúngica:** *Candida albicans* (ATCC® 10231).

2.11.2 Preparación de las muestras.

Para la especie *L. paniculata* se utilizaron 20 mg de los extractos desclorofilados de AcOEt y MeOH y del compuesto identificado como Ledol, en un 1ml de Dimetilsulfóxido (DMSO).

Se utilizó para la especie *P. lanceifolium* 100mg de los extracto MeOH en 1000µl de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se realizó para la determinación de la CMI frente a bacterias y hongos.

2.11.3 Preparación del cultivo overnight.

Se utilizó microorganismos que se encuentran en reserva criogénica a -80°C. Los medios de cultivo y la incubación para cada microorganismo se detallan en la tabla 4 y tabla 5.

Tabla 4: Microorganismos y condiciones de incubación para *L. paniculata*.

Bacterias	Medios de cultivo	Condiciones de incubación
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Trypticasa Soja	Temperatura: 37°C Tiempo de incubación: 14-16 horas
<i>Salmonella enteritidis</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Muller Hinton (Difco)	

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

Tabla 5: Microorganismos y condiciones de incubación para *P. lanceifolium*.

Bacterias	Medio de Cultivo	Temperatura de Incubación	Tiempo de Incubación
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	Caldo Trypticasa Soya	37°C	14-16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Infusión Cerebro Corazón		
<i>Micrococcus luteus</i>	Caldo Nutritivo	35°C	
Levadura			
<i>Candida albicans</i>	Caldo Sabouraud	35°C	

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

2.11.4 Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias.

Se tomó 10µm del cultivo overnight con la bacteria respectiva y se colocan en 10ml de caldo Muller Hinton, de esta dilución se tomaron 100µl para completar el volumen final de la placa de cultivo de 200µl.

2.11.5 Preparación de la suspensión del inóculo para levaduras.

Se toman 10 µL del cultivo overnight con la bacteria a utilizar y se colocan en 10mL del caldo Sabouraud, de esta dilución se toman 100µl para completar el volumen final 200 µL de la placa de cultivo.

2.11.6 Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. Se colocó 100µl de medio Muller Hinton en cada pocillo, luego en la fila A-12 se añade 80µl más del mismo medio. En la fila A-9 se colocó 20µl de los extractos y compuestos con los que se realizará la prueba. Se contó con un control de esterilidad en A10, en donde se colocó 20µl más del medio, un control positivo en A11 colocando 20µl de DMSO y un control negativo en A12 donde se colocó 20µl de antibiótico (tetraciclina). Luego se realizaron diluciones seriadas tomando 100µl de la fila A-12 y diluyendo con 100µl de la fila B-12, hasta llegar a los pocillos de la fila H-12 donde se desechó los 100µl sobrantes. Preparadas las placas se inoculan con 100µl de la suspensión del inóculo completando el volumen final, ajustando así la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL para bacterias y 5×10^4 UFC/mL para levaduras. Finalmente selló las placas y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

2.12 Determinación de la actividad enzimática

2.12.1 Ensayo de α-glucosidasa.

Para determinar la actividad inhibitoria de α-glucosidasa se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos con p-nitrofenil-α-D-glucopiranosido (PNPG, SIGMA N1377) como sustrato, tomando como referencia el método descrito por Tao, Zhang, Cheng, & Wang, 2013, con ligeras modificaciones, utilizando acarbosa como control positivo. Las soluciones de muestra se prepararon usando 10mg de extracto en 210µl de MeOH de manera que obtengamos como concentración final 2mg/ml. En el ensayo, en caso de conseguir la inhibición completa de la enzima se prepararon varias diluciones en PBS.

Primero se tomó 75µl de PBS (SIGMA-P4417), se mezcló con 5µl de la muestra y 20µl de la solución de enzima (SIGMA G5003, 0,15UI/ml en PBS pH 7.4) y se preincubó a 37°C durante 5 min antes de la iniciación de la reacción por la adición del sustrato. Luego se añadió 20µl de una solución de PNPG (tampón fosfato 5mM, pH 7.4) a cada pocillo y se incubó durante 60 min a 37°C. La cantidad de para-nitrofenol (p-NP) liberado, se midió en un lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK®) a 405nm durante 60 minutos, registrando la absorbancia cada 5 minutos. La actividad inhibitoria (%) se calculó de acuerdo a la fórmula descrita por Choi, Lee, & Kim, 2015.

$$\text{Inhibición (\%)} = [(A_o - A_s) / A_o] \times 100$$

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Extractos obtenidos de las especies

En la tabla 6 se resume el peso y el rendimiento de los extractos totales de Acetato de etilo y Metanol, a partir de 300 g de *Lepechinia paniculata* y 200 g de *Piper lanceifolium*.

Tabla 6: Peso y rendimiento de extractos totales.

Especie	Extracto	Peso de planta seca (g)	Peso final del extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>Lepechinia paniculata</i>	AcOEt	300	19,89	6,63
	MeOH		27,48	9,16
<i>Piper lanceifolium</i>	MeOH	200	18,11	6.03

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

El rendimiento de los extractos desclorofilados de *Lepechinia paniculata* se resume en la tabla 7.

Tabla 7: Peso y rendimiento de extractos desclorofilados.

Extracto	Peso del extracto total (g)	Peso del extracto desclorofilado (g)	Rendimiento (%)
AcOEt	3	1,626	54,2
MeOH	4,5	3	66,67

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

3.2 Compuestos aislados del extracto de acetato de etilo de la especie *Lepechinia paniculata*

3.2.1 Fracción LB 88/13.

De la purificación de la fracción LB 6/4 se obtuvo 12 fracciones de las cuales LB 88/13 (5.8mg) se presentó como cristales. Se realizó cromatografía en capa fina usando como eluyente Hex/AcOEt en proporción 95:05 donde se observó una mancha de color morado (Figura 7).



Figura 7: CCF de la fracción LB 88/13
Fuente: Autora 2018
Elaboración: Autora 2018

El compuesto fue identificado mediante la técnica de RMN, comparando los espectros de ^1H y ^{13}C con literatura (Tabla 8) se determinó que se trata de un sesquiterpeno oxigenado con peso molecular de 222.3g/mol y fórmula química $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ denominado Ledol (Figura 8) (Anexo 1).

Tabla 8: Datos espectroscópicos de ^{13}C y ^1H RMN del Ledol

Ledol - LB 88/13	Ledol (Szafranek, Synak, Waligóra, Szafranek, & Nawrot, 2008)	Ledol – LB 88/13	Ledol (Szafranek et al., 2008)
^{13}C		^1H	
C-1: 53.9	C-1: 53.9	2.11 (1H, dt, $J= 6.4$ Hz, 1-H)	2.11 (1H, dt, $J= 6.3$ Hz, 1-H)
C-2: 24.7	C-2: 24.7	2.01 (1H, dt, $J= 6.8$ Hz, 4-H)	2.01 (1H, dt, $J= 6.3$ Hz, 4-H)
C-3: 30.9	C-3: 31.0	0.33(1H, dd, $J= 10.4,$ 9.2 Hz, 6-H)	0.35 (1H, dd, $J= 10.7,$ 8.8 Hz, 6-H)
C-4: 38.6	C-4: 38.6	0.72(1H,ddd, $J= 8.8,$ 10.7, 5.4 Hz,7-H)	0.74 (1H,ddd, $J= 8.8,$ 10.7, 5.4 Hz,7-H)
C-5: 40.9	C-5: 40.8	0.98 (3H, s, 12-H)	1.00 (3H, s, 12-H)
C-6: 23.6	C-6: 23.5	1.04 (3H, s, 13-H)	1.05 (3H, s, 13-H)
C-7: 25.2	C-7: 25.1	1.14 (3H, s, 14-H)	1.16 (3H, s, 14-H)
C-8: 20.4	C-8: 20.4	0.94 (3H, s, 15-H)	0.95 (3H, s, 15-H)
C-9: 39.4	C-9: 39.4		

C-10: 74.7	C-10: 74.6		
C-11: 19.3	C-11: 19.3		
C-12: 15.5	C-12: 15.5		
C-13: 28.8	C-13: 28.8		
C-14: 30.7	C-14: 30.7		
C-15: 16.1	C-15: 16.1		

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

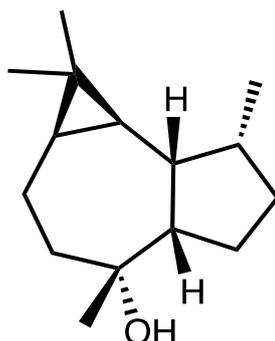


Figura 8: Estructura química del Ledol

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

Según literatura este compuesto se ha encontrado en el aceite esencial de *Lepechinia conferta*, *Lepechinia mutica* (Borges et al., 2006; Malagón et al., 2003) en extractos y aceite esencial de *Lepechinia schiedeana* siendo este el compuesto mayoritario (Rojas, Usubillaga, Cegarra, Borregales, & Carrero, 2004; Stashenko, Cervantes, Combariza, Fuentes, & Martínez, 1999). Se ha reportado que el Ledol presenta actividad antimicrobiana y antiinflamatoria (Kumar, Kumaravel, & Lalitha, 2010). Además se lo ha encontrado en el género *Tetradenia* de la familia Lamiaceae (Gazim et al., 2010), y en la familia Ericaceae (Baananou et al., 2015) y Amaranthaceae (Ozer, Sarikurkcu, Ceylan, Akdeniz, & Tepe, 2017).

3.2.2 Fracción LB 7/4.

En la cromatografía en capa fina de la fracción LB 7/4 (49.8 mg) se observa una mancha de color morado (Figura 8). Analizada mediante CG-EM se detectó que es una mezcla de dos sesquiterpenos oxigenados: Guaiol y Ledol (Anexo 2).



Figura 9: CCF de la fracción LB 7/4

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

En la figura 10 se muestra la estructura química del Guaiol y Ledol.

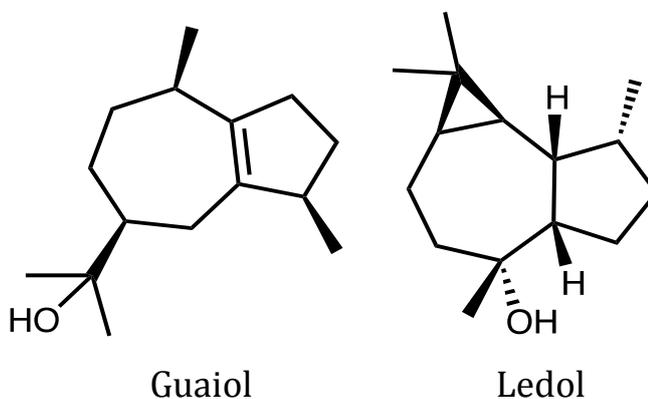


Figura 10: Estructura química del Guaiol y Ledol

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

El índice de retención de los compuestos se determinó con el tiempo de retención de una mezcla estándar de hidrocarburos de C10-C15, inyectada en las mismas condiciones de la fracción LB 7/4. Para confirmación se comparó los espectros de masa y el índice de retención de los compuestos con los reportados en el libro de Adams 2007 (Tabla 9).

Tabla 9: Sesquiterpenos oxigenados identificados en la fracción LB 7/4

Compuesto	TR	IR	^a IR	Diferencia
Guaiol	14,18	1602	1600	3,11
Ledol	14,3	1613	1602	11,43

TR: tiempo de retención. IR: índice de retención. ^aIR: índice de retención del libro Adams

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

Guaiol ha sido reportado en el aceite esencial de *Lepechinia conferta* y *Lepechinia rádula* (Borges et al., 2006; Morocho et al., 2017). Este compuesto se ha probado frente a bacterias

Gram positivas presentando actividad contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi* (Choudhary, Batool, Atif, Hussain, & Rahman, 2007). Además se ha reportado la presencia de este compuesto en la familia Myrtaceae (Granados, Santafé, & Yáñez, 2012) y Erythroxylaceae (Ventura, Castro, Roque, & Ruiz, 2009).

3.2.3 Fracción LB 239/34.

Del fraccionamiento de LB 20/4 se obtuvo la fracción LB 239/34 (1.5mg) que se observó como una sustancia pura. Se realizó cromatografía en capa fina usando como eluyente Hex/AcOEt en proporción 7:3 donde se observa una mancha de color ligeramente verde (Figura 11).

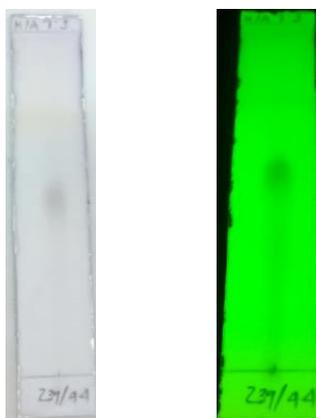


Figura 11: CCF de la fracción LB 239/34

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

El compuesto se identificó mediante la técnica de RMN y el espectro de ^1H se comparó con literatura (Tabla 10), determinándose que se trata de un diterpeno denominado Carnosol con fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$.

Tabla 10: Datos espectroscópicos de ^1H RMN del Carnosol

LB 239/34	Carnosol (Pukalskas, Beek, & De Waard, 2005)
^1H	
6.69 (H, s, H-14)	6.69 (H, s, H-14)
5.44 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-7)	5.43 (1H, d, $J = 2.8$, Hz, H-7)
3.28 (1H, sept, H-15)	3.25 (1H, sept, H-15)
2.91 (1H, dd, $J = 15, 2$ Hz, H-1 α)	2.80 (1H, dd, $J = 14.3, 1.6$ Hz, H-1 α)
2.40 (1H, ddd, $J = 14, 4.1$ Hz, H-1 β)	2.57 (1H, ddd, $J = 14.1, 4.4$ Hz, H-1 β)

1.91 (1H, ddd, H-6 α)	1.84 (1H, ddd, H-6 α)
2.20 (1H, m, H-6 β)	2.20 (1H, m, H-6 β)
1.22 (2 \times 3H, d, $J = 6.8$, H ₃ -17, H ₃ -16)	1.20 (2 \times 3H, d, $J = 6.7$, H ₃ -17, H ₃ -16)
0.87 (3H, s, H-18, H-19)	0.87 (3H, s, H-18, H-19)

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

A continuación se observa la estructura química del Carnosol.

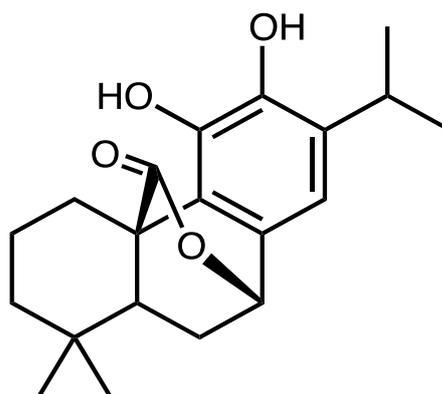


Figura 12: Estructura química del Carnosol

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

Este compuesto se reporta como constituyente de extractos en diferentes solventes obtenidos de *Lepechinia hastata* (Encarnación, Almada, & Virgen, 1998), *Lepechinia graveolens* (Parejo et al., 2004) y *Lepechinia bullata* (Pérez, Vivas, Rojas, Usubillaga, & Chataing, 2014). En el estudio del aceite esencial de *Lepechinia paniculata* no se ha encontrado reporte de este compuesto.

Estudios recientes indican que el Carnosol presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antiangiogénicas y antimicrobianas (Johnson, 2011; Lo, Liang, Lin-Shiau, Ho, & Lin, 2002). Se ha demostrado que el Carnosol presenta efectos inhibidores y citotóxicos en varias líneas celulares de cáncer como en las células de cáncer de colon (HCT116) (Park et al., 2014), células de cáncer de mama (Ling et al., 2015), células de cáncer de próstata (PC3) (Johnson et al., 2008) y en células de glioblastoma (U87MG) (Giacomelli et al., 2016). Además es un potente inhibidor de la angiogénesis tanto in vitro como in vivo, demostrando así su capacidad para bloquear la diferenciación, proliferación, migración y el potencial proteolítico de las células endoteliales (López, García, Medina, & Quesada, 2013).

Se ha demostrado que el Carnosol ha suprimido el nivel de expresión y la actividad de las enzimas CYP1A1 y CYP1B. De esta manera, la modulación de la expresión de las enzimas CYP por este compuesto, puede mejorar significativamente el impacto de los medicamentos preventivos y terapéuticos para el cáncer (Kashyap et al., 2017).

También se le atribuye propiedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, gracias a la presencia de los grupos acetilos que inhiben la acción antibacteriana, debido al bloqueo de los grupos hidroxilos de naturaleza fenólica, los cuales probablemente actúan produciendo lisis de la membrana plasmática de las bacterias (Encarnación et al., 1998; Pérez et al., 2014).

3.3 Compuestos aislados del extracto de metanol de la especie *Piper lanceifolium*

3.3.1 Fracción PL9.

De la purificación de la muestra PL2 se obtuvo la fracción PL9 (49.3mg) que se presentó como una sustancia cristalina. Se realizó cromatografía en capa fina usando como eluyente Hex/AcOEt en proporción 1:1 que al ser revelado con ácido sulfúrico al 5% y vainilla se observó una mancha de color anaranjado (Figura 13).

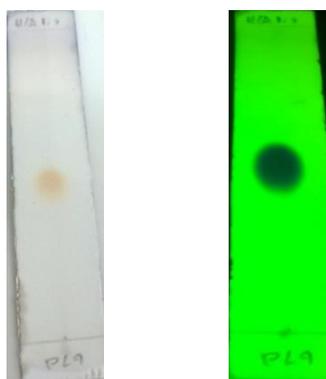


Figura 13: CCF de la fracción PL9

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

El compuesto fue identificado mediante la técnica de RMN, con los datos de ^1H que fueron comparados con literatura (Tabla 11) se determinó que se trata del éster metílico del ácido lanceaefólico con peso molecular de 250 g/mol y fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$. (Anexo 4)

Tabla 11: Datos espectroscópicos de ^1H RMN del éster metílico del ácido lanceaefólico.

PL9	(López et al., 2002)
^1H	
2.79 (s)	2.83 (s)

8.13 (d, $J=2.0$)	7.96 (d, $J=2.1$)
7.76 (d, $J=2.0$)	7.62 (d, $J=2.1$)
1.60 (s)	1.48 (s)
3.89 (s)	3.86 (s)

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

En la figura 14 se observa la estructura molecular del éster metílico del ácido lanceafólico.

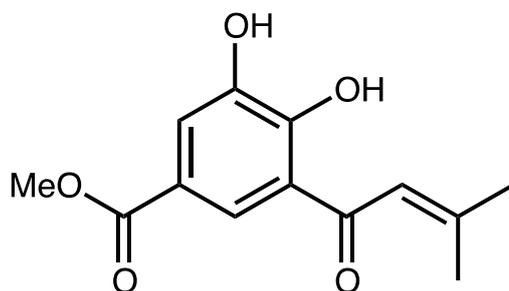


Figura 14: Estructura química del éster metílico del ácido lanceafólico

Fuente: Autora 20178

Elaboración: Autora 2018

Según bibliografía el compuesto éster metílico del ácido lanceafólico se ha reportado en el análisis del extracto metanólico de *P. lanceafolium* presentando actividad antifúngica contra *C. albicans* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 100ug/ml (López et al., 2002).

3.3.2 Fracción PL3.

La fracción PL3 (975.7mg) se obtuvo como un compuesto puro de aspecto sólido blanquecino, que eluye en polaridad 1:1 Hex/AcOEt. Al ser revelado con ácido sulfúrico al 5% y vainillina se observó una mancha de color anaranjado (Figura 15).

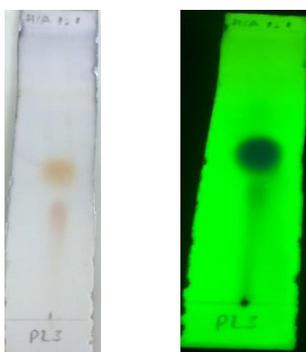


Figura 15: CCF de la fracción PL3

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

El compuesto fue identificado mediante RMN y los datos de ^1H fueron comparados con literatura (Tabla 12). El compuesto fue identificado como éster metílico del ácido ciclanceaeólico con fórmula $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$ y peso molecular de 250 g/mol. (Anexo 5)

Tabla 12: Datos espectroscópicos de ^1H RMN del éster metílico del ácido ciclanceaeólico.

PL3	(López et al., 2002)
^1H	
2.81 (s)	2.81 (s)
7.98 (d, J= 2.4)	7.96 (d, J= 2.0)
7.60 (d, J= 2.4)	7.62 (d, J= 2.0)
1.50 (s)	1.50 (s)
3.87 (s)	3.87 (s)

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

La estructura química del éster metílico del ácido ciclanceaeólico se observa en la figura 16.

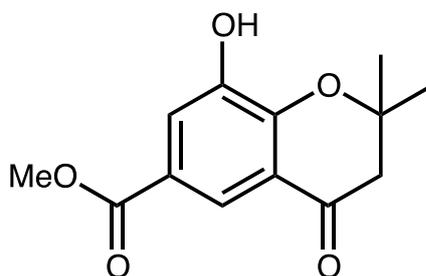


Figura 16: Estructura química del éster metílico del ciclanceaeólico

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

El éster metílico del ácido ciclanceaeólico según bibliografía ha sido aislado del extracto de metanol y de acetona de *P. lanceaeifolium* en donde se ha encontrado que presenta actividad antifúngica contra *C. albicans* mostrando baja actividad dentro del rango de concentraciones evaluadas, y actividad antimicrobiana contra 26 cepas de *N. gonorrhoeae* inhibiendo el crecimiento de estas en un 50% con una concentración alta de 128ug/ml (López et al., 2002; Ruddock et al., 2011).

3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de microdilución en caldo a partir de los extractos desclorofilados de AcOEt, MeOH y el compuesto Ledol de la especie *L. paniculata* que mostraron actividad contra los microorganismo evaluados. El extracto total de MeOH de *P. lanceaeifolium* no mostro efecto

antimicrobiano contra los microorganismos de la prueba. Los resultados se detallan en la tabla 13.

Tabla 13: Concentración mínima inhibitoria

Especie	Extracto/Compuesto	Microorganismo	Resultado
			CMI
<i>L. paniculata</i>	Ext. desclorofilado de AcOEt	<i>Proteus vulgaris</i>	62,5ug/ml
	Ext. desclorofilado de MEOH	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	500ug/ml
	Ledol	<i>Staphylococcus aureus</i>	500ug/ml
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125ug/ml
<i>P. lanceifolium</i>	MEOH	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>	-

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

El extracto de AcOEt de la especie *L. paniculata* presenta actividad antimicrobiana alta de 62,5ug/ml contra *Proteus vulgaris*, el extracto de MeOH presenta actividad antimicrobiana media de 500ug/ml contra *Klebsiella pneumoniae* y el compuesto Ledol presenta actividad media de 500ug/ml contra *Staphylococcus aureus* y actividad alta de 125ug/ml contra *Klebsiella pneumoniae*.

Estudios realizados con las diferentes especies de *Lepechinia* como *L. bullata* muestran actividad contra *S. aureus* (10ug/ml) el extracto de hexano y el extracto de acetona presenta actividad contra *B. subtilis*, *S. aureus* (10ug/ml) y *E. faecalis* (100ug/ml) (Pérez et al., 2014). Además se han realizado diversos estudios del aceite esencial de *L. caulescens* que reporta actividad contra *V. cholerae* (4ug/ml) (Avila et al., 2005), de *L. radula* presenta actividad antifúngica contra *T. rubrum* (31.25ug/ml) y *T. mentagrophytes* (62.50ug/ml) (Morocho et al., 2017), de *L. schideana* muestra actividad antifúngica contra *C. albicans* con un halo de inhibición de 0,5-0,6 cm, en donde se ha identificado el Ledol compuesto mayoritario (Rojas et al., 2004).

El extracto de MeOH de *P. lanceifolium*, no presento actividad antibacteriana para ningún microorganismo de prueba, sin embargo estudios realizados al aceite esencial de *P. lanceaefolium* presenta actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis* (20mg/ml) (Pino, Melendez, et

al., 2009). Además se ha evaluado el extracto etanólico de diferentes especies de *Piper* en las que se puede observar actividad contra diferentes microorganismos a concentración de 40mg/ml, entre estas especies tenemos *P. tricuspe*, *P. gorgonillense* y *P. hispidum* con actividad contra *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*, *P. multiplinervium* con actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis*, y *P. peltatum* con actividad contra *S. aureus* (Pino, 2008). Este género tiene un contenido alto en derivados de ácidos benzoicos que han sido evaluados contra parásitos como *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*, presentando actividad significativa (Flores et al., 2008).

3.5 Determinación de la actividad enzimática

En la tabla 14 se presentan los resultados de la actividad inhibitoria en α -glucosidasa in vitro del extracto total de MeOH y de los compuestos identificados de *P. lanceifolium*.

Tabla 14: Actividad inhibitoria de α -glucosidasa en extracto total y compuestos de *P. lanceifolium*.

Ex. Total/Compuestos	IC ₅₀ μ g/ml
Extracto de MeOH	114,73
Éster metílico del ácido lanceaeofolico	143,80
Éster metílico del ácido ciclanceaeofolico	147,94

Fuente: Autora 2018

Elaboración: Autora 2018

En la prueba realizada de α -glucosidasa tanto el extracto de Metanol como los compuestos éster metílico del ácido lanceaeofolico y éster metílico del ácido ciclanceaeofolico presentaron una actividad inhibitoria débil con valor de IC₅₀ de 114,73 μ g/ml, 143,80 μ g/ml, 147,94 μ g/ml respectivamente, en relación con

Este ha sido el primer estudio de la actividad hipoglucemiante reportado en la especie *P. lanceifolium* y a los dos compuestos aislados, sin embargo se ha realizado diferentes estudios en otras especies del género *Piper* como en *P. longum* en la que se ha reportado que el extracto de metanol posee una baja actividad inhibitoria de la enzima (Pullela et al., 2006), en *P. sarmentosum* se ha evaluado el extracto de dicloro encontrando que posee inhibición moderada para α -glucosidasa (Damsud, Adisakwattana, & Phuwapraisirisan, 2013), y en *P. angustifolium* se ha estudiado el extracto acuoso mostrando una inhibición moderada (44%) de la enzima α -glucosidasa (Ranilla, Kwon, Apostolidis, & Shetty, 2010).

CONCLUSIONES

- Del extracto de acetato de etilo de la especie *L. paniculata* mediante técnicas cromatográficas se aislaron e identificaron 3 compuestos conocidos como Ledol, Guaiol y Carnosol. Del extracto de metanol de la especie *P. lanceifolium* se identificaron dos derivados de ácido benzoico denominados éster metílico del ácido lanceaefolico y éster metílico del ácido ciclanceaefolico.
- El extracto desclorofilado de acetato de etilo de la especie *L. paniculata* presentó actividad antibacteriana moderada frente a *Proteus vulgaris*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, de igual manera el extracto desclorofilado de metanol presentó actividad frente a *Klebsiella pneumoniae*. El compuesto Ledol presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.
- El extracto total de metanol de la especie *P. lanceifolium* no presento actividad antimicrobiana frente a los microorganismos de prueba.
- En el ensayo de α -glucosidasa realizado a la especie *P. lanceifolium*, el extracto de metanol y los compuestos éster metílico del ácido lanceaefolico y éster metílico del ácido ciclanceaefolico presentan una actividad inhibitoria débil con valor de IC₅₀ de 114,73 μ g/ml, 143,80 μ g/ml, 147,94 μ g/ml respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de la especie *Lepechinia paniculata*, enfocándose en realizar pruebas de actividad biológica y antioxidante de extractos totales y compuestos aislados.
- Potenciar el estudio de actividad biológica de los derivados de ácido benzoico, ya que estos muestran fuerte actividad contra *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, Z., Merino, B., & Gutierrez, M. (2013). Principales familias de árboles, arbustos y hierbas del sur del Ecuador, 1–112.
- Altuntas, F., Yildiz, O., Eser, B., Gündogan, K., Sumerkan, B., & Çetin, M. (2004). Catheter-related bacteremia due to *Kocuria rosea* in a patient undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *BMC Infectious Diseases*, *4*(1), 1–3.
- Andrade, J., Armijos, C., Malagón, O., & Lucero, H. (2009). Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas, Provincia de Loja-Ecuador. (Editorial UTPL, Ed.). Loja-Ecuador.
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Peñaherrera, E., Tobar, V., & Witte, P. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, *23*(1), 89–97.
- Ashman, R., Farah, C., Wanasaengsakul, S., Hu, Y., Pang, G., & Clancy, R. (2004). Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. *Immunology and Cell Biology*, *82*(2), 196–204.
- Ávalos, A., & García, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, *2*(3), 119–145.
- Avila, J., Muñoz, J., Martínez, A., García, A., Martínez, G., & Peñalosa, I. (2005). In vitro anti-*Vibrio cholerae* activity of essential oil from *Lepechinia caulescens*. *Fitoterapia*, *76*(1), 104–107.
- Baananou, S., Bagdonaite, E., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., & Boughattas, N. (2015). Supercritical CO₂ extract and essential oil of aerial part of *Ledum palustre* L.--Chemical composition and anti-inflammatory activity. *Natural Product Research*, *29*(11), 999–1005.
- Bhalla, R., Narasimhan, K., & Swarup, S. (2005). Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Reports*, *24*(10), 562–571.
- Borges, R., Rojas, L., Cegarra, J., & Usubillaga, A. (2006). Study of the essential oils from the leaves and flowers of *Lepechinia conferta* (Benth) Epl. *Flavour and Fragrance Journal*, *21*(1), 155–157.

- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2010). Jawetz, Melnick y Adelberg. *Microbiología Médica*. (E. Mexicana, Ed.) (25a. edici). México, D.F.
- Cano, E., Ortiz, A., Carmen, M., Lombardo, M., & Cobos, J. (2009). flora medicinal utilizada en las enfermedades de la piel y en belleza Medicinal flora used in the illnesses of the skin and in beauty, 165–179.
- Cerón, C. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 285–293.
- Choudhary, M., Batool, I., Atif, M., Hussain, S., & Rahman, A. (2007). Microbial transformation of (-)-guaiol and antibacterial activity of its transformed products. *Journal of Natural Products*, 70(5), 849–852.
- Cortez, V., Macedo, J., & Arteaga, G. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Medigraphic Artemisa*, 15(2), 123–136.
- Costantin, M., Sartorelli, P., Limberger, R., Henriques, A., Steppe, M., Ferreira, M., Kato, M. (2001). Essential Oils from Piper cernuum and Piper regnellii: Antimicrobial Activities and Analysis by GC/MS and 13 C-NMR. *Planta Medica*, 67(8), 771–773.
- Da Silva, J., Pinto, L., Burbano, R., Montenegro, R., Guimarães, E., Andrade, E., & Maia, J. (2014). Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 58, 55–60.
- Damsud, T., Adisakwattana, S., & Phuwapraisirisan, P. (2013). Three new phenylpropanoyl amides from the leaves of Piper sarmentosum and their α -glucosidase inhibitory activities. *Phytochemistry Letters*, 6(3), 350–354.
- De la Torre, L., Alarcón, D., Kvist, P., & Salazar, J. (2008). Usos medicinales de las plantas. *Encilopedia de Las Plantas Útiles Del Ecuador*, 105–114.
- Del Castillo, S., González, J., González, J., Prieto, S., & Urquiola, A. (2004). Identificación fitoquímica de las hojas y ramas de la Helietta cubensis Monach-Moldenke, especie endémica de Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*, 38(1), 0–0.
- Delgado, G., Hernández, J., Chávez, M. I., Alvarez, L., Gonzaga, V., & Martínez, E. (1994). Di- and triterpenoid acids from Lepechinia caulescens. *Phytochemistry*, 37(4), 1119–1121.
- Drew, B., & Sytsma, K. (2013). The South American radiation of Lepechinia (Lamiaceae): phylogenetics , divergence times and evolution of dioecy, 171–190.

- Echeverri, L., Rueda, Z., Maya, W., Agudelo, Y., & Ospina, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 29(2), 175–182.
- Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R., & Santa, M. (2008). Resonancia Magnética Nuclear De Protón. *Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense*, (Madrid, España), 1–47.
- Encarnación, R., Almada, G., & Virgen, M. (1998). Minimum antimicrobial inhibitory concentration of carnosol and of the ethanol extract from *Lepichinia hastata* (Lamiaceae). *Phytomedicine*, 5(4), 301–305.
- Esteves, P., Kuster, R., Barbi, N., & De Menezes, F. (2010). Chemical composition and cytotoxic activity of *Lepechinia speciosa* (St. Hill) Epling. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(1), 38–44.
- Ferrario, C., Lugli, G., Ossiprandi, M., Turroni, F., Milani, C., Duranti, S., Ventura, M. (2017). Next generation sequencing-based multigene panel for high throughput detection of food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1–2), 155–171.
- Flores, N., Jiménez, I., Giménez, A., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Bourdy, G., & Bazzocchi, I. (2008). Benzoic Acid Derivatives from Piper Species and Their Antiparasitic Activity. *Journal Natural Products*, 48, 71, 15, 38.
- Fu, S., Octavia, S., Tanaka, M., Sintchenko, V., & Lan, R. (2015). Defining the core genome of salmonella enterica serovar typhimurium for genomic surveillance and epidemiological typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2530–2538.
- Gazim, Z., Amorim, A., Hovell, A., Moraes, C., Nascimento, I., Alves, G., & Garcia, D. (2010). Seasonal Variation, Chemical Composition, and Analgesic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. *Journal Molecules*, 15, 5509–5524.
- Giacomelli, C., Natali, L., Trincavelli, M. L., Daniele, S., Bertoli, A., Flamini, G., Martini, C. (2016). New insights into the anticancer activity of carnosol: P53 reactivation in the U87MG human glioblastoma cell line. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 74, 95–108.

- Granados, C., Santafé, G., & Yáñez, X. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 12–23.
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(1), 33–39.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1–93.
- Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigación Textil Y de Cooperación Industrial*, (122), 35–41.
- Johnson, J. (2011). Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters*, 305(1), 1–7.
- Johnson, J., Syed, D., Heren, C., Suh, Y., Adhami, V., & Mukhtar, H. (2008). Carnosol, a dietary diterpene, displays growth inhibitory effects in human prostate cancer PC3 cells leading to G2-phase cell cycle arrest and targets the 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2125–2134.
- Kashyap, D., Kumar, G., Sharma, A., Sak, K., Tuli, H., & Mukherjee, T. (2017). Mechanistic insight into carnosol-mediated pharmacological effects: Recent trends and advancements. *Life Sciences*, 169, 27–36.
- Kelmanson, J., Jäger, A., & Van Staden, J. (2000). Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(3), 241–246.
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto Y Atlas En Color* (Ed. Médica).
- Kumar, P., Kumaravel, S., & Lalitha, C. (2010). Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(July), 191–195.
- Lago, J., Chen, A., Young, M., Guimarães, E., De Oliveira, A., & Kato, M. (2009). Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, 2(3), 96–98.
- Lamarque, A. (2008). Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica/Theoretical and practical organic chemistry. (Editorial Brujas., Ed.).

- Ling, T., Tran, M., González, M., Gautam, L., Connelly, M., Wood, R., Rivas, F. (2015). (+)-Dehydroabietylamine derivatives target triple-negative breast cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 102, 9–13.
- Lo, A.-H., Liang, Y.-C., Lin-Shiau, S.-Y., Ho, C.-T., & Lin, J.-K. (2002). Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23(6), 983–991.
- Lopez, A., Hudson, J., & Towers, G. (2001). Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2–3), 189–196.
- López, A., Ming, D., & Towers, G. (2002). Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper lanceaefolium*. *Journal of Natural Products*, 65(1), 62–64.
- López, J. (2008). Estandarización De La Técnica De Cromatografía De Gases Acoplada a Espectrometría De Masas Para La Identificación Y Cuantificación De Metilésteres De Ácidos., 84.
- López, M., García, M., Medina, M., & Quesada, A. (2013). Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *European Journal of Nutrition*, 52(1), 85–95.
- Lowy, F. (1998). Staphylococcus aureus infections. *New England Journal of Medicine*, 339, 520–532.
- Malagón, O., Vila, R., Iglesias, J., Zaragoza, T., & Cañigüeral, S. (2003). Composition of the essential oils of four medicinal plants from Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6), 527–531.
- Marinoff, M. (1994). Las plantas medicinales desde la Biblia a la actualidad. *Unne.Edu.Ar*.
- Morocho, V., Toro, M., Cartuche, L., Guaya, D., Valarezo, E., Malagon, O., & Ramirez, J. (2017). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Lepechinia radula* Benth Epling. *Records of Natural Products*, 11(1), 57–62.
- Mundina, M., Vila, R., Tomi, F., Tomàs, X., Ciccíó, J., Adzet, T., Cañigüeral, S. (2001). Composition and chemical polymorphism of the essential oils from *Piper lanceaefolium*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(7), 739–748.
- Murray, B. (2000). Vancomycin Resistant Enterococcal Infections. *The New England Journal of Medicine*, 342, 710–721.

- Nanclares, D. (2016). Evaluación de las bacterias aisladas de material particulado PM2.5 captado en tres estaciones de la Red de Monitoreo de Calidad de Aire del Área Metropolitana Valle de Aburrá. Universidad Nacional de Colombia.
- Nostro, A., Germano, M., D'Angelo, V., Marino, A., & Cannatelli, M. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30(5), 379–384.
- OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. *Organización Mundial de La Salud*, 72.
- Ozer, M., Sarikurkcu, C., Ceylan, O., Akdeniz, I., & Tepe, B. (2017). A comprehensive study on chemical composition, antioxidant and enzyme inhibition activities of the essential oils of *Chenopodium botrys* collected from three different parts of Turkey. *Industrial Crops and Products*, 107(June), 326–331.
- Pardo, M., Blanco, E., & Morales, R. (2005). Plants known as té in Spain: An ethnopharmaco-botanical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1–2), 1–19.
- Parejo, I., Caprai, E., Bastida, J., Viladomat, F., Jáuregui, O., & Codina, C. (2004). Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 175–184.
- Park, K. W., Kundu, J., Chae, I. G., Kim, D. H., Yu, M. H., Kundu, J. K., & Chun, K. S. (2014). Carnosol induces apoptosis through generation of ROS and inactivation of STAT3 signaling in human colon cancer HCT116 cells. *International Journal of Oncology*, 44(4), 1309–1315.
- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Boll, P. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46(4), 597–673.
- Parmar, V., Jain, S., Gupta, S., Talwar, S., Rajwanshi, V., Kumar, R., Wengel, J. (1998). Polyphenols and alkaloids from *piper* species. *Phytochemistry*, 49(4), 1069–1078.
- Pellegrini, M., Alvarez, M., Ponce, A., Cugnata, N., De Piano, F., & Fuselli, S. (2014). Antiquorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. *Journal of Essential Oil Research*, 26(6), 458–465.
- Pérez, A., Vivas, K., Rojas, L., Usubillaga, A., & Chataing, B. (2014). Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata* (kunth) Epling. *Revista de La Facultad de Farmacia*, 56(1), 40–45.

- Pérez, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- Pino, N. (2008). Antibacterial activity starting from extracts of leaves of six species of the genus *Piper* L. (Piperaceae), 27(1), 67–75.
- Pino, N., Melendez, E., & Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia*.
- Pino, N., Meléndez, E., & Stashenko, E. (2009). Essential oil composition from two species of Piperaceae family grown in Colombia. *Journal of Chromatographic Science*, 47(9), 804–807.
- Pukalskas, A., Beek, T., & De Waard, P. (2005). Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. *Journal of Chromatography A*, 1074(1–2), 81–88.
- Pullela, S., Tiwari, A., Vanka, U., Vummenthula, A., Tatipaka, H., Dasari, K., Janaswamy, M. (2006). HPLC assisted chemobiological standardization of α -glucosidase-I enzyme inhibitory constituents from *Piper longum* Linn-An Indian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 445–449.
- Ranilla, L., Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101(12), 4676–4689.
- Rios, M., Koziol, M., Pedersen, H., & Granda, G. (2007). Plantas útiles del Ecuador aplicaciones, retos y perspectivas (p. 652).
- Rojas, L., Usubillaga, A., Cegarra, J., Borregales, E., & Carrero, S. (2004). Composición química y actividad antimicótica de el aceite esencial de la *Lepechinia schiedeana* (Schlecht) Vatke. *Revista de La Facultad de Farmacia*, 46(1), 27–30.
- Ruddock, P., Charland, M., Ramirez, S., López, A., Neil, G., Arnason, J., Dillon, J.-A. (2011). Antimicrobial Activity of Flavonoids From *Piper lanceaefolium* and Other Colombian Medicinal Plants Against Antibiotic Susceptible and Resistant Strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Diseases*, 38(2), 82–88.
- Sajc, L., Grusbisic, D., & Novakovic, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: An out

- further research. *Biochem. Eng. J.*, 4, 89–99.
- Sarin, R. (2005). Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology*.
- Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. (McGraw-Hill, Ed.) (5ª Edición). Madrid, España.
- Spangenberg, B., Poole, C., & Weins, C. (2011). Quantitative thin-layer chromatography: a practical survey. Springer Science & Business Media.
- Stashenko, E., Cervantes, M., Combariza, Y., Fuentes, H., & Martínez, J. (1999). HRGC/FID and HRGC/MSD analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and in vitro evaluation of its antioxidant activity. *Journal of High Resolution Chromatography*, 22(6), 343–349.
- Szafranek, B., Synak, E., Waligóra, D., Szafranek, J., & Nawrot, J. (2008). Leaf surface compounds of the potato (*Solanum tuberosum*) and their influence on Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) feeding. *Chemoecology*, 18(4), 205–216.
- Tene, V., Malagón, O., Vita, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81.
- UNAM. (2007). Técnicas Cromatográficas. *Química Analítica Instrumental II*, 1–123.
- Valarezo, E., Castillo, A., Guaya, D., Morocho, V., & Malagón, O. (2012). Chemical composition of essential oils of two species of the Lamiaceae family: *Scutellaria volubilis* and *Lepechinia paniculata* from Loja, Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, 24(1), 31–37.
- Ventura, G., Castro, A., Roque, M., & Ruiz, J. (2009). Chemical composition of essential oil *Erythroxylum coca* Lam var. *coca* (Coca) and evaluation of its antibacterial activity. *Ciencia E Investigación*, 12(1), 24–28.
- Vidal, J., Canizález, A., Gutiérrez, J., & Navarro, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5), 376–386.
- WHO Policy Perspectives on Medicines. (2002). Medicina Tradicional – Necesidades Crecientes y Potencial. *World Health Organization*, 2, 1–6.
- Wiert, C. (2006). Plants Classified in the Family Polygonaceae. Medicinal Plants of Asia and

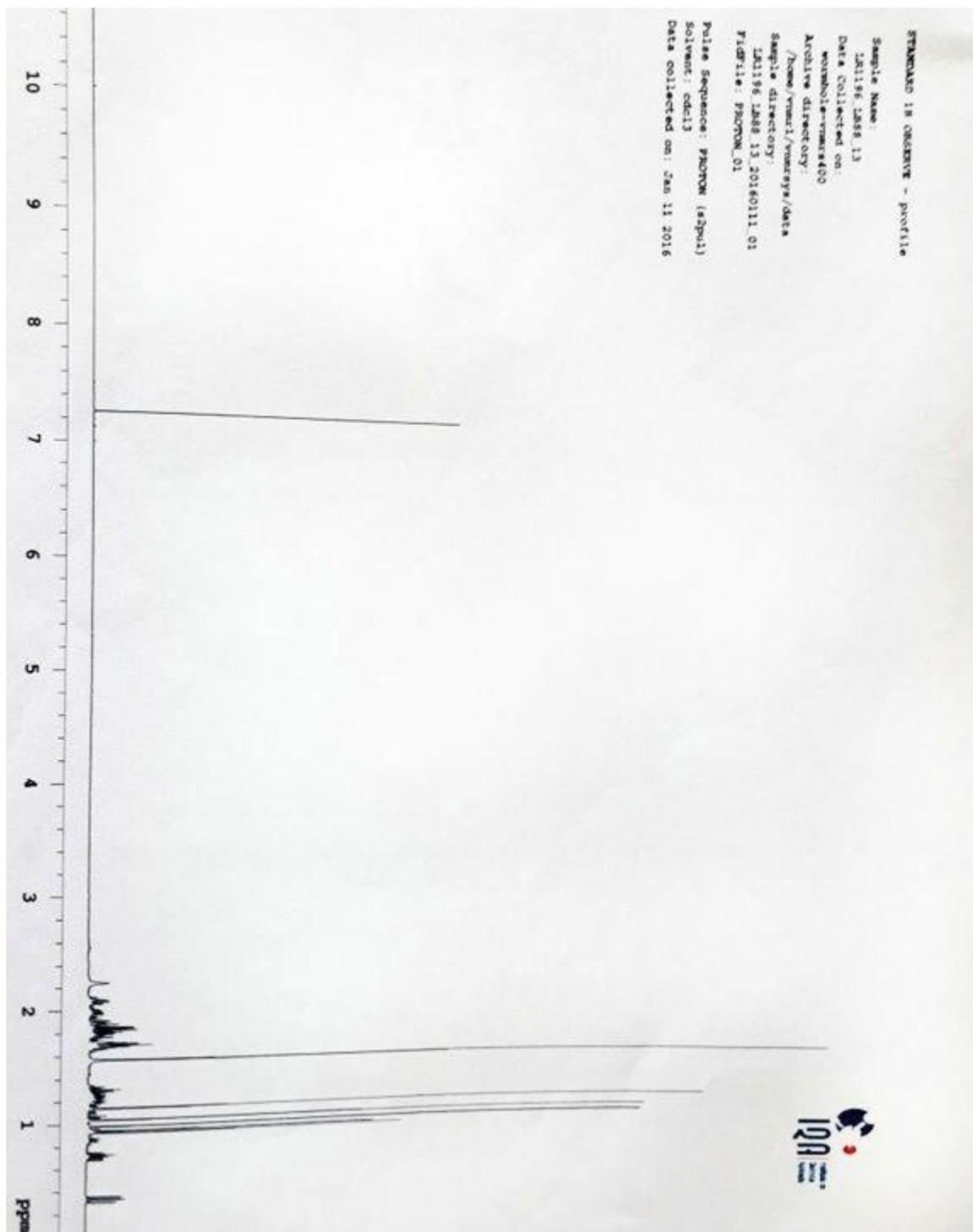
the Pacific.

Yamaguchi, L., Lago, J., Tanizaki, T., Mascio, P., & Kato, M. (2006). Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, 67(16), 1838–1843.

Zampini, I., Cudmani, N., & Isla, M. (2007). Antimicrobial activity of Argentine medicinal plants on antibiotic-resistant bacteria. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(3), 99–105.

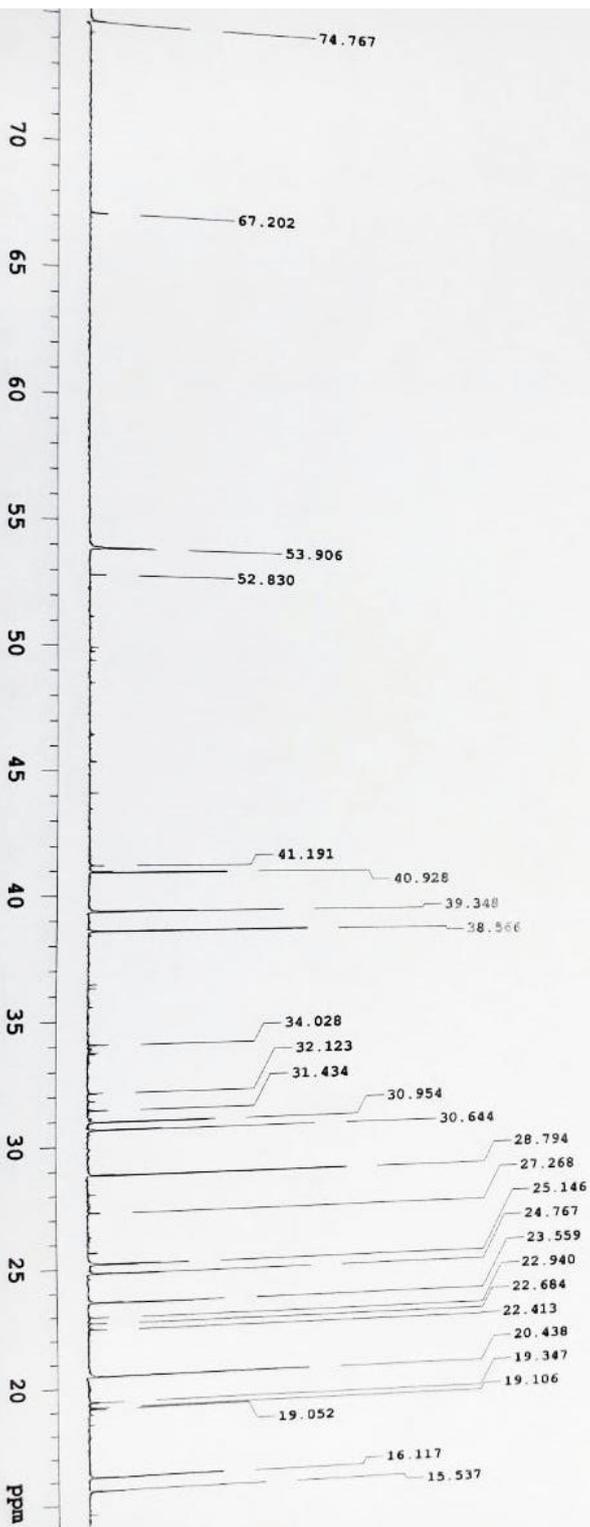
ANEXOS

Anexo 1: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción LB 88/13 (^1H , ^{13}C 400MHz, CDCl_3)

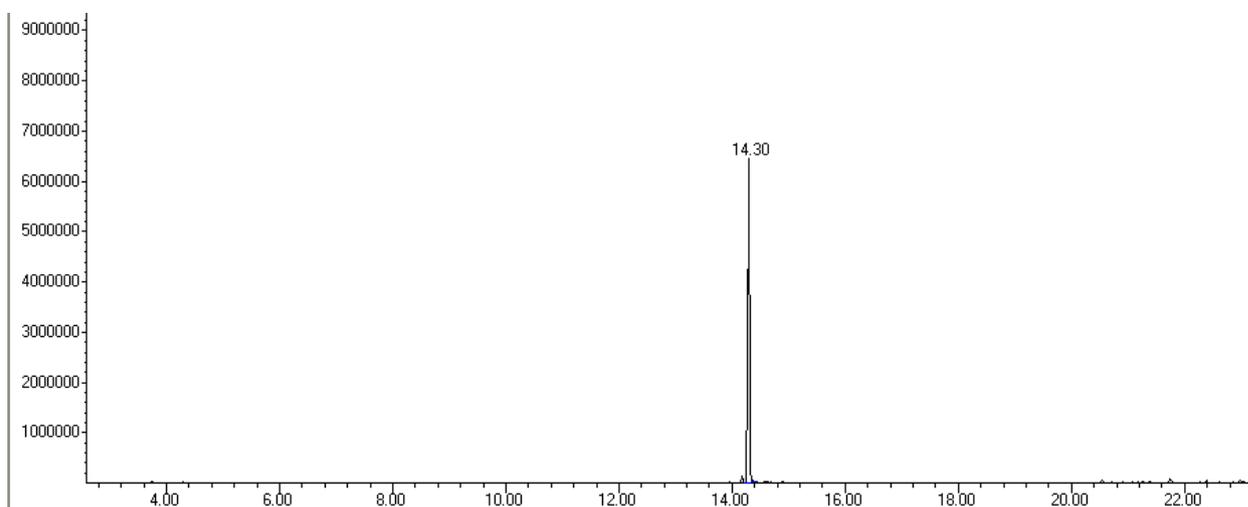


STANDARD 1H OBSERVE - profile

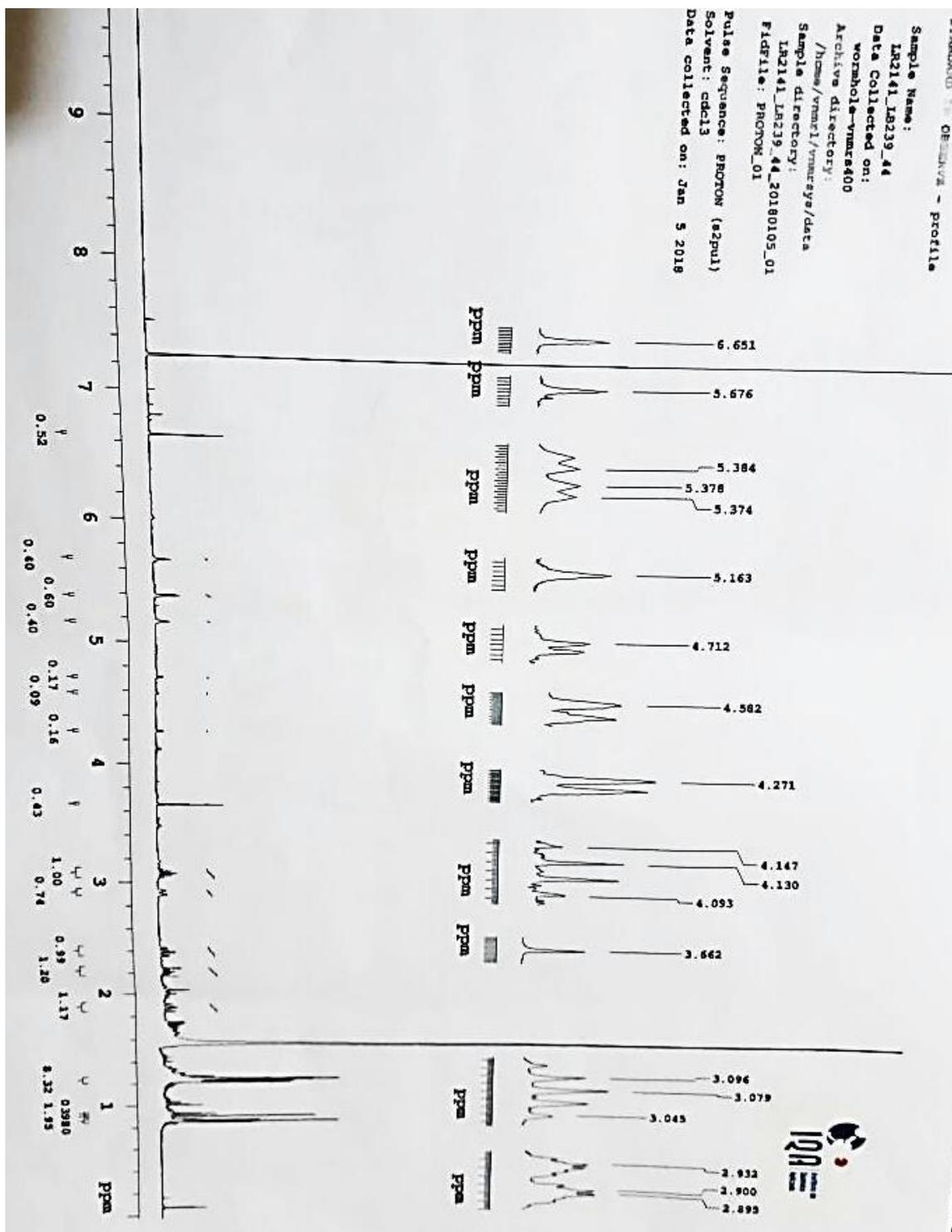
Sample Name: LRI027_Lp_18
Data Collected /data
workhole-vmrst400
Archive directory: /home/vmrst1/vmrstays/data
Sample directory: LRI027_Lp_18_7_4_20151015_01
FIDFile: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Oct 15 2015



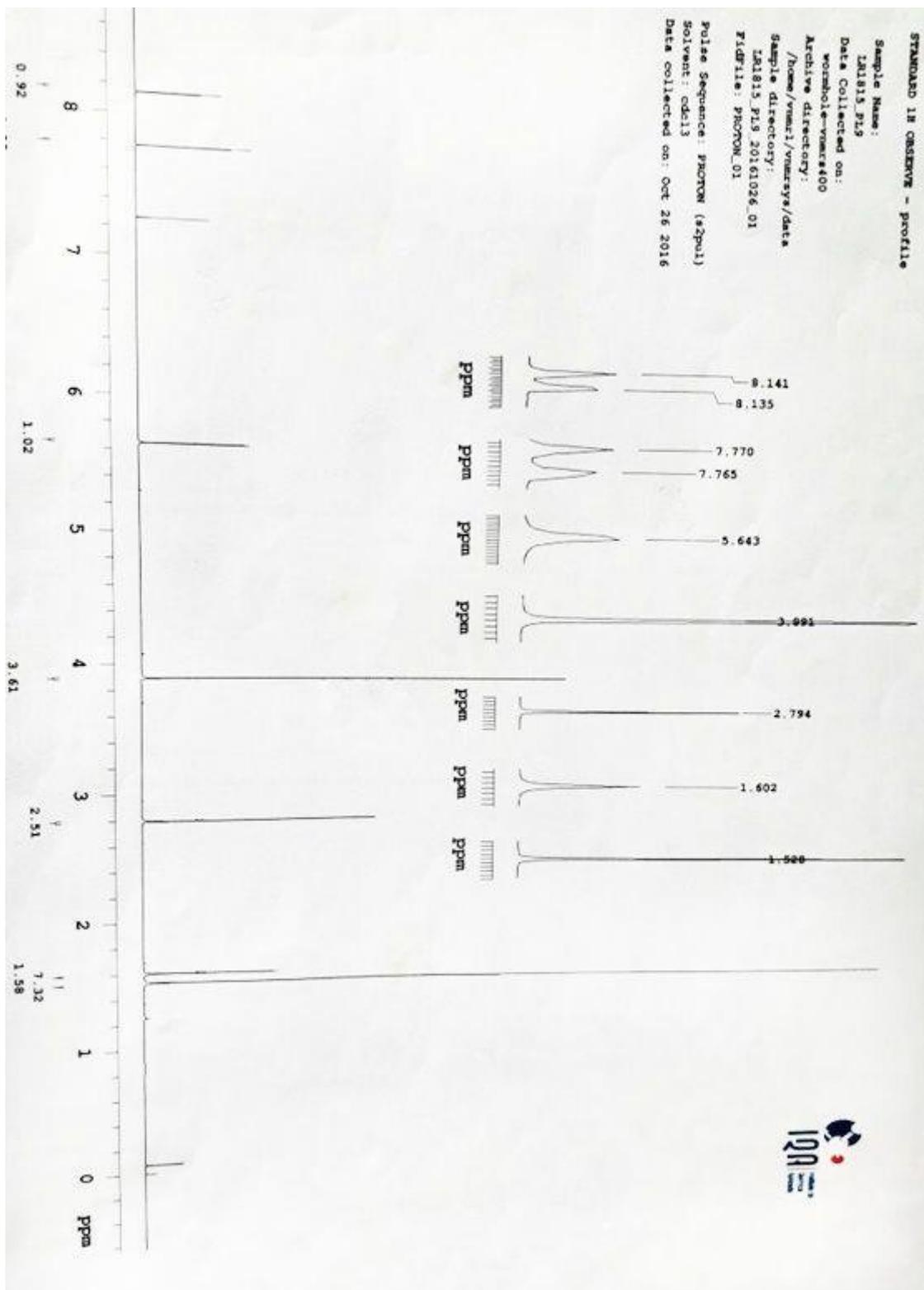
Anexo 2: Espectro de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases de la fracción LB 7/4



Anexo 3: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción LB 239/34 (^1H 400MHz, CDCl_3)



Anexo 4: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción PL9 (^1H 400MHz, CDCl_3)



Anexo 5: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción PL3 (^1H 400MHz, CDCl_3)

