UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TITULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Estudio fitoquímico del tubérculo de la especie *Eriotheca ruizii*

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Santos Díaz, María Soledad

DIRECTOR: Romero Benavides, Juan Carlos, 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

Loja, mayo del 2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Juan Carlos Romero Benavides

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración

En el presente trabajo de titulación **"Estudio fitoquímico del tubérculo *Eriotheca ruizii*"**, realizado por Santos Díaz María Soledad, el mismo que ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo

Loja, abril del 2018

f)……

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Santos Díaz María Soledad, declaro ser la autora del presente trabajo de titulación **Estudio fitoquímico del tubérculo *Eriotheca ruizii*** de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo el Ph.D. Juan Carlos Romero Benavides director del presente trabajo; y eximo 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 titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f)…….

Autor: Santos Díaz María Soledad

Cédula: 1104965981

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Dios y la Virgencita del Cisne quienes me acompañan por el camino de la vida, me dan fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentan.

A mi familia, especialmente para mis padres Lida y Fredy quienes me han enfocado a todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos Adriana, Stefany, Fredy Jr., Leonardo y Fernanda por estar siempre presentes, acompañándome para poder realizar esta meta.

A mi tía Grey, abuelitos Mariana y Arturo, a mis sobrinas Milagros y Antonela quienes ha sido y son también mi motivación, inspiración y felicidad.

AGRADECIMIENTO

La vida se encuentra plagada de retos, y uno de ellos es la universidad. Tras verme dentro de ella, me he dado cuenta que más allá de ser un reto, es una base, no solo para mi entendimiento del campo en el que me he visto inmersa, sino para lo que concierne a la vida y mi futuro.

Agradezco primeramente a Dios por permitirme vivir y estar cumpliendo esta meta tan anhelada.

Gracias de corazón a mi tutor Juan Carlos Romero Benavides por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Ha hecho fácil lo difícil, ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

Gracias a mis padres que sin ellos no estuviera aquí, por su amor, dedicación en guiarme por lo duro y blando del camino de la vida.

Gracias a mi hermana Adriana que ha sido, es y será siempre mi ejemplo a seguir, por el gran amor y paciencia.

Gracias a todas las extraordinarias personas del departamento de Química Básica y Aplicada, especialmente a la Dra. Alírica Suárez, Ronald, Paola, Claudia, Ivannova por bríndame siempre consejos, ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Gracias a la Universidad Técnica Particular de Loja para darme la oportunidad de estudiar y ser profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN ii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS iii
DEDICATORIA iv
AGRADECIMIENTO v
ÍNDICE DE FIGURAS ix
ÍNDICE DE TABLAS x
LISTA DE FÓRMULAS xi
ABREVIATURAS xii
RESUMEN 1
ABSTRACT 2
INTRODUCCIÓN 3
CAPÍTULO I 5
1.1. Fin, propósito y componentes del Proyecto 6
1.1.1. Fin del Proyecto 6
1.1.2. Propósito del Proyecto 6
1.1.3. Componentes del Proyecto 6
CAPÍTULO II ASPECTOS GENERALES 7
2.2. Aspectos Generales 8
2.2.1. Biodiversidad en el Ecuador 8
2.2.2. Medicina Tradicional y Natural 8
2.2.3. Estudio Fitoquímico 9
2.2.4. Metabolitos Secundarios 9
2.2.5. Tamizaje fitoquímico 9
2.3. Descripción de las características de la familia y del género *Eriotheca.* 10
2.3.1. Descripción de la especie *Eriotheca ruizii* 11
2.4. Algunas técnicas de aislamiento, identificación y caracterización de metabolitos secundarios. 12
2.4.1. Cromatografía 12
2.4.2. Cromatografía en capa fina (CCF) 12
2.4.3. Cromatografía en columna (CC) 13

2.4.4. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas 13
2.4.5. Resonancia nuclear magnética..... 14
2.4.6. Cristalización 14
2.4.7. Punto de fusión..... 14
3.1. Materiales y métodos 16
3.2. Selección y recolección de la materia vegetal 17
3.3. Obtención de extractos..... 17
3.3.1. Maceración estática..... 17
3.4. Fraccionamiento de extractos 19
3.4.1. Montaje de columna 19
3.4.2. Cromatografía en capa fina 20
3.4.3. Unión y purificación 20
3.4.4. Microcolumna 20
3.4.5. Tamizaje fitoquímico..... 22
3.4.6. Extracción de alcaloides 24
3.5. Caracterización de metabolitos secundarios 24
3.5.1. Punto de fusión..... 24
3.5.2. Factor de retención..... 24
3.5.3. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (CG/EM). .. 24
3.5.4. Espectroscopia de Resonancia Nuclear Magnética (RMN)..... 25
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 26
4.1. Resultados y discusión..... 27
4.1.1. Rendimiento de los extractos obtenidos 27
4.2. Tamizaje fitoquímico 28
4.3. Actividad Biológica 32
4.4. Aislamiento, caracterización e identificación de metabolitos secundarios en *Eriotheca ruizii.* 33
4.4.1. Extracto de acetato de etilo – epidermis 33
4.4.1.1. Fracción Er-AcOEt-EP4..... 34
4.4.1.1.1. Fracción Er_AcOEt_Ep_F4F1F1..... 34
4.4.1.1.2. Fracción Er_AcOEt_Ep_Fr4F3F1 35
4.4.1.2. Fracción Er-AcOEt-EP6..... 35
4.4.1.2.1. Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F1F1..... 36

4.4.1.2.2. Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F1F2 37
4.4.1.2.3. Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F7 37
4.4.1.3. Fracción Er-AcOEt-EP12 38
4.4.1.3.1. Fracción Er_AcOEt_Ep_F12F1 39
4.4.1.3.2. Fracción Er_AcOEt_Ep_F12F6F7 39
4.4.2. Extracto Metanol – epidermis 40
4.4.2.1. Fracción alcaloidea 40
4.4.2.2. Fracción alcaloidea en pH 8 41
4.4.2.2.1. Columna de la fracción alcaloidea en pH 8 41
4.4.3. Extracto Metanol – cortex blanco 45
4.4.3.1. Fracción Er-MeOH-CB1 46
4.4.3.2. Fracción Er-MeOH-CB3 47
4.4.3.3. Fracción Er-MeOH-CB19 48
4.4.3.4. Fracción Er-MeOH-CB20 50
4.4.3.4.1. Fracción Er-MeOH-CB20F14 51
CONCLUSIONES 54
RECOMENDACIONES 55
BIBLIOGRAFÍA 56
ANEXOS 68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de compuestos aislados del género *Eriotheca* 11
Figura 2 Esquema de los Métodos empleados en la Investigación 16
Figura 3. Mapa de lugar de la recolección del tubérculo *Eriotheca ruzii* 17
Figura 4. Tubérculo de la especie Eriotheca ruizii y sus segmentaciones (a) córtex marrón y (b) blanco; (c) pulpa marrón y (d) blanco..... 18
Figura 5 Placas cromatográficas de los extractos de *Eriotheca ruizzi* .Nomenclatura de las muestras: **EP** (epidermis), **CM** (cortex marón), **CB** (cortex blanco), **PM** (pulpa marrón), **PB** (pulpa blanca). 1) corresponde al extracto hexano; 2) corresponde al extracto acetato de etilo; 3) corresponde al extracto de metanol. 28
Figura 6. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_Fr4F1F1,..... 35
Figura 7. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_Fr4F3,..... 35
Figura 8. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F1F,..... 36
Figura 9. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F1F2,..... 37
Figura 10. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F7,..... 37
Figura 11. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F12F1,..... 39
Figura 12. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F12F6F7,..... 40
Figura 13. Placas de CCF: (**1**) se muestra los resultados de la prueba de Dragendorff positivo en el extracto de las separaciones del tubérculo, (**2**) fracción alcaloidea en pH 8 polaridad de elución: CH_2Cl_2:MeOH 96:4; (**3**) fracción alcaloidea en pH 11polaridad de elución: CH_2Cl_2:MeOH 99:1; (**4**) fracción alcaloidea pH 8 eluída en: CH_2Cl_2: MeOH 95:5, (**5**) fracción alcaloidea pH 11 eluída en: CH_2Cl_2:MeOH 1:1; (**1, 4, 5**) revelado con dragendorff y (**2, 3**).con ácido sulfúrico y vainillina..... 41
Figura 14. CCF de unión de Fracciones de la extracción de alcaloides en pH 8 42
Figura 15. Estructuras de los compuestos identificados de la fracción alcaloidea en pH 8 del extracto metanol-epidermis de *E ruizii*: (**1**) éster metílico del ácido palmítico, (**2**) éster metílico del ácido heptadecanoico, (**3**) éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico, (**4**) éster metílico del ácido 7- octadecenoico, (**5**) éster metílico del ácido octadecenoico, (**6**) éster metílico del ácido 2-octil- ciclopropanetetradecanoico..... 44
Figura 16. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_Fr20FF14,..... 51
Figura 17. Estructura del arabinofuranosil-(I"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil. 52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de *Eriotheca ruizii* 12
Tabla 2. Condiciones para montaje de microcolumna de las fracciones obtenidas de cromatografía en columna 20
Tabla 3. Condiciones de operación de equipo CG/EM 25
Tabla 4. Rendimientos, peso y características de los extractos obtenidos de las diferentes estructuras morfológicas de E. ruizii. 27
Tabla 5. Resultados de Tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos de las diferentes estructuras morfológicas del tubérculo E. ruizii. 30
Tabla 6. Fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo de epidermis de E. ruizii. 33
Tabla 7. Unión de las fracciones de Er-AcOEt-EP4 de la columna del extracto acetato de etilo-epidermis de E. ruizii. 34
Tabla 8. Unión de las fracciones de Er-AcOEt-EP6 de la columna del extracto acetato de etilo-epidermis de E. ruizii. 36
Tabla 9. Fracciones obtenidas de la fracción Er-AcOEt-EP12 de la columna del extracto acetato de etilo-epidermis de E. ruizii. 38
Tabla 10. Unión de la fracción alcaloidea en pH 8 del extracto de metanol-epidermis de E. ruizii. 41
Tabla 11. Compuestos aislados de la fracción alcaloidea en pH 8 del extracto metanol-epidermis de E. ruizii, con la actividad reportada en bibliografía. 43
Tabla 12. Unión de las fracciones de extracto de metanol-cortex blanco de E. ruizii. 45
Tabla 13. Unión de las fracciones de Er- MeOH-CB1 de la columna del extracto metanol-cortex blanco de E. ruizii. 46
Tabla 14. Unión de las fracciones de fracción Er-MeOH-CB3 de la columna del extracto metanol-cortex blanco de E. ruizii. 47
Tabla 15. Unión de las fracciones de fracción Er-MeOH-CB19 de la columna del extracto metanol-cortex blanco de E. ruizii. 48
Tabla 16. Unión de fracciones de Er-MeOH-CB20 de la columna del extracto metanol-cortex blanco de E. ruizii. 50
Tabla 17. Datos espectroscópicos de ^{1}H- RMN (CD_3OD) del arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil. 52
Tabla 18. Datos espectroscópicos de ^{13}C-RMN (CD_3OD) del arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil. 53

LISTA DE FÓRMULAS

Fórmula 1. Cálculo del rendimiento

Fórmula 2. Cálculo del factor de retención

ABREVIATURAS

Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
CH_2Cl_2	Diclorometano
$CHCl_3$	Cloroformo
H_2O	Agua
CH_2O_2	Ácido fórmico
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas
RMN	Resonancia magnética nuclear
IR	Índice de retención
t_R	Tiempo de retención
Rf	Factor de retención
UV	Ultravioleta
Rf	Radio frecuencia
COSY	Espectroscopía relacionada
HSQC	Correlación cuántica múltiple heteronuclear.
HMBC	Correlación de enlace múltiple heteronuclear.

RESUMEN

La especie *Eriotheca ruizii* se recolectó, en El Naranjo-Paltas-Loja. El tubérculo fue segmentado en epidermis, cortex blanco y marrón, pulpa blanca y marrón, debido a la maduración, obteniendo extractos; utilizando disolventes: hexano, acetato de etilo y metanol, a los extractos obtenidos se realizó un tamizaje fitoquímico para evaluar la presencia de fitoconstituyentes. Los extractos que mostraron mayor actividad biológica en líneas celulares de cáncer humano, epidermis-acetato de etilo y cortex blanco-metanol se los fraccionó mediante cromatografía en columna abierta, y al extracto de epidermis-metanol se realizó la extracción de alcaloides. Obteniéndose una mezcla de 25 compuestos de los cuales 6 podrían ser alcaloides y otros 6 fueron identificados como: éster metílico del ácido palmítico, éster metílico del ácido heptadecanoico, éster metílico del ácido 8,11-octadecadenoico, éster metílico del ácido 7- octadecenoico, éster metíllico del ácido octadecenoico, éster metílico del ácido 2-octil- ciclopropanotetradecanoico; del extracto cortex-blanco se obtuvo un compuesto identificado como arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil. Para la identificación del compuesto se utilizó cromatografía de gases acoplado a masas, ^{1}H- RMN y ^{13}C-RMN, HMBC, HSQC, COSY, índice de retención, punto de fusión, factor de retención.

Palabras clave: *Eriotheca ruizii*, tamizaje fitoquímico, arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil

ABSTRACT

The species Eriotheca ruizii was collected, in El Naranjo-Paltas-Loja. The tuber was segmented into epidermis, white and brown cortex, white and brown pulp, due to maturation, obtaining extracts; using solvents: hexane, ethyl acetate and methanol, phytochemical screening was carried out to evaluate the presence of phytoconstituents. The extracts that showed the highest biological activity in human cancer cell lines, ethyl acetate epidermis and white methanol cortex were fractionated by open column chromatography, and alkaloid extraction was performed to the epidermis methanol extract. Obtaining a mixture of 25 compounds of which 6 could be alkaloids and 6 others were identified as: palmitic acid methyl ester, heptadecanoic acid methyl ester, 8,11-octadecadenoic acid methyl ester, 7-octadecenoic acid methyl ester, methyl ester of octadecenoic acid, 2-octyl-cyclopropanotetradecanoic acid methyl ester; of the white cortex extract a compound identified as arabinofuranosyl- (l "→ 6 ') - glucopyranosyl-4-hydroxy-3-methoxy-phenethyl was obtained. For compound identification, gas chromatography coupled to masses, ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR, HMBC, HSQC, COZY, retention index, melting point, retention factor.

Key words: *Eriotheca ruizii*, phytochemical screening, arabinofuranosyl- (l "→ 6 ') - glucopyranosyl-4-hydroxy-3-methoxy-phenethyl.

INTRODUCCIÓN

La interacción del hombre con los recursos naturales en su búsqueda de conocer lo que nos rodea y de obtener los medios para su supervivencia se ve reflejada a través de la historia en muchas actividades (Gallego & Quijano, 2012). A las plantas se les ha dado un uso medicinal para el alivio de dolencias y tratamiento de enfermedades desde tiempos antiguos, actualmente continúan siendo las más significativas fuentes de medicamentos, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el bienestar del 80% de la población de países en desarrollo usan las plantas como medicina tradicional, terapias espirituales y prácticas ancestrales de curación, los metabolitos secundarios presentes en las plantas permiten el tratamiento y profilaxis de diferentes desordenes físicos y biológicos (Tinitana, Rios, Romero-Benavides, de la Cruz Rot, & Pardo-de-Santayana, 2016)

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos relacionados con el crecimiento y desarrollo de la planta, se hallan distribuidos de forma diferencial a lo largo de los grupos taxonómicos (Croteau et al., 2000). Estos compuestos fitoquímicos comprenden una amplia variedad de estructuras químicas (Mareggiani, 2001).

La obtención de compuestos secundarios, es un tema de interés actualmente con el fin de buscar y conocer de donde provienen, mecanismos de producción (biosíntesis), la utilización de estos en las planta para los diferentes procesos que permiten su crecimiento (alimentación), mecanismos de defensa, interacción con el medio, entre otras, así como el uso de estos en reemplazo de productos sintéticos (Gallego & Quijano, 2012).

La ciencia moderna estudia los efectos beneficiosos de las plantas, quiere precisar, conjugar y catalogar las diversas propiedades, para agrupar a las plantas que los contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, plantear modificaciones estructurales en busca de mayor actividad biológica (Alvarado, 2012).

La familia *Malvaceae* subfamilia *Bombacoideae* presenta 16 géneros y 120 especies (Rodríguez et al., 2016). En el Ecuador está representada por 5 especies distribuidos en los bosques secos pluviestacionales (Aguirre, Tene, Aguiñaga, & Villegas, 2012).

En dicha familia se han reportado metabolitos secundarios como: saponinas, taninos, flavonoides, esteroides, entre otros, con actividad biológica antimicrobiana (Ramos Corrales, 2016). Otros autores reportan la presencia de fracciones activas, en las cortezas de *Amphipterygium adtrigens (Schltdl.)* y *Ceiba spp,* lográndose identificar el ácido 3α-

hidroximasticadienónico, mostrando efecto positivo en eliminación de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 y reducción de las lesiones producidas por daño térmico en un modelo de ratones, esto justica el uso tradicional para combatir infecciones (Muñoz-Cazares, 2013).

Compuestos químicos aislados (α y β amirina) a partir de *Eriotheca pubescens* presentan numerosas actividades biológicas como ansiolíticos, antidepresivos, anti-inflamatorios, hepatoprotectores y gastroprotectores (Machado, 2015).

Además, de esta misma especie *Eriotheca pubescens* se aisló el ácido 7-oxo-labda-8,13-dien-15-oico (un diterpenoide labdano) con actividad anti-inflamatoria, el ácido Δ13,14-ent-labd-8β-ol-15-oico que exhiben alta actividad antibacteriana y el ácido 4-hidroxibenzoico, demuestran que tiene actividad antimicrobiana, antimutagénica, hipoglucémico, antiviral, antioxidante (Machado, 2015).

Existen estudios preliminares de metabolitos secundarios presentes en el tubérculo *Eriotheca ruizzi,* en cuyos extractos metanólicos se han encontrado alcaloides, metilencetonas glicósidos cardiotónicos, cumarinas, taninos y polifenoles, de estos compuestos los polifenoles y tal vez alcaloides de naturaleza fenólica serían los responsables de actividad antifúngica y antibacteriana; en el mismo estudio utilizando *Artemia salina*, se pudo predecir actividades plaguicidas, pudiendo concluir que *Eriotheca ruizzi* tiene actividad farmacológica debido a su amplio rango de compuestos químicos.

Debido a lo antes mencionado y a que no existen reportes sobre el aislamiento de metabolitos secundarios de esta especie, consideramos importante llevar a efecto un estudio más detallado, que a la vez contribuya al aprovechamiento de recursos naturales locales, así como el ámbito fitoquímico de especies del bosque seco del Ecuador.

CAPÍTULO I

1.1. Fin, propósito y componentes del Proyecto

1.1.1. Fin del Proyecto

- ✓ Aportar con el aislamiento de nuevos metabolitos secundarios presentes en plantas nativas del bosque seco del Ecuador.

1.1.2. Propósito del Proyecto

- ✓ Realizar un estudio fitoquímico del tubérculo de la especie *Eriotheca ruizii*.

1.1.3. Componentes del Proyecto

- ✓ Selección, identificación y recolección de la especie *Eriotheca ruizii.*
- ✓ Obtención de extractos a partir de disolventes de polaridad ascendentes (hexano, acetato de etilo y metanol).
- ✓ Fraccionamiento de extractos obtenidos mediante cromatografía en columna.
- ✓ Aislamiento, purificación, caracterización e identificación de los metabolitos secundarios mediante CG-EM, RMN de ^{1}H y ^{13}C.

CAPÍTULO II ASPECTOS GENERALES

2.2. Aspectos Generales

2.2.1. Biodiversidad en el Ecuador

La Diversidad Biológica incluye la amplia variedad de seres vivos sobre la Tierra y los patrones naturales que la conforman, que son el resultado de miles de millones de años de evolución, es el resultado, tanto de procesos naturales como de las actividades de las sociedades humanas, incluyen conceptos tan amplios que van desde la variedad de ecosistemas hasta las diferencias genéticas dentro de una especie (Bravo, 2014).

Ecuador es un país privilegiado en términos de biodiversidad, a pesar de su tamaño pequeño forma parte de los que se conocen como países “megadiversos” (Bravo, 2014), significa que él cuenta con las más variadas formas de vida expresadas en su flora, fauna y microoganismos, en su diversidad genética y en una variedad de ecosistemas (Agudelo & Hoet, 2011).

Las razones son varias, pero las más importantes son la posición tropical (que genera un clima adecuado más o menos similar a lo largo del año), la presencia de los Andes y otras montañas (que genera una escalera en cuyos peldaños se encuentran muchas más formas de vida) y las corrientes marinas (que generan un clima seco en la parte litoral y las Galápagos, y muy húmedo en la parte sierra y oriente) (Golinelli, Vega-villa, & Villa-Romero, 2015).

Ecuador es la región con la tercera densidad más alta de especies de plantas endémicas en el mundo. Y este es un país con especies de plantas con la más alta actividad citotóxico contra las células cancerosas humanas se puede encontrar, en comparación con otros países con diversidad biológica similar. Otra característica importante de Ecuador es el conocimiento etnomédico de muchas comunidades indígenas (Bailon-Moscoso, Romero-Benavides, Tinitana-Imaicela, & Ostrosky-Wegman, 2015).

2.2.2. Medicina Tradicional y Natural

La medicina tradicional y Natural es conceptualizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como las prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades (WHO, 2005).

Esta ha desempeñado un papel importante en el tratamiento de diversas patologías, fundamentalmente en los países en desarrollo, el 80% de la población acude a este tipo de medicina, en las últimas décadas han alcanzado una presencia cada vez mayor debido al desarrollo científico de los fitomedicamentos y al mayor conocimiento de riesgo-beneficio de las fármacos sintéticos (Prieto, Garrido, González, & Molina, 2014).

2.2.3. Estudio Fitoquímico

La fitoquímica es una especialidad derivada de la Farmacognosia y está dedicada al estudio químico de las plantas. (Phillipson, 2007).

Estudia desde su estructura química molecular, hasta las propiedades biológicas de las plantas, y principios activos, estos compuestos pueden prevenir enfermedades letales con su cuantificación y análisis de los efectos beneficiosos y prejudiciales a la salud humana, mediante los métodos de obtención de esos componentes activos, su clasificación de acuerdo al grupo funcional químico orgánico a que pertenece y estudia los métodos analíticos para comprobar su calidad (Phillipson, 2007; Prashant, Bimlesh, & Harleen, 2011).

2.2.4. Metabolitos Secundarios

El metabolismo secundario implica procesos que son únicos para una planta, y no son universales. Ciertos metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies y cumplen una función específica. Se conoce que estas moléculas desempeñan un papel importante en la adaptación de las plantas a su entorno, ciertos flavonoides y compuestos fenólicos actúan como antioxidantes, capturando especies reactivas de oxígeno previniendo la oxidación celular. Otros, aparentemente suelen ser selectivamente tóxicos para células precancerosas reduciendo el riesgo de formación de carcinomas como es el caso de glucosinolatos, estos representan una importante fuente de productos farmacéuticos activos en los últimos 50 años han aumentado los estudios sobre metabolitos secundarios de plantas (Bourgaud, Gravot, Milesi, & Gontier, 2001; Miño & Jadán, 2007) Las cumarinas y los flavonoides muchos poseen actividad antitumoral (Bailon-Moscoso et al., 2015).

2.2.5. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico nos ayude a determinar cualitativamente la composición química de los metabolitos en las plantas. Son reacciones de coloración, las cuales son sensibles, reproducibles y de bajo costo. Algunos de los compuestos que podemos identificar son

ácidos grasos, azucares reductores, polisacáridos, saponinas, flavonoides, alcaloides, mucílagos y taninos; los resultados de las reacciones se reportan como (+) presencia y/o (-) ausencia del compuesto presente en la planta (Sharapin, 2000).

2.3. Descripción de las características de la familia y del género *Eriotheca.*

La taxonomía se ha descrito bajo revisión bibliográfica en donde nos menciona que en la antigua literatura a la familia *Bombacaceae* se la consideraba como una subfamilia bajo *Malvaceae.* Sin embargo, en la mayoría de los trabajos taxonómicos recientes, *Bombacaceae* ha sido tratada como una familia independiente de la orden *Malvales. Bombacaceae* difiere de *Malvaceae* en varios caracteres anatómicos y florales; siendo exclusivamente arborescente (árboles leñosos), que a menudo poseen un tronco espinoso, llevan anteras ditecal (bicompartimental) y en otras monotecal (una celda), siempre teniendo granos lisos de polen (Refaat et al., 2017).

El género *Eriotheca* fue creado por Schott y Endlicher (1832) basado en dos especies descritas originalmente en *Bombax* Schumann (1886) y Van den Brink (1924) rechazaron a *Eriotheca* y la trataron como un sinónimo de *Bombax*. No fue hasta Robyns (1963), que *Eriotheca* fue reconocido como un género distinto. Sin embargo el uso de evaluación rápida de genes permitió la inclusión de *Eriotheca* y otras especies por primera vez, aclarar las relaciones filogenéticas entre este género y otros taxones del núcleo *Bombacoideae* (Duarte et al., 2011). En Ecuador se han reportado para el género tres especies, distribuidas geográficamente en laderas y colinas de los bosques secos entre 0-1000 msnm, en provincias de Loja, El Oro, Guayas y Manabí(Aguirre et al., 2012).

Los usos de este género principalmente son usos maderables, y aunque medicinalmente se utiliza para curar cataratas y cicatrizar heridas (Aguirre et al., 2012), se reconocen 12 especies para uso medicinal (medicina humana y veterinaria) destinadas para curar afecciones de la piel, mal de ojo, ulceras, estreñimiento, dolor de muelas y purgante para animales (Balslev, Bush, Cleef, Lucero, & Sarmiento, 2006).

De este género se han aislado varios metabolitos secundarios cuatro triterpenoides α-amirina (**1**), β-amirina (**2**), lupenona (**3**), lupeol (**4**); dos diterpenoides ácido 7-oxo-labda-8,13-dien-15-oico (**5**), ácido $\Delta^{13,14}$-*ent*-labd-8*β*-ol-15-oico (**6**), cuatro ácidos carboxílicos aromáticos ácido *p*-hidroxibenzoico (**7**), ácido 3,4-diidroxibenzoico (**8**), ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (**9**), ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (**10**) y un flavonoide: quercetina (**11**) (Machado, 2015)**.**

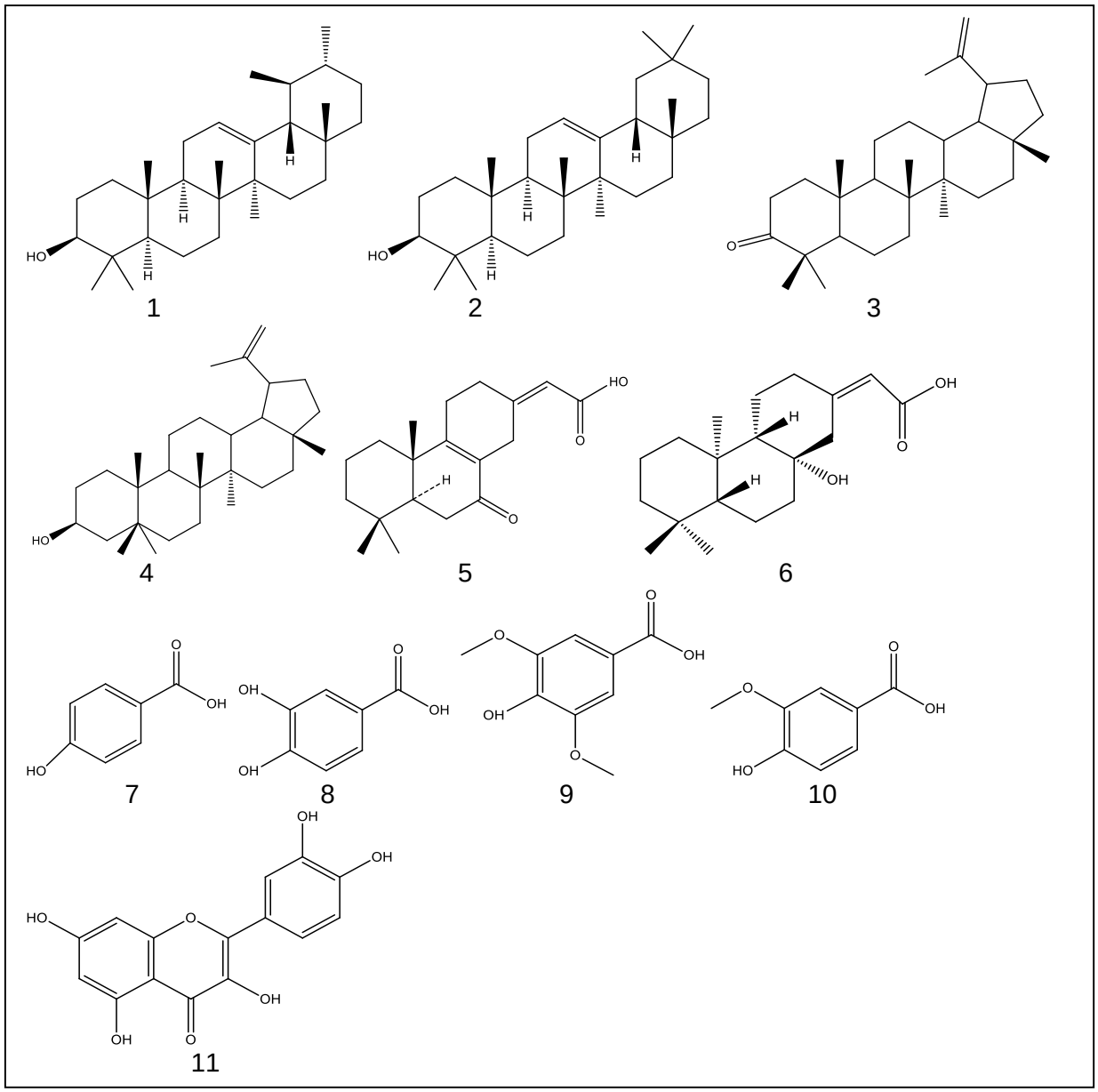


Figura 1. Estructuras de compuestos aislados del género *Eriotheca*
Fuente: Machado, 2015
Elaborado: Santos, M. 2017

2.3.1. Descripción de la especie *Eriotheca ruizii*

Eriotheca ruizzi (K. Schum) o Bombax ruizii (K. Schum), conocido por su nombre común como “pate”, “pati”, “ceiba”, “pasallo”, “pate colorado”. Es un árbol caducifolio, de hasta 15 m de alto, hojas digitadas o palmadamente compuestas, folíolos 5-7, 6 x 3.5-20 x 8.5 cm, aserrados, ápice caudado, más pálido y pubescente en la parte abaxial, peciólulos articulados en la base; flores en panículas laxas, flores cremas de 1.5-2.5 cm de largo, estambres 30-35; cápsula globosa, 1.7-3 cm de largo (Rodríguez, Alvítez, Pollack, Huamán, & Sagástegui, 2016).

Tabla 1 Taxonomía de *Eriotheca ruizii*

Reino:	Plantae	
Clase:	Equisetopsida C. Agarth	
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht	
Orden:	Malvales Juss	
Familia:	Bombacoideae	
Género:	*Eriotheca Schott & Endl*	
Especie:	*ruizii*	

Fuente: (Tropicos, n.d.)
Elaborado: Santos, M. 2017

Hasta el momento no hemos encontrado reportes de aislamiento e identificación de metabolitos secundarios en esta especie, en donde se realizó un tamizaje fitoquímico reportando la presencia de saponinas, metilencetonas, flavonoides, alcaloides, polifenoles, glucósidos cardiotónicos, se ha reportado que a partir de los extractos metanólicos presentó actividad antimicrobiana mostrando inhibición en tres cepas bacterias (*Staphylococcus. aureus, Pseudomonas. aeruginosa* y *Escherichia. coli*) trabajadas, también se evaluó la actividad antifúngica de los mismo presentando inhibición en *Candida albicans* (Pineda, 2015).

2.4. Algunas técnicas de aislamiento, identificación y caracterización de metabolitos secundarios.

2.4.1. Cromatografía

Esta técnica se basa en mantenerse una fase inmóvil o estacionaria y la otra (fase móvil) se pasa sobre ella, como se indicó anteriormente. La fase móvil puede ser un líquido o un gas; la fase estacionario puede ser un líquido o un sólido. Las cuatro combinaciones posibles son: líquido-solido, líquido- líquido, gas-sólido y gas-líquido (Sharma, 2007).

2.4.2. Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre la superficie plana. La muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie absorbente inerte (sílica, alúmina, etc.) distribuida uniformemente. Es una técnica importante ya que permite proporcionar información sobre la homogeneidad de

los componentes químicos del producto y garantizar que las sustancias responsables de la actividad biológica estén presentes (Spangenberg, Poole, & Weins, 2011).

2.4.3. Cromatografía en columna (CC)

En cromatografía en columna, la fase móvil es un líquido y éste desciende a través de la columna. La fase estacionaria es frecuentemente un líquido que recubre el interior del tubo capilar o la superficie de partículas sólidas empaquetadas dentro de la columna (Mallat & Barcelo, 1998).

Esta técnica se basa en hacer pasar la solución que contiene el compuesto que se quiere purificar a través de una columna en la que se ha situado una matriz solida porosa (resina, sílica, alúminas) que está inmersa en un solvente. Los diferentes componentes van interaccionando con la matriz de acuerdo a su carga, hidrofobicidad, tamaño o capacidad especifica de unirse a grupos químicos particulares según la matriz escogida. (Domínguez, 2016).

2.4.4. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas

En la cromatografía de gases se debe tener en cuenta la fase estacionaria, los cilindros, las trampas de gases y la correcta aplicación de los diferentes detectores, la muestra se volatiliza para luego ser inyectada en una columna de cromatografía, para ello, la muestra debe ser volátil y termoresistente. La elución se produce generalmente de los gases de tipo inerte como He, N_2, H_2 (Quirós, 2006).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que proporciona información tanto cualitativa (estructura) como cuantitativa (masa molecular o concentración), de las moléculas analizadas previamente convertidas en iones adquiriendo carga negativa o positiva, utilizando movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa/carga (Chocho, 2007).

Es así, que para la identificación de compuestos, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es más eficaz ya que permite una correcta separación de muestras complejas y la identificación de los diferentes compuestos a través de los índices de retención y los espectros de masas. Además es una técnica que muestra una alta sensibilidad (Quirós, 2006).

2.4.5. Resonancia nuclear magnética

Es el método espectroscópico con la cual podemos observar la estructura de una molécula que solo se puede diferenciar por la disposición de sus electrones, se utiliza para determinar los compuestos orgánicos por los núcleos que son magnéticamente activos como son los átomos ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P y ^{19}F, es decir poseen espín, igual que los electrones.(Valcárcel, González, & Valcárcel, 2017).

Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β, el espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra en una gráfica de frecuencias vs. Intensidad, que es llamado espectro. El termino resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia (o sea, a la misma frecuencia). Es decir, los núcleos pasas de un estado de espín a otro como respuesta a la radio frecuencia (**rf)** a la que son sometidos (Valcárcel et al., 2017).

2.4.6. Cristalización

La cristalización es un proceso natural pero también es una técnica que puede ocurrir a partir de una disolución de un sólido impuro en la menor cantidad posible del disolvente adecuado, en temperatura alta. En estas circunstancias se genera una disolución saturada que al enfriar se sobresatura que origina la cristalización. El proceso de cristalización es un proceso dinámico, de manera que las moléculas que están en la disolución están en equilibrio con las que forman parte de la red cristalina (Martínez, 2010).

2.4.7. Punto de fusión

El punto de fusión de un sólido se define como la temperatura a la cual la base sólida y liquida coexisten en el equilibro (Ramírez, Valencia, & Vivas, 2015), a medida que se aplica calor a un sólido, su temperatura aumentará hasta que se alcance el punto de fusión. La temperatura de fusión de los sólidos cristalinos es una figura característica y se usa para identificar compuestos y elementos puros. La mayoría de las mezclas y sólidos amorfos se funden en un rango de temperaturas (Encyclopaedia Britannica, 2016).

CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y métodos

En la figura 1 se muestra el esquema de la metodología que se utilizó para el trabajo investigativo.

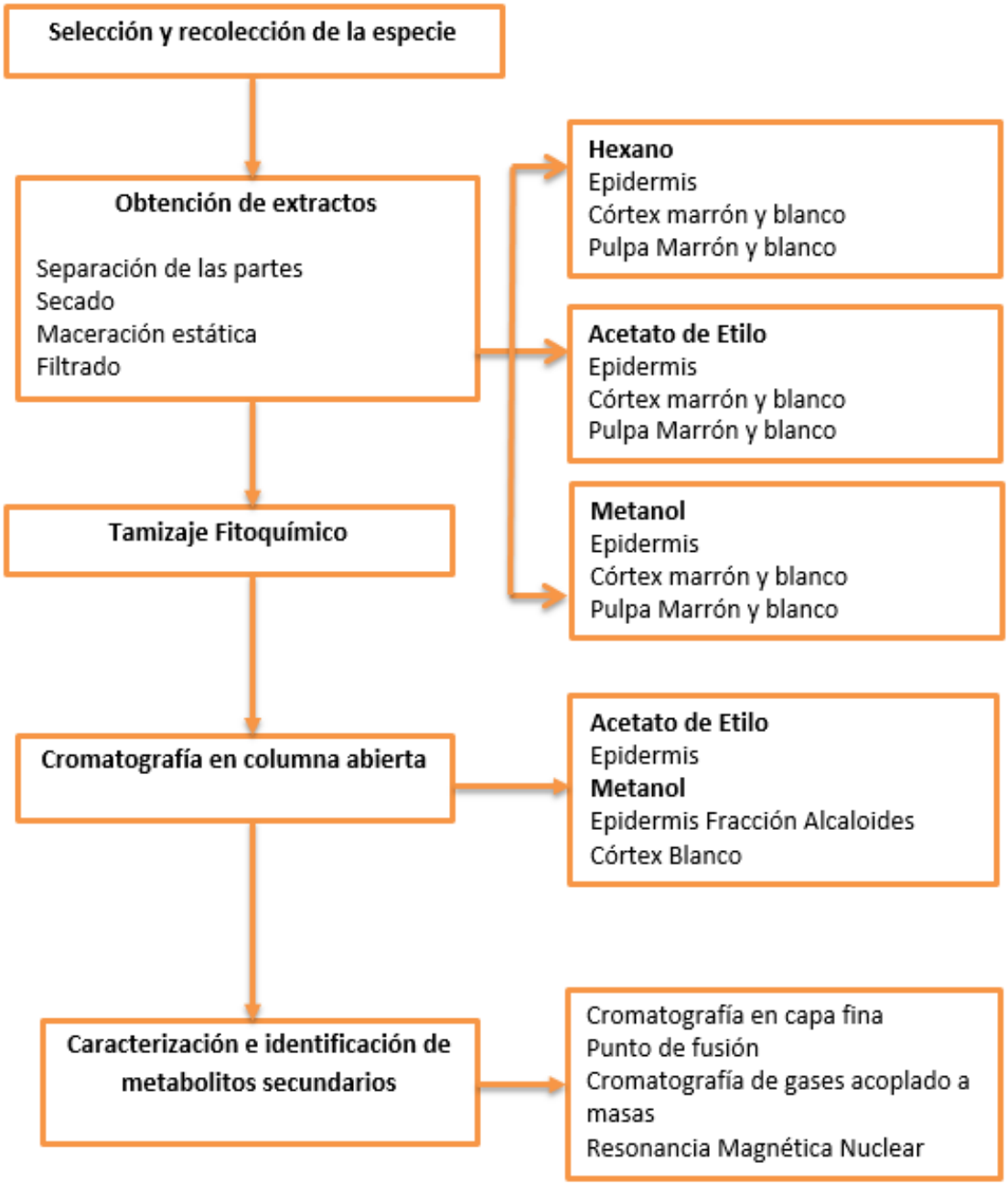


Figura 2 Esquema de los Métodos empleados en la Investigación
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

3.2. Selección y recolección de la materia vegetal

En base a la información bibliográfica se realizó la selección de la especie vegetal (tubérculo). La materia prima se recolectó en el bosque seco; entre octubre y diciembre del 2016, en el sector El Naranjo, parroquia Catacocha, cantón Paltas, provincia de Loja con coordenada 4º 01' 38.7 S, 79º 36' 38.5 W (Figura 3). Para la recolección e investigación se cuenta con el permiso MAE-DNB-CM-2015-0016 de acceso a recursos genéticos otorgado por el Ministerio del Ambiente (MAE) a la UTPL. Una vez identificada la especie por el Dr. Mario Ruiz y el Dr. Eduardo Jadán, se depositó una muestra en el herbario de la UTPL.

Figura 3. Mapa de lugar de la recolección del tubérculo *Eriotheca ruzii*
Fuente: Google Maps, 2018
Elaboración: Santos, M. 2017

3.3. Obtención de extractos

3.3.1. Maceración estática

37.14 kg de la especie (tubérculo), fueron segmentados en: epidermis, cortex blanco y marrón, pulpa blanca y marrón, debido a la maduración y las propiedades alelopáticas que presenta la planta (figura 4). Se lavó previamente la materia prima para eliminar cualquier tipo de impurezas que tenga y que pudieran interferir con el aislamiento, caracterización e identificación de los compuestos presentes.

Figura 4. Tubérculo de la especie Eriotheca ruizii y sus segmentaciones (1) epidermis, (2) córtex marrón y (3) cortex blanco; (4) pulpa marrón y (5) pulpa blanca.
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

Una vez finalizado el paso anterior, se colocó la materia vegetal en un cuarto de secado con flujo de aire constante a 37º C por 7 días con el fin de deshidratar las partes mencionadas.

Se llevó a maceración estática utilizando disolventes en polaridad ascendente: Hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) secuencialmente. La especie fue colocada en cinco recipientes, de los cuales contenían epidermis (matraz de 5 L), cortex marrón (frasco de vidrio de 4 L), cortex blanco (matraz de 5 L), pulpa blanca (frasco de vidrio de 6 L) y pulpa marrón (frasco de vidrio de 6 L) con sus respectivas etiquetas. Se agregó en total a los cinco recipientes aproximadamente 26 litros de cada disolvente, en relación 1:2; p/v hasta cubrir completamente la materia vegetal y se dejó reposar durante 72 horas (anexo 3), luego se procedió al filtrado y concentrado al vació en un rotaevaporador BUCHI R-210. Se realizaron tres extracciones con cada disolvente. Finalmente se pesó y etiquetó cada extracto (anexo 4).

El rendimiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$rendimiento\ \% = \frac{peso\ de\ extracto}{peso\ materia\ seca} * 100$$

Fórmula 1

Cada estructura morfológica se trabajó por separado debido a pequeñas diferencias en el perfil cromatográfico de los diferentes extractos.

3.4. Fraccionamiento de extractos

3.4.1. Montaje de columna

Al extracto de acetato de etilo- epidermis se lo fraccionó, mediante cromatografía en columna abierta (13.5 mm de diámetro y 55 cm de altura de cuerpo) y se trabajó 4 gramos de extracto, recolectando fracciones de 15 ml.

Para el extracto de metanol-cortex blanco se realizó el fraccionamiento en columna abierta (60 mm de diámetro y 100 cm de altura de cuerpo) y se trabajó 40 gramos de extracto, recolectando fracciones de 20 ml (anexo 5).

Para ambas columnas se utilizó sílica gel 60 (0.015 – 0.040 mm), la elución fue con Hex, AcOEt, MeOH, CH_2Cl_2, H_2O, así como también mezclas de los mismos, en una proporción 1:20 extracto: sílica, y se realizó cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones obtenidas.

3.4.2. Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de aluminio cubiertas de sílica gel 60 y también placas fase inversa C18, la visualización se realizó en luz UV 254 y 365 nm, cada placa fue revelada con ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

3.4.3. Unión y purificación

Para realizar la unión se tomó en cuenta la similitud en el perfil cromatográfico de cada fracción, el Rf de las manchas en la placa de cromatografía en capa fina que se observaron en la luz UV a 254 y 365 nm y la similitud visual del revelador utilizando ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

La purificación de cada compuesto se hizo en basa al grado de solubilidad que presentaba frente a cada disolvente utilizando el que fuera más adecuado para realizar el lavado, y en otros casos se utilizaron microcolumnas.

3.4.4. Microcolumna

Para el fraccionamiento en microcolumna se utilizó sílica gel 60 de tamaño de partículas de 0.015 - 0.040 mm y 0.063 – 0.200 mm. Se realizó cromatografía en capa fina de cada uno de éstas, se unieron las fracciones que presentaban similitud en el perfil cromatográfico. Las condiciones para cada microcolumna se describen la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para montaje de microcolumna de las fracciones obtenidas de cromatografía en columna

Condiciones de elución de cromatografía en columna abierta						
Extracto	Peso extracto	Relación extracto: Sílica	Dimensiones		Polaridades	Volumen separación
			Diámetro (mm)	Altura (cm)		
Er-AcOEt-Ep4	200	1:100	65	50	Hex: AcOEt 8:2	3
Er-AcOEt-EP6	60	1:200	25	35	CH_2Cl_2:MeOH 98:2	3
Er-AcOEt-EP12	2020	1:25	65	50	CH_2Cl_2:MeOH 99:1 98:2 96:4 90:10	7.5

					85:15 80: 20 70:30 100 MeOH	
ALC-Er-EP	480	1:200	25	35	100 CH_2Cl_2	2.5
Er-MeOH-CB1	185	1:200	15	35	AcOEt: MeOH 95: 5 AcOEt:MeOH:H_2O 90: 8: 2 85: 13: 2 80: 15: 5 70: 25: 5 60: 35: 5 55: 40 : 5 100 MeOH	3.5
Er-MeOH-CB3	179	1:200	20	35	AcOEt:MeOH:H_2O 80: 20: 0.2 75: 25: 0.2 70: 30: 0.2 65: 35: 0.2 60: 40: 0.5 50:40: 0.5 100 MeOH	3
Er-MeOH-CB19	456.7	1:200	25	35	AcOEt:MeOH: H_2O 82: 13: 5 77: 18: 5 50: 45: 5 100 MeOH	3
Er-MeOH-CB20	378.9	1:200	25	35	$CHCl_3$:MeOH:H_2O: Cl_2O_2 90:20:0.2:0.1	3

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

3.4.5. Tamizaje fitoquímico

Basado en la metodología de Mandal, Mandal, & Das, 2015; Miranda & Cuellar, 2001. Se colocó una alícuota significativa de los extractos obtenidos de cada una de las siguientes estructuras morfológicas en tubos de ensayo individuales en los cuales se agregó 15 ml de metanol, mezclando hasta homogenizar. Se distribuyó 1 ml de esta mezcla a un tubo de ensayo para realizar los siguientes ensayos:

Determinación de proteínas (Ensayo de Ninhidrina): Se agregó dos gotas de una solución de ninhídrina al 2% al extracto. Una coloración púrpura-azul indica la presencia de aminoácidos. Se utilizó como estándar el ácido glutámico.

Determinación de carbohidratos – azucares reductores (Ensayo de Fehling): Se adicionó 1ml de Fehling A y 1ml de Fehling B, luego se calentó de 5-10 min (cerca del punto de ebullición si es necesario). El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado. Como estándar se utilizó fructosa.

Determinación de grasas (Ensayo de Sudán): Se adicionó 1 ml de una solución diluida en agua del colorante Sudán III o Sudán IV. Luego se calentó en baño de agua hasta evaporación del disolvente. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayo. Se utilizó como estándar la glicerina.

Determinación de alcaloides (Ensayo de Wagner y Dragendorff):

Ensayo de Wagner: Se adicionó a la muestra una gota de ácido clorhídrico concentrado (calentamiento suave y se dejó enfriar), posterior a ello se agregó unas gotas de reactivo de Wagner. Se considera positiva la prueba si se observa opalescencia (+), turbidez (++)**,** precitado coposo (+++).

Ensayo de Dragendorff: se adicionó a la muestra una gota de ácido clorhídrico concentrado (calentar suavemente y dejar enfriar), luego se agregó unas gotas del reactivo de Dragendorff. Se considera positiva la si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++). Se utilizó como estándar la cafeína.

Determinación de terpenos- esteroides (Ensayo de Lieberman Burchard): Se disolvió la alícuota del extracto seco con 1 ml de cloroformo, luego se adiciono 1ml de anhídrido acético y se mezcló bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar 2-3 gotas de

ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- Rosado- azul muy rápido
- Verde intenso-visible aunque rápido
- Verde oscuro-negro-final de la reacción

Como estándar se utilizó Argentatina A (triterpeno de tipo cicloartano)

Determinación de Flavonoides (Ensayo de Shinoda): Se diluyó con 1ml de HCl concentrado un pedazo de cinta de magnesio metálico, después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 ml de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta que se separen. El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja marrón o rojo intensos en todos los casos. Fue utilizada hesperidina como estándar

Determinación de Saponinas (Ensayo de espuma): A la muestra que se solubilizó en metanol se procedió a diluirla cinco veces su volumen con agua destilada, luego se agitó la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persiste por más de 2 minutos. Se utilizó como estándar papa.

Determinación de Quininas (Ensayo de Borntragen): a cada muestra se colocó 1 ml de cloroformo, se adicionó 1 ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoniaco al 5% en agua. Se agitó mezclando las fases y se dejó en reposo hasta su separación, si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, el ensayo se considera positivo. Coloración rosado (++), coloración rojo (+++). El estándar utilizado fue hidroquinona.

Determinación de Taninos- Fenoles (Ensayo de Cloruro Férrico): A la muestra se le adicionó 3 gotas de una solución de hidróxido férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,9% en agua).

Un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.

Desarrollo de una coloración verde intensos, taninos de tipo pirocatecólicos.

Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalatánicos.

El estándar utilizado fue Vainillina 1%

3.4.6. Extracción de alcaloides

Inicialmente para confirmar la presencia de alcaloides en los extractos metanólicos de todas las partes (epidermis, cortex marrón y blanco, pulpa marrón y blanca) se realizó una prueba de Dragendorff en placas de CCF, la presencia de machas de color naranja oscuro es indicativo de la presencia de alcaloides.

La metodología aplicada fue la descrita por Games et al., 1974 al extracto se adicionó 2 ml de ácido sulfúrico 1 M, a la solución ácida se adicionó CH_2Cl_2 para remover trazas de grasas, luego se ajustó a pH 8 la fase acuosa con bicarbonato de sodio y se extrajo con CH_2Cl_2 para dar la fracción metanólica que contiene los alcaloides libres, a la fase restante se reacidificó a pH 11 con ácido clorhídrico y se refluyó a 60 – 70 º C por 3 horas con lo que se logra hidrolizar los alcaloides, a la fase acuosa reflujada se reajustó a pH 8 con bicarbonato de sodio y extrajo con CH_2Cl_2 (3x100ml) que contiene la fracción liberada de alcaloides.

3.5. Caracterización de metabolitos secundarios

3.5.1. Punto de fusión

Para determinar el punto de fusión de los compuestos aislados se utilizó el equipo Fisher Johns.

3.5.2. Factor de retención

Se determinó el factor de retención de cada uno de los compuestos aislados. La relación que expresa la distancia recorrida de la muestra (punto de siembra) y la distancia recorrida por el solvente.

$$Rf = \frac{Distancia\ recorrida\ (muestra)}{Distancia\ recorrida\ (solvente)}$$

Fórmula 2

3.5.3. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (CG/EM).

Para determinar los espectros de masa se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Techonologies 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert) y una columna cromatográfica capilar DB-5MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano) un inyector automático split/ splitles serie 7683. Para la identificación de los compuestos se

emplearon las bases de datos de Wiley 7n.I y espectral data base for organic compounds SDBS. Las condiciones de operación del equipo se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de operación de equipo CG/EM

Columna capilar: Agilent 122-5562 DB-5ms, 0.25mm* 30 m* 0.25µm	
COLUMNA	Temperatura máxima: 350 º C
	Flujo constante Flujo inicial 1.0 ml/min
	Presión inicial: 52.66 kPa
	Velocidad promedio: 36 cm/s
	Presión de salida: vacío
INYECTOR en modo splitless	Temperatura inicial: 250 º C
	Gas: Helio
DETECTOR	Temperatura: 250 º C
	Gas: Helio
HORNO	Temperatura inicial: 50 º C
	Temperatura final: 270 º C
	Gradiente de temperatura de 3 º C/min

Fuente: Laboratorio de análisis químico e instrumental de la UTPL
Elaborado: Santos, M. 2017

3.5.4. Espectroscopia de Resonancia Nuclear Magnética (RMN)

Para obtener los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C, se utilizó un equipo de resonancia magnética nuclear Varian 400 MHz-Premium Schelded, las muestras fueron analizadas a 400 MHz y 100 MHz respectivamente, para la lectura de las muestras se realizó una disolución de la misma empleando disolventes deuterados adecuados como $CDCl_3$ y CD_3OD.

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión

4.1.1. Rendimiento de los extractos obtenidos

Los rendimientos y otras características de los extractos obtenidos a partir de 6.12 Kg materia vegetal seca, distribuidos en epidermis 1.06 kg, cortex marrón 2.25 kg, cortex blanco 0.71 kg, pulpa marrón 1.94 kg y pulpa blanca 0.16, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Rendimientos, peso y características de los extractos obtenidos de las diferentes estructuras morfológicas de *E. ruizii*.

Parte morfológica usada	Disolvente	Código	Peso (kg)	Rendimiento (%)	Apariencia física
Epidermis	Hexano	Er_Hex_EP	0.72	0.07	Semisólido Amarillo
	AcOEt	Er_AcOEt_EP	6.61	0.62	Semisólido Café
	Metanol	Er_MeOH_EP	108.13	10.20	Sólido marrón
Cortex marrón	Hexano	Er_Hex_CM	3.77	0.17	Semisólido Amarillo
	AcOEt	Er_AcOEt_CM	5.10	0.25	Semisólido Café
	Metanol	Er_MeOH_CM	280.13	12.45	Sólido marrón
Cortex Blanco	Hexano	Er_Hex_CB	1.41	0.20	Semisólido Amarillo
	AcOEt	Er_AcOEt_CB	7.10	1.00	Semisólido Café
	Metanol	Er_MeOH_CB	166.1	23.45	Sólido marrón
Pulpa Marrón	Hexano	Er_Hex_PM	5.95	0.31	Líquido Amarillo
	AcOEt	Er_AcOEt_PM	4.97	0.26	Semisólido Café
	Metanol	Er_MeOH_PM	450.65	23.19	Sólido marrón
Pulpa Blanca	Hexano	Er_Hex_PB	2.34	1.44	Líquido Amarillo
	AcOEt	Er_AcOEt_PB	5.75	3.55	Semisólido Café
	Metanol	Er_MeOH_PB	109.51	68.44	Sólido marrón

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

Los extracto metanólicos de cada una de las estructuras morfológicas utilizadas fueron los de mayor rendimiento, mientras que los extractos con menor rendimiento fueron los de hexano; de los extractos metanólicos el de mayor rendimiento fue el extracto pulpa blanca con 68.44%, y en cambio de los extractos de hexano el de menor rendimiento fue el de epidermis con 0.07%. Comparando el porcentaje de rendimiento observamos variación,

sabiendo que el metanol es un disolvente que va arrastrar mayoritariamente compuestos polares, se puede decir que el tubérculo de la especie *Eriotheca ruizii* contiene una gran cantidad de compuestos polares, a diferencia de compuestos medianamente polares y apolares que van hacer arrastrados por acetato de etilo y hexano respectivamente.

Debido a la diferencia en el perfil cromatográfico de cada de las estructuras morfológicas empleadas se trabajaron los extractos por separado. En la figura 5 se pueden observar el perfil cromatográfico de los extractos en CCF.

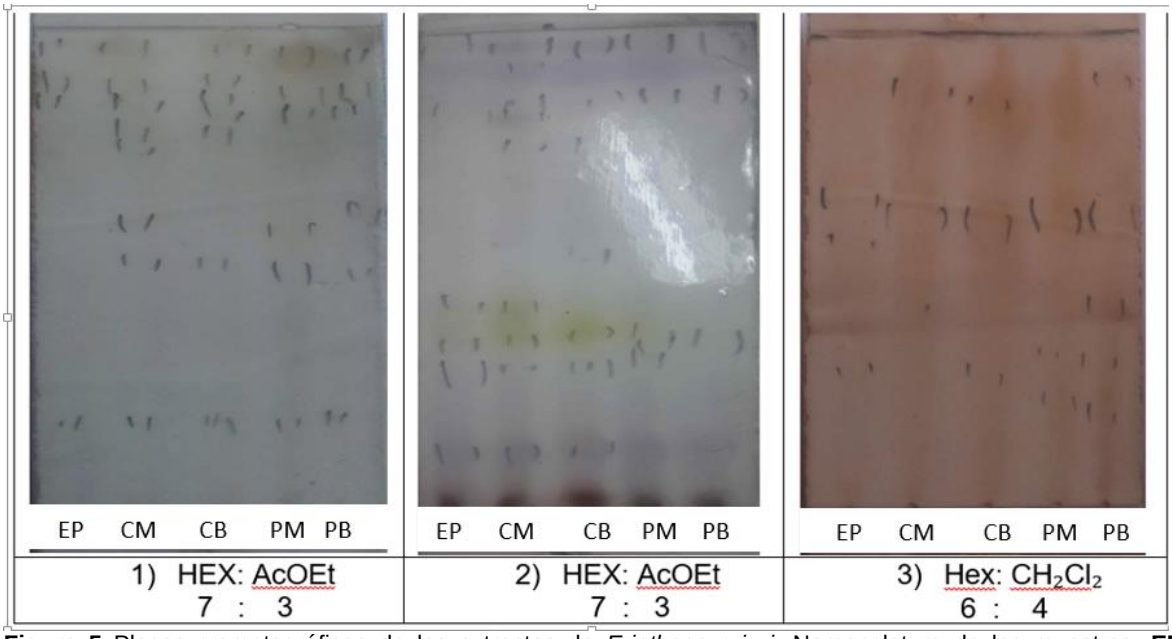


Figura 5 Placas cromatográficas de los extractos de *Eriotheca ruizzi* .Nomenclatura de las muestras: **EP** (epidermis), **CM** (cortex marón), **CB** (cortex blanco), **PM** (pulpa marrón), **PB** (pulpa blanca). 1) corresponde al extracto hexano; 2) corresponde al extracto acetato de etilo; 3) corresponde al extracto de metanol.
Fuente: Santos, M. 2017
Elaborado: Santos, M. 2017

4.2. Tamizaje fitoquímico

Con el fin de valorar la presencia de compuestos químicos en los extractos, se realizó el tamizaje fitoquímico preliminar. En la tabla 5 se muestran los resultados de los ensayos realizados a las diferentes estructuras morfológicas del tubérculo empleadas. Se puede observar como similitud la ausencia de proteínas, pero muestran diferentes fito-constituyentes, como: alcaloides, terpenos, flavonoides, quinonas y taninos principalmente en los extractos acetato de etilo y metanol de cada una de las partes del tubérculo. Estudios previos confirman que el género *Eriotheca* presenta diversos constituyentes químicos como alcaloides, flavonoides, cumarinas, metilcetonas, glicosidos cardiotónicos en los extractos metanólicos (Pineda, 2015), la familia *Bombacaceae* también se caracteriza por la

presencia de alcaloides, flavonoides, taninos en cantidades mayoritarias y también la presencia de esteroides o triterpenoides en extractos acuosos y etanólicos (González, Ayala, & Gutiérrez, 2006; Moreno & Jaramillo, 2017; Orantes, 2008).

Tabla 5. Resultados de Tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos de las diferentes estructuras morfológicas del tubérculo *E. ruizii.*

Muestra y Código	Proteínas	Carbohidratos	Grasas	Alcaloides	Terpenos	Flavonoides	Saponinas	Quinonas	Taninos
EPIDERMIS									
Hexano (Er_Hex_EP)	-	-	++	+	+	-	-	-	-
AcOEt (Er_AcOEt_EP)	-	-	+	++	+	+	-	+	+
MeOH (Er_MeOH_EP)	-	-	-	++	-	+	+	++	+
CORTEX MARRÓN									
Hexano (Er_Hex_CM)	-	-	++	+	-	-	-	-	-
AcOEt (Er_AcOEt_CM)	-	+	+	++	+	+	-	++	+
MeOH (Er_MeOH_CM)	-	+	-	++	-	+	+	++	+
CORTEX BLANCO									
Hexano (Er_Hex_CB)	-	-	++	-	+	-	-	-	-
AcOEt (Er_AcOEt_CB)	-	+	+	++	+	+	-	++	+
MeOH (Er_MeOH_CB)	-	+	-	++	-	+	-	++	+

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

++: Fuertemente positivo; **+**: positivo; **-**: ausente

Tabla 5. Resultados de Tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos de las diferentes estructuras morfológicas de *E. ruizii* (continuación)

PULPA MARRÓN									
Hexano (Er_Hex_PM)	-	-	++	+	-	-	-	-	-
AcOEt (Er_AcOEt_PM)	-	-	+	++	-	-	+	+	+
MeOH (Er_MeOH_PM)	-	+	-	++	+	+	+	++	+
PULPA BLANCA									
Hexano (Er_Hex_PB)	-	-	++	+	-	-	-	-	-
AcOEt (Er_AcOEt_PB)	-	-	+	++	+	-	-	-	-
MeOH (Er_MeOH_PB)	-	+	-	++	-	+	+	++	+
Extracto acuoso									
Epidermis	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Corteza	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Pulpa	-	+	-	+	+	+	+	+	+

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

++: Fuertemente positivo; **+**: Positivo; **-**: ausente

4.3. Actividad Biológica

Una vez observado el perfil cromatográfico de los extractos, se evaluó su capacidad inhibitoria en células cáncer humano (citotoxicidad) (Datos proporcionados por la Dra. Natalia Bailón del Departamento de Ciencias de la Salud de la UTPL) para poder direccionar la investigación hacia el aislamiento de metabolitos secundarios de los extractos más activos. Cabe mencionar que a los extractos de Hexano no se probaron debido a problemas de solubilidad.

El extracto de acetato de etilo de la epidermis (Er_AcOEt_EP) mostró 89.61 ± 0.09 % de inhibición, en la línea PC-3 (cáncer de próstata); 68.59 ± 2.65 para la línea A-549 (cáncer de pulmón) y 60,52 ± 1,11 para la línea RKO (cáncer de colon rectal).

Seguido del extracto metanólico de cortex blanco (Er_MeOH_CB) con 55.03 ± 3.18 % y cortex marrón 41,22 ± 5,29 % en la línea celular PC-3.

Algunos estudios para *Eriotheca* evalúan *in vitro* fracciones de acetato de etilo obtenidas por partición líquido - líquido frente a catepsinas K, L y V mostrando un inhibición superior a estas enzimas con 58%, 91%, 94% respectivamente y en la fracción metanol/ agua 40% 46% y 50% (Machado, 2015); estudios indican que catepsina K está asociada con un mayor potencial invasivo a progreso de cáncer de próstata y mama (Lecaille, Brömme, & Lalmanach, 2008); catepsina L es regulada en varios tipos de células de cáncer y metafase tumoral (Lankelma et al., 2010); catepsina V ha sido considera un marcador potencial del diagnóstico de tumores de colon, carcinomas de mama (Priscila Severino, Cezar Vieira, & Fapesp, 2008). Además muestra que poseen actividad letal o citotoxicidad en los extractos metanólicos contra el crustáceo *Artemia salina* aplicando diferentes lapsos de tiempo y concentraciones, existe una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *Artemia* y la citotoxicidad frente a las células cancerígenas (Pineda, 2015),

En la familia se ha encontrado especies como, *Chorisia insignis Kunth*, cuyo extracto metanólico tuvo un porcentaje de citotoxicidad de 37.5% en la línea celular cáncer de colon (HCT-116) (Moustafa, Menshawi, Wassel, Mahmoud, & Mounier, 2014). Así mismo los extractos de dietil éter y petróleo ligero de flores de *Bombax ceiba* se mostraron la mayor actividad anti-proliferativa contra el adenocarcinoma renal humano (ACHN) y para cáncer de pulmón (A-549) de una manera dependiente de la concentración (Tundis, Rashed, Said, Menichini, & Loizzo, 2014). Además para el extracto metanólico de hojas de

Bombax malabaricum (MEBM) se confirmó su actividad antiinflamatoria en dosis de 100, 200 y 400 mg/kg ya que redujo significativamente el edema de la pata de una rata inducido por carragenina, observando a su vez que no era tóxico hasta una dosis de 2 g/kg (Hossain et al., 2013). Además MEBM evidenció actividad anti-inflamatoria significativa en Pirexia inducida por levadura de *Baker*, la máxima actividad ocurrió a las 6 h, lo que indica lento pero absorción constante, el extracto era dependiente de la dosis, con mayor dosis produce una mayor actividad. (Hossain, Mandal, & Gupta, 2011).

4.4. Aislamiento, caracterización e identificación de metabolitos secundarios en *Eriotheca ruizii.*

4.4.1. Extracto de acetato de etilo – epidermis

Para el fraccionamiento del extracto, mediante cromatografía en columna se tomó 4g del mismo, se recolectaron 141 separaciones con un volumen de 15 ml cada una, las cuales se unieron de acuerdo a la similitud que presentaron en el perfil cromatográfico. En la tabla 6 se muestran las 12 fracciones resultantes con sus características.

Tabla 6. Fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo de epidermis de *E. ruizii*.

Fracción	Separación	Polaridad	Apariencia	Peso (mg)
Er-AcOEt-EP1	1-11	Hex:AcOEt 9:1	Semisólido amarillo verdoso	40
Er-AcOEt-EP2	12-22	Hex:AcOEt 9:1	Sólido blanco	60
Er-AcOEt-EP3	23-33	Hex:AcOEt 8.5:1.5	Sólido amarillo	60
Er-AcOEt-EP4	**34-46**	**Hex:AcOEt 8:2**	**Sólido amarillo verdoso**	**200**
Er-AcOEt-EP5	47-59	Hex:AcOEt 8:2	Sólido amarillo	40
Er-AcOEt-EP6	**60-92**	**Hex:AcOEt 7.5:2.5**	**Sólido café**	**60**
Er-AcOEt-EP7	93-108	Hex:AcOEt 7:3	Sólido amarillo	20
Er-AcOEt-EP8	109-122	Hex:AcOEt 6:4	Sólido amarillo	20
Er-AcOEt-EP9	123-130	Hex:AcOEt 6:4	Sólido café	20
Er-AcOEt-EP10	131-139	Hex:AcOEt 1:1	Sólido café	10

Er-AcOEt-EP11	140	AcOEt 100	Semisólido marrón	120
Er-AcOEt-EP12	**141**	**MeOH 100**	**Semisólido marrón**	**2020**

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

Se trabajó las fracciones con mayor peso y que estaban más puras, estas fueron: Er-AcOEt-EP4; Er-AcOEt-EP6; Er-AcOEt-EP12.

4.4.1.1. Fracción Er-AcOEt-EP4

De la columna del extracto de acetato de etilo-epidermis Er-AcOEt-EP, se obtuvo 200mg de la fracción Er-AcOEt-EP4 a ésta se la trabajó en una microcolumna en condición isocrática, con polaridad 8:2 hexano: acetato de etilo, se recolectaron 90 separaciones con un volumen de 5 ml cada una, se unieron de acuerdo a la similitud en el perfil cromatográfico resultando 9 fracciones (Er-AcOEt-EP4-F1 a Er-AcOEt-EP4-F9). Las fracciones y sus características se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Unión de las fracciones de Er-AcOEt-EP4 de la columna del extracto acetato de etilo-epidermis de *E. ruizii.*

Fracción	Separación	Apariencia	Peso (mg)
Er-AcOEt-EP4-F1	**1 – 9**	**Sólido blanco**	**8.3**
Er-AcOEt-EP4-F2	10 – 23	Sólido blanco	2.3
Er-AcOEt-EP4-F3	24 – 33	Sólido blanco	15.5
Er-AcOEt-EP4-F4	**34 – 44**	**Sólido blanco**	**7.7**
Er-AcOEt-EP4-F5	45 – 52	Sólido blanco	3
Er-AcOEt-EP4-F6	53 – 57	Polvo amarillo	5.4
Er-AcOEt-EP4-F7	58 – 64	Polvo amarillento	4.3
Er-AcOEt-EP4-F8	65 – 90	Polvo amarillento	57.6
Er-AcOEt-EP4-F9	Lavado	Sólido amarillento	47.8

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.1.1.1. Fracción Er_AcOEt_Ep_F4F1F1

De la fracción Er_AcOEt_Ep_Fr4F1, se aisló la fracción identificada como Er_AcOEt_Ep_Fr4F1F1 (figura 6), obteniendo 2 mg de un polvo blanquecino de solubilidad en CH_2Cl_2, Rf de 0.51 en una polaridad 95:5 Hex: AcOEt y punto de fusión 50 – 52 °C.

Figura 6. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_Fr4F1F1, polaridad 95:5 Hex: AcOEt
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.1.1.2. Fracción Er_AcOEt_Ep_Fr4F3F1

A partir de Er_AcOet_Ep_Fr4F3, se obtuvo fracción identificada como Er_AcOEt_Ep_Fr4F3F1 (figura 7), se aisló 1 mg un polvo blanquecino, soluble en CH_2Cl_2, presentó un Rf de 0.68 en polaridad CH_2Cl_2: MeOH 98: 2 y punto de fusión >300 °C.

Figura 7. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_Fr4F3, en luz de 365 nm, polaridad CH_2Cl_2: MeOH 98: 2
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.1.2. Fracción Er-AcOEt-EP6

Se realizó una microcolumna en condiciones isocráticas a partir de la fracción Er-AcOEt-EP6, en polaridad 98:2 CH_2Cl_2: MeOH, se recolectaron 151 separaciones con un volumen de 3 ml cada una, las fracciones con el mismo perfil cromatográfico se unieron obteniéndose 8 fracciones (Er-AcOEt-EP6-F1 a Er-AcOEt-EP6-F8). En la tabla 8 se describe las fracciones, separaciones, apariencia y peso.

Tabla 8. Unión de las fracciones de Er-AcOEt-EP6 de la columna del extracto acetato de etilo-epidermis de *E. ruizii.*

Fracción	Separación	Apariencia	Peso (mg)
Er-AcOEt-EP6-F1	**1- 25**	**Polvo transparente**	**6.3**
Er-AcOEt-EP6-F2	26 – 49	Polvo transparente	0.7
Er-AcOEt-EP6-F3	50 – 68	Polvo Transparente	1
Er-AcOEt-EP6-F4	69 – 70	Polvo Transparente	1.2
Er-AcOEt-EP6-F5	71 – 91	polvo amarillento	5.7
Er-AcOEt-EP6-F6	92 – 102	Polvo amarillento	5.3
Er-AcOEt-EP6-F7	**103 – 151**	**Polvo amarillo**	**13.8**
Er-AcOEt-EP6-F8	Lavado	Polvo café	18.9

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.1.2.1. Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F1F1

Se aisló la fracción identificada como Er_AcOEt_EP_F6F1F1, se obtuvo 1.8 mg de polvo blanquecino, soluble en CH_2Cl_2, con Rf de 0.34 en polaridad de elusión Hex: AcOEt 95:5 y punto de fusión de 60-65 °C (figura 8).

Figura 8. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F1F, polaridad de elución: Hex: AcOEt 95:5.
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.1.2.2. Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F1F2

Se aisló la fracción identificada como Er_AcOEt_EP_F6F1F2, obteniendo 0.7 mg de polvo transparente, soluble en CH_2Cl_2, con Rf de 0.39 en la CCF eluída en Hex: AcOEt 95: 5 y punto de fusión 75 – 79°C (figura 9).

Figura 9. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F1F2, polaridad de elución: Hex: AcOEt 95: 5
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.1.2.3. Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F7

De la fracción identificada como Er_AcOEt_EP_F6F7, obteniendo 3.7mg de polvo blanquecino, soluble en CH_2Cl_2 y CH_3Cl, con Rf de 0.58 en CCF eluída en Hex: AcOEt 95:5 y punto de fusión de 65 – 69 °C (figura 10).

Figura 10. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F6F7, polaridad de elución: 95:5 Hex: AcOEt.
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

La fracción fue analizada en CG/EM y se obtuvo una mezcla de 3 compuestos, con tiempo de retención de 29.71; 32.54; 33.29 minutos (Anexo 4). Los mismos que se compararon con la base de datos WILEY 7 n.l, pero no se pudieron identificar.

4.4.1.3. Fracción Er-AcOEt-EP12

Se realizó una microcolumna según gradiente creciente de fuerza eluotrópica a partir de la fracción Er-AcOEt-EP12, se recolectaron 430 separaciones con un volumen de 3 ml cada una, las fracciones con el mismo perfil cromatográfico se unieron obteniéndose 14 fracciones (Er-AcOEt-EP12-F1 a Er-AcOEt-EP12-F14). En la tabla 9 se describe la fracción, separaciones, polaridad, apariencia y peso.

Tabla 9. Fracciones obtenidas de la fracción Er-AcOEt-EP12 de la columna del extracto acetato de etilo-epidermis de *E. ruizii.*

Fracción	Separación	Polaridad	Apariencia	Peso (mg)
Er-AcOEt-EP12-F1	**1 – 70**	**CH_2Cl_2:MeOH 99:1**	**polvo transparente**	**27.1**
Er-AcOEt-EP12-F2	71 – 85	CH_2Cl_2:MeOH 99:1	polvo transparente	4.4
Er-AcOEt-EP12-F3	86 – 91	CH_2Cl_2:MeOH 98:2	polvo transparente	4.4
Er-AcOEt-EP12-F4	92 – 113	CH_2Cl_2:MeOH 98:2	Semisólido transparente	5.9
Er-AcOEt-EP12-F5	114 – 123	CH_2Cl_2:MeOH 96:4	Semisólido amarillento	7.4
Er-AcOEt-EP12-F6	**124 – 148**	**CH_2Cl_2:MeOH 96:4**	**Polvo amarillento**	**46.4**
Er-AcOEt-EP12-F7	149 – 158	CH_2Cl_2:MeOH 90:10	Polvo amarillento	11.9
Er-AcOEt-EP12-F8	159 – 191	CH_2Cl_2:MeOH 90:10	Polvo blanco	37.3
Er-AcOEt-EP12-F9	192 – 224	CH_2Cl_2:MeOH 85:15	Polvo blanco	15.9
Er-AcOEt-EP12-F10	225 – 260	CH_2Cl_2:MeOH 85:15	Polvo amarillento	13.9
Er-AcOEt-EP12-F11	261 – 336	CH_2Cl_2:MeOH 80: 20	Cristales marón	20.7
Er-AcOEt-EP12-F12	337 – 392	CH_2Cl_2:MeOH 80: 20	Polvo marrón	16.8
Er-AcOEt-EP12-F13	393 – 430	CH_2Cl_2:MeOH 70:30	Polvo café	10.6

Er-AcOEt-EP12-F14	Lavado	100 MeOH	Polvo café	568.5

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.1.3.1. Fracción Er_AcOEt_Ep_F12F1

Se aisló la fracción identificada como Er_AcOEt_EP_F12F1 obteniendo 1mg de polvo blanquecino, con soluble en CH_2Cl_2, con Rf de 0.8 en polaridad de elusión CH_2Cl_2:MeOH 98:2 y punto de fusión de >300°C (figura 11).

Figura 11. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F12F1, eludía en CH_2Cl_2:MeOH 98:2, en luz de 365 nm.
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.1.3.2. Fracción Er_AcOEt_Ep_F12F6F7

Se aisló la fracción identificada como Er_AcOEt_EP_F12F6F7, obteniendo 1mg de polvo blanquecino, soluble en CH_2Cl_2/MeOH, con Rf de 0.65 en CCF polaridad de elusión Hex: AcOEt 95:5 y punto de fusión >300°C (figura 12).

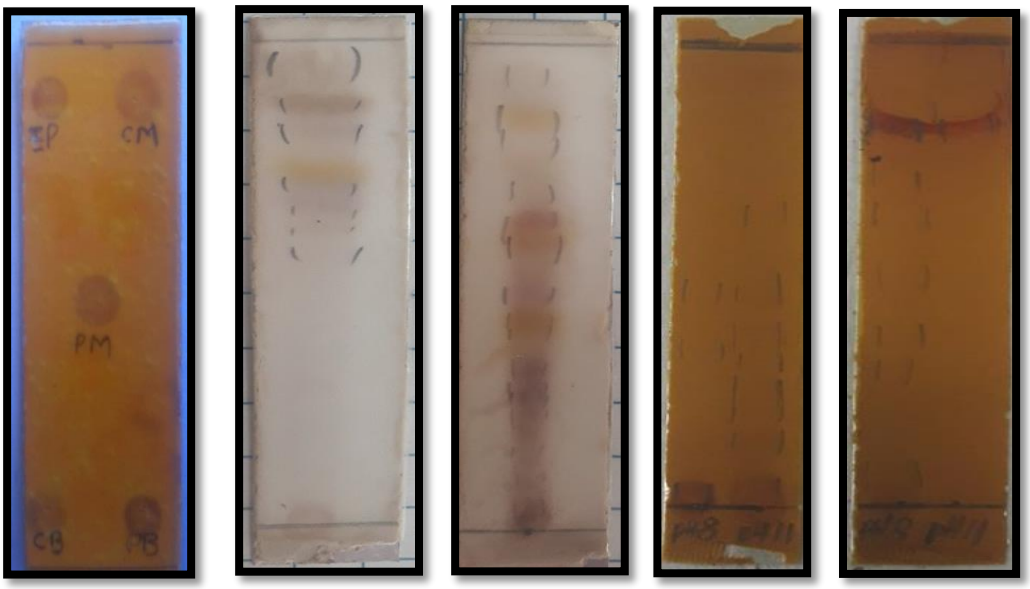
Figura 12. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_F12F6F7, eludía en Hex: AcOEt 95:5 en luz de 254 nm.
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.2. Extracto Metanol – epidermis

4.4.2.1. Fracción alcaloidea

Anteriormente con el tamizaje fitoquímico pudimos confirmar la presencia de alcaloides en los todos los extractos de las respectivas divisiones del tubérculo, exceptuando en cortex blanco epidermis del extracto hexano, la parte trabajada fue el extracto metanólico – epidermis, en donde pudimos reconfirmar realizando la prueba de Dragendorrf en CCF (Figura13.1), observando las manchas de color naranja oscuro dando como resultado positivo, por lo cual procedimos a la de separación mediante cromatografía en columna abierta.

Una vez aplicada la metodología correspondiente a la extracción de alcaloides se obtuvo un peso de 480 mg en pH 8 y 56 mg en pH 11.



1 2 3 4 5

Figura 13. Placas de CCF: (**1**) se muestra los resultados de la prueba de Dragendorff positivo en el extracto de las separaciones del tubérculo, (**2**) fracción alcaloidea en pH 8 polaridad de elución: CH_2Cl_2:MeOH 96:4; (**3**) fracción alcaloidea en pH 11polaridad de elución: CH_2Cl_2:MeOH 99:1; (**4**) fracción alcaloidea pH 8 eluída en: CH_2Cl_2: MeOH 95:5, (**5**) fracción alcaloidea pH 11 eluída en: CH_2Cl_2:MeOH 1:1; (**1, 4, 5**) revelado con dragendorff y (**2, 3**).con ácido sulfúrico y vainillina
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.2.2. Fracción alcaloidea en pH 8

Se extrajo 480 mg de extracto soluble en metanol. La fracción fue analizada en mediante CG/EM, con la base de datos WILEY 7 n.l, se obtuvo una mezcla de 25 compuestos, con tiempos de retención, tR 13.86, 17.30, 17.69, 22.31, 23.21, 23.37, 24.09, 24.15, 24.38, 24.76, 25.21, 25.31, 25.69, 25.82, 25.99, 26.21, 27.53, 28.19, 28.76, 38.47, 39.39, 41.97, 43.03, 43.89, 44.62 (Anexo 3).

4.4.2.2.1. Columna de la fracción alcaloidea en pH 8

Se realizó una microcolumna en condiciones isocráticas con los 480 mg del extracto alcaloideo con polaridad 100% CH_2Cl_2, se recolectó 350 separaciones de 2.5 ml cada una, según la similitud del perfil cromatográfico se unieron, resultando 16 fracciones en total (ALC-Er-EP1 a ALC-Er-EP16). En la tabla 10 se especifican la unión de las mismas con su respectivo peso y apariencia.

Tabla 10. Unión de la fracción alcaloidea en pH 8 del extracto de metanol-epidermis de *E. ruizii.*

Fracción	Separación	Apariencia	Peso (mg)
ALC-Er-EP1	1 – 20	Viscoso transparente	0.7

ALC-Er-EP2	21 - 44	Viscoso transparente	0.9
ALC-Er-EP3	45 – 53	Viscoso transparente	1.2
ALC-Er-EP4	54 – 84	Viscoso amarillento	5.3
ALC-Er-EP5	85 – 91	Polvo transparente	7.8
ALC-Er-EP6	92 – 120	Polvo transparente	9.1
ALC-Er-EP7	121 – 130	Polvo transparente	4.2
ALC-Er-EP8	131 – 159	Polvo blanquecino	4.3
ALC-Er-EP9	160 – 216	Cristales transparentes	20
ALC-Er-EP10	217 – 226	Viscoso transparente	10
ALC-Er-EP11	227 – 236	Polvo transparente	34
ALC-Er-EP12	237 – 260	Polvo blanco	27.4
ALC-Er-EP13	261 – 328	Polvo transparente	10.1
ALC-Er-EP14	329 – 340	Viscoso transparente	37.6
ALC-Er-EP15	341 – 350	Viscoso amarillento	42
ALC-Er-EP16	Lavado	Viscoso marrón	101.8

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

En la figura 14 se muestra la CCF con las fracciones obtenidas de la microcolumna en pH 8, corrida en CH_2Cl_2:MeOH 99:1.

Figura 14. CCF de unión de Fracciones de la extracción de alcaloides en pH 8
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

De la fracción alcoloidea Er-MeOH-ALC en pH 8 se obtuvo una mezcla de compuestos con solubilidad en diclorometano y cloroformo, punto de fusión de 52-53°C, fue analizada en CG/EM, el espectro de masas mostró en siete tiempos de retención 17.30; 22.31, 24.09,

26.21; 27.53; 28.76, 44.62 minutos con masas impares, compuestos que podrían ser alcaloides, además se muestran otros siete compuestos (anexo 6): éster metílico del ácido palmítico, (**1**) con un tiempo de retención (tR) de 22.31 min, cuya masa molecular es 270. 45 g/mol; éster metílico del ácido heptadecanoico (**2**) con tR de 23.37 min., cuya masa molecular es 284.48 g/mol; éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (**3**) con tR de 24.09 min., cuya masa molecular es 294.47.45 g/mol, éster metílico del ácido 7-octadecenoico (**4**) con tR de 24.15 min., cuya masa molecular es 296.49 g/mol, éster metíllico del ácido octadecenoico (**5**) con un tR de 24.38 min., cuya masa molecular es de 294.47 g/mol; éster metílico del ácido 2-octil- ciclopropanetetradecanoico (**6**) con un tR de 25.21 min., cuya masa molecular es de 394.67 g/mol. Según la base de datos Wiley 7n.l del equipo los porcentajes de similitud son 99, 98, 99, 99, 99, 95% respectivamente para cada uno de los compuestos. Además se comparó los patrones de fraccionamiento de masa de cada uno de estos compuestos y coinciden con las estructuras propuestas (Zaky, Fasihuddin, Ho, & Pang, 2014).

En la figura 15 se muestran las estructuras de los compuestos presentes en la mezcla. El éster metílico del ácido palmítico ha sido reportado en otra especie de mismo género, *Eriotheca gracilipes* (Mayworm & Salatino, 1996), el resto de compuestos no han sido reportados aún para el género y especie. Se ha reportado que cinco de estos compuestos poseen diversas actividades biológicas tales como: antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes, antinflamatorio, se resumen en el tabla 11.

Tabla 11. Compuestos aislados de la fracción alcaloidea en pH 8 del extracto metanol-epidermis de *E. ruizii*, con la actividad reportada en bibliografía.

Compuesto	Actividad Biológica	Referencia
éster metílico del Ácido palmítico, (**1**)	Anti microbiano, insecticida, antibacteriano, ayuda en la prevención del cáncer	(Senthilkumar, Murugesan, & Vijayalakshmi, 2012)
Éster metílico Ácido heptadecanoico, (**2**)	Antioxidante, antinflamatorio	(Zaky et al., 2014)
Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico (**3**)	inhibe la carcinogénesis, hipoglucemiante, hepatoprotector	(Pariza, Park, & Cook, 2001)

éster metílico del Ácido 7-octadecanoico, (**4**)	Antimicrobiano, anti fúngico, antinflamatorio, anticancerígeno	(Kuo, Kim, & Hou, 2001)
Éster metíllico del ácido octadecenoico (**5**)	Antibacteriano, anti-fúngica, antiviral, anti-inflamatorio, antioxidante, inmuno-estimulante	(Silici & Kutluca, 2005)

Fuente: (Senthilkumar, Murugesan, & Vijayalakshmi, 2012; Zaky et al., 2014; Pariza, Park, & Cook, 200; Kuo, Kim, & Hou, 200; Silici & Kutluca, 2005; Chen et al., 2016; Fürstner, Thiel, Kindler, & Bartkowska, 2000).
Elaboración: Santos, M. 2017

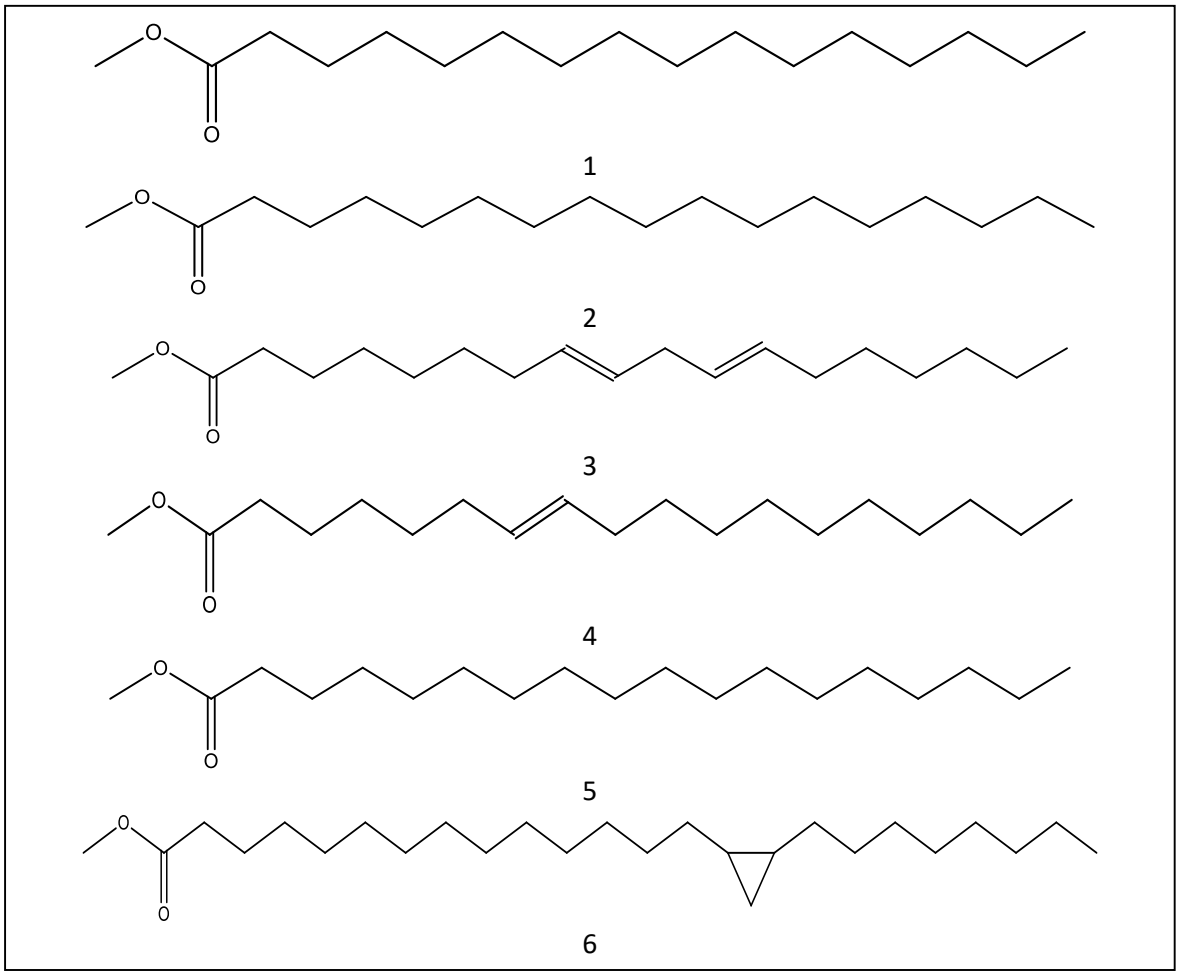


Figura 15. Estructuras de los compuestos identificados de la fracción alcaloidea en pH 8 del extracto metanol-epidermis de *E ruizii*: (**1**) éster metílico del ácido palmítico, (**2**) éster metílico del ácido heptadecanoico, (**3**) éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico, (**4**) éster metílico del ácido 7- octadecenoico, (**5**) éster metílico del ácido octadecenoico, (**6**) éster metílico del ácido 2-octil- ciclopropanetetradecanoico.
Fuente: (Datos de Química del NIST, 2015)

Elaborado: Santos M., 2018

4.4.3. Extracto Metanol – cortex blanco

Para el fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta del extracto metanólico de cortex blanco se tomó 40g, se recogió 262 separaciones de un volumen de 20 ml cada una, las cuales se unieron de acuerdo a la semejanza en el perfil cromatográfico. En la tabla 11 se muestras las fracciones, separaciones, polaridad del eluída, apariencia y peso.

Tabla 12. Unión de las fracciones de extracto de metanol-cortex blanco de *E. ruizii.*

Fracción	Separación	Polaridad	Apariencia	Peso (mg)
Er-MeOH-CB1	**1 – 53**	**AcOEt: MeOH 95: 5**	**Viscoso amarillento**	**185**
Er-MeOH-CB2	54 – 60	AcOEt: MeOH: H_2O 90: 8: 2	Viscoso amarillento	88
Er-MeOH-CB3	**61 – 78**	**AcOEt: MeOH: H_2O 90: 8: 2**	**Viscoso amarillento**	**179**
Er-MeOH-CB4	79 – 95	AcOEt: MeOH: H_2O 85: 13: 2	viscoso amarillo	**38**
Er-MeOH-CB5	96 – 100	AcOEt: MeOH: H_2O 85: 13: 2	viscoso amarillo	110
Er-MeOH-CB6	101 – 103	AcOEt: MeOH: H_2O 85: 13: 2	Polvo marrón	23.4
Er-MeOH-CB7	104 – 117	AcOEt: MeOH: H_2O 80: 15: 5	Polvo marrón	141.5
Er-MeOH-CB8	118 – 120	AcOEt: MeOH: H_2O 80: 15: 5	Polvo marrón	28.4
Er-MeOH-CB9	121 – 132	AcOEt: MeOH: H_2O 80: 15: 5	Polvo café	299.3
Er-MeOH-CB10	133 – 143	AcOEt: MeOH: H_2O 75: 20: 5	Polvo café	314.7
Er-MeOH-CB11	144 – 151	AcOEt: MeOH: H_2O 75: 20: 5	Polvo café	49.7
Er-MeOHFCB12	152 – 156	AcOEt: MeOH: H_2O 75: 20: 5	Polvo café	359.3
Er-MeOH-CB13	157 – 163	AcOEt: MeOH: H_2O 75: 20: 5	Polvo café	193.5
Er-MeOH-CB14	164 – 174	AcOEt: MeOH: H_2O 70: 25: 5	Polvo café	253.7
Er-MeOH-CB15	175 – 180	AcOEt: MeOH: H_2O 70: 25: 5	Polvo café	131.4
Er-MeOH-CB16	181 – 187	AcOEt: MeOH: H_2O 70: 25: 5	Polvo café	176.5

Er-MeOH-CB17	188 – 195	AcOEt: MeOH: H_2O 70: 25: 5	Polvo café	209.5
Er-MeOH-CB18	196 – 209	AcOEt: MeOH: H_2O 70: 25: 5	Polvo café	514.9
Er-MeOH-CB19	**210 – 223**	**AcOEt: MeOH: H_2O 60: 35: 5**	**Polvo café**	**456.7**
Er-MeOH-CB20	**224 – 234**	**AcOEt: MeOH: H_2O 60: 35: 5**	**Polvo café**	**378.9**
Er-MeOH-CB21	235 – 262	AcOEt: MeOH: H_2O 60: 35: 5	Polvo café	890.5
Er-MeOH-CB22	Lavado	100 MeOH	Polvo café	4865.6

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

Se trabajó las muestras que contenían aparentemente mayor pureza las cuales fueron Er-MeOH-CB1, Er-MeOH-CB3, Er-MeOH-CB19, Er-MeOH-CB20.

4.4.3.1. Fracción Er-MeOH-CB1

A partir de la columna del extracto total Er-MeOH-CB, se procedió a realizar una microcolumna según gradiente creciente de fuerza eluotrópica de la fracción Er-MeOH-CB1, se recogieron 229 separaciones de 3 ml cada una, obteniendo 16 fracciones (Er-MeOH-CB1-F1 a Er-MeOH-CB1-F16), según el perfil cromatográfico se unió. En la tabla 12 se detallan las fracciones.

Tabla 13. Unión de las fracciones de Er- MeOH-CB1 de la columna del extracto metanol-cortex blanco de *E. ruizii.*

Fracción	Separación	Polaridad	Apariencia	Peso (mg)
Er-MeOH-CB1F1	1 – 27	AcOEt: MeOH 95: 5	Amarillo viscoso	36.6
Er-MeOH-CB1F2	28 – 39	AcOEt: MeOH: H_2O 90: 8: 2	Viscoso transparente	17.3
Er-MeOH-CB1F3	40 – 51	AcOEt: MeOH: H_2O 90: 8: 2	Viscoso amarillento	9.7
Er-MeOH-CB1F4	52 – 77	AcOEt: MeOH: H_2O 85: 13: 2	Viscoso amarillento	12.4
Er-MeOH-CB1F5	78 – 103	AcOEt: MeOH: H_2O 85: 13: 2	Polvo blanco	34.5

Er-MeOH-CB1F6	104 – 113	AcOEt: MeOH: H_2O 85: 13: 2	Polvo transparente	6.7
Er-MeOH-CB1F7	114 – 143	AcOEt: MeOH: H_2O 80: 15: 5	Polvo blanco	8.9
Er-MeOH-CB1F8	144 – 158	AcOEt: MeOH: H_2O 80: 15: 5	Polvo amarillo	23.4
Er-MeOH-CB1F9	159 – 163	AcOEt: MeOH: H_2O 80: 15: 5	Polvo amarillo	56.7
Er-MeOH-CB1F10	164 – 171	AcOEt: MeOH: H_2O 70: 25: 5	Polvo marrón	9.4
Er-MeOH-CB1F11	172 – 180	AcOEt: MeOH: H_2O 70: 25: 5	Polvo marrón	11.1
Er-MeOH-CB1F12	181 – 197	AcOEt: MeOH: H_2O 60: 35: 5	Polvo café	56.8
Er-MeOH-CB1F13	198 – 206	AcOEt: MeOH: H_2O 60:35 : 5	Polvo café	68.3
Er-MeOH-CB1F14	207 – 218	AcOEt: MeOH: H_2O 60: 35: 5	Polvo café	54.6
Er-MeOH-CB1F15	219 – 229	AcOEt: MeOH: H_2O 55: 40 : 5	Polvo café	37.4
Er-MeOH-CB1F16	Lavado	100 MeOH	Polvo café	56.7

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

No se logró aislar ningún compuesto puro.

4.4.3.2. Fracción Er-MeOH-CB3

De la fracción Er-MeOH-CB3, obtenida a partir de la columna de extracto Er- MeOH-CB, se realizó la microcolumna según gradiente creciente de fuerza eluotrópica, se recolectó 219 separaciones con un volumen de 3 ml cada una, obteniendo 10 fracciones (Er-MeOH-CB3-F1 a Er-MeOH-CB3-F10) y se unió de acuerdo a la similitud cromatográfica. Las fracciones y sus características se describen en la tabla 14.

Tabla 14. Unión de las fracciones de fracción Er-MeOH-CB3 de la columna del extracto metanol-cortex blanco de *E. ruizii.*

Fracción	Separación	Polaridad	Apariencia	Peso (mg)

Er-MeOH-CB3F1	1- 45	AcOEt: MeOH: H_2O 80: 20: 0.2	Amarillo viscoso	34.4
Er-MeOH-CB3F2	46 – 65	AcOEt: MeOH: H_2O 80:20: 0.2	Viscoso amarillento	5.6
Er-MeOH-CB3F3	66 – 102	AcOEt: MeOH: H_2O 75: 25: 0.2	Viscoso amarillento	6.8
Er-MeOH-CB3F4	103 – 145	AcOEt: MeOH: H_2O 75: 25: 0.2	Polvo amarillo	32.5
Er-MeOH-CB3F5	146 – 155	AcOEt: MeOH: H_2O 70: 30: 0.2	Viscoso transparente	34.2
Er-MeOH-CB3F6	156 – 171	AcOEt: MeOH: H_2O 70: 30: 0.2	Viscoso amarillento	87.6
Er-MeOH-CB3F7	172 – 189	AcOEt: MeOH: H_2O 65: 35: 0.2	Polvo amarillento	12.3
Er-MeOH-CB3F8	190 – 200	AcOEt: MeOH: H_2O 60: 40: 0.5	Polvo amarillento	56.8
Er-MeOH-CB3F9	201 – 219	AcOEt: MeOH: H_2O 50:40: 0.5	Polvo café	65.4
Er-MeOH-CB3F10	Lavado	100 MeOH	Polvo café	78.9

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

Fracciones que están pendientes de trabajar.

4.4.3.3. Fracción Er-MeOH-CB19

Se realizó la microcolumna según gradiente creciente de fuerza eluotrópica de la fracción Er-MeOH-CB19, obtenida a partir de la columna del extracto total Er-MeOH-CB, se recolectaron 160 separaciones de 3 ml cada una, se obtuvieron 17 separaciones (Er-MeOH-CB19-F1 a Er-MeOH-CB19-F17), se unió de acuerdo a la similitud cromatográfica. Las fracciones y sus características se describen en la tabla 15.

Tabla 15. Unión de las fracciones de fracción Er-MeOH-CB19 de la columna del extracto metanol-cortex blanco de *E. ruizii.*

Fracción	Separación	Polaridad	Apariencia	Peso (mg)

Er-MeOH-CB19F1	1 – 31	AcOEt: MeOH: H_2O 82: 13: 5	Polvo transparente	1.4
Er-MeOH-CB19F2	32 – 36	AcOEt: MeOH: H_2O 82: 13: 5	Polvo transparente	1.9
Er-MeOH-CB19F3	37 – 39	AcOEt: MeOH: H_2O 82: 13: 5	Polvo café	25.3
Er-MeOH-CB19F4	40 – 45	AcOEt: MeOH: H_2O 82: 13: 5	Polvo café	13.6
Er-MeOH-CB19F5	46 – 57	AcOEt: MeOH: H_2O 82: 13: 5	Polvo café	29
Er-MeOH-CB19F6	58 – 63	AcOEt: MeOH: H_2O 82: 13: 5	Polvo café	11.8
Er-MeOH-CB19F7	64 – 67	AcOEt: MeOH: H_2O 82: 13: 5	Polvo café	8.6
Er-MeOH-CB19F8	68 – 77	AcOEt: MeOH: H_2O 82: 13: 5	Polvo café	54.4
Er-MeOH-CB19F9	78 – 89	AcOEt: MeOH: H_2O 82: 13: 5	Polvo café	56.1
Er-MeOH-CB19F10	90 – 91	AcOEt: MeOH: H_2O 77: 18: 5	Polvo café	4.1
Er-MeOH-CB19F11	92 – 100	AcOEt: MeOH: H_2O 77: 18: 5	Polvo café	24.1
Er-MeOH-CB19F12	101 – 115	AcOEt: MeOH: H_2O 77: 18: 5	Polvo café	42.1
Er-MeOH-CB19F13	116 – 133	AcOEt: MeOH: H_2O 77: 18: 5	Polvo café	11
Er-MeOH-CB19F14	134 – 147	AcOEt: MeOH: H_2O 77: 18: 5	Polvo café	4.2
Er-MeOH-CB19F15	148 – 151	AcOEt: MeOH: H_2O 50: 45: 5	Polvo café	73.2
Er-MeOH-CB19F16	152 – 160	AcOEt: MeOH: H_2O 50: 45: 5	Polvo café	6.8

Er-MeOH-CB19F17	Lavado	100 MeOH	Polvo café	23.4

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

Fracciones que están pendientes de trabajar.

4.4.3.4. Fracción Er-MeOH-CB20

Se realizó una microcolumna en condiciones isocráticas, con polaridad de elusión $CHCl_3$:MeOH:H_2O:CH_2O_2 90:20:0.2:0.1 de la fracción Er-MeOH-CB20 obtenida a partir de la columna del extracto Er-MeOH-CB, en la cual se recolectó 453 muestras de 3 ml cada una, se obtuvo 20 separaciones (Er-MeOH-CB20-F1 a Er-MeOH-CB20-F20), se unió de acuerdo a la similitud cromatográfica. Las fracciones y sus características se describen en la tabla 15.

Tabla 16. Unión de fracciones de Er-MeOH-CB20 de la columna del extracto metanol-cortex blanco de *E. ruizii.*

Fracción	Separación	Apariencia	Peso (mg)
Er-MeOH-CB20F1	1 – 16	Viscoso transparente	2.9
Er-MeOH-CB20F2	17 – 18	Viscoso transparente	0.3
Er-MeOH-CB20F3	19 – 29	Viscoso transparente	0.9
Er-MeOH-CB20F4	30 – 55	Viscoso transparente	3.3
Er-MeOH-CB20F5	56 - 79	Viscoso transparente	3.9
Er-MeOH-CB20F6	80 – 96	Viscoso transparente	3.7
Er-MeOH-CB20F7	97 – 105	Viscoso amarillento	2.5
Er-MeOH-CB20F8	106 – 129	Viscoso amarillento	8.9
Er-MeOH-CB20F9	130 – 143	Viscoso transparente	6.4
Er-MeOH-CB20F10	144 – 149	Viscoso transparente	4.1
Er-MeOH-CB20F11	150 – 152	Viscoso transparente	2.3
Er-MeOH-CB20F12	153 – 168	Viscoso transparente	9.7
Er-MeOH-CB20F13	169 – 189	Viscoso amarillento	16.7
Er-MeOH-CB20F14	**190 – 253**	**Viscoso amarillento**	**26.1**
Er-MeOH-CB20F15	254 – 275	Viscoso amarillento	26.3

Er-MeOH-CB20F16	276 – 299	Viscoso amarillento	11.7
Er-MeOH-CB20F17	300 – 351	Viscoso amarillento	46.3
Er-MeOH-CB20F18	352	Viscoso marrón	13.7
Er-MeOH-CB20F19	353	Viscoso café	28.9
Er-MeOH-CB20F20	Lavado MeOH	Polvo café	18.9

Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

4.4.3.4.1. Fracción Er-MeOH-CB20F14

De la fracción identificada como Er_MeOH_CB_Fr20F14, se obtuvo 9.7 mg de un líquido viscoso amarillento, soluble en MeOH y H_2O, con Rf 0.56 en CCF eludía en $CHCl_3$:MeOH: H_2O:CH_2O_2 65:25:04:0.1 (figura 16).

Figura 16. CCF de Fracción Er_AcOEt_Ep_Fr20FF14, eludía en $CHCl_3$:MeOH: H_2O:CH_2O_2 65:25:04:0.1
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

Este compuesto se identificó por RMN (Anexo 7 al 11) como arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil fue caracterizado mediante comparación de espectros reportados en literatura (Çalis, Tasdemir, Sticher, & Nishibe, 1999; Wang et al., 2011). En las tablas 17 y 18 se muestran los datos espectroscópicos en donde sus desplazamientos químicos se expresan en ppm, correspondientes a ^{1}H- RMN y ^{13}C-RMN, adicional se realizó HMBC, HSQC, COSY (Anexo del 9 al 13) para confirmar la disposición de glucósido del compuesto. No hay reportes de estudios o actividad biológica para este compuesto, sin embargo, existen reportes de glucósidos feniltanoides que presentan

actividad neuroprotector (Kyung et al., 2005), antimicrobiana (Kyriakopoulou, Prokopios, Skaltsounis, Nektarios, & Harvala, 2001), anti-inflamatorio (Schapoval et al., 1998), antioxidante, anticancerígeno (Wong, He, Huang, & Chen, 2001) y antibacterial (Jiménez & Riguera, 1994). Algunos extractos ricos en glucósidos evidencian apoptosis inducida a través del daño del ADN; que resulta en la reducción de la viabilidad celular de las células de cáncer cervical HeLa, la inducción de oxígeno reactivo (ROS) y la posterior activación de p53 e inducción de la muerte celular a través de apoptosis (Bailon-Moscoso et al., 2015).

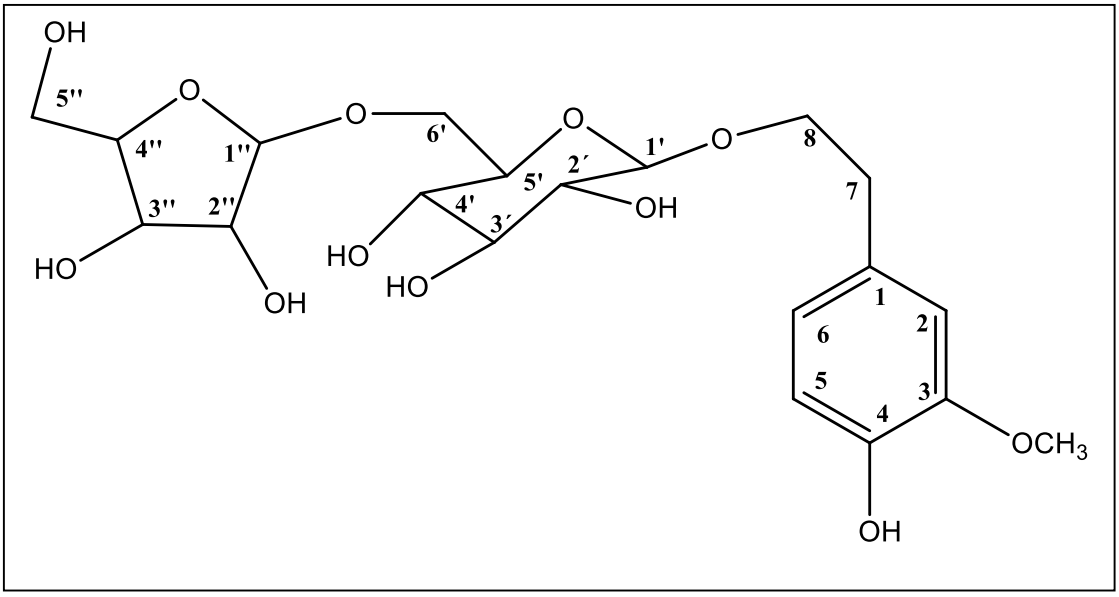


Figura 17. Estructura del arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil.
Fuente: Santos, M. 2017
Elaboración: Santos, M. 2017

Tabla 17. Datos espectroscópicos de ¹H- RMN (CD_3OD) del arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil.

¹H- RMN(400 Mhz, CD_3OD)			**¹H- RMN** (Çalis et al., 1999; Wang et al., 2011)	
Número de H	**Desplazamiento químico /ppm**	**Multiplicidad, integral, *J*/Hz**	**Desplazamiento químico**	**Multiplicidad, integral, *J*/Hz**
Aglicona				
1	-		-	
2	6.86	d,1H, 1.54	6.86	d, 1H
3	-		-	
4	-		-	
5	6.68	d, 1H, 3.2	6.70	d, 1H
6	6.69	dd,1H,	6.60	dd, 1H
7	2.85	m,1H, 6.8	2.85	m, 1H
8	3.18	t,1H, 7.6	3.18	t, 1H
Glucosa				

1'	4.30	d, 1H, 7.8	4.32	d, 1H, 7.8
2'	4.96	dd, 1H,	4.94	dd, 1H, 9.5
3'	3.31	m, 1H	3.35	m, 1H
4'	3.25	m, 1H	3.25	m, 1H
5'	3.45	m, 1H	3.45	m,1H
6'	3.71	m, 1H, 5	3.70	m, 1H
Arabinofuranosil				
1"	4.96	d, 1H, 1.3	4.94	d, 1H, 1.7
2"	4.00	dd, 1H	4.00	dd, 1H,
3"	3.82	dd, 1H, 3.3 y 5.9	3.82	m, 1H, 3.3 y 6.0
4"	3.97	m, 1H	3.97	m, 1H
5"	3.63	m, 1H, 5.8 y 11.8	3.64	m, 1H, 5.4 y 11.8

Fuente: (Çalis et al., 1999; Wang et al., 2011).
Elaboración: Santos, M. 2017

Tabla 18. Datos espectroscópicos de ^{13}C-RMN (CD_3OD) del arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil.

^{13}C-RMN (100 Mhz, CD_3OD)			^{13}C-RMN (Çalis et al., 1999; Wang et al., 2011).	
Número de C	**Desplazamiento químico**	**Multiplicidad**	**Desplazamiento químico**	**Multiplicidad**
Aglicona				
1	131.5	c	129.4	c
2	113.7	d	113.0	d
3	148.8	s	147.3	s
4	145.8	s	144.9	s
5	116.1	d	116.3	d
6	122.4	d	119.5	d
7	36.7	t	35.1	t
8	72.2	t	70.8	t
Glucosa				
1'	104.4	D	102.8	d
2'	75.1	D	73.3	d
3'	78.0	D	76.6	d
4'	71.9	D	70.2	d
5'	76.7	D	75.5	d
6'	68.2	T	67.7	t
Arabinofuranosil				
1"	110.0	d	109.2	d
2"	83.2	d	83.1	d
3"	78.9	d	78.9	d
4"	85.9	d	85.9	d
5"	63.1	t	63.1	T

Fuente: (Çalis et al., 1999; Wang et al., 2011).
Elaboración: Santos, M. 2017

CONCLUSIONES

De los extractos obtenidos de la especie *Eriotheca ruizii* el que obtuvo el mayor rendimiento fue el extracto de cortex blanco metanol con 68.44% y el de menor rendimiento fue el extracto de epidermis hexano de la con 0.07%.

De la fracción alcaloidea en pH 8 de extracto metanol-epidermis presentó 25 compuestos 6 de los cuales posiblemente sean alcaloides y también se logró identificar otros 6 compuestos a su semejanza en espectro de masas: éster metílico del ácido palmítico, éster metílico del ácido heptadecanoico, éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico, éster metílico del ácido 7- octadecenoico, éster metíllico del ácido octadecenoico, éster metílico del ácido 2-octil- ciclopropanetetradecanoico.

Del extracto de acetato de etilo-epidermis se obtuvieron 6 compuestos posiblemente puros, con pesos de 2; 1; 1.8; 0.7; 1; 1 mg, que no fueron posibles de identificar debido a la poca cantidad.

Del extracto metanólico de cortex blanco se logró aislar 9.7 mg de un líquido viscoso, amarillento, que fue identificado como arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil.

RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio de la actividad citotóxica del extracto de acetato de etilo epidermis y los extractos metanólicos y de los compuestos aislados del tubérculo de la especie *Eriotheca ruizii.*

Utilizar técnicas cromatográficas con mayor selectividad como HPLC preparativa, con la finalidad de lograr la separación de compuestos presentes en los extractos y fracciones obtenidas de la especie, para obtener en mayor proporción los compuestos que podrían ser responsables de la actividad citotóxica de la especie en líneas celulares de cáncer humano.

BIBLIOGRAFÍA

Agudelo, N., & Hoet, A. (2011). Bienvenido al Manual de Salud Publica Veterinaria, 162.

Aguirre, Z., Tene, V., Aguiñaga, M., & Villegas, T. (2012). Especies Forestales, Bosques secos Ecuador. *MInisterio Del Ambiente*, *1*, 1–74.

Bailon-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Tinitana-Imaicela, F., & Ostrosky-Wegman, P. (2015). Medicinal plants of Ecuador: A review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Medicinal Chemistry Research*, *24*(6), 2283–2296. https://doi.org/10.1007/s00044-015-1335-7

Balslev, H., Bush, M., Cleef, A., Lucero, H., & Sarmiento, F. (2006). Lyonia 10 (2) March 2006 - Biodiversity and Cultural Diversity in the Andes and Amazon / Dry Forest Conservation : Ethnobotany and Forest Use, *10*(March).

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, *161*(5), 839–851. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3

Bravo, E. (2014). La Biodiversidad en el Ecuador (Universita, p. 141). Cuenca-Ecuador.

Çalis, I., Tasdemir, D., Sticher, O., & Nishibe, S. (1999). Phenylethanoid glycosides from Digitalis ferruginea subsp. ferruginea (=D. aurea Lindley) (Scrophulariaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *47*(9), 1305–1307.

Chocho, J. (2007). Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos. *Espectrometría, Universidad de Santiago de Compostela*.

Datos de Química del NIST. (2015). National Institute of Standards and Technology U.S. Departament of Commerce. Retrieved April 1, 2018, from http://webbook.nist.gov/chemistry/

Domínguez, B. P. (2016). Determinación de parámetros operaciones necesarios en el empaquetado de columnas de cromatografía, 1–61.

Duarte, M. C., Esteves, G. L., Salatino, M. L. F., Walsh, K. C., David, A., Duarte, M. C., … Baum, D. A. (2011). Phylogenetic Analyses of Eriotheca and Related Genera (

Bombacoideae , Malvaceae) Phylogenetic Analyses of Eriotheca and Related Genera, *36*(3), 690–701. https://doi.org/10.1600/036364411X583655

Encyclopaedia Britannica. (2016). Melting point | chemistry |. Retrieved March 18, 2018, from https://www.britannica.com/science/melting-point

Gallego, J. C. V., & Quijano, L. (2012). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN HOJAS DE Wigandia urens (Hydrophyllaceae). *Scientia et Technica*, *2*(51), 197–202. https://doi.org/10.22517/23447214.6599

Golinelli, S., Vega-villa, K., & Villa-Romero, J. (2015). Biodiversidad, *2.0*, 345–396.

González, J., Ayala, A., & Gutiérrez, E. (2006). Determinación de fenoles y taninos condensados en especies arbóreas con potencial forrajero de la Región de Tierra Caliente Michoacán, México. *Livestock Research for Rural Development*, *18*, 1–6.

Hossain, E., Mandal, S. C., & Gupta, J. (2011). Phytochemical Screening and In-vivo Antipyretic Activity of the Methanol Leaf-Extract of Bombax Malabaricum DC (Bombacaceae). *Pharm Res Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *10*(101), 55–55.

Hossain, E., Sarkar, D., Chatterjee, M., Chakraborty, S., Mandal, S. C., & Gupta, J. K. (2013). Effect of methanol extract of bombax malabaricum leaves on nitric oxide production during inflammation. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, *70*(2), 255–260. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23614281

Jiménez, C., & Riguera, R. (1994). Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Nature Product Reports*, *11*(6), 591–606. https://doi.org/10.1039/NP9941100591

Kuo, T. M., Kim, H., & Hou, C. T. (2001). Production of a Novel Compound, 7,10,12-Trihydroxy-8(E)-Octadecenoic Acid from Ricinoleic Acid by Pseudomonas aeruginosa PR3. *Current Microbiology*, *43*(3), 198–203. https://doi.org/10.1007/s002840010287

Kyriakopoulou, I., Prokopios, M., Skaltsounis, A., Nektarios, A., & Harvala, C. (2001). Samioside a New Phenylethanoid Glycoside with Free-Radical Scavenging and Antimicrobial Activities from Phomis samia. *Journal of Natural Products*, *64*, 1095–

1097.

Kyung, K., Sung, S., Park, J., Hyun, S., Lee, K., & Kim, Y. (2005). In vitro Neuroprotective Activities of Phenylethanoid Glycosides from Callicarpa dichatoma. *Planta Medica*, *71*, 778–780. https://doi.org/10.1055/s-2005-871213

Lankelma, J. M., Voorend, D. M., Barwari, T., Koetsveld, J., Van der Spek, A. H., De Porto, A. P. N. A., … Van Noorden, C. J. F. (2010). Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sciences*, *86*(7–8), 225–233. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.11.016

Lecaille, F., Brömme, D., & Lalmanach, G. (2008). Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie*, *90*(2), 208–226. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.011

Machado, M. A. (2015). Metabólitos Secundarios de Eriotheca pubescens (Malvaceae): Actividades e Inhibitoria de Catepsinas.

Mallat, E., & Barcelo, D. (1998). Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography – post-column derivatization with fluorescence detection. *Chromatography*, *823*, 129–136.

Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Qualitative Phytochemical Screening. *Essentials of Botanical Extraction*, 173–185. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802325-9.00009-4

Mareggiani, G. (2001, June). Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioqu'micas de origen vegetal, *2*, 22–30.

Martínez, E. (2010). *Tema 11. métodos físicos de separación y purificación 1.*

Mayworm, M. A. S., & Salatino, A. (1996). Fatty acid composition of "cerrado" seed oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *72*(2), 226–230. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199610)72:2<226::AID-JSFA649>3.0.CO;2-U

Miño, G., & Jadán, M. (2007). Investigación fitoquímica e Identificación de principios activos en seis especies en seis especies del género Baccharis. *Facultada de Ingeniería En Biotecnología.ESPE. Sede Sangolquí*.

Miranda, M., & Cuellar, A. (2001). *Farmacognosia y productos naturales* (Félix Vare). La Abana.

Moreno, N. C., & Jaramillo, B. C. (2017). ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE Pachira quinata (Jacq.) W.S. Alverson, Bogotá, Colombia. *Boletín Semillas Ambientales*, *11*(1), 30–39.

Moustafa, S. M., Menshawi, B. M., Wassel, G. M., Mahmoud, K., & Mounier, M. (2014). Screening of some Plants in Egypt for their Cytotoxicity against four Human Cancer cell lines. *International Journal of PharmTech Research*, *6*(3), 1074–1084.

Muñoz-Cazares, R. (2013). *Estudio Fitoquímico Y Evaluación De La Actividad Inhibidora Del S | 123dok*. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.

Orantes, E. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibea yunckeri Standley Subsp. izabalensis W.S. Alverson ex Véliz (bombacaceae)*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Retrieved from http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2698.pdf

Organization World Health. (2005). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional.

Pariza, M., Park, Y., & Cook, M. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, *40*(4), 283–298. https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00008-X

Phillipson, J. D. (2007). Phytochemistry and pharmacognosy. *ScienceDirect*, *68*, 2960–2972. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.028

Pineda, X. (2015). *Evaluacion Fitoquímica, actividad antimicrobiana y letal del tebeérculo Eriotheca sp con potencial farmacológico*. Universidad Técnica de Machala.

Prashant, T., Bimlesh, K., & Harleen, K. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Sciencia*, *1*(1).

Prieto, S., Garrido, G., González, J., & Molina, J. (2014). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria, (November).

Priscila Severino, R., Cezar Vieira, P., & Fapesp, B. (2008). *Busca de Produtos Naturais como Inibidores Específicos de Enzimas*. Universidad Federal de San Carlos .

Quirós, M. (2006). Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases (Universida, Vol. 10). Costa Rica.

Ramírez, N., Valencia, R., & Vivas, R. (2015). Predicción del punto de fusión de indoles con base en la estructura molecular usando redes neuronales artificiales, 197–204.

Ramos Corrales, P. C. (2016, October 20). *"Balsa"* Ochroma pyramidale *(Cav. ex Lam.) Urb. (Bombacaceae)*. Universidad Nacional de la Plata. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/56011

Refaat, J., Desoky, S. Y., Ramadan, M. A., Kamel, M. S., Refaat, J., Desoky, S. Y., … Kamel, M. S. (2017). *Bombacaceae : A phytochemical review Bombacaceae : A phytochemical review* (Vol. 209). https://doi.org/10.3109/13880209.2012.698286

Rodríguez, E., Alvítez, E., Pollack, L., Huamán, E., & Sagástegui, A. (2016). Notas sobre Malvaceae subfamilia Bombacoideae en la región La Libertad , Perú, (April).

Schapoval, E. E. ., Winter de Vargas, M. R., Chaves, C. G., Bridi, R., Zuanazzi, J. A., & Henriques, A. T. (1998). Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from Stachytarpheta cayennensis. *Journal of Ethnopharmacology*, *60*(1), 53–59. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00136-0

Senthilkumar, N., Murugesan, S., & Vijayalakshmi, K. B. (2012). GC-MS-MS analysis of Trichilia connaroides (Wight & Arn.) Bentv (Meliaceae): A tree of ethnobotanical records. *Asian Journal of Plant Science and Research*, *2*(2), 193–197. Retrieved from http://www.imedpub.com/articles/gcmsms-analysis-of-trichilia-connaroides-wight--arn-bentv-meliaceae-a-tree-of-ethnobotanical-records.pdf

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo.

Sharma, B. (2007). *Chromatography* (Fifth Edition).

Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, *99*(1), 69–73. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046

Spangenberg, B., Poole, C. F., & Weins, C. (2011). *Quantitative thin-layer chromatography : a practical survey*. Springer.

Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., de la Cruz Rot, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *12*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4

Tropicos. (n.d.). Eriotheca ruizii (K. Schum.) A. Robyns. Retrieved January 31, 2018, from http://www.tropicos.org/Name/3900655

Tundis, R., Rashed, K., Said, A., Menichini, F., & Loizzo, M. R. (2014). In vitro cancer cell growth inhibition and antioxidant activity of Bombax ceiba (Bombacaceae) flower extracts. *Natural Product Communications*, *9*(5), 691–694. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25026723

Valcárcel, J., González, H., & Valcárcel, D. (2017). Espectroscopia. fundamento de la resonancia magnética nuclear, (21), 89–94.

Wang, Y. S., Liao, Z., Li, Y., Huang, R., Zhang, H. B., & Yang, J. H. (2011). A new megastigmane diglycoside from litsea glutinosa (Lour.) C. B. Rob. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *22*(11), 2234–2238. https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001100030

Wong, I. Y. F., He, Z.-D., Huang, Y., & Chen, Z.-Y. (2001). Antioxidative Activities of Phenylethanoid Glycosides from *Ligustrum purpurascens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(6), 3113–3119. https://doi.org/10.1021/jf0100604

Zaky, M., Fasihuddin, A., Ho, W.-S., & Pang, S.-L. (2014). GC -MS ANALYSIS OF PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS IN LEAF EXTRACTS OF NEOLAMARCKIA CADAMBA (RUBIACEAE) FROM MALAYSIA. *International Journal of Pharmacy Research Science*, *6*(9), 5.

Agudelo, N., & Hoet, A. (2011). Bienvenido al Manual de Salud Publica Veterinaria, 162.

Aguirre, Z., Tene, V., Aguiñaga, M., & Villegas, T. (2012). Especies Forestales, Bosques secos Ecuador. *MInisterio Del Ambiente*, *1*, 1–74.

Bailon-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Tinitana-Imaicela, F., & Ostrosky-Wegman, P. (2015). Medicinal plants of Ecuador: A review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Medicinal Chemistry Research*, *24*(6), 2283–2296.

https://doi.org/10.1007/s00044-015-1335-7

Balslev, H., Bush, M., Cleef, A., Lucero, H., & Sarmiento, F. (2006). Lyonia 10 (2) March 2006 - Biodiversity and Cultural Diversity in the Andes and Amazon / Dry Forest Conservation : Ethnobotany and Forest Use, *10*(March).

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, *161*(5), 839–851. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3

Bravo, E. (2014). La Biodiversidad en el Ecuador (Universita, p. 141). Cuenca-Ecuador.

Çalis, I., Tasdemir, D., Sticher, O., & Nishibe, S. (1999). Phenylethanoid glycosides from Digitalis ferruginea subsp. ferruginea (=D. aurea Lindley) (Scrophulariaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *47*(9), 1305–1307.

Chocho, J. (2007). Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos. *Espectrometría, Universidad de Santiago de Compostela*.

Datos de Química del NIST. (2015). National Institute of Standards and Technology U.S. Departament of Commerce. Retrieved April 1, 2018, from http://webbook.nist.gov/chemistry/

Domínguez, B. P. (2016). Determinación de parámetros operaciones necesarios en el empaquetado de columnas de cromatografía, 1–61.

Duarte, M. C., Esteves, G. L., Salatino, M. L. F., Walsh, K. C., David, A., Duarte, M. C., … Baum, D. A. (2011). Phylogenetic Analyses of Eriotheca and Related Genera (Bombacoideae , Malvaceae) Phylogenetic Analyses of Eriotheca and Related Genera, *36*(3), 690–701. https://doi.org/10.1600/036364411X583655

Encyclopaedia Britannica. (2016). Melting point | chemistry |. Retrieved March 18, 2018, from https://www.britannica.com/science/melting-point

Gallego, J. C. V., & Quijano, L. (2012). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN HOJAS DE Wigandia urens (Hydrophyllaceae). *Scientia et Technica*, *2*(51), 197–202.

https://doi.org/10.22517/23447214.6599

Golinelli, S., Vega-villa, K., & Villa-Romero, J. (2015). Biodiversidad, *2.0*, 345–396.

González, J., Ayala, A., & Gutiérrez, E. (2006). Determinación de fenoles y taninos condensados en especies arbóreas con potencial forrajero de la Región de Tierra Caliente Michoacán, México. *Livestock Research for Rural Development*, *18*, 1–6.

Hossain, E., Mandal, S. C., & Gupta, J. (2011). Phytochemical Screening and In-vivo Antipyretic Activity of the Methanol Leaf-Extract of Bombax Malabaricum DC (Bombacaceae). *Pharm Res Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *10*(101), 55–55.

Hossain, E., Sarkar, D., Chatterjee, M., Chakraborty, S., Mandal, S. C., & Gupta, J. K. (2013). Effect of methanol extract of bombax malabaricum leaves on nitric oxide production during inflammation. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, *70*(2), 255–260. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23614281

Jiménez, C., & Riguera, R. (1994). Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Nature Product Reports*, *11*(6), 591–606. https://doi.org/10.1039/NP9941100591

Kuo, T. M., Kim, H., & Hou, C. T. (2001). Production of a Novel Compound, 7,10,12-Trihydroxy-8(E)-Octadecenoic Acid from Ricinoleic Acid by Pseudomonas aeruginosa PR3. *Current Microbiology*, *43*(3), 198–203. https://doi.org/10.1007/s002840010287

Kyriakopoulou, I., Prokopios, M., Skaltsounis, A., Nektarios, A., & Harvala, C. (2001). Samioside a New Phenylethanoid Glycoside with Free-Radical Scavenging and Antimicrobial Activities from Phomis samia. *Journal of Natural Products*, *64*, 1095–1097.

Kyung, K., Sung, S., Park, J., Hyun, S., Lee, K., & Kim, Y. (2005). In vitro Neuroprotective Activities of Phenylethanoid Glycosides from Callicarpa dichatoma. *Planta Medica*, *71*, 778–780. https://doi.org/10.1055/s-2005-871213

Lankelma, J. M., Voorend, D. M., Barwari, T., Koetsveld, J., Van der Spek, A. H., De Porto, A. P. N. A., … Van Noorden, C. J. F. (2010). Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sciences*, *86*(7–8), 225–233. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.11.016

Lecaille, F., Brömme, D., & Lalmanach, G. (2008). Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie*, *90*(2), 208–226. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.011

Machado, M. A. (2015). Metabólitos Secundarios de Eriotheca pubescens (Malvaceae): Actividades e Inhibitoria de Catepsinas.

Mallat, E., & Barcelo, D. (1998). Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography – post-column derivatization with fluorescence detection. *Chromatography*, *823*, 129–136.

Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Qualitative Phytochemical Screening. *Essentials of Botanical Extraction*, 173–185. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802325-9.00009-4

Mareggiani, G. (2001, June). Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioqu'micas de origen vegetal, *2*, 22–30.

Martínez, E. (2010). *Tema 11. métodos físicos de separación y purificación 1.*

Mayworm, M. A. S., & Salatino, A. (1996). Fatty acid composition of "cerrado" seed oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *72*(2), 226–230. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199610)72:2<226::AID-JSFA649>3.0.CO;2-U

Miño, G., & Jadán, M. (2007). Investigación fitoquímica e Identificación de principios activos en seis especies en seis especies del género Baccharis. *Facultada de Ingeniería En Biotecnología.ESPE. Sede Sangolquí*.

Miranda, M., & Cuellar, A. (2001). *Farmacognosia y productos naturales* (Félix Vare). La Abana.

Moreno, N. C., & Jaramillo, B. C. (2017). ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE Pachira quinata (Jacq.) W.S. Alverson, Bogotá, Colombia. *Boletín Semillas Ambientales*, *11*(1), 30–39.

Moustafa, S. M., Menshawi, B. M., Wassel, G. M., Mahmoud, K., & Mounier, M. (2014). Screening of some Plants in Egypt for their Cytotoxicity against four Human Cancer

cell lines. *International Journal of PharmTech Research*, *6*(3), 1074–1084.

Muñoz-Cazares, R. (2013). *Estudio Fitoquímico Y Evaluación De La Actividad Inhibidora Del S | 123dok*. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.

Orantes, E. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibea yunckeri Standley Subsp. izabalensis W.S. Alverson ex Véliz (bombacaceae)*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Retrieved from http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2698.pdf

Organization World Health. (2005). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional.

Pariza, M., Park, Y., & Cook, M. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, *40*(4), 283–298. https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00008-X

Phillipson, J. D. (2007). Phytochemistry and pharmacognosy. *ScienceDirect*, *68*, 2960–2972. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.028

Pineda, X. (2015). *Evaluacion Fitoquímica, actividad antimicrobiana y letal del tebeérculo Eriotheca sp con potencial farmacológico*. Universidad Técnica de Machala.

Prashant, T., Bimlesh, K., & Harleen, K. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Sciencia*, *1*(1).

Prieto, S., Garrido, G., González, J., & Molina, J. (2014). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria, (November).

Priscila Severino, R., Cezar Vieira, P., & Fapesp, B. (2008). *Busca de Produtos Naturais como Inibidores Específicos de Enzimas*. Universidad Federal de San Carlos .

Quirós, M. (2006). Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases (Universida, Vol. 10). Costa Rica.

Ramírez, N., Valencia, R., & Vivas, R. (2015). Predicción del punto de fusión de indoles con base en la estructura molecular usando redes neuronales artificiales, 197–204.

Ramos Corrales, P. C. (2016, October 20). *"Balsa"* Ochroma pyramidale *(Cav. ex Lam.) Urb. (Bombacaceae)*. Universidad Nacional de la Plata. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/56011

Refaat, J., Desoky, S. Y., Ramadan, M. A., Kamel, M. S., Refaat, J., Desoky, S. Y., … Kamel, M. S. (2017). *Bombacaceae : A phytochemical review Bombacaceae : A phytochemical review* (Vol. 209). https://doi.org/10.3109/13880209.2012.698286

Rodríguez, E., Alvítez, E., Pollack, L., Huamán, E., & Sagástegui, A. (2016). Notas sobre Malvaceae subfamilia Bombacoideae en la región La Libertad , Perú, (April).

Schapoval, E. E. ., Winter de Vargas, M. R., Chaves, C. G., Bridi, R., Zuanazzi, J. A., & Henriques, A. T. (1998). Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from Stachytarpheta cayennensis. *Journal of Ethnopharmacology*, *60*(1), 53–59. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00136-0

Senthilkumar, N., Murugesan, S., & Vijayalakshmi, K. B. (2012). GC-MS-MS analysis of Trichilia connaroides (Wight & Arn.) Bentv (Meliaceae): A tree of ethnobotanical records. *Asian Journal of Plant Science and Research*, *2*(2), 193–197. Retrieved from http://www.imedpub.com/articles/gcmsms-analysis-of-trichilia-connaroides-wight--arn-bentv-meliaceae-a-tree-of-ethnobotanical-records.pdf

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo.

Sharma, B. (2007). *Chromatography* (Fifth Edition).

Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, *99*(1), 69–73. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046

Spangenberg, B., Poole, C. F., & Weins, C. (2011). *Quantitative thin-layer chromatography : a practical survey*. Springer.

Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., de la Cruz Rot, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *12*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4

Tropicos. (n.d.). Eriotheca ruizii (K. Schum.) A. Robyns. Retrieved January 31, 2018, from http://www.tropicos.org/Name/3900655

Tundis, R., Rashed, K., Said, A., Menichini, F., & Loizzo, M. R. (2014). In vitro cancer cell

growth inhibition and antioxidant activity of Bombax ceiba (Bombacaceae) flower extracts. *Natural Product Communications*, *9*(5), 691–694. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25026723

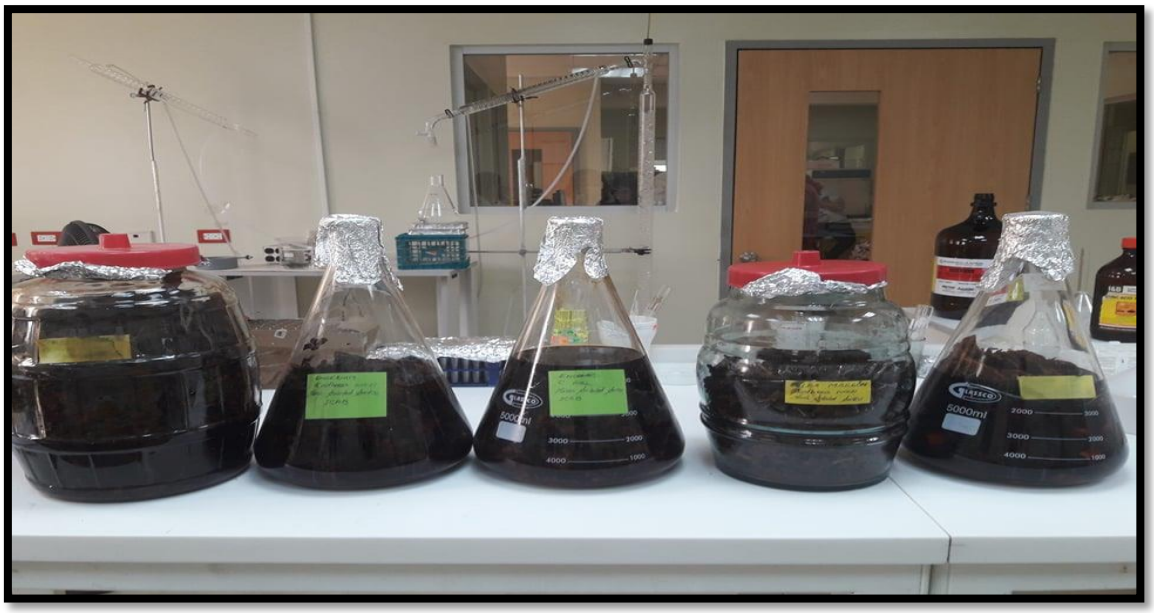
Valcárcel, J., González, H., & Valcárcel, D. (2017). Espectroscopia. fundamento de la resonancia magnética nuclear, (21), 89–94.

Wang, Y. S., Liao, Z., Li, Y., Huang, R., Zhang, H. B., & Yang, J. H. (2011). A new megastigmane diglycoside from litsea glutinosa (Lour.) C. B. Rob. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *22*(11), 2234–2238. https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001100030

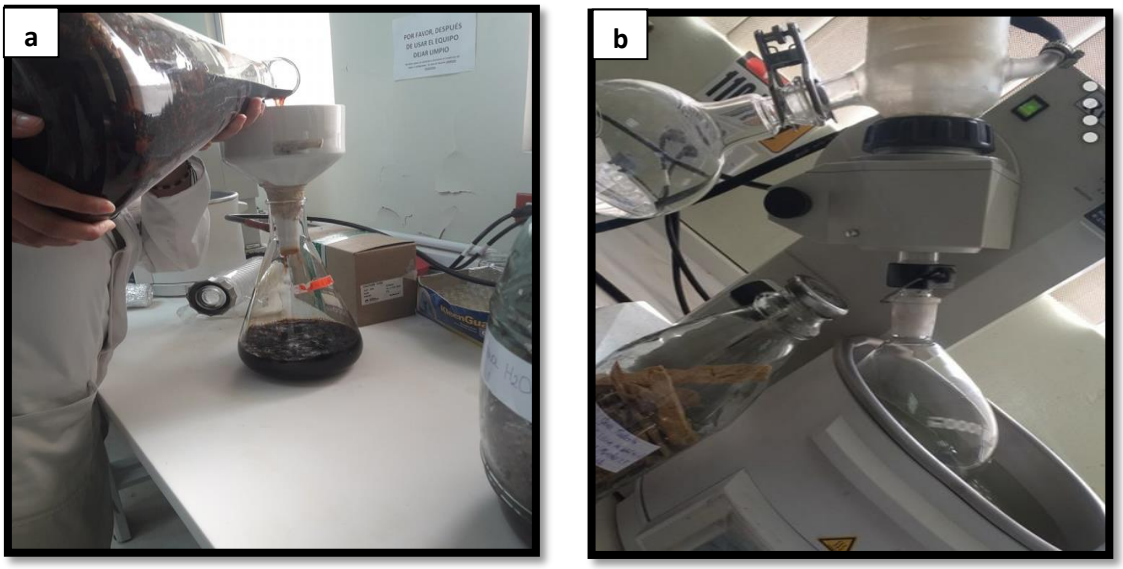
Wong, I. Y. F., He, Z.-D., Huang, Y., & Chen, Z.-Y. (2001). Antioxidative Activities of Phenylethanoid Glycosides from *Ligustrum purpurascens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(6), 3113–3119. https://doi.org/10.1021/jf0100604

Zaky, M., Fasihuddin, A., Ho, W.-S., & Pang, S.-L. (2014). GC -MS ANALYSIS OF PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS IN LEAF EXTRACTS OF NEOLAMARCKIA CADAMBA (RUBIACEAE) FROM MALAYSIA. *International Journal of Pharmacy Research Science*, *6*(9), 5.

ANEXOS

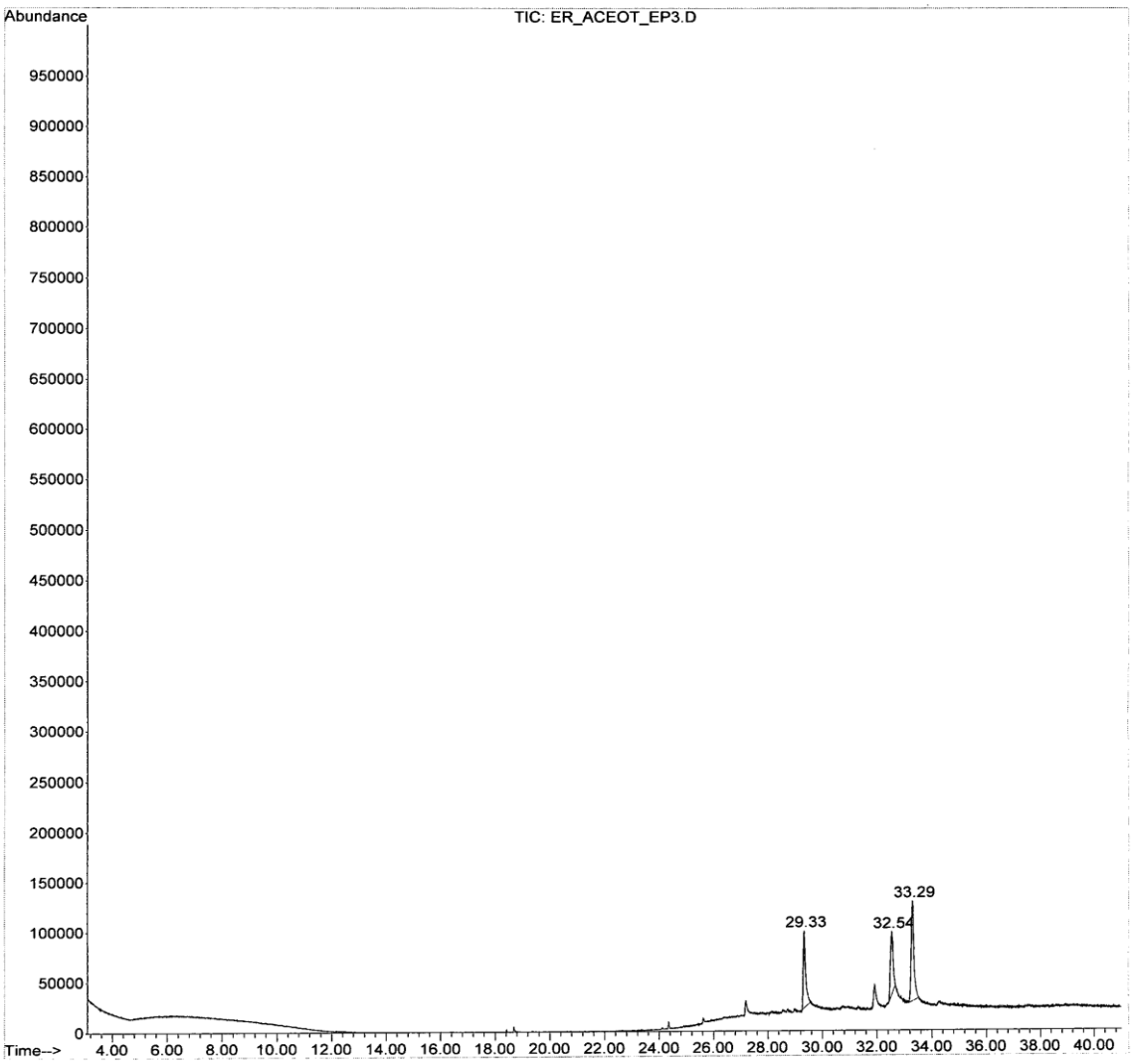


Anexo 1. Maceración estática de las segmentaciones del tubérculo *Eriotheca ruizii*.

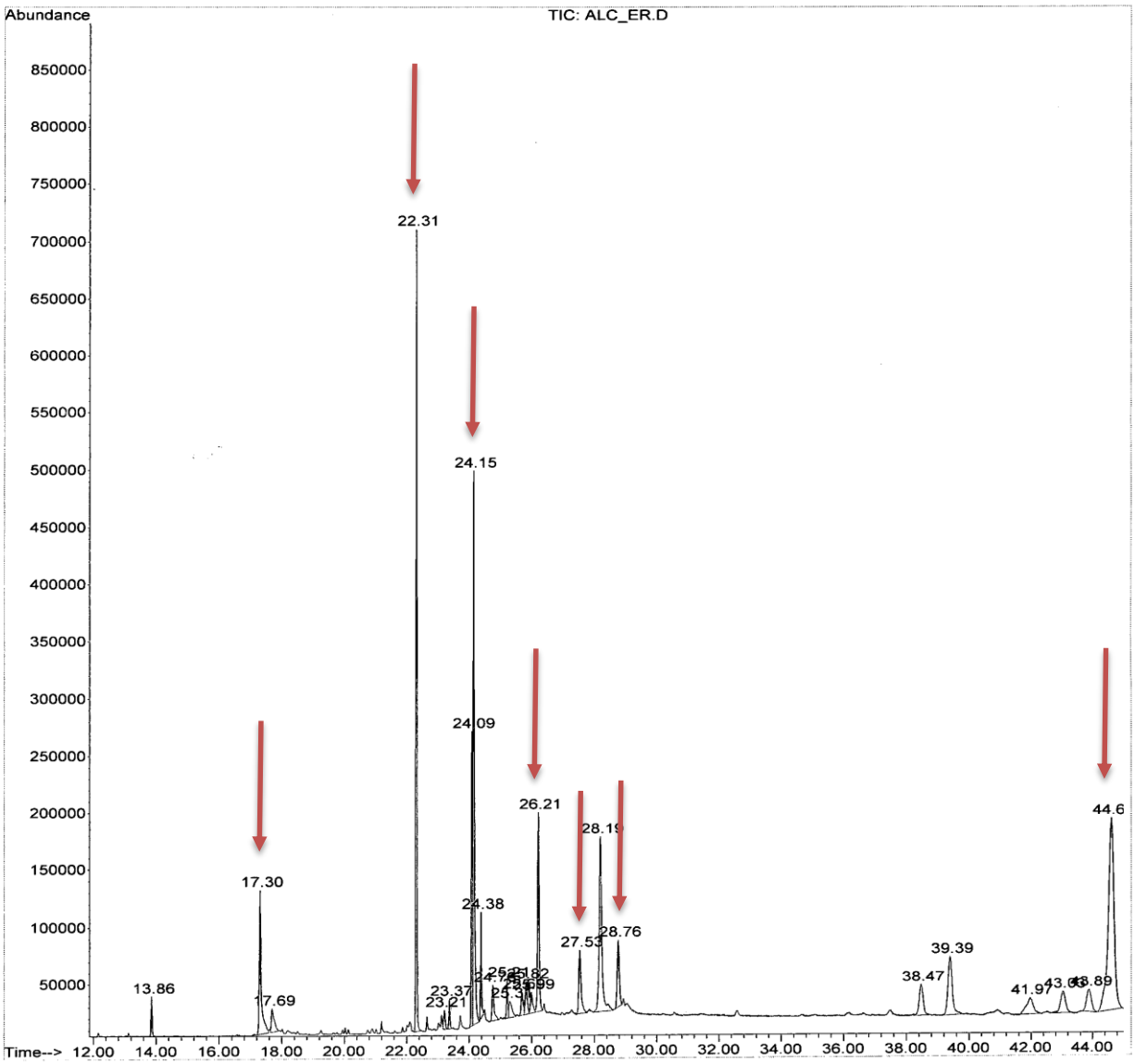


Anexo 2. (**a**) Filtración y (**b**) rotaevaporación al vacío de los extractos de *Eriotheca ruizii*.

Anexo 3. Cromatografía de Columna Abierta del extracto metanol- cortex marrón de *Eriotheca ruizii.*

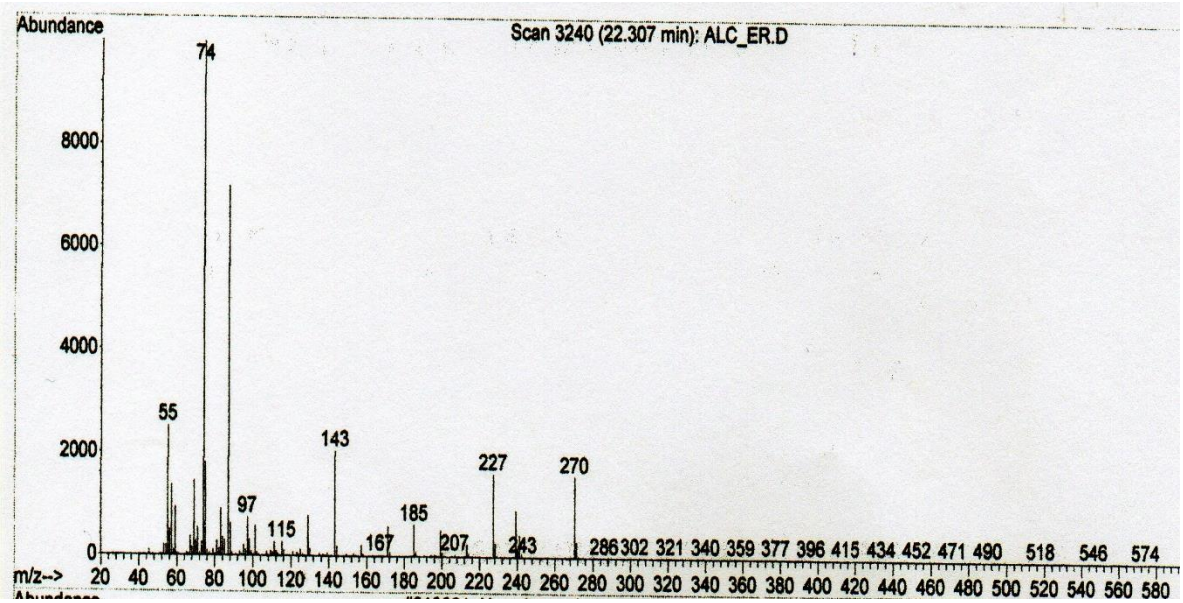


Anexo 4. Espectro de masas de los compuestos pertenecientes a la mezcla Er_AcOEt_EP_Fr6F1F7 con tR = 29.33 min., 32.54 min, 33.29 min.

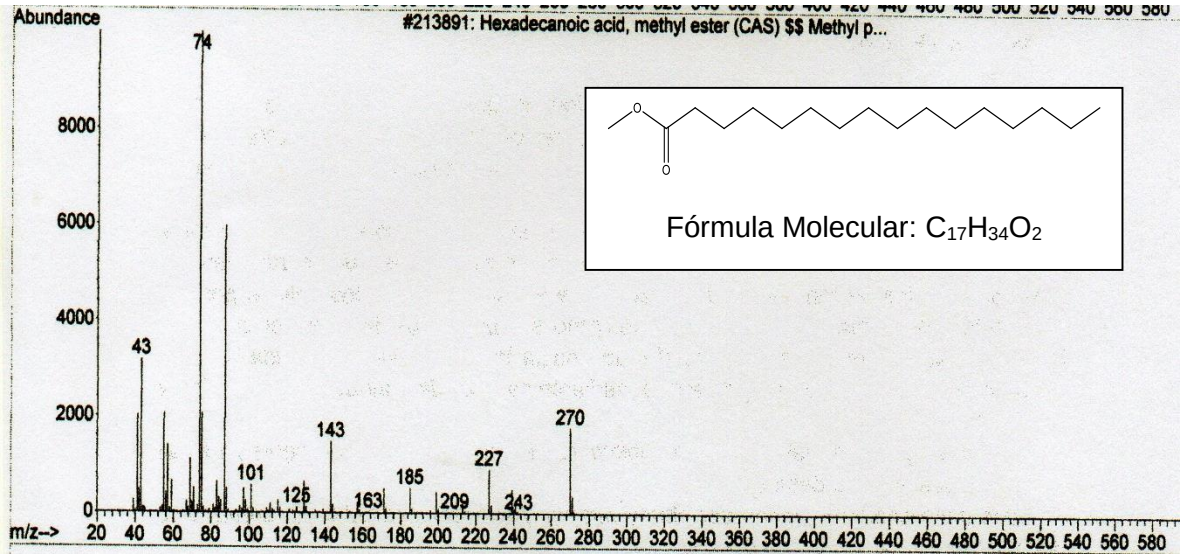


Anexo 5. Espectro de CG de la fracción alcaloidea en pH 8, se muestran los 12 tiempos de retención destacando, tR 13.86, 17.30, 17.69, 22.31, 23.21, 23.37, 24.09, 24.15, 24.38, 24.76, 25.21, 25.31, 25.69, 25.82, 25.99, 26.21, 27.53, 28.19, 28.76, 38.47, 39.39, 41.97, 43.03, 43.89, 44.62 minutos, flecha indica los espectros que tienen masas impares, que podrían ser alcaloides.

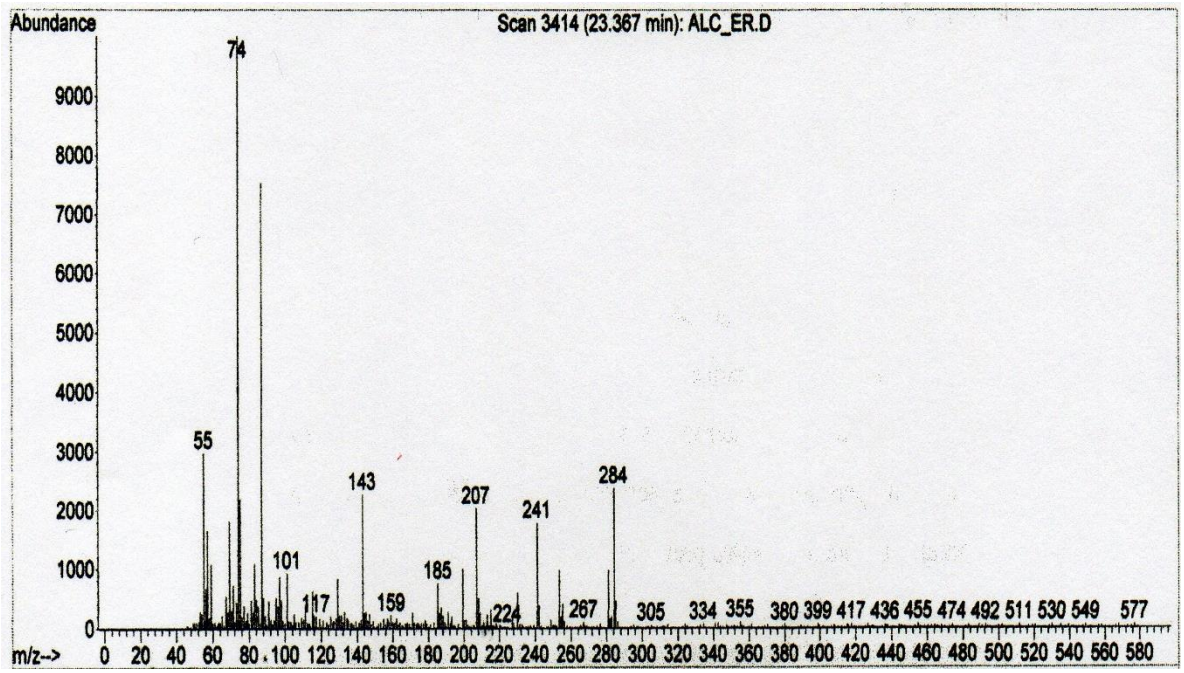
Anexo 6. Espectro de masas de los compuestos identificados en la fracción alcaloideas en pH 8.



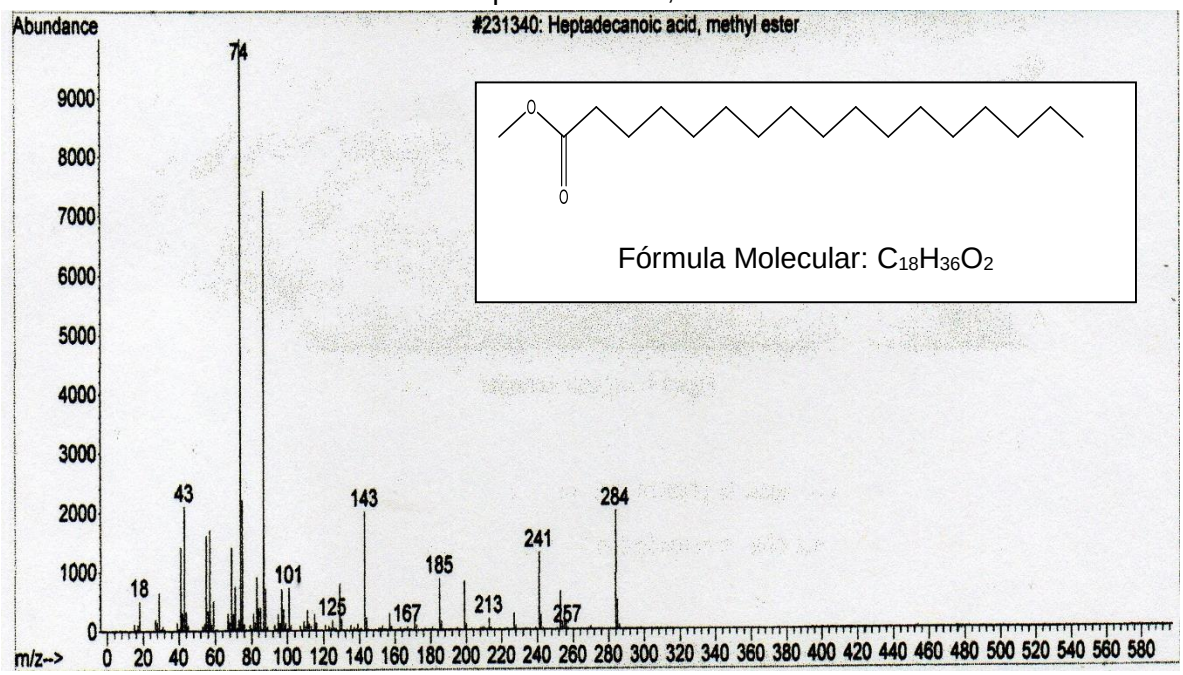
Anexo 6a. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como éster metílico del ácido palmítico, con tR = 22.31 min.



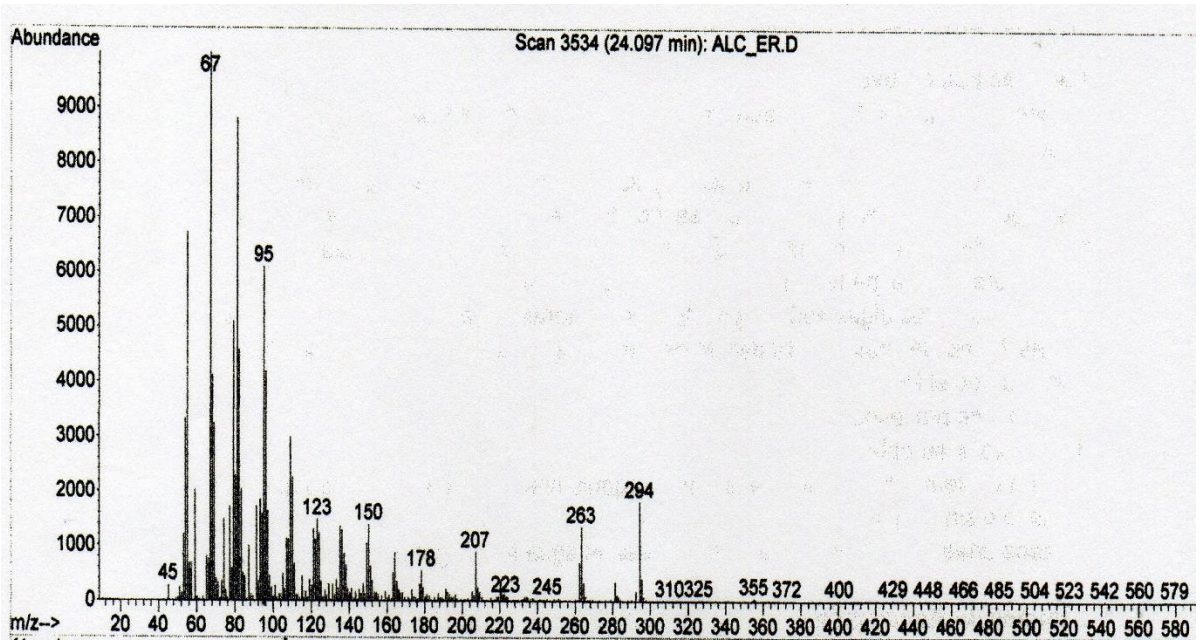
Anexo 6b. Espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico, base de datos Wiley 7n.l



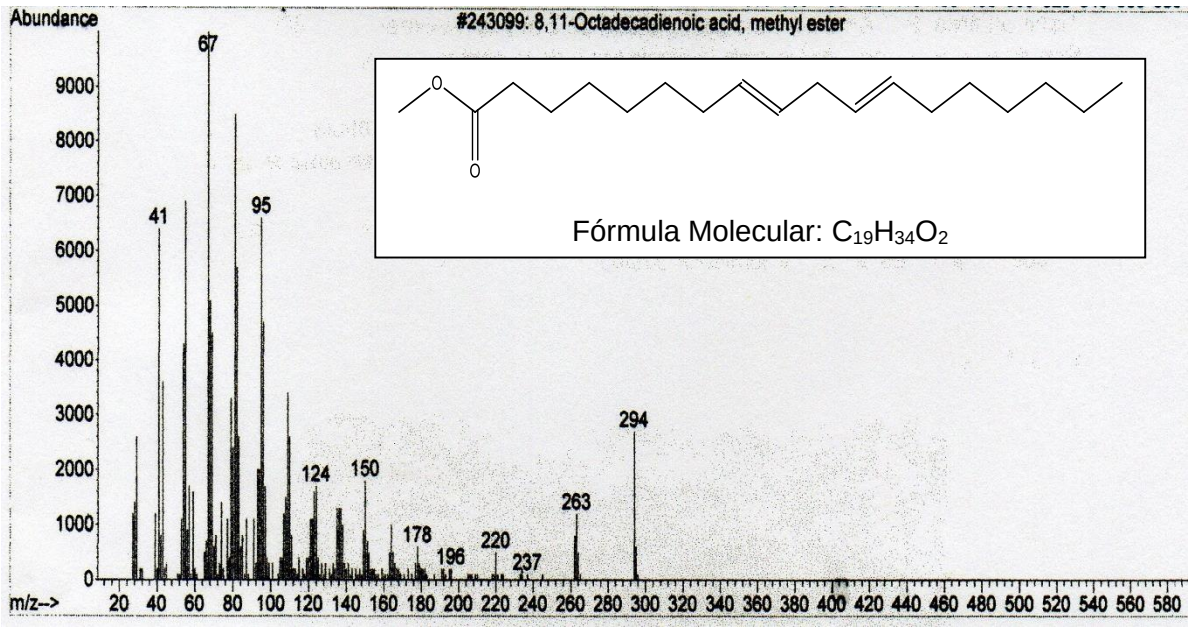
Anexo 6a. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como ester metílico del ácido heptadecanoico, tR = 23.37 min.



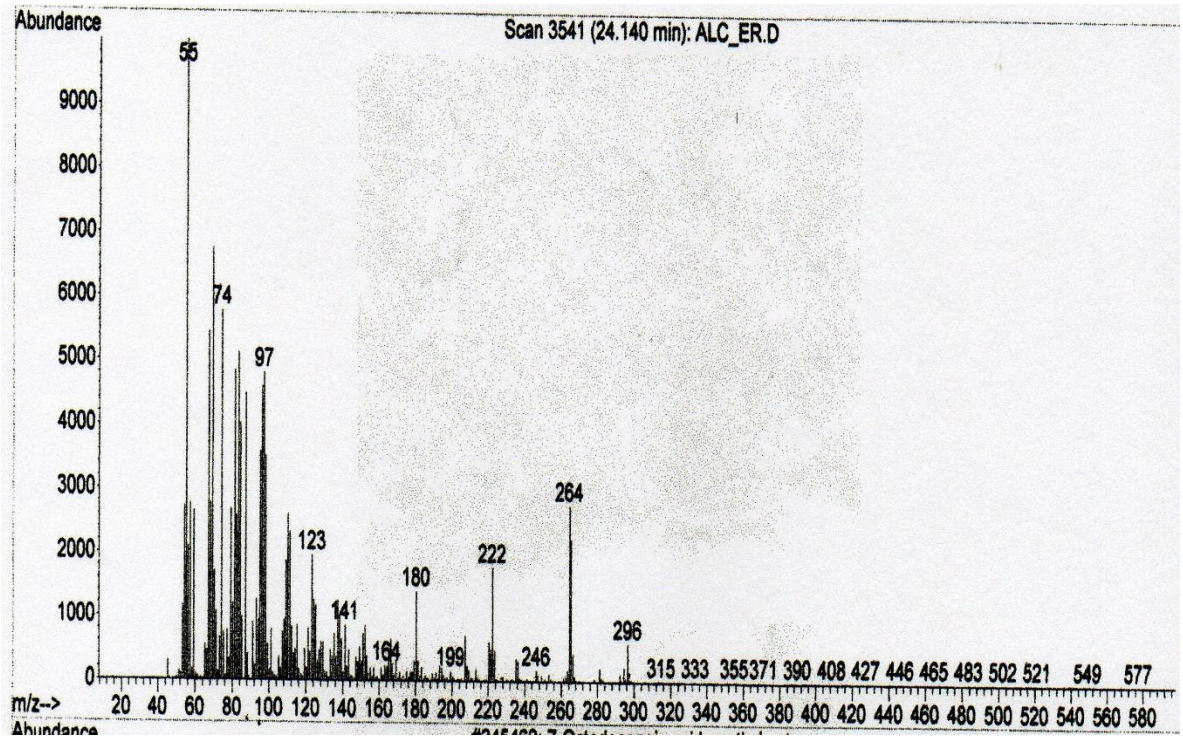
Anexo 6b. Espectro de masas del éster metílico del ácido heptadecanoico, base de datos Wiley 7n.l



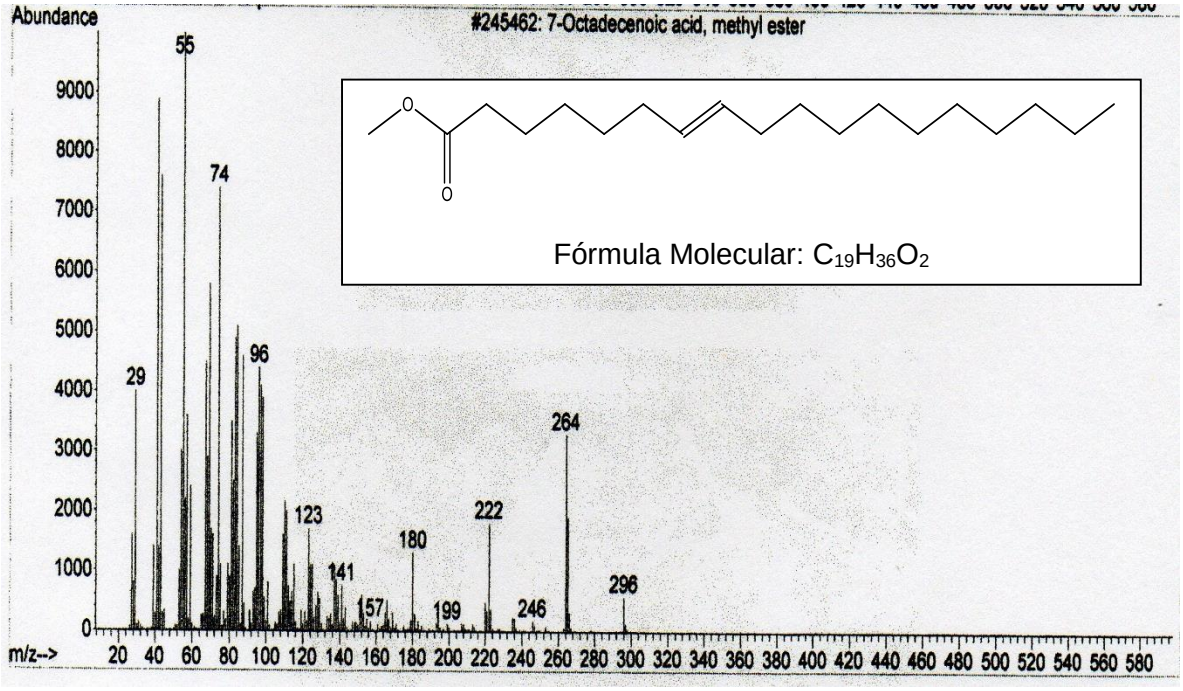
Anexo 6a. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como éster metílico del acido 8,11 octadecadienoico, tR de 24.09 min.



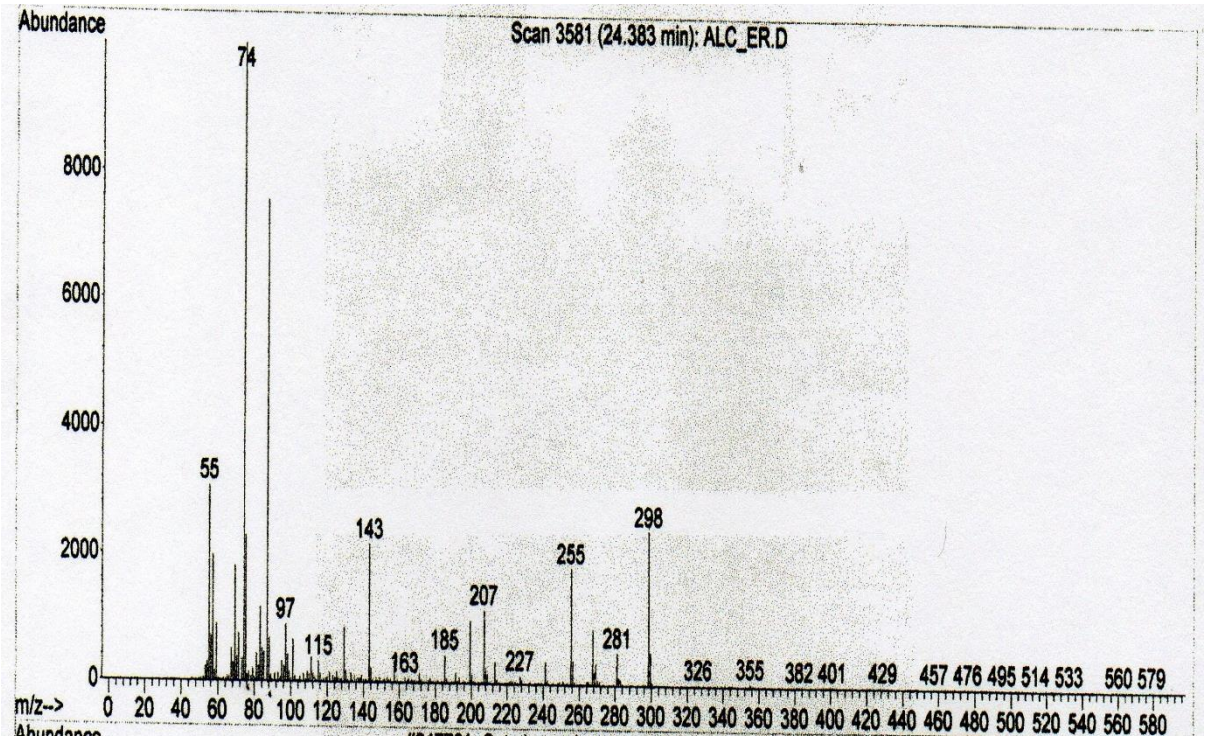
Anexo 6b. Espectro de masas del compuesto éster metílico del acido 8, 11 octadecadienoico, base de datos Wiley 7n.l



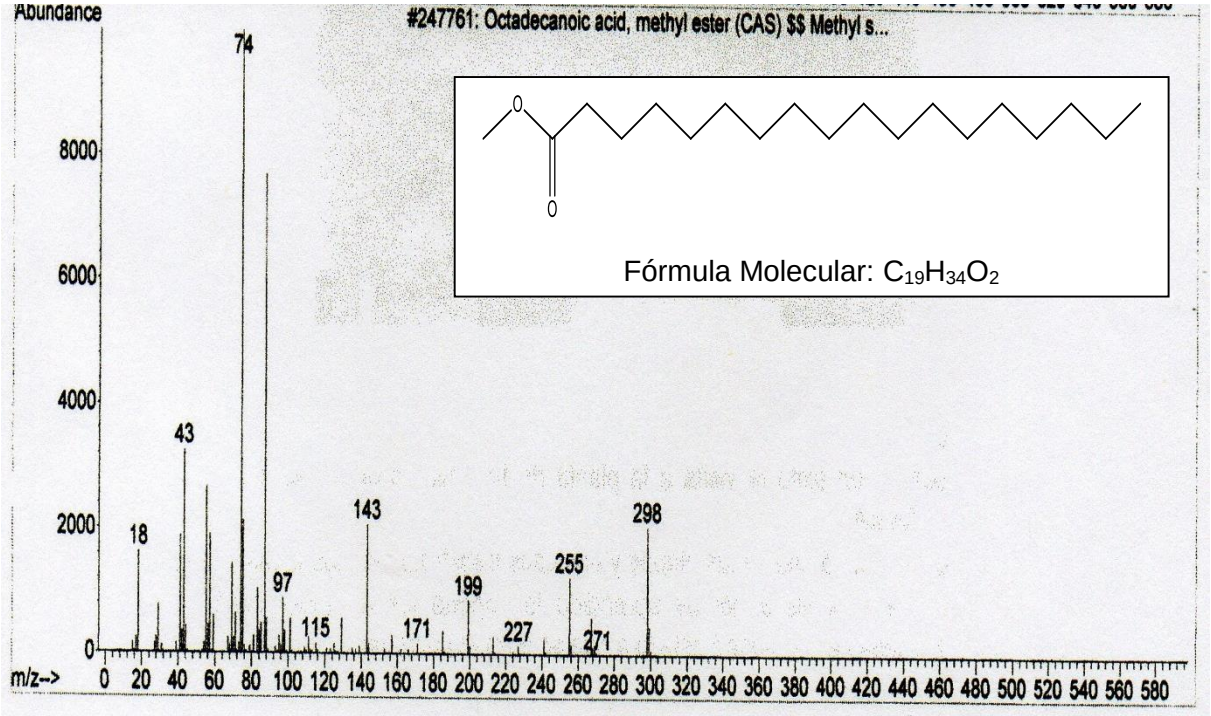
Anexo 6a. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como éster metílico del ácido 7- octadecenoato, tR de 24.15 min.



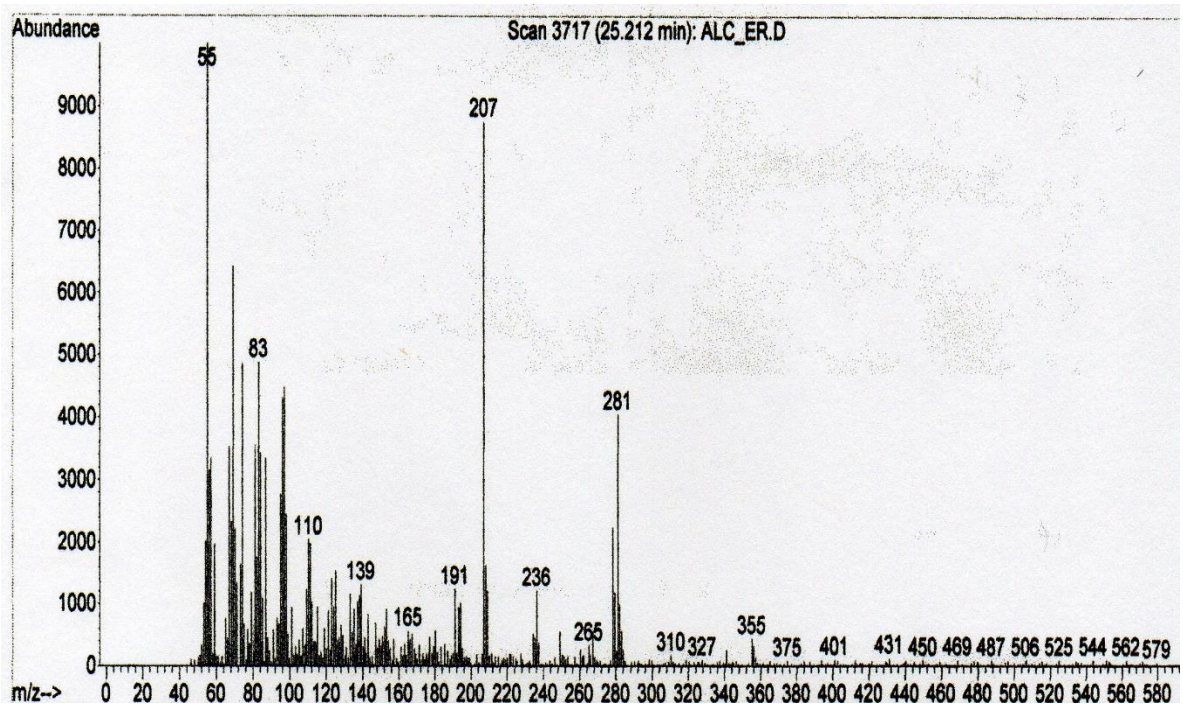
Anexo 6b. Espectro de masas del éster metílico del ácido 7- octadecenoato, base de datos Wiley 7n.l



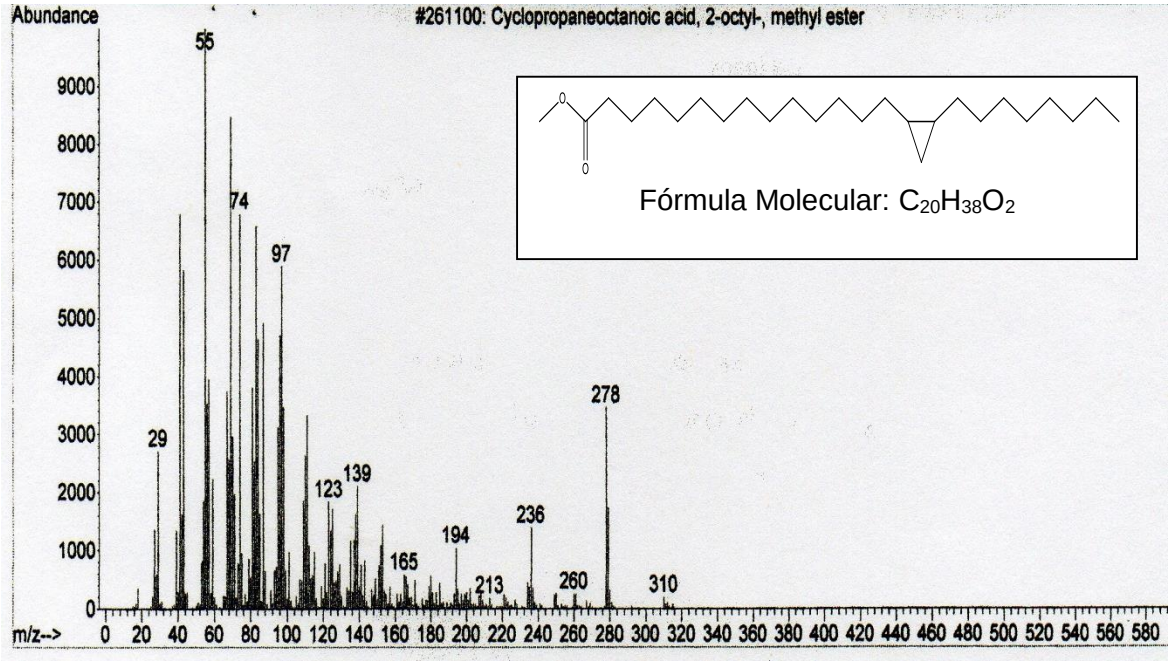
Anexo 6a. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como éster metílico del ácido octadecenoico, tR = 24.38 min.



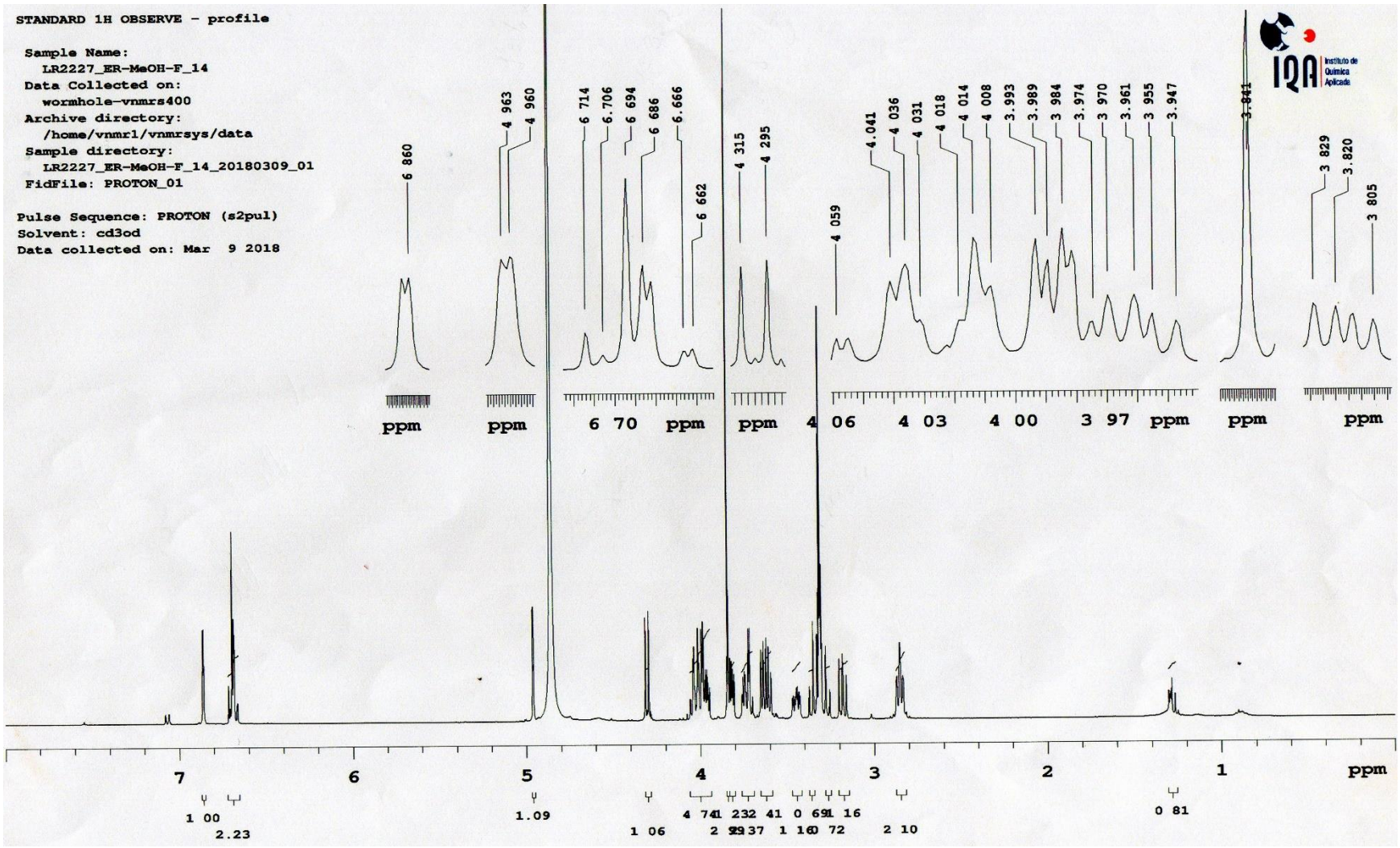
Anexo 6b. Espectro de masas del éster metílico ácido del octadecenoico, base de datos Wiley 7n.l



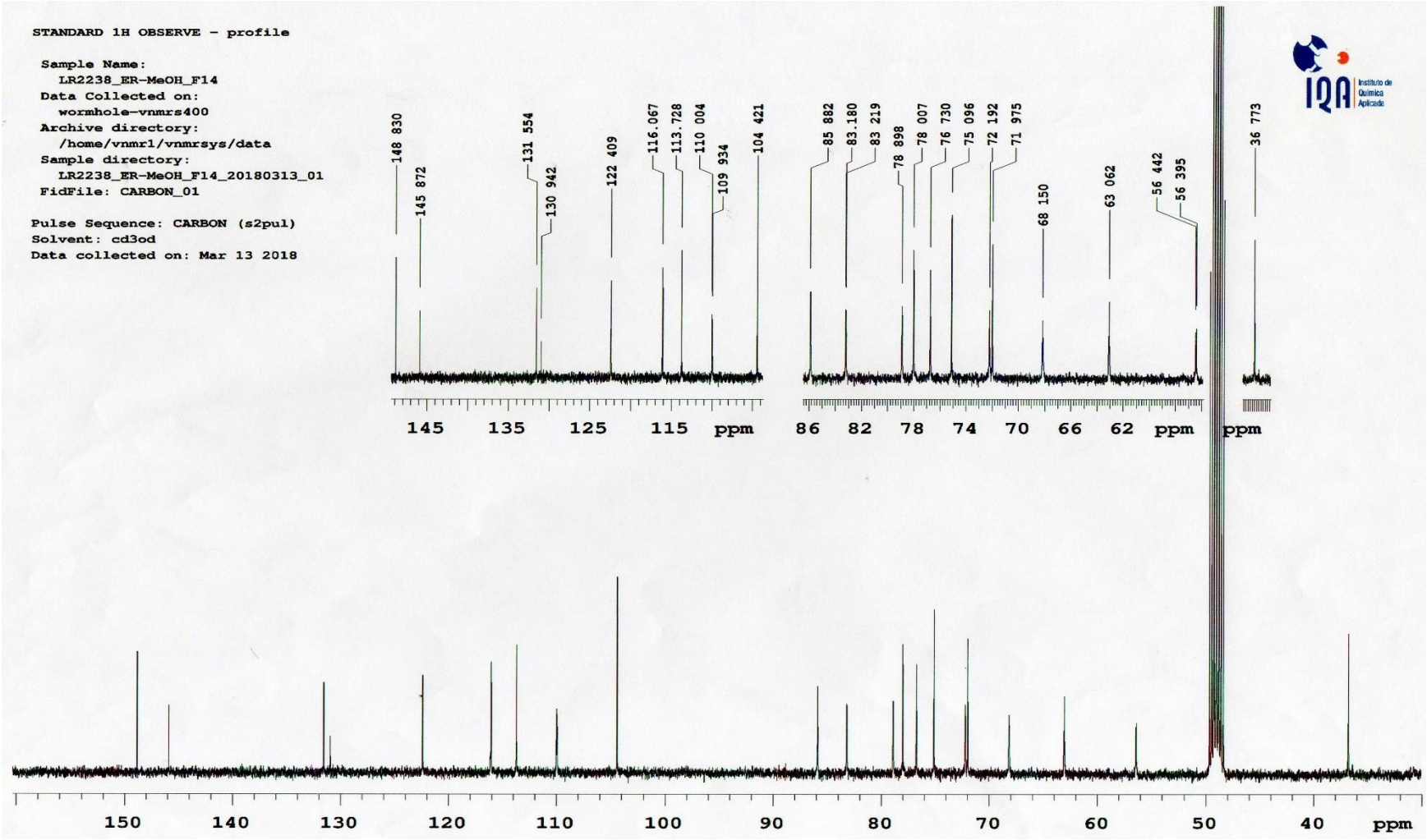
Anexo 6a. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como éster metílico del acido 8-ciclopropiloctanoico, 2-octil, tR = 25.21min.



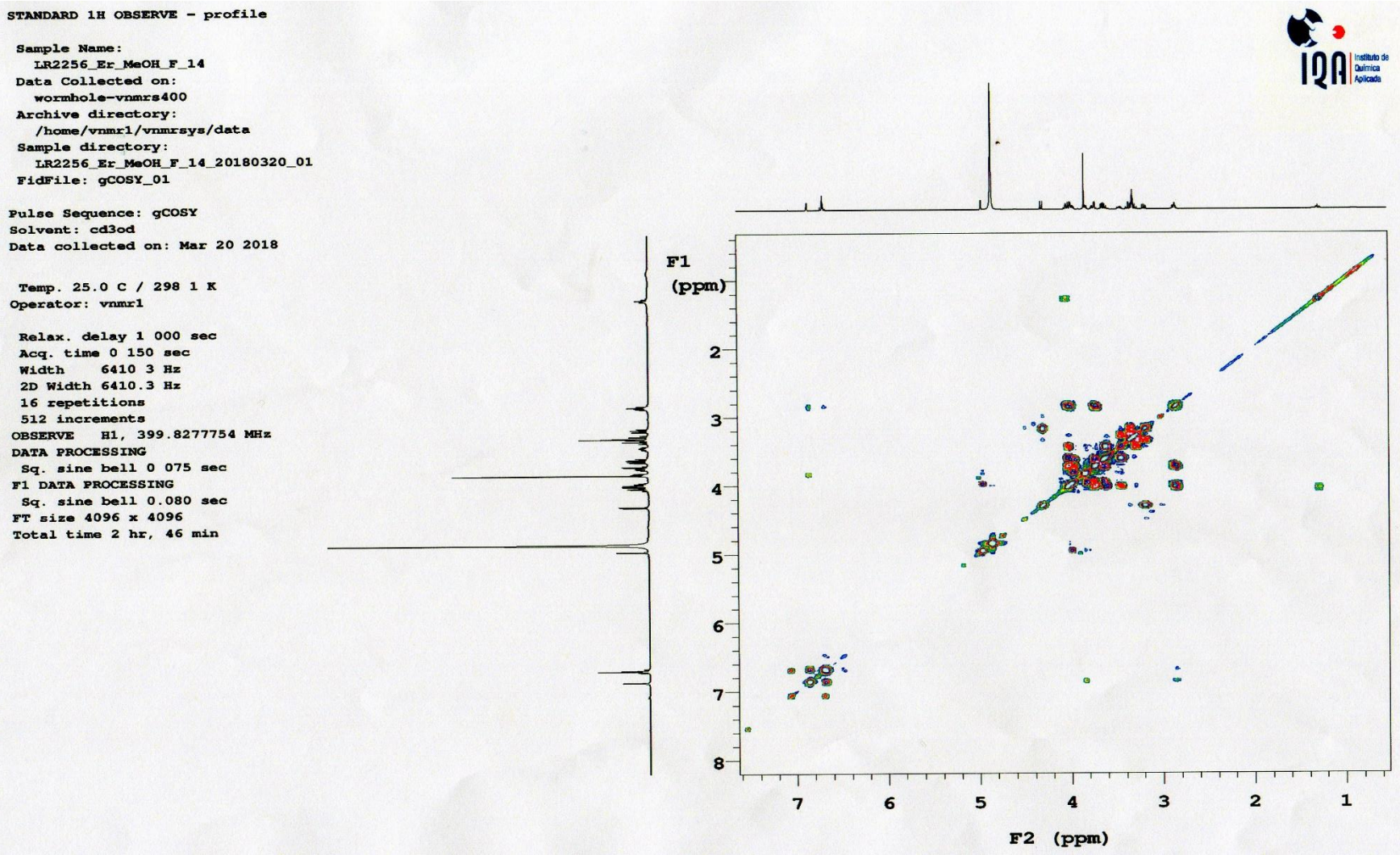
Anexo 6b. Espectro de masas del éster metílico del ácido 8-ciclopropiloctanoico, base de datos Wiley 7n.l



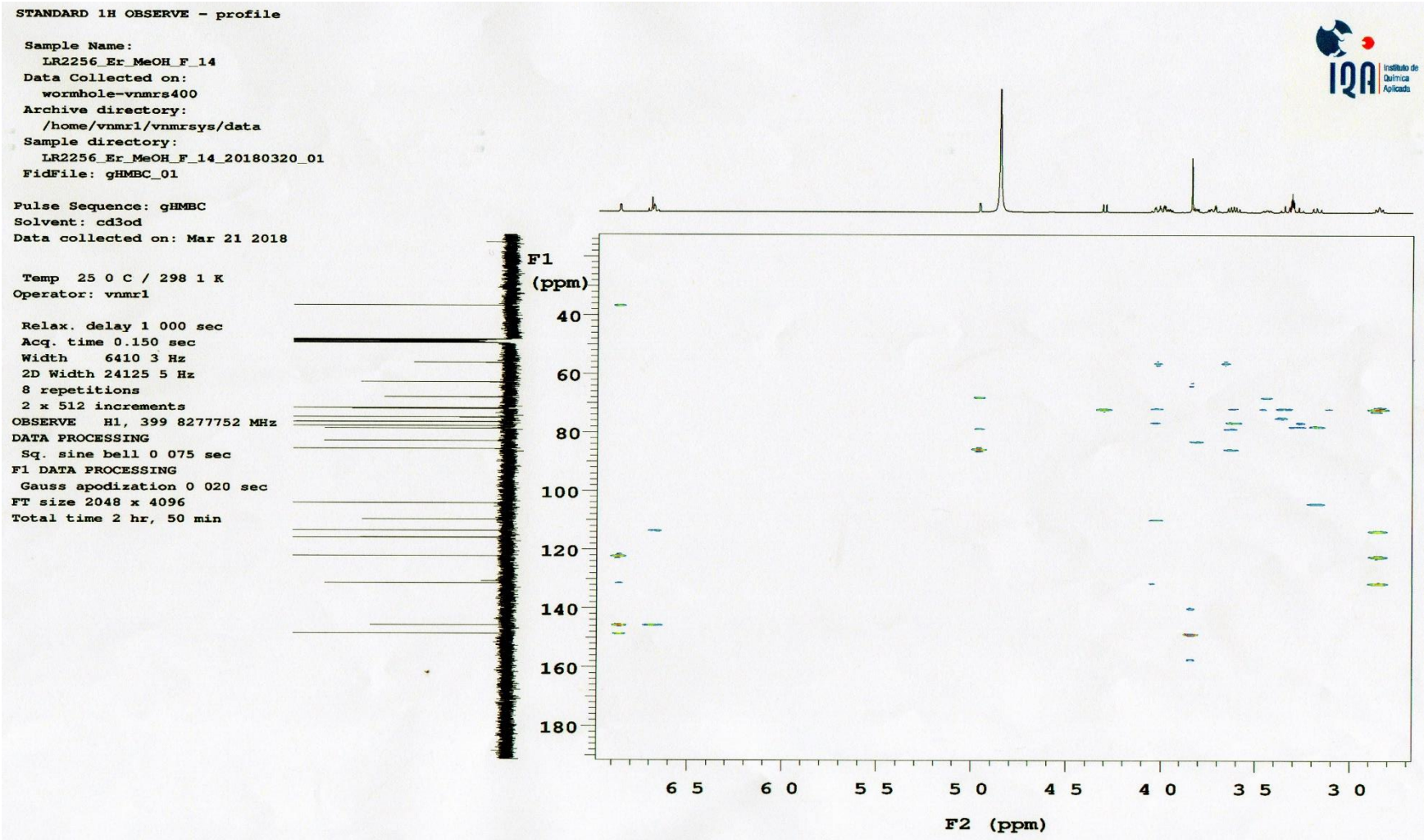
Anexo 7. Espectro de ¹H- RMN del compuesto arabinofuranosil-(l"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil del extracto de metanol-córtex blanco



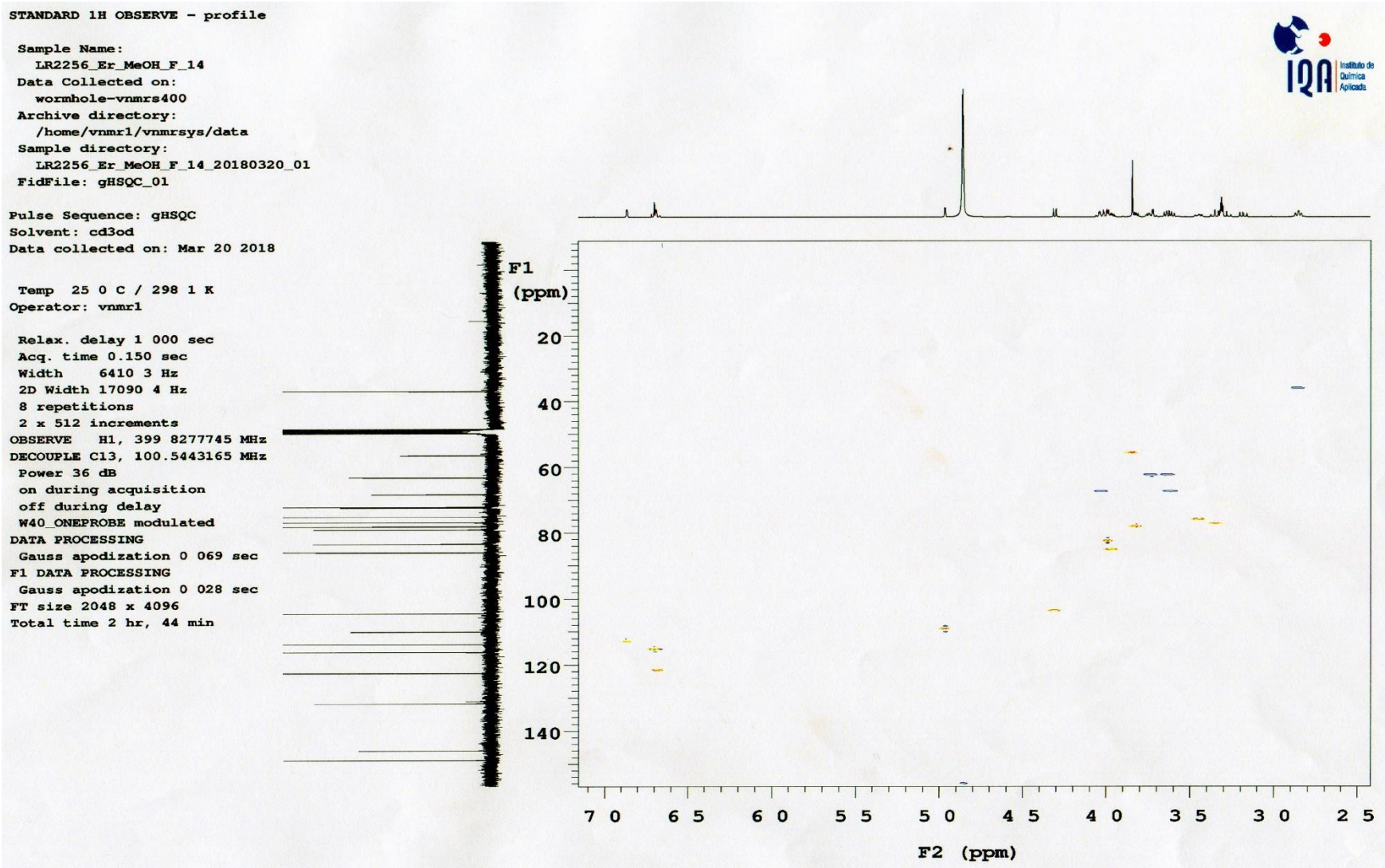
Anexo 8. Espectro de ^{13}C-RMN del compuesto arabinofuranosil-(I"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil del extracto de metanol-córtex blanco.



Anexo 11 Espectro de COSY del compuesto arabinofuranosil-(I"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil del extracto de metanol-córtex blanco.



Anexo 10 Espectro de HMBC del compuesto arabinofuranosil-(I"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil del extracto de metanol-córtex blanco.



Anexo 11 Espectro de HSQC del compuesto arabinofuranosil-(I"→6')-glucopiranosil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetil del extracto de metanol-córtex blanco.