

SECRETARÍA NACIONAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA TECNOLOGIA E INNOVACION

PROYECTO PROMETEO

FORMATO DE PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

Nombres del Investigador (a) / Asesor (a)	Haydelba Trinidad	Apellidos del Investigador (a) / Asesor (a)	D'Armas Regnault	
Área de investigación	Recursos Naturales			
Título de PhD.	En Química	Universidad que otorga el doctorado	University of the West Indies	
Institución de acogida (PRINCIPAL) – Ciudad de localización	Universidad de Machala	Nombre de la contraparte en la institución de acogida	Wunster Favián Maza Valle	
Institución de Educación Superior de acogida (COMPLEMENTARIA) – Ciudad de localización		Nombre de la contraparte en la institución de acogida		
Nombre de la investigación con la que el Investigador (a) / Asesor (a) contribuye	Evaluación de productos naturales orgánicos con posible actividad biológica, de las plantas medicinales Hierbaluisa (<i>Lyppia citriodora</i> , familia Verbenaceae) y Toronjil (<i>Melissa officinalis</i> , familia Labiatae) del Sur del Ecuador			
Objetivo general de la investigación	Evaluar la presencia y bioactividad de algunos metabolitos secundarios en dos plantas recolectadas en la zona sur del Ecuador			
Fecha de inicio de actividades	18/02/ 2014	Fecha final de actividades	13/02/2015	
Total meses de vinculación	12 Meses			
Número de vinculación	Primera	(X)	Individual	(X)
	Segunda	()	Institucional	()

Perfil de Investigador (a) / Asesor (a)

Me considero una persona con espíritu crítico, metódico, ordenado, intencionado, tolerante y respetuoso de los demás. He ejercido la docencia en la carrera de Química (química orgánica, análisis orgánico, lípidos, productos naturales) e investigación por 33 años de labor en la categoría de Profesor Titular desde el año 2000. Como investigador he ejercido siempre una actividad creativa y sistemática para acrecentar el conocimiento científico, sobre todo en el área de Lípidos en organismos marinos y Productos Naturales terrestres y marinos. Además, durante mis años como investigador, me he apoyado tanto en la teoría como en la experimentación y he desarrollado la actividad investigativa en forma individual o grupal, asesorando muchos estudiantes de pre y post-grado, pero independiente del camino para desarrollar proyectos, los resultados de la mayoría de esos trabajos han sido comunicados en congresos científicos o publicados.

1. Pregunta de investigación, así como su delimitación espacial, temporal.

¿Cuáles serán los constituyentes químicos o metabolitos secundarios o principios activos responsables de la posible bioactividad que poseen las plantas Hierbaluisa (*Lyppia citriodora*) y Toronjil (*Melissa officinalis*) de uso

medicinal de la zona Sur del Ecuador?

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

La investigación será realizada en la Universidad Técnica de Machala y las plantas serán recolectadas en la ciudad de Machala u otras áreas pertenecientes a la provincia de El Oro.

Las fases de la investigación a realizar, serían las siguientes: recolección de los ejemplares y secado (febrero-marzo 2014), obtención de los extractos (marzo-abril 2014), pruebas químicas o análisis fitoquímico preliminar (abril 2014), pruebas biológicas (mayo 2014), fraccionamiento cromatográfico (mayo-noviembre 2014), análisis y caracterización estructural (noviembre-diciembre 2014) y redacción del informe final (enero-febrero 2015).

2. En esta parte señale claramente cuál será la contribución de la investigación en el área del conocimiento respectiva.

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.

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 plantas medicinales Hierbaluisa (*Lyppia citriodora*, familia Verbenaceae) y Toronjil (*Melissa officinalis*, familia Labiatae), ya que son plantas de mayor consumo en la provincia de El Oro, recolectadas en Ecuador, 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. Es importante señalar que los resultados que se obtengan de esta investigación constituirán un aporte para la validación del uso medicinal de ambas plantas, debido a que se les extraerá y aislara el principio activo, con actividad terapéutica para utilizarlo como ingrediente de algún medicamento. 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 constituirá un aporte científico importante para la población de la provincia ecuatoriana de El Oro, ya que las mismas 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 tiene propiedades digestiva, antiespasmódica, 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 activos de ambas plantas, incrementaría la base de datos de productos naturales bioactivos provenientes de plantas medicinales de gran uso medicinal en el sur del Ecuador.

3. La metodología a utilizarse en la investigación. En esta parte se debe demostrar la viabilidad de

la investigación.

Para la realización de este trabajo de investigación, se cuenta con algunos materiales, reactivos y equipos de los laboratorios de la Facultad de Ciencias Química y Salud de la universidad; así como su instrumental analítico. Además, se contará con el apoyo de otras Instituciones y la valiosa colaboración de investigadores de experiencia pertenecientes a dicha Facultad.

RECOLECCIÓN DE LA ESPECIE EN INTERÉS

Los ejemplares de la planta *seleccionada* se recolectarán en Ecuador. Luego, dichos ejemplares serán trasladados en bolsas desde el sitio de muestreo hasta el laboratorio en la universidad. Seguidamente, se procederá a deshidratar la muestra dejándola secar a temperatura ambiente en un lugar protegido del polvo y la incidencia directa de los rayos del sol, para luego proceder a su posterior estudio. Guardándose un ejemplar para su identificación taxonómica.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para la obtención del extracto crudo serán separadas las hojas y tallo, luego se molerán en un molino eléctrico y, posteriormente, se extraerán con hexano o éter de petróleo. Luego de decantado y filtrado el solvente de extracción, el mismo será evaporado bajo presión reducida en un rotaevaporador, con lo cual se obtendrá el extracto crudo en hexano o éter. El residuo será re-extraído con acetato de etilo, usando el mismo procedimiento para obtener el extracto en acetato. Obtenidos todos los extractos, se procederá a la realización de los análisis fitoquímicos preliminares, así como también, las pruebas de actividad biológica, y su posterior fraccionamiento cromatográfico.

PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES

La presencia de las diferentes familias de metabolitos secundarios (alcaloides, esteroides, saponinas, triterpenos, polifenoles, etc) que se encuentran en los extractos obtenidos, se determinará utilizando las metodologías de análisis fitoquímico reportadas (Marcano y Hasegawa, 2002; Murrillo y Méndez, 2007).

PRUEBAS BIOLÓGICAS

Actividad letal con *Artemia salina*

Este crustáceo se usará en este bioensayo para evaluar el nivel de toxicidad del extracto crudo de la planta o de sus fracciones. Para ello, se colocarán los quistes del crustáceo con agua de mar bifiltrada en un envase plástico provisto de una apertura, que facilitará la aireación continua durante 24 horas, para obtener así los nauplios de *Artemia*. Conjuntamente, se preparará una solución madre de 10 000 µg/ml del extracto o fracción con agua de mar bifiltrada o en dimetilsulfóxido (DMSO), según la solubilidad de los mismos. A partir de la solución madre, se prepararán soluciones diluidas de 1 000; 100; 10; 1; 0,1 y 0,01 µg/ml mediante diluciones sucesivas. Posteriormente, a cada concentración se le agregarán 10 nauplios de *A. salina* eclosionados anteriormente, y por cada concentración se realizarán 3 réplicas del bioensayo. Al igual, se realizarán 3 réplicas de un blanco. Se determinará la mortalidad de los nauplios transcurridas las 48 horas de la realización del bioensayo, y se anotará el número de organismos muertos en cada una de las concentraciones (Meyer, 1982). Seguidamente, será determinada la concentración letal media (CL₅₀) mediante un programa de computación (Stephan, 1977).

Actividad antibacteriana

Este bioensayo se determinará por medio de la técnica de difusión en agar o método de antibiograma, la cual consiste en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 ó 10 mm de diámetro con 10 ó 25 µl de una solución (preparada con 40 mg del extracto o fracción a probar en 1 ml de un solvente adecuado), para luego colocar dichos discos en una placa de agar Müller-Hinton, previamente inoculada con una suspensión bacteriana de concentración conocida (10⁸ células/ml) utilizando distintas cepas de bacterias certificadas. Posteriormente, se preincubarán a 5°C por 12 horas, y luego se incubarán a 37°C por 24 horas. La acción antibacteriana se medirá tomando el diámetro (mm) del crecimiento bacteriano alrededor del disco (Bauer, 1966).

FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

Se empleará la cromatografía en columna (CC), para la separación de los compuestos presentes en los extractos crudos de *la planta*, se utilizará sílica gel 35-70 o 200-430 mesh como fase estacionaria; mientras que para la fase móvil, se utilizarán distintos solventes y/o mezclas de solventes, variando la polaridad en forma creciente según sea necesario para la separación. Otra de las técnicas cromatográficas empleadas, será la cromatografía en capa fina (CCF), la cual se utilizará para combinar las fracciones provenientes de la CC. Para ello, se utilizarán placas de aluminio recubiertas con sílica gel con indicador de fluorescencia. Se tomarán los R_f de las fracciones utilizando como agentes reveladores una solución de molibdato de amonio al 10% en H_2SO_4 al 5% y luz ultravioleta. Ocasionalmente, se podría utilizar la cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), para purificar los compuestos provenientes de las fracciones y sub-fracciones obtenidas. Esta técnica es semejante a la CCF, con la diferencia de que el espesor de la sílica gel (tipo GF) que recubre la placa de vidrio de 20 x 20 cm², tiene un espesor de 1 mm, y los metabolitos separados serán recuperados del adsorbente, mediante disolución de los mismos en un solvente adecuado.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Para la elucidación estructural de los componentes aislados se utilizarán técnicas espectroscópicas convencionales, tales como la espectroscopia infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM).

Literatura Citada

- Bauer, A.; Kirby, A.; Sherris, J. y Turk. M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathol.*, 45: 493-496.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. UCV. Litopar
- Meyer, B; Ferrigni, N; Putman, j.; Jacobsen, L.; Nichols, D. y McLaughling, J. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45:31-34.
- Murrillo, E. y Mendez, J. 2007. *Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios*. Universidad de Tolima. Colombia.
- Stephan, C. 1977. Methods for calculating in LC_{50} . En: American Society for Testing and Material (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. F.L. Mayer y J. Hamelink (eds), Philadelphia, Pennsylvania.

4. Productos esperados

COMPONENTES	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	RESULTADOS POR OBJETIVO
1 INVESTIGACIÓN	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtener los extractos crudos de las hojas y tallo de <i>la planta</i> con solventes de diferentes polaridades 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. 3. Determinar la actividad biológica de los extractos, fracciones y/o compuestos a obtener de la planta 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Extractos contentivos de la mezcla de los constituyentes químicos de la planta 2. Noción de las distintas familias químicas presentes en la planta. 3. Conocimiento de cuales son las fracciones o extractos bioactivos, como fuentes promisorias de compuestos. 4. Obtención de metabolitos bioactivos puros o mezclas simples de los mismos. 5. Identificación estructural del o

COMPONENTES	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	RESULTADOS POR OBJETIVO
	<p>estudiada, por medio de bioensayos de actividad antibacteriana y letalidad.</p> <p>4. Aislar, en lo posible, los metabolitos secundarios presentes en <i>la planta</i>, mediante uso de técnicas cromatográficas.</p> <p>5. Caracterizar químicamente los metabolitos secundarios mediante las técnicas espectroscópicas convencionales.</p>	<p>los compuestos, o mezclas de los mismos, responsables de la antibiosis observada.</p>
2 CAPACITACIÓN CIENTÍFICA EN EL ÁREA PERTINENTE A SU ESPECIALIDAD (teórico y formativo)	<p>Asesorar a estudiantes de pre y postgrado, 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</p>	<p>-Redacción y presentación de trabajo escrito en base a los resultados obtenidos en la investigación. -Elaboración de manuscritos para su publicación en revistas arbitradas o indizadas</p>
3 ASESORÍA EN LA ELABORACIÓN DE POLÍTICAS PÚBLICAS	N/A	
4 DOCENCIA	<p>Proporcionar al alumno una visión general de los Productos Naturales Orgánicos y sus características estructurales, biosintéticas, ecológicas y farmacológicas.</p>	<p>Se pretende que el alumno obtenga una visión de los Productos Naturales Orgánicos, con especial énfasis en su influencia en las relaciones ecológicas entre los distintos organismos que habitan en el mar, y entre plantas de las mismas o diferentes especies, y la aplicabilidad de los productos naturales como nuevas fuentes de fármacos.</p>
5 ASESORÍA Y DISEÑO DE PROGRAMAS DE POSTGRADO	N/A	
6 GESTIÓN DE RECURSOS NACIONALES E INTERNACIONALES (administrativos, humanos, económicos, etc.)	N/A	

COMPONENTES	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	RESULTADOS POR OBJETIVO
7 RELACIONAMIENTO ESTRATÉGICO INTERINSTITUCIONAL NIVEL NACIONAL E INTERNACIONAL	<p>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.</p> <p>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 relacionadas con esta área, pertenecientes a otras Instituciones Universitarias ecuatorianas</p>	<p>1. Fortalecimiento del desarrollo del talento creador, formando profesionales investigadores que contribuyan al desarrollo de la sociedad de la que forman parte, ya sea Ecuador o Venezuela, logrando así, un desarrollo sustentable, crecimiento del capital social y establecimiento de una visión amplia basada en la diversidad científica y cultural.</p> <p>2. Planificación y realización de Jornadas Científicas Nacionales en el campo de los Productos Naturales y afines</p>

Firma y sello de la contraparte de la institución de acogida	
Nombre de la contraparte de la institución de acogida	Wunster Favián Maza Valle
Fecha de la propuesta	21 de Junio del 2013