



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Extracción, aislamiento, caracterización de metabolitos secundarios y  
evaluación de la actividad biológica de los extractos de  
*Dendrophorbium cf. balsapampae* (Cuatrec.) B. Nord de la familia  
Asteraceae**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**AUTORA:** Montaña Chávez, Karen Gabriela

**DIRECTOR:** Morocho Zaragocín, Segundo Vladimir, PhD

LOJA-ECUADOR

2017



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

2017

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph. D

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín.

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **“Extracción, aislamiento, caracterización de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad biológica de los extractos de *Dendrophorbium cf. balsapampae* (Cuatrec.) B. Nord de la familia Asteraceae”** realizado por Montaña Chávez Karen Gabriela ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2017

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Karen Gabriela Montaña Chávez declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **“Extracción, aislamiento, caracterización de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad biológica de los extractos de *Dendrophorbium cf. balsapampae* (Cuatrec.) B. Nord de la familia Asteraceae”**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Ph. D Segundo Vladimir Morocho Zaragocín director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

**Autor:** Karen Gabriela Montaña Chávez

**CI** 1106085564

## **DEDICATORIA**

El siguiente trabajo de investigación va dedicado primeramente a Dios quien supo guiarme por el camino correcto y darme las fuerzas necesarias para seguir adelante y no caer ante las diversas circunstancias que la vida me ha presentado, culminando de esta manera con gran éxito mis metas propuestas.

A mis padres y a mi hermano quienes por ellos soy lo que soy, por sus consejos, el apoyo incondicional especialmente en los momentos difíciles, ya que me han brindado su amor y cariño para no desvanecer ante mi objetivo propuesto; y a mis amigos quienes me han apoyado y me permitieron entrar en su vida durante este recorrido de vida universitaria.

Karen Gabriela Montaña Chávez

## **AGRADECIMIENTO**

Expreso mis agradecimientos a nuestro padre Dios ya que gracias a él, he logrado culminar mi carrera y a mi familia por sus palabras y compañía durante esta vida universitaria.

A quienes laboran en el Departamento de Química y Ciencias Exactas por ayudarme compartiendo sus conocimientos en la realización de este proyecto de investigación. En especial a mi tutor de tesis Ph. D Vladimir Morocho que gracias a sus conocimientos me ha orientado, apoyado y corregido en mi labor científica con un interés y una entrega absoluta, así pudiendo concluir con éxito el presente trabajo.

Karen Gabriela Montaña Chávez

## INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA .....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS .....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION .....	3
CAPITULO 1.....	5
MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. MEDICINA TRADICIONAL .....	6
1.2. PLANTAS MEDICINALES .....	6
1.3. Familia Asteraceae.....	8
1.4. Género <i>Dendrophorbium</i> .....	8
1.4.1 <i>Dendrophorbium balsapampae</i> .....	9
1.5. METABOLITOS SECUNDARIOS .....	9
1.5.1 TERPERNOS.....	10
1.6. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	11
1.6.1. Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) .....	11
1.6.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	11
1.7. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	12
1.7.1. BACTERIAS GRAM POSITIVAS .....	13
1.7.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
1.7.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	13

1.7.1.3. <i>Micrococcus luteus</i> .....	14
1.7.2. BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.....	14
1.7.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	14
1.7.3. LEVADURAS.....	15
1.7.3.1. <i>Candida albicans</i> .....	15
1.8. Diabetes Mellitus.....	15
CAPITULO 2.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1. Metodología Empleada.....	18
2.2. Recolección de la especie vegetal.....	19
2.3. Secado del material vegetal.....	19
2.4. Obtención de extractos totales.....	19
2.5. Cromatografía en capa fina (CCF).....	19
2.6. Fraccionamiento del Extracto de Acetato de Etilo.....	20
2.7. Purificación de Metabolitos Secundarios.....	22
2.7.1. Purificación de metabolitos secundarios de la fracción KM009/4 y KM011/4.....	22
2.8. Eludación química de los compuestos aislados.....	22
2.9. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).....	22
2.10. Determinación de la actividad antimicrobiana.....	23
2.11. Microorganismos de prueba.....	23
2.12. Preparación de las muestras.....	23
2.13. Preparación del cultivo overnight.....	23
2.14. Preparación de la suspensión del inóculo para las bacterias.....	24
2.15. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	24
2.16. Actividad Enzimática.....	24
2.16.1. Ensayo de $\alpha$ -glucosidasa.....	24
CAPITULO 3.....	25



RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1. Compuesto 1 (Fracción KM009/4) .....	26
3.1.1. Identificación y caracterización de KM009/4.....	26
3.2. Compuesto 2 (Fracción KM047/11) .....	27
3.2.1. Identificación y caracterización de KM047/11.....	28
3.3. Actividad Antimicrobiana del extracto total de <i>Dendrophorbium balsapampae</i> .....	29
3.4. Actividad hipoglucemiante de los compuestos aislados.....	30
CONCLUSIONES .....	31
RECOMENDACIONES .....	32
BIBLIOGRAFIA.....	33
ANEXOS.....	39

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura. 1.</b> Medicina Tradicional .....	6
<b>Figura. 2.</b> Variedad de Plantas Medicinales .....	8
<b>Figura. 3.</b> <i>Dendrophorbium balsapampae</i> .....	9
<b>Figura. 4.</b> Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas .....	11
<b>Figura. 5.</b> Equipo de Resonancia Magnética Nuclear .....	12
<b>Figura. 6.</b> Imagen microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
<b>Figura. 7.</b> Imagen microscópica de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	14
<b>Figura. 8.</b> Representación microscópica de <i>Micrococcus luteus</i> .....	14
<b>Figura. 9.</b> Ilustración microscópica de <i>Escherichia coli</i> .....	15
<b>Figura. 10.</b> Ilustración microscópica de <i>Candida albicans</i> .....	15
<b>Figura. 11.</b> Esquema de la metodología empleada en el aislamiento y caracterización en <i>Dendrophorbium balsapampae</i> .....	18
<b>Figura. 12.</b> <i>Dendrophorbium balsapampae</i> llevada a la cámara de secado (34°C) .....	19
<b>Figura. 13.</b> a) Maceración estática b) Filtración al vacío c) Rota evaporación a presión reducida	
<b>Figura. 14.</b> Fraccionamiento de extracto total de acetato .....	20
<b>Figura. 15.</b> CCF de las fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo. a) Luz UV 365 b) CCF revelada.....	20
<b>Figura. 16.</b> CCF 95:5 Hexano- Acetato de etilo .....	26
<b>Figura. 17.</b> Estructura química del Ácido kaurenoico.....	26
<b>Figura. 18.</b> CCF 9:1 Hexano-Acetato revelada .....	28
<b>Figura. 19.</b> Estructura química del Kaurenol.....	28

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los terpenos .....	10
<b>Tabla 2.</b> Fraccionamiento cromatográfico del extracto de Acetato de Etilo .....	21
<b>Tabla 3.</b> Especificaciones del cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas ....	22
<b>Tabla 4.</b> Medios de Cultivo y condiciones de incubación para actividad biológica del extracto total de Acetato de Etilo .....	23
<b>Tabla 5.</b> Datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H del ácido kaurenico en CDCl <sub>3</sub> .....	27
<b>Tabla 6.</b> Datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H del kaurenol en CDCl <sub>3</sub> .....	28
<b>Tabla 7.</b> CMI antibacteriana del extracto total AcOEt.....	29
<b>Tabla 8.</b> Actividad in-vitro en α-glucosidasa del extracto total y compuesto aislados .....	30

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) del Acido Kaurénico.....	40
<b>Anexo 2.</b> Espectro de CG-EM del Acido Kaurénico .....	41
<b>Anexo 3.</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) del Kaurenol .....	42
<b>Anexo 4.</b> Espectro de CG-EM del Kaurenol .....	43

## RESUMEN

En el presente estudio fitoquímico del extracto total de acetato de etilo a partir de las hojas de *Dendrophorbium balsapampae* se identificaron dos compuestos de origen diterpénico conocidos como Ácido kaurenico y kaurenol mediante técnicas espectroscópicas RMN y CG-EM. Se evaluó de los extractos totales y sus moléculas la actividad antibacteriana mediante microdilución en caldo y la actividad hipoglucemiante se determinó mediante la actividad inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa. Los resultados mostraron, que el extracto total fue inactivo para ambos ensayos, en cambio el ácido kaurenico mostró actividad frente a  $\alpha$ -glucosidasa con un  $CI_{50}$  de 115.43 $\mu$ M y el kaurenol con un  $CI_{50}$  de 626.48  $\mu$ M frente a la acarbosa con  $CI_{50}$  de 377  $\mu$ M

**Palabras Claves:** *Dendrophorbium balsapampae*, ácido kaurenico, kaurenol,  $\alpha$ -glucosidasa

## ABSTRACT

In the present phytochemical study of total ethyl acetate extract from the leaves of *Dendrophorbium balsapampae* two compounds of diterpene origin known as kaurenic acid and kaurenol were identified by NMR and GC-MS spectroscopic techniques. The total extracts and molecules were evaluated for antibacterial activity by microdilution in broth and the hypoglycemic activity was determined by  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. The results showed that the total extract was inactive for both tests, whereas kaurenic acid showed activity against  $\alpha$ -glucosidase with an IC<sub>50</sub> of 115.43 $\mu$ M and kaurenol with an IC<sub>50</sub> 626.48  $\mu$ M of against acarbose with IC<sub>50</sub> of 377  $\mu$ M

**Key words:** *Dendrophorbium balsapampae*, kaurenic acid, kaurenol,  $\alpha$ -glucosidase

## INTRODUCCION

Las plantas medicinales dentro de la historia y la cultura han constituido de manera esencial un aporte importante dentro de los pueblos indígenas, ya que mediante las diversas aplicaciones que les han dado a través de los años han permitido curar diversas enfermedades, este aporte ha sido transmitido de generación en generación (Pérez, 2008).

En el año de 1978 la OMS definió a la planta medicinal como “Cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica” (Cañigual, Dellacassa, & Bandoni, 2003).

En el Ecuador existe una amplia gama en cuanto a la variedad de plantas medicinales y el respectivo uso que se le da a cada una de ellas, dando un significado de enriquecimiento terapéutico y cultural. El mayor empleo de estas plantas es en el tratamiento de dolores, fiebre, tos y diarrea, además son utilizadas para la cura de enfermedades infecciosas e infestaciones (De la Torre, Navarrete, Macía, & Balslev, 2008).

Existen alrededor de 5172 especies con fines útiles en el Ecuador, en donde el 60 % tienen aplicación medicinal, el 55% son utilizados para materiales de construcción, el 30% son de uso comestible y el 20% para fines sociales (De la Torre et al., 2008).

Las familias de plantas más utilizadas por los habitantes en el Ecuador son Asteraceae, Lamiaceae, Solanaceae, Fabaceae, Onagraceae y Apiaceae (Tene, Malagon, Vita, Vidari, & Armijos, 2007).

Las especies de la familia Asteraceae se usan habitualmente como desinfectante, cicatrización de heridas, para el dolor el estómago, dolor hepático, problemas renales, infecciones, influenza y diferentes fiebres como la malaria (Tene et al., 2007).

En especies de la familia Asteraceae se ha reportado la presencia de isoflavonoides, lactonas sesquiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales y diversos derivados acetilénicos (Del Vitto & Petenatti, 2009).

La presencia de lactonas sesquiterpénicas en la familia Asteraceae, ha sido vinculada con actividad citotóxica, antiinflamatoria, antitumoral, antibacteriana y fungicida, a través de diversos estudios tanto de la estructura química como bioactividad (Reyes & Suarez, 2015).

El género *Dendrophorbium* perteneciente a la familia Asteraceae siendo incluye alrededor de 88 especies a nivel mundial. Son empleados en cuanto al tratamiento de heridas, en procesos antiinflamatorios como regulador de la sangre y vasodilatadores, además ayuda a aliviar el dolor de estómago (Yang et al., 2011).

Algunas especies del género *Dendrophorbium* es empleado en la medicina tradicional del Ecuador para tratar afecciones del hígado y de los riñones, así como también para tratar malestares femeninos (De la Torre et al., 2008).

Las especies de este género se encuentran en la ceja andina y en el subpáramo en altitudes de hasta 4400 m s.n.m. y crecen sobre diversidad de suelos (Ordóñez, Aguirre, & Hofstede, 2001).

El propósito de esta investigación es aportar en el estudio fitoquímico mediante el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de extractos totales de ***Dendrophorbium cf. balsapampae*** mediante técnicas espectroscópicas RMN y CG-EM, asimismo en la determinación de la actividad biológica de extractos totales y metabolitos secundarios aislados de ***D. cf. balsapampae***.

Este proyecto de investigación se enmarca dentro del programa del estudio químico y biológico de plantas, hongos, actinomicetos de la región Sur del Ecuador (Proy\_QUI\_1440 UTPL/2017).



**CAPITULO 1.**

**MARCO TEÓRICO**

## 1.1. MEDICINA TRADICIONAL

La utilización de plantas medicinales desde épocas antiguas ha continuado vigente con el fin de llevar a cabo varios y diferentes tratamientos que son provocados por patologías de diversa índole, la argumentación que justifica esto, es la reducción de los efectos tóxicos y adversos, a diferencia de aquellos fármacos de origen sintético. Otra razón es la automedicación, con todo esto, en la actualidad el empleo de plantas medicinales ha tenido una mayor aceptabilidad (Rubio, 2013).

El Ecuador, es uno de los estados en América Latina que contiene una riqueza y biodiversidad en cuanto a la flora, por lo tanto demuestra que hay un extenso conocimiento de la medicina tradicional que nos abre muchos caminos para la investigación de principios activos que se presentan en cada una de las especies, constituyendo una base fundamental para la elaboración de nuevos y diversos fármacos que ayuden al tratamiento de las diversas enfermedades presentes en el mundo (Ansaloni et al., 2010).

La Medicina Tradicional se la define al conjunto de convicciones, conocimientos y prácticas los cuales se encuentran justificadas a través del uso de los recursos naturales, así como también al empleo de técnicas de forma manual mediante las cuales permiten explorar y aportar con varias ideas para sostener el bienestar que se encuentra presente en el mundo (Pereyra & Fuentes, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la medicina tradicional a la agrupación de aptitudes, practicas, sabiduría y conocimiento todo esto fundamentado en las diversas teorías y creencias que se dan de manera propia o a través de las culturas con el objetivo de proteger la salud de cada una de las personas y de esta manera evitar cualquier tipo de enfermedad. La medicina tradicional está orientada hacia la prevención, diagnóstico y cura de enfermedades tanto físicas como mentales (OMS, 2013).



**Figura. 1.** Medicina Tradicional

**Fuente:** Maya, 2014

**Elaboración:** Maya, 2014

## 1.2. PLANTAS MEDICINALES

La utilización de plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades nace desde épocas antiguas al igual que la especie humana. El análisis que se viene realizando desde aquellos

tiempos sobre el uso y la eficacia de la especie vegetal, aportan de manera significativa a la revelación de sus propiedades terapéuticas, de modo que se prescriben frecuentemente (Silva & Fernandes Júnior, 2010).

Sus propiedades se han ido empleando durante miles de años para saborear y conservar los alimentos, así como también en el tratamiento de alteraciones en la salud, ayudando así a prevenir enfermedades como son las epidemias. El estudio de sus características curativas se ha difundido a los largos de los tiempos dentro y fuera de las distintas comunidades (Silva & Fernandes Júnior, 2010).

Durante el metabolismo de la planta se forman compuestos activos que son los responsables de las cualidades biológicas de las diversas especies vegetales utilizadas en todo el mundo con varios fines (Silva & Fernandes Júnior, 2010).

El deseo por conocer y dar a entender las propiedades que poseen las plantas medicinales, así como las diversas dolencias que tratan, ha sido de suma importancia a lo largo de la existencia de la humanidad. Las plantas medicinales son un medio fundamental dentro de las agrupaciones campesinas como indígenas que se encuentran habitando nuestro país. Cerca del 80% de la sociedad ecuatoriana utiliza la medicina tradicional abarcando tanto las plantas como productos naturales con el propósito de mantener el bienestar físico como mental de la persona (Ansaloni et al., 2010).

En el año de 1978 la OMS define a una planta medicinal como cualquier planta que posee varias sustancias ya sea en uno o varios de sus órganos las cuales pueden ser empleadas en acciones fito terapéuticas o que son pioneros para la semisíntesis químico-farmacéutico (Cañigüeral et al., 2003).

Dentro de la importancia de las plantas medicinales sobresale su utilidad como materia prima en cuanto a la elaboración de medicamentos que se dan a partir de elementos naturales a través de un proceso de síntesis química, siendo su principal herramienta el principio activo que se encuentra inmersa en ella, la cual se empleará como un indicador taxonómico en la búsqueda e investigación de procesos para la producción de fármacos (Bermúdez, Oliveira-miranda, & Velázquez, 2005).

El resultado medicinal de la materia vegetal es beneficiosa en varias ocasiones, ya que resulta de las combinaciones de productos secundarios presentes en la planta (Barboza, Cantero, Núñez, Pacciaroni, & Espinar, 2009). En varias oportunidades es la planta entera quien posee un elevado interés medicinal, aunque lo más común es que se emplee solo una parte de la misma como lo es las semillas, hojas, flores y cada una de sus respectivas partes, en donde están presentes aquellos principios activos los cuales aportan al tratamiento de las diversas

enfermedades presentes en la actualidad (Vicente-Herrero et al., 2013).



**Figura. 2.** Variedad de Plantas Medicinales

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

### **1.3. Familia Asteraceae**

La familia Asteraceae se distingue por su manera de reproducción ya que sus flores se establecen de manera sésil sobre un receptáculo ensanchado. Esta familia está constituida desde pequeñas hierbas que miden 1cm hasta árboles con un tamaño de 30m. Abarca más de 1700 géneros y 24 000 hasta 30 000 especies las cuales se encuentran distribuidos alrededor del mundo (Katinas, Gutierrez, Grossi, & Crisci, 2007).

Posee una extensa gama de componentes químicos o principios activos que tienen propiedades fisiológicas de gran importancia, dentro de los componentes encontramos lactonas sesquiterpénicas, indoides, fenilpropanoides, flavonoides y aceites esenciales los cuales le conceden las características medicinales que son utilizadas como tratamiento especialmente del tracto digestivo (Alonso, Ibarra, & Martínez, 2008).

Arrázola, Atahuachi, Saravia, & Lopez (2002) nos mencionan que la familia Asteraceae tienen importantes propiedades las cuales son antiinflamatoria, expectorante y como antiséptico. Además, poseen un conjunto extenso de estructuras químicas denominados principios activos en donde las lactonas sesquiterpénicas son el grupo mayoritario con 3000 estructuras aproximadamente.

Además de sus características antiinflamatorias, analgésicas y potencial antipiréticas de algunas especies, poseen en un alto nivel antioxidante que han sido identificados en varios extractos y partes de la planta como son sus raíces, tallos, corteza, hojas, etc. Su característica antioxidante le ha permitido ser empleada en la medicina, así como en las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias (Bessada, Barreira, & Oliveira, 2015).

### **1.4. Género *Dendrophorbium***

El género *dendrophorbium* se encuentra principalmente en la zona andina de Colombia, Perú, Bolivia y Ecuador. Se caracterizan por ser arbustos herbáceos grandes o subarbustos, con

hierbas robustas, ramas alargadas y erectas (Díaz-Piedrahita & Cuatrecasas, 1999).

#### 1.4.1 *Dendrophorbium balsapampae*

La especie *D.balsapampae* considerada como endémica en el Ecuador es un árbol o arbusto que se localiza en las provincias de Bolívar y Loja a una altitud de 2500 a 3000m (Jørgensen & León-Yáñez, 1999).



**Figura. 3.** *Dendrophorbium balsapampae*

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

### 1.5. METABOLITOS SECUNDARIOS

Investigar de donde provienen los metabolitos secundarios de plantas es uno de los temas de mayor interés en la actualidad que tiene como fin buscar y conocer su origen, además de investigar los diferentes tipos de mecanismos de cómo se producen, para la utilización de estos metabolitos en la planta y para elaborar diferentes procesos que permitan su crecimiento, hallar la diversa interacción que hay entre la planta y el medio que la rodea, mostrando así un desarrollo de mejora para la humanidad (Dirzo, 1985).

Las plantas generan una suficiente diversidad de compuestos bioactivos y metabolitos, los cuales intervienen en la defensa contra microorganismos y los diversos cambios que existen en el medio que nos rodea (humedad, temperatura, luz, agua), es por ellos que durante años han sido utilizados esencialmente en la fabricación de medicamentos, preservación de alimentos y medio ambiente (Vélez-Terranova, Gaona, & Sánchez-Guerrero, 2014).

Un metabolito secundario es el encargado de las propiedades organolépticas como el sabor, olor, color y la consistencia de las diversas especies vegetales. Asimismo poseen cualidades que les permiten abarcar distintos campos entre ellos la elaboración de fármacos, agroquímicos, colorantes, narcóticos, esencias, saborizantes, etc (Chacón & González, 2009).

La amplia gama de metabolitos secundarios son elaborados por microorganismos, formando la interfase química entre estos componentes y el mundo. La relación entre ellos es de gran importancia, las mismas que se consideran un motivo para el desarrollo y obtención de nuevos

metabolitos. Diversos estudios acerca de las interacciones han permitido que en la época actual una gran mayoría de estos componentes de distinta naturaleza se diferencie de aquellos antibióticos que contienen una variedad de actividades biológicas (Brizuela, García, Pérez, & Mansur, 1998).

### 1.5.1 TERPERNOS

Terpenos o terpenoides forman el conjunto mayoritario de metabolitos secundarios, posee más de 4000 moléculas diferentes. Su trayecto biosintético forma tanto a metabolitos primarios como secundarios que son necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta (García & Carril, 2009).

García & Carril (2009) indican que los terpenos poseen la siguiente clasificación de acuerdo al número de unidades de isopreno:

**Tabla 1.** Clasificación de los terpenos

<b>GRUPO</b>	<b>UNIDADES DE ISOPRENO</b>
<b>Monoterpenos</b>	2
<b>Sesquiterpenos</b>	3
<b>Diterpenos</b>	4
<b>Triterpenos</b>	6
<b>Tetraterpenos</b>	8
<b>Politerpenos</b>	más de 8 unidades

**Fuente:** (García & Carril, 2009)

**Elaboración:** (García & Carril, 2009)

Las características esenciales de los terpenos conllevan a un importante interés de los mismos al ser usados para aromas y fragancias, en alimentación y cosmética. Algunos poseen propiedades medicinales como antimalariales, anticarcinogénicas, anti ulcerosas y antimicrobianas (García & Carril, 2009).

#### 1.5.1.1. DITERPENOS

Se denomina diterpenos a los metabolitos secundarios que se encuentran formados por cuatro unidades isoprenicas en unión cabeza-cola. Estas moléculas están colocadas ampliamente dentro de la especie vegetal de manera especial en las familias Lamiaceae y Euphorbiaceae (González, 2013).

Poseen actividad medicinal entre ellas antiinflamatoria, anticancerígena, antifúngica, antioxidante y antimicrobiana. En los últimos años aumentado el interés en el estudio de estos

componentes como agentes neuroprotectores (González, 2013).

## 1.6. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

### 1.6.1. Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

La cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas es una técnica analítica que permite reconocer y cuantificar sustancias orgánicas. Es una combinación sinérgica de dos técnicas micro analíticas en donde la cromatografía de gases tiene como función el separar componentes de una mezcla en el tiempo, mientras que la espectrometría de masas nos da información que ayuda a la identificación estructural de cada componente. Por otro lado, este método es esencial dentro de los campos como son la ciencia ambiental, salud y en la investigación tanto medica como biológica (Sparkman, Zeld, & Fulton, 2011).

Los compuestos con características como un bajo o mediano peso molecular, son aptos para el análisis a través de este método (Stashenko & Martínez, 2010).

Cuando existe la combinación de componentes y se inyecta al cromatógrafo de gases hay una separación en la columna cromatográfica de esta manera se logra especificar sucesivamente aquellos componente individuales aislados los cuales pasaran de manera inmediata al espectrómetro de masas. Cada compuesto se reconocerá en forma de pico y se lo identificará a través del espectro de masas (Gutiérrez & Droguet, 2002).



**Figura. 4.** Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

### 1.6.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Este método tiene su inicio en el año de 1950 cuando se empezaron a distribuir los primeros espectrómetros con el fin de obtener espectros de protones. Esta técnica crea un extenso y considerado espectro de aplicaciones dentro del ámbito en el estudio estructural de moléculas. (Garrido, Vélez, & Vélez, 2013)

Un espectrómetro de RMN está constituido por un imán, un emisor de radiofrecuencia y un detector de radiofrecuencia que forman un sistema, que hace referencia a las propiedades magnéticas de los núcleos y se emplea con mayor frecuencia en las propiedades del núcleo de hidrógeno.” Los electrones van a producir modificaciones, débiles pero observables, siendo esos efectos electrónicos los que darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento, permitiendo así el estudio detallado de la estructura electrónica de las moléculas”

(Elguero, Alkorta, Pardo, Claramunt, & Santa María, 2004).

Existen experimentos los cuales son utilizados para la elucidación:

<sup>13</sup>C: Esta técnica permite contar el número de átomos de carbono diferentes en una molécula (McMurry, 2012).

<sup>1</sup>H: Permite señalar el número de protones con sus respectivos desplazamientos químicos (McMurry, 2012).



**Figura. 5.** Equipo de Resonancia Magnética Nuclear

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

## 1.7. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En los últimos años se ha demostrado que las plantas poseen la capacidad de producir moléculas químicas, las cuales tienen diferentes propiedades entre ellas sirven como mecanismos de defensa hacia insectos y microorganismos. Con lo mencionado anteriormente, el hombre ha expandido sus investigaciones enfocándose a la extracción y purificación de compuestos que tienen actividad antimicrobiana, demostrando así que gran número de especies de origen vegetal inhiben el crecimiento de bacterias (Castillo Mompié, Pascual Sanchez, CunhaNune, de la Paz Lorente, & Cañete Aguila, 2014).

Existe una extensa variedad de antimicrobianos naturales los cuales son adquiridos a partir de microorganismos, animales y de mayor índole como son las plantas. Muchos de ellos ya han sido utilizados en la conservación de alimentos o para otros fines (Rosas-Gallo & Lopez-Malo, 2011).

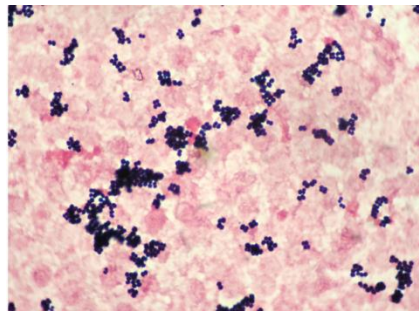


## 1.7.1. BACTERIAS GRAM POSITIVAS

### 1.7.1.1. *Staphylococcus aureus*

Pertencen a los cocos Gram positivos, miden de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , se caracterizan por formar cadenas cortas como un racimo de uvas, se encuentran en pares o tétradas. Su nombre proviene del griego staphyle que significa racimo de uvas. Estas bacterias no presentan cápsula y son anaerobias facultativas (Cervantes-García, García-gonzález, & Salazar-schettino, 2014).

Es un patógeno que coloniza alrededor del 30% en la población humana y provoca un alto rango de infecciones clínicas. Es una de una de las principales causas de bacteriemia y endocarditis infecciosa, además afecta a nivel articular, piel y tejidos blandos (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015).



**Figura. 6.** Imagen microscópica de *Staphylococcus aureus*

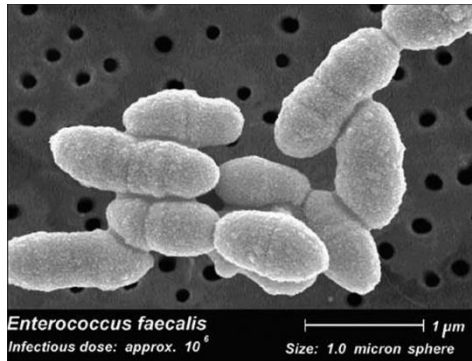
**Fuente:** A. Pahissa, 2009

**Elaboración:** Pahissa, 2009

### 1.7.1.2. *Enterococcus faecalis*

Son anaerobios facultativos Gram positivos que presentan un tamaño comprendido entre 0,6 a 2,6  $\mu\text{m}$ , con forma esférica u ovoide, se presentan en forma de cadenas cortas, no forman endosporas, tienen características de quimiorganotrofos con un metabolismo fermentativo. Las diversas infecciones que ocasionan estos patógenos se dan cuando las defensas del organismo de la persona se encuentran disminuidas o por el uso de dispositivos invasivos, ocasionando así enfermedades graves como endocarditis y bacteriemia (Díaz Pérez, Martínez Rodríguez, & Zhurbenko, 2010).

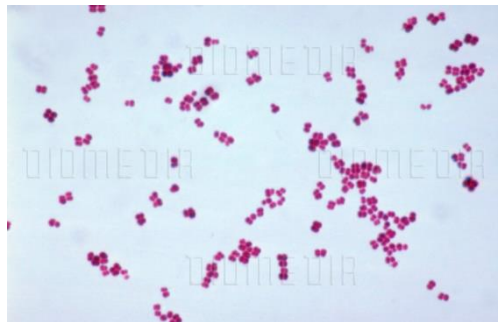
Además son los responsables de infecciones como septicemia, abscesos intraabdominales y pélvicos, infecciones ocasionadas a nivel de piel, tejidos blandos y neonatales (Díaz Pérez et al., 2010).



**Figura. 7.** Imagen microscópica de *Enterococcus faecalis*  
**Fuente:** L. Moghadas, 2012  
**Elaboración:** Moghadas, 2012

### 1.7.1.3. *Micrococcus luteus*

Es un coco Gram positivo que se encuentra como un saprofito normal en la nasofaringe, se caracteriza por presentar una pared celular del ácido teicuronico que es una cadena larga de polisacáridos compuesta por casi cien unidades de disacáridos. Es el agente causante de septicemia, endocarditis, meningitis, infecciones del tracto urinario así como infecciones como sinusitis, gingivitis (Souhami, Feld, C, & Tuffnell, 1979).



**Figura. 8.** Representación microscópica de *Micrococcus luteus*  
**Fuente:** M Abbey, 2010  
**Elaboración:** Abbey, 2010

## 1.7.2. BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

### 1.7.2.1. *Escherichia coli*

Pertenece a los Gram negativos, es un bacilo anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, se caracteriza por ingresar en el ser humano y colonizar el intestino del mismo, es considerado como un microorganismo presente en la flora normal, aunque hay presencia de cepas que pueden provocar daño, dando como resultado diversas enfermedades y cuadro clínicos (Rodríguez, 2002).

Puede provocar diversas infecciones y enfermedades entre ellas entéricas, a nivel del tracto urinario y sepsis, diarrea, meningitis, entre otras. Este tipo de infecciones se dan mediante

factores de virulencia los cuales afectan a una amplia gama de procesos celulares (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004).



**Figura. 9.** Ilustración microscópica de *Escherichia coli*  
**Fuente:** G. Prats, 2006  
**Elaboración:** G. Prats, 2006

### 1.7.3. LEVADURAS

#### 1.7.3.1. *Candida albicans*

Se caracteriza por ser un microorganismo con capacidad de sobrevivir como comensal en los distintos lugares del cuerpo humano como son el intestino, cavidad oral y vaginal, además de originar enfermedades cuando existe la posibilidad siempre y cuando el organismo se encuentre bajo en defensas (Castrillon, Palma, & Padilla, 2005).

*Candida* es polimórfica ya que puede presentarse de dos distintas maneras como filamentos o levadura. Su invasión conduce a una infección sistémica cuando el huésped se encuentra expuesto a varios factores entre esta el uso de antibióticos de amplio espectro, agentes inmunosupresores, SIDA, diabetes mellitus o alteraciones en el sistema gastrointestinal (Castrillón et al., 2005).



**Figura. 10.** Ilustración microscópica de *Candida albicans*  
**Fuente:** S. Fernández, 2016  
**Elaboración:** S. Fernández, 2016

### 1.8. Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico debido a defectos en la secreción o acción de la insulina, ésta deficiencia provoca la hiperglicemia crónica con alteraciones de carbohidratos, grasas y proteínas. Cuando va avanzando la enfermedad se producen

complicaciones como diabetes graves, retinopatía, nefropatía, complicaciones cardiovasculares, y úlceras, además de abarcar una gama de enfermedades heterogéneas (Bastaki, 2005).

La diabetes tipo 2 es la que tiene un predominio mayor del 85 al 95% especialmente en países en desarrollo la cual está relacionada con el mal uso de insulina por las células diana y por los diferentes tejidos (Piero, Nzaro, & Njagi, 2015).

La insulina es una hormona polipeptídica sintetizada en humanos y otros mamíferos dentro de las células beta en los Islotes de Langerhans en el páncreas. La producción de insulina no siempre depende de los niveles de glucosa en sangre. La deficiencia de insulina juega un papel importante en todas las formas de diabetes ya que es la hormona principal que permite que las células absorban la glucosa del torrente sanguíneo (Piero et al., 2015).

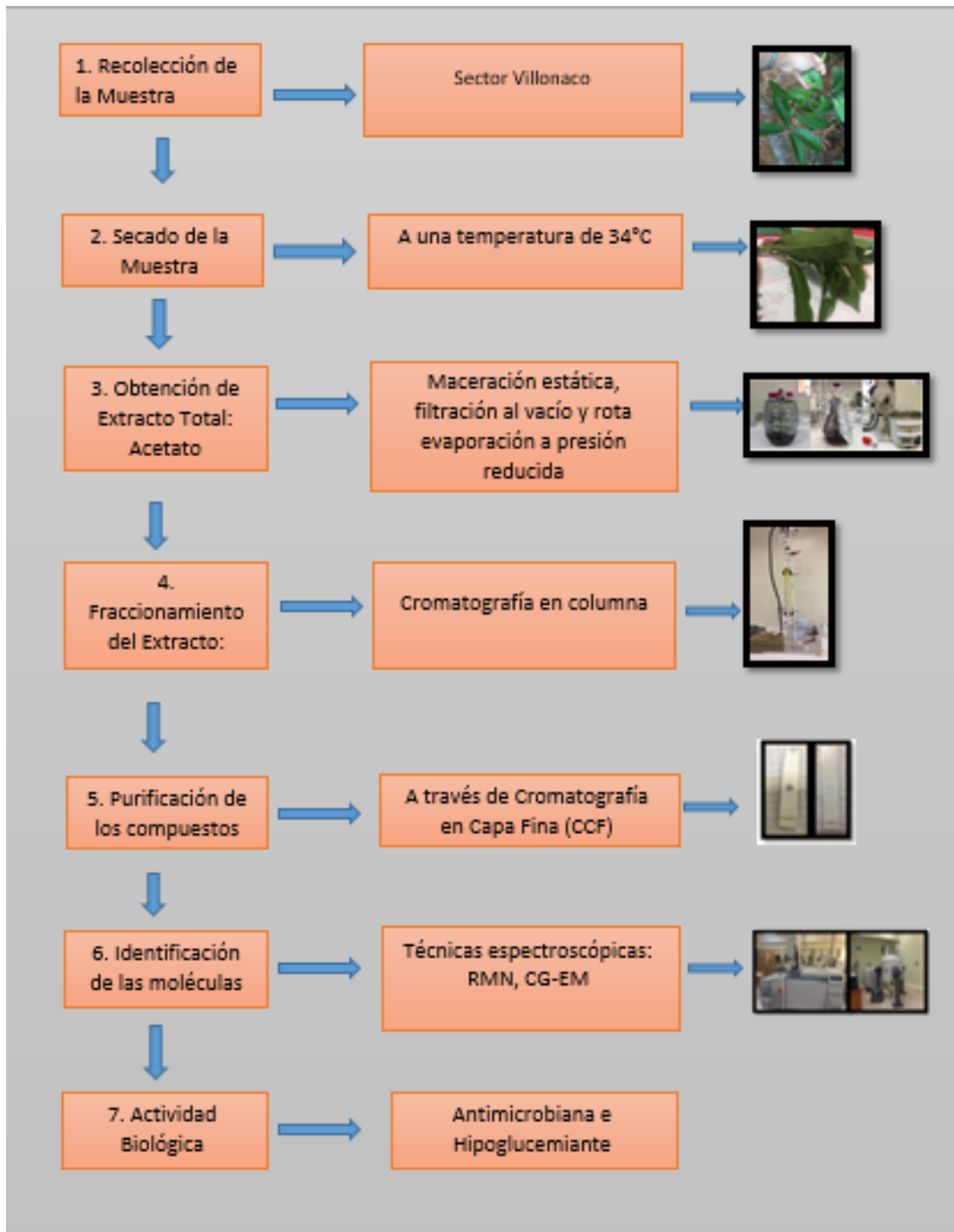
Para la disminución de la glucemia en personas con diabetes existen coadyuvantes entre ellos esta  $\alpha$ -glucosidasa que interviene en el borde del cepillo del epitelio del intestino delgado ayudando a disminuir la digestión y la absorción de glucosa en la circulación sistémica, de esta manera permite que las células  $\beta$  del páncreas regulen la secreción de insulina (AG, 1994).

**CAPITULO 2.**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Metodología Empleada

En el siguiente esquema se muestra la metodología empleada en la presente investigación.



**Figura. 11.** Esquema de la metodología empleada en el aislamiento y caracterización en *Dendrophorbium balsapampae*

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

## 2.2. Recolección de la especie vegetal

Se recolectaron las hojas de la planta *Dendrophorbium balsapampae* en el sector Villonaco en marzo del 2016, ubicado al occidente de la ciudad de Loja con coordenadas 3°59'47" S, 79° 16'31' O. La muestra fue identificada por el Dr. Nixon Cumbicus y depositada en el HUTPL de la UTPL.

## 2.3. Secado del material vegetal

Luego de haberse recolectado la especie vegetal, se procedió a eliminar hojas deterioradas, a continuación fue llevada hacia la cámara de secado a 34°C por 5 días, evitando así que tenga alguna contaminación.



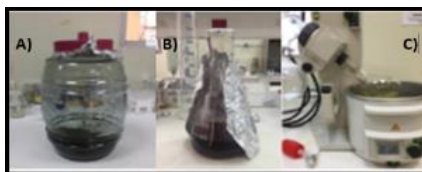
**Figura. 12.** *Dendrophorbium balsapampae* llevada a la cámara de secado (34°C)

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

## 2.4. Obtención de extractos totales

Los extractos totales se obtuvieron a partir de 500g de las hojas mediante maceración estática por 24 horas utilizando como disolvente Acetato de etilo, se lo ejecutó por triplicado durante 3 días a temperatura ambiente. Seguidamente, se filtró el extracto al vacío y se concentró a presión reducida a 30°C en donde finalmente se obtuvo el extracto total en acetato de etilo.



**Figura. 13.** a) Maceración estática b) Filtración al vacío c) Rota evaporación a presión reducida

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

## 2.5. Cromatografía en capa fina (CCF)

Antes de proceder al fraccionamiento de la columna, se realizó estudios del extracto total a través de Cromatografía en capa fina con diferentes solventes y a distinta polaridades y de esta manera ver la riqueza de los compuestos y a su vez la mejor opción para la separación de los mismos.



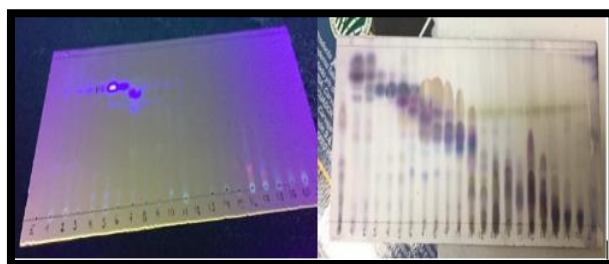
**Figura. 14.** Fraccionamiento de extracto total de acetato

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

## 2.6. Fraccionamiento del Extracto de Acetato de Etilo

A partir de 2g del extracto total el cual fue sometido a un fraccionamiento en cromatografía en columna utilizando 200g de sílice gel 60 F254 en relación 1:100, con polaridad creciente, comenzando con hexano 100% hasta Hexano-Acetato en relación 40:60. Se recolectaron 270 fracciones de aproximadamente 100 mL cada una. Luego se procedió a realizar cromatografía en capa fina de las fracciones resultantes utilizando una placa de CCF (sílice gel 60 F254) como fase estacionaria y como fase móvil Hexano-Acetato relación 9:1. Seguidamente se observaron en una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365nm y finalmente se unieron las fracciones de acuerdo a los resultados obtenidos en las placas de CFF dando un total de 22 fracciones.



**Figura. 15.** CCF de las fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo. a) Luz UV 365 b) CCF revelada

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017



**Tabla 2.** Fraccionamiento cromatográfico del extracto de Acetato de Etilo

<b>Fracciones</b>	<b>Muestra</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Peso en mg</b>
KM022/4	0-53	Hex-AcOEt	22,1
KM001/4	132-139	Hex-AcOEt	113,8
KM002/4	54-59	Hex-AcOEt	43,5
KM003/4	60-67	Hex-AcOEt	18,2
KM004/4	68-73	Hex-AcOEt	9,9
KM005/4	74-79	Hex-AcOEt	23,6
KM006/4	80-88	Hex-AcOEt	26
KM007/4	89-91	Hex-AcOEt	42,7
KM008/4	92-98	Hex-AcOEt	256,9
<b>KM009/4</b>	<b>99-103</b>	<b>Hex-AcOEt</b>	<b>178</b>
KM010/4	104-111	Hex-AcOEt	159,7
<b>KM011/4</b>	<b>112-120</b>	<b>Hex-AcOEt</b>	<b>97</b>
KM012/4	121-128	Hex-AcOEt	64,1
KM013/4	129-131	Hex-AcOEt	36,4
KM014/4	139-145	Hex-AcOEt	135,6
KM015/4	146-171	Hex-AcOEt	120,2
KM016/4	172-178	Hex-AcOEt	38,7
KM017/4	179-200	Hex-AcOEt	98,6
KM018/4	201-209	Hex-AcOEt	92,9
KM019/4	210-240	Hex-AcOEt	106,3
KM020/4	241-258	Hex-AcOEt	27,7
KM021/4	259-270	Hex-AcOEt	19

Fuente: Autor 2017

Elaboración: Autor 2017

\*1. KM009/4

\*2. KM011/4

## 2.7. Purificación de Metabolitos Secundarios

### 2.7.1. Purificación de metabolitos secundarios de la fracción KM009/4 y KM011/4

Para la fracción KM009/4 no se realizó purificación, ya que el compuesto fue obtenido de la primera columna que se realizó en la investigación.

En la fracción KM011/4 se realizó una columna a partir de 80mg de muestra en 20g de sílica gel 60 F254 eluyendo con polaridad creciente Hexano-Diclorometano 9:1 hasta Hexano-Diclorometano 6:4. Obteniendo de esta manera el compuesto KM047/11.

## 2.8. Eludación química de los compuestos aislados

Este proceso se lo realizó a través de análisis de Resonancia Magnética Nuclear, el cual está operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , usando como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

## 2.9. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Para la identificación se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serio 5973 inert, este sistema de operación se encuentra dotado de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, el cual presenta un inyector automático Split/splitless serie 7683.

En la tabla 3 se detalla las características de cada uno de los parámetros utilizados en CG-EM.

**Tabla 3.** Especificaciones del cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

Fracción	KM009/4; KM047/11
Columna Capilar	Modelo DB- 5MS, Agilent 122-5532 T° Máxima: 350°C Flujo: Constante Flujo inicial: 1.0mL/min P. inicial: 52.8 kPa Velocidad Promedio: 36cm/sec
Inyector	Modo: Split Radio de partición: 50:1 Temperatura inicial: 250°C Gas de arrastre: Helio
Detector	Espectrómetro de masas Temperatura: 250°C
Horno	Temperatura inicial: 50°C Temperatura final: 270°C

Fuente: Autor 2017

Elaboración: Autor 2017

## 2.10. Determinación de la actividad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se la determinó a través del método de micro dilución en caldo.

## 2.11. Microorganismos de prueba

Se procedió a utilizar 5 cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240) como bacterias Gram positivas; *Escherichia coli* (ATCC 43888) como Gram negativas y levaduras como *Candida albicans* (ATCC 10231).

## 2.12. Preparación de las muestras

Se realizó una dilución de 100mg del extracto desclorofilado de Acetato de Etilo en 1000 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO)

## 2.13. Preparación del cultivo overnight

Las cepas que se utilizaron se encontraron en una reserva criogénica a -80°C. A continuación se detallan la incubación de los microorganismos.

**Tabla 4.** Medios de Cultivo y condiciones de incubación para actividad biológica del extracto total de Acetato de Etilo

<b>Microorganismos</b>	<b>Medios de Cultivos</b>	<b>Condiciones de Incubación</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Caldo Tripticasa soya	35°C por 14 a 16 horas
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	35°C por 14 a 16 horas
<b><i>Micrococcus luteus</i></b>	Caldo Nutritivo Cerebro-Corazón	35°C por 14 a 16 horas
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Caldo Tripticasa soya	35°C por 14 a 16 horas
<b><i>Cándida albicans</i></b>	Caldo Sabouraud	37°C por 14 a 16 horas

Fuente: Autor 2017

Elaboración: Autor 2017

Una vez que se preparó los medios y se los esterilizo se inició con el inculo de cada bacteria

## **2.14. Preparación de la suspensión del inoculo para las bacterias**

Del cultivo overnight se toman 10  $\mu\text{L}$  y se colocan en 10 mL de caldo Mueller Hinton para bacterias y de caldo Sabouraud para hongos, de esta dilución se cogen 100 $\mu\text{L}$  que se utilizaron para completar el volumen final en la placa de 96 pocillos.

## **2.15. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana**

Este método se realizó en placas estériles de 96 pocillos, colocando 180mL de caldo Mueller Hinton en la primera fila A y 100  $\mu\text{L}$  en los pocillos restantes. A continuación se procede a adicionar 20  $\mu\text{L}$  del extracto diluido en estudio en los pocillos de la fila A y se realiza una mezcla. Posteriormente, se efectúa diluciones seriadas tomando 100  $\mu\text{L}$  de los pocillos de la fila A y se los diluye en los pocillos de la fila B hasta llegar a la fila H, desechando la parte sobrante.

Para los controles se colocan 200  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton o Sabouraud en la columna A10-H10 y como control negativo se emplea 180  $\mu\text{L}$ +20  $\mu\text{L}$  de DMSO en el pocillo A11 y a este procedimiento se realiza de dilución doble seriada. Para el control positivo emplea 180  $\mu\text{L}$ +20  $\mu\text{L}$  del antibiótico (gentamicina 1mg/ml) o antifúngico (itroconazol 1mg/ml)

Ya preparadas la placas se inoculan con 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de cada inoculo bacteriano para completar el volumen final ajustando la población bacteriana de  $5 \times 10^5 \text{ufc/mL}$  y  $5 \times 10^9 \text{ufc/mL}$  para levaduras. Finalmente se incuban a  $37^\circ\text{C}$  en un periodo de 18 a 24 horas.

## **2.16. Actividad Enzimática**

### **2.16.1. Ensayo de $\alpha$ -glucosidasa**

La medición de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa se determinó usando una placa de micro titulación de 96 pocillos p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido como sustrato, con ligeras modificaciones usando la acarbosa como control positivo. Las soluciones de muestra se prepararon disolviendo 10mg de la muestra en 1mL de una mezcla MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1), en caso de conseguir la inhibición completa de la enzima se prepararon varias diluciones en PBS.

En primer lugar se tomó 75  $\mu\text{L}$  de PBS, se mezcló con 5  $\mu\text{L}$  de la muestra y 20  $\mu\text{L}$  de la solución de la enzima, se pre incubo a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 min antes de la iniciación de la reacción por la adición del sustrato.

Después de la pre incubación se añadió 20  $\mu\text{L}$  de solución PNPG en cada pocillo, la placa se incubo durante 15min a  $37^\circ\text{C}$ . La cantidad de p-Nitrofenol liberado se midió mediante absorbancia en un lector de microplacas EPOCH 2 (BIOTEK®) a 405nm durante 60 min, registrando la absorbancia cada 5min.

**CAPITULO 3.**

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Compuesto 1 (Fracción KM009/4)

La fracción KM009/4 se presentó en forma de cristales amorfos blanquecinos, obteniendo un peso de 178mg. Seguidamente se procedió a realizar cromatografía en capa fina (CCF), eluyendo en Hexano-AcOEt relación 95:5 en donde se visualizó el compuesto puro con una coloración morada al ser revelada con vainilla y ácido sulfúrico (Fig. 16).



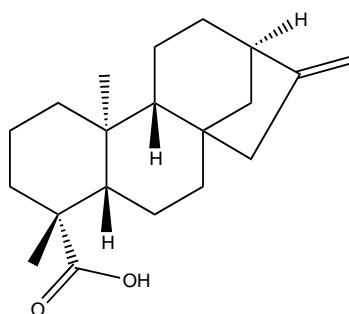
**Figura. 16.** CCF 95:5 Hexano-Acetoato de etilo  
**Fuente:** Autor 2017  
**Elaboración:** Autor 2017

#### 3.1.1. Identificación y caracterización de KM009/4

Para la identificación y caracterización de los cristales se la realizó mediante técnicas espectroscópicas de RMN y CG-EM. Con los valores obtenidos el compuesto identificado se trata del ácido kaurenico, que es un diterpeno de fórmula molecular  $C_{20}H_{30}O_2$  y con un peso molecular de 302 g/mol, datos que fueron corroborado con literatura en la tabla 2.

El protón del ácido kaurenico presenta señales que corresponden a dos metilos 0.99 (3H, s, H-20) y 1.23 (3H, s, H-18), dos protones olefínicos en 4.72 (1H, s, H-17a), y 4.78 (1H, s, H-17b), un singulete ancho en 2.67 (H-13).

En la figura 17 se muestra la estructura química del Ácido kaurenico



**Figura. 17.** Estructura química del Ácido kaurenico  
**Fuente:** Autor 2017  
**Elaboración:** Autor 2017

En la tabla 5 se indica los datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  corroborado con literatura.

**Tabla 5.** Datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  del ácido kaurenico en  $\text{CDCl}_3$

Datos Experimentales	(Suárez et al., 2013)	Datos Experimentales	(Suárez et al., 2013)
$^1\text{H}$ NMR (400MHz)	$^1\text{H}$ NMR (400MHz)	$^{13}\text{C}$ (100 MHz)	$^{13}\text{C}$ (100 MHz)
<b>0.99 (3H, s, H-20)</b>	0.99 (3H, s, H-20)	15.7 (C20)	15.7 (C20)
<b>1.23 (3H, s, H-18)</b>	1.23 (3H,s, H-18)	29.1 (C18)	29.00 (C18)
<b>4.72 (1H, s, H-17a)</b>	4.72 (1H, s, H-17a)	103.1 (C17)	103.10 (C17)
<b>4.78 (1H, s, H-17b)</b>	4.78 (1H, s, H-17b)	103.1(C17)	103.10 (C17)
<b>2.67 (H-13)</b>	2.67 (H-13)	44.0 (C13)	43.90 (C13)

Fuente: Autor 2017

Elaboración: Autor 2017

Ácido kaurenico es un diterpeno tetracíclico intermediario el cual está involucrado en la biosíntesis de diterpenos tipo Kaurano, incluyendo giberelinas que son fitohormonas del crecimiento, por lo tanto actúa como regulador del crecimiento de plantas (García, De Oliveira, & Batista, 2007).

Estudios realizados en el ácido kaurenico menciona que posee importantes funciones entre ellas antiinflamatorias, antibacterianas, anti fúngicas, entre otras (García et al., 2007). Además de tiene un potente efecto hipoglicémico (Joseph-Nathan, 2011).

Se ha demostrado esta molécula presenta actividades contra *Staphylococcus aureus* y acción sobre células tumorales. También se indica que tiene una elevada actividad leishmanicida (Brito, Crescente, Fernández, Coronado, & Rodriguez, 2006).

### 3.2. Compuesto 2 (Fracción KM047/11)

El compuesto presenta cristales amorfos blanquecinos obteniendo un peso de 4,8 mg en donde se realizó una CCF eluyendo en Hexano-AcOEt relación 9:1 en donde se pudo observar color ligeramente morado al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina. (Fig. 18)



**Figura. 18.** CCF 9:1 Hexano-Acetato revelada

**Fuente:** Autor 2017

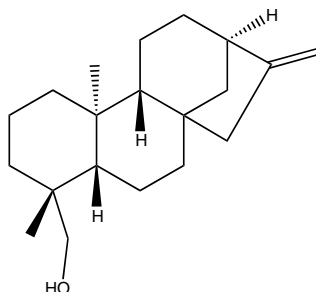
**Elaboración:** Autor 2017

### 3.2.1. Identificación y caracterización de KM047/11

Para la identificación y caracterización del compuesto se lo realizo a través de técnicas espectroscópicas RMN y CG-EM, corroborando con la literatura que se encuentra en la tabla 6. A través de los valores obtenidos se trata del compuesto denominado Kaurenol con su fórmula molecular  $C_{20}H_{30}O$  y con un peso molecular de 288 g/mol.

En el análisis de RMN  $^1H$  presenta señales de dos metilos 1.00 (3H, s, H-20) y 0.98 (3H, s, H-18), dos protones olefínicos en 4.73 (1H, s, H-17a), y 4.78 (1H, s, H-17b), un singulete ancho en 2.63 (H-13) y un doblete diasterotópico a 3.44 ppm (H-19, d)

En la figura 19 se muestra la estructura química del Kaurenol



**Figura. 19.** Estructura química del Kaurenol

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

En la tabla 6 se indica los datos de  $^1H$  y  $^{13}C$  corroborado con literatura.

**Tabla 6.** Datos espectroscópicos de RMN  $^1H$  del kaurenol en  $CDCl_3$

Datos Experimentales $^1H$	(Baptista, Monsalve, Alonso, Avila, & Usubillaga, 2007)	Datos Experimentales	(Baptista et al., 2007)
NMR (400Mz)		$^{13}C$ (100 MHz)	$^{13}C$ (100 MHz)



	<sup>1</sup> H NMR (400Mz)		
<b>1.00 (3H, s, H-20)</b>	1.00 (3H, s, H-20)	18.26 (C20)	18.10 (C20)
<b>0.98 (3H, s, H-18)</b>	0.98 (3H, s, H-18)	27.22 (C18)	27.10 (C18)
<b>4.73 (1H, s, H-17a)</b>	4.73 (1H, s, H-17a)	103.10 (C17)	103.00 (C17)
<b>4.78 (1H, s, H-17b)</b>	4.78 (1H, s, H-17b)	103.10 (C17)	103.00 (C17)
<b>2.63 (H-13, sa)</b>	2.63(H-13, s)	44.33 (C13)	44.20 (C13)
<b>3.44 (H-19, d)</b>	3.44 (H-19, d)	65.73 (C19)	65.60 (C19)

**Fuente:** Autor 2017

**Elaboración:** Autor 2017

La biotransformación de los terpenos tiene aplicaciones en las más diversas y distintas áreas como la farmacéutica, alimenticia, cosmética y fragancia (Takahashi, Gomes, Lyra, Dos Santos, & Martins, 2014). Dentro de sus principales actividades biológicas está la inhibición de las proteasas así como también la de  $\alpha$ -glucosidasa e interferencia con el ensamblaje de viriones (Villamizar, Caballero, & Gómez, 2010). En la familia de los diterpenos kaurenoides también presentan interesantes actividades que literatura nos menciona como agentes antibacterianos y alelopáticos (Villa-Ruano et al., 2013).

El uso de diterpenos kaurénicos en las conversiones microbiológicas se dirigen esencialmente en estudios de biosíntesis y a la producción de derivados con diversas actividades biológicas. Aquellos compuesto kaurénicos que establecen un enlace de hidrogeno con un grupo carbonilo C-15 se ha asociado con actividad antitumoral, además de actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas (Takahashi et al., 2014).

Según literatura, el Kaurenol es una molécula diterpénica y dentro de su importancia se caracteriza en ser antiparasitario, antitumoral, antiinflamatorio, anti-VIH e hipotensivo (García et al., 2007).

### 3.3. Actividad Antimicrobiana del extracto total de *Dendrophorbium balsapampae*

El extracto total en acetato de etilo, presentó una actividad antimicrobiana nula frente a las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos, a la dosis más alta probada de 5mg/mL.

**Tabla 7.** CMI antibacteriana del extracto total AcOEt

<b>Microorganismos</b>	<b>AcOEt (<math>\mu</math>g/mL)</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	NA

<i>Enterococcus faecalis</i>	NA
<i>Micrococcus luteus</i>	NA
<i>Escherichia coli</i>	NA
<i>Candida albicans</i>	NA

Fuente: Autor 2017

Elaboración: Autor 2017

\*NA: No Activo

Dentro de los resultados obtenidos en la actividad antimicrobiana se demostró que no es activo para ninguna de las bacterias empleadas, en literatura no existe información pertinente acerca de la especie vegetal estudiada en la presente investigación pero en *Senecio* sinónimo de *Dendrophorbium* presenta actividad con ciertas bacterias Gram positivas, pero tiene poca o nula actividad contra bacterias Gram negativas, así mismo tiene efectos anti fúngicos contra algunas levaduras (Yang et al., 2011).

### 3.4. Actividad hipoglucemiante de los compuestos aislados

A continuación se indica en la tabla 8 el efecto hipoglucemiante del extracto total y los compuestos aislados.

**Tabla 8.** Actividad in-vitro en  $\alpha$ -glucosidasa del extracto total y compuesto aislados

No.	Extracto/ Compuesto	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1	Extracto de AcOEt	NA
2	Ácido Kaurenico	115.43
3	Kaurenol	626.48

Fuente: Autor 2017

Elaboración: Autor 2017

En el ensayo de  $\alpha$ -glucosidasa para el extracto total no hubo efecto inhibitorio a la dosis máxima ensayada 2mg/mL. Estudios realizados por (Torres-Naranjo et al., 2016) nos menciona que acarbosea presentan un valor de 377  $\mu$ M, en la presente investigación el ácido kaurenico si presenta una alta actividad hipoglucemiante con un valor de 115.43 $\mu$ M , muy superior a la acarbosea.

Dentro del ensayo hipoglucemiante el kaurenol presenta un valor 626.48  $\mu$ M, a diferencia del inhibidor comercial acarbosea que tiene un valor de 377  $\mu$ M. (Torres-Naranjo et al., 2016) demostrando que posee actividad inhibitoria frente a  $\alpha$ -glucosidasa.

## CONCLUSIONES

- Se identificaron dos compuestos de origen diterpenico conocidos como Acido kaurenico y Kaurenol, a partir del extracto en acetato de etilo
- El extracto de acetato de etilo de *D. balsapampae*, no mostró actividad antimicrobiana e hipoglucemiante.
- El ácido kaurenico mostró una gran actividad inhibitoria frente a  $\alpha$ - glucosidasa con un valor de 33.30 ug/mL, y el kaurenol presentó una actividad baja de 180.83 ug/mL en comparación al inhibidor comercial acarbossa.

## RECOMENDACIONES

- Continuar con los estudios fitoquímicos de la especie *D. balsapampae* en diferentes disolventes.
- Continuar con los estudios de los compuestos probando diferentes tipos de actividades biológicas como anticancerígeno, antioxidante.

## BIBLIOGRAFIA

- AG, H. B. B. (1994). Pharmacology of  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*, 19(1), 24–29.
- Alonso, T. M. G., Ibarra, M. C. M., & Martínez, D. de S. M. (2008). Estudio Fitoquímico de plantas medicinales propias del Estado de Querétaro. *Universidad Autónoma de Zacatecas, Universidad Autónoma de Querétaro*, 1–4.
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Tobar, V., Witte, P. De, & Leuven, U. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1), 89–97.
- Arrázola, R. S., Atahuachi, M., Saravia, E., & Lopez, A. (2002). Etnofarmacológico De Las Plantas De Los Valles Secos De Cochabamba - Bolivia Medicinal Flora. *Revista Boliviana de Ecología*, 12(53), 53–85.
- Baptista, G., Monsalve, M., Alonso, M. E., Avila, J. L., & Usubillaga, A. (2007). Ensayos de actividad alimentaria sobre *Tribolium castaneum* y *Sitophilus oryzae* de algunos derivados del ent-kaureno. *Ciencia*, 15(2), 248–258.
- Barboza, G. E., Cantero, J. J., Núñez, C., Pacciaroni, A., & Espinar, L. A. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34(1–2), 7–365.
- Bastaki, S. (2005). Review Diabetes mellitus and its treatment. *Int J Diabetes & Metabolism*, 13, 111–134.
- Bermúdez, A., Oliveira-miranda, M. A., & Velázquez, D. (2005). La Investigación Etnobotánica Sobre Plantas Medicinales : Una Revisión De Sus Objetivos Y Enfoques Actuales. *Interciencia*, 30(8), 453–459.
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Asteraceae species with

most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 604–615.

Brito, S., Crescente, O., Fernández, A., Coronado, A., & Rodríguez, N. (2006). Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Biomédica et Al Artículo Original Biomédica*, 2626(1), 180–7180.

Brizuela, M., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol*, 69–74.

Cañigueral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. L. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22(3), 265–277.

Castillo Mompié, A., Pascual Sanchez, Y. M., CunhaNune, L. C., de la Paz Lorente, C., & Cañete Aguila, F. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. ( noni ) Evaluation of the antimicrobial activity of extracts from leaves. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 374–382.

Castrillon, L. E., Palma, A., & Padilla, C. (2005). Factores de virulencia en *Candida* sp, 12–27.

Cervantes-garcía, E., García-gonzález, R., & Salazar-schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*, 61(1), 28–40.

Chacón, C., & González, A. R. (2009). Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios. *Rev. Ciencias UNICACH*, 3(2), 59–65.

De la Torre, L., Navarrete, H., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Quito; Aarhus / Herbario QCA; Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Del Vitto, L. A., & Petenatti, E. M. (2009). Asteráceas de importancia económica y ambiental.

Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*, 18(2), 87–115.

Díaz-Piedrahita, S., & Cuatrecasas, J. (1999). *Asteraceas de la flora de Colombia: senecioneae-I, géneros dendrophorbium y pentacalia*. SANTA FE DE BOGOTA, D.C. COLOMBIA: GUADALUPE.

Díaz Pérez, M., Martínez Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Fundamental features on the *Enterococcus* genus as a very important pathogen at present time. *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*, 48(2), 147–161.

Dirzo, R. (1985). Metabolitos secundarios en las plantas, ¿Atributo panglossianos o de valor adquisitivo? *Ciencia*, 36, 137–145.

Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R. M., & Santa María, M. D. (2004). Resonancia Magnética Nuclear De Protón. *Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense*, (Madrid, España), 1–47.

García, A. A., & Carril, E. P. U. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.

García, P. A., De Oliveira, A. B., & Batista, R. (2007). Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. *Molecules*, 12(3), 455–483.

Garrido, R., Vélez, H., & Vérez, V. (2013). Resonancia Magnética Nuclear Cuantitativa, Nuevas aplicaciones en vacunas basadas en polisacáridos. *Vaccimonitor*, 22(1), 35–42.

González, E. M. (2013). *Estudio de la actividad neuroprotectora de diterpenos aislados del género sideritis*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La Cromatografía De Gases Y La Espectrometría De Masas: Identificación De Compuestos Causantes De Mal Olor. *Intexter*, 1(122), 35–41.

- Jørgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.
- Joseph-Nathan, P. (2011). REUNIÓN INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES. *Latinoamericana de Química*, 38(6).
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123–140.
- Katinas, L., Gutierrez, D. G., Grossi, M. a., & Crisci, J. (2007). Panorama de la familia Asteraceae ( = Compositae ) en la Introducción Breve historia taxonómica de la familia. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 42(1–2), 113–130.
- McMurry, J. (2012). *Química Organica*. (C. Learning, Ed.) (8th ed.).
- OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. *Organización Mundial de La Salud*, 72.
- Ordóñez, L., Aguirre, N., & Hofstede, R. (2001). *Sitios de recolección de semillas forestales andinas del Ecuador*. Quito, Ecuador. (ECOPAR, Ed.).
- Pereyra, R., & Fuentes, D. (2012). Medicina Tradicional versus Medicina Científica ¿En verdad somos tan diferentes en lo esencial? *Acta Medica Peruana*, 29(2), 62–63.
- Perez, I. (2008). El uso de las plantas medicinales. Intercultural.
- Piero, M. N., Nzaro, G. ., & Njagi, J. . (2015). Diabetes mellitus – a devastating metabolic disorder. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(40), 1–7.
- Reyes, E. R., & Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológica. *CENIC*, 46(1), 9–24.
- Rodriguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública México*, 45(5), 464–475.
- Rosas-Gallo, A., & Lopez-Malo, A. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de



tomillo (*Thymus Vulgaris*). Mexico.

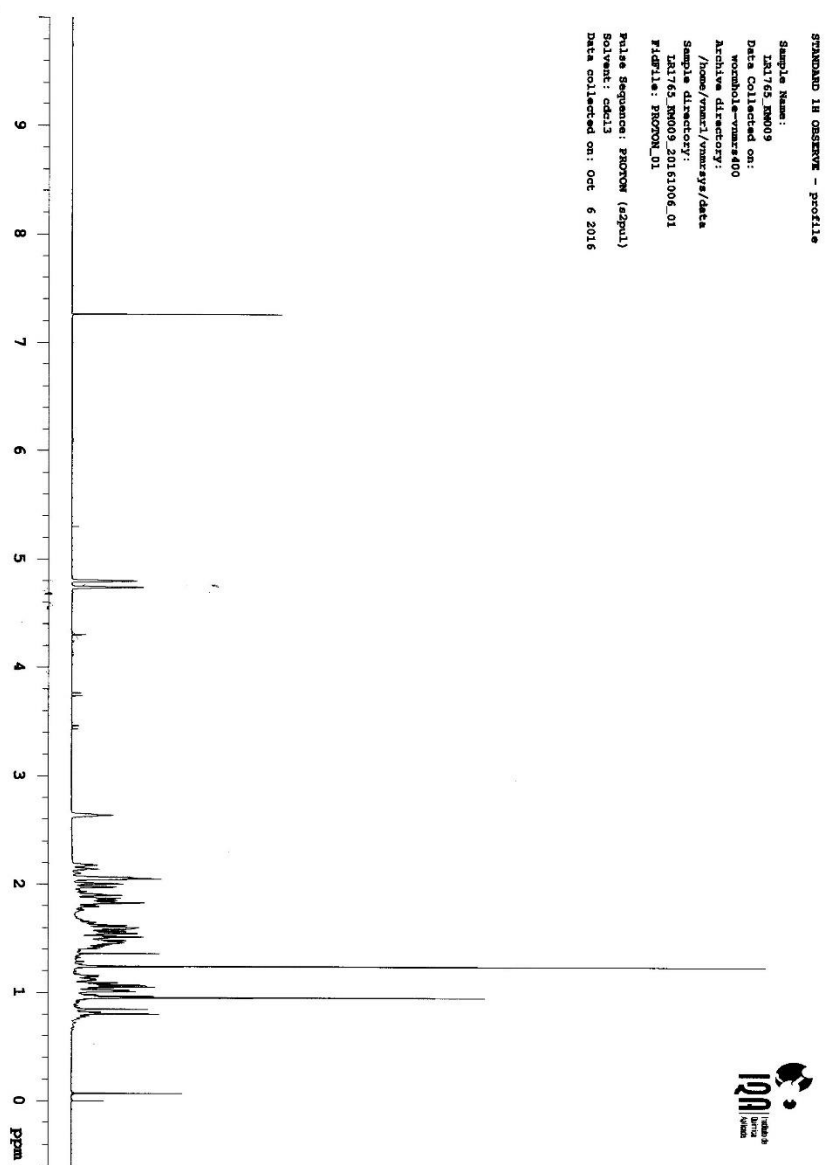
- Rubio, P. (2013). *Diseño y Elaboracion de un Lipo gel antiinflamatorio de Baccharis teindalensis Kunt. (Chilca)*. Universidad Central del Ecuador.
- Silva, N., & Fernandes Júnior, A. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16(3), 402–413.
- Souhami, L., Feld, R., C, F. C. P., & Tuffnell, P. G. (1979). *Micrococcus Luteus Pneumonia : A Case Report and Review of the Literature*, 314, 309–314.
- Sparkman, O. D., Zeld, P., & Fulton, G. K. (2011). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide* (Academic P). California, USA.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29–47.
- Suárez, A. I., Chavez, K., Blanco, Z., Compagnone, R. S., Tillett, S., & Torrico, F. (2013). Estudio Fitoquímico Del Extracto Etanólico De La Corteza De. *Revista Latinoamericana de Quimica*, 41(3), 161–170.
- Takahashi, J. A., Gomes, D. C., Lyra, F. H., Dos Santos, G. F., & Martins, L. R. (2014). The remarkable structural diversity achieved in ent-kaurane diterpenes by fungal biotransformations. *Molecules*, 19(2), 1856–1886.
- Tene, V., Malagon, O., Vita, P., Vidari, G., & Armijos, C. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador, 111, 63–81.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.

- Torres-Naranjo, M., Suárez, A., Gilardoni, G., Cartuche, L., Flores, P., & Morocho, V. (2016). Chemical Constituents of *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn (Polygonaceae) and Its In Vitro  $\alpha$ -Amilase and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities. *Molecules*, 21(1461).
- Vélez-Terranova, M., Gaona, R. C., & Sánchez-Guerrero, H. (2014). USO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS PARA REDUCIR LA METANOGENÉNESIS RUMINAL. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 489–499.
- Vicente-Herrero, M. T., Jesús, M., García, T., Iñiguez, M. V. R., Torre, D., García, L. M. C., & Katrina, Á. A. L. G. (2013). Especies , hierbas medicinales y plantas . Usos en medicina . Revisión de la bibliografía científica ( Medline ). *Medicina Balear*, 28(2), 35–42.
- Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Lozoya-Gloria, E., Rubio-Rosas, E., Ruiz-González, N., Martínez-Orea, Y., & Ramón-Canúl, L. G. (2013). Lipophilic Constituents and some biological activities of hexanic extracts from *Zaluzania montagnifolia*, (SCH. BIP.) SCH. BIP. (ASTERACEAE). *Agrociencia*, 47(4), 335–346.
- Villamizar, V. E. M., Caballero, J. M. Á., & Gómez, H. S. (2010). Terpenos con actividad biológica anti-VIH. *Duazary*, 72(2), 257.
- Yang, Y., Zhao, L., Wang, Y. F., Chang, M. L., Huo, C. H., Gu, Y. C., ... Kiyota, H. (2011). Chemical and pharmacological research on plants from the genus *Senecio*. *Chemistry and Biodiversity*, 8(1), 13–72.

|

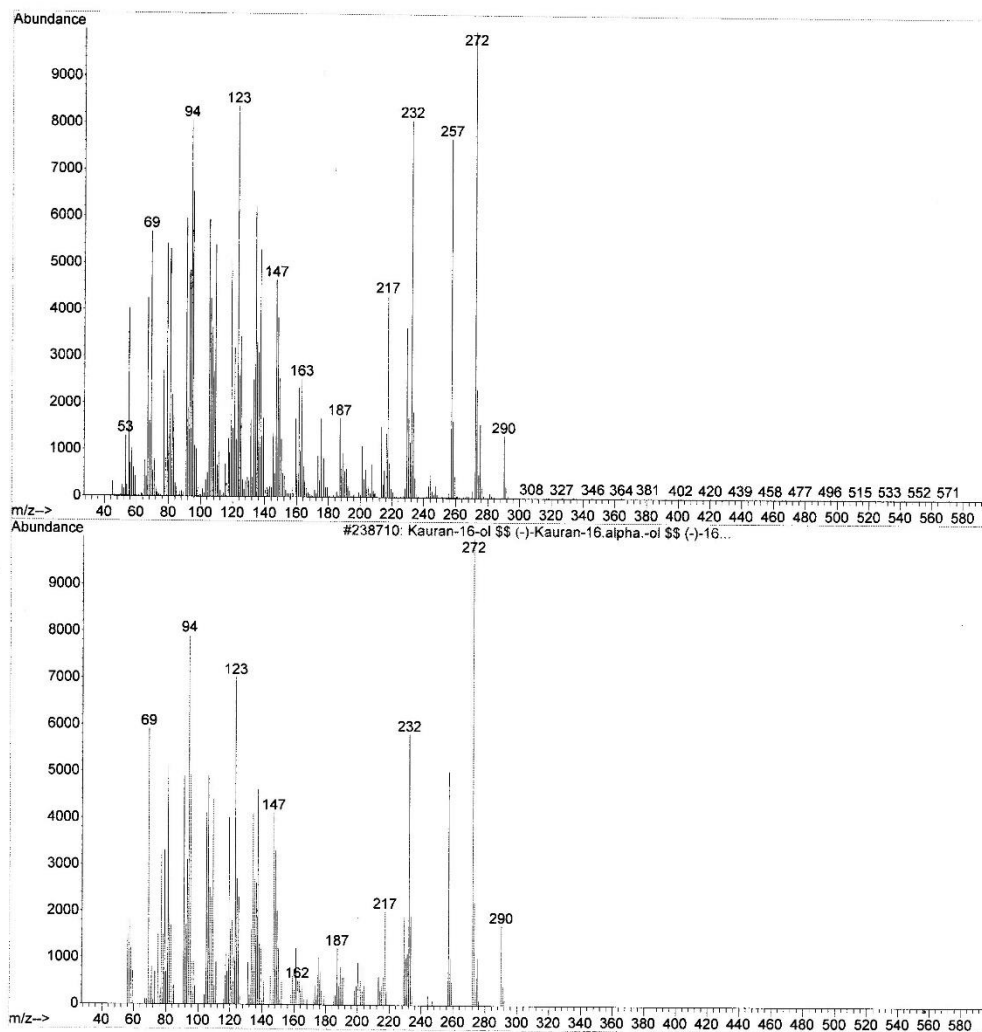
## **ANEXOS**

# Anexo 1. Espectro de 1H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Ácido Kaurénico

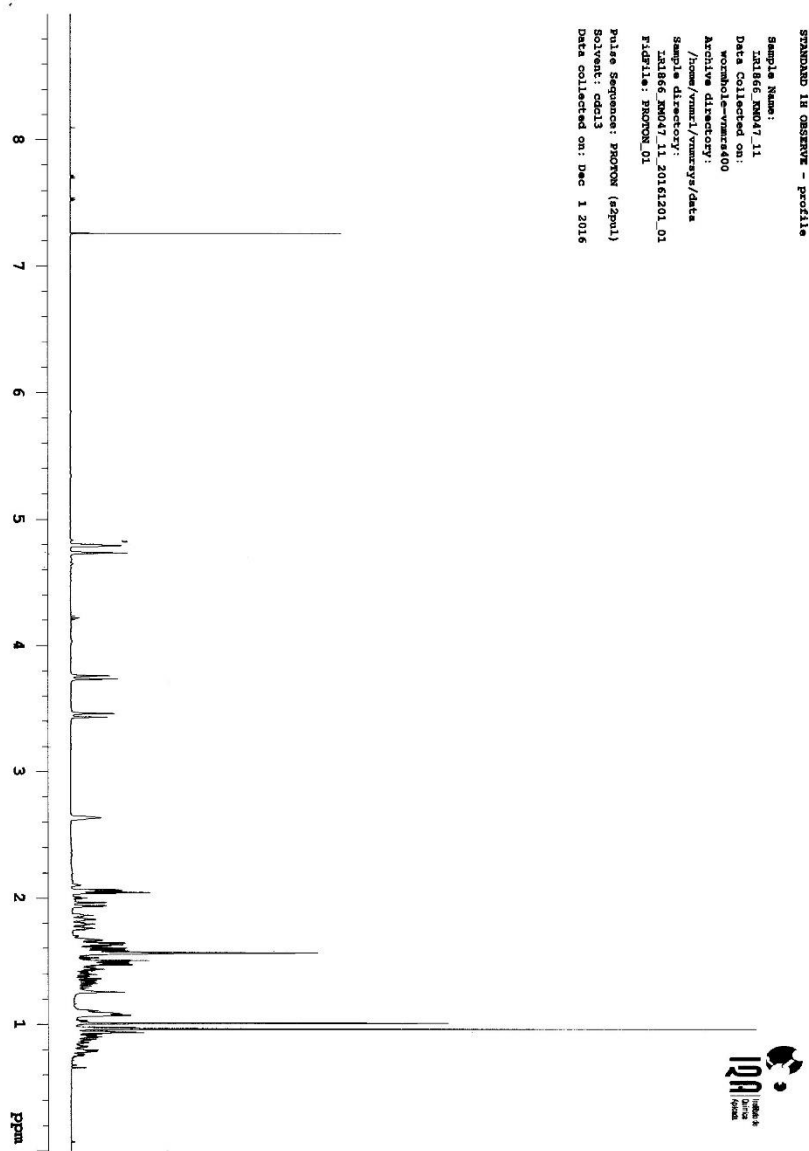


## Anexo 2. Espectro de CG-EM del Ácido Kaurénico

File :D:\MSDCHEM\DATA\2016\KAREN MONTANO\KM\_009\_4.D  
Operator : JC  
Acquired : 28 Oct 2016 21:34 using AcqMethod METODO\_GENERAL  
Instrument : GCMSD CET  
Sample Name: KM\_009\_4  
Misc Info :  
Vial Number: 5



Anexo 3. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del Kaurenol



# Anexo 4. Espectro de CG-EM del Kaurenol

File : D:\MSDCHEM\DATA\2016\KAREN MONTANO\KM61\_12.D  
Operator : JC  
Acquired : 2 Dec 2016 16:05 using AcqMethod METODO\_GENERAL  
Instrument : GCMSD CET  
Sample Name: KM61\_12  
Misc Info :  
Vial Number: 1

