



**UNIVERSIDAD DEL AZUAY**

**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA, ECOLOGÍA Y GESTIÓN**

**Caracterización fitoquímica y actividad biológica de especies del género *Azorella*, presentes en la sierra sur ecuatoriana.**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:**  
**BIÓLOGO CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y GESTIÓN**

**Autor:**

**DIEGO HERNÁN ABAD POLO**

**Director:**

**AIDA ANTONIETA CAZAR RAMÍREZ**

**CUENCA- ECUADOR**

**2015**

**DEDICATORIA:**

A mis padres por todo el cariño y confianza recibidos.

A las personas de la comunidad de Quilloac, quienes  
con su constante esfuerzo contribuyen al cuidado  
del medio ambiente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar a Dios por haberme permitido realizar este trabajo.

A mis padres por su cariño y apoyo incondicional.

A las personas de la comunidad de Quilloac, especialmente al M. Sc. Jacinto Aguaiza, quienes hicieron posible el desarrollo de esta investigación.

A la Ing. Aida Cazar y a la Dra. María Elena Cazar, docentes de la Universidad del Azuay y de la Universidad de Cuenca respectivamente, por haberme guiado con paciencia y esmero y por su apoyo frente a todas las adversidades que se suscitaron.

Al personal de la Red de Bioproductos por la coordinación para el desarrollo del trabajo experimental en la Universidad de Cuenca y en la Universidad Técnica Particular de Loja.

También les doy las gracias al personal de los laboratorios de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay: Ing. Ximena Orellana y Lcdo. Diego Vidal, a los docentes de la Universidad del Azuay: Dra Raffaella Ansaloni y Blgo. Danilo Minga, a la docente de la Universidad de Cuenca: M. Sc. María Elisa Durán, a los docentes de la Universidad Técnica Particular de Loja: Dr. Omar Malagón, Ing. Gabriela Vintimilla y M. Sc. Luis Cartuche y a los estudiantes de la Universidad Técnica Particular de Loja: Gabriel León, Héctor Cedeño, Lisseth Conde y Sandra Espinosa por su ayuda técnica.

Finalmente agradezco a mis amigos: BQ. Adriana Jara, Emanuel Martínez, Xavier Pinos y Dolores Sinchi.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pag</b>
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS .....	ix
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT .....	v
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
OBJETIVOS .....	6
<b>CAPÍTULO 1: FUNDAMENTO TEORICO</b> .....	<b>7</b>
1.1 Generalidades de la familia Apiaceae .....	7
1.2 Descripción botánica de la familia Apiaceae .....	8
1.3 Descripción botánica del género <i>Azorella</i> .....	9
1.4 El género <i>Azorella</i> en Ecuador.....	9
1.5 Fitoquímica de Apiaceae y del género <i>Azorella</i> .....	10

<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
2.1 Materiales .....	16
2.1.1 Solventes, reactivos químicos y medios de cultivo.....	16
2.2 Métodos.....	17
2.2.1 Recolección del material vegetal e identificación de las muestras .....	17
2.2.2 Preparación del extracto.....	19
2.2.3 Ensayos de actividad biológica in vitro .....	19
2.2.3.1 Bioensayo de actividad antibacteriana .....	19
2.2.3.2 Bioensayo de actividad antifúngica .....	21
2.2.4 Ensayo de actividad antioxidante.....	22
2.2.5 Caracterización fitoquímica del extracto orgánico .....	24
2.2.5.1 Cromatografía en capa fina .....	24
2.2.5.2 Revelado químico.....	25
2.2.5.3 Factor de retención.....	25
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	27
3.1 Actividad antibacteriana.....	27
3.2 Actividad antifúngica .....	30
3.3 Actividad antioxidante .....	31

3.4 Comparación de placas cromatográficas.....	33
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>44</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

Figura 1: Distribución geográfica de la familia Apiaceae .....	7
Figura 2: Acetilenos alifáticos aislados a partir de plantas alimenticias	
Apiaceae .....	10
Figura 3: Flavonas e isoflavonas de la familia Apiaceae.....	11
Figura 4: Principales furanosesquiterpenos aislados del aceite esencial de	
Alexander .....	12
Figura 5: Estructura de los diterpenos ulinano y azorellano.....	12
Figura 6: Diterpenoides de tipo mulinano aislados de <i>Azorella compacta</i> .....	13
Figura 7: Terpenoides de tipo azorellano aislados de <i>Azorella madreporica</i> .....	14
Figura 8: Mapa de sitios de recolección .....	18
Figura 9: Esquema para el desarrollo del bioensayo de actividad antibacteriana	
en placas de 96 pocillos .....	20
Figura 10: Esquema para el desarrollo del bioensayo de actividad antifúngica	
en placas de 96 pocillos .....	22
Figura 11: Cálculo del Rf.....	26
Figura 12: Actividad del extracto frente a <i>Proteus vulgaris</i> y <i>Staphilococcus</i>	
<i>aureus</i> .....	27
Figura 13: Actividad del extracto frente a <i>Enterococcus faecalis</i> y	
<i>Salmonella typhimurium</i> .....	27

Figura 14: Actividad del extracto frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	28
Figura 15: Actividad del extracto frente a <i>Escherichia coli</i> .....	28
Figura 16: Actividad del extracto frente a <i>Fusarium sp</i> y <i>Acremonium sp</i> .....	30
Figura 17: Curva de calibración de actividad antioxidante .....	32
Figura 18: Comparación de placa cromatográfica de referencia con placa revelada en cámara de yodo .....	33
Figura 19: Comparación de placa cromatográfica de referencia con placa revelada por vapores de amoníaco .....	34

Tabla 1: Especies de <i>Azorella presentes en Ecuador</i> .....	9
Tabla 2: Composición del medio Mueller-Hinton .....	16
Tabla 3: Composición del medio Czapek .....	17
Tabla 4: Sitios de recolección de muestras de plantas del género <i>Azorella</i> .....	18
Tabla 5: Desarrollo de curva de calibración para actividad antioxidante .....	31
Tabla 6: Valores de Rf para los compuestos mayoritarios presentes en las placas cromatográficas .....	35

Anexo 1: Cálculos realizados para obtener el valor en micromoles de trolox/mg de extracto .....	45
Anexo 2: Cálculos realizados para obtener los factores de retención de los métodos de revelado cromatográfico .....	46

**CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE  
ESPECIES DEL GÉNERO AZORELLA, PRESENTES EN LA SIERRA SUR  
ECUATORIANA**

**RESUMEN**

En esta investigación se evaluó la actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante del extracto metanólico de partes aéreas de *Azorella pedunculata*, recolectada en páramos de Azuay y Cañar. Se realizó una aproximación a los compuestos mayoritarios presentes en el extracto utilizando cromatografía en capa fina y métodos de revelado químico. El extracto presentó una actividad antioxidante moderada, equivalente a 488.25  $\mu$ moles de trolox por mg de extracto. La concentración mínima inhibitoria para los hongos *Acremonium sp* y *Fusarium sp* fue de 62.5  $\mu$ g/ml. El extracto metanólico de la especie en estudio no inhibió el crecimiento de siete bacterias patógenas a humanos, ensayadas por la técnica de microdilución en placas de 96 pocillos.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian el potencial de *Azorella pedunculata* como fuente de compuestos antioxidantes y antifúngicos: compuestos insaturados y fenólicos, evidenciados cualitativamente como mayoritarios en este extracto.

**Palabras clave:** *Azorella pedunculata*, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, compuestos insaturados, compuestos fenólicos.

  
-----

Ing. Aida Antonieta Cazar Ramírez

**Director de tesis**

  
-----

Blgo. Edwin Javier Zárate Hugo

**Director de Escuela**

  
-----

Diego Hernán Abad Polo

**Autor**

**PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY  
OF AZORELLA GENUS SPECIES, FOUND IN THE SOUTHERN  
ECUADORIAN HIGHLANDS**

**ABSTRACT**

In this research, we evaluated the antibacterial, antifungal and antioxidant activity of the aerial parts of the *methanolic extracts of Azorella pedunculata*, collected in Azuay and Cañar grasslands. An approximation to the major compounds present in the extract was carried out by using thin layer chromatography and chemical developing methods. The extract showed a moderate antioxidant activity, equivalent to 488.25 trolox pmol per mg of extract. The minimum inhibitory concentration for *Acremonium* sp and *Fusarium* sp fungi was 62.5 ug / ml. The methanol extract of the species under study did not inhibit the growth of seven pathogenic bacteria to humans, employing the *micro-dilution assay techniques* on 96 well-plates.

The results obtained in this study showed the *Azorella Pedunculata* potential as a source of antioxidants and antifungal compounds: unsaturated and phenolic compounds, evidenced qualitatively as majority in this extract.

**Keywords:** *Azorella Pedunculata*, antibacterial, antifungal, antioxidant, unsaturated compounds, phenolic compounds.



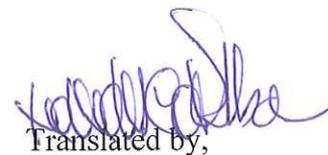
Ing. Aida Antonieta Cazar Ramírez  
**Thesis Director**



Blgo. Edwin Javier Zárate Hugo  
**School Director**



Diego Hernán Abad Polo  
**Author**



Translated by,  
Lic. Lourdes Crespo

Abad Polo Diego Hernán

Trabajo de Grado

Ing. Aida Antonieta Cazar Ramírez

Febrero 2015.

## **CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ESPECIES DEL GÉNERO AZORELLA, PRESENTES EN LA SIERRA SUR ECUATORIANA**

### **INTRODUCCIÓN**

Los seres humanos a lo largo de la historia se han beneficiado de las plantas a través de diversos usos, ya sea alimenticio, medicinal, control de plagas, entre otros.

Las plantas medicinales juegan un rol preponderante en la terapéutica de la humanidad. Alrededor del 80% de la población en países en vías de desarrollo depende de las plantas para su cuidado primario de salud. A pesar del importante progreso en síntesis orgánica en el siglo XX, alrededor del 25% de las medicinas prescritas en países industrializados deriva directa o indirectamente de plantas (Newman *et al.*, 2000).

Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico (Arina y Beg, 2000). La base de los medicamentos fitoterapéuticos son las drogas vegetales y los diferentes productos que a partir de éstas se obtienen. No hay que confundir los términos droga vegetal, planta medicinal y principio activo (Cañigüeral *et al.*, 2003). La OMS definió estos conceptos de la siguiente manera:

- Planta medicinal: Es 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 química farmacéutica.
- Droga vegetal: Es la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica.
- Principios activos: Son las sustancias responsables de la acción farmacológica (OMS, 1978).

La Fitoterapia utiliza drogas vegetales y preparaciones de dichas drogas en la forma farmacéutica más adecuada para su administración. Las investigaciones orientadas hacia la búsqueda de plantas con usos en fitoterapia se fundamenta en un proceso de selección de especies candidatas en la cual se relaciona la actividad biológica promisorias con el perfil de metabolitos secundarios. Esto permite confrontar la bioactividad con la producción de compuestos químicos en las especies promisorias. En literatura existen numerosos ejemplos de esta metodología, desarrollada para extractos de plantas y aceites esenciales. (Dorman y Deans, 2000; Karioti *et al.*, 2001; Okawa *et al.*, 2001).

Estudios de selección de especies con actividad antimicrobiana, antioxidante e inhibidora de la proliferación celular muestran un fundamento metodológico similar: el uso de bioensayos unido a métodos químicos sencillos para establecer especies candidatos para el desarrollo de fármacos por su bioactividad (Dorman y Deans, 2000; Karioti *et al.*, 2001; Okawa *et al.*, 2001).

Cuando la causa de una enfermedad es conocida, es posible desarrollar pruebas directas “in vitro” en los receptores o enzimas, de origen humano o animal, involucradas en la patología (Simoes-Pires *et al.*, 2009).

Una combinación de estrategias químicas con screening biológico es la forma más eficiente para llegar a identificar especies vegetales promisorias para el desarrollo de fármacos. Para el efecto es necesario poner a punto pruebas biológicas o farmacológicas con el fin de localizar la actividad elegida en el extracto vegetal. (Simoes-Pires *et al.*, 2009).

Es indispensable realizar investigaciones que permitan generar conocimiento y valor sobre las plantas, debido a la creciente desaparición de las selvas tropicales y otras importantes áreas de vegetación. (Hostettmann y Marston, 2002).

Se debe enfocar urgentemente la atención en un estimado de 250 000 plantas en la tierra, de las cuales un gran porcentaje no ha sido investigado desde el punto de vista fitoquímico (Hostettmann y Marston, 2002).

El Ecuador cuenta con una gran diversidad de flora, se han documentado 18 198 especies de plantas vasculares (Neil y Ulloa, 2011), de estas 5 172 especies son utilizadas con diferentes objetivos: el 60% medicinales, el 55% como fuente de materiales de construcción, el 30% comestibles y el 20% en usos sociales (ritos religiosos), todo estos porcentajes sobre pasan el 100% cifra, que indica que las especies vegetales tienen más de un solo uso. La ventaja de estos recursos depende del grupo étnico y la región geográfica de la cual proviene, por ejemplo el 42% de las tierras bajas del Oriente (Amazonía Ecuatoriana), 47% de los Andes y el 12% de las tierras bajas de la Costa y de las Islas Galápagos (De la Torre *et al.*, 2008).

Las etnias indígenas han logrado conservar su conocimiento ancestral, su tradición y cultura en relación con la naturaleza, una de ellas es la comunidad de Quilloac, que continua con su medicina tradicional basada en plantas medicinales. La Comunidad Quilloac se encuentra localizada en las cercanías del cantón Cañar, capital arqueológica del Ecuador. (Proaño, 2009).

En la región austral se encuentran vestigios arqueológicos de la época preinca (Cerro Narrío) y de la época incásica (Ingapirca). El historiador Julio María Iglesias en su obra “Los aborígenes de Cañar” (1964) establece que “los primitivos pobladores de Hatun Cañar formaron con otras tribus la federación de pueblos o tribus cañaris y siguieron con ellas una sola y misma trayectoria histórica”. El autor afirma que los cañaris hablaban su propia lengua, conocida como cañare. La población estimada de la comunidad de Quilloac es de dos mil habitantes (Proaño, 2009).

En Ecuador, la investigación en recursos naturales es un tema muy importante. Al reconocer la alta biodiversidad de los ecosistemas nativos, la investigación debe estar orientada al aprovechamiento racional de nuestra riqueza, basado en los conocimientos ancestrales de los usos de plantas medicinales.

Un grupo de especies botánicas que crecen en la región altoandina de Sudamérica y que representan a los géneros *Mulinum*, *Laretia* y *Azorella* pertenecientes a la familia de las Apiaceae (tribu Mulinae) han sido motivo de interés, por la diversidad de metabolitos secundarios producidos, la potencialidad de las actividades biológicas detectadas y por sus usos en la medicina folklórica. (Loyola *et al.*, 2004).

*Azorella compacta* ha sido usada en las tierras altas de Chile como antidiabético (Wickens, 1995) y para tratar el asma, bronquitis y resfríos (Munizaga *et al.*, 1958; Fuentes *et al.*, 2005), mientras que en Perú se usa como antiinflamatorio, utilizando la resina en forma de emplasto sobre las contusiones y golpes en la piel (Brack, 1999; Cabrera, 2007). *Azorella trifurcata* es utilizada en Argentina como expectorante y antireumático (Padín, 1999).

Los antecedentes fitoquímicos de la familia Apiaceae muestran que los compuestos más comunes son las cumarinas y sesquiterpenos, aunque también han sido descritos alcaloides (cicuta). En lo que se refiere a estudios de especies de la tribu Mulinae, se han hallado principalmente diterpenos y ocasionalmente flavonoides y compuestos aromáticos (Loyola *et al.*, 2005).

En la actualidad, se han estudiado los compuestos mayoritarios de las especies *Azorella cryptantha*, *Azorella compacta*, *Azorella madreporica*, *Azorella monantha*, *Azorella julianii* y *Azorella trifurcata*. Estas especies han sido recolectadas principalmente en Chile; también existen estudios de especímenes recolectados en Argentina (Colloca *et al.*, 2004).

Las especies de yareta *Azorella compacta* y *Mulinum crassifolium*, son ricas en diterpenoides, compuestos con variedad de actividades biológicas (Loyola *et al.*, 1997).

En nuestro país las especies del género *Azorella* se han caracterizado botánicamente y se preservan debido al importante rol que juegan en el ecosistema páramo. Estas plantas forman cojines compactos que actúan como reservorios de agua que alimenta lagos y ríos, asegurando reservas de agua para la población (Ulloa *et al.*, 2004).

No obstante, el potencial de estas especies como productoras de metabolitos secundarios no ha sido estudiado a profundidad. Por consiguiente, el desarrollo de la presente investigación constituirá una aproximación inicial a la caracterización fitoquímica de especies nativas del género *Azorella*. Los resultados obtenidos serán comparados con los reportes previos de las especies estudiadas en Chile y Argentina.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

Caracterizar los grupos de compuestos mayoritarios existentes en especies del género *Azorella*, presentes en la sierra sur ecuatoriana y su actividad biológica.

### **Objetivos específicos:**

- Determinar los compuestos fitoquímicos mayoritarios en *Azorella*.
- Establecer la actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica de los compuestos presentes en el extracto orgánico de especies del género *Azorella*.

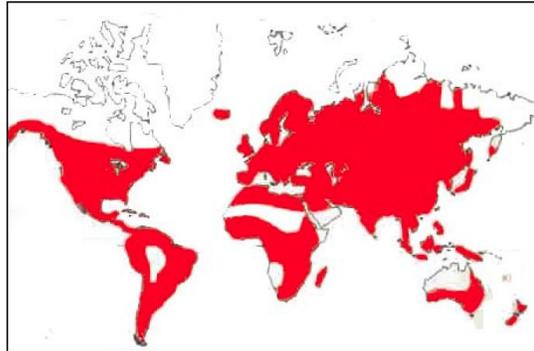
## CAPÍTULO 1

### FUNDAMENTO TEÓRICO

#### 1.1 Generalidades de la familia Apiaceae

La familia Apiaceae pertenece a las plantas fanerógamas del orden Apiales, abarca varias especies de hierbas y algunos arbustos, son comúnmente conocidas como umbelíferas. Esta familia presenta 418 géneros y alrededor de 3100 especies, siendo una familia cosmopolita común en regiones templadas y relativamente rara en latitudes tropicales (Figura 1). Tiene alrededor de 434 géneros, 3780 especies (Stevens, 2008). Se han descrito en Argentina 200 especies que están distribuidas en 47 géneros (Zuloaga, *et al.*, 2008).

**Figura 1.** Distribución geográfica de la familia Apiaceae.



**Fuente:** Stevens, 2008.

Esta familia se caracteriza por la producción de frutos aromáticos que constan de mericarpo y generalmente contienen aceites esenciales, por ejemplo las semillas de algunas especies se emplean como aromatizantes, como por ejemplo: el anís (*Pimpinella anisum L.*), el cilantro (*Coriandrum sativum L.*), el comino (*Cuminum cyminum L.*), el eneldo (*Anethum graveolens L.*) y el hinojo (*Foeniculum vulgare Miller*).

Otras especies se usan para el arte culinario como el perejil (*Petroselinum crispum*) y la zanahoria (*Daucus carota L.*), además de la elaboración de cosméticos y licores como el anís (*Pimpinella anisum L.*) (Hill, 1965.).

Muchas especies son venenosas, como ejemplo la cicuta (*Conium maculatum L.*), que fue empleada por Sócrates para su muerte (Heywood, 1985). Algunas especies pertenecientes a esta gran familia de plantas son empleadas en medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades, como es el uso de infusiones de eneldo y anís para la eliminación de gases y dolores intestinales.

## **1.2 Descripción botánica de la familia Apiaceae**

Esta familia está constituida por plantas herbáceas, algunas son tipo arbustivo. El tallo, articulado en nudos y entrenudos, porta hojas alternas y en su mayoría divididas. Una de las características más sobresaliente de la familia es la inflorescencia en forma de umbela, simple o compuesta (una umbela con varias umbelas en cada extremo). La inflorescencia también puede adquirir la forma de capítulo, por acortamiento del pedúnculo de la umbela (*Eryngium*). Las flores en su mayoría son de color blanco, actinomorfas y con nectarios, generalmente bastante pequeñas, aunque pueden ser zigomorfas (unisexuales o estériles), desarrollando desproporcionadamente 1 o 2 pétalos (*Tordylium apulum*). El verticilo del cáliz queda reducido a 5 dientecillos y en algunos casos puede ser completamente inconspicuo. La corola está formada por 5 pétalos, en algunos casos bilobulados (Furnari *et al.*, 2014).

### 1.3 Descripción botánica del género *Azorella*

Plantas perennes, bajas y extendidas, usualmente forman cojines de hierbas glabras o pubescentes. Hojas pecioladas, membranáceas, carnosas o coriáceas, simples y enteras con 5-7 lóbulos. Pecíolo revestido o pulvinado y persistente en las ramas. Inflorescencia de umbelas simples. Pedúnculos terminales, algunas o todas las umbelas sésiles. Involucro presente, pero generalmente escondido por las hojas terminales. Pedicelos extendidos ascendentes o erectos, frecuentemente elongados. (Mathias y Constance, 1976).

Dientes del cáliz prominentes a obsoletos, pétalos de color blanco verdoso a amarillo, ovalados, sin un ápice más estrecho plegado, estilos cortos, persistentes o no, el estilopodio cónico a deprimido. Carpóforo 0. Fruto ovoide a orbicular, liso y cilíndrico a dorsalmente comprimido, glabro, costillas prominentes oscuras, un endocarpio leñoso que rodea la cavidad de la semilla; semilla lisa y cilíndrica aplanada dorsalmente en la transacción, la cara plana (Mathias y Constance, 1976).

### 1.4 El género *Azorella* en Ecuador

En Ecuador, el género *Azorella* se encuentra mayoritariamente en páramos andinos, desde Carchi hasta Loja. A continuación se presenta una lista de las especies que han sido reportadas hasta el momento.

**Tabla 1.** Especies de *Azorella* presentes en Ecuador

1. <i>Azorella pedunculata</i> (Spreng.)
2. <i>Azorella multifida</i> (Ruiz & Pav.) Pers.
3. <i>Azorella aretioides</i> (Spreng.) DC.
4. <i>Azorella biloba</i> (Schltdl.) Wedd.
5. <i>Azorella crenata</i> (Ruiz & Pav.) Pers.
6. <i>Azorella corymbosa</i> (Ruiz & Pav.) Pers.
7. <i>Azorella pulvinata</i> Wedd.

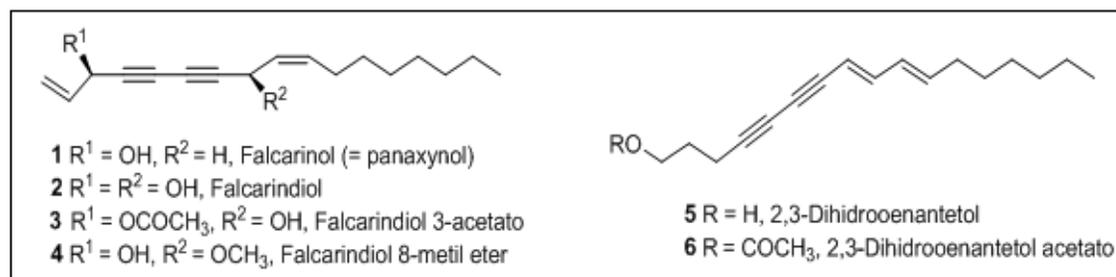
**Fuente:** Jorgensen y León-Yáñez, 1999.

En el Parque Nacional Cajas, *Azorella pedunculata* es una especie muy común en varios ambientes. Se trata de plantas dispuestas en almohadillas muy compactas y grandes de hasta 2 metros de diámetro. Las hojas están amontonadas al final de las ramas, miden hasta 1 cm de largo, son muy duras y brillantes, tienen el ápice profundamente partido en 3 a 5 lóbulos espinosos. La inflorescencia es pequeña, mide menos de 1 cm y tiene hasta 20 flores. Las flores son diminutas, miden 3 mm de largo, son de color verde amarillento (Ulloa *et al.*, 2004).

### 1.5 Fitoquímica de Apiaceae y del género *Azorella*

Las plantas alimenticias de la familia Apiaceae como la zanahoria, el apio y el perejil, contienen un grupo de compuestos bioactivos alifáticos conocidos como poliacetilenos C-17 (Figura 2).

**Figura 2.** Acetilenos alifáticos aislados a partir de plantas alimenticias Apiaceae.



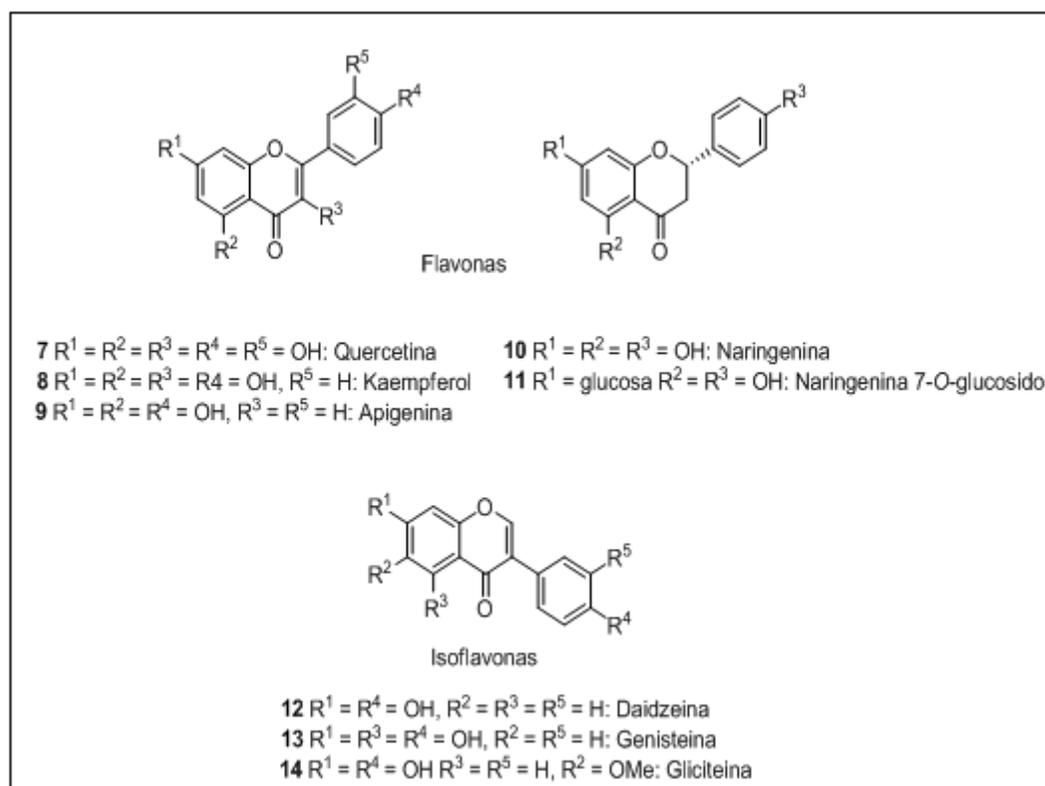
**Fuente:** Christensen y Brandt, 2006

Estos compuestos han demostrado ser altamente tóxico para los hongos, bacterias y células de mamíferos, además de efectos neurotóxicos, anti-inflamatorios, antiplaquetarios, entre otros (Christensen y Brandt, 2006).

En adición a estos compuestos bioactivos, se han identificado flavonas a lo largo de diferentes especies pertenecientes a esta familia (Figura 3), las cuales han servido para

dividir la familia Apiaceae en dos grandes grupos: el primer grupo está compuesto por nueve tribus en el que las flavonas son raras o están ausentes y el segundo grupo de cuatro tribus (Apieae, Dauceae, Laserpitieae y Scandiceae) en el que las flavonas son comunes o predominantes (Saleh *et al.*, 1983; Zech, 1999). Junto con las flavonas un número limitado de isoflavonas han sido reportados en dos representantes de un género (*Bupleurum*) (Figura 3), pertenecientes a la Apiaceae (Liang *et al.*, 2000; Li y Yu, 1998).

**Figura 3.** Flavonas e isoflavonas presentes en diferentes especies de la familia Apiaceae.

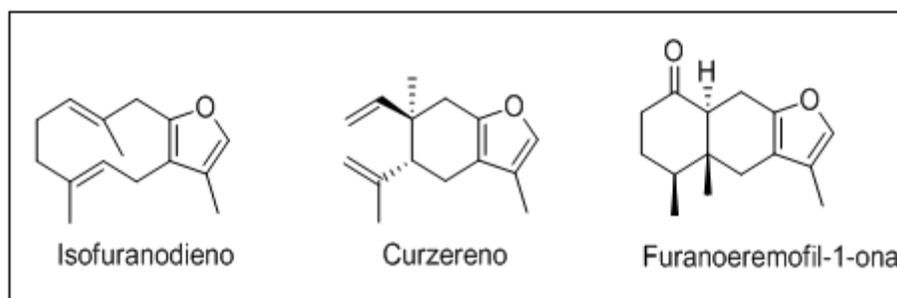


**Fuente:** Saleh *et al.*, 1983.

De la maleza tóxica *Conium maculatum* L. (Apiaceae) fue aislado un nuevo alcaloide relacionado con la coniina nombrado con el nombre común conmaculatin (2-pentilpiperidina), el cual presenta una fuerte actividad anticonceptiva periférica y central (Radulovic *et al.*, 2012). Del aceite esencial de diferentes partes de la especie

*Smyrniolum olusatrum*, más conocido como Alexander o apio silvestre se identificaron distintos furanosesquiterpenos (Figura 4). Estos aceites esenciales presentaron efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales (Quassinti *et al.*, 2013).

**Figura 4.** Principales furanosesquiterpenos aislados del aceite esencial de Alexander.

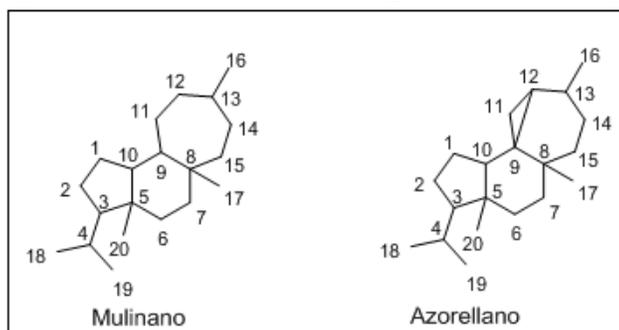


**Fuente:** Quassinti *et al.*, 2013.

El género *Azorella* es bien conocido por tener un amplio rango de metabolitos secundarios como diterpenoides, triterpenoides y flavonoides presentes en varias especies de este género (Neira *et al.*, 1998; Watcher *et al.*, 1999; Loyola *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2005; Areche *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos de diferentes estudios del género *Azorella*, principalmente especies chilenas, han demostrado que son una fuente exclusiva de diterpenos del tipo mulinano y azorellano (Figura 5).

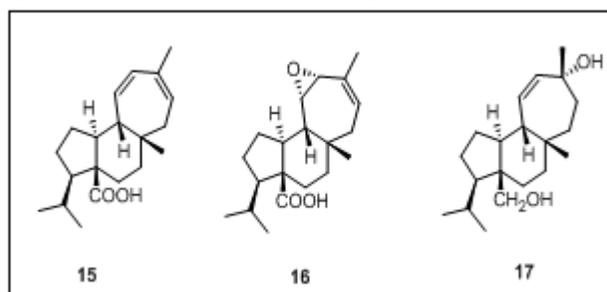
**Figura 5.** Estructura de los diterpenos mulinano y azorellano.



**Fuente:** Watcher, 1999.

Del extracto de éter de petróleo de *Azorella compacta*, conocida como “yareta” fueron aislados tres diterpenoides del tipo mulinano, el ácido 11,13-dien-mulin-20-oico (15) (Loyola *et al.*, 1997), el ácido 11,12-epoximulin-13-en-20-oico (16) (Loyola *et al.*, 1998) y mulinol (17) (Loyola *et al.*, 1997). Estos diterpenoides se muestran en la figura 6:

**Figura 6.** Diterpenoides del tipo mulinano aislados de *Azorella compacta*.

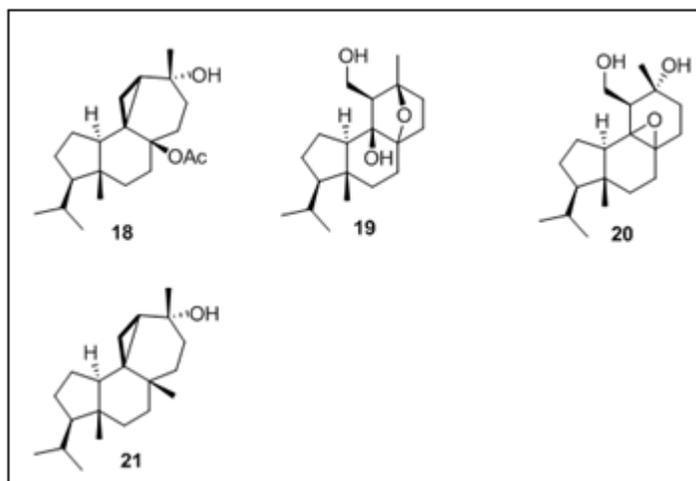


**Fuente:** Loyola *et al.*, 1997; Loyola *et al.*, 1998.

Del extracto de éter de petróleo de *Azorella madreporica* recolectada al interior de Vallenar, Chile, se logró el aislamiento de un nuevo diterpenoide del tipo azollerano: 17-acetoxi-13 $\alpha$ -hidroxiazorellano (18) y los nuevos norditerpenos 9,11-dihidroxi-8,9-epoxiyaretano (19) y 11,13-dihidroxi-8,9-epoxiyaretano (20), que corresponden a un esqueleto carbonado tricíclico relacionado con el azorellano, que se originaría por apertura del anillo ciclo propano y pérdida del C-17 (Wachter *et al.*, 1998), además del aislamiento de estos diterpenoides del tipo azollerano, de la especie *Azorella yareta Hauman*, recolectada en la precordillera de Vallenar se aisló un nuevo diterpenoide nombrado como 13 $\beta$ -hidroxiazorellano (21) (Loyola *et al.*, 2001).

Los terpenoides anteriormente mencionados se indican en la figura 7:

**Figura 7.** Terpenoides del tipo azorellano aislados de *Azorella madreporica*.



**Fuente:** Watcher *et al.*, 1998; Loyola *et al.*, 2001.

Estos diterpenoides han mostrado una amplia variedad de actividades biológicas, incluyendo trypanosomicida (Neira *et al.*, 1998), trichomonocida (Loyola *et al.*, 2001), antibacterial (Watcher *et al.*, 1999; Areche *et al.*, 2010), disminución de la motilidad y viabilidad espermática (Morales *et al.*, 2003), antituberculosis (Molina-Salinas *et al.*, 2010), antiinflamatoria (Delporte *et al.*, 2003) y antihiper glucémica (Fuentes *et al.*, 2005). Muchos triterpenoides tienen un rango único de efectos biológicos potencialmente viables como antiinflamatorio, antiulceroso, antimicótico, hepatoprotector e inmunomodulador (Dzubak *et al.*, 2006).

Se ha reportado el aislamiento de isoflavonas en especies del género *Azorella* que han demostrado actuar como fitoestrógenos disminuyendo la frecuencia de los síntomas de la menopausia (Levis *et al.*, 2011). Se han aislado isoflavonas de la especie *Azorella madreporica* que mostraron actividad antibacterial y gastroprotectora (Quesada *et al.*, 2012).

Los metabolitos implicados en actividades biológicas involucran compuestos constitutivos de las plantas en sí, los cuales hacen parte de la composición química de cada especie (Morrissey y Osbourn, 1999). Sin embargo, estas moléculas pueden variar

en concentración o pueden ser precursores de otros compuestos sintetizados de novo, como respuesta a diferentes formas de estrés (Pedras y Ahiahonu, 2005).

Estas variaciones se presentan frecuentemente en el caso de poblaciones de la misma especie creciendo en regiones biogeográficas diferentes, en las que varía con el hábitat y las presiones externas a las que está sometida una planta. Por lo tanto, los metabolitos son el resultado de la interacción del genoma de la planta con su ambiente, lo cual hace parte de su sistema regulatorio de una forma integrada (Rochfort, 2005).

Es reconocido que la interacción genotipo-ambiente afecta la composición cuantitativa y cualitativa de compuestos con propiedades antioxidantes como carotenoides y tocoferoles, lo cual se refleja en su actividad biológica (Rochfort, 2005).

## CAPÍTULO 2:

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Materiales

##### 2.1.1 Solventes, reactivos químicos y medios de cultivo

Para la obtención de extractos se empleó metanol de grado técnico. Para el desarrollo del bioensayo ante bacterias se utilizó medio de cultivo Mueller-Hinton (MH) y ante los hongos medio de cultivo líquido Czapek, formulado a partir de reactivos de grado analítico. Los reactivos utilizados para la determinación de actividad antioxidante, Trolox® (6-hidroxi-2,5,7,8, tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) y DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl tetrazoliumsalt) fueron adquiridos de la casa comercial SIGMA.

La composición del medio Mueller-Hinton es la siguiente:

Reactivo	Gramos por litro de agua destilada	pH
Peptona ácida de caseína	17.5	7.3 ± 0.2
Agar	15	
Almidón	1.5	
Calcio	0.2-0.25	
Magnesio	0.1-0.125	

**Tabla 2. Composición del medio Mueller-Hinton.**

La composición del medio Czapek se presenta a continuación:

<b>Reactivo</b>	<b>Gramos por litro de agua destilada</b>	<b>pH</b>
Cloruro de potasio	0.5	7.3 ± 0.2
Fosfato dipotásico	1.0	
Nitrato de sodio	2.0	
Sacarosa	30.0	
Sulfato ferroso	0.01	
Sulfato de magnesio	0.5	

**Tabla 3. Composición del medio Czapek.**

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1 Recolección del material vegetal e identificación de las muestras**

Las muestras se recolectaron en tres sitios. En cada sitio se estableció un punto de recolección. Cada uno de ellos fue registrado en el sistema de coordenadas UTM, datum WGS84.

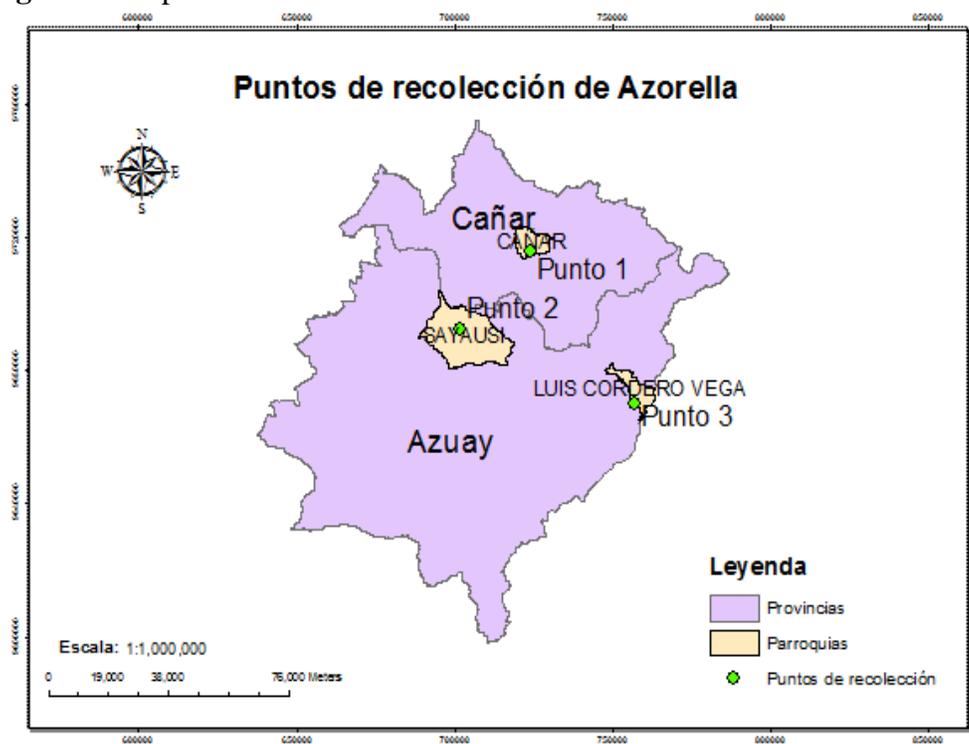
Las partes aéreas de las muestras recolectadas fueron entregadas al Herbario Azuay e identificadas taxonómicamente por el Blgo. Danilo Minga Ochoa. Todas correspondieron a la especie *Azorella pedunculata*.

A continuación, se indican los sitios de recolección, con sus respectivos puntos de muestreo y especie recolectada:

**Tabla 4.** Sitios de recolección de muestras de plantas del género *Azorella*.

Sitio de muestreo	Punto de recolección	Especie
Parroquia Cañar, Comunidad Quilloac, cantón Cañar, provincia de Cañar.	Punto 1: 17M 724056 9715690 Altitud: 3778 m.s.n.m	<i>Azorella pedunculata</i>
Parroquia Sayausí, vía al Parque Nacional Cajas, cantón Cuenca, provincia de Azuay.	Punto 2: 17M 701951 9692514 Altitud: 3606 m.s.n.m	<i>Azorella pedunculata</i>
Parroquia Luis Cordero, cantón Gualaceo, provincia de Azuay.	Punto 3: 17M 756836 9670361 Altitud: 3190 m.s.n.m	<i>Azorella pedunculata</i>

**Fuente:** Autor.

**Figura 8.** Mapa de sitios de recolección.

**Fuente:** Autor.

### **2.2.2 Preparación del extracto**

Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 días. Posteriormente se pesaron 50 gramos de tallos y hojas en una balanza analítica. El material fue triturado y colocado dentro de un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. A continuación se añadieron aproximadamente 500 ml de metanol. El extracto se dejó macerar durante 4 días. Después de la maceración, el material vegetal se separó del filtrado mediante papel filtro. Posteriormente, el extracto fue obtenido mediante concentración con un evaporador rotatorio. Se programó el baño maría del evaporador rotatorio a 40 °C y la velocidad de rotación a 150 rpm. La presión fue de 741 mbar. Se concentró el extracto durante un periodo de 2 horas. Después se recuperó el extracto utilizando metanol.

Previo al desarrollo de bioensayos se eliminaron trazas de solvente con corriente de CO<sub>2</sub> durante 2 horas.

### **2.2.3 Ensayos de actividad biológica in vitro**

#### **2.2.3.1 Bioensayo de actividad antibacteriana**

Se realizó un ensayo de actividad antibacteriana “in vitro” con 2 bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* y 5 bacterias Gram negativas: *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las bacterias objetivo, previamente crecidas en medio líquido Mueller-Hinton (MH), fueron diluidas con medio fresco estéril en proporción 1:1.

Para evaluar la actividad antibacteriana se utilizó el proceso de microdilución en placas de 96 pocillos. Para desarrollar el bioensayo se preparó una solución madre de extracto de concentración 500 µg/ml.

Posteriormente, se preparó una solución de trabajo diluyendo el extracto en medio MH hasta una concentración final de 100 µg/ml. Se realizó una dilución seriada del extracto desde la fila A hasta la fila H, en un rango de concentraciones de 100 a 0,78 µg/ml. Las microdiluciones se realizaron por triplicado en las columnas 1,2 y 3 para la bacteria objetivo 1 y 6,7 y 8, para la bacteria objetivo 2. La columna 11 se designó para el control positivo, (100 µl de medio más 100 µl del inóculo). En la columna 12 se realizó control de esterilidad del ensayo añadiendo 200 µl de medio MH. Se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) para mejorar la solubilidad de los extractos y gentamicina como antibiótico de referencia. El efecto antibacteriano del antibiótico de referencia se verificó en las columnas 5 y 10 y del DMSO en las columnas 4, y 9. El volumen final de los pocillos después de la inoculación con las bacterias objetivo fue de 200 µL.

En cada placa de 96 pocillos fue posible probar el efecto del extracto ante dos bacterias objetivo. La organización de las placas con controles positivo, de solvente, de esterilidad y negativo se presenta en la figura 9:

**Figura 9.** Esquema para el desarrollo del bioensayo de actividad antibacteriana en placas de 96 pocillos. Filas A-H: microdilución. Columnas 1,2,3,6,7,8, repeticiones. Columnas 5 y 10: antibiótico de referencia. Columna 4 y 9: DMSO. Columna 11: control de crecimiento. Columna 12: Control de esterilidad.

	Bacteria 1					Bacteria 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

**Fuente:** Autor.

Posteriormente, las placas preparadas según lo descrito se colocaron en una incubadora a 37°C y después de 24 horas se procedió a observar los resultados. Se determinó visualmente el aumento de turbidez del medio de cultivo en comparación con el control de esterilidad.

### **2.2.3.2 Bioensayo de actividad antifúngica**

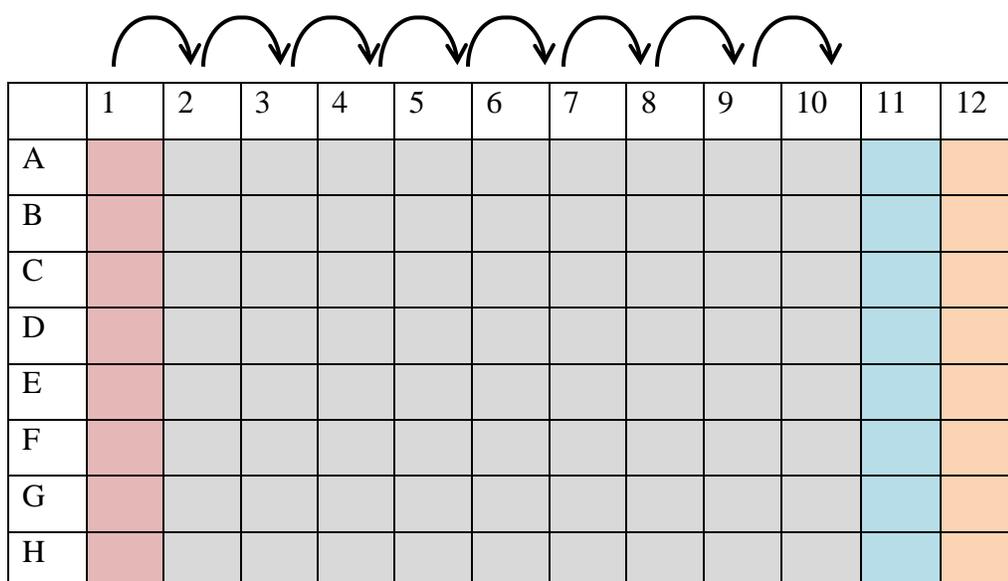
El ensayo de actividad antifúngica se realizó con el fin de probar la eficiencia del extracto de *A. pedunculata* ante hongos filamentosos contaminantes de cultivos “in vitro” de orquídeas, provistos por el Orquideario de la Universidad de Cuenca. Los hongos pertenecen a los géneros *Fusarium* y *Acremonium*.

La evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento de los hongos de prueba fue desarrollada de acuerdo a la metodología descrita por Cazar (2006). La solución madre de extracto fue preparada según lo descrito en la sección 2.2.3.1. Posteriormente, se realizó una dilución con medio Czapek hasta obtener una concentración de 100 µl/ml de extracto y se homogenizó mediante agitación. La dilución del extracto fue colocada en la primera columna de una placa de dilución de 96 pocillos. Se desarrolló una microdilución en placa, desde la columna 1 hasta la columna 10, mientras que la columna 11 se utilizó para control de esterilidad del medio y la columna 12 para control de crecimiento de los microorganismos de prueba. Posteriormente, se inocularon todos los pocillos, a excepción de los controles de esterilidad, con una solución acuosa de concentración  $1 \times 10^6$  esporas/ml de *Fusarium sp* en las filas A,B,C,D y  $1 \times 10^6$  esporas/ml de *Acremonium sp* en las filas E,F,G,H. Las placas preparadas según el esquema descrito fueron incubadas por un periodo de 96 horas.

Posteriormente, la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue determinada como la concentración que inhibe visualmente el crecimiento micelial de los hongos objetivo.

Los ensayos fueron realizados por triplicado.

**Figura 10.** Esquema para el desarrollo del bioensayo de actividad antifúngica en placas de 96 pocillos. Columnas 1 a 10: microdilución. Columna 11: control de esterilidad. Columna 12: control de crecimiento. Filas A a D: Inoculación de *Fusarium sp.* Filas E a H: Inoculación de *Acremonium sp.*



**Fuente:** Autor.

#### 2.2.4 Ensayo de actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante del extracto en estudio se utilizó el método de atrapamiento del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl), Se utilizó como sustancia de referencia Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8, tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), una sustancia soluble en agua y análoga a la vitamina E.

Se preparó una curva de calibración a partir de una solución patrón de Trolox (250 µg/ml). La solución de trabajo del radical libre estable DPPH se ajustó a una concentración de 250 µg/ml.

Para el desarrollo de la reacción se diluyó la solución de DPPH con metanol hasta una concentración final de 50 µg/ml. El atrapamiento del radical libre se monitoreó mediante espectroscopía ultravioleta visible. Previo al análisis se realizó un barrido para verificar el máximo de longitud de onda, y se fijó en 515 nm. La absorbancia de los patrones y muestras fue leída usando como solvente de referencia metanol.

La solución diluida de DPPH fue utilizada para fijar el rango máximo de absorbancia para las lecturas espectrofotométricas. Este proceso se realizó por quintuplicado hasta conseguir un valor de absorbancia de  $1.1 \pm 0.2$ . Se preparó una serie de seis diluciones de Trolox, en un rango de 0 a 800 µM para el desarrollo de la curva de calibración.

La reacción de atrapamiento del radical libre estable DPPH se desarrolló en viales de 3 ml, mezclando 2850 µL de la solución de trabajo de DPPH más 150 µL de las diluciones de Trolox. Se realizaron tres repeticiones por cada dilución.

Para evaluar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *Azorella pedunculata* se preparó una solución patrón de concentración 1000 µg/ml. Posteriormente, el extracto fue diluido para evaluar una solución de trabajo de 100 µg/ml. El desarrollo de la reacción de atrapamiento de DPPH se realizó de igual forma que lo descrito para las soluciones de Trolox. La reacción de patrones y extracto se desarrollaron en condiciones de oscuridad durante un periodo de 24 horas. Posteriormente se procedió a establecer la curva de calibración, realizando mediciones de absorbancia por triplicado. La ecuación generada a partir de la curva de calibración se utilizó para estimar la capacidad antioxidante del extracto, la cual fue expresada en µg de Trolox por mg de extracto. La metodología descrita fue adaptada del trabajo de Pegg *et al.*, 2007.

## 2.2.5 Caracterización fitoquímica del extracto orgánico

### 2.2.5.1 Cromatografía en capa fina

El ensayo cualitativo de identificación de compuestos mayoritarios en el extracto metanólico de *A. pedunculata* se realizó mediante estrategias de revelado químicas de cromatografía en capa fina.

Las cromatografías del extracto en estudio fueron desarrolladas utilizando placas cromatográficas de sílica gel de 8x3 cm y como fase móvil una mezcla Hexano: Acetato de Etilo en proporción 7:3. Se escogió esta fase móvil luego del estudio de diferentes mezclas de los solventes anteriormente mencionados. La mezcla 7:3 generó la mejor resolución de los mayoritarios del extracto.

Con una micropipeta, se colocó una gota del extracto a 0.5 cm del borde inferior de cada placa.

Las cromatografías fueron desarrolladas en vasos de precipitación de 500 ml en los que previamente se pusieron 10 ml de fase móvil. Los recipientes fueron cubiertos con papel aluminio para permitir que se saturaran con los vapores de la fase móvil. Después se introdujeron las placas cromatográficas previamente sembradas con el extracto en estudio. El solvente ascendió hasta 1 cm antes del borde superior de cada placa. Posteriormente se retiraron las placas de los vasos, se dejaron secar y se procedió a la observación de las manchas correspondientes a los compuestos mayoritarios.

Se prepararon tres placas cromatográficas; se conservó una placa desarrollada sin revelar como referencia, una fue sometida a yodo y otra a vapores de amoníaco. Las placas que fueron reveladas se compararon con la placa de referencia, para determinar la existencia de manchas no observadas en la placa sin revelar.

### **2.2.5.2 Revelado químico**

Se emplearon dos estrategias químicas: cámara de yodo y vapores de amoníaco.

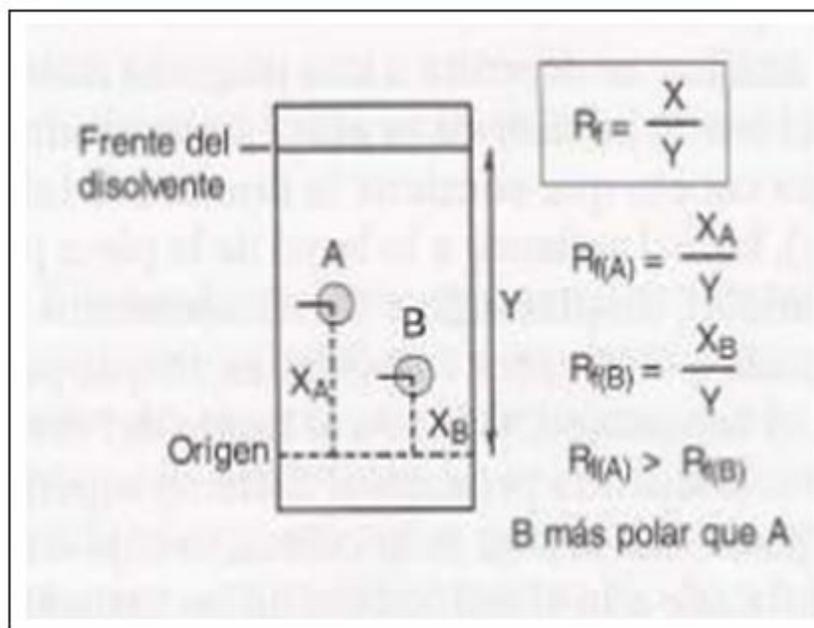
Se preparó una cámara de yodo con el fin de evidenciar la presencia de compuestos insaturados por la reacción de dobles enlaces ante este elemento. La cámara fue preparada embebiendo yodo en un soporte de algodón, previamente sellado en un frasco hermético. La placa cromatográfica se sometió a la acción de este elemento por 20 minutos.

Otra placa cromatográfica se sometió a la acción de vapores de amoníaco bajo campana de extracción, para detectar la presencia de compuestos fenólicos.

### **2.2.5.3 Factor de retención**

Se calculó el factor de retención ( $R_f$ ) para cada compuesto de cada placa. El  $R_f$  es la relación entre la distancia recorrida por el compuesto ( $X$ ), la cual se mide desde el centro de la mancha y la distancia recorrida por el eluyente ( $Y$ ), denominada frente del solvente; ambas tomadas desde el origen de la placa. Las distancias se midieron en centímetros. El  $R_f$  es inversamente proporcional a la polaridad del compuesto.

El procedimiento para calcular el  $R_f$  se muestra en la figura 11.

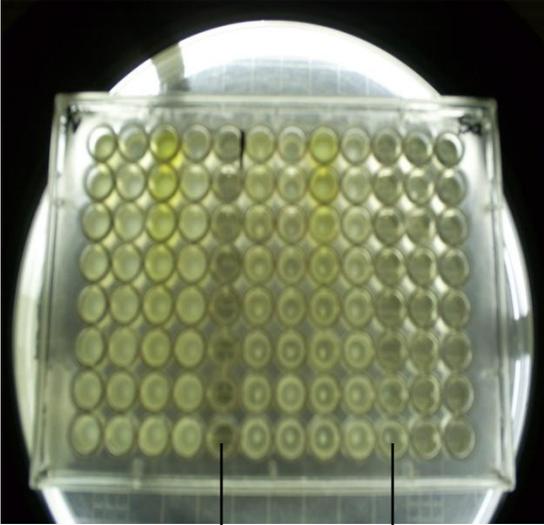
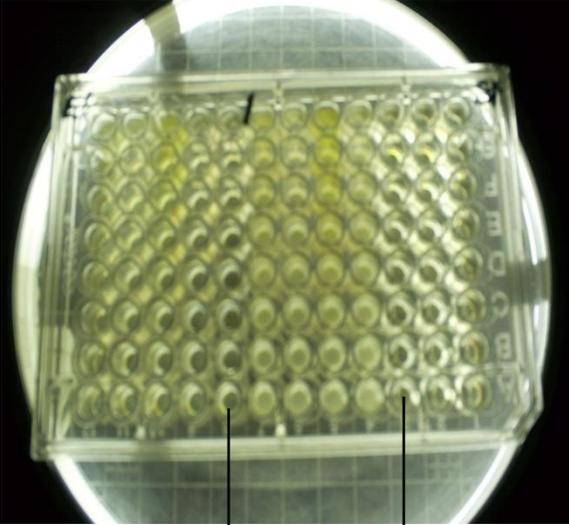
**Figura 11.** Cálculo del R<sub>f</sub>.

**Fuente:** Watcher, 1999.

### CAPÍTULO 3

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Actividad antibacteriana

<p><b>Figura 12.</b> Actividad del extracto frente a <i>Proteus vulgaris</i> (Columnas 1,2,3) y <i>Staphylococcus aureus</i> (Columnas 6,7,8). Columnas 4 y 9: DMSO. Columnas 5 y 10: Gentamicina. Columna 11: Control de crecimiento. Columna 12: Control de esterilidad.</p>  <p style="text-align: center;">Inhibición por gentamicina</p> <p><b>Fuente:</b> Autor</p>	<p><b>Figura 13.</b> Actividad del extracto frente a <i>Enterococcus faecalis</i> (Columnas 1,2,3) y <i>Salmonella typhimurium</i> (Columnas 6,7,8). Columnas 4 y 9: DMSO. Columnas 5 y 10: Gentamicina. Columna 11: Control de crecimiento. Columna 12: Control de esterilidad.</p>  <p style="text-align: center;">Inhibición por gentamicina.</p> <p><b>Fuente:</b> Autor</p>
<p>Se observa turbidez en las columnas 1,2,3,4,6,7,8,9, por lo que en éstas no hubo inhibición del crecimiento bacteriano. Las columnas 5 y 10 se ven transparentes, lo que indica inhibición del crecimiento.</p>	<p>Se observa turbidez en las columnas 1,2,3, 4,6,7,8,9, por lo que en éstas no hubo inhibición del crecimiento bacteriano. Las columnas 5 y 10 se ven transparentes, lo que indica inhibición del crecimiento.</p>

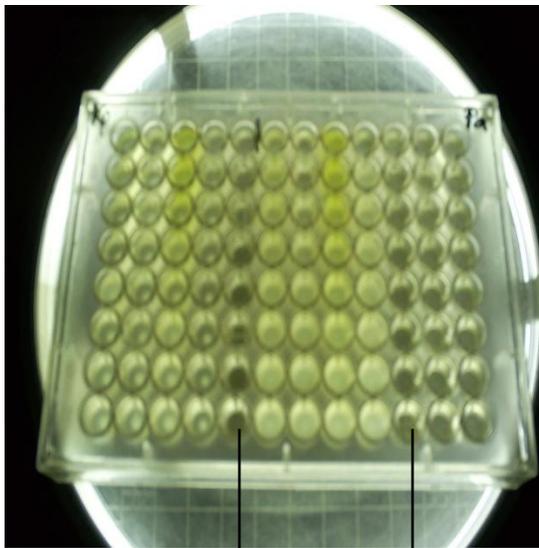
**Figura 14.** Actividad del extracto frente a *Klebsiella pneumoniae* (Columnas 1,2,3) y *Pseudomona aeruginosa* (Columnas 6,7,8).

Columnas 4 y 9: DMSO.

Columnas 5 y 10: Gentamicina.

Columna 11: Control de crecimiento.

Columna 12: Control de esterilidad.



Inhibición por gentamicina

**Fuente:** Autor

Se observa turbidez en las columnas 1,2,3, 4,6,7,8,9, por lo que en éstas no hubo inhibición del crecimiento bacteriano. Las columnas 5 y 10 se ven transparentes lo que indica inhibición del crecimiento.

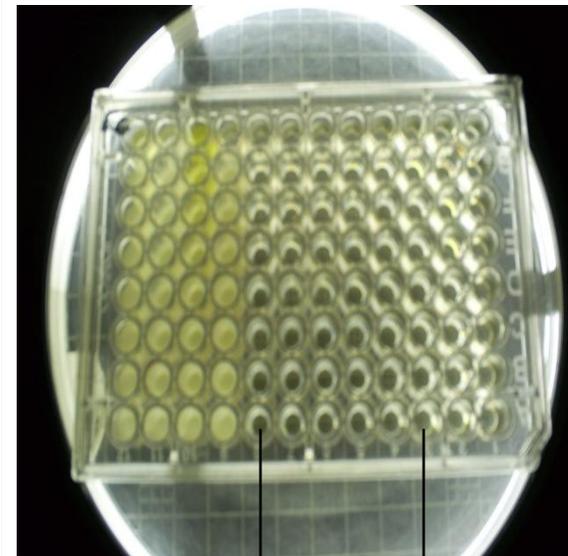
**Figura 15.** Actividad del extracto frente a *Escherichia coli* (Columnas 1,2,3,6,7,8).

Columnas 4 y 9: DMSO.

Columnas 5 y 10: Gentamicina.

Columna 11: Control de crecimiento.

Columna 12: Control de esterilidad.



Inhibición por gentamicina

**Fuente:** Autor

Se observa turbidez en las columnas 1,2,3, 4,6,7,8,9, por lo que en éstas no hubo inhibición del crecimiento bacteriano. Las columnas 5 y 10 se ven transparentes lo que indica inhibición del crecimiento.

Satorres *et al.*, (2013), elaboraron 9 extractos de *Azorella trifurcata* utilizando los siguientes solventes: 100 % hexano, acetato de etilo-hexano en las siguientes relaciones: 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 70:30, 100% acetato de etilo y metanol-acetato de etilo en relación 2:98.

Los extractos de 100% hexano, acetato de etilo-hexano 10:90, 20:80, 30:70, 70:30 y 100% acetato de etilo, mostraron una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*. Los extractos acetato de etilo-hexano 40:60 y 50:50 mostraron una CIM de 0.5 mg/ml y el extracto metanol-acetato de etilo 2:98 presentó una CIM de 1 mg/ml frente a la bacteria mencionada.

El extracto de 100% hexano mostró una CIM de 4 mg/ml frente a *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*, mientras que los extractos acetato de etilo-hexano 40:60, 50:50, 70:30 y metanol-acetato de etilo 2:98 mostraron una CIM de 2 mg/ml para ambas bacterias.

Quesada *et al.*, (2013), evaluaron la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de *Azorella monantha* y *Azorella spinosa* frente a *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Escherichia coli* en un rango de concentración de 1.25 a 0.078125 mg/ml.

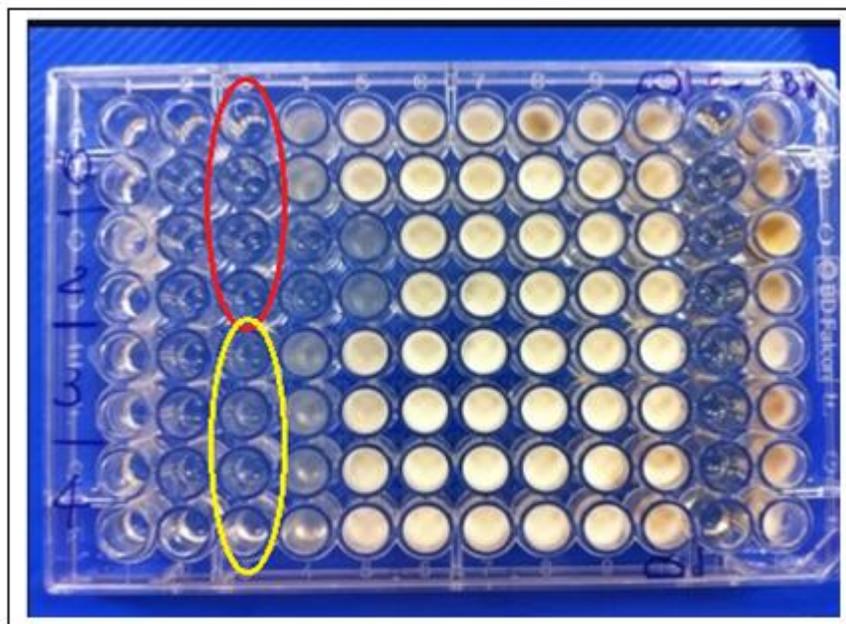
Reportaron que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano en ninguna de las concentraciones que emplearon.

El rango de concentración al cual fue evaluado el extracto metanólico de *A. pedunculata* fue de 100 a 0,78 µg/ml. Quesada *et al.*, trabajaron con un rango de concentración mucho mayor al del extracto de *A. pedunculata* y mencionaron que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano, por lo cual es de esperar que con el rango empleado en la presente investigación, tampoco hubiera inhibición. De igual manera, el rango empleado en este trabajo es inferior a las CIM reportadas en el estudio de Satorres *et al.*

### 3.2 Actividad antifúngica

Los resultados del ensayo de actividad antifúngica ante los hongos filamentosos de prueba revelaron una moderada bioactividad del extracto de *A. pedunculata*. Los resultados se expresaron como concentración inhibitoria mínima (CIM). La concentración inhibitoria mínima es la más baja concentración de extracto que inhibe la proliferación de micelio fungal.

**Figura 16.** Actividad del extracto frente a *Fusarium sp* (filas A, B, C,D) y frente a *Acremonium sp* (filas E,F,G,H). Se observa una CIM de 62.5 µg/ml para *Fusarium sp*, señalada en color rojo, al igual que para *Acremonium sp*, señalada en color amarillo.



**Fuente:** Autor.

En estudios que previamente se han realizado para probar bioactividad de extractos de especies del género *Azorella*, no se ha evaluado su actividad antifúngica. Los resultados obtenidos en esta investigación son promisorios y señalan el potencial del extracto metanólico de *A. pedunculata* como fuente de compuestos inhibidores del crecimiento de hongos fitopatógenos

### 3.3 Actividad antioxidante

En el ensayo de actividad antioxidante se desarrolló una curva de calibración con un rango de soluciones de Trolox. Los resultados del desarrollo de la curva de calibración se presentan a continuación:

**Tabla 5.** Desarrollo de curva de calibración de solución patrón de Trolox.\*

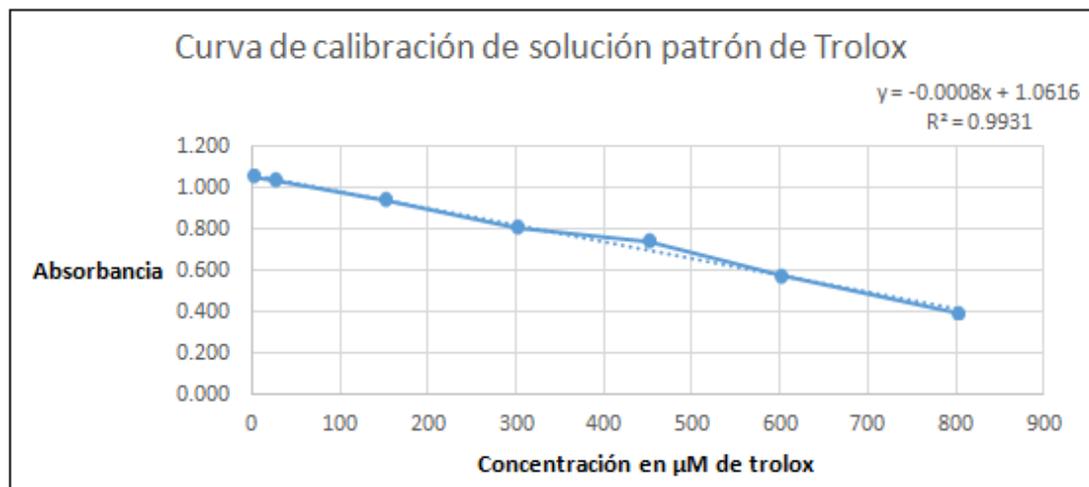
\*: Promedio de seis repeticiones.

Concentración Trolox ( $\mu\text{M}$ )	Absorbancia*
0	1.055
25	1.036
150	0.941
300	0.808
450	0.742
600	0.578
800	0.397

**Fuente:** Autor.

El gráfico de la relación entre la concentración y absorbancia se presenta en la siguiente figura:

**Figura 17.** Curva de calibración de solución patrón de Trolox, ecuación de regresión por mínimos cuadrados y coeficiente de correlación.



**Fuente:** Autor.

La absorbancia del extracto, evaluado en las condiciones descritas en la sección 2.2.3.2, fue aplicada en la ecuación obtenida por mínimos cuadrados, generando la actividad antioxidante expresada en  $\mu\text{moles}$  de trolox/mg de extracto. El cálculo desarrollado se presenta a continuación:

$$\mu\text{moles Trolox por mg extracto} = \frac{\text{Absorbancia} - 1.0616}{-0.008} * \text{factor de dilución}$$

El factor de dilución para este cálculo es 10 (1 mg de extracto/ml diluido 10 veces para preparar la solución de trabajo (100  $\mu\text{g/mL}$ ))

$$\text{Actividad antioxidante} = \frac{0.671 - 1.0616}{-0.008} * 10 = 488,25 \mu\text{moles Trolox por mg extracto} *$$

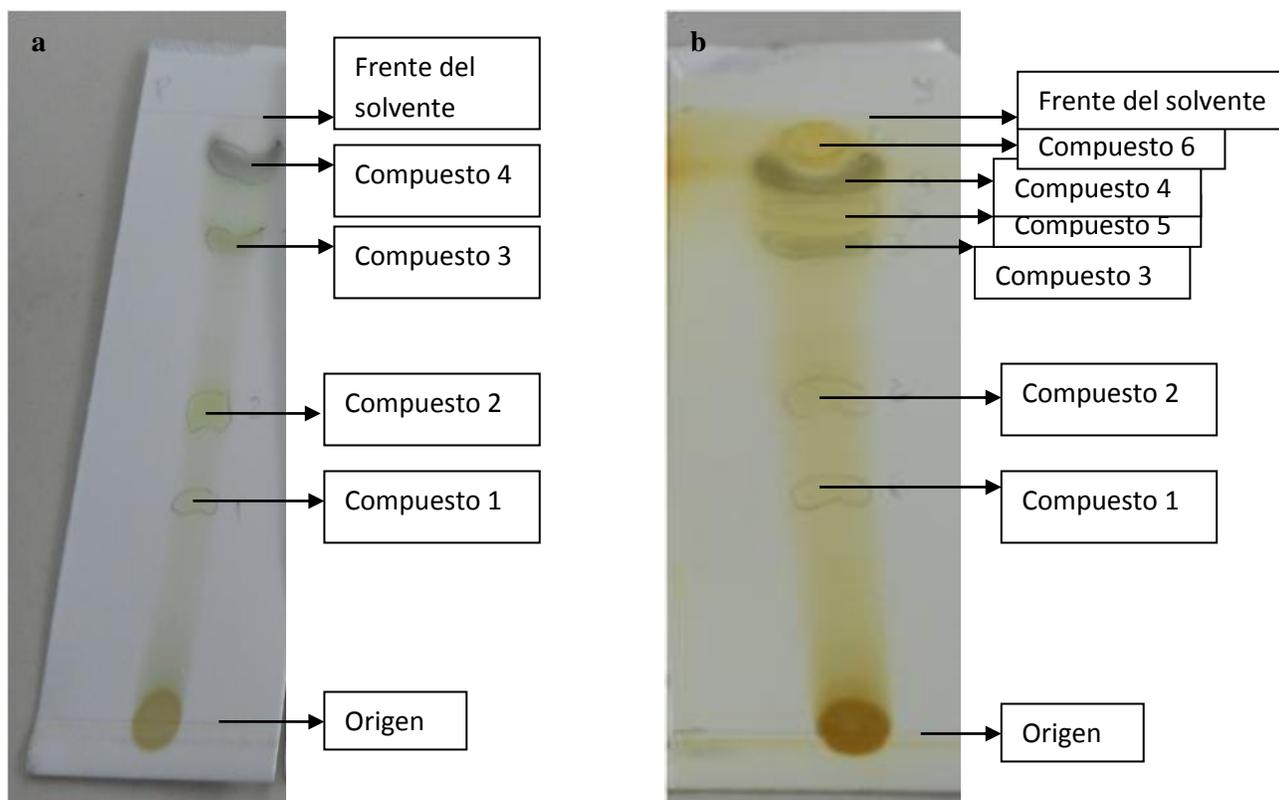
\*Promedio de nueve repeticiones.

Los resultados indican que cada mg de extracto tiene una capacidad antioxidante equivalente a 488.25  $\mu$ moles Trolox. Dado que el rango de concentraciones de Trolox empleado va de 0 a 800  $\mu$ M, se considera que el extracto de *A. pedunculata* presentó una actividad antioxidante moderada.

### 3.4 Comparación de placas cromatográficas

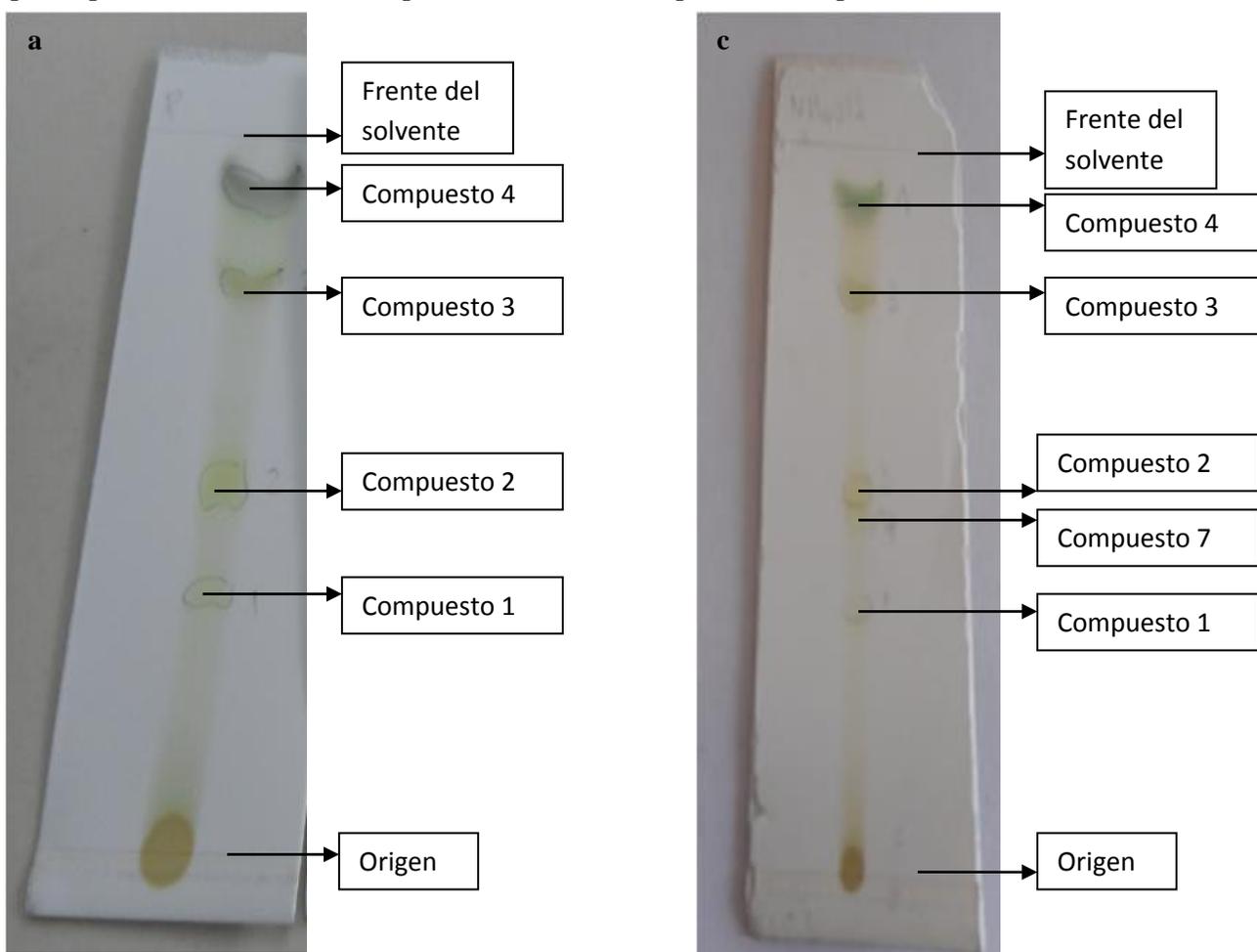
Los compuestos mayoritarios presentes en las placas cromatográficas de sílica gel embebidas en Hexano-Acetato de etilo en relación 7:3, fueron evidenciados visualmente y se calculó el factor de retención (Rf) para cada compuesto de cada placa.

**Figura 18.** Comparación de placa cromatográfica de referencia (a) con placa revelada en cámara de yodo (b). Aparece un nuevo compuesto (compuesto 6).



**Fuente:** Autor.

**Figura 19.** Comparación de placa cromatográfica de referencia (a) con placa revelada por vapores de amoníaco (c). Aparece un nuevo compuesto (compuesto 7).



Fuente: Autor.

**Tabla 6.** Valores de Rf para los compuestos mayoritarios presentes en las placas cromatográficas.

Compuesto	Método de revelado		
	Placa de referencia	Yodo	Amoniaco
1	0.32	0.32	0.32
2	0.62	0.62	0.62
3	0.76	0.76	0.76
4	0.9	0.9	0.9
5	-	0.82	-
6	-	0.94	-
7	-	-	0.44

**Fuente:** Autor.

Mediante el cálculo de Rf se evidencia la presencia de compuestos que reaccionan específicamente a los reactivos de revelado empleados para visualizar los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto de *A. pedunculata*. El análisis de estos datos permite establecer dos compuestos que se revelan específicamente con vapores de yodo (5 y 6) y un compuesto revelado únicamente con vapores de amoníaco (7). Las reacciones químicas desarrolladas en las técnicas de revelado permiten identificar a grupos de compuestos insaturados y fenólicos. Esta aproximación preliminar concuerda con los grupos mayoritarios de compuestos reportados por Neira *et al.*, 1998; Watcher *et al.*, 1999; Loyola *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2005; Areche *et al.*, 2010, para el género *Azorella*: terpenos y fenólicos. Para identificar compuestos específicos se requieren estudios avanzados con patrones de referencia y separaciones cromatográficas finas en sistemas de alta resolución.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los extractos metanólicos de *Azorella pedunculata* no inhibieron el crecimiento de ninguna de las bacterias objetivo en el rango de concentración bajo las condiciones del bioensayo aplicado en este trabajo de investigación.  
Otros estudios reportaron actividad antibacteriana de extractos de *Azorella*, sin embargo cabe recalcar que en éstos se utilizaron solventes además del metanol para elaborar los extractos y los rangos de concentración utilizados fueron mayores al que se empleó en este estudio. Se reportaron CIM desde 0.5 mg/ml hasta 4 mg/ml. Es por esto que se recomienda realizar estudios adicionales de *A. pedunculata* elaborando extractos con distintos solventes y partiendo de una concentración inicial de 0.5 mg/ml.
- En lo que se refiere a la actividad antifúngica, el extracto logró inhibir a hongos fitopatógenos de los géneros *Acremonium* y *Alternaria*. No se ha evaluado la actividad antifúngica de extractos de otras especies de *Azorella*, sin embargo los resultados reportados en este estudio son alentadores, razón por la cual es necesario realizar más estudios sobre las especies del género *Azorella* como posibles inhibidores fúngicos.
- El extracto de *A. pedunculata* mostró una actividad antioxidante moderada.
- La caracterización fitoquímica reveló la presencia de compuestos insaturados y compuestos fenólicos, los cuales han sido descritos en otras especies de *Azorella* y a los que se atribuye su actividad biológica.
- Finalmente, se recomienda realizar más investigaciones fitoquímicas sobre *Azorella pedunculata* y otras especies de *Azorella* presentes en Ecuador, ya que

este género tiene un gran potencial para ser usado para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y como antioxidante.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. **ARECHE**, C., Vaca, I., Loyola L.A., Borquez, J., Rovirosa, J., San-Martín, A. 2010. **Diterpenoids from *Azorella madreporica* and their antibacterial activity**. *Planta Medica*. Vol. 76. No. 15. pp. 1749–1751.
2. **ARINA**, Z., Beg, I.A. 2000. **Effect of *Plumbago zelanica* extract and certain curing agents on multidrog resistant bacteria of clinical drugs**. *World journal of microbiology & biotechnology*. Vol. 16. No. 8-9. pp. 841-844.
3. **BRACK**, A. 1999. **Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú**. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cusco-Perú.
4. **CABRERA**, J. 2007. **Plantas etnomedicinales de la comunidad campesina Salinas y Huito, Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca**. Tesis para optar el título profesional de Biólogo. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa-Perú.
5. **CAÑIGUERAL**, S., Dellacassa, E., Bandoni, A.L. 2003. **Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo?** *Latin American Journal of Pharmacy*. Vol. 22. No. 3. pp. 265.
6. **CAZAR**, M.E. 2006. **Fungicidas y bactericidas de Suelo**. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, mención Investigación y Desarrollo de Productos Naturales. Universidad de Talca. Talca-Chile.
7. **CHRISTENSEN**, L.P., Brandt, K. 2006. **Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol 41. No. 3. pp. 683-693.
8. **COLLOCA**, C. B., Pappano, D. B; Bustos, D. A; Sosa, V. E; Baggio, R. F; Garland, M. T., Gil, R.R. 2004. **Azorellane diterpenes from *Azorella cryptantha***. *Phytochemistry*. Vol. 65. No. 14. pp. 2085-2086.
9. **DE LA TORRE**, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M.J, Balslev, H. (eds). 2008. **Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador**. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Herbario

AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito-Ecuador, Aarhus-Dinamarca.

10. **DELPORTE**, C., Backhouse, N., Salinas, P., San-Martín, A., Bórquez, J., Loyola, A. 2003. **Pharmaco-toxicological study of diterpenoids**. Biorganic & Medicinal Chemistry. Vol. 11. No. 7. pp. 1188-1190.
11. **DORMAN**, H.J., Deans, S.G. 2000. **Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils**. Journal of Applied Microbiology. Vol. 88. No. 2. pp. 308 – 316.
12. **DZUBAK**, P; Hajdich, M; Vydra, D; Hustova, A; Kvasnica, M; Biedermann, D; Markova, L; Urban, M; Sarek, J. 2006. **Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications**. Natural product reports. Vol. 23. No. 3. pp 394.
13. **FUENTES**, N.L., Sagua, H., Morales, G., Borquez, J., San-Martín A, Soto, J., Loyola, L. A. 2005. **Experimental antihyperglycemic effect of diterpenoids of llareta *Azorella compacta* (Umbelliferae) Phil in rats**. Phytotherapy Research. Vol. 19. No. 8. pp. 713–715.
14. **FURNARI**, G., A, Guglielmo, A., Longhitano, N., Pavone, P., Salameri, P., Scelsi, F. 2014. **Tabla de Botánica Sistemática**. <[http://www.dipbot.unict.it/sistematica\\_es/Apia\\_fam.html](http://www.dipbot.unict.it/sistematica_es/Apia_fam.html)> (20 de agosto de 2014).
15. **HEYWOOD**, V. H. 1985. **Las plantas con flores**. Ed. Reverté S.A. Barcelona-España.
16. **HILL**, A. F. 1965. **Botánica Económica, plantas útiles y productos vegetales**. Ed. Omega. Barcelona-España.
17. **HOSTETTMANN**, K., Marston, A. 2002. **Twenty years of research into medicinal plants: Results and Perspective**. Phytochemistry reviews. Vol. 1. No. 1. pp. 275 – 285.
18. **JORGENSEN**, P. M., León-Yáñez, S. (eds.) 1999. **Catalogue of the vascular plants of Ecuador**. Missouri Botanical Garden. San Luis, Estados Unidos.

19. **KARIOTI, A., Skaltsa, H., Lazari, D., Sokovic, M., García, B., Harvala, C.** 2001. **Secondary metabolites from *Centaurea deusta* with antimicrobial activity.** Zeitschrift für Naturforschung. Vol. 57. No. 1. pp. 75-80.
20. **LEVIS, S., Strickman-Stein, N., Ganjein-Azar, P., Xu, P., Doerge, D.R., Krischer, J.** 2011. **Soy isoflavones in the prevention of menopausal bone loss and menopausal symptoms: A randomized, double-blind trial.** Archives of Internal Medicine. Vol. 171. No. 15. pp. 1363-1369.
21. **LI, T., Yu, Y., Bin, W., Ruyi, Z., Guangzhong, T.** 1998. **New isoflavonoside from *Bupleurum scorzonerifolium*.** J. Chinese Chemical Letters. Vol. 9. No. 1. pp. 71-73.
22. **LIANG, H., Zhao, Y, Cui, Y., Liu, Q.** (2000). **Flavonoids from the roots of *Bupleurum chinense* DC.** Journal of Beijing Medical University. Vol. 32. No. 3. pp. 223-225.
23. **LOYOLA, L., Bórquez, J., Morales, G., San-Martín, A.** 1997. **Diterpenoids from *Azorella compacta*.** Phytochemistry. Vol. 44. No. 4. pp. 649-651.
24. **LOYOLA, L. A., Bórquez, J, Morales, G., San-Martín, A.** 1998. **11,12-epoxymulin-13-en-20.oic acid, a diterpenoid from *Azorella compacta*.** Phytochemistry. Vol. 49. No. 4. pp. 1091-1093.
25. **LOYOLA, L.A., Borquez, J., Morales, G., Araya, J., Gonzalez, J., Neira, I., Sagua, H., San.Martín, A.** 2001.**Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities.** Phytochemistry. Vol. 56. No. 2. pp. 177–180.
26. **LOYOLA, L.A., Borquez, J., Morales, G., San-Martín, A., Darias, J., Flores, N., Giménez, A.** 2004. **Mulinane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiplasmodial activity.** Phytochemistry. Vol. 65. No. 13. pp. 1931-1935.
27. **LOYOLA, L. A., Borquez, J., San-Martín, A.** 2005. **Química y actividad biológica de diterpenoides de Apiaceae de la región altoandina de Chile.** Universidad de Playa Ancha. Valparaíso-Chile.
28. **MATHIAS, M., Constance, L.** 1976. **Umbelliferae, en: Flora of Ecuador.** NFR Swedish Natural Science Research. Lund, Suecia.
29. **MOLINA-SALINAS, G. M., Bórquez, J., Said-Fernández, S., Loyola, L.A., Yam-Puc, A., Becerril-Montes, P., Escalante-Erosa, F., Peña-Rodríguez, L.M.**2010.

- Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids.** *Fitoterapia*. Vol. 81. No. 3. pp. 219-222.
30. **MORALES, P., Kong, M., Pizarro, E., Pasten, C., Morales, G., Borquez, J, Loyola, L.A.** 2003. **Effect of azorellanone, a diterpene from *Azorella yareta Hauman* on human sperm physiology.** *Journal of Andrology*. Vol. 24. No.3. pp. 366–370.
31. **MORRISSEY, J. P., Osbourn, A. E.** 1999. **Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 63. No. 3. pp. 709.
32. **MUNIZAGA, C., Gunkel, H.** 1958. **Notas etnobotánicas del pueblo atacameño de Socaire.** Universidad de Chile.
33. **NEILL, D.A., Ulloa, C.** 2011. **Adiciones a la Flora del Ecuador: Segundo Suplemento, 2005-2010.** Fundación Jatun Sacha, Quito-Ecuador. Missouri Botanical Garden. San Luis-Estados Unidos.
34. **NEIRA, I., Poblete, L., Porcille, P., Silva, P., Araya, J., Bórquez, J., Morales, G., Loyola, L.A., Sagua, H.** 1998. **Activity of diterpenoid isolated from *Azorella compacta* (Llaretá) on *Trypanosoma cruzi* amastigotes.** *Boletín chileno de parasitología*. Vol. 53. No. 1-2. pp. 9–13.
35. **NEWMAN, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M.** 2000. **The influence of natural products upon drug discovery.** *Natural Product Reports*. Vol. 17. No.3. pp.217.
36. **OKAWA, M., Kinjo, J., Nohara, T., Ono, M.** 2001. **DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants.** *Biological Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 24. No.10. pp. 1202-1205.
37. **OMS, 1978. The promotion and development of traditional medicine.** Technical report series. No. 622. Ginebra, Suiza.
38. **PADÍN, O. H.** 1999. **Caracterización de la biodiversidad de la franja costera norte de Tierra del Fuego.** Ed. Totalfina. Tierra de Fuego, Argentina.
39. **PEDRAS, M., Ahiahonu, P.** 2005. **Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi.** *Phytochemistry*. Vol. 66. No. 4. pp. 395.

40. **PEGG, R., Amarowicz, R., Nackzk, M., Fereidoon, S. PHOTOCHEM® for Determination of Antioxidant Capacity of Plant Extracts.** ACS symposium series. Vol. 956. No. 11. pp. 143-148.
41. **PROAÑO, A. 2009. Quilloac: memoria, etnicidad y migración entre los kañaris.** Tesis para optar al grado de Magister en Antropología. Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales. Sede Ecuador.
42. **QUASSINTI, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Barboni, L., Ricciutelli, M., Sagratini, G., Papa, F., Caprioli, G., Petrelli, D., Vitalia, L.A., Vittori, S., Maggi, F. 2013. In vitro biological activity of essential oils and isolated furanosesquiterpenes from the neglected vegetable *Smyrniium olusatrum L. (Apiaceae)*.** Food Chemistry. Vol. 138. No. 2-3. pp. 808-813.
43. **QUESADA, L., Areche, C., Astudillo, L., Gutierrez, M., Sepulveda, B., San-Martin, A. 2012. Biological activity of isoflavonoids from *Azorella madreporica*.** Natural Product Communications. Vol. 7. No. 9. pp. 1187–1188.
44. **QUESADA, L., Gutiérrez, M., Astudillo, L., San-Martín, A., Fuentes, E., Palomo, I., Peñahilillo, P. 2013. Determination of antibacterial, antioxidant, antiplatelet and inhibition of cholinesterase activities from the methanolic extracts of *Azorella species (Apiaceae)*.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Vol. 12. No. 1. pp. 100-106.
45. **RADULOVIC, N., Dordevic, N., Denic, M., Pinheiro, M., Fernandes, P.D., Boylan, F. 2012. A novel toxic alkaloid from poison hemlock (*Conium maculatum L., Apiaceae*): Identification, synthesis and anticonceptive activity.** Food and Chemical Toxicology. Vol. 50. No. 2. pp. 274-279.
46. **ROCHFORT, S. 2005. Metabolomics Reviewed: A New Omics Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research.** Journal of Natural Products. Vol 68. No. 12. pp. 1813-1817.
47. **SALEH, N., Sabry, I., El-Negoumy, M., El-Hadidi, N., Hasnaa, A.H. 1983. Comparative study of the flavonoids of some local members of the umbelliferae.** Phytochemistry. Vol. 22. No. 6. pp. 1417-1420.
48. **SATORRES, S.E., Chiaramello A., Mattana, C.M., Alcaráz, L.E., Rossomando, P.C., Tonn, C, Laciari, A.L. 2013. *Azorella trifurcata* and *Mulinum echeagarayii***

- obtained from central region of Argentina: antibacterial activity of their organic extracts. *Emirates Journal of food and Agriculture*. Vol. 25. No. 6. pp. 458-460.
49. SIMOES-PIRES, C.A., Hmicha, B., Marston, A., Hostettmann, K. 2009. **A TLC bioautography method for the detection of  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase inhibitors in plant extracts**. *Phytochemical Analysis*. Vol. 20. No. 6. pp. 511 – 515.
50. STEVENS, P.F. **Angiosperm Phylogeny Website**. 2008. <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> (20 de agosto de 2014).
51. ULLOA, C., Alvarez, S., Jorgesen, P., Minga, D. 2004. **Cien plantas silvestres del páramo, Parque Nacional Cajas**. ETAPA, Cuenca-Ecuador. Missouri Botanical Garden. San Luis-Estados Unidos.
52. WATCHER, G. A., Matoq, G., Hoffmann, J.J., Maiese, W.M., Singh, M.P., Montenegro, G., Timmermann, B. N. 1999. **Antibacterial diterpenoid acids from *Azorella madreporica***. *Journal of natural products*. Vol. 62. No. 1. pp. 1319-1321.
53. WATCHER, G.A., Franzblau, S.G., Montenegro, G., Suárez, E., Fortunato, R.H., Saavedra, E., Timmermann B.N. 1998. **A New antitubercular mulinane diterpenoid from *Azorella madreporica* Clos**. *Journal of natural products*. Vol. 61. No. 7. pp. 965–968.
54. WICKENS, G.E. 1995. **Llaretá (*Azorella compacta*, Umbelliferae): A review**. *Economic botany*. Vol. 49. No. 2. pp. 207-212.
55. ZECH, J. 1999. **Flavonoid distribution of *Mulinum* (Apiaceae, Hydrocotyloideae, Mulinaceae)**. *Brittonia*. Vol. 51. No. 4. pp. 415-421.
56. ZULOAGA, F. O., Morrone, O., Belgrano, M.J. 2008. **Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur: (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)**. Missouri Botanical Garden Press. San Luis-Estados Unidos.

**ANEXOS**

**Anexo 1. Cálculos realizados para obtener el valor en micromoles de trolox/mg de extracto.**

Concentracion trolox ( $\mu\text{M}$ )	Absorbancia		Promedio	Mediana	Desv estándar	
0	1.069	1.068	1.066	1.068	1.068	0.002
0	1.045	1.042	1.042	1.043	1.042	0.002
25	1.038	1.038	1.036	1.037	1.038	0.001
25	1.036	1.035	1.034	1.035	1.035	0.001
150	0.954	0.954	0.939	0.949	0.954	0.009
150	0.938	0.929	0.932	0.933	0.932	0.005
300	0.926	0.923	0.876	0.908	0.923	0.028
300	0.887	0.862	0.376	0.708	0.862	0.288
450	0.757	0.754	0.751	0.754	0.754	0.003
450	0.751	0.737	0.703	0.730	0.737	0.025
600	0.699	0.692	0.539	0.643	0.692	0.090
600	0.532	0.532	0.474	0.513	0.532	0.033
800	0.454	0.473	0.218	0.382	0.454	0.142
800	0.223	0.217	0.796	0.412	0.223	0.333

Extracto	Absorbancia		Promedio	Mediana	Desv estándar	
Muestra 1	0.772	0.796	0.796	0.788	0.796	0.0139
Muestra 2	0.569	0.572	0.573	0.571	0.572	0.0021
Muestra 3	0.653	0.654	0.654	0.654	0.654	0.0006

**Anexo 2. Cálculos realizados para obtener los factores de retención de los métodos de revelado cromatográfico.**

<b>R<sub>f</sub></b>	<b>Cálculo</b>	<b>Resultado</b>
1	2.1/6.6	0.32
2	4.1/6.6	0.62
3	5/6.6	0.76
4	6/6.6	0.9
5	5.4/6.6	0.82
6	6.2/6.6	0.94
7	2.9/6.6	0.44

