

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Análisis de metabolitos secundarios de *Lachemilla orbiculata* (Ruiz & Pavón) Rydb.  
(Rosaceae) en dos localidades de los Andes del Ecuador.**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas**

**TANIA IVANOVA GONZÁLEZ RIVADENEIRA**

**Quito, 2011**

Yo, Katya Romoleroux PhD., Directora de Disertación, **Certifico:** que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Srta. Tania Ivanova González Rivadeneira ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Firma de la Directora de la Disertación

*“La alegría es la piedra filosofal que todo lo convierte en oro”*

Benjamín Franklin.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Gran Espíritu por la luz.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por financiar este proyecto de Investigación.

A la Dra. Katya Romoleroux por brindarme la oportunidad de aprender de ella, por su dirección y paciencia.

Al Instituto de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, especialmente al Dr. Omar Malagón, al Ing. Jorge Ramírez, a la Licenciada Mónica Valdivieso y a todo el personal del laboratorio por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por todo el apoyo brindado.

Al c. MS. Ramiro Merino por su colaboración a lo largo de toda la investigación.

Al Dr. Javier Carvajal por su aporte en las correcciones de este trabajo.

A la Dra. Rita Urgilés.

El agradecimiento infinito a mis padres, por su apoyo y su amor incondicional.

A mi hermano por ser el puntal de mis decisiones.

Un agradecimiento especial a Samita por enseñarme de su fortaleza, paciencia y amor por la vida.

A mis abuelitos, mis primos y toda mi familia por eónico acompañamiento y apoyo en cada momento de mi existencia.

A mis compañeros del Laboratorio de Botánica Sistemática de la Escuela de Ciencias Biológicas.

A todos mis amigos y amigas que de una u otra forma han estado presentes a lo largo de la elaboración de este trabajo.

A Katic García por todo el tiempo y apoyo.

A todos los miembros de la Inti por todo su cariño y preocupación.

A Xavier Méndez por su presencia.

A las Lachemillas por permitirme extraer su esencia.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
3.1. METABOLITOS SECUNDARIOS.....	3
3.1.1. TERPENOS.....	5
SUBDIVISIÓN GENERAL DE TERPENOS.....	6
3.1.2 ESTEROLES.....	7
3.1.2.1. ESTIGMASTEROL.....	8
3.1.3. FENOLES.....	8
TIPOS DE FLAVONOIDES.....	9
3.2. IMPORTANCIA DE LA FITOQUÍMICA EN LA FAMILIA ROSACEAE JUSS.....	10
3.3. GÉNERO <i>LACHEMILLA</i> (FOCKE) RYDB.....	15
3.4. <i>LACHEMILLA ORBICULATA</i> (RUIZ & PAVÓN) RYDB.....	16
3.5. JUSTIFICACIÓN.....	17
3.6. OBJETIVOS.....	19
3.6.1. GENERAL.....	19
3.6.2. ESPECÍFICOS.....	19
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
4.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	20
4.1.1. PÁRAMO DE PAPALLACTA.....	21
4.1.2. PÁRAMO DE FIERRO URCO.....	22

4.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	23
4.3. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES.....	23
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.....	24
4.3.1 ANÁLISIS A PARTIR DEL EXTRACTO ETÉREO.....	25
4.3.2. ANÁLISIS A PARTIR DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO.....	26
4.3.3. ANÁLISIS A PARTIR DEL EXTRACTO ACUOSO.....	28
4.4. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	29
4.4.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	29
4.4.2 DETERMINACIÓN TOTAL DE FENOLES.....	30
4.4.3. CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA Y CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC).....	31
4.4.4. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	32
4.5. ANÁLISIS DE SUELOS.....	33
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
5.1. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES.....	34
5.2. DETERMINACIÓN TOTAL DE FENOLES.....	36
5.3. CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA.....	37
5.4. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	38
5.5. ANÁLISIS DE SUELOS.....	40
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
6.1. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES.....	41
6.2. DETERMINACIÓN TOTAL DE FENOLES.....	43

6.3.CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA Y DE CAPA FINA.....	45
6.4. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	47
6.5. ANÁLISIS DE SUELOS.....	50
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>8. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>52</b>
<b>9. FIGURAS.....</b>	<b>74</b>
<b>10. TABLAS.....</b>	<b>98</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>114</b>
<b>12. GLOSARIO.....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Recolección de hojas (lámina y peciolo) de <i>Lachemilla orbiculata</i> (Fierro Urco-Loja).....	75
<b>Figura 2.</b> Hojas secas de <i>Lachemilla orbiculata</i> , listas para triturar.....	75
<b>Figura 3.</b> Recolección de muestras de suelo en Papallacta (Mismo procedimiento para Fierro Urco).....	76
<b>Figura 4.</b> Columna cromatográfica ensamblada.....	76
<b>Figura 5.</b> Prueba de Dragendorff en extracto etéreo. ....	77
<b>Figura 6.</b> Prueba de Mayer en extracto etéreo. ....	77
<b>Figura 7.</b> Prueba de Wagner en extracto etéreo.....	78
<b>Figura 8.</b> Prueba de Baljet en extracto etéreo.....	78
<b>Figura 9.</b> Prueba de Liebermann-Burchard en extracto etéreo.....	79
<b>Figura 10.</b> Prueba de Baljet en extracto alcohólico.....	79
<b>Figura 11.</b> Prueba de Liebermann-Burchard en extracto alcohólico.....	80
<b>Figura 12.</b> Prueba de $\text{Cl}_3\text{Fe}$ en extracto alcohólico.....	80
<b>Figura 13.</b> Prueba de Borntrager en extracto alcohólico.....	81
<b>Figura 14.</b> Prueba de Shinoda en extracto alcohólico.....	81
<b>Figura 15.</b> Prueba de Dragendorff en extracto alcohólico.....	82
<b>Figura 16.</b> Prueba de Mayer en extracto alcohólico.....	82
<b>Figura 17.</b> Prueba de Wagner en extracto alcohólico.....	83
<b>Figura 18.</b> Prueba de Dragendorff en extracto acuoso.....	83

<b>Figura 19.</b> Prueba de Mayer en extracto acuoso. ....	84
<b>Figura 20.</b> Prueba de Wagner en extracto acuoso.....	84
<b>Figura 21.</b> Prueba de $\text{Cl}_3\text{Fe}$ en extracto acuoso.....	85
<b>Figura 22.</b> Prueba de Shinoda en extracto acuoso. ....	85
<b>Figura 23.</b> Prueba de Fehling en extracto acuoso.....	86
<b>Figura 24.</b> Curva de calibración. Concentración y absorbancia del ácido gálico.....	87
<b>Figura 25.</b> Cromatografía de Capa Fina.....	88
<b>Figura 26.</b> Compuesto aislado del extracto.....	89
<b>Figura 27.</b> Estructura química del estigmasterol.....	89
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del estigmasterol de la muestra de Fierro Urco en $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).....	90
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del estigmasterol de la muestra de Papallacta en $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).....	91
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del estigmasterol de la muestra de Fierro Urco en $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).....	92
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del estigmasterol de la muestra de Papallacta en $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).....	93
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN DEPT del estigmasterol de la muestra de Fierro Urco en $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).....	94
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN DEPT del del estigmasterol de la muestra de Papallacta en $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).....	95
<b>Figura 34.</b> Cantidad de cationes en una muestra de suelo de Fierro Urco.....	96

<b>Figura 35.</b> Cantidad de cationes en una muestra de suelo de Papallacta.....	96
<b>Figura 36.</b> Porcentaje de materia orgánica del suelo de las muestras de Fierro Urco y Papallacta.....	97
<b>Figura 37.</b> pH en la muestra de Fierro Urco y Papallacta.....	97

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Muestras de <i>Lachemilla orbiculata</i> recolectadas.....	99
<b>Tabla 2.</b> Cantidad de <i>Lachemilla orbiculata</i> en alcohol absoluto para la obtención de extractos alcohólicos.....	99
<b>Tabla 3.</b> Características de los extractos alcohólicos.....	99
<b>Tabla 4.</b> Marcha fitoquímica. Presencia o ausencia de metabolitos secundarios en extracto etéreo.....	100
<b>Tabla 5.</b> Marcha fitoquímica. Presencia o ausencia de metabolitos secundarios en extracto alcohólico.....	101
<b>Tabla 6.</b> Marcha fitoquímica. Presencia o ausencia de metabolitos secundarios en extracto acuoso.....	102
<b>Tabla 7.</b> Valores de las soluciones de ácido gálico.....	103
<b>Tabla 8.</b> Contenido total de fenoles.....	104
<b>Tabla 9.</b> Cromatografía en columna y TLC de la muestra de Fierro Urco.....	105
<b>Tabla 10.</b> Cromatografía en columna y TLC de la muestra de Papallacta.....	108
<b>Tabla 11.</b> Características de los compuestos aislados.....	109
<b>Tabla 12.</b> Desplazamiento en el espectro de protón de Fierro Urco y Papallacta.....	110
<b>Tabla 13.</b> RMN <sup>13</sup> C de los compuestos de Fierro Urco y Papallacta.....	111
<b>Tabla 14.</b> Diferencias de los desplazamientos entre los Carbonos analizados de las dos localidades.....	112

<b>Tabla 15.</b> Cantidad de cationes de las muestras de Papallacta y Fierro Urco.....	113
<b>Tabla 16.</b> Cantidad de cationes de las muestras de Papallacta y Fierro Urco.....	113
<b>Tabla 17.</b> Porcentaje de Materia orgánica en porcentaje de las muestras de Papallacta y Fierro Urco.....	113

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> <i>Lachemilla orbiculata</i> (Ruiz & Pavón) Rydb.....	115
<b>Anexo 2.</b> Equipo Fisher Jhons (Melting point apparatus).....	116
<b>Anexo 3.</b> Equipo de Resonancia Magnética Nuclear Varian 400 MHz.....	116
<b>Anexo 4.</b> Resultados $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ y DEPT del estigmasterol de la muestra de Fierro Urco en $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).....	117
<b>Anexo 5.</b> Resultados $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ y DEPT del estigmasterol de la muestra de Papallacta $\text{CDCl}_3$ (400 MHz).....	118
<b>Anexo 6.</b> Análisis de suelo de la muestra de Fierro Urco.....	119
<b>Anexo 7.</b> Análisis de suelo de la muestra de Papallacta.....	120

## 1. RESUMEN

Los usos tradicionales de las plantas para el tratamiento de enfermedades se atribuyen a la presencia de metabolitos secundarios, como la familia Rosaceae caracterizada por contener taninos, sorbitol, triterpenos y esteroides. *Lachemilla* es un género de Rosaceae, nativo y diverso de la región andina, utilizado con fines medicinales y ambientales en Colombia y Ecuador.

Se determinó que en dos localidades de los Andes del Ecuador (Fierro Urco y Papallacta), las hojas de *Lachemilla orbiculata* contienen alcaloides, triterpenos, compuestos lactónicos, taninos, fenoles, quinonas, flavonoides y azúcares reductores. Una cuantificación total de fenoles reveló que una muestra de Fierro Urco, *L. orbiculata* posee 356,35 mg EAG/g y una de Papallacta 368,8 mg EAG/g lo que evidencia la capacidad antioxidante de la especie. Además, se aisló el compuesto terpénico más abundante en cada localidad: 25,9 mg en Fierro Urco y 6,9 mg en Papallacta, identificados, por medio del análisis de Resonancia Magnética Nuclear:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT, como estigmasterol, esterol reportado por primera vez en el género *Lachemilla*.

Las pruebas de suelo revelaron que la muestra recolectada en Fierro Urco contiene más materia orgánica que la de Papallacta, estos resultados podrían explicar en parte la cantidad de metabolitos secundarios encontrados en *L. orbiculata*. Adicionalmente, los análisis indicaron que el pH de las muestras es neutro, lo que posiblemente no tiene una relación importante en la transferencia de carbonos del suelo a la planta.

**Palabras clave:** Análisis, estigmasterol, fenoles, Fierro Urco, fitoquímica, *Lachemilla orbiculata*, Papallacta.

## 2. ABSTRACT

Traditional uses of plants for the treatment of diseases are attributed to the presence of secondary metabolites, such as Rosaceae family characterized by containing tannin, sorbitol, triterpenes and steroids. *Lachemilla* is a genus of Rosaceae, native and diverse in the Andean region, is used with medicinal and environmental purposes in Colombia and Ecuador.

It was determined, at two locations in the Ecuadorian Andes (Fierro Urco and Papallacta), that the leaves of *Lachemilla orbiculata* contain alkaloids, triterpenes, lactonic compounds, tannins, phenols, quinones, flavonoids and reducing sugars. A quantification of total phenols in the two localities revealed that Fierro Urco *L. orbiculata* has 356.35 mg GAE/g and Papallacta has 368.8 mg GAE/g, which shows a considerable antioxidant capacity of the species. Furthermore, the most abundant terpene was isolated in each locality: 25.9 mg of Fierro Urco and 6.9 mg of Papallacta identified, through analysis of Nuclear Magnetic Resonance:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and DEPT, as stigmasterol, sterol reported for the first time in the genre *Lachemilla*.

Soil tests revealed that the sample collected in Fierro Urco contains more organic matter than the Papallacta's sample, which could explain in part the amount of secondary metabolites found in each locality. Additionally, the results indicated that the samples' pH are neutral, which may not have an important bearing on the transfer of carbon from the soil to the plant.

**Key words:** Analysis, Fierro Urco, *Lachemilla orbiculata*, phenols, phytochemistry, Papallacta, stigmasterol.

### **3. INTRODUCCIÓN**

El uso medicinal de las plantas para el alivio de dolencias y el tratamiento de enfermedades data de hace aproximadamente cinco milenios. En la actualidad las plantas continúan siendo las más importantes fuentes de medicamentos en muchas poblaciones humanas de diversas zonas, incluyendo en los páramos (Hoffman, 2003; Nates *et al.*, 1996).

Los usos tradicionales de plantas para el tratamiento y profilaxis de diferentes desórdenes físicos se atribuyen a la presencia de metabolitos secundarios como fenoles, vitaminas, carotenos que se encuentran en las especies vegetales (Kiselova, *et al.*, 2006).

El análisis de los metabolitos secundarios de las plantas permite comprender mejor la importancia de especies útiles, la clasificación taxonómica y las relaciones evolutivas y ecológicas entre especies (Smith, 1975).

#### **3.1. METABOLITOS SECUNDARIOS**

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos relacionados con el crecimiento y desarrollo de la planta, se encuentran distribuidos de forma diferencial a lo largo de los grupos taxonómicos (Croteau *et al.*, 2000).

Los metabolitos secundarios son el resultado de diversas rutas metabólicas que actúan sobre diferentes sustratos (Pichersky y Gang, 2000). Genéticamente, entre el 15 y 20 % de los genes de las plantas codifican para la formación de enzimas del metabolismo secundario (Pichersky y Gang, 2000); la hibridación entre variedades o especies también

puede generar cambios en los patrones de la variación química en las rutas metabólicas secundarias, y por consecuencia en las relaciones plantas-herbívoros (Orians, 2000).

En las plantas, la mayoría de metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra depredadores y agentes alelopáticos (Judd *et al.*, 2008), tienen propiedades inhibitorias del desarrollo y el comportamiento de los insectos, son reguladores del crecimiento y disuasivos de la ovoposición y la alimentación. (Cavalcante *et al.*, 2006; Celis *et al.*, 2008; Vigliano *et al.*, 2008; Wheeler y Isman, 2001; y Castillo *et al.*, 2010). Colaboran en la dispersión y polinización de plantas (Judd *et al.*, 2008; Kokaly *et al.*, 2009), contribuyen a las funciones adaptativas, de aclimatación y de respuesta a condiciones de estrés (Anttonen, 2007).

En la salud humana, los metabolitos secundarios tienen mucha importancia; se han relacionado con la disminución en la mortalidad y en la incidencia de asma, en la reducción del riesgo de contraer cáncer, diabetes y otras enfermedades (Anttonen, 2007).

Los metabolitos secundarios más importantes son los terpenos (hormonas, pigmentos o aceites esenciales), los compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina, taninos), glucósidos (saponinas, glucósidos cardiotónicos, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos) y alcaloides (Ávalos y Pérez, 2009; Smith, 1975).

En taxonomía, los metabolitos más utilizados incluyen alcaloides, betalinas, antocianinas, glucósidos cianogénicos, terpenoides, fenoles, flavonoides (Ávalos y Pérez, 2009; Judd *et al.*, 2008; Smith, 1975).

### 3.1.1. TERPENOS

Los terpenos o isoterpenos se caracterizan por provenir de la ruta biosintética de los isopentenil y dimetilalil pirofosfato que ocurre en los tricomas glandulares de las hojas, en las exudaciones de las yemas y de la corteza (Walton y Brown, 1999).

Químicamente, se forman de hidrocarburos insaturados cíclicos con diferentes grados de oxigenación (alcohólico, cetónicos, etc.) en los grupos sustituyentes adjuntos a la base del esqueleto de carbono (Walton y Brown, 1999).

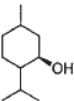
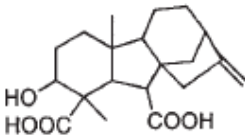
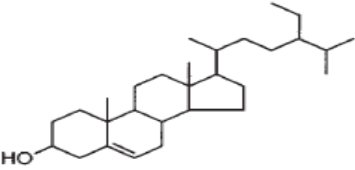
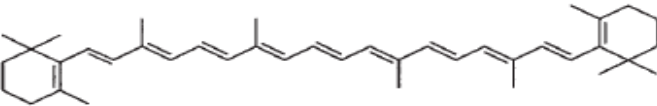
Los terpenos son el grupo más abundante de productos naturales; son toxinas, repelentes o atrayentes de otros organismos por lo que cumplen funciones ecológicas en interacciones antagónicas o mutualistas (Gershenzon<sup>1</sup> y Dudareva, 2007).

Los terpenos o terpenoides incluyen hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glucósidos cardiacos), látex y aceites esenciales (Ávalos y Pérez, 2009).

Gran parte de los terpenoides tienen usos comerciales como aromas y fragancias, en la alimentación y la cosmética o en la calidad de productos agrícolas, mientras que otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. (Ávalos y Pérez, 2009).

Se subdividen de acuerdo al número de unidades de 5-carbonos (C<sub>5</sub>) que poseen. Los grupos principales son los monoterpenoides (C<sub>10</sub>), diterpenoides (C<sub>20</sub>), triterpenoides (C<sub>30</sub>), tetraterpenoides (C<sub>40</sub>) (Walton y Brown, 1999).

### SUBDIVISIÓN GENERAL DE TERPENOS

Tipo	Ejemplo Estructura	Nombre
Monoterpeno		Mentol
Diterpeno		Giberelina
Triterpeno		β-sitosterol
Tetraterpeno		β-caroteno

(Davis y Croteau, 2000)

Los triterpenos son el grupo más extenso de terpenos, se caracterizan por poseer seis unidades de isopreno, e incluyen a esteroides y esteroides derivados del escualeno (Ávalos y Pérez, 2009; Primo, 1995; Walton y Brown, 1999).

Los esteroides que contienen un grupo alcohol, como casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroides. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitoesterol, que difieren entre sí porque el primero presenta un doble enlace entre C<sub>22</sub> y C<sub>23</sub> (Ávalos y Pérez, 2009).

### **3.1.2. ESTEROLES**

Los esteroides son esenciales para los eucariotes, pero a diferencia de los animales, las plantas sintetizan gran cantidad de esteroides, entre estos los predominantes son el sitoesterol estigmasterol y el 24-metilcolesterol (Hartmann, 1998).

Una de las funciones más importantes de los esteroides es la de formar parte de las membranas celulares, al mismo tiempo que determinan su viscosidad y estabilidad, algunos tienen funciones protectoras frente a insectos, y otros esteroides, como el estigmasterol pueden ser utilizados en la multiplicación celular en plantas. (Ávalos y Pérez, 2009; Hoffmann, 1951).

### 3.1.2.1 ESTIGMASTEROL

La fórmula molecular del estigmasterol es  $C_{29}H_{48}O$  (NIST, 2011). Es uno de los fitoesteroles más abundantes, es sintetizado durante el crecimiento de las plantas, y proporciona fluidez y permeabilidad a las membranas celulares (De-Eknamkul y Potduang, 2003; Hartmann, 1998).

En medicina, se ha utilizado el estigmasterol en el tratamiento de pacientes hipercolesterolémicos (Nigon *et al.*, 2001) y es recomendado, conjuntamente con otros fitoesteroles, para reducir la absorción de colesterol (Foley *et al.*, 2010).

### 3.1.3. FENOLES

Los compuestos fenólicos son estructuras aromáticas con varios grupos hidroxilos como sustituyentes (Walton y Brown, 1999), provienen del mismo intermediario: la fenilalanina, del ácido siquímico o de precursores biosintéticos como el ácido gálico que también da origen a taninos hidrolizables y al ácido elágico (Anttonen, 2007).

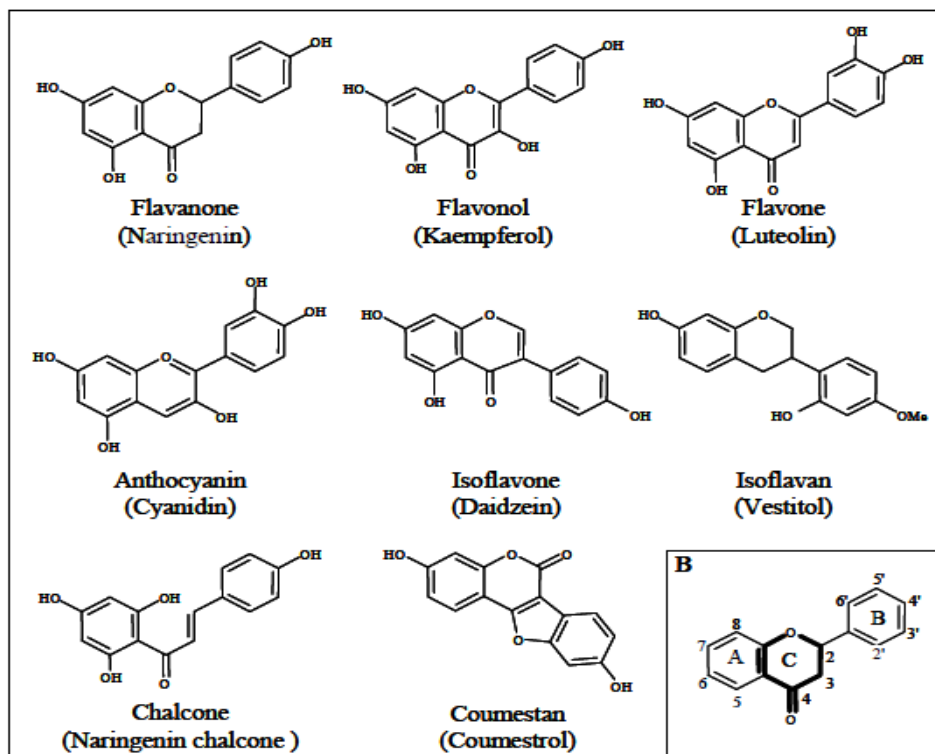
Los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer al menos un anillo fenólico con uno o más grupos de ácido hidroxilo (Anttonen, 2007).

Los fenoles pueden ser divididos en varios grupos dependiendo de la estructura aglicona que acompañe a un azúcar o un grupo carboxílico (Anttonen, 2007), se encuentran distribuidos en diferentes grupos dependiendo de la estructura vegetal (Larson, 1988).

Los compuestos fenólicos se encuentran generalmente en las plantas vasculares y poseen roles de adaptación y aclimatación, cumplen funciones en las interacciones con otros organismos y son importantes en la salud humana como antioxidantes y antimicrobiales (Anttonen, 2007).

En las plantas los compuestos fenólicos más abundantes son los ácidos hidroxibenzóicos, hidroxinámicos, taninos hidrolizables, flavonoides, flavonas, proantocianidinas di y triméricas, y antocianidinas (Määttä-Riihinen *et al.*, 2004).

### TIPOS DE FLAVONOIDES



(Rispaill *et al.*, 2005)

### 3.2. IMPORTANCIA DE LA FITOQUÍMICA EN LA FAMILIA ROSACEAE JUSS.

La familia Rosaceae se compone de alrededor de 100 géneros y 3000 especies distribuidas mundialmente. En el Ecuador se han registrado 17 géneros de Rosaceae, de los cuales diez son nativos, por ejemplo: *Lachemilla*, *Polylepis*, *Acaena*, *Hesperomeles* (Jørgensen y León, 1999; Romoleroux, 1996).

Rosaceae tiene gran importancia económica debido a que varios géneros como *Malus* (manzana), *Prunus* (cerezas, damasco, durazno, capulí), *Fragaria* (frutilla) son fuentes de alimento comercializados a nivel mundial (De Ávila, 2005).

La familia Rosaceae se ha caracterizado químicamente, en la taxonomía tradicional, por la presencia de taninos, proantocianidinas, ácido elágico y gálico, saponinas triterpénicas, sorbitol (Cronquist, 1981) triterpenos y esteroides (Wallaart, 1980).

Los glucósidos cianogénicos, flavonoides y taninos son los metabolitos con mayor importancia taxonómica en la familia (Okuda *et al.*, 1992; Wallaart, 1980).

Judd *et al.* (2008) consideró algunas características como la presencia o ausencia de sorbitol, flavonoides, glucósidos cianogénicos y ácido elágico para subdividir a Rosaceae en tres subfamilias: Spiraeoideae, Dryadoideae y Rosoideae.

Las subfamilias Dryadoideae y Spiraeoideae se caracterizan por la presencia de sorbitol, glucósidos cianogénicos y flavones; mientras que la subfamilia Rosoideae presenta ácido elágico (Judd *et al.*, 2008); Wilkes y Glasl (2001) consideran la presencia del ácido 2-Pirone-4,6-dicarboxilicosil como un marcador taxonómico de esta subfamilia.

Adicionalmente, en la familia Rosaceae se han realizado diversos estudios fitoquímicos no taxonómicos (Loayza *et al.*, 2002; Tiberti *et al.*, 2007; Tucker *et al.*, 2003; Hamad *et al.*, 2010), principalmente en especies de importancia comercial (Tiberti *et al.*, 2007; Häkkinen, *et al.*, 1999).

Se conoce que el compuesto 7-estigmasterol está presente en cantidades bajas en el albaricoque (*Prunus domestica*), melocotón (*Prunus americana*) y durazno (*Prunus persica*), todos pertenecientes a la familia Rosaceae, y son potenciales sustituyentes del aceite de almendra (Hassanein, 1999).

En la familia Rosaceae también se ha reportado la presencia de taninos como antioxidantes con usos potenciales a nivel comercial (Oszmianski *et al.*, 2007).

La manzana (*Malus domestica*), por su alto contenido de polifenoles antioxidantes y ácido ascórbico, podría reducir el riesgo de adquirir enfermedades degenerativas como el cáncer y afecciones cardiovasculares (Kunradi *et al.*, 2009); así mismo varias especies de *Prunus* han sido utilizadas popularmente como laxantes, y para el tratamiento de la faringitis (Gilani *et al.*, 2000; Wang, 1997), y se conoce que otras especies como *Fragaria ananassa*, *Rubus glaucus*, *Rubus idaeus*; *R. arcticus*, *R. chamaemorus*, *Aronia melocarpa* var. *grandifolia* y *Crataegosorbus mitschurinii* contienen ácido clorogénico, catequinas, epicatequinas, quercetinas, antocianinas, entre otros compuestos (Riihinen, 2005; Vasco *et al.*, 2009).

Los análisis fitoquímicos, especialmente aquellos relacionados con la determinación total de fenoles en el género *Prunus* son varios (Nakatani *et al.*, 2000; Ong & Khoo, 2000; Takeoka 2003), de estos un análisis importante es el realizado en *P. domestica* por Donovan *et al.*, (1998) quienes recomiendan el consumo de esta fruta para la

dieta diaria por tener actividad antioxidante, gracias a la presencia de compuestos fenólicos como ácidos hidroxicinámicos en altas concentraciones (Donovan *et al.*, 1998).

Dentro de la familia Rosaceae otro género importante es el de las “peras”, *Pyrus* del que se conoce que la exudación de tallos, hojas y brotes posee una fuerte actividad antibacterial al igual que el extracto de los tejidos de especies del mismo género (Hildebrand and Schroth 1964a, b; Jin y Sato, 2003).

En las raíces de *Pyrus communis* L. se ha encontrado arbutina, compuesto fenólico conocido por su propiedad antioxidante (Petkou, 2002).

También se han realizado estudios en especies de Rosaceae que no son ampliamente comercializadas, pero que tienen importancia etnobotánica, por ejemplo, la especie *Polylepis australis* es utilizada por poblaciones indígenas en el noreste de Argentina en infusiones para tratar la diabetes, y gracias a la presencia de terpenos, ácido oleanólico y ursólico se ha confirmado la actividad diurética de la especie (Daud *et al.*, 2007; Lampasona *et al.*, 1992).

Las especies de *Rubus* han sido utilizadas popularmente para tratar infecciones, diabetes y otras enfermedades, su actividad fue comprobada con análisis químicos que reconocen sus propiedades analgésicas (Kanegusuku *et al.*, 2007), gracias a la presencia de diterpenos, triterpenos, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, compuestos volátiles, glucósidos diterpénicos, entre otros (Chou *et al.*, 1987; Maga *et al.*, 1992; Mingsheng, 1994; Niero *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 1994; Shepherd *et al.*, 1999).

En Brasil, *Rubus imperialis* es una especie utilizada popularmente, su estudio fitoquímico certifica la actividad anticéptica y su uso para tratar enfermedades infecciosas cutáneas (Niero *et al.*, 2002; Bella Cruz *et al.*, 2006).

En China, la especie *Rubus chingii*, utilizada tradicionalmente, posee una potente actividad antioxidante, atenuando daños oxidativos en medios citotóxicos (Yau *et al.*, 2002).

*Rubus idaeus*, especie de importancia tradicional en el tratamiento de fiebres, desórdenes estomacales, durante un análisis mostró actividad relajante en células gastrointestinales *in vitro* (Rojas *et al.*, 2002).

El género *Potentilla* se lo usa para el tratamiento de inflamaciones, algunas formas de cáncer, infecciones bacterianas, virales o fúngicas, es uno de los géneros que tienen más concentración de proantocianidinas en las raíces. Según un estudio realizado por Oszmianski *et al.*, (2007) *Potentilla* es un género con alta actividad contra las caries, antioxidante y antibacteriana, con gran número de ácidos orgánicos, triterpenos, flavonoides, cumarinas y poliprenoles y otros compuestos (Tomczyk y Latté, K., 2009; Tomczyk, 2010 a, b )

Para el género *Aphanes* se conoce que las hojas de una de las especies: *A. arvensis*, son utilizadas como aditivo alimenticio, con posibles aplicaciones cosméticas y farmacéuticas debido a su potencial antioxidante y a su baja capacidad citotóxica (Burrows, 2005; Condrat *et al.*, 2010; Hamad *et al.*, 2010).

Para *Alchemilla* se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos en gran número de especies (Ayaz y Hayirlioglu, 2001), y la presencia de compuestos flavonólicos

como quercetina-3-arabinopiranosido quercetina-3-glucuronido, taninos, polifenoles, cumarinas y ácidos grasos (Fraisse *et al.*, 2000; Ondrejovic, 2009; Schimmer y Eschelbach, 1997; Yeung y Che, 2010).

*Alchemilla xanthochlora* presenta compuestos lipofílicos como el  $\beta$ -caroteno o licopeno, además de compuestos flavonólicos o cumarinas glicosídicas por lo que se considera una especie con potenciales usos antioxidantes (Ondrejovic *et al.*, 2009). Además, *A. xanthochlora* presenta compuestos oleicos volátiles: terpenos, aldehídos, hidrocarburos, ésteres, entre otros, siendo los de mayor proporción los compuestos terpénicos (Falchero *et al.*, 2009).

*Alchemilla vulgaris* es usada popularmente durante la menopausia y contra cólicos, en el tratamiento de úlceras, eczemas, y lesiones de la piel, como astringente, antidiarréico, diurético, depurativo y para tratar afecciones urogenitales, antidiarreicas y antisépticas debido a su contenido polifenólico (Condrat *et al.*, 2010; Fraisse *et al.*, 1999) y a la capacidad de actuar como protector frente a la citotoxicidad en células mamarias (Kiselova, *et al.*, 2006)

Químicamente *A. vulgaris* presenta taninos hidrolizables (elagitaninos); polifenoles, aceites esenciales, fitoesterol, ácido palmítico, flavonoides, taninos, entre otros compuestos, y posee propiedades astringentes que inhiben la oxidación de LDL, es antiinflamatorio, diurético, antihemorrágico, antidiarréico (Del Río, 2005; Trouillas *et al.*, 2003).

*Alchemilla vulgaris* está involucrada en la protección de tejidos conjuntivos y elásticos con un efecto adverso al de las enzimas proteolíticas, sin presentar toxicidad (Jonadet, 1986). El extracto de *A. vulgaris* juega un papel importante en la proliferación de células animales cultivadas *in vitro* debido a una posible asociación con la actividad

promitótica en células epiteliales y miofibroblastos sugiriendo que *in vivo* podrían reducir la destrucción de la matriz extracelular de tejidos dérmicos (Shrivastava *et al.*, 2007) y puede generar la síntesis de hormonas en la tiroides (Borodin *et al.*, 1999).

En el Ecuador Vasco *et al.* (2009) identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos de los frutos de las siguientes especies de Rosaceae: *Fragaria ananasa*, *Rubus glaucus*, *Prunus salicina* y *Prunus serotina* var. *capuli* encontrando que los componentes principales son elagitaninos, glucósidos cianidínicos, proantocianidinas, pelargonidinas en diferentes concentraciones, todos con propiedades antioxidantes.

Los usos populares, la actividad biológica, las aplicaciones médicas y nutricionales, en concordancia con los datos químicos y etnofarmacológicos enfatizan la importancia de los estudios químicos en la familia Rosaceae (De Ávila, 2005).

### **3.3. GÉNERO *LACHEMILLA* (FOCKE) RYDB.**

*Lachemilla* es un género monofilético de aproximadamente 80 especies (Gehrke *et al.*, 2008; Morales, 2010; Romoleroux, 1996) ubicado en la familia Rosaceae, subfamilia Rosoideae (Hutchinson 1964).

Notov y Kusnetzova (2004) ubican a *Lachemilla* en la tribu Potentilleae, en la subtribu *Alchemillinae* junto a *Alchemilla*, y *Aphanes* debido a que estos tres géneros comparten varias características morfológicas.

*Alchemilla* y *Lachemilla* difieren, principalmente, en aspectos como la distribución geográfica, la ecología, el número y posición de estambres y anteras (Romoleroux, 1996).

En cuanto a los usos, en Colombia todas las especies de *Lachemilla*, especialmente *L. orbiculata*, *L. pectinata*, *L. mutisii* y *L. aphanoides* se emplean en infusiones para el tratamiento de la enteritis, de diarreas, disenterías y hemorragias intestinales, también son utilizadas en lavados contra las hemorroides con resultados positivos (García, 1992).

Ecológicamente *Lachemilla* contribuye en la formación de reservorios naturales de agua por encontrarse formando asociaciones con otras plantas en los páramos (Romoleroux, 2004).

En el Ecuador *L. aphanoides*, *L. galioides*, *L. hirta*, *L. nivali* y *L. orbiculata* son utilizadas en la medicina popular para curar afecciones indeterminadas, para la reforestación, evitar la erosión de los suelos, entre otros usos (De la Torre *et al.*, 2008).

### **3.4. LACHEMILLA ORBICULATA (RUIZ & PAVÓN) RYDB.**

*Lachemilla orbiculara* se caracteriza por presentar hábito estolonífero; Hojas basales en rosetas, lámina palmatilobada orbicular-reniforme, cartáceas o subcoriáceas, lóbulos obtusos o redondos, margen crenado-aserrado; peciolo vellosos, sericeos o glabros; carecen de hojas y estípulas distales. Inflorescencias en cimas terminales con brácteas connadas que envuelven parcialmente a las flores; cada flor posee cuatro sépalos y cuatro episépalos, un hipantio campanulado-elongado, dos a cuatro carpelos, estigma subclavado (Perry, 1929; Romoleroux, 2004) (Anexo 1).

Esta especie se distribuye desde Venezuela hasta Perú (Gaviria, 1997; Morales, 2010; Rothmaler, 1937; Romoleroux, 1996). En el Ecuador *Lachemilla orbiculata* ha sido reportada en toda la región andina entre los 2230 y los 4300 m.s.n.m (Romoleroux, 1996).

*Lachemilla orbiculata* conocida como “orejuela” o “plegadera”, en Colombia es utilizada como forraje, astringente y diurética, para el tratamiento de la diarrea, hemorroides, hemorragias intestinales y enfermedades hepáticas (García, 1992).

Se ha analizado la actividad antioxidante de esta especie en una localidad de Colombia, mostrando que el extracto etanólico tiene actividad antioxidante más alta que el extracto comercial del *Rosmarinus officinalis* (Romero) (Argoti *et al.*, 2011).

En el Ecuador *Lachemilla orbiculata* se utiliza para evitar la erosión de los suelos, como forraje de ganado vacuno, caprino y de cuyes (De la Torre *et al.*, 2008), en la comunidad de Zuleta, en la provincia de Imbabura se la conoce como “orejuelo” o “Chitski” (Aguilar *et al.*, 2009).

En este trabajo se presenta un análisis fitoquímico de *Lachemilla orbiculata* que es el primero efectuado en Ecuador.

### **3.5. JUSTIFICACIÓN**

La presente investigación se enfoca en el análisis fitoquímico de *Lachemilla orbiculata* por ser una especie andina ampliamente distribuida en los páramos del Ecuador, de la que no se conocen sus compuestos químicos (Romoleroux, 2004).

Se considera la presencia de fenoles, terpenos y esteroides en diversas especies de la familia Rosaceae (Hassanein, 1999; Kanegusuku *et al.*, 2007; Yau *et al.*, 2002) así como la importancia de estos compuestos para el ser humano (Wolbis *et al.*, 2001; Tomczyk y Latté, K., 2009; Tomczyk, 2010 a, b; Vasco *et al.*, 2009). Además de los usos de *Lachemilla* en la medicina popular y medioambiental (de la Torre *et al.*, 2008; García, 1992) y los conocimientos sobre la actividad antioxidante reportados para una localidad de Colombia. (Argoti *et al.*, 2011)

Esta investigación toma en cuenta la cercanía taxonómica entre los géneros *Lachemilla* y *Alchemilla* (Focke, 1888; Perry, 1929; Rothmaler, 1937; Notov y Kusnetzova, 2004), así como las aplicaciones de *Alchemilla* en la etnobotánica europea.

Así mismo, al ser el suelo un factor determinante para la composición química de las plantas (Cabidot, *et al.*, 1987) se considera las diferencias en los componentes edáficos de las localidades en las que se realiza el estudio (Papallacta y Fierro Urco) como posibles influyentes en las diferencias fitoquímicas de las muestras recolectadas.

El conocimiento de los metabolitos secundarios de *Lachemilla orbiculata* implica aportar a posteriores análisis quimiotaxonómicos, a estudios que permitan sustentar los usos de especies vegetales y argumenta la importancia de la conservación de los páramos.

## **3.6. OBJETIVOS**

### **3.6.1. GENERAL**

Analizar los metabolitos secundarios de *Lachemilla orbiculata* en dos localidades del Ecuador.

### **3.6.2. ESPECÍFICOS**

- Determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios de *Lachemilla orbiculata* en dos localidades del Ecuador.
- Identificar al menos un metabolito secundario presente en *Lachemilla orbiculata*.
- Relacionar la composición del suelo con la composición química de *Lachemilla orbiculata* en dos localidades del Ecuador.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El ecosistema páramo se localiza entre los 3000 y los 5000 m.s.n.m. y los 11 °N y 8 °S de latitud, su distribución es continua a lo largo de los Andes. A pesar de sus condiciones agrestes, la flora vascular del páramo es una de las floras más diversas de las altas montañas tropicales (León- Yáñez, 2000).

En los páramos, las angiospermas son un grupo predominante de plantas, con 101 géneros de monocotiledóneas y 346 géneros de dicotiledóneas agrupados en 85 familias. Rosaceae es una de las 10 familias más diversas, se encuentra representada por 11 géneros y 76 especies (Sklenar *et al.*, 2005).

En el Ecuador, el páramo se extiende en las zonas altas de la Cordillera Andina con una superficie de alrededor de 12.560 km<sup>2</sup> (León- Yáñez, 2000). Se encuentra en 18 de las 24 provincias existentes en la cordillera occidental, oriental y la región austral (Baquero *et al.*, 2004).

En la región andina, los factores geográficos y climáticos juegan un papel importante en la distribución vegetal debido a que en los páramos la formación de “islas” separadas en las áreas del límite superior de los bosques que actúan como refugios interglaciares (Van der Hammen, 2000).

#### 4.1.1. PÁRAMO DE PAPALLACTA

También llamado páramo de la Virgen, se encuentra localizado en la Reserva Ecológica Cayambe Coca en la cordillera oriental entre las provincias de Pichincha y Napo (León- Yáñez, 1993).

La reserva Cayambe-Coca incluye diferentes ecosistemas, como los bosques siempre-verdes montanos bajo y alto, el bosque de neblina, el páramo de pajonal, el páramo pantanoso (Coloma, 2007).

Las familias más diversas del páramo de Guamaní son Asteraceae, Poaceae y Rosaceae. En muchas zonas se encuentran extensiones de almohadillas caracterizadas por la presencia de especies de los género *Diplostephium*, *Plantago*, *Xenophyllum*, *Azorella*; *Diplostephium rupestre* es una de las especies que se encuentra ampliamente distribuíada en algunas zonas del páramo de Papallacta, que junto a *Huperzia crassa*, musgos y líquenes complementan los espacios que no han sido cubiertos por las almohadillas (Lauer *et al.*, 2001; León- Yáñez, 1993).

La cordillera oriental de los Andes, de la que es parte el páramo de Guamaní, está formada principalmente, por rocas metamórficas del precámbrico con esquistos cristalinos de la edad paleozoica-jurásica, adicionalmente contiene arcillas, tobas y areniscas (Hofstede *et al.*, 1998).

En la zona de Papallacta, el suelo se encuentra cubierto por lava y materiales piroclásticos de andesitas y dacitas de origen neoterciario y cuaternario (Sauer, 1965).

#### 4.1.2. PÁRAMO DE FIERRO URCO

Fierro Urco se encuentra en la provincia de Loja, cerca al pueblo Saraguro en el límite del Nudo de Loja junto al Cerro Chinchilla. El páramo se extiende entre los 3100-3700 m.s.n.m. en las zonas de la Cordillera Austral, de Amaluza y de Saraguro (Richter y Moreira-Muñoz, 2005).

El páramo alto tropical de Fierro Urco se caracteriza por suelos húmedos, con tierras heladas que albergan vegetación de tipo arbustivo, generalmente de hasta 1,5 m de alto (Richter y Moreira-Muñoz, 2005).

La flora predominante se compone de *Baccharis genistelloides*, *Chuquiraga jussieui*, *Diplostephium empetrifolium*, *Hieracium frigidum* (Asteraceae), *Blechnum aurantium* (Blechnaceae) *Brachyotum andreanum* (Melastomataceae), *Escallonia myrtilloides* (Grossulariaceae), *Huperzia reflexa* (Lycopodiaceae), *Hypericum decandrum* (Hypericaceae), *Gaultheria amoena*, *Macleania rupestris*, *Pernettya prostrata*, *Vaccinium floribundum* (Ericaceae), *Neurolepis elata*, *N. laegaardii*, *Chusquea neurophylla* (Poaceae), *Puya eryngioides*, *Puya nitida* (Bromeliaceae), existen grandes extensiones dedicadas a la agricultura y la ganadería donde prevalecen cultivos alimenticios y pastizales de *Calamagrostis macrophylla*, *Stipa ichu* y *S. rosea* (Poaceae) (Richter y Moreira-Muñoz, 2005).

Los suelos de la región austral provienen de tobas volcánicas del neoterciario, han sido afectados por las glaciaciones, y se encuentran parcialmente cubiertos por un paleosuelo ferralítico muy arcilloso (Podwojewski y Poulenard, 2000; Sauer, 1965).

## **4.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

Las muestras fueron recolectadas directamente de su hábitat en dos salidas de campo en el mes de abril y mayo del 2011 en las localidades de Fierro Urco y Papallacta.

Se recolectó especímenes de *Lachemilla orbiculata*, se seleccionó las hojas (lámina y peciolo) hasta completar un kilo de material fresco; se las secó a temperatura ambiente por una semana, se las tamizó para desechar la tierra e impurezas y se las trituroó. Tabla 1. Figuras 1, 2.

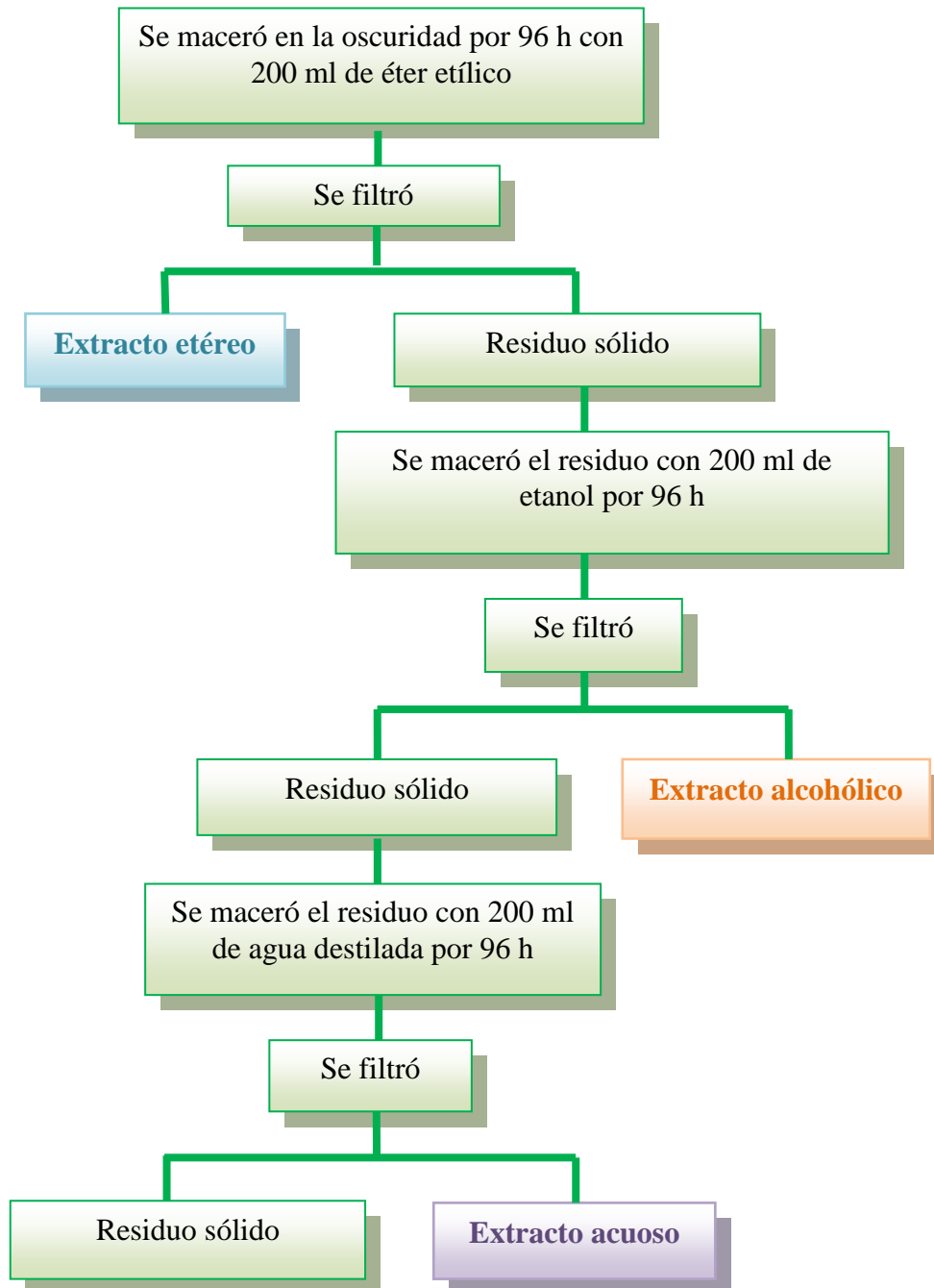
Además se tomó muestras de suelo de los 10 cm superficiales en el lugar en que se colectó a *Lachemilla orbiculata* (Figura 3). Se guardó el material a 4 °C.

Se recolectó especímenes para el Herbario QCA y el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).

## **4.3 PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES**

Las hojas de *Lachemilla orbiculata* fueron secadas al ambiente por una semana. Se trituroó y pesó 37,9 g del material para ser sometido a tres extracciones sucesivas según la metodología descrita por Migdalia y Culler (2001) según el siguiente esquema.

## OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES



Las pruebas en cada extracto fueron realizadas por triplicado.

### 4.3.1 ANÁLISIS A PARTIR DEL EXTRACTO ETÉREO

#### Ácidos grasos

- **Sudan III:** A 5 ml del extracto se añadió 1 ml de la solución de Sudan III, se calentó en baño de agua a 65 °C por 10 min. hasta que se evapore parte del solvente.

#### Alcaloides

- **Dragendorff:** Se calentó en baño de agua 5 ml de extracto durante 1 h, se dejó evaporar 3 ml del solvente, se añadió 1 ml de ácido clorhídrico al 1% en agua; se adicionó tres gotas del reactivo de Dragendorff.
- **Mayer:** Se procedió igual que con la prueba de Dragendorff, una vez obtenida la solución ácida se añadió 0,5 g de cloruro de sodio en polvo, se agitó y se adicionó tres gotas del reactivo de Mayer.
- **Wagner:** Se procedió igual que con la prueba de Dragendorff, a la solución ácida se añadió tres gotas de reactivo de Wagner.

#### Compuestos lactónicos

- **Baljet:** Se calentó 5 ml de extracto en baño de agua por 1 h, se evaporó 3 ml del solvente; se añadió 1 ml de alcohol y 1 ml del reactivo de Baljet.

#### Triterpenos y esteroides

- **Liebermann Burchard:** Se evaporó el solvente de 2 ml de extracto, se adicionó 1 ml de cloroformo y 1 ml de anhídrido acético, se mezcló bien. Por las paredes del tubo se dejó resbalar tres gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

#### 4.3.2. ANÁLISIS A PARTIR DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO

##### **Catequinas**

- **Ensayo de catequinas:** Se tomó 1 ml de la solución con un capilar y se la aplicó sobre un papel filtro. Sobre la mancha se adicionó una solución de carbonato de sodio.

##### **Resinas**

- **Ensayo de resinas:** A 2 ml del extracto se adicionó 10 ml de agua destilada.

##### **Compuestos lactónicos**

- **Ensayo de Baljet:** A 2 ml del extracto se le añadió 1 ml del reactivo de Baljet.

##### **Saponinas**

- **Ensayo de la espuma:** Se diluyó 2 ml del extracto con 10 ml de agua y se mezcló fuertemente durante 10 min.

##### **Compuestos fenólicos y/o taninos**

- **Ensayo de cloruro férrico:** Se tomó 2 ml del extracto, se le agregó 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en una solución salina fisiológica.

### **Aminas y Aminoácidos libres**

- **Ensayo de nihidrina:** Se tomó 2 ml del extracto y se mezcló con 2 ml de solución al 2% de nihidrina en agua. Se calentó la mezcla en baño de agua durante 10 min.

### **Quinonas**

- **Ensayo de Borntrager:** Se evaporó 1 ml del solvente en baño de agua, se le agregó 1 ml de cloroformo y 1 ml de hidróxido de sodio al 5 % en agua. Se agitó y dejó en reposo hasta su ulterior separación.

### **Flavonoides**

- **Ensayo de Shinoda:** A 2 ml del extracto alcohólico se añadió 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y una cinta de magnesio metálico. Se dejó en reposo durante 5 min., se adicionó 1 ml de alcohol amílico, se mezcló y dejó reposar.

### **Estructuras de secuencias C3-C6-C3 del grupo flavonóico**

- **Ensayo de Antocianidina:** Se calentó 2 ml del extracto etanólico y 1 ml de HCL concentrado durante 10 minutos. Se dejó enfriar y se adicionó 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico. Se agitó y se dejó separar las dos fases.

### **Alcaloides**

- **Ensayo de Dragendorff, Meyer y Wagner:** Se tomó 2 ml del extracto y se procedió de la misma forma que con los extractos etéreos.

### **Azúcares reductores**

- **Ensayo de Fehling:** Se evaporó 1 ml del solvente de una alícuota de 2 ml, se adicionó 2 ml de agua y 2 ml del reactivo, se calentó a baño de agua a 40 °C por 10 min.

### **Triterpenos y/o esteroides**

- **Ensayo de Liebermann Burchard:** Se evaporó 1 ml del solvente de 2 ml de extracto; se adicionó 1 ml de cloroformo y 1 ml de anhídrido acético, se mezcló bien. Por las paredes del tubo se dejó deslizar tres gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

## **4.3.3. ANÁLISIS A PARTIR DEL EXTRACTO ACUOSO**

### **Mucílagos**

- **Ensayo de Mucílagos:** Se tomó 2 ml del extracto, se enfrió a 5 °C por 10 min.

### **Alcaloides**

- **Ensayo de Dragendorff, Meyer y Wagner:** Se tomó 2 ml del extracto y se procedió de la misma forma que con los extractos etéreos y alcohólicos.

### **Taninos:**

- **Ensayo de cloruro férrico:** A 2 ml del extracto se añadió acetato de sodio y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica.

### **Flavonoides**

- **Ensayo de Shinoda:** Se añadió 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedazo de cinta de magnesio metálico a 2 ml del extracto. Se esperó 5 min. después de la reacción y se añadió 1 ml de ácido amílico, se mezcló y se dejó reposar hasta que las fases se separen.

### **Azúcares reductores**

- **Ensayo de Feheling:** A 2 ml del extracto se añadió 2 ml del reactivo, se calentó a baño de agua a 40 °C por 10 min.

### **Saponinas**

- **Ensayo de la espuma:** Se agitó 2 ml del extracto en un tubo de ensayo por 10 min.

## **4.4. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

Se trabajó con una muestra de Fierro Urco (S03°41'40,7" W079°18'07,8"; 3023 m.s.n.m) y una muestra de Papallacta (S00°22'31,6" W078°09'08,3"; 3376 m.s.n.m).

### **4.4.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Los extractos alcohólicos fueron realizados según la Tabla 2, se dejaron macerar por 96 h en un recipiente cerrado en la oscuridad. Posteriormente, se colocó las muestras en

un Rotavapor Heidolph a 40 °C hasta que el alcohol se evapore totalmente, se recogió el extracto adherido a las paredes con 30 ml de acetona, se lo colocó en un baño seco Digital DryBath Labnet a 37 °C durante una noche hasta que se evapore el acetona. Las características de los extractos se muestran en la Tabla 3.

Las muestras se refrigeraron a 4°C hasta ser transportada al Laboratorio de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) donde se realizó la determinación total de fenoles, la cromatografía de columna y de capa fina, y el análisis de resonancia magnética nuclear.

#### **4.4.2 DETERMINACIÓN TOTAL DE FENOLES**

La determinación de los fenoles totales se realizó utilizando el método Folin-Ciocalteu citado por Thaipong *et al.* (2006). A 150 µl del extracto alcohólico seco se adicionó 2400 µl de agua destilada, 150 µl de Folin 0,25 N. Se agitó por 2 min., se dejó reaccionar por 3 min., se agregó 300 µl de carbonato de sodio 1 N, se dejó reposar por 2 h en la oscuridad, se midió las absorbancias en el espectrofotómetro modelo 6400 Jenway, New York, USA a 725 nm, se reportó el valor promedio de 5 repeticiones (Ovaca y Pineda, 2011).

Los estándares se realizaron con una solución stock de 0,0268 g en 100 ml (260 ppm) de ácido gálico en metanol, se realizaron alícuotas de 0,4; 1; 2; 4 ml y se aforó a 10 ml de metanol (Ovaca y Pineda, 2011).

Se tomó 150 µl de cada concentración y se sumó 2400 µl de agua destilada, 150 µl

de Folin 0,25 N, se agitó a temperatura ambiente por 2 min, se dejó reaccionar por 3 min, se agregó 300 µl de carbonato de sodio 1 N (en agua), se dejó reposar por 2 h en la oscuridad, se determinó las absorbancias a 725 nm (Gutiérrez *et al.*, 2008; Ovaca y Pineda, 2011; Thaipong *et al.*, 2006).

Se determinó la cantidad total de fenoles utilizando la fórmula  $C=cV/m$  donde  $c$  es la concentración de ácido gálico (absorbancia),  $V$  es el volumen de la muestra y  $m$  la cantidad de extracto etanólico seco con el que se realizó el análisis (Argoti *et al.*, 2011).

#### **4.4.3. CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA Y CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)**

Se realizó un fraccionamiento inicial con hexano y diclorometano en un embudo de decantación. Se recolectó la fase más densa, la del diclorometano, se dejó evaporar el solvente y con 5 g del extracto seco más 10 g de sílica gel en polvo (Merck 0.015-0.040 mm) se elaboró una mezcla conocida como papina.

Se insertó un tampón de algodón en una bureta, se añadió de 90 g de sílica gel en polvo (Merck 0.015-0.040 mm), se compactó bien la columna, se aplicó la papina y los solventes no polares (Fase móvil) (Fox & Whitesell, 2000) en concentraciones que incrementaban la polaridad cada cinco unidades de acetato de etilo en Hexano. Figura 4.

Se realizaron cromatografías de capa fina de cada fracción con placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> MERCK (fase directa de 250 µm) en las que se colocó las muestras a 1 cm del extremo inferior de la placa, se la sumergió en los solventes, y se dejó correr 4,5 cm, se

calcularon los Rfs (factores de retención) correspondientes. Los solventes utilizados para la fase móvil fueron: Hexano: Acetato de etilo (1:1). El revelado se realizó con luz de 254 y 365 nm, con ácido sulfúrico, vainillina y calor.

Una vez que se obtuvieron las fracciones se dejó evaporar el solvente y se agregó metanol para disolver compuestos polares y dejar que se precipiten las partículas no polares. Se realizó TLCs individuales del compuesto precipitado redisolto en gotas de diclorometano. Se midió el punto de fusión del compuesto en un equipo *Fisher Johns (Melting point apparatus)*. Anexo 2.

#### **4.4.4. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)**

La Resonancia magnética nuclear es una técnica espectroscópica que determina la estructura molecular de un compuesto puro, informa sobre la configuración y simetría de la molécula. En la RMN se pueden observar únicamente compuestos que contengan núcleos magnéticos ya que los estados de transición del espín nuclear se miden excitando los núcleos de la muestra con pulsaciones de radiofrecuencia y observando el entorno de la magnetización (Shriver *et al.*, 1998)

Se disolvió en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) 10 mg del compuesto aislado en las fracciones 8 y 9 de Fierro Urco, se inyectó la muestra en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear Varian 400 MHz. (Anexo 3). Se realizaron pruebas de protones, carbonos y DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer).

De la muestra de Papallacta se disolvió 6,9 mg del compuesto en  $\text{CDCl}_3$  y se

realizaron los mismos análisis que para la muestra de Fierro Urco.

#### **4.5. ANÁLISIS DE SUELOS**

La determinación de cationes, pH y de materia orgánica de las muestras de suelos fue realizada en el Instituto de Análisis de Suelos y Aguas del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES

En los extractos etéreos, utilizando las pruebas de Dragendorff, Meyer y Wagner se observó la presencia de alcaloides en los tres extractos por la aparición de precipitados, opalescencia y turbidez. En el Análisis de Dragendorff, la muestra de Fierro Urc tuvo un positivo más evidente (Tabla 4. Figuras 5, 6, 7).

La prueba de Liebermann-Burchard reveló la presencia de triterpenos con un precipitado acompañado de cambio de coloración de verde a verde oscuro o negro (Figura 9); la presencia de compuestos lactónicos se evidenció con un precipitado rojo en la prueba de Baljet para los tres extractos (Tabla 4. Figura 9).

En el extracto etéreo se realizó también la prueba para ácidos grasos en la que no hubo una reacción positiva en ninguno de los tres extractos (Tabla 4).

En los extractos alcohólicos, el ensayo de Baljet reaccionó positivamente para la presencia de compuestos lactónicos con un precipitado rojo en las tres muestras (Tabla 5. Figura 10).

La presencia de triterpenos y esteroides en el mismo extracto fue evidenciada con una coloración verde oscura en donde la muestra de Fierro Urco presentó mayor intensidad como producto de la prueba de Liebermann-Burchard (Tabla 5. Figura 11).

La presencia de fenoles y taninos fue revelada con una coloración inicial rojiza, y posteriormente verde intensa (Tabla 5. Figura 12).

Las pruebas de quinonas realizadas con el ensayo de Borntrager evidenciaron una coloración rojo intensa, un positivo evidente en los tres extractos (Tabla 5. Figura 13).

Se observó la presencia de flavonoides con el ensayo de Shinoda en el que los tres extractos manifestaron una reacción positiva con un cambio de coloración de verde a rojizo en todos los casos, las dos muestras de Papallacta tuvieron coloraciones más intensas (Tabla 5. Figura 14).

Las pruebas para alcaloides: Dragendorff, Mayer y Wagner produjeron una reacción positiva con opalescencia, turbidez y la aparición de un precipitado según se indica en la Tabla 5 para las tres muestras, aunque el ensayo de Dragendorff reaccionó con mayor opalescencia en el extracto de Fierro Urco (Tabla 5. Figuras 15, 16, 17 respectivamente).

En los extractos alcohólicos de las tres muestras se observó resultados negativos para la presencia de catequinas, resinas, azúcares reductores saponinas, aminoácidos y antocianidinas (Tabla 5).

En el extracto acuoso se observó la presencia de alcaloides con las pruebas de Dragendorff, Mayer y Wagner, en donde los resultados fueron más evidentes para la prueba de Wagner (Tabla 6. Figuras 18, 19, 20).

Para el mismo extracto, la presencia de fenoles y taninos fue positiva con una coloración violeta-rojiza en los tres extractos (Tabla 6. Figura 21). La prueba de Shinoda mostró también una reacción positiva, evidenciando la aparición de flavonoides (Tabla 6. Figura 22)

En este extracto se observó una reacción positiva para los azúcares reductores debido al ensayo realizado con el Reactivo de Felhing, los extractos tuvieron una coloración rojiza (Tabla 6 Figura 23).

En los tres extractos acuosos no hubo reacciones positivas para las pruebas de saponinas y mucílagos (Tabla 6).

## **5.2. DETERMINACIÓN TOTAL DE FENOLES**

La absorbancia de las soluciones de ácido gálico se estableció desde 0 hasta 0,467 nm según se indica en la Tabla 7, los resultados incrementan de forma proporcional a las concentraciones de cada solución.

La ecuación de la recta elaborada a partir de las absorbancias del ácido gálico fue de  $Y=0,0045X-0,0119$  con un  $R^2=0,9915$ .

Los resultados obtenidos se encuentran expresados como el equivalente del ácido gálico usando la ecuación  $C=cV/m$ , donde  $c$  (mg/ml) es la concentración de ácido gálico obtenido de la regresión de la recta ( $Y=0,0045X-0,0119$  con un  $R^2=0,9915$ ),  $V$  (ml) es el volumen de la solución de extracto analizado, y “ $m$ ” (g) es el peso del extracto seco con el que se realizó la solución. El contenido total de fenoles en Fierro Urco fue 356,35 mg EAG/g y 368,8 mg EAG/g en Papallacta (Tablas 7 y 8. Figura 24).

### 5.3. CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

En la muestra de Fierro Urco se obtuvieron 68 fracciones de 200 ml, de las cuales dos eluyeron con hexano al 100%; seis con hexano y acetato de etilo en relación 90:10; 51 con hexano, acetato de etilo en relación 85:15, y 9 con hexano, acetato de etilo en proporción 75:25.

De la muestra de Papallacta se obtuvieron 15 fracciones de 200 ml, de las cuales tres eluyeron con hexano al 100%; 10 con hexano y acetato de etilo en relación 90:10, y 2 con hexano, acetato de etilo en relación 85:15.

Las TLCs (Cromatografía de capa fina) aplicadas a cada fracción mostraron la presencia de clorofilas debido a que éstas presentaron coloraciones rojizas en la luz de 365 nm, grises en la luz de 254 nm y verdes después del revelado con vainillina y ácido sulfúrico (Tabla 9).

Además se obtuvo manchas con varias coloraciones con Rfs diferentes en las TLCs, que denotan varios metabolitos secundarios, los cuales no pudieron ser determinados debido a que no eluyeron cantidades altas como para realizar los análisis que identifiquen dichos compuestos.

Los Rfs de los metabolitos obtenidos varían entre 0,933 a 0,30 en Fierro Urco; y para Papallacta, entre 0,95 y 0,55 lo que indica que los compuestos fraccionados son no polares en su gran mayoría.

En todas las TLCs de las fracciones de Papallacta y en 56 de las 68 fracciones de Fierro Urco se revelaron coloraciones plomizas o plomizas-violetas después del revelado.

El perfil cromatográfico de *Lachemilla orbiculata* realizado para compuestos no polares, permite la confirmación del grupo químico de compuestos, en su mayoría terpenos. Sin embargo, la mayoría de fracciones no mostraron ningún precipitado, por lo que no se las pudo analizar con otras técnicas.

De la muestra de Fierro Urco las fracciones 8 y 9 purificadas contenían un precipitado blanquecino, al igual que la fracciones 7 de Papallacta. Las características, incluyendo los puntos de fusión constan en la tabla 11 y en las figuras 25 y 26.

#### **5.4. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)**

El análisis  $^1\text{H}$  de la muestra de Fierro Urco mostró 17 señales, de las cuales seis (1,008; 0,913; 0,864; 0,822; 0,806 y 0,68) corresponden a desplazamientos de 3 H, siete corresponden a 1 H y cinco señales no se pudieron identificar. Las señales encontradas corresponden a hidrógenos de los carbonos C<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>27</sub> y C<sub>18</sub>, y un H corresponde al grupo OH unido al C<sub>3</sub>. En algunos casos, más de un hidrógeno corresponde a un solo carbono. (Tabla 12, Figura 27 y 28).

En la muestra de Papallacta se obtuvieron 27 señales pertenecientes a hidrógenos, de las cuales seis (1,009; 0,914; 0,846; 0,823; 0,806 y 0,681) corresponden a desplazamientos de 3H, una (1,49) a desplazamientos de 2 H, diez a desplazamientos de 1 H, ocho señales no pudieron ser identificadas. Las señales fueron de hidrógenos de diferentes carbonos: C<sub>1</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> y C<sub>18</sub>, algunos

hidrógenos fueron de los mismos carbonos y 1 H pertenece al grupo OH unido al C<sub>3</sub> (Tabla 12. Figuras 27 y 29).

En el análisis de <sup>13</sup>C para la muestra de Fierro Urco se observaron 28 señales (además de las señales del solvente) que correspondían a carbonos de diferentes tipos: C, CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> determinados con el análisis DEPT (Tabla 15. Figuras 27 y 30, 32. Anexos 4 y 5).

En el análisis de <sup>13</sup>C del compuesto aislado de la muestra de Papallacta se observaron 29 señales (además de las señales del solvente) que correspondieron a diferentes tipos de Carbonos: C, CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, con la particularidad que para el C<sub>25</sub> se observaron dos señales: 29,321 y 29,855 las que se tomaron en cuenta como una sola señal para dicho carbono (Tabla 13, Figuras 27, 31 y 33).

Las diferencias en los desplazamientos de los carbonos en cada una de las muestras varían entre sí, mostrando valores ligeramente más altos en el espectro del compuesto de Papallacta, las diferencias poseen un promedio de 0,188, siendo la más elevada 0,70 para al C<sub>25</sub> y la más baja de 0,169 (Tabla 14).

Los C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub> tuvieron una misma señal duplicada que se expresó en un mismo pico a un desplazamiento de 31,900 ppm (Tabla 14).

Todos estos análisis mostraron que se trata del mismo compuesto terpénico aislado de las muestras de las dos localidades, un estero: el estigmasterol (Figura 27).

## 5.5. ANÁLISIS DE SUELOS

Los análisis de suelos revelaron que los compuestos más abundantes para la muestra de Fierro Urco son el nitrógeno y el hierro según se indica en las tablas 15 y 16, figuras 34, 35 (anexo 6), otra característica de esta muestra es la alta cantidad de materia orgánica (14,10%) y el pH ácido (4,97), mientras que los compuestos con menor proporción fueron el calcio y el boro. (Tablas 15, 16 y 17. Figuras 36 y 37. Anexo 6).

En la muestra de suelo de Papallacta existió mayor concentración de hierro; en cambio el magnesio y el boro son los que tienen menor cantidad, según se observa en las tablas 17 y 18, figuras 36, 37 y el anexo 7. El pH de esta muestra fue ácido (5,25); el contenido de materia orgánica fue de 8,20% (Tablas 15, 16 y 17. Figuras 36 y 37. Anexo 7).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES

Las pruebas fitoquímicas preliminares revelaron que el extracto alcohólico es el que recoge más metabolitos secundarios en comparación con los extractos etéreos y acuosos, estos resultados concuerdan con los reportados para otras especies de diferentes familias (Oliveira *et al.*, 2008).

Cáceres *et al.* (2005) sugieren que los aceites esenciales son las sustancias que contienen mayor cantidad de metabolitos secundarios, sin embargo, *Lachemilla orbiculata* no posee aceites esenciales según lo observado con el ensayo de Sudan III que resultó negativo para los tres extractos, y que conjuntamente con la ausencia de exudaciones verdosas y de un olor característico indican que *L. orbiculata* no es una especie aromática (Skaria *et al.*, 2007).

En los extractos etéreos, alcohólicos y acuosos los resultados para alcaloides fueron positivos, lo que indica que, posiblemente en *Lachemilla orbiculata*, estos se encuentran formando sales con otros compuestos polares y bases con moléculas no polares (Chávez *et al.*, 2007; Repetto y Repetto, 2009). La presencia de alcaloides en *L. orbiculata* podría tener importancia farmacológica y quimiotaxonómica debido a que en Rosaceae contribuyen con las propiedades antisépticas de *Rubus idaeus*, además de que han permitido definir la historia geológica de poblaciones de *Spireae japonica* en China (Cobzac *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

Existieron diferencias en la intensidad de las reacciones ocurridas con las pruebas de Dragendorff, Wagner y Mayer para alcaloides, probablemente debido a la concentración

de estos compuestos en cada uno de los extractos o a la sensibilidad de las pruebas para detectar cantidades pequeñas de compuestos (Chávez *et al.*, 2007).

La prueba de azúcares reductores fue positiva para las tres muestras evidenciando, probablemente la presencia de glucosa y otros azúcares reductores reportados para géneros de Rosaceae como *Pyrus* y *Malus*, donde la presencia de estos metabolitos incrementa el potencial alimenticio de los frutos (Shakir *et al.*, 2007).

En los extractos alcohólicos y acuosos, las hojas de *Lachemilla orbiculata* presentaron fenoles, posiblemente relacionados con la pigmentación de los pecíolos o con la protección contra rayos UV de las hojas (Simões *et al.*, 2004).

Los compuestos fenólicos encontrados coinciden con los reportados para *Alchemilla*, el género hermano de *Lachemilla*, en donde los flavonoides explican los usos de especies del género en el tratamiento de enfermedades (Adegboye *et al.*, 2008; Condrat *et al.*, 2010; Nikitina *et al.*, 2007).

Algunos compuestos fenólicos registrados en *Lachemilla orbiculata* como taninos, flavonoides y quinonas coinciden con las características quimiotaxonómicas de la familia Rosaceae (Edeoga *et al.*, 2005; Judd *et al.*, 2008) y están presentes en hojas, flores y frutos de los géneros *Prunus*, *Rubus*, *Malus*, *Potentilla*, en los que se ha demostrado su capacidad antioxidante, su actividad antimicrobial, sus posibles usos a nivel comercial y en la nutrición humana (Oszmianski *et al.*, 2007; Scalbert, 1991; Vasco *et al.*, 2009; Yau *et al.*, 2002).

Los terpenos encontrados en *Lachemilla orbiculata* pueden estar relacionados con propiedades antiinflamatorias, como es el caso de las hojas y flores de *Prunus spinosa* donde la presencia de terpenos y esteroides corroboran los usos de la especie (Wolbis *et al.*, 2001).

Se ha confirmado la presencia de terpenos de tipo lactónico, reportados como constituyentes de aromas de algunas especies de *Prunus* (Gómez y Ledbetter, 2010), y que en *Lachemilla orbiculata* pueden cumplir funciones similares, sin embargo los resultados fueron negativos para la presencia de saponinas en los extractos acuosos y alcohólicos, al igual que en especies de Rosaceae del género *Cydonia*, mientras que en *Rubus brasiliensis* han sido identificados en varias partes del hábito (Edeoga *et al.*, 2005; Pateh *et al.*, 2011).

Se obtuvo resultados negativos para la presencia de resinas y mucílagos al igual que en *Cydonia vulgaris*, sin embargo, estos metabolitos se encuentran asociados al epicarpio de las frutas y semillas en numerosas familias, incluyendo Rosaceae (Edeoga *et al.*, 2005; Pateh *et al.*, 2011; Parlato, 2011).

La ausencia de catequinas y antocianidinas en *Lachemilla orbiculata* difiere de los resultados obtenidos para *Pyrus*, *Malus* y *Alchemilla* (González *et al.*, 2001; Madhuri y Pandey, 2009; Pfeiffer *et al.*, 2006) que han sido consideradas como características químicas de la familia Rosaceae, por lo que su ausencia podría ser una característica quimiotaxonómica del género.

Las pruebas que arrojaron resultados negativos no comprueban definitivamente la inexistencia de tales metabolitos, ya que pueden explicarse, en parte a la sensibilidad de la prueba para caracterizar pequeñas concentraciones de sustancia o a la interferencia de otros compuestos en la reacción de reconocimiento (Chávez *et al.*, 2007).

## **6.2 DETERMINACIÓN TOTAL DE FENOLES**

El contenido total de fenoles de la muestra de Fierro Urco es de 356,35 mg EAG/g y el de la muestra de Papallacta es de 368,8 mg EAG/g. La diferencia entre los valores es de

12,56 mg. Al comparar ambos valores con el valor reportado para *Lachemilla orbiculata* en una localidad de Colombia (134.49 mg EAG/g), las muestras de Fierro Urco y Papallacta tienen un incremento de 221,86 mg y 234,31 mg EAG/g en el contenido total de fenoles.

Estas diferencias pueden explicarse por las circunstancias climáticas, la época del año en la que se recolectó el material, las características del suelo: pH, cantidad de nutrientes o incluso a factores genotípicos que juegan un rol importante en la producción de algunos tipos de fenoles como antocianinas, flavonoides (Dragovic *et al.*, 2010; Macrecoft *et al.*, 1992).

Varios autores han reportado diferencias en el contenido total de fenoles en los frutos de *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae), entre 358.7 mg EAG/100 g y 528.2 mg EAG/100 g de material fresco, atribuyendo estas diferencias a las condiciones mediambientales de los cultivos, lo que podría explicar, también las diferencias en el contenido total de fenoles de *Lachemilla orbiculata* en las dos localidades analizadas (Dragovic *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2003).

Así mismo gran parte de la actividad biológica de los extractos de *Potentilla* (Rosaceae) es descrita a partir de su alto contenido fenólico (Connor *et al.*, 2002). Se ha reportado para una especie del género una variación en el contenido total de fenoles de  $49.9 \pm 1.5$  mg EAG/g hasta  $116.3 \pm 3.9$  mg EAG/g de material seco (Tomczyk *et al.*, 2010b).

Los valores reportados en *Potentilla* son similares a los encontrados en *L. orbiculata* por Argoti *et al.* (2011), sin embargo los resultados fueron duplicados para las muestras recolectadas en Fierro Urco y Papallacta. Considerando que los datos obtenidos para *Vaccinium corymbosum* están expresados por cada 100 g de material fresco, y que en *Lachemilla orbiculata* tanto Argoti *et al.* (2010) como en este trabajo se obtuvieron valores expresados por cada gramo de material seco, se puede señalar que los extractos obtenidos

del material seco de *L. orbiculata* tienen un alto contenido fenólico.

El contenido total de fenoles está relacionado directamente con la actividad antioxidante debido a que los fenoles poseen propiedades redox, y actúan como agentes reductores, donadores de hidrógeno (Connor *et al.*, 2002; Harrison y Were, 2007; Rice-Evans *et al.*, 1997). El contenido total de fenoles y las características antioxidantes han sido reportadas anteriormente en la especie y en la familia Rosaceae (Argoti *et al.*, 2011; Kiselova *et al.*, 2006; Nikitina *et al.*, 2007; Vasco *et al.*, 2009).

Metodológicamente, se debe considerar que la curva de calibración en el rango de las concentraciones examinadas, demostró ser lineal por tener un coeficiente de correlación de 0,99. Además se ha demostrado que el método espectrofotométrico, utilizado en la cuantificación de fenoles es preciso en el análisis cuantitativo de algunos metabolitos secundarios como los fenoles (Velázquez, 2004).

La técnica para determinar el contenido total de fenoles con el Reactivo de Folin-Cicalteo ha sido ampliamente utilizada (Argoti *et al.*, 2011; Dragovic *et al.*, 2010), sin embargo el método no proporciona una caracterización del tipo de compuestos polifenólicos de las muestras (Tomczyk *et al.*, 2010b) por lo que en estudios quimiotaxonómicos no debe usarse el contenido total de fenoles, sino la identificación de los mismos en las especies de un mismo clado.

### **6.3 CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA Y DE CAPA FINA**

Durante el fraccionamiento, de la columna cromatográfica de la muestra de Fierro Urco eluyeron 68 fracciones, mientras que de la muestra de Papallacta 15. La diferencia de

la velocidad con la que eluyeron los compuestos puede deberse a condiciones experimentales: diferencias en el diámetro de las columnas o de la abertura por donde eluyeron las fases móviles de cada caso o a la presión ejercida sobre la fase estacionaria (Freifelder, 2003).

Varios Rfs que constan en las tablas 9 y 10 coinciden con los reportados en la literatura para compuestos fenólicos, sin embargo las coloraciones observadas bajo la luz de 365 nm y con el revelado de vainilla, ácido sulfúrico y calor no fueron amarillas o anaranjadas como se espera para los fenoles (Aldana, 2007; Seigler *et al.*, 2002), descartando su presencia en las fracciones no polares.

Así mismo, las manchas en las TLCs con Rfs entre 0,19 y 0,86 después del revelado con vainillina, ácido sulfúrico y calor se tornaron de coloración azul o violeta, como se observa en la Figura 26, según Sánchez *et al.* (2010) estas características son típicas de compuestos terpénicos.

La selección del compuesto terpénico a ser purificado de cada extracto analizado, se realizó debido a que fue el compuesto mayoritario entre las fracciones no polares obtenidas, y en consideración de que tradicionalmente la fitoquímica se ha encargado del estudio e identificación de los metabolitos secundarios con mayor concentración (Cechinel y Yunes, 1998).

Otros compuestos no polares observados en el fraccionamiento fueron clorofilas (identificadas por presentar con el revelado químico coloraciones verdes y bajo la luz de 254 nm coloraciones plomas) que verifican la capacidad de elusión de la fase móvil, sin embargo, considerando que gran parte de los metabolitos secundarios pueden ser aislados con solventes de polaridad intermedia, como se confirmó en la marcha fitoquímica, no se descarta la posibilidad de encontrar otros compuestos químicos en concentraciones

importantes con solventes semipolares y polares en la fase móvil (Valdivieso, 2010).

Posteriormente se determinó su punto de fusión en los compuestos aislados. Estos resultados son similares en ambos casos y concuerdan con los reportados para el estigmasterol (Steele y Mosettig, 1963).

#### **6.4 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)**

Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos con la técnica de RMN son típicos de compuestos terpénicos, esteroidales debido a que la mayoría de señales del  $^1\text{H}$  NMR se sobrelapan en multipletes (grupos de más de tres señales) en la región de bajo desplazamiento químico (Forgo y Kövér, 2004).

La identificación de moléculas esteroidales se realizó a través de señales características, entre estas las correspondientes al hidroxilo, las de los grupos metilo y a los enlaces dobles fuera de los anillos (Forgo y Kövér, 2004).

Las señales que se tomaron en cuenta fueron el singlete del desplazamiento químico 7,260 ppm para la muestra de Fierro Urco y Papallacta. Este hidrógeno tiene el mayor desplazamiento, por lo que se puede tratar de radicales como R-OH,  $\text{CHCl}_3$ , se debe tomar en cuenta que la influencia química de los compuestos aledaños a cada hidrógeno pueden variar su desplazamiento (Hesse *et al.*, 1999).

El desplazamiento en duplete que en la muestra de Fierro Urco y Papallacta se encuentran en aproximadamente 5,4 ppm en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN corresponden a señales de los  $\text{C}_{22}$  y  $\text{C}_{23}$  reportados en la literatura como los únicos dobles enlaces fuera de los anillos, se desplazan a valores similares por formar parte del mismo doble enlace, y por que los hidrógenos circundantes tienen características similares. (De-Ekamkul y Potduang,

2003; Forgo y Kövér, 2004; Subhadhirasakul y Pechpongs, 2005). Las señales de los C<sub>22</sub> y C<sub>23</sub> son las únicas que diferencian al stigmasterol del  $\beta$ -sitosterol, un fitoesterol que carece de un doble enlace entre los carbonos señalados, y en cuyo caso el número de hidrogenos de los C<sub>22</sub> y C<sub>23</sub> produce desplazamientos diferentes (De-Ekamkul y Potduang, 2003).

Otros desplazamientos determinantes para el estigmasterol fueron los correspondientes a las señales de menor desplazamiento equivalentes a señales de los grupos CH<sub>3</sub> de los C<sub>18</sub> de cada muestra debido a que fueron fácilmente identificables en los espectros y concuerdan casi exactamente con los reportados en la literatura (Forgo y Kövér, 2004).

En el espectro de <sup>13</sup>C NMR, sin las señales del solvente (tres para Fierro Urco y cinco para Papallacta), la muestra de Fierro Urco posee 28 señales y la de Papallacta 29. El C<sub>25</sub> en la muestra de Fierro Urco corresponde a 29,151 ppm y que en el análisis DEPT se observa como un CH, mientras que en la muestra de Papallacta corresponde a dos señales: 29,855 y 29,321 ppm esto ocurre debido a que la intensidad relativa de una señal en la espectroscopia de RMN protón y de carbón es proporcional al número de protones y carbonos que contribuyen a la señal (Hesse *et al.*, 1999) y a que la curva de integración definida para cada espectro <sup>13</sup>C puede variar por la cantidad de la muestra analizada, por la presencia de impurezas y a condiciones externas que varían la sensibilidad del equipo (Hesse *et al.*, 1999)

Las señales correspondientes a 31,9 ppm en la muestra de Fierro Urco y 32,07 ppm en la muestra de Papallacta son señales que se encuentran duplicadas para dos carbonos: CH<sub>2</sub> y CH, debido a que los tiempos entre los impulsos provocados por carbonos similares fueron demasiado cortos como para permitir la relajación de los sistemas de spins de ambos

carbonos y producir dos señales, apareciendo como una sola (De-Eknamkul y Potduang, 2003; Forgo y Kövér, 2004; Hesse *et al.*, 1999).

En el análisis DEPT los acoplamientos  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  se replican en otros campos: una señal de un  $\text{CH}_3$  puede observarse también en el campo correspondiente a los  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}$  por las interacciones de los núcleos atómicos cuando se relajan los spins. Para minimizar los errores fue necesario comparar los datos obtenidos en el espectro  $^{13}\text{C}$  NMR con los resultados del análisis DEPT (Duddeck *et al.*, 2000) de forma que solo los desplazamientos con valores detectados por el equipo para el espectro de  $^{13}\text{C}$  y los reportados en el DEPT sean los que se toman como señales de cada carbono.

Los desplazamientos químicos de los espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR de Fierro Urco y de Papallacta muestran diferencias entre 0,17 y 0,7 ppm, teniendo un promedio de 0,188 en los desplazamientos de las muestras. Estas diferencias son químicamente no significativas y pueden deberse a las condiciones experimentales en las que fueron realizadas las resonancias, confirmandose que se trata de la misma molécula en las dos localidades (De-Ekamkul y Potduang, 2003; Forgo y Kövér, 2004; Subhadhirasakul y Pechpongs, 2005).

La presencia del estigmasterol en *Lachemilla orbiculata* puede tener estar involucrada en las funciones protectoras frente a insectos, en la multiplicación celular de tejidos vegetales o puede encontrarse proporcionando estabilidad y viscosidad a las paredes celulares como se ha reportado para otros géneros, incluyendo a *Prunus* de la familia Rosaceae (Ávalos y Pérez, 2009; Hoffmann, 1951; Wolbis *et al.*, 2001).

El estigmasterol es un fitoesterol relacionado con la creación de esteroides y de hormonas sexuales, en otras especies vegetales es aislado y utilizado para la evaluación biológica y para reducir la absorción del colesterol en seres humanos (Edeoga *et al.*, 2005; Foley *et al.*, 2010; Ling y Jones, 1995), por lo que *Lachemilla orbiculata* podría ser

estudiada para éstos fines.

El estigmasterol aislado en Fierro Urco fue 25,9 mg y en Papallacta, 6,9 mg, la diferencia entre los dos compuestos podría estar relacionada con factores climáticos o edáficos, y no con la técnica cromatográfica debido a que después de obtener el compuesto en ambas columnas, éstas siguieron eluyendo y no mostraron las mismas características (Dragovic *et al.*, 2010).

## 6.5 ANÁLISIS DE SUELOS

La muestra de suelo de Fierro Urco presentó mayor concentración de compuestos; se encontró 14,10% de materia orgánica en Fierro Urco, mientras que en la muestra de suelo de Papallacta se encontró 8,20%, estas diferencias pueden explicarse por factores como la presencia y distribución de microorganismos, el flujo de agua, los usos que han tenido los suelos, la cobertura vegetal y la humedad de la superficie (Casper y Cahill, 1996; Fu *et al.*, 1999; Jackson y Caldwell, 1993).

La concentración de materia orgánica tiene una relación directamente proporcional con la transferencia de carbonos del suelo hacia la planta (Van Bergeijk y Noordijk, 1992), de forma que el porcentaje de materia orgánica en las dos localidades puede explicar, en parte la cantidad de compuestos con carbono encontrados, como es el caso del estigmasterol en cada localidad.

Por otra parte el pH del suelo que para la muestra de Fierro Urco fue de 4,97 y para la de Papallacta fue de 5,25 posiblemente no tiene una relación importante con la transferencia de carbonos del suelo a la planta, debido a que en otros estudios no se considera determinante al pH neutro del suelo (Van Bergeijk y Noordijk, 1992).

## 7. RECOMENDACIONES

- *Lachemilla orbiculata* al tener gran cantidad de antioxidantes naturales es una especie con potencial para la evaluación de sus constituyentes en especies animales, y como bactericida (Hammad *et al.*, 2010; Nikitina *et al.*, 2007) y podría ser recomendada en la dieta alimenticia (Kiselova *et al.*, 2006).
- *Lachemilla orbiculata* debe ser analizada a través de otros métodos como DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidracilo y la expulsión de radicales libres (RSA por sus siglas en inglés) que corroboren los resultados obtenidos en este trabajo (Argoti *et al.*, 2011; Hamad *et al.*, 2010)
- Se debería continuar la investigación en *Lachemilla orbiculata* con cromatografía en columna utilizando solventes semipolares y polares con el fin de identificar y cuantificar otros metabolitos secundarios importantes.
- Es necesario realizar estudios fitoquímicos con más muestras de *Lachemilla orbiculata* de varias localidades para tener una visión más integral de las propiedades químicas de la especie, así como de otras especies del género *Lachemilla* y de otros géneros de los páramos del Ecuador para sustentar los usos tradicionales de las plantas y argumentar la importancia de la conservación de los ecosistemas andinos.

## 8. LITERATURA CITADA

Adegboye, M. Akinpelu, D. Okoh, A. 2008. The bioactive and phytochemical properties of *Garcinia kola* (Heckel) seed extract on some pathogens. African Journal of Biotechnology 7(21): 3934-3938.

Aguilar, Z., Ulloa, C., Hidalgo, P. 2009. Plantas útiles de los páramos de Zuleta, Ecuador. Proyecto de manejo y aprovechamiento sustentable de alpacas en los páramos de Zuleta. PPA- Ecociencia. Quito, Ecuador.

Aldana, D. 2007. Detección y cuantificación de flavonoides en *Polypodium triseriale* Swartz, *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. y *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger: tres especies de calahuala nativas de Guatemala. Tesis para optar al título de Maestría multidisciplinaria en productos y uso de plantas medicinales. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Estudios de Postgrados. Guatemala.

Anttonen, M. 2007. Evaluation of means to increase the content of bioactive phenolic compounds in soft fruits. Natural and Environmental Science 208: 1- 93.

Atkins, P. 2007. Las moléculas de Atkins. Ediciones Akal. Madrid, España.

Argoti, J., Salido, S., Linares, J., Ramirez, B., Insuasty, B. 2011. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of a selection of wild-growing Colombian plants. Journal of the Science of Food and Agriculture 91(13): 2399-2406.

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

Ayaz, F. y Hayirlioglu, A. 2001. Total phenols and condensed tanins in the leaves of some *Alchemilla species*. *Biología Bratislava* 56 (4): 449-453.

Baquero, F., Sierra, R., Ordóñez, L., Tipán, M., Espinosa, L., Rivera, M. y Soria, P. 2004. La Vegetación de los Andes del Ecuador. Memoria explicativa de los mapas de vegetación: potencial y remanente a escala 1:250.000 y del modelamiento predictivo con especies indicadoras. EcoCiencia/CESLA/Corporación EcoPar/MAG SIGAGRO/CDC - Jatun Sacha/División Geográfica - IGM. Quito, Ecuador.

Bella Cruz, A., Cé, R., Kanegusuku, M., Cechinel, V., Yunes, R., Delle, F. y Niero, R. 2006. Antimicrobial activity of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25(2): 256-259.

Bennington, J. 2000. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.

Borodin, Y., Selyatitskaya, V., Obukhova, L., Pal'chikova, N., Odintsov, S. y Kukushkina, T. 1999. Effects of polyphenol compounds from *Alchemilla vulgaris* on Morphofunctional state of thyroid gland in rats exposed to low temperature. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 127(6): 697-699.

Burrows, I. 2005. Food from the wild. New Holland Publishers (UK) Ltd, London, England.

Cabido, M., Breimer, R. y Vega, G. 1987. Plant communities and associated soil types in a high plateau of Cordoba mountains, Central Argentina. *Mountain Research and Development* 7(1): 25-42.

Cáceres, A., Cruz V, Sully M., Samayoa, M., Molina, R. 2005. Caracterización de los extractos vegetales y aceites esenciales como nuevos recursos para el desarrollo agroindustrial Fase III. Departamento de Citohistología, Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de CCQQ y Farmacia, Laboratorio de Toxicología, Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC y Laboratorio Farmaya S.A.

Casper, B. y Cahill, J. 1996. Limited effects of soil nutrient heterogeneity on populations of *abutilon theophrasti* (Malvaceae). *American Journal of Botany* 83(3): 333-341.

Castillo, L., Jiménez, J. y Delgado, M. 2010. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12: 445-462.

Cavalcante, G., Carrano, A. y Dias, S. 2006. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca branca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 9-14.

Cechinel, V. y Yunes, R. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 21(1): 99-105.

Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W. y Cuca, L. 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperácea. Una Revisión. *Agronomía Colombiana* 26 (1): 97-106.

Chávez, O., Paladines, O., Bacca, C. 2007. Análisis fitoquímico preliminar de las hojas de la especie *Columnea picta* (capitana), planta utilizada por la comunidad Awá cuaiquier como antiofídica. *Revista cubana de química* 19 (2): 59-63.

Chou, W., Oinaka, T., Kanamaru, F., Mizutani, K., Chen, F. y Tanaka, O. 1987. Diterpene glycosides from leaves of *Rubus chingii* and fruits of *R. Suavissimus*, and identification of the source plant of the Chinese folk medicine fu-pen-zi. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 3021-3024.

Cobzac, S., Moldovan, M. Olah, N., Bobos, I. y Surducan, E. 2005. Tannin extraction efficiency, from *Rubus idaeus*, *Cydonia oblonga* and *Rumex acetosa*, using different extraction techniques and spectrophotometric quantification. *Acta Universitatis Cibiniensis* 8:55-59.

Coloma, A. 2007. Reserva Ecológica Cayambe- Coca. En Guía del Patrimonio de las áreas protegidas del Ecuador. ECOFUND, FAN, Darwin net, IGM. Quito, Ecuador.

Condrat, D., Mosoarca, C., Zamfir, A., Crisan, F., Szabo, M. y Lupea, A. 2010. Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga-aurea* by chip-electrospray ionization mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Central European Journal of Chemistry* 8(3): 530-535.

Connor, A., Luby, J., Hancock, J., Berkheimer, S., Hanson, E. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*: 50: 893–898.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Nueva York. U.S.A.

Croteau R., Kutchan, T. y Lewis, N. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.). American Society of Plant Physiologists 1250-1378.

Daud, A., Habib, N. y Sanchez, A., 2007. Actividad diurética de extractos acuosos de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). *Revista Cubana Plantas Medicinales* 12 (4): 1-6.

De Ávila, 2005. Estudio químico e das atividades citotóxica, antioxidante e antifúngica de *Prunus myrtifolia* L. (Urban.) (Rosaceae). Tesis de Doctorado en Química. Instituto de Química de la Universidad Estatal Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Sao Paulo, Brazil.

De-Eknamkul, W. y Potduang, B. 2003. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* 62: 389–398.

De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macia, M. y Balslev, H. 2008. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Ecuador.

Del Río, P. 2005. Vademécum de Fitoterapia. Quintana de Rueda. León – España.

Davis, E. y Croteau, R. 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Topics in Current Chemistry* 209: 54- 92.

Devore, G. y Muñoz, E. 1983. Química orgánica. Publicaciones cultural S. A. México D.F., México.

Días, R. 2006. Aportes de la ciencia y la tecnología al manejo productivo y sustentable de los suelos del cono sur. IICA, PROCISUR. Montevideo, Uruguay.

Donovan, J., Meyer, A. y Waterhouse, A. 1998. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Prunes and Prune Juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1247 – 1252.

Dragovic, V., Zvonimir, S., Brala, A., Levaji, B., Bursa, D., Biko, A. 2010. Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) Grown in the Northwest Croatia. *Food and Technology Biotechnology*. 48 (2): 214–221.

Duddeck, H., Dietrich, W. y Tóth, G. 2000. Elucidación estructural mediante RMN: ejercicios y problemas. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona, España.

Edeoga, H., Okwu, D. y Mbaebie, B. 2005. Phytochemical constituents of some nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 4 (7): 685-688.

Falchero, L., Coppa, M., Fossi, A. y Lombardi. 2009. Essential oil composition of lady's mantle (*Alchemilla xanthochlora* Rothm.) growing wild in Alpine pastures. *Natural Product Research* 23 (15): 1367–1372.

Foley, D., O'Callaghan, Y., O'Brien, N., McCarthy, F. y Maguire, A. 2010.

Synthesis and characterization of stigmasterol oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2):1165–1173.

Font Quer, P. 1982. *Diccionario de Botánica*. Editorial Labor. Barcelona, España.

Focke, W. 1888. *Alchemilla*. In: Engler, A., Prantl, K. (Eds.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Berlin. 3:43.

Fox, M. A. & Whitesell, J.K. 2000. *Química Orgánica*. Segunda Edición. Prentice Hall. México.

Forgo, P. y Kövér, K. 2004. Gradient enhanced selective experiments in the <sup>1</sup>H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids* 69: 43–50.

Fraisse, D., Carnat, A., Carnat, A., y Lamaison, J. 1999. Standardization of the aerial parts of *Alchemilla*. *Annales Pharmaceutiques Francaises* 57: 401–405.

Fraisse, D., Heitz, A., Carnat, A., Carnat, A. y Lamaison, J. 2000. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia* 71: 463–464.

Freifelder, D. 2003. *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Editorial Reverté S. A. Barcelona, España.

Fu, B., Chen, L., Ma, K., Zhou, H. y Wang, J. 1999. Relationships between land use and soil conditions in the hilly area of the loess plateau in northern Shaanxi, China. *Catena* 39(1): 69-78.

García, H. 1992. Flora medicinal de Colombia, in *Botánica Médica*. Tercer Mundo Editores, 392–396. Bogotá, Colombia.

Garritz, A. y Chamizo, J. 1998. *Química*. Pearson, Prentice Hall. Naucalpan, México.

Gaviria, J. 1997. Sinopsis del género *Lachemilla* (Focke) Rydberg (Rosaceae) para Venezuela. *Plántula* 1(3): 189-212.

Gehrke, B., Bräuchler, C., Romoleroux, K., Lundberg, M., Heubl, G. y Eriksson, T. 2008. Molecular phylogenetics of *Alchemilla*, *Aphanes* and *Lachemilla* (Rosaceae) inferred from plastid and nuclear intron and spacer DNA sequences, with comments on generic classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 1030–1044.

Gershenzon<sup>1</sup>, J. y Dudareva, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Natural Chemical Biology* 3(7): 408- 414.

Gil, A. 2010. Tratado de Nutrición. 2a ed. Tomo IV: Nutrición Clínica. Medica Panamericana D. L. Madrid, España.

Gilani, A., Asís, N., Ali, A. y Saeed, M. 2000. Pharmacological basis for the use of peach leaves in constipation. *Journal of Ethnopharmacology* 73 (1): 87-93.

Gómez, E., Ledbetter, C. 2010 The Flavor of Plums. En Hui, Y. 2010. Handbook of Fruit and Vegetable Flavors. John Wiley & Sons, Inc. Murcia, España.

González, Y., Peña, m., Sánchez, R., Santana, J. 2001. Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del fotoenvejecimiento. *Rev. Cubana de investigación biomédica*. 20 (1): 16- 20.

Gutiérrez, D., Ortiz, C. y Mendoza, A. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

Hamad, I Erol-Dayi, Ö., Pekmez, M., Önay-Uçar, E. y Arda, N. 2010. Antioxidant and cytotoxic activities of *Aphanes arvensis* extracts. *Plant Foods Humman Nutrition* 65:44–49.

Häkkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J. y Törrönene, R. 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International* 32: 345- 353.

Hartmann, M. 1998. Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science* 3(5): 170- 175.

Hassanein, M. 1999. Studies on non-traditional oils: Detailed studies on different profiles of some Rosaceae kernel oils. *Grasas y Aceites* 50 (5): 379- 384.

Harrison, K. y Were, L. 2007. Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of Almond skin extracts. *Food Chemistry* 102: 932–937.

Hesse, M., Meier, H. y Zeeh, B. 1999. Métodos espectroscópicos en química orgánica. Editorial Síntesis. Madrid, España.

Hildebrand, D. y Schroth, M. 1964a. Antibiotic activity of pear leaves against *Erwinia amylovora* and its relation to  $\beta$ -glucosidase. *Phytopathology* 54: 59–63.

\_\_\_\_\_ 1964b. Arbutin-hydroquinone complex in pear as a factor in fire blight development. *Phytopathology* 54: 640-645.

Hoffman, D. 2003. Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine. Healing Arts press. Rochester, Vermont.

Hofstede, R., J. Lips, W. Jongsma y J. Sevink. 1998. Geografía, Ecología y Forestación de la Sierra alta del Ecuador, Revisión de Literatura. EcoPar/Abya Yala, Quito.

Howard, L., Clark, J. y Brownmiller, C. 2003. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 83: 1238-1247.

Hutchinson, J. 1964. *The Genera of Flowering Plants* I. Pp. 174-216. Oxford.

Jackson, R. y Caldwell, M. 1993. The scale of nutrient heterogeneity around individual plants and its quantification with geostatistics. *Ecology* 74(2): 612-614.

Jin, S. y Sato, D. 2003. Benzoquinone, the substance essential for antibacterial activity in aqueous extracts from succulent young shoots of the pear *Pyrus* spp. *Phytochemistry* 62 (1): 101-107.

Jonadet M., Meunier M., Villie F., Bastide J. y Lamaison J. 1986. Flavonoids extracted from *Ribes nigrum* L. and *Alchemilla vulgaris* L.: 1. In vitro inhibitory activities on elastase, trypsin and chymotrypsin. 2. Angioprotective activities compared in vivo. *Journal of Pharmacology*. 17 (1):21-27.

Jørgensen, P. y León- Yáñez, S. 1999. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden Press. U.S.A.

Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., Stevens, P. y Donoghue, M. 2008. Plant systematics, a phylogenetic approach. 3ra. ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA.

Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., y Yankova, T. 2006. Correlation between the *In vitro* antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from bulgarian herbs. *Phytotherapy Research* 20: 961-965.

Kanegusuku, M., Sbars, D., Bastos, S., Souza, M., Cechinel- Filho, V., Yunes, R., Delle, F. y Niero, R. 2007. Phytochemical and analgesic activity of extract, fractions and a

19-hydroxyursane-type triterpenoid obtained from *Rubus rosaefolius* (Rosaceae).  
Biological and Pharmaceutical Bulletin 30(5): 999-1002.

Kokaly, R., Asner, G., Ollinger, S., Martin, M. y Wessman, C. 2009.  
Characterizing canopy biochemistry from imaging spectroscopy and its application to  
ecosystem studies. Remote Sensing of Environment 113: S78–S9.

Kunradi, F., Campelo, G., Copetti, C., Gonzaga, L., Nunes, E. y Fett, R. 2009.  
Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three  
apple cultivars. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 59 (1): 101-106.

Lampasona, M., Catalán, C., Gedris, T. y Herz, W. 1992. Oleanolic and ursolic acid  
derivates from *Polylepis australis*. Phytochemistry 49 (7): 2061-2064.

Larson R. 1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry 27: 969–978.

Lauer, W., Rafiqpoor, D., Theisen, I. 2001. Physiogeographie, Vegetation und  
Syntaxonomie der Flora des Páramo de Papallacta (Ostkordillere Ecuador). Franz Steiner  
Verlag. Stuttgart, Germany.

León- Yáñez, S. 1993. Estudio Ecológico y Fitogeográfico de la vegetación del  
Páramo de Guamaní, Pichincha-Napo, Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia  
Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

León- Yáñez, S. 2000. La flora de los páramos ecuatorianos. En: La biodiversidad  
de los páramos. Serie Páramo (Josse, C., Mena, P., Medina, G.) pp.7: 5-21. GTP/AbyaYala.  
Quito, Ecuador.

Ling, W. y Jones, P. 1995. Dietary phytosterols: A review of metabolism. *Life Science* 57: 195-206.

Loayza, I., Vilaseca, A., Lorenzo, D. y Dellacassa, E. 2002. Characterization of the essential oil and extracts from the aerial parts of kehuña (*Polylepis besseri*). *Ecotropica* 8: 233- 238.

Määttä, K., Kamal-Eldin, A., Mattila, P., González- Paramás, A. y Torronen, R. 2004a. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4477-4486.

Macrecroft, M., Woodwart, F. y Marrs, R. 1992. Attitudinal trends in leaf nutrient contents, leaf size and  $^{13}\text{C}$  of *Alchemilla alpine*. *Functional Ecology* 6(6): 730-740.

Madhuri, S. y Pandey, G. 2009. Some anticancer medicinal plants of foreign origin. *Current Science* 96(6): 779-783.

Maga, J., Squire, C. y Hughes, H. 1992. Bramble dried leaf volatiles. *Food Science Humman Nutrition*. 29: 145-148.

Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela.

Migdalia, M. y Culler, A. 2001. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Felix Varela. Cuba.

Mingsheng, L. 1994. Chemical constituents of *Rubus* plants. *Journal of Shenyang College of Pharmacy* 11: 68-72.

Morales, D. 2010. Relaciones filogenéticas de *Lachemilla* (Focke) Rydb. (Rosaceae) inferidas a partir de secuencias de ADN nuclear y cloroplástico, con énfasis en las especies del norte de Sudamérica. Disertación previa a la obtención del Título de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

Nakatani, N., Kayano, S., Kikusaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., y Mitani, T. 2000. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48(11): 5512-5516.

Nates, B. y Hernández, E. 1996. Las plantas y el territorio: clasificación, usos y concepciones en los andes colombianos. Editorial Abya -Yala. Colombia.

Niero, R., Kanegusuku, M., Souza, M. y Yunes, R. 2002. Antinociceptive action of extracts and fractions from *Rubus imperialis* (Rosaceae) *Therapie*. 57(3): 242-245 (242).

Nigon, F., Serfaty-Laerosniere, I. Beucler, D. Chauvois, C. Neveu, P. Giral, M. Chapman, J. y Bruckert, E. 2001. Plant sterol-enriched margarine lowers plasma LDL in hyperlipidemic subjects with low cholesterol intake: effect of fibrate treatment. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 39:634-640.

Nikitina, V., Kuz'mina, L., Melent'ev, A. y Shendel, G. 2007. Antibacterial Activity of Polyphenolic Compounds Isolated from Plants of Geraniaceae and Rosaceae Families. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* 43(6): 707-714.

NIST. National Institute of Standards and Technology 2011. <<<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=83-48-7>>>. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America [Consultado: 1 de noviembre del 2011. 9:43 am].

Notov, A. y Kusnetzova, T. 2004. Architectural units, axilaty and their taxonomic implications in Alchemillinae. *Wulfenia* 11: 85- 130.

Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Iwasaki, M., Kubo, M., Orime, T., Yoshizaki, M. y Naruhashi, N. 1992. Hydrolyzable tannins as chemotaxonomic markers in the *Rosaceae*. *Phytochemistry* 31: 3091-3096.

Oliveira, H., Pereira, E. y Martins, L. 2008. Phytochemical analysis composition from *Annona squamosa* (ATA) ethanolic extract leaves *Revista Brasileira de Farmacia* 89(3): 180-184.

Ondrejovic, M., Ondrigova, Z. y Kubincová, J. 2009. Isolation of antioxidants from *Alchemilla xanthochlora*. *Nova Biotechnologica* 9(3): 313-318.

Ong, K. y Khoo, H. 2000. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats *Life Sciences* 67(14): 1695-1705.

Orians, C. 2000. The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant-herbivore interactions. *American Journal of Botany* 87(12): 1749-1756.

Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E. y Swiader, K. 2007. Antioxidant tannins from *Rosaceae* plant roots. *Food Chemistry* 100: 579-583.

Ovaca, D. y Pineda, I. 2011. Los residuos de Cacao (*Theobroma cacao* L.) como fuente alternativa de antioxidantes. Tesis de Ingeniería. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador.

Parlato, S. 2011. Antimicrobial sensitivity and resistance development caused by nutraceuticals. Thesis for the degree of Master of Science Graduate in Microbiology and Molecular Genetics. The Graduate School of Biomedical Sciences University of Medicine and Dentistry of New Jersey. Ney Jersey, USA.

Pateh, N., Shah, V., Mahajan, A. y Shah, D. 2011. Isolation of Mucilage from *Cydonia vulgaris* Pers. Seeds and its Evaluation as Superdisintegrant. Journal of Applied Pharmaceutical Science 01 (04): 110-114.

Petkou, D., Diamantidis, G. y Vasilakakis, M. 2002. Arbutin oxidation by pear (*Pyrus communis* L.) peroxidases. Plant Science. 162: 115-119.

Perry, L. 1929. A tentative revision of *Alchemilla* section *Lachemilla*. Contr. Gray . Herb. 84: 1-57.

Pfeiffer, J., Kühnel, C., Brandt, J., Duy, D., Punyasirip, A., Forkmann, G. y Fischer, T. 2006. Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. Plant physiology and biochemistry 44(5): 323-334.

Pichersky, E. y Gang, D. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. Trends in Plant Science 5(10): 439-445.

Podwojewski, P. y Poulenard, J. 2000. Los suelos de los páramos del Ecuador. En Páramo (Mena, P., Josse, C. y Medina, G. eds.) Serie Páramo 5. GTP/ Abya- Yala. Quito, Ecuador.

Primo, E. 1995. Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Tomo II. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España.

Repetto, M. y Repetto, G. 2009. Toxicología fundamental. Cuarta edición. Ediciones Días Santos. Madrid, España.

Rice-Evans, C., Miller, N. y Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Science 2: 152-159.

Richards, R., Durham, D. y Liu, X. 1994. Antibacterial activity of compounds from *Rubus pinfaensis*. Planta Medica 60: 471- 473.

Riihinen, K. 2005. Phenolic Compounds in Berries. Doctoral dissertation. University of Kuopio. Kuopio, Finland.

Rispail, N., Morris, P. y Webb, J. 2005. Phenolic compounds: extraction and analysis. En: *Lotus japonicus* Handbook. (Márquez, A.) Springer. The Netherlands 349-355.

Ritcher, M. y Moreira-Muñoz, A. 2005. Heterogeneidad climática y diversidad de la vegetación en el sur de Ecuador: un método de fitoindicación. Revista Peruana de Biología 12(2): 217-238.

Romoleroux, K. 1996. Rosaceae. En: Harling, G., Andersson, L. (Eds.), Flora of Ecuador 56: 1-152.

Romoleroux, K., 2004. The genus *Lachemilla* (Rosaceae) in the northern Andes of South America. *Lyonia* 7(1): 21-32.

Rojas, J., Patel, A. y Dacke, C. 2002. Relaxant activity of raspberry (*Rubus idaeus*) leaf extract in guinea-pig ileum *in vitro*. *Phytoterapy Research* 16: 665-68.

Rothmaler, W. 1937. Systematische vorarbeiten zu einer monographie der gattung *Alchemilla* (L.) Scop. emend. VII. aufteilung der gattung und nomenclatur. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 42: 164-173.

Sánchez, E., León, M., Chávez, D., Hechevarría, I. y Pino, J. 2010. Caracterización farmacognóstica de *Melissa officinalis* L. (toronjil). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 15(4): 192-197.

Sauer, W. 1965. Geología del Ecuador. Ministerio de Educación, Quito, Ecuador.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannin. *Phytochem* 30: 3875-3883.

Steele, J. y Mosettig, E. 1963. The solvolysis of stigmasteryl tosylate. *Journal of Organic Chemistry* 28(2): 571-572.

Seigler, D., Pauli, G., Nahrstedt, A. y Leen, R. 2002. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry* 60: 873-882.

Shakir, I., Durrani, Y., Hussainm, I., Mabood, I. y Zeb, 2007. Physicochemical analysis of apple and pear mixed fruit jam prepared from varieties grown in Azad Jammu and Kashir. *Journal of Food Safety* 9: 22-24.

Shepherd, T., Robertson, G., Griffiths, D. y Birch, A., 1999. Epicuticular wax ester and triacylglycerol composition in relation to aphid infestation and resistance in raspberry (*Rubus idaeus*). *Phytochemistry* 52 (7): 1239-1254.

Schimmer, O. Y Eschelbach, 1997. Esculetin in *Alchemilla speciosa*: identification and antimutagenic properties. *Pharmazie* 52: 476-478.

Shrivastava, R., Cucuat, N. y Gareth, J. 2007. Effects of *Alchemilla vulgaris* and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats. *Phytotherapy Research* 21: 369-373.

Shriver, D., Atkins, P. y Langford, C. 2004. Química inorgánica, Volumen 2. Editorial Reverté. Barcelona, España.

Simões, C., Schenkel, E. y Gosmann, G. 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento: Editora da UFSC. Porto Alegre, Brazil.

Skaria, B., Joy, P., Gracy, S., Joseph, A. y Joseph, R. 2007. Aromatic Plants. New Delhi, India.

Sklenar, P., Luteyn, L., Ulloa Ulloa, C., Joergensen, P. y Dillon, M. 2005. Flora genérica de los Páramos. Guía Ilustrada de Plantas Vasculares. The New York Botanical Garden.

Smith, P. 1975. The chemotaxonomy of plants. Ed. Edward Arnold. Edimburgo, Escocia.

Subhadhirasakul, S. y Pechpongs, P. 2005. A terpenoid and two steroids from the flowers of *Mammea siamensis*. Songklanakarin Journal of Science and Technology 27(2): 555-561.

Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Castelló de la Plana: Publicaciones de la Universidad de Jaume I, D. L.

Takeoka, G. y Dao, L. 2003. Antioxidant Constituents of Almond *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb Hulls. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 496-501.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. y Hawkins, D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis. USA 19: 669-675.

Teijón, J., Garido, A., Blanco, D., Villaverde, C., Mendoza, C., Ramirez, J. 2006. Fundamentos de bioquímica estructural. Editorial Tébar. Madrid, España.

Tiberti, L., Yariwake, J., Ndjoko, K. y Hostettmann, K. 2007. On-line LC/UV/MS Analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. Journal of Brazilian Chemistry Society 18(1): 100-105.

Tomczyk, M. y Latté, K. 2009. *Potentilla*. A review of its phytochemical and pharmacological profile. Journal of Ethnopharmacology 122: 184-204.

Tomczyk, M., Bazylko, A. y Staszewska A. 2010a. Determination of polyphenolics in extracts of *Potentilla* species by high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method. *Phytochemical Analysis* 21: 174-179.

---

\_\_\_\_\_ 2010b. Variation in total polyphenolics contents of aerial parts of *Potentilla* species and their anticariogenic activity. *Molecules* 15: 4639 -4651.

Trouillas, P., Calliste, A., Allais, D., Simon, A., Marfak, A., Delage, C. y Duroux, J. 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry* 80: 399-407.

Tucker, A., Maciarello, M., Henrickson, J. y Davis, J. 2003. The essential oils of *Chamaebatiaria millefolium*, *Chamabatia australis* and *Chamabatia foliosa* (Rosaceae) and comments on "*Chamaebatiaria multiflorum*" and "*Chamaebatiaria nelleae*" as medicinal Plants *Botany Economic* 57 (4): 570-575.

Valdivieso, M. 2010. "Aislamiento y caracterización de Metabolitos Secundarios Mayoritarios del fruto de *Annona montana*". Tesis de Grado Previa a la Obtención del Título de Bioquímica Farmacéutica. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Loja, Ecuador.

Van Bergeijk, K. y Noordijk, H. 1992. Influence of pH, soil type and soil organic matter content on soil-to-plant transfer of radiocesium and strontium as analyzed by a nonparametric method. *Journal of Environmental Radioactivity* 15 (3): 265-276.

Van der Hammen, T. 2000. Aspectos de historia y ecología de la biodiversidad norandina y amazónica. *Revista Académica Colombiana de Ciencias* 24 (91): 231-245.

Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J. y Kamal-Eldin, A. 2009. Phenolic Compounds in Rosaceae Fruits from Ecuador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(4): 1204-1212.

Velázquez, A. 2004. Extracción de taninos presentes en el banano verde. *Revista lasallista de investigación* 1(2): 17-22.

Vigliano, A., Novo, R., Cragolini, C. Nassetta, M. y Caballo, A. 2008. Antifeedant and repellent effects of extracts of three plants from Córdoba (Argentina) against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *BioAssay* 3(4): 1-6.

Wallaart, R. 1980. Distribution of sorbitol in Rosaceae. *Phytochemistry* 19: 2603-2610.

Walton, N. y Brown, D. 1999. Chemical from plants perspectives on plant secondary products. Imperial collage Press. Londres, Inglaterra.

Wang, H., Muraldeedharang, G., Strasburg, M., Booren, A. y Gray, J. 1999. Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (3): 840-844.

Wheeler, D. y Isman, M. 2001. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 98: 9-16.

Wilkes, S. y Glasl, H. 2001. Isolation, characterization, and systematic significance of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid in Rosaceae. *Phytochemistry* 58: 441-449.

Wolbis, M., Olszewska, M. y Wesolowski, W. 2001. Triterpenes and sterols in the Flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. (Rosaceae). *Acta Poloniae Pharmaceutical-Drug Research* 58 (6): 459-462.

Yau, M., Liang, S., kong, Y. y Fong, W. 2002. An aqueous extract of *Rubus chingii* fruits protects primary rat hepatocytes against tert-butyl hydroperoxide induced oxidative stress. *Life Sciences* 72(3): 329-338.

Yeung, M., Che, C. 2010. Review on presence of Oleanolic acid in Natural Products. Copyright. *Natura Proda Medica* 127-128.

Zhang, Z., Fam. L., Yang, J., Hao, X. Y Gu, Z. 2006. Alkaloid polymorphism and its sequence variaion in the spiraea japonica complex (Rosaceae) in China: traces of the biological effects of the Himalaya-Tibet plateau uplift. *American Journal of Botany* 93(5): 762-769.

Zheng, Y., Wang, C., Wang, S. y Zheng, W. 2003. Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins and antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 7162-7169.

## 9. FIGURAS



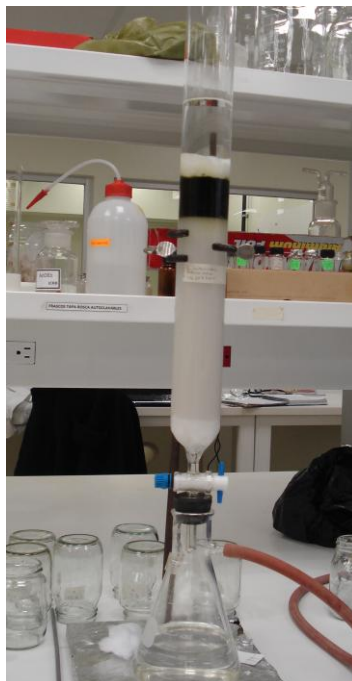
**Figura 1.** Recolección de hojas (lámina y peciolo) de *Lachemilla orbiculata* (Fierro Urco-Loja).



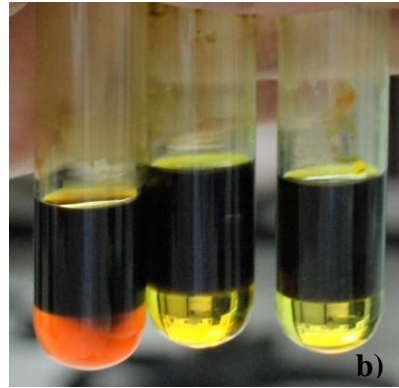
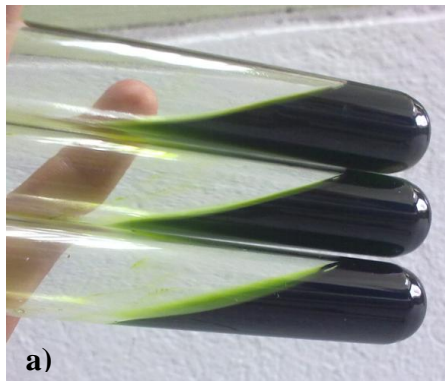
**Figura 2.** Hojas secas de *Lachemilla orbiculata*, listas para triturar.



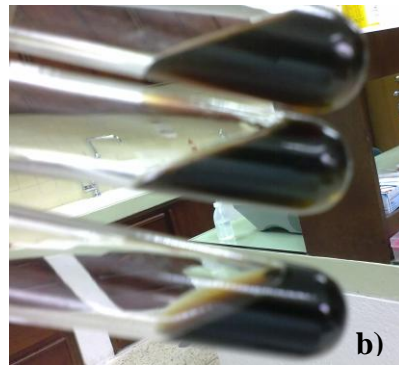
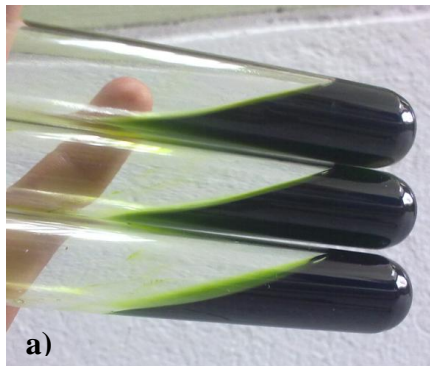
**Figura 3.** Recolección de muestras de suelo en Papallacta (Mismo procedimiento para Fierro Urco).



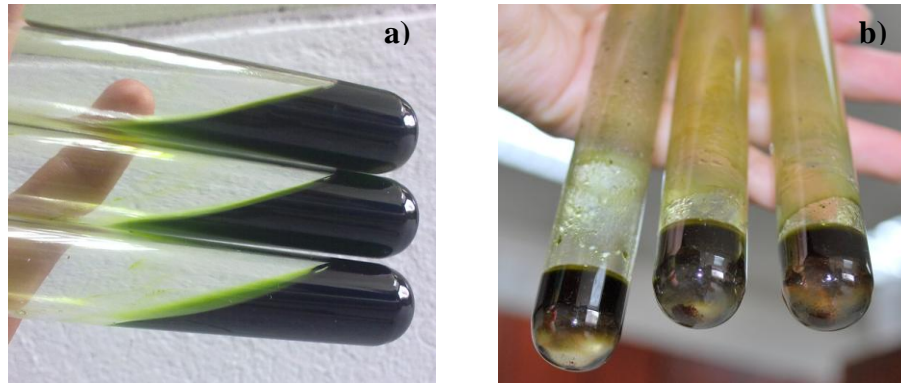
**Figura 4.** Columna cromatográfica armada.



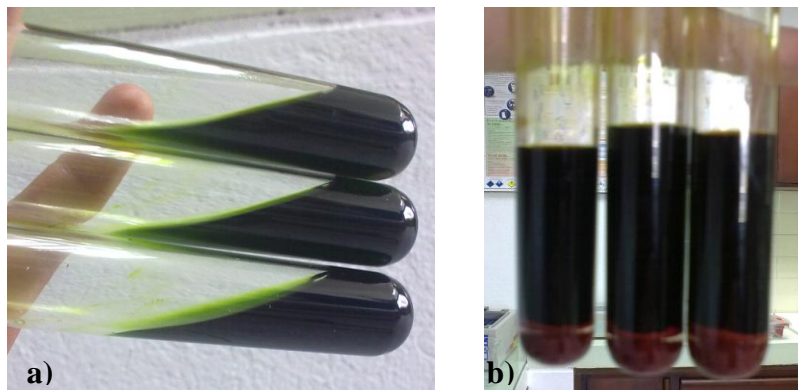
**Figura 5.** Prueba de Dragendorff en extracto etéreo. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Ensayos Dragendorff. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Cambio de color, opalescencia, turbidez.



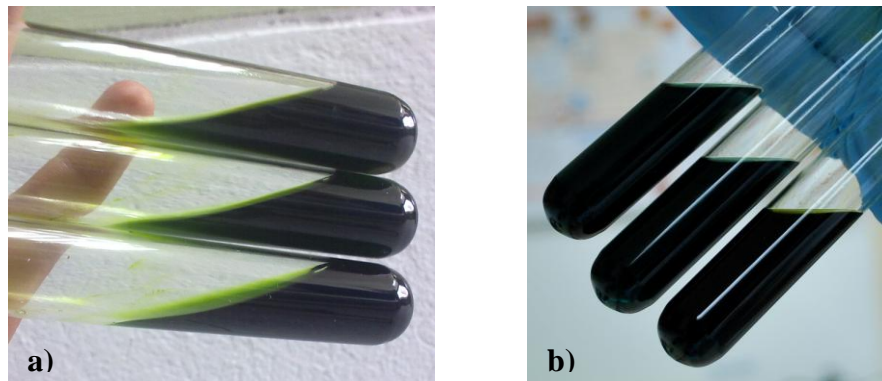
**Figura 6.** Prueba de Mayer en extracto etéreo. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Mayer. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. Positivo: Opalescencia, turbidez definida.



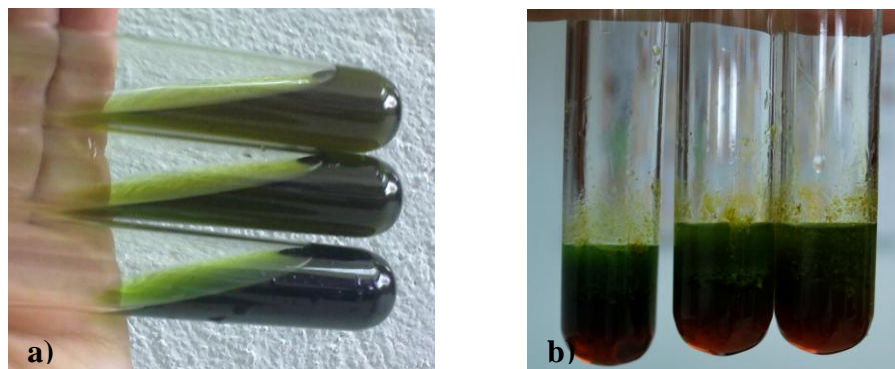
**Figura 7.** Prueba de Wagner en extracto etéreo. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Wagner. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Opalescecia, turbidez, presipitado.



**Figura 8.** Prueba de Baljet en extracto etéreo. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Baljet. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Coloración o presipitado rojo.



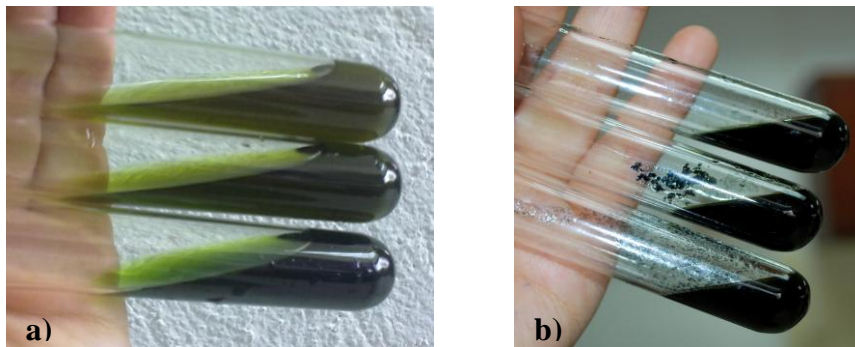
**Figura 9.** Prueba de Liebermann-Burchard en extracto etéreo. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Liebermann-Burchard. Orden de arriba hacia abajo: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y Laguna de Papallacta. Positivo: Verde-oscuo, negro.



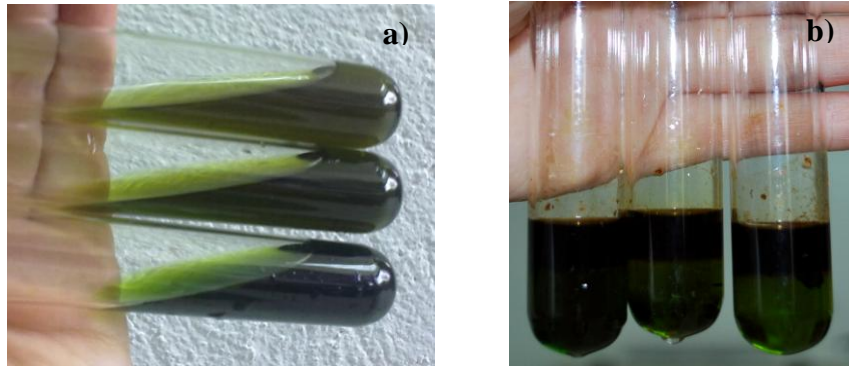
**Figura 10.** Prueba de Baljet en extracto alcohólico. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Baljet. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Coloración o presipitado rojizo.



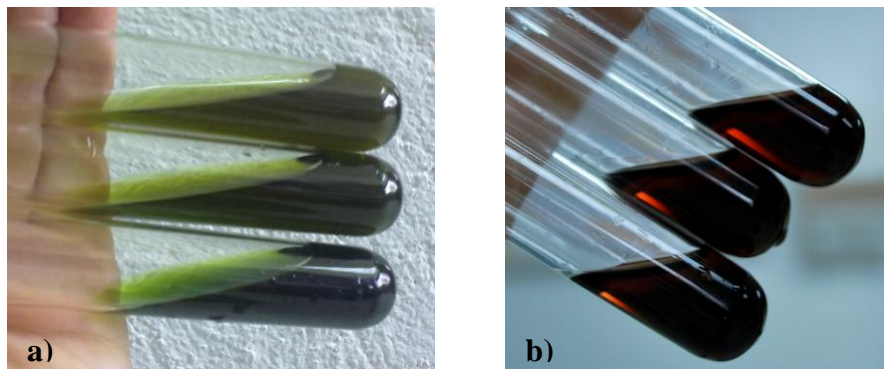
**Figura 11.** Prueba de Liebermann-Buchard en extracto alcohólico. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Liebermann-Burchard. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Verde intenso visible aunque rápido.



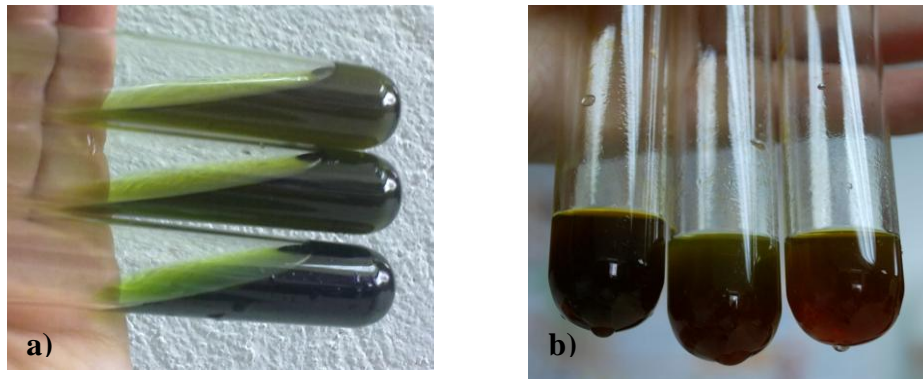
**Figura 12.** Prueba de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  en extracto alcohólico. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ . Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. Positivo: Coloración azul: taninos.



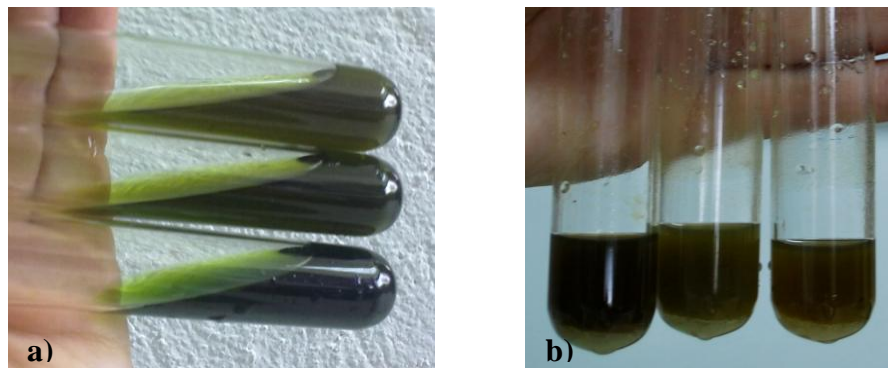
**Figura 13.** Prueba de Bortrager en extracto alcohólico. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Bortrager. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Fase con tonalidades rojizas- cafés.



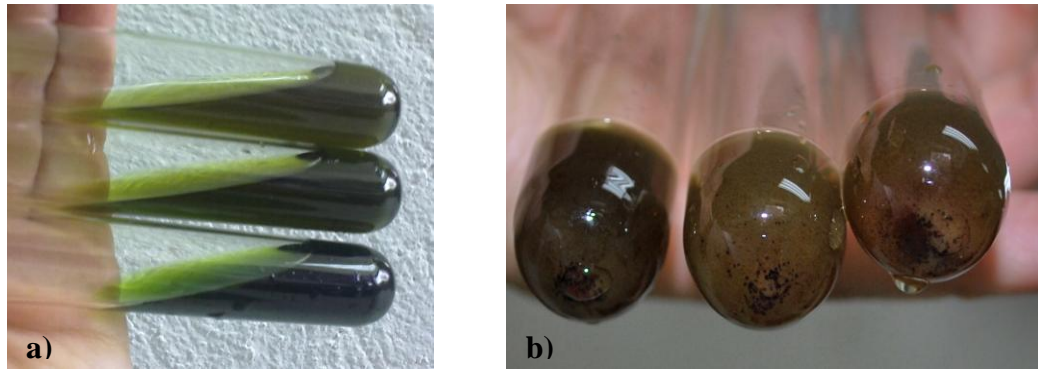
**Figura 14.** Prueba de Shinoda en extracto alcohólico. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Shinoda. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. Positivo: Amarillo, naranja o tonalidades rojizas.



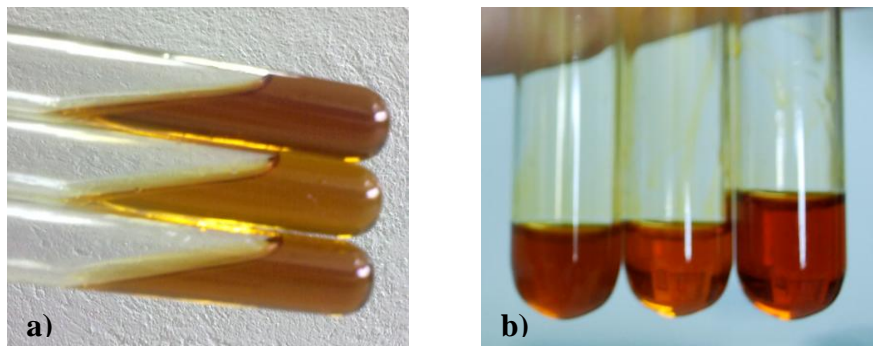
**Figura 15.** Prueba de Dragendorff en extracto alcohólico. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Dragendorff. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Opalescencia, turbidez, presipitado.



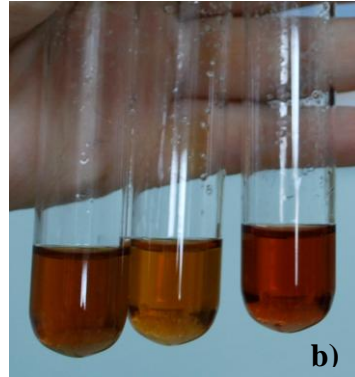
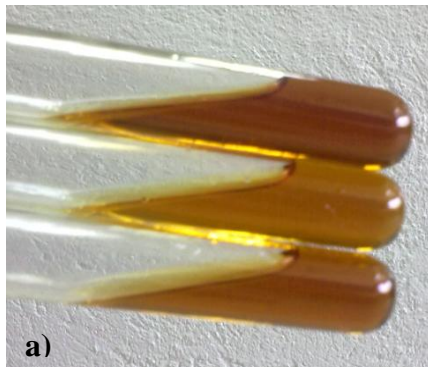
**Figura 16.** Prueba de Mayer en extracto alcohólico. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Mayer. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Opalescencia, turbidez, presipitado.



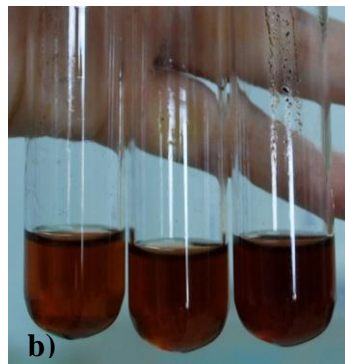
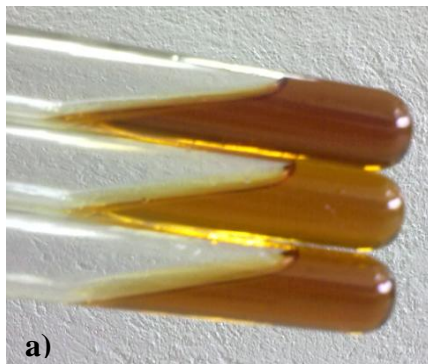
**Figura 17.** Prueba de Wagner en extracto alcohólico. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Wagner. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Opalescencia, turbidez, presipitado.



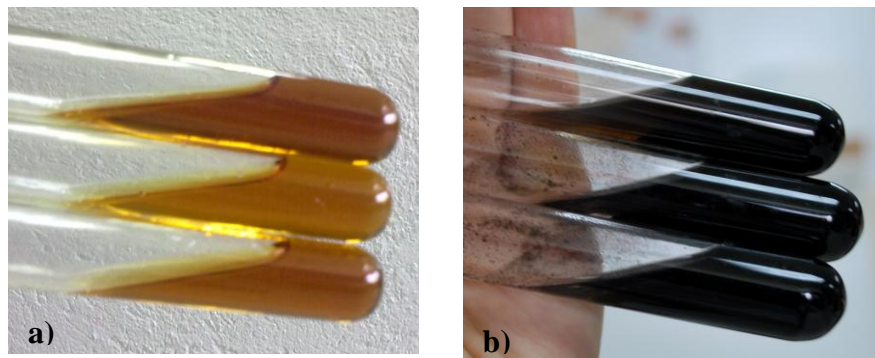
**Figura 18.** Prueba de Dragendorff en extracto acuoso. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Dragendorff. Orden: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Cambio de coloración, opalescencia, turbidez, presipitado.



**Figura 19.** Prueba de Mayer en extracto acuoso. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Mayer. Orden: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y Laguna de Papallacta. Positivo: Cambio de coloración, opalescencia, turbidez, presipitado.



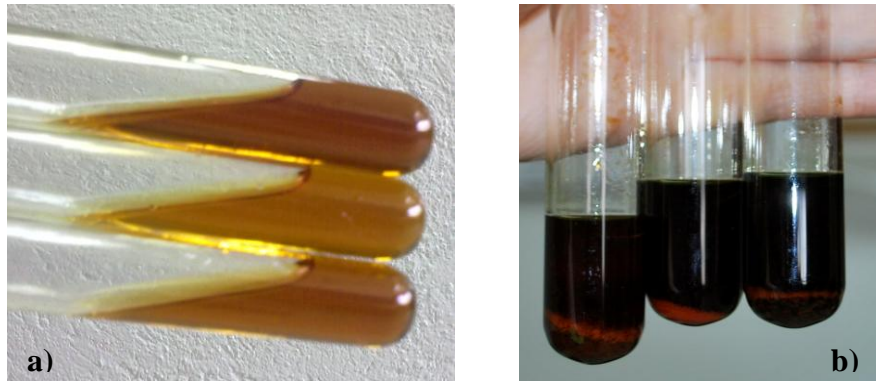
**Figura 20.** Prueba de Wagner en extracto acuoso. a) Extractos control. Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Wagner. Orden: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Cambio de coloración, opalescencia, turbidez, presipitado.



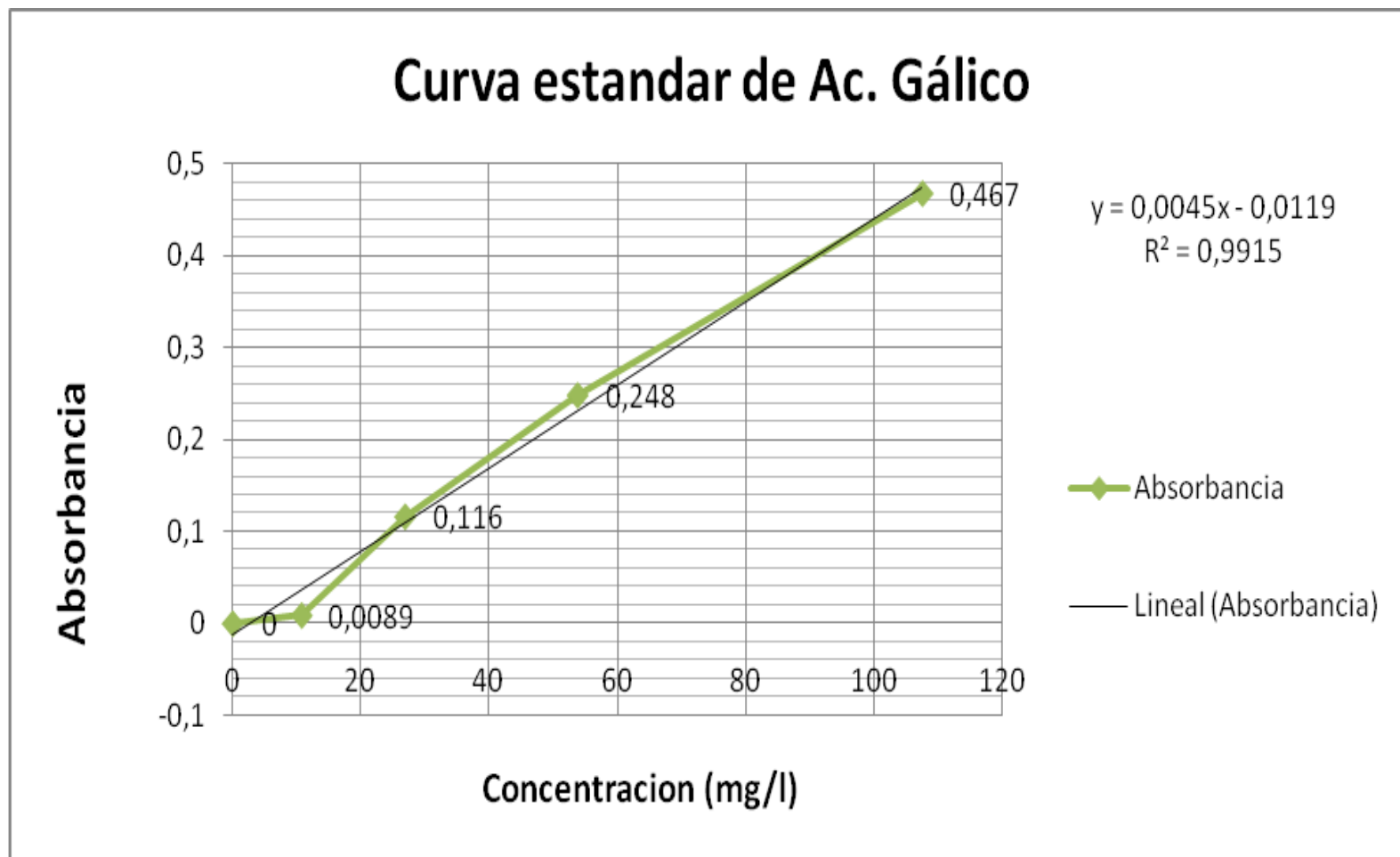
**Figura 21.** Prueba de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  en extracto acuoso. a) Extractos control. Orden de Arriba hacia abajo: laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ . Orden de arriba hacia abajo: Laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. Positivo: Coloración azul: taninos.



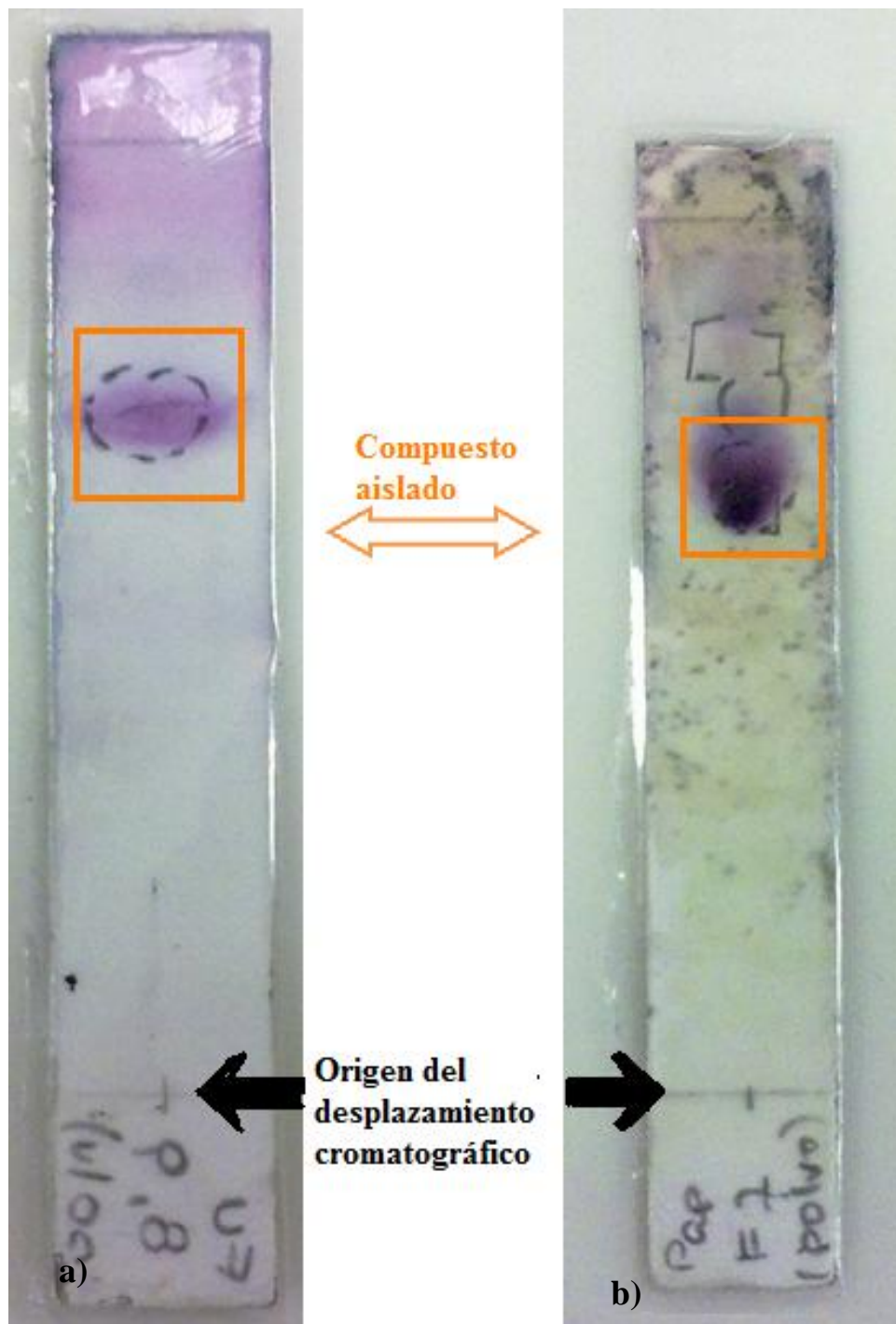
**Figura 22.** Prueba de Shinoda en extracto acuoso. a) Extractos control. Orden de Arriba hacia abajo: laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Shinoda. Orden de Izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y Laguna de Papallacta. Positivo: Coloración amarillo, naranja o rojizo.



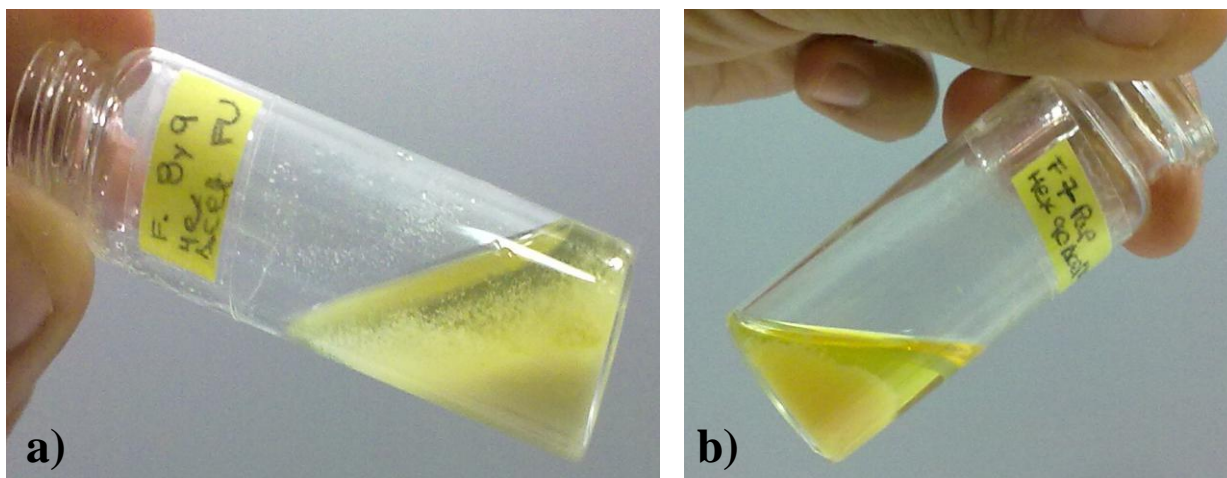
**Figura 23.** Prueba de Fehling en extracto acuoso. a) Extractos control. Orden de Arriba hacia abajo: laguna de Papallacta, Camino Viejo a Papallacta y Fierro Urco. b) Prueba de Fehling. Orden de izquierda a derecha: Fierro Urco, Camino Viejo a Papallacta y laguna de Papallacta. Positivo: Aparición de un precipitado y de coloraciones rojizas.



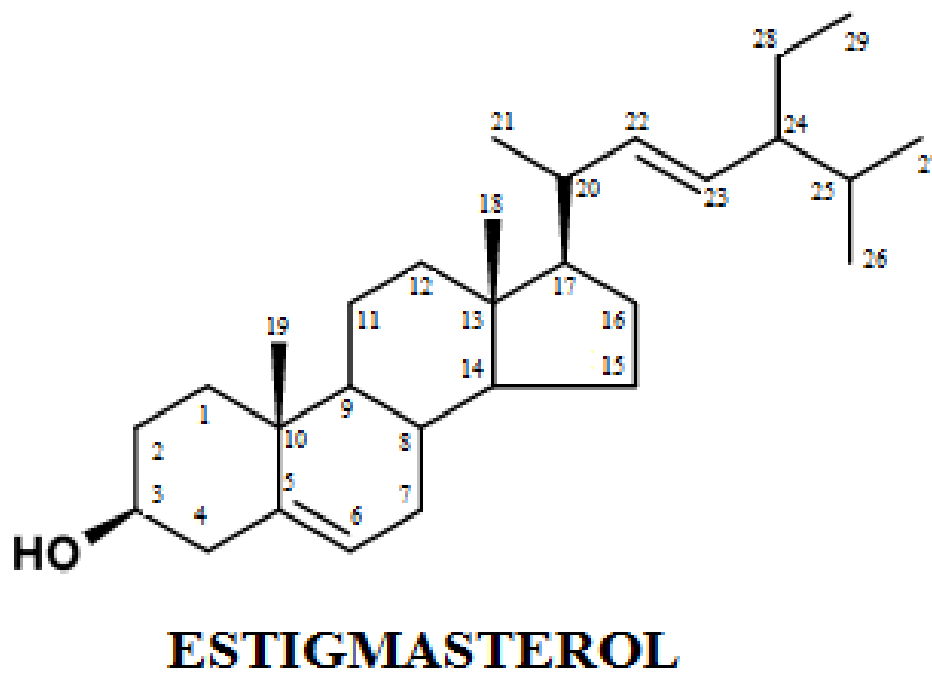
**Figura 24.** Curva de calibración. Concentración y absorbancia del ácido gálico



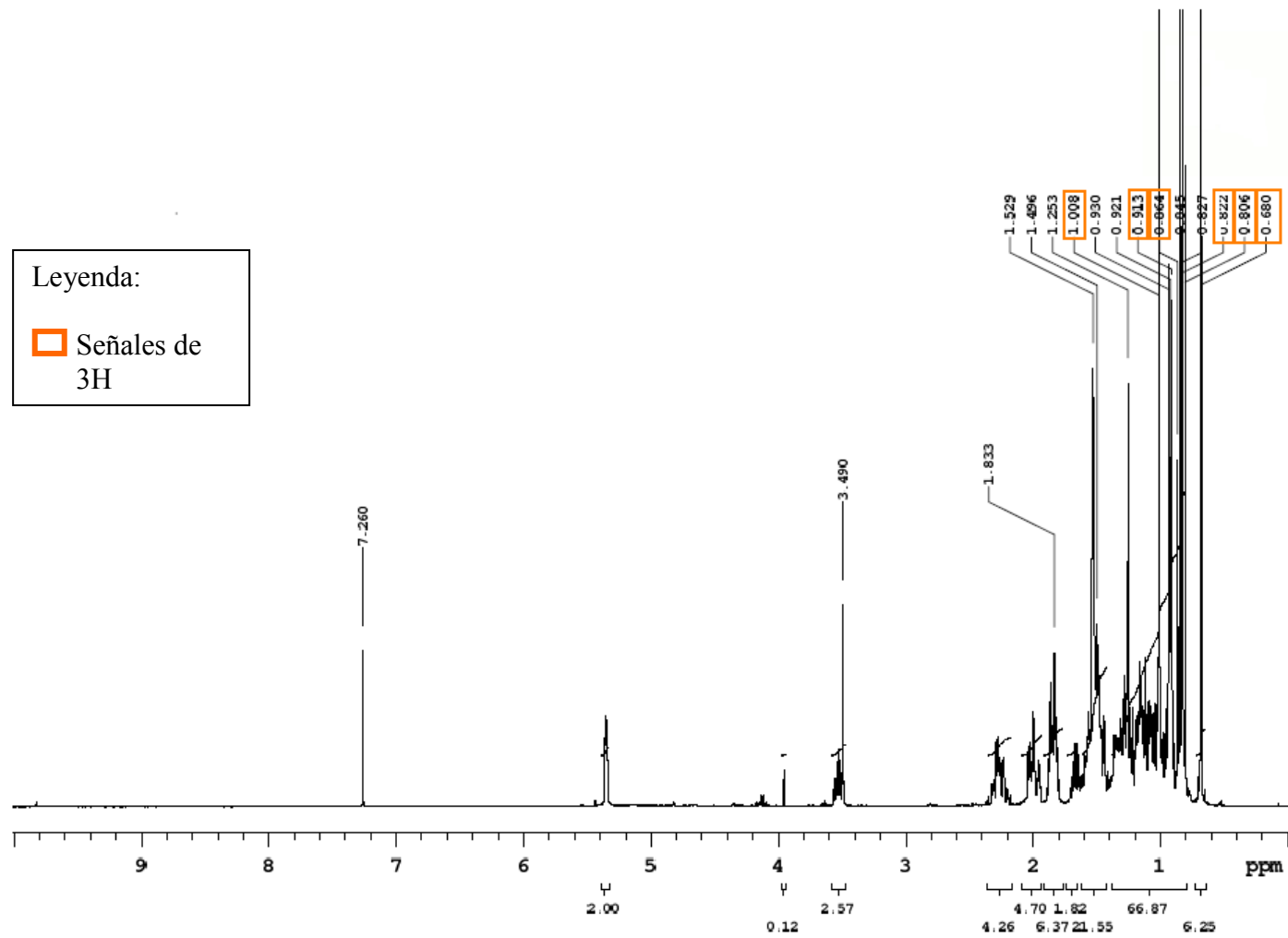
**Figura 25.** Cromatografía de Capa Fin. a) Fracciones 8 y 9 de la muestra de Fierro Urco.  
b) Fracción 7 de la muestra de Papallacta.



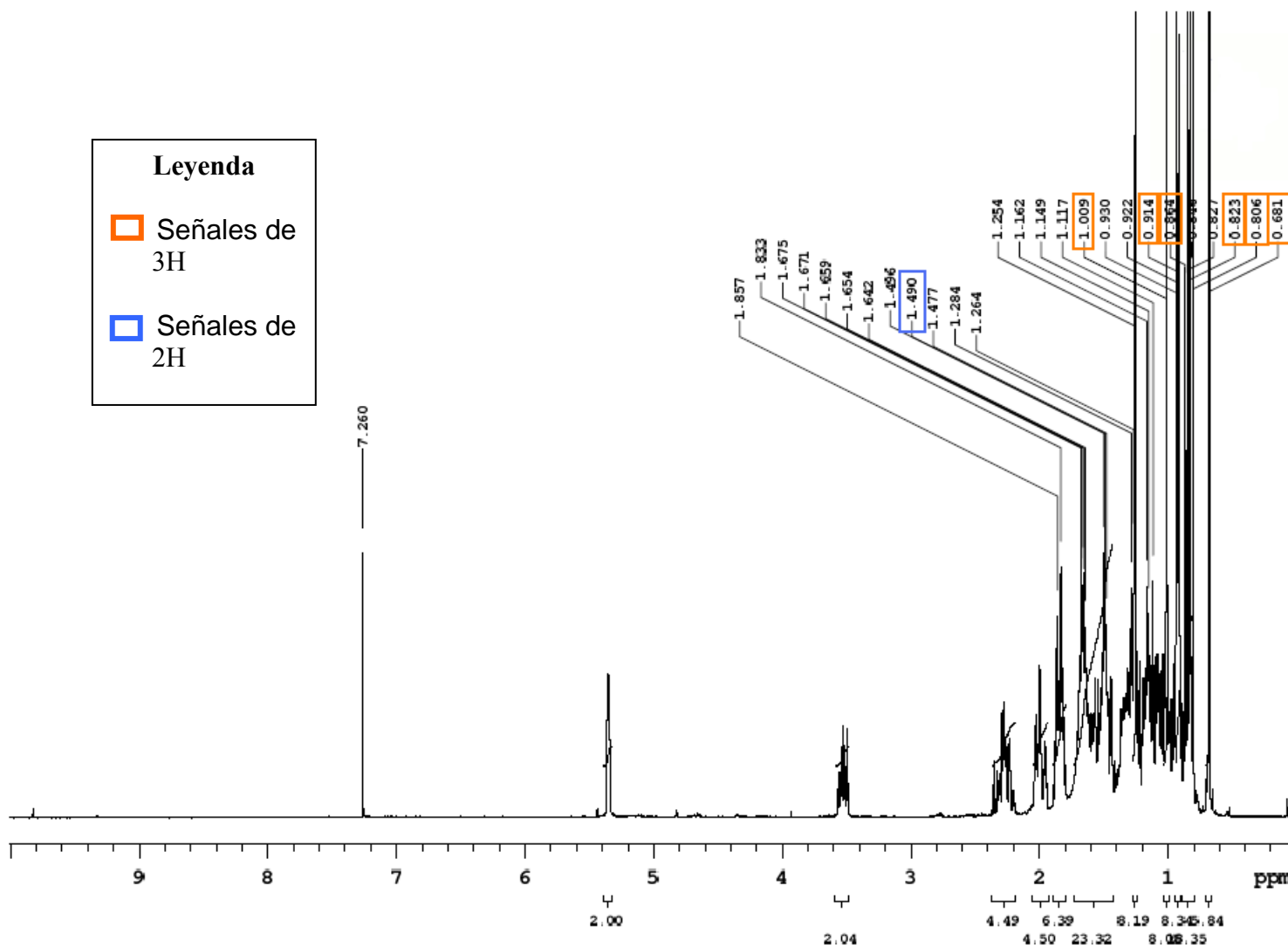
**Figura 26.** Compuesto aislado del extracto. a) Fracciones 8 y 9 de Fierro Urco. b) Fracción 7 de Papallacta.



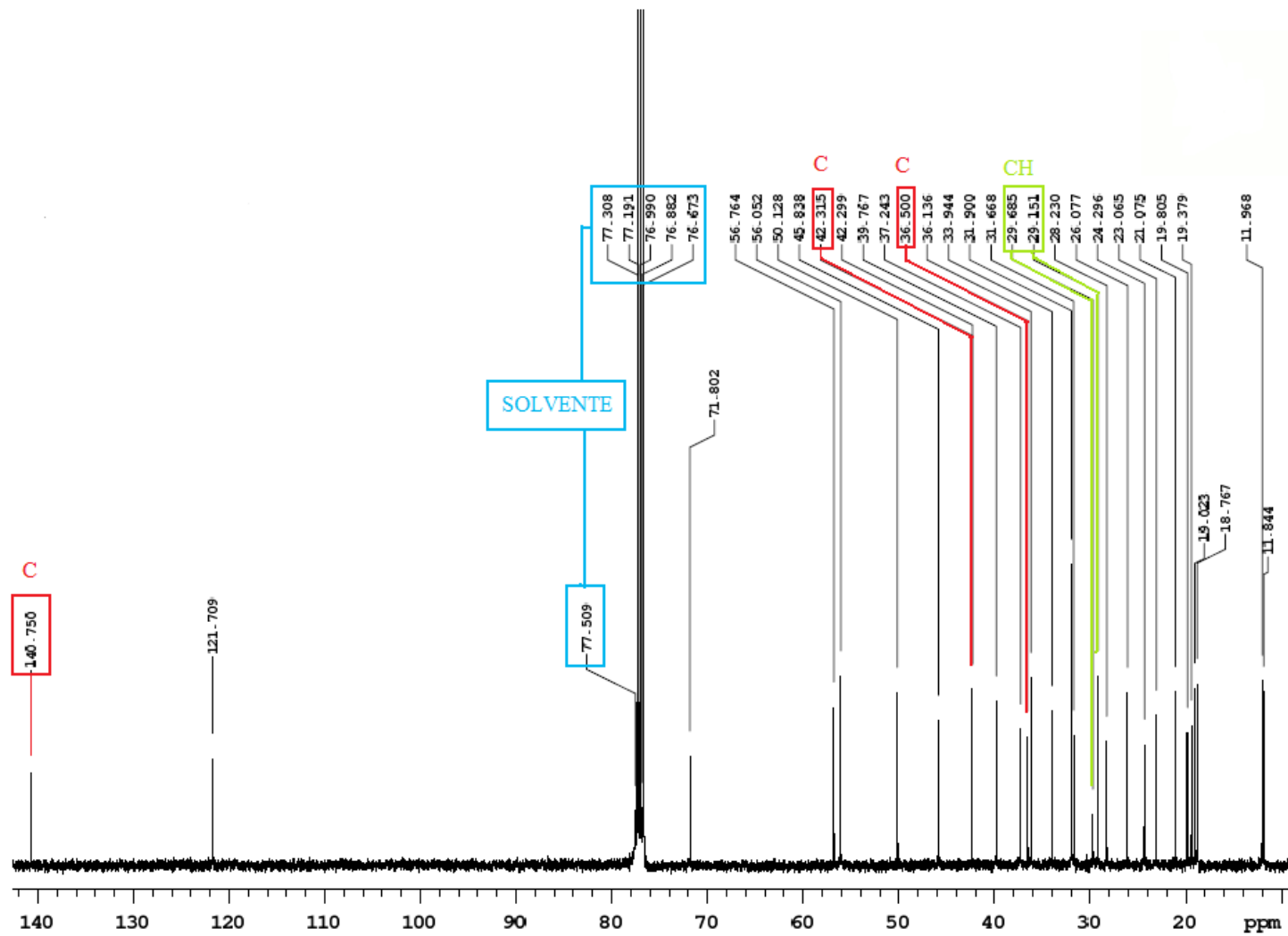
**Figura 27.** Estructura química del estigmasterol.



**Figura 28.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del estigmasterol de la muestra de Fierro Urco en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).



**Figura 29.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del estigmasterol de la muestra de Papallacta en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).



**Figura 30.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del estigmasterol de la muestra de Fierro Urco en CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).

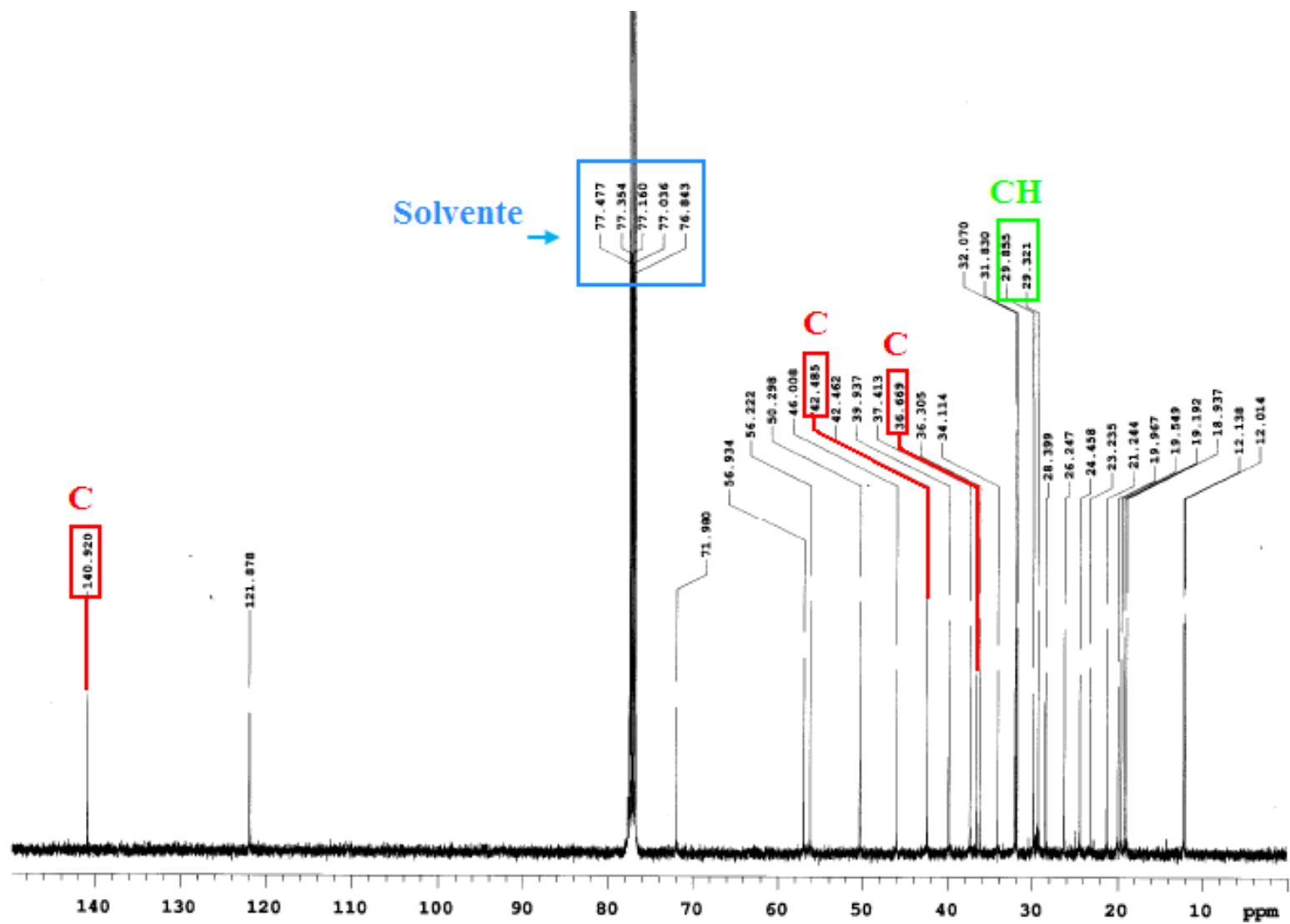
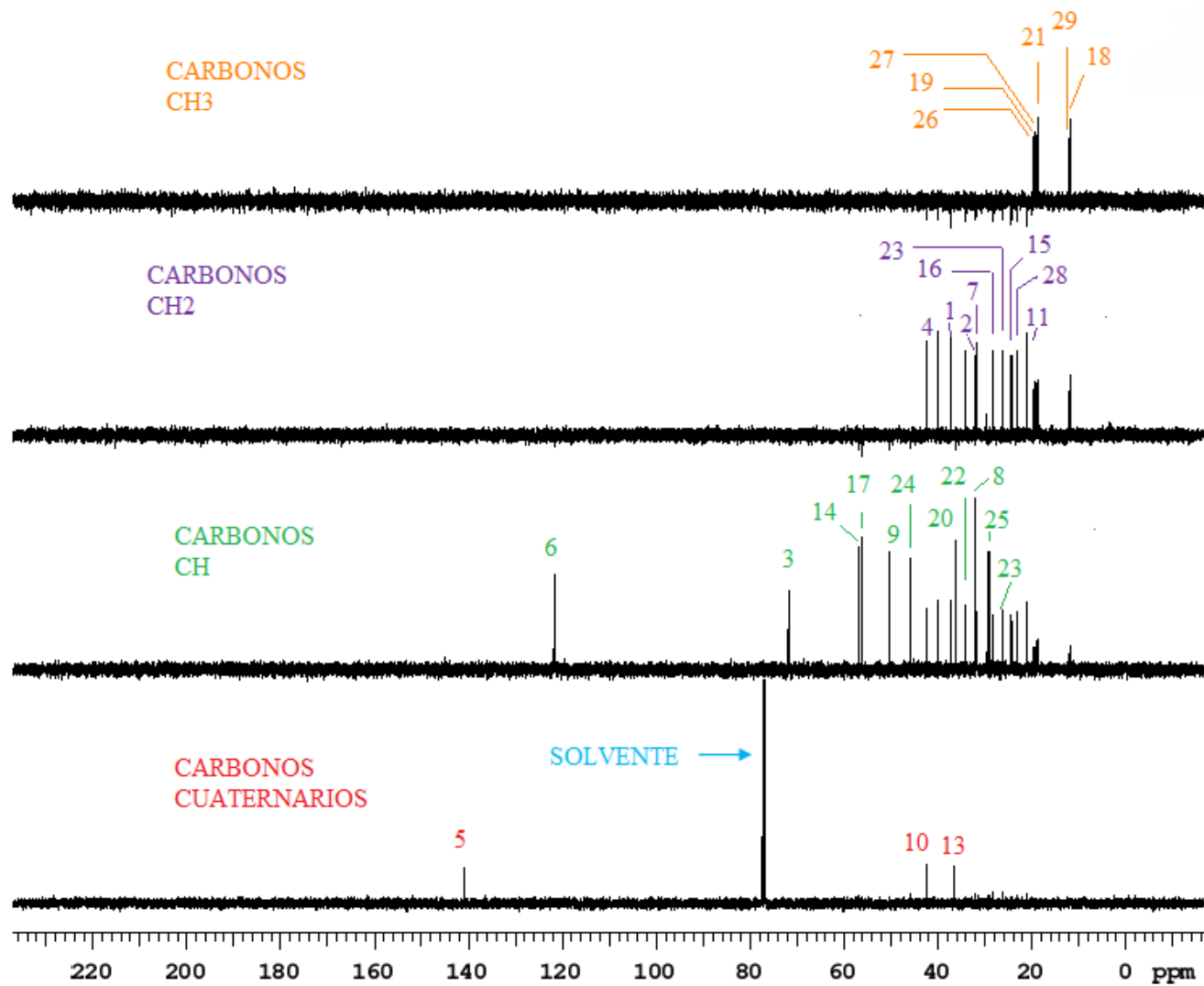
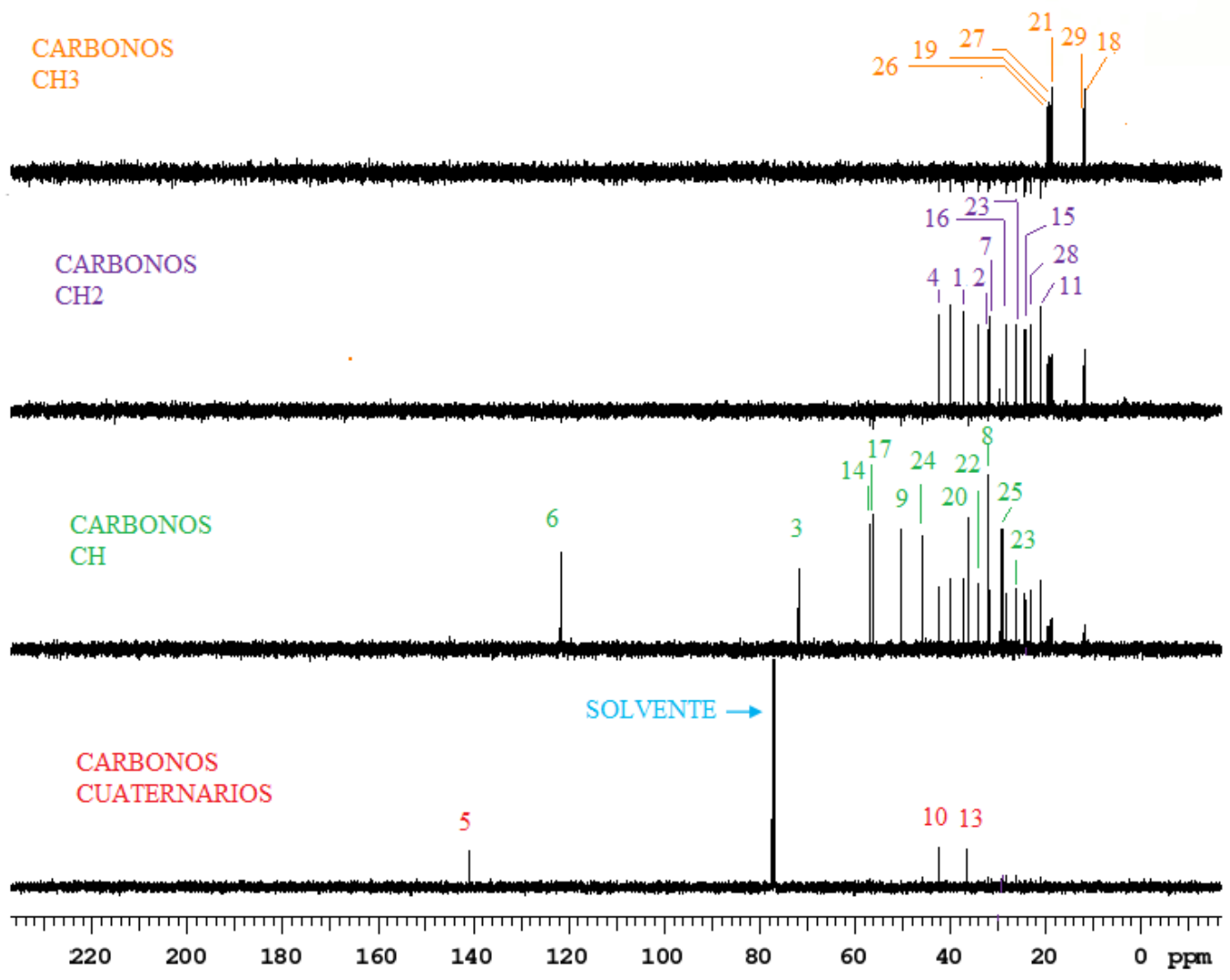


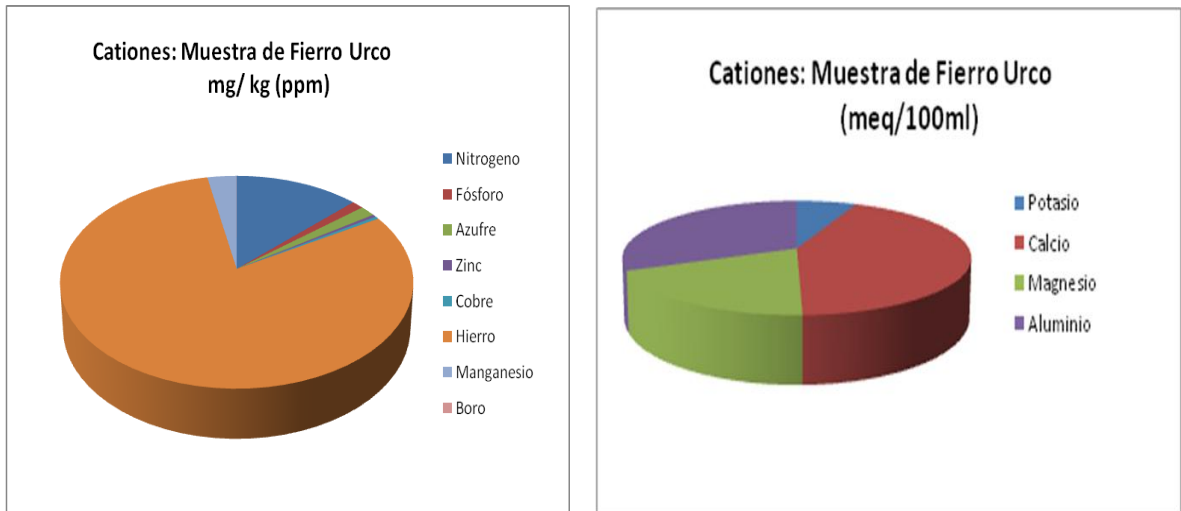
Figura 31. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del estigmasterol de la muestra de Papallacta en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).



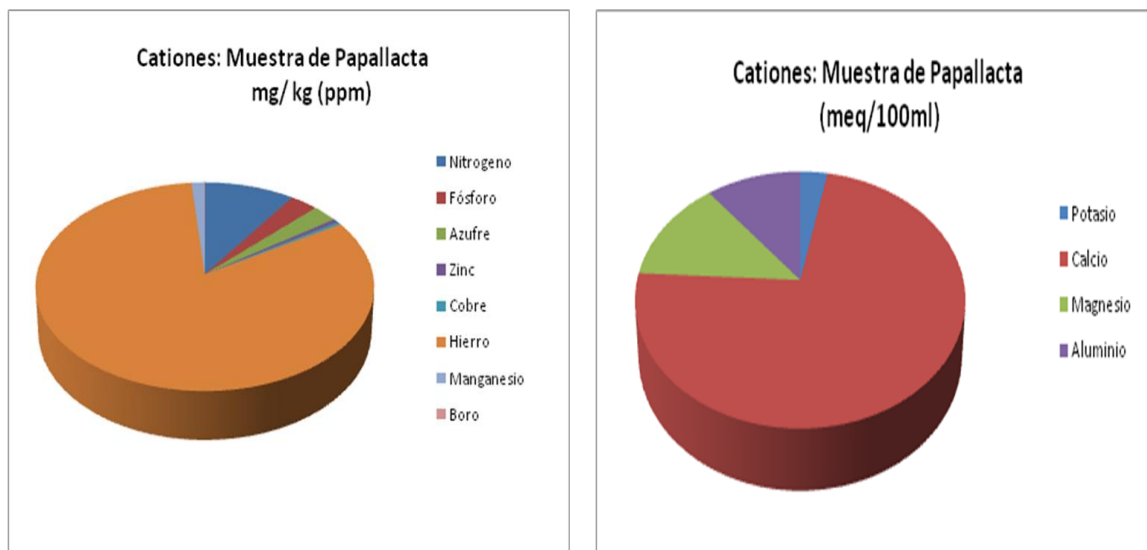
**Figura 32.** Espectro de RMN DEPT del estigmasterol de la muestra de Fierro Urco en CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



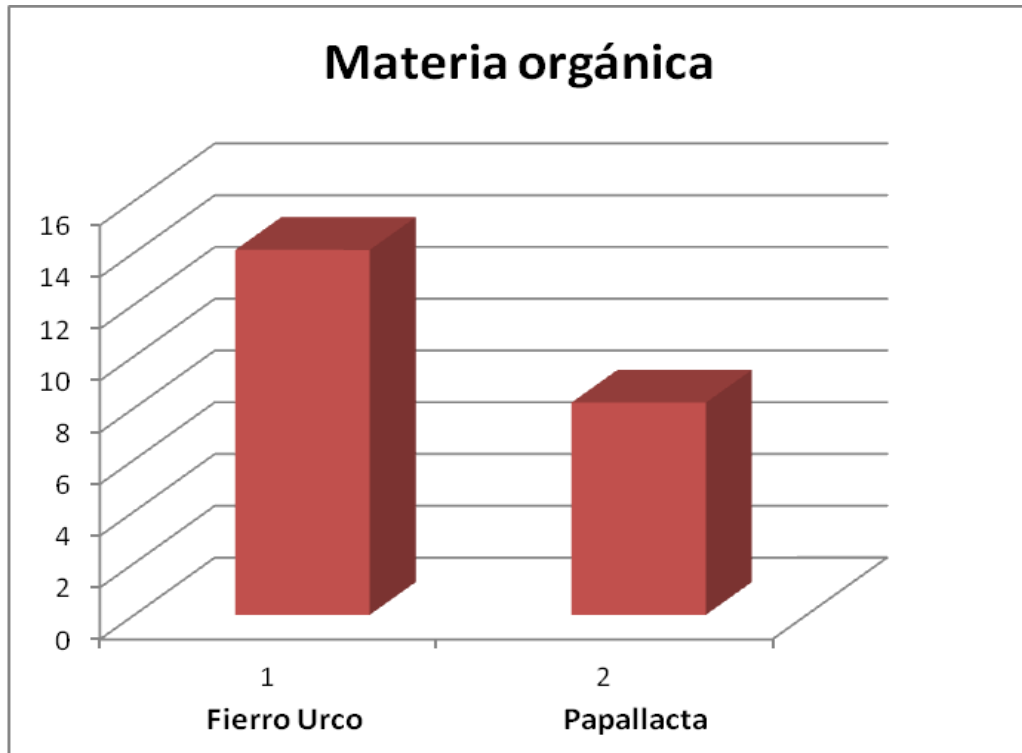
**Figura 33.** Espectro de RMN DEPT del del estigmasterol de la muestra de Papallacta en CDCl<sub>3</sub> (400 MHz).



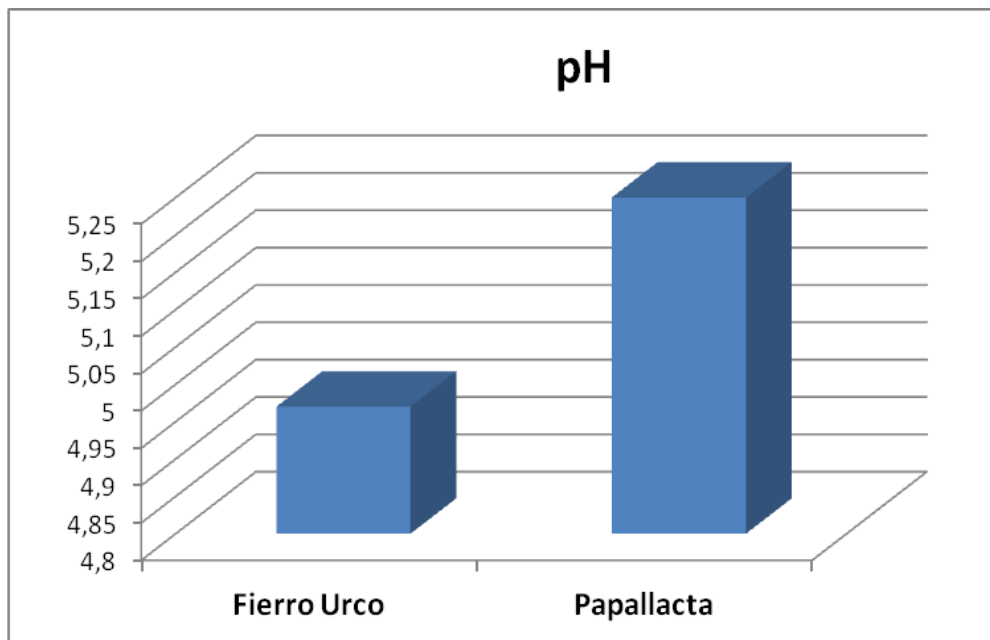
**Figura 34.** Cantidad de cationes en la muestra de suelo de Fierro Urco.



**Figura 35.** Cantidad de cationes en la muestra de suelo de Papallacta.



**Figura 36.** Porcentaje de materia orgánica del suelo de las muestras de Fierro Urco y Papallacta.



**Figura 37.** pH del suelo de las muestras de Fierro Urco y Papallacta.

## 10. TABLAS

**Tabla1.** Muestras de *Lachemilla orbiculata* colectadas

Fecha	Localidad	Altitud	Coordenadas	Peso material seco triturado (gramos)
30/4/11	Fierro Urco	3023m.s.n.m	S03°41'40,7" W079°18'07,8"	229,75
18/5/11	Papallacta. Camino Viejo	3758m.s.n.m	S00°17'54,1" W078°13,59,3"	233,30
18/5/11	Papallacta. Junto a la laguna	3376m.s.n.m	S00°22'31,6" W078°09'08,3"	234,71

**Tabla 2.** Cantidad de *Lachemilla orbiculata* en alcohol absoluto para la obtención de extractos alcohólicos

Localidad	Material triturado (gramos)	Alcohol (ml)
Fierro Urco	191,85	790
Papallacta. Camino Viejo	195,40	800
Papallacta. Junto a la laguna	196,80	800

**Tabla 3.** Características de los extractos alcohólicos

Localidad	Extracto sin alcohol (gramos)	Apariencia
Fierro Urco	44,44	Verde oscuro intenso, no posee un olor característico, viscoso, no muy denso.
Papallacta. Camino Viejo	59,52	Verde oscuro intenso, apariencia más líquida, levemente viscoso.
Papallacta. Junto a la laguna	42,85	Verde oscuro intenso, sin olor característico, muy viscoso.

**Tabla 4.** Marcha fitoquímica. Presencia o ausencia de metabolitos secundarios en extracto etéreo

Extracto Etéreo					
Compuesto	Prueba	Fierro Urco	Papallacta (Camino Viejo)	Papallacta (Laguna)	Observaciones
Compuestos Grasos	Sudán	-	-	-	Cambio de color al permanecer en calor
	Dragendorff	++	+	+	Cambio de color y Opalescencia para Fierro Urco, mientras que para las muestras de Papallacta solo hubo Cambio de coloración
Alcaloides	Mayer	+	+	+	Cambio de color sin opalescencia ni turbidez
	Wagner	+	+	+	Turbidez al colocar el reactivo, se forma fase coloidal y opaca
Compuestos Lactónicos	Baljet	+	+	+	Precipitado rojizo
Triterpenos	Liebermann Buchard	+	+	+	Cambio de coloración a azul verdoso inmediato

**Tabla 5.** Marcha fitoquímica. Presencia o ausencia de metabolitos secundarios en extracto alcohólico

Extracto Alcohólico					
Compuesto	Prueba	Fierro Urco	Papallacta (Camino Viejo)	Papallacta (Laguna)	Observaciones
Catequinas		-	-	-	
Resinas		-	-	-	
Azúcares reductores	Fehling	-	-	-	Los extractos se tornaron de coloración azul, pero ninguno tuvo tonos rojizos
Compuestos lactónicos	Baljet	+	+	+	Tienen diferencias bien marcadas con el positivo del extracto etéreo
Saponinas	Espuma	-	-	-	Se colocó en el Vortex, pero no hubo espuma ni durante ni inmediatamente después del procedimiento.
Triterpenos y esteroides	Liebermann Burchard	++	+	+	El extracto de Fierro Urco mostró una tonalidad más intensa
Fenoles y taninos	Cl <sub>3</sub> Fe	+	+	+	Reacción inmediata
Nihidrina	Aminoácidos	-	-	-	
Quinonas	Borntrager	+++	+++	+++	Coloración roja intensa
Flavonoides	Shinoda	+	+	++	La coloración es levemente más intensa en la muestra de Papallacta
Antocianidina		-	-	-	No se formaron fases ni hubo coloración marrón.
Alcaloides	Dragendorff	++	+	+	más Evidente en Fierro Urco
	Mayer	+	+	+	Opalescencia leve
	Wagner	++	++	++	Fierro Urco presentó más turbidez, sin embargo no hubo un precipitado considerable.

**Tabla 6.** Marcha fitoquímica. Presencia o ausencia de metabolitos secundarios en extracto acuoso

Extracto Acuoso					
Compuesto	Prueba	Papallacta			Observaciones
		Fierro Urco	(Camino Viejo)	Papallacta (Laguna)	
Alcaloides	Dragendorff	++	+	+	Precipitado mínimo en las muestras.
	Mayer	+	+	+	Tonalidades distintas de los extractos.
	Wagner	++	++	++	En la muestra de la laguna de Papallacta existe más cambio de coloración y turbidez, en el extracto de Fierro Urco se observó un precipitado.
Fenoles y Taninos	Cl <sub>3</sub> Fe	+++	+++	+++	Color Violeta intenso. En la muestra de la Laguna de Papallacta se observa cierta tonalidad rojiza, casi imperceptible
Flavonoides	Shinoda	++	++	++	
Saponinas	Espuma	-	-	-	Se colocó en el Vortex, pero no hubo espuma ni durante ni inmediatamente después del procedimiento.
Az. Reductores	Fehling	+	+	+	
	Mucílagos	-	-	-	

**Tabla 7.** Valores de las soluciones de ácido gálico

Concentración sol. Madre mg/ml (ppm)	Vol. Sol. 1	Concentración mg/ml sol 2	Absorbancia (nm)
26	0	0	0
	0,4	10,75	0,0089
	1	26,88	0,116
	2	53,77	0,248
	4	107,55	0,467

**Tabla 8.** Determinación total de fenoles

	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración de ac. Galico mg/L (ppm)</b>	<b>Concentración mg/ml</b>	<b>V. de solución ml</b>	<b>Extracto etanólico seco (g)</b>	<b>Contenido fenólico total (mg EAG/g)</b>
Fierro Urco	0,389	89,0889	0,08909	10	0,0025	356,35
Papallacta	0,403	92,2	0,0922	10	0,0025	368,8

**Tabla 9.** Cromatografía en columna y TLC de la muestra de Fierro Urco

<b>Polaridad (Hexano: Ac. de etilo)</b>	<b>No. Fracción</b>	<b>Rf</b>	<b>UV 365nm</b>	<b>UV 254 nm</b>	<b>Revelado + calor</b>	<b>Posible Compuesto</b>
<b>100:0</b>	1,2	-	-	-	-	
	3	0,53	-	-	Plomo	
	4	-	-	-	-	
<b>90:10</b>		0,53	-	-	Celeste- Plomizo	
	5	0,60	Fluorescencia Verde	-	-	
		0,73	Rojizo Fluorescente	-	-	Clorofila
		0,82	Fluorescencia Verde	-	-	
	6	0,8	-	-	Celeste-Plomizo	
	7	0,73	-	-	Plomo	
	8	0,68	-	-	Lila Rojizo	
	9	0,68	-	-	Lila Rojizo	
<b>85:15</b>		0,84	Fluorescencia Verde	-	-	Clorofila
	10, 11	0,68	-	-	Plomo	
		0,88	Rojizo Fluorescente	-	-	Clorofila
	12	0,88	Rojizo Fluorescente	-	-	Clorofila
	13	0,84	-	-	Lila Plomizo	
		0,93	Rojizo Fluorescente	-	-	Clorofila
	14, 15	0,93	Rojizo Fluorescente	-	-	Clorofila
		0,62	-	Plomo	Lila Plomizo	
	16-18	0,71	-	-	Lila Plomizo	
		0,80	-	-	Lila Rojizo	
		0,84	Rojizo Fluorescente	-	Verde	Clorofila
	19	0,80	Rojizo Fluorescente	-	-	Clorofila
20	0,84	-	-	Plomo		
21	0,93	Rojizo Fluorescente	-	Verde	Clorofila	
22-24	0,68	Rojizo Fluorescente	-	Verde	Clorofila	

Continuación tabla 9

		0,75	-	-	Plomo	
		0,82	Rojizo Fluorescente	-	-	Clorofila
	25-27	0,66	-	-	Lila Plomizo	
		0,73	Rojizo Fluorescente	-	-	Clorofila
	28-34	0,62	-	-	Lila Plomizo	
		0,53	Rojizo Fluorescente	Plomo	Verde	Clorofila
	35-39	0,62	-	-	Lila Plomizo	
		0,6	Rojizo Fluorescente	-	-	Clorofila
	40-46	0,51	-	-	Plomo	
		0,57	-	-	Plomo	
		0,84	Rojizo Fluorescente	Plomo	Verde	Clorofila
		0,68	-	-	Celeste- Turquesa	
		0,73	-	-	Rojiza	
		0,84	Verde	Plomo	Lila Plomizo	
		0,46	-	Plomo	-	
	47-52	0,66	Rojizo Fluorescente		Verde	Clorofila
		0,73	-	-	Plomo	
		0,80	Rojizo Fluorescente	Plomo	-	Clorofila
	53-58	0,22	-	-	Lila	
		0,33	-	-	Celeste- Turquesa	
		0,44	Rojizo Fluorescente	Plomo	Verde	Clorofila
		0,55	-	-	Lila Rojizo	
		0,88	Verde	-	Lila	
	59	0,84	-	-	Plomo	
		0,33	-	Plomo	-	
<b>75:25</b>	60-63	0,53	-	-	Verde	
		0,66	Rojizo Fluorescente	-	Verde	Clorofila
		0,73	-	-	Celeste- Turquesa	
		0,95	Azul Fluorescente	-	Rojiza	

Continuación tabla 9

64,65,66	0,69	-	-	Celeste- Plomizo	Clorofila
	0,58	Rojizo Fluorescente	-	-	
	0,23	Verde	-	-	
67,68	0,69	-	-	Celeste- Turquesa	
	0,30	-	-	Lila- Rojizo	

**Tabla 10.** Cromatografía en columna y TLC de la muestra de Papallacta

<b>Polaridad (Hexano: Ac. De etilo)</b>	<b>No. Fracción</b>	<b>Rf</b>	<b>Luz UV 365nm</b>	<b>Luz UV 254 nm</b>	<b>Revelado + calor</b>	<b>Posible Compuesto</b>	
<b>100:0</b>	1,2,3	-	-	-	-		
<b>90:10</b>	4, 5	0,95	Fluorescencia Verde	-	Color Plomizo	Clorofila	
	6	0,95	Fluorescencia Verde	-	Color Lila Intenso	Clorofila	
	7	0,68	-	-	Violeta Intense		
	8, 9	0,66	Rojizo, Fluorescente	Azúl	Verde- Plomizo	Clorofila	
	10		0,73	-	-	Plomo	
			0,8	-	-	Plomo	
	11		0,55	-	-	Lila- Plomizo	
			0,62	-	Plomo	Amarillo	
			0,71	Rojizo, Fluorescente	Plomo	Verde	Clorofila
			0,80	-	-	Rosado- Lila Intense	
			0,86	Rojizo, Fluorescente	Plomo	Verde	Clorofila
			0,95	Verde	Plomo		
			12	0,80	-	-	Rosado- Lila Intense
	13		0,55	-	-	Lila- Plomizo	
			0,62	-	Plomo	Amarillo	
0,71			Rojizo, Fluorescente	Plomo	Verde	Clorofila	
0,80			-	-	Rosado- Lila Intense		
0,86			Rojizo, Fluorescente	Plomo	Verde	Clorofila	
<b>85:15</b>	14 Y 15	0,70	-	Plomo	Plomo		
		0,78	-	-	Lila- Plomizo		
		0,83	Rojo	Plomo	Verde	Clorofila	
		0,90	-	-	Lila		
		0,96	Verde	Plomo- Azúl	Plomo		

**Tabla 11.** Características de los compuestos aislados

<b>Localidad</b>	<b>Fracción</b>	<b>Gradiente Hexano: Acet. Etilo</b>	<b>Apariencia física</b>	<b>Rf</b>	<b>Cantidad obtenida (mg)</b>	<b>Características TLC</b>	<b>Punto de fusion °C</b>
Fierro Urco	8, 9	85: 15	Polvo blanco	0,7	25,9	Apareció con el revelado de Ac. Sulfúrico, vainillina y calor. Color violeta intenso	133- 136
Papallacta	7	90: 10	Polvo blanquecino	0,86	6,9	Apareció solo con el revelado de Ac. Sulfúrico, vainillina y calor Violeta intenso.	121- 127

**Tabla 12.** Desplazamiento en el espectro de protón de Fierro Urco y Papallacta

Desplazamiento(ppm)		No. de C	No. de H
Fierro Urco	Papallacta		
7,26	7.260		1H
3,49		3	1H
1,833	1,833	1	1H
	1,675	16	1H
	1,671		
	1,659		
	1,654		
	1,642		
1,529		2	1H
1,496	1,496	7	1H
	1,490	11	2H
	1,477	7	1H
	1,284	16	1H
	1,264		
1,253	1,254		
	1,162	12	1H
	1,149	17	1H
	1,117	17	1H
1,008	1,009	19	3H
0,930	0,930	9	1H
0,921	0,922		
0,913	0,914	28	3H
0,864	0,086	26	3H
0,845	0,846		
0,827	0,827		
0,822	0,823	29	3H
0,806	0,806	27	3H
0,680	0,681	18	3H

**Tabla 13.** RMN <sup>13</sup> C de los compuestos de Fierro Urco y Papallacta

No de C en la molécula	Desplazamientos (ppm)		DEPT
	Fierro Urco	Papallacta	
5	140,750	140,920	C
6	121,709	121,878	CH
1	71,802	71,980	CH
14	56,764	56,934	CH
17	56,052	56,222	CH
9	50,128	50,298	CH
24	45,838	46,008	CH
10	42,315	42,485	C
4	42,299	42,462	CH <sub>2</sub>
12	39,767	39,937	CH <sub>2</sub>
1	37,243	37,413	CH <sub>2</sub>
13	36,500	36,669	C
20	36,136	36,305	CH
22	33,944	34,114	CH
7, 8	31,900	32,070	CH <sub>2</sub> , CH
2	31,668	31,830	CH <sub>2</sub>
25	29,151	29,855 29,321	CH
16	28,230	28,399	CH <sub>2</sub>
23	26,077	26,247	CH
15	24,296	24,458	CH <sub>2</sub>
28	23,065	23,235	CH <sub>2</sub>
11	21,075	21,244	CH <sub>2</sub>
26	19,805	19,967	CH <sub>3</sub>
19	19,379	19,549	CH <sub>3</sub>
27	19,023	19,192	CH <sub>3</sub>
21	18,767	18,937	CH <sub>3</sub>
29	11,968	12,138	CH <sub>3</sub>
18	11,844	12,014	CH <sub>3</sub>

**Tabla 14.** Diferencias de los desplazamientos entre los Carbonos analizados de las dos localidades.

No de C	Fierro Urco	Papallacta	Diferencia
5	140,750	140,92	0,170
6	121,709	121,878	0,169
1	71,802	71,98	0,178
14	56,764	56,934	0,170
17	56,052	56,222	0,170
9	50,128	50,298	0,170
24	45,838	46,008	0,170
10	42,315	42,485	0,170
4	42,299	42,462	0,163
12	39,767	39,937	0,170
1	37,243	37,413	0,170
13	36,500	36,669	0,169
20	36,136	36,305	0,169
22	33,944	34,114	0,170
7, 8	31,900	32,07	0,170
2	31,668	31,83	0,162
25	29,151	29,855 29,321	0,704
16	28,230	28,399	0,169
23	26,077	26,247	0,170
15	24,296	24,458	0,162
28	23,065	23,235	0,170
11	21,075	21,244	0,169
26	19,805	19,967	0,162
19	19,379	19,549	0,170
27	19,023	19,192	0,169
21	18,767	18,937	0,170
29	11,968	12,138	0,170
18	11,844	12,014	0,170
Promedio			0,188

**Tabla 15.** Cantidad de cationes de las muestras de suelo de Papallacta y Fierro Urco.

	<b>Fierro Urco</b>	<b>Papallacta</b>
<b>Catión</b>	<b>Cantidad (ml/ kg)</b>	
Nitrógeno	136	65
Fósforo	13	20
Azufre	17	18
Zinc	4	4
Cobre	4,4	2,8
Hierro	852	552
Manganesio	31,7	8,9
Boro	0,3	0,65

**Tabla 16.** Cantidad de cationes de las muestras de Papallacta y Fierro Urco

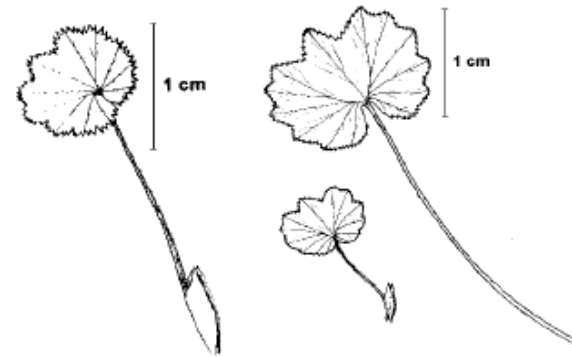
	<b>Fierro Urco</b>	<b>Papallacta</b>
<b>Catión</b>	<b>Cantidad (meq/ 100ml)</b>	
Potasio	0,44	0,23
Calcio	2,9	5,4
Magnesio	1,3	0,99
Aluminio	2,1	0,8

**Tabla 17.** Porcentaje de Materia orgánica en porcentaje de las muestras de Papallacta y Fierro Urco

	<b>Fierro Urco</b>	<b>Papallacta</b>
<b>Nutriente</b>	<b>Cantidad (%)</b>	
Materia orgánica	14,1	8,2

## **11. ANEXOS**

Anexo 1. *Lachemilla orbiculata*



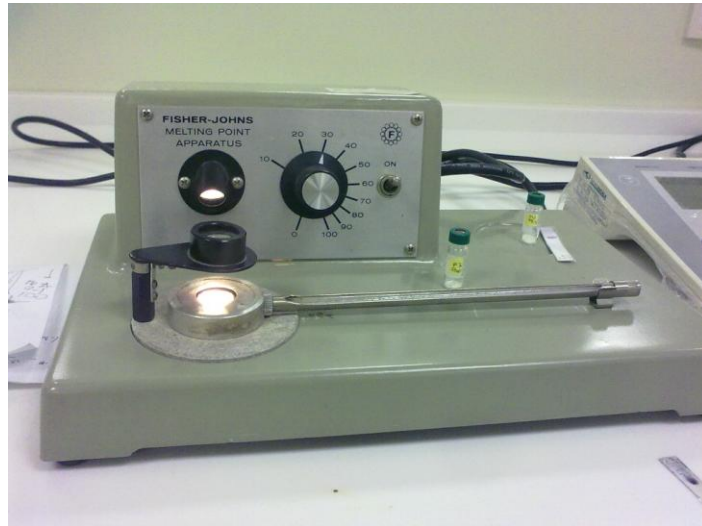
Hojas de *Lachemilla orbiculata*



Hábito de *L. orbiculata*

Foto: Tania González. Dibujos: tomados  
y modificados de Romoleroux (1996).

## Anexo 2.



**Equipo para determinar el Punto de Fusión Fisher Jhons (Melting point apparatus)**

## Anexo 3.



**Equipo de Resonancia Magnética Nuclear Varian 400 MHz**

**Anexo 4. Resultados  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT del estigmasterol de la muestra de Fierro Urco en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).**

**Anexo 5. Resultados  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT del estigmasterol de la muestra de Papallacta en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).**

## **Anexo 6. Análisis de suelo de la muestra de Fierro Urco**

## **Anexo 7. Análisis de suelo de la muestra de Papallacta**

## 12. GLOSARIO

**Absorbancia:** Expresa la extensión de absorción lumínica cuando la energía radiante pasa a través de una solución.

**Ácido clorogénico:** Compuesto fenólico que contribuye con el color y sabor de estructuras vegetales.

**Ácido palmítico:** Á. Hexadecanoico; el ácido graso más abundante en los seres humanos.

**Ácido siquímico:** Intermediario de la ruta de biosíntesis de fenoles. Está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales.

**Alcaloide:** Sustancia orgánica nitrogenada de origen vegetal con un núcleo heterocíclico.

**Aldehído:** Compuesto orgánico que posee un grupo  $-CHO$  unido a hidrogeno o al carbono de un radical orgánico. Algunos intervienen en el metabolismo vegetal como es el caso del formaldehído.

**Alelopático:** La alelopatía es el grado de inhibición del crecimiento que provoca una planta sobre otra, entre especies diferentes y entre cultivares de la misma especie por la presencia de compuestos químicos (Aleloquímicos).

**Antocianinas:** Pigmento de flor y frutos, usualmente glucósidos. Los más representativos son la mistilina y la sambucina.

**Betalina:** Compuesto fenólico, contiene nitrógeno. Su función principal es ser el pigmento de las flores.

**Brácteas connadas:** Órgano foliáceo situado en la proximidad de las flores, distinto por sus características de las hojas normales y de las que constituyen el cáliz y la corola que, habiendo nacido conjuntamente aparecen más o menos unidos entre sí.

**Cianidina:** Una antocianidina con dos grupos –OH en el anillo bencénico situado a la derecha, proporciona el color de moras, manzanas, fresas.

**Cromatografía:** El análisis cromatográfico es un método físico-químico que permite separar componentes de una sustancia, a través de la interacción de cada uno de los elementos de la mezcla con un disolvente que constituye la fase móvil y con un sólido que es la fase estacionaria. La separación cromatográfica ocurre por la afinidad relativa de cada compuesto con las fases, y por ende por la velocidad con la que fluye por la fase estacionaria.

**Cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en inglés):** Variante de la cromatografía de columna o de papel. La fase fija está formada por una capa uniforme de adsorbente. La fase fija se adhiere a una placa rígida, generalmente de vidrio, y puede prepararse en cromatofolios.

**Cromatografía de columna:** Las técnicas de cromatografía se valen de la diferencia de solubilidad de las distintas moléculas en una fase móvil en relación con una fase estacionaria. En la cromatografía de líquidos la fase móvil (el eluyente) es un líquido y la fase estacionaria es un sólido compuesto de partículas pequeñas en torno a las cuales fluye el líquido.

**Cumarina:** Estructura química simple, posee dos o más fenoles hidroxilicos que pueden ser clasificados como reductores. Las cumarinas se encuentran en la naturaleza derivados de esqueletos de glucosa.g

**Espectrofotómetro:** instrumento óptico que mide la energía luminosa transmitida a través de una solución o un gas a cualquier longitud de onda determinada dentro de una banda continua de longitudes de onda.

**Fase móvil:** es un fluido que viaja a través de la muestra y de la fase estacionaria para arrastrar compuestos químicos con diferente solubilidad.

**Fenilalanina:** aminoácido aromático esencial que forma el 5% de las proteínas.

**Flavonoides:** Grupo mayoritario de compuestos fenólicos, posee un núcleo de 15C. Posee dos anillos benzoicos unidos por una estructura C3, normalmente, el núcleo del flavonoide está unido a un azúcar y forma un glucósido polar. La mayoría de flavonoides se encuentran en las vacuolas de las células vegetales.

**Glucósidos:** Son compuestos que poseen grupos -OH, -NH<sub>2</sub> y -SH que pueden reaccionar con -OH del carbono de un monosacárido con pérdida de una molécula de agua. Es una molécula compuesta por un glúcido (generalmente monosacáridos) y un compuesto no glucídico. **Glucosinolatos:** Glucósidos que contienen J-D-Thioglucosa.

**Hidrocarburo insaturado:** Es un hidrocarburo en que algún átomo de carbono no está saturado (es decir, unido a otros cuatro átomos exclusivamente por enlaces simples) sino que tiene algún enlace doble o triple. Los hidrocarburos insaturados pueden ser de dos tipos: alquenos (con dobles enlaces) y alquinos (con triples enlaces).

**Hojas pinnatolobadas:** Órgano foliáceo de nervadura palmeada dividida hasta la mitad en lóbulos muy marcados y más o menos redondos.

**Isopropeno:** Precursor de las proteínas liposolubles y de compuestos terpeénicos

**Lignina:** Sustancias que acompañan a la celulosa en las paredes celulares de los tejidos. Forma un 25% de la madera seca. Es de carácter hidroaromático, con grupos hidroxilos metilados en un 15- 20%.

**Margen creanado-aserrado:** muesca, recortado y a modo de sierra, con dientes agudos y próximos.

Polifenol: Varias moléculas con las características de los fenoles.

**Proantocianidinas:** Cadenas poliméricas de flavonoides como flavonas y catequinas.

**RMN:** Método espectroscópico más utilizado para la determinación de la estructura molecular. Da información sobre la forma y simetría con un grado de precisión mayor que lo que es posible con otras técnicas espectroscópicas.

**Saponinas:** Glucósidos de esteroides o de triterpenoides, que forman soluciones coloidales espumosas.

**Seríceos:** Cubierto de pelos adpresos, generalmente cortos, rectos y que tienen un cierto brillo, como de seda.

**Solución de cloruro férrico:** Se disuelve  $CL_3Fe$  al 10 % en agua.

**Solución reactiva de Baljet:** Dos soluciones elaboradas independientemente que al momento de ser utilizadas se las mezcla. Sol. A: 1 g de ácido pícrico en 100 ml de etanol; Sol B. 10 g de NaOH en 100 ml de agua.

**Solución reactiva de Dragendorff:** Solución preparada con 21,3 ml de ácido nítrico aforado a 62 ml. En 20 ml de ésta solución se disuelven 5 g de subnitrito de bismuto. Separadamente se disuelve 31,2 g de yoduro de potasio en 69 ml de agua. Se mezcla las dos soluciones.

**Solución reactiva de Mayer:** Sol A. 1,258 g cloruro mercuríco se disuelven en 60 ml de agua. Sol. B. 5 gr de yoduro de potasio en 20 ml de agua, se mezclan ambas soluciones y se afora a 100 ml con agua.

**Solución reactiva Sudan III:** Solución al 6 % de Sudan III en una solución al 50% de alcohol y glicerina.

**Solución reactiva de Wagner:** Se disuelven 2 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en 100 ml.

**Sorbitol:** Compuesto que se forma por la reducción de azúcares con seis carbonos (aldohosas y cetohehexosas).

**Taninos:** son metabolitos secundarios de las plantas, fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni solventes orgánicos.

(Atkins, 2007; Bennington, 2000; Devore y Muñoz, 1983; Días, 2006; Font- Quer, 1982; Fox y Whitesell, 2000; Garritz y Chamizo, 1998; Gil, 2010; Marcano y Hasegawa, 2002; Migdalia y Culler, 2001; Shriver *et al.*, 2004; Taiz y Zeiger, 2006; Teijón *et al.*, 2006).

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Tania Ivanova González Rivadeneira, C.I. 172198346-6, autora del trabajo de graduación intitulado “Análisis de metabolitos secundarios de *Lachemilla orbiculata* (Ruiz & Pavón) Rydb. (Rosaceae) en dos localidades de los Andes del Ecuador” previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 1 de diciembre del 2011

Srta. Tania I. González R.

C.I. 1721983466