

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio Químico Comparativo de Metabolitos Fijos y Aceite Esencial De *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez y Evaluación de su Actividad Biológica

Juan Manuel Álvarez Caballero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2016

Estudio Químico Comparativo de Metabolitos Fijos y Aceite Esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez y Evaluación de su Actividad Biológica

Juan Manuel Álvarez Caballero

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Doctor en Ciencias Químicas

Director (a):

Luis Enrique Cuca Suárez

Profesor titular Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de
Colombia

Línea de Investigación:

Productos Naturales Vegetales

Grupo de Investigación:

Estudio químico y de actividad biológica de Rutaceae y Myristicaceae
Colombianas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2016

*A mi Familia, especialmente a mi padre
ALFONSO por su amor y apoyo incondicional*

Agradecimientos

A la UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA por la financiación del programa doctoral mediante el Programa de Formación Avanzada para la Docencia y la Investigación.

Al profesor LUIS ENRIQUE CUCA SUÁREZ, por la confianza, por las oportunidades brindadas, su dedicación, paciencia, amistad y por su valiosa dirección, orientación y enseñanzas.

A la profesora ALEGRIA CARRASCO PANCORBO de la Universidad de Granada (España), agradezco la oportunidad dada para la realización de la pasantía en su grupo de investigación, por su asesoría y acompañamiento en el desarrollo de la caracterización y estudio químico comparativo de extractos mediante CL/EM, por la confianza, enseñanzas y amistad brindada.

A JESUS MARTIN y FERNANDO REYES de la FUNDACION MEDINA, Granada (España) por su apoyo incondicional y asesoría en la realización de los análisis de cromatografía líquida preparativa y los ensayos de actividad antimicrobiana.

Al profesor IGNACIO FERNANDEZ, de la Universidad de Almería (España), por su oportuna asesoría y valiosa ayuda en cuanto al desarrollo de toma de espectros de RMN y experimento DOSY, por la confianza y amistad brindada.

Al profesor FABIO ARISTIZABAL, del Dpto de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, por la asesoría en los ensayos de actividad citotóxica

Al LABORATORIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR de la Universidad Nacional de Colombia por la toma de espectros de RMN.

Al LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS de la Universidad Nacional de Colombia por la toma de los espectros de masas de baja y/o alta resolución.

Al HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO de la Universidad Nacional de Colombia por la determinación taxonómica de las muestras vegetales empleadas en el estudio fitoquímico.

Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo aportar a la exploración química de la familia Lauraceae específicamente del género *Persea*, combinando el aislamiento e identificación de metabolitos de la especie *Persea caerulea* con el estudio químico comparativo mediante plataformas analíticas (CL/EM;CG/EM), de extractos y aceites esenciales obtenidos de un total de veinte individuos de la especie colectados en la región Caribe y Andina del territorio colombiano. Adicional a ello, se realizó la exploración del potencial biológico de la especie *P. caerulea* evaluando de manera preliminar la actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica de extractos, aceites esenciales, metabolitos aislados y derivados.

El estudio fitoquímico de hojas, corteza y madera de *P. caerulea* permitió la caracterización e identificación de veinticinco metabolitos incluidos cinco flavonoides acilados sin reportes previos en la literatura, denominados caerulina A-E (HPc6-HPc10), seis flavonoles glicosidados, cuatro esteroides, tres hidroxycumarinas, tres flavanoles, un flavanol, una naftoquinona, un lignano y un glicósido. En esta investigación diferentes técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas (RMN y EM) fueron utilizados para la identificación de los compuestos.

La caracterización química de los aceites esenciales determinó que los sesquiterpenos son los compuestos más abundantes en el aceite esencial de *P. caerulea*, siendo β -cariofileno y β -farneseno los metabolitos mayoritarios. El análisis multivariado de extractos de hojas, corteza y madera colectados en las diversas regiones permitió establecer que las muestras de hojas presentan mayor diferencia en composición respecto a corteza y madera. Los aceites esenciales se diferenciaron no solo por lugar sino por periodo de colecta. Los flavonoides glicosidados quercetina-3-O- β -glucósido y quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosido son los principales metabolitos responsables de la diferenciación entre los extractos de las diferentes estructuras analizadas. Para el caso de los aceites esenciales los compuestos sabineno y β -cariofileno marcaron la diferencia

entre los lugares y periodo de colecta. Sólo los extractos etanólicos de hojas de *P. caerulea* presentaron actividad antifúngica, mientras que los extractos de corteza y madera mostraron actividad citotóxica. Los aceites esenciales exhibieron actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*. El 2,7-dimetoxi-5-hidroxi-6-(1-hidroxietil)-1,4-naftoquinona aislado de la corteza de *P. caerulea* fue el compuesto más activo exhibiendo actividad antifúngica, citotóxica y antibacteriana. En general los compuestos modificados exhibieron mayor actividad biológica que la molécula original o precursora.

Palabras clave: Lauraceae, *Persea caerulea*, Flavonoides, Estudio Comparativo, Citotóxico, Antifúngico, Antibacteriano.

Abstract

The present work aims to contribute to the chemotaxonomic exploration of the Lauraceae family specifically of the genus *Persea*, combining the isolation and identification of metabolites of the *Persea caerulea* species with the comparative chemical study using analytical platforms (LC/MS; GC/MS) of extracts and essential oils obtained from 20 individuals of the species collected in the Caribbean and Andean region from Colombia. In addition, the biological potential of the *P. caerulea* species was evaluated by preliminary evaluation of the antifungal, antibacterial and cytotoxic activity of extracts, essential oils, isolated and derivatives.

Phytochemical study of leaves, bark and wood from *P. caerulea* let the characterization and identification of twenty five secondary metabolites, including five acylated flavonoids without previous reports in the literature and named: caerulin A-E (HPc6-HPc10), six glycosidic flavonols, four sterols, three hydroxycoumarins, three flavanols, one flavonol, one naphthoquinone, one lignan and one glycoside. In this investigation different chromatographic and spectroscopic, spectrometric techniques (NMR and MS) were used to identify the compounds.

The chemical essential oils characterization determined that the sesquiterpene compounds are the most abundant ones in the *P. caerulea*'s essential oil, this composition dominated by β -caryophyllene and β -farnesene. The multivariate analysis of leaf extracts, bark and wood collected in the different regions, indicated higher composition variability in the leaf samples, than bark and wood. In addition, the extracts were differentiated by place of origin.

Essential oils differed not only by location but also by period of sampled. The differentiation metabolites over all extracts (leaf, wood and bark) and all structures are, the glycoside flavonoids quercetine-3-O- β -glucoside and quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside. In the case of essential oils, sabinene and β -caryophyllene marked difference among place and collect period. Only ethanolic extracts from *P. caerulea*'s leaves presented antifungal activity, while wood and bark's extracts showed citotoxic

activity. The essential oils exhibited antifungal activity against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. 2,7-dimethoxy-5-hydroxy-6-(1-hydroxyethyl)-1,4-naphthoquinone isolated from bark's extract was the most active compound, showing antifungal, cytotoxic and antibacterial activity. In general, the modified compounds displayed higher biological activity than the original molecule or their precursor.

Keywords: Lauraceae, *Persea caerulea*, flavonoids, cytotoxic, antimicrobial, comparative study.

Contenido

	Pág
Resumen	VIII
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XIX
Lista de Símbolos y abreviaturas	XX
Introducción	1
1. Estado actual del tema	5
1.1 Generalidades de la familia Lauraceae	5
1.1.1 Usos de especies de la familia Lauraceae	6
1.2 Generalidades del género <i>Persea</i>	8
1.2.1 Distribución del género <i>Persea</i>	9
1.2.2 Morfología del género <i>Persea</i>	10
1.2.3 Usos del género <i>Persea</i>	11
1.2.4 Estudio fitoquímico del género <i>Persea</i>	12
1.2.5 Actividad biológica del género <i>Persea</i>	18
1.2.6 Generalidades de la especie <i>P. caerulea</i>	19
2. Estudio Fitoquímico de Hojas, Corteza y Madera de <i>P. caerulea</i>	23
2.1 Generalidades	23
2.2 Metodología.....	24
2.2.1 General	24
2.2.2 Material vegetal.....	26
2.2.3 Extracción, Fraccionamiento y Purificación de Metabolitos Secundarios del Extracto Crudo de Hojas de <i>P. caerulea</i>	26
2.2.4 Extracción, Fraccionamiento y Purificación de Metabolitos Secundarios del Extracto Crudo de Corteza de <i>P. caerulea</i>	30
2.2.5 Extracción, Fraccionamiento y Purificación de Metabolitos Secundarios del Extracto Crudo de Madera de <i>P. caerulea</i>	31
2.3 Resultados y discusión	34
2.3.1 Extracción, Fraccionamiento y Purificación de Metabolitos Secundarios del Extracto Crudo de Hojas, Corteza y Madera de <i>P. caerulea</i> ...	34
2.3.1.1 Elucidación estructural de los compuestos HPc6-HPc10	39
2.3.1.2 Experimento DOSY con matriz asistida de los compuestos HPc16 y Hpc17	55
2.4 Conclusiones	65

3. Estudio Químico Comparativo de la especie <i>P. caerulea</i>	67
3.1 Generalidades	67
3.2 Metodología	68
3.2.1 Estudio Químico Comparativo de Extractos Etanólicos de Hojas, Corteza y Madera de <i>P. caerulea</i>	68
3.2.2 Estudio Químico Comparativo de Aceites Esenciales de Hojas de <i>P. caerulea</i>	75
3.3 Resultados y discusión.....	76
3.3.1 Estudio Químico Comparativo de los Extractos de Hojas, Corteza y Madera de <i>P. caerulea</i>	76
3.3.2 Estudio Químico Comparativo de los Aceites Esenciales de Hojas de <i>P. caerulea</i>	95
3.4 Conclusiones.....	109
4. Actividad Antifúngica, Antibacteriana y Citotóxica de Extractos, Aceites Esenciales, Compuestos aislados y Transformados	113
4.1 Generalidades	113
4.2 Metodología	115
4.2.1 Derivados Hemisintéticos del Flavonol Quercetina	115
4.2.2 Estudio de citotoxicidad en líneas celulares tumorales	118
4.2.3 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana	120
4.3 Resultados y discusión.....	122
4.3.1 Esteres de Aminoácidos Derivados de la Quercetina.....	122
4.3.2 Derivado de la Quercetina con Grupo Trifluorometilo.....	128
4.3.3 Estudios de Citotoxicidad en Líneas Celulares Tumorales.....	130
4.3.4 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.....	135
4.4 Conclusiones.....	143
Bibliografía	145
Producción científica	162
Recomendaciones y Sugerencias	164
Anexos	165

Lista de figuras

	Pág
Figura 1-1: Distribución Mundial de la Familia Lauraceae.....	6
Figura 1-2: Morfología del género <i>Persea</i>	10
Figura 1-3: Morfología <i>P. caerulea</i>	19
Figura 1-4: Distribución mundial de la especie <i>P. caerulea</i>	20
Figura 1-5: Distribución en Colombia de la especie <i>P. caerulea</i>	21
Figura 2-1: Esquema general de extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de <i>P. caerulea</i>	29
Figura 2-2: Esquema general de extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la corteza de <i>P. caerulea</i>	31
Figura 2-3: Esquema general de extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la madera de <i>P. caerulea</i>	33
Figura 2-4: Compuestos aislados de las hojas de <i>P. caerulea</i>	34
Figura 2-5: Compuestos aislados de la corteza de <i>P. caerulea</i>	36
Figura 2-6: Compuestos aislados de la madera de <i>P. caerulea</i>	37
Figura 2-7: Espectro RMN ^1H para el compuesto HPc6 (acetona- d_6 , 500 MHz)	40
Figura 2-8: Espectro RMN ^1H para el compuesto HPc-6 (acetona- d_6 , 500 MHz)	41
Figura 2-9: Espectro RMN ^{13}C para el compuesto HPc-6 (acetona- d_6 , 500 MHz)	42
Figura 2-10: Espectro HMBC para el compuesto HPc-6 (acetona- d_6 , 500 MHz).....	43
Figura 2-11: Cromatogramas de CL obtenidos de la mezcla de los derivados de HPc6 y los estándares D-ramnosa y L-ramnosa	44
Figura 2-12: Estructura de caeruleina A (HPc6)	45
Figura 2-13: Espectro RMN ^1H para el compuesto HPc-8 (acetona- d_6 , 500 MHz)	48
Figura 2-14: Espectro RMN ^1H para el compuesto HPc-9 (acetona- d_6 , 500 MHz)	49
Figura 2-15: Espectro HMBC para el compuesto HPc-8 (acetona- d_6 , 500 MHz).....	50
Figura 2-16: Espectro HMBC para el compuesto HPc-9 (acetona- d_6 , 500 MHz).....	50
Figura 2-17: Espectro RMN ^1H para el compuesto HPc-7 (acetona- d_6 , 500 MHz)	52
Figura 2-18: Espectro RMN ^1H para el compuesto HPc-10 (acetona- d_6 , 500 MHz)	52
Figura 2-19: Espectro HMBC para el compuesto HPc-7 (acetona- d_6 , 500 MHz).....	53
Figura 2-20: Espectro HMBC para el compuesto HPc-10 (acetona- d_6 , 500 MHz).....	54
Figura 2-21: a) Comportamiento lineal de Stejskal-Tanner de los datos de PGSE RMN para HPc16 (1) y HPc17 (2) tanto en acetona- d_6 como en una mezcla binaria de DMSO- d_6 /D $_2$ O (20% v / v). b) Espectro ^1H DOSY (500 MHz) de la mezcla de los flavonoides en DMSO- d_6 /D $_2$ O (20% v / v) sin micelas de SDS a temperatura ambiente.....	58
Figura 2-22: a) Coeficientes de difusión en función de la concentración de dodecil sulfato sódico (SDS) en solución de DMSO- d_6 -D $_2$ O (20% v / v) que contiene los compuestos HPc16	

y HPc17 en proporción 0.4:1.0, respectivamente. (b) Diferencia de los radios hidrodinámicos (Δr_H) entre HPc16 y HPc17 en función de la concentración de SDS.	60
Figura 2-23: a) Comportamiento lineal de Stejskal-Tanner de los datos de PGSE y b) Espectro 1H DOSY (500 MHz) de la mezcla de los flavonoides y micelas de SDS a 180 mM en una mezcla binaria DMSO- d_6 /D $_2$ O (20% v / v).	61
Figura 2-24: Espectro RMN 1H para el compuesto HPc-16 y HPc-17 (acetona- d_6 , 400 MHz).63	63
Figura 2-25: Estructura de kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosido (HPc16) y quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosido (HPc17)	64
Figura 3-1. Distribución de individuos colectados de <i>P. caerulea</i>	70
Figura 3-2. Población de San Pedro de la Sierra (S) y Bonda (B) en la Región Caribe de Colombia (Magdalena)	71
Figura 3-3. Población de La Vega (V) en la Región Andina de Colombia (Cundinamarca) 71	71
Figura 3-4: BPC de los extracto etanólico de hojas, corteza y madera de <i>P. caerulea</i>	77
Figura 3-5: Perfiles UV-Vis del extracto etanólico de hojas, corteza y madera de <i>P. caerulea</i>	78
Figura 3-6: BPC del extracto etanólico de hojas de <i>P. caerulea</i> : Los números de picos corresponden con los valores de la Tabla 3-2.	79
Figura 3-7: BPC del extracto etanólico de corteza de <i>P. caerulea</i> : Los números de picos corresponden con los valores de la Tabla 3-2	79
Figura 3-8: BPC del extracto etanólico de madera de <i>P. caerulea</i> : Los números de picos corresponden con los valores de la Tabla 3-2	79
Figura 3-9: Comparación de los BPC de los extractos etanólicos de hojas colectados en las tres regiones (S, V y B).....	81
Figura 3-10: Análisis de componentes principales de los datos obtenidos de hojas, corteza y madera de <i>P. caerulea</i> (superior). Gráficas de contribución de componentes del PCA (inferior)	82
Figura 3-11: Análisis de diagrama de carga del PC1 en los datos obtenidos de las hojas de <i>P. caerulea</i>	83
Figura 3-12: Análisis de los diagramas de carga del PC2 en los datos obtenidos de las maderas de <i>P. caerulea</i>	83
Figura 3-13: OPLS-DA obtenidos de los datos de hojas, corteza y madera. Diferenciación por color de cada estructura, Hojas: Azul, Corteza: Verde y Madera: Rojo.....	84
Figura 3-14: OPLS-DA obtenidos de los datos de Hojas de <i>P. caerulea</i>	85
Figura 3-15: OPLS-DA obtenidos de los datos de Hojas de Bonda (superior). Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos de hojas de S y B indicando los metabolitos mayoritarios presentes (inferior)	86
Figura 3-16: OPLS-DA obtenidos de los datos de Hojas de Bonda y La Vega (superior). Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos de hojas de B y V indicando los metabolitos mayoritarios presentes (inferior).	87
Figura 3-17: OPLS-DA obtenidos de los datos de Hojas de San Pedro y La Vega (superior). Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos de hojas de S y V indicndo los metabolitos mayoritarios presentes (inferior).....	88
Figura 3-18: OPLS-DA obtenidos de los datos de Corteza de <i>P. caerulea</i>	89
Figura 3-19: OPLS-DA obtenidos de los datos de corteza de Bonda y San Pedro	90
Figura 3-20: OPLS-DA obtenidos de los datos de corteza de Bonda y Vega	91
Figura 3-21: OPLS-DA obtenidos de los datos de corteza de San Pedro y Vega.	91
Figura 3-22: OPLS-DA obtenidos de los datos de Madera de <i>P. caerulea</i>	92
Figura 3-23: OPLS-DA obtenidos de los datos de la Madera de San Pedro y La Vega.	93
Figura 3-24: OPLS-DA obtenidos de los datos de la madera de San Pedro y Bonda.	94

Figura 3-25:	OPLS-DA obtenidos de los datos de la madera de La Vega y Bonda.....	94
Figura 3-26:	Análisis de componentes principales de los datos obtenidos de los aceites esenciales de hojas de <i>P. caerulea</i> colectado en S, B y V	100
Figura 3-27:	OPLS-DA de las muestras de <i>P. caerulea</i> de acuerdo al lugar de colecta (S, B y V).....	101
Figura 3-28:	OPLS-DA de las muestras de <i>P. caerulea</i> de acuerdo al periodo de colecta (P1 y P2)	101
Figura 3-29:	OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas San Pedro y Bonda. Análisis de diagrama de carga indicando los metabolitos responsables.....	102
Figura 3-30:	OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas Bonda y Vega. Análisis diagrama de carga de los datos obtenidos de B y V señalando los metabolitos responsables.	103
Figura 3-31:	OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas San Pedro y Vega. Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos indicando los metabolitos responsable (inferior).	104
Figura 3-32:	PCA-OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas San Pedro, Vega y Bonda colectadas en el primer periodo (P1).....	105
Figura 3-33:	Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos al comparar muestras de V y B.	106
Figura 3-34:	Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos al comparar muestras de S y B	106
Figura 3-35:	OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas San Pedro, Vega y Bonda colectadas en el segundo periodo (P2)	107
Figura 3-36:	Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos al comparar muestras de B y V	108
Figura 4-1:	Esquema general de la reacción para la obtención de los esteres de aminoácidos.	117
Figura 4-2:	Esquema general de la reacción para la obtención del derivado con grupo trifluorometilo de la quercetina.....	118
Figura 4-3:	Espectro RMN ^1H de la quercetina (HPc11), 400 MHz, Acetona- d_6	122
Figura 4-4:	Espectro RMN ^1H de <i>N-ter</i> -butoxicarbonil-L-triptófano A1 , 400 MHz, CDCl_3	123
Figura 4-5:	Espectro RMN ^1H del derivado HPc11a , 400 MHz, Acetona- d_6	123
Figura 4-6:	Espectro RMN ^1H de <i>N-ter</i> -butoxicarbonil-L-prolina (A2), 400 MHz, Acetona- d_6	124
Figura 4-7:	Espectro RMN ^1H del derivado HPc11b , 400 MHz, Acetona- d_6	124
Figura 4-8:	Espectro RMN ^1H de <i>N-ter</i> -butoxicarbonilglicina A3 , 400 MHz, Acetona- d_6	125
Figura 4-9:	Espectro RMN ^1H del derivado HPc11c , 400 MHz, Acetona- d_6	125
Figura 4-10:	TIC y EMAR del derivado HPc11a	126
Figura 4-11:	TIC y EMAR del derivado HPc11b	127
Figura 4-12:	TIC y EMAR del derivado HPc11c	128
Figura 4-13:	Espectro RMN ^1H de 2-cloro-5-(trifluorometil)-1,3-dinitrobenceno (A4), 400 MHz, Acetona- d_6	129
Figura 4-14:	Espectro RMN ^1H de HPc11d , 400 MHz, Acetona- d_6	129
Figura 4-15:	TIC y EMAR del derivado HPc11d	130

Lista de tablas

	Pág
Tabla 1-1: Usos en la Medicina Tradicional de Algunas Especies de la Familia Lauraceae	7
Tabla 1-2: Especies del género <i>Persea</i> en Colombia.....	10
Tabla 1-3: Usos en la medicina tradicional del género <i>Persea</i>	11
Tabla 1-4: Actividad Biológica de especies del género <i>Persea</i>	18
Tabla 2-1: Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos HPc6 – HPc10 (acetona- d_6).....	46
Tabla 2-2: Coeficiente de Difusion (D) y valores de radio hidrodinámico Stokes-Einstein (r_H) para los compuestos HPc16 y HPc17 a temperatura ambiente (K) En función de la concentración de SDS.	59
Tabla 3-1. Localización de las muestras colectadas de <i>P. caerulea</i>	69
Tabla 3-2: Identificación de metabolitos aislados de hojas, corteza y madera de <i>P. caerulea</i> empleando CL/EM.	80
Tabla 3-3: Composición química del aceite esencial de hojas de <i>P. caerulea</i> colectado en tres regiones diferentes	96
Tabla 4-1: Valores de concentración letal media (CL_{50}) estimados para extractos etanólicos de <i>P. caerulea</i>	132
Tabla 4-2: Valores de concentración letal media (CL_{50}) estimados para metabolitos aislados y derivados de <i>P. caerulea</i>	134
Tabla 4-3: Actividad antifúngica de extractos de <i>P. caerulea</i> contra <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Candida albicans</i> (% de inhibición).....	136
Tabla 4-4: Actividad antifúngica de aceites esenciales de <i>P. caerulea</i> contra <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Candida albicans</i> (% de inhibición).....	137
Tabla 4-5: Actividad antibacteriana de aceites esenciales de <i>P. caerulea</i> contra <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> (SARM) (% de inhibición).	138
Tabla 4-6: Actividad antifúngica de metabolitos aislados y derivados de <i>P. caerulea</i> contra <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Candida albicans</i> (% de inhibición).....	139
Tabla 4-7: Actividad antibacteriana de metabolitos aislados y derivados de <i>P. caerulea</i> contra <i>A. baumannii</i> y <i>S. aureus</i> (SARM) (% de inhibición).	142

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
AcOEt	Acetato de etilo
AcOiPr	Acetato de isopropilo
ACN	Acetonitrilo
ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
AE	Aceite esencial
AT	Ácido trifluoroacético
BPC	Cromatograma de pico base
°C	Grado Celsius
c	Cuarteto
c	Concentración
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterada
CF	Cromatografía flash
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CL ₅₀	Concentración letal para el 50% de la población
CLV	Cromatografía líquida al vacío
cm ⁻¹	Centímetros inversos
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Doblete
D	Coeficiente de difusión
da	Doblete ancho
dd	Doble doblete
DAD	Detector de arreglo de diodos
DE	Desviación estándar
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
DOSY	Espectroscopia de difusión
dt	Doble triplete
EdP	Éter de petróleo
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ES	Complejo enzima-sustrato
ESI	Ionización por electrospray

EtOH	Etanol
HCA	Análisis de conglomerado jerárquico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
Hz	Hertz
IE	Impacto electrónico
IK	Índice de retención de Kovats
IR	Espectroscopia Infrarroja
J	Constante de acoplamiento
CL-EM	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
CL-EM-IT-TOF	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas empleando trampa de iones y detección de tiempo de vuelo
m	Multiplete
mM	Milimolar
m/z	Relación masa/carga
MAD	Matriz asistida
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
MEDINA	Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OPLS	Mínimos cuadrados parciales ortogonal
PCA	Análisis de componente principales
PC1	Primer componente
PGSE	Gradiente de pulso de espin echo
PVP	Polivinilpirrolidona
ppm	Partes por millón
rH	Radio hidrodinámico
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singlete
FBS	suero fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato sódico
t	Triplete
tR	Tiempo de retención
TIC	Total ion current
UFC	Unidad formadora de colonias
UPLC	Cromatografía líquida de ultra eficiencia
UV	Ultravioleta
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
[α]	Rotación óptica
δ	Desplazamiento químico
δC	Desplazamiento químico en ¹³ C
δH	Desplazamiento químico en ¹ H

Introducción

Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo; en el ámbito vegetal cuenta con aproximadamente 45.000 especies, de las cuales un porcentaje mínimo se encuentran caracterizadas químicamente y se conocen sus usos o aplicaciones (Romero et al., 2008). De ese extenso reservorio vegetal que posee nuestro país las especies de la familia Lauraceae corresponden a un grupo relevante de organismos distribuidos a lo largo del territorio nacional que a pesar de su amplia distribución, la información taxonómica registrada en los herbarios nacionales es muy poca y más bien reducida, situación que se presenta por su alta diversidad biológica dificultades en la identificación y poca información química y molecular de sus organismos (Madriñán, 2004). En Colombia, el género *Persea* (Lauraceae) se encuentra ampliamente distribuido pero la información en cuanto a su diversidad biológica, caracterización quimiotaxonómica de sus especies y usos potenciales en el campo farmacológico es bastante reducida, con muy pocos registros científicos. Un ejemplo de ello es la especie *P. caerulea*, que de acuerdo a la información registrada en el Herbario Nacional Colombiano, es uno de los representantes del género *Persea* de mayor distribución en Colombia abarcando alrededor de doce departamentos. La amplia extensión de esta especie a lo largo de las diversas regiones del país ha permitido que los individuos hayan desarrollado cierta variabilidad morfológica observándose en los ejemplares colectados diferencias en cuanto a estructuras como hojas, tallo o fruto (Instituto de Ciencias Naturales/Herbario Nacional Colombiano/Universidad Nacional de Colombia). Además, existe poca información de la composición química de esta especie en nuestro territorio; se desconoce la manera como puede variar la presencia y/o concentración de sus metabolitos secundarios de acuerdo a las condiciones particulares en que se desarrolla cada grupo de individuos en las diferentes regiones geográficas del territorio nacional. Esta variabilidad en su composición puede estar determinada por factores externos o internos propios del medio (Gnavi et al., 2010).

En este contexto, el presente trabajo se planteó con el objetivo de contribuir a la exploración quimiotaxonómica de la familia Lauraceae específicamente del género *Persea*. Para ello se seleccionó un número de individuos colectados en diferentes regiones de Colombia con el fin de describir el comportamiento químico que tiene una especie, específicamente *Persea caerulea* en condiciones geográficas distintas empleando para tal fin diversas plataformas analíticas (CL/EM-CG/EM) acompañadas de herramientas estadísticas como el análisis multivariado para el procesamiento de los diversos datos obtenidos. Adicional a ello, se aislaron diversos metabolitos en diferentes estructuras de la especie, con el objetivo de emplearlos como estándares en el proceso comparativo de los individuos colectados y permitiera una caracterización química y una información más detallada y clara del comportamiento de los individuos en cada región analizada. Con el fin de aportar al potencial terapéutico que presentan las especies de la Familia Lauraceae, se desarrolló la evaluación antifúngica, antibacteriana y citotóxica de extractos, aceites esenciales, metabolitos aislados y derivados de *P. caerulea*.

Este trabajo está dividida en cuatro capítulos. El primero describe el estado actual del tema realizando una breve reseña de las características morfológicas, químicas y de acción biológica de la Familia Lauraceae, especialmente del género *Persea*. En el capítulo dos se detalla el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios de *P. caerulea*, en el capítulo tres se presentan los resultados del análisis multivariado del estudio comparativo de extractos y aceites esenciales de los individuos colectados en diversas áreas geográficas y finalmente, el cuarto capítulo describe la actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica de extractos, aceites esenciales, metabolitos aislados y transformados.

1.Estado actual del tema

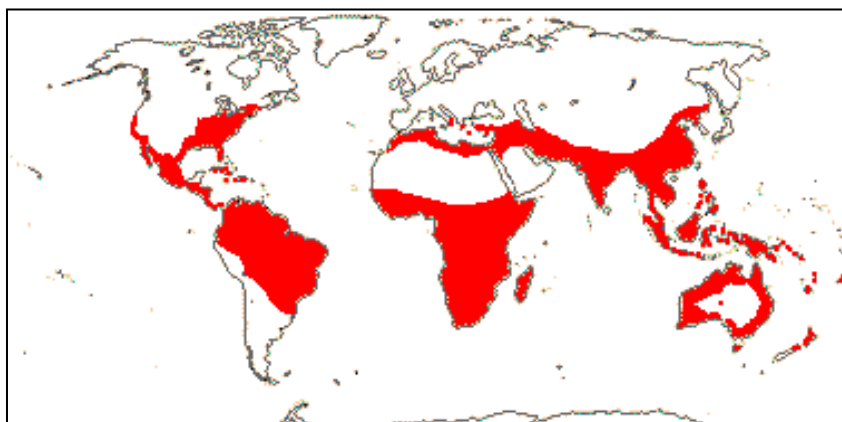
1.1 Generalidades de la familia Lauraceae

La familia Lauraceae está constituida por plantas leñosas que alberga unas 2500 a 3000 especies agrupadas en 50 géneros. Los organismos de esta familia se encuentran distribuidos a lo largo de latitudes tropicales y subtropicales (Chanderballi et al., 2001). Los principales centro de diversidad de esta familia se encuentran en la región Indomalaya y en América del sur y central, mientras que África es una de las regiones con menor presencia de especies (Rohwer, 1993). En los trópicos americanos sus especies figuran entre los componentes más importantes de los bosques de tierras bajas y con frecuencia son elementos dominantes en la vegetación de las montañas (Chanderballi et al., 2001). Se reconocen tres tribus para la familia Lauraceae: Lindera, Cryptocaryeae y Perseae, que se encuentran distribuidas en líneas geográficas definidas (Werff et al., 1991). Lindera posee los géneros *Litsea*, *Lindera*, *Sassafras* distribuidos entre Norte América y Asia; *Laurus* en el Mediterráneo y especies de los géneros *Actinodaphne* y *Neolitsea* endémicas de Asia. Cryptocaryeae incluye los géneros pantropicales *Beilschmiedia*, *Cryptocarya* y otros como *Endiandra* y *Potamei* que se encuentran predominantemente en el hemisferio sur; por su lado, la tribu Perseae se encuentra ampliamente distribuida en la región Neotropical con los géneros *Ocotea*, *Cinammomum* y *Persea* (Chanderballi et al., 2001).

En Colombia, esta familia se encuentra bien representada en diversos tipos de bosques, se han identificado alrededor de 18 géneros y aproximadamente 232 especies reportadas (Madrián, 2004). Comparada con otras familias de plantas, la taxonomía de Lauraceae es poco conocida debido a su gran diversidad, dificultad de identificación, reducido

trabajo taxonómico y poca información molecular (Madrinán, 2004). Situación que motiva el incremento en el estudio de especies de esta familia a nivel nacional, contribuyendo de esa manera a un progreso importante en la sistemática de la familia Lauraceae en nuestro país (Laboratorio de Botánica y Sistemática, Universidad de los Andes).

Figura 1-1: Distribución Mundial de la Familia Lauraceae



1.1.1 Usos de especies de la familia Lauraceae

Los organismos pertenecientes a esta familia tienen gran interés económico como productores de especias, aceites esenciales, frutos comestibles o en algunos casos como maderables (Scora et al., 1990). Hoy en día el producto más importante para la familia es el aguacate, fruto obtenido de la especie *P. americana* y que se emplea en la elaboración de alimentos (Rohwer, 1993). Después del aguacate, el producto relevante es la canela, empleada como especia y es obtenida a partir de la corteza joven de *Cinnamomum verum*. Los aceites esenciales obtenidos de organismos de esta familia son utilizados en diferentes campos por ejemplo, en la industria cosmética exactamente en la perfumería se emplean las especies *Aniba rosaeodora* (aceite de palo de rosa) y *Ocotea odorífera* (aceite de sassafras brasileño), en el área farmacéutica se reconoce el alcanfor obtenido de la especie *Cinnamomum camphora*. La familia Lauraceae también es identificada a nivel mundial por su diversidad de usos en la medicina tradicional (Tabla 1-1). Entre los usos más relevantes de sus especies encontramos: como carminativo, emenagogo, diuréticos, vermífugo, antiespasmódicos, para el tratamiento de picaduras de insectos, entre otros (Barriga, 1992).

Tabla 1-1: Usos en la Medicina Tradicional de Algunas Especies de la Familia Lauraceae

Especie	Estructura utilizada	Modo de Preparación	Ubicación Geográfica	Uso	Referencia
<i>Cinnamomum camphora</i>	-	Maceración	África	Diabetes	Mootosamy et al., 2014
<i>Beilschmiedia glauca</i>	Corteza	Decocción	China	Antiinflamatorio	Zheng et al., 2013
<i>Litsea cubeba</i>	Hojas	Tostado	China	Dolor de cabeza, resfriado	Zheng et al., 2013
<i>Machilus salicina</i>	Hojas, Corteza	Maceración	China	Dolor de cabeza, heridas	Zheng et al., 2013
<i>Litsea glaucescens</i>	Hojas	Decocción	México	Alteración sistema nervioso	Gutiérrez et al., 2012
<i>Laurus nobilis</i>	Hojas	Infusión	España	Antiespasmódico Expectorante	González et al., 2010
	Hojas	Decocción	España	Resfriado	Menendez et al., 2014
<i>Nectandra cuspidata</i>	Corteza	Decocción	Perú	Diarrea	Valadeau et al., (2010)
<i>Cinnamomum cassia</i>	Hojas	Decocción	Tanzania	Anemia	Peter et al., 2014
<i>Persea americana</i>	Hojas	Maceración	Perú	Traumatismos y contusiones	González et al., 2014
<i>Cassytha filiformis</i>	Tronco	-	Tanzania	Inflamación, dolores de cabeza	Peter et al., 2014
<i>Cinnamomum verum</i>	Corteza	Infusión	Colombia	Dolores Menstruales	Ceuterick et al., 2008

1.2 Generalidades del género *Persea*

El nombre *Persea* fue propuesto por primera vez por Clusius (1601) y deriva su nombre de la mitología griega (Campos et al., 2007). En 1753 Linneo reconoce a *Persea* como un género válido y lo sinonimiza bajo el nombre de *Laurus*, la descripción válida de este género fue publicada por Miller en 1754, pero la primera publicación donde se le da un tratamiento sistemático al género *Persea* es Mez en 1889 y recientemente Kopp en 1966, quien reconoce *Persea* Mill. como un género incluido en la tribu Perseae (Bernal, 2007).

El género *Persea* conformado por unas 190 especies pertenece a la familia Lauraceae y se encuentra distribuido ampliamente en la región mesoamericana (Madriñán, 1996). Este género se encuentra dividido en dos grandes subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne* (Kopp, 1966). Las principales características de distinción entre estos subgéneros son la pubescencia de los tépalos y el tamaño de fruto; el subgénero *Persea* presenta ambas caras de los sépalos pubescentes, mientras que en *Eriodaphne* generalmente solo la cara abaxial de los tépalos es pubescente. Por el tamaño del fruto, el subgénero *Persea* tiene frutos grandes (~7-20 cm) mientras que en *Eriodaphne* los frutos son pequeños (menores a 2 cm) (Kopp, 1966). El subgénero *Eriodaphne* se extiende principalmente en Suramérica (Scora et al., 1990) e incluye especies como *P. borbonia* Spreng, *P. indica* Spreng, *P. lingue* Nees, y *P. caerulea* Mez., *P. cinerascens* Blake, *P. donnell-smithii* Mez, *P. excels* Kosterm., *P. palustris* Sarg, *P. rigens* Allen, *P. silvatica* van der Werff, *P. skutchii* Allen, y *P. standleyi* Allen (Scora et al., 1990) (Barrientos y López, 2000). Algunas especies pertenecientes al subgénero *Eriodaphne* son importantes por presentar cierta resistencia a enfermedades de tipo fúngica, por ejemplo la denominada “pudrición de las raíces del aguacate” originada por *Phytophthora cinnamomi* (Campos et al., 2007). El subgénero *Persea* abarca principalmente la región mesoamérica e incluye las especies *P. americana* Mill., *P. schiedeana* Nees, *P. parvifolia* Williams, *P. primatogena* Williams (Scora et al., 2002) (Scora et al., 1990) (Williams et al., 1977). La especie más reconocida del género es *P. americana*, su fruto conocido comúnmente como aguacate es la base de la industria pomológica en las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Bergh et al., 1973). *P. americana* es una especie polimórfica y consta de algunos taxones independientes que pueden ser consideradas variedades botánicas o subespecies: *floccosa* Mez., *steyermarkii* Allen y *nubigena* Kopp.,

de igual forma se identifican las razas comerciales: *americana* Mill., *drymifolia* Blake y *guatemalensis* Williams (Bergh et al., 1973 y Scora et al., 2002).

1.2.1 Distribución del género *Persea*

La distribución general de *Persea* Miller abarca principalmente la región de mesoamérica y los andes suramericanos, exceptuando a *P. americana* Mill. por ser una especie mundialmente cultivada. Dentro de las especies presentes en mesoamérica se encuentran *P. cuneata* Meisn., *P. pseudofasciculata* L.E.Kopp, y *P. poveda* W.C.Burger, el resto de especies se hayan distribuidos específicamente en los andes suramericanos (Laboratorio de Botánica y Sistemática, Universidad de los Andes).

En cuanto a su distribución altitudinal, las especies que se encuentran entre los 0-1.000 m y que podríamos denominar de tierras bajas son *P. croizatii* van der Werff, *P. perseiphylla* (C.K. Allen) van der Werff, *P.povedae* W.C. Burger, y *P. pseudofasciculata* L.E. Kopp. Las que están en un rango de 1.000-2.500 m son *P. areolatocostae* (C.K. Allen) van der Werff, *P. caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez, *P. cuneata* Meisn., *P. fastigiata* L.E. Kopp, *P. rigens* C.K. Allen, en el rango de 2.000-3.000 m están *P. chrysophylla* L.E. Kopp, *P. hexanthera* L.E. Kopp, *P. mutisii* Kunth, *P. subcordata* (Ruiz & Pav.) Nees. Las de subpáramo que alcanzan en algunos casos los 4.000 m son *P. bernardii* L.E. Kopp y *P. ferruginea* Kunth (Laboratorio de Botánica y Sistemática, Universidad de los Andes).

En Colombia las especies de *Persea* están distribuidas por todo el territorio nacional, el género está asociado a los andes colombianos, además de algunos representantes de tierras bajas. Las especies que alcanzan mayor distribución con excepción de *P. americana* Mill. son *P. caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez y *P. mutisii* Kunth ampliamente distribuidas con registro en por lo menos nueve departamentos de Colombia (Instituto de Ciencias Naturales/Herbario Nacional Colombiano y Laboratorio de Botánica y Sistemática, Universidad de los Andes). En la **Tabla 1-2** se indican las especies del género *Persea* presentes en Colombia.

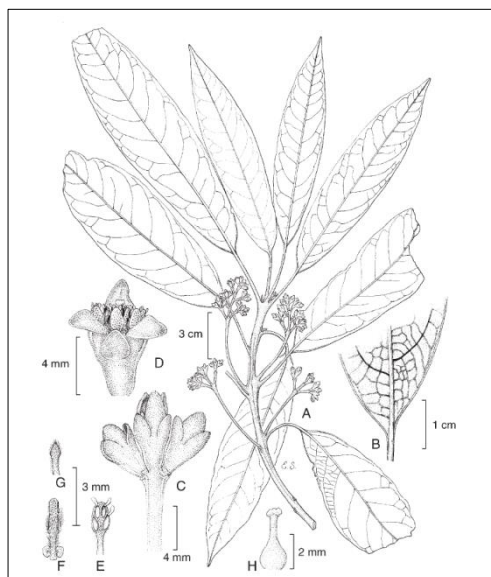
Tabla 1-2: Especies del género *Persea* en Colombia

No	Nombre	No	Nombre	No	Nombre
1	<i>P. americana</i>	7	<i>P. croizatii</i>	13	<i>P. perseiphylla</i>
2	<i>P. areolatocostae</i>	8	<i>P. cuneata</i>	14	<i>P. povedae</i>
3	<i>P. bernardii</i>	9	<i>P. fastigiata</i>	15	<i>P. pseudofasciculata</i>
4	<i>P. caerulea</i>	10	<i>P. ferruginea</i>	16	<i>P. rigens</i>
5	<i>P. chrysophylla</i>	11	<i>P. hexanthera</i>	17	<i>P. subcordata</i>
6	<i>P. costata</i>	12	<i>P. mutissi</i>		

1.2.2 Morfología del género *Persea*

Árboles o arbustos. Hojas cartáceas a coriáceas, simples, enteras, alternas, penninervadas (Figura 1-2) (Scora et al., 2002). La madera puede ser liviana o pesada, fragante o no. Las ramas pueden ser glabras, glabrescentes, tomentosas y hasta lanosas, de colores café, amarillo y rojo en todas sus tonalidades hasta blanquecinas. Los pecíolos por lo general son glabros o glabrescentes, en algunos casos presentan indumentos, pueden ser angulares, teretes o planos. Las hojas pueden tomar formas elípticas, ovadas, lanceoladas y oblongas. Inflorescencias tirso-paniculadas, con frecuencia originadas de una

Figura 1-2: Morfología del género *Persea* (Lorea, 2005)



yema terminal vegetativa (Figura 1-2.). Flores trímeras, bisexuales (Figura 1-2.) (Rohwer, 1993). El tamaño de las flores por lo general va 0.5-1.8 mm de largo por 1-8 mm de ancho, estas presentan tubos florales circulares ovados y elípticos, generalmente son de apariencia pubescente, tomentosa, seríceo, estrigulosa y lanosa. (Bernal, 2007). El fruto es pequeño en la mayoría de especies, globoso, tiene una semilla y puede presentar para la mayoría de los casos el cáliz persistente o no (Figura 1-2) (Scora et al., 2002).

1.2.3 Usos del género *Persea*

A continuación, en la Tabla 1-3 se describen los principales usos etnobotánicos de algunos organismos pertenecientes al género *Persea*, especialmente de la especie más reconocida de este taxón: *P. americana*.

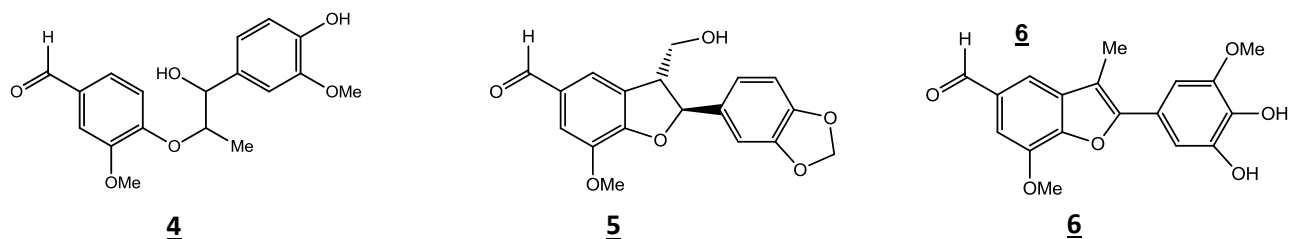
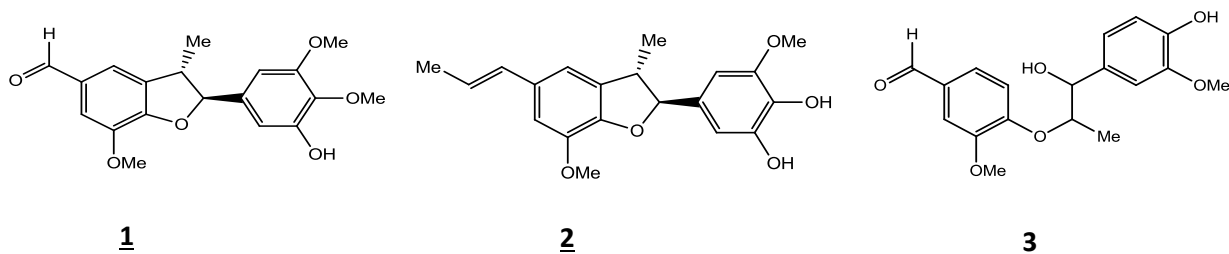
Tabla 1-3: Usos en la medicina tradicional del género *Persea*

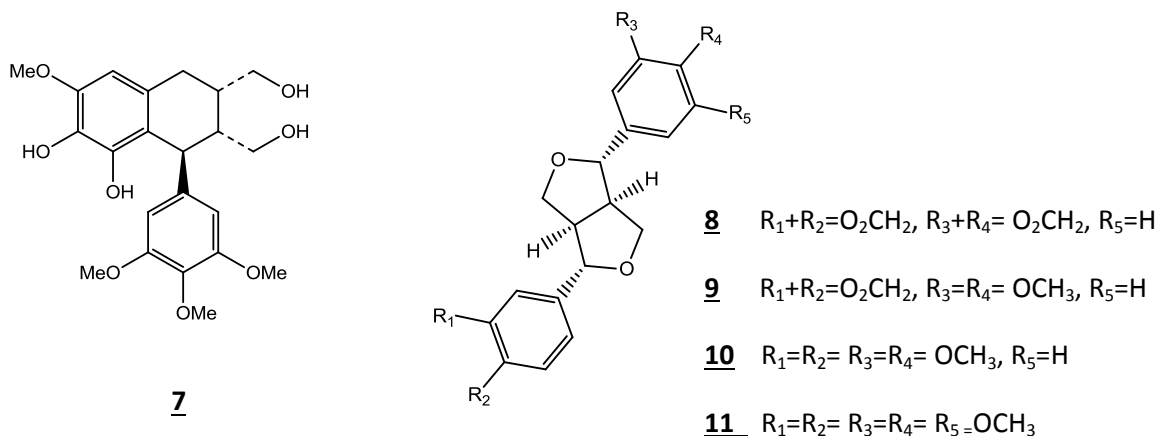
Especie	Estructura utilizada	Modo de Preparación	Ubicación Geográfica	Uso	Reporte
<i>Persea americana</i>	Hojas	Infusión	Rep. Dominicana	Regular la menstruación	Ososki et al., 2002
	Hojas	Infusión	Trinidad y Tobago	Hipertensión	Lans, 2006
	Hojas	Decocción	Asia	Hipertensión	Wright et al., 2007
	Hojas	Infusión	Portugal	Analgésico gástrico, protector hepático	Novais et al., 2004
	Hojas	Infusión	México	Antihipoglicémico	Andrade-Cetto et al., 2005
	Hojas, flores frutos	Infusión	Brasil	Diurético, emenagogo, expectorante	Tomazzoni, 2004
	Hojas, frutos semillas	-	Uganda	Tratamiento tuberculosis	Tabuti et al., 2010
	Hojas	Decocción	Guinea	Enfermedades infecciosas	Magassouba et al., 2010
	Semillas	Decocción	México	Enfermedades micóticas, Analgésico	Ramos et al., 2004
	Semillas	-	Uganda	Tratamiento de VIH	Lamorde, et al., 2010
	Hojas	Maceración	Perú	Trauma y contusiones	Gonzales, et al., 2014
	Fruto	Jugo	Mauritius	Catarata	Mootoosamy, et al., 2014
	Hojas	Infusión	Nigeria	Diabetes	Ezuruike, et al., 2014
	Hojas	Triturada/polvo	Kenia	Cancer	Ochwang, et al., 2014.
	Hojas	-	Nigeria	Malaria	Dike et al. 2012
<i>Persea cordata</i>	Corteza	-	Brasil	Tratar procesos infecciosos	Schlemper et al., 2001
	Corteza	-	Brasil	Antiinflamatorio Antibacterial	Cechinel-Filho, et al., 2007
<i>Persea gratissima</i>	Hojas	Decocción	India	Hipotensivo	Kruthiventi et al., 2000
<i>Persea major</i>	Corteza	-	Brasil	Tratar heridas y desordenes gástricos	Cosmo et al., 2007
<i>Persea indica</i>	Hojas	-	Islas Canarias	Protege papa almacenada (plagas)	González-Coloma et al., 1992
<i>Persea borbonia</i>	Hojas	Decocción	USA	Antidiarreico	Mohagheghzadeh et al., 2006

1.2.4 Estudio fitoquímico del género *Persea*

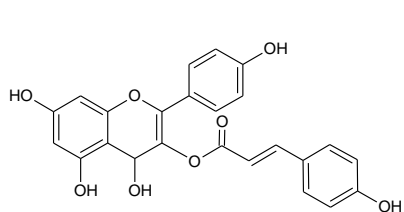
Este género ha sido objeto de diversos estudios por su gran uso etnobotánico, lo que ha generado un interés en la validación de estos usos mediante la búsqueda de metabolitos llevando al aislamiento de un amplio rango de compuestos, dentro de los cuales se cuentan: flavonoides, terpenos, lignanos, ácidos absíricos entre otros (Fraga et al., 2017; Falodun et al., 2013; Lu et al., 2012; Ding et al., 2007; Tsai et al., 1998).

Los lignanos han sido aislados de las especies *P. indica*, *P. lingue*, *P. pyrifolia* entre a otras. Del extracto etanólico de las hojas de la especie *P. indica* se identificaron los neolignanos: obovatinal (**1**), obovatifol (**2**), perseal A (**3**), perseal B (**4**), perseal C (**5**) y perseal D (**6**) (Tsai et al., 1996 y Tsai et al., 1998). Un nuevo aril lignano denominado lingueresinol (**7**), fue obtenido de la corteza de la especie *P. lingue* (Sepulveda et al., 1990) y del extracto hexánico de las hojas de *P. pyrifolia* se aislaron los lignanos de tipo furofurano: sesamina (**8**), metilpiperitol (**9**), eudesmina (**10**) y magnolina (**11**) (De Luca et al., 2010).

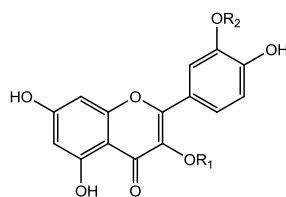




Entre los flavonoides identificados en el género encontramos: 3-*O-trans-p*-cumarilkaempferol (**12**), quercetina 3-*O*-ramnósido (**13**) isorhamnetina (**14**), aislados de las flores de la especie *P. gratissima* (Kruthiventi et al., 2000). Al igual afzelina (**15**), quercetina-3-*O*-D-arabinosido (**16**), catequina (**17**), y epicatequina (**18**), aislados en hojas y semillas de *P. americana*, respectivamente (Ding et al., 2007). El estudio comparativo de diversas especies del género (*P. palustris*, *P. borbonia*, *P. littoralis*, *P. humilis*) realizado en el sureste de los Estados Unidos permitió identificar los flavonoides glicosidados: orientina (**19**), isoorientina (**20**), vitexina (**21**), isovitexina (**22**), afzelina (**15**), kaempferol 3-*O*-glucósido (**23**), quercetina 3-*O*-ramnósido (**13**), quercetina-3-*O*-xilósido (**24**), quercetina 3-*O*-glucósido (**25**), quercetina 3-*O*-galactósido (**26**) y rutina (**27**) (Wofford E, 1974). Los flavonoides glicosidados también han sido aislados de las hojas de *P. americana*, del extracto acuoso fueron aislados siete compuestos entre los que se encuentran dos nuevos flavonoles monoglicosidados: quercetina y kaempferol 3-*O*-α-D-arabinopiránósido (**28**) (**29**), los otros flavonoides identificados corresponden a quercetina-3-*O*-α-ramnopiránósido (**13**), quercetina-3-*O*-β-glucopiránósido (**23**), quercetina-3-*O*-β-galactopiránósido (**25**), afzelina (**15**).

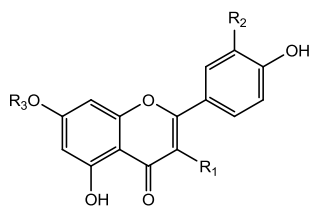


12



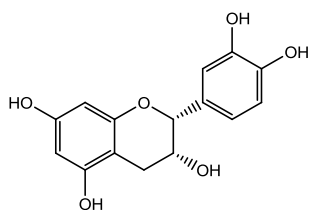
13 R₁=L-Rha; R₂=H

14 R₂=D-Glu; R₂=CH₃

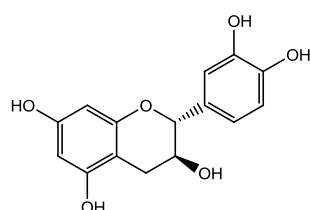


15 R₁=O-L-Rha; R₂=H; R₃=H

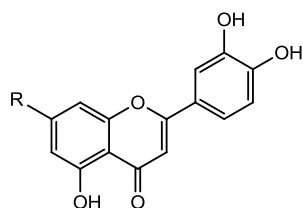
16 R₁=O-D-Ara; R₂=OH; R₃=H



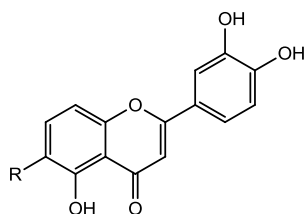
17



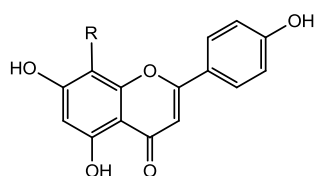
18



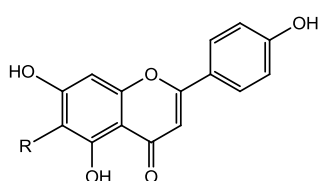
19 R= Glu



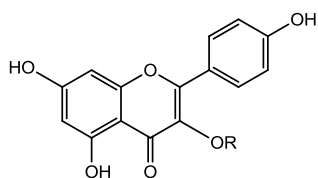
20 R= Glu



21 R= Glu

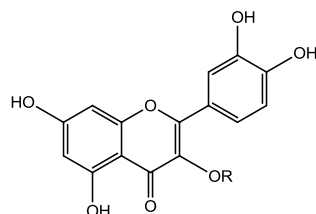


22 R= Glu



23 R= Glu

29 R= O-D-Ara



24 R= Xilosa

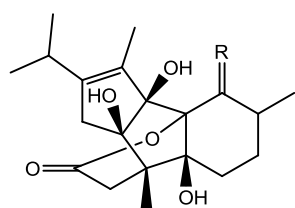
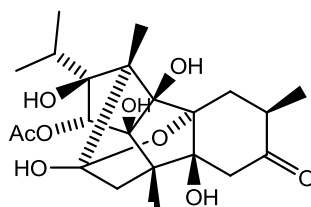
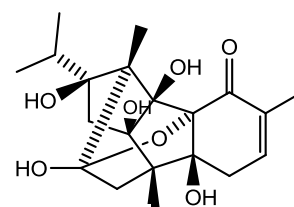
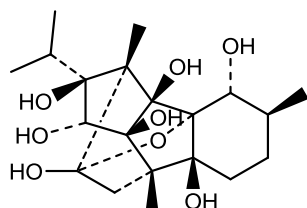
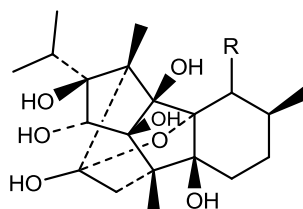
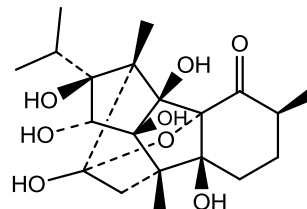
25 R= Galactosa

26 R= Glucosa

27 R= Rutinose

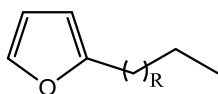
28 R= O-D-Arabinosa

Los terpenos también han sido característicos en las especies del género *Persea*, algunos ejemplos de este tipo de metabolito identificados, son: anhidrocinnzeilanona (**30**), anhidrocinnzeilanina (**31**), garajonona (**32**), 2,3-didehidrocinnzeilanona (**33**), ryanodol (**34**), cinnzeylanol (**35**), cinnzeylanina (**36**) y cinnzeylanona (**37**) aislados del extracto etanólico de las partes aéreas de *P. indica* (González-Coloma et al., 1996 y González-Coloma et al., 1992).

**30** R=O**31** R= α -OH.H**32****33****34****35** R= α -OH**36** R= α -OAc**37**

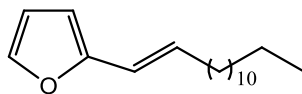
Además de los metabolitos ya mencionados, en este género se han identificados un gran número de sustancias con gran relevancia desde el punto de vista biológico. Estos metabolitos corresponden principalmente a los compuestos denominados: alquilfuranos, oxoalquilacetatos y compuestos polihidroxiados.

Los alquilfuranos también denominados avocadofuranos han sido aislados principalmente del fruto de *P. americana*, un ejemplo de estos metabolitos son el 2-pentadecilfurano (**38**), 2-heptadecilfurano (**39**), 2-1Z-pentadecilfurano (**40**), 2-1E-pentadecenil furano (**41**), identificados del fruto de *P. americana* (Rodríguez-Saona et al., 1998) y además, perseafurano (**42**), avocadienofurano (**43**) y avocadinenofurano (**44**) aislados del fruto de *P. indica* (Fraga, et al., 1996).

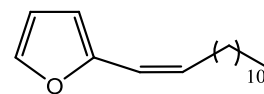


38 R=13

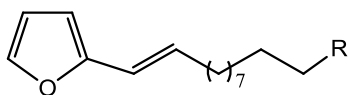
39 R=15



40



41



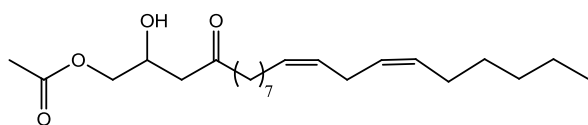
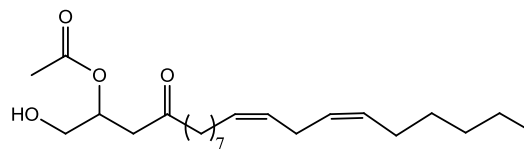
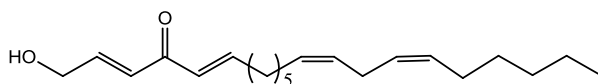
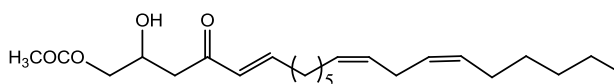
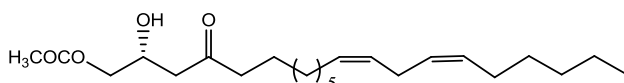
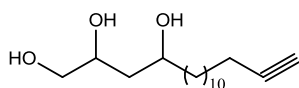
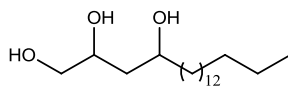
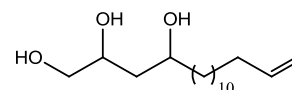
42 R=-(CH₂)₃Me

43 R=-C=CH₂

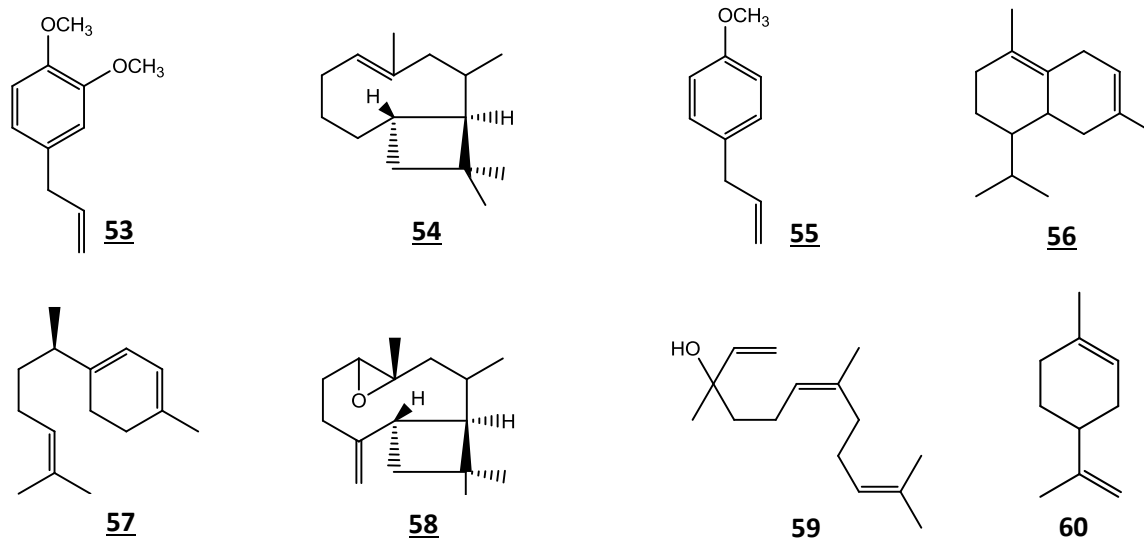
44 R=-C≡CH₂

Los oxoalquilacetatos son compuestos olefínicos altamente oxigenados y de cadena larga acetilénica. Estos compuestos han sido aislados junto con los avocadofuranos de las células de idioblastos del fruto de *P. americana*. Algunos ejemplos de este tipo de metabolito identificados en este fruto son: persina (**45**), isopersina (**46**) (Rodríguez-Saona et al., 1998), (2*E*,5*E*,12*Z*,15*Z*)-1-hidroxiheneicosa-2,5,12,15-tetraen-4-ona (**47**), acetato (5*E*,12*Z*,15*Z*)-2-hidroxi-4-oxoheneicosa-5,12,15-trien-1-ilo (**48**), acetato (2*R*,12*Z*,15*Z*)-2-hidroxi-4-oxoheneicosa-12,15-dien-1-ilo (**49**) (Kawagishi et al., 2001).

De igual forma de este género han sido aislados compuestos polihidroxlados como: 1,2,4-trihidroxinadecano (**50**), 1,2,4-trihidroxiheptadec-16-eno (**51**), 1,2,4-trihidroxiheptadec-16-ino (**52**) y 1,2,4-trihidroxinadecano identificados en el fruto inmaduro de *P. americana* (Oberlies et al., 1998 y Giffoni et al., 2009).

**45****46****47****48****49****50****51****52**

Por otra parte la literatura señala diversos estudios de aceites esenciales que han sido extraídos de diferentes especies de este género. El análisis del aceite esencial obtenido de las hojas de *P. americana* permitió identificar: metil eugenol (**53**), β -cariofileno (**54**), estragol (**55**) y δ -cadineno (**56**), como los principales componentes del aceite (Larijani et al., 2010). Del aceite esencial de las hojas de *P. indica* se identificaron como componentes mayoritarios: β -cariofileno (**54**) y γ -curcumeno (**57**) (Pino et al., 2004). El estragol (**55**) ha sido reportado como el principal constituyente del aceite de las hojas de *P. gratissima*. El aceite esencial obtenido de las flores *P. bombyciana*, se caracterizó principalmente por la presencia de óxido de cariofileno (**58**) y (*E*)-nerolidol (**59**). El análisis del aceite esencial realizado a *P. duthiei* permitió determinar que los principales constituyentes identificados fueron: limoneno (**60**) para el aceite de hojas, y (*E*)-nerolidol (**59**) para el aceite de flores y frutos (Padalia et al., 2009).



1.2.5 Actividad biológica del género *Persea*

Existen diversos reportes de actividad biológica para especies del género *Persea*, en la Tabla 1-4. Se relaciona algunos ejemplos de estos estudios adelantados en diferentes partes del mundo.

Tabla 1-4: Actividad Biológica de especies del género *Persea*

Especie	Metabolitos y/o extractos obtenidos	Actividad biológica	Referencia
<i>Persea americana</i>	2-(pentadecil)-Furano 2-(heptadecil)furano	Insecticida contra <i>Spodoptera exigua</i>	Rodríguez-Saona et al., 1999
	Extracto acuoso de la corteza	Antiinflamatorio y analgésico	Adeyemi et al., 2002
	(<i>E,Z,Z</i>)-1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicososa-5,12,15-trieno	Antifúngico contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Domergue et al., 2000
	Procianidinas	Capacidad antioxidante	Wang et al., 2010
	Extracto hexánico del fruto	Inhibición del crecimiento del cáncer de próstata.	Lu et al., 2005
	1,2,4-trihidroxiheptadec-16-ino	Citotóxico (Cáncer de próstata) e Insecticida (<i>Aedes aegypti</i>)	Oberlies et al., 1998

Tabla 1-4. (continuación)

	acetato(2 <i>R</i>)-(12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i>)-2-hidroxi-4-oxoheneicosa-12,15-dien-1-ilo	Inhibidores de superóxido (O ₂) y óxido nítrico	Kim et al., 2000
	Persina	Produce necrosis del tejido apocinar de glándula mamaria	Oelrichs et al., 2006
	1,2,4-trihidroxinonadecano	Actividad tripanocidal contra <i>Tripanosoma cruzi</i>	Abe et al., 2005
	Extracto metanólico y hexánico	Larvicida y antifúngica	Giffoni et al., 2009
	Persenona A	Inhibidor de la Acetil CoA	Hashimura et al., 2001
<i>Persea indica</i>	Anhidrocinnzeilanona	Insecticida contra <i>Spodoptera littoralis</i>	Fraga et al., 2001
<i>Persea cordata</i>	Extracto hexánico	Antiespasmódico	Cechinel-Filho et al., 2007

1.2.6 Generalidades de la especie *P. caerulea*

Descripción Morfológica: Árbol de aproximadamente 12 m de altura. Su corteza externa blanquecina, interior rosa; ramas delgadas glabrescentes. Hojas alternas cartáceas; pecíolos pubescentes-tomentosos, rojizos; láminas ovadas-lanceoladas a elípticas-oblongo-ovadas, pubescente por el envés, venación terciaria poco prominente (Figura 1-3). Inflorescencias axilares, paniculadas, muy densas; pedúnculos delgados glabrescentes rojizos. Flores pubescentes rojizas, tubo floral alargado; pedicelo 3-5 mm; tépalos I verticilo adaxial glabros, tépalos II verticilo, pubescentes tanto adaxial como abaxial; estambres verticilo I y II fértiles, filamentos pilosos, anteras tetravalvares que abren hacia arriba, conectivo de forma ovoide, estambres verticilo III con filamentos pilosos, anteras café-amarillento, de cuatro valvas que abren hacia los lados, conectivo de forma ovoide, provistos de glándulas café oscuro, estambres IV verticilo (estaminodios), con filamentos pilosos amarillento, conectivo sagitado, café oscuro; ovario sub-globoso-ovoide. Infrutescencias múltiples, cáliz persistente, drupa y globosa (Figura 1-3).

Figura 1-3: Morfología *P. caerulea*



Distribución: Esta especie está ampliamente distribuida (500-2000 m) desde bosques de tierras bajas a bosques pre-montanos en mesoamérica y Suramérica, principalmente en los países de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Figura 1-4.). En Colombia esta especie es de amplia distribución identificándose en los Andes, Valle del Cauca y Valle del Magdalena, específicamente en los departamentos de Antioquia, Caldas, Guajira, Valle, Magdalena, Santander, Boyacá y Cundinamarca (Figura 1-5.) (Instituto de Ciencias Naturales/Herbario Nacional Colombiano/Universidad Nacional de Colombia).

Figura 1-4: Distribución mundial de la especie *P. caerulea* (GIBF)



Usos: Es apropiada para programas de reforestación, corredores viales y retiros de quebradas. Es importante por la producción de frutos para la fauna silvestre (Universidad de Antioquia y Vargas, 2002).

Estudio fitoquímico: De la especie *P. caerulea* existen muy pocos reportes de tipo fitoquímico en la literatura. El primer estudio corresponde al análisis de los aceites esenciales de hojas de diversas especies del género *Persea*, incluida *P. caerulea*; en esta investigación se identificó como componentes mayoritarios de la especie; sabineno (**61**) y β -cariofileno (**54**) (Scora et al., 2001). En otro estudio similar, del aceite esencial de hojas de *P. caerulea* se obtuvieron como compuestos principales los sesquiterpenos β -cariofileno (**54**) y germacreno D (**62**). En este mismo estudio el aceite esencial exhibió

actividad inhibitoria contra la cisteína-proteasas cruzaina, que juega un papel importante en el metabolismo, replicación y supervivencia del protozooario *Trypanosoma cruzi* (Setzer et al., 2007). En cuanto al estudio de los metabolitos fijos en esta especie, del extracto metanólico de la corteza de *P. caerulea* se aislaron los compuestos: catequina (**17**) y epicatequina (**18**) (Cuca, 1978).

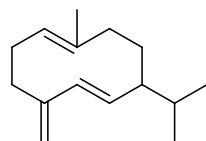
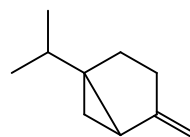
**61****62**

Figura 1-5: Distribución en Colombia de la especie *P. caerulea*.



Fuente: Herbario Nacional Colombiano

2. Estudio Fitoquímico de Hojas, Corteza y Madera de *P. caerulea*

2.1 Generalidades

El estudio fitoquímico de especies del género *Persea* ha permitido el aislamiento de un gran número de diversos tipos de metabolitos, entre los cuales se mencionan: flavonoides reportados en *P. gratissima* (Kruthiventi and Krishnaswamy, 2000), *P. americana* (Ding et al., 2007), *P. palustris*, *P. borbonis*, *P. littoralis*, *P. humilis* (Wofford, 1974), terpenos aislados en *P. indica* (González-Coloma et al., 1992), lignanos de *P. obovatifolia* (Tsai et al., 1996), *P. pyrifolia* (Batista et al., 2010), *P. japonica* (Wang et al., 1996), *P. lingue* (Sepulveda-Boza et al., 1990), *P. kurzii* (Prasitpan et al., 1996), alcaloides identificados en *P. japonica* (Wang et al., 1996), derivados de ácidos abscísicos de *P. americana* (Ramos et al., 2004), alquilfuranos aislados de *P. americana* (Rodríguez-Saona et al., 1998), *P. indica* (González-Coloma et al., 1996) y compuestos polihidroxilados, entre las que se encuentran las denominadas acetogeninas alifáticas y alcanoles identificados en *P. americana* (Oberlies et al., 1998; Rodríguez-Saona et al., 1998). En cuanto a la especie *P. caerulea*, en la literatura se reportan tres estudios, dos de los cuales están centrados en el análisis de la composición química de los aceites esenciales de hojas y su acción biológica frente a *Trypanosoma cruzi* (Scora and Scora, 2001; Setzer et al., 2007), mientras que el último describe el aislamiento de catequina, epicatequina, proantocianidinas B1, B2 y β -sitosterol (Cuca, 1978).

2.2 Metodología

2.2.1 General

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron por efecto de la gravedad (CC), por aplicación de presión mediante cromatografía flash (CF) y por aplicación de vacío mediante cromatografía líquida al vacío (CLV). La fase estacionaria utilizada para el método tradicional de CC fue sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh), para la CF fue sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh) y para CLV sílica gel 60HF₂₅₄ Merck. Algunas fracciones fueron procesadas mediante un sistema de CF automática (CombiFlash Rf, Teledyne Isco). Las separaciones cromatográficas en capa delgada preparativa (CCDP) se realizaron en placas de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck de 1 mm de espesor. Los estudios cromatográficos, el monitoreo de las CC, CCDP y el control de pureza se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD) empleando cromatoplacas de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck, utilizando como reveladores vapores de yodo, luz UV (254 y 365 nm) y vainillina/H₃PO₄. Los solventes empleados para las separaciones cromatográficas fueron de grado técnico (destilados antes de su uso) y/o grado analítico.

El análisis de HPLC-semipreparativo se llevó a cabo en el Instituto de investigación Fundación MEDINA en Granada (España), empleando para ello, un cromatógrafo Gilson GX281 equipado con colector automático de fracciones, con detector UV-DAD y una columna Waters XBridge semiprep C18 ,5um; 10x15 mm. Se emplearon solventes LiChrosolv (Merck) (filtrados sobre una membrana millipore de nylon 66 y desgasificados bajo vacío previamente a su uso) y Panreac grado HPLC (desgasificados antes de su uso en baño de ultrasonido). Los sistemas de elución empleados fueron determinados de acuerdo a las características de las muestras empleadas.

Los compuestos aislados fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales que incluyen RMN, EM, IR y UV y por comparación de los datos obtenidos con la literatura. Los espectros RMN (¹H, ¹³C, DEPT 135, COSY, HMQC, HMBC) fueron tomados en los espectrómetros Bruker Avance 400 y Bruker

Avance III a 500 MHz con criosonda de 1.7 mm, a 400 MHz y 500 MHz para ^1H ; 100 MHz y 125 MHz para ^{13}C empleando cloroformo deuterado (CDCl_3), acetona deuterada (acetona- d_6), metanol deuterado (CD_3OD), dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$), como solventes. Los datos de desplazamiento químico están expresados en ppm con TMS como estándar interno y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en un espectrofotómetro Perkin-FT-IR Panagon-500 serie 1000, en pastilla de KBr y en ventana de NaCl. Los espectros de masas de baja resolución (EM) fueron llevados a cabo en un sistema HPLC 1206-LC (Agilent Technologies, CA, USA) equipado un detector de arreglo de diodos (DAD) y acoplado a un detector de masas con interfase ESI como fuente de ionización y TI como analizador de masa Bruker Daltonics Esquire 2000™ ion (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se realizaron en la plataforma Waters Acquity UPLC™ H-Class system (Waters, Manchester, UK) acoplado a un espectrómetro de masas microTOF equipado con una fuente electrospray y en un CL Agilent (Santa Clara, CA) 1200RR, acoplado a un espectrómetro de masas Bruker maXis HR-QTOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). Los análisis se llevaron a cabo en modo positivo o negativo, de acuerdo al tipo de compuesto, y con ayuda de experimentos MS2 seleccionando el pseudo-ión molecular. Siempre se hizo un scan entre 100,000 y 1000,000 m/z .

Para los experimentos de espectroscopía de difusión (DOSY), se prepararon soluciones stock de los flavonoides en $\text{DMSO-}d_6$, diluidos en D_2O o en solución de dodecil sulfato sódico (SDS), según lo requerido, hasta generar para cada flavonoide una concentración final de 25 mM. Las muestras seleccionadas para los experimentos con matriz asistida (MAD) fueron preparadas empleando la fracción correspondiente que contenía los dos flavonoides y adicionando de manera progresiva SDS hasta obtener concentraciones finales de 25, 60, 120 y 180 mM. Las medidas de difusión se llevaron a cabo empleando pulsos eco de secuencia y pares bipolares (PGSE). Los valores de D fueron determinados empleando DiffAtOnce package. Los espectros de RMN fueron desarrollados en los espectrómetros Bruker Avance III 300 (^1H , 300.13 MHz; ^{13}C , 75.47

MHz) y Bruker Avance III 500 (^1H , 500.13 MHz; ^{13}C , 125.76 MHz). Los datos de desplazamiento químico están expresados en ppm con TMS como estándar interno y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

2.2.2 Material vegetal

La muestra vegetal de hojas, corteza y madera de la especie *P. caerulea* fueron colectadas en Diciembre de 2009 en la población de San Pedro de la Sierra, jurisdicción del municipio de Ciénaga, departamento del Magdalena, Colombia (10°54'21.12"N de latitud, 74° 2'45.67"O de longitud) por el Magister Juan Manuel Álvarez Caballero. Fue identificada por el botánico Adolfo Jara Muñoz y un ejemplar del espécimen se encuentra depositado en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia con el número de colección COL518189.

2.2.3 Extracción, Fraccionamiento y Purificación de Metabolitos Secundarios del Extracto Crudo de Hojas de *P. caerulea*

El material vegetal seco y molido (2.105 g de Hojas) fue sometido a extracción por maceración con etanol al 96%, a temperatura ambiente. El solvente fue removido por destilación a presión reducida en rotaevaporador para obtener 345.8 g de hojas del extracto etanólico crudo. Una muestra de este extracto (58 g) fue fraccionado por CLV sobre sílica gel, utilizando como fase móvil disolventes en polaridad creciente: éter de petróleo (EdP), cloroformo (CHCl_3), tolueno, acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). Luego de la evaporación de los solventes se obtuvieron las fracciones denominadas EdP (6 g), tolueno (4 g), CHCl_3 (5 g), AcOEt (14 g) y MeOH (23 g)

La fracción EdP (6 g) fue sometida a CF sobre sílica gel, empleando como sistema de elución tolueno-AcOEt (95:5 a 20:80) en polaridad creciente, obteniéndose 19 fracciones (EdP1-EdP19). La fracción EdP13 (235 mg) fue eluida sobre sílica gel con n-hexano-AcOEt 90:10, para producir una mezcla de los compuestos campesterol **HPc1**, estigmasterol **HPc2** y β -sitosterol **HPc3**.

La fracción CHCl_3 (4 g) se sometió a CF empleando como eluyentes tolueno-AcOiPr 90:10 para generar 25 fracciones, la fracción 15 (435 mg) fue purificada mediante CC sobre sílica gel eluyendo con una mezcla de CHCl_3 -MeOH (95:5 a 30:70), obteniéndose con ello las cumarinas identificadas como escopoletina **HPc4** e isofraxidina **HPc5**.

La fracción AcOEt (14 g) fue sometida a CF sobre sílica gel, utilizando como eluyente una mezcla de tolueno- AcOiPr (80:20 a 20:80) en polaridad creciente para producir 24 fracciones (1-24). La fracción 3 (265 mg) fue sometida a CF utilizando como fase móvil tolueno-acetato de etilo-ácido acético 70:30:10 generando 16 fracciones (3.1-3.16). La fracción 3.7 (9 mg) fue purificada por HPLC semi-preparativo en fase reversa utilizando como eluyentes ACN y H_2O acidulada al 0.01% con ácido trifluoroacético (ATF), se empleó un sistema isocrático con la composición de fase móvil A:B (60:40) con un tiempo de 35 min y flujo 3mL/min. La fracción fue disuelta en MeOH con un volumen de inyección de 50 μl , permitiendo la obtención del glicósido de flavonol acilado 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-Z-p-cumaril-4''-E-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc6** (1 mg). La fracción 3.9 (7 mg) también fue sometida a HPLC semi-preparativo empleando las mismas condiciones anteriores, permitiendo con ello la obtención de otro grupo de glicósidos de flavonol acilados 4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-E-p-cumaril-4''-E-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc7** (0.7 mg), 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-Z-p-cumaril-4''-Z-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc8** (0.5 mg), 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-E-p-cumaril-4''-Z-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc9** (0.6 mg) y 4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-Z-p-cumaril-4''-E-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc10** (0.5 mg).

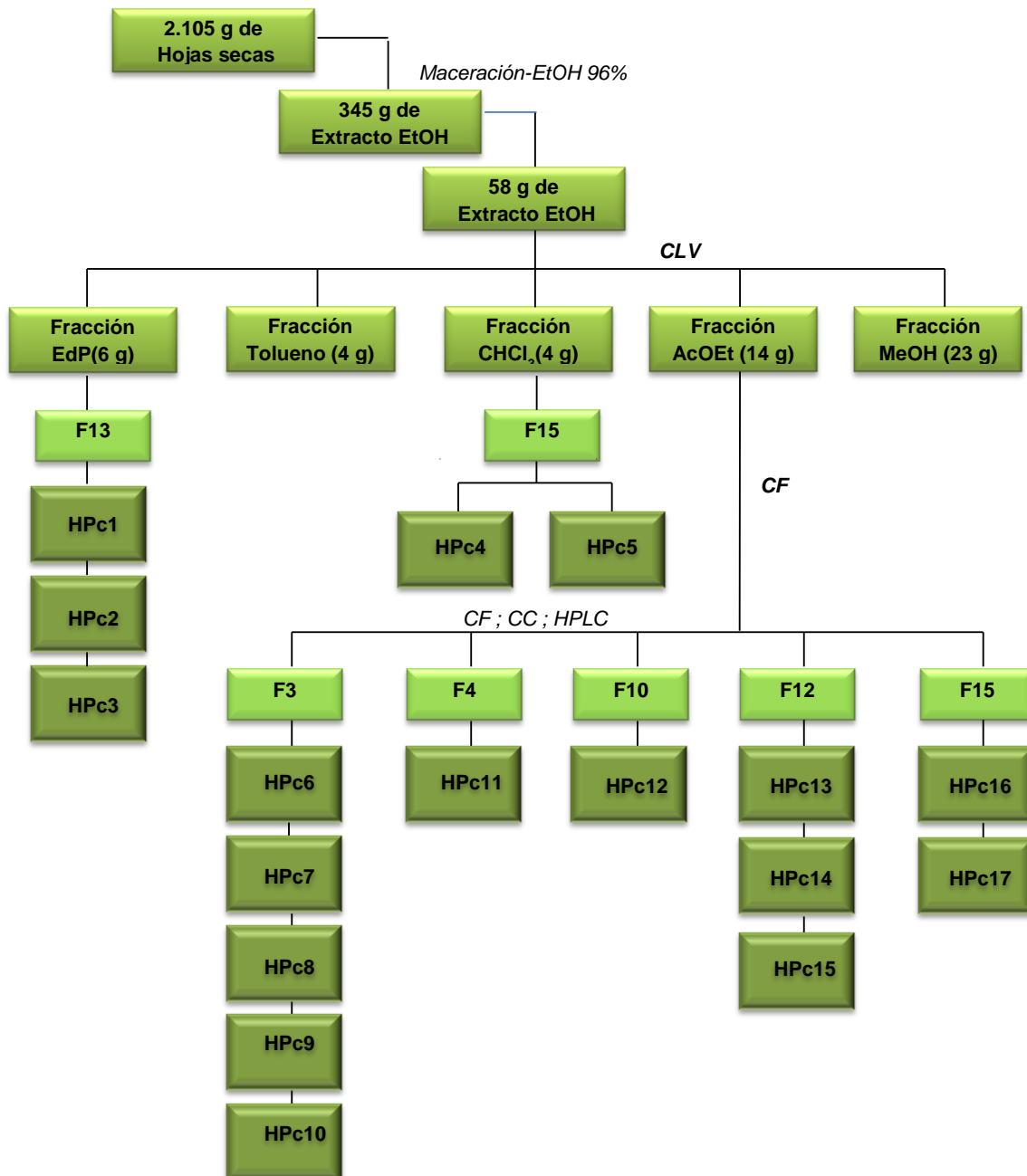
La fracción 4 (152 mg) se llevó a CC en sílica gel utilizando como elución la mezcla de tolueno - AcOiPr (70:30 a 80:20) en polaridad creciente, permitiendo obtener el flavonol quercetina **HPc11** (8 mg).

La fracción 10 (220 mg) se sometió a CF empleando tolueno-AcOEt-ácido acético (70:30:10 a 30:70:10) como mezcla eluyente en polaridad creciente permitiendo el aislamiento del glicósido denominado kaempferido-3-O- α -L-ramnopiranosido **HPc12** (8

mg). La fracción 12 (750 mg) fue sometida a CF sobre sílica gel utilizando como eluentes en polaridad creciente tolueno-AcOEt-ácido acético (60:40:10 a 30:70:10) obteniendo 21 fracciones (12.1-12.21). La fracción 12.13 (324 mg) fue purificada mediante CF utilizando como sistema de elución tolueno-AcOEt-ácido acético (50:50:10 a 30:70:10) aislando el flavonol glicosidado quercetina-3-O- β -glucósido **HPc13** (11 mg). De las fracciones 12.14 (120 mg) y 12.18 (135 mg) empleando CC y eluyendo con tolueno-AcOEt-ácido acético (50:50:10 a 20:80:10) se obtuvieron los flavonoides glicosidados kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranósido **HPc14** (10 mg) y quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosido **HPc15**, (12 mg), respectivamente.

La fracción 15 (350 mg) fue purificada mediante CF y eluida con una mezcla de tolueno-AcOEt-ácido acético (60:40:10 a 30:70:10) obteniendo la mezcla de los flavonoles glicosidados denominados kaempferol-3-O-ramnopiranosido **HPc16** y quercetina-3-O-arabinofuranósido **HPc17** (10 mg).

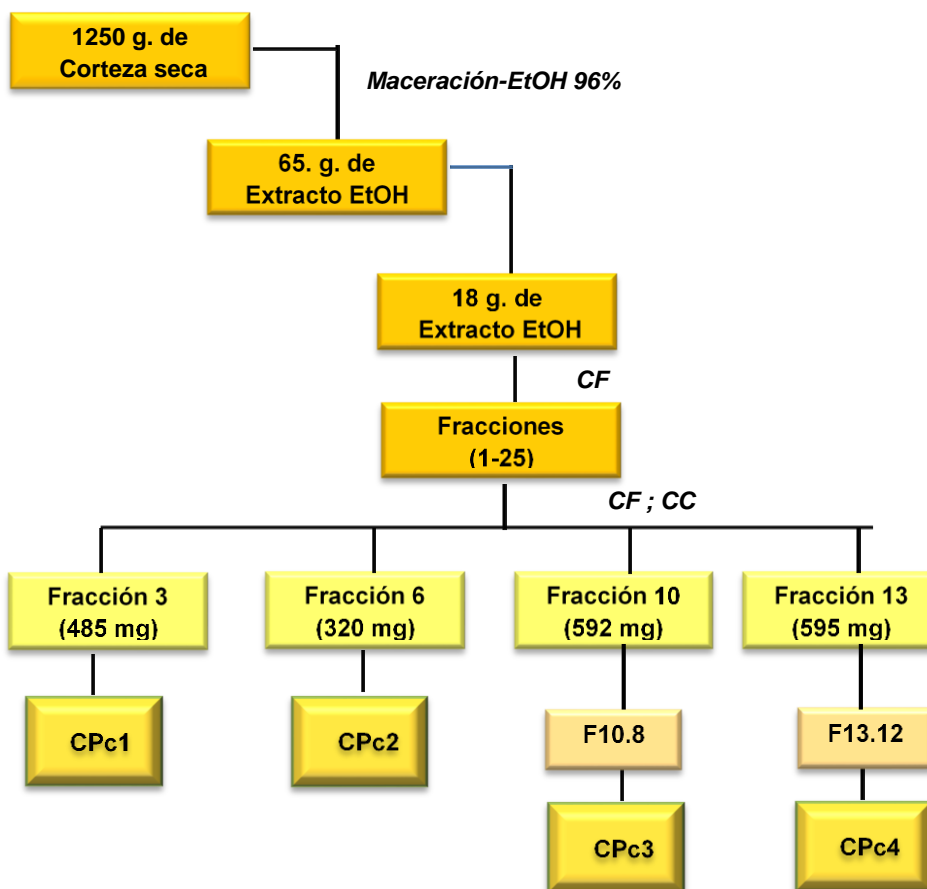
Figura 2-1: Esquema general de extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *P. caerulea*



2.2.4 Extracción, Fraccionamiento y Purificación de Metabolitos Secundarios del Extracto Crudo de Corteza de *P. caerulea*

La corteza de *P. caerulea* seca y molida (1250 g) fue sometida a maceración con etanol al 96% a temperatura ambiente. El disolvente fue evaporado a presión reducida obteniéndose 65 g de extracto crudo. Una muestra de este extracto (18 g) fue fraccionado por CF empleando como fase móvil tolueno-AcO*i*-Pr (90:10 a 10:90), produciendo 25 fracciones (1-25). La fracción 3 (485 mg) fue purificada empleando CC y la mezcla de solvente tolueno-AcOEt 90:10 como eluyentes; este proceso permitió el aislamiento del compuesto β -sitosterol **CPc1** (6 mg). La fracción 6 (320 mg) fue sometida a CF utilizando como sistema de elución hexano-AcO*i*-Pr 60:40, permitiendo el aislamiento de la cumarina escopoletina **CPc2** (4 mg). La fracción 10 (592 mg) fue sometida a CF utilizando como fase móvil hexano-AcO*i*-Pr (80:20 a 30:70) para producir 18 fracciones (10.1-10.18). La fracción 10.8 (85 mg) fue sometida a CC empleando como eluyente hexano-AcO*i*-Pr (90:10 a 30:70), obteniendo el flavanol denominado 5,7-dimetoxi-3',4'-metilendioxi epicatequina **CPc3** (8 mg). La fracción 13 (595 mg) fue sometida a CF utilizando como eluyente hexano-AcO*i*-Pr (60:40 a 20:80), produciendo 16 fracciones (13.1-13.16). La fracción 13.12 (103 mg) fue sometida a CC con el sistema eluyente CH₂Cl₂-ACN 95:5, produciendo la quinona 2,7-dimetoxi-5-hidroxi-6-(1-hidroxietil)-1,4-naftoquinona **CPc4** (12 mg).

Figura 2-2: Esquema general de extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la corteza de *P. caerulea*

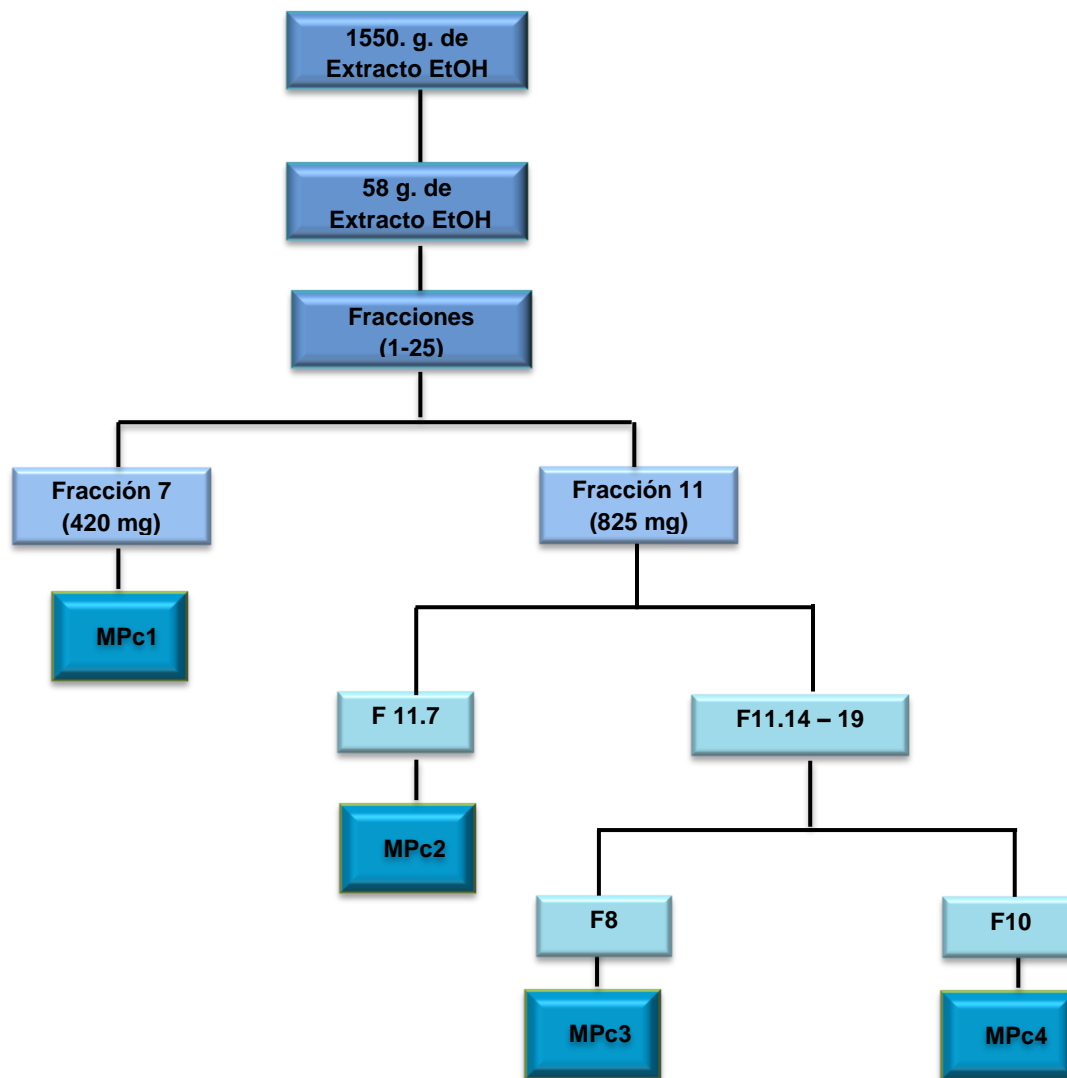


2.2.5 Extracción, Fraccionamiento y Purificación de Metabolitos Secundarios del Extracto Crudo de Madera de *P. caerulea*

La madera seca y molida de *P. caerulea* (1550 g) fue extraída por el método de maceración con etanol al 96% a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado mediante destilación a presión reducida para obtener 72.5 g de extracto crudo. 58 g de este extracto fueron sometidos a CLV sobre sílica gel, utilizando como sistema de elución una mezcla de AcOEt-MeOH en polaridad creciente (80:20 a 30:70), obteniéndose 25 fracciones. La fracción 7 (420 mg) fue purificada mediante CF empleando como

eluyentes tolueno-AcOEt (70:30) permitiendo con ello obtener el compuesto **MPc1** (10 mg). La fracción 11 (825 mg) fue sometida a CF empleando como sistema de elución tolueno-AcO*i*-Pr-MeOH (70:30:10 a 30:70:10) obteniendo 19 fracciones (11.1-11.19), la fracción 11.7 (50 mg) fue purificada por CC eluyendo con mezcla de tolueno--AcO*i*-Pr (60:40 a 20:80) obteniendo el compuesto **MPc2** (11 mg). Las fracciones 11.14-11.19 (3.4 g) fueron reunidas y fraccionadas mediante un sistema de CF automática (CombiFlash Rf, Teledyne Isco) equipado con 30 g sílica gel en fase reversa, utilizando un gradiente lineal CH₂Cl₂ a CH₃OH durante 50 minutos con un flujo 10 mL/min, obteniéndose con ello 16 fracciones (14-19.1 ; 14-19.16). Las fracciones 14-19.8 y 14-19.10 fueron purificadas por HPLC semi-preparativo utilizando como eluyentes ACN y H₂O acidulada al 0.01% con ácido trifluoroacético (ATF), se empleó un sistema isocrático con la composición de fase móvil A: B (70:30) con un tiempo de 42 min y flujo 3mL/min, obteniéndose con ello los compuestos **MPc3** (1 mg). La fracción 14-19.12 (220 mg) fue sometida a CC empleando sephadex LH-20 como fase estacionaria y MeOH como eluyente, permitiendo obtener 13 fracciones. La fracción 2 y 6 fueron purificadas por HPLC semi-preparativo empleando las mismas condiciones anteriores permitiendo obtener los compuestos **MPc4** (0.7 mg).

Figura 2-3: Esquema general de extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la madera de *P. caerulea*

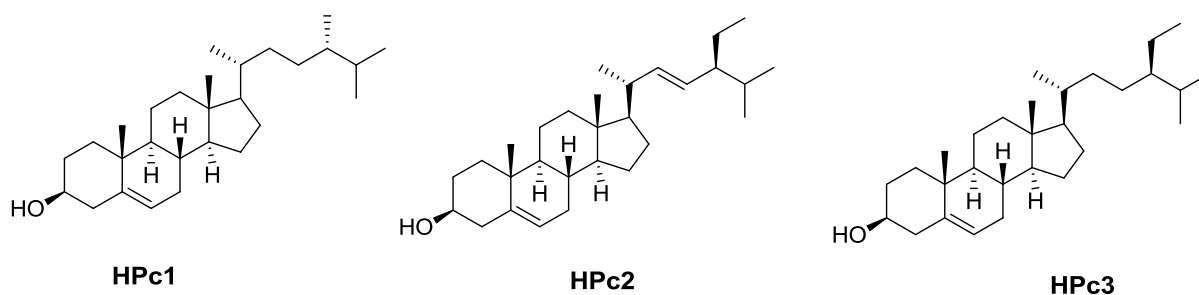


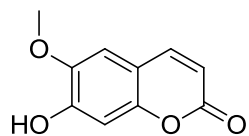
2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Extracción, Fraccionamiento y Purificación de Metabolitos Secundarios del Extracto Crudo de Hojas, Corteza y Madera de *P. caerulea*

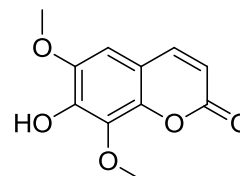
El estudio fitoquímico realizado en las fracciones de EdP, tolueno, CHCl_3 , AcOEt, y MeOH obtenidas del extracto de hojas de *P. caerulea*, permitió el aislamiento e identificación de diecisiete sustancias, entre las que se encuentran tres esteroides: campesterol **HPc1**, estigmasterol **HPc2** y β -sitosterol **HPc3**; dos cumarinas: escopoletina **HPc4** e isofraxidina **HPc5**; cinco flavonoides acilados: 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-Z-p-cumaril-4''-E-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc6** (caerulina A), 4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-E-p-cumaril-4''-E-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc7** (caerulina B), 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-Z-p-cumaril-4''-Z-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc8** (caerulina C), 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-E-p-cumaril-4''-Z-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc9** (caerulina D) y 4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-Z-p-cumaril-4''-E-p-cumaril)- α -L-ramnopiranosido **HPc10** (caerulina E); un flavonol: quercetina **HPc11** y 6 flavonoides glicosidados: kaempferido-3-O- α -L-ramnopiranosido **HPc12**, quercetina-3-O- β -glucósido **HPc13**, kaempferol-3-O- α -L-arabinofuranósido **HPc14**, quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosido **HPc15**, kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosido **HPc16** y quercetina-3-O- α -L-arabinofuranósido **HPc17**. Todos los compuestos fueron elucidados por métodos espectroscópicos, por comparación con los datos descritos en la literatura. Las estructuras de los compuestos aislados de las hojas de *P. caerulea* se muestran en la Figura 2-4.

Figura 2-4: Compuestos aislados de las hojas de *P. caerulea*

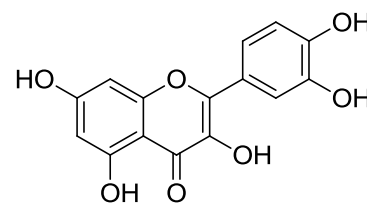
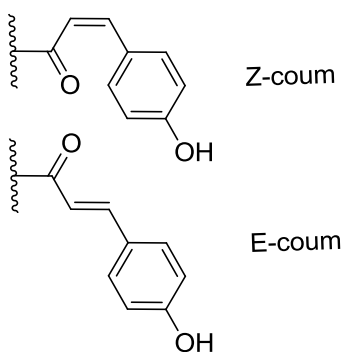
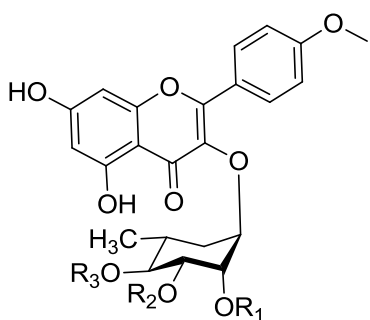




HPc4



HPc5



HPc11

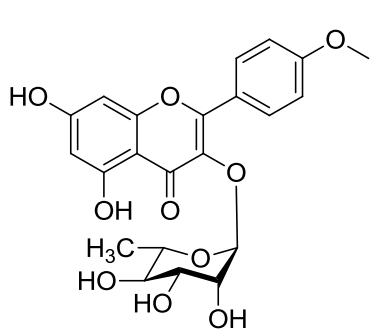
HPc6 R₁= E-coum R₂=H R₃= Z-coum

HPc7 R₁= H R₂= E-coum R₃= E-coum

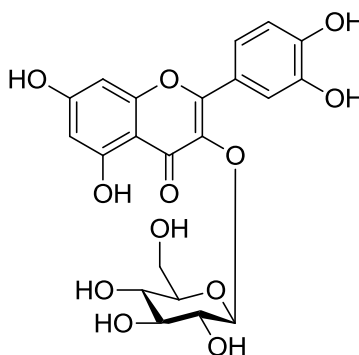
HPc8 R₁= Z-coum R₂=H R₃= Z-coum

HPc9 R₁= Z-coum R₂=H R₃= E-coum

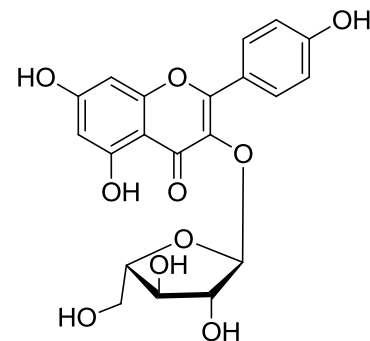
HPc10 R₁= H R₂= E-coum R₃= Z-coum



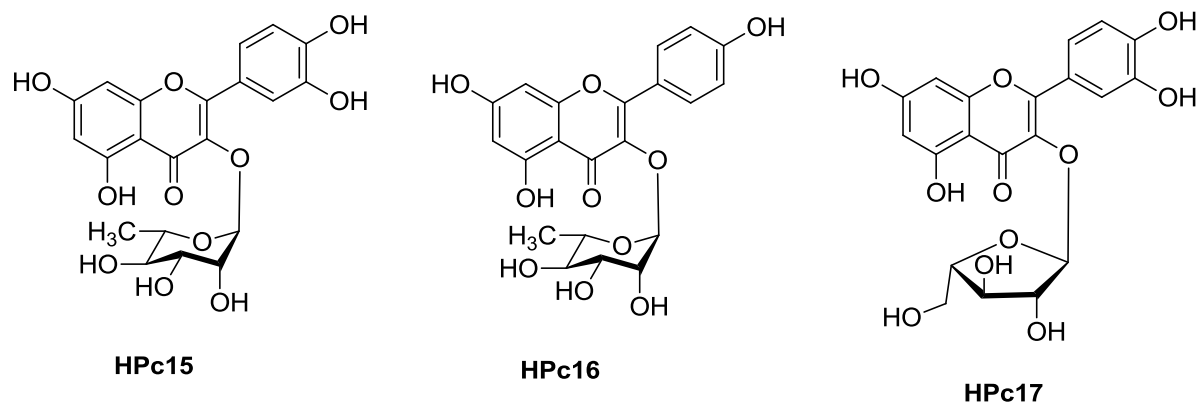
HPc12



HPc13

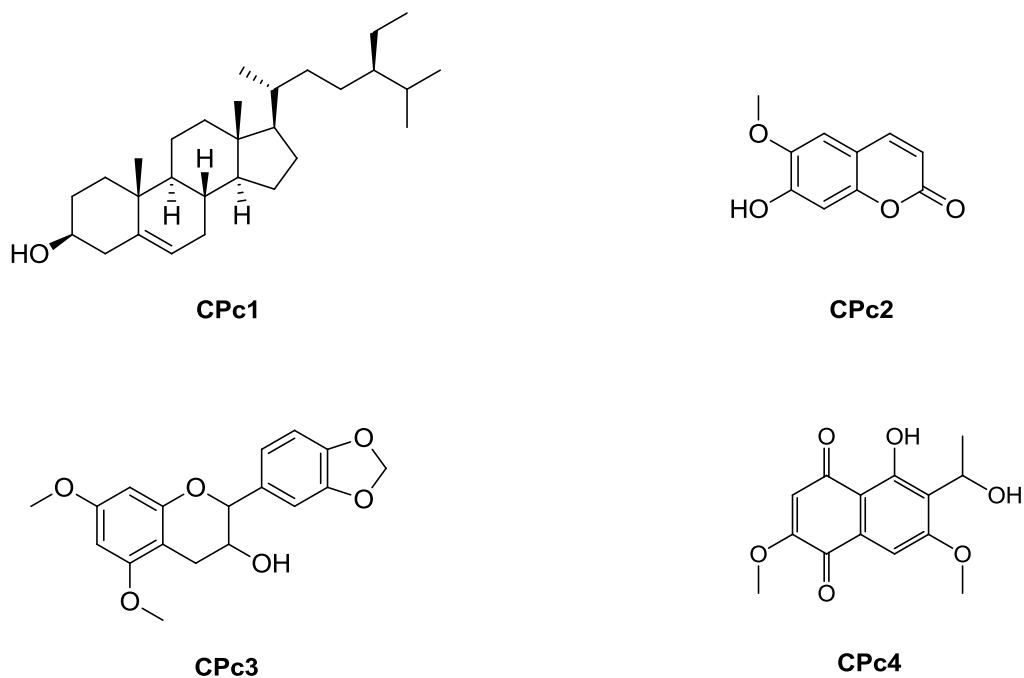


HPc14



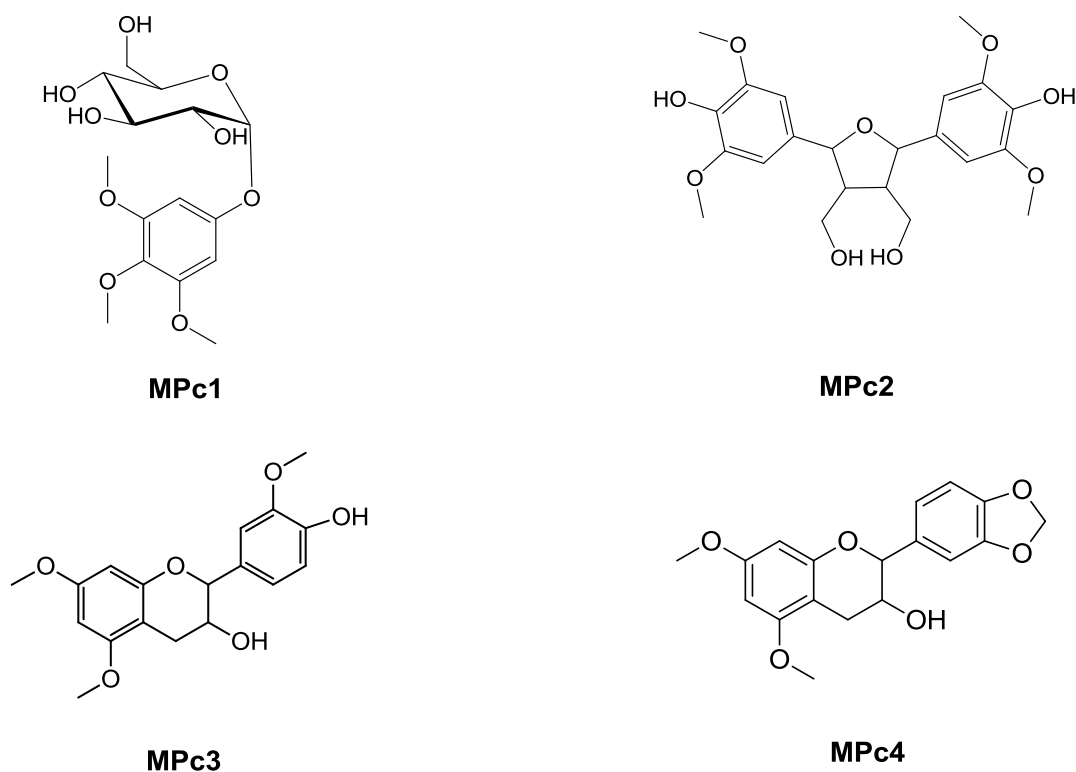
La purificación por técnicas cromatográficas de las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de la corteza de *P. caerulea* condujo al aislamiento e identificación de cuatro compuestos, entre las que se encuentran un estero: β -sitosterol **CPc1**; una cumarina: escopoletina **CPc2**; un flavanol: 5,7-dimetoxi-3',4'-metilendioxi epicatequina **CPc3** y una quinona 2,7-dimetoxi-5-hidroxi-6-(1-hidroxietil)-1,4-naftoquinona **CPc4**. Todos los compuestos fueron elucidados por métodos espectroscópicos, por comparación con los datos descritos en la literatura. Las estructuras de los compuestos aislados de la corteza de *P. caerulea* se muestran en la Figura 2-5.

Figura 2-5: Compuestos aislados de la corteza de *P. caerulea*



El estudio fitoquímico realizado en las fracciones obtenidas del extracto etanólico de la madera *P. caerulea* permitió el aislamiento e identificación de cuatro sustancias, entre las que se encuentran un glicósido: 3,4,5-trimetoxifenil- β -D-glucopiranosido **MPc1**, un lignano: huazhongilexina **MPc2** y dos flavanoles 4'-hidroxi-5,7,3'-trimetoxiflavan-3-ol **MPc3** y 5,7-dimetoxi-3',4'-metilendioxi epicatequina **MPc4**. Todos los compuestos fueron elucidados por métodos espectroscópicos y por comparación con los datos descritos en la literatura. Las estructuras de los compuestos aislados de la madera de *P. caerulea* se muestran en la Figura 2-6.

Figura 2-6: Compuestos aislados de la madera de *P. caerulea*



El estudio fitoquímico de *P. caerulea* condujo al aislamiento de un grupo de metabolitos sin reportes previos en la literatura correspondientes a flavonoles glicosidados acilados, que se denominaron: (caerulina A) **HPc6**, (caerulina B) **HPc7**, (caerulina C) **HPc8**, (caerulina D) **HPc9** y (caerulina E) **HPc10**.

En esta investigación, todos los compuestos aislados, a excepción de **HPc3** (Cuca 1978) son referenciados por primera vez en la especie *P. caerulea*. De igual forma, este es el primer reporte de la presencia de los compuestos **HPc5**, **HPc14**, **HPc17**, **CPc3**, **MPc1**, **MPc2**, **MPc3** y **MPc4** en el género *Persea* y de **HPc12**, **CPc4** en la familia Lauraceae.

Los flavonoides son los compuestos mayoritarios aislados en este estudio con la presencia principalmente de flavonoles glicosidados y sus agliconas, lo que es consecuente con los estudios previos que se reportan en el género (Miranda et al., 1997; Wofford, 1974). Entre los compuestos aislados, **HPc11** fue reportado en *P. americana* (Owolabi et al., 2010), **HPc13**, **HPc15**, **HPc16**, han sido previamente aislados en *P. palustris*, *P. borbonia*, *P. littoralis*, *P. humilis* (Wofford, 1974; Yang, 1998), *P. americana* (De Almeida et al., 1998; Miranda et al., 1997; Wigg et al., 1996) y *P. gratissima* (Kruthiventi and Krishnaswamy, 2000). Los flavanoles **CPc3** y **MPc4** no tienen reportes previos en el género *Persea*, pero sí en otros grupos taxonómicos de la familia Lauraceae (Mukherjee et al., 1994) (Chen et al., 2005).

Diversos trabajos han permitido determinar que 3-O-glicósidos de quercetina, kaempferol y C-glicósidos de luteolina y apigenina son los principales flavonoides aislados en las especies del género *Persea* (Yang, 1998; Wofford, 1974). Además, cabe resaltar que desde el punto de vista quimiotaxonómico los reportes señalan una diferenciación entre los subgéneros *Eriodaphne* y *Persea*, el primero de ello se caracteriza por la presencia de flavonoles glicosidados y flavonas C- glicosidas, mientras que *Eriodaphne* se identifica por poseer falvonoles glicosidados y sus respectivas agliconas (Almeida et al., 1998; Miranda et al., 1997).

La presencia de flavonoles metilados ha sido observado en algunos géneros de la familia Lauraceae: *Cryptocarya*, *Lindera* y *Persea* (Yang, 1998); un ejemplo de ello es el kaempférido (en su forma aglicona y glicosidada), caracterizado en *P. americana* y *P. borbonia*, respectivamente (Hurtado-Fernández et al., 2011; Yang, 1998). Esta investigación es el primer reporte del kaempferol metilado **HPc12** en la familia

Lauraceae, pero ha sido previamente reportado en especies de la familia Rosaceae (Bilia et al., 1993; Bilia et al., 2011) y Euforbiaceae (Rifai et al., 2011).

Las naftoquinonas son un grupo de metabolitos extendido en la naturaleza, que han sido identificadas en plantas superiores y hongos (Medentsev et al., 1998). Las 5-hidroxi-1,4-naftoquinonas son compuestos principalmente reportados en la familia Juglandaceae, específicamente en el género *Juglans* (Montenegro et al., 2010), en la familia Lauraceae, este es el primer reporte de este tipo de metabolito. El compuesto **CPc4** ha sido aislado en los hongos *Hendersonula toruloidea* (Van Eijk et al., 1983), *Guignardia laricina* (Otomo et al., 1983) y *Delitschia corticola* (Rong et al., 2011); no se han hallados reportes en plantas.

Las cumarinas no son metabolitos comunes en las especies del género *Persea*, los compuestos **HPc4** y **CPc2** solamente han sido identificados en *P. americana* (Merici et al., 1992), **HPc5** no tiene estudios previos en *Persea*, pero sí ha sido aislado en otros géneros de la familia Lauraceae (Tsai et al., 1996). Los lignanos son compuestos que han sido aislados en *P. obovatifolia* (Tsai et al., 1996), *P. lingue* (Sepulveda et al., 1999) y *P. pyriformis* (De Luca et al., 2010), pero **MPc2** no ha sido reportado previamente en este género. Por otro lado, existen algunos reportes de los esteroides **HPc1**, **HPc2** y **HPc3** (**CPc1**) en *P. americana* (Piironen et al., 2003), *P. japónica* (Wang et al., 2003) y *P. caerulea* (Cuca, 1978).

2.3.1.1 Elucidación estructural de los compuestos **HPc6-HPc10**

El compuesto **HPc6** fue obtenido como un sólido amarillo amorfo, cuyo espectro de IR presentó bandas características de grupo carbonilo (1680 cm⁻¹), hidroxilo (3410 cm⁻¹) y anillo aromático (1605). El espectro de UV muestra banda de absorción máxima en 265 y 314 nm, característico del núcleo flavonoide (Harborne, 1994).

El espectro de RMN ¹H muestra la presencia de dos protones en δ 8.01 (d, J= 8.7 Hz, 2H) y δ 7.26 (d, J= 8.7 Hz, 2H) característico de un sistema AA'XX' y los protones en δ

6.58 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H) y δ 6.32 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H) correspondiente a un sistema AX, todas estas señales características de los anillos B y A de un flavonol, respectivamente. Se observa una señal en δ 5.80 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H) característica de protón anomérico y señales en δ 5.64 (dd, $J = 1.2, 3.2$ Hz, 1H), δ 5.01 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H), δ 4.22 (dd, $J = 3.2, 9.8$ Hz, 1H), δ 3.39 (m, 1H) correspondientes a hidrógenos metínicos de azúcar, además una señal en δ 0.88 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H) de hidrógeno metílico (Tabla 2-1). Los desplazamientos, constante de acoplamiento e integración de estas señales permiten establecer la presencia del monosacárido α -ramnosa. El mismo espectro muestra una señal en δ 3.9 (s, 3H) distintiva de protones de grupo metoxilo.

El espectro de RMN ^1H del compuesto **HPc6**, exhibe un par de sistema de acoplamiento, en δ 7.60 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H), δ 6.96 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), δ 6.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H) y muestra señales de dos pares de protones olefínicos en δ 7.70 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H7'''); δ 6.45 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H8'''); δ 7.58 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H7''''') y δ 6.30 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H8''''') (Tabla 2-1) (Figura 2-7) que son característicos de dos unidades p-cumaril. Las constantes de acoplamiento que exhiben los protones olefínicos de este sistema permite inferir que cada uno de ellos posee isomería trans.

Figura 2-7: Espectro RMN ^1H para el compuesto **HPc6** (acetona- d_6 , 500 MHz)

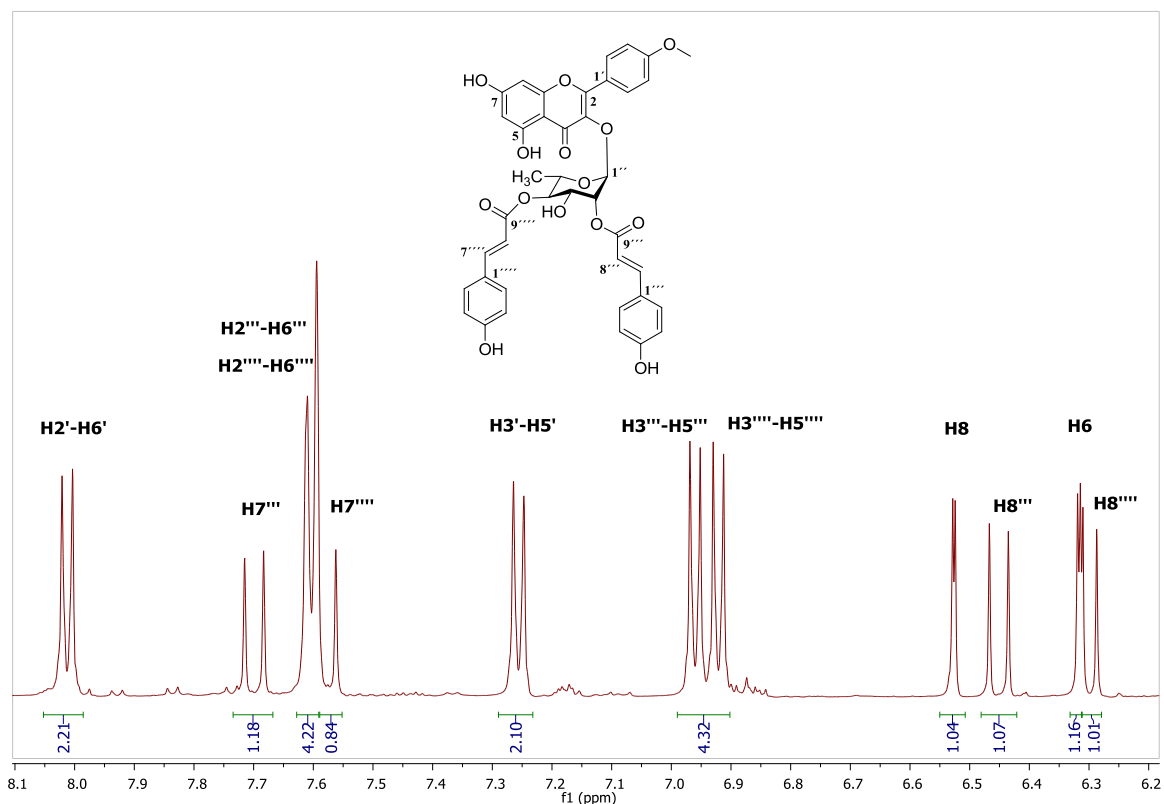
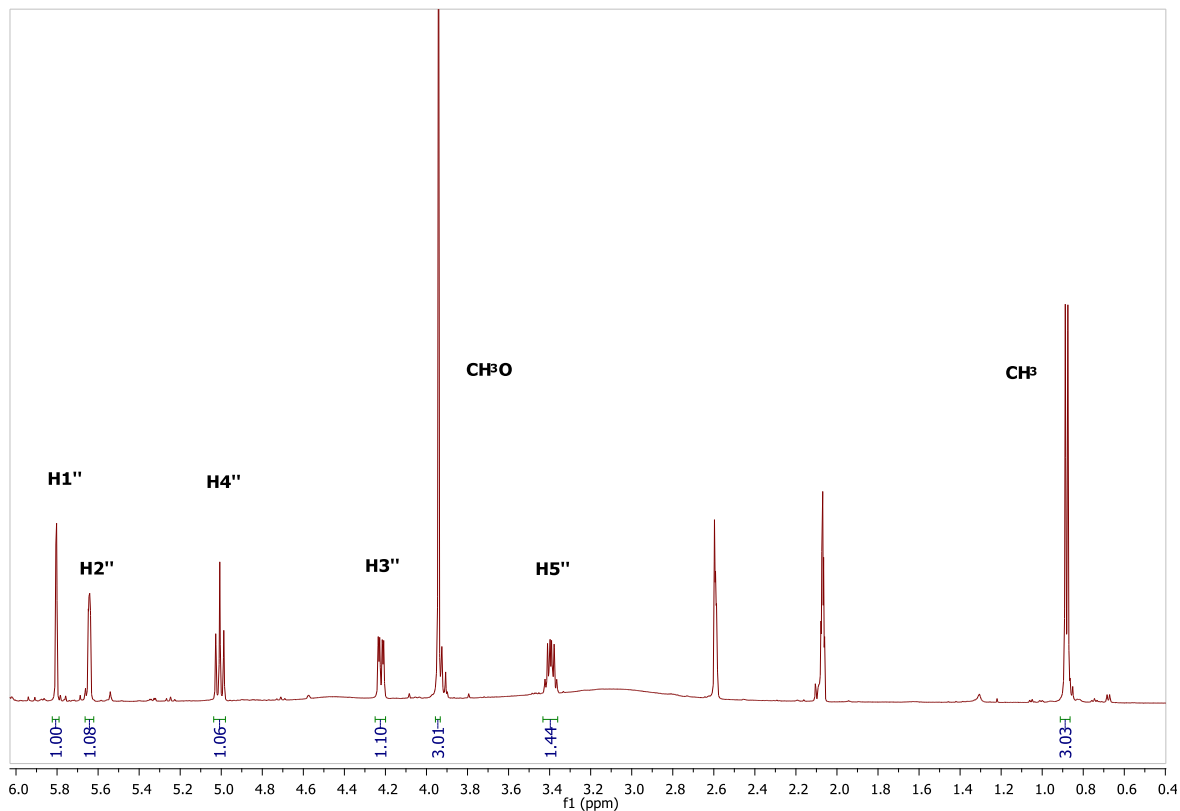
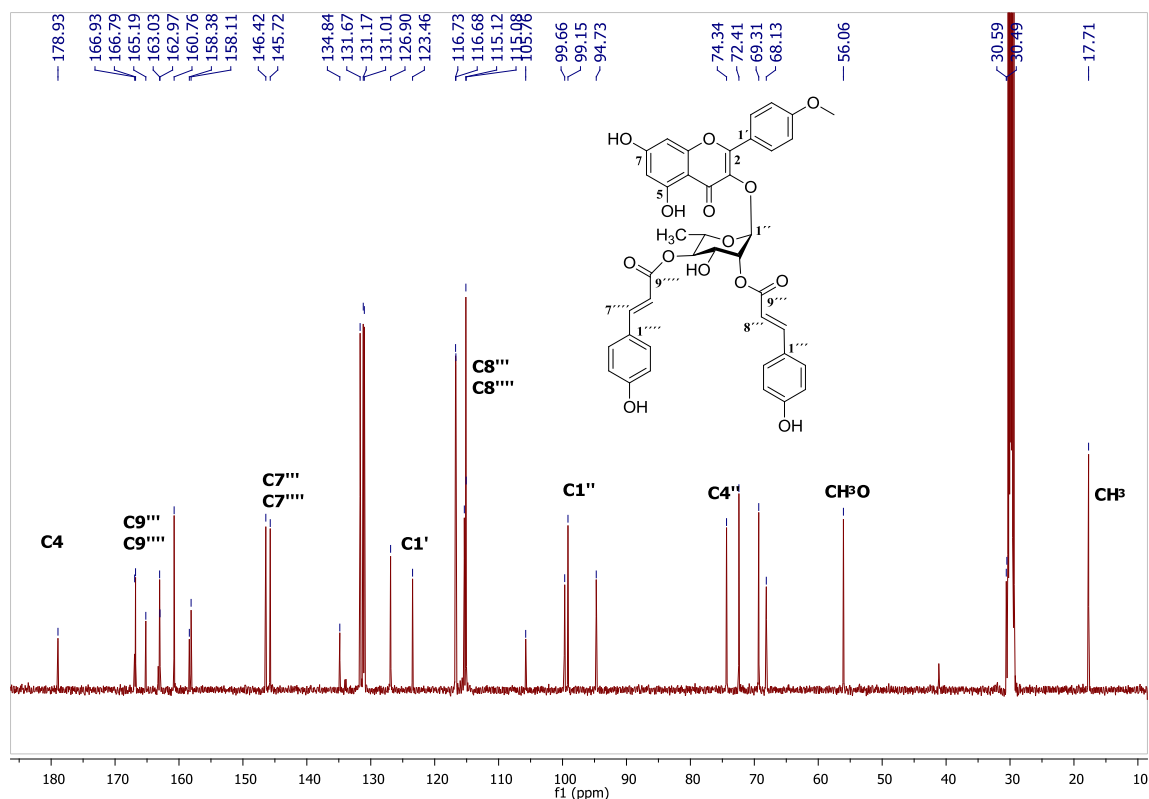


Figura 2-8: Espectro RMN ^1H para el compuesto **HPc-6** (acetona- d_6 , 500 MHz)

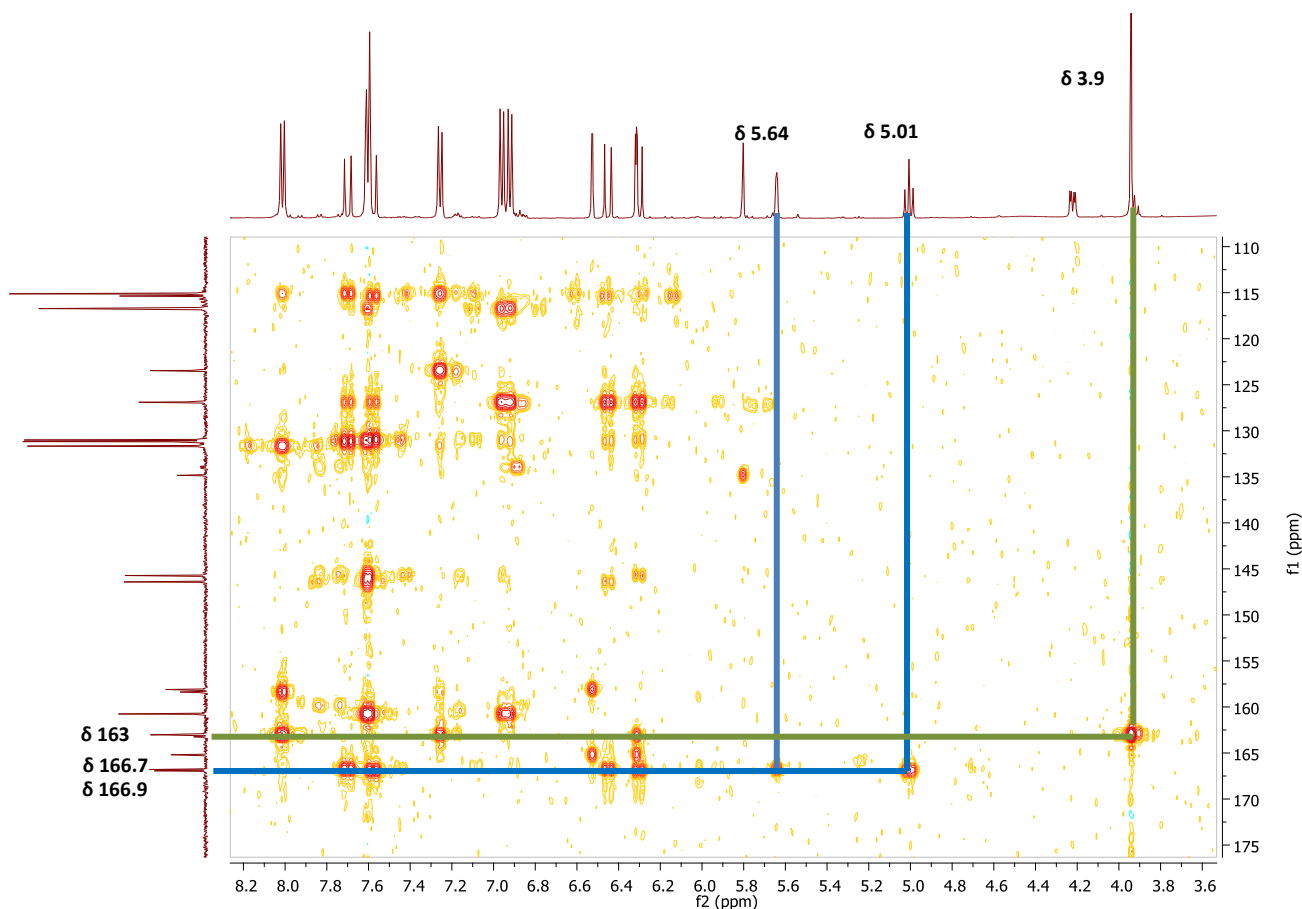


El espectro de RMN ^{13}C muestra señales en δ 178.9, δ 166.7 y δ 166.9 (Figura 2-9) características por su desplazamientos de carbono de grupo carbonilo; la primera señal se encuentra desplazada a campo bajo lo que sugiere que este grupo funcional se encuentra quelatado y es característico de núcleo flavonoide, las otras dos señales son correspondiente a carbonilos de éster de la unidades *p*-cumaril. En este mismo espectro también se muestran las señales en δ 56.0 y δ 17.7 (Figura 2-9) que caracterizan a carbono oxigenado de grupo metoxilo y carbono alifático de grupo metilo, respectivamente.

Figura 2-9: Espectro RMN ^{13}C para el compuesto **HPC-6** (acetona- d_6 , 500 MHz)



El espectro de HMBC permite asignar la ubicación del grupo metoxilo sobre el anillo B del núcleo flavonoide al observarse la relación entre la señal en δ 3.9 (s, 3H) y el carbono en δ 163.0 (C 4') (Figura 2-10), esta posición es corroborada por el espectro NOESY donde se observan las correlaciones entre las señales δ 3.9 (s, 3H) y 7.26 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H) del anillo aromático. El espectro de HMBC, también indica la correlación entre los protones metínicos δ 5.64 (H2'') y δ 5.01 (H4'') del azúcar con los carbonos carbonílicos en δ 166.7 (C9''') y δ 166.9 (C9''''') de las unidades *p*-cumaril (Figura 2-10), lo que permite asignar estas unidades en los carbonos (C2'' y C4'') de la ramnosa. Esta asignación es confirmada por los desplazamientos a campo bajo de los protones en δ 5.64 (H2''), δ 5.01 (H4'') y los carbonos en 72.4 (C2'') y δ 74.3 (C4'') del azúcar (Tabla 2-1).

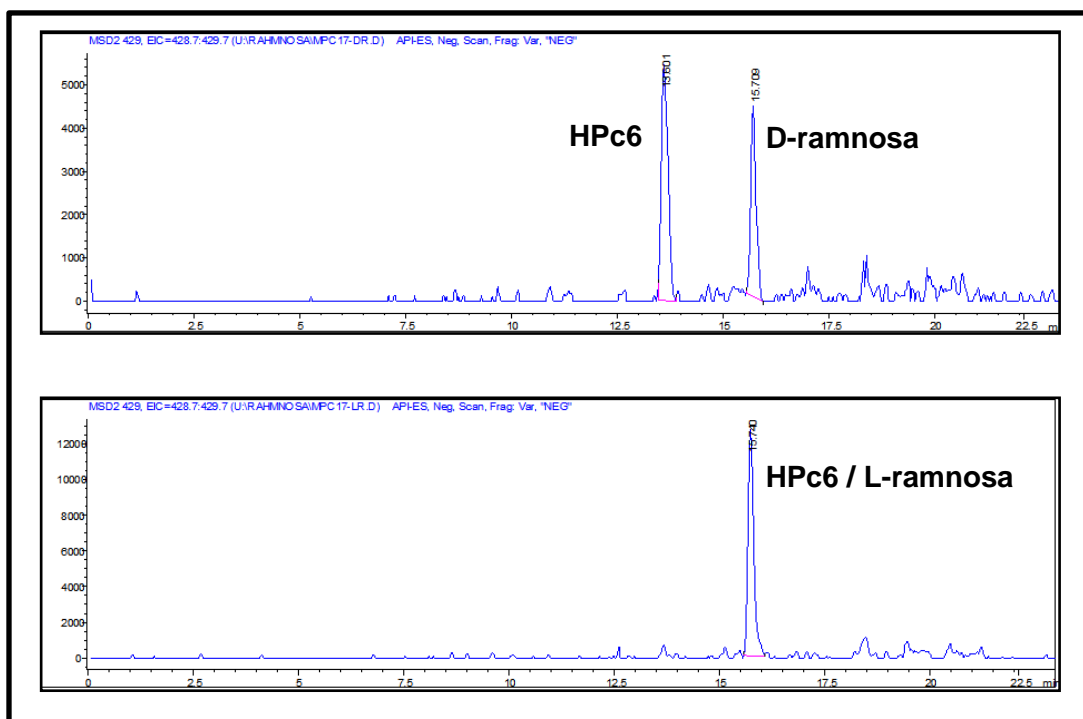
Figura 2-10: Espectro HMBC para el compuesto **HPc-6** (acetona- d_6 , 500 MHz)

La fórmula molecular de **HPc6** fue establecida como $C_{40}H_{34}O_{14}$ a partir del análisis de EMAR-ESI-TOF ($[M-H] m/z$ 737.1876; calculado para $C_{40}H_{33}O_{14}$ 737.1870), la cual es consistente con el resultado obtenido del análisis espectroscopio realizado.

La determinación de la configuración absoluta del monosacárido de **HPc6** fue determinada por el método descrito por Tanaka. El glicósido **HPc6** se mantuvo durante 4 horas en 300 μ L de HCl 1 N (Tanaka et al., 2007). La muestra fue monitoreada cada 30 minutos por CL-EM y al final secada en corriente de N_2 . Al producto se le adicionó 100 μ L de una disolución de L-cisteína metil éster (8,3 mg) en 150 μ L de piridina en atmosfera inerte y se mantuvo en agitación a 60°C durante 2 horas. Posteriormente, Añadimos 200 μ L de una disolución de o-tolil-isocianato (8,3 mg) en 360 μ L de piridina en atmosfera inerte dejando la reacción a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla de la reacción fue analizada por CL-EM en fase reversa, al igual que los derivados de los estándares (L-ramnosa/D-ramnosa). Al final, la mezcla de la reacción obtuvo igual

tiempo de retención de los derivados del estándar L, lo que concluye que el azúcar constituyente del compuesto **HPc6** es L-ramnosa (Figura 2-11). Esta misma metodología fue empleada para **HPc7-HPc10** obteniendo el mismo resultado anterior, es decir todos los flavonoles acilados presentaron L-ramnosa.

Figura 2-11: Cromatogramas de CL obtenidos de la mezcla de los derivados de **HPc6** y los estándares D-ramnosa y L-ramnosa



De este modo, con los datos obtenidos de los espectros de RMN ^1H , de RMN ^{13}C , uni-y bidimensional, EM y apoyados en los datos bibliográficos (Wang et al., 2007), se puede establecer que el compuesto **HPc6** corresponde al flavonoide 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-*E-p*-coumaril,4''-*E-p*-coumaril)- α -L-ramnopiranosido, denominado caeruleina A (Figura 2-12).

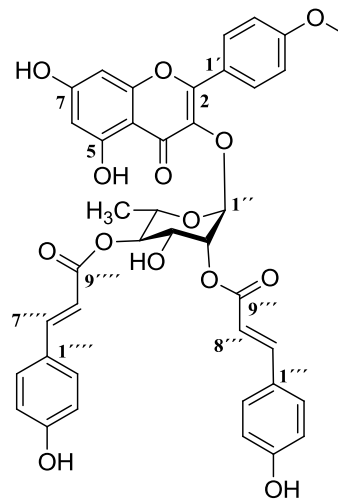
Figura 2-12: Estructura de caerulina A (HPc6)

Tabla 2-1: Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos **HPc6 – HPc10** (acetona- d_6)

	HPc6		HPc7		HPc8		HPc9		HPc10	
	δ ^1H (m, J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (m, J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (m, J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (m, J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (m, J Hz)	δ ^{13}C
<i>Kaempferol</i>										
2	-	158.38	-	158.29	-	158.42	-	158.38	-	158.44
3	-	134.84	-	135.30	-	134.93	-	130.98	-	131.78
4	-	178.93	-	179.15	-	179.02	-	178.94	-	179.26
5	-	162.97	-	163.24	-	163.20	-	163.17	-	163.14
6	6.32 (1H, d, 2.2)	99.66	6.30 (1H, d, 1.7)	99.75	6.30 (1H, s)	99.81	6.29 (1H, d, 2.10)	99.76	6.30 (1H, d, 1.9)	99.82
7	-	165.19	-	165.30	-	165.47	-	165.38	-	165.36
7-OH	12.60 (1H, s)	-	12.62 (1H, s)	-	12.59 (1H,s)	-	12.58 (1H,s)	-	12.62 (1H, s)	-
8	6.58 (1H, d, 2.2)	94.73	6.51 (1H, s)	94.73	6.51 (1H, s)	94.74	6.50 (1H, d, 2.10)	94.71	6.52 (1H, d, 1.9)	94.90
9	-	158.11	-	158.13	-	158.10	-	158.06	-	158.31
10	-	105.76	-	105.84	-	105.71	-	105.71	-	105.91
1'	-	123.46	-	123.55	-	123.42	-	123.33	-	123.70
2'/6'	8.01 (2H, d, 8.7)	131.67	8.01 (2H, d, 8.7)	131.66	7.99 (2H, d, 8.8)	131.63	7.95 (2H, d, 8.8)	131.57	8.01 (2H, d, 8.8)	131.83
3'/5'	7.26 (2H, d, 8.7)	115.12	7.24 (2H, d, 8.7)	115.12	7.23 (2H, d, 8.8)	115.15	7.15 (2H, d, 8.8)	115.01	7.24 (2H, d, 8.8)	115.30
4'	-	163.03	-	162.95	-	163.03	-	163.01	-	163.12
4'-OCH₃	3.90 (3H, s)	56.06	3.90 (3H,s)	56.02	3.90 (3H,s)	56.05	3.93 (3H,s)	56.03	3.89 (3H,s)	56.19
<i>Rhamnosa</i>										
1''	5.80 (1H, d, 1.2)	99.15	5.73 (1H, s)	101.89	5.70 (1H, s)	99.32	5.70 (1H, d, 1.7)	99.40	5.74 (1H, s)	101.98
2''	5.64 (1H, dd, 1.2, 3.2)	72.41	4.54 (1H, s)	69.50	5.60 (1H, d, 1.6)	72.24	5.63 (1H, dd, 1.7, 3.2)	72.48	4.52 (1H, s)	69.49
3''	4.22 (1H, dd, 3.2, 9.8)	68.13	5.38 (1H, dd, 2.9, 9.9)	72.22	4.21 (1H, d, 3.4, 9.8)	68.15	4.18 (1H, dd, 3.2, 9.8)	68.14	5.37 (1H, dd, 2.9, 10.1)	72.06
4''	5.01 (1H, t, 9.8)	74.34	5.28 (1H, d, 9.9)	71.02	4.93 (1H, t, 9.8)	74.32	4.98 (1H, t, 9.8)	74.18	5.23 (1H, t, 10.1)	71.17
5''	3.39 (1H, m)	69.31	3.39 (1H, m)	69.50	3.46 (1H, m)	69.30	3.39 (1H, m)	69.25	3.42 (1H, m)	69.75
6''	0.88 (3H, d, 6.2)	17.71	0.88 (3H, d, 6.3)	17.68	0.84 (3H, d, 6.1)	17.67	0.86 (3H, d, 6.2)	17.67	0.84 (3H, d, 6.2)	17.85
<i>p-coumaril</i>										
1'''		126.90		126.78		127.15		126.80		126.91
2'''/6'''	7.60 (4H, d, 8.6)	131.17	7.53 (2H, d, 8.5)	131.04	7.79 (2H, d, 8.6)	133.97	7.58 (2H, d, 8.5)	131.15	7.79 (2H, d, 8.6)	134.15
3'''/5'''	6.96 (2H, d, 8.6)	116.68	6.89 (2H, d, 8.5)	116.73	6.85 (2H, d, 8.6)	115.84	6.90 (2H, d, 8.5)	116.73	6.83 (2H, d, 8.6)	115.90

4'''		160.76		160.77		159.96		160.88		159.85
7'''	7.70 (1H, d, 15.9)	146.42	7.61 (1H, d, 15.9)	146.08	6.90 (1H, d, 12.8)	145.27	7.68 (1H, d, 15.9)	146.44	6.87 (1H, d, 12.8)	145.62
8'''	6.45 (1H, d, 15.9)	115.08	6.28 (1H, d, 15.9)	115.17	5.86 (1H, d, 12.8)	115.93	6.43 (1H, d, 15.9)	115.05	5.72 (1H, d, 6.8)	116.15
9'''		166.79		166.96		165.91		166.82		166.69
<i>p-coumaril</i>										
1'''		126.90		126.82		126.81		127.12		126.58
2'''/6'''	7.60 (4H, d, 8.6)	131.01	7.49 (2H, d, 8.4)	131.04	7.58 (2H, d, 8.0)	130.99	7.79 (2H, d, 8.7)	133.99	7.51 (2H, d, 8.7)	131.21
3'''/5'''	6.92 (2H, d, 8.6)	116.73	6.86 (2H, d, 8.4)	116.73	6.94 (2H, d, 8.0)	116.79	6.90 (2H, d, 8.7)	115.72	6.83 (2H, d, 8.7)	116.86
4'''		160.76		160.83		160.91		159.92		160.94
7'''	7.58 (1H, d, 15.9)	145.72	7.52 (1H, d, 16.0)	146.03	7.55 (1H, d, 16.0)	145.76	6.91 (1H, d, 12.8)	145.16	7.52 (1H, d, 15.9)	146.23
8'''	6.30 (1H, d, 15.9)	115.36	6.22 (1H, d, 16.0)	114.90	6.26 (1H, d, 16.0)	115.29	5.73 (1H, d, 12.8)	116.04	6.21 (1H, d, 15.9)	115.01
9'''		166.93		166.61		166.96		166.28		166.32

Los espectros de RMN ^1H de los compuestos **HPc7- HPc10** muestran señales similares exhibidas por el compuesto **HPc6** (Tabla 2-1), lo que permite deducir que corresponde al mismo tipo de molécula con variación en la posición de los *p*-coumaril y el tipo de isomería que presenta los hidrógenos olefínicos en estas unidades. Los compuestos **HPc8** y **HPc9** exhiben a campo bajo los protones δ 5.60 (H2''), δ 4.93 (H4'') y δ 5.63 (H2''), δ 4.98 (H4'') (Tabla 2-1) (Figura 2-13; Figura 2-14) de la ramnosa, respectivamente; permitiendo sugerir que los *p*-coumaril se encuentra enlazado al monosacárido en los carbonos C2'' y C4''.

Figura 2-13: Espectro RMN ^1H para el compuesto **HPc-8** (acetona- d_6 , 500 MHz)

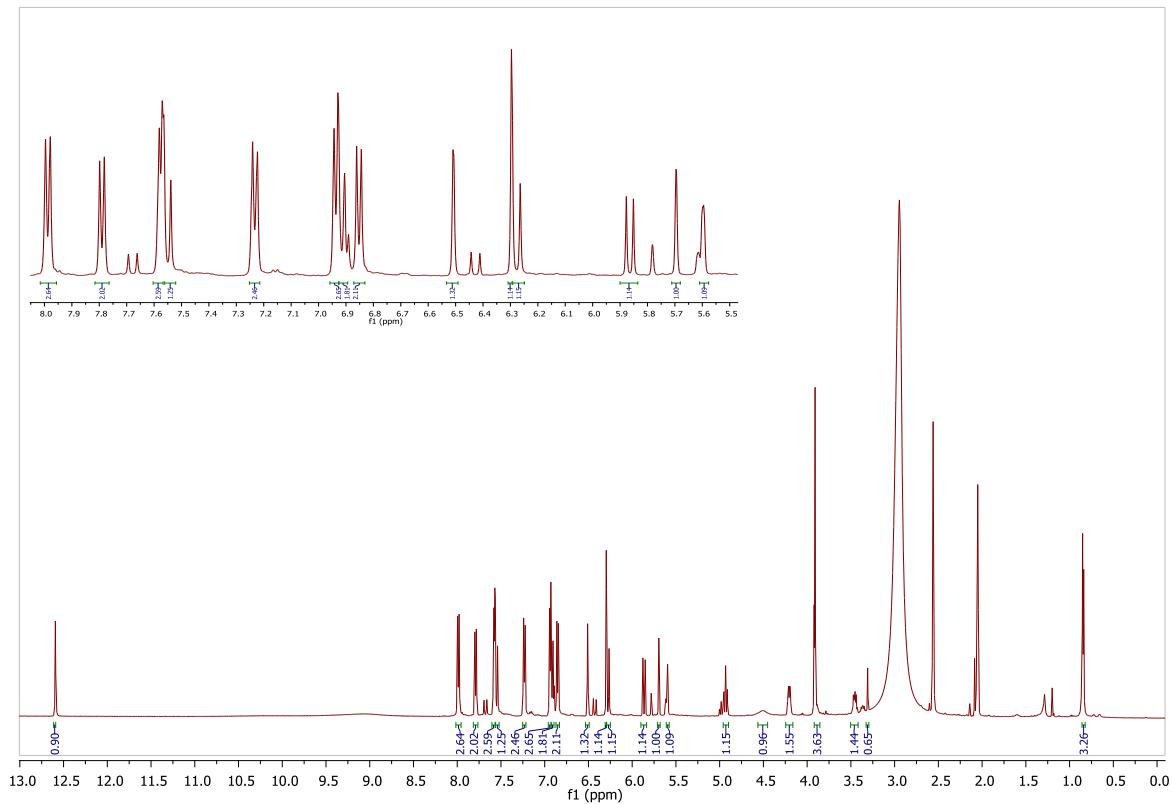
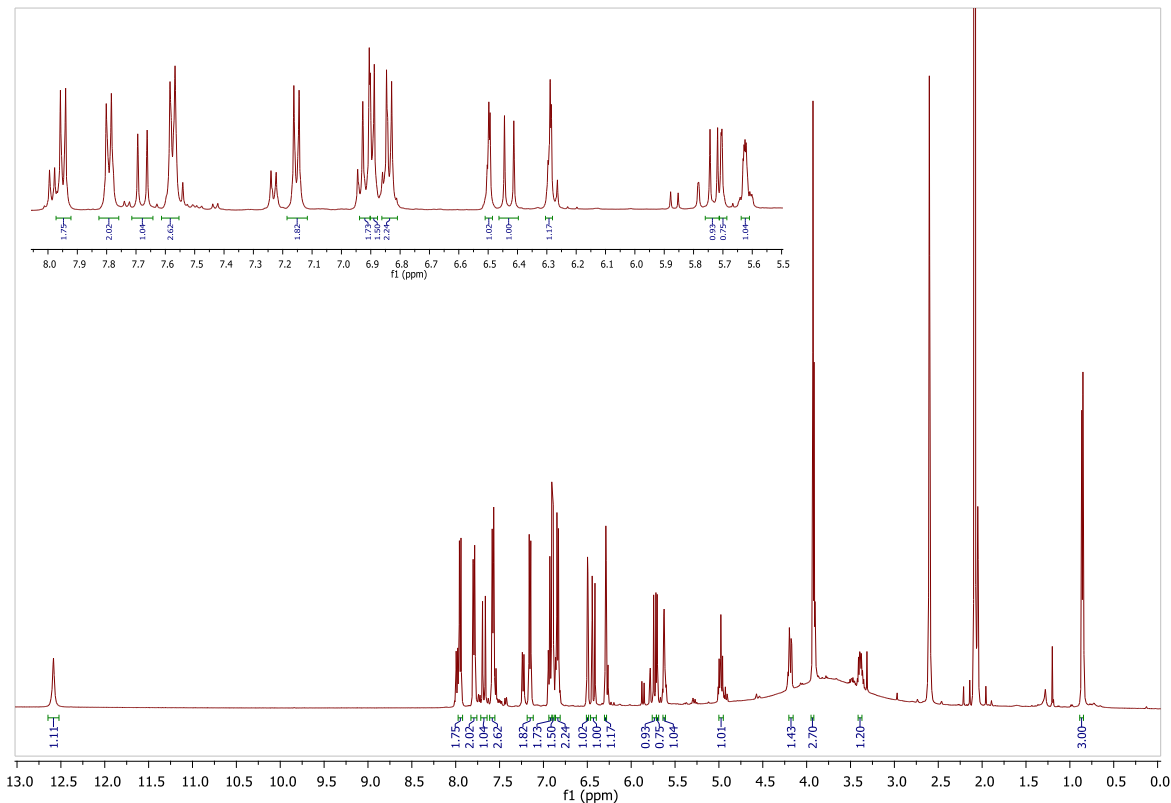


Figura 2-14: Espectro RMN ^1H para el compuesto **HPc-9** (acetona- d_6 , 500 MHz)



El espectro de HMBC nos permite confirmar la posición de estos sustituyentes al observarse la correlación en el compuesto **HPc8** entre el protón en δ 5.60 (H2'') y el carbono δ 165.9 (C9''') y el protón en δ 4.93 (H2'') con la señal en δ 166.9 (C9''') (Figura 2-15). De igual forma para **HPc9** se identifica la correlación entre los protones δ 5.63 (H2'') y δ 4.98 (H4'') con los carbonos carbonílicos en δ 166.8 (C9''') y δ 166.2 (C9''') respectivamente (Figura 2-16).

Figura 2-15: Espectro HMBC para el compuesto **HPc-8** (acetona- d_6 , 500 MHz)

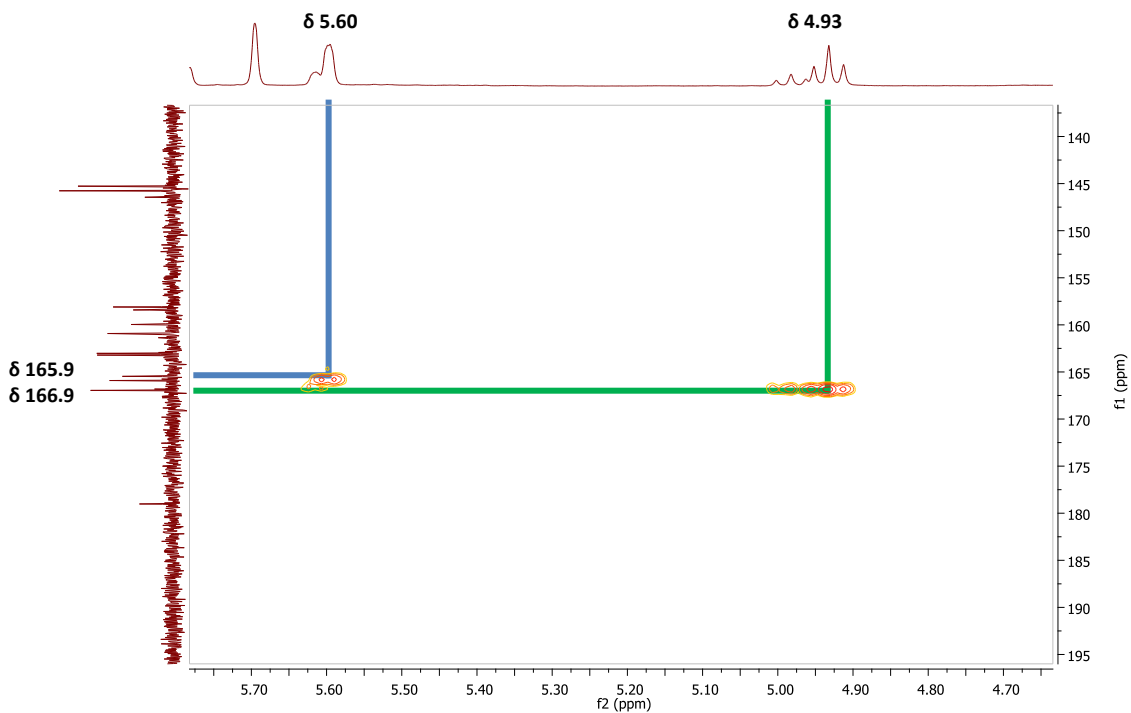
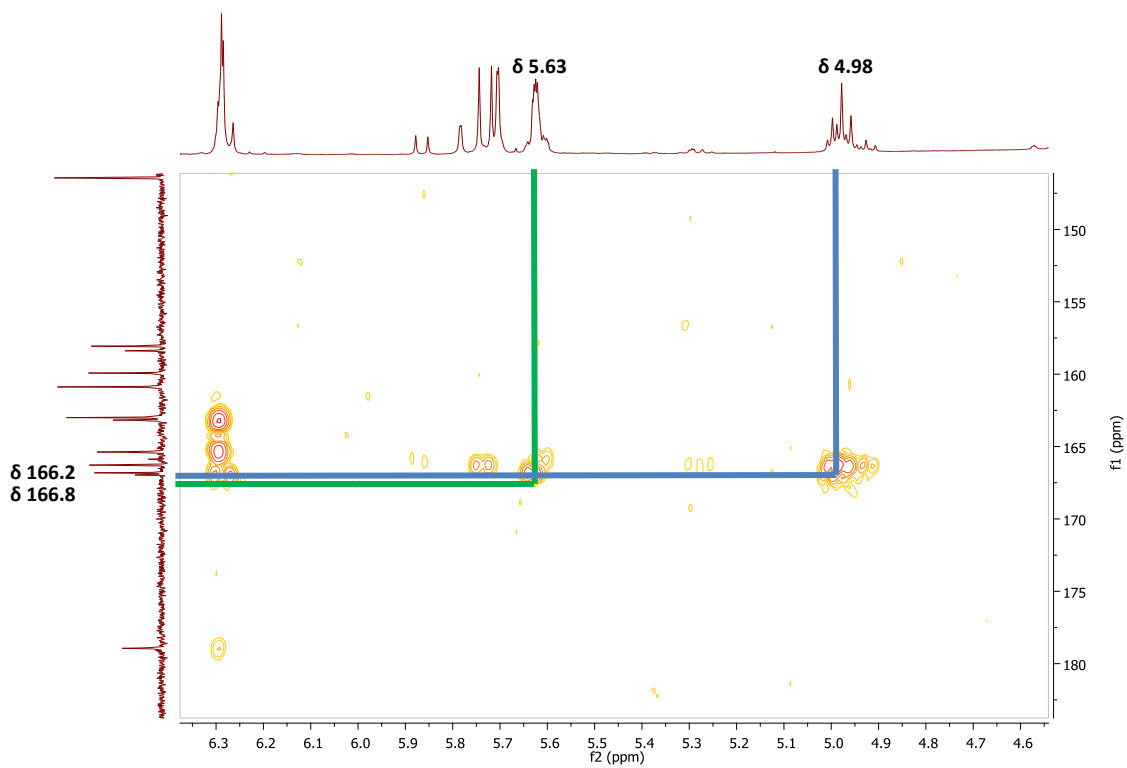


Figura 2-16: Espectro HMBC para el compuesto **HPc-9** (acetona- d_6 , 500 MHz)



En **HPc8** los protones olefínicos en δ 6.90 (1H, d, 12.8, H7''), δ 5.86 (1H, d, 12.8, H8'') y 7.55 (1H, d, 16.0, H7''') 6.26 (1H, d, 16.0, H8''') con valores de $J=$ 12.8 Hz y 16.0 Hz (Tabla 2-1) (Figura 2-13) permite establecer que las unidades de *p*-coumaril exhiben isomería cis y trans respectivamente. Para **HPc9** los dos pares de protones en δ 7.68 (1H, d, 15.9, H7''), δ 6.43 (1H, d, 15.9, H8'') y δ 6.91 (1H, d, 12.8, H7'''), δ 5.73 (1H, d, 12.8, H8''') (Tabla 2-1) (Figura 2-14) presentan isomería trans y cis respectivamente.

La fórmula molecular de **HPc8** y **HPc9** fue establecida como $C_{40}H_{34}O_{14}$ a partir del análisis de EMAR-ESI-TOF (**HPc8** [M-H] m/z 737.1907 [M-H]; calculado para $C_{40}H_{33}O_{14}$ 737.1870); (**HPc9** [M-H] m/z 737.1876 [M-H]; calculado para $C_{40}H_{33}O_{14}$ 737.1870). Con los datos espectroscópicos, EM obtenidos y apoyados en los datos bibliográficos (Wang et al., 2007), se puede establecer que **HPc8** corresponde al 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-*Z*-*p*-coumaril,4''-*E*-*p*-coumaril)- α -L-ramnopiranosido (caerulina C) y el compuesto **HPc9** al 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-*E*-*p*-coumaril,4''-*Z*-*p*-coumaril)- α -L-ramnopiranosido (caerulina D).

Los espectros de RMN 1H de **HPc7** y **HPc10** permite sugerir que las unidades de *p*-coumaril se encuentran enlazadas en los C3'' y C4'' de la ramnosa debido a la presencia a campo bajo de los protones δ 5.38 (1H, dd, 2.9, 9.9, H3''), δ 5.28 (1H, d, 9.9, H4'') para **HPc7** y δ 5.37 (1H, dd, 2.9, 10.1, H3''), δ 5.23 (1H, t, 10.1, H4'') para **HPc10** (Tabla 2-1) (Figura 2-17) (Figura 2-18).

Figura 2-17: Espectro RMN ^1H para el compuesto **HPc-7** (acetona- d_6 , 500 MHz)

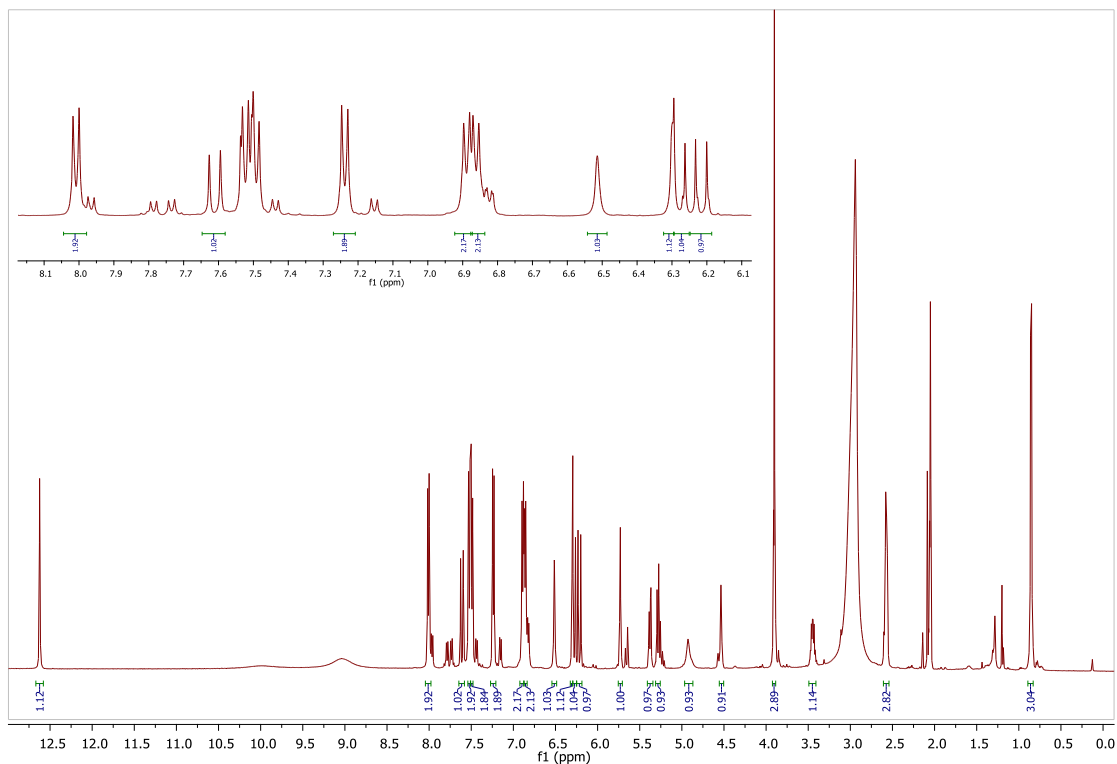
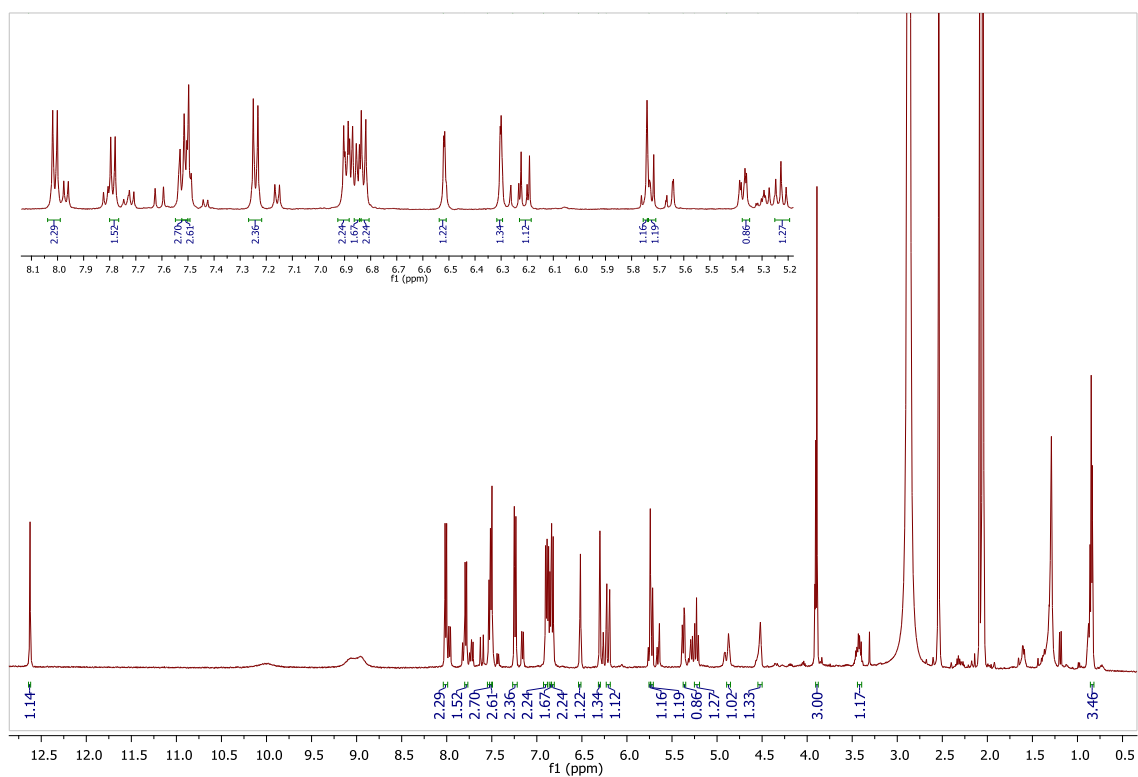


Figura 2-18: Espectro RMN ^1H para el compuesto **HPc-10** (acetona- d_6 , 500 MHz)



La posición de los sustituyentes es confirmada mediante el espectro HMBC donde se observa las correlaciones entre los protones metínicos de la ramnosa y los carbonos carbonílicos de los *p*-coumaril. En el compuesto **HPc7** se presenta correlación entre los protones δ 5.38 (H3'') y δ 5.28 (H4'') con los carbonos en δ 166.96 (C9''') y δ 166.61 (C9''') (Figura 2-19) y para el compuesto **HPc10** se observa la correlación entre δ 5.37 (H3'') y δ 5.23 con los carbonos en δ 166.69 (C9''') y δ 166.32 (C9''') respectivamente (Figura 2-20).

Figura 2-19: Espectro HMBC para el compuesto **HPc-7** (acetona- d_6 , 500 MHz)

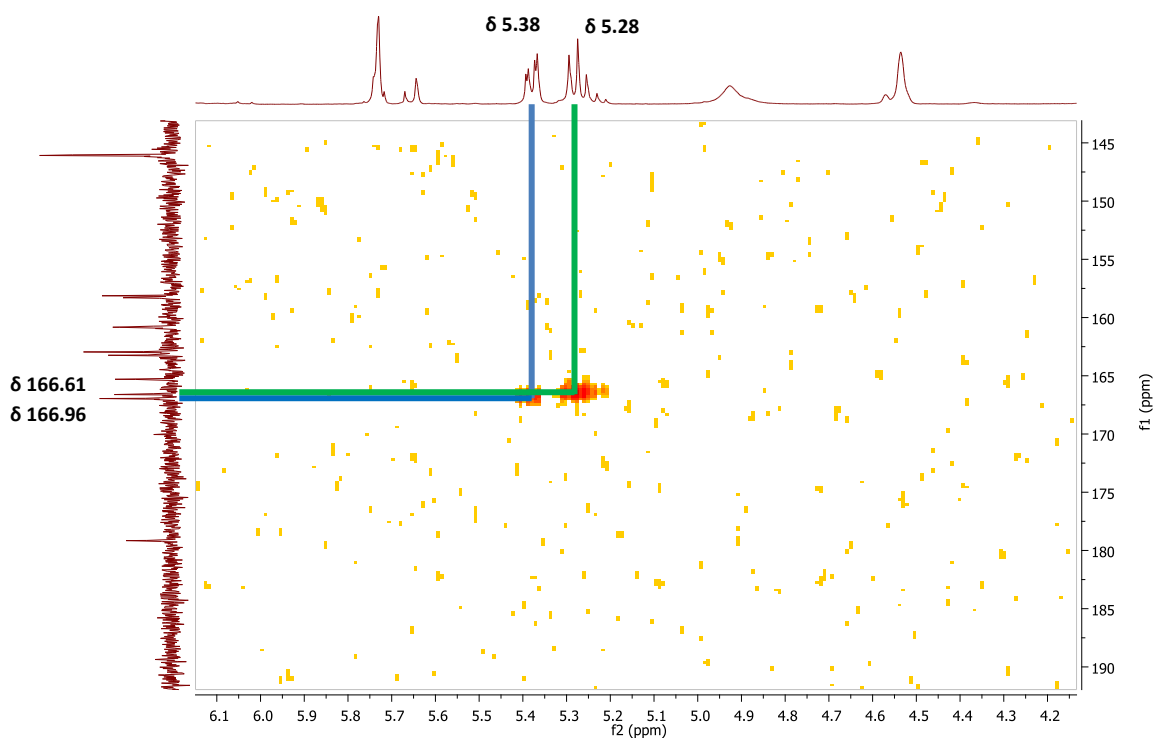
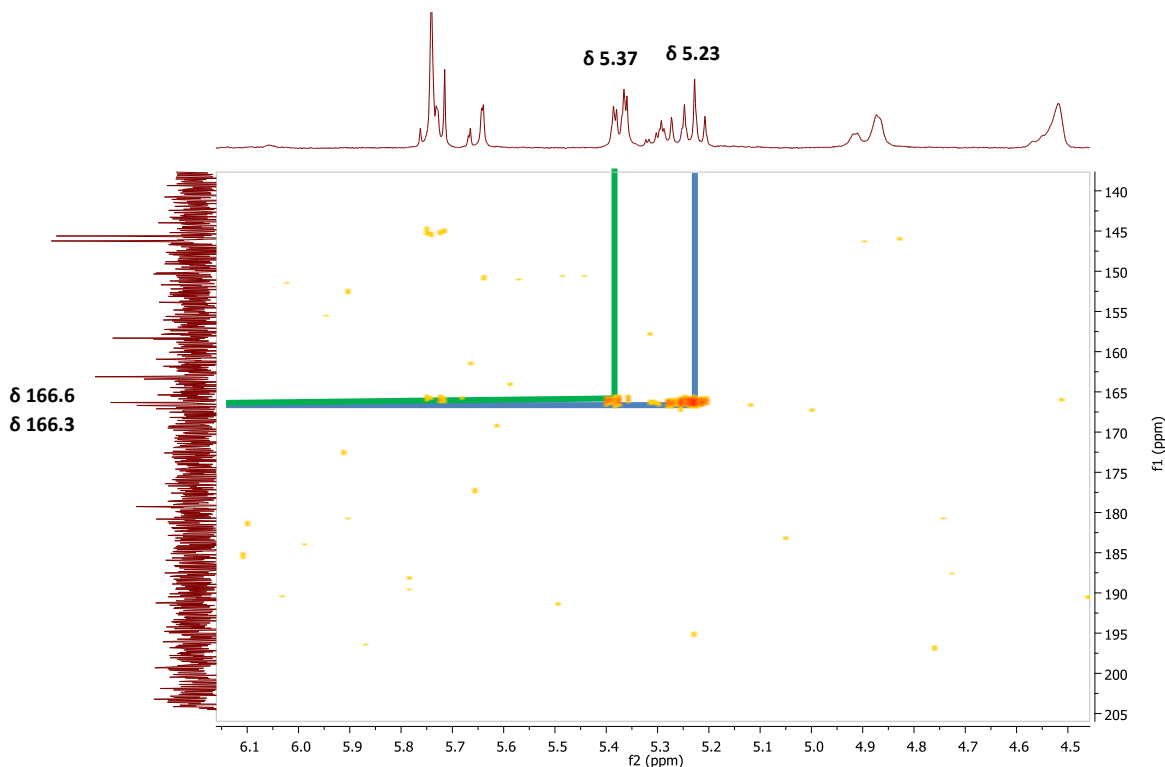


Figura 2-20: Espectro HMBC para el compuesto **HPc-10** (acetona- d_6 , 500 MHz)



Los valores de $J=15.9$ Hz y $J=16.0$ Hz de los protones olefínicos en δ 7.61 (1H, d, 15.9), δ 6.28 (1H, d, 15.9) y δ 7.52 (1H, d, 16.0), δ 6.22 (1H, d, 16.0) (Tabla 2-1) para el compuesto **HPc8** permite identificarlo con isomería trans, mientras que **HPc10** con los protones en δ 6.87 (1H, d, 12.8), δ 5.72 (1H, d, 12.8) y δ 7.52 (1H, d, 15.9), δ 6.21 (1H, d, 15.9) (Tabla 2-1) establecen isomería cis y trans en cada unidad *p*-coumaril.

Para los compuestos **HPc7** y **HPc10** la fórmula molecular fue establecida como $C_{40}H_{34}O_{14}$ a partir del análisis de EMAR-ESI-TOF (**HPc7** [M-H] m/z 737.1891 [M-H]; calculado para $C_{40}H_{33}O_{14}$ 737.1870); (**HPc10** [M-H] m/z 737.1876 [M-H]; calculado para $C_{40}H_{33}O_{14}$ 737.1870). Con la información obtenida de los espectros de RMN 1H , RMN ^{13}C , uni- y bidimensional, EM y apoyados en los datos bibliográficos (Wang et al., 2007), se puede establecer que el compuesto **HPc7** corresponde 4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-*E*-*p*-cumaril-4''-*E*-*p*-cumaril)- α -L-ramnopiranosido y **HPc10** a 4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-*Z*-*p*-cumaril-4''-*E*-*p*-cumaril)- α -L-ramnopiranosido.

2.3.1.2 Experimento DOSY con matriz asistida de los compuestos HPc16 y Hpc17

Hoy en día RMN es una de las herramientas más importante en la elucidación estructural de un compuesto, y como complemento de ello, la espectroscopia de difusión (DOSY) se ha ido consolidando como una alternativa en el análisis de mezclas (Antalek et al., 2002; Cassani et al., 2012). Sin embargo, cuando los coeficientes de difusión son muy similares o los espectros a analizar se encuentran muy solapados, DOSY presenta algunos inconvenientes en su resolución. Recientemente se ha demostrado que la realización de DOSY adicionando una matriz, con la cual los analitos actúan diferencialmente puede ayudar a la resolución de señales de compuestos similares que de otro modo exhibirían el mismo comportamiento de difusión. En un experimento DOSY asistido con matriz (MAD), la interacción de los analitos con la matriz modula los coeficientes de difusión, debido a que cada componente de la mezcla interactúa con la matriz en distinto grado. La velocidad efectiva de difusión de cada molécula en esta condición puede diferir considerablemente de su valor en solución y por lo tanto el objetivo es la diferenciación de la señal y no la cuantificación del valor de difusión (D).

El incremento en la resolución de los espectros de DOSY mediante la adición de micelas se logró por primera vez por Morris y colaboradores (Morris et al., 1994). Adicional a ello, un trabajo enfocado en compuestos fenólicos fue desarrollado por Cassani, quienes describieron por primera vez una metodología eficiente para el análisis por RMN de flavonoides usando SDS para separar las señales de RMN de compuestos de tamaño similar como fisetina, (+) - catequina y quercetina (Cassani et al., 2012). Este método también se ha extendido a técnicas de RMN de estado sólido, donde se ha utilizado el gel de sílice para obtener espectros bien separados y de alta resolución para los componentes individuales (Viel et al., 2003).

En los últimos años, se ha demostrado que las micelas en los experimentos MAD se pueden utilizar como agentes de separación para distinguir entre los isómeros de

dihidroxibenceno, catecol, resorcinol e hidroquinona, metoxifenol y también en la diferenciación de los alcoholes de longitud de cadena media (Evans et al., 2009; Tormena et al., 2010). Se han empleado otros agentes, tales como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol y gel de sílice, encontrándose este último resultado satisfactoriamente (Kavakka et al., 2010). Versiones quirales también se han logrado mediante el uso de ciclodextrinas, que han permitido la resolución de una mezcla de dos epímeros. Más recientemente, Nilson y colaboradores han presentado el uso de tensioactivos no iónicos en disolventes mixtos para el análisis de DOSY de mezclas relevantes para productos naturales (Nilson et al., 2014).

Inspirado en la investigación de Cassani, se planteó la necesidad de conocer los vínculos de dos glucósidos de flavonoides con micelas de SDS (dodecil sulfato sódico) en la mezcla de disolventes binarios agua-DMSO, tratando de comprender las interacciones que permitan la separación de sus señales de RMN eficientemente a través del uso de metodologías PGSE y DOSY. Este es el primer trabajo en que se desarrolla el experimento DOSY con matrix asistida (MAD) en una mezcla de flavonoides glicosidados obtenidos a partir de un extracto de origen natural.

Aunque la caracterización de ambos compuestos en la mezcla fue posible gracias a las técnicas de RMN, nos interesó el estudio de sus propiedades de difusión a través del PGSE y DOSY debido a la importancia que ha venido desarrollando estas técnicas en la resolución de mezclas complejas.

Las gráficas de RMN de PGSE y los espectros de DOSY (Figura 2-13) de la mezcla de los glucósidos **HPc16** y **HPc17** en acetona- d_6 a temperatura ambiente mostraron, como se esperaba, que sus coeficientes de difusión (y por lo tanto sus radios hidrodinámicos) eran muy similares lo que dificulta su proceso de separación y por ende, sugiere la necesidad de aplicar un experimento de matrix asistida, MAD.

La adición de SDS a la mezcla de compuestos cambió completamente la situación. Se realizaron varios experimentos de difusión utilizando SDS de 25 a 180 mM, y se demostró debido a las diferentes interacciones de los metabolitos con las micelas, que la diferencia en el coeficiente de difusión entre **HPc16** y **HPc17** se hace más evidente, siendo esta diferencia más pronunciada a medida que aumenta la concentración de SDS en la mezcla (Tabla 2-2).

En la solución de acetona (Figura 2-21) los dos flavonoles tienen casi el mismo coeficiente de difusión ($11,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) con pequeñas diferencias en sus radios hidrodinámicos (aproximadamente $-0,04 \text{ \AA}$). En el caso de la mezcla de disolventes binarios a base de DMSO- d_6 /D₂O (20% v / v) la situación es bastante similar con un coeficiente de difusión casi equivalente de $1,0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Curiosamente, en este medio disolvente prótico, la diferencia de radios hidrodinámicos se incrementa ligeramente (aproximadamente $0,3 \text{ \AA}$) y el tamaño total de los flavonoides es significativamente mayor, probablemente debido a alguna interacción de puente de hidrógeno con el disolvente, en paralelo con una agregación inducida por este en la mezcla binaria DMSO- d_6 /D₂O.

Figura 2-21: (a) Comportamiento lineal de Stejskal-Tanner de los datos de PGSE RMN para **HPc16 (1)** y **HPc17 (2)** tanto en acetona- d_6 como en una mezcla binaria de DMSO- d_6 /D $_2$ O (20% v / v). b) Espectro ^1H DOSY (500 MHz) de la mezcla de los flavonoides en DMSO- d_6 /D $_2$ O (20% v / v) sin micelas de SDS a temperatura ambiente

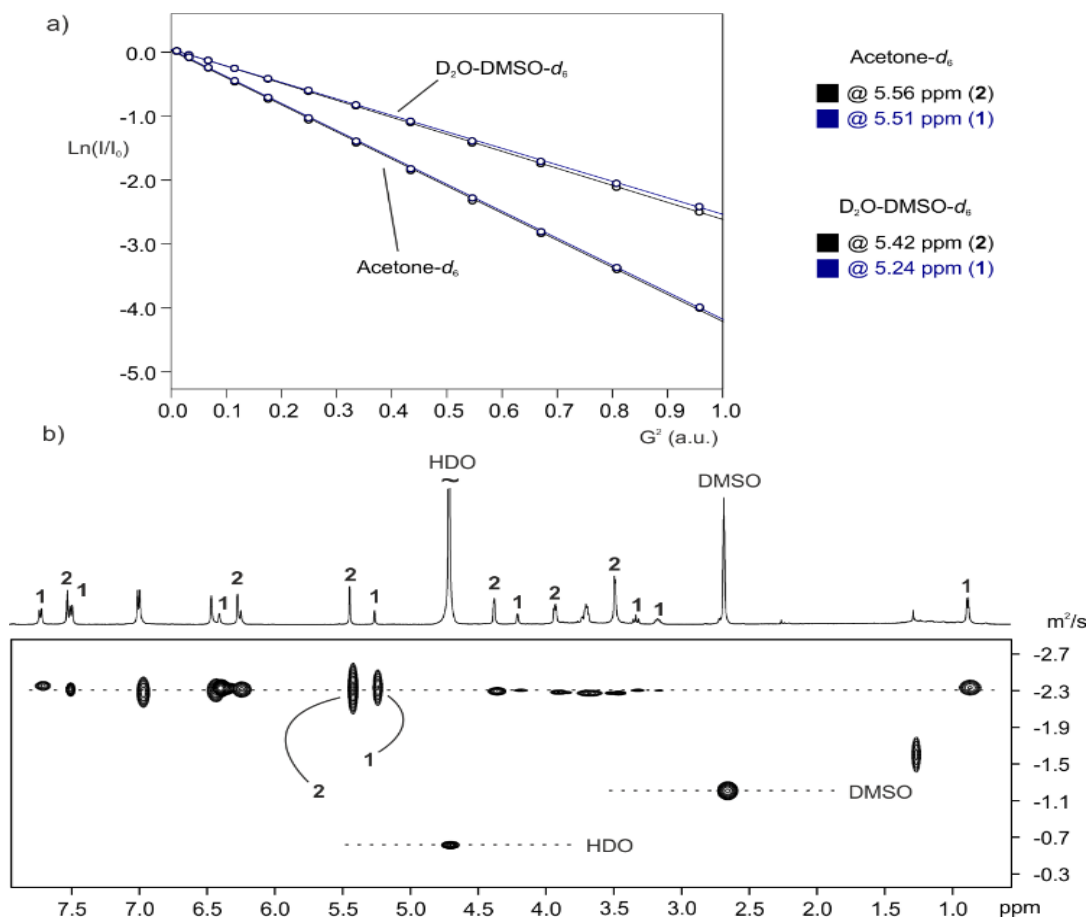


Tabla 2-2: Coeficiente de Difusión (D) y valores de radio hidrodinámico Stokes-Einstein (r_H) para los compuestos **HPc16** y **HPc17** a temperatura ambiente (K) En función de la concentración de SDS.

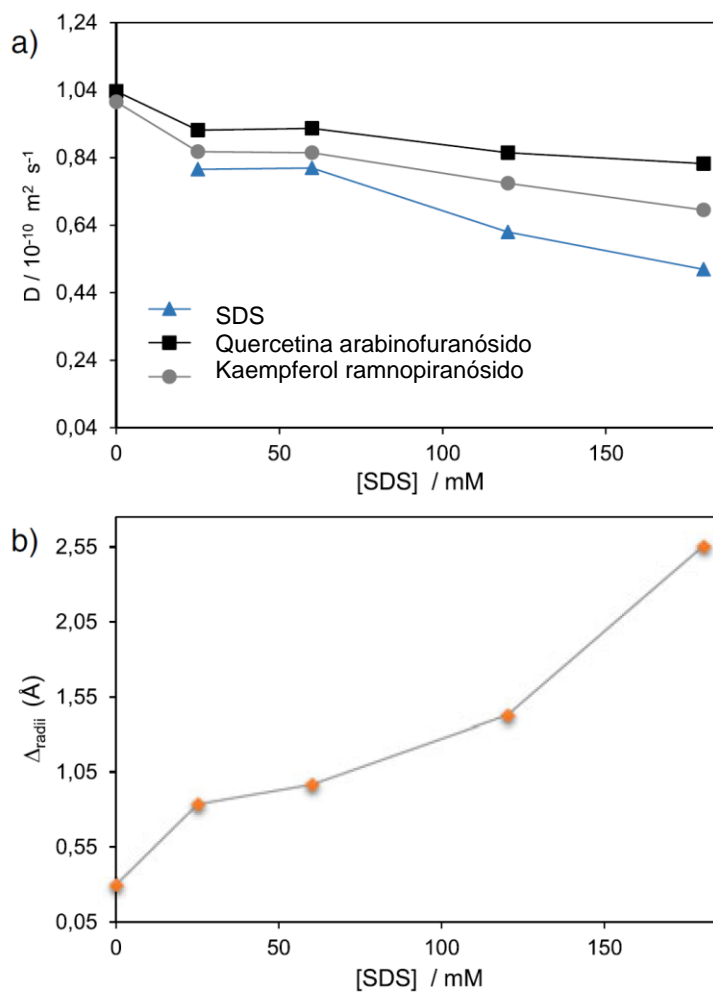
SDS(mM)	Compuestos	$D \times 10^{10}(\text{m}^2 \text{s}^{-1})^{[a]}$	ΔD	$r_H (\text{Å})^{[b]}$	Δr_H
–	HPc16 ^[c]	11.131	-0.0057	6.23	-0.04
	HPc17 ^[c]	11.074		6.27	
	HPc16 ^[d]	1.005	0.00313	10.34	0.3
	HPc17 ^[e]	1.036		10.04	
	HDO ^[f]	6.915		1.50	
	DMSO ^[g]	3.703		2.81	
25	HPc16	0.8578	0.00633	12.13	0.84
	HPc17	0.9211		11.29	
	SDS	0.8055		12.9	
60	HPc16	0.8544	0.00723	12.18	0.97
	HPc17	0.9267		11.21	
	SDS	0.8095		12.90	
120	HPc16	0.7644	0.00902	13.61	1.43
	HPc17	0.8546		12.18	
	SDS	0.6200		16.80	
180	HPc16	0.6849	0.01377	15.20	2.56
	HPc17	0.8226		12.64	
	SDS	0.5095		20.40	
	HDO ^[f]	6.742		1.54	
	DMSO ^[g]	3.607		2.88	

[a] El error experimental en los valores de D es ± 2 %. [b] Los valores de viscosidad corresponden a 0.3147 y $0.2077 \cdot 10^{-3} \text{ Kg s}^{-1} \text{ m}^{-1}$ acetona y dimetilsulfóxido, respectivamente. [c] En acetona- d_6 . [d] Señal fue monitoreada en ^1H 5.24 ppm. [e] Señal fue monitoreada en ^1H 5.42 ppm. [f] Señal fue monitoreada en ^1H 4.71 ppm. [g] Señal fue monitoreada en ^1H 2.67 ppm.

La **Figura 2-22** ilustra la variación de los coeficientes de difusión y la diferencia de los radios hidrodinámicos en función de la concentración de SDS. El aumento en la concentración de SDS conduce a una disminución significativa en el coeficiente de difusión para todas las especies presentes.

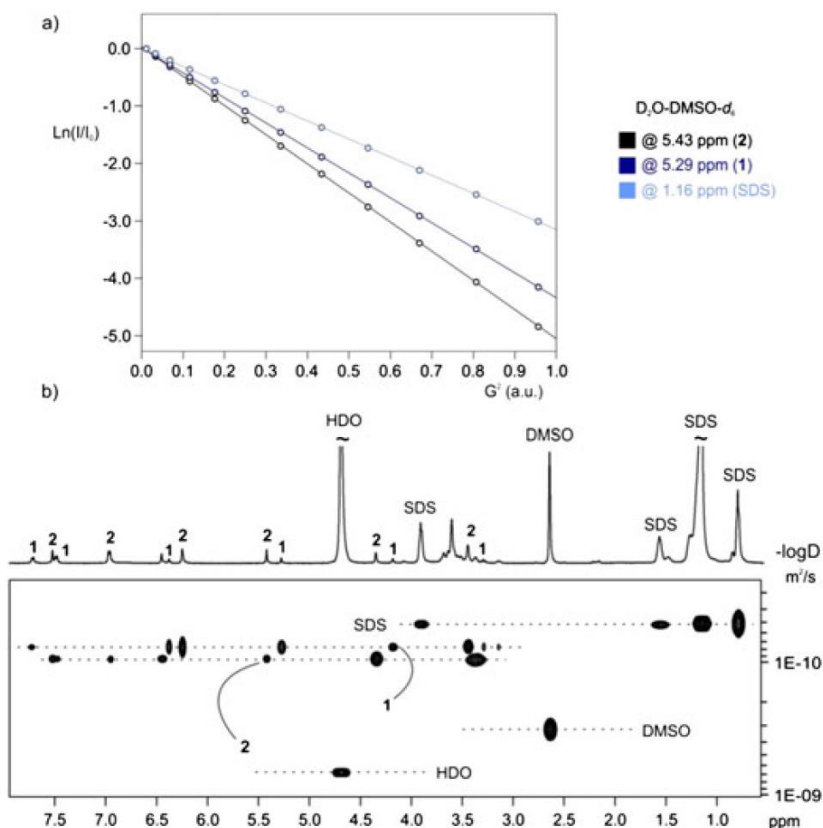
Los valores muy semejantes obtenidos de D para DMSO y H₂O en muestras con y sin SDS (**Tabla 2-2**) permite validar las medidas realizadas bajo diferentes condiciones y por lo tanto, explicar qué el incremento en el tamaño se debe a interacciones reales con la micela y no se atribuye a un cambio en la viscosidad.

Figura 2-22: a) Coeficientes de difusión en función de la concentración de dodecil sulfato sódico (SDS) en solución de DMSO- d_6 -D₂O (20% v / v) que contiene los compuestos **HPc16** y **HPc17** en proporción 0.4:1.0, respectivamente. (b) Diferencia de los radios hidrodinámicos (Δr_H) entre **HPc16** y **HPc17** en función de la concentración de SDS.



Como era de esperar, el ΔrH máximo entre **HPc16** y **HPc17** (Figura 2-14b) fue alcanzado cuando la concentración de SDS se mantuvo por encima CMC, es decir, a una concentración de 180 mM. La asociación más fuerte (el coeficiente de difusión más bajo) se observa para kaempferol ramnopiranosido **HPc16**, mientras que el más débil se observa para la quercetina arabinofuranósido **HPc17**. Es interesante conocer, que los valores de difusión de **HPc16** y **HPc17** en presencia de SDS a 180 mM (Tabla 2-2) son completamente comparables con el valor D de la micela de SDS, demostrando la formación de los agregados isotrópicos entre **HPc16** ó **HPc17** y el surfactante.

Figura 2-23: a) Comportamiento lineal de Stejskal-Tanner de los datos de PGSE y b) Espectro 1H DOSY (500 MHz) de la mezcla de los flavonoides y micelas de SDS a 180 mM en una mezcla binaria DMSO- d_6 /D $_2$ O (20% v / v).



Los glicósidos **HPc16** y **HPc17** interactúan diferencialmente con las micelas y, como resultado, exhiben diferentes coeficientes de difusión ($0,68 \times 10^{-10}$ y $0,82 \times 10^{-10} m^2 s^{-1}$

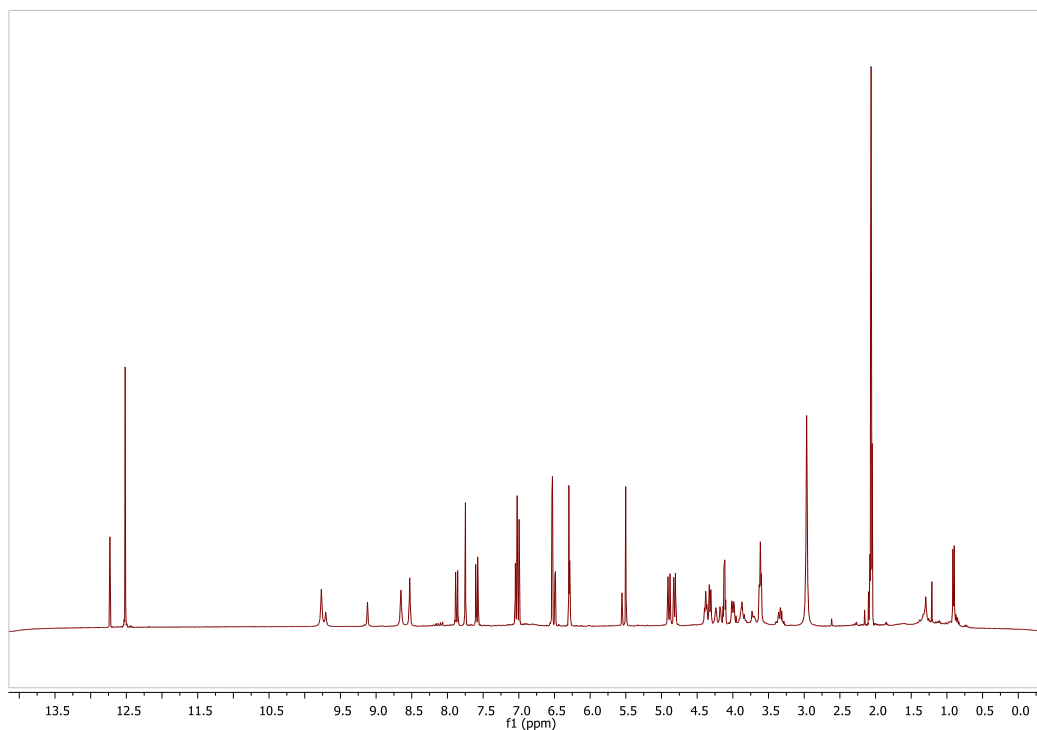
para **HPc16** y **HPc17**, respectivamente) (Figura 2-23). Aunque existe una cierta superposición de señales entre los compuestos, están suficientemente bien resueltos en presencia de SDS para permitir una caracterización adecuada.

El hecho de que la adición de surfactante conduce a la resolución DOSY tiene un significado importante, pero también es un elemento atrayente que motiva a especular sobre el posible mecanismo de interacción. Se plantea que las especies permanecen en intercambio rápido, como es común para las soluciones micelares, con un equilibrio entre estados libres y asociados. Un modelo simple para un sistema acuoso sería la incorporación de los solutos en el núcleo micelar, para lo cual la partición del flavonoide entre estados libres y ligados dependerá de la hidrofobicidad. Sin embargo, la presencia de los grupos hidroxilos en los compuestos (**HPc16** y **HPc17**) dispuestos en un medio prótico, sugieren que esto sea en el mejor de los casos una explicación parcial, y otros factores tales como las interacciones de enlace de hidrógeno en la interfase de núcleo de micela / grupo de cabeza, podrían mejorar o debilitar la unión de estos metabolitos a las micelas.

Los compuestos **HPc16** y **HPc17** se caracterizaron estructuralmente por RMN, EM de alta resolución y EM/EM. El compuesto **HPc16** presentó señales características de protones aromáticos a δH 7.86 y 7.02 ppm para H2' y H3' y señales de doblete a δH 6.27 ($J = 2.1$ Hz) y δH 6.49 ppm ($J = 2.1$ Hz) para H6 y H8, respectivamente. En el espectro de RMN 1H , un doblete a δH 0,90 ppm ($J = 5,9$ Hz) indicó la presencia de protones de grupo metilo del azúcar ramnosa y la señal a δH 5,54 ppm ($J = 1,4$ Hz) es característica del protón anomérico. En el espectro de RMN ^{13}C , **HPc16** muestra la presencia de una señal a δC 135,7 ppm, que coincidió con la glicosilación en la posición C3 y, por tanto, confirmó la presencia de un azúcar en la molécula. La señal de carbono anomérico se observó a δC 102,6 ppm, mientras que el resto de carbonos del azúcar aparecen entre δC 71,5-73 ppm.

Para el compuesto **HPc17**, El espectro de RMN ^1H mostró señales característica del flavonol quercetina, con tres protones aromáticos a δH 7,74 (d, $J = 2,1$ Hz), 7,57 (dd, $J = 8,4, 2,1$ Hz) y 7,00 ppm (d, $J = 8,4$ Hz) , que se observaron como un sistema ABX y dos señales acopladas en la región aromática a δH 6.28 (d, $J = 2.1$, H-6) y 6.52 ppm (d, $J = 2.1$, H-8) correspondiente a la sustitución 5, 7 - dihidroxi. El protón anomérico a δH 5,49 ppm junto con protones a δH 3,60 (t, $J = 4,2$ Hz), 3,99 (ddd, $J = 8,4, 3,8, 1,7$ Hz), 4,11 (c, $J = 3,7$ Hz) y 4,31 ppm (dd, $J = 7,0, 1,6$ Hz) indican la presencia del azúcar arabinofuranósido. La multiplicidad del protón anomérico y el análisis de los datos de RMN ^{13}C además de las correlaciones NOESY entre el protón anomérico H-A1 y H-2 'y H-6' indicaron de nuevo el enlace en C3 de la aglicona.

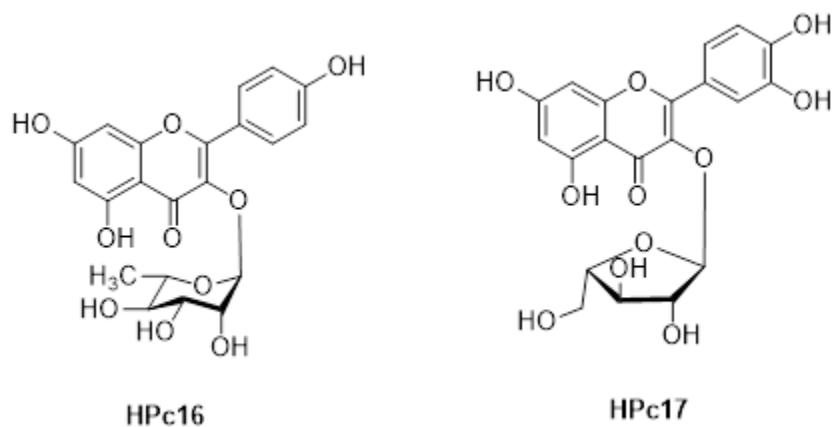
Figura 2-24: “Espectro RMN ^1H para el compuesto **HPc-16** y **HPc-17**(acetona- d_6 , 400 MHz).



Con respecto al análisis CL-EM de los glicósidos; el espectro de masa ESI-TOF (modo negativo) de **HPc16** mostró un ion pseudo-molecular de m/z 431.0990 $[\text{M-H}]^-$ correspondiente a la fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$ y también el ion de m/z 284,7, correspondiente a la aglicona, corroborando con ello la asignación de RMN para kaempferol-3-O- α -L-

ramnopiranosido. Para el compuesto **HPc17**, el espectro de masa ESI-TOF mostró un ion pseudo-molecular $[M-H]^-$ de m/z 433,0781, correspondiente a la fórmula $C_{20}H_{17}O_{11}$ y un pico de m/z 300,7 confirmando la asignación para la molécula quercetina-3-O- α -L-arabinofuranósido.

Figura 2-25: Estructura de kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosido (**HPc16**) y quercetina-3-O- α -L-arabinofuranósido (**HPc17**)



2.4 Conclusiones

- El estudio fitoquímico desarrollado en las hojas de *P. caerulea* permitió el aislamiento de cinco nuevos flavonoles acilados denominados caerulina A-E, HPc6-HPc10 y de doce compuestos conocidos correspondientes a seis flavonoles glicosidados, tres esteroides, dos cumarinas, un flavonol, de los cuales once de ellos son reportados por primera vez para la especie y dos para el género, contribuyendo de esta forma a las investigaciones químicas en la familia Lauraceae.
- La investigación fitoquímica llevada a cabo en la corteza de *P. caerulea* condujo al aislamiento de cuatro compuestos conocidos entre los que se encuentran un flavanol, un esteroide, una naftoquinona y una cumarina. Tres de los metabolitos son reportados por primera vez para la especie; la naftoquinona es el primer reporte para la familia Lauraceae.
- El trabajo fitoquímico desarrollado en la madera de *P. caerulea* permitió el aislamiento de cuatro compuestos conocidos, dos flavonoles, un lignano y un glicósido todos ellos reportados por primera vez para la especie y el género *Persea*, aportando información quimiotaxonómica importante para la Familia Lauraceae.
- El uso de metodologías PGSE y DOSY empleadas sobre una mezcla de dos flavonoles glicosidado y asistida por una matriz (micelas de SDS), permitió que las moléculas interactuaran diferencialmente con las micelas y como resultado de ello, presentaran diferentes coeficientes de difusión. Aunque existe una cierta superposición de señales entre los compuestos, están suficientemente bien resueltos en presencia de SDS para permitir una caracterización adecuada.

3. Estudio Químico Comparativo de la especie *P. caerulea*

3.1 Generalidades

Diversos organismos tienen la capacidad de generar en su proceso de desarrollo una serie de compuestos denominados metabolitos secundarios. Estas sustancias químicas que se presentan en plantas, animales y hongos entre otros, aportan información relevante de las características propias de una especie o grupo taxonómico en particular (Wink, 2003). La información fitoquímica de un organismo vegetal, es decir, el tipo y contenido de metabolitos secundarios, puede estar determinada por una serie de factores de tipo extrínsecos como también intrínsecos (Gnavi et al., 2010). Los primeros corresponden principalmente a los denominados factores ambientales (luz solar, temperatura, humedad, entre otros) y los segundos están directamente relacionados con aquellos factores que son particulares para cada organismo y son propios de sus procesos metabólicos (características fisiológicas, morfológicas, genéticas, entre otras). Existen muchos estudios que señalan la variabilidad en la producción de metabolitos secundarios mediados por este tipo de factores (Nheme et al., 2008; Gnavi et al., 2010; Smith et al., 2010; Costa et al., 2009; Hanitriainaina et al., 2006). Ahora no solo los factores físicos y químicos influyen en este proceso sino también las diversas interacciones bióticas que se establecen entre los organismos que se desarrollan en torno a una especie vegetal, por ejemplo, algunos de los metabolitos secundarios en una planta son producidos como mecanismo de defensa o protección frente a patógenos (hongos o insectos) (Harborne et al., 2001; Wink, 2003; Nheme et al., 2008). Lo anterior permite concluir que es relevante tener en cuenta los diversos cambios en la composición química que pueda presentar un organismo vegetal debido a las condiciones en que este se desarrolla en un área o región determinada, ya que ello podría permitir la identificación de formas polimórficas dentro de las especies

(quimiotipos) que ayudaría a comprender la distribución, origen y los mecanismos de interacción entre estos quimiotipos así como la co-evolución con otras especies (Nheme et al., 2008).

Un estudio de este tipo que involucra diversos factores en un individuo o especie en particular, se puede llevar a cabo mediante un análisis metabólico (Patti, Yanes *et al.* 2012), el cual a su vez requiere de la implementación de diversas plataformas analíticas (CL, CG o, en algunas aplicaciones, CE) acopladas a diferentes sistemas de detección (DAD, EM) y el acompañamiento de herramientas estadísticas que permita relacionar varios parámetros cuantitativos y establecer interacciones entre las variables analizadas por medio de matrices de correlación (Díaz Monroy y Morales Rivera 2012), análisis jerárquico y de mínimos cuadrados parciales como métodos quimiométricos de reducción de datos (Dunn y Ellis 2005, Griffiths 2008). Los modelos creados a partir de variables de interés ya sean cualitativas o cuantitativas ayudan en la caracterización de extractos y permiten hacer una discriminación inicial de los mismos ya sea respecto al lugar de recolección, la especie, o la parte de la planta evaluada, que permita establecer en una muestra desconocida información referente a estas características.

En este capítulo se llevó a cabo el análisis químico comparativo de extractos y aceites esenciales de la especie *P. caerulea* colectados en tres regiones de Colombia empleando para ello CL-DAD-EM/CG-EM.

3.2 Metodología

3.2.1 Estudio Químico Comparativo de Extractos Etanólicos de Hojas, Corteza y Madera de *P. caerulea*

- **Recolección e Identificación del Material Vegetal**

La muestra vegetal de hojas, corteza y madera de la especie *P. caerulea* fueron colectadas en la región Caribe y Andina de Colombia (Figura 3-1). En la región Caribe el material

vegetal fue colectado en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta en jurisdicción del municipio de San Pedro de la Sierra (S) (1360 m.s.n.m.) (10°54'0" N de latitud, 74°3'0" W de longitud) y en la población de Bonda (B) (320 m.s.n.m.) corregimiento de la ciudad de Santa Marta, departamento del Magdalena (Figura 3-2). En la región Andina las muestras vegetales se colectaron en la población de La Vega (V) (1180 m.s.n.m.), municipio del departamento de Cundinamarca (Figura 3-3). El muestreo se llevó a cabo en el mismo periodo del año y hora del día para evitar efectos estacionales y circadianos, las muestras fueron colectadas en el mes de abril de 2010 entre las 9:00 y las 14:00. La distancia aproximada entre las poblaciones son: S y B 80 Km. S y V 900 Km. Se colectaron un total de veinte individuos distribuidos en: ocho organismos en S, cinco organismos en B y siete organismos en V (Tabla 3-1). El vegetal fue colectado por el Magister Juan Manuel Álvarez Caballero e identificado por el botánico Adolfo Jara Muñoz y un ejemplar de cada espécimen se encuentra depositado en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia con los números de colección COL556718-COL556738.

Tabla 3-1. Localización de las muestras colectadas de *P. caerulea*

Región	Localidad	Especimen	Latitud	Longitud
Caribe	San Pedro de la Sierra	1	10°54'21.12"N	74° 2'45.67"O
Caribe	San Pedro de la Sierra	2	10°54'16.65"N	74° 2'45.14"O
Caribe	San Pedro de la Sierra	3	10°52'3.58"N	74° 1'51.68"O
Caribe	San Pedro de la Sierra	4	10°53'58.61"N	74° 1'53.62"O
Caribe	San Pedro de la Sierra	5	10°53'51.73"N	74° 1'54.11"O
Caribe	San Pedro de la Sierra	6	10°53'43.12"N	74° 1'54.70"O
Caribe	San Pedro de la Sierra	7	10°53'34.48"N	74° 1'55.24"O
Caribe	San Pedro de la Sierra	8	10°53'11.76"N	74° 1'59.71"O
Caribe	Bonda	9	11°14'33.66"N	74° 3'51.83"O
Caribe	Bonda	10	11°14'34.68"N	74° 3'51.76"O
Caribe	Bonda	11	11°14'35.89"N	74° 3'51.98"O
Caribe	Bonda	12	11°14'36.34"N	74° 3'52.67"O
Caribe	Bonda	13	11°14'36.89"N	74° 3'53.52"O
Andina	La Vega	14	5° 0'16.79"N	74°20'20.81"O
Andina	La Vega	15	5° 0'18.99"N	74°20'22.54"O
Andina	La Vega	16	5° 0'24.41"N	74°20'23.83"O
Andina	La Vega	17	5° 0'27.36"N	74°20'23.52"O
Andina	La Vega	18	5° 0'33.32"N	74°20'27.57"O
Andina	La Vega	19	5° 0'36.94"N	74°20'29.03"O
Andina	La Vega	20	5° 0'41.92"N	74°20'28.25"O

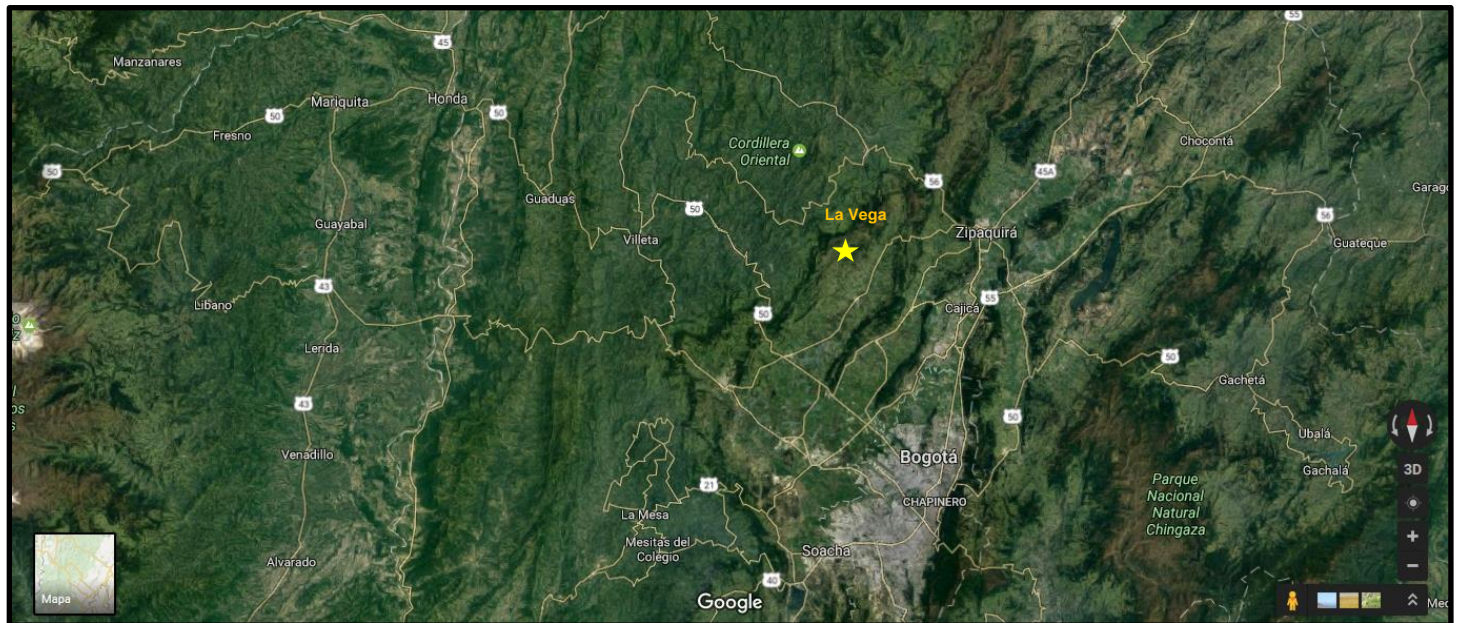
Figura 3-1. Distribución de individuos colectados de *P. caerulea*



Figura 3-2. Población de San Pedro de la Sierra (S) y Bonda (B) en la Región Caribe de Colombia (Magdalena)



Figura 3-3. Población de La Vega (V) en la Región Andina de Colombia (Cundinamarca)



▪ **Obtención y Preparación de los Extractos Etanólicos de *P. caerulea***

Las hojas, corteza y madera (20 g) secas y molidas de los 20 individuos colectados se sometieron a extracción por maceración empleando etanol al 96% a temperatura ambiente. El proceso se llevó a cabo durante 5 días empleando en cada extracción 300 mL de etanol y realizando control por CCD. El disolvente fue evaporado a presión reducida obteniéndose 2.2 g (hojas) 0.9 g (corteza) y 0.9 g (madera) de extracto y posteriormente refrigerado a 4°C. 1 mg de cada extracto crudo fue reconstituido en 1mL de MeOH y filtrado en una membrana de 5µm (Millipore, Bedford, MA, USA) antes de ser analizado por CL. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado.

Se prepararon muestras de control de calidad (QC) de cada extracto, a partir de muestras de cada zona geográfica (mezclando un volumen equivalente de cada extracto) con el propósito de evaluar la repetibilidad del método y asegurar durante las secuencias el correcto funcionamiento del sistema. La QC fue inyectada después de cada 10 análisis (después de un blanco) en cada secuencia.

▪ **Reactivos y Solventes**

Todos los solventes empleados fueron grado CL (ACN-ácido acético), el agua utilizada fue doblemente desionizada en un sistema Milli-Q con una conductividad de 18.2 MΩ. El etanol empleado en el proceso de extracción fue adquirido de Panreac (Barcelona, España) y el metanol para redissolver las muestras fue adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Para el análisis de los compuestos aislados se empleó la misma cantidad agregando metanol suficiente para contener en cada solución stocks 100 ppm de cada metabolito. Las soluciones stock, los solventes, las muestras y reactivos fueron filtrados en una membrana de 5 µm (Millipore, Bedford, MA, USA) antes de ser utilizados

- **Condiciones Cromatográficas**

Para el análisis cromatográfico del estudio comparativo se empleó un sistema HPLC 1260-LC (Agilent Technologies, CA, USA) equipado con desgasificador al vacío, automuestreador, una bomba binaria y un detector de arreglo de diodos (DAD). La columna empleada fue una Zorbax Eclipse Plus, 4,6 mm x 150 mm de 1,8 μ m de tamaño de partícula operando a temperatura ambiente a un flujo 0,8 mL/min. Las fases móviles fueron agua con ácido acético (0,5 %) (fase A) y ACN (fase B), el cambio de gradiente se efectuó de acuerdo a las siguientes condiciones: 0-10 min 5 % B, 10-12 min. 30% B, 12-17 min 38% B, 17-20 min, 50% B; 20-23 min 95% B. Finalmente se retomaron condiciones iniciales (5%) en 2 min y re-equilibrando la columna por 2,5min. El volumen de inyección de las muestras fue de 10 μ L. Los compuestos separados fueron monitoreados utilizando los canales de detección: 240, 254, 280 y 330 nm, además de la permanente recogida de datos espectrales en el rango 190-640 nm.

El CL fue acoplado a un detector de masa con interfase ESI como fuente de ionización y TI como analizador de masa Bruker Daltonics Esquire 2000™ ion (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). La TI fue operada en modo negativo y positivo con voltaje del capilar fijado en +3200 V. Los espectros de masa fueron adquiridos en un rango de m/z entre 50-800 y los valores óptimos utilizados por EM-ESI fueron: La temperatura del gas secante fue de 300 °C a un flujo de 9 L/min y la presión del gas nebulizante fue de 30 psi. La adquisición y procesamiento de datos se desarrolló empleando el software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonik).

- **Caracterización Química de Extractos mediante CL-EM (ESI-TOF)**

Para el proceso de caracterización e identificación de los perfiles obtenidos de cada extracto se empleó el CL (empleado anteriormente) acoplado a un detector de masa de alta resolución. En esta plataforma se analizaron los extractos obtenidos de la especie *P. caerulea*. La identificación de cada pico se realizó comparando tanto el tiempo de migración como los datos espectrales de EM (EM exacta y espectro de EM/EM) obtenidos de los extractos estudiados y compuestos aislados.

El CL fue acoplado a un espectrómetro de masas micro TOF de Bruker Daltonik empleando como interfase ESI (modelo G1607A de Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). El espectrómetro de masas fue operado en modo de ionización negativa y positiva, los datos fueron adquiridos en un rango de masa de m/z 50 a 800. El capilar fue ajustado a +4000 V, el desplazamiento de la placa final a ~ 500 V, el gas nebulizador a 2 Bar y el gas secante a 9 L / min a 250°C. Los datos de masa exacta de los iones moleculares se procesaron a través del software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonik), el cual proporciona la lista de posibles fórmulas elementales usando la herramienta Smart Formula™. Se realizó la calibración externa del espectrómetro de masas Usando una jeringa Cole Palmer 74900-00-05 (Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos) conectada directamente a la interface. La solución estándar fue Inyectada al inicio de la secuencia, y todos los espectros fueron calibrados antes de la caracterización de los extractos.

▪ **Análisis Estadístico**

Se construyó una matriz con áreas relativas (22 minutos de análisis) para cada muestra a partir de los perfiles cromatograficos CL-EM tratados en Data Analysis 4.0., teniendo como variable el tiempo de retención, previo a esto se alinearon los perfiles para evitar errores por corrimientos cromatograficos. Se usó un límite del 10 % para la generación de la tabla de señales (por debajo de este porcentaje no se considera como una señal). Con los datos alineados se realizaron análisis de componentes principales PCA en el programa SIMCA (Simca-P+ software package, version 13.0-Umetrics, Umeå, Sweden). De cada modelo se generaron las gráficas de contribución de componentes para determinar la varianza acumulada explicada con las componentes generadas, *Score line*, *Hotelling's T2* y *DMOX* para evaluar el modelo obtenido.

3.2.2 Estudio Químico Comparativo de Aceites Esenciales de Hojas de *P. caerulea*

- **Recolección e Identificación del Material Vegetal**

La muestra vegetal corresponde a hojas de la especie *P. caerulea* que fueron colectadas en la región Caribe y Andina de Colombia. Los individuos empleados en este estudio corresponden a los mismos organismos utilizados en el estudio químico comparativo de extractos etanólicos de la especie *P. caerulea*. El muestreo se llevó a cabo con 20 individuos colectados en el departamento del Magdalena y Cundinamarca (Tabla 3-1) durante dos periodos del año en los meses de abril (P1) y octubre (P2) de 2010 entre las 9:00 y las 14:00.

- **Obtención e Identificación del Aceite Esencial de Hojas de *P. caerulea***

El aceite esencial de hojas de la especie *P. caerulea* se obtuvo mediante destilación por arrastre con vapor durante 2h en un equipo tipo Cleavenger, partiendo de 1500 g de muestra vegetal fresca. Los aceites fueron secados sobre sulfato de sodio anhidro y mantenidos a una temperatura aproximada de 4 °C hasta su posterior análisis. En total se procesaron 20 muestras correspondientes a igual número de individuos.

El análisis de los aceites esenciales se llevó a cabo por CG-EM empleando un cromatografo Agilent Technologies 7890A GC System equipado con un detector selectivo de masas, (Agilent Technologies Inc. GC System 5975C VL MSD) con columna capilar no polar tipo DB-1MS 30m de largo, 0,25mm de diámetro interno y 0.25µm de espesor de película. 100% dimetilsiloxano (J & W Scientific, Folsom, CA, EEUU) y columna capilar polar tipo DB-WAX 30m de largo, 0,25mm de diámetro interno y 0.25µm de espesor de película. Polietilenglicol (Agilent Technologies, EEUU). Se empleó He como gas de arrastre a un flujo de 1,0 mL/min inyectándose 1µL en modo Split 1/30, la temperatura del inyector y la línea de transferencia fueron 250°C y 300°C respectivamente. El EM fue operado por impacto electrónico a una energía de ionización de 70eV y los espectros de masas fueron

adquiridos en un rango de m/z 35-450 uma. La temperatura de la columna DB-1MS se programó desde 40°C (5 min) hasta 160°C a 4°C/min, se aumentó hasta 220°C a 8°C/min y finalmente se elevó hasta 280°C (4 min). Para la columna DB-WAX la temperatura del horno se programó desde 40°C (5 min) hasta 250°C a 4°C/min.

La identificación de los componentes presentes en los aceites se llevó a cabo por comparación de los índices de retención calculados y los espectros de masas con las bases de datos NIST MS Search 8.0, Pherobase y los reportados en la literatura (Adams, 2001) (Joulain y Koning, 1998). Los índices de retención fueron determinados empleando una serie homóloga de alcanos (C_{10} - C_{24}) que fueron eluidas bajo las mismas condiciones cromatográficas de las muestras analizadas.

- **Análisis Estadístico**

Se elaboró una matriz a partir de los índices de retención y la abundancia relativa de cada compuesto del cromatograma de los diversos individuos colectados de cada región en los dos periodos de análisis. Con los datos obtenidos se llevó a cabo el análisis de componentes principales PCA con el programa SIMCA (Simca-P+ software package, version 13.0-Umetrics, Umeå, Sweden). De cada modelo se generaron las gráficas de contribución de componentes para determinar la varianza acumulada explicada con los componentes generados, *Score line*, y *DMOX* para evaluar el modelo obtenido.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Estudio Químico Comparativo de los Extractos de Hojas, Corteza y Madera de *P. caerulea*

- **Caracterización de Metabolitos Aislados por CL/EM**

La CL-EM fue empleada para determinar los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos de hojas, corteza y madera de la especie *P. caerulea* (Figura 3-4) Los BPC

(cromatograma de pico base) y perfiles UV-Vis de los extractos etanólicos de una muestra representativa de cada estructura del vegetal se muestran en las **Figura 3-4 a 3-8** donde se han asignado los números de picos de los metabolitos aislados acuerdo al orden de elución en el cromatograma (Tabla 3-2). En los perfiles cromatograficos se identificaron un total de 21 compuestos teniendo en cuenta tiempo de retención, fórmula molecular y masa de cada pico.

Figura 3-4: BPC de los extractos etanólicos de hojas, corteza y madera de *P. caerulea*.

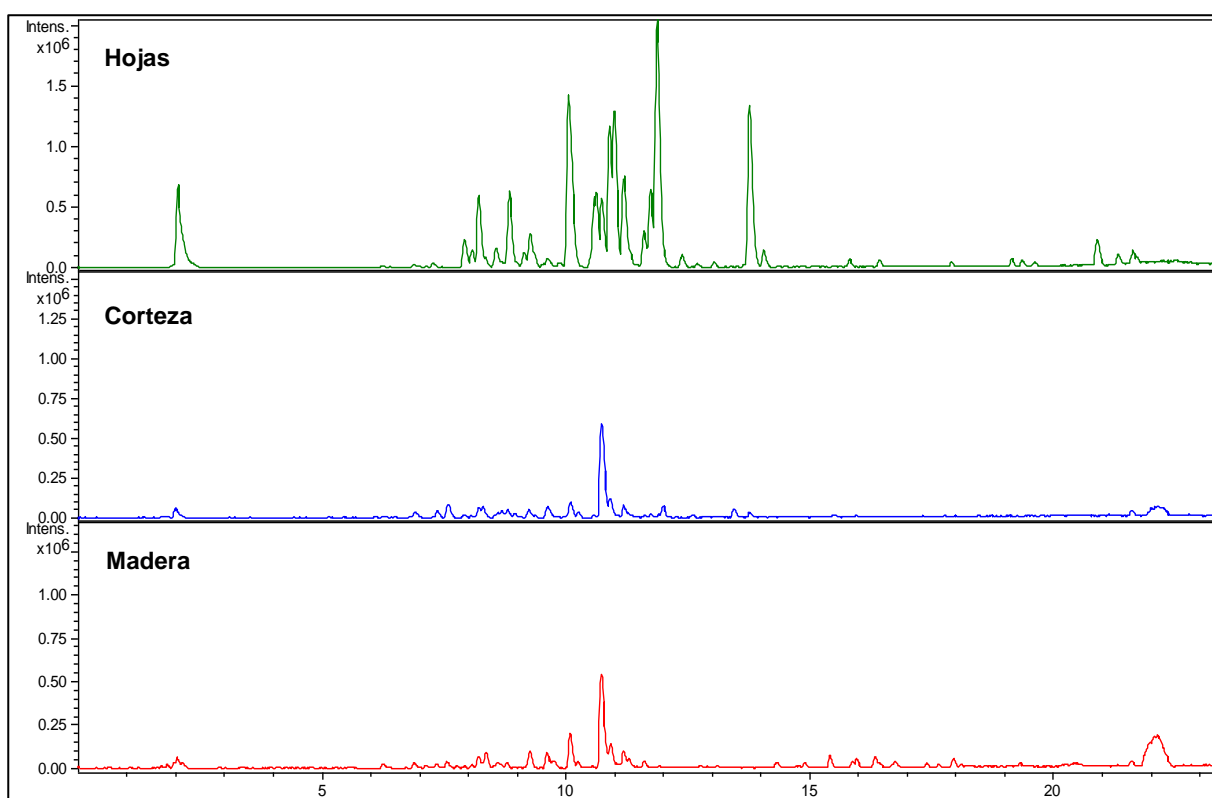


Figura 3-5: Perfiles UV-Vis del extracto etanólico de hojas, corteza y madera de *P. caerulea*.

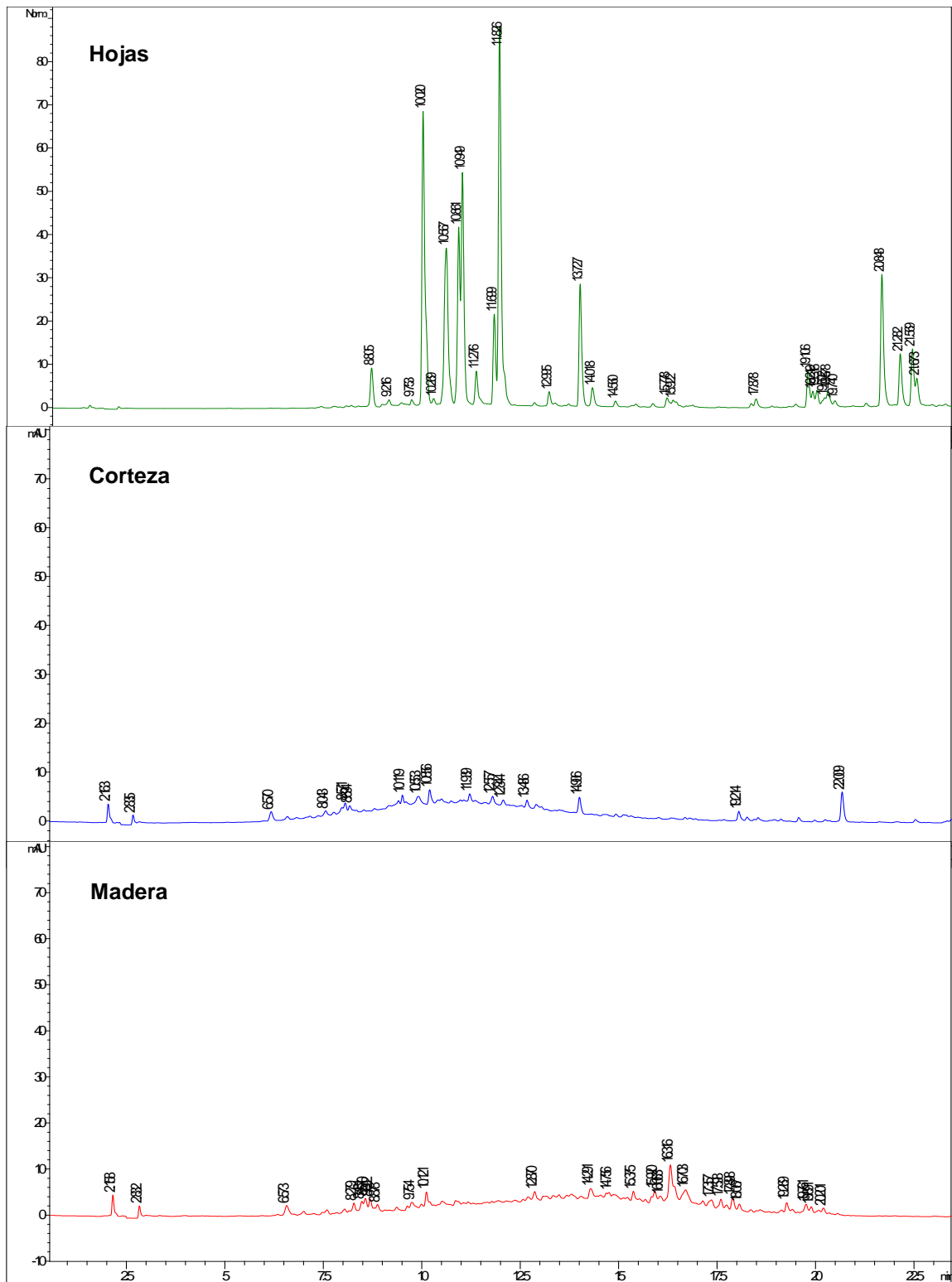


Figura 3-6: BPC del extracto etanólico de hojas de *P. caerulea*: Los números de picos corresponden con los valores de la Tabla 3-2.

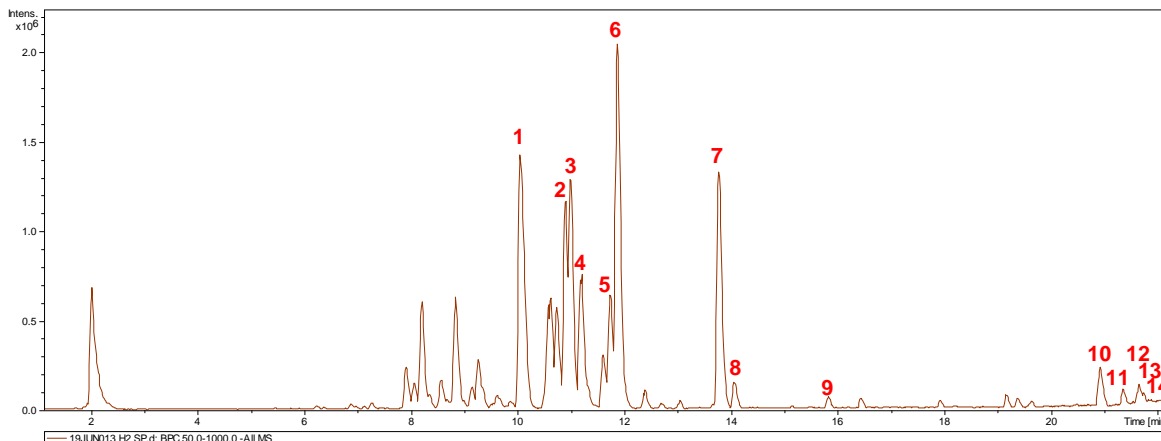


Figura 3-7: BPC del extracto etanólico de corteza de *P. caerulea*: Los números de picos corresponden con los valores de la Tabla 3-2

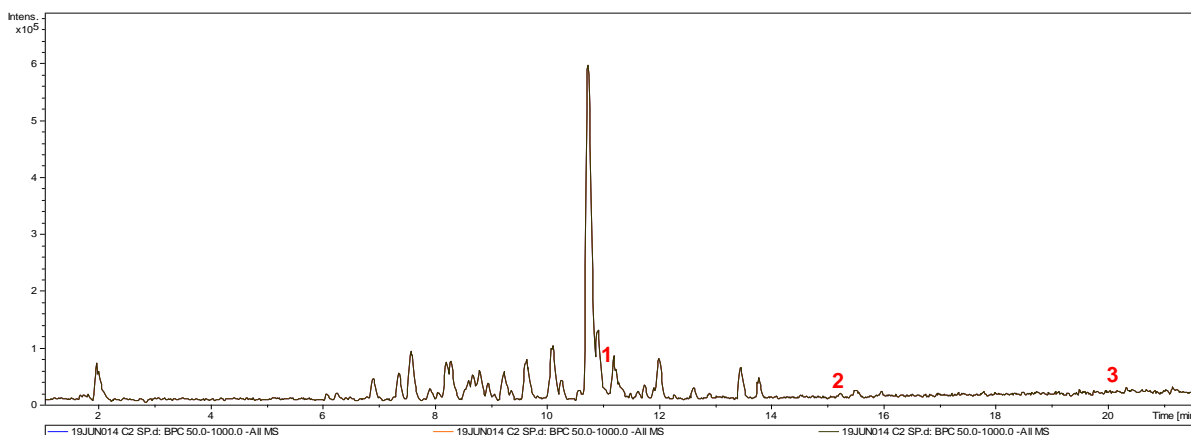


Figura 3-8: BPC del extracto etanólico de madera de *P. caerulea*: Los números de picos corresponden con los valores de la Tabla 3-2

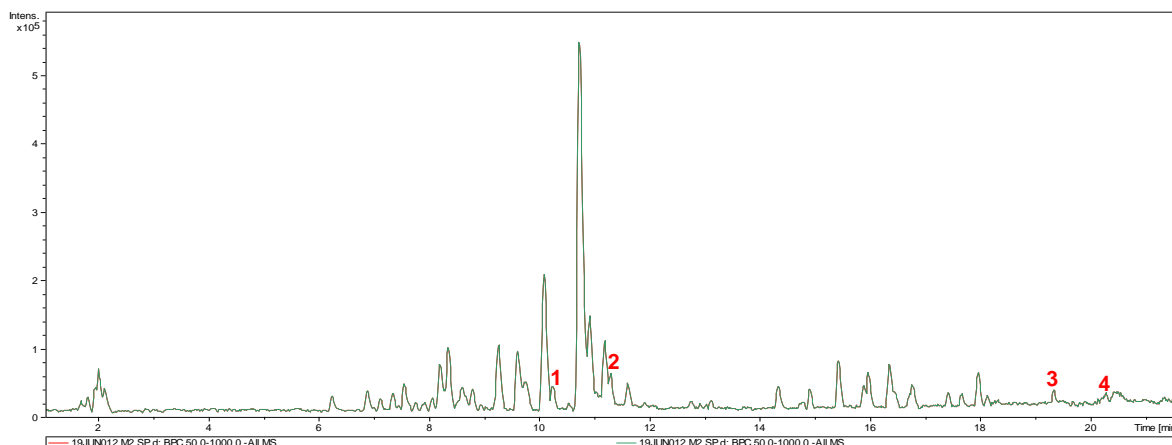
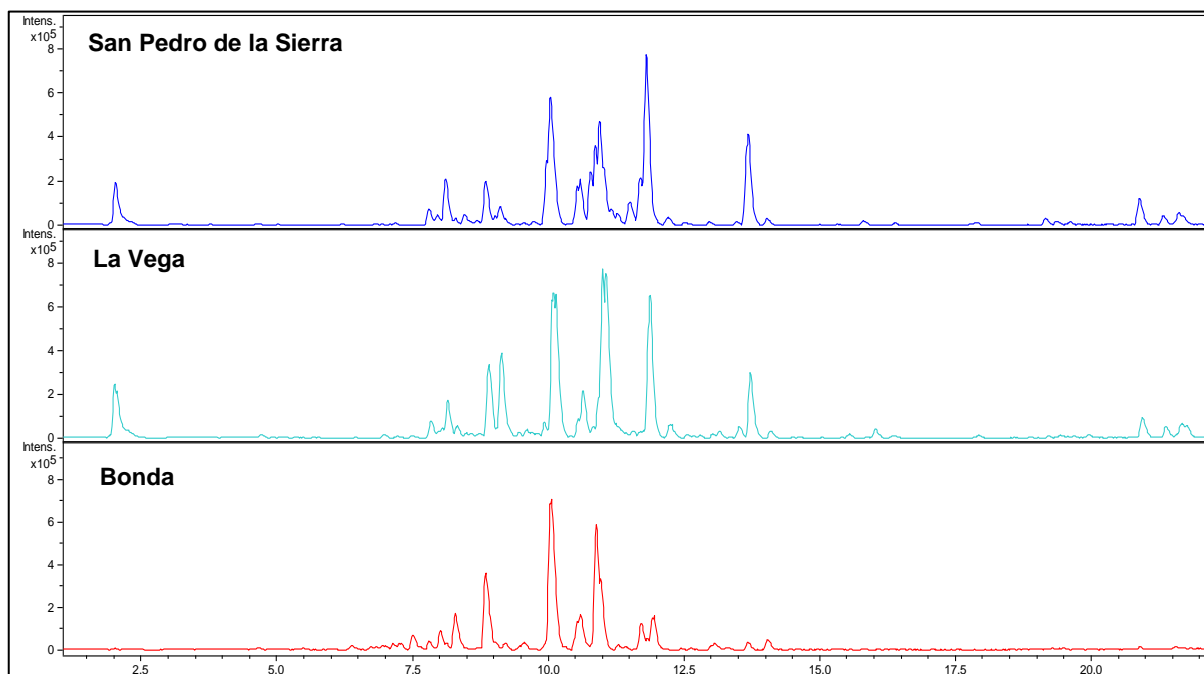


Tabla 3-2: Identificación de metabolitos aislados de hojas, corteza y madera de *P. caerulea* empleando CL/EM.

TR (min)	Código	Compuestos
HOJAS		
1	10.0	HPc13 Quercetina-3-O-β-glucósido
2	10.9	HPc17 Quercetina-3-O-α-L-arabinofuranósido
3	11.0	HPc15 Quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosido
4	11.3	HPc5 Isofraxidina
5	11.6	HPc4 Escopoletina
6	11.7	HPc14 Kaempferol-3-O-α-L-arabinofuranósido
7	11.9	HPc16 Kaempferol-3-O- α-L-ramnopiranosido
8	13.8	HPc12 Kaempferido-3-O-α-L-ramnopiranosido
9	15.8	HPc11 Quercetina
10	20.9	HPc6 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-Z-p-cumaril-4''-E-p-cumaril)-α-L-ramnopiranosido
11	21.3	HPc7 4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-E-p-cumaril-4''-E-p-cumaril)-α-L-ramnopiranosido
12	21.6	HPc8 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-Z-p-cumaril-4''-Z-p-cumaril)-α-L-ramnopiranosido
13	21.7	HPc9 4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-E-p-cumaril-4''-Z-p-cumaril)-α-L-ramnopiranosido
14	21.8	HPc10 4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-Z-p-cumaril-4''-E-p-cumaril)-α-L-ramnopiranosido
CORTEZA		
1	11.1	CPc2 Escopoletina
2	15.5	CPc4 2, 7-dimetoxi-5-hidroxi-6-(l-hidroxietil)-1,4-naftoquinona
3	20.4	CPc3 5,7-dimetoxi-3',4'-metilendioxi epicatequina
MADERA		
1	10.2	Mpc1 3,4,5-trimetoxifenil-β-D-glucopiranosido
2	11.3	Mpc2 huazhongílexina
3	19.3	Mpc3 4'-hydroxy-5,7,3'-trimetoxiflavan-3-ol
4	20.4	Mpc4 5,7-dimetoxi-3',4'-metilendioxi epicatequina

Con el fin de ilustrar la variabilidad de los perfiles, en la Figura 3-9 se observan los BPC de los extractos de hojas de las muestras pertenecientes a cada región estudiada (S, V y B).

Figura 3-9: Comparación de los BPC de los extractos etanólicos de hojas colectados en las tres regiones (S, V y B)

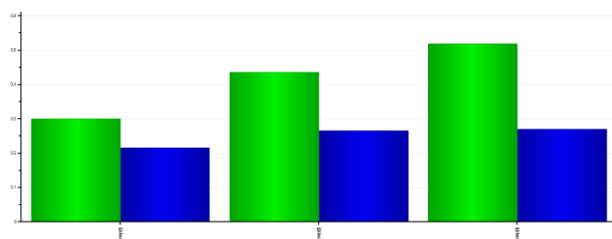
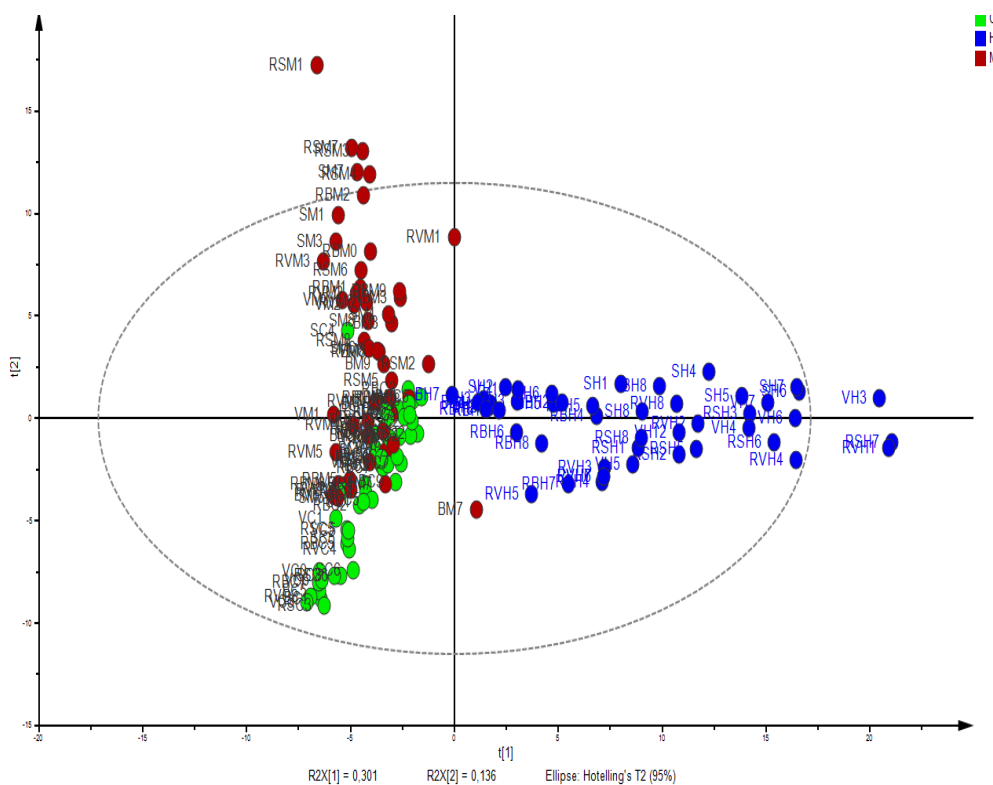


▪ **Análisis Estadístico de Extractos de Hojas, Corteza y Madera de *P. caerulea***

Mediante el programa Simca de Umetrics 13.0 se llevó a cabo un análisis de componentes principales con el total de las muestras (149 incluidas réplicas) de hojas, corteza y madera de *P. caerulea* colectadas en los tres lugares de procedencia. Este proceso permitió explicar el 40% de la varianza total de los datos en los dos primeros componentes (escalado centrado). A pesar de que la información preliminar que proporcionan los perfiles cromatográficos señala una posible diferenciación entre las estructuras, este hecho es solo confirmable al realizar el análisis de PCA de todos los individuos muestreados. En este análisis la primera característica que se identifica es la homogeneidad en el comportamiento químico de cada estructura a pesar de ser colectados en diferentes lugares, pero principalmente confirma que las muestras de hojas (H) presentan mayor diferencia en composición respecto a madera (M) y corteza (C), y que no es posible discriminarlas a lo largo del primer componente (PC1), pero sí es posible diferenciarlas en el segundo (PC2). Adicional a ello se observa cierto grado de similitud en la composición de las muestras de

madera y corteza aunque procedan de diferentes lugares y hallan estado expuestas a diferentes condiciones ambientales (Figura 3-10).

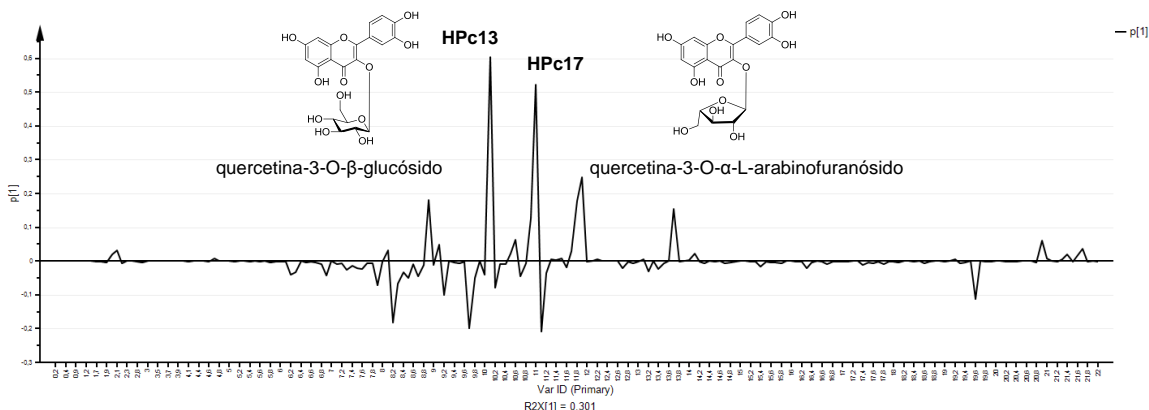
Figura 3-10: Análisis de componentes principales de los datos obtenidos de hojas, corteza y madera de *P. caerulea* (superior). Gráficas de contribución de componentes del PCA (inferior)



Con el objetivo de conocer las variables que influyen en la discriminación de las muestras (presencia o ausencia de un compuesto) se obtuvieron los diagrama de carga que establecen las variables que más influyen en la discriminación de las mismas sobre cada componente: Para PC1 las variables o los compuestos que se encuentran en mayor proporción en hoja y por lo tanto diferencian esta estructura de madera y corteza,

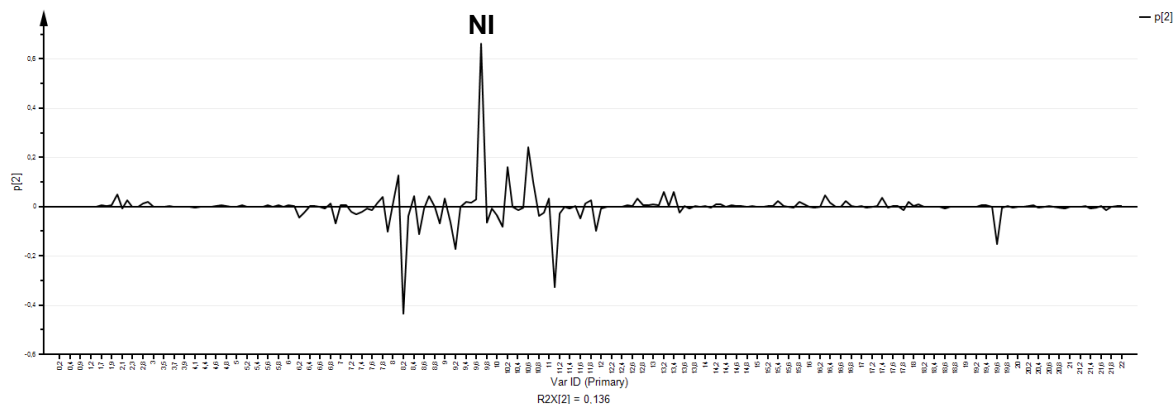
corresponden a la quercetina-3-O- β -glucósido (**HPc13**) y quercetina-3-O- α -L-arabinofuranósido (**HPc17**) que eluyen en el minuto 10.0 y 11.0 respectivamente (Figura 3-11).

Figura 3-11: Análisis de diagrama de carga del PC1 en los datos obtenidos de las hojas de *P. caerulea*



Para el PC2, que permite diferenciar entre madera y corteza, se determinó la presencia de un compuesto que eluye a los 9.6 min. (No identificado, NI) (Figura 3-12) y que se encuentra presente en mayor proporción en la madera, permitiendo con ello, discriminarlas de las otras estructuras.

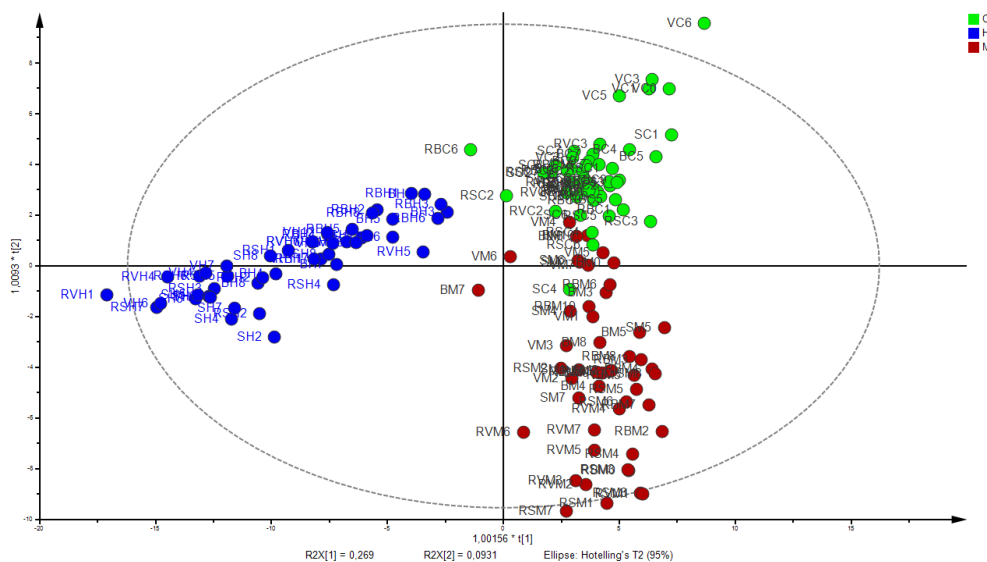
Figura 3-12: Análisis de los diagramas de carga del PC2 en los datos obtenidos de las maderas de *P. caerulea*.



Cuando las muestras son sometidas a un análisis supervisado por regresión de mínimos cuadrados (OPLS-DA generalizado) discriminando por estructura de la planta, se evidencia

una mayor varianza entre las muestras de hojas con respecto a las de corteza y madera, corroborando con ello la información obtenida en el PCA (Figura 3-13).

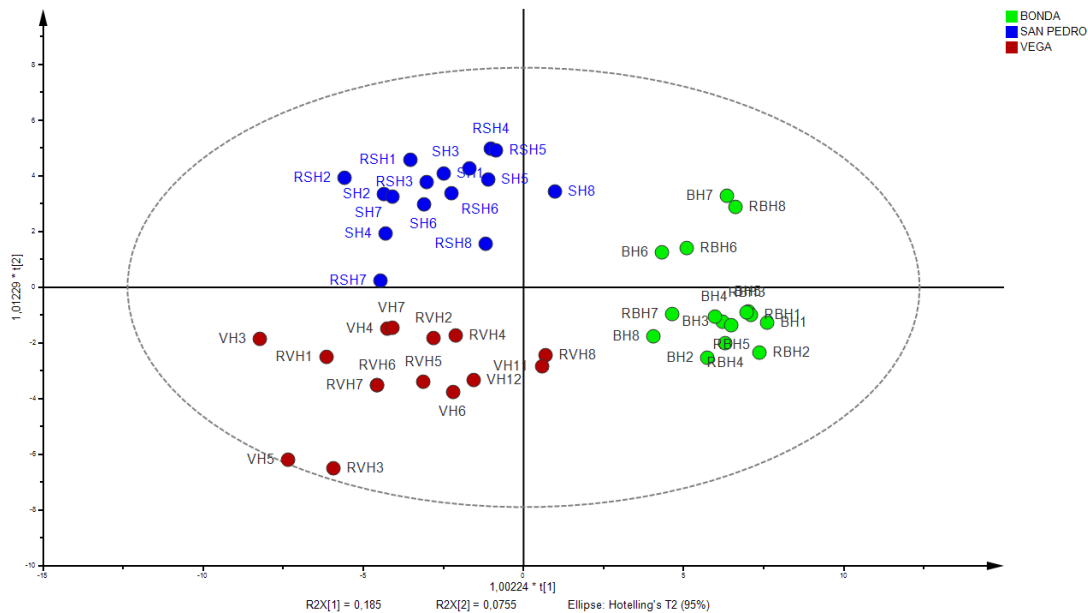
Figura 3-13: OPLS-DA obtenidos de los datos de hojas, corteza y madera. Diferenciación por color de cada estructura, Hojas: Azul, Corteza: Verde y Madera: Rojo.



▪ **Análisis de las Hojas de *P. caerulea***

El análisis supervisado de las hojas (Figura 3-14) permite determinar que la composición de las muestras depende del lugar de procedencia. En este caso se observa mayor similitud entre las muestras de Bonda (B) por la poca dispersión entre sus individuos, y una clara discriminación de estas con respecto a los otros lugares de procedencia. A través del PC2, se observa mayor varianza entre sí, en las muestras de San Pedro de la Sierra (S) y La Vega (V).

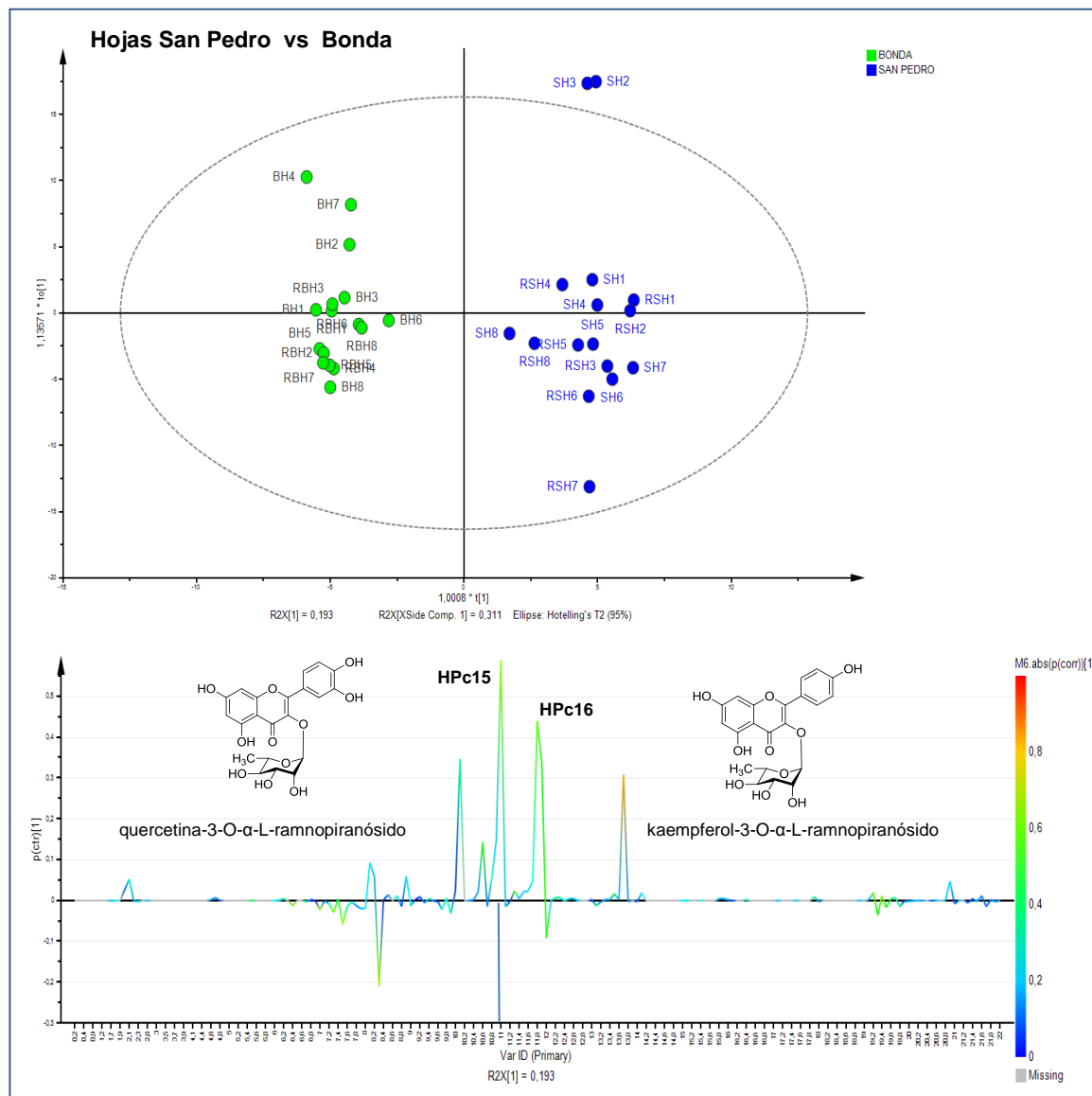
Figura 3-14: OPLS-DA obtenidos de los datos de Hojas de *P. caerulea*.



Al realizar el análisis entre los diferentes lugares de colecta, es posible determinar que variables influyen en la clasificación de las muestras o son propias de cada origen geográfico.

El análisis entre las muestras de B y S permite inferir que existen diferencias entre los individuos colectados en cada una de los lugares de estudio. El diagrama de carga permite establecer que la diferencia entre los individuos está determinada por la presencia en mayor abundancia en S de los compuestos quercetina-3-O-β-glucósido (**HPc13**), quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosido (**HPc15**), kaempferol-3-O-α-L-ramnopiranosido (**HPc16**), kaempferido-3-O-α-L-ramnopiranosido (**HPc12**) y NI que eluyen a 10.0, 11.0, 11.9, 13.8 y 10.6 min (Figura 3-15), respectivamente.

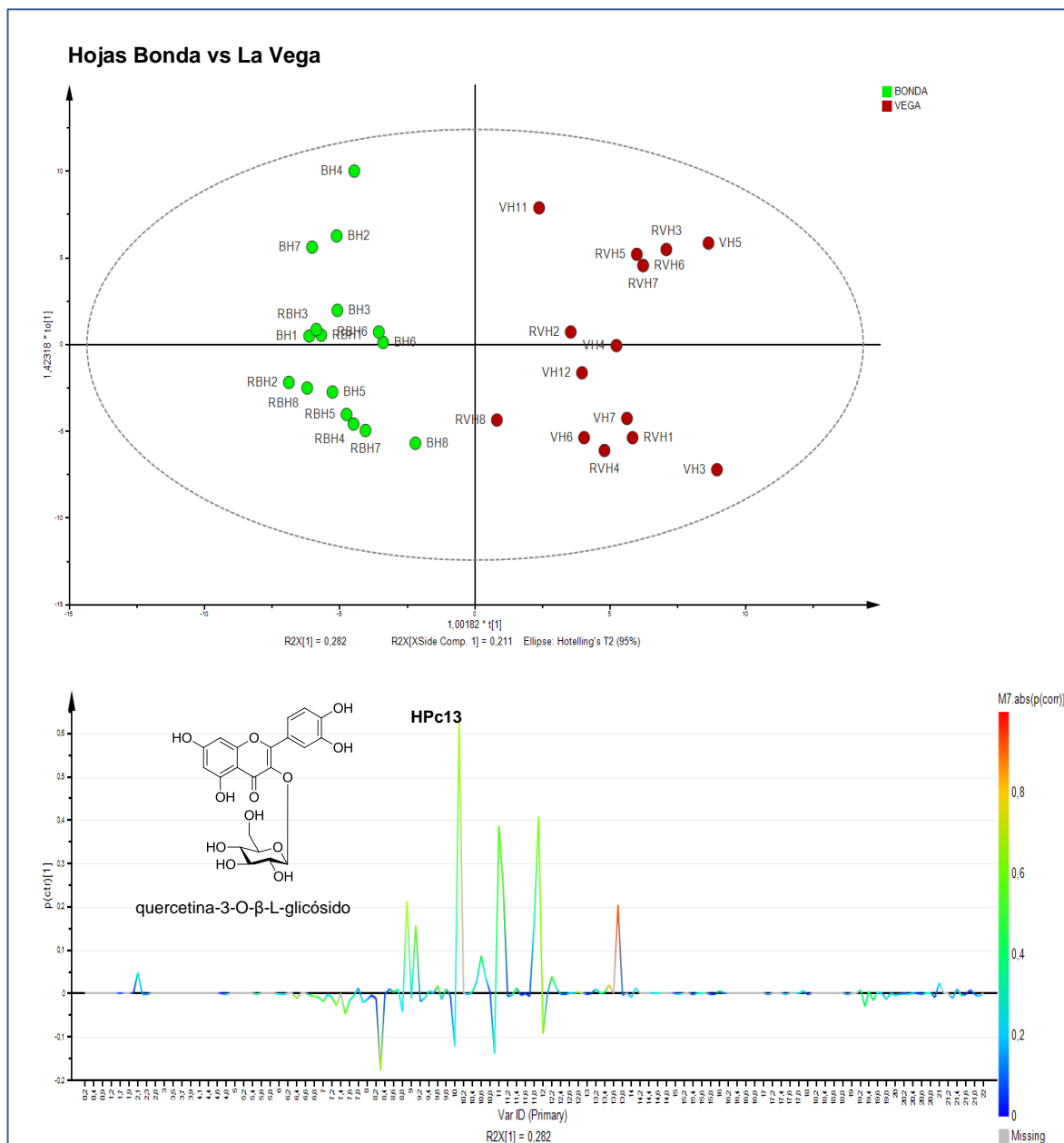
Figura 3-15: OPLS-DA obtenidos de los datos de Hojas de Bonda (superior). Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos de hojas de S y B indicando los metabolitos mayoritarios presentes (inferior)



De la misma forma se realizó el análisis para las muestras colectadas en B y V, encontrando resultados similares a los obtenidos entre los dos lugares anteriores (S y B) (Figura 3-15) En este caso se observa con mayor claridad la varianza que existe entre las muestras en V respecto a las colectadas en B. Se podría establecer que los compuestos posiblemente responsables de esta varianza son quercetina-3-O-β-glucósido (HPc13), quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosido (HPc15), kaempferol-3-O-α-L-ramnopiranosido (HPc16) y kaempferido-3-O-α-L-ramnopiranosido (HPc12) que eluyen a 10.0, 11.0, 11.9 y

13.8 min, y que se presentan en mayor proporción en las muestras colectadas en V (Figura 3-16).

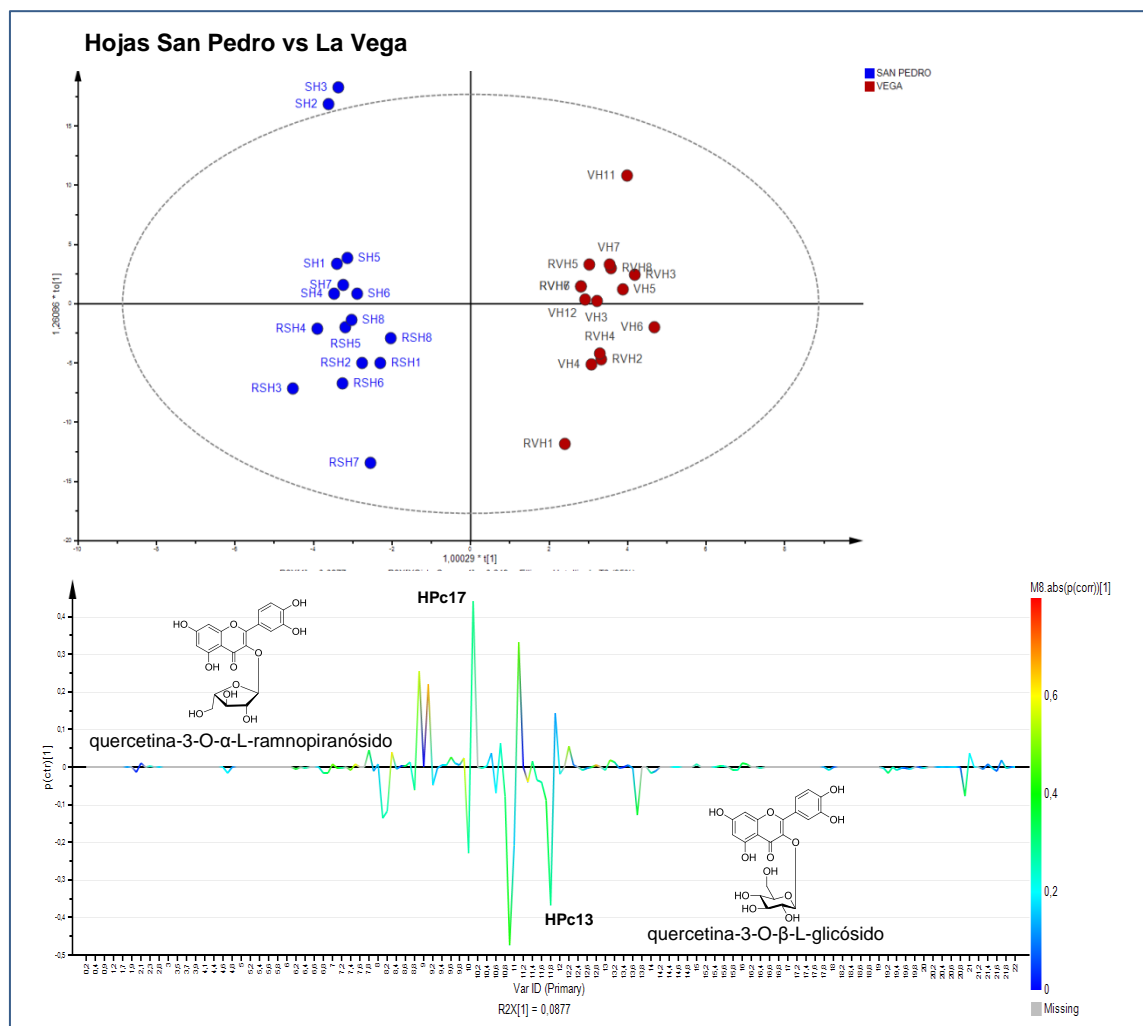
Figura 3-16: OPLS-DA obtenidos de los datos de Hojas de Bonda y La Vega (superior). Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos de hojas de B y V indicando los metabolitos mayoritarios presentes (inferior).



Con respecto al análisis de las muestras colectadas en S y V, se observa una menor varianza en las muestras de S, a excepción de dos muestras atípicas, muy diferentes a las

demás (SH2 y SH3). La diferencia entre las muestras de S y V está determinada por la presencia de los compuestos quercetina-3-O- β -glucósido (**HPc13**), (NI), quercetina-3-O- α -L-arabinofuranósido (**HPc17**) y kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosido (**HPc16**) que eluyen a 10, 11.2, 10.9 y 11.9 min respectivamente. **HPc13** y NI están presentes en mayor proporción en V, mientras que **HPc16** y **HPc17** son más abundantes en S (Figura 3-17).

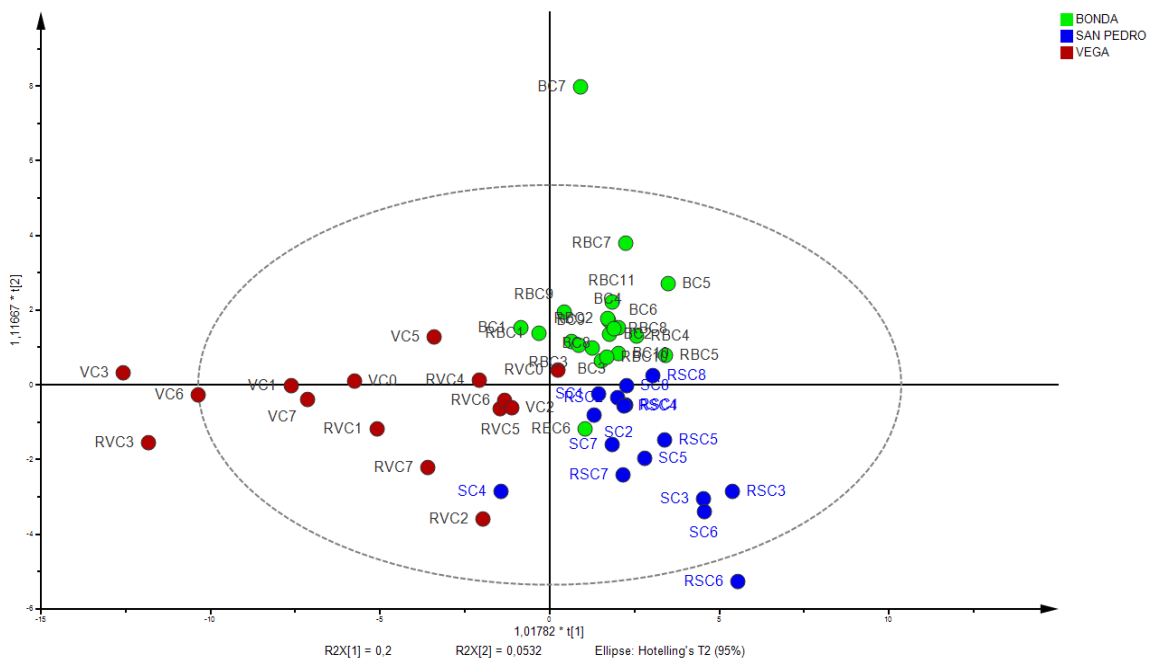
Figura 3-17: OPLS-DA obtenidos de los datos de Hojas de San Pedro y La Vega (superior). Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos de hojas de S y V indicando los metabolitos mayoritarios presentes (inferior).



▪ **Análisis de la Corteza *P. caerulea***

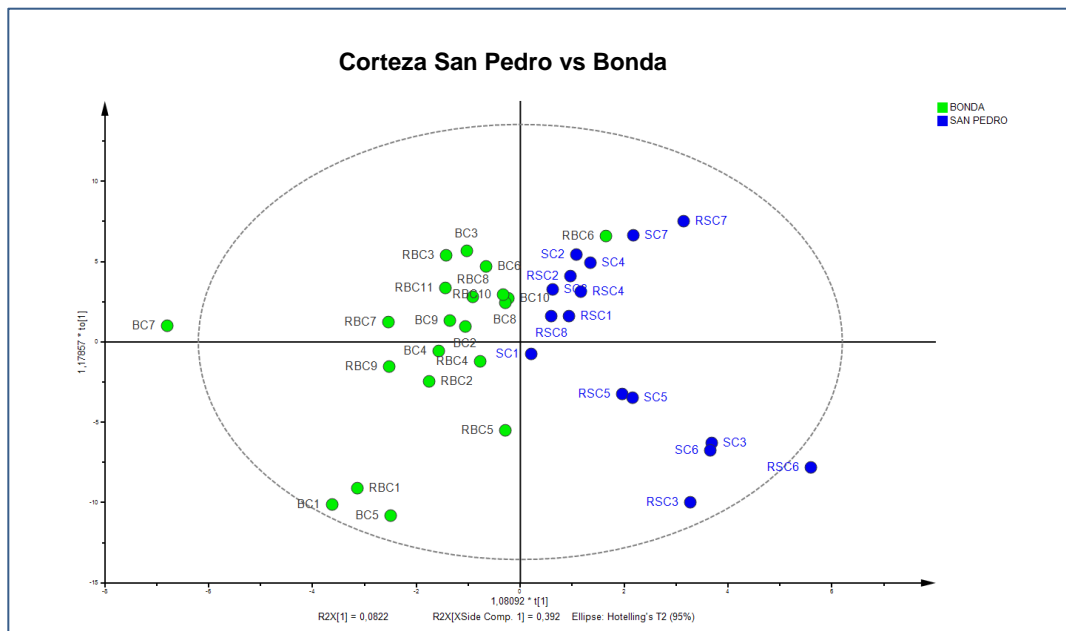
El análisis supervisado de las cortezas permitió discriminar las muestras entre sí, acorde al lugar de procedencia, a pesar que en alguno de ellos (V) la alta dispersión es la característica más relevante (Figura 3-18). Las muestras de S y B a pesar de las diferencias que se observan entre sus muestras, se puede inferir algún grado de similitud en el comportamiento químico de sus individuos.

Figura 3-18: OPLS-DA obtenidos de los datos de Corteza de *P. caerulea*.



Al realizar el análisis por parejas de los diferentes lugares, se observa que entre S y B, la varianza entre grupos no es suficiente para diferenciar entre muestras de uno y otro lugar. Dentro de las diferencias que se observan está la presencia en mayor proporción de los compuestos eluidos a 9.2 (NI) y 8.2 (NI) min. en las muestras de S y en B los metabolitos eluidos a 10.9 (NI) y 17.8 (NI) min respectivamente (Figura 3-19).

Figura 3-19: OPLS-DA obtenidos de los datos de corteza de Bonda y San Pedro



Para el caso de las muestras de B y V, a pesar de que se presenta una alta varianza, se observa entre ellas una mayor diferenciación. El compuesto que eluye a 10.9 (NI) min (Figura 3-20) se encuentra en mayor cantidad en las muestras de la V por lo tanto es una de las variable que marca diferencia entre los dos grupos.

En el análisis de S y V a pesar de la dispersión de las muestras, se observa claras diferencias entre individuos colectados en cada lugar. La variable que marca diferencia entre estos dos grupos son los compuestos eluidos a los 10.9 (NI) y 11.2 (NI) min. presentes en la V y 10.2 (NI) y 10.6 (NI) presentes en S (Figura 3-21).

Figura 3-20: OPLS-DA obtenidos de los datos de corteza de Bonda y Vega

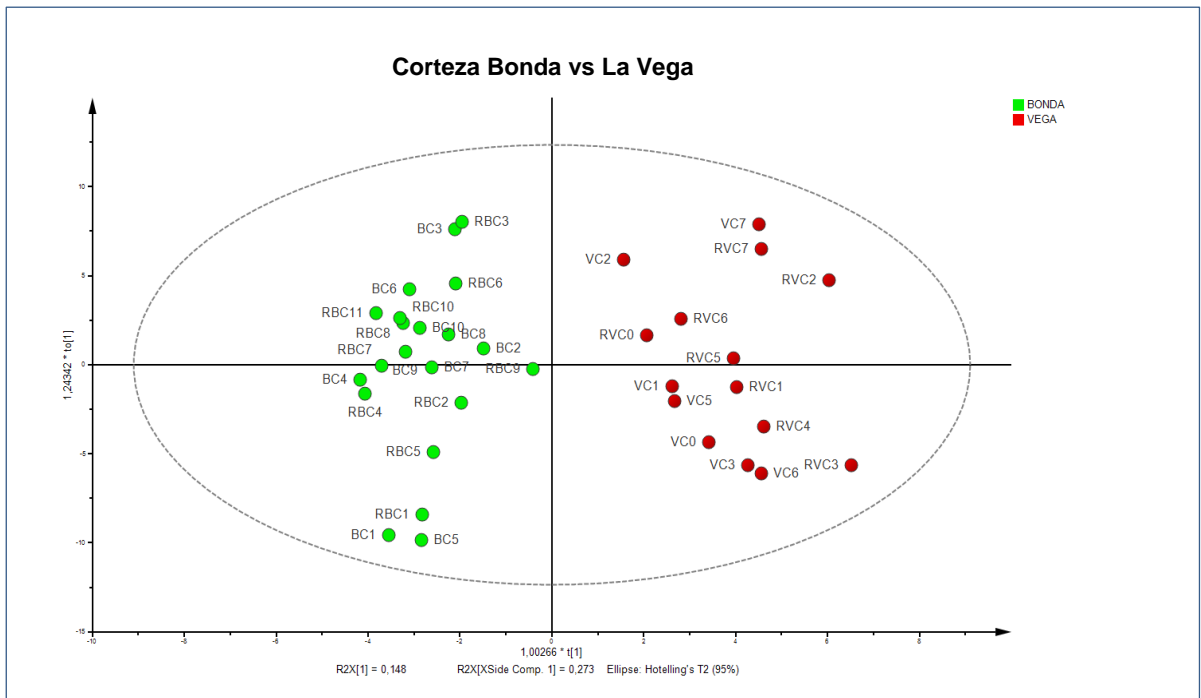
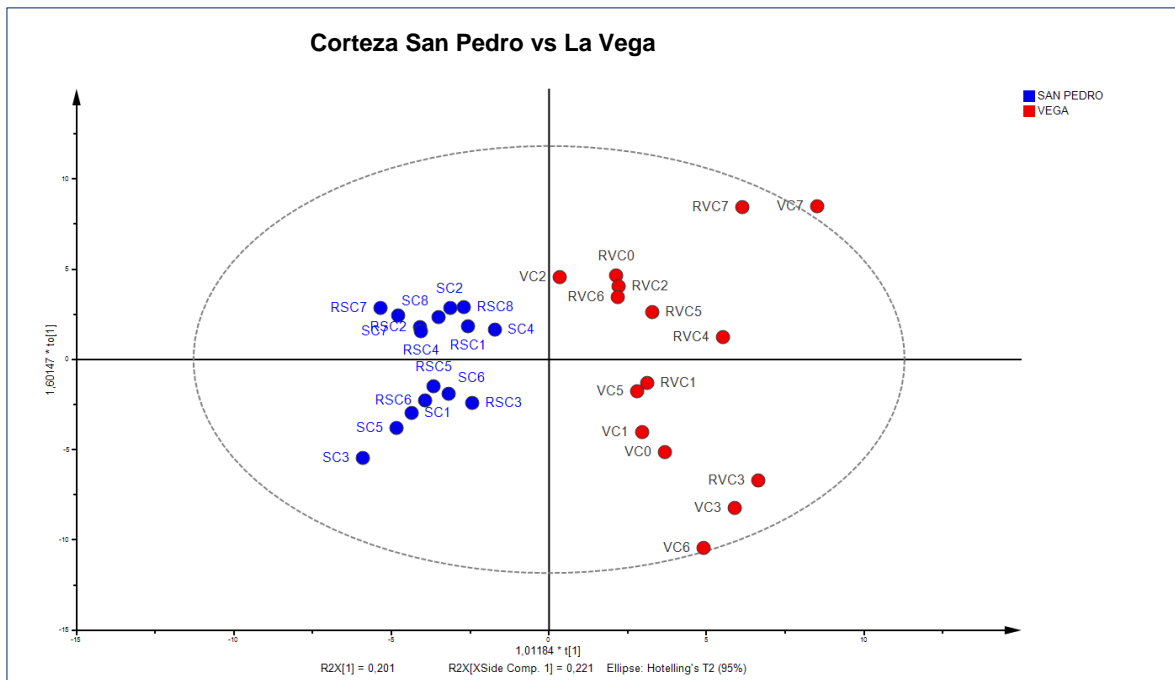


Figura 3-21: OPLS-DA obtenidos de los datos de corteza de San Pedro y Vega.



▪ **Análisis de la Madera de *P. caerulea***

El análisis supervisado discriminante (OPLS-DA) de las muestras de madera permite inferir una clara diferenciación de acuerdo a lugar de colecta, además como se observa en la Figura 3-22, las muestras de B son las de mayor uniformidad en su composición, en comparación con S y V. Es importante tener en cuenta que los extractos de madera colectados poseen perfiles cromatográficos de baja intensidad en comparación con los obtenidos de hojas, indicando ello que los metabolitos se presentan en menor cantidad y posiblemente en menor variabilidad en esta estructura. La mayor cantidad de metabolitos que exhiben las hojas es coherente con la mayor capacidad que presentan esta estructura en las plantas desde el punto de vista metabólico.

Al comparar de manera específica los individuos de S y V se mantiene la diferencia antes descritas, pero se observa una mayor dispersión de las muestras de cada área de colecta (Figura 3-22). Las diferencias están marcadas por la mayor proporción de los compuestos que eluyen a los 10.7 min (NI) en la V y 10.2 min (NI) en las muestras de S.

Figura 3-22: OPLS-DA obtenidos de los datos de Madera de *P. caerulea*.

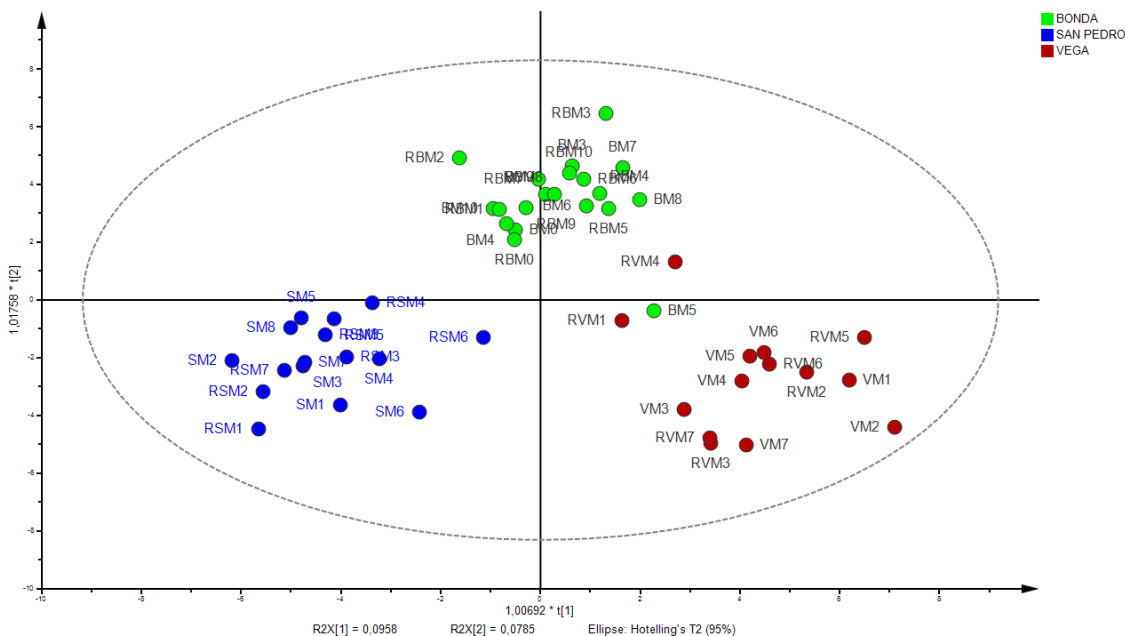
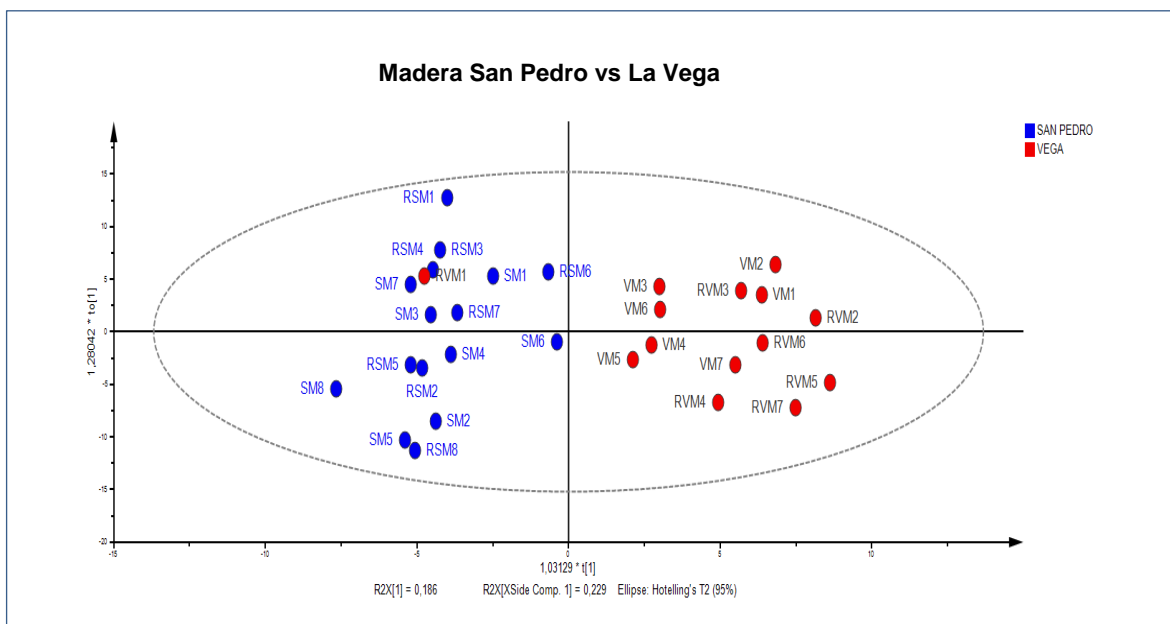


Figura 3-23: OPLS-DA obtenidos de los datos de la Madera de San Pedro y La Vega.



Al analizar las muestras de los individuos de B y S se puede observar que presentan dispersión, pero a pesar de ello hay elementos que la hacen distinguibles entre sí. El compuesto que eluye a 9.6 min (NI) presente en mayor proporción en las muestras de S, es el metabolito que hace la diferencia entre los dos lugares de colecta (Figura 3-24).

Al comparar las muestras de V con los individuos de B se puede concluir que existe cierto grado de diferenciación entre ellas que permite ubicarlas en cada área de colecta. Se sugiere que los compuestos presentes en B que eluyen a 8.2 (NI) 10.5 min (NI) y en V a 9.6 (NI), 10.7 (NI) y 11.1 (NI) min, permiten diferenciar las muestras entre los dos lugares de procedencia (Figura 3-25).

Figura 3-24: OPLS-DA obtenidos de los datos de la madera de San Pedro y Bonda.

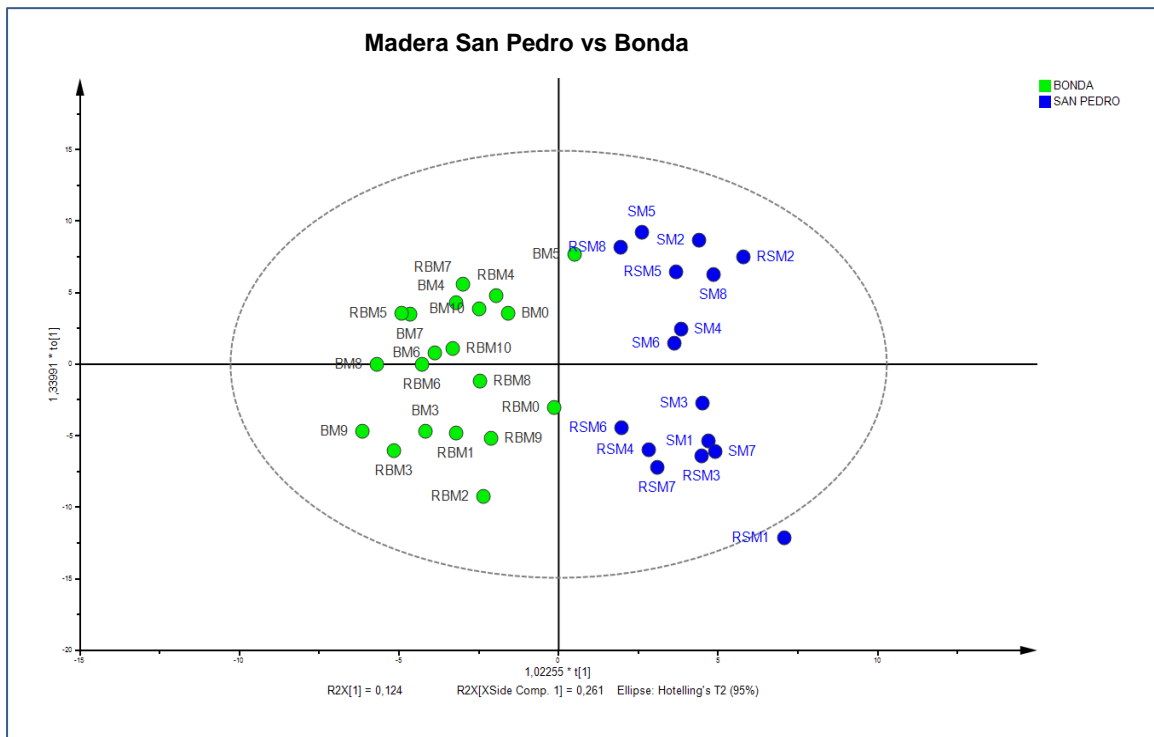
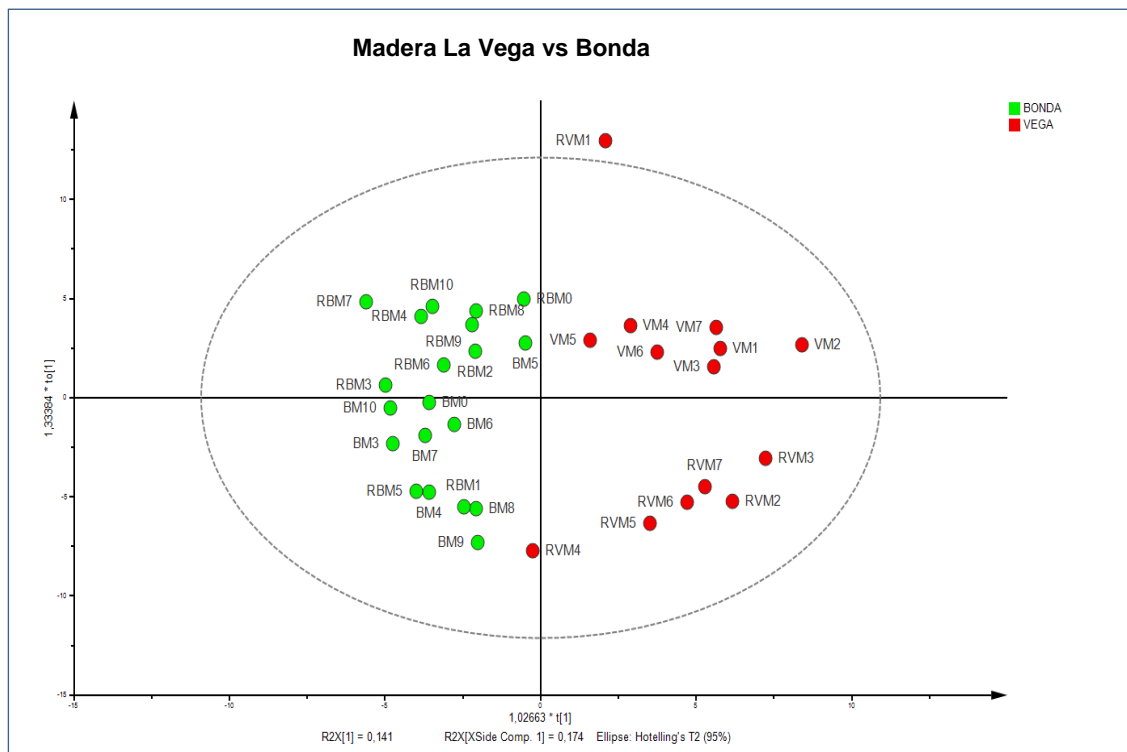


Figura 3-25: OPLS-DA obtenidos de los datos de la madera de La Vega y Bonda.



3.3.2 Estudio Químico Comparativo de los Aceites Esenciales de Hojas de *P. caerulea*

▪ Composición Química de los Aceites Esenciales

El análisis químico de los aceites esenciales de hojas de *P. caerulea*, se realizó mediante CG-EM. La determinación de la identidad de los componentes de los aceites esenciales se realizó teniendo en cuenta criterios cromatográficos y espectrométricos (comparación de los índices de retención, los espectros de masas, abundancias de pico con los reportados en la literatura especializada y en diferentes bases de datos) (Adams R, 2001; Joulain, D y Koning, W, 1998; Nist 11, 2011; Pherobase, 2011). En las condiciones de análisis se determinó la presencia de 53 compuestos que representan el 80.01% de la composición relativa de los aceites de hojas de *P. caerulea*. En la **Tabla 3-3** se presenta la composición relativa de los aceites esenciales según su orden de elución en la columna DB1, los índices de retención y las cantidades con base en el porcentaje de las áreas de pico relativas de cada componente en la mezcla de volátiles. El análisis se llevó a cabo en un total de 20 individuos colectados en tres regiones (San Pedro de la Sierra, S; Bonda, B; y Vega, V) y durante dos periodos del año (P1 y P2).

Como se observa en la **Tabla 3-3** los sesquiterpenos corresponden a los componentes mayoritarios totales, representando alrededor del 60% de la composición química de los aceites esenciales de hojas de *P. caerulea*, por el contrario los monoterpenos solo representaron el 16% del total. Al analizar la composición de los aceites teniendo en cuenta el lugar de procedencia se observa que los monoterpenos poseen los valores más altos en las muestras colectadas en B (23,05%) y S (20,40%), en comparación con las muestras colectadas en la V (4.58%). Para el caso de los sesquiterpenos los valores son similares para los individuos colectados en S (56,70%) y B (55,20%) mientras que en V se encuentran con un valor de 66,37%.

De las 55 sustancias identificadas en el aceite esencial de hojas de *P. caerulea*, los componentes mayoritarios fueron: el monoterpeno sabineno (23.13%) y los sesquiterpenos β -farneseno (38.90%), β -cariofileno (35.64%) y espatulenol (28.35%). Los reportes de estudios previos indican diferencias tanto cualitativas como cuantitativas con respecto a esta investigación, se identifica variación en el porcentaje de monoterpenos y de compuestos mayoritarios en este estudio (Scora et al., 2001; Setzer et al., 2007)

Tabla 3-3: Composición química del aceite esencial de hojas de *P. caerulea* colectado en tres regiones diferentes

Compuestos	IR	San Pedro De la Sierra														
		P1								P2						
		1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7
α -Tujeno	932		0,28	0,63	0,49	0,32	0,32	0,58	0,19			1,01	0,99			
α -Pinen	937	0,91	1,69	3,79	2,50	2,02	1,86	3,42	1,13			3,98	3,90	0,87	0,84	0,95
Camfeno	944															
Sabineno	967	5,22	8,90	23,13	10,87	5,28	7,94	12,40	6,28	2,30	0,79	20,95	20,94	7,89	7,31	6,20
β -Pinen	971	0,85	1,88	3,50	2,40	1,56	1,70	2,76	1,05			3,64	3,64	1,00	0,94	1,01
Mirceno	985	0,42	1,19	2,12	1,66	0,82	1,14	1,65	0,57			1,96	1,94	0,49	0,46	0,16
α -Felandreno	1008							0,22								
Isosilvestreno	1019		0,90	0,91	1,40	1,77	1,42	2,49								
<i>o</i> -Cimeno	1020	0,85	1,83	1,35	3,73		0,63	0,59	1,17	1,45	0,56	7,34	7,27	2,59	2,45	3,46
β -Felandreno	1029	0,28	1,03	1,71	1,44	0,69	0,96	1,51	0,39			1,37	1,36			
Limoneno	1031		0,51	0,73	0,87	0,38	0,48	0,64	0,24			1,04	1,03	0,42	0,40	0,33
Z- β -Ocimeno	1039		0,33	1,25	1,41	0,80	1,13	1,61	0,34			1,19	1,17			
E- β -Ocimeno	1049			0,80	0,86	0,45	0,75	0,96	0,22			0,62	0,60			
γ -Terpineno	1056	0,37	2,89	2,14	4,04	3,38	2,90	4,26	0,40			1,01	0,97			
α -Terpinoleno	1082		0,74	0,64	1,24	0,70	0,81	1,11	0,18			0,49	0,50			
Terpinen-4-ol	1164											0,29	0,28			0,31
δ -Elemeno	1345					0,55	0,48	0,60								
α -Cubebeno	1352										1,33				0,26	0,21
Copaeno	1372							0,26								1,37
α -Ylangeno	1377	1,21	0,97	0,46	0,47	0,23	0,56	0,16	0,24	0,81		0,48	0,47	0,55	0,55	0,22
β -Burboneno	1378			0,34	0,43	0,19	0,51		0,84		2,60	0,53	0,50	1,17	1,12	0,62
β -cubeno	1382															
β -elemeno	1383	0,69	0,91	1,46	1,25	0,91	0,94	1,65	1,02	1,17		1,02	1,01	1,16	1,06	0,94
Dodecanal	1408															
β -Cariofileno	1423	9,31	14,39	19,56	20,13	22,57	13,30	23,62	12,14	18,89	4,74	15,43	15,46	16,18	15,23	14,07
γ -Elemeno	1438															
β -Gurjuneno	1444															
α -Cariofileno	1450		1,67	1,79	2,26	1,71	1,69	2,45	1,11	1,59		1,54	1,53	1,84	1,77	1,77
β -Farneseno	1458	38,98	34,85	13,68	13,24	29,97	20,49	15,94	33,00	14,54	12,13	8,77	8,75	14,89	13,69	5,13
γ -Salineno	1474	3,00	2,63	0,87	1,52	1,52	2,63	1,43	3,20	1,38	1,67	0,97	0,98	2,61	2,43	1,36
Germacreno D	1476	1,19	1,99	2,57	3,65	6,08	3,64	5,65	0,91	0,85		1,70	1,76	0,77	0,66	0,29
β -Salineno	1481	2,91	2,35	0,88	1,35	1,41	2,15	1,31	3,01	1,86	1,37	0,82	0,81	2,32	2,19	1,08
Jasmolactona E	1481	0,54	0,37	0,19				0,26	0,51	1,88	0,91	0,40	0,28	0,37	0,34	0,59
β -Guaiano	1501		4,00					2,85	4,30	3,23	1,33	1,10	1,12	1,78	1,67	0,66
α -Selineno	1504															
Biciclogermacreno	1507													0,31	0,28	0,27
α -Muroleno	1513	0,64	0,72	0,24	0,43	0,49	0,41	0,32	0,46			0,36	0,37			
Z- α -Bisaboleno	1518	0,50	0,63	0,18	0,30	0,35	0,43	0,31	0,70			0,32	0,31	0,78	0,73	0,65
γ -Cadineno	1519								0,32					0,54	0,51	0,46
β -Bisaboleno	1521		0,34			0,17	0,46	0,20	0,22			0,22	0,21	0,46	0,46	0,43
Z-Calameneno	1528															0,28
Eicosano	1536						0,22	0,25					0,31	0,95	0,24	0,35
δ -Cadinene	1541										3,03	0,69	0,72	0,99	1,06	1,01
Z-Nerolidol	1564	1,37	0,28	0,44			0,34		1,20	8,82		0,97	0,96	6,18	6,03	8,22
Espatuleno	1567	1,66	0,91	0,90	1,27		0,50	0,17	3,79	8,73	3,66	4,28	4,24	14,31	14,26	14,75
Oxido de Cariofileno	1569								0,30							
Guaiol	1602								0,33			0,34	0,35	0,96	0,98	1,17
1-Epicubenol	1621						0,31	0,19								
10-epi- γ -eudesmol	1632				0,40		0,39	0,22	0,26					0,63	0,64	0,57
β -Eudesmol	1648									1,48						0,51
Acido Mirístico	1759	15,56	3,87	3,87	5,58	3,10	9,73	1,30	8,39	6,54	3,81					
E-Fitol	2115			1,13	0,78		0,43		0,67					0,84	0,88	0,76
Monoterpenos San Pedro										20,4						
Sesquiterpenos San Pedro										56,70						
Total	80	86,87	93,05	91,44	86,54	87,42	81,65	93,34	89,97	77,02	37,93	85,55	85,44	83,85	78,74	69,88

Tabla 3-3: (continuación)

Compuestos	IR	Bonda									
		P1					P2				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
α -Tujeno	932	0,32	0,30	0,30	0,31	0,66	0,71		0,79	0,39	0,20
α -Pinoeno	937	1,80	1,54	1,78	2,20	3,81	3,15	1,37	3,97	1,99	1,29
Camfeno	944										
Sabineno	967	10,20	6,57	10,44	10,40	11,34	17,67	10,19	22,69	10,43	9,07
β -Pinoeno	971	1,71	1,44	1,83	1,61	2,38	2,86	1,33	3,09	1,76	1,20
Mirceno	985	1,15	0,89	1,22	0,40	0,98	1,23	0,53	1,66	0,86	0,41
α -Felandreno	1008										
Isosilvestreno	1019	0,70	0,52								
<i>o</i> -Cimeno	1020	0,58	1,00	4,00	5,71	6,41	6,78	2,29	4,60	2,97	2,01
β -Felandreno	1029	0,84	0,65	0,74		0,20			0,89	0,49	0,21
Limoneno	1031	0,40	0,34	0,54	0,56	0,60	0,79	0,37	0,76	0,44	0,34
Z- β -Ocimeno	1039	0,72	0,75	0,44					0,35	0,40	0,25
E- β -Ocimeno	1049	0,45	0,47	0,15					0,14	0,16	
γ -Terpineno	1056	1,74	1,67								
α -Terpinoleno	1082	0,44	0,44								
Terpinen-4-ol	1164			0,17		0,19			0,20	0,22	0,16
δ -Elemeno	1345										
α -Cubebeno	1352				0,22						
Copaeno	1372										
α -Ylangeno	1377	0,34	1,22	0,62	0,17	1,71	1,43	0,49	0,61		0,46
β -Burboneno	1378	0,37	0,48		0,21	0,26		0,36		0,17	0,62
β -cubebeno	1382										
β --elemeno	1383	0,72	0,80	1,06	0,35	0,31		0,92	0,67	1,05	1,01
Dodecanal	1408										
β --Cariofileno	1423	16,92	12,15	31,53	5,52	8,10	10,99	26,96	13,84	28,42	27,30
γ -Elemeno	1438									0,18	
β -Gurjuneno	1444				0,56	0,26					
α -Cariofileno	1450	1,63	1,22	3,00	0,80	1,12	1,39	2,53	1,43	2,57	2,50
E- β -Farneseno	1458	31,89	29,55	17,93	11,06	24,62	16,55	14,57	15,32	11,75	10,70
γ -Salineno	1474	1,34	2,07	1,19	1,87	2,43	1,68	1,73	1,21	1,70	1,54
Germacreno D	1476	2,36	2,78		0,25	0,26		1,20	1,20	1,11	1,36
β -Salineno	1481	1,24	1,88	1,06	1,74	2,30	2,04	1,45	0,99	1,66	1,28
Jasmolactona E	1481		0,36		0,27	0,18		0,46	0,21	0,37	0,18
β -Guaiano	1501				0,67	1,35	1,43	2,45		2,80	
α -Selineno	1504										
Biclogermacreno	1507			0,42	0,31	0,29					
α -Muuroleno	1513	0,66	0,68						0,35	0,34	0,16
Z- α -Bisaboleno	1518	0,61	0,62	0,24	0,70	0,63	0,16	1,01	0,71	0,69	0,47
γ -Cadineno	1519				0,41						
β -Bisaboleno	1521				0,36	0,62			0,27	0,23	
Z-Calameneno	1528									0,30	
Eicosano	1536										
δ -Cadinene	1541		0,59	0,71	0,84	0,57	0,82	1,52		1,15	
Z-Nerolidol	1564	0,54	0,78	2,12	10,83	3,23	6,01				
Espatulenol	1567	0,72	0,71	4,25			11,78	10,03	4,13	8,75	5,98
Oxido de Cariofileno	1569			0,31				0,67		0,45	0,56
Guaiol	1602						1,00	0,71	0,30	0,51	0,39
1-Epicubanol	1621		0,36	0,23					0,34	0,38	
10-epi- γ -eudesmol	1632				0,52	0,51			0,32	0,21	
β -Eudesmol	1648										
Acido Mirístico	1759	4,13	11,00								4,98
E-Fitol	2115	0,69	0,83								0,28
Monoterpenos Bonda							23,05				
Sesquiterpenos Bonda							55,20				
Total	80	85,21	84,66	87,11	59,11	75,66	88,47	83,14	81,04	84,90	74,91

Tabla 3-3: (Continuación)

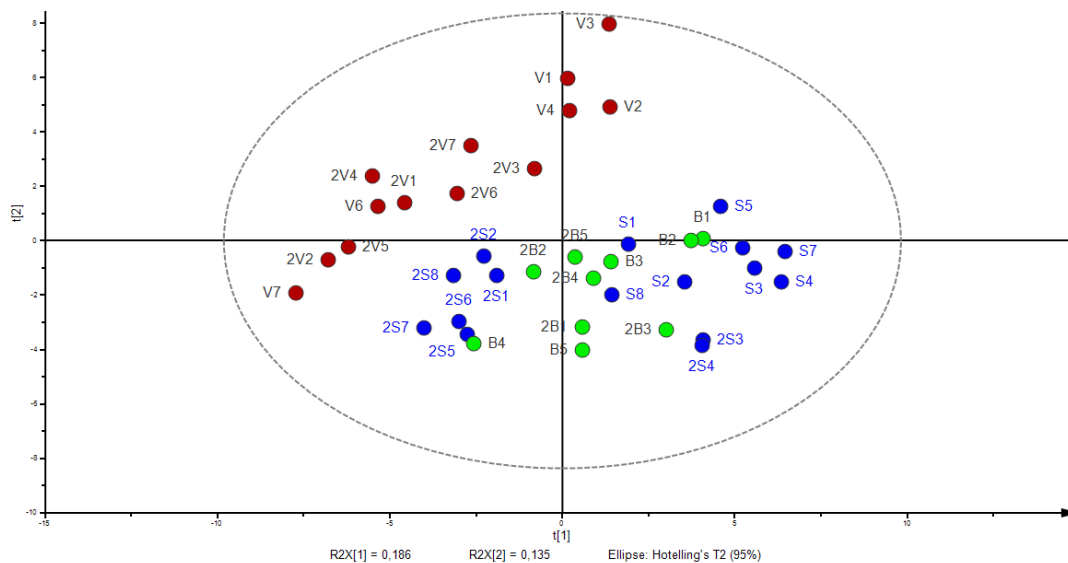
Compuestos	IR	La Vega													
		P1							P2						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
α -Tujeno	932		0,18												
α -Pino	937	0,50	1,82	1,38	3,38	0,49	5,82	1,58	5,83	1,52	3,86	2,91	1,98	0,63	0,56
Camfeno	944						0,25		0,24						
Sabineno	967	0,77	2,76	0,33	1,64	0,51	2,56	1,47	2,57	1,53		0,57	1,14		
β -Pino	971	0,37	0,96	0,60	1,34		2,28	1,12	2,51	1,24		1,10	0,65		0,36
Mirceno	985		0,44	0,17	0,38	0,26	0,18		0,30						
α -Felandreno	1008					2,73									
Isosilvestreno	1019														
<i>o</i> -Cimeno	1020	0,21	1,07			0,40	1,07	0,81	1,06	0,86	0,44	0,44	0,70	1,63	
β -Felandreno	1029		0,27											0,63	
Limoneno	1031	0,15	0,25		0,30		0,50	0,48	0,50	0,54		0,22	0,21		
Z- β -Ocimeno	1039	0,33	0,23	0,75	0,61	1,01									
E- β -Ocimeno	1049	0,21		0,56	0,45	0,71									
γ -Terpineno	1056		0,41		0,33	0,31									
α -Terpinoleno	1082					0,66									
Terpinen-4-ol	1164														
δ -Elemeno	1345	0,30		0,93		0,73									
α -Cubebeno	1352	0,17		0,48	0,64	0,94	0,20	0,36		0,35		0,36	0,35	0,78	0,17
Copaeno	1372			2,96											2,51
α -Ylangeno	1377	4,42	2,01	0,35	6,94	2,94	3,66	5,95	3,61	5,78	3,60	3,43	5,50	4,47	0,36
β -Burboneno	1378	0,40	0,48	0,71			0,69	1,10	0,42	1,06		0,40	0,33		0,80
β -cubebeno	1382				1,30	1,05	0,81	1,72	0,78			0,99			
β -elemeno	1383	1,32	0,85	2,15	1,33	0,92	1,17		1,18	1,57		1,24	1,19	2,16	1,56
Dodecanal	1408	0,43	0,20	0,42		0,56									
β -Cariofileno	1423	33,63	28,07	27,12	30,22	15,03	24,12	9,09	25,24	7,22	35,64	29,54	6,62	13,45	34,19
γ -Elemeno	1438	0,15		0,38											0,24
β -Gurjuneno	1444	0,11		0,25		0,71	0,52	0,54	0,73	0,72	3,04	0,91	0,25		
α -Cariofileno	1450	3,20	3,15	3,05	4,32	3,36	3,11	1,57	3,14	1,26		4,64	1,42	2,19	3,60
β -Farneseno	1458	18,57	23,08	15,02	12,94	16,27	4,61	2,81	7,58	10,72	5,34	5,65	1,02	1,98	10,28
γ -Salineno	1474	1,16	0,96	0,93	1,02	0,99	1,21	2,11	1,11			1,38	1,11		0,97
Germacreno D	1476	4,46	1,86	9,82	6,07	1,99	0,22		0,52		6,98	1,36			3,63
β -Salineno	1481	1,04	0,92	0,79	0,82	0,89	1,35	2,38	1,29	2,19		1,37	1,50		0,64
Jasmolactona E	1481	0,29	0,33	0,33			0,45	1,02	0,93	1,36					0,70
β -Guaieno	1501						2,26	1,55		1,71		3,96	0,30	0,73	1,27
α -Selineno	1504				0,42	0,48					6,98				
Biciclogermacreno	1507							0,51		0,65		0,29	0,30		0,33
α -Muurolo	1513	0,62	0,75	0,44		0,45									
Z- α -Bisaboleno	1518	0,54	0,41		0,28	0,39	0,79	0,39	0,39	0,82		0,39	0,39		0,43
γ -Cadineno	1519						0,52	0,70	0,52	0,73		0,91	0,44	0,65	0,33
β -Bisaboleno	1521	0,29			0,74	0,72	0,78	1,01	0,76	1,17		0,95	1,21	1,92	0,50
Z-Calameneno	1528			0,45											
Eicosano	1536											0,32			
δ -Cadinene	1541		0,32				1,22	1,22	1,16	1,12		0,64	2,03		1,27
Z-Nerolidol	1564	0,94	0,76	0,47	0,47	0,99	10,06	5,76	9,34	4,92	7,99			5,25	2,00
Espatulenol	1567	1,29	1,87	0,69	0,73	0,43	9,09	15,62	8,49	13,61		7,37	28,35	17,59	7,61
Oxido de Cariofileno	1569														
Guaiol	1602						1,12	1,82	1,06	1,86		1,08	3,90	2,06	0,85
1-Epicubeno	1621														
10-epi- γ -eudesmol	1632	0,23								0,43		0,33			0,30
β -Eudesmol	1648														
Acido Mirístico	1759	6,15	11,92		6,28	12,09									2,30
E-Fitol	2115					1,23									0,84
Monoterpenos La Vega									4,58						
Sesquiterpenos La Vega									66,37						
Monoterpenos Total =	16,51								60,39				Otros = 3,11		
Total	80,01	82,52	86,79	71,53	82,95	70,24	76,01	62,69	81,26	67,91	73,87	72,75	80,63	59,39	80,42

En los aceites esenciales de hojas de *P. caerulea* colectados en S, los compuestos mayoritarios corresponden al β -farneseno y β -cariofileno con valores del 38.98% y 23.62%, respectivamente. Teniendo en cuenta el periodo de colecta se observan diferencias marcadas como es el caso del δ -cadineno que solo se encuentra presente en el P2 del análisis. Con respecto a los aceites esenciales colectados en B, el β -farneseno (31.89%) y β -cariofileno (31.53%) fueron los componentes mayoritarios. Al igual que en el análisis anterior el periodo de colecta marca algunas diferencias, en el P2 se observa aumento en el porcentaje de abundancia del compuesto espatulenol, mientras que en este mismo periodo hay disminución en β -farneseno. Los aceites esenciales colectados en V se caracterizaron por presentar los compuestos mayoritarios β -cariofileno (35.64%) y espatulenol (28.35%), el compuesto *Z*- β -ocimeno estuvo influenciado por el tiempo de colecta solo se observó su presencia durante el primer periodo de colecta (P1).

- **Análisis Estadístico de Aceites Esenciales de Hojas *P. caerulea***

Los datos de tiempo de retención, abundancia relativa, índice de retención, lugar y periodo de colecta fueron procesados y organizados generando una matriz de 60 variables a partir de 38 muestras. El análisis de componentes principales permite explicar el 60% de la varianza total de los datos. A pesar de que no se observa una clara distinción de los individuos en cada región sí es posible esbozar una diferenciación entre algunos lugares de colecta (Figura 3-26).

Figura 3-26: Análisis de componentes principales de los datos obtenidos de los aceites esenciales de hojas de *P. caerulea* colectado en S, B y V”.



Después del análisis generalizado se llevó a cabo un discriminante por mínimos cuadrados ortogonales (OPLS-DA) teniendo en cuenta el lugar y periodo de colecta (Figura 3-27), en el primero se evidencian una diferenciación entre las muestras de acuerdo al origen de procedencia especialmente en las muestras colectadas en la V. En los individuos colectados en S y B, se identifican cierta similitud en la composición de sus muestras pero una mayor dispersión entre sí. Con respecto al tiempo de colecta, se observa que la mayoría de las muestras se pueden diferenciar en dos grandes grupos P1 y P2 haciendo referencias a los dos periodos del año (abril-octubre) en que se llevaron a cabo los muestreos. En el análisis se evidencia que las muestras de P1 tienen una alta dispersión y alguna de ella exhiben cierta similitud con P2 (Figura 3-28).

Figura 3-27: OPLS-DA de las muestras de *P. caerulea* de acuerdo al lugar de colecta (S, B y V)".

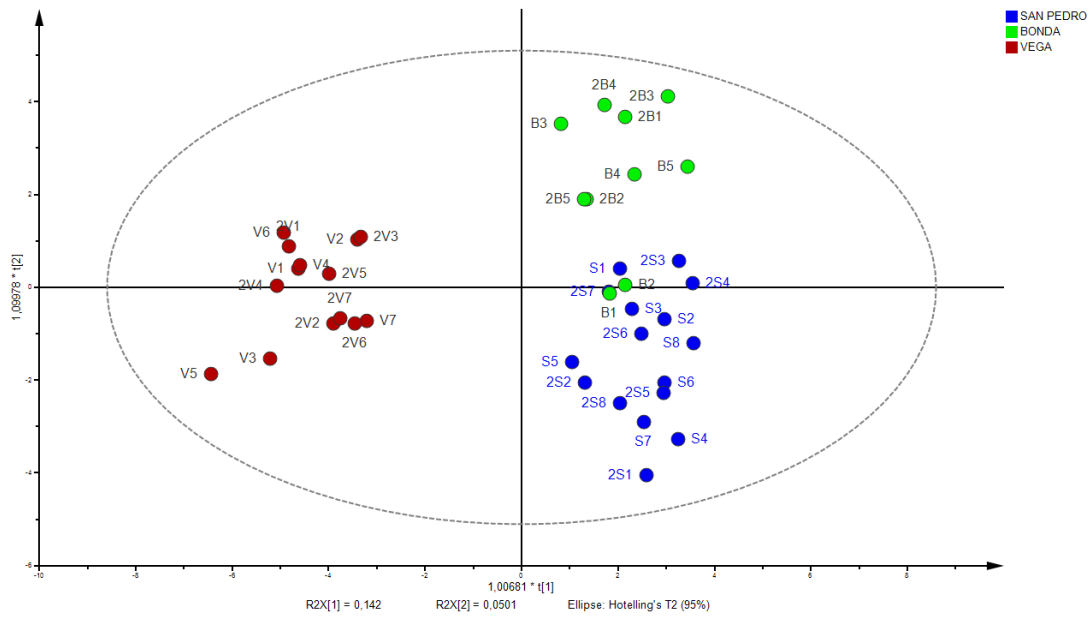
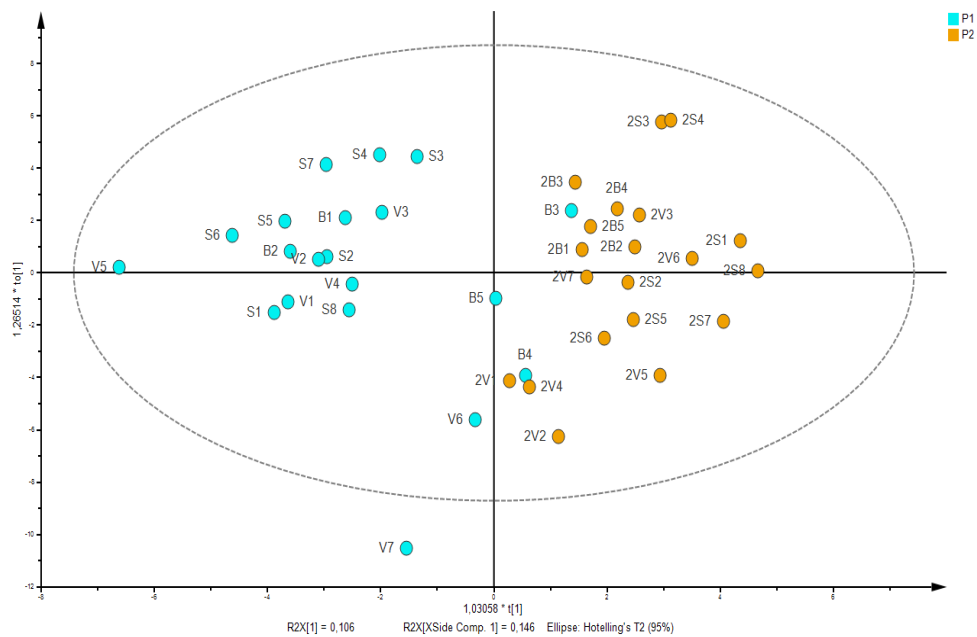


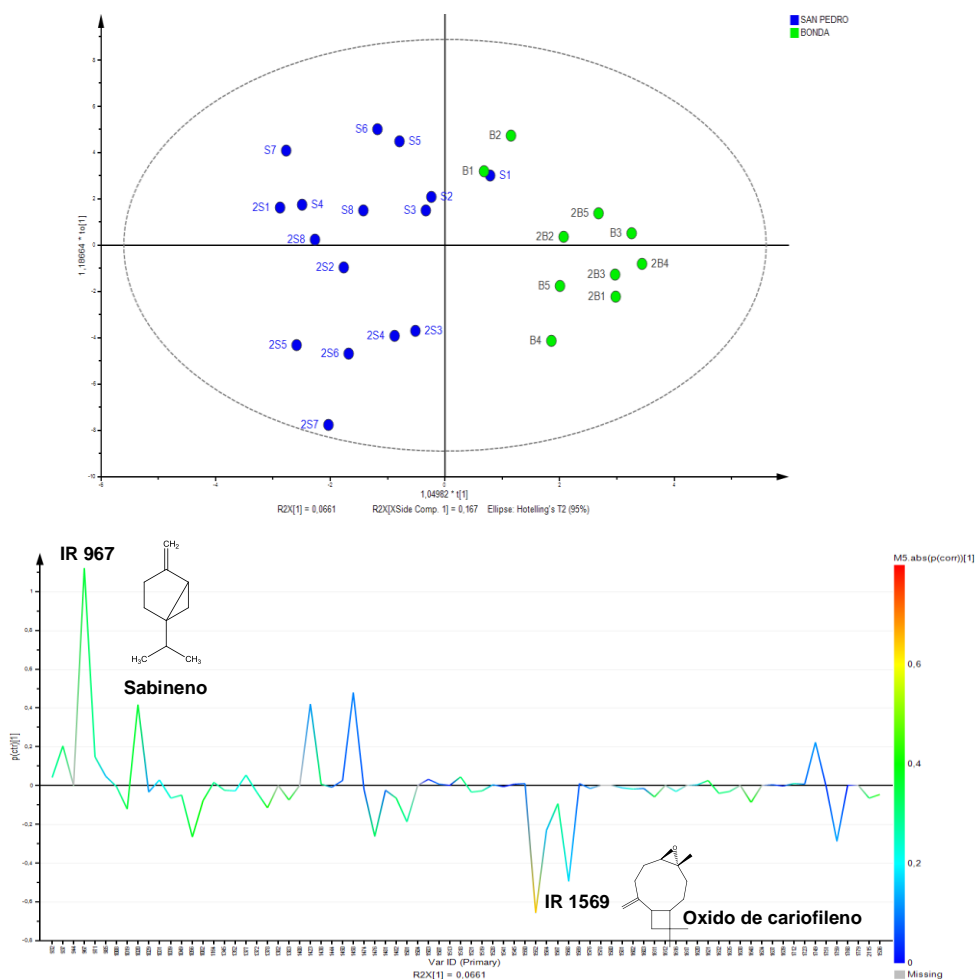
Figura 3-28: OPLS-DA de las muestras de *P. caerulea* de acuerdo al periodo de colecta (P1 y P2)



▪ Análisis por Lugar de Recolección

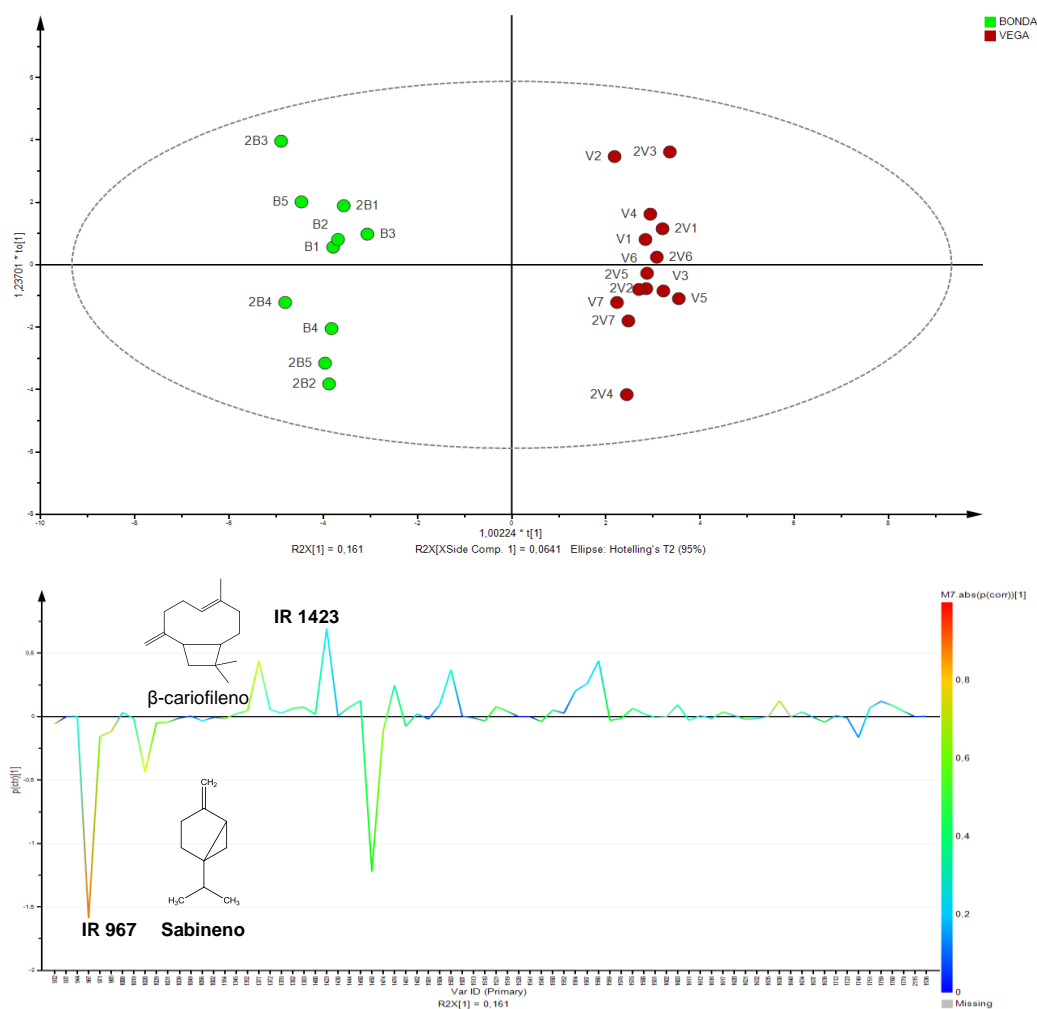
Al comparar entre los lugares de recolección, es posible determinar variables que influyen en la discriminación de muestras. El OPLS-DA entre S y B presenta una alta varianza en muestras de S pero a pesar de ello, se logra distinguir el lugar de procedencia de los individuos. El diagrama de carga indica que los compuestos que marcan diferencia entre las regiones corresponden a sabineno (IR 967), o-cimeno (IR 1020), β -cariofileno (IR 1423) y β -farnesenol (IR 1458) que se encuentra con mayor abundancia en las muestras de B, mientras que los metabolitos óxido de cariofileno (IR 1569) y NI (IR 1759) se encuentran presentes en mayor proporción en las muestras de S (Figura 3-29).

Figura 3-29: OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas San Pedro y Bonda. Análisis de diagrama de carga indicando los metabolitos responsables.



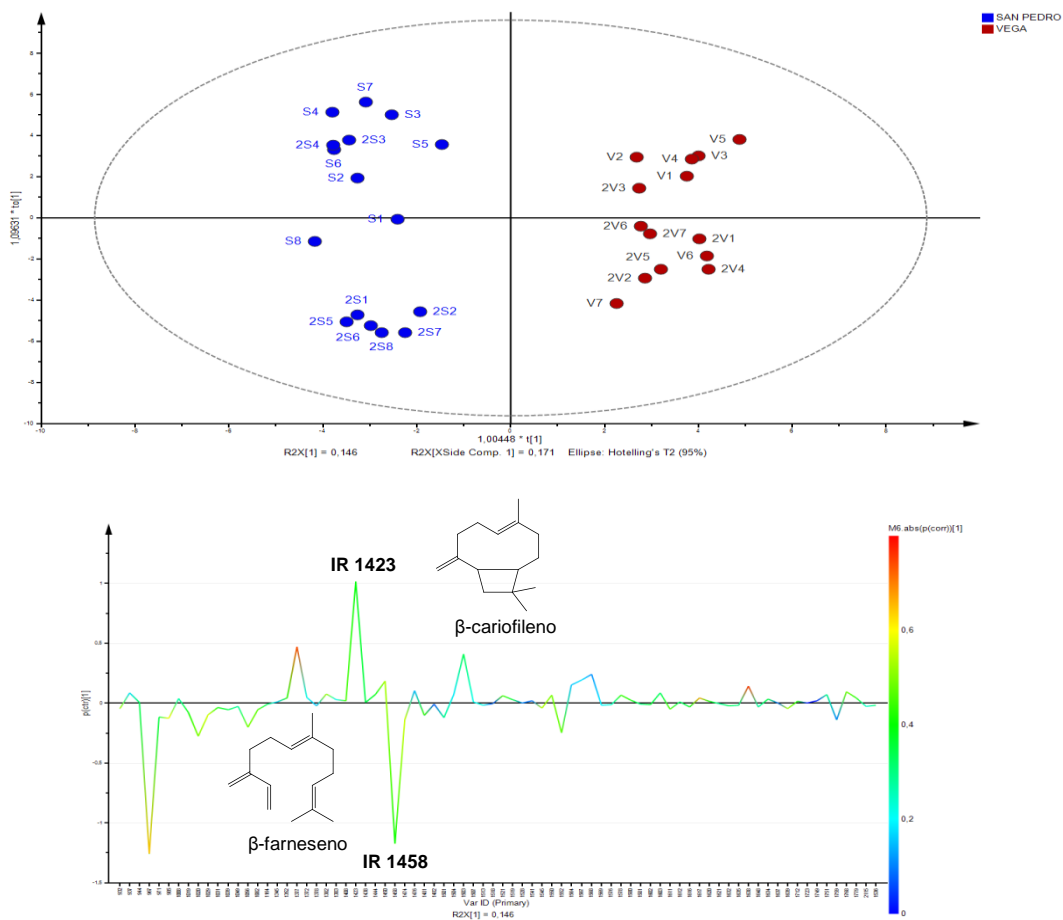
Al analizar las muestras entre las regiones B y V se observa que existe una particularidad en la composición de cada lugar que permite la diferenciación entre las muestras. En B se observa menor uniformidad en su composición, el análisis permite sugerir una pequeña diferencia entre ellas relacionadas con el periodo de colecta (P1-P2). Los individuos de V se caracterizaron por presentar mayor similitud en su composición química (Figura 3-30). El análisis permitió establecer como componentes que aportan la diferencia entre los lugares, los compuestos espatulenol (IR 1567), α -cubebeno (IR 1352), β -cariofileno (IR 1423), NI (IR 1503) presentes en V y los metabolitos sabineno (IR 967) y β -farneseno (IR 1458) en B.

Figura 3-30. OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas Bonda y Vega. Análisis diagrama de carga de los datos obtenidos de B y V señalando los metabolitos responsables.



El análisis de las muestras de S y V señala diferencias que permite separarlas por lugar de colecta, además se observa que no hay un comportamiento uniforme en la composición de las muestras y en cada caso, tanto en S como en V se observa una tendencia a separarse por periodo de colecta (P1 y P2) (Figura 3-31). Los compuestos que permiten diferenciar entre las regiones son sabineno (IR 967) y β -farneseno (IR 1458) que se encuentran en mayor abundancia en las muestras colectadas en S y α -yiangeno (IR 1377) y β -cariofileno (IR 1423) presentes en las muestras de V.

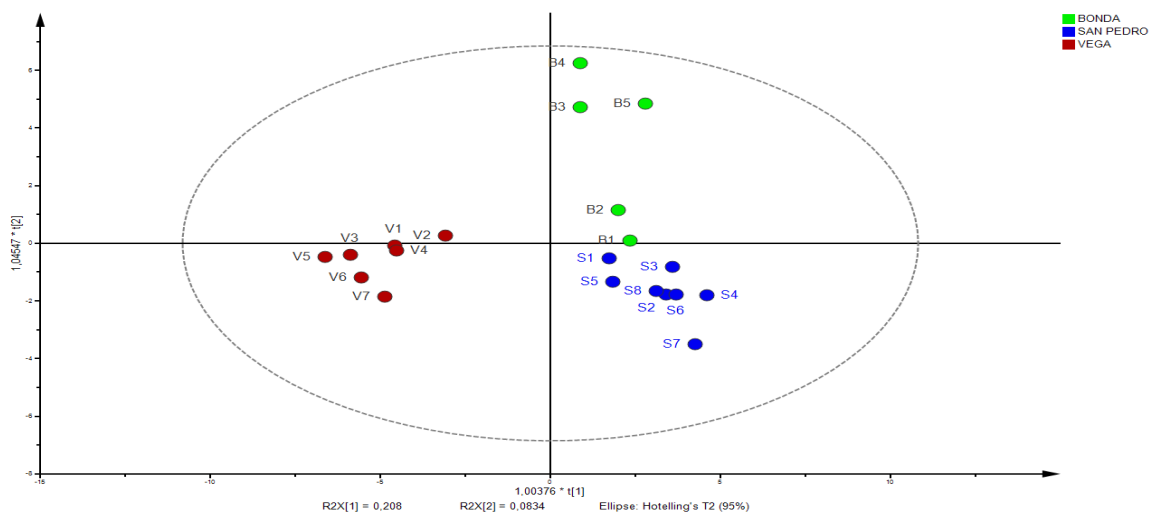
Figura 3-31: OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas San Pedro y Vega. Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos indicando los metabolitos responsable (inferior).



▪ Análisis por Periodo de Colecta

Al comparar entre los periodos o tiempo de colecta es posible determinar algunas variables que influyen en la discriminación de muestras. El OPLS-DA de las muestras colectadas durante P1 permite diferenciar de manera clara las tres regiones, además, se observa una homogeneidad en el comportamiento químico en las muestras de V y S. Para el caso de B hay mayor dispersión y algunas muestras parecen tener un composición química semejante a las de S (Figura 3-32).

Figura 3-32. PCA-OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas San Pedro, Vega y Bonda colectadas en el primer periodo (P1).



El análisis de P1 permite inferir que los compuestos responsables de las diferencias entre V - B y V - S corresponden a β -cariofileno (IR 1423) con mayor abundancia relativa en las muestras de la V; sabineno (IR 967) y β -farneseno (IR 1458) en las muestras de B y S (Figura 3-333). Para el caso de las muestras entre S y B las diferencias están determinadas por los compuestos β -farneseno (IR 1458) y ácido mirístico (IR 1759)

presentes en S y Z-nerolidol (IR 1564) e isosilvestreno (IR 1019) presentes con mayor abundancia en las muestras de B (Figura 3-34).

Figura 3-33. Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos al comparar muestras de V y B.

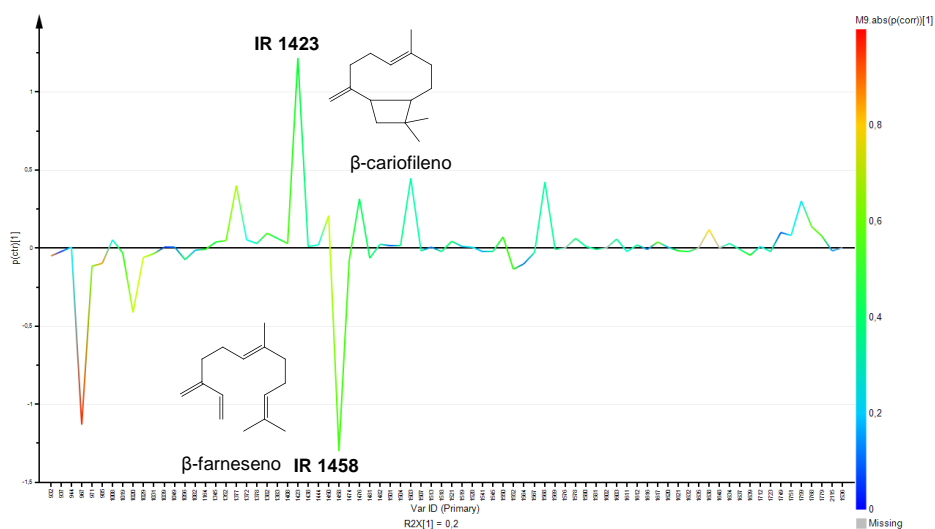
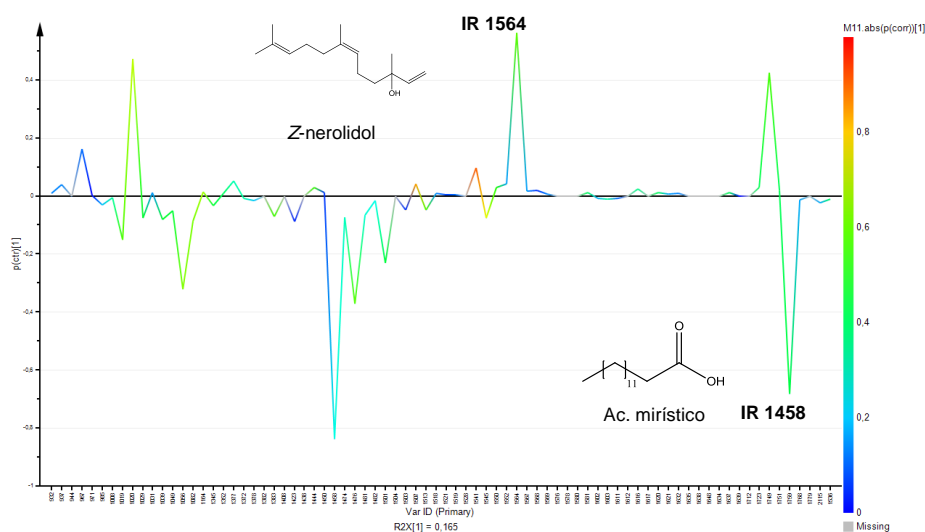
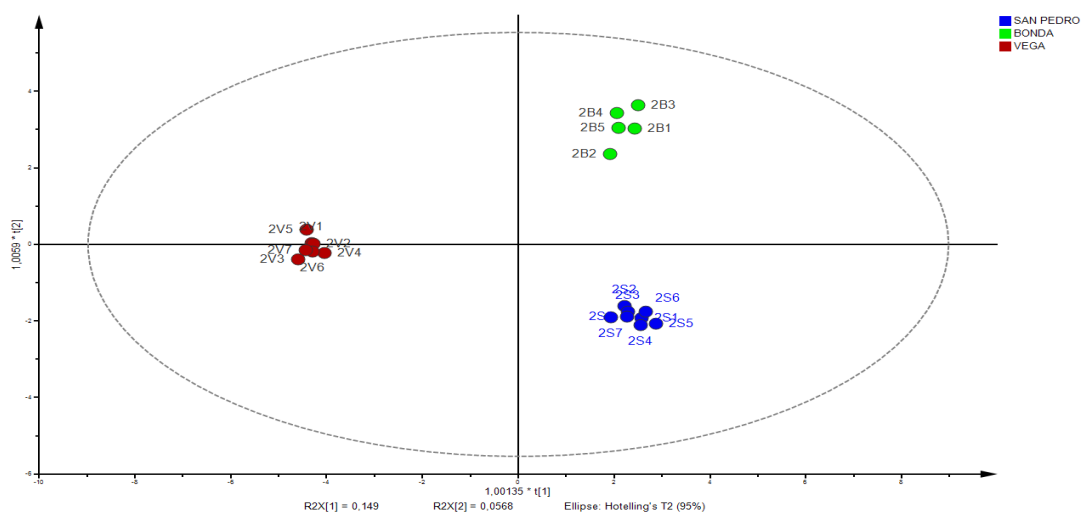


Figura 3-34. Análisis de diagrama de carga de los datos obtenidos al comparar muestras de S y B



El análisis por OPLS-DA de las muestras colectadas durante P2 permitió deducir un comportamiento diferencial muy claro entre las tres regiones, además se observó una definida similitud en la composición química entre las muestras de un mismo lugar (Figura 3-35).

Figura 3-35. OPLS-DA de las muestras de aceites esenciales de hojas San Pedro, Vega y Bonda colectadas en el segundo periodo (P2)



Las diferencias observadas en este periodo (P2) entre las muestras de B y V (Figura 3-36) se debe a la presencia de los metabolitos con IR 967 (sabineno), 1458 (β -farneseno) en B y 1377 (α -yiangeno) en V, para el caso de las muestras ubicadas en S y V los volátiles que marcan la diferencia de las muestras, son IR 967 (sabineno), 1458 (β -farneseno), 1020 (α -cimeno) colectadas en S, y 1377 (α -yiangeno), 1423 (β -cariofileno), 1567 (NI) en V. Al comparar los aceites esenciales obtenidos en B y S el análisis estadístico permite determinar que los compuestos con IR 967 (sabineno), 1423 (β -cariofileno), 1458 (β -farneseno) presentes en B y 1564 (NI), 1588 (NI), 1584 (NI) presentes en S, son los responsables de las diferencias entre las muestras colectadas en estas dos regiones.

3.4 Conclusiones

- El análisis de componente principales de los extractos etanólicos de hojas, corteza y madera de la especie *P. caerulea* permitió deducir que existe una clara distinción en la composición química entre las tres estructuras evaluadas (hojas, corteza y madera), especialmente de las hojas donde se observa mayor diferencia en comparación con corteza y madera, esto a pesar de que procedan de diferentes lugares y hallan estado expuestas a diferentes condiciones ambientales.
- El análisis multivariado de los extractos etanólicos de la especie *P. caerulea* permitió concluir que a pesar de que se observa cierto grado de varianza entre los individuos colectados en el mismo sitio o lugar, existe una diferenciación en la composición de cada estructura de la planta (hojas, corteza y madera) con respecto a los diferentes lugares de colecta: San Pedro de la Sierra, Bonda y La Vega.
- Los resultados del análisis estadístico permite sugerir que los metabolitos quercetina-3-O- β -glucósido (**HPc13**), quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosido (**HPc15**), kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosido (**HPc16**), escopoletina (**CPc2**), y los compuestos sin identificar que eluyeron en 8.1, 9.7, 10.5, y 10.7 min (madera), son los posibles responsables de las diferencias observadas entre los extractos evaluados por estructura y lugar de colecta.
- El análisis comparativo de los aceites esenciales de hojas de *P. caerulea* evidencia una diferencia clara entre los lugares de colecta. Las muestras de la Vega se observa mayor distinción en su composición química con respecto a los demás lugares. Entre las muestras de San Pedro de la Sierra y Bonda se presenta mayor similitud, hecho que se apoya en que poseen los mismos compuestos mayoritarios y el porcentaje de monoterpenos y sesquiterpenos presentes son muy semejantes. El análisis con respecto al tiempo de colecta, evidencia que gran parte de las muestras se pueden diferenciar en dos grandes grupos P1 y P2, haciendo referencias a los dos periodos de análisis evaluados (abril-octubre).

4. Actividad Antifúngica, Antibacteriana y Citotóxica de Extractos, Aceites Esenciales, Compuestos aislados y Transformados

4.1 Generalidades

Muchos estudios recientes, muestran una concordancia significativa entre el uso tradicional de plantas por parte de los indígenas y el trabajo experimental que ha permitido el desarrollo de la actividad antibacteriana, antifúngica, anticancerígena y antiviral en todo el mundo (Fabricant et al., 2001).

Además, de diversas plantas medicinales se han producido drogas como: quinina, vincristina, digoxina, digitoxina, emetina y artemisina, consideradas hoy en día como nuevos compuestos farmacéuticos. Un estudio mostró que de 104 compuestos que han sido utilizadas en el mundo como drogas, 60 de ellos se originaron a partir de plantas medicinales tradicionales Chinas (Gen et al., 1986). Más recientemente reportes revelan que algunos de los flavonoides derivados de plantas son extremadamente activos a nivel nanomolar contra bacterias y son más activos que antibióticos bien establecidos como vancomicina y tetraciclina (Fabricant et al., 2001; Daglia et al., 2011; Gen et al., 1986). Por lo tanto, la búsqueda de bioactividad en plantas medicinales es extremadamente importante para identificar candidatos promisorios que sean fuente de potenciales agentes terapéuticos de tipo antimicrobiano y citotóxico.

La epidemiología de infecciones invasivas ha cambiado significativamente en los últimos 30 años; como resultado, micosis y enfermedades bacteriales actualmente son consideradas como enfermedades emergentes. Esta es una área importante que

demanda el descubrimiento de nuevos y efectivos agentes antimicrobianos para enfrentar cepas de patógenos resistentes a los antibióticos (Gullo et al., 2009).

El cáncer por su parte, es una de las principales causas de muerte en el mundo, con registros de 14 millones de casos por año y 8.2 millones de muertes en el año 2014, motivo por el cual se quiere incrementar la búsqueda de agentes anti-neoplásicos, principalmente de origen natural, ya que recientes investigaciones han demostrado que los productos naturales son más efectivos que los sintéticos, debido a un mayor efecto terapéutico y menos efectos secundarios indeseados en el tratamiento del cáncer (Ferlay et al., 2014; Terrasse et al., 2014) .

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos son una prioridad especialmente en países tropicales y naciones en desarrollo donde enfermedades infecciosas y agentes cancerígenos están poco reguladas. Por consiguiente, la identificación de nuevas fuentes de compuestos antimicrobianos y anticancerígenos es una importante tarea para el desarrollo de drogas y la innovación de estrategias que contribuyan al adelanto de protocolos de búsqueda constantemente desarrollados.

En el género *Persea* se han desarrollados diversos estudios enfocados en la búsqueda de agentes terapéuticos de tipo antifúngico, antibacteriano y citotóxico. De la especie *P. americana* existen varios reportes que señalan su actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares (Oberlies et al., 1998), (Butt et al., 2006). En cuanto a la actividad antimicrobiana, el aceite esencial de *P. duthiei*, *P. odoratissima* y *P. gamblei* han exhibido actividad antibacterial frente a diversas bacterias Gram positiva y Gram negativa (Joshi et al., 2010) y diversos metabolitos aislados de *P. americana* han presentado actividad antifúngica contra diversos organismos (Rodríguez-Saona et al., 2000) (Domergue et al., 2000).

Con el objetivo de aportar a la búsqueda de posibles agentes terapéuticos en el género *Persea* en el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana, antifúngica y citotóxica de extractos vegetales, aceites esenciales, compuestos aislados y derivados obtenidos de *P. caerulea*.

4.2 Metodología

4.2.1 Derivados Hemisintéticos del Flavonol Quercetina

- **Materiales y Métodos**

Las separaciones cromatográficas en capa delgada se llevaron a cabo empleando sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck o cromatoplasmas de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck; las separaciones cromatográficas en columna se realizaron empleando sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh) y Sephadex LH-20. En todos los casos, los criterios de selección de fracciones para purificación posterior fueron perfil cromatográfico y cantidad en masa de la fracción misma. El control de pureza se efectuó en CCD empleando siempre luz UV, vapores de yodo y vainillina en ácido fosfórico como reveladores. Los solventes empleados para las separaciones cromatográficas fueron grado técnico (destilados antes de su uso) y/o grado analítico. Los compuestos aislados fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas convencionales que incluyen RMN, EM, UV y por comparación de los datos obtenidos con la literatura.

Los espectros RMN (¹H, ¹³C, DEPT 135, COSY, HMQC, HMBC) fueron tomados en los espectrómetros Bruker Avance 400 y Bruker Avance III a 500 MHz con criosonda de 1.7 mm, a 400 MHz y 500 MHz para ¹H ; 100 MHz y 125 MHz para ¹³C empleando CDCl₃, acetona-*d*₆, CD₃OD, DMSO-*d*₆, como solventes. Los datos de desplazamiento químico están expresados en ppm con TMS como estándar interno ($\delta=0$) y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz. Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en un espectrómetro Perkin-FT-IR Panagon-500 serie 1000, en pastilla de KBr y en ventana de NaCl.

Los solventes utilizados como eluyentes en cromatografía fueron destilados antes de su uso. El diclorometano, el tolueno y el benceno fueron destilados en presencia de CaH₂. El tetrahidrofurano (THF) y el N,N dimetilformamida (DMF) se destilaron con sodio/benzofenona y BaCl₂ respectivamente, bajo nitrógeno, justo antes de su utilización. El resto de los reactivos fueron adquiridos comercialmente y utilizados sin purificación adicional.

Los espectros de masas de alta resolución se realizaron en una plataforma maXis HPLC-ESI-TOF de Bruker, empleando ionización por electrospray en modo positivo o negativo, de acuerdo al tipo de compuesto, y con ayuda de experimentos MS2 seleccionando el pseudo-ión molecular. Siempre se hizo un scan entre 100,0000 y 1000,0000 *m/z*.

- **Esteres de Aminoácidos Derivados de la Quercetina**

Esteres del Triptófano

A una disolución de quercetina **HPc11** (26 mg, 0.087 mmol) en THF (15 mL) se le adicionó DCC (*N,N*-diciclohexilcarbodiimida) (1.5 mg, 0.104 mmol) DMAP (4-dimetilaminopiridina) (1.5 mg, 0.012 mmol) y Boc-Trp-OH (*N-ter*-butoxicarbonil-L-triptófano) **A1** (63 mg, 0.209 mmol) la mezcla de la reacción fue agitada a temperatura ambiente por 10 h (Huang et al., 2009). El producto obtenido fue filtrado y sometido a CC empleando como sistema de elución CH₂Cl₂/MeOH 95:5 y posteriormente purificado mediante Sephadex LH-20 utilizando MeOH como eluyente; obteniéndose un sólido amarillo denominado **HPc11a** (R 42%). En la **Figura 4-1** se observa un esquema general de la reacción.

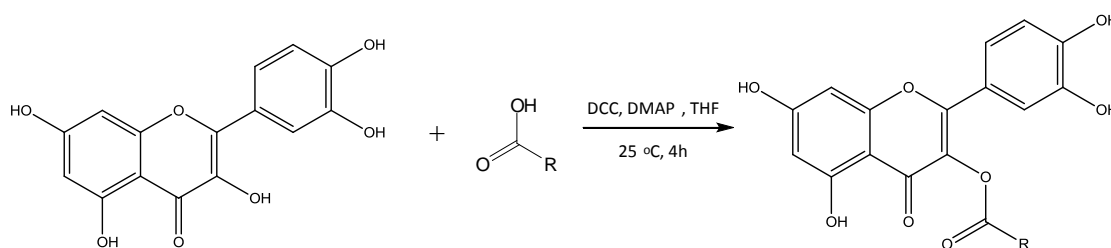
Esteres de la Prolina

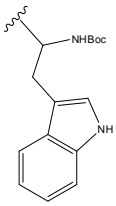
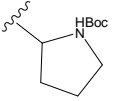
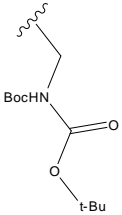
Empleando un procedimiento similar para la obtención de **HPc11a**, la mezcla de quercetina **HPc11** (26 mg, 0.087 mmol), DCC (1.5 mg, 0.104 mmol), DMAP (1.5 mg, 0.012 mmol) y Boc-Pro-OH (*N-ter*-butoxicarbonil-L-prolina) **A2** (45 mg, 0.209 mmol) en THF (15 mL) fue agitada a temperatura ambiente por 10h (Huang et al., 2009). El crudo obtenido fue purificado por CC utilizando CH₂Cl₂/MeOH 95:5, permitiendo la obtención de un sólido amarillo denominado **HPc11b** (R 46%) (Figura 4-1).

Esteres de la Glicina

Utilizando un procedimiento similar para la obtención de **HPc11a**, partiendo del aminoácido Boc-Gli-OH (*N*-*ter*-butoxicarbonil-L-glicina) **A3** (36.7 mg, 0.209 mmol) (Huang et al., 2009), se obtuvo un sólido amarillo denominado **HPc11c** (R 38%) (Figura 4-1).

Figura 4-1: Esquema general de la reacción para la obtención de los ésteres de aminoácidos.

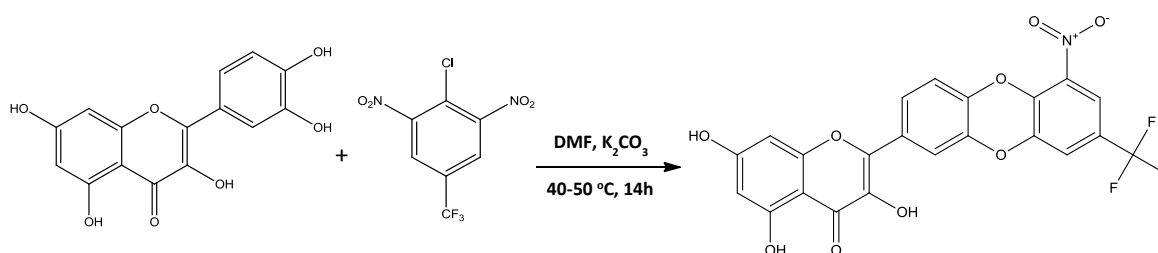


Aminoácido	R	Producto
A1		HPc11a
A2		HPc11b
A3		HPc11c

▪ Derivado de la Quercetina con Grupo Trifluorometilo

A una disolución de quercetina **HPc11** (26 mg, 0.087 mmol) en 5 mL DMF se le adicionó 2-cloro-5-trifluorometil-1,3-dinitrobenzoceno (22 mg, 0.087 mmol) y K_2CO_3 (100 mg), la mezcla se llevó a agitación durante 14h a una temperatura de 40-50 °C (Figura 4-2) (Tempesti et al., 2012). La reacción fue monitoreada por CCD. El crudo fue extraído con acetato de etilo y agua, la fase orgánica fue secada y el sólido obtenido fue purificado por CC empleando como fase móvil $CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5. El producto correspondiente a un sólido amarillo, fue denominado **HPc11d** (R 58%).

Figura 4-2: Esquema general de la reacción para la obtención del derivado con grupo trifluorometilo de la quercetina.



4.2.2 Estudio de citotoxicidad en líneas celulares tumorales

En este ensayo se evaluaron los extractos, aceites esenciales (empleados en el estudio químico comparativo), metabolitos aislados y derivados de la especie *P. caerulea*. La evaluación de la actividad citotóxica se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacogenética del Cáncer, Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, bajo la asesoría del Profesor Fabio Aristizabal.

Se emplearon cinco líneas celulares: A-549 (carcinoma de pulmón), HT-29 (carcinoma de colón), Hep G2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB 231 (cáncer de seno) y Hela (cáncer de cervix) todas de crecimiento adherente, derivadas de tumores sólidos humanos, obtenidas del Banco de Células del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, en Bogotá. Estas líneas fueron escogidas dentro

un panel de líneas celulares de tumores humanos ya que representan neoplasias con alta incidencia en nuestra población. Todas fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial (MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS), gentamicina (50 µg/mL) y bicarbonato de sodio (2,2 g/L), en cajas de cultivo estériles de 75 cm², e incubadas en condiciones estándar. Para el mantenimiento de los cultivos se realizó cambio de medio cada dos días lavando las células con solución tampón de fosfatos (PBS) de 298 mOsm/L y pH=7,3 (Escobar et al., 2010).

Las células al alcanzar un 90% de confluencia, fueron lavadas con solución de fosfatos (PBS) y tripsinizadas (Trypsina :0,025% + EDTA 0,03%) durante 5 minutos a 37°C. Luego se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer por medio del método de exclusión de azul de tripán. En cada pozo de la placa de 96 pozos fueron sembradas 3500 células para las líneas celulares en estudio. Después se incubaron por 24 horas a las condiciones previamente mencionadas, con el fin de permitir la adherencia de las células a la superficie del pozo. Al cumplir las 24 horas se adicionaron los tratamientos (Medio + Tratamiento) a las concentraciones establecidas y se incubaron por 72 horas. Sin embargo, algunos pozos fueron usados para establecer el control de crecimiento (Medio + células): con el fin de demostrar que las células durante el tiempo de cultivo permanecieron viables y que estaban en óptimas condiciones para su crecimiento y blancos de tratamiento (Tratamiento + medio - sin células: para demostrar que los tratamientos no estaban contaminados y como punto de comparación durante el análisis de los resultados para los cálculos de CL₅₀). Se realizaron tres replicas por concentración y tres repeticiones en diferentes días (Morantes et al., 2006).

Para valorar el efecto citotóxico de los compuestos puros, se prepararán, tres diluciones seriadas, en medio MEM suplementado con 5% de FBS, obteniendo las siguientes concentraciones finales: 0.5 µg/mL, 5 µg/mL y 50 µg/mL (Gómez et al., 2006); como control positivo se empleó doxorubicina.HCl. Para la evaluación de los extractos y aceites esenciales, las muestras fueron disueltas en DMSO para obtener una concentración final de 125µg/mL (Stock). Posteriormente se evaluaron tres diferentes concentraciones, 1,25 µg/mL 12,5 µg/mL y 125 µg/mL. Después de un tratamiento durante 48 horas, se determinó paralelamente la población celular viable mediante los ensayos con MTT y resazurina. Para establecer la influencia de los factores de tratamiento sobre las líneas celulares empleadas se realizó un análisis de varianza

(ANOVA). Los valores de CL_{50} se expresaron en $\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$ (Desviación estándar) y se determinaron por medio del software GraphPad 5.0-Prism.

4.2.3 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

Se llevó a cabo la evaluación de extractos, aceites esenciales, metabolitos aislados y derivados contra los hongos *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y los organismos bacterianos *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (SARM). La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo en el Laboratorio de ensayos clínicos del Instituto Fundación Medina en Granada, España. Un total de 60 extractos etanólicos y 15 aceites esenciales (estudio químico comparativo) fueron sometidos a evaluación de actividad antimicrobiana.

4.2.3.1 Ensayo de Actividad Antifúngica sobre *Aspergillus fumigatus*

La determinación de la actividad antifúngica de extractos, aceites esenciales, compuestos y derivados contra *A. fumigatus* se realizó utilizando microdilución en placa de 384 pocillos. Las cepas empleadas para el ensayo antifúngico corresponden a *A. fumigatus* ATCC 46645. Para el ensayo fue usada una suspensión de conidios a una concentración de $2,5 \times 10^4$ UFCmL⁻¹. La viabilidad celular fue medida utilizando resazurina a una concentración final de 0,002 % y el crecimiento de las colonias se llevó a cabo en medio RPMI-1640 modificado (Vicente et al., 2009). Todas las muestras se disolvieron en DMSO con un volumen de 4 μL /pozo para extractos y aceites esenciales y 0,8 μL /pozo para los compuestos. El volumen final fue de 50 μL /pozo en placas de microtitulación de 384 pozos. Anfotericina B fue utilizada como control positivo. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 25-30 h. Los ensayos se realizaron por triplicado. La lectura se llevó a cabo en EnVision® Multilabel (Perkin Elmer) utilizando la longitud de onda estandarizada para resazurina (excitación 570 nm y emisión 600 nm).

Los porcentajes de reducción de resazurina e inhibición del crecimiento fueron determinados mediante la ecuación:

% reducción

$$= 100 \times \left(\frac{\text{Intensidad fluorescente (IF) del agente de ensayo} - \text{IF del control sin tratar}}{\text{IF de la resazurina reducida} - \text{IF del control sin tratar}} \right)$$

% inhibición = 100 - % reducción

Los extractos y compuestos fueron considerados activos cuando su porcentaje de inhibición fue superior a 55%.

▪ **Ensayo de Actividad Antifúngica sobre *C. albicans***

La suspensión stock de inóculos fue sembrada en placas sobre Agar Dextrosa Sabouraud (ADS, 65 g L⁻¹) e incubadas por 18 h a 37 °C. El crecimiento de los microorganismos fue realizado en placas con ADS y suspendidas en medio modificado de RPMI-1640 con el fin de preparar un inóculo ajustado a 2.5 en 660 nm. En estas condiciones la suspensión fue diluida 1:10 y empleada para inocular las placas. La actividad antifúngica se obtuvo utilizando como revelador resazurina y el ensayo y los resultados obtenidos fueron desarrollados como se describió anteriormente para *A. fumigatus*.

▪ **Ensayo de Actividad Antibacteriana sobre *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus* (SARM)**

Los ensayos antibacterianos se llevaron a cabo con suspensiones stock de inóculos de cada microorganismo (SARM, y *A. baumannii*) sembradas en placas con agar Luria-Bertani (LBA, 40 g/L) e incubadas a 37 °C durante toda la noche. Colonias individuales de cada organismo fueron inoculadas en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB, 25 g/L en matraces Erlenmeyer de 250 mL) llevadas a incubación y agitación a 220 rpm, y posteriormente diluidas hasta obtener inóculos de ensayos de aproximadamente 1.1x10⁶ CFU/mL (SARM) o 5-6 x 10⁵ UFC/mL (*A. baumannii*)

El ensayo se llevó a cabo mezclando 90 µL (por pozo) del inóculo con 1.6 µL (por pozo) de cada compuesto (disuelto en DMSO). Se emplearon como control interno vancomicina para SARM y rifampicina para *A. baumannii*. La absorbancia en OD₆₁₂ fue medida en un espectrómetro Tecan Ultraevolution (Tecan, Durham, USA) a T₀ (tiempo cero) e

inmediatamente después las placas fueron incubadas a 37 °C durante 20 h. Después de este periodo, las placas se llevaron a agitación empleando un DPC Micromix 5 y una vez más se determinó la absorbancia a OD₆₁₂ a T_f (tiempo final). El porcentaje de inhibición del crecimiento fue calculado empleando la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times \{1 - [(T_f \text{ muestra} - T_0 \text{ muestra}) - (T_f \text{ blanco} - T_0 \text{ blanco})] / [(T_f \text{ crecimiento} - T_0 \text{ crecimiento}) - (T_f \text{ Blanco} - T_0 \text{ Blanco})]\}$$

Los extractos y compuestos fueron considerados activos cuando su porcentaje de inhibición fue superior al 55%.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Esteres de Aminoácidos Derivados de la Quercetina

La esterificación de la quercetina (obtenida de hojas *P. caerulea*) a partir de los aminoácidos **A1**, **A2** y **A3**, permitió la formación de tres derivados **HPc11a**, **HPc11b** y **HPc11c**, cuya diferencia estructural radicó en la sustitución del hidrogeno del grupo OH en en el C3 del núcleo C de la quercetina por cada uno de los aminoácidos **A1**, **A2** y **A3**. Los derivados **HPc11a**, **HPc11b** y **HPc11c** fueron identificados por comparación de los espectros de RMN y los EMAR de **HPc11**, **A1**, **A2** y **A3** (Figura 4-3 a 4-12).

Figura 4-3: Espectro RMN ¹H de la quercetina (**HPc11**), 400 MHz, Acetona-d₆

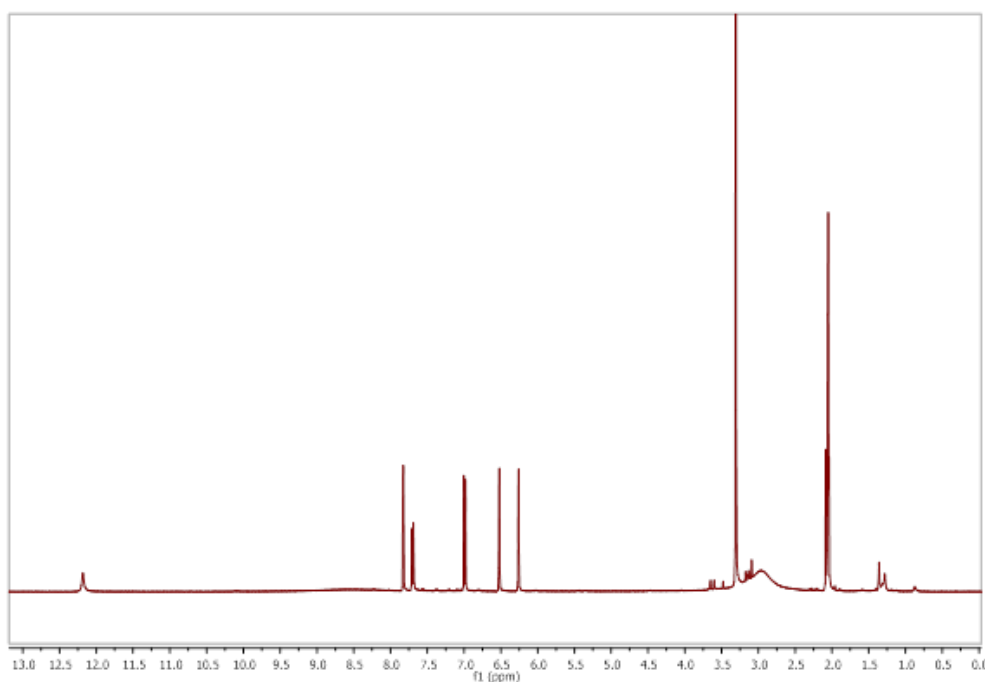


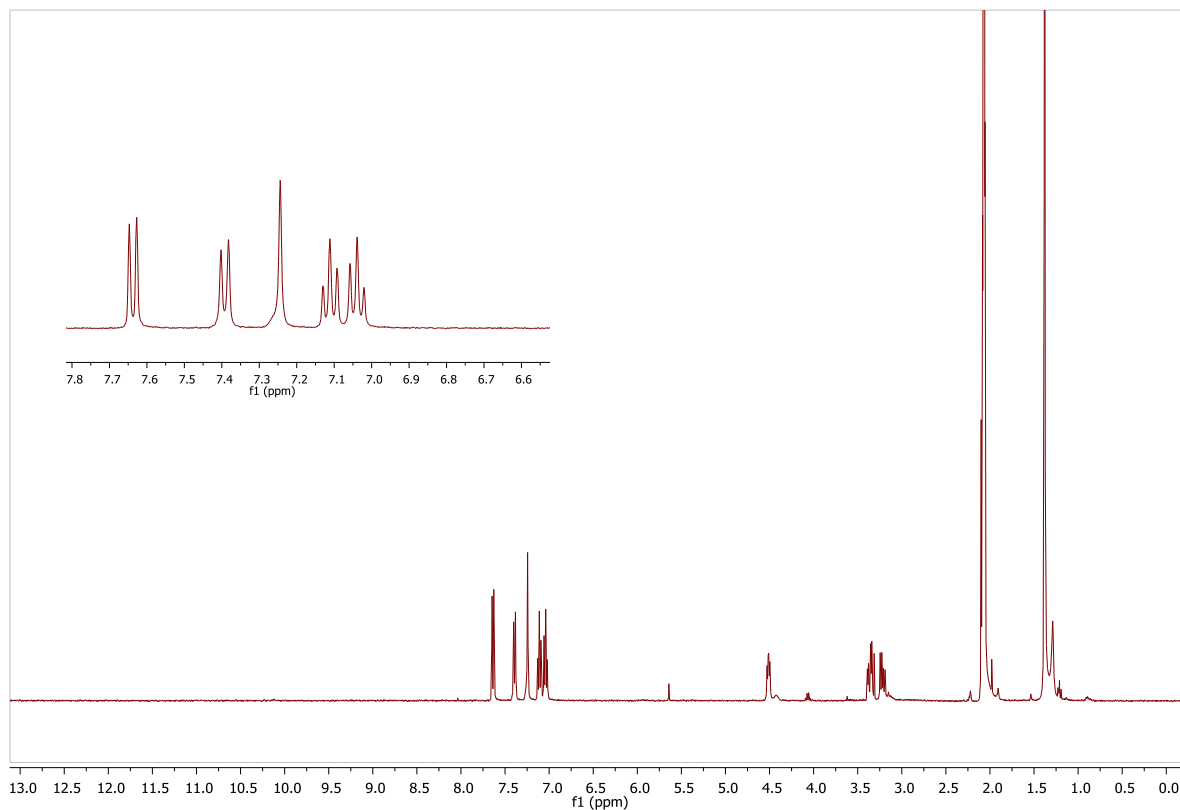
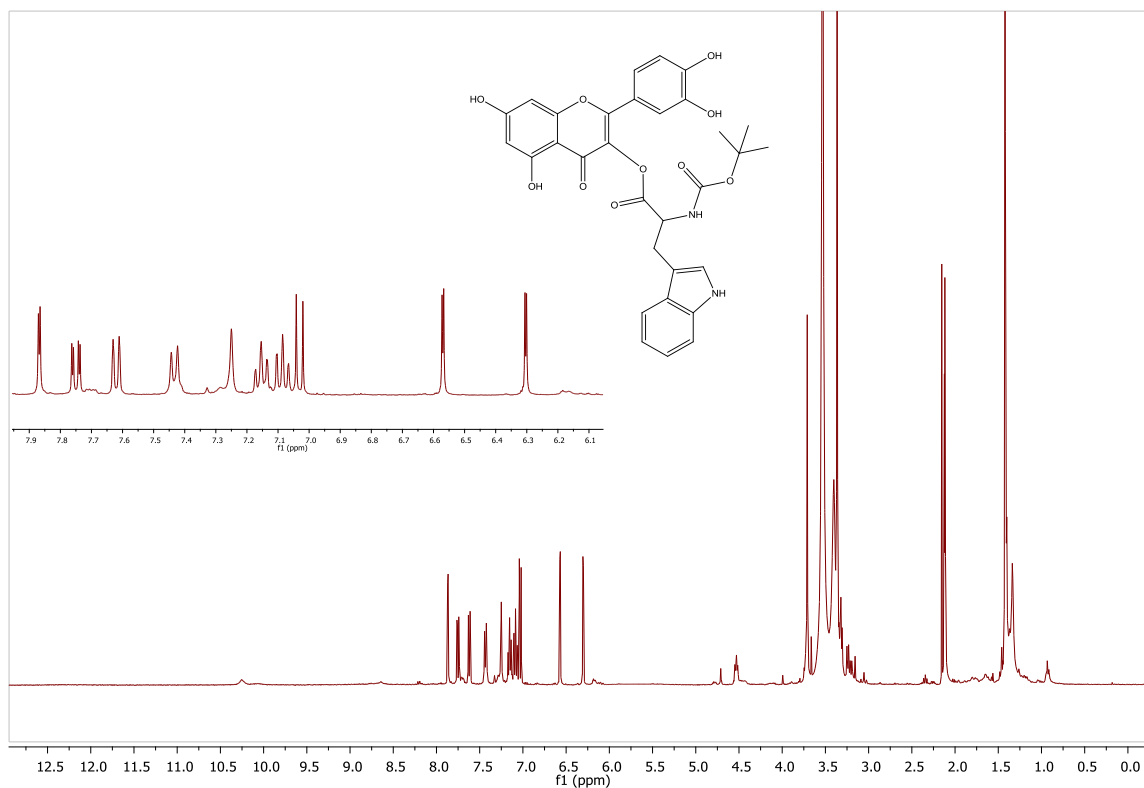
Figura 4-4: Espectro RMN ^1H de *N*-*ter*-butoxicarbonil-L-triptófano **A1**, 400 MHz, CDCl_3 **Figura 4-5:** Espectro RMN ^1H del derivado **HPc11a**, 400 MHz, Acetona- d_6 

Figura 4-6: Espectro RMN ^1H de *N*-*ter*-butoxicarbonil-L-prolina (**A2**), 400 MHz, Acetona- d_6

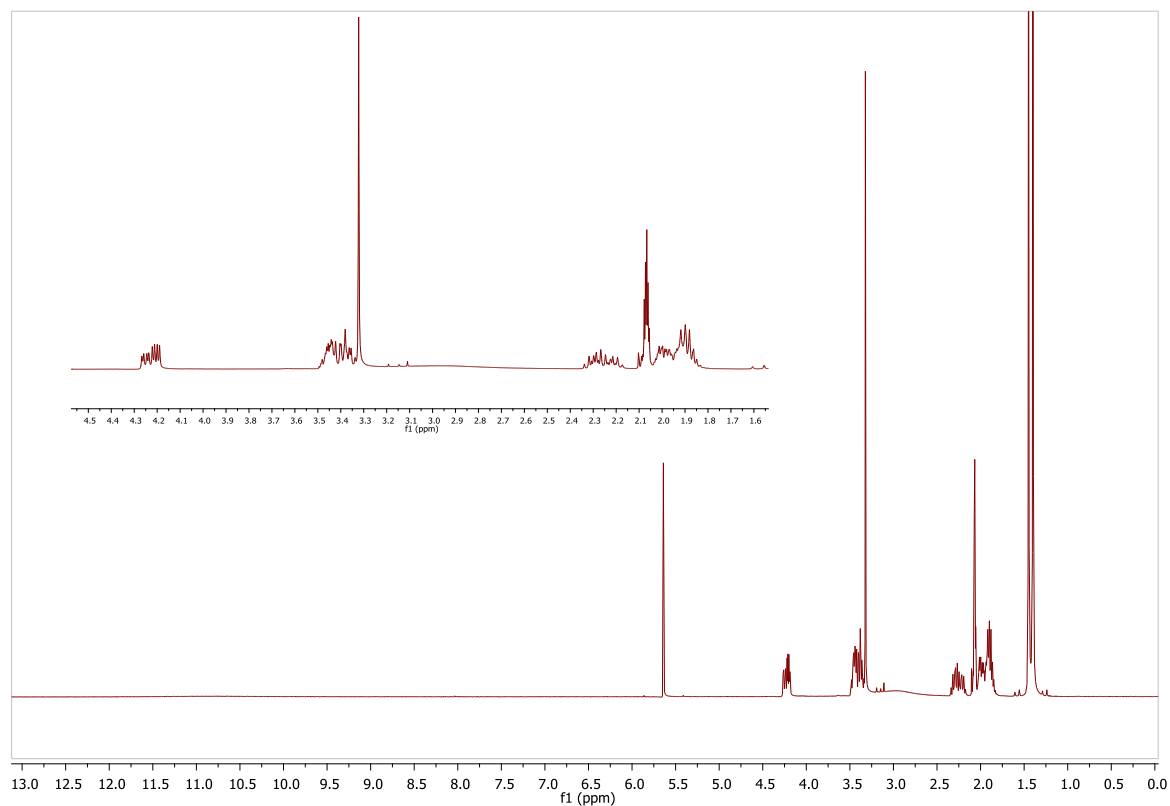


Figura 4-7: Espectro RMN ^1H del derivado **HPc11b**, 400 MHz, Acetona- d_6

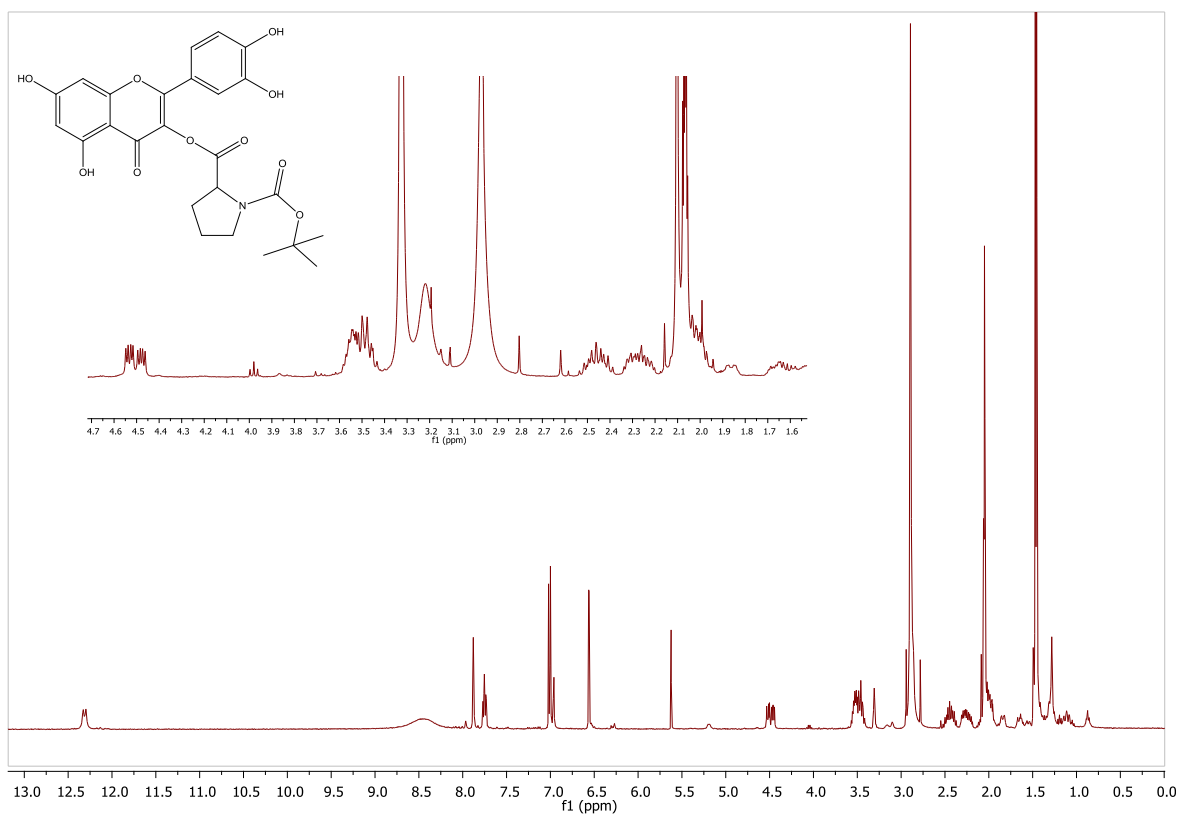


Figura 4-8: Espectro RMN ^1H de *N*-*ter*-butoxicarbonilglicina **A3**, 400 MHz, Acetona- d_6

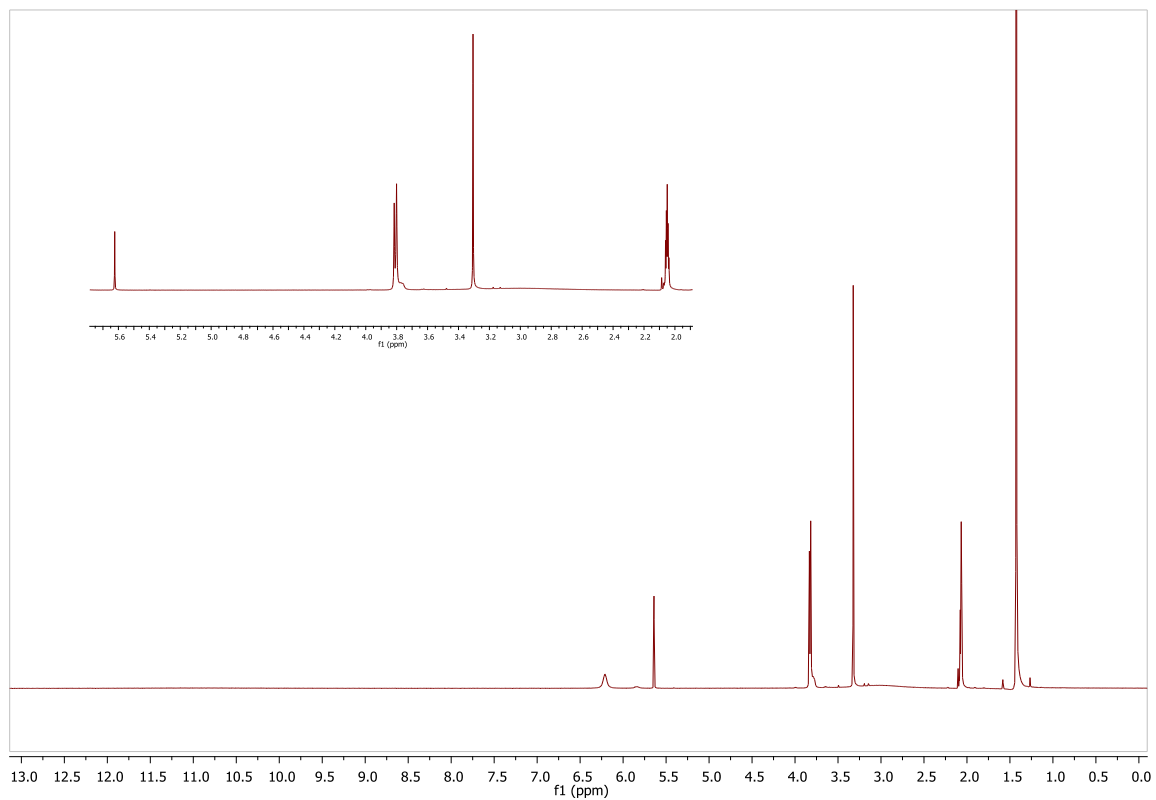
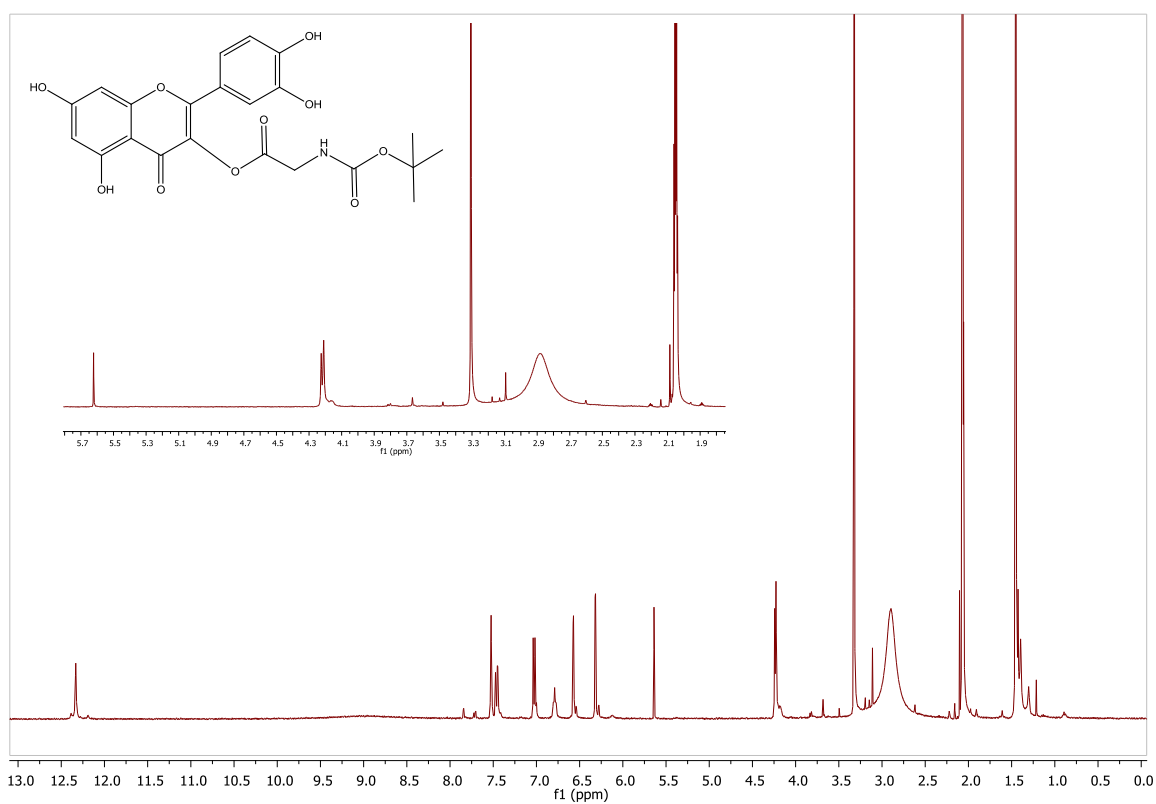
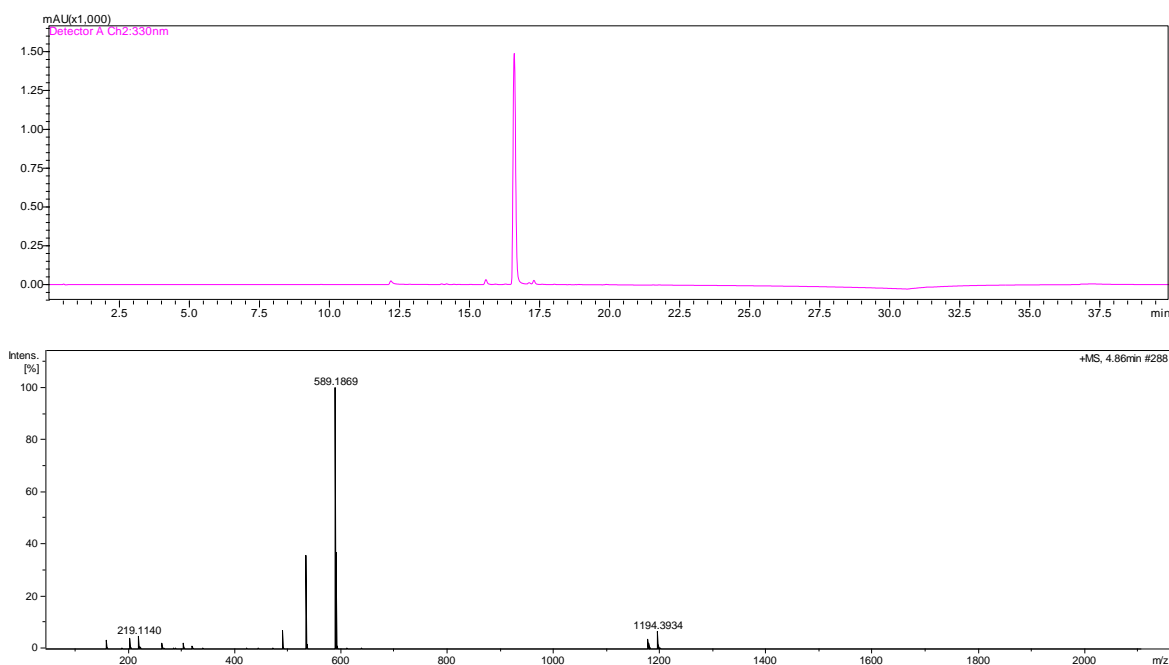


Figura 4-9: Espectro RMN ^1H del derivado **HPc11c**, 400 MHz, Acetona- d_6



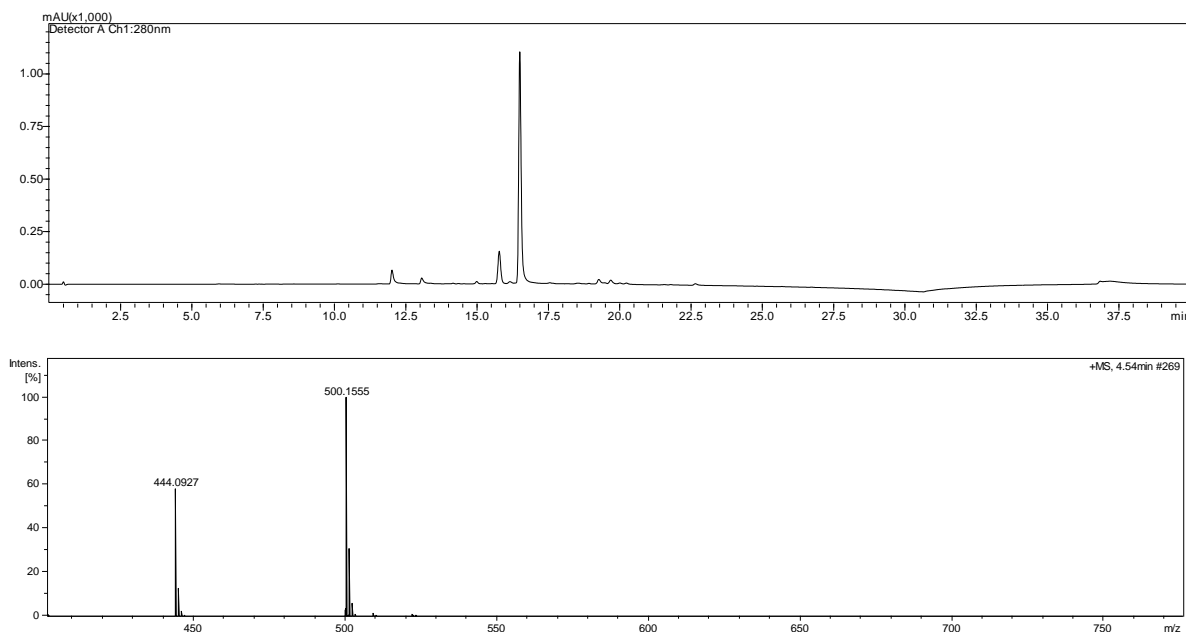
El análisis de los espectros de RMN ^1H de cada uno de los derivados (**HPc11a**, **HPc11b**, **HPc11c**) permite identificar señales características en cada uno de ellos, se observa en la **Figura 4-5** dos dobletes en δ 7.55, δ 7.37; un singlete en δ 7.18 y dos tripletes en δ 7.09 y δ 7.02 respectivamente, sistema característico de los protones de los anillos de seis y cinco miembros de un compuesto indólico, adicional a ello se observan dos señales en δ 4.46 y δ 3.25 correspondiente a los protones de la región alifática del triptófano, y un singlete en δ 1.33 característico de los protones metílicos del terbutóxido del grupo protector. Además el espectro de RMN ^1H también nos indica señales en δ 7.83, δ 7.68, δ 6.96, δ 6.50 y δ 6.23 que por su desplazamiento y constante de acoplamiento corresponden a protones de anillos aromáticos trisustituido y tetrasustituido respectivamente, característico del flavonol quercetina (Charisiadis et al., 2014). El análisis de EMAR (Figura 4-10) permitió establecer como fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (m/z 589.1869 $[\text{M}+\text{H}]^+$) calculado para 589.1817; $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{10}$, consistente con los datos espectroscópicos se determinó que el derivado **HPc11a**, correspondía a 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*chromen-3-il-2-(*ter*-butoxicarbonilamino)-3-(1*H*-indol-3-il) propanoato.

Figura 4-10: TIC y EMAR del derivado **HPc11a**



El espectro de RMN ^1H de **HPc11b** (Figura 4-6 y 4-7) se observan un doble de dobles en δ 4.49 (1H), cuatro multipletes en δ 3.49 (2H), δ 2.44 (1H), δ 2.25 (1H), δ 1.93 (2H) respectivamente, que por su desplazamiento y multiplicidad son protones característicos de un anillo pirrolidínico (Lobato et al., 2006) y un singlete en δ 1.46 de los protones metílicos del *ter*-butoxicarbonilamino. Además se observan las señales características de los protones del sistema aromático de la quercetina (Figura 4-7) (Charisiadis et al., 2014). El análisis de EMAR (Figura 4-11) permitió establecer como fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{NO}_{10}$ (m/z 500.1551 $[\text{M}+\text{H}]^+$) calculado para 499.1465; $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NO}_{10}$, consistente con los datos espectroscópicos se determinó que el derivado **HPc11b**, corresponde a 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4Hcromen-3-il-1-*ter*-butoxicarbonilpirrolidina-2-carboxilato.

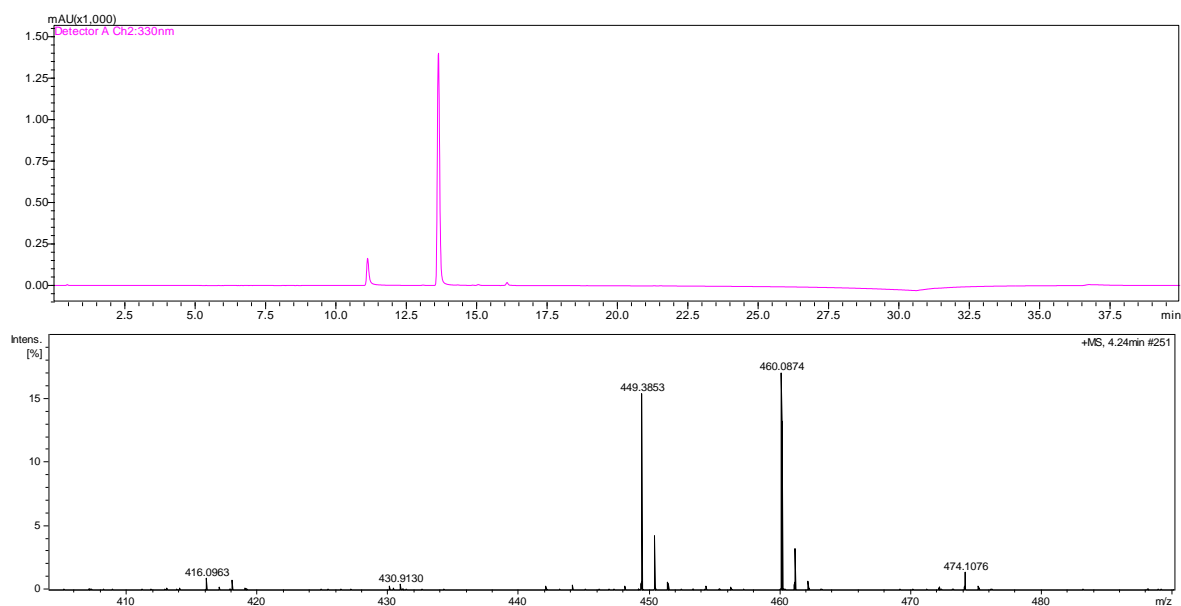
Figura 4-11: TIC y EMAR del derivado **HPc11b**



En el espectro de RMN ^1H de **HPc11c** (Figura 4-8 y 4-9), se observa un doblete en δ 4.22 (2H) y un singlete en δ 1.44 (3H) que por su desplazamiento y constante de acoplamiento son característicos de protones de metileno y metilos de *N*-(*ter*-butoxicarbonil) glicina. Adicional a ello se observan señales típicas de protones aromáticos del flavonoide quercetina. El análisis de EMAR (Figura 4-12) confirma los

datos espectroscópicos, permitiendo establecer como fórmula molecular $C_{22}H_{22}NO_{10}$ (m/z 460.0874 $[M+H]^+$) calculado para 459.0857; $C_{22}H_{21}NO_{10}$, con ello estableciendo que el derivado **HPc11c**, corresponde a 2-(3,4-dihroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il 2-(*ter*-butoxicarbonilamino) acetato.

Figura 4-12: TIC y EMAR del derivado **HPc11c**



4.3.2 Derivado de la Quercetina con Grupo Trifluorometilo

El acoplamiento del 2-cloro-5-(trifluorometil)-1,3-dinitrobenceno con el flavonol permitió la formación del derivado de quercetina **HPc11d**. La reacción se caracteriza por la sustitución nucleofílica de los hidrógenos de los grupos OH en C3' y C4' del núcleo B del flavonoide. El derivado **HPc11d** fue identificado por comparación de los espectros de RMN y EMAR de **HPc11** y **A4**, (Figura 4-13 y 4-14).

Figura 4-13: Espectro RMN ^1H de 2-cloro-5-(trifluorometil)-1,3-dinitrobencono (**A4**), 400 MHz, Acetona- d_6 .

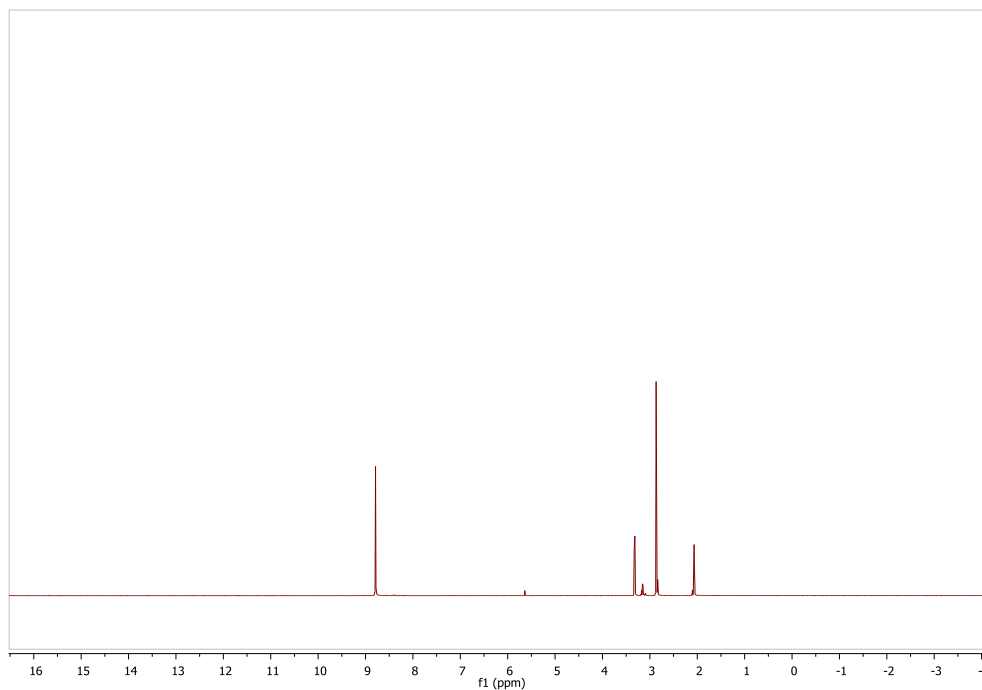
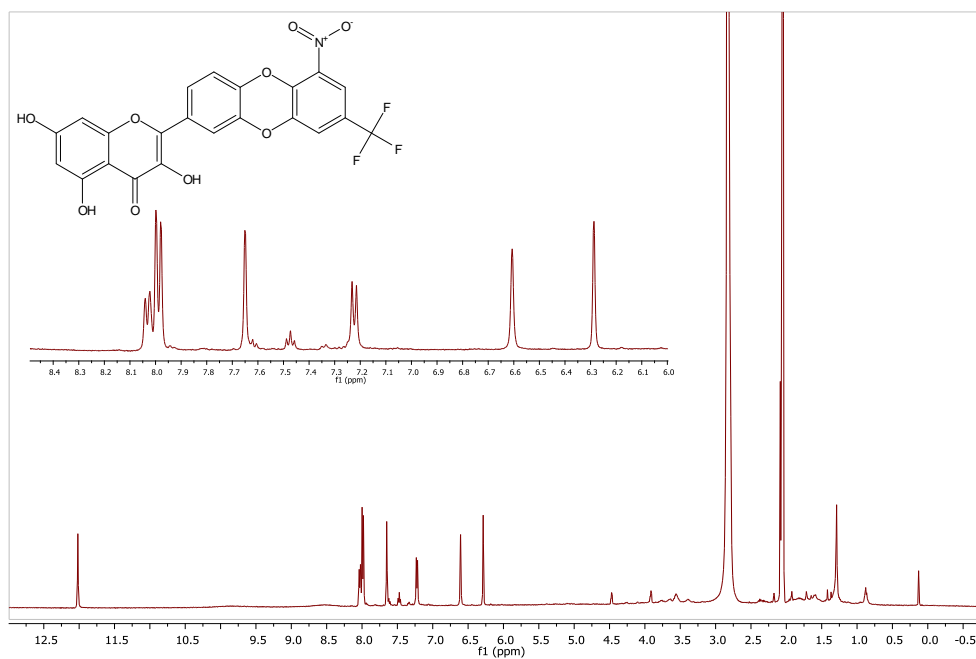
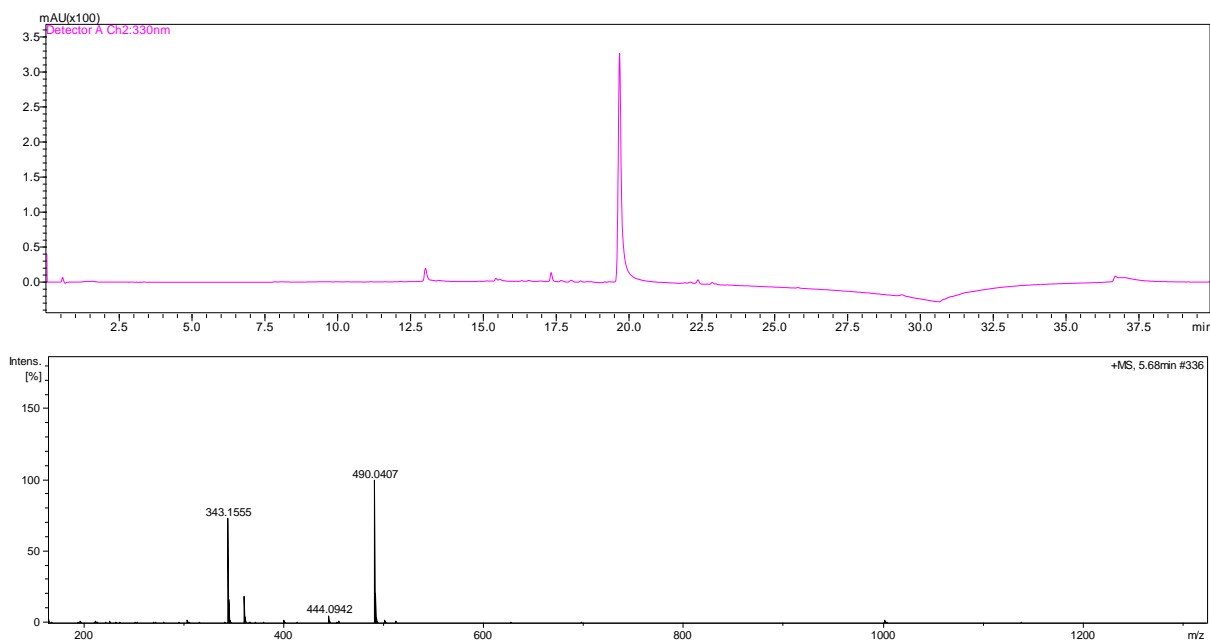


Figura 4-14: Espectro RMN ^1H de **HPc11d**, 400 MHz, Acetona- d_6



En el espectro de RMN ^1H de **HPc11d** de la **Figura 4-154**, se observan dos singletes en δ 8.00 (1H) y en δ 7.65 (1H) característicos por su desplazamiento de dos protones sobre anillo aromático en posición meta, sistema que caracteriza al compuesto con grupo trifluorometilo, además se observan dos dobletes en δ 8.03 (1H) y δ 7.22 (1H), tres singlete en δ 7.98, δ 6.61 y δ 6.29, correspondientes al flavonol quercetina. El análisis de EMAR (Figura 4-15) permitió establecer como fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{NO}_9$ (m/z 490.0407 $[\text{M}+\text{H}]^+$) calculado para 489.0334; $\text{C}_{22}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_9$, consistente con los datos espectroscópicos se determinó que el derivado **HPc11d**, corresponde a: 3,5,7-trihidroxil-2-(6-nitro-8-(trifluorometil)dibenzo[*b,e*][1,4]dioxin-2-il)-4*H*-cromen-4-ona.

Figura 4-15: TIC y EMAR del derivado **HPc11d**



4.3.3 Estudios de Citotoxicidad en Líneas Celulares TumORAles

En el siguiente texto se expone la actividad citotóxica de extractos, aceites esenciales, compuestos aislados y transformados de *P. caerulea*, frente a cinco líneas celulares: A-549 (carcinoma de pulmón), HT-29 (carcinoma de colón), Hep G2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB 231 (cáncer de seno) y Hela (cáncer de cervix). Las líneas celulares fueron sensibles al taxol, agente antineoplásico empleado en este ensayo para verificar la sensibilidad de las células. Asimismo, se observó la inocuidad del DMSO

empleado como vehículo para la preparación de los extractos, lo que evidencia que la concentración usada (0,2%) no interfiere con los resultados del análisis.

En total se evaluaron 60 extractos etanólicos de hojas (H), corteza (C) y madera (M) de individuos colectados en tres regiones del país, San Pedro de la Sierra (S), La Vega (V) y Bonda (B). Los extractos etanólicos provenientes de hojas y madera no tuvieron efecto sobre la proliferación celular de las líneas tumorales empleadas, ya que en todos los casos el porcentaje de supervivencia celular se mantuvo alrededor de 100%, independientemente de la concentración de extracto empleado. Por el contrario, el extracto de corteza presentó actividad citotóxica moderada (Tabla 4-1).

La mayoría de extractos de corteza provenientes de B (BC1, BC2, BC3 y BC4) fueron activos frente a las cinco líneas celulares evaluadas, mientras que los colectados en V solo uno (VC1) exhibió actividad citotóxica, en el caso de las muestras provenientes de S ninguno mostró actividad inhibitoria frente a las líneas tumorales evaluadas.

En general, los resultados obtenidos para los extractos (actividad citotóxica de corteza) es similar al comportamiento observado en el análisis químico comparativo (Capítulo 3), donde se muestra una marcada diferencia en la composición de los extractos provenientes de hojas con respecto a los de corteza. Al analizar cada estructura de la planta acorde al lugar de colecta se observa una diferenciación entre las muestras de corteza colectadas en B con respecto a los otros lugares de procedencia, lo que apoyaría los resultados obtenidos con la actividad de los extractos colectados en B.

Es interesante también anotar que otro elemento que apoya los resultados obtenidos es el hecho de que especies del género, como *P. americana* hayan presentado actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares (Ding et al., 2007).

Los aceites esenciales que se obtuvieron a partir de las hojas, no demostraron ningún efecto citotóxico en ninguna de las concentraciones evaluadas. A pesar que hasta el momento no hay estudios de actividad citotóxica en aceites esenciales aislados de esta especie, otros reportes realizados en el género *Persea* demuestran actividad citotóxica frente a las líneas M-14 (Melanoma), MCF7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 (Moriarity et al., 2007).

Tabla 4-1: Valores de concentración letal media (CL₅₀) estimados para extractos etanólicos de *P. caerulea*

Extracto <i>P. caerulea</i>	Concentración Letal media (CL ₅₀) ± DE (µg/mL)				
	MDA MB231	HELA	A549	HEPG2	HT-29
BC1	40.53 ±4.8	51.02 ±1.3	> 125 ug/mL	88 ±2.7	> 125 ug/mL
BC2	60.88 ±1.7	51.47±3.4	58.47 ±6.56	46.64 ±3.0	57.01 ±7.2
BC3	41.48 ±5.4	36.67±4.1	55.56 ±2.9	44.03 ±6.8	45.18 ±1.2
BC4	43.70±3.3	40.28±5.7	> 125 ug/mL	55.53±1.3	> 125 ug/mL
VC1	103.36±3.8	94.78±0.6	> 125 ug/mL	88.61±2.8	> 125 ug/mL
Taxol	27x10 ⁻² ±2.3	.32x10 ⁻² ±2.8	38x10 ⁻² ±1.8	34x10 ⁻² ±2.0	39x10 ⁻² ±1.0

C= Corteza; B= Bonda; V= Vega;

Un total de 14 compuestos aislados de *P. caerulea* y 4 derivados fueron evaluados frente a las cinco líneas celulares A-549, HT-29, Hep G2, MDA-MB 231 y Hela. Los resultados que se presentan en la **Tabla 4-2**, muestran que los compuestos aislados de *P. caerulea* **HPc5** (escopoletina), **HPc11** (quercetina), **CPc2** (isofraxidina) y **CPc4** (2, 7-dimetoxi-5-hidroxi-6-(l-hidroxietil)-1,4-naftoquinona) presentaron inhibición sobre la proliferación de las líneas tumorales empleadas.

El compuesto **CPc4** aislado de corteza presenta un amplio rango de actividades biológicas como actividad antitumoral, antibacterial, antiinflamatoria, citotóxica, entre otras (Rahmoun et al., 2013). Esta naftoquinona presentó los valores de CL₅₀ más promisorios frente a los demás compuestos evaluados, demostrando ser citotóxico en las líneas celulares HT29 y HeLa (CL₅₀= 3,16 µg/mL y CL₅₀= 4,28 µg/mL, respectivamente) en comparación de HepG2 y MDA-MB-231 (CL₅₀ = 11,65 µg/mL y CL₅₀ = 9,37 µg/mL respectivamente) (Tabla 4-2). **CPc4** no fue activo en la línea A549 en ninguna de las concentraciones evaluadas. Este resultado es importante ya que fue el único compuesto que disminuyó el porcentaje de supervivencia a cero en cuatro de las cinco líneas tumorales evaluadas. A pesar de no ser un compuesto selectivo, es considerado como un compuesto promisorio anticancerígeno según valores de referencia sugeridos por el Instituto Nacional de Cancerología (INC) (≤ 4 µg/mL). A pesar de que esta molécula no tiene reportes previos de actividad citotóxica, estructuras similares, es decir tipo 1,4 naftoquinona sí han presentado capacidad de inhibición de crecimiento y angiogénesis en la línea celular HCT116 (Kayashima et al., 2009).

CPc2 aislado de la corteza y **HPc5** aislado de las hojas de *P. caerulea* son cumarinas ampliamente distribuida en las plantas, **CPc2** es un compuesto que ha obtenido gran interés recientemente debido a su actividad antioxidante, antiinflamatoria, neuroprotectiva y antitumoral (Rajagopal et al., 2014; Malik et al., 2011). Los resultados indican que **CPc2** exhibió un grado variable de perfiles de citotoxicidad, siendo las líneas HepG2, MDA-MB-231 y A549 (CL_{50} = 19.48 μ g/mL, CL_{50} = 16.10 μ g/mL y CL_{50} = 19.99 μ g/mL, respectivamente) aquellas con mayor sensibilidad al tratamiento. Estudios previos también muestran la citotoxicidad de **CPc2** al exponer las líneas MDA-MB-468 y HT29 a una concentración de 0,01-2 μ g/mL por 72 h (Ensayo MTT - GI=0,09 μ g/mL y GI=50 0,17 μ g/mL, respectivamente) (GI: Inhibición del crecimiento), datos consistentes con los resultados obtenidos en el presente estudio (Rajagopal et al., 2014). Para el caso de **HPc5**, es un metabolito que ha mostrado una gran variedad de propiedades biológicas como, anti-tumoral, anti-estrés, anti-fatiga, anti-ulcerativa, gástrica- antidepresiva, efectos anti-inflamatorios, entre otras (Zhao et al., 2014; Yamazaki et al., 2014). Trabajos previos, demuestran que induce actividad citotóxica mediada por diferentes vías apoptóticas y además disminuye la viabilidad de la línea Adenocarcinoma de colon a 46,4% y de HepG2 a 18,1%, de una manera dosis-dependiente (Chou et al., 2011). Este estudio es consistente con los resultados observados en este trabajo, ya que el compuesto HPc5 exhibió actividad citotóxica en las líneas HepG2, MDA-MB-231 y HT29 (CL_{50} = 35,68 μ g/mL, CL_{50} = 31,19 μ g/mL y CL_{50} = 27,52 μ g/mL, respectivamente). Sin embargo las líneas A549 y HeLa fueron resistentes a este compuesto. La citotoxicidad observada en este trabajo, posiblemente está asociada con la detención del ciclo celular y la vía de apoptosis mitocondrial.

HPc11 es un flavonol muy importante en la dieta humana y ampliamente distribuido en el reino vegetal (Paliwal et al., 2005). Varios reportes, demuestran que este compuesto tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de varias líneas celulares de origen tumoral como leucemia, cáncer de ovario, cáncer colorectal, cáncer de seno y cáncer de próstata, sugiriendo su potencial anticancerígeno con fines terapéuticos. Gracias a que la modificación estructural (que influye en las propiedades físico-químicas de los compuestos) es hoy en día un campo vigente e importante en la optimización de la actividad citotóxica de compuestos derivados de plantas (Daníhelová et al., 2013), en este estudio se comparó el efecto citotóxico en líneas de origen tumoral, y cuatro

compuestos modificados estructuralmente (**HPc11a**, **HPc11b**, **HPc11c**, **HPc11d**) derivados de la quercetina (**HPc11**).

Al comparar los resultados obtenidos de **HPc11** con sus respectivos derivados, se observa que este compuesto (**HPc11**) no presentó actividad citotóxica sobre las líneas HT29 y A549, por el contrario **HPc11d** mostró inhibición significativa de la proliferación celular de HT29 ($IC_{50}=21,30 \mu\text{g/mL}$) y una moderada actividad sobre A549 ($IC_{50}=62.64 \mu\text{g/mL}$). Frente a la línea tumoral MDA-MB231 el comportamiento fue similar, el derivado **HPc11d** ($IC_{50}=21,30 \mu\text{g/mL}$) presentó una actividad citotóxica alta con respecto a **HPc11** ($IC_{50}=42,90 \mu\text{g/mL}$) mientras que **HPc11a** ($IC_{50}=38.49 \mu\text{g/mL}$) y **HPc11c** ($IC_{50}=43.83 \mu\text{g/mL}$) mostraron valores muy semejante a su precursor (**HPc11**). Por otro lado cabe resaltar la selectividad exhibida por **HPc11b** frente a la línea HepG2 ($CL_{50} = 27.05 \mu\text{g/mL}$), resultado que es coherente con estudios previos que sugieren que la selectividad de este tipo de compuestos que incluyen un residuo de prolina, puede estar relacionada con una alta actividad prolidasa que se encuentra asociada a la formación de diversos tipos de tumores (Stankiewicz-Kranc et al., 2000). **HPc11a** también mostró selectividad, ya que solo fue activo en las líneas HepG2 y MDA-MB-231 ($CL_{50} = 29.24 \mu\text{g/mL}$ y $CL_{50} = 38.49 \mu\text{g/mL}$).

Tabla 4-2: Valores de concentración letal media (CL_{50}) estimados para metabolitos aislados y derivados de *P. caerulea*.

Metabolitos y Derivados	Concentración Letal media (CL_{50}) \pm DE ($\mu\text{g/mL}$)				
	MDA MB231	HELA	A549	HEPG2	HT-29
HPc5	35.68 \pm 3.5	> 50 ug/mL	> 50 ug/mL	19.48 \pm 2.7	27.52 \pm 2.7
CPc2	16.10 \pm 0.5	> 50 ug/mL	19.99 \pm 7.1	19.48 \pm 2.7	24.29 \pm 3.9
CPc4	9.37 \pm 2.4	4.28 \pm 0.6	> 50 ug/mL	11.65 \pm 2.1	3.16 \pm 0.4
HPc11	42.9 \pm 2.0	17.51 \pm 3.4	> 50 ug/mL	26.18 \pm 2.5	> 50 ug/mL
HPc11a	38.49 \pm 1.8	> 50 ug/mL	> 50 ug/mL	29.24 \pm 1.7	> 50 ug/mL
HPc11b	> 50 ug/mL	> 50 ug/mL	> 50 ug/mL	27.05 \pm 6.2	> 50 ug/mL
HPc11c	43.48 \pm 1.4	18.35 \pm 1.4	62.65 \pm 8.6	32.26 \pm 2.8	43.4 \pm 1.3
HPc11d	28.27 \pm 16.92	40.05 \pm 30.30	> 50 ug/mL	45.79 \pm 8.23	21,30 \pm 2,3
Taxol	29 $\times 10^{-2}$ \pm 1.3	33 $\times 10^{-2}$ \pm 1.6	31 $\times 10^{-2}$ \pm 2.7	27 $\times 10^{-2}$ \pm 2.1	35 $\times 10^{-2}$ \pm 1.3

4.3.4 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

En este estudio se evaluó la actividad de extractos etanólicos, aceites esenciales, compuestos aislados y derivados de la especie *P. caerulea* contra los hongos *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y las bacterias *Acinetobacter baumannii* (gram positiva) y SARM (gram negativa). Del total de muestras evaluadas, 21 extractos, 14 aceites esenciales, 10 compuestos aislados y 3 derivados presentaron actividad antifúngica y/o antibacteriana significativa frente a los ensayos realizados.

Se evaluó la actividad antifúngica de 60 extractos correspondientes a hojas, corteza y madera de 20 individuos de la especie *P. caerulea* (muestras correspondientes del estudio comparativo), colectados en tres regiones del país (San Pedro de la Sierra=S, Bonda=B y la Vega=V) contra *A. fumigatus* y *C. albicans*. Estos extractos fueron evaluados en concentraciones de 3, 1.5, 0.75, 0.32 y 0.16 mg/mL (Tabla 4-3). Los resultados señalan que 21 extractos presentaron actividad inhibitoria contra los dos tipos de organismos fúngicos. Cabe resaltar que los extractos que presentaron actividad corresponden en su mayoría a hojas de *P. caerulea* colectadas en las tres regiones. La mayor parte de los extractos exhibieron actividad inhibitoria contra el hongo filamentoso *A. fumigatus*, solamente los extractos provenientes de B inhibieron el crecimiento en *C. albicans*. La actividad antifúngica puede sugerir que los extractos etanólicos de hojas de *P. caerulea* puedan contener compuestos que sean selectivo hacia los microorganismos *A. fumigatus* y *C. albicans*. Estos resultados son coherentes con el análisis químico comparativo realizado con los extractos colectados, donde se observa una clara diferenciación en la composición de los extractos de hojas de los provenientes de corteza y madera (Figura 3-10), además también el análisis indica una distinción entre los extractos de hojas proveniente de B, en comparación con los de S y V (Figura 3-14), lo que explicaría el comportamiento antifúngico contra *C. albicans*, expresado exclusivamente por las muestras colectadas en B. Los extractos no presentaron actividad antibacteriana contra los organismos evaluados.

Tabla 4-3: Actividad antifúngica de extractos de *P. caerulea* contra *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (% de inhibición).

Extracto <i>P. caerulea</i>	<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645					<i>C. albicans</i> 1055				
	3.00 ^a	1.5	0.75	0.32	0.16	3.00	1.5	0.75	0.32	0.16
SH1	63±0.2	34±0.3	24±0.2	12±0.4	3±0.2	-	-	-	-	-
SH4	57±0.5	35±0.6	27±0.4	10±0.6	1±0.3	-	-	-	-	-
SH5	58±0.3	30±0.4	22±0.2	11±0.5	2±0.2	-	-	-	-	-
SH8	58±0.5	32±0.4	23±0.6	12±0.4	0±0.5	-	-	-	-	-
SC6	64±0.7	52±0.5	33±0.6	18±0.3	4±0.7	-	-	-	-	-
SC7	74±0.5	54±0.4	38±0.3	22±0.7	8±0.3	-	-	-	-	-
SC8	66±0.8	57±0.6	37±0.5	19±0.5	5±0.4	-	-	-	-	-
BH1	61±0.3	38±0.4	26±1.2	16±0.7	0±0.8	-	-	-	-	-
BH2	56±0.8	34±0.9	28±0.7	18±0.7	2±0.3	73±0.6	54±0.8	43±0.2	32±0.6	13±0.9
BH3	62±0.8	46±1.0	34±0.9	26±0.8	8±0.8	65±3.5	45±3.4	38±3.0	25±1.5	6±2.5
BH4	68±2.2	56±0.8	36±1.8	28±0.8	10±0.8	86±3.5	68±0.5	57±1.8	45±3.5	2±1.6
BH5	69±1.5	54±1.2	38±1.8	26±0.8	16±2.8	63±2.8	47±0.2	32±3.1	18±2.2	3±2.2
BC4	60±0.8	34±0.8	26±0.4	16±0.8	2±0.9	-	-	-	-	-
BM5	60±1.2	36±1.1	26±0.8	18±1.8	6±0.8	-	-	-	-	-
VH1	62±1.2	45±1.1	35±2.2	19±1.7	6±1.9	-	-	-	-	-
VH2	55±0.2	30±1.2	19±1.4	11±1.2	3±2.2	-	-	-	-	-
VH3	56±2.2	40±1.2	22±2.5	15±1.2	7±2.2	-	-	-	-	-
VH4	57±1.2	39±2.5	20±1.8	12±1.2	6±1.2	-	-	-	-	-
VH5	56±1.5	40±1.8	21±2.5	19±1.5	5±1.5	-	-	-	-	-
VH6	65±2.4	55±3.5	35±1.3	5±1.5	8±1.5	-	-	-	-	-
VH7	58±1.0	35±1.5	20±1.1	18±2.5	0±1.4	-	-	-	-	-
A	100±1.5	100±1.3	100±2.1	100±2.0	100±1.8					

a.mg/mL; H= hojas; C= corteza; M= madera; S= San Pedro; B= Bonda; V= Vega;
A=anfoterecina B

Se evaluó la actividad antifúngica de 15 aceites esenciales de hojas de *P. caerulea* colectadas en S, B y V (muestras correspondientes del estudio comparativo) contra *A. fumigatus* y *C. albicans*. Los ensayos se llevaron a cabo en diluciones de 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.62 µl/mL. Como se observa en la **Tabla 4-4** un total de 14 aceites esenciales mostraron una alta actividad inhibitoria contra los dos hongos evaluados, presentando inhibición no solo en concentración de 10 µl/mL sino de 5 y hasta 1.25 µl/mL. Los aceites esenciales obtenidos de los individuos colectados en S y B exhibieron los valores más altos de porcentaje de inhibición contra *A. fumigatus* y *C. albicans*, mientras que las muestras de la V mostraron valores más bajos y solo presentaron actividad frente a *A.*

fumigatus (Tabla 4-4). Esta diferencia en el comportamiento de los aceites esenciales está relacionada indiscutiblemente frente a la composición química y al lugar de procedencia de las muestras. En el estudio químico comparativo se observó una marcada diferenciación entre las muestras colectadas en la región V, con respecto a las de S y B (Figura 3-14).

Tabla 4-4: Actividad antifúngica de aceites esenciales de *P. caerulea* contra *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (% de inhibición).

A. E. <i>P.caerulea</i>	<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645					<i>C. albicans</i> 1055				
	10 ^a	5	2.5	1.25	0.62	10 ^a	5	2.5	1.25	0.62
S1	86±0.4	77±0.5	64±0.5	52±0.6	43±0.3	69±1.2	55±0.9	43±0.8	39±0.2	25±2.2
S2	73±1.2	62±1.1	58±2.2	47±1.7	36±1.9	71±2.1	65±0.6	55±1.8	42±1.2	37±2.1
S3	74±1.2	65±1.1	55±2.2	46±1.7	41±1.9	65±0.7	54±0.9	43±0.6	30±0.7	24±0.8
S4	88±0.2	72±0.4	64±0.6	52±0.4	40±0.6	64±2.5	55±2.4	48±2.0	36±1.5	22±2.5
S5	90±0.7	75±0.5	63±0.6	58±0.3	44±0.7	69±1.8	58±1.4	47±1.5	39±2.4	30±1.2
S6	76±0.7	64±0.4	58±0.3	45±0.6	38±0.3	66±2.1	53±2.0	48±2.2	37±2.8	31±3.2
B1	84±0.5	70±0.4	64±1.6	55±0.7	39±0.9	83±2.0	71±0.5	67±0.9	55±1.2	41±2.6
B2	80±0.6	78±0.8	65±0.8	59±0.9	40±0.3	63±0.6	57±1.3	44±0.5	36±0.7	28±0.8
B3	72±0.5	62±1.1	55±1.9	42±0.7	35±0.6	65±3.5	45±3.4	38±3.0	25±1.5	61±2.5
B4	68±2.2	58±0.8	49±1.8	38±0.8	25±0.8	70±3.5	65±0.5	54±1.8	45±3.5	32±1.6
B5	77±1.5	64±1.2	58±1.3	45±0.5	34±2.2	69±2.7	58±0.2	46±2.1	38±2.0	30±2.1
V1	60±0.8	52±1.0	44±1.0	33±1.1	28±2.0	-	-	-	-	-
V2	62±2.0	53±1.2	42±2.5	35±1.2	27±2.2	-	-	-	-	-
V4	76±1.0	66±2.5	53±1.8	42±1.2	26±1.2	-	-	-	-	-
A	100±2.5	100±1.0	100±1.3	100±2.5	100±3.3	100±1.2	100±2.5	100±2.1	100±1.4	100±1.8

a. µl/mL; S= San Pedro; B= Bonda; V= Vega; A=anfoterecina B

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales se llevó a cabo frente a dos tipos de microorganismos, *S. aureus* (SARM) (gram positivo) y *A. baumannii* (gram negativo). Los ensayos se llevaron a cabo empleando las siguientes concentraciones: 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.62 µl/mL. Los resultados indican que los aceites esenciales obtenidos de las hojas de individuos colectados en S y B presentaron una alta actividad inhibitoria contra las dos cepas evaluadas, exhibiendo valores de inhibición promisorios (70-100%) en dosis de 10

a 2.5 µl/mL. Los aceites esenciales obtenidos de los individuos de la V, a pesar de que mostraron una actividad antibacteriana significativa, contra *S. aureus* (SARM) y *A. baumannii*, los valores de inhibición en general fueron considerablemente bajos (Tabla 4-5).

Tabla 4-5: Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *P. caerulea* contra *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus* (SARM) (% de inhibición).

A. E. <i>P. caerulea</i>	<i>A. baumannii</i>					<i>S. aureus</i> (SARM)				
	10 ^a	5	2.5	1.25	0.62	10 ^a	5	2.5	1.25	0.62
S1	100±0.6	98±0.8	79±0.5	35±0.8	22±0.3	100±1.2	100±0.9	100±0.8	50±0.2	21±2.2
S2	100±1.1	96±1.3	72±2.0	27±1.7	18±1.9	100±2.4	100±1.6	95±1.8	62±1.2	28±2.0
S3	100±1.0	85±1.1	62±2.1	41±1.3	30±1.5	65±0.7	100±0.9	100±0.6	46±0.7	32±0.8
S4	100±0.2	100±0.4	85±0.6	62±0.4	40±0.6	100±2.0	100±1.4	88±1.8	40±1.7	36±2.3
S5	100±0.7	99±0.5	71±0.6	55±0.3	43±0.7	100±1.5	100±1.4	99±1.8	68±2.2	32±1.3
S6	100±1.7	96±0.7	62±0.4	42±0.7	33±0.3	100±2.1	100±2.9	78±2.1	39±3.8	41±3.2
B1	100±0.5	100±0.4	72±1.6	54±0.7	32±0.9	100±2.1	100±0.6	87±0.7	45±1.3	31±2.4
B2	100±1.6	100±0.5	94±0.6	69±0.7	38±0.5	100±0.6	100±1.3	100±0.5	46±0.7	37±0.8
B3	100±0.8	100±1.2	73±1.4	52±0.8	45±0.8	100±3.5	100±2.7	93±2.3	48±1.6	28±2.4
B4	100±2.1	100±0.9	100±1.9	38±1.8	24±0.8	100±3.2	100±0.7	74±1.2	51±2.5	37±1.4
B5	100±1.5	100±1.2	51±1.3	35±0.5	36±2.2	89±2.7	68±0.8	48±1.1	35±1.0	20±2.0
V1	62±0.8	50±1.1	41±1.2	32±1.3	28±2.0	55±1.8	47±1.5	31±0.9	18±2.8	9±0.8
V2	42±2.7	33±1.5	22±2.4	15±1.3	7±2.2	82±1.5	64±0.8	38±1.3	29±2.1	14±2.3
V4	94±1.1	71±2.3	54±1.2	41±1.1	32±0.8	95±1.1	81±0.8	62±1.2	51±0.5	24±1.4
R	100±1.5	100±2.2	100±2.4	100±0.8	100±0.7	100±0.9	100±1.3	100±1.4	100±2.7	100±2.8
V	100±0.5	100±2.8	100±0.6	100±2.5	100±2.2	100±2.1	100±1.3	100±0.5	100±0.7	100±2.7

b. µl/mL; S= San Pedro; B= Bonda; V= Vega; R= Rifampicina; V= Vancomicina

En general los resultados de actividad antimicrobiana exhibidos por extractos y aceites esenciales de *P. caerulea* están soportados en el hecho de que algunas de las especies del género (*P americana* y *P. cordata*) han sido utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Cechinel-Filho et al., 2007; Magassouba et al., 2010).

Con respecto a los compuestos, en total se evaluaron 25 metabolitos aislados de hojas, corteza y madera de *P. caerulea* y 4 derivados contra *A. fumigatus*, *C. albicans*, *A. baumannii* y *S. aureus* SARM. Los efectos inhibitorios de los compuestos frente a los

hongos *A. fumigatus* y *C. albicans* se presentan en la **Tabla 4-6**. Los resultados señalan que 8 compuestos del total evaluado presentaron actividad antifúngica: **HPc5** (isofraxidina), **HPc11** (quercetina), **HPc16** (kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosido) y **HPc17** (quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosido) aislados de hojas, **CPc3** (5,7-dimetoxi-3',4'-metilendioxi epicatequina) y **CPc4** (2,7-dimetoxi-5-hidroxi-6-(1-hidroxi-etil)-1,4-naftoquinona) obtenidos de la corteza y los compuestos derivados **HPc11b** (2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4H-cromen-3-il-1-ter-butoxicarbonilpirrolidina-2-carboxilato.) y **HPc11d** (3,5,7-trihidroxi-2-(6-nitro-8-(trifluorometil)dibenzo[*b,e*][1,4]dioxin-2-il)-4H-cromen-4-ona). Los compuestos **HPc5**, **HPc16**, **HPc17** y **CPc3** presentaron efecto inhibitorio sobre *A. fumigatus*, mientras que los compuestos **CPc4** y **HPc11d** mostraron actividad antifúngica frente a *C. albicans*. Los compuestos **HPc11** y **HPc11b** exhibieron actividad antifúngica frente a los dos organismos evaluados. Todos los metabolitos y derivados que presentaron actividad antifúngica se caracterizan por ser compuestos de tipo fenólico. Entre este grupo de compuestos se identifican las cumarinas cuya capacidad antimicrobiana ha sido descrita en diversos reportes (Kumar et al., 2012; De Souza et al., 2016), y que apoya el hecho de la capacidad inhibitoria que ha exhibido **HPc5** contra *A. fumigatus*. También conforman este grupo, los flavonoides (**HPc11**, **HPc16**, **HPc17** y **CPc3**), que se caracterizan por su amplia distribución y por jugar un papel importante en las interacciones de los vegetales (López-Lázaro et al., 2011; Berhow et al., 1999). Los flavonoides glicosidados y agliconas se encuentran muy asociados a la relaciones de las plantas con microorganismos patógenos y simbióticos (Dixon et al., 1994; Gianinazzi et al., 1996). En general este tipo de compuestos fenólicos han sido reportados por exhibir gran variedad de actividades como antioxidantes, antiviral, citotóxico, antiinflamatorios, entre otros (Harborne et al., 2000). Los compuestos **HPc11**, **HPc16** y **HPc17** han sido reportados por presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y anti-infectivo (Vo et al., 2012; Ur Rahman et al., 2016; Flaviana et al., 2016).

Tabla 4-6: Actividad antifúngica de metabolitos aislados y derivados de *P. caerulea* contra *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (% de inhibición).

Metabolitos y derivados	<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645					<i>C. albicans</i> 1055				
	48 ^a	24	12	6	3	48	24	12	6	3
HPc5	88±0.7	65±0.5	54±0.6	38±0.3	14±0.7	-	-	-	-	-
HPc11	57±1.5	44±1.2	38±1.3	25±0.5	10±2.2	62±2.7	51±0.2	46±2.1	31±2.2	20±1.1

HPc16	71±1.1	60±0.8	51±1.0	47±1.3	19±1.1	-	-	-	-	-
HPc17	71±1.1	60±0.8	51±1.0	47±1.3	19±1.1	-	-	-	-	-
CPc3	60±1.2	50±1.0	41±1.1	33±1.5	11±0.9	-	-	-	-	-
CPc4	-	-	-	-	-	100±0.3	70±0.9	51±1.0	48±1.3	29±1.1
HPc11b	61±0.8	50±1.4	38±1.8	26±1.3	14±1.0	94±2.0	80±2.1	61±3.2	48±2.3	19±2.0
HPc11d	-	-	-	-	-	71±2.2	62±2.8	50±3.0	38±1.3	12±1.1
A	100±1.3	100±1.7	100±0.7	83±2.1	58±1.0	100±1.8	100±2.1	100±0.7	85±2.1	65±1.0

a. µg/mL; Anfotericina B

Los resultados de la actividad antibacteriana de metabolitos aislados y derivados frente a *A. baumannii* y *S. aureus* (SARM) se observa en la **Tabla 4-7** en ella se identifican un total de 9 compuestos activos, 5 de ellos aislados de las hojas, uno obtenido de la corteza y tres derivados, correspondiente a: **HPc6** (4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-*E-p*-cumaryl-4''-*E-p*-cumaryl)- α -L-ramnopiranosido), **HPc7** (4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-*E-p*-cumaryl-4''-*E-p*-cumaryl)- α -L-ramnopiranosido), **HPc8** (4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-*Z-p*-cumaryl-4''-*E-p*-cumaryl)- α -L-ramnopiranosido), **HPc9** (4'-metoxikaempferol-3-O-(2''-*E-p*-cumaryl-4''-*Z-p*-cumaryl)- α -L-ramnopiranosido) **HPc10** (4'-metoxikaempferol-3-O-(3''-*Z-p*-cumaryl-4''-*E-p*-cumaryl)- α -L-ramnopiranosido), **CPc4** (2, 7-dimetoxi-5-hidroxi-6-(1-hidroxietil)-1,4-naftoquinona), **HPc11b** (2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*cromen-3-il-1-*ter*-butoxicarbonilpirrolidina-2-carboxilato.), **HPc11c** (2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il 2-(*ter*-butoxicarbonilamino) acetato. y **HPc11d** (3,5,7-trihidroxi-2-(6-nitro-8-(trifluorometil)dibenzo[*b,e*][1,4]dioxin-2-il)-4*H*-cromen-4-ona). Los resultados señalan que los metabolitos **HPc6**, **HPc7**, **HPc8**, **HPc9** y **HPc10** exhibieron una alta actividad antibacteriana contra *S. aureus* (SARM), mientras que los compuestos derivados **HPc11b**, **HPc11c** y **HPc11d** presentaron una inhibición moderada contra *A. baumannii*. El compuesto **CPc4** mostró inhibición frente a los dos tipos de bacterias.

Los resultados observados en los compuestos **HPc6**, **HPc7**, **HPc8**, **HPc9** y **HPc10** están acordes con las características mencionadas anteriormente en los flavonoides. Por otro lado cabe resaltar, que a pesar de que estos metabolitos son reportados por primera vez presentando este tipo de actividad, existen reportes de núcleos semejantes que han exhibidos una alta actividad antibacteriana frente a *S. aureus* (SARM) (Otsuka et al., 2008), estableciendo algunos de ellos, relación estructura-actividad entre este tipo de flavonoles y su efecto antibacteriano (Morais-Braga et al., 2016).

El compuesto **CPc4** es una quinona aislada de la corteza de *P. caerulea* que exhibió actividad antifúngica y antibacteriana, frente a *C. albicans*, *A. baumannii* y *S. aureus* (SARM). Se reporta como el único metabolito aislado de *P. caerulea* que demostró inhibir el crecimiento de hongos y bacterias evaluadas. En la literatura este tipo de compuestos, derivados de tipo 1,4-naftoquinona han sido estudiados por exhibir actividad antimicrobiana, presentando actividad inhibitoria contra *C. albicans* (Tandon et al., 2004). Es la primera vez que se identifica la actividad antifúngica contra *C. albicans* para el **CPc4**.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los compuestos derivados **HPc11b**, **HPc11c** y **HPc11d** se presentan en las **Tabla 4-7**. En ellas se indica que **HPc11b** presentó efectos inhibitorios contra *A. fumigatus*, *C. albicans* y *A. baumannii*, **HPc11d** mostró actividad antifúngica contra *C. albicans* y actividad antibacteriana contra *A. baumannii*, mientras que **HPc11c** solo presentó inhibición contra *A. baumannii*. Este es el primer estudio de actividad antimicrobiana reportada para **HPc11b**, **HPc11c** y **HPc11d**, en otros trabajos estos compuestos han exhibido valores significativos de inhibición contra tirosina quinasa enzima involucrada en el desarrollo de células cancerígenas (Huang et al., 2009). Al comparar los valores obtenidos de **HPc11** con sus derivados (**HPc11b**, **HPc11c** y **HPc11d**) podemos sugerir que las moléculas modificadas presentaron mayor actividad antifúngica que su precursor, **HPc11** mostró una inhibición del 62% contra *C. albicans*, mientras que **HPc11b** y **HPc11d** presentaron inhibición del 94% y 71% respectivamente. Adicional a ello los compuestos modificados **HPc11b**, **HPc11c** y **HPc11d** mostraron actividad antibacteriana contra *A. baumannii*, por el contrario **HPc11** no presentó efecto inhibitorio contra la bacteria. Se sugiere que las diferencias en los valores obtenidos de los derivados con respecto a **HPc11**, radica principalmente en el aumento de la lipofilidad que exhiben los compuestos modificados en comparación con la molécula no transformada (Tempesti et al., 2004).

Tabla 4-7: Actividad antibacteriana de metabolitos aislados y derivados de *P. caerulea* contra *A. baumannii* y *S. aureus* (SARM) (% de inhibición).

Metabolitos y derivados	<i>A. baumannii</i>					<i>S. aureus</i> (SARM)				
	48 ^a	24	12	6	3	48	24	12	6	3
HPc6	-	-	-	-	-	100±0.3	90±0.9	81±1.0	46±1.3	32±1.1
HPc7	-	-	-	-	-	100±1.2	95±1.5	84±18	52±2.4	38±2.3
HPc8	-	-	-	-	-	100±0.3	93±1.9	86±2.0	48±1.4	35±3.2
HPc9	-	-	-	-	-	100±0.3	98±0.9	80±1.0	66±2.3	22±1.4
HPc10	-	-	-	-	-	100±0.3	100±0.9	80±2.0	56±1.3	32±1.1
CPc4	89±2.5	65±0.8	46±1.0	34±1.8	22±2.3	69±2.7	55±0.8	38±1.1	24±1.0	12±2.0
HPc11b	59±0.89	49±1.6	36±1.2	28±0.9	11±1.1	-	-	-	-	-
HPc11c	55±1.2	32±09	18±1.4	11±1.1	3±2.1	-	-	-	-	-
HPc11d	51±0.8	30±1.2	16±1.8	10±1.4	2±2.2	-	-	-	-	-
R	100±1.8	93±0.5	72±1.8	57±1.8	36±2.8	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	100±1.9	100±2.2	100±0.7	87±2.1	65±1.0

a. µg/mL

4.4 Conclusiones

- Los aceites esenciales de hojas de *P. caerulea* exhibieron una significativa actividad antifúngica frente a *A. fumigatus* y *C. albicans* un total de 14 aceites esenciales mostraron una alta actividad inhibitoria contra los dos hongos evaluados, presentando inhibición no solo en concentración de 10 µl/mL sino de 5 y hasta 1.25 µl/mL. Los aceites colectados en San Pedro de la Sierra y Bonda fueron los que mostraron mayor inhibición en el crecimiento de los organismos fúngicos. Ningún aceite esencial presentó actividad antibacteriana y citotóxica.
- Los extractos etanólicos de *P. caerulea* fueron selectivos contra los ensayos evaluados. Solo los extractos etanólicos de hojas de la especie presentaron actividad antifúngica, mientras que los extractos de corteza y madera mostraron actividad citotóxica. Ningún extracto exhibió actividad antibacteriana. En los resultados de los ensayos citotóxico y antifúngico se evidencia una clara distinción entre los extractos de acuerdo a lugar de procedencia, lo cual es coherente con el análisis químico comparativo que indica una diferenciación en composición de cada estructura con el lugar de colecta.
- Un total de doce metabolitos de *P. caerulea* mostraron actividad antimicrobiana ó citotóxica, el compuesto tipo quinona CPc4, aislado de la corteza de *P. caerulea*, fue el único metabolito que presentó tanto actividad citotóxica como antifúngica y antibacteriana frente a diversos organismos evaluados. CPc4 presentó los valores de CL₅₀ más promisorios, demostrando ser citotóxico en las líneas celulares HT29 y HeLa (CL₅₀= 3,16 µg/mL y CL₅₀= 4,28 µg/mL, respectivamente) y actividad antifúngica y antibacteriana, frente a *C. albicans*, *A. baumannii* y *S. aureus* (SARM). Estos resultados permite sugerirlo para estudios posteriores como posible candidato a agente terapéutico.

- Al comparar los valores obtenidos de HPc11 con sus derivados (HPc11b, HPc11c y HPc11d) se observa que las moléculas modificadas presentaron mayor actividad biológicas en los ensayos evaluados. Los derivados mostraron actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica a diferencia de HPc11 que no presentó actividad antibacteriana. Los compuestos modificados presentaron mayor actividad antifúngica, HPc11 mostró una inhibición del 62% contra *C albicans*, mientras que HPc11b y HPc11d presentaron inhibición del 94% y 71% respectivamente. Con respecto a la actividad citotóxica, en general los resultados obtenidos son muy similares entre HPc11 y sus derivados a excepción de HPc11d que mostró mayor actividad citotóxica frente a las líneas tumorales MDA-MB-231 y HT29.

Bibliografía

Abe, F.; Nagafuji, S.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Akahane, H. and Ogura, T. (2005). Trypanocidal constituents in plants 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. ***Biological & Pharmaceutical Bulletin***. 28, 1314–7.

Adams, R. P. (2001). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy; Allured Publishing: Carol Stream, IL, USA. pp. 20-470.

Adeyemi, O.; Okpo, S. and Ogunti, O. (2002). Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill. Lauraceae. ***Fitoterapia***. 73, 375-380.

Ahmet, H.; Gülçin, I.; Beydemir, S.; Elmastaş, M. and Büyükkokuroğlu, M.E. (2004). *In Vitro* Antioxidant Properties of morphine. ***Pharmacological Research***, 49, 59–66.

Andrade-Cetto, A. and Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. ***Journal of Ethnopharmacology***. 99, 325–348.

Antalek, B. (2002). Using pulsed gradient spin echo NMR for chemical mixture analysis: How to obtain optimum results. ***Concepts in Magnetic Resonance***. 14, 225–258

Barrientos, P. and López L. (2000). Historia y genética del aguacate. In: Teliz, D. (2007). El Aguacate y su Manejo Integrado. Mundi - Prensa, México D.F, pp. 19–30.

Barriga. H. (1992). Flora Medicinal de Colombia. Vol. II. Tercer Mundo Editores. Bogotá. 353-367.

Bergh, B.; Scora, R. and Storey, W. (1973). A Comparison of Leaf Terpenes in *Persea* Subgenus *Persea*. ***Botanical Gazette***. 134, 130-134.

Berhow, M. A. and Vaughn, S. F. (1999). Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. Principles and practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions.– ***CRC Press, Boca Raton***. 423–438.

Bernal, D. (2007). Revisión del género *Persea Miller* para Colombia. **Tesis de pregrado**, Carrera de Biología. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes, Bogotá. pp. 20-83.

Brittain, H. (2000). Techniques of chiroptical spectroscopy. **Applied Spectroscopy Reviews**. 35, 175-201.

Butt, A.; Roberts, C.; Seawright, A.; Oelrichs, P.; MacLeod, J. and Liaw, T. (2006). A novel plant toxin, persin, with in vivo activity in the mammary gland, induces Bim-dependent apoptosis in human breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**. 5, 2300-9

Cabral, M.; Barbosa-Filho, J.; Maia, G; Chaves, M.; Braga, M.; De Souza, W. and Soares, R. (2010). Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**. 124, 319-324.

Calderon-Montano M, J.; Burgos-Morón, E.; Pérez-Guerrero, C. and López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini reviews in medicinal chemistry**, 11, 298-344.

Campos, E.; Terrazas, T. and López-Mata, L. (2007). *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 54, 249-258.

Cassani, J.; Nilsson, M. and Morris, G A. (2012). Flavonoid Mixture Analysis by Matrix-Assisted Diffusion-Ordered Spectroscopy. **Journal of Natural Products**. 75, 131-134.

Cechinel-Filho, V.; Zampirolo, J.; Stulzer, H. and Schlemper, V. (2007). Antispasmodic effects of *Persea cordata* bark fractions on guinea pig ileum. **Fitoterapia**. 78, 125-128.

Ceuterick, M.; Vandebroek, I.; Torry, B. and Pieroni, A. (2008). Cross-cultural adaptation in urban ethnobotany: The Colombian folk pharmacopoeia in London. **Journal of Ethnopharmacology**. 120, 342-359.

Chanderbali, A.; Van der Werff, H. and Renner, S. (2001). Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 88, 104-134.

Charisiadis, P.; Kontogianni, V. G; Tsiafoulis, C. G; Tzakos, A. G; Siskos, M. and Gerothanassis, I. P. (2014). H-NMR as a Structural and Analytical Tool of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds of Phenol-Containing Natural Products and Model Compounds. **Molecules**, 19 (9), 13643-13682.

Chou, S.T.; Peng, H. Y.; Chang, C. T.; Yang, J. S.; Chung, H. K.; Yang, S. T.; Wood, W. G and Chung, J. G (2011). *Zanthoxylum Ailanthoides Sieb and Zucc.* Extract Inhibits Growth and Induces Cell Death through G2/M-Phase Arrest and Activation of Apoptotic

Signals in Colon 205 Human Colon Adenocarcinoma Cells. ***Anticancer Research***, 31, 1667–1676.

Cosmo, S.; Mayer, B.; Freitas, C.; Baggio, C. and Marques, M. (2007). Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract from barks of *Persea major* Kopp (Lauraceae) in rats. ***Brazilian Journal of Pharmacognosy***. 17, 533-537.

Costa, D.; (2009). Seasonal Variability of Essential Oils of *Eugenia uniflora* Leaves. ***Journal Brazilian Chemistry***. 20, 1287-1293.

Coy, E.; Cuca, L. and Sefkow, M. (2009). PAF-antagonistic inhibitory properties of Lauraceae neolignans. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters***. 19, 6922–6925.

Cuca, L. (1978). Contribución al estudio químico de las *lauraceas* en Colombia: estudio fitoquímico de la *Persea caerulea*. ***Revista Colombiana de Química***. 8, 7-14.

Cuca, L. E.; Coy, E. D.; Alarcón, M. A.; Fernández, A. and Aristizábal, F. A. (2011). Cytotoxic Effect of Some Natural Compounds Isolated from Lauraceae Plants and Synthetic Derivatives. ***Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud***. 31, 335–343.

Daglia M. (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. ***Current Opinion in Biotechnology***. 23, 1-8.

Danihelová, M.; Veverka, M.; Šturdík, E. and Jantová, S. (2013). Antioxidant Action and Cytotoxicity on HeLa and NIH-3T3 Cells of New Quercetin Derivatives. ***Interdisciplinary Toxicology***. 6 (4), 209–216.

De Almeida, A.; Miranda, M.; Simoni, I.; Wigg, M.; Lagrota, M. H. and Costa, S. (1998). Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. ***Phytotherapy Research***. 12, 562–567.

De Luca, A.; Batista J.; López, S.; Furlan, M.; Cavalheiro, A.; Siqueira, D.; Da Silva V.; Massayoshi, S. and Yoshida, M. (2010). Aromatic compounds from three brazilian Lauraceae species. ***Química Nova***. 33, 321-323.

De Souza, L. G; Renno, M. N. and Figueroa-Villa, J. (2016). Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. ***Chemico-Biological Interactions***. 254, 11-23

Díaz Monroy, L.G and Morales Rivera, M.A. (2012). “Análisis estadístico de datos multivariados”. Bogotá - Colombia, Universidad Nacional de Colombia: 407-443

Dike, I.; Obembe, O. and Adebisi, F. (2012). Ethnobotanical survey for potential anti-malarial plants in south-western Nigeria. ***Journal of Ethnopharmacology***. 144, 618–626.

Ding, H.; Chin, Y.; Kinghorn, D.; Steven, M. and D'Ambrosio, S. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. ***Seminars in Cancer Biology***. 17, 386–394.

Dixon, R. A.; Harrison, M. J. and Lamb, C. J. (1994). Early events in the activation of plant defense responses. ***Annual Review Phytopathology***. 32, 479–501.

Domergue, F.; Helms, G; Pruskyc, D. and Browsea, J. (2000). Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. ***Phytochemistry***. 54, 183-189.

Dunn, W.B. and Ellis, D.I. (2005). Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. ***TrAC Trends in Analytical Chemistry***. 24(4): 285-294.

Escobar, L.; Alfonso, P. and Aristizábal F. (2009). Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. ***Revista Colombiana Biotecnología***. XI, 49-56.

Escobar, L. and Aristizábal, F. (2010). Aplicación de Un Método Fluorométrico Para Evaluar La Proliferación Celular En Líneas Celulares Tumorales. ***Revista de la facultad de química farmacéutica***, 17(2), 173–180.

Escobar, L.; Rivera, A. and Aristizábal, F. (2010). Estudio comparativo de los métodos de Resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. ***Vitae***. 17, 67-74.

Escobar, M.; Aristizábal, G. and Fabio, A. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. ***Vitae***. 17(2), 173-180.

Evans, R.; Haiber, S.; Nilsson, M. and Morris, GA. (2009). Isomer Resolution by Micelle-Assisted Diffusion-Ordered Spectroscopy. ***Analytical Chemistry***. 81 (11) 4548–4550.

Ezuruike, U. and Prieto, J. (2014). The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. ***Journal of Ethnopharmacology***. 155, 857–924.

Fabricant, D. S. and Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. ***Environmental health perspectives***. 109 (Suppl 1), 69.

Falodun, A.; Engel, N.; Kragl, U.; Nebe, B. and Langer, P. (2013). Novel anticancer alkene lactone from *Persea americana*. ***Pharmaceutical Biology***. 51(6), 700–706.

Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D. and Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. ***International Journal of Cancer***. 136(5), E359-86.

- Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M. and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. ***International journal of cancer***. 136(5), E359-E386.
- Fraga, B. and Terrero, D. (1996). Alkene- γ -lactones and avocado furans from *Persea indica*: a revision of the structure of majorenolide and related lactones. ***Phytochemistry***. 41, 229-232.
- Fraga, B.; Terrero, D.; Gutiérrez, C. and González-Coloma, A. (2001). Minor diterpenes from *Persea indica*: their antifeedant activity. ***Phytochemistry***. 56, 315-320.
- Fraga, F.; Terrero, D.; Bolaños, P. and Díaz, C. E. (2017). Diterpenes with new isoryanodane derived skeletons from *Persea indica*. ***Tetrahedron Letters***. 58, 2261-2263.
- Gen, X. P. (1986). Medicinal plants: the chinese approach. ***World Health Organization Forum***. 7, 84-85.
- Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. ***The Plant Cell***. 8, 1871-1883.
- Giffoni, J.; Salles, E.; Aguiar R.; Nogueira, R.; Costa, J.; Medeiros, L.; de Moraes, S. and Gadelha, M. (2009). Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***. 42, 110-113.
- Gnavi, G. (2010). Comparative characterization of *Santolina insularis* chemotypes by essential oil composition, 5S-rRNA-NTS sequencing and EcoRV RFLP-PCR. ***Phytochemistry***. 71, 930-936.
- Gómez, L.; Morantes, S.; Cordero, C. and Aristizábal, F. (2006). Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. ***Biomédica. Revista del Instituto Nacional de Salud de Colombia***. 26, 161-168.
- Gómez, Y. (2007). Actividad antifúngica de extractos orgánicos del árbol *Fagara monophylla* (Rutaceae) en Venezuela. ***Revista Biológica Tropical***. 55, 767-775.
- Gonzales de la Cruz, M.; Baldeón, S.; Beltrán, H.; Jullian, V. and Bourdy, G (2014). Hot and cold: Medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). ***Journal of Ethnopharmacology***. 155, 1093-1117.
- González, J.; García-Barriuso, M. and Amich, F. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. ***Journal of Ethnopharmacology***. 131, 343-55.

González-Coloma, A.; Cabrera, R.; Castañera, P.; Gutiérrez, C. and Fraga, B. (1992). Insecticidal activity and diterpene content of *Persea indica*. **Phytochemistry**. 31, 1549-1552.

González-Coloma, A.; Terrero, D.; Perales, A.; Pierre Escoubas, P. and Fraga, B. (1996). Insect Antifeedant Ryanodane Diterpenes from *Persea indica*. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 44, 296-300.

Griffiths, W.J. (2008). Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling. **Royal Society of Chemistry**. 254-288

Gullo, A. (2009). Invasive fungal infections: the challenge continues. **Drugs**. 69, 65-73.

Gutiérrez, S.; Cansino, R.; Zebadua, J.; Perez, N. and Chilpa, R. (2012). Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of β -pinene and linalool as active principles. **Journal of Ethnopharmacology**. 143, 673–679.

Hanitriniaina, A. (2006). Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oils from *Ravensara aromatica* Sonnerat, a tree endemic to Madagascar. **Flavour and Fragrance Journal**. 21, 833-838.

Harborne, J. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. **Natural Products Reports**. 18, 361–379.

Harborne, J. B. (1986). The Flavonoids. Advance in research since 1986. Chapman and Hall. London. pp 251.

Harborne, J. B. and Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. 55 (6), 481-504.

Hashimura, H.; Ueda, C.; Kawabata, J. and Kasai T. (2001). Acetyl-CoA carboxylase inhibitors from avocado (*Persea americana* Mill.) fruits. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. 65, 1656–8.

Huang, H.; Jia, Q.; Ma, J.; Qin, G; Chen, Y.; Xi, Y.; Lin, L.; Zhu, W.; Ding, J.; Jiang, H. and Liu, H. (2009). Discovering novel quercetin-3-O-amino acid-esters as a new class of Src tyrosine kinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 44 (5), 1982-8.

Instituto de Ciencias Naturales/Herbario Nacional Colombiano/ Universidad Nacional de Colombia. Acceso vía web: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/> (consultada 30 julio de 2010).

Joulain, D. and Koning, W. (1998). The atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, 1st ed.; E.B. Verlag Hamburg: Hamburg. pp 275.

Kawagishi, H.; Fukumoto, Y.; Hatakeyama, M.; He, P.; Arimoto, H.; Matsuzawa, T.; Arimoto, Y.; Suganuma, H.; Inakuma, T. and Sugiyama, A. (2001). Liver Injury Suppressing Compounds from Avocado (*Persea americana*). **Journal Agricultural Food Chemistry**. 49, 2215-2221.

Kayashima, T.; Mori, M.; Yoshida, H.; Mizushima, Y. and Matsubara, K. (2009). 1,4-Naphthoquinone Is a Potent Inhibitor of Human Cancer Cell Growth and Angiogenesis. **Cancer Letters**. 278(1), 34–40.

Kim, O.; Murakami, A.; Nakamura, Y.; Takeda, N.; Yoshizumi, H. and Ohigashi, H. (2000). Novel Nitric Oxide and Superoxide Generation Inhibitors, Persenone A and B, from Avocado Fruit. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 48, 1557-1563.

Kopp, L. E. (1966). A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (Perseae Lauraceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 14, 1–117.

Kruthiventi, A. and Krishnaswamy, N. (2000). Constituents of the flowers of *Persea gratissima*. **Fitoterapia**. 71, 94-96.

Kuete, V.; Kamga, J.; Sandjo, L.; Ngameni, B.; Poumale, H. and Ambassa, P. (2011). Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 11: 6.

Kumar, R.; Saha, A. and Saha, D. (2012). A new antifungal coumarin from *Clausena excavata*. **Fitoterapia**. 83 (1), 230-233.

Laboratorio de Botánica y Sistemática, UNIANDÉS. Acceso vía web: <http://botanica.uniandes.edu.co/investigacion/lauraceae/generos/persea.htm> (Consultada 25 de Julio de 2010).

Lamorde, M.; Tabuti, J.; Obua, C.; Kukunda-Byobona, C.; Lanyero, H.; Byakika-Kibwika, P.; Bbosa, G; Lubega, A. and Okeng, J. (2010). Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**. 130, 43-53.

Lans, Ch. (2006). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 2, 1-11.

Larijani, K.; Rustaiyan, A.; Azar, P.; Nematollahi, F. and Taban, S. (2010). Composition of essential oil of leaves of *Persea americana* cultivated in Iran. **Chemistry of Natural Compounds**. 46, 489-490.

Larock, R. (1999). *Comprehensive Organic Transformations*. Wiley-VCH. Segunda edición. Canadá. pp. 2224-2535.

Li, P., Zhao, Q. L., Wu, L. H., Jawaid, P., Jiao, Y. F., Kadowaki, M. and Kondo, T. (2014). Isofraxidin, a Potent Reactive Oxygen Species (ROS) Scavenger, Protects Human Leukemia Cells from Radiation-Induced Apoptosis via ROS/ mitochondria Pathway in p53-Independent Manner. ***Apoptosis***. 19, 1043–1053.

Li, P.; Zhao, Q. L.; Wu, L. H.; Jawaid, P.; Jiao, Y. F.; Kadowaki, M. and Kondo, T. (2014). Isofraxidin, a Potent Reactive Oxygen Species (ROS) Scavenger, Protects Human Leukemia Cells from Radiation-Induced Apoptosis via ROS/ mitochondria Pathway in p53-Independent Manner. ***Apoptosis***. 19(6), 1043–1053.

Lobato, C.; Enríquez, R. and Reynolds, W. (2006). Estudio conformacional del sistema anular de l-prolina mediante el uso de efectos de disolvente. ***Revista de Ciencias Básicas UJAT***. Vol. 5. No. 1, 3–14.

López-Lázaro, M.; Calderón-Montaño, J. M.; Burgos-Morón, E. and Pérez-Guerrero, C. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. ***Mini Reviews in Medicinal Chemistry***. 11 (4), 298–344.

Lorea, F. G. (2005). Nuevas especies de *Licaria*, *Ocotea* y *Persea* (Lauraceae) de México. ***Acta Botánica Mexicana***. 71, 61-87.

Lu, Q.; Arteaga, J.; Zhang, Q.; Huerta, S.; Go, V. and Heber, D. (2005). Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. ***Journal of Nutritional Biochemistry***. 16, 23–30.

Lu, Y. C.; Chang, H. S.; Peng, C. F.; Lin, C. H. and Chen, I. S. (2012). Secondary metabolites from the unripe pulp of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. ***Food Chemistry***. 135 (4), 2904-2909.

Madriñán, S. (1996). Systematic studies in the Lauraceae Monograph of *Rhodostemonodaphne*. ***Tesis de posgrado***, Doctorado en Biología. Department of Organismic and Evolutionary Biology. Harvard University. Cambridge. pp. 2-26.

Madriñán, S. (2004). Flowering plants of the Neotropics. Lauraceae (Avocado family). ***Princeton University Press***. 204-206.

Magassouba, F. B.; Diallo, A.; Kouyaté, M.; Mara, F.; Mara, O.; Bangoura, O.; Camara, A.; Traoré, S.; Diallo, A. K.; Zaoro, M.; Lamah, K.; Diallo, S.; Camara, G.; Traoré, S.; Kéita, A.; Camara, M. K.; Barry, R.; Kéita, S.; Oularé, K.; Barry, M. S.; Donzo, M.; Camara, K.; Toté, K.; Vanden Berghe, D.; Totté, J.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J. and Baldé, A. M. (2007). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. ***Journal of ethnopharmacology***, 114 (1), 44-53.

Malik, A.; Kushnoor, A.; Saini, V.; Singhal, S. K. and Yadav, Y. C. (2011). In Vitro Antioxidant Properties of Scopoletin. ***Pharmacological Research***. 3, 659–665.

Medentsev, A.G. and Akimenko, V.K. (1998). Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry*. 47 (6), 935-59.

Menendez, G; Aceituno, L.; Molina, M.; Reyes, V.; Tardío, J. and Pardo, M. (2014). Medicinal plants traditionally used in the northwest of the Basque Country (Biscay and Alava), Iberian Peninsula. *Journal of Ethnopharmacology*. 152, 113–134.

Merck. (1965). Reactivos de Coloración para Cromatografía en Capa Fina y en Papel. E. Merck, *Darmstadt (R.F. de Alemania)*. 27-332.

Miranda, M.; Almeida, A.; Costa, S.; Santos, M.; Lagrota, M. and Wigg, M. (1997). In vitro activity of extracts of *Persea americana* leaves on acyclovir-resistant and phosphonoacetic resistant herpes simplex virus. *Phytomedicine*. 4, 347-352.

Mohagheghzadeh, A.; Pouya Faridi, P.; Shams-Ardakani, M. and Ghasemi, Y. (2006). Medicinal smokes. *Journal of Ethnopharmacology*. 108, 161–184.

Mohammed Rahmoun, N.; Boucherit-Atmani, Z.; Benabdallah, M.; Boucherit, K.; Villemin, D. and Choukchou-Braham, N. (2013) Antimicrobial Activities of the Henna Extract and Some Synthetic Naphthoquinones Derivatives. *American Journal of Medical and Biological Research*. 1, 16–22.

Montenegro, R. C.; Araújo, A. J.; Molina, M. T.; Barreto, J. D.; Marinho, F.; Rocha, D. D.; López-Montero, E.; Marília, O.F.; Goulart M.O.; Bento, E.S.; Alves, A. P.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O. and Costa-Lotufo, L. V. (2010). Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 184. No. 3, 439-448.

Mootosamy, A. and Mahomoodally, M. (2014). Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. *Journal of Ethnopharmacology*. 151, 413–444.

Morais-Braga, M. F. B.; Carneiro, J. N. P.; Machado, A. J. T.; dos Santos, A. T. L.; Sales, D. L.; Lima, L. F.; Figueredo, F. G. and Coutinho, H. D. M. (2016). *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. *Journal of Ethnopharmacology*. 194, 1140–1152.

Morantes, S. J.; Páez, A.; Cordero, C. P.; Rincón, J. and Aristizábal, F. A. (2006). Actividad citotóxica y análisis fitoquímico de fracciones aisladas del extracto etanólico total de *Acnistus Arborescens*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 25, 491–496.

Morantes, S. J.; Páez, A.; Cordero, C. P.; Rincón, J. and Aristizabal, F. A. (2007). Actividad citotóxica y análisis fitoquímico de fracciones aisladas del extracto etanólico total de *Acnistus arborescens*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 25 (4), 491.

Moriarty, D. M.; Bansala, A.; Cole, R. A.; Takaku, S.; Haber, W. A. and Setzer, W. N. (2007). Selective cytotoxic activities of leaf essential oils from Monteverde, Costa Rica. Actividades citotóxicas selectivas de los aceites esenciales de la hoja de Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**. 2 (12), 1263-1268.

Morris, K. F.; Stilbs, P. and Johnson Jr. C. S. (1994). Analysis of mixtures based on molecular size and hydrophobicity by means of diffusion-ordered 2D NMR. **Analytical Chemistry**. 66, 211–215.

Mukherjee, R.; Fujimoto, Y. and Kakinuma, K. (1994). 1-(ω -Hydroxyfattyacyl) glycerols and two flavanols from *Cinnamomum camphora*. **Phytochemistry**. 37 (6), 1641-1643.

Nheme, C. (2008). Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. 36, 602–611.

Novais, M.; Santos, I.; Mendesa, S. and Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). **Journal of Ethnopharmacology**. 93, 183–195.

Oberlies, N.; Rogers, L.; Martin, J. and McLaughlin, J. (1998). Cytotoxic and Insecticidal Constituents of the Unripe Fruit of *Persea Americana*. **Journal of Natural Products**. 61, 781-785.

Ochwang, D.; Kimwele, C.; Oduma, J.; Gathumbi, P.; Mbaria, J. and Kiama, S. (2014). Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**. 151, 1040–1055.

Oelrichs, P.; Ng, J.; Seawright, A.; Ward, A.; Schäffeler, L. and Macleod, J. (2006). Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium. **Natural Toxins**. 3, 344-349.

Ososki, A.; Lohr, P.; Reiff, M.; Balick, M.; Kronenberg, F.; Fugh-Berman, A. and O'Connor, B. (2002). Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. **Journal of Ethnopharmacology**. 79, 285–298.

Otomo, N.; Sato, H. and Sakamura, S. (1983). Novel phytotoxins produced by the causal fungus of the shoot blight of larches. **Agricultural and Biological Chemistry**. 47 (5), 1115-1119.

Otsuka, N.; Liu, M. H.; Shiota, S.; Ogawa, W.; Kuroda, T.; Hatano, T. and Tsuchiya, T. (2008). Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 31 (9), 1794-1797.

- Owolabi, M.; Coker, H. and Jaja, S. (2010). Bioactivity of Phytoconstituents of leaves of *Persea americana*. **Journal of Medicinal Plants Research**. 4, 1130-1135.
- Padalia, R.; Joshi, S. and Bisht, D. (2009). Mathela essential oil composition of *Persea duthiei*. **Chemistry of Natural Compounds**. 45, 5745-747.
- Paliwal, S.; Sundaram, J. and Mitragotri, S. (2005) Induction of Cancer-Specific Cytotoxicity towards Human Prostate and Skin Cells Using Quercetin and Ultrasound. **British journal of cancer**. 92, 499-502.
- Patti, G. J.; Yanes, O. and Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews-Molecular Cell Biology**. 13, 263-269.
- Peter, E.; Rumisha, S.; Mashoto, K. and Malebo, H. (2014). Ethno-medicinal knowledge and plants traditionally used to treat anemia in Tanzania: A cross sectional survey. **Journal of Ethnopharmacology**. 154, 767-773.
- Pino, J.; Fernandes, P.; Sá Fontinha, S.; Marbot, R. and Rosado, A. (2004). Leaf Oils of *Helichrysum melaleucum* Rchb. ex Holl. *Oenanthe divaricata* (R. Br.) Mabb. and *Persea indica* (L.) Spreng from Madeira. **Journal of essential oil research**. 16, 487-489.
- Rahman, I. U.; Ijaz, F.; Iqbal, Z.; Afzal, A.; Ali, N.; Afzal, M.; Khan, M. A.; Muhammad, S.; Qadir, G and Asif, M. (2016). A novel survey of the ethno medicinal knowledge of dental problems in Manoor Valley (Northern Himalaya), Pakistan. **Journal of Ethnopharmacology**. 194, 877–894.
- Rajagopal, M. S. (2014). *Canarium Patentinervium* MIQ. (Burseraceae Kunth): A Phytochemical and Pharmacological Study. **Thesis PhD in chemistry**, University of Nottingham, Malaysia.
- Ramos, M.; Jerza, G; Villanueva, S.; López-Dellamary, Waibel, R. and Winterhalter, P. (2004). Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass). **Phytochemistry**. 65, 955-962.
- Rodríguez-Saona, C.; Maynard, D. F. and Trumble, J. (1998). Novel antifeedant and insecticidal compounds from avocado idioblast cell oil. **Journal of Chemistry Ecology**. 24, 867-890.
- Rodríguez-Saona, C.; Maynard, D.; Phillips, S. and Trumble, J. (1999). Alkylfurans: Effects of Alkyl Side-Chain Length on Insecticidal Activity. **Journal of Natural Products**. 62, 191-193.
- Rodríguez-Saona, C. and Trumble, J. (2000). Biologically active aliphatic acetogenins from specialized idioblast oil cells. **Current Organic Chemistry**. 4,1249–60.

- Rodríguez-Carpena, J. G.; Morcuende, D.; Andrade, M. J.; Kylli, P. and Estevez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, *In Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and protein oxidation in porcine patties. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 59, 5625–5635.
- Rohwer, J.; Kubitzki, K. and Bittrich, V. (1993). Lauraceae. ***The Families and Genera of Vascular Plants. II. Flowering Plants - Dicotyledons***. Springer-Verlag pp. 366-380.
- Rokaya, M.; Münzbergová, Z. and Timsina, B. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal. ***Journal of Ethnopharmacology***. 130, 485-504.
- Romero, M. (2008). Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007. ***Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt***. Bogotá D. C., Colombia. pp. 181.
- Rong S.; Yan-Xiu, G; Kai-Ze, S.; Yao-Bo, X.; Chun-Ren, W.; Hai-Yang, Liu. and Jin-Yan, D. (2011). Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. ***Phytochemistry Letters***. 4 (2), 101.
- Schlemper, S.; Schlemper, V.; da Silva, D.; Cordeiro, F.; Cruz, A.; Oliveira, A., and Cechinel-Filho, V. (2001). Antibacterial activity of *Persea cordata* stem barks. ***Fitoterapia***. 72, 73-75.
- Scora, R. and Bergh, B. (1990). The Origins and Taxonomy of Avocado (*Persea americana*) Mill. Lauraceae. ***Acta Horticulturae***. 275, 386-389.
- Scora, R. and Scora, P. (2001). Essential leaf oil of *Persea* subgenus *Eriodaphne* and closely related *Perseoid* genera. ***Journal of essential oil research***. 13, 37-42.
- Scora, R.; Wolstenholme, B. and Lavi, U. (2002). Taxonomy and Botany. En: W. Whiley, A.; Schaffer, B.; Wolstenholme, B. ***Avocado: Botany, Production and Uses***. **CABI Publishing**. pp. 15-16.
- Sepulveda, S.; Delhvi, S. and Cassels, B. (1990). An aryltetralin lignan from *Persea lingue*. ***Phytochemistry***. 29, 2357-2358.
- Setzer, W.; Stokes, S.; Penton, A.; Takaku, S.; Haber, W.; Hansell, E.; Caffrey, C. and Mc Kerrow, J. (2007). Cruzain Inhibitory Activity of the Leaf Essential Oils of Neotropical Lauraceae and Essential Oil Components. ***Natural Product Communications***. 2, 1203-1210.
- Smith, J. (2010). Intraspecific variation in essential oil composition of *Eremophila longifolia* F. Muell. (Myoporaceae): Evidence for three chemotypes. ***Phytochemistry***. 71, 1521-1527.

Stankiewicz-Kranc, A.; Bielawska, A.; Bielawski, K. and Skrzydlewska, E. (2009). Proline Analogue of Nitrosourea as a New Cytotoxic Prodrug. **Archiv der Pharmazie**. 342, 632–639.

Joshi, S.; Verma, A. and Chandra S. Mathela, C. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 37–40.

Tabuti, J.; Kukunda, C. and Waako, P. (2010). Medicinal plants used by traditional medicine practitioners in the treatment of tuberculosis and related ailments in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**. 127, 130-136.

Tanaka, T.; Nakashima, T.; Ueda, T.; Tomii, K. and Kouno, I. (2007). Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 55(6), 899-901.

Tandon, V. K.; Chhor, R. B.; Singh, R. V.; Rai, S. and Yadav, D. B. (2004). Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 14(5), 1079-1083.

Tempesti, T.; Alvarez, M. G; De Araújo, M. F.; Araújo, F. E.; De Carvalho, M. G and Durantini, E. (2012). Antifungal activity of a novel quercetin derivative bearing a trifluoromethyl group on *Candida albicans*. **Medicinal Chemistry Research**. 21 (9), 2217 – 2222.

Terrasse, V. (2014). Global Battle against Cancer Won't Be Won with Treatment Alone-Effective Prevention Measures Urgently Needed to Prevent Cancer Crisis. **Central European journal of public health**. 22, 3–4.

Tomazzoni, M. (2004). Subsídios para a introdução do uso de fitoterápicos na rede básica de saúde do município de Cascavel/Pr. **Tesis de posgrado**. Programa Maestría en Enfermería. Universidad Federal do Paraná. Curitiba. pp. 75-82.

Tormena C. F.; Evans R.; Haiber S.; Nilsson M. and Morris G A. (2010). Matrix-Assisted Diffusion-Ordered Spectroscopy: Mixture Resolution by NMR Using SDS Micelles. **Magnetic Resonance in Chemistry**. 48, 550-553.

Tsai, I.; Hsieh, Ch.; Duht, Ch. and Chen, I. (1996). Cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*. **Phytochemistry**. 43, 1261-1263.

Tsai, I.; Hsieh, Ch.; Duht, Ch. and Chen, I. (1998). Additional cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*. **Phytochemistry**. 48, 1371-1375.

Universidad de Antioquia, Banco de objetos de Aprendizaje y de Información. Acceso vía web en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/ova/?q=node/554> (consultada 2 de Agosto de 2010).

Valadeau, C.; Castillo, J.; Sauvain, M. and Lores, A. (2010). The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**. 127, 175-192.

Van der Werff, H. (1991). A key to genera of Lauraceae from Ecuador and Peru. **Annals. Missouri Botanical**. 78, 377-387.

Van der Werff, H. (1996). *Ocotea ikonyokpe*, a new species of *Ocotea* from Cameroon. **Novon**. 6 (4), 460-462.

Van Eijk, G W. and Roeymans, H. J. (1983). A further naphthoquinone derivative from the fungus *Hendersonula toruloidea*. **Experientia**. 39(5), 513-14.

Vargas, W. (2002). *Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales*. **Universidad de Caldas**. pp. 356-357.

Vicente, F.; Basilio, A.; Platas, G.; Collado, J.; Bills, G. F.; González, A. G.; Serrano, J. M.; Tormo, J. R.; Harris, G. H.; Zink, D. L.; Justice, M.; Kahn, J. N. and Peláez, F. (2009). Distribution of the antifungal agents sordarins across filamentous fungi. **Mycological Research**. 113 (6), 754-770.

Vicente, F.; Basilio, A.; Platas, G; Collado, J.; Bills, G F.; González del Val, A.; Martín, J.; Tormo, J. R.; Harris, G H.; Zink, D. L.; Justice, M.; Kahn, J. N.; Peláez, F. (2009). Distribution of the antifungal agents sordarins across filamentous fungi. **Mycological Research**. 113, 754-70.

Vieira, Mariano G S.; Gramosa, Nilce, V.; Ricardo, N'ágila, M. P. S.; Morris, Gareth, A.; Adams, Ralph, W. and Nilsson, M. (2014). Natural product mixture analysis by matrix-assisted DOSY using Brij surfactants in mixed solvents. **The Royal Society of Chemistry**. 4, 42029–42034.

Viel S.; Ziarelli F. and Caldarelli S. (2003). Enhanced diffusion-edited NMR spectroscopy of mixtures using chromatographic stationary phases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 100, 9696.

Vo, V. A.; Lee, J. W.; Chang, J. E.; Kim, N. H.; Kim, J. Y.; Lee, H. J.; Kim, S. S.; Chun, W and Know, Y. S. (2012). Avicularin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppressing ERK Phosphorylation in RAW264.7 Macrophages. **Biomolecules & Therapeutics**. 20, 532–537.

Wang, G. J.; Tsai, T. H. and Lin, L. C. (2007). Prenylflavonol, acylated flavonol glycosides and related compounds from *Epimedium sagittatum*. **Phytochemistry**. 68, 2455–64.

Wang, W.; Bostic, T. and Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. **Food Chemistry**. 122, 1193-1198.

Williams, L. (1977). The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg *Persea*. ***Economic Botany***. 31, 315–320.

Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. ***Phytochemistry***. 64, 3-19.

Wofford, E. (1974). The systematic significance of flavonoids in *Persea* of the Southeastern United States. ***Biochemical Systematics and Ecology***. 2, 89-91.

Wright, C.; Van-Buren, L.; Kroner, C. and Koning, M. (2007). Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. ***Journal of Ethnopharmacology***. 114, 1-31.

Yamazaki, T. and Tokiwa, T. (2010). Isofraxidin, a Coumarin Component from *Acanthopanax Senticosus*, Inhibits Matrix Metalloproteinase-7 Expression and Cell Invasion of Human Hepatoma Cells. ***Biological & pharmaceutical bulletin***. 33, 1716–1722.

Yong, J. (1998). A flavonoid study of the Lauraceae. ***MSc thesis***. Faculty of Science. University of British Columbia. pp. 55-90.

Zhang, J. H.; Chung, T. D. and Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. ***Journal of Biomolecular Screening***. 4, 67-73

Zheng, X. and Xing, F. (2009). Ethnobotanical study on medicinal plants around Mt. Yinggeling, Hainan Island, China. ***Journal of Ethnopharmacology***. 124, 197-210.

Zheng, X.; Wei, J.; Sun, W.; Li, R., Liu, S. and Dai, H. (2013). Ethnobotanical study on medicinal plants around Limu Mountains of Hainan Island, China. ***Journal of Ethnopharmacology***. 148, 964–974.

Producción científica

Parte de los resultados obtenidos de la presente tesis doctoral han sido objeto de las siguientes publicaciones:

- Alvarez, J. Cuca, L. E., Carrasco, A., Fernández, A., Fernández, I. Phenolic constituents of leaves from *Persea caerulea* Ruiz & Pav; Mez (Lauraceae). *Biochem. System. Ecol.* 67 53-57, **2016**
- Alvarez, J. Cuca, L. E., Carrasco, A., Fernández, A., Fernández, I., Raya, A. Flavonoid glycosides from *Persea caerulea*. Unraveling their interactions with SDS-micelles through matrix assisted DOSY, PGSE, mass spectrometry, and NOESY. *Magn. Reson. Chem.* 54,9; 718–728 **2016**

Así mismo se participó como ponente en los siguientes congresos:

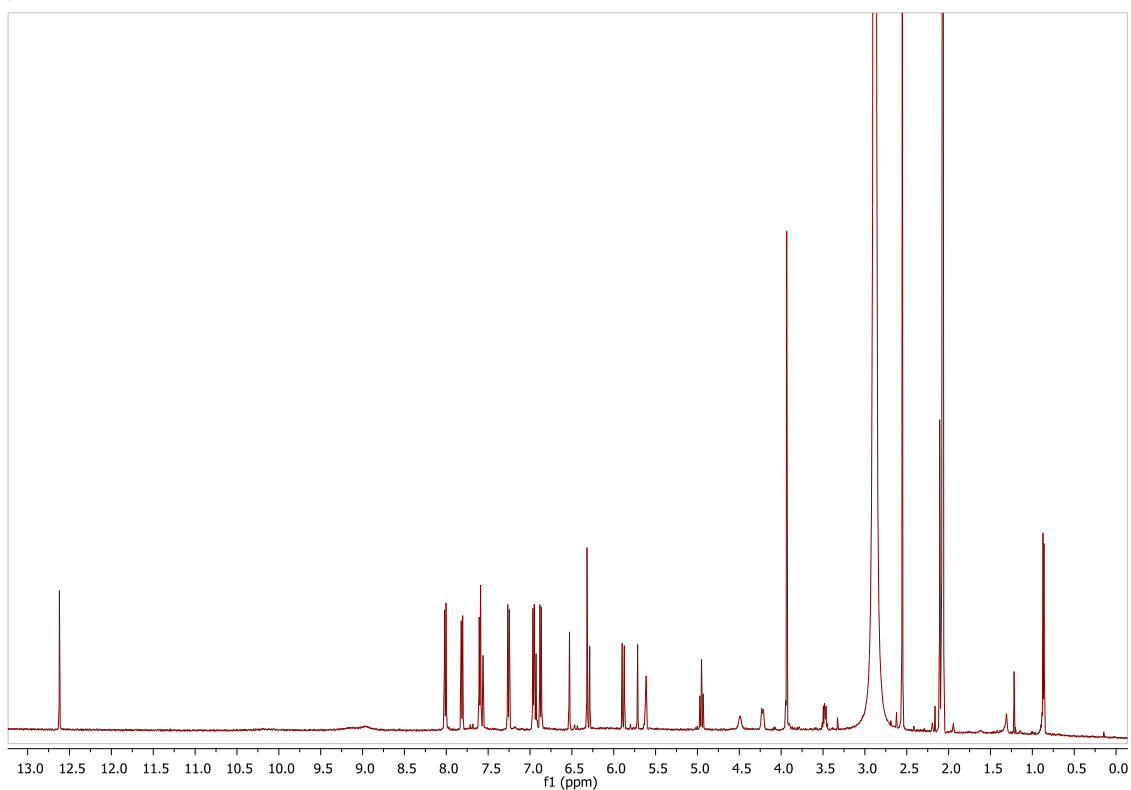
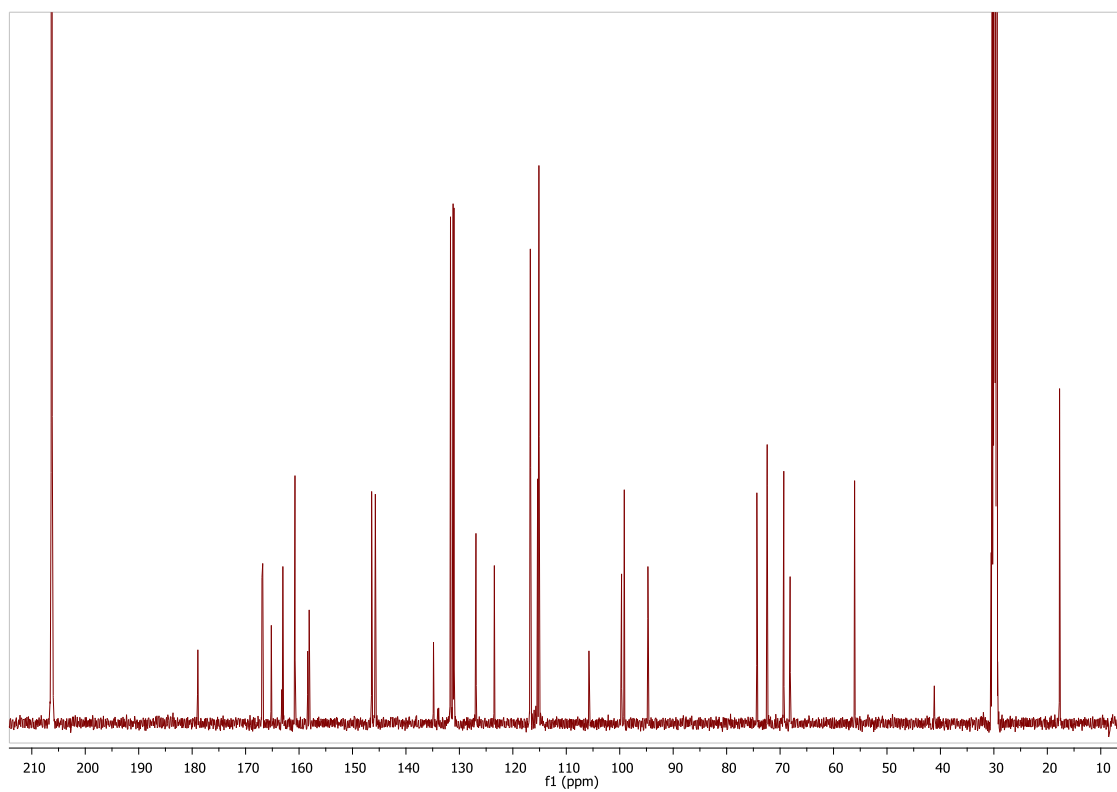
- Alvarez, J. Cuca, L. E. Actividad Antifúngica del aceite esencial de *Persea caerulea*. XI Congreso Colombiano de Fitoquímica. Medellín, Colombia, **2011**. Participación en modalidad oral.
- Alvarez, J. Cuca, L. E., Aristizabal, F. Actividad citotóxica de extractos etanólicos de especies del Caribe Colombiano. XI Congreso Colombiano de Fitoquímica. Medellín, Colombia, **2011**. Participación en modalidad poster.
- Alvarez, J. Cuca, L. E. Chemical variability of essential oil of *Persea caerulea* from different geographic regions in colombia. Braziiian Conference on Natural Products (3rd BCNP), XXIX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXIX RESEM) and VII Meeting of the Latin American Society of

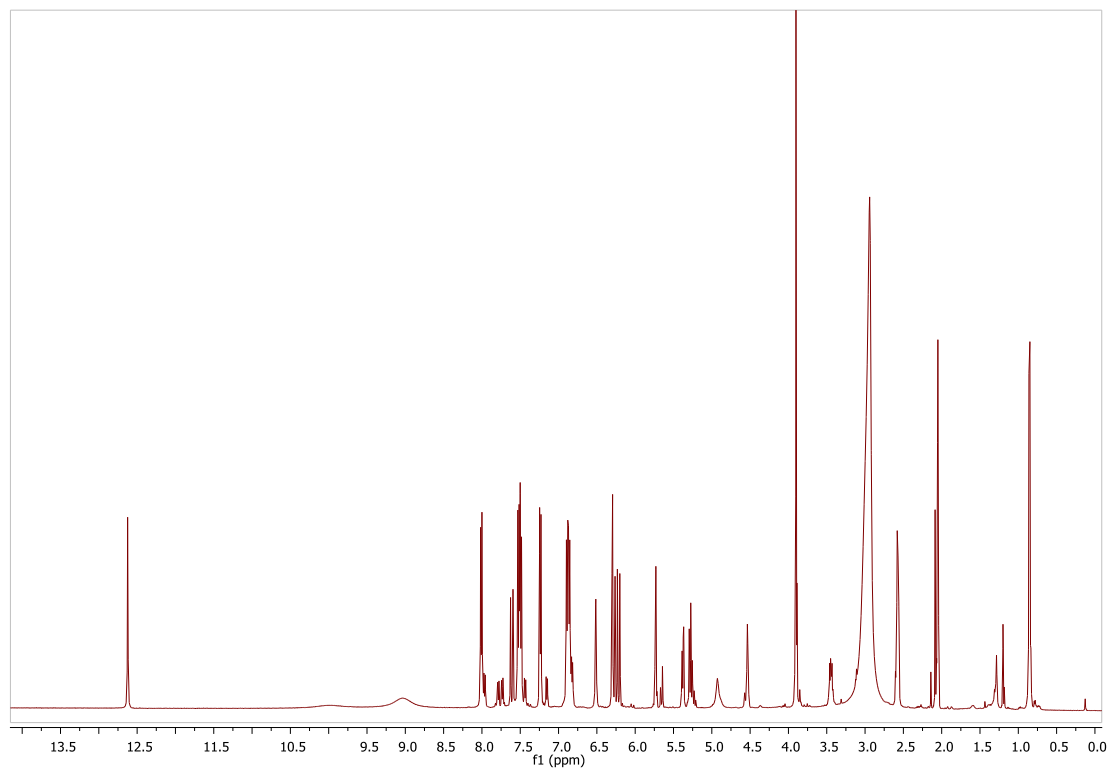
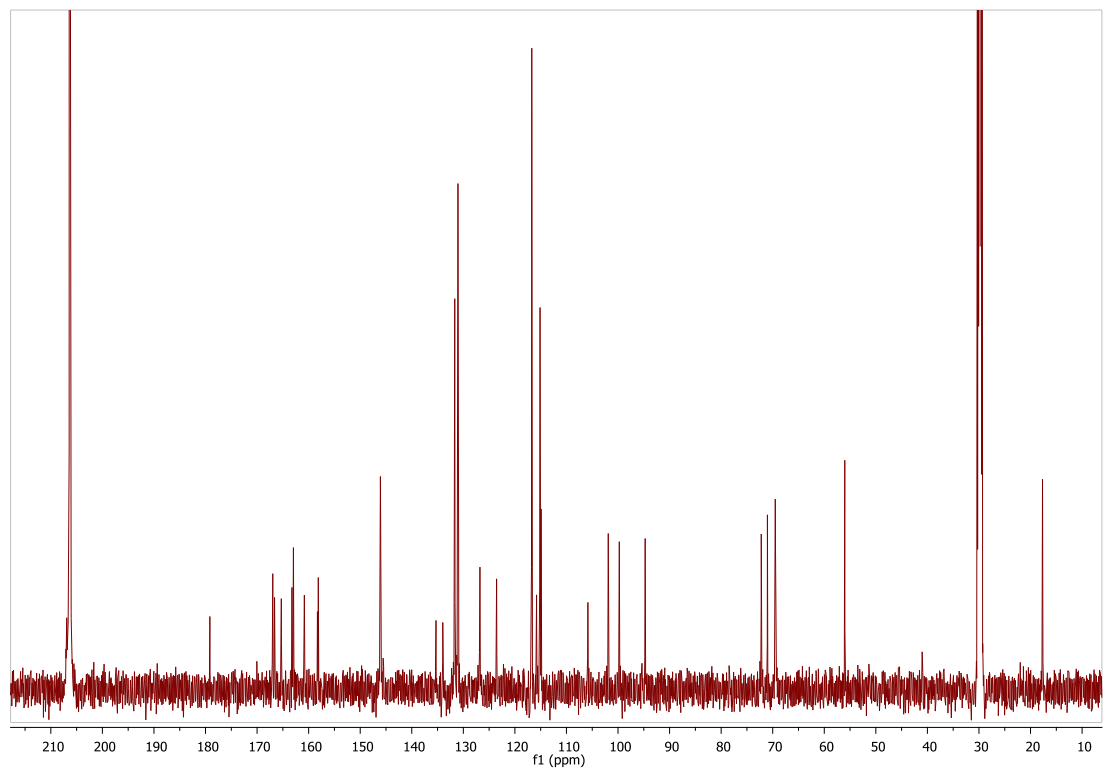
- Phytochemistry (VII SFL). Ouro Preto, Brasil, **2011**. Participación en modalidad poster.
- Alvarez, J. Cuca, L. E., Carrasco, A., Fernández, A. Estudio químico comparativo de frutos de especies del género *Persea* empleando LC-DAD-ESI-IT-MS. Silae-Latino American Congress of Ethnomedicine. Salerno, Italia, **2012**. Participación en modalidad oral.
 - Alvarez, J. Cuca, L. E., Aristizabal, F. Actividad biológica de extractos etanólicos de *Persea caerulea*. Silae- LatinoAmerican Congress of Ethnomedicine. Salerno, Italia, **2012**. Participación en modalidad poster.
 - Alvarez, J. Cuca, L. E., Mendoza, D. Caracterización fitoquímica y actividad acaricida de extractos etanólicos de especies vegetales de la familia Lauraceae. XXX Congreso Latinoamericano De Química, CLAQ. Cancún, México, **2012**. Participación en modalidad poster.
 - Alvarez, J. Cuca, L. E., Carrasco, A., Fernández, I. Application of matrix assisted pulse gradient diffusion NMR on *Persea caerulea* fractions. VI Mediterranean Organic Chemistry Meeting Granada, España, **2013**. Participación en modalidad oral.
 - Alvarez, J. Cuca, L. E., Carrasco, A. Application of matrix-assisted DOSY in flavonoids from *Persea caerulea*. 4th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP) and 4thXXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution Systematics and Ecology. Natal, Brasil, **2014**. Participación en modalidad poster.
 - Alvarez, J. Cuca, L. E., Aristizabal, F. Biological activity of essential oils of *P. caerulea* collected in diversity regions from Colombia. XXIV Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina- SLIAE. Punta cana, República dominicana, **2015**. Participación en modalidad poster.

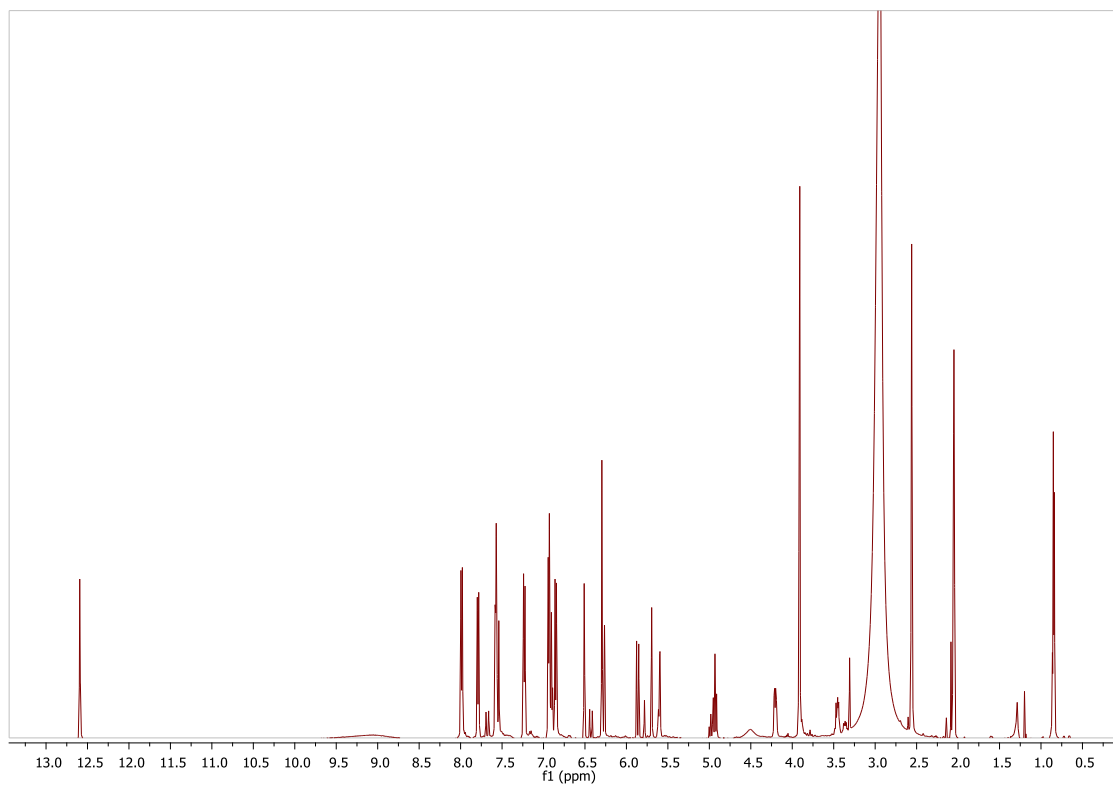
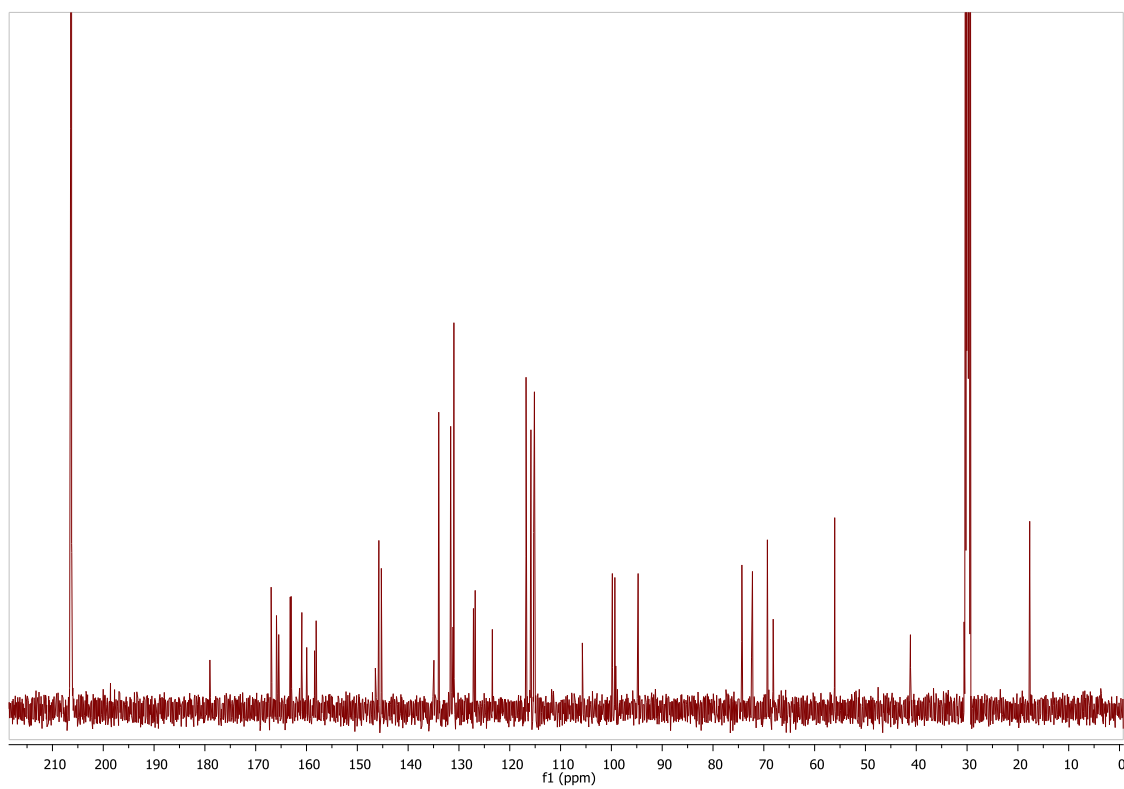
Recomendaciones y Sugerencias

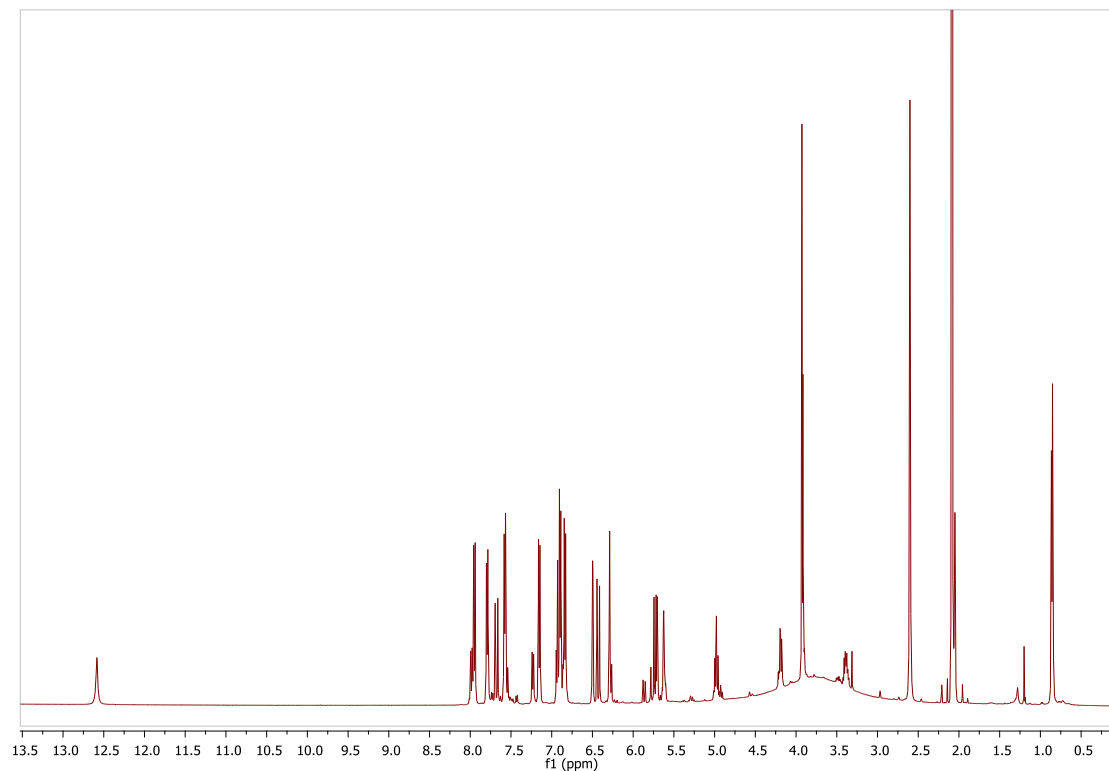
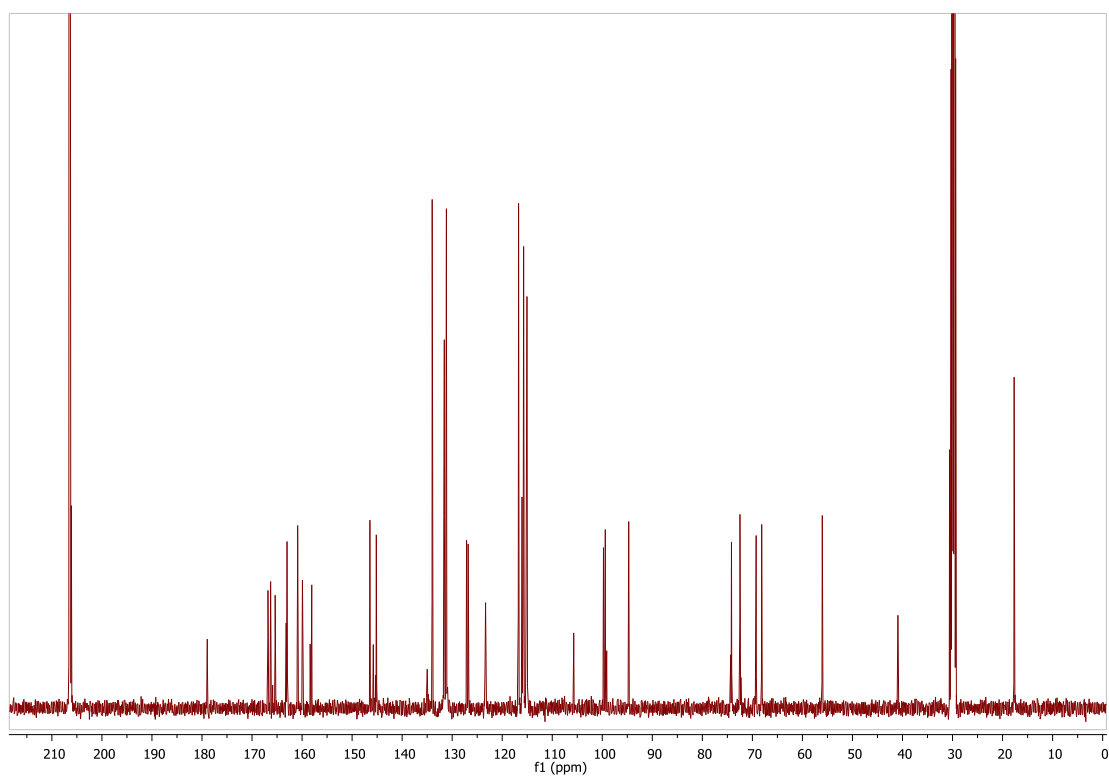
- Continuar con el proceso de aislamiento, purificación e identificación de los constituyentes presentes en las fracciones y otros órganos vegetativos no incluidos en esta investigación a fin de completar el estudio fitoquímico de las especie *P. caerulea*.
- Con la información obtenida mediante CL/DAD/EM desarrollar la caracterización total de cada uno de los perfiles cromatográficos con el objetivo de ampliar la información química de la especie y por ende del genero *Persea*.
- Realizar estudios químicos en otras especies del género *Persea* con el fin de establecer una relación quimiotaxonómica que ayude a resolver los problemas morfológicos que existen en la actualidad con los géneros.
- Realizar otro tipo de modificaciones estructurales a las moléculas aisladas con el fin de potenciar el efecto citotóxico y/o antimicrobiano que exhibieron. Al igual se recomienda extender las modificaciones estructurales realizadas en el presente estudio a las otros metabolitos que se identificaron en en el componente fitoquímico.

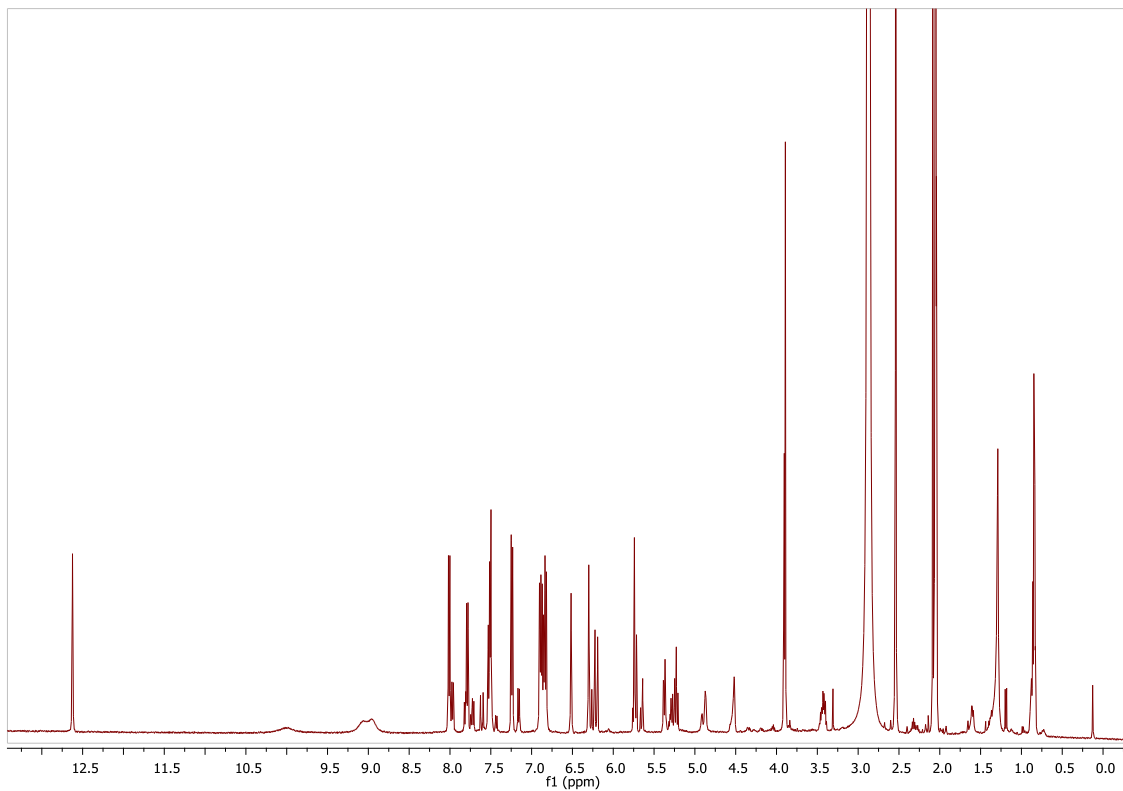
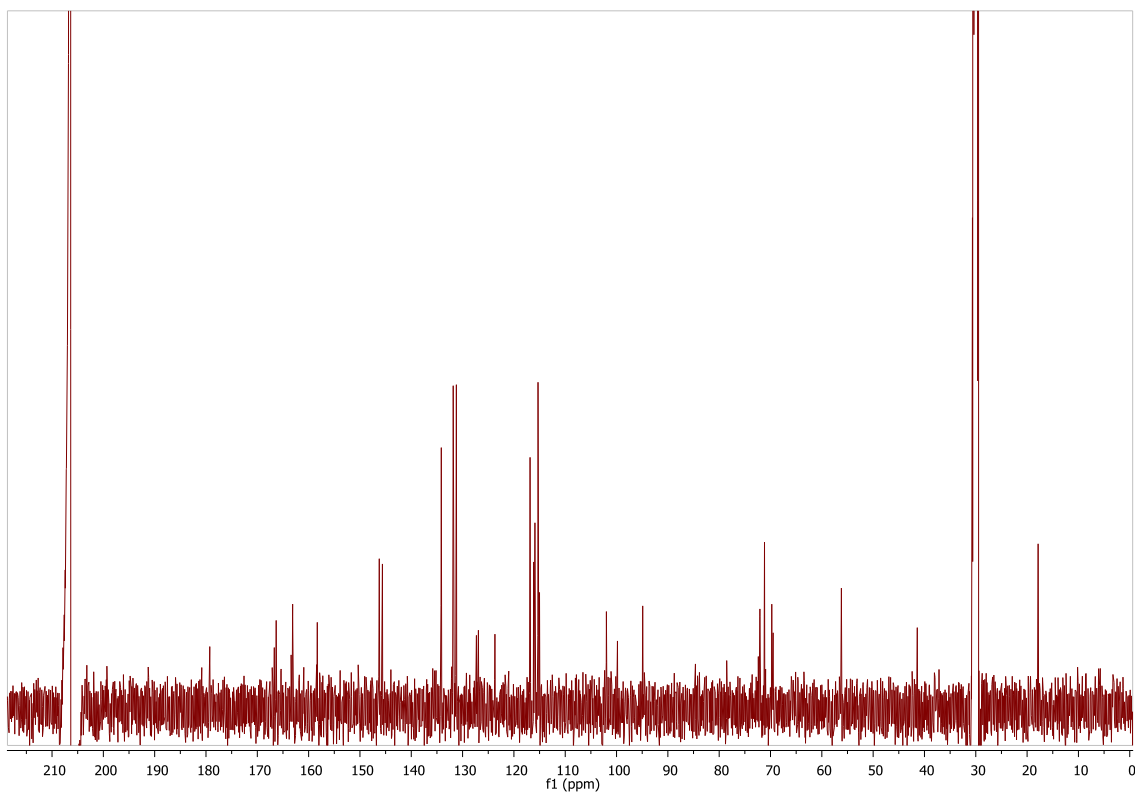
Anexos

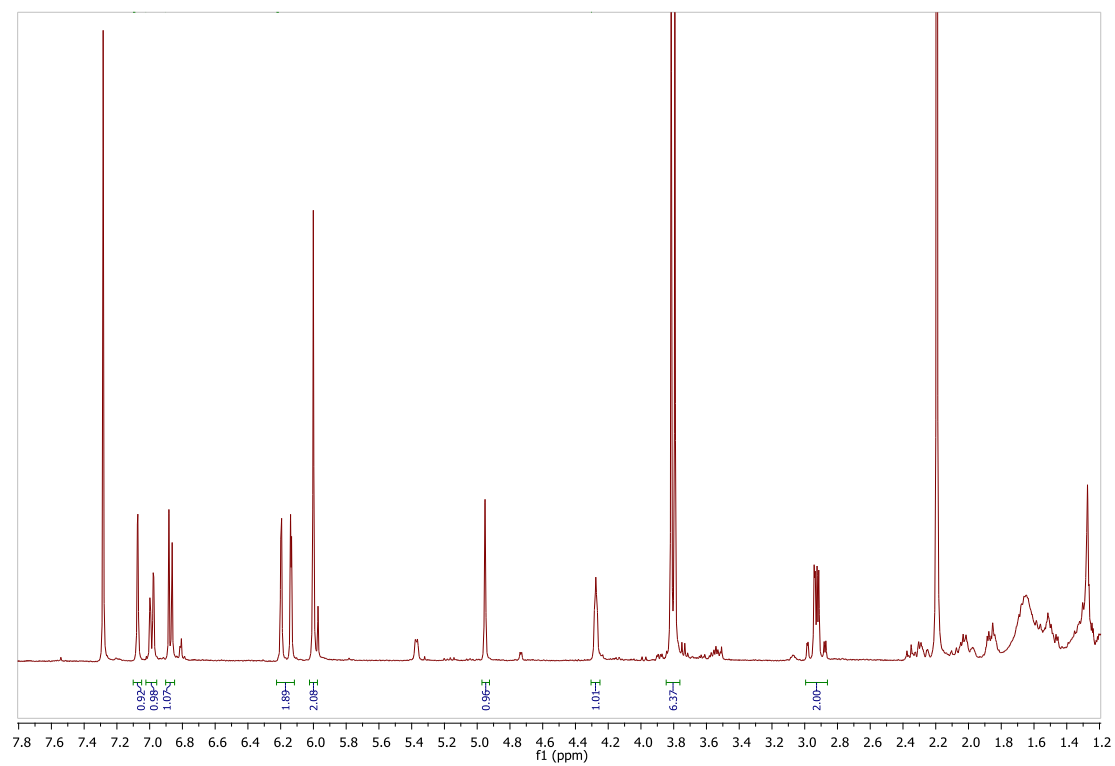
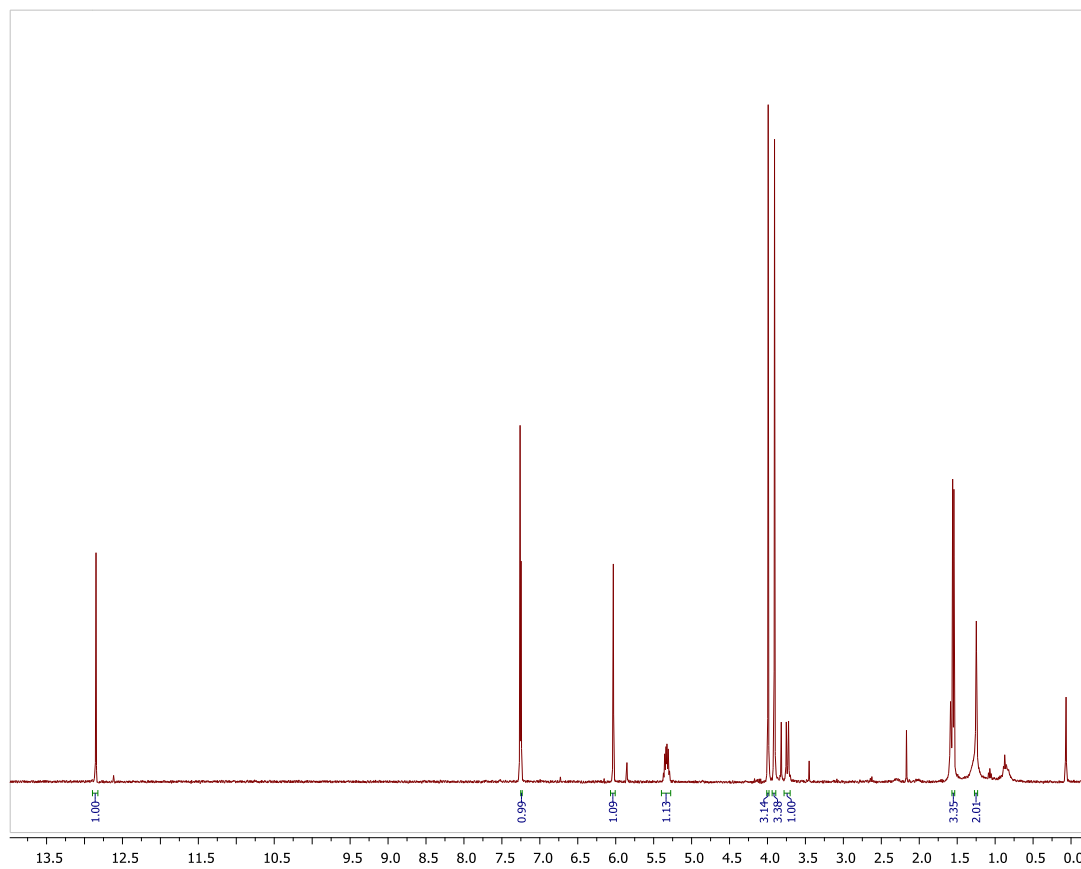
Espectro de RMN ^1H de **HPc6**, 500 MHz, Acetona d_6 Espectro de RMN ^{13}C de **HPc6**, 125 MHz, Acetona d_6 

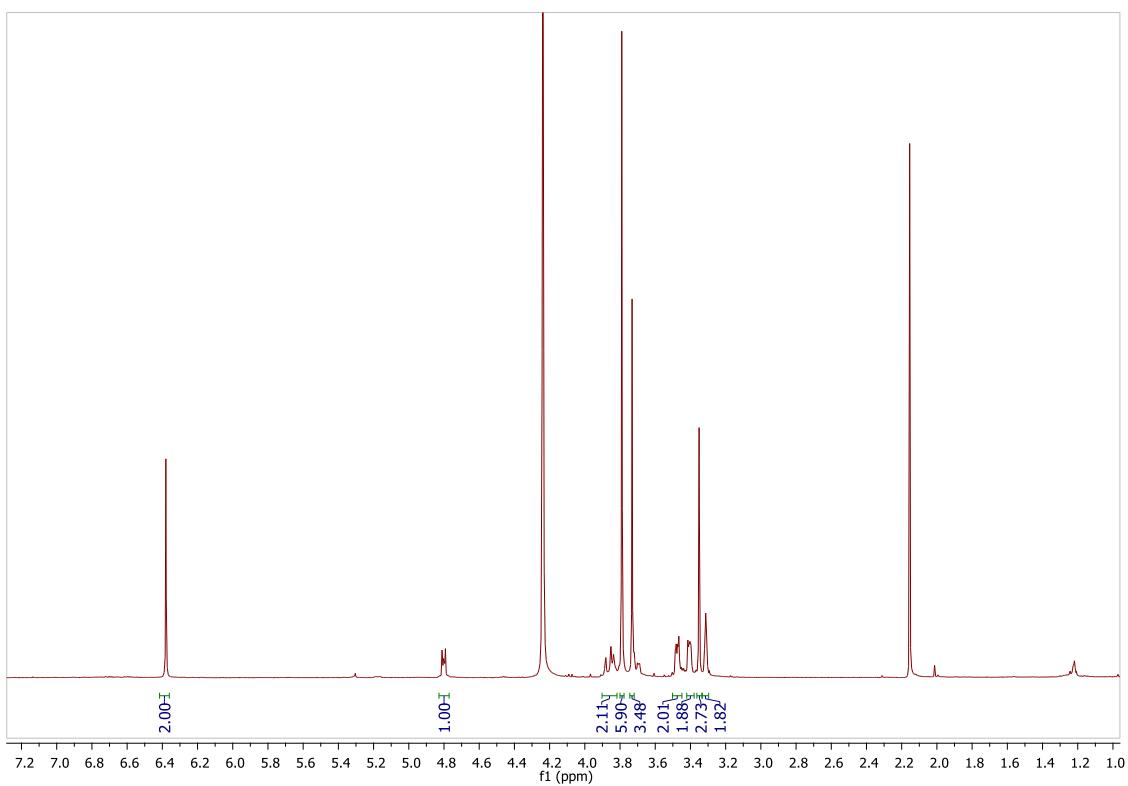
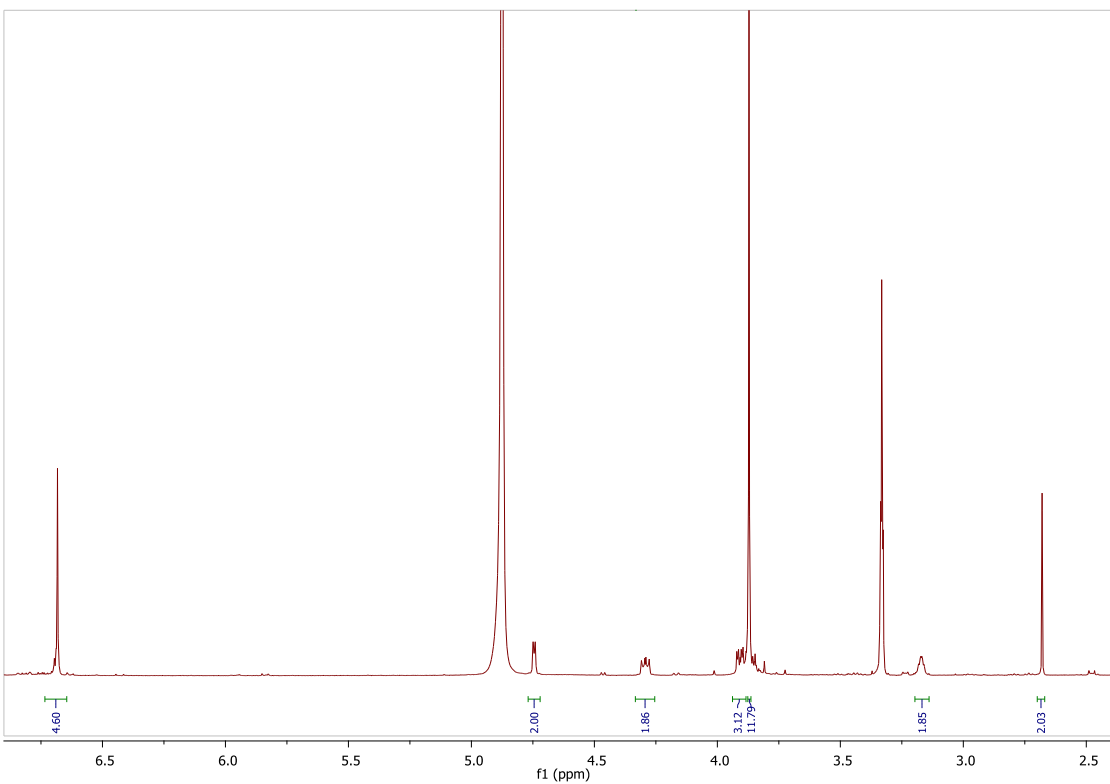
Espectro de RMN ^1H de **HPc7**, 500 MHz, Acetona d_6 Espectro de RMN ^{13}C de **HPc7**, 125 MHz, Acetona d_6 .

Espectro de RMN ^1H de **HPc8**, 500 MHz, Acetona d_6 Espectro de RMN ^{13}C de **HPc8**, 125 MHz, Acetona d_6 

Espectro de RMN ^1H de **HPc9**, 500 MHz, Acetona d_6 Espectro de RMN ^{13}C de **HPc9**, 125 MHz, Acetona d_6 

Espectro de RMN ^1H de **HPc10**, 500 MHz, Acetona d_6 Espectro de RMN ^{13}C de **HPc10**, 125 MHz, Acetona d_6 

Espectro de RMN ^1H de **CPc3**, 500 MHz, Acetona d_6 Espectro de RMN ^1H de **CPc4**, 500 MHz, Acetona d_6 

Espectro de RMN ^1H de **MPc1**, 500 MHz, Acetona d_6 Espectro de RMN ^1H de **MPc2**, 500 MHz, Acetona d_6 

Espectro de RMN ^1H de **MPC3**, 500 MHz, Acetona d_6

