

## **INFORME FINAL**

### **NOMBRE DEL INVESTIGADOR**

**Dra. Haydelba Trinidad D'Armas Regnault**

### **NOMBRE DEL PROYECTO**

**Evaluación de productos naturales orgánicos con posible actividad biológica, de las plantas medicinales Hierbaluisa (*Lyppia citriodora*, familia Verbenaceae) y Toronjil (*Melissa officinalis*, familia Labiatae)**

### **ÁREA DE DESARROLLO**

**Ciencias de la Vida**

### **NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN DE ACOGIDA**

**Universidad Técnica de Machala**

**PERIODO DE VINCULACIÓN 18/02/2014 13/02/2015**

#### **Citar:**

**Evaluación de productos naturales orgánicos con posible actividad biológica, de las plantas medicinales Hierbaluisa (*Lyppia citriodora*, familia Verbenaceae) y Toronjil (*Melissa officinalis*, familia Labiatae). Universidad Técnica de Machala. Periodo de Vinculación: 18/02/2014 13/02/2015**

## Contenido

INTRODUCCIÓN .....	2
MARCO TEÓRICO.....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	10
DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	12
JUSTIFICACIÓN .....	14
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
RESULTADOS OBTENIDOS.....	17
PAPER INDEXADO O ARTÍCULO CIENTÍFICO PUBLICADO .....	17
1.    CONTRIBUCIÓN AL PLAN DEL BUEN VIVIR .....	61
2.    DESCRIPCIÓN DE PRODUCTOS ALCANZADOS .....	61
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	68
LIMITACIONES .....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS.....	72

# INFORME FINAL DE ACTIVIDADES

## INTRODUCCIÓN

### Tema y los objetivos

Mi proyecto de Investigación titulado: “**Evaluación de productos naturales orgánicos con posible actividad biológica, de las plantas medicinales Hierbaluisa (*Lyppia citriodora*, familia Verbenaceae) y Toronjil (*Melissa officinalis*, familia Labiatae)**”, se basó en la necesidad de investigar la composición química de las plantas mencionadas previamente y sus efectos antibacteriano, antifúngico y citotóxico, debido al uso ancestral de las mismas en Ecuador, y a la ausencia de reportes en la literatura sobre los metabolitos secundarios y bioactividad de estas especies vegetales cultivadas en este país. Estudios han demostrado que la producción o biosíntesis de compuestos bioactivos constituyen el mecanismo de defensa de las plantas y depende del hábitat donde la misma se desarrolla o sea de las condiciones ambientales, tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes, entre otros.

### Objetivo General

"Evaluar la presencia y bioactividad de algunos metabolitos secundarios en dos plantas recolectadas en la zona sur del Ecuador"

### Objetivos Específicos

Los objetivos específicos se agruparon siguiendo las áreas de la Matriz de Planificación de los Investigadores del Programa Prometeo

#### *1 Investigación*

##### 1.1. Objetivos específicos

1.1.1. Obtener los extractos crudos de las hojas y tallo de la planta con solventes de diferentes polaridades.

1.1.2. Caracterizar fitoquímicamente los diferentes extractos obtenidos, para detectar la presencia de algunos grupos de metabolitos secundarios en las diferentes partes botánicas de la especie.

1.1.3. Determinar la actividad biológica de los extractos, fracciones y/o compuestos a obtener de la planta estudiada, por medio de bioensayos de actividad antibacteriana y letalidad.

1.1.4. Aislar, en lo posible, los metabolitos secundarios presentes en la planta, mediante uso de técnicas cromatográficas.

1.1.5. Caracterizar químicamente los metabolitos secundarios mediante las técnicas espectroscópicas convencionales.

## ***2. Capacitación científica en el área pertinente a su especialidad (dirigida a estudiantes y profesores de la institución)***

### ***2.1. Objetivos específicos***

2.1.1. Asesorar a estudiantes de pre y post-grado, en la realización de sus tesis de grado, para llevar a cabo una investigación en el área de Lípidos y Productos Naturales Orgánicos, provenientes de plantas terrestres y organismos marinos

## ***3 Asesoría en la elaboración de políticas públicas (No Aplica)***

## ***4 Docencia a impartir (dirigida a estudiantes)***

### ***4.1. Objetivos específicos***

4.1.1 Proporcionar al alumno una visión general de los Productos Naturales Orgánicos y sus características estructurales, biosintéticas, ecológicas y farmacológicas.

## ***5 Asesoría y diseño de programas de postgrado (No Aplica)***

## ***6 Gestión de recursos nacionales e internacionales (No Aplica)***

## ***7 Relacionamiento estratégico interinstitucional a nivel nacional e internacional***

### ***7.1. Objetivos específicos***

7.1.1. Fomentar el establecimiento de una red de investigación y transferencia de conocimientos científicos en el área de los Productos Naturales con la Universidad de Oriente (Venezuela) y en el área de los Productos Naturales Marinos y Ecología Química con el Instituto Oceanográfico de Venezuela.

7.1.2. Promover el intercambio de conocimientos científicos y tecnológicos entre el grupo de investigación en el área de los Productos Naturales y campos afines de la Universidad Técnica de Machala, con otros grupos de investigación relacionada con esta área, perteneciente a otras Instituciones Universitarias ecuatorianas.

### **Hipótesis y breve justificación**

Hipótesis: Los constituyentes químicos o metabolitos secundarios o principios activos presentes en las plantas hierba luisa (*Lyppia citriodora*) y toronjil (*Melissa officinalis*), cultivadas y de uso medicinal en Ecuador, son responsables de la bioactividad que estas poseen.

El contenido en principios activos es muy importante para valorar una planta medicinal, cosa que depende tanto de la variedad como de las condiciones donde ha crecido la planta. Es decir, la producción de dichos compuestos bioactivos por las plantas, está muy relacionado con el hábitat donde crecen las especies vegetales, entiéndase el tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes, depredadores, entre otros, ya que los metabolitos del metabolismo secundario son biosintetizados por las mismas, como un mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros, etc., y supervivencia en el medio donde éstas se desarrollan.

Es importante investigar la composición química y propiedades biológicas de *L. citriodora* y *M. officinalis*, por no existir informes en la literatura científica sobre la química y bioactividad de estas especies cultivadas en Ecuador, a pesar de que son ampliamente utilizadas para fines terapéuticos.

### **Descripción breve de lo que se hizo**

Se alcanzó el objetivo principal de esta investigación, el cual consistió en caracterizar químicamente los metabolitos secundarios o principios activos con actividad biológica, presentes en las plantas hierba luisa (*L. citriodora*) y toronjil (*M. officinalis*) cultivadas en la zona Sur de Ecuador, cuyos resultados han conducido a la producción de varios artículos

científicos, su aceptación y presentación en Congresos Internacionales (31st Congreso Latinoamericano de Química-CLAQ2014 y VII FIRMA), su publicación en revistas científicas, la producción de Proyectos de Investigación, entre otros.

Es importante señalar que los resultados obtenidos de esta investigación constituyen un aporte científico valioso para la validación del uso medicinal de ambas plantas, debido a que se les extrajeron sus aceites esenciales, separaron e identificaron los principios activos en extractos de hojas y esencias. El contenido en principios bioactivos es muy importante para valorar una planta medicinal, cosa que depende tanto de la variedad como de las condiciones ambientales y del suelo donde ha crecido la planta (hábitat). El hecho de poder identificar químicamente los principios activos de ambas especies vegetales, incrementa la base de datos de productos naturales orgánicos con actividad biológica demostrada, provenientes de plantas medicinales de gran uso terapéutico en Ecuador.

Adicionalmente, en el marco de esta investigación, se realizó un adiestramiento científico, a estudiantes y algunos profesionales, en la realización de análisis fito-químicos (reacciones químicas de caracterización de grupos funcionales, separación cromatográfica por distintas técnicas y caracterización estructural de compuestos químicos por cromatografía de gases con detector de masas) necesarios en el campo de los productos naturales orgánicos y producción de fitofármacos; así como en la realización de pruebas de actividad biológica, tales como actividad antibacteriana y antifúngica, capacidad antioxidante y letalidad o toxicidad aguda contra larvas de *Artemia salina*, y estimación de la calidad microbiológica de plantas. Para tal fin, se están aún desarrollando nueve proyectos de investigación (están en fase final) involucrados en estos aspectos, bajo mi dirección y asesoría académico-científica continua, los cuales constituyen las tesis o trabajos de titulación de nueve estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Unidad de Ciencias Químicas de la UTMACH.

## **MARCO TEÓRICO**

En los últimos años, han sido muy explotados los productos químicos de origen natural, provenientes del reino vegetal, animal y de microorganismos. Sin embargo, los productos

originados de las plantas, pueden ser considerados como una fuente considerable de información para el descubrimiento de nuevos compuestos químicos de uso potencial en la medicina. Un gran número de compañías de investigación, sectores académicos e industrial, aprovechan ciertos indicios suministrados por ciertos grupos étnicos para descubrir y establecer el potencial terapéutico de los denominados fármacos naturales, los cuales son sustancias orgánicas en su mayoría complejas, que a través de procesos biotecnológicos y la automatización de las pruebas farmacológicas, son aisladas y transformadas, si es necesario, para combatir enfermedades.

Muchos de los progresos en la química de los productos naturales orgánicos de origen vegetal, se han alcanzado gracias a la instrumentación y métodos empleados. Muchas familias de plantas distribuidas en zonas tropicales son ricas en metabolitos secundarios confiriéndole una importante actividad biológica, esto ha incrementado en las últimas décadas, las investigaciones acerca de las plantas con propiedades farmacológicas. El fraccionamiento puede, en el mejor de los casos, permitir el aislamiento y posterior identificación de este tipo de compuestos (metabolitos secundarios) con posible actividad biológica, que después pueden servir como drogas de origen natural o como prototipos para la síntesis de sustancias terapéuticamente útiles.

Las plantas producen una sorprendente diversidad de metabolitos secundarios, tales como los alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos, esteroides y glicósidos, los cuales son recursos invaluable, tanto nutracéuticos como farmacéuticos. Los metabolitos secundarios son sintetizados en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, su producción está restringida a determinados géneros de plantas, familias e incluso a algunas especies. Se ha demostrado que los metabolitos secundarios varían dependiendo de la localidad y temporada del año.

La producción farmacéutica en Ecuador a partir de plantas de uso medicinal es escasa, según reportes existentes en la literatura. Los fitomedicamentos producidos son vendidos sin un control de calidad adecuado y sin condiciones adecuadas para la población, ya que es probable que no cumplan con las exigencias de normas internacionales, constituyendo un riesgo para la población. Esta situación también hace que los productos naturales nacionales no compitan con los elaborados por la industria farmacéutica foránea, aun

cuando el país dispone de una gran biodiversidad de plantas medicinales que pueden constituir materias primas para la elaboración de fitomedicamentos con fines comerciales.

Desde hace mucho tiempo la FAO (Food and Agriculture Organization) reconoce la importancia de las plantas medicinales no solo por su valor para el tratamiento de las enfermedades en las poblaciones rurales, sino también por su repercusión como actividad económica, pudiendo incluso generar beneficios a través de la exportación. La FAO recomienda una recolección sostenible de la materia prima vegetal para la obtención de fitofármacos, para asegurar que los recursos sigan estando disponibles y con atención a la conservación de la biodiversidad de las plantas medicinales existentes en Ecuador (FAO, 1983).

Muchos de los usos de las plantas medicinales para tratar enfermedades provienen de los conocimientos tradicionales o saberes ancestrales. La necesidad de la validación y protección de ese conocimiento cobra relevancia por su papel estratégico en la conservación y uso sostenible de la biodiversidad. La Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también su relevancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tienen un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos (OMS, 2000).

El uso de plantas medicinales reduce los riesgos de un gran número de enfermedades crónicas debido a sus propiedades antioxidantes y la modulación del daño oxidativo por contener metabolitos tales como vitaminas, polifenoles y carotenoides (Cemeli *et al.*, 2009). Existe una gran cantidad de estudios que sugieren que una mayor ingesta de dichos compuestos secundarios, está asociada con una menor incidencia de mortalidad por enfermedades crónicas que incluyen, además, la hipertensión arterial, la aterosclerosis y la *diabetes mellitus* (Avello y Cisternas, 2010).

Ecuador por ser un país multicultural y poseer una elevada biodiversidad, es un sitio estratégico para los intereses de la industria farmacéutica, puesto que su mayor riqueza está reflejada en el saber ancestral relacionado al mundo vegetal (Ríos *et al.*, 2008). En el país existen alrededor de 432 especies medicinales, 273 se expenden en las hierberías de los



mercados y 255 son silvestres, 92 se comparten entre las de mercado y silvestres. Las especies de las hierberías tratan 77 enfermedades y las silvestres 74, entre las enfermedades más comunes en los dos casos están la inflamación estomacal, problemas de la circulación, afecciones nerviosas, resfrío, entre otras. Entre las especies de las hierberías, 178 son nativas, 83 introducidas y 12 endémicas, mientras que de las silvestres 199 son nativas, 43 introducidas y 13 endémicas (Cerón, 2006).

Las sustancias activas de las plantas medicinales, denominadas metabolitos secundarios, en muchas ocasiones restringen su presencia a determinadas especies, puesto que su biosíntesis se rige principalmente por factores como la genética vegetal, la fisiología, el estrés, la procedencia geográfica y condiciones de recolección del vegetal (Trease, 2006). Se pueden encontrar compuestos de naturaleza fenólica como las antocianinas, taninos, flavonoides; terpénica, como las saponinas y aceites esenciales; alcaloidea; esteroidea como los glucósidos cardiotónicos, polímeros heterogéneos como los mucílagos, entre otros (Bruneton, 2000).

La extracción de los principios activos está basada en la polaridad de las moléculas y de acuerdo a esa propiedad se han desarrollado técnicas analíticas de separación, que facilitan la obtención de perfiles químicos detallados, lo que a su vez favorece el aislamiento e identificación de moléculas bioactivas con mayor rapidez y precisión. Dentro de éstas, destacan la cromatografía de capa fina o delgada (CCF ó CCD); *High Performance Liquid Chromatography* o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), *Ultra High Performance Liquid Chromatography* o cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UHPLC) y cromatografía de gases (CG) con acoplamiento a espectrómetros de masas (EM); y la resonancia magnética nuclear (RMN), todas en orden creciente de complejidad. Los resultados del uso de esas técnicas han aportado informaciones valiosas de metabolitos activos que se han usado para contrarrestar la resistencia bacteriana, enfermedades devastadoras como el cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la malaria (paludismo) y la diabetes, que en conjunto representan las tasas de mortalidad más altas del mundo (Villa-Ruano *et al.*, 2011).

Basados en los antecedentes que existen de muchas especies vegetales, de países suramericanos, acerca de sus constituyentes químicos principales, y de que los productos naturales han sido, durante la historia, la principal fuente de agentes farmacológicos, de hecho, el 90% de las prácticas terapéuticas actuales utiliza compuestos derivados de plantas y hoy en día un tercio de la población mundial utiliza plantas medicinales para su atención farmacéutica primaria, el presente trabajo de investigación está enfocado en el estudio de las especies vegetales hierba luisa (*Lyppia citriodora*, familia Verbenaceae) y toronjil (*Melissa officinalis*, familia Lamiaceae) recolectadas en Ecuador, ya que son plantas de gran uso medicinal en la provincia de El Oro, con el fin de identificar los constituyentes químicos y/o principios bioactivos presentes en las hojas, que son la parte más utilizada de la planta, por los habitantes de la región.

Varios estudios científicos y etnográficos reportan que las drogas vegetales incluidas en este estudio, pertenecientes a los géneros *Lippia* y *Melissa*, poseen múltiples propiedades medicinales:

El género *Lippia* (Verbenaceae) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños; la mayoría de ellos son tradicionalmente utilizados como remedios para problemas gastrointestinales y respiratorios. Algunas especies han mostrado propiedades antimalarial, antiviral y citostáticas. Se cree que los aceites esenciales y compuestos fenólicos (flavonoides) son responsables de estas propiedades (Pascual *et al.*, 2001). Algunas especies del género *Lippia* han mostrado propiedades analgésicas, sedativas, antiinflamatorias y antipiréticas; y son usadas para el tratamiento de los nervios (Abenaa *et al.*, 2003).

El género *Melissa* pertenece a la familia Lamiaceae, que incluye a plantas aromáticas constituida principalmente por hierbas o arbustos, provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (Fernández-Alonso & Rivera-Díaz, 2006). Son muy utilizadas en diversas preparaciones aromáticas por sus propiedades carminativas y sedantes, como estimulante digestivo, presentan actividad antibacteriana y sedativa, así como actividad antiviral e indicadas en el tratamiento de espasmos gastrointestinales (Sánchez *et al.*, 2010).

Es importante señalar que los resultados obtenidos de esta investigación constituyen un aporte para la validación del uso medicinal de ambas plantas, debido a que se extrajeron y caracterizaron químicamente los aceites esenciales y principios activos a sus hojas, con actividad terapéutica cuya información podría ser usada en la elaboración de fitofarmacos. El contenido en principios activos es muy importante para valorar una planta medicinal, cosa que depende tanto de la variedad como de las condiciones donde ha crecido la planta. Además, esta investigación constituye un aporte científico importante para la población de la provincia ecuatoriana de El Oro, ya que dichas drogas vegetales son de mayor consumo en esta provincia, donde es sabido que hierba luisa se usa para el sistema nervioso, en las indigestiones, contra vértigos y migrañas, y el toronjil se utiliza como digestivo, antiespasmódico, cicatrizante, sedante y balsámico, ya que constituye un magnífico tónico relajante que disminuye la ansiedad y el nerviosismo.

El hecho de poder identificar químicamente los principios químicos con actividad biológica de ambas plantas, usando cromatografía líquida y de gases acoplada a espectrometría de masas y otros procedimientos usuales en el trabajo fitoquímico, incrementaría la base de datos de productos naturales bioactivos provenientes de plantas medicinales de gran uso medicinal en el sur del Ecuador, ya que no se dispone de información científica suficiente que avale el uso de las especies vegetales en estudio.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Entre los antecedentes de este proyecto de investigación, se podría indicar:

- El Artículo 350 de la Constitución de la República del Ecuador, el cual señala que el Sistema de Educación Superior tiene como finalidad la formación académica y profesional con visión científica y humanista: la investigación científica y tecnológica; la innovación, promoción, desarrollo y difusión de los saberes y las culturas: la construcción de soluciones para los problemas del país, en relación con los objetivos del régimen de desarrollo.
- El Artículo 13 de la LOES la cual cita - Funciones del Sistema de Educación Superior.-  
Son funciones del Sistema de Educación Superior:

a) Garantizar el derecho a la educación superior mediante la docencia, la investigación y su vinculación con la sociedad, y asegurar crecientes niveles de calidad. Excelencia académica y pertinencia.

Adicionalmente, uno de los objetivos del Plan Nacional del Buen Vivir (Obj. 3) del gobierno de Ecuador es “Mejorar la vida de la población”. Entre sus políticas y metas considera “Fortalecer y consolidar la salud intercultural, incorporando la medicina ancestral y alternativa al sistema Nacional de salud”. En sintonía con estas políticas, en la Planta Piloto de Farmacia se vienen desarrollando algunos proyectos para generar fitofármacos a partir de recursos naturales autóctonos.

Con este proyecto de investigación, se planteó la necesidad de validar científicamente el empleo de las plantas medicinales *Lippia citriodora* y *Melissa officinalis* que se usan y cultivan en Ecuador, mediante un estudio amplio de sus propiedades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antioxidante y citotóxica), así como la caracterización química de sus principios bioactivos e incentivar la producción de fitomedicamentos seguros y eficaces a partir de estas drogas vegetales cultivadas en el país.

La OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales como parte de la terapéutica, sin embargo, las tendencias actuales precisan fusionar el uso tradicional o empírico con la evidencia científica (Avello y Cisternas, 2010). La calidad es un requisito básico de los medicamentos, no sólo por su significación intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros seguridad y eficacia (Mosihuzzaman y Choudhary, 2008). Ello resulta aún más importante en los medicamentos a base de plantas medicinales, en los que la problemática es mucho más compleja que en los fármacos de síntesis.

Los metabolitos secundarios son sintetizados en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos García y Pérez-Urria Carril, 2009), por lo que es importante identificar los metabolitos secundarios presentes en las dos plantas medicinales seleccionadas en esta investigación, para confirmar sus potencialidades químicas y farmacológicas.

Adicionalmente, es de hacer notar que la producción de metabolitos secundarios o compuestos bioactivos por las plantas, está muy relacionado con el hábitat donde crecen las especies vegetales, entendiéndose el tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes, depredadores etc., ya que los mismos son biosintetizados por las mismas, como un mecanismo de defensa y supervivencia en el medio.

Por lo indicado anteriormente, resulta de suma importancia realizar estudios fitoquímicos y farmacológicos a las plantas medicinales para corroborar sus potencialidades y garantizar una explotación racional y sustentable. En vista de que no existen reportes en la literatura, sobre información científica suficiente de las plantas medicinales en estudio cultivadas en Ecuador, que garantice el uso seguro de las mismas, se hace necesario evaluar la química, mediante las técnicas mencionadas previamente (Wu *et al.*, 2013), y actividad biológica de esas especies vegetales.

## **DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

La cobertura que tuvo esta Propuesta de Trabajo, fue la siguiente:

Con este trabajo de investigación, se pretendió conocer los principios activos de estas dos especies, cuyo contenido es muy importante para valorarlas como plantas medicinales, el cual que depende muchísimo de las condiciones ambientales o medio donde ha crecido la planta. El aislamiento y caracterización química del o los principios activos, permitiría su uso para fines farmacológicos.

La investigación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Investigación, Bromatología, Microbiología y Planta Piloto de Farmacia de la Universidad Técnica de Machala; laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (Venezuela) y Laboratorio de Espectrometría de Masas del Departamento de Química de la Universidad de Alberta (Canadá); y las plantas se recolectaron en la ciudad de Machala y otras áreas pertenecientes a la provincia de El Oro.

Las fases de la investigación realizada, fueron las siguientes: recolección de los ejemplares y secado (febrero-marzo 2014), obtención de los extractos orgánicos (marzo-abril 2014), pruebas químicas o análisis fitoquímico preliminar (abril –mayo 2014), obtención de los aceites esenciales (mayo-junio 2014), análisis cromatografía de gases-masas (junio-julio), fraccionamiento cromatográfico y análisis espectroscópicos (agosto-diciembre 2014), pruebas de actividad biológica (septiembre 2014-diciembre 2015), control microbiológico (diciembre 2014-enero 2015), análisis de datos de caracterización estructural (octubre 2014-enero 2015) y redacción del informe final (enero-febrero 2015).

Los sujetos que participaron en la realización de este estudio fueron algunos estudiantes de las carreras de Bioquímica y Farmacia e Ingeniería de Alimentos, estudiantes del último año de la carrera de Bioquímica y Farmacia que realizan sus Trabajos de Titulación bajo mi tutoría, algunos Docentes y Profesionales de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, y mi persona.

A continuación, se presentan las variables que se consideraron para la Investigación, siguiendo las cuatro secciones a desarrollar según la Matriz de Planificación:

*Investigación:* Datos experimentales obtenidos en los análisis químicos y biológicos realizados a las hojas de las plantas en estudio, una vez que fueron procesadas y obtenidos los extractos respectivos. Número de artículos enviados para publicación. Número de artículos proceso de redacción. Número de proyectos de Investigación asesorados.

*Capacitación científica en el área pertinente a su especialidad:* Sesiones de clases personalizadas a estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia, en el Laboratorio. Sesiones de tutorías personalizadas a estudiantes tesistas. Cursos en tópicos del área de productos naturales orgánicos.

*Docencia a impartir:* Sesiones de trabajo dirigidas a la producción del anteproyecto de Tesis de Titulación. Número de proyectos de Titulación de tesistas del último año de la carrera de Bioquímica y Farmacia. Asesorías y dirección de trabajos de investigación para el concurso Galardones 2014. Numero de Software Educativos producidos.

*Relacionamiento estratégico interinstitucional a nivel nacional e internacional*  
Actividades de Investigación orientadas hacia la búsqueda de Acuerdos de Cooperación Instituto Oceanográfico-Universidad de Oriente (Venezuela)/UTMACH. Cooperación entre Departamento de Química de la Universidad de Alberta (Canadá) y la UCQS (UTMACH). Participación en redes de conocimiento, específicamente en una Red de Investigación en Biotecnología y post-grado (Universidad de Quevedo). Difusión de trabajos en congresos internacionales. Producción de Proyecto con otras instituciones universitarias y de investigación.

## **JUSTIFICACIÓN**

La importancia y relevancia que tiene la propuesta de trabajo que se ha realizado, son las siguientes:

Los fitomedicamentos son un valor agregado a la producción de plantas medicinales y ya tienen un posicionamiento en el conjunto de productos terapéuticos de los laboratorios tradicionales, lo cual indica que los principios activos de plantas medicinales están siendo utilizados en el tratamiento de diversas patologías, tanto con fines preventivos como curativos. Las plantas medicinales usadas correctamente proveen alternativas para prevenir y tratar numerosas condiciones de salud de forma efectiva y segura.

La información obtenida de este estudio es de importancia para fundamentar y respaldar investigaciones dirigidas a la búsqueda de drogas vegetales de calidad, seguras y eficaces que pueden ser utilizadas en la elaboración de fitofármacos seguros y eficaces, específicamente a partir de *L. citriodora* y *M. officinalis*, entre otras especies analizadas.

Esta investigación se justifica con el Art. 32 sección 7 SALUD, del Plan Nacional del Buen Vivir, que textualmente dice: “Derecho a la Salud” y se ajusta a la norma 3 que plantea: “Mejorar la calidad de vida de la población”, ya que esta investigación se propone contribuir al mejoramiento de la salud humana.

Con este proyecto se dió cumplimiento a lo estipulado por la Ley Orgánica de Educación superior (LOES) en su artículo 8 literal c) que plantea “Contribuir al conocimiento,

preservación y enriquecimiento de los saberes ancestrales y de la cultura nacional, y en el artículo 387; Objetivo 2, Política 2,6 que describe textualmente “Promover la investigación y el conocimiento científico, la revalorización de conocimientos y saberes ancestrales, y la innovación tecnológica”.

Adicionalmente, la presente propuesta de investigación incluyó la participación de varios estudiantes del último año de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, contribuyendo en parte a su desarrollo, cumpliendo así con el artículo 350 de la ley anteriormente mencionada, ya que de esta manera se contribuyó al proceso de aprendizaje teórico-experimental y se favoreció la formación académica y profesional con visión científica y humanística de los estudiantes, en especial de los nueve estudiantes asesorados por mi persona en la realización de sus Trabajos de Titulación.

El desarrollo de este proyecto que contemplo el análisis fitoquímico y de actividad biológica de las especies *L. citriodora* y *M. officinalis*, permitió evaluar la presencia de metabolitos bio-activos y su poder antimicrobiano, antioxidante y cito-tóxico, así como el control microbiológico de dichas materias primas. Los resultados del proyecto tributan al campo Salud y podrán ser aplicados como alternativas terapéuticas para la población. Además, este proyecto contribuyó al desarrollo de la investigación y la docencia en la Unidad Académica, al permitir la formación y superación de estudiantes y profesionales con habilidades teóricas y prácticas en el área de la farmacognosia y fitoquímica. Se logró la realización de nueve tesis de pre-grado o trabajos de titulación, la obtención de publicaciones de impacto internacional, la participación en eventos internacionales (CLAQ 2014 y VII FIRMA 2014), entre otros resultados importantes.

## **OBJETIVO GENERAL**

### **Objetivo General**

Evaluar la presencia y bioactividad de algunos metabolitos secundarios en dos plantas recolectadas en la zona sur del Ecuador



## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **Objetivos Específicos**

Los objetivos específicos se agruparon siguiendo las áreas de la Matriz de Planificación de los Investigadores del Programa Prometeo

#### ***1 Investigación***

##### **1.1. Objetivos específicos**

1.1.1. Obtener los extractos crudos de las hojas y tallo de la planta con solventes de diferentes polaridades.

1.1.2. Caracterizar fitoquímicamente los diferentes extractos obtenidos, para detectar la presencia de algunos grupos de metabolitos secundarios en las diferentes partes botánicas de la especie.

1.1.3. Determinar la actividad biológica de los extractos, fracciones y/o compuestos a obtener de la planta estudiada, por medio de bioensayos de actividad antibacteriana y letalidad.

1.1.4. Aislar, en lo posible, los metabolitos secundarios presentes en la planta, mediante uso de técnicas cromatográficas.

1.1.5. Caracterizar químicamente los metabolitos secundarios mediante las técnicas espectroscópicas convencionales.

#### ***2. Capacitación científica en el área pertinente a su especialidad (dirigida a estudiantes y profesores de la institución)***

##### **2.1. Objetivos específicos**

2.1.1. Asesorar a estudiantes de pre y post-grado, en la realización de sus tesis de grado, para llevar a cabo una investigación en el área de Lípidos y Productos Naturales Orgánicos, provenientes de plantas terrestres y organismos marinos

#### ***3 Asesoría en la elaboración de políticas públicas (No Aplica)***

#### ***4 Docencia a impartir (dirigida a estudiantes)***

##### **4.1. Objetivos específicos**

4.1.1 Proporcionar al alumno una visión general de los Productos Naturales Orgánicos y sus características estructurales, biosintéticas, ecológicas y farmacológicas.

**5 Asesoría y diseño de programas de postgrado (No Aplica)**

**6 Gestión de recursos nacionales e internacionales (No Aplica)**

**7 Relacionamiento estratégico interinstitucional a nivel nacional e internacional**

7.1. Objetivos específicos

7.1.1. Fomentar el establecimiento de una red de investigación y transferencia de conocimientos científicos en el área de los Productos Naturales con la Universidad de Oriente (Venezuela) y en el área de los Productos Naturales Marinos y Ecología Química con el Instituto Oceanográfico de Venezuela.

7.1.2. Promover el intercambio de conocimientos científicos y tecnológicos entre el grupo de investigación en el área de los Productos Naturales y campos afines de la Universidad Técnica de Machala, con otros grupos de investigación relacionada con esta área, perteneciente a otras Instituciones Universitarias ecuatorianas.

## **RESULTADOS OBTENIDOS**

### **ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS**

#### **Artículos Científicos indexados:**

1. Composición química de aceites esenciales de ocho plantas medicinales cultivadas en Ecuador; se envió al International Journal of Tropical Biology/Revista de Biología Tropical (<http://www.biologiatropical.ucr.ac.cr>).

2. Identificación estructural de algunos constituyentes químicos de la fracción apolar de las hojas de *Melissa officinalis* con posible actividad biológica; se envió a la revista Interciencia ([www.interciencia.org/](http://www.interciencia.org/)).

3. Constituyentes químicos y letalidad contra *Artemia salina* de extractos de las hojas de *C. citratus*, *L. citriodora* y *M. officinalis* provenientes de Ecuador (en proceso de redacción); se presentará en Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (<http://blacpma.cl>).

4. Evaluación de la capacidad antioxidante de dieciséis plantas medicinales de Ecuador; se envió a La Revista de la Sociedad Química del Perú ([www.sqperu.org.pe](http://www.sqperu.org.pe)) para su arbitraje. Redactado en conjunto con la Dra. Ana Echavarría.

5. Metabolitos secundarios y su relación con la bioactividad de ocho extractos de especies vegetales. Se enviará a Scientia Agropecuaria ([www.sci-agropecu.unitru.edu.pe/](http://www.sci-agropecu.unitru.edu.pe/)). En proceso de redacción en conjunto con la Dra. Ana Echavarría).

**Artículo científico arbitrado:**

Evaluación de la toxicidad aguda de plantas medicinales cultivadas en Ecuador contra el crustáceo *Artemia salina* (arbitrado para ser publicado en el Libro VII FIRMA, producto del Foro Iberoamericano de Recursos Marinos y de la Acuicultura <http://www.usc.es/congresos/foroacui/firma/seccion/117/evento/60/i-circular-vii-foro-iberoamericano-de-los-recursos-marinos-y-la-acuicultura-vii-firma-ecuador--014-machala-18--1-de-noviembre.php>).

**Artículo Científico Indexado 1:** se envió al *International Journal of Tropical Biology/Revista de Biología Tropical* (<http://www.biologiatropical.ucr.ac.cr>) (en revisión).

**COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE OCHO PLANTAS MEDICINALES CULTIVADAS EN ECUADOR**

Haydelba D'Armas<sup>1,2</sup>, Karen Montesinos<sup>1</sup>, Carmita Jaramillo Jaramillo<sup>1</sup> & Ricardo León<sup>1</sup>

1. Planta Piloto de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y Salud, Universidad Técnica de Machala, Ecuador; [haydelba@yahoo.com](mailto:haydelba@yahoo.com)

2. Lab. de Productos Naturales y Lípidos, Depto. de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela.

**Abstract: Chemical composition of essential oils from leaves of eight medicinal plants grown in Ecuador.** Each aromatic plant biosynthesized a single essence or chemotype of an essential oil, although its composition varies according to the conditions of soil and climate, as well as the part of the plant. Essential oils, synthesized and accumulated in plants, have a wide range of applications in the pharmaceutical, health, cosmetics, food, and agricultural industries. This study aimed to analyze the volatile secondary metabolites of essential oils of eight medicinal plants in Ecuador in order to identify possible bioactive compounds and contribute to the chemotaxonomy of these species. Leaves from

*Cymbopogon citratus* (Poaceae), *Lippia citriodora* (Verbenaceae), *Melissa officinalis* (Lamiaceae), *Artemisia absinthium* L (Asteraceae), *Ageratum conyzoides* (Asteraceae), *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae), *Piper carpunya* Ruiz & Pav (Piperaceae), and *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) were collected and their essential oils were obtained by hydro-distillation. The oil fraction was analyzed and characterized by GC/MS. The extraction yields were of 0.2459, 0.0091, 0.0063, 0.0327, 0.0424, 0.0071, 0.0096, and 0.0222%, and the oil constituents of 88.95, 87.98, 83.90, 71.85, 77.03, 86.42, 79.43, and 82.89%, respectively. The main oils found were: oxygenated monoterpenoids (87.88, 64.17, 80.13, 70.83, 46.15, 60.44, and 69.92%) in *C. citratus*, *L. citriodora*, *M. officinalis*, *A. absinthium* L, *A. conyzoides*, *P. carpunya* Ruiz & Pav, and *E. globulus* respectively; non oxygenated sesquiterpenoids (77.55%) in *A. vulgaris*, and oxygenated sesquiterpenoids (16.31%) in *A. conyzoides*. The geranial (31.23, 42.09, and 24.29 %) in *C. citratus*, *L. citriodora*, and *M. officinalis*, myrtenyl acetate (33.82%) and thujone (34.70%) in *A. absinthium* L, artemisyl ketone (16.38%) and verbenone (12.76%) in *A. conyzoides*, himachalene (42.66%) in *A. artemisiifolia*, piperitone (50.96%) in *P. carpunya* Ruiz & Pav, and eucaliptol (69.92%) in *E. globulus*, were the main constituents in their respective essential oils. The geranial, neral and geraniol were the most abundant monoterpenoids in *C. citratus*, *L. citriodora* and *M. officinalis*. These plants may require similar secondary metabolites for their ecological interactions; furthermore, the occurrence of many possible bioactive components in these plant species grown in Ecuador could demonstrate their medicinal use for several disorders.

**Key words:** essential oils, gas chromatography-mass spectrometric, hydrodistillation, medicinal plants.

Número total de palabras: 5 314

## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales se utilizan para satisfacer casi todas las necesidades humanas otorgan a la población muchos beneficios, entre los predominantes están el comestible y el medicinal. Las plantas medicinales son aquellas a las que se le atribuyen propiedades curativas (Bermúdez *et al.*, 2005), según la Organización Mundial de la Salud, entre el 66 y 88% de la población humana recurre a las plantas medicinales para atender sus padecimientos y enfermedades (WHO, 2002).

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, naturales, mezclas complejas de metabolitos secundarios caracterizados por un fuerte olor y generalmente con densidad menor a la del agua, y destilables, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, los mismos son biosintetizados y acumulados en las plantas aromáticas, tienen

una amplia gama de aplicaciones en la salud, campo farmacéutico, cosméticos, alimentos e industrias agrícolas (Martínez, 2003; Bakkali *et al.*, 2008; Stefanazzi *et al.*, 2011).

La composición química del aceite esencial es inconstante y depende del método de extracción, de su duración y la temperatura, del estado y la procedencia de la planta, y de las condiciones geobotánicas y agrícolas de su cultivo (Rojas *et al.*, 2012). Actualmente, en Europa, Asia y algunos países de América Latina, se estudian las estructuras de estos aceites y su utilidad en las industrias farmacéutica, biocida, tabacalera, alimenticia y petroquímica.

El género *Lippia* (Verbenaceae) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños; la mayoría de ellos son tradicionalmente utilizados como remedios para problemas gastrointestinales y respiratorios. Algunas especies han mostrado propiedades antimalarial, antiviral y citostáticas. Se cree que los aceites esenciales y compuestos fenólicos (flavonoides) son responsables de estas propiedades (Pascual *et al.*, 2001). Algunas especies del género *Lippia* han mostrado propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas (Abenaa *et al.*, 2003).

El género *Melissa* pertenece a la familia Lamiaceae, que incluye a plantas aromáticas constituida principalmente por hierbas o arbustos, provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (Fernández-Alonso & Rivera-Díaz, 2006). Son muy utilizadas en diversas preparaciones aromáticas por sus propiedades carminativas y sedantes, como estimulante digestivo, presentan actividad antibacteriana y sedativa, así como actividad antiviral e indicadas en el tratamiento de espasmos gastrointestinales (Sánchez *et al.*, 2010).

Las especies del género *Piper* (Piperaceae) se encuentran ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo, muchas de las cuales han sido usadas en la medicina tradicional en Latinoamérica y la región de las indias Occidentales (Bezerra *et al.*, 2008). Este género comprende más de 700 especies, muchas de las cuales han sido reportadas con diversas propiedades biológicas y farmacológicas.

Las especies del género *Cymbopogon* han sido ampliamente usadas en la medicina tradicional en el tratamiento de muchas enfermedades, pertenecen a la familia de las Poaceae, posee alrededor de 55 especies de las regiones tropicales y cálidas originalmente de Asia. La mayoría de las especies son usadas para el tratamiento de los nervios, problemas gastrointestinales, también se utilizan como antiespasmódico, analgésico, antiinflamatorio, antipirético, diurético y sedativo (Santin *et al.*, 2009; Kpoviessi *et al.* 2014).

Las plantas del género *Ambrosia* (Asteraceae), crecen en sitios con temperaturas bajas como serranías y cordilleras, por esta razón son pocas las especies en regiones costeras y llanuras. Este género ha sido estudiada como antioxidante por los flavonoides y glicósidos que contienen (Maksimovic *et al.*, 2008), es utilizado para dolor del cuerpo, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, úlceras, manchas de la piel, varices, cicatrices y transtornos menstruales (Yañez *et al.*, 20011).

El género *Artemisia*, es uno de los más grandes de la familia Asteraceae, comprende entre 200-500 taxones o especies, los cuales son comúnmente arbustos o hierbas. Muchas de las especies *Artemisia* tienen un alto valor económico en varios campos, algunas como plantas alimenticias, en la elaboración de licores, como especias; en medicina como antihelmínticos (Lima *et al.*, 2008).

El género *Ageratum* (Asteraceae), comprende plantas herbáceas con usos medicinales tradicionales en muchos países del mundo, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales. Se han conocido por sus propiedades curativas y se han utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como quemaduras y heridas, para muchas condiciones infecciosas, artrosis, dolores de cabeza y disnea, neumonía, analgésico, antiinflamatorio, antiasmático, efectos antiespasmódicos, dolencias estomacales, enfermedades ginecológicas y de la piel ( Kamboj & Kumar-Saluja, 2008).

Las especies del género *Eucalyptus* pertenecen a la familia Myrtaceae y la mayoría de ellas son usadas en Latinoamérica en la medicina tradicional, para el tratamiento de varias condiciones médicas, tales como resfriado, fiebre, gripe e infecciones bronquiales. Además, se ha demostrado que los aceites esenciales de algunas especies de este género, producen efectos anti-inflamatorios y analgésicos (Silvia *et al.*, 2003).

Este estudio permitió la obtención de los aceites esenciales de las hojas de ocho plantas de uso medicinal en Ecuador [*Cymbopogon citratus* (hierbaluisa), *Lippia citriodora* (cedrón), *Melissa officinalis* (toronjil), *Artemisia absinthium* L (ajenjo), *Ageratum conyzoides* (mastranto), *Ambrosia artemisiifolia* (altamisa), *Piper carpunya* Ruiz & Pav (guaviduca) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto blanco)], y analizarlos mediante CG/EM con el propósito de identificar los posibles compuestos volátiles bioactivos, y a su vez realizar un aporte a la quimiotaxonomía de estas especies recolectadas en latitudes ecuatorianas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de las plantas:** Las muestras de material vegetal silvestre de *C. citratus*, *L. citriodora*, *M. officinalis*, *A. absinthium*, *A. conyzoides*, *A. artemisiifolia*, *P. carpunya* y *E.*

*globulus* fueron recolectadas en distintas localidades de las Provincias del Oro y Azuay, Ecuador, en mayo de 2014. La identificación de las plantas las realizó el botánico Jesús Inca del Herbario de Quito, Ecuador.

**Obtención del aceite esencial:** Para la extracción de los aceites esenciales, se separaron las hojas frescas de cada una de las especies en estudio, se cortaron en pequeños trozos (200g), se lavaron con agua destilada y se sometieron a hidrodestilación en un balón de 4l, con la adición de 2l de agua destilada para cada una de las muestras. Al cabo de 2h aproximadamente, se separó el aceite obtenido de la capa acuosa, por disolución y extracción del mismo con cloroformo al 100%, usando un embudo de separación. La fase orgánica extraída se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el solvente en un rotaevaporador marca Hidolph, a presión reducida (aprox. 11mbar) y temperatura de 40°C, para obtenerse los aceites esenciales de cada una de las plantas.

**Determinación de la composición química del aceite esencial:** La identificación de los componentes presentes en cada uno de los aceites esenciales, se realizó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM). Para la separación de dichos constituyentes se preparó una solución con 50µl del aceite disueltos en 1ml de cloroformo puro grado HPLC, posteriormente se inyectó 1µl de la solución en un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies modelo 7890 con fuente de ionización por impacto electrónico, equipado con una columna de 30 m x 250 µm x 0,25 µm. La temperatura inicial del horno fue de 30°C, luego 25 °C/min hasta 290 °C. Cada corrida cromatográfica se realizó en un tiempo de 23 min y se realizaron por triplicado. El cromatógrafo de gases está acoplado a un detector de masas *single cuadrupole* modelo 5975C.

La cuantificación de los constituyentes de cada una de las especies vegetales analizadas, se realizó con base en las áreas relativas de cada pico. La identificación de los componentes se realizó por comparación de los espectros de masas obtenidos con la base de datos de la librería espectral de masas NIST 08.

## RESULTADOS

**Rendimiento de los aceites esenciales:** Los aceites esenciales de las hojas de las plantas *C. citratus*, *L. citriodora*, *M. officinalis*, *A. absinthium*, *A. conyzoides*, *A. artemisiifolia*, *P. carpunya* y *E. globulus* fueron obtenidos por la técnica de hidrodestilación, con rendimientos de extracción de 0.2459 (491.8mg), 0.0091 (18.2mg), 0.0063 (12.6mg), 0.0327 (65.4mg), 0.0424 (84.8mg), 0.0071 (14.2mg), 0.0096 (19.2mg) y 0.0222% (44.4mg) respectivamente, a partir de 200g de las hojas frescas de dichas plantas.

**Composición química de los aceites esenciales:** Se identificaron la mayoría de los constituyentes químicos de los aceites esenciales de las hojas de las plantas estudiadas, cuyos constituyentes y composición porcentual de dichas esencias se especifican en el

Cuadro 1. Para *Artemisia absinthium*, *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus globulus*, *Lippia citriodora*, *Piper carpunya*, *Melissa officinalis*, *Ambrosia artemisiifolia* y *Ageratum conyzoides*, el porcentaje en masa identificado de sus aceites esenciales fueron 71.85, 87.88, 82.89, 87.98, 79.43, 83.90, 86.42, 77.03%, respectivamente.

El porcentaje de las distintas familias de constituyentes químicos identificados en los aceites esenciales de las hojas de las plantas estudiadas, se muestran en el Cuadro 2 y Fig. 1. La familia química predominante en todos los aceites esenciales analizados, fue la correspondiente a derivados oxigenados de monoterpenos, a excepción de la especie *A. artemisiifolia*, cuyo aceite mostró predominancia de compuestos volátiles de estructura sesquiterpenoide (77.55%) y los monoterpenos oxigenados en menor proporción (6.20%) en relación a las demás especies analizadas.

Específicamente, en el aceite de *A. absinthium*, *C. citratus* y *E. globulus* predominaron casi en su totalidad, los derivados oxigenados de monoterpenos (70.83, 77.88 y 84.05%) y en muy baja proporción se encontraron monoterpenos (1.08, 1.07 y 5.06%); mientras que, los aceites esenciales de las especies *P. carpunya* y *M. officinalis* se componen de monoterpenos (8.99 y 13.28%) y derivados oxigenados de monoterpenos (60.00 y 64.7%), además de 10% de derivados aromáticos para *P. carpunya* y sesquiterpenos en un 6.45% para *M. officinalis*.

Por su parte, el aceite de *L. citriodora* está constituido por derivados oxigenados de monoterpenos (80.13%) y sesquiterpenos en menor proporción (4.53%). La familia química predominante en el aceite de *A. conyzoides* fueron derivados oxigenados de monoterpenos (46.15%) y sesquiterpenos (16.31%), y metabolitos secundarios volátiles con estructura no terpenoidal (12.33%).

Particularmente, el análisis del aceite esencial de las hojas de *A. absinthium*, arrojó como compuestos mayoritarios al 4-tujeno (1.08%), tujona (34.70%), tujanona (1.31%), acetato de mirtenilo (33.82%) y tujol (0.94%); y el de *C. citratus*,  $\beta$ -mirceno (1.07%), citronellal (3.07%), citronellol (1.68%), neral o citral B (18.77%), *trans*-geraniol (31.15%), geraniol o citral A (31.23%) y *cis*-geraniol o nerol (1.98%).

Mientras que los compuestos  $\alpha$ -pineno (3.54%), D-limoneno (1.52%), 1,8-cineol o eucaliptol (69.92%),  $\alpha$ -terpineol (1.52%),  $\alpha$ -acetato de terpenilo (1.61%), isodieno (2.37%), aromadendreno (0.65%) y alloaromadendreno (0.76%) fueron los constituyentes mayoritarios del aceite esencial de las hojas de *E. globulus*; y los de *L. citriodora* fueron nerol (4.82%), neral (23.40%), *trans*-geraniol (7.71%), geraniol (42.04%), acetato de geraniol (2.16%),  $\alpha$ -curcumeno (1.42), nerolidol (0.82%), alloaromadendreno (3.71%) y 1,3-bis-(2-ciclopropil-2-metilciclopropil)-but-2-en-1-ona (1.90%).

Por su parte, el aceite esencial de las hojas de *P. carpunya* estuvo constituido principalmente por los compuestos  $\alpha$ -terpinoleno (4.67%), *p*-cimeno (3.77%), D-limoneno



(4.32%), linalool (5.65%), *cis*-4-tujanol (2.03%), *trans*-2-carene-4-ol (1.01%), piperitona (50.96%), safrol (2.46%), acetato de terpinilo (0.79%) y *o*-metilisoeugenol (3.77%). Para la esencia de *M. officinalis*, los componentes en mayor proporción fueron  $\beta$ -mirceno (3.28%),  $\beta$ -pineno (10.00%), citronellal (2.97%), 3-undecino (3.51%), citronellol (2.28%), neral (12.11%), *trans*-geraniol (21.11%), geranial (24.29%), acetato de geranilo (7.15%) y  $\beta$ -cariofileno (6.45%).

Ambos aceites esenciales de las hojas de *A. artemisiifolia* y *A. conyzoides*, mostraron como constituyentes mayoritarios a trece compuestos; en el caso de *A. artemisiifolia*, la composición química de su aceite consta de eucaliptol (0.61%), tujona (0.41%), 3,3-dimetil-6-metilenciclohexeno (0.62%), *cis*-verbenol (2.07%), acetato de bornilo (2.01%), acetato de verbenilo (1.10%),  $\alpha$ -farneseno (0.90%), cubebeno (14.90%),  $\gamma$ -elemeno (17.87%), carotol (0.64%), veridiflorol (1.41%), zingibereno (1.22%) e himachaleno (42.66%).

Mientras que 1-octen-3-ol (6.34%), linalol (6.90%), cetona de artemisilo (16.38%),  $\alpha$ -terpineol (2.03%), verbenona (12.76%), piperitona (8.08%), duroquinona (2.71%), eugenol (1.22%), (*Z*)-cariofileno (1.02%), ciclooctanocarboxaldehído (3.28%),  $\tau$ -cadinol (1.72%), nerolidol 1 (2.67%) y óxido de cariofileno (11.92%) fueron los componentes mayoritarios del aceite esencial de *A. conyzoides*.

## DISCUSIÓN

En relación a los porcentajes de rendimientos obtenidos de los aceites esenciales, se observó que las especies *C. citratus*, *A. absinthium*, *A. conyzoides* y *E. globulus* biosintetizan una mayor cantidad de productos naturales volátiles, en relación a las otras cuatro especies estudiadas. Este hecho puede ser debido a que la habilidad para sintetizar metabolitos secundarios está en función de las necesidades de cada planta, ya que los metabolitos acumulados en los órganos de estas especies, podrían desempeñar una importante función en las interacciones entre las plantas y el medio que las rodea, como mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros, etc. Las plantas aromáticas analizadas pertenecen a distintos géneros y familias taxonómicas (Opiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Vernenaceae, Piperaceae y Lamiaceae), por lo cual responden de forma distinta al medio ambiente, biosintetizando familias químicas en proporciones diferentes para su interacción ecológica (Gros *et al.*, 1985).

Como se puede observar en la Fig. 1, existe una abundancia de derivados oxigenados de monoterpenos en la casi todos los aceites esenciales de las especies analizadas, al contrario de la especie *A. artemisiifolia*, cuyo aceite mostró predominancia de sesquiterpenos y monoterpenos oxigenados en menor proporción. Sin embargo, estudios previos reportan a los monoterpenos limoneno, alfa-pineno y mirceno, y el sesquiterpeno germacrene-D como constituyentes principales del aceite de *A. artemisiifolia*; además de que el mismo ha

presentado una actividad bactericida y fungicida significativa contra varios microorganismos ensayados (Chalchat *et al.*, 2004).

Todas las especies de *Artemisia* producen aceites aromáticos (alcanfor como componente mayoritario en algunas especies), y varias son hierbas culinarias utilizadas como aromatizantes, alucinógenos, vermífugos y productos farmacéuticos y algunos son tóxicos. Ciertas especies de este género producen compuestos antimaláricos, y el compuesto aislado artemisinina mata selectivamente las células del cáncer de mama en humanos (Dhingra *et al.*, 2000; Singh & Lai, 2001). El aceite esencial analizado de *A. absitium* mostró a tujona y acetato de mirtenilo como constituyentes mayoritarios, a diferencia de lo reportados en la literatura para otras especies de este género (Lima *et al.*, 2008).

La abundancia de monoterpenos y en especial de derivados oxigenados de monoterpenos (Fig 1), así como algunos de los compuestos identificados en el aceite esencial de *C. citratus* (Cuadro 1), en especial neral, geraniol y geranial, han sido informados previamente en el aceite esencial de las hojas de esta especie (Pino & Rosado, 2000), presentando actividad biológica variada como antibacteriana contra la cepa *Propioni bacterium* acnés (Meza & Vargas, 2013) y como repelente de insectos contra *Tribolium castaneum* (Olivero-Verbel *et al.*, 2009).

Por su parte, los aceites esenciales de *L. citriodora* y *M. officinalis*, presentaron un comportamiento similar en cuanto a la alta proporción de derivados oxigenados de monoterpenos (Fig. 1, Cuadro 1), por lo que podrían poseer actividades biológicas semejantes, tales como las actividades antimicrobial (contra cepas Gram-positivas y negativas, y hongos), antioxidante y citotóxica reportadas en la literatura para *L. citriodora* (Mothana *et al.*, 2010; Oliva *et al.*, 2010); y la citotoxicidad y fuerte actividad antibacteriana en contra de cepas Gram-positivas, pero no así contra cepas Gram-negativas, y contra el hongo *Candida albicans*, mostrada por *M. officinalis* (Hansianu *et al.*, 2008). Según los resultados obtenidos en esta investigación (Cuadros 1 y 2), los aceites de las plantas *L. citriodora* (cedrón) y *M. officinalis* cultivadas en Ecuador están de acuerdo con el mismo quimiotipo geranial, y *C. citratus* (hierba luisa) con los quimiotipos geraniol y geranial. Las tres especies mencionadas se utilizan en Ecuador como relajantes y tranquilizantes, propiedades debidas a la composición química similar de sus aceites esenciales.

Geranial, neral y geraniol fueron los monoterpenoides más abundantes y comunes en las esencias de *C. citratus*, *L. citriodora* y *M. officinalis*. Estas plantas pueden requerir metabolitos secundarios similares para sus interacciones ecológicas, posiblemente debido a factores ambientales comunes como temperatura, presión, nutrientes, depredadores, entre otros; los mismos le permiten a las plantas comunicarse entre sí, además de que los aceites

esenciales son también una reserva energética para situaciones de emergencia, como en el caso de situaciones climatológicas adversas.

En el caso de las especies *E. globulus*, *P. carpunya* y *A. conyzoides*, cuyos aceites esenciales presentan cierta similitud entre ellos, en cuanto a las familias de metabolitos biosintetizados, cuya abundancia corresponde a derivados oxigenados de monoterpenos (Fig. 1, Cuadro 2); sin embargo, los distintos tipos de compuestos identificados son diferentes en su estructura química y proporción (Cuadro 1). Tal es el caso de la predominancia de los monoterpenos oxigenados: 1,8-cineol en *E. globulus*, piperitona en *E. carpunya*, y cetona de artemisilo y verbenona en *A. conyzoides*, además del sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno en este último. Esto podría deberse a respuestas diferentes de estas plantas a las adversidades del medio ambiente, así como a la quimiotaxonomía de las especies en particular, ya que pertenecen a distintas familias biológicas.

Por otro lado, en la literatura se reportan al precoceno 1 (fenipropanoide) y al óxido de cariofileno como componentes principales de la esencia de *A. conyzoides*, recolectada en Asia (Mensah *et al.*, 1996). El aceite esencial de esta especie ha mostrado propiedad antioxidante y actividad inhibitoria contra cepas del grupo de hongos *Arpegillus* e inhibición de la producción de aflatoxinas; además, una fuerte actividad antibacterial contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Rajaram *et al.*, 2010). Los aceites esenciales de tres especies *Eucalyptus* (*E. citriodora*, *E. tereticornis*, y *E. globulus*) produjeron efectos antiinflamatorios y analgésicos en ensayos con ratones, lo cual induce al desarrollo de nuevas drogas a partir del aceite de estas especies (Silva *et al.*, 2003). En otra investigación, se demostraron las propiedades sinérgicas de los terpenos aromadendreno y 1,8-cineol presentes en el aceite esencial de *E. globulus* contra cepas patógenas de bacterias susceptibles y resistentes a antibióticos (Mulyaningsih *et al.*, 2010). Estos estudios indican que estas plantas cultivadas en Ecuador pueden presentar una valiosa fuente de metabolitos bioactivos.

Los estudios químicos de especies del género *Piper*, han conllevado a la caracterización de varios productos naturales bioactivos, así como a la caracterización de sus aceites esenciales y la evaluación de sus actividades biológicas como actividad antimicrobiana, antimutagénica, antioxidante y larvicida, entre otras (Morais *et al.*, 2007; Guerrini 2009, Olivero-Verberl, 2009). De la especie *P. carpunya* no se han reportado estudios fitoquímicos importantes, así como de la composición de su aceite esencial.

De manera global, se obtuvo que los constituyentes mayoritarios en los respectivos aceites esenciales fueron el geranial en *C. citratus*, *L. citriodora* y *M. officinalis*, acetato de mirtenilo y tujona en *A. absinthium*, cetona de artemisilo y verbenona en *A. conyzoides*, himachaleno en *A. artemisiifolia*, piperitona en *P. carpunya*, y 1,8-cineol o eucaliptol en *E. globulus*. Las plantas aromáticas mencionadas producen esos compuestos para repeler los

insectos y así protegerse o defenderse, gracias a sus propiedades antifúngicas, antivirales, antibacterianas y repelentes; por el contrario, atraen a los insectos polinizadores que las mismas necesitan para su reproducción. Además, la presencia de muchos posibles componentes bioactivos en estas especies de plantas cultivadas en Ecuador, podría demostrar sus usos medicinales para varios trastornos (Cerón, 2006).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Proyecto Prometeo de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de la República de Ecuador (SENESCYT) por el financiamiento de esta investigación. A John Vederas y Jing Zheng, del laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Alberta, por su colaboración en la realización de los análisis de CG/EM.

## RESUMEN

Cada planta aromática biosintetiza una esencia única o quimiotipo de un aceite esencial, aunque su composición varía según las condiciones del suelo y del clima, así como de la parte de la planta. Los aceites esenciales son sintetizados y acumulados en las plantas, tienen mucha aplicación en la industria farmacéutica, sanitaria, cosmética, agrícola y alimenticia. Los aceites esenciales de las hojas de las plantas *C. citratus* (Poaceae), *L. citriodora* (Vernaceae), *M. officinalis* (Lamiaceae), *A. absinthium* (Asteraceae), *A. conyzoides* (Lamiaceae), *A. artemisiifolia* (Asteraceae), *P. carpunya* (Piperaceae) y *E. globulus* (Myrtaceae) fueron obtenidos con rendimientos de extracción de 0.2459, 0.0091, 0.0063, 0.0327, 0.0424, 0.0071, 0.0096 y 0.0222% respectivamente, y se identificaron la mayoría de los constituyentes de dichos aceites esenciales (88.95, 87.98, 83.90, 71.85, 77.03, 86.42, 79.43 y 82.89%, respectivamente). Los metabolitos secundarios encontrados en mayor proporción fueron: monoterpenos oxigenados en *C. citratus*, *L. citriodora*, *M. officinalis*, *A. absinthium*, *A. conyzoides*, *P. carpunya* y *E. globulus* (87.88, 64.17, 80.13, 70.83, 46.15, 60.44 y 69.92% respectivamente); sesquiterpenos (77.55%) en *A. Vulgaris* y derivados oxigenados de sesquiterpenos (16.31%) en *A. conyzoides*. Los constituyentes mayoritarios en sus respectivos aceites esenciales fueron el geranial (31.23, 42.09, y 24.29 %) en *C. citratus*, *L. citriodora* y *M. officinalis*, acetato de mirtenilo (33.82%) y tujona (34.70%) en *A. absinthium*, cetona artemisilo (16.38%) y verbenona (12.76%) en *A. conyzoides*, himachaleno (42.66%) en *A. artemisiifolia*, piperitona (50.96%) en *P. carpunya* y eucaliptol (69.92%) en *E. globulus*. Geranial, neral y geraniol fueron los monoterpenoides más abundantes y comunes en las esencias de *C. citratus*, *L. citriodora* y *M. officinalis*. Estas plantas pueden requerir metabolitos secundarios similares para sus interacciones ecológicas; además, la presencia de muchos posibles componentes bioactivos en estas especies de plantas cultivadas en Ecuador, podría demostrar sus usos medicinales para varios trastornos.

**Palabras Clave:** aceites esenciales, cromatografía de gases-espectrometría de masas, hidrodestilación, plantas medicinales

## REFERENCIAS

Abenaa, A.A., Diatewaa, M., Gakossoa, G., Gbeassorc, M., Hon-di-Assaha, T.H. & Ouambab, J.M. (2003). Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. *Fitoterapia*, 74, 231-236.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idomar, M. (2008). Biological effects of essential oils: A review. *Food. Chem. Toxicol.*, 46, 446-475.

Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. & Velásquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. Una revisión y enfoques. *Interciencia*, 30(8), 453-459.

Cerón, C. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. La Paz, Bolivia: Universidad de San Andrés.

Chalchat, J.C., Maksimovic, Z. A., Petrovic, S. D., Gorunovic, M. S., Dordevic, S. & Mraovic, M. (2004). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Ambrosia artemisiifolia* L. Essential Oil. *Journal of Essential Oil Research*, 16 (3), 270-273.

Dhingra, V., Rao, V. & Narasu, L. (2000). Current state of artemisin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Science*, 66, 279-300.

Fernández-Alonso, J. & Rivera-Díaz, O. (2006). *Las labiadas (familia Labiatae o Lamiaceae)*. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia.

Gros, E., Pomilio, A., Seldes, A. & Burton, G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. (Monografía N° 30). Washington, D.C., EEUU: Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.

Guerrini, A., Sachetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonado, M. & Bruni, R. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* and *Piper obliquum* (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 27, 39-48.

Hancianu, M., Aprotosoiaie, A. C., Gille, E., Poiata, A., Tuchilus, C., Spac, A. & Stanescu U. (2008). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Melissa officinalis* L. from Romania. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, 112 (3), 843-847.

- Juan, R., Palacios, O. & Ronceros, S. (2012). Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) sobre el *Tripanosoma cruzi* en ratones. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 29(1), 61-68.
- Kamboj, A. & Kumar-Saluja, A. (2008). *Ageratum conyzoides* L.: A review on its phytochemical and pharmacological profile. *International Journal of Green Pharmacy*, 2 (2), 59-68.
- Kpoviessia, B. S., Accrombessia, G., Frédérique, M., Moudachirouc, M. & Quetin-Leclercq, J. (2014). Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 652–659.
- Lima, B., de Lampasona, M.P., Schuff, C., Tapia, A., Bomben, R., Duschatzky, C. & Feresin, G. (2008). Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Artemisia mendozaana* D.C. Essential Oil. *Jeobp*, 11 (5), 496 – 502.
- Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Medellín, Colombia: Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.
- Mensah, M., Sarpong, K., Baser, K. H. & Özek, T. (1993). The Essential Oil of *Ageratum conyzoides* L. from Ghana. *Journal of Essential Oil Research*, 5 (1), 113-115.
- Meza, K. & Vargas, G. (2013). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hierba luisa (Cymbopogon citratus) Poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica*. Trabajo de grado, Universidad Politécnica Salesiana.
- Morais, S., Facundo, V., Medeiros, L., Barreira, E., Anjos, J., Ferreira, S., Sousa, E. & Sousa, M. (2007). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Biochem. Systemat. Ecol.*, 35, 670-675.
- Mothana, R.A., Abdo, S.A., Hasson, S., Althawab, F.M., Alaghbari, S.A. & Lindequist, U. (2010). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 7(3), 323-30.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J. & Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17 (13), 1061-1066.
- Natalia, S., Stadlerb, T. & Ferrero, A. (2011). Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium*

*castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) *Pest Manag Sci.*, 67: 639–646.

Oliva, M., Beltramino, E., Gallucci, M., Casero, C., Zygadlo, J. & Demo, M. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton from different regions of Argentina. *Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(1), 29-37.

Olivero-Verbel, J., Güette-Fernández, J. & Stashenko, E. (2009). Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (5), 419-427.

Pascual, ME, Slowing, K., Carretero, E., Sánchez-Mata, D. & Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol.*, 76 (3), 201-214.

Pino, J. & Rosado, A. (2000). Chemical Composition of the Essential Oil of *Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf. from Cuba *J. Essert. Oil Res.*, 12, 301-302.

Pati, R., Nimbalkar, M., Jadhav, U., Dawkar, V. & Govindwar, S. (2010). Antiaflatoxic and antioxidant activity of an essential oil from *Ageratum conyzoides*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90 (4), 608-614.

Sánchez, E., León, M., Chávez, D., Hechevarría, I. & Pino, J. (2010). Caracterización farmacognóstica de *Melissa officinalis* (toronjil). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15 (4), 198-208.

Singh, N. & Lai, H. (2001). Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferin toward human breast cancer cells. *Life Sciences*, 70, 49-56.

Silva, J., Abebe, W., Souza, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I. & Matos, M.A.J. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 89 (2-3), 277-283.

WHO. (2002). *WHO Traditional medicine strategy 2002-2005*. Geneva, Suiza: World Health Organization.

Yañez, C., Ríos, N., Mora, F., Rojas, L., Díaz, T., Velasco, J., Ríos, N. & Meléndez, P. (2011). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. de los llanos venezolanos. *Rev. Perú. Biol.*, 18 (2), 149 – 151.

Maksimovic, Z. (2008). *In vitro* antioxidant activity of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb. *Industrial Crops and Products*, 8: 356-360.

CUADRO 1

Composición química de los aceites esenciales de las hojas de las diferentes plantas medicinales

TABLE 1

Chemical composition of essential oils from the leaf of the medicinal plants

Constituyente	<i>A. abs</i>	<i>C. cit</i>	<i>E. glo.</i>	<i>L. cit</i>	<i>P. car</i>	<i>M. off</i>	<i>A. art.</i>	<i>A. con</i>
<b>Monoterpenos</b>								
4-tujeno	1.08							
β-mirceno		1.07				3.28		
α-pineno			3.54					
D-limoneno			1.52		4.32			
α-terpinoleno					4.67			
β-pineno						10		
tujona	34.7						0.41	
acetato de mirtenilo	33.82							
(1S,4S,5R)-(+)-3-tujanona	1.31							
3-tujol	0.94							
citronelal		3.07				2.97		
citronelol		1.68				2.28		
neral o citral B		1,77		23.4		12.11		
<i>trans</i> -geraniol		31.55		7.71		21.11		
geranial o citral A		31.23		42.04		24.29		
<i>cis</i> -geraniol o nerol		1.98		4.82				
eucaliptol			69.92				0.61	
α-terpineol			1.52					2.03
α-acetato de terpenilo			1.61					
acetato de geranilo				2.16		7.15		
<i>cis</i> -4-tujanol					2.03			
linalool					5.65			6.9
<i>trans</i> -2-carene-4-ol					1.01			
piperitona					50.96			8.08
β-acetato de terpinilo					0.79			
(-)- <i>cis</i> -verbenol							2.07	
acetato de verbenilo							1.1	
acetato de bornilo							2.01	
cetona de artemisilo								16.38
verbenona								12.76
<b>Sesquiterpenos</b>								
isoledeno			2.37					



aromadendreno	0.65								
alloaromadendreno	0.76	3.71							
nerolidol		0.82							
$\beta$ -cariofileno					6.45				
(Z,E)- $\alpha$ -farneseno								0.9	
cubebeno								14.9	
(-)- $\gamma$ -elemeno								17.87	
carotol								0.64	
veridiflor								1.41	
zingibereno								1.22	
(Z)-cariofileno									1.02
$\tau$ -cadinol									1.72
<i>cis</i> -nerolidol									2.67
óxido de cariofileno									11.92
himachaleno								42.66	
<b>Aromáticos</b>									
$\alpha$ -curcumeno		1.42							
<i>p</i> -cimeno					3.77				
safrol					2.46				
<i>o</i> -metilisoeugenol					3.77				
eugenol									1.22
<b>Otros metabolitos secundarios</b>									
1,3-bis-(2-ciclopropil-2-metilciclopropil)-but-2-en-1-ona				1.9					
3,3-dimetil-6-metilenciclohexeno								0.62	
1-octen-3-ol									6.34
Ciclooctanocarboxialdehido									3.28
duroquinona									2.71
<b>Total</b>	71.91	87.88	82.89	87.98	79.43	83.9	86.42	77.03	
<b>Rendimiento</b>	0.0327	0.2459	0.0222	0.0091	0.0096	0.0063	0.0071	0.0424	

*A. abs: Artemisia absinthium L; C.cit: Cymbopogon citratus; E. glo: Eucalyptus globulus; L. cit: Lippia citriodora; P. car: Piper carpyunya; M. off: Melissa officinalis; A. art: Ambrosia artemisiifolia; A. con: Ageratum conyzoides*

## CUADRO 2

Composición de familias químicas en los aceites esenciales de las hojas de las plantas medicinales

TABLE 2

Chemical family composition in the essential oils from the leaf of the medicinal plants

Familia química	<i>A. abs.</i>	<i>C. cit.</i>	<i>E. glo.</i>	<i>L. cit.</i>	<i>P. car.</i>	<i>M. off.</i>	<i>A. art.</i>	<i>A. con.</i>
Mt	1.08	1.07	5.06	0	8.99	13.28	0	0
MtO	70.83	87.88	74.05	80.13	60.44	64.17	6.2	46.15
Sqt	0	0	3.78	0	0	6.45	77.55	1.02
SqtO	0	0	0	4.53	0	0	2.05	16.31
Ar	0	0	0	1.42	10	0	0	1.22
HC	0	0	0	0	0	3.51	0.62	0
OMS	0	0	0	1.9	0	0	0	12.33

Mt: monoterpenos; MtO monoterpenos oxigenados; Sqt: sesquiterpenos; SqtO: sesquiterpenos oxigenados; Ar: aromáticos; HC: hidrocarburos no terpenoidales; OMS: otros metabolitos secundarios. *A. abs.*: *Artemisia absinthium* L.; *C.cit.*: *Cymbopogon citratus*; *E. uro.*: *Eucaliptus globulus*; *L. cit.*: *Lippia citriodora*; *P. car.*: *Piper carpunya*; *M. off.*: *Melissa officinalis*; *A. art.*: *Ambrosia artemisifolia*; *A. con.*: *Ageratum conyzoides*.

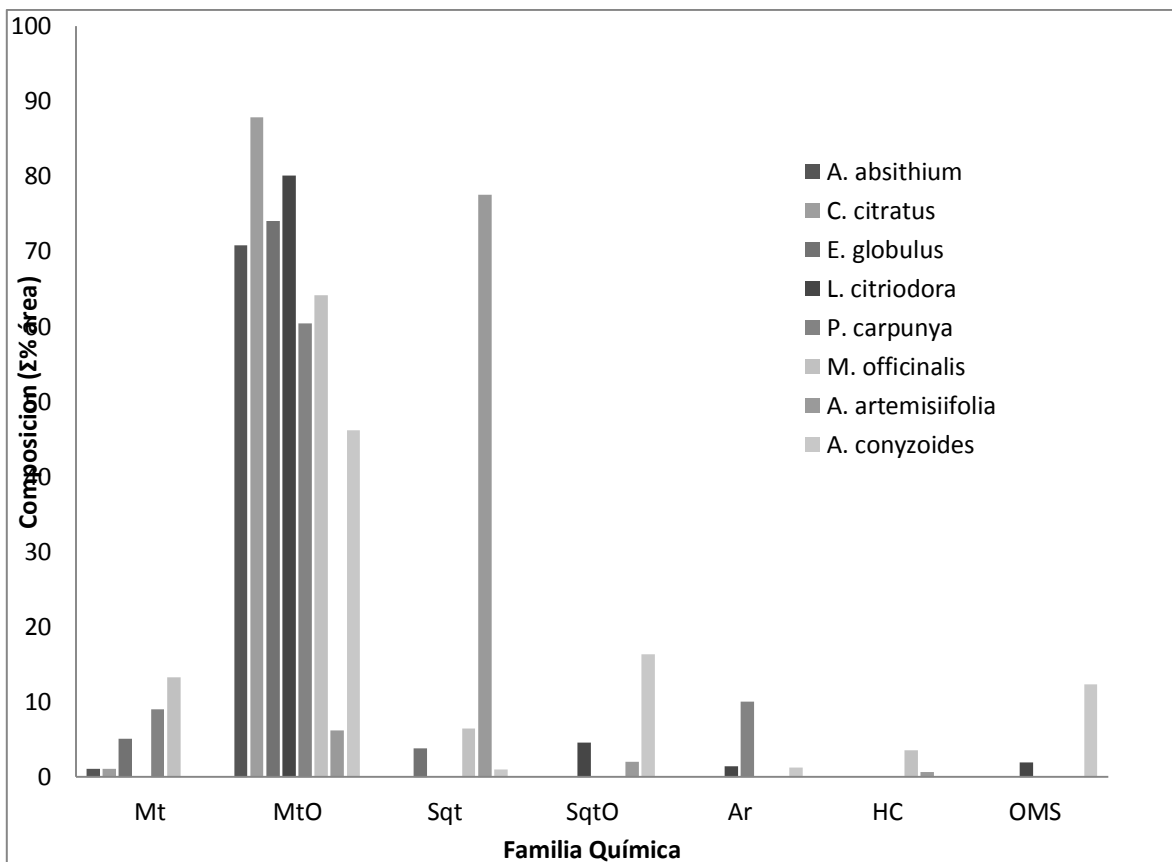


Fig. 1. Distribución de familias químicas en los aceites esenciales de las hojas de las plantas (Mt: monoterpenos; MtO: monoterpenos oxigenados; Sqt: sesquiterpenos; SqtO: sesquiterpenos oxigenados; Ar: aromáticos; HC: hidrocarburos no terpenoidales; OMS: otros metabolitos secundarios).

Fig. 1. Chemical family distribution in the essential oils from the leaf of the plants (Mt: monoterpenes; MtO: oxygenated monoterpenes; Sqt: sesquiterpenes; SqtO: oxygenated sesquiterpenes; Ar: aromatic derivatives; HC: non-terpenoid hydrocarbons; OMS: other non-terpenoid secondary metabolites).

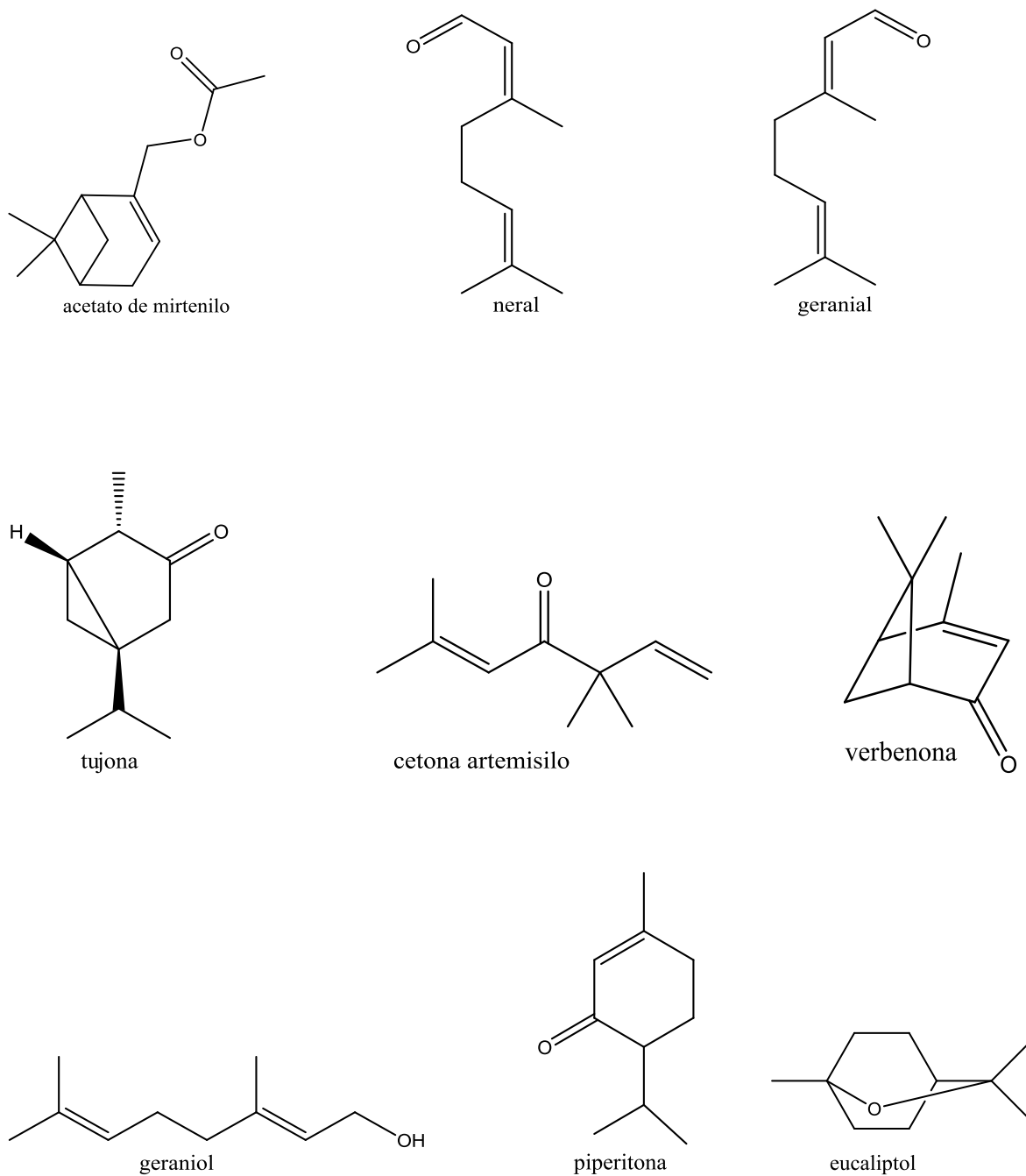


Fig. 2. Estructuras de algunos metabolitos volátiles mayoritarios en los aceites esenciales de las ocho plantas analizadas.

Fig. 2. Structures of some major volatile metabolites in the essential oils of the eight analyzed plants.

**Artículo Científico Indexado 2:** se envió a la revista Interciencia ([www.interciencia.org/](http://www.interciencia.org/))  
(en revisión)

## **IDENTIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE ALGUNOS CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LA FRACCIÓN APOLAR DE LAS HOJAS DE *Melissa officinalis* CON POSIBLE ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Haydelba D'Armas, Carmita Jaramillo Jaramillo, Ligia Llovera y Liz Cubillán

### **RESUMEN**

Las plantas medicinales han sido tradicionalmente utilizadas en el tratamiento de muchas enfermedades y sus propiedades farmacológicas y terapéuticas han sido atribuidas a los distintos constituyentes químicos aislados de sus extractos crudos. *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) o bálsamo de limón, es ampliamente usada como té de hierbas para tratar o aliviar la perturbación nerviosa del sueño y los trastornos gastrointestinales funcionales. Con el objetivo de estudiar dicha planta, se analizó el extracto en hexano de las hojas de *M. officinalis* recolectada en la ciudad de Machala, Provincia del Oro, Ecuador. Se evaluaron las propiedades antibacteriana, antifúngica y tóxica del extracto crudo, revelándose una actividad antibacteriana moderada frente a las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*, así como una letalidad significativa ( $CL_{50}$  de 78,82  $\mu\text{g/ml}$ ) contra *Artemia salina*. Las fracciones B y C obtenidas usando cromatografías de columna eluidas con mezclas de hexano: diclorometano en distintas proporciones exhibieron una letalidad muy significativa y la fracción B presentó actividad antifúngica contra las cepas *Mucor* sp y *C. albicans*. Mediante análisis de la fracción B por CG/EM se identificaron los compuestos: 7,9- di-tert-butil- 1- oxaspiro [4,5] deca-6,9-dieno-2,8-diona, docosanol como compuesto mayoritario, una mezcla de esteroides tipo colestano y un éster de ácido graso de un esteroide. A partir de la fracción C se aisló un sólido blanquecino, el cual se recristalizó con metanol/acetona, obteniéndose un punto de fusión de 136,4-138,9°C. Para la caracterización estructural de este sólido se realizaron análisis espectroscópicos (IR, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, HMQC y HMBC), cuyos datos espectrales permitieron establecer al campesterol como estructura posible del esteroide aislado.

Palabras claves: campesterol, GC/EM, *Melissa officinalis*, RMN

## STRUCTURAL IDENTIFICATION OF SOME CHEMICAL CONSTITUENTS OF APOLAR EXTRACT FROM *Melissa officinalis* LEAVES WITH POSSIBLE BIOLOGICAL ACTIVITY

Haydelba D'Armas, Carmita Jaramillo Jaramillo, Ligia Llovera y Liz Cubillán

### ABSTRACT

Medicinal plants have been traditionally used in the treatment of many diseases and their pharmacological and therapeutic properties have been attributed to various chemical constituents isolated from their crude extracts. *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) or lemon balm is widely used as herbal tea to treat or relieve nervous sleep disturbance and functional gastrointestinal disorders. For the purpose of studying the plant, the hexane extract of the leaves of *M. officinalis* collected in the city of Machala, El Oro Province, Ecuador, was analyzed. The antibacterial, antifungal and toxic properties of the crude extract were evaluated, revealing a moderate antibacterial activity against bacteria *S. aureus* and *P. aeruginosa*, as well as a significant lethality (LC<sub>50</sub> of 78.82 µg/ml) against *Artemia salina*. B and C fractions obtained using column chromatography eluted with hexane: dichloromethane in different proportions exhibited a significant lethality, and fraction B showed antifungal activity against *C. albicans* and *Mucor* sp strains. Through analysis of fraction B by GC/MS some compounds were identified: 7,9- di-tert-butyl-1- oxaspiro [4,5] deca-6,9-diene-2,8-dione, docosanol as majority compound, a mixture of cholestane type sterols and fatty acid ester of a sterol. From the fraction C was isolated a white solid, which was recrystallized from methanol/acetone to give a melting point of 136.4-138.9°C. Spectroscopic analyzes were performed (IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HMQC and HMBC) for the structural characterization of this solid, whose spectral data allowed to establish campesterol as possible structure of isolated sterol.

Key words: campesterol, GC/MS, *Melissa officinalis*, NMR

**Haydelba D'Armas.** Ph.D. en Química, University of the West Indies (UWI). MSc. en Oceanografía Química, Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV), Universidad

de Oriente (UDO). Docente e Investigador, Dpto. de Química, Escuela de Ciencias, UDO, Cumaná, Venezuela. Investigador Prometeo-SENESCYT en la Planta Piloto de Farmacia, Unidad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Machala, Provincia del Oro, Ecuador. e-mail: [haydelba@yahoo.com](mailto:haydelba@yahoo.com).

**Carmita Jaramillo Jaramillo.** MSc. en Química Farmacéutica, Universidad de la Habana, Cuba. MSc. en Docencia Universitaria e Investigación, Universidad Técnica de Machala (UTMACH). Administrador Técnico de Laboratorio de Planta Piloto de Farmacia de la UTMACH. Cotutora de Trabajos de Investigación de la Unidad de Ciencias Químicas de la Salud y Contraparte técnico de proyectos Prometeo en la UTMACH, Machala, Provincia del Oro, Ecuador. e-mail: [carmitagjj@hotmail.com](mailto:carmitagjj@hotmail.com).

**Ligia Llovera.** MSc en Química, Universidad Simón Bolívar (USB). Profesional Asociado a la Investigación, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Centro de Química, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Carretera Panamericana, Km 11, Altos de Pipe, Municipio Los Salias, estado Miranda, Venezuela. Apartado 20632. e-mail: [llovera@ivic.gob.ve](mailto:llovera@ivic.gob.ve).

**Liz Cubillán.** MSc. en Química, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesional Asistente en Análisis Instrumental en el Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Lic. en Educación Mención Química, UCV. Profesor A de Química en Institutos privados y preparadora del Programa Nacional de Formación de Grado en Gestión Ambiental de la UBT. E-mail: [cubillan@ivic.gob.ve](mailto:cubillan@ivic.gob.ve).

## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales se han utilizado tradicionalmente en el tratamiento de varias enfermedades humanas y sus propiedades farmacológicas y terapéuticas han sido atribuidas a diferentes constituyentes químicos aislados de sus extractos crudos. De particular importancia, componentes químicos con actividad antioxidante se encuentran en altas concentraciones en las plantas y pueden ser responsables de sus efectos preventivos en diversas enfermedades degenerativas, como el cáncer, enfermedades neurológicas y cardiovasculares (Picada *et al*, 2009).

*Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) o bálsamo de limón o toronjil, es una planta perenne familia de la menta y nativa de Europa, una hierba comestible para la región mediterránea. Su uso como hierba medicinal se remonta a la Edad Media, es ampliamente utilizada como té de hierbas, y es muy bien conocido por su capacidad para reducir el estrés y la ansiedad, estimular el sueño, mejorar el apetito, aliviar el dolor o propiedades antiespasmódicas y las molestias asociadas con la digestión (trastornos gastrointestinales funcionales). Es de gran importancia, algunos estudios que han demostrado efectos antitumorales y neuroprotectores de *M. officinalis* (de Sousa, 2004; Marioungu, 2004).

Se recomienda el aceite esencial de *M. officinalis* por su actividad antimicrobiana demostrada (Mimica-Dukic *et al*, 2004) y los extractos acuosos de esta especie porque exhiben propiedades antivirales (Hohmann *et al*, 1999) y antioxidante (Hussain *et al*, 2011). También se informó de que *M. officinalis* contiene sustancias que inhiben la biosíntesis de proteínas en las células cancerosas (Galasinski *et al*, 1996). Estas actividades biológicas se han atribuido al aceite esencial (donde los mayores constituyentes son los terpenoides como el citral o mezcla de los isómeros neral y geranial, citronelal, geraniol, nerol y linalol), taninos (WHO, 2002), flavonoides (Patora y Klimek, 2002), antocianinas (Hossain *et al*, 2009) y ácidos fenólicos hidroxicinámicos (Lamaison *et al*, 1991; Canova y Brandsteterova, 2001).

Se han demostrado variaciones cualitativas de su aceite esencial por factores genéticos y variaciones cualitativas debidas a las condiciones ambientales, duración del día y composición del suelo. Los estudios sobre el aceite esencial han sido extensa, pero la información de los componentes no volátiles es escasa (Herode *et al*, 2003; Brieskorn y Krause, 1974). Mencherine *et al* (2007) aislaron y caracterizaron cinco nuevos triterpenos tipo urseno y oleaneno y un nuevo glucósido urseno del extracto polar de las hojas y tallos de *M. officinalis* recolectada en Italia; así como los compuestos conocidos quadranosido III, luteolin y los ácidos rosmarínico y salviánico A. Además, demostraron el efecto antimicrobial de los extractos y compuestos. Varios estudios sugieren que el toronjil o bálsamo de limón es beneficioso para una amplia variedad de trastornos humanos tales como el cáncer, el VIH-1, la enfermedad de Alzheimer, trastorno de hiperactividad por



déficit de atención, indigestión, gas, insomnio, y el hipertiroidismo (Galasinski *et al.*, 1996; Geuenich *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2006; Muller y Klement, 2006).

## **Materiales y métodos**

### *Muestreo*

Los ejemplares de la planta *Melissa officinalis* se recolectaron en la ciudad de Machala, Provincia del Oro, región suroeste de Ecuador, entre 3°16' 0" S y 79° 59' 0" W, durante abril de 2014. La muestra fue taxonómicamente identificada por el Botánico Jesús Inca del Herbario Nacional de Quito (Ecuador).

### *Extracción*

Para la obtención del extracto apolar de la planta se procedió de la siguiente manera: Las hojas se lavaron con agua destilada, secaron a la sombra y a temperatura ambiente en el laboratorio y luego en la estufa a 40° por 24h. Posteriormente, se realizó la molienda de las hojas secas, en un molino eléctrico, para ser maceradas con hexano durante 48h. Luego de filtrado el solvente, el residuo se macero con hexano nuevamente para garantizar la extracción completa de los metabolitos secundarios presentes. El filtrado total de las dos maceraciones, fue evaporado y concentrado a presión reducida en un rota-evaporador para la obtención del extracto hexánico. Luego, se le realizaron las pruebas de actividad biológica y un estudio fitoquímico preliminar antes del fraccionamiento cromatográfico.

### *Fraccionamiento cromatográfico*

La separación de los compuestos presentes en el extracto en hexano se realizó por cromatografía de columna por gravedad (CC) con sílica-gel 35-70 mesh (0,2-0,5 mm), en una columna de 2,5 cm de diámetro y 70 cm de largo. Se utilizaron 3,8960 g del extracto y 116,8800 g de sílica en una relación muestra: sílica 1:30. Se usaron como eluyentes hexano, mezclas en polaridad creciente de hexano-diclorometano, diclorometano-acetona, acetona-metanol; acetona y metanol al 100%. A cada uno de los eluatos obtenidos, se les realizó CCF en placas cromatográficas de vidrio 20x20 cm<sup>2</sup>, recubiertas con sílica-gel de 60 mesh tipo GF, con un espesor de 0,5 mm, empleándose mezclas de hexano-acetona en proporciones de 4:1, 1:1 y acetona al 100%, obteniéndose ocho fracciones (A-H) por

comparación de sus  $R_f$ . Se empleó como revelador luz ultravioleta (UV) de longitud de onda corta (100-280 nm) y una solución de molibdato de amonio al 5% en  $H_2SO_4$  al 10%.

La fracción C se fraccionó por CC con sílica-gel 35-70 mesh, para lo cual se empleó una bureta de 25 ml como columna. Se cromatografiaron 0,2032 g de la fracción con 8,1280 g de sílica en una relación muestra: sílica 1:40, utilizándose hexano, mezclas en polaridad ascendente de hexano-diclorometano, acetona y metanol, como eluyentes. A cada uno de los eluatos obtenidos de la CC de esta fracción, se les realizó CCF, empleándose mezclas de hexano-cloroformo en proporciones de 4:1, 1:1 y cloroformo 100%, obteniéndose 7 sub-fracciones por comparación de sus  $R_f$ . Las CCF mostraron que la sub-fracción C.3, fue la única mezcla que presentó una buena separación de sus constituyentes con un componente que mostró mayor intensidad, ya que las subfracciones restantes resultaron ser mezclas muy complejas de compuestos con  $R_f$  muy cercanos de difícil separación. Esta sub-fracción se fraccionó nuevamente por CC con sílica-gel 35-70 mesh, en una bureta de 25 ml como columna, para lo cual se cromatografiaron 0,1580 g de la subfracción con 6,3210 g de sílica en una relación muestra: sílica 1:40. Como eluyentes se usaron hexano, mezclas en polaridad creciente de hexano-diclorometano, diclorometano y acetona; los eluatos obtenidos se combinaron según las evidencias de la CCF usando los mismos solventes mencionados.

La subfracción C.3.2 eluida en hexano/diclorometano 4:1 se obtuvo como un sólido blanquecino, el cual revelaba en CCF una sola mancha utilizando varios sistemas de solventes, siendo presumiblemente un solo compuesto, ya que se observó una mancha bien definida al ser revelada con una solución ácida de molibdato de amonio, por lo cual esta sub-fracción fue recrystalizada en una mezcla acetona-metanol, y analizada por IR y RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$ .

#### *Caracterización estructural de la fracción B*

La cromatografía de gases y los espectros de masas por impacto electrónico (70eV), se realizaron en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC), los cuales se registraron en un equipo de CG/EM marca VARIAN modelo Saturno 2000, con una fuente de ionización por impacto electrónico y un detector de trampa de iones. Se utilizó una columna de CP-SIL-8CB-MS de 30 m  $\times$  0,25 D.I y helio (He) como gas de arrastre. La temperatura del inyector fue de 280°C, la

temperatura inicial del horno fue de 100°C con una rapidez de calentamiento de 5°C por minuto, hasta llegar a una temperatura final de 295°C. Posteriormente, la identificación de los compuestos se realizó por comparación computarizada con las librerías WILEY y NIST.

#### *Caracterización estructural del esteroide (fracción C.3.2)*

La estructura del compuesto aislado se elucidó mediante el uso combinado de resonancia magnética nuclear (RMN) uni y bi-dimensional ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMQC y HMBC) y espectroscopía infrarroja (IR). El metabolito fue analizado en un equipo de RMN Varian de 500MHz en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para la obtención de los espectros, la muestra fue disuelta en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) obtenidos en los espectros se reportaron en ppm, en relación a un estándar interno de tetrametilsilano (TMS). Del espectro HMQC se obtuvieron las conectividades directas entre carbonos e hidrógenos. Del espectro HMBC se obtuvieron las conectividades entre carbonos e hidrógenos distanciados por dos o tres enlaces. Para los análisis de espectroscopía infrarroja (IR) se colocó el compuesto aislado, disuelto en  $\text{CHCl}_3$ , en pastillas de KCl y se analizó en un espectrofotómetro de FTIR 16PC Perkin Elmer, con 24 barridos a resolución de  $2\text{cm}^{-1}$ . Este espectro se obtuvo en el Instituto de Investigaciones de Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA) de la Universidad de Oriente, Venezuela.

#### *Ensayos biológicos*

La actividad biológica del extracto y las fracciones de las hojas de *M. officinalis* se evaluó mediante el uso de los siguientes bioensayos:

*Actividad antibacteriana.* La presencia de principios activos antibacterianos se detectó utilizando cepas de bacterias certificadas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Gram positiva); *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativas), siguiendo la técnica de difusión en agar o método de antibiograma (Bauer *et al*, 1966). La antibiosis se verificó midiendo el diámetro (mm) de los halos de inhibición alrededor de los discos de 5 mm de diámetro. Se evaluaron los diámetros de los halos de inhibición tomando como referencia los criterios expuestos, por algunos investigadores del área de productos naturales, para extractos crudos (Monks *et al*, 2002).

*Actividad antifúngica.* Igualmente, se midió esta la actividad biológica inoculándose con las cepas de hongos patógenos *Candida albicans* y *Mucor* sp, siguiendo el procedimiento descrito por Madubunyi (1995). La aparición de halos de inhibición alrededor del disco (5 mm), fue el indicativo de la actividad fúngica del extracto o fracción, los cuales se midieron tomando en cuenta el diámetro en mm.

*Letalidad.* El grado de letalidad o toxicidad de los extractos y de algunas fracciones, fue evaluada en larvas del crustáceo *Artemia salina*, siguiendo la técnica descrita por Meyer *et al* (1982). Se analizaron los resultados obtenidos de mortalidad de los nauplios, con el método estadístico diseñado por Stephan (1977) para determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) (Probit, Logit, Moving Average o Binomial con un límite de confianza de 95%).

### **Resultados y discusión**

Los bioensayos realizados permitieron evaluar los efectos del extracto crudo en hexano y algunas fracciones obtenidas en la separación cromatográfica de dicho extracto de *M. officinalis* sobre los microorganismos ensayados. Los resultados obtenidos proporcionaron información acerca de las fracciones bioactivas, donde posiblemente se encontraban los metabolitos secundarios causantes de la actividad biológica observada, permitiendo seleccionar algunas de las fracciones para ser analizadas.

#### *Actividad antimicrobiana*

En el bioensayo realizado contra diversas cepas microbianas (hongos y bacterias), el extracto crudo en hexano mostró un efecto antibacteriano moderado frente a las cepas *S. aureus* (12 mm) y *P. aeruginosa* (16 mm), sin embargo las bacterias *E. coli* y *B. cereus* no presentaron sensibilidad ante el extracto hexánico. La fracción B mostró actividad antibacteriana leve o efecto antagónico contra *B. cereus* (9 mm), mientras que la fracción C mostró actividad moderada contra *S. aureus* (13 mm) y *P. aeruginosa* (15 mm). Ninguna de ambas fracciones ensayadas mostraron efecto bactericida o bacteriostático contra la bacteria *E. coli*. Además, se observó que la fracción B exhibió actividad antifúngica moderada frente a las cepas de hongos *Mucor* sp. (12 mm) y *C. albicans* (11 mm).

Estos resultados indican la existencia de metabolitos secundarios con potencial antibacteriano y antifúngico en el extracto apolar de *M. officinalis* y la actividad biológica observada puede deberse a la alta concentración de dichos componentes en la fracción, así como a la presencia de más de un compuesto bioactivo en la misma. El extracto apolar de *M. officinalis* mostró un efecto bactericida contra la cepa Gram positiva *S. aureus* y fungicida contra *Mucor* sp y *C. albicans*, resultado similar fue obtenido en un estudio realizado con extractos polares de tallos y hojas de esta planta, donde éstos exhibieron un efecto bacteriostático contra las bacterias *S. aureus* y *S. epidermitis*, y el hongo *B. spizizenii* (Mencherine *et al.*, 2007).

#### *Actividad letal*

La letalidad *in vivo* del crustáceo *Artemia salina* puede ser usada como un medio para la discriminación y fraccionamiento en el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos (McLaughlin *et al.*, 1991), por lo que es utilizado comúnmente para la evaluación de productos naturales y de actividad farmacológica. Se ha reportado la presencia de compuestos anticancerígenos y antitumorales aislados de organismos marinos, los cuales previamente mostraron actividad tóxica en el ensayo de *A. salina*. Este es un bioensayo simple que en alguna forma se correlaciona con la citotoxicidad (Schmitz *et al.*, 1993). El bioensayo mostró valores de CL<sub>50</sub> de 78,82 µg/ml para el extracto hexánico; 31,16 y 29,06 µg/ml para las fracciones B y C (obtenidas por separación cromatográfica) respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron una actividad letal muy significativa para el extracto hexánico y las fracciones B y C, lo cual evidencia una toxicidad significativa (Meyer *et al.*, 1982) para esta especie y conduce a presumir la existencia de compuestos o metabolitos secundarios con una alta actividad citotóxica.

Según reportes en la literatura valores de CL<sub>50</sub> < 1000 µg/ml se consideran tóxicos y para CL<sub>50</sub> menores o igual a 30 µg/ml se tiene una buena correlación con líneas celulares anticancerígenas del tipo 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y 9SP (leucemia), por lo que el extracto o compuestos bioactivos que constituyen una especie en particular pueden exhibir un potencial citotóxico importante (Carballo *et al.*, 2002). Probablemente, la mortalidad observada se deba a que los extractos hacen que aumente la tasa de consumo de oxígeno, así cuando el animal es expuesto a un agente tóxico, los procesos fisiológicos actúan para compensar el estrés tóxico, provocando alteraciones que pueden llevar hasta la

muerte del organismo. Este estudio proporciona resultados de interés, ya que investigaciones de toxicidad aguda contra *Artemia* de las partes botánicas de *M. officinalis*, son casi inexistentes.

#### *Caracterización de la fracción B*

Se obtuvo en muy poca cantidad, como un sólido beige. Debido a que esta fracción presentó actividad antifúngica contra las cepas *Mucor* sp y *C. albicans*, exhibió una CL<sub>50</sub> de 31,16 µg/ml y no mostró una buena separación de sus constituyentes en la CCF, se decidió analizarla por CG/EM. La cromatografía de gases de esta fracción, mostró la presencia de los compuestos siguientes: 7,9-di-tert-butil-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9-dieno-2,8-diona (TR=12,43 min), docosanol (TR=13,75 min) como compuesto mayoritario, una mezcla de esteroides (TR=22,81 y TR=29,77 min) y éster de ácido graso de un esteroide (TR=28,03 min). El espectro de masas del 7,9-di-tert-butil- 1- oxaspiro [4,5] deca-6,9-dieno-2,8-diona desplegó un ión molecular a m/z 276 [M<sup>+</sup>], en concordancia con la fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>, y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 261, 206, 175, 135, 109, 91 y 57 (pico base). Esta cetona no ha sido reportada en especies de la familia Lamiaceae; siendo este el primer reporte de este compuesto en una planta perteneciente a dicha familia. No existe información en la literatura de algún tipo de actividad farmacológica relacionada con este compuesto; sin embargo, el mismo fue identificado mediante CG/EM en el extracto etéreo del arroz, en una investigación sobre la actividad alelopática que posee este cereal (Murillo, 2006).

El espectro de masas del docosanol desplegó un ión molecular a m/z 308 [M<sup>+</sup>], que corresponde a la fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>46</sub>O y los fragmentos de los picos mas abundantes a m/z 97 y 43 (pico base). Este alcohol graso saturado, utilizado principalmente como agente antiviral, es el ingrediente activo de una crema de uso tópico específica para el tratamiento de enfermedades causadas por el virus del herpes simple y funciona inhibiendo la fusión de la célula huésped humana con la envoltura viral del virus del herpes, previniendo las réplicas (Sachs *et al*, 2001). Docosanol fue reportado como uno de los ácidos grasos de la *Nicotiana tabacum* L y a su vez se informó sobre la actividad alelopática de esta planta (Vlitos y Crosby, 1959).

En el espectro de masas del esteroil 4,4,10,13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo, se observó un ión molecular a  $m/z$  468 [ $M^+$ ], correspondiente a la fórmula molecular  $C_{32}H_{52}O_2$ , y los picos de los fragmentos más abundantes se observaron a  $m/z$  393, 355, 295, 239, 159, 119 y 43 (pico base). Mientras que el del 4,4-dimetil-colesta-8, 14,24-trien-3-ol, desplegó un ión molecular a  $m/z$  410 [ $M^+$ ] en concordancia con la fórmula molecular  $C_{29}H_{46}O$  y los picos de los fragmentos de masas más abundantes se observaron a  $m/z$  396, 382 (pico base), 355, 330, 304, 270, 228, 145 y 41. El espectro de masas del otro compuesto identificado como 4, 4,17- trimetilcolest-8,14- dien-3-il dodecanoato exhibió un ión molecular a  $m/z$  608 [ $M^+$ ], el cual corresponde con la fórmula molecular  $C_{42}H_{72}O_2$ , y los picos de los fragmentos más abundantes se observaron a  $m/z$  564, 489, 409, 393, 375 (pico base), 355, 269, 230, 207,145 y 55.

Los esteroides provenientes de las plantas o fitosteroides, son tipos de fitoquímicos que tienen una variedad de propiedades medicinales. Los esteroides y estanoles vegetales son alimentos seguros que pueden generar grandes beneficios en poblaciones con hipercolesterolemia moderada o riesgo cardiovascular. En un estudio realizado se reportó la eficacia de los esteroides vegetales como agentes de reducción media en lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Eldin y Moazami, 2006). La presencia del 4, 4,17-trimetilcolest-8,14-dien-3-il dodecanoato, en las hojas de *M. officinalis* es de importancia medicinal, ya que en un estudio realizado en humanos, se mostró que los ésteres de ácidos grasos de esteroides vegetales no solo disminuyen los niveles de colesterol en la sangre (colesterol-LDL), sino los niveles de triacilgliceroides (Arnqvist, 2007).

#### *Aislamiento y caracterización estructural del esteroil*

El compuesto aislado, C.3.2, proveniente de una fracción bioactiva ( $CL_{50}$  de 29,06  $\mu\text{g/ml}$  y con actividad bactericida) exhibió un punto de fusión en un rango de 136,4-138,9°C. Su espectro IR mostró una absorción a  $3400\text{ cm}^{-1}$ , debida al estiramiento del enlace oxígeno-hidrógeno del grupo hidroxilo (-OH), otra absorción a  $3000\text{ cm}^{-1}$  producto del estiramiento del enlace carbono-hidrógeno, de un carbono  $sp^2$  (H-C=), así como una señal a  $1210\text{ cm}^{-1}$  debida al estiramiento asimétrico del enlace carbono-oxígeno (C-O).

En la región a campo bajo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la sub-fracción C.3.2 se observaron dos señales, una que integra para un protón olefínico a  $\delta_{\text{H}}$  5,33 debido a la existencia de un doble enlace en la estructura de la molécula, y otra a  $\delta_{\text{H}}$  3,50 como un multiplete para un protón asignado a un hidrógeno que se encuentra enlazado a un carbono unido a un átomo de oxígeno (H-C-O). A campo alto, también se pudo observar un multiplete a  $\delta_{\text{H}}$  2,26, que integra para dos protones, correspondiente a un metileno enlazado a un carbono olefínico ( $\text{CH}_2\text{-C=}$ ), así mismo a  $\delta_{\text{H}}$  1,99 y 1,83 se revelan dos multipletes asignables a dos metilenos. Además, la zona alifática exhibió seis señales asignadas a metilos, cuatro como dobletes a  $\delta_{\text{H}}$  0,84; 0,85; 0,89 y 0,90 (metilos secundarios) y dos como singuletes a  $\delta_{\text{H}}$  0,67 y 0,95 (metilos terciarios) (Tabla I).

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de esta sub-fracción mostró desplazamientos químicos de 28 carbonos diferentes, específicamente tres señales a campo bajo, dos señales a  $\delta_{\text{C}}$  140,74 y 121,70, que corresponden y confirman la existencia de un doble enlace en la estructura de la molécula, y otra a  $\delta_{\text{C}}$  71,80 asignable a un carbono unido a un átomo de oxígeno. Los otros desplazamientos químicos corresponden a carbonos alifáticos, entre los que se observaron seis señales a campo más alto entre  $\delta_{\text{C}}$  11,80 y 22,80 asignables a carbonos metílicos (Tabla II).

Las señales observadas en los espectros DEPT, ayudaron a identificar los tipos de carbonos presentes en la estructura, ya que se constató la presencia de seis carbonos metílicos en el compuesto a 11,84, 19,38, 18,70, 22,54, 22,79 y 17,59 ppm, lo cual concuerda con los seis desplazamientos químicos a campos altos observados en el espectro de RMN $^{13}\text{C}$  correspondientes a los carbonos C-18, C-19, C-21, C-26, C-27 y C-28 respectivamente; así como diez carbonos metilénicos. Además, se verificó la presencia de nueve metinos (71,80, 121,70, 31,89, 50,15, 56,76, 56,15, 35,77, 38,0 y 28,21 ppm asignables a los carbonos C-3, C-6, C-8, C-9, C-14, C-17, C-20, C-24 y C-25 respectivamente), con un doble enlace trisustituído, debido a la ausencia de una de las señales olefínicas a 140,74 ppm, correspondiente a uno (C-5) de los tres carbonos cuaternarios (C-10 a  $\delta_{\text{C}}$  36,50 y C-13 a  $\delta_{\text{C}}$  42,19). Estas señales están en concordancia con un esqueleto esteroideal.



El espectro HMQC permitió obtener las conectividades directas existentes entre las señales observadas en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , entre las que se encuentran la conectividad entre  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_6$  con  $\text{H}_3$  y  $\text{H}_6$ , las correlaciones entre  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_{19}$ ,  $\text{C}_{21}$ ,  $\text{C}_{26}$ ,  $\text{C}_{27}$  y  $\text{C}_{28}$  con  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_{18}$ ,  $\text{H}_{19}$ ,  $\text{H}_{21}$ ,  $\text{H}_{26}$ ,  $\text{H}_{27}$  y  $\text{H}_{28}$ , además se observó que  $\text{C}_5$  no presentaba ninguna conectividad. Los datos de HMBC mostraron la correlación existente entre  $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_9$  y  $\text{C}_{10}$  con  $\text{H}_{19}$ ;  $\text{C}_3$  y  $\text{H}_4$ , más las conectividades entre  $\text{C}_{13}$ ,  $\text{C}_{14}$  y  $\text{C}_{17}$  con  $\text{H}_{18}$ , con estas correlaciones se logró conformar la estructura del núcleo esteroidal (Figura 1a). Adicionalmente, con este experimento de RMN, se observaron las conectividades que existen entre  $\text{C}_{17}$  y  $\text{C}_{20}$  con  $\text{H}_{21}$ , y la de  $\text{C}_{25}$  con  $\text{H}_{26}$  y  $\text{H}_{28}$ , las cuales condujeron a la estructura de la cadena lateral del esterol (Figura 1b) (Tabla II).

Basado en un análisis combinado de los datos suministrados por los espectros IR y RMN uni y bidimensional de la sub-fracción C.3.2, se estableció que el compuesto aislado se trataba de un esterol, con un esqueleto similar al del colesterol, cuya posible estructura es la del campesterol (Figura 3). Este esterol no ha sido aislado previamente de *M. officinalis*; siendo este el primer reporte en la literatura de un compuesto esteroidal para esta planta, ya que solo se ha informado sobre la presencia de compuestos triterpenoidales en esta especie, cultivada en otras latitudes (Mencherine *et al.*, 2007). El campesterol es un compuesto por lo general más de origen vegetal que animal, de allí que a menudo sea denominado un fitoesterol. Hasta ahora la mayor importancia de este tipo esteroides naturales, es para la industria farmacéutica, en especial la dedicada a la producción de esteroides (Martínez, 2002). El campesterol se aisló, junto a otros esteroides y demás compuestos, del tallo de *Fagara tessmannii* (Rutaceae) (Mbaze *et al.*, 2007), y se identificó mediante CG/EM del aceite de la semilla de *Hippophae rhamnoides* L. (Li *et al.*, 2007). Aunque a los esteroides naturales o fitoesteroides no se les conocen actividades biológicas específicas fuera de las funciones biológicas citadas anteriormente, se ha demostrado que poseen además propiedades: inmuno-moduladoras, antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas (Muñoz *et al.*, 2011).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Proyecto Prometeo de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de la República de Ecuador (SENESCYT) por el financiamiento de esta investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

Arnqvist L (2007) *Plant sterol metabolism with emphasis on glycoalkaloid biosynthesis in potato*. PhD Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 50pp.

Bauer A, Kirby A, Sherris J, Turk M (1966) Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathol.* 45: 493-496.

Brieskorn C y Krause W (1974) Weitere triterpene aus *Melissa officinalis* L. *Arch. Pharm.* 307: 603-612.

Canova A, Brandsteterova E (2001) HPLC Analysis of Phenolic Acids in *Melissa officinalis*. *J Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24: 2647-2659.

Carballo J, Hernández Z, Pérez P, García D (2002) A comparison between two brine shrimp assay to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *Biotechnology.* 2: 17-21.

de Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattass CR (2004) *Melissa officinalis* L essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol.* 56:677-681.

Eldin A, Moazzami A (2009) Plant sterols and stanols as cholesterol-lowering ingredients in functional foods. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 1: 1-14.

Galasinski W, Chlabicz J, Paszkiew-Gadek A, Marcinkrewicz C, Gindzienski A (1996) The substances of plants origin that inhibit protein biosynthesis. *Acta Pol. Pharm.* 53: 311-318.

Geuenich S, Goffinet S, Venzke S, Nolkemper S, Baumann I, Plinkert P, Reichling J, Keppler OT (2008) Aqueous extract from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti- HIV-1 activity by increasing the virion density. *Retrovirology.* 5: 27.

Herode SS, Hadolin M, Skerget M, Knez Z (2003) Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem.* 80: 275-82.

Hohmann J, Zupko I, Redei D, Csanyi M, Falkay G, Mathei I (1999) Protective effect of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavanda angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Medica.* 65:576-578.

- Hossain MA, Kim S, Kim KH, Lee SJ, Lee H (2009) Flavonoids compounds are enriched in lemon balm (*Melissa officinalis*) leaves by a high level of sucrose and confer antioxidant activity. *HortScience*. 44: 1907-1913.
- Hussain AI, Anwar F, Iqbal T, Bhatti IA (2011) Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. *Pak. J. Bot.* 43: 1315-1321.
- Kennedy D, Little W, Haskell C, Sholey AB (2006) Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress. *Phytoter. Res.* 20: 96-102.
- Lamaison JL, Petitjean-Freytet C, Carnat A (1991) Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharm Acta Helv.* 66:185-8.
- Li T, Beveridge T, Drover J (2007) Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: extraction and identification. *Food Chemistry*. 101: 1633-1639.
- Madubunyi I (1995) Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.* 33: 232-237.
- McLaughling J, Chang C, Smith D (1991) Bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. Studies in Natural Products Chemistry. Vol. 9. Elsevier Science Publisher BV. Amsterdam, Holanda. 385pp.
- Marongiu B, Porcedda S, Piras A, Rosa A, Deiana M, Dessi MA (2004) Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp. *inodora*. *Phytother Res* 18:789-792.
- Martínez A (2002) *Esteroles*. Facultad de química Farmaceutica. Universidad de Antioquia. Medellin, Colombia. 37pp.
- Mbaze L, Poumake H, Wansi J, Lado J, Khan S, Iqbal M, Ngadjui B, Laatsch H (2007)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory pentacyclic triterpenes from the stem bark of *Fagara tessmannii* (Rutaceae). *Phytochemistry*. 68: 591-595.
- Mencherini T, Picerno P, Scesa C and Aquino R (2007) Triterpene, Antioxidant, and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*. *J. Nat. Prod.* 70: 1889-1894.
- Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nicols D, McLaughlin J (1982) Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34.
- Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N (2004) Antimicrobial and antioxidant activities of *M. officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J Agric Food Chem*. 52: 2485-9.

Monks N, Lerner C, Henriques A, Farias F, Schapoval E, Suyenaga E, Da Rocha A, Schwartsmann G, Mothes B (2002) Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, Southern Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 281: 1-12.

Muller SF y Klement S (2006) A combination of valerian and lemon balm is effective in the treatment of restlessness and dyssomnia in children. *Phytomedicine.* 13: 383-387.

Muñoz AM, Alvarado-Ortiz UC, Encina ZC (2011) Fitoesteroles y Fitoestanoles: Propiedades saludables. *Rev. Horiz. Med.* 11: 93-100.

Murillo E, Vina A, Pérez C, Ruiz V (2006) Actividad alelopática de las arvenses asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa L.*) en el Tolima-Colombia. *Inf. Tecnol.* 17: 15-24.

Patora J, Klimek B (2002) Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis L.*, Lamiaceae). *Acta Pol Pharm.* 59:139-43.

Picada R, Fachinetto E, de Souza A, Luiz R, Santos G, Heinzmann B, Krapf T, Athayde M, Escobar M, Farias A, Morsch V, Teixeira J (2009) Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res.* 34:973-983.

Sachs S, Thisted R, Jones T, Barbarash R, Mikolich D (2001) Clinical efficacy of topical docosanol 10% cream for herpes simplex labialis: a multicenter, randomized, placebo controlled trial. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45: 222-230.

Schmitz F, Bowden A, Toth S (1993) Antitumor and cytotoxic compounds from marine organism. En Attaway DA, Zaborsky OR (Eds.) *Marine Biotechnology*. Vol. 1. Plenum Press. New York, EEUU. pp. 197-138.

Stephan, C. 1977. Methods for calculating in LC<sub>50</sub>. En Mayer FL, Hamelink J (Eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. ASTM. Philadelphia, EEUU. 54-68 pp.

Vlitos AJ, Crosby DC (1959) Isolation of fatty alcohols with plant growth-promoting activity from Maryland Mammoth tobacco. *Nature* 184: 462-3.

WHO (2002) *Monographs on Selected medicinal plants*. Vol. 2. Ginebra: World Health Organization. Ginebra, Suiza. 180 pp.

TABLA I  
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS Y ASIGNACIÓN DE ALGUNAS SEÑALES  
SELECCIONADAS DEL RMN DE  $^1\text{H}$  DEL ESTEROL

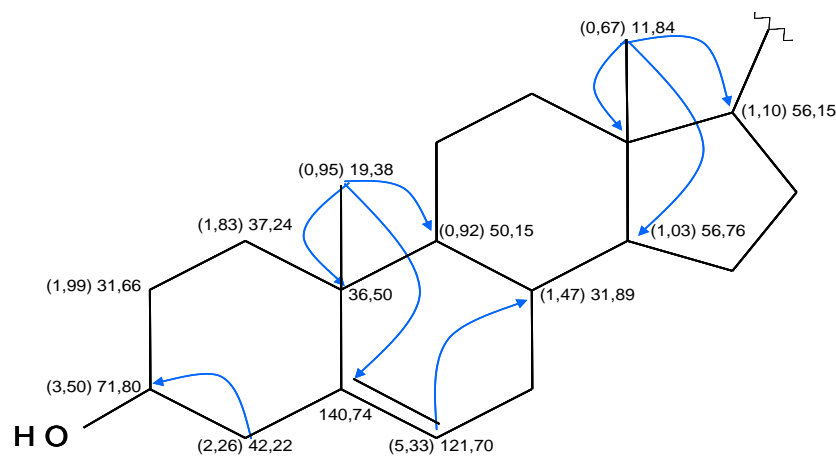
Posición	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) <sup>a</sup>	(N° de protones, multiplicidad)	Asignación
H-18	0,67	(3H, s)	$\text{CH}_3 - \text{C} -$
H-26	0,84	(3H, d)	$\text{CH}_3 - \text{CH} -$
H-28	0,85	(3H, d)	$\text{CH}_3 - \text{CH} -$
H-27	0,89	(3H, d)	$\text{CH}_3 - \text{CH} -$
H-21	0,90	(3H, d)	$\text{CH}_3 - \text{CH} -$
H-19	0,95	(3H, s)	$\text{CH}_3 - \text{C} -$
H-4	2,26	(2H, m)	$-\text{CH}_2 - \text{C} =$
H-3	3,50	(1H, m)	$-\text{CH} - \text{O} -$
H-6	5,33	(1H, t)	$-\text{CH} = \text{CH} -$

a: Espectro realizado en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm en relación al TMS.

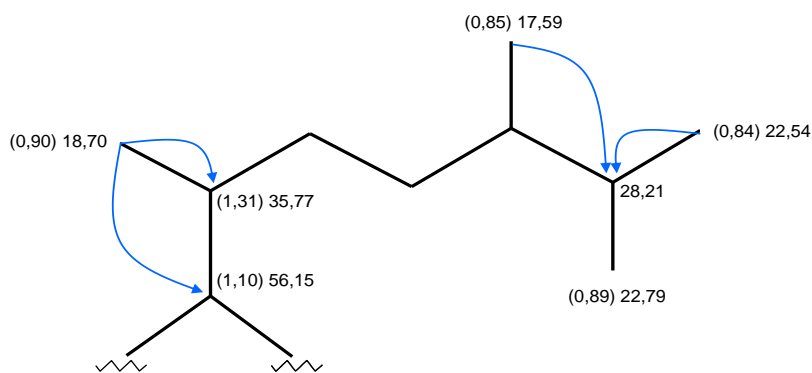
TABLA II  
 DATOS SELECCIONADOS DE RMN <sup>1</sup>H Y <sup>13</sup>C, HMQC Y HMBC PARA LAS  
 ESTRUCTURAS PARCIALES A Y B DEL ESTEROL

Posición	$\delta_H$ (ppm) <sup>a</sup>	HMQC	HMBC
		$\delta_C$ (ppm) <sup>b</sup>	$\delta_C$ (ppm) <sup>b</sup>
1	1,83	37,24	-
2	1,99	31,66	-
3	3,50	71,80	-
4	2,26	42,22	71,80
5	-	140,74	-
6	5,33	121,70	31,89
8	1,47	31,89	-
9	0,92	50,15	-
10	-	36,50	-
13	-	42,79	-
14	1,03	56,76	-
17	1,10	56,15	-
18	0,67	11,84	42,79; 56,76; 56,15
19	0,95	19,38	140,74; 50,15; 36,50
20	1,31	35,77	-
21	0,90	18,70	56,15; 35,77
25	1,38	28,21	-
26 <sup>c</sup>	0,84	22,54	28,21
27 <sup>c</sup>	0,89	22,79	-
28	0,85	17,59	28,21

a: Espectro realizado en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm en relación al TMS. b: Espectro realizado en  $\text{CDCl}_3$  a 125 MHz. c: valores podrían ser intercambiables. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm en relación al TMS.



(a)



(b)

Figura 1. Algunas correlaciones HMBC (H→C) para (a) la estructura del núcleo esteroidal y (b) la estructura de la cadena lateral.

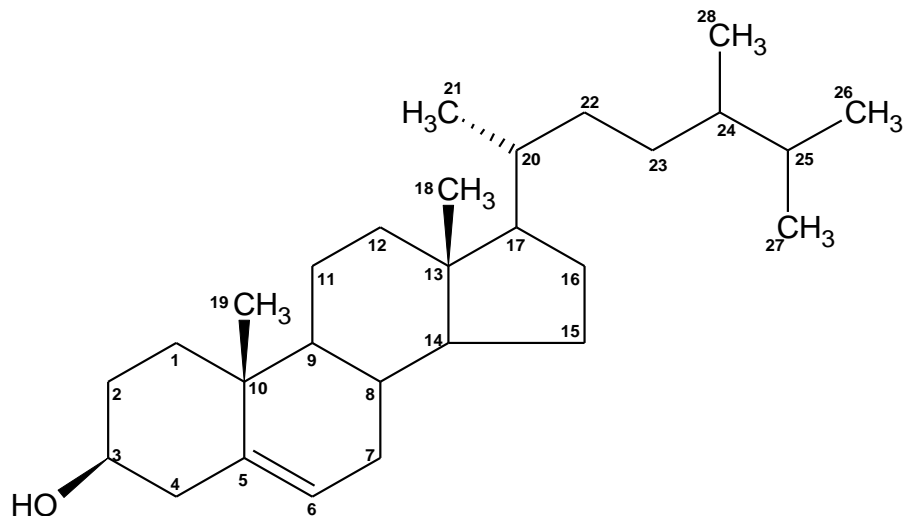


Figura 2. Estructura del posible estero: campesterol (subfracción C.3.2).

### Resúmenes de los otros artículos:

#### **CONSTITUYENTES QUÍMICOS Y LETALIDAD CONTRA *ARTEMIA SALINA* DE EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE *Cymbopogon citratus*, *Lippia citriodora* Y *Melissa officinalis* PROVENIENTES DE ECUADOR**

**<sup>1,2</sup>D'Armas Haydelba, <sup>1</sup>Vélez Elington, <sup>1</sup>Vélez Ruth, <sup>1</sup>Espinoza Brenda y <sup>1</sup>Carmita Jaramillo Jaramillo**

<sup>1</sup>Planta Piloto de Farmacia, Unidad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Provincia del Oro, Ecuador. <sup>2</sup>Lab. de Productos Naturales y Lípidos, Dpto. de Química, Escuela de ciencias, Universidad de Oriente, estado sucre, Venezuela

#### RESUMEN

El aislamiento de compuestos con actividad biológica, derivados de plantas y animales, ha sido de gran importancia biomédica y los productos crudos aislados de estos organismos han servido como fuente de nuevas drogas y sustancias precursoras en la síntesis de las mismas. A los extractos hexánicos y etanólicos, de las hojas de las plantas *C. citratus*, *L. citriodora* y *M. officinalis*, se les realizó un estudio químico por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG/EM) y se les evaluó la toxicidad aguda contra larvas de crustáceo *Artemia salina*. Mediante la técnica mencionada se lograron identificar



los siguientes compuestos mayoritarios para todos los extractos: 2,5-diol-3-hexeno (35,56%), di-n-decilsulfona (12,80%), 1-metilciclopentanol (10,27%) y 9-octadecenamida (7,62%); gamma-sitosterol (41,60%), 9-octadecenemida (17,68%), éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (7,30%) y pentadecanal (6,81%) para los extractos hexánicos y etanólicos de *M. officinalis* respectivamente. Acetato de 9,19-cicclolanost-24-en-3-ol (17,23%), acetato de *trans*-geranilo (11,61%), 9-octadecenamida (10,87%) y  $\alpha$ -farnesol (9,16%); acetato de 9,19-cicclolanost-24-en-3-ol (21,77%), ácido 9,12,15-octadecatrienoico (15,81%), acetato de *cis*-geranilo (12,55%), acetato de *trans*-geranilo (11,74%) para los extractos hexánicos y etanólicos de *C. citratus* respectivamente. 2,5-diol-3-hexeno (47,80%), 1-metilpentil hidroperóxido (10,71%), 1-etilbutil hidroperóxido (9,92%) y 1-metilcicloentanol (6,96%); heptacosano (22,45%), gamma-sitosterol (16,74%), ácido 9,12,15-octadecatrienoico (9,16%) y geranial o citral A (8,79%) para los extractos hexánicos y etanólicos de *L. citriodora* respectivamente. Todos los extractos revelaron actividad tóxica o letal con valores de  $CL_{50}$  inferiores a 400  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , excepto el de hexano de *L. citriodora*, el cual presentó una  $CL_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , siendo el más significativo el arrojado por el extracto etanólico de *M. officinalis* ( $CL_{50}=72,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y el menos significativo el mostrado por el extracto etanólico de *C. citratus* ( $CL_{50}=358,03 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), ambos a las 24h de exposición. Se podría decir que los componentes mayoritarios identificados en ambos extractos, y especialmente los esteroides detectados en mayor proporción podrían ser los causantes de la bioactividad observada. Estas dos últimas plantas citadas, se perfilan como fuente promisorias de compuestos cito-tóxicos.

Palabras claves: *Artemia salina*, CG/EM, *Cymbopogon citratus*, *Lippia citriodora*, *Melissa officinalis*.

## EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y METABOLITOS SECUNDARIOS DE DIECISÉIS PLANTAS MEDICINALES DE ECUADOR

<sup>1</sup>Ana Paola Echavarría, <sup>1,2</sup>Haydelba D'Armas, <sup>1</sup>Carmita Jaramillo, <sup>1</sup>Lisbeth Matute, <sup>1</sup>Luisa Rojas de Astudillo, <sup>2</sup>Ricardo Benítez

<sup>1</sup>Planta Piloto de Farmacia, Unidad de Ciencias Químicas y Salud, Universidad Técnica de Machala, Provincia del Oro, Ecuador; [echavarría@utamachala.edu.ec](mailto:echavarría@utamachala.edu.ec). <sup>2</sup>Lab. de Productos Naturales y Lípidos, Depto. de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela. <sup>3</sup>Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

### RESUMEN

El presente estudio evaluó la capacidad antioxidante de dieciséis plantas estudiadas: Escoba amarga (*Parthenium hysterophons*), ajeno (*Artemisia absinthium*), guarumo (*Cecropia*

*obtusifolia*), chaya (*Cnidoscolus chayamansa*), borraja (*Borago officinalis*), balsa (*Ochroma sp.*), linasa (*Linum usitatissimum*), hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), toronjil (*Melissa officinalis*), buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*), alcachofa (*Cynara scolymus*), guaviduca (*Piper carpunya*), altamisa (*Ambrosia cumanensis*), diente de León (*Taxacum officinales*), buscapina (*Parietaria officinalis*) y moringa (*Moringa oleifera*). Para ello, se usó el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil) (Brand Williams *et al.*, 1995)<sup>1</sup>; además, se realizaron ensayos de reconocimiento de metabolitos secundarios a fin de obtener los primeros indicios de compuestos de interés fitoquímico. La actividad captadora de radicales libres de los extractos se expresó como valor de IC<sub>50</sub> (µg/mL). El valor bajo de IC<sub>50</sub> refleja mejor acción eliminadora de radicales libres. Aunque la mayoría de las muestras evaluadas mostraron buena capacidad antioxidante con este método (DPPH), los ensayos de los extractos hidro-alcohólicos demuestran que alcachofa (IC<sub>50</sub> 9,89 µg/mL), moringa (IC<sub>50</sub> 11,4 µg/mL) y borraja (IC<sub>50</sub> 14,0 µg/mL) fueron los que presentan mayor capacidad antioxidante. Mediante las pruebas químicas de caracterización, se detectó la presencia de flavonoides, taninos, triterpenos, alcaloides y saponinas en la mayoría de las especies analizadas (aproximadamente 56-69%); tan sólo un 20% de las mismas mostró la presencia de polifenoles, glucósidos cianogénicos, lactonas, cumarinas, esteroides y antraquinonas. Según los resultados obtenidos, se podría considerar a estas plantas como fuentes prometedoras de metabolitos secundarios con actividad antioxidante.

**Palabras clave:** Capacidad antioxidante, plantas medicinales, metabolitos secundarios

## EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY AND SECONDARY METABOLITES OF SIXTEEN MEDICINAL PLANTS OF ECUADOR

### ABSTRACT

This study evaluated the antioxidant capacity of sixteen medicinal plants: Escoba amarga (*Parthenium hysterophons*), ajeno (*Artemisia absinthium*), guarumo (*Cecropia obtusifolia*), chaya (*Cnidoscolus chayamansa*), borraja (*Borago officinalis*), balsa (*Ochroma sp.*), linasa (*Linum usitatissimum*), hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), toronjil (*Melissa officinalis*), buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*), alcachofa (*Cynara scolymus*), guaviduca (*Piper carpunya*), altamisa (*Ambrosia cumanensis*), diente de León (*Taxacum officinales*), buscapina (*Parietaria officinalis*) and moringa (*Moringa oleifera*). For this, the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilhidracil) method was used (Brand-Williams *et al.*, 1995)<sup>1</sup>; furthermore, recognition assays of secondary metabolites were performed, in order to obtain the first signs of phytochemical compounds of interest. The free radical scavenging activity of the extracts was expressed as IC<sub>50</sub> value (g/mL). The low value of IC<sub>50</sub> reflects better free radical scavenging action. Although most of the samples tested showed good

antioxidant capacity with this method (DPPH), tests of hydro-alcoholic extracts show that alcachofa (IC<sub>50</sub> 9.89 mg/mL), moringa (IC<sub>50</sub> 11.4 mg/mL) and borraja (IC<sub>50</sub> 14.0 mg/mL) were those with higher antioxidant capacity. Through chemical characterization tests, the presence of flavonoids, tannins, triterpenes, alkaloids and saponins was detected in most of the species analyzed (approximately 56-69%); only 20% of them showed the presence of polyphenols, cyanogenic glycosides, lactones, coumarins, anthraquinones and sterols. According to the results obtained, these plants might consider as promising sources of secondary metabolites with antioxidant activity.

Key words: Antioxidant capacity, medicinal plants, secondary metabolites.

## METABOLITOS SECUNDARIOS Y SU RELACIÓN CON LA BIOACTIVIDAD DE OCHO EXTRACTOS DE ESPECIES VEGETALES

<sup>1</sup>Ana Paola Echavarría, <sup>1,2</sup>Haydelba D'Armas, <sup>1</sup>Lisbeth Matute y Jaime Andrés Castro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Machala, Provincia del Oro, Ecuador

<sup>3</sup>Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná, Sucre, Venezuela

<sup>2</sup>INTAL, Medellín, Antioquia, Colombia

### RESUMEN

Los extractos vegetales son mezclas complejas de metabolitos secundarios que cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades biológicas. El objetivo de este trabajo es la identificación de los constituyentes químicos de los extractos orgánicos de ocho plantas de uso medicinal en Ecuador, y relacionarla con las actividades biológicas reportadas en la literatura para los componentes químicos encontrados en dichos extractos. Para tal fin, se procesaron las plantas y se obtuvieron los extractos mediante extracción hasta agotamiento con etanol. La caracterización química de los extractos etanólicos de las especies vegetales se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de masas. El análisis de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos, exhibió la presencia de algunos metabolitos secundarios comunes en varias de las plantas. Tal es el caso de los esteroides del tipo estigmasterol, sitosterol, tocoferol y/o elasterol, los cuales están presentes en todas las especies vegetales analizadas, excepto en *Cymbopogon citratus*. Esta última mostró predominancia de compuestos monoterpénicos oxigenados, al igual que *Melissa officinalis*; sin embargo, se destaca también la presencia de sesquiterpenos no-oxigenados y oxigenados en *C. citratus*. Las plantas *Ageratum*

*conyzoides*, *Cynara scolymus*, *Moringa oleifera* y *Bougainvillea spectabilis* mostraron la presencia de ácidos grasos y sus derivados ésteres. Compuestos triterpenoidales pentacíclicos estuvieron presentes en los extractos de *C. citratus*, *A. conyzoides*, *Cnidocolus chayamansa*. Cabe destacar que diterpenos oxigenados, derivados aromáticos, hidrocarburos no terpenoidales y otros tipos de metabolitos secundarios fueron identificados en algunas de las especies estudiadas. Adicionalmente, se estableció la relación existente entre los metabolitos secundarios identificados en los extractos con la bioactividad reportada en la literatura para las especies vegetales sujetas a esta investigación.

Palabras claves: cromatografía de gases-masas, bioactividad, metabolitos secundarios, plantas medicinales.

## SECONDARY METABOLITES AND ITS RELATION WITH BIOACTIVITY OF EIGHT PLANT EXTRACTS

### ABSTRACT

Plant extracts are complex mixtures of secondary metabolites with diverse biological properties that cover a wide spectrum of pharmacological effects. The aim of this work is the identification of the chemical constituents of the organic extracts from eight medicinal plants in Ecuador, and its relationships with the biological activities reported in the literature for chemical components found in these extracts. Plants were processed and extracts were obtained by continuous extraction with ethanol. The chemical characterization of the ethanolic extracts of the species was performed using the gas chromatography with mass detector technique. The analysis of the chromatograms and mass spectra obtained, showed the presence of some common secondary metabolites in various plants. Such is the case of sterols type compounds (stigmasterol, sitosterol, tocopherol and/or elasterol), which are present in all plant species tested, except *Cymbopogon citratus*. This plant and *Melissa officinalis* showed a predominance of monoterpenes oxygenates; however, *C. citratus* also showed the presence of non-oxygenated and oxygenated sesquiterpenes. *Ageratum conyzoides*, *Cynara scolymus*, *Moringa oleifera* and *Bougainvillea spectabilis* showed the presence of fatty acids and esters derivatives. Pentacyclic triterpene compounds were present in extracts of *C. citratus*, *A. conyzoides* and *Cnidocolus chayamansa*. Oxygenated diterpenes, aromatic derivatives and non-terpenoidal hydrocarbons and other types of secondary metabolites were identified in some of the studied species. Additionally, the relationship between identified secondary metabolites in these extracts with bioactivity reported in the literature for the investigated plants was established.

Key words: Bioactivity, Gas Chromatography/Mass, medicinal plants, secondary metabolites.

## EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE PLANTAS MEDICINALES CULTIVADAS EN ECUADOR CONTRA EL CRUSTÁCEO *Artemia salina*

Jaramillo A. (1), Rojas de Astudillo L. (1,2), D'Armas H. (1,2) y Jaramillo C. (1)

(1) Planta Piloto de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y Salud, Universidad Técnica de Machala, Ecuador. (2)Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela. Email: [anyissita2203@gmail.com](mailto:anyissita2203@gmail.com)

### RESUMEN

La exploración y el aprovechamiento de los recursos marinos abordan perspectivas científicas, tecnológicas y económicas. *Artemia salina*, un organismo marino que ocupa un lugar importante dentro del grupo de bioensayos aplicados a la ecotoxicología, es utilizado en esta investigación para evaluar la toxicidad aguda de extractos de algunas plantas medicinales como fuentes promisorias de compuestos bioactivos de origen natural. El bioensayo se realizó con los extractos alcohólicos de las plantas: *Taraxacum officinale* (diente de león), *Parthenium hysterophorus* (escoba amarga), *Artemisia absinthium* (ajenjo), *Cnidocolus chayamansa* (chaya) y *Piper carpunya* (guaviduca), el cual consistió en exponer grupos de larvas de *Artemia salina*, previamente eclosionados, a concentraciones del extracto de 1000, 100 y 10 µg/ml por 24h; se calculó la CL<sub>50</sub> mediante el programa estadístico Finney Dos (métodos Probit, Logit y MovingAverage) (Meyer *et al*, 1982) La detección de familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos, se realizó según la metodología descrita por Miranda (2002). El análisis fitoquímico mostró la presencia de diversos principios activos como fenoles, flavonoides, taninos, saponinas, glicósidoscianogénicos y alcaloides en todas las plantas estudiadas, mientras que guaviducadió positivo el ensayo para quinonas, y tanto chaya como escoba amarga exhibieron la presencia de antocianidinas. El bioensayo de letalidad fue considerado válido, ya que el porcentaje de mortalidad en los controles (tubos preparados e incubados en las mismas condiciones, pero en ausencia de extracto) no excedió del 10 %. Teniendo de ésta manera que las CL<sub>50</sub> obtenidas oscilaron entre los valores 3,37 µg/ml y 274,34µg/ml, para *P. carpunya* (guaviduca) siendo extremadamente letal o tóxica y para *T. officinale* (diente de león) siendo altamente tóxica, respectivamente. Posiblemente, los metabolitos secundarios identificados en las cinco plantas, son los causantes de la toxicidad observada; por lo cual se puede decir que las mismas podrían ser fuentes promisorias de compuestos antitumorales. El bioensayo de *Artemia salina*, constituye un valioso instrumento para químicos de productos naturales y farmacéuticos ecuatorianos, al contribuir al descubrimiento de plantas medicinales con potencial farmacológico.

Palabras claves: *Artemia salina*, *Taraxacum officinale*, *Parthenium hysterophorus*, *Artemisia absinthium*, *Cnidocolus chayamansa*, *Piper carpunya*.

## **CONTRIBUCIÓN AL PLAN DEL BUEN VIVIR**

Este proyecto de investigación se relacionó con el Objetivo No. 3 del Plan Nacional del Buen Vivir: “Mejorar la calidad de vida de la población”, específicamente en su apartado 3.4: “Fortalecer y consolidar la salud intercultural, incorporando la medicina ancestral y alternativa al Sistema Nacional de Salud”.

La información obtenida de este trabajo de investigación constituye un aporte muy valioso y de gran importancia para la elaboración de fitofármacos y fito-nutrientes seguros y eficaces, a partir de drogas vegetales de calidad previamente estandarizadas y validadas con estudios científicos. De esta manera los resultados obtenidos fomentan la producción de fitofármacos con actividad farmacológica antibacteriana, antifúngica, antioxidante y/o citotóxica demostrada en los experimentos realizados con las plantas medicinales en cuestión, cultivadas en suelo ecuatoriano.

## **DESCRIPCIÓN DE PRODUCTOS ALCANZADOS**

### **1. INVESTIGACIÓN (VER ANEXO DIGITAL 1)**

Se enviaron tres artículos científicos a revistas indexadas, los cuales están en proceso de revisión por los árbitros asignados por el Comité Editorial de cada revista.

Están en proceso de redacción dos artículos para ser enviados a las revistas indexadas indicadas a continuación.

Se envió un artículo producto del resumen en extenso del trabajo presentado en el VII FIRMA 2014.

### **Artículos Científicos:**

1. Composición química de aceites esenciales de ocho plantas medicinales cultivadas en Ecuador; se envió al *International Journal of Tropical Biology/Revista de Biología Tropical* (<http://www.biologiatropical.ucr.ac.cr>), para su arbitraje.

2. Identificación estructural de algunos constituyentes químicos de la fracción apolar de las hojas de *Melissa officinalis* con posible actividad biológica; se envió a la revista *Interciencia* ([www.interciencia.org/](http://www.interciencia.org/)).

3. Constituyentes químicos y letalidad contra *Artemia salina* de extractos de las hojas de *C. citratus*, *L. citriodora* y *M. officinalis* provenientes de Ecuador (en proceso de redacción); se presentará en *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* (<http://blacpma.cl>).

4. Evaluación de la capacidad antioxidante de dieciséis plantas medicinales de Ecuador; se envió a *La Revista de la Sociedad Química del Perú* ([www.sqperu.org.pe](http://www.sqperu.org.pe)) para su arbitraje. Redactado en conjunto con la Dra. Ana Echavarría.

5. Metabolitos secundarios y su relación con la bioactividad de ocho extractos de especies vegetales. Se enviará a *Scientia Agropecuaria* ([www.sci-agropecu.unitru.edu.pe/](http://www.sci-agropecu.unitru.edu.pe/)). En proceso de redacción en conjunto con la Dra. Ana Echavarría.

6. Evaluación de la toxicidad aguda de plantas medicinales cultivadas en Ecuador contra el crustáceo *Artemia salina* (enviado para ser publicado en el Libro IIV FIRMA, <http://www.usc.es/congresos/foroacui/firma/seccion/117/evento/60/i-circular-vii-foro-iberoamericano-de-los-recursos-marinos-y-la-acuicultura-vii-firma-ecuador--014-machala-18--1-de-noviembre.php>).

### **Publicaciones en Congresos:**

Representación de la UTMACH en el 31 Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ2014), celebrado en Lima (Perú) del 14 al 17 de octubre 2014, como autora principal del trabajo expuesto titulado (proyecto SENESCYT): "Chemical composition of essential oils obtained from eight medicinal plants leaves grown in Ecuador". Además, co-autora de los trabajos de investigación (relacionados con el proyecto SENESCYT): "Determinación cuantitativa de aceites esenciales con actividad antifúngica sobre *Sigatoka Negra* (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en doce especies de plantas vegetales cultivadas en Ecuador" y "Evaluación de la capacidad antioxidante de diez y seis plantas medicinales de Ecuador" (Se publicaron tres resúmenes de los trabajos presentados, en el libro de

Memorias del Congreso, <http://sqperu.org.pe/31-congreso-latinoamericano-de-quimica-2014-2/>).

Representación de la UTMACH en el VII FIRMA 2014, celebrado en Machala del 18 al 21 de noviembre del 2014, como co-autora del trabajo expuesto titulado: “Evaluación de la toxicidad aguda de plantas medicinales cultivadas en Ecuador contra el crustáceo *Artemia salina*” (a publicar en el Libro VII FIRMA).

## **2. CAPACITACIÓN ACADÉMICO-CIENTÍFICA (VER ANEXO DIGITAL 2)**

Transferencia de conocimientos y adiestramiento científico a algunos Investigadores, Profesores y estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Unidad de Ciencias Químicas y de la Salud de la UTMACH, en la realización de análisis fitoquímicos necesarios en el campo de los Productos Naturales Orgánicos y producción de fitofármacos, tales como pruebas de caracterización química de grupos funcionales de compuestos químicos, métodos de extracción orgánica, separación cromatográfica de los compuestos o metabolitos secundarios presentes en los extractos por las técnicas de cromatografía de columna (CC) y cromatografía de capa fina o delgada (CCF ó CCD), preparación de soluciones seriadas, obtención de aceites esenciales por hidrodestilación, análisis de datos obtenidos por cromatografía de gases-masas, entre otros.

Capacitación teórica y experimental en la realización de pruebas de actividad biológica o bioensayos, tales como actividad antibacteriana (preparación de medios de cultivo, metodología de montaje del ensayo y medida del efecto del extracto contra cepas de bacterias ), antifúngica (preparación de medios de cultivo, metodología de montaje del ensayo y medida del efecto del extracto contra cepas de hongos) y letalidad o citotoxicidad contra larvas del crustáceo *Artemia salina* (montaje completo del bioensayo y cálculo de la concentración letal media o  $CL_{50}$  con el paquete estadístico para tal fin). Además, de métodos de cuantificación de metabolitos secundarios (por método espectrofotometría de UV-vis) y determinación de la actividad antioxidante de los mismos (medida del % de inhibición de radicales libres y cálculo de la concentración de inhibición media o  $IC_{50}$ ).



Asesorías en la elaboración y desarrollo de proyectos de investigación involucrados en los aspectos previamente mencionados, los cuales se están aún llevando a cabo bajo mi dirección y asesoría académico-científica continua, y constituirán las Tesis o Trabajos de Titulación de algunos estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la UCQS-UTMACH, los mismos son:

-Composición química, potencial antimicrobiano y letalidad de los aceites esenciales de las hojas de hierba luisa (*C. citratus*), toronjil (*M. officinalis*), mastranto (*A. conyzoides*), guaviduca (*Piper carpunya*), cedrón (*L. citriodora*) y ajeno (*A. absintium*).

-Estudio farmacognóstico y composición proximal de las plantas *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), *Lippia citriodora* (cedrón) y *Melissa officinalis* (toronjil) proveniente de Ecuador.

-Análisis farmacognóstico de los órganos botánicos de *Lippia citriodora* (cedrón) con poder bactericida, antimicótico y letal, cultivado en la República de Ecuador.

-Evaluación comparativa de metabolitos secundarios y actividad biológica (antimicrobiana y letal contra *Artemia salina*) de extractos orgánicos de las plantas hierba luisa (*C. citratus*), y toronjil (*M. officinalis*).

- Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador.

- Estudio de la calidad bacteriológica de doce plantas medicinales procesadas en la Planta Piloto de farmacia de la Universidad Técnica de Machala.

-Determinación del contenido total de hongos en doce especies vegetales cultivadas en Ecuador.

- Identificación de productos naturales por técnicas cromatográficas, cuantificación de flavonoides y actividad antioxidante de las hojas de *C. citratus* (hierba luisa), *M. officinalis* (toronjil) y *L. citriodora* (cedrón).

-Caracterización fitoquímica y actividad biológica del tubérculo *Eriotheca* sp (Mimosaceae) con potencial farmacológico, recolectado en la región suroeste de la provincia del Oro, Ecuador.

Asesoría dirigida a la preparación de dos estudiantes egresados de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la UCQS-UTMACH, para el “II Concurso de reconocimiento a la investigación universitaria estudiantil, Galardones Nacionales, convocatoria 2014”, en cuanto al desarrollo exitoso de sus proyectos de investigación. Los proyectos de investigación dirigidos para este concurso fueron:

- Determinación cuantitativa de aceites esenciales con actividad antifúngica sobre sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en doce especies de plantas vegetales. Estudiante: Karen Montesinos.

- Evaluación del contenido de fenoles y taninos por el método espectrofotométrico en doce especies vegetales del Ecuador y su capacidad tóxica o letal. Estudiantes: Anyi Jaramillo y Carolina Córdova.

### **3. DOCENCIA (VER ANEXO DIGITAL 3)**

Capacitación a Investigadores (6) y estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia (24) e Ingeniería de Alimentos (4) de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la UTMACH, en transferencia de conocimientos sobre todos los aspectos importantes en el área de Productos Naturales y Fitofármacos, específicamente: generalidades sobre los productos naturales de origen terrestre y marino, diversos tipos de productos naturales o metabolitos secundarios según su estructura química y función, aplicabilidad de los mismos, mecanismos de biosíntesis de estos compuestos, técnicas de separación cromatográfica (CCF, CCFP, CC, CG, HPLC), técnicas espectroscópicas y espectrométricas de caracterización estructural de estos metabolitos secundarios o productos naturales (IR, EM, UV-vis, RMN y CG/EM) ampliamente usadas en el campo farmacéutico.

- **Curso-Taller de “La Química de lo Natural: Productos Naturales”** (dictado en dos ocasiones, con una duración de 40h cada vez; ver Anexo 3).

- **Producción de varios software educativos (ver Anexo 3):**

Fueron publicados en una aplicación de la web 2.0, como lo es slideshare (<http://www.slideshare.net>), con la finalidad de compartir con la comunidad académica científica en general, las presentaciones en power point y permitir una mayor difusión de los conocimientos impartidos en UTMACH, logrando proyectar la Universidad.

Los links respectivos son:

[http://www.slideshare.net/htrinidad86/generalidades-productos-naturalesutmach?qid=dabc0482-1682-4069-a6a3-19b9694f3b99&v=qf1&b=&from\\_search=1](http://www.slideshare.net/htrinidad86/generalidades-productos-naturalesutmach?qid=dabc0482-1682-4069-a6a3-19b9694f3b99&v=qf1&b=&from_search=1)

<http://www.slideshare.net/htrinidad86/qumica-pn-metabolitos-1-utmach>

<http://www.slideshare.net/htrinidad86/qumica-de-productos-naturales-metabolitos-2-utmach>

<http://www.slideshare.net/htrinidad86/qumica-de-productos-naturales-generalidades-de-cromatografa-utmach>

<http://www.slideshare.net/htrinidad86/qumica-de-productos-naturales-irem-utmach>

<http://www.slideshare.net/htrinidad86/qumica-de-productos-naturales-uvvisutmach>

<http://www.slideshare.net/htrinidad86/qumica-pn-rmn-utmach>

**-Asesoramiento de Tesis de Pregrado o Trabajos de Titulación**

1. Composición química, potencial antimicrobiano y letalidad de los aceites esenciales de las hojas de hierba luisa (*C. citratus*), toronjil (*M. officinalis*), mastranto (*A. conyzoides*), guaviduca (*Piper carpubya*), cedrón (*L. citriodora*) y ajeno (*A. absintium*). Estudiante: Priscilla Valverde.

2. Estudio farmacognóstico y composición proximal de las plantas *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), *Lippia citriodora* (cedrón) y *Melissa officinalis* (toronjil) proveniente de Ecuador. Estudiante: Alexander Zambrano.

3. Análisis farmacognóstico de los órganos botánicos de *Lippia citriodora* (cedrón) con poder bactericida, antimicótico y letal, cultivado en la República de Ecuador. Estudiante: Elington Vélez.
4. Evaluación comparativa de metabolitos secundarios y actividad biológica (antimicrobiana y letal contra *Artemia salina*) de extractos orgánicos de las plantas hierba luisa (*C. citratus*), y toronjil (*M. officinalis*). Estudiante: Ruth Vélez.
5. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Estudiante: Andrea Azuero.
6. Estudio de la calidad bacteriológica de doce plantas medicinales procesadas en la Planta Piloto de farmacia de la Universidad Técnica de Machala. Estudiante: Katherine Barros.
7. Determinación del contenido total de hongos en doce especies vegetales cultivadas en Ecuador. Estudiante: Mariuxi Medina.
8. Identificación de productos naturales por técnicas cromatográficas, cuantificación de flavonoides y actividad antioxidante de las hojas de *C. citratus* (hierba luisa), *M. officinalis* (toronjil) y *L. citriodora* (cedrón). Estudiante: Brenda Espinosa.
9. Caracterización fitoquímica y actividad biológica del tubérculo *Eriotheca* sp (Mimosaceae) con potencial farmacológico, recolectado en la región suroeste de la provincia del Oro, Ecuador. Estudiante: Xavier Pineda.

#### **4. RELACIONAMIENTO ESTRATÉGICO INTERINSTITUCIONAL A NIVEL NACIONAL E INTERNACIONAL**

- ✓ Cooperación llevada a cabo y vigente por parte del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alberta (Canadá) con la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala, para la realización de análisis químicos, específicamente con equipos de cromatografía (CG\_EM y HPLC\_EM) y espectroscopía (IR y RMN).

- ✓ Colaboración prestada a la UTMACH por parte del Dpto. de Química de la Universidad de Oriente (Venezuela) e Instituto Venezolano de Investigación Científica (Venezuela), para la realización de análisis de cromatografía, infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN), ICP u otro tipo de análisis químico; dicha cooperación está vigente, y en proceso de establecerse un convenio interinstitucional entre la Universidad de Oriente y la UTMACH. Dicho convenio, incluiría también al Instituto Oceanográfico de Venezuela que está adscrito al Rectorado de la Universidad de Oriente.
- ✓ Está en proceso la creación de una Red de Investigación en Biotecnología y postgrado, que dirige la Universidad de Quevedo, y de la cual formaremos parte, o sea la UTMACH a través de mi persona y otros prometeos vinculados a la UTMACH.
- ✓ Programación de la realización de las 1ras Jornadas Nacionales de Alimentos y Fito-nutrientes en el 2015.
- ✓ Colaboradora del Proyecto “*Investigaciones en plantas medicinales para el desarrollo de fitofármacos y fórmulas nutricionales seguros y eficaces*”, elaborado por el grupo de investigación de la Planta Piloto de Farmacia, al cual pertenezco, según la Convocatoria 2014 del Centro de Investigaciones-UTMACH.
- ✓ Participación en el proyecto sobre “*Desarrollo de fitomedicamentos, nutracéuticos y bebidas funcionales*”, el cual será sometido a organismos aun no definidos, para su financiamiento futuro.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A continuación se presentan las conclusiones y recomendaciones obtenidas del proceso de investigación siguiendo el orden de las distintas áreas de la Matriz de Planificación:

### *Investigación*

Se llevó a cabo el completo desarrollo de las investigaciones, gracias a: la oportuna compra de una gran mayoría de materiales y reactivos necesarios, por parte de la UTMACH, SENESCYT y mi persona; la Planta Piloto de Farmacia cuenta con muchos materiales,

reactivos y equipos de distintas tecnologías; la cooperación interinstitucional entre la UTMACH, la Universidad de Oriente y el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (Venezuela), y el Departamento de Química de la Universidad de Alberta (Canadá).

Esto permitió obtener resultados y analizarlos para la redacción y envío de tres artículos a revistas indexadas, dos que están en proceso de redacción, y otro redactado y enviado para arbitraje en el libro del Congreso.

Presentación de trabajos de investigación en dos Congresos Internacionales

### ***Capacitación científica en el área pertinente a su especialidad***

Se lograron la mayoría de las metas planteadas en esta propuesta de investigación, en cuanto a la capacitación a profesores, profesionales y estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la UTMACH, en transferencia de conocimientos y adiestramiento científico en la realización de análisis fitoquímicos necesarios en el campo de los Productos Naturales Orgánicos y producción de fitofármacos, así como en la realización de pruebas de actividad biológica, tales como la antibacteriana, antifúngica, antioxidante y letalidad o toxicidad contra *Artemia salina*. Técnicas cromatográficas convencionales y métodos espectroscópicos de caracterización.

Tutorías personalizadas a estudiantes del último año de la carrera de Bioquímica y Farmacia, en cuanto la elaboración de sus Proyectos de Titulación, los cuales desarrollaron bajo mi dirección y asesoría académico-científica continua, y constituirán las tesis de titulación de esos estudiantes.

### ***Docencia a impartir***

Transferencia de conocimientos sobre todos los aspectos importantes en el área de Productos Naturales y Fitofármacos, a través de un seguimiento diario del trabajo de los tesisistas y explicación continua de todos los aspectos relacionados con los tópicos de sus tesis de titulación (talleres), uso de las herramientas de la web 2.0 y base datos bibliográficas, montaje de experimentos, estandarización de métodos; cálculos, gráficos y tabulación de resultados; análisis y discusión de los mismos, entre otros.

Producción de varios software educativos, los cuales fueron publicados en una aplicación de la web 2.0, como lo es slideshare (<http://www.slideshare.net>), con la finalidad de compartirlos con la comunidad académica-científica en general y permitir una mayor difusión de los cursos-talleres impartidos.

### ***Relacionamiento estratégico interinstitucional a nivel nacional e internacional***

Cooperación entre la Universidad Técnica de Machala y la Universidad de Oriente, el Instituto Oceanográfico de Venezuela, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas y la Universidad de Alberta.

### **RECOMENDACIONES**

- Realización frecuente de talleres a los profesores, sobre redacción y crítica de artículos científicos y desarrollo de proyectos de investigación.
- Realización de talleres dirigidos a estudiantes del último año de la carrera de Bioquímica y Farmacia, e Ingeniería de Alimentos, sobre la redacción de Proyectos de Titulación y Diseño Experimental de sus tesis de grado, y estimular a los egresados para que terminen sus Trabajos de Titulación.
- Asignar horas de investigación a todos los docentes en su horario semanal, ya que la falta de horas asignadas a la investigación no les permite dedicarle tiempo necesario a su investigación.
- Permitir que las Universidades Clase D, puedan presentar proyectos de Investigación ante la SENESCYT
- Fomentar los convenios de cooperación interinstitucionales.

### **LIMITACIONES**

Los docentes tienen asignado muy pocas horas de Investigación en su programación mensual, por lo que no pueden dedicarle el tiempo necesario para llevar a cabo un proyecto, se sugieren mínimo 10h semanales.

La clasificación de la UTMACH como clase D, lo cual impide la aplicación a los Proyectos de la SENESCYT

## BIBLIOGRAFÍA

Abenaa A, Diatewaa M, Gakossoa G, Gbeassorc M, Hondi-Assaha TH, Ouambab JM. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. *Fitoterapia*. 2003, 74: p 231-236.

Ávalos-García A y Pérez-Urria C. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2009, 2 (3): p 119-145.

Avello L, M. y Cisternas F, I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. Med. Chile*. 2010, 138 (10): p 1288-1293.

Bruneton J. Farmacognosia. 2ª ed. España: Editorial ACRIBIA, S.A. 2000. p. 4.

Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. *Antioxidants and the Comet assay*. *Mutat Res* 2009, 681: p 51–67.

Cerón C. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. La Paz, Bolivia: Universidad de San Andrés. 2006, p 285-293.

FAO Unasylva-Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Revista Nacional de Silvicultura e industrias forestales. 1983, Vol. 35. Rev. febrero 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/q1460s/q1460s00.htm>.

Fernández-Alonso J, Rivera-Díaz O. *Las labiadas (familia Labiatae o Lamiaceae)*. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. 2006.

Mosihuzzaman, M., Choudhary, M.I. Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 2008, 80: p 2195–2230.

Organización Mundial para la Salud (OMS). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra. 2000. Disponible en <http://archives.who.int/tbs/trm/s4930s.pdf>

Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez-Mata D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol.*, 2001, 76 (3): p 201-214

Ríos M, De La Cruz R, Mora A. Conocimiento tradicional y plantas útiles del Ecuador-saberes y prácticas. Quito-Ecuador, Ediciones Abya- Yala, 2008, p. 10.

Sánchez E, León M, Chávez D, Hechevarría I, Pino J. Caracterización farmacognóstica de *Melissa officinalis* (toronjil). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2010, 15 (4): p 198-208.



Trease, E W. Farmacognosia. 15thed. España: Editorial Elsevier Limited. 2006, 9, p 41-51.

Villa-Ruano N, Pacheco-Hernández Y, Lara-Zaragoza E, Franco-Monsreal E, Montserrat I, Galván-Valencia O, Ruiz-Gómez L. Biotecnología de plantas medicinales: generando fármacos de un futuro tornado presente. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 2011, 15 (3): p 13-20.

Wu H, Guo J, Chen S, Liu X, Zhou Y, Zhang X, Xu X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013, 72: p 267– 291.

FIRMA DEL INVESTIGADOR /DOCENTE	
FIRMA CONTRAPARTE INSTITUCIONAL 1	
FIRMA CONTRAPARTE INSTITUCIONAL 2	

## **ANEXOS DIGITALES (1-4)**