

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**



PONTIFICIA  
**UNIVERSIDAD  
CATÓLICA**  
DEL PERÚ

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE *CAPPARIS OVALIFOLIA***

Tesis para optar el título de Licenciado en Química, que presenta la Bachiller

Madelaine Zoila Camacho Huerta

**Asesora:** Mag. Ana Pastor de Abram

Lima, Febrero 2012

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me apoyaron para sacar adelante mi tesis. En especial a mi madre una persona de lucha constante y que ha sido mi guía espiritual, mi padre quien me motiva a seguir luchando por lo que quiero, a mis hermanos porque están siempre apoyándome moralmente, a mis hijas, que sin querer han sacrificado su tiempo, pero que algún día sabrán que sus hermosas sonrisas me motivaban a querer seguir avanzando y terminar lo que había comenzado y a mi esposo.

También quiero agradecer a mis amigos, que estuvieron siempre apoyándome, en especial a Nino Castro.

Finalmente, quiero dedicarle unas líneas, con mucho cariño, a mi muy querida Asesora de tesis, Profesora Anita Pastor de Abram, pues sin su incondicional apoyo, no hubiera sido realidad este trabajo. Usted ha sido como una madre para mí, me ha apoyado y guiado no sólo académicamente, me ha acompañado y ha estado conmigo en los momentos más complicados de mi vida y su presencia, con su cálida sonrisa ha sido y será para mí imborrables. No alcanzarían líneas para agradecerle, sin embargo aún así quiero decirle: "MIL GRACIAS Y QUE DIOS LA BENDIGA POR SER TAN BUENA PERSONA"

## RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo el estudio fitoquímico de la especie *Capparis ovalifolia*, buscando identificar algunos metabolitos presentes en sus hojas, las cuales son utilizadas en la medicina tradicional y como insecticida natural.

Se colectó la muestra de *Capparis ovalifolia* en la localidad Batán Grande (1000 msnm), provincia de Ferreñafe, departamento de Lambayeque. El material vegetal colectado, fue estudiado taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la UNMSM, para luego ser analizado químicamente en nuestros laboratorios.

El análisis de este material vegetal consistió en la obtención de aceites esenciales por el método de destilación por arrastre de vapor. Posteriormente se prepararon extractos crudos en diversos solventes, a partir de ellos se aislaron metabolitos secundarios usando diversas técnicas cromatográficas para la separación y purificación de fracciones y metabolitos. Finalmente en base a métodos espectroscópicos IR, UV-V, RMN mono y bidimensional y espectrometría de masas, se procedió a la elucidación estructural de algunos de los metabolitos presentes en esta especie. Mediante GC-FID se reconoció la composición estructural del aceite esencial de esta planta.

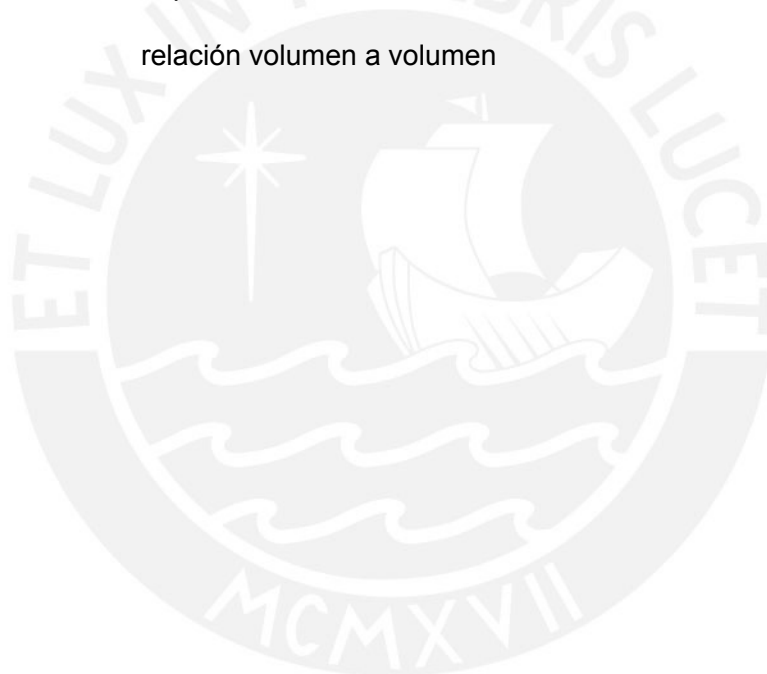
A partir del extracto de acetato de etilo se aisló un compuesto cristalino, incoloro, de punto de fusión 210-212 °C, sus datos espectroscópicos confirman que se trata del triterpeno  $C_{30}H_{50}O$  llamado lupeol. Se ha demostrado la potencialidad antioxidante de esta especie en función a su contenido de lupeol. El estudio de RMN mono y bidimensional permitió determinar su estereoquímica. Se aisló un metabolito sólido, amorfo, de color blanco, que corresponde a un hidrocarburo ácido de cadena larga y un compuesto sólido de color amarillo, amorfo, de tipo terpeno.

El aceite esencial de las hojas de *Capparis ovalifolia* contiene como productos mayoritarios al mentol, acetato de metilo, 3-octenona, viridiflorol, neo-mentol, piperitona, mentona e isomentona. Cabe destacar que el contenido de mentol en esta especie es de 51,7 % convirtiéndolo en una fuente natural de esa sustancia de probada actividad antiespasmódica.

## Abreviaturas

%T	porcentaje de transmitancia
$^{13}\text{C}$ -RMN	resonancia magnética nuclear de carbono
$^1\text{H}$ - RMN	resonancia magnética nuclear de hidrógeno
CC	cromatografía de columna
CCD	cromatografía de capa delgada
CCD-P	cromatografía de capa delgada preparativa
COSY	correlation spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization
FT-IR	espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GC-FID-MS	cromatografía gases con detector de ionización por flama acoplado a un espectrómetro de masas
GC-MS	cromatografía gases con detector de masas
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IR	infrarrojo
M	multiplete
m/V	relación masa / volumen
m/z	relación masa / carga
mL/min	mililitro por minuto
N	normalidad
nm	nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement

P.A.	para análisis
PM	peso molecular
RMN	resonancia magnética nuclear
sa	singulete ancho
sp <sup>2</sup>	hibridación de tipo sp <sup>2</sup>
Tr	tiempo de retención
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de san Marcos
UV-VIS	espectrometría ultravioleta visible
V/V	relación volumen a volumen



## Índice

	N° de Página
Resumen	
I	
Introducción	01
1.1 Antecedentes fitoquímicos	09
1.2 Antecedentes de estudios biológicos	11
1.3 Antecedentes de bioensayos	12
II	
Parte Experimental	16
2.1 Materiales y reactivos	16
2.2 Equipos	16
2.3 Muestra botánica	16
2.4 Determinación de humedad	18
2.5 Obtención y caracterización del aceite esencial	18
2.5.1 Método de hidrodestilación	18
2.6 Metodología de análisis GC - FID – MS	19
2.6.1 Condiciones analíticas	19

2.7	Marcha fitoquímica	20
2.8	Proceso de extracción con solventes	22
2.9	Separación cromatográfica	23
2.10	Elucidación estructural	24
2.11	Bioactividad del aceite esencial	25
III	Resultados	26
3.1	Obtención del aceite esencial	26
3.2	Marcha fitoquímica	26
3.3	Estudio del aceite esencial	27
3.3.1	Identificación de compuestos	27
3.3.2	Cuantificación de compuestos	27
3.4	Separación cromatográfica del extracto	29
3.5	Elucidación estructural	32
3.5.1	Compuesto 1	32
3.6	Actividad biológica del aceite esencial	47
IV	Conclusiones	48

V	Recomendaciones	49
	Bibliografía	50





## Índice de tablas

	N° de Página
<b>Tabla 1:</b> Moléculas con actividad antioxidante	03
<b>Tabla 2:</b> Compuestos de las hojas de <i>Capparis ovalifolia</i> reconocidos por la marcha fitoquímica	27
<b>Tabla 3:</b> Composición química del aceite esencial	28
<b>Tabla 4:</b> Condiciones de CCD del extracto en acetato de etilo	30
<b>Tabla 5:</b> Fracciones obtenidas en CC a partir del extracto acetato de etilo	31
<b>Tabla 6:</b> Desplazamientos de señales de Carbono e Hidrógeno en RMN del lupeol	42
<b>Tabla 7:</b> Correlaciones reconocidas en el espectro Noesy del lupeol	43
<b>Tabla 8:</b> Ensayo de bioactividad del aceite esencial	47

## Índice de Figuras

	N° de Página
<b>Figura 1:</b> Estructura de mangiferina	02
<b>Figura 2:</b> Estructuras de los compuestos kaempferol y quercetina	02
<b>Figura 3:</b> Imágenes de <i>Curcuma longa</i> y <i>Cydonea Oblonga</i>	03
<b>Figura 4:</b> Estructura del triterpeno ácido $\beta$ -elemónico	04
<b>Figura 5:</b> Estructura del triterpeno lupeol	05
<b>Figura 6:</b> Fotografías de <i>Steriphoma ellipticum</i> , <i>Capparis spinosa</i> y <i>Cleome hasleriana</i>	06
<b>Figura 7:</b> Fotografía de Alcaparras, frutos de <i>capparis</i>	07
<b>Figura 8:</b> Estructuras de los compuestos isoginkgetina y ginkgetina	07
<b>Figura 9:</b> Fotografía de <i>Capparis ovalifolia</i>	08
<b>Figura 10:</b> Estructuras de los compuestos glucocapparina y glucocleomina	10
<b>Figura 11:</b> Estructura del ácido cinámico	11
<b>Figura 12:</b> Estructura del compuesto isocodonocarpina	12
<b>Figura 13:</b> <i>Pseudomonas aeruginosas</i>	13
<b>Figura 14:</b> <i>Escherichia coli</i>	14

<b>Figura 15:</b> <i>Salmonella choleraesuis</i>	14
<b>Figura 16:</b> <i>Micrococcus luteus</i>	15
<b>Figura 17:</b> Ubicación de Batán grande en el departamento de Lambayeque	17
<b>Figura 18:</b> Marcha fitoquímica de las hojas de <i>Capparis ovalifolia</i>	21
<b>Figura 19:</b> Proceso de extracción de las hojas de <i>Capparis ovalifolia</i>	22
<b>Figura 20:</b> Estructuras de los compuestos mentol, acetato de mentilo, viridiflorol y neomentol	29
<b>Figura 21:</b> Espectro Infrarrojo del compuesto I	33
<b>Figura 22:</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN del compuesto I	35
<b>Figura 23:</b> Espectro $^{13}\text{C}$ RMN del compuesto I	36
<b>Figura 24:</b> Espectro $^{13}\text{C}$ RMN del compuesto I, DEPT 135; DEPT 90	37
<b>Figura 25:</b> Estructura del lupeol	38
<b>Figura 26:</b> Espectro COSY del lupeol	39
<b>Figura 27:</b> Espectro HSQC del lupeol	41
<b>Figura 28:</b> Estructura del lupeol	42
<b>Figura 29:</b> Espectro NOESY del lupeol	44
<b>Figura 30:</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN del compuesto 2	46

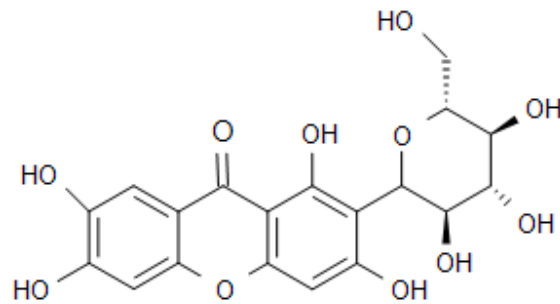


## I. Introducción

Desde tiempos ancestrales, el hombre utilizó diversas plantas para satisfacer sus más urgentes necesidades como son la alimentación y la medicina. Originando de esta manera el interés de algunos por el estudio químico de las plantas, permitiendo la formación de la fitoquímica, una disciplina científica que emplea diversas técnicas que le permiten aislar extractos y fraccionarlos sucesivamente hasta obtener metabolitos secundarios. Estas sustancias están presentes en pequeñas cantidades, sin embargo, en base a las técnicas espectroscópicas es posible reconocer su estructura molecular.

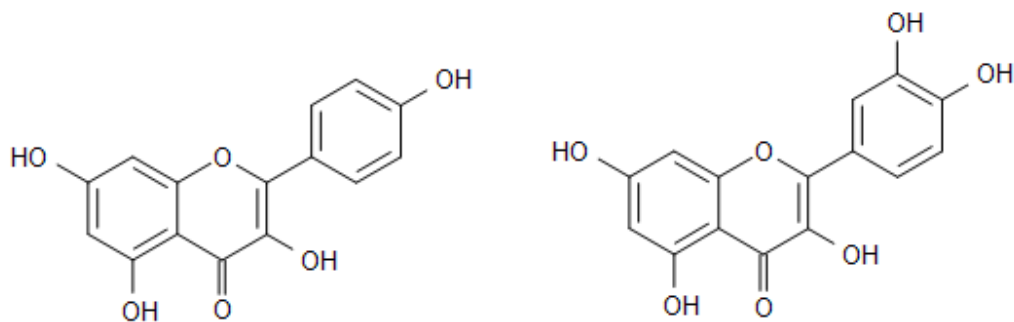
Los estudios fitoquímicos en las últimas décadas, han seguido el modelo de fraccionamiento biodirigido<sup>(1)</sup>. Los extractos crudos y parcialmente purificados, así como los metabolitos secundarios aislados, son probados frente a la actividad biológica esperada<sup>(2)</sup>. Una de estas actividades con mayor interés en los últimos tiempos es la antioxidante, ya que tiene la propiedad de prevenir la degradación oxidativa de diversas sustancias dentro del cuerpo humano, evitando reacciones radicálicas que conduzcan a la degeneración de tejidos y órganos, así los terpenos presentes en maníes reportan actividad antioxidante<sup>(3)</sup>.

Los radicales de oxígeno reactivo juegan un papel importante en estados de enfermedad de cáncer. En los últimos años se han reportado estudios fitoquímicos de mangos, en los cuales se aislaron compuestos, tales como el lupeol y la mangiferina (figura 1) habiéndose demostrado para ellos actividades anticáncer<sup>(4)</sup>. Los triterpenos, flavonoides, entre otros compuestos fitoquímicos con actividad antioxidante, cuando se encuentran en alimentos son denominados alimentos funcionales<sup>(5)</sup>. Debido a ello es que las plantas que contienen moléculas antioxidantes tienen propiedades de alto valor cuando están presentes en alimentos, nutraceuticos, fitofármacos y medicamentos ya que son agentes quimiopreventivos del cáncer<sup>(6)</sup>.



**Figura 1:** Estructura de mangiferina

Los flavonoides son sustancias naturales con numerosos hidroxilos fenólicos en su estructura, encontrándose principalmente en vegetales. Son buenos agentes quelantes de hierro y se ha comprobado que cumplen funciones de protección frente a agentes oxidantes como la radiación ultravioleta, contaminantes ambientales, sustancias presentes en alimentos y en el cuerpo humano. Estas sustancias no pueden sintetizarse dentro del organismo, por lo que las dietas que incluyen frutas y verduras son aportantes de este tipo de sustancias, entre ellas podemos mencionar a un par que se les atribuye contribución en la disminución en el riesgo de cáncer pancreático, el kaempferol y la quercetina (figura 2)<sup>(7)</sup>.



**Figura 2:** Estructuras de kaempferol (der.) y quercetina (izq.)

Diversas especies vegetales presentadas en la Tabla 1 son fuentes de kaempferol y quercetina habiéndose comprobado en esos casos actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y principalmente antioxidante, Las plantas de las que se han extraído estos flavonoides se pueden observar en la figura 3.

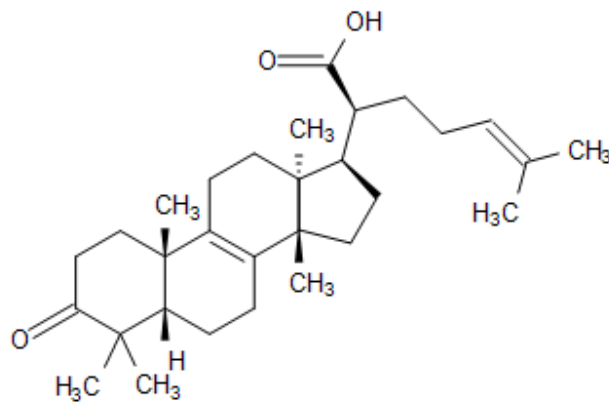
**Tabla 1:** Moléculas con actividad antioxidante

PLANTA	MOLÉCULA	ACTIVIDAD
<i>Cydonia oblonga</i>	kaempferol	antimicrobiana <sup>(8)</sup>
<i>Lycium barbarum</i>	kaempferol	antioxidante <sup>(9)</sup>
<i>Curcuma longa</i> <i>Allium cepa</i>	quercetina	inhibidor de cáncer al colon <sup>(10)</sup>
<i>Capparis spinosa</i>	kaempferol y quercetina	antiinflamatorio y antioxidante <sup>(11)</sup>



**Figura 3:** Fotografías de: *Curcuma longa*<sup>(a)</sup> (der.) y *Cydonea Oblonga*<sup>(b)</sup> (izq.)

Otros metabolitos secundarios con actividad antioxidante son los terpenos, siendo más específicos los triterpenos, los cuales están constituidos por 30 átomos de carbono, formados por condensación de unidades isoprénicas<sup>(12)</sup>. Estos terpenos, los cuales se encuentran en algunas frutas y verduras, se caracterizan por su actividad antioxidante, insecticida y fungicida, además de antimicrobiana y antiinflamatoria, atribuido al ácido  $\beta$ -elemónico aislado de hojas y cortezas de *Bursera graveolens*<sup>(13, 14)</sup> (ver figura 4).

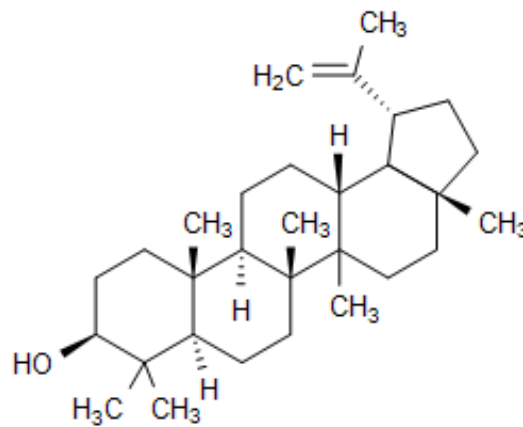


**Figura 4:** Estructura del triterpeno ácido  $\beta$ -elemónico

Por otro lado tenemos al compuesto lupeol (Figura 5), un triterpeno que se encuentra en diversas especies vegetales habiéndosele reconocido en frutas tales como uva, fresa y mango. Se le ha aislado de un gran número de plantas entre ellas *cnidosculus elasticus*<sup>(15)</sup> últimamente se logró aislar lupeol de emulsiones de látex y exudados de *Ficus carica* encontrándose presente en alta concentración<sup>(16)</sup>.

Se ha comprobado que el lupeol posee propiedades farmacológicas tales como, antiinflamatorio, hepatoprotector, antilipídémico y, principalmente, antioxidante<sup>(17)</sup>.





**Figura 5:** Estructura del triterpeno lupeol

Las plantas de la familia Capparaceae o Capparidaceae pertenecen a un grupo de árboles arbustos o hierbas del orden Brassicales. Estas plantas tienen hojas palmaticompuestas o simples, a veces ternadas o palmeadas, frecuentemente alternas y estipuladas. Presentan flores hermafroditas sigomorfas y en casos especiales actinomorfas.

En las flores se pueden reconocer un cáliz con cuatro sépalos, corola con cuatro pétalos siendo notoria en ellas la presencia de androceo con mínimo de seis estambres, pero en algunos casos con alto número de ellos. Presentan gineceo súpero bicarperal el cual se sostiene por un largo ginóforo. Los frutos son de tipo capsular o baciforme. En esta familia se han reconocido más de ciento cincuenta especies, la mayoría de ellas en la zona ecuatorial.

Entre los géneros de mayor preponderancia destacan *Bachmannia*, *Boscia*, *Cadaba*, *Capparis*, *Euadenia*, *Neothoreli*, *Puccionia* y *Tirania*<sup>(18)</sup>. A continuación se presentan fotografías de flores de plantas Capparidaceae, donde se aprecia que lo más saltante en ellas son los estambres, los cuales varían en número y tamaño (figura 6).



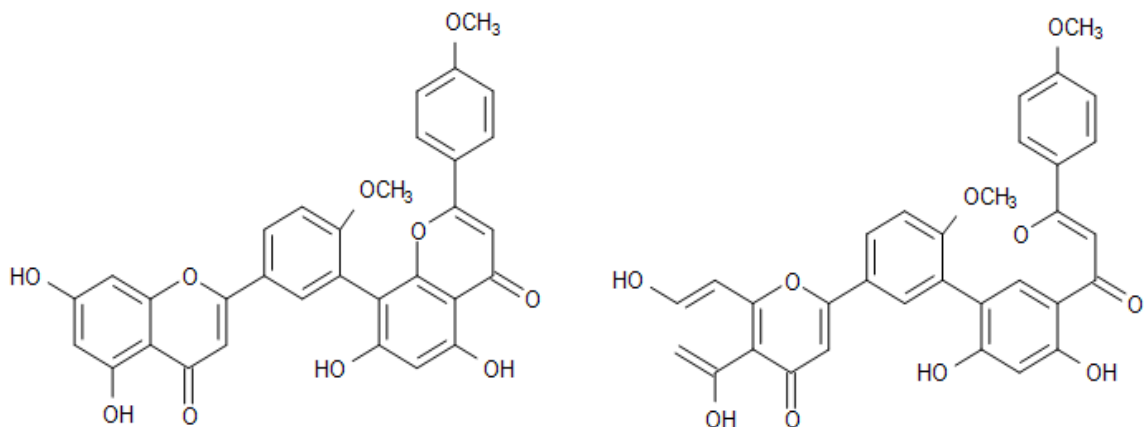
**Figura 6:** Fotografías de *Steriphoma ellipticum*<sup>(c)</sup>, *Capparis spinosa*<sup>(d,e)</sup> y *Cleome hassleriana*<sup>(f)</sup>

En el caso de la especie *Capparis spinosa* se conoce, desde tiempos ancestrales, el uso de sus estambres en alimentación conocidos con el nombre de alcaparras, productos vegetales de alto valor y de uso en comida gourmet<sup>(19)</sup>. La cocina francesa y la hindú incluyen en sus platos mas representativos a las alcaparras, las cuales se mantienen frescas en una solución salina o en aceite de oliva.



**Figura 7:** Fotografía de Alcaparras, frutos de *capparis*

En los frutos de *Capparis Spinosa*, alcaparras, ver figura 7, se logró aislar biflavonoides, compuestos que han sido encontrados por primera vez en la familia Capparidaceae, en estos compuestos se estudiaron efectos antiinflamatorios, encontrándose los mayores efectos en isoginkgetina y ginkgetina<sup>(20)</sup>.



**Figura 8:** Estructuras de los compuestos isoginkgetina (izq.) y ginkgetina (der.)

Nuestra investigación seleccionó como material de estudio una especie del género *Capparis*, de nombre vulgar “Vichayo”, el que se muestra en la figura 9. Su clasificación taxonómica corresponde a la siguiente:

Familia: Capparidaceae

Género: *Capparis*

Especie: *ovalifolia*

Nombre científico: *Capparis ovalifolia*

Nombre común: “vichayo” (Perú)

Sinónimos: *Capparis avicennifolia*



**Figura 9:** Fotografía de *Capparis ovalifolia* <sup>(h)</sup>



## 1.1 Antecedentes Fitoquímicos

Los estudios realizados sobre el género *Capparis* han reconocido un significativo uso de esas especies, se reportó el uso medicinal de sus extractos y propiedades aromáticas en su aceite esencial<sup>(21)</sup>. Algunas especies de este género emplean los frutos y las raíces por sus efectos diuréticos, astringentes y tónicos, mientras que las partes aéreas frescas incluyendo los frutos, se conservan en vinagre por tres meses para ser usados medicinalmente<sup>(22)</sup>.

Existe interés en reconocer nuevas fuentes de aceites vegetales para cubrir requerimientos nutricionales, industriales y también para aplicaciones farmacéuticas, desde este punto de vista existen estudios para reconocer la composición del aceite de semillas y de la parte aérea de estas especies<sup>(23)</sup>. Existen escasos estudios de la composición de ácidos grasos y características de esos aceites, entre ellos Gupta y colaboradores<sup>(24)</sup>, determinaron que las semillas contienen en promedio un 30 % de aceite y reconocieron en ellos a los ácidos oléico palmítico y linoléico, mientras que Akgul y Ozcan<sup>(25)</sup> indican que las semillas de *Capparis* provenientes de Turquía contienen los mismos ácidos pero en diferentes proporciones.

Estudios etnobotánicos reportaron que *Capparis spinosa* posee usos medicinales como reducción de flatulencia, tratamiento contra el reumatismo, anemia y artritis. Asimismo, otras de sus aplicaciones médicas incluyen su ingestión para mejorar funciones hepáticas, diuréticas y como desinfectante del riñón<sup>(26,27)</sup>.

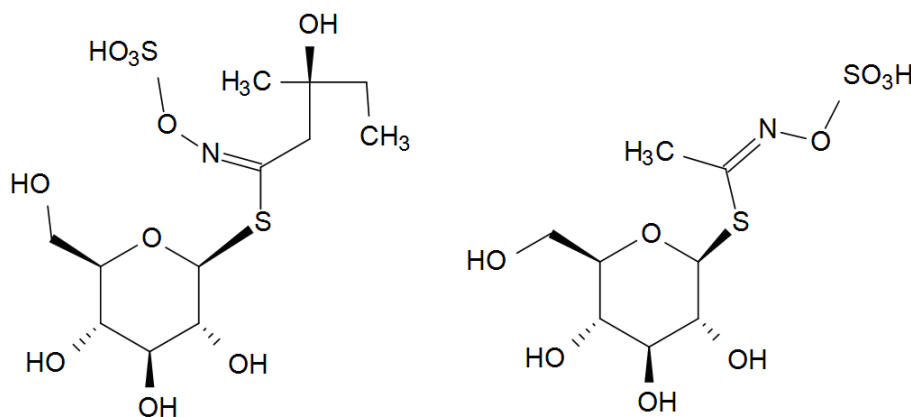
*Capparis flexuosa*, considerada como fuente protéica potencial, se incluye como suplemento alimenticio del ganado (bovino y caprino)<sup>(28)</sup>, además de tener propiedades diuréticas y su infusión es empleada en casos de hidropesía<sup>(29)</sup>.

En el caso específico de *Capparis ovalifolia*, se le atribuyen propiedades antirreumática, antiescorbútica, antineurítica y antiespasmódica<sup>(30)</sup>. En este mismo trabajo se reportó los resultados de una marcha fitoquímica donde se reconocían compuestos del tipo taninos, flavonoides, esteroides entre otros.

En el año 2008 se publicó un estudio farmacológico de las hojas de esta especie donde se informa de la caracterización de un fármaco, con un contenido del 4,6 % de cenizas totales.

Los metabolitos detectados en el tamizaje fitoquímico detectaron aceites, grasas, triterpenos y alcaloides en el extracto diclorometánico, mientras que en el extracto etanólico se confirmó la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides, catequitas, triterpenos, esteroides, antocianidinas y aminoácidos. Finalmente en el extracto acuoso se observó alcaloides, taninos, flavonoides y principios amargos. El conteo microbiológico del lavado y desinfección dio positivo para enterobacteria<sup>(31)</sup>.

De una serie de extractos polares del género *Capparis* fue posible el aislamiento de metabolitos secundarios los cuales fueron analizados por técnicas espectroscópicas como RMN, IR, UV-VIS, GC-MS<sup>(32)</sup>. De esta manera se ha reconocido en este género el predominio de los metabolitos de tipos glucocapparina y glucocleomina, que se observan en la figura 10. Estos compuestos pertenecen a productos naturales derivados de aminoácidos llamados glucosinolatos, los cuales presentan una amplia gama de actividad biológica, para aumentar la resistencia no específica de antioxidantes y efectos inmunoestimulantes<sup>(33)</sup>.



**Figura 10:** Estructuras de los compuestos glucocleomina (der.) y glucocapparina (izq.)

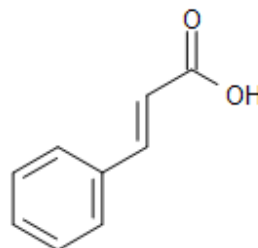
Actualmente se usa *Capparis flavicans kurz* en medicina al noreste de Tailandia, reconociendo a esta especie como agente promotora de lactancia en humanos. El estudio fitoquímico de esta especie identificó un compuesto nuevo llamado capparosido A<sup>(34)</sup>.

## 1.2 Antecedentes de estudios biológicos

Se ha encontrado actividad antioxidante en los extractos polares del género *Capparis*, así como la presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoides y terpenos<sup>(6)</sup>. Los extractos de *Capparis spinosa* han demostrado una efectiva actividad antioxidante<sup>(11)</sup>. Como se mencionó anteriormente, ésta es una especie mediterránea empleada especialmente en la preparación de alimentos congelados<sup>(11)</sup>.

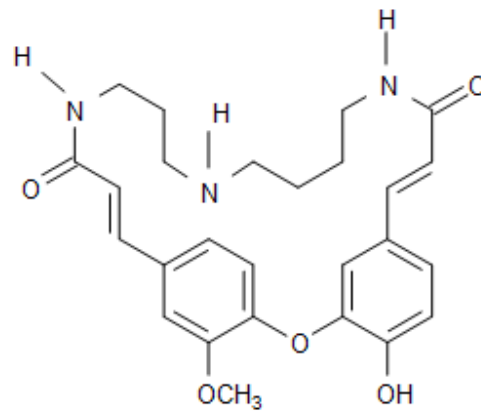
En otro estudio con la misma especie *Capparis spinosa*, proveniente de Sicilia, se evaluó la actividad antioxidante, en este caso se analizaron sus efectos en la alimentación empleando para ello una digestión gástrica simulada<sup>(35)</sup>.

El extracto acuoso de *Capparis spinosa* administrado repetida y oralmente, reduce la hiperglicemia normal y severa en ratas. Así también se comprobó que exhibe una potente reducción de lípidos<sup>(36,37)</sup>. El reporte indica que el extracto contiene componentes de tipo flavonoides (derivados del kaempferol y quercetina) y ácido cinámico, ver figura 11, con variados efectos biológicos, tales como el antiinflamatorio<sup>(38)</sup>.



**Figura 11:** Estructura del ácido cinámico

Se han reportado estudios en *Capparis decidua* y *Capparis aphylla*, especies nativas de zonas áridas de Pakistan. En la primera especie se aisló un nuevo alcaloide de tipo espermidina, muy activo biológicamente, llamado isocodonocarpina, ver figura 12. En la especie *Capparis aphylla* se detectó 14-N-acetilisocodonocarpina y 15-N-acetilcapparisina<sup>(39)</sup>.



**Figura 12:** Estructura del compuesto isocodonocarpina

La parte aérea de *Capparis flavicans* contiene un nuevo caparósido el 2-metoxi-4-hidroxifenol-1-O- $\beta$ -D-xilopiranosilo-D-glucopiranosido, adicionalmente en ella se reconoció la presencia de 28 compuestos ya conocidos como  $\beta$ -espionosida, tashiosida, koaburosida, leounorosida, entre otros<sup>(34)</sup>.

En base a lo antes mencionado, podemos observar el grado de importancia atribuida a los diferentes compuestos químicos contenidos en estas plantas.

### 1.3 Antecedentes de Bioensayos

La gran diversidad de metabolitos presentes en las plantas, permite el uso de éstas para tratar infecciones de diferentes tipos, inclusive el causado por hongos, ya que plantas como *Capparis spinosa*, presentan actividad antifúngica y/o antimicótica. Sin embargo los seres vivos tenemos la capacidad de crear resistencia al uso de antifúngicos y antimicóticos. Debido a ello es que se incrementa cada vez más la necesidad de buscar nuevos fármacos y por consiguiente plantas que contengan este tipo de actividad<sup>(40, 41)</sup>.

Los diferentes extractos y aceites esenciales, pueden someterse a pruebas de actividad biológica, frente a microorganismos como bacterias y hongos, últimamente se ha desarrollado



la técnica denominada bioautografía, mediante la cual se establece la presencia o ausencia de determinada actividad biológica<sup>(42)</sup>.

Las bacterias más comunes utilizadas en el análisis de bioautografía son las presentadas a continuación:

*Staphylococcus aureus* es un agente provocador de diferentes enfermedades entre ellas infección a la piel y tejidos blandos, bacteremia y en algunos casos ataca el tracto genitourinario. La búsqueda de moléculas que reduzcan las infecciones bacterianas, contra *S. aureus* se mantiene permanentemente, ya que estos microbios sufren mutaciones que demuestran sucesivas quimioresistencias, así inicialmente se trataban con penicilina, luego con  $\beta$ -lactamasas y finalmente con meticilina<sup>(43)</sup>.

*Pseudomonas aeruginosa* (ver figura 13), bacteria aeróbica gram-negativa, es un patógeno que ataca tanto a humanos como a plantas, *P. aeruginosa* se reconoce por una apariencia perlada mostrando un olor a uvas. Su identificación clínica se hace reconociendo la producción de fluoresceína en combustibles como el kerosene, esto porque el microorganismo se alimenta de hidrocarburos, su acción se conoce como corrosión microbiana<sup>(44)</sup>.



**Figura 13:** *Pseudomonas aeruginosa*<sup>(i)</sup>

*Escherichia coli* (ver figura 14), es una bacteria que vive en el intestino del hombre, algunas de ellas son inofensivas y otras producen diarreas hemorrágicas que causan insuficiencia renal. Se puede adquirir por intoxicación con alimentos, por ello es motivo de preocupación en los sistemas de salud<sup>(45)</sup>.



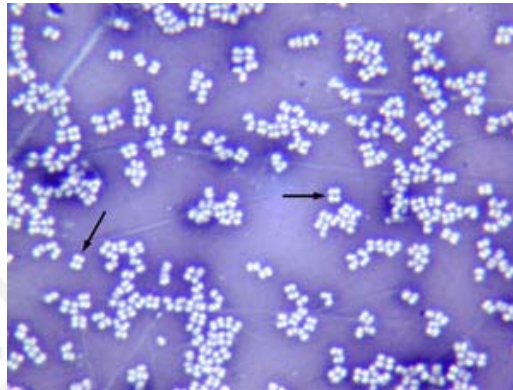
**Figura 14:** *Escherichia coli*<sup>(j)</sup>

*Salmonella choleraesuis* (ver figura 15), es una bacteria de tipo proteobacteria, es un agente que produce fiebre tifoidea, una enfermedad muy incidente en la salud del hombre con una presencia de 16 millones de casos al año, causando seiscientos mil muertes<sup>(46)</sup>.



**Figura 15:** *Salmonella choleraesuis*<sup>(k)</sup>

*Micrococcus luteus* (ver figura 16), es un género de bacteria de tipo actinobacteria que crecen sobre alimentos. Se utilizan para observar la morfología, tamaño celular y agrupaciones características de las células,. Esta especie es de color amarillo blanquecino, frecuentemente generan infecciones odontológicas<sup>(47)</sup>.



**Figura 16:** *Micrococcus luteus*<sup>(1)</sup>

En la literatura no se reportan estudios fitoquímicos ni biológicos de las hojas de *Capparis ovalifolia*. En relación a esta especie los campesinos que viven cerca a la zona de colecta coincidieron en referir el empleo del extracto acuoso de las hojas de *Capparis ovalifolia* para proteger sus cultivos, asignándole actividad biocida. Estas son las razones que nos motivan a investigar los aceites esenciales y otros metabolitos contenidos en la especie.

El método utilizado para la determinación de actividad antibacteriana es la bioautografía directa, el cual consiste en sumergir en las placas de cromatografía de capa delgada, el agente antimicrobiano en una suspensión en su propio caldo de cultivo, para luego ser incubado permitiendo el crecimiento de los microorganismos.

Los resultados se aprecian como zonas de inhibición a los microorganismos. La visualización emplea reactivos con actividad deshidrogenasa, siendo los más comunes las sales de tetrazolium<sup>(42)</sup>.

## II Parte experimental

### 2.1.- Materiales y reactivos

- Sílica gel Merck para CC (0,063 - 0,200 mm)
- Solventes grado P.A. Merck, sin tratamiento previo.
- Revelador I H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / EtOH 5 %
- Revelador II EtOH / vainillina 1 %
- Cámara de yodo

### 2.2.- Equipos

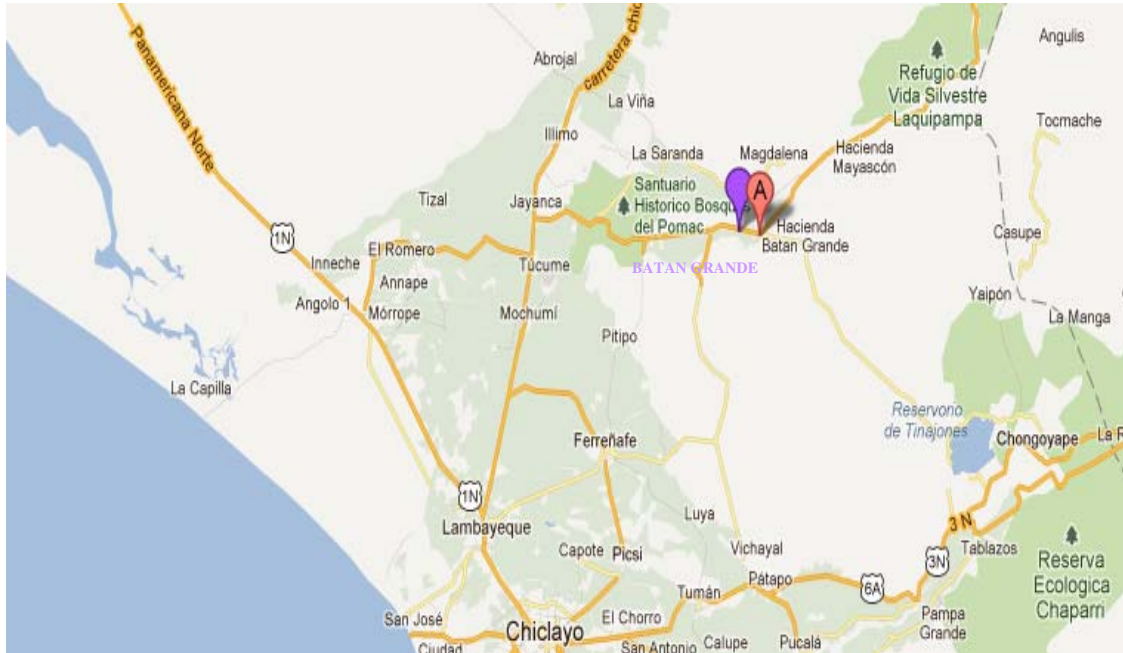
- Equipo Melting point Fisher-Johns
- Equipo de hidrodestilación Bidwill Sterling
- Polarímetro Carl Zeiss Jena modelo 32-G-58
- Espectrofotómetro UV-V Lambda 2 Perkin Elmer
- FTIR Serie 1600 Perkin Elmer
- RMN Bruker 300 MHz Consola Avance III
- GC-FID-MS Perkin Elmer GC modelo Clarus MS 500
- GC-MS HP 5890 Serie II detector masas

### 2.3.- Muestra botánica

La muestra botánica son hojas secas de *Capparis ovalifolia*, éstas fueron colectadas en la localidad Batán Grande (1000 msnm), provincia de Ferreñafe, Región Lambayeque, ver figura 17. El estudio taxonómico fue realizado en el Museo de Historia Natural de la UNMSM donde se mantiene una muestra botánica.

*Capparis ovalifolia* es una planta xerofítica siempre verde, que está distribuida desde la parte occidental del Ecuador, penetrando en la costa peruana hasta los 10° 18', es decir, hasta los cauces secos de La Zorra, lugar situado entre el río Huarmey (Casma) y la Fortaleza de

Paramonga. Es originaria de América, se ubica principalmente en zonas semiáridas. En el Perú, su área de dispersión está circunscrita a las zonas costeras de Tumbes, Piura, Lambayeque, La Libertad y Ancash, hasta los 1600 msnm.



**Figura 17:** Ubicación de Batán grande en el departamento de Lambayeque<sup>(m)</sup>

Es un arbusto tanto silvestre como cultivado, que al igual que las otras especies de su género, alcanzan de 1,5 a 2 m de altura en la zona Norte del Perú.

Las raíces son fuertemente desarrolladas, alcanzando una longitud de 1,8 a 2 m a los 6 meses de edad, de hojas alternas, pecioladas, sin estípulas, coriáceas, con el haz verde oscuro y brillante, algo áspero, el envés cremoso debido a la pilosidad estrellada, con nervaduras pronunciadas; de borde entero, lanceoladas oblongas, con ápice y la base obtusa, de 16 a 20 cm de largo y de 4 cm de ancho. Las flores son hermafroditas, actinomorfas, de pétalos libres con inflorescencia en racimos agrupados en cimas.



## 2.4.- Determinación de humedad

Se colocaron 15 g de hojas secas y molidas de *Capparis ovalifolia* en 100 mL de tolueno en un balón de 250 mL, ensamblándose el equipo Bidwell-Sterling. Se colocó tolueno en la trampa receptora, con algodón en el extremo superior del condensador para que sirvan de barrera al ingreso y salida de humedad. Se llevó la muestra a ebullición observándose que el agua sea colectada en la trampa; antes de finalizar el proceso, se aumentó la velocidad de destilación comprobando que no ocurran variaciones en el volumen de agua colectado en la trampa durante intervalos de 15 minutos. El contenido de agua se expresó como porcentaje de masa, mediante la siguiente fórmula:

$$H = \frac{V(100)}{M}$$

Donde: H: contenido de humedad en %  
M: masa de la muestra  
V: volumen de agua en la trampa.

La determinación se realizó según el método descrito en la literatura<sup>(48)</sup>.

## 2.5.- Obtención y caracterización del aceite esencial

### 2.5.1.- Método de hidrodestilación

Se mezclaron 30 g de hojas secas y molidas de *Capparis ovalifolia* con 160 mL de agua y se llevó la mezcla a ebullición. Se recolectó el aceite esencial arrastrado por el vapor de agua, la mezcla se trató con éter y la fase orgánica se concentró.

El concentrado se analizó por CCD sobre sílica gel, utilizando como fase estacionaria sílica gel GOF 254, como fase móvil tolueno / acetato de etilo (93:7 V/V) y los reveladores R1, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / EtOH 5 % y R2, EtOH / vainillina 1 %.

## 2.6.- Metodología de análisis GC - FID - MS:

El análisis cuali-cuantitativo de los aceites esenciales se realizó por GC-FID-MS en un equipo Perkin Elmer GC modelo Clarus 500 con una configuración especial, provisto de un único inyector tipo *split/splitless* conectado, con un divisor de flujos, a dos columnas capilares de sílice fundido a) polietilenglicol de PM aprox. 20,000 (DB-Wax, J&W Scientific) y b) 5 % fenil-95 % dimetilpolisiloxano (DB-5, J&W Scientific), ambas de 60 m x 0,25 mm de diámetro y 0,25  $\mu$  de espesor de fase estacionaria.

La columna polar se conectó al detector FID (FID A) mientras que la columna no polar se conectó al detector FID (FID B) y a un detector de masas cuadrupolar (70 eV), por medio de un sistema de venteo (MSVent™). Esta configuración permitió obtener tres datos a partir de una única inyección de las muestras:

1. orden de elución en una columna polar;
2. orden de elución en una columna no polar, y
3. espectros de masas de los compuestos separados por la columna no polar

### 2.6.1.- Condiciones analíticas:

Las condiciones analíticas empleadas para el análisis cuali-cuantitativo del aceite esencial por CG-FID-MS fueron:

Flujo de gas de arrastre: helio a 1,87 mL/min.

Inyector tipo *split/splitless* (relación de *split*: 1:100) conectado con un divisor de flujos a dos columnas capilares de sílice fundido (una polar y otra no polar)

Programación de temperatura inicial: 90 °C, luego a 3 °C/min hasta los 225 °C (15 min).

Temperaturas de inyector y detectores FID: 255 °C y 275 °C, respectivamente.

Temperatura de la línea de transferencia: 180 °C.

Temperatura de la fuente de iones: 150 °C.

Tiempo total de corrida: 70 min

Rango de masas escaneado: 40-400 *m/z*

## 2.7.- Marcha Fitoquímica

Se preparó un extracto acuoso de las hojas de la planta en estudio, se extrajeron alícuotas que sirvieron para la identificación de los metabolitos, tomando como referencia los métodos fitoquímicos de IPSS<sup>(49)</sup> y del libro Investigación Fitoquímica<sup>(50)</sup> (ver figura 18).

Esteroides y Triterpenoides: Se mezcló una alícuota con cloroformo, se agitó y se dejó reposar, separándose la fase orgánica de la acuosa, se repitió el tratamiento por triplicado. Las fases orgánicas reunidas se trataron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para secarlas. La solución se filtró y se trató con 1 mL AcOEt y 1 gota de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  cc<sup>(1)</sup>. Para reconocer la presencia de esteroides, debemos observar la coloración verde amarillenta y luego de algunos minutos tonalidades rojizas, que indicarían la presencia de triterpenoides

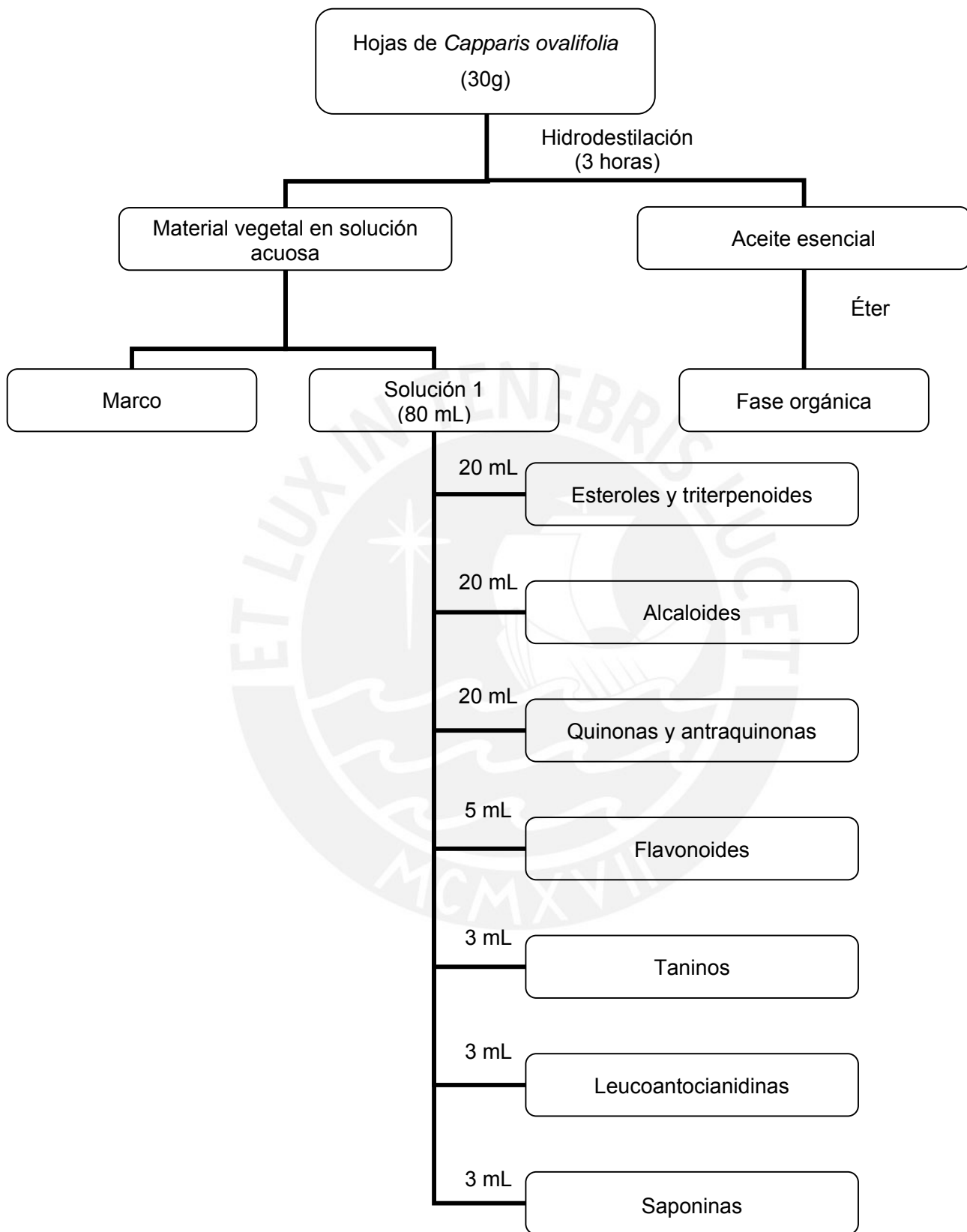
Quinonas: Se dejó reposar 20 mL de la alícuota, después se extrajo con 10 mL de benceno. Se separó la fase orgánica la cual fue tratada con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y concentró parcialmente, añadiendo NaOH 5 %, se dejó reposar para apreciar variaciones de color que indiquen liberación de quinonas.

Alcaloides: Se trató 20 mL de la alícuota con  $\text{NH}_3$  cc y éter etílico: cloroformo (3:1 V/V), se procedió a separar la fase orgánica, repitiendo la extracción por tres veces. La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró, se evaporó a sequedad añadiéndole HCl 0,5 N, se dejó reposar por una hora, luego se filtró y se extrajeron 2 alícuotas; la primera se trató con reactivo de Mayer y la segunda con reactivo de Dragendorff, para observar una coloración rojo vino y naranja, indicativo de alcaloides.

Flavonoides y Taninos: Para comprobar la presencia de estos metabolitos se trató una alícuota de la solución acuosa con NaOH al 10 % y se hizo reaccionar con  $\text{FeCl}_3$  al 1 %, hasta observar una coloración verde oscuro indicando la presencia de estos metabolitos.

Leucoantocianidina: Una alícuota de la solución acuosa con 1 mL HCl 2 N en 1-propanol, se llevó a 46 °C en baño maría, para comprobar la presencia de leucoantocianidinas, al observarse un anillo de color rojo-carmesí.

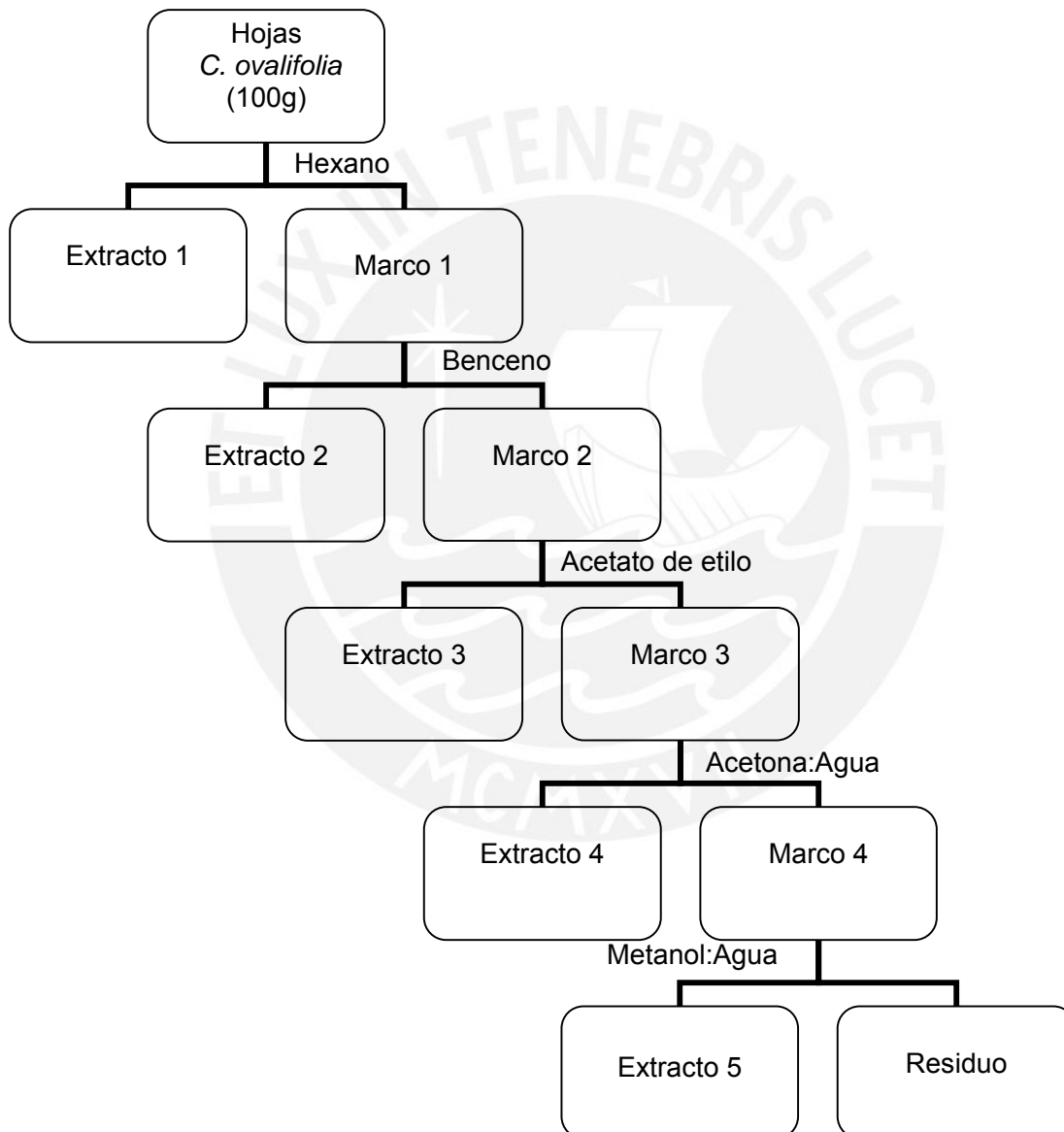




**Figura 18:** Marcha fitoquímica de las hojas de *Capparis ovalifolia*

## 2.8.- Procesos de extracción con solventes

Se pesó 100 g de hojas secas y molidas de *Capparis ovalifolia*, las cuales se maceraron en 250 mL de hexano. Después de dos días, se procedió a filtrar y concentrar, se obtuvo el extracto 1. (Ver figura 19).



**Figura 19:** Proceso de extracción de las hojas de *Capparis ovalifolia*

El material vegetal del marco se dejó secar a temperatura ambiente por un día, luego se repitió el procedimiento anterior, pero esta vez con 250 mL de benceno (extracto 2), seguida de 250 mL de acetato de etilo (extracto 3), 320 mL de acetona : agua 1:1 (extracto 4) y por último, 300 mL de metanol : agua 6:4 (extracto 5).

Cada uno de los extractos se concentraron a presión reducida, obteniendo los respectivos sólidos crudos, los cuales se analizaron por CCD sobre sílica gel utilizando 7 sistemas eluyentes y diferentes reveladores.

## 2.9.- Separación Cromatográfica

Se procedió a separar los metabolitos del extracto 3 empleando cromatografía de columna. Se usó como adsorbente sílica gel 0,063 – 0,2 mm en hexano dentro de una columna de 30 cm de largo x 2,5 cm de diámetro. Se colocó la muestra en la cabeza de la columna y se procedió a eluir inicialmente con hexano y luego con diferentes mezclas de solventes de polaridad creciente.

Se recibieron 117 alícuotas de aproximadamente 10 mL cada una, las que fueron analizadas por CCD en diferentes sistemas de elución, posteriormente las placas fueron observadas a la luz UV-254 y UV-366 nm y reveladas con vapores de yodo.

Las alícuotas evaluadas por CCD se reunieron según sus componentes. La reunión A que agrupa las fracciones 82, 83, 84, 85 y 86 y la reunión B que agrupa las fracciones 26, 27 y 28, se estudiaron inicialmente por CCD para definir el mejor sistema de elución, reconociendo tres metabolitos principales en la reunión B y cuatro en la reunión A. En base a estos resultados se definió la metodología de separación de dichos metabolitos.

Se realizó la purificación de las fracciones A y B empleando CCD-P y recristalizaciones sucesivas.

Se elaboraron placas para CCD-P, mezclando sílica-gel 60 GF 254 con agua, la mezcla libre de burbujas se depositó en el dispensador del equipo laminador de placas cromatográficas que disponía de placas de vidrio de 20 x 20 cm.

Después de correr el aplicador sobre las placas, estas se secaron al ambiente y luego se dejaron por una hora en estufa para activarlas.

Las muestras se colocaron en la línea base formando un depósito parejo para lograr un mínimo de anchura, luego se secaron al ambiente. Se mantuvo, por unos minutos, la cámara saturada con el eluyente elegido, luego se introdujeron las placas para que el solvente avance hasta 3 cm antes del extremo superior, considerando ese avance como línea de fondo.

Las placas se retiraron de la cámara, se secaron al ambiente para eliminar el solvente y luego se analizaron en base a las manchas que se apreciaban, bajo las siguientes condiciones:

1. A simple vista
2. Bajo luz 254 nm
3. Bajo luz 366 nm
4. Frente a reveladores

En el segmento revelado se pudieron reconocer los diferentes compuestos separados sobre la cromatoplaça. Se recogieron una a una las bandas de sílica-gel que contienen los metabolitos, recibéndolas sobre solventes; la mezcla, en cada caso, se agitó y filtró para retirar la sílica-gel. La solución que contenía al metabolito se concentró a vacío para eliminar el solvente.

En cada caso se confirmó la pureza del metabolito que debe dar una sola mancha en la CCD, en algunos casos fue necesario purificar el metabolito mediante sucesivas recristalizaciones.

## 2.10.- Elucidación estructural

Los metabolitos aislados se sometieron a análisis espectroscópicos. Se preparó una solución de cada muestra en AcOEt y MeOH, según fue el caso, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS entre 190 y 700 nm. Los espectros infrarrojo (IR), se hicieron mezclando KBr con las muestras y preparando con ellas pastillas de concentración aproximada al 1 %, que son medidas entre 4000 y 700  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de resonancia nuclear se obtuvieron disolviendo las muestras en  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{CD}_3\text{OD}$ , según fue el

caso, logrando obtener espectros de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) e hidrógeno ( $^1\text{H}$ - RMN) mono y bidimensionales.

### 2.11 Bioactividad del aceite esencial

El aceite esencial fue sometido al método de bioautografía para probar su actividad contra *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis*.

La actividad antimicrobiana, sobre las especies antes mencionadas, se probó de la siguiente manera, las muestras fueron aplicadas, en concentraciones de 1,5 y 2,5  $\mu\text{L}$ , sobre placas de sílica gel F<sub>254</sub>, las placas fueron cubiertas con una fina placa del medio de cultivo, que en este caso consistía de agar Mueller-Hinton, inoculando las bacterias a concentraciones de  $1 \times 10^8$  UFC/ mL, para *M. luteus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, mientras que *S. choleraesuis* fue inoculado a  $2 \times 10^8$  UFC/ mL. Se mantuvo por 24 horas a 37 °C para esperar el proceso de activación respectiva, finalmente las placas recibieron una solución de violeta de *p*-yodonitrotetrazolium, para visualizar los halos de inhibición. Los análisis se realizaron en la Pontificia Universidad Católica de Río Grande du Sul, Brazil.

### III Resultados

La determinación de humedad con el equipo Bidwell-Sterling, permitió recolectar 1,01 mL de agua, correspondiendo a este dato un contenido de humedad en hojas de *Capparis ovalifolia* de 6,67 %, indicando una baja humedad comparado con el contenido de humedad del material vegetal en Lima, el cual oscila 8 - 12 % ya que la planta se secó primero al aire y luego en estufa a 40 °C.

#### 3.1.- Obtención del aceite esencial

El proceso de hidrodestilación de las hojas secas da un aceite levemente amarillento, inicialmente opaco, pero después del reposo y secado, bastante transparente. Su rendimiento fue de 0,15 %.

#### 3.2.- Marcha fitoquímica

Los resultados de la marcha fitoquímica en base a reacciones de precipitación y coloración, se resumen en la Tabla 2.

Entre los metabolitos detectados en la marcha fitoquímica destacan los esteroides y triterpenoides que mostraron presencia muy significativa comparada con la de taninos y flavonoides, ya que los últimos dieron reacciones de color y precipitación de baja intensidad.

A partir de esta observación decidimos centrar nuestro interés en estudiar los extractos medianamente polares para aislar triterpenos, sabiendo que se trata de compuestos con valiosa actividad biológica.

**Tabla 2:** Compuestos de las hojas de *Capparis ovalifolia* reconocidos por la marcha fitoquímica

Tipo de compuesto	Resultado
esteroides/ triterpenoides	presencia
alcaloides	ausencia
quinonas y antraquinonas	ausencia
taninos y flavonoides	presencia
leucoantocianidina	ausencia
saponinas	ausencia

### 3.3 Estudio del aceite esencial

#### 3.3.1 Identificación de compuestos

La identificación de los componentes del aceite esencial se realizó por comparación de sus espectros de masa con los contenidos en las bases de datos<sup>(51)</sup>, estándares propios y por comparación de sus índices de retención obtenidos en las dos columnas empleadas respecto de una serie homóloga de alcanos ( $C_6$ - $C_{24}$ ), con los obtenidos de estándares propios y con los que figuran en la bibliografía.

#### 3.3.2 Cuantificación de los compuestos

La composición porcentual de los diferentes metabolitos reconocidos y su cuantificación fue determinada por el método de porcentaje de áreas, considerando que el factor de respuesta para todos los componentes es igual a 1. Para cada componente fue tomada la menor respuesta obtenida entre las correspondientes a cada columna utilizada.

El aceite esencial presentó una composición química compleja con numerosos compuestos. La presencia de un pico de ftalato se puede deber al contacto del aceite esencial con algún material plástico. Los resultados se muestran en la Tabla 3.



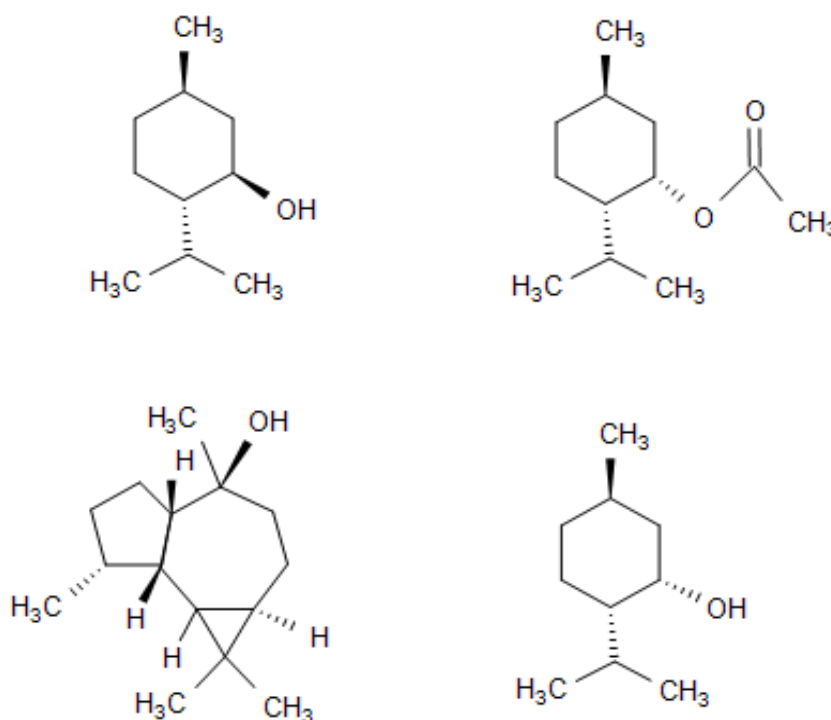
**Tabla 3:** Composición química del aceite esencial

Compuesto	Abundancia (%)	Columna Polar (IR DB-Wax) t (s)	Columna no polar (IR DB-5) t (s)
mentol	51,7	1599	1170
acetato de mentilo	5,8	1574	1293
3 octenona	5,6	1298	975
viridiflorol	2,4	2105	1590
neo-mentol	2,0	1599	1163
piperitona	1,6	1697	1250
mentona	1,1	1461	1150
iso-mentol	1,0	1686	1180
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	0,9	1556	1070
<i>trans</i> - $\beta$ -damascenona	0,9	-	1382
octadecano	0,8	1802	1800
$\beta$ -elemeno	0,6	1600	1387
neo iso-mentol	0,5	1622	1184
$\alpha$ -terpineol	0,5	1652	1187
$\beta$ -copaeno	0,5	1591	1430
t-muurolol	0,5	2209	1640
isomentona	0,4	1420	1160
benzoato de metilo	0,3	1628	1090
óxido de cariofileno	0,3	2008	1582
selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	0,3	2273	1655
pulegona	0,2	1637	1235
carvacrol	0,2	2238	1297
acetato de isomentilo	0,2	-	1302
1,10-di-epicubenol	0,2	-	1620
<i>cis</i> -tuyona	0,1	-	1100
<i>trans</i> -tuyona	0,1	-	1111
<i>cis</i> -par-ment-2,8-dien-1-ol	0,1	1638	1138
<b>totales</b>	<b>79,4</b>	-	

Se puede reconocer la presencia de mentol y acetato de mentilo, así como, viridiflorol y neomentol, mostrados en la figura 21, siendo el mentol el que se encuentra en mayor proporción comparado a lo reportado en el aceite esencial de las flores de *capparis spinosa*



(4,61%)<sup>(52)</sup> se sabe que este compuesto es bioactivo, reconociéndole propiedades antimicrobianas<sup>(53)</sup>.



**Figura 20:** Estructuras de los compuestos: mentol (sup. izq.), acetato de mentilo (sup. der.), viridiflorol (inf. izq.) y neomentol (inf. der.)

Se han encontrado también, compuestos minoritarios, la mayoría monoterpenos de 10 carbonos con excepción de estructuras de 18 carbonos (octadecanos) y 24 carbonos.

### 3.4 Separación cromatográfica de los extractos

Como se describió anteriormente, el someter la muestra a procesos de extracción con diferentes solventes permitió contar con extractos crudos en hexano, acetato de etilo, acetona-agua y metanol-agua. El estudio por cromatografía de capa delgada de estos extractos permite reconocer la complejidad de cada uno de ellos.

Las condiciones de fase móvil y reveladores a las que fueron sometidos los extractos de las hojas secas de *Capparis ovalifolia* se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Condiciones de CCD del extracto en acetato de etilo

ELUYENTE	FASE MÓVIL	REVELADOR
1	Hexano	UV-VIS 254 UV-VIS 366
2	hexano : acetato de etilo (10:1 V/V)	UV-VIS 254 UV-VIS 366
3	hexano : acetato de etilo (7:3 V/V)	UV-VIS 254 UV-VIS 366
4	hexano : acetato de etilo (1:1 V/V)	UV-VIS 254 UV-VIS 366 cloruro de aluminio 1 %
5	acetato de etilo : hexano (7:3 V/V)	UV-VIS 254 UV-VIS 366
6	acetato de etilo : hexano (10:1 V/V)	UV-VIS 254 UV-VIS 366
7	acetato de etilo	UV-VIS 254 UV-VIS 366

El análisis por cromatografía de capa delgada de los 5 extractos permitió reconocer que el tercero en acetato de etilo, posee una variada concentración de componentes. Por su polaridad, se dedujo que debería contener metabolitos de interés, se decidió centrar el estudio en este extracto, el cual contendría compuestos de tipo esteroides y triterpenos, productos interesantes por su actividad biológica reportada en plantas del mismo género.

El extracto de acetato de etilo fraccionado en CC, fue eluído con sistemas de solventes de polaridad creciente, obteniendo 117 alícuotas, cuya distribución se presenta en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Fracciones obtenidas en CC a partir del extracto acetato de etilo

FRACCIONES	FASE MÓVIL	FRACCIONES	FASE MÓVIL
1	Hexano	82-83	acetato de etilo : hexano (70:30 V/V)
2-5	hexano : acetato de etilo (99:1 V/V)	84-88	acetato de etilo : hexano (60:40 V/V)
6-9	hexano : acetato de etilo (97:3 V/V)	89-92	hexano : acetato de etilo (1:1 V/V)
10-15	hexano : acetato de etilo (95:5 V/V)	93-98	hexano : acetato de etilo (3:7 V/V)
16-28	hexano : acetato de etilo (93:7 V/V)	98-99	hexano : acetato de etilo (2:8 V/V)
29-52	hexano : acetato de etilo (90:10 V/V)	100-104	acetato de etilo
56-60	hexano : acetato de etilo (88:12 V/V)	105-107	Acetato de etilo : metanol (9:1 V/V)
61-66	hexano : acetato de etilo (84:16 V/V)	10-109	Acetato de etilo : metanol (1:1 V/V)
67-75	hexano : acetato de etilo (80:20 V/V)	110-112	Acetato de etilo : metanol (3:7 V/V)
76-81	hexano : acetato de etilo (75:25 V/V)	113-117	metanol

Estas fracciones fueron sometidas a cromatografía de capa delgada (CCD) y en base a esos resultados, se lograron las reuniones A y B, las cuales fueron analizadas nuevamente por CCD y eluidas con hexano/acetato de etilo 7:3.

La separación de los metabolitos presentes en las reuniones A y B se hicieron por CCD-P siguiendo la metodología mostrada en el apartado 2.9. Se logró aislar los compuestos: 1 (39 mg), 2 (12 mg) y 3 (5 mg). Cada uno fue sometido a procesos de recristalizaciones sucesivas para purificación.

Las muestras purificadas se sometieron a análisis espectroscópicos empleando las técnicas de UV – Vis, IR, <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN mono y bidimensionales.

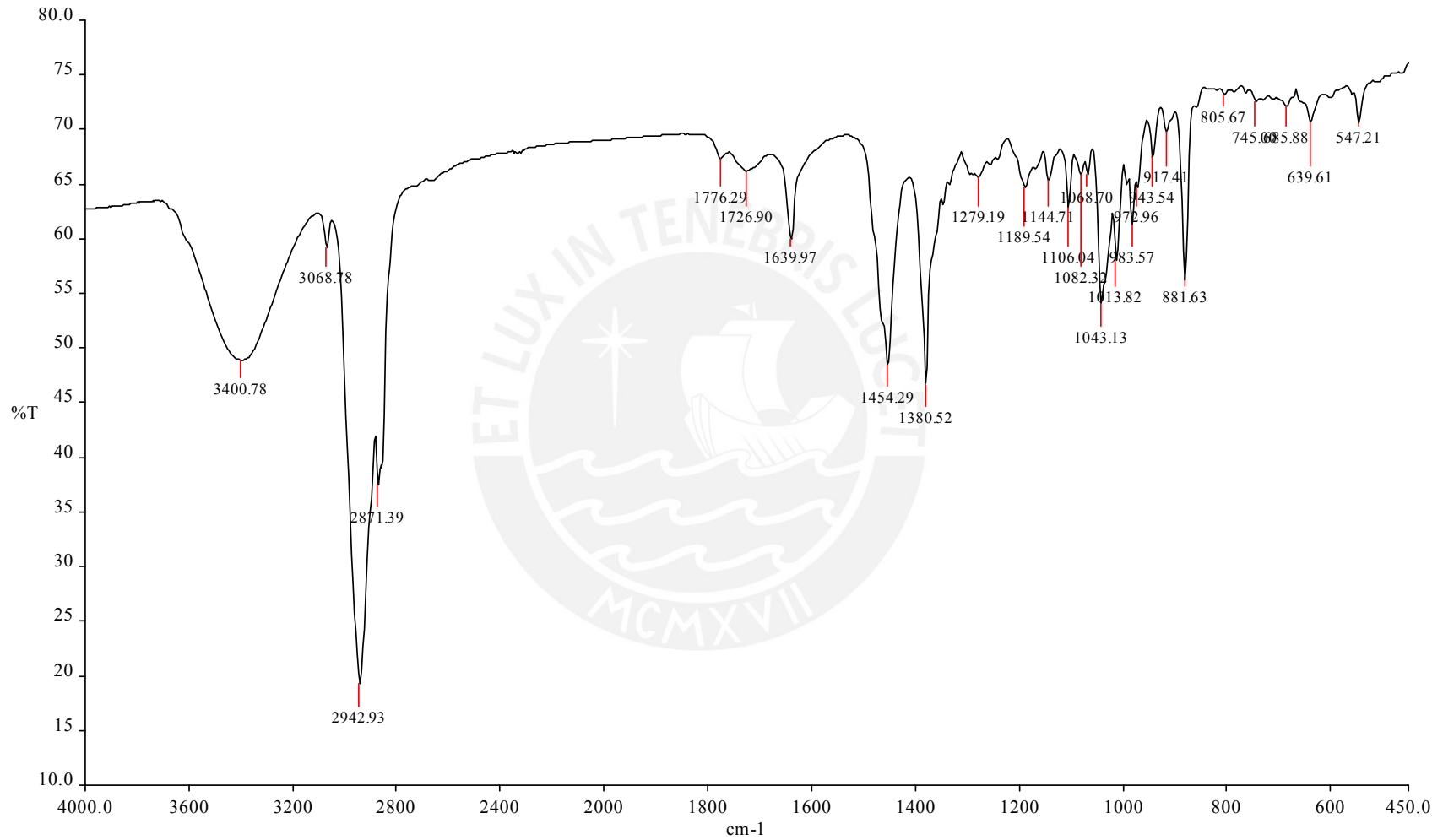
### 3.5.- Elucidación estructural.

#### 3.5.1.- Compuesto 1

El compuesto 1 que pesó 39 mg, se aisló como un sólido cristalino en forma de agujas incoloras, con punto de fusión de 210-212 °C. En una solución de acetato de etilo (0,1% p/V) se midió la rotación óptica, se obtuvo  $[\alpha]_D^{25^\circ C} = 27,3$  en cloroformo, confirmando la presencia de quiralidad en la molécula.

No presenta absorciones significativas en el UV-Vis sobre 210 nm, indicando con esto la ausencia de cromóforos conjugados significativos. Las absorciones más importantes en el infrarrojo, ver figura 21, son las siguientes: 3357  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento OH); 1082  $\text{cm}^{-1}$  (C-O); 3067  $\text{cm}^{-1}$  (HC=); 1639  $\text{cm}^{-1}$  (C=C); y 881  $\text{cm}^{-1}$  (exometileno terminal).

33  
Figura 21: Espectro Infrarrojo (IR) del compuesto 1



El espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 1 en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) (ver figura 22), muestran varias señales de alta intensidad entre 0,75 y 1,02 ppm asignadas a 18 H de 6 grupos metilo; a 1,67 ppm metilo sobre carbono  $\text{sp}^2$ ; a 3,18 (m, 1H) de H geminal a función oxigenada; a 4,56 (sa, 1H) y 4,67 ppm (sa, 1H) sistema AB de metileno terminal ya reconocido por IR. Entre 1 y 1,6 ppm multipletes para metilenos.

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 1, (ver figura 23) presenta señales para 30 carbonos. Las señales que aparecen a 151,1 y 109,5 ppm corresponden a carbonos  $\text{sp}^2$  de tipo alquénico, debajo de 100 ppm se encuentran 28 carbonos saturados, el carbono de desplazamiento 79,1 ppm, se asignará a un carbono geminal a un hidroxilo.

Los espectros  $^{13}\text{C}$  RMN desacoplado, DEPT 135 y DEPT 90, se presentan en la figura 24. En ellos se observan 9 señales para  $\text{CH}_2$ , 7 señales para  $\text{CH}_3$ , 5 señales para CH y la presencia de 5 carbono tipo cuaternarios.

$^1\text{H}$  Muestra 1 en  $\text{CDCl}_3$

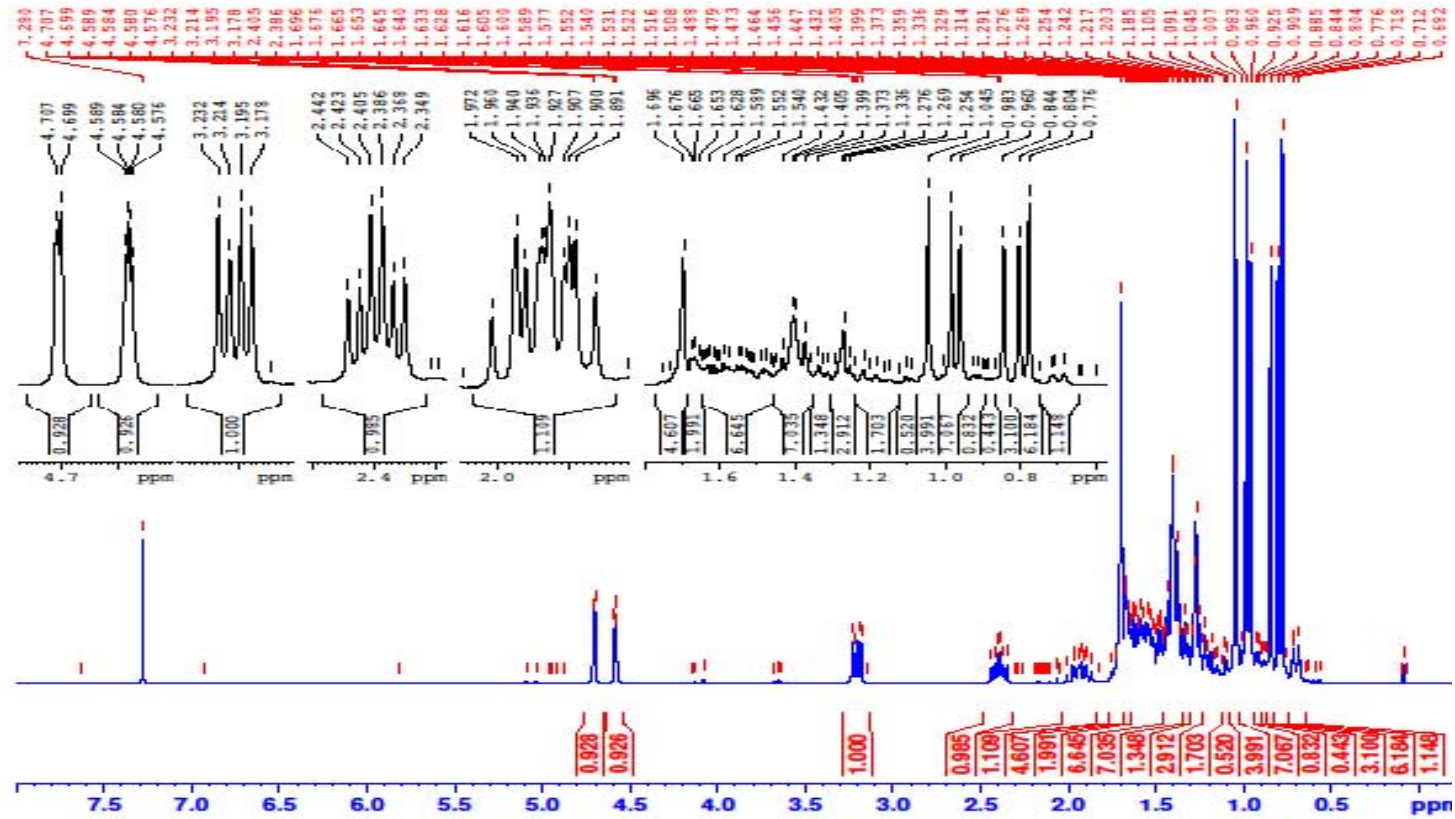


Figura 22: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 1.



$^{13}\text{C}$  Muestra 1 en  $\text{CDCl}_3$

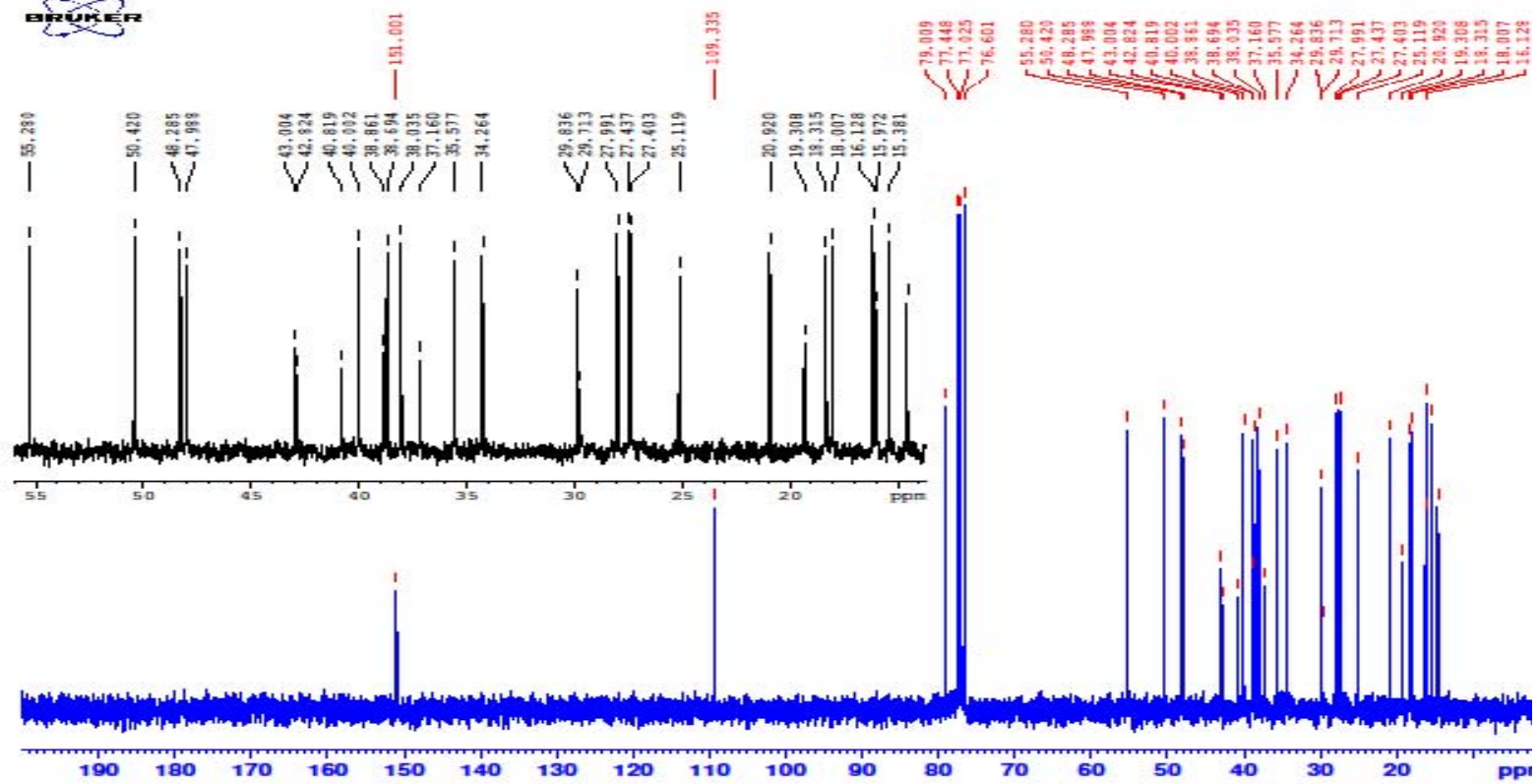


Figura 23: Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 1

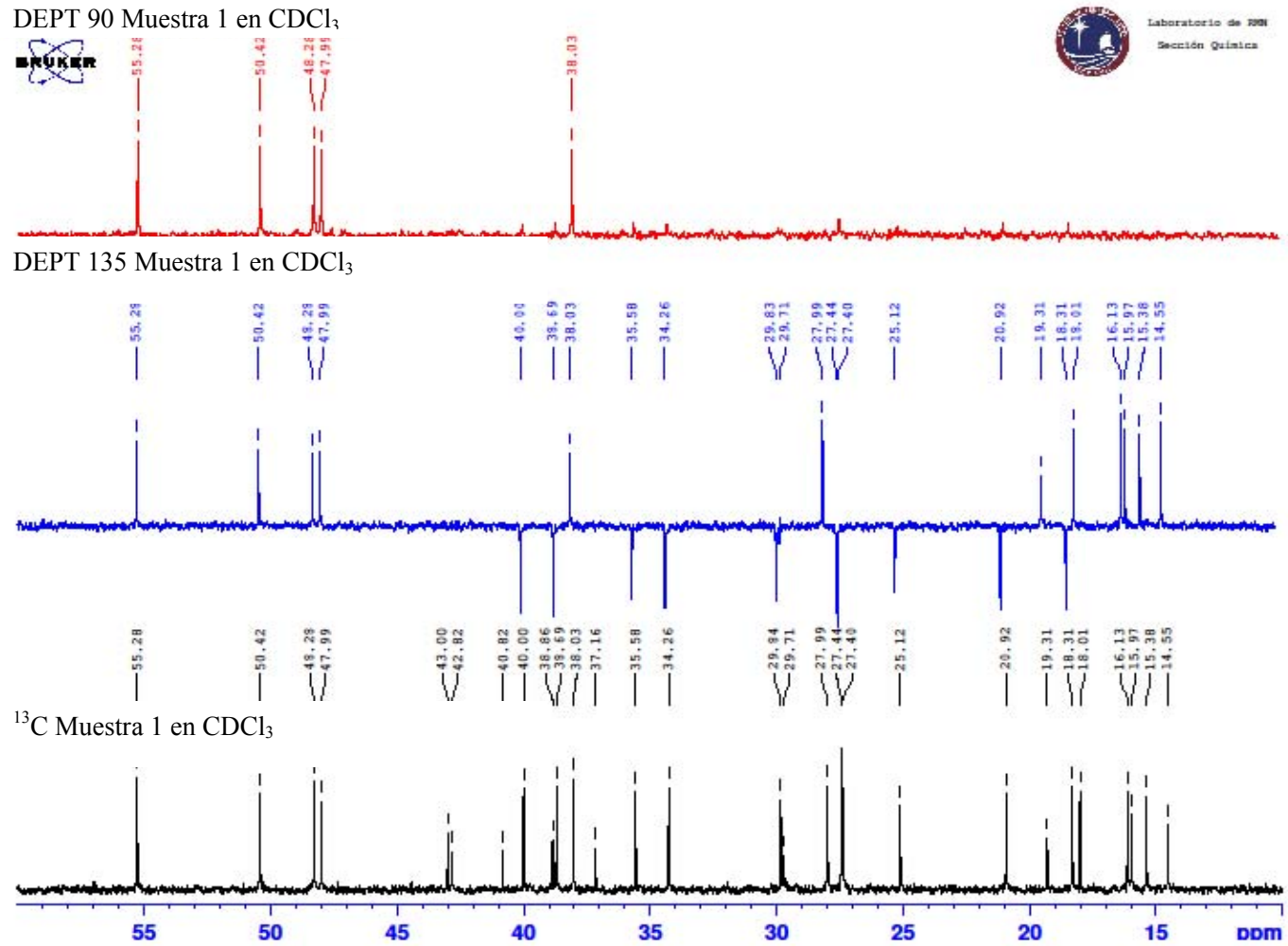
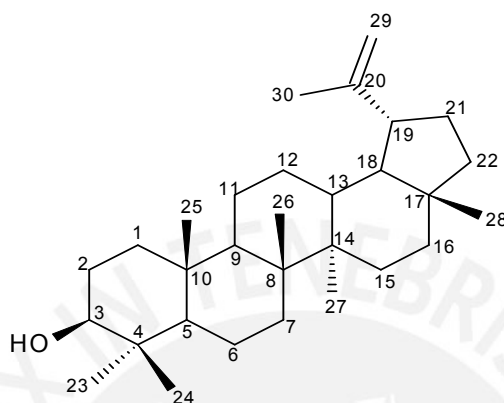


Figura 24: Espectro DEPT 90, DEPT 135 y  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 1

En base a la información presentada y por comparación con datos bibliográficos, proponemos la estructura del compuesto 1 como la del lupeol en la figura 25, un triterpeno presente en plantas como *Holarhena floribunda*, entre otras<sup>(54)</sup>.



**Figura 25:** Estructura del lupeol

En el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  se observa a 4,68 ppm un sa que corresponde a uno de los H-29, el cual acopla con el otro H-29 del metileno terminal.

A 3,2 ppm se observa un doble doblete de H-3 con  $J = 4,8$  y 11 Hz, la multiplicidad se justifica por su acoplamiento con H-2 $\alpha$  y H-2 $\beta$ , respectivamente.

Centrado en 2,39 ppm encontramos un doble triplete de H-19 con  $J = 4$  y 9,6 Hz que acopla con H-21 y, H-18. A 1,90 ppm se observa un multiplete de H-21 $\beta$  el cual acopla con H-19, H-21 $\alpha$ , H-22 $\alpha$  y H-22 $\beta$ .

Finalmente, centrado en 0,70 ppm aparece un doblete ancho de H-5 entre los ciclos A y B del triterpeno, H-5 acopla con uno de los H-6. El acoplamiento entre H-5 y el otro H-6, no puede reconocerse por ser muy pequeño, debido al ángulo diedro formado entre ellos.

COSY Muestra 1 en  $\text{CDCl}_3$

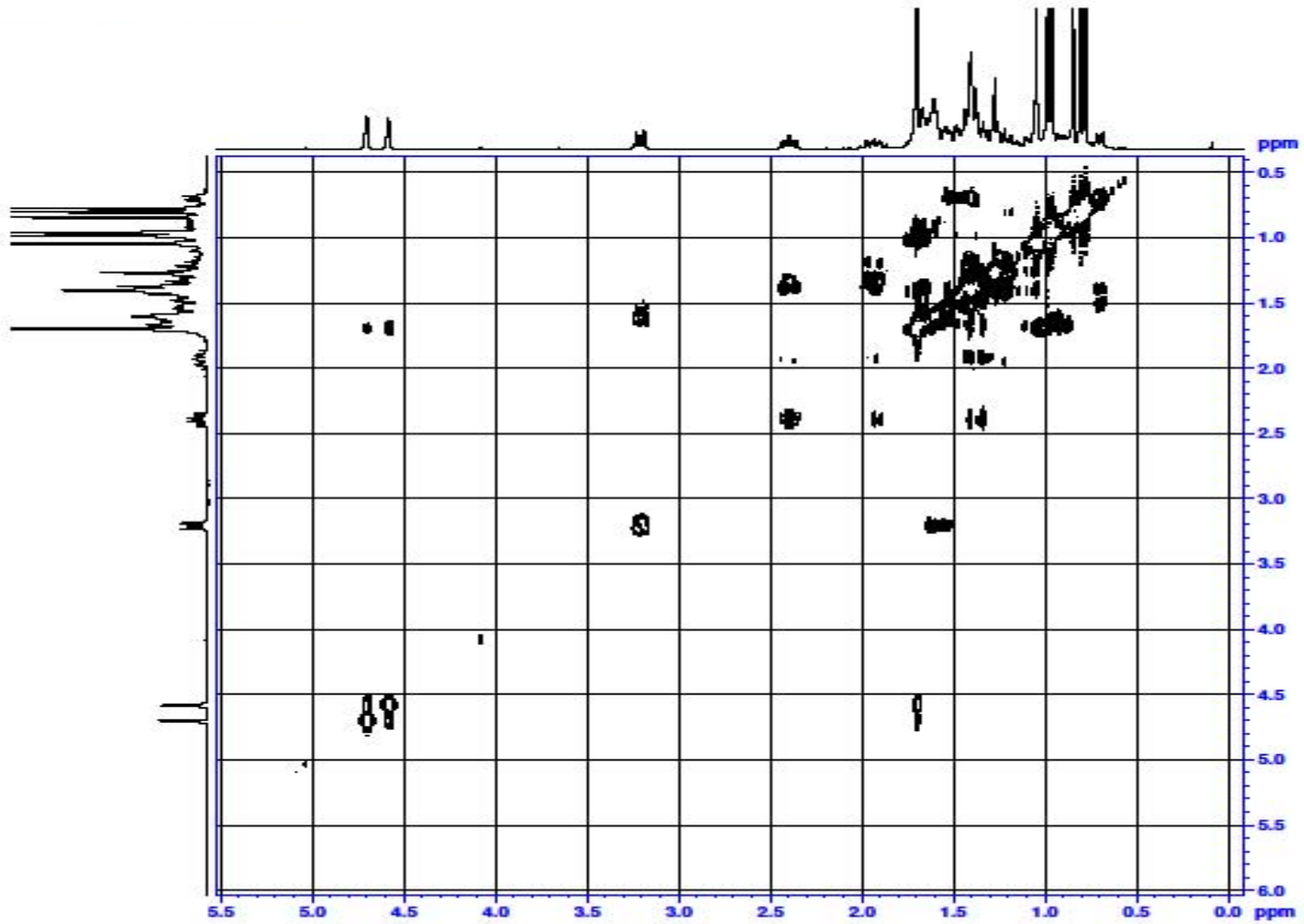


Figura 26: Espectro COSY del Lupeol

La asignación de estos hidrógenos es explícita al analizar el espectro COSY (ver figura 26), observando correlación entre la señal a 3,2 (H-3) con la de 1,6-1,7ppm (H-2 $\alpha$  y H-2 $\beta$ ); a 2,39 (H-19) con 1,9 ppm (H-21) y 1,3 ppm (H-18). A 1,9 ppm (H-21) con el otro H-21 (1,4 ppm) y a 1-1,5ppm (H-22 $\alpha$  y H-22 $\beta$ .)

El espectro HSQC, (ver figura 27) permitió encontrar correlaciones de carbono e hidrógeno confirmando las asignaciones atribuidas en el espectro COSY. Observando señales a 109 y 151 ppm correspondiente a carbonos sp<sup>2</sup>, característico de carbono alquénico. La señal de 151 ppm, se le atribuye al C-20 ya que no presenta correlación con ningún hidrógeno. Mientras que a 109 ppm tenemos al C-29 correlacionando a 4,60 con H-29a y 4,70 con H-29b. Así también tenemos al C-3 a 79,1 ppm que correlaciona a 3,2 ppm con el H-3.



HSQC Muestra 1 en  $\text{CDCl}_3$

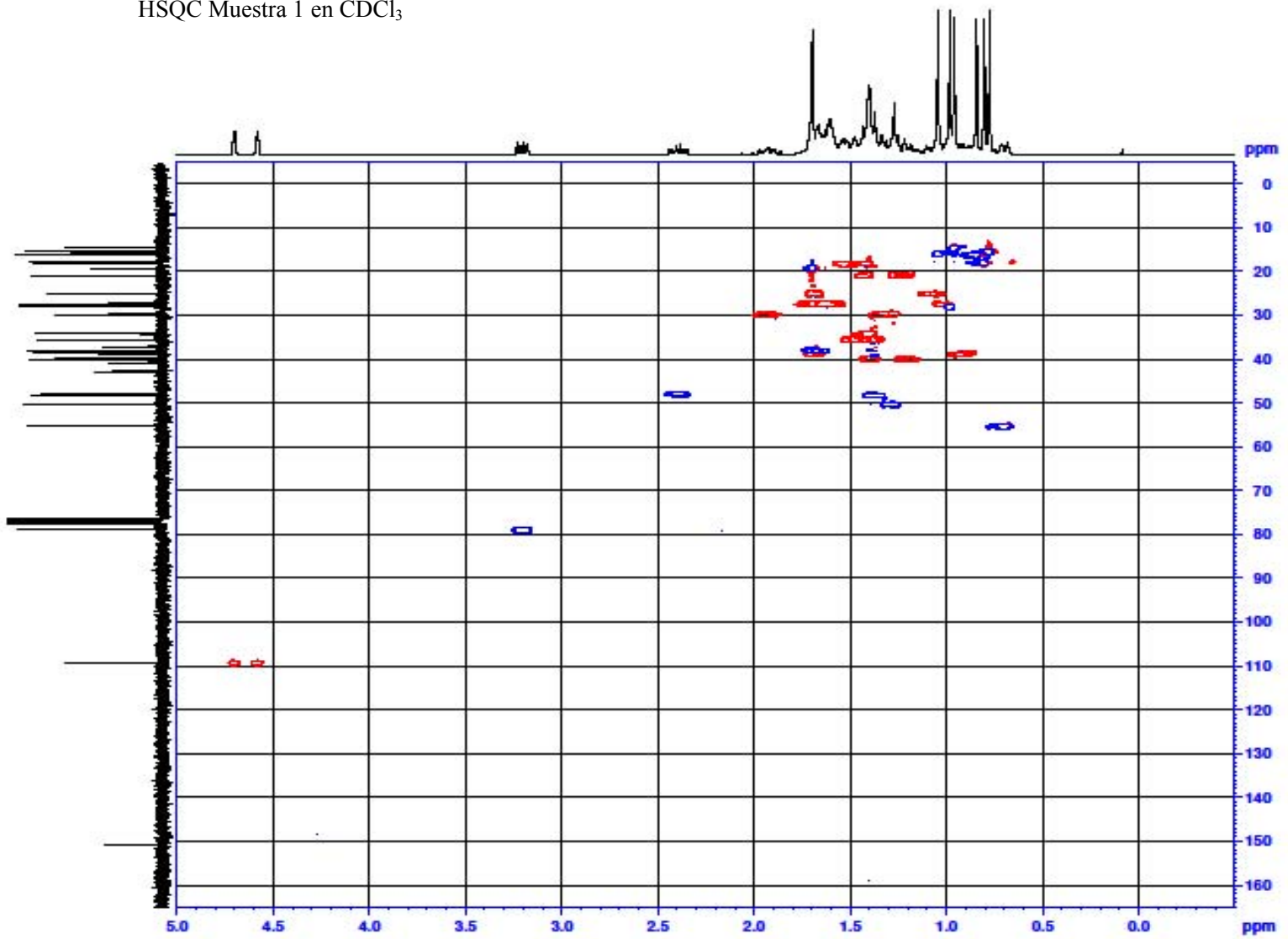


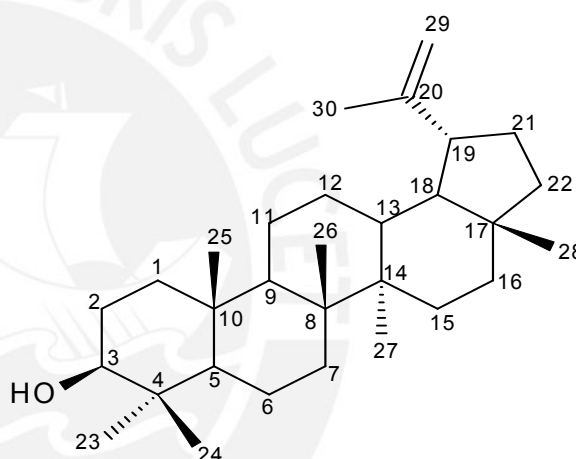
Figura 27: Espectro HSQC del lupeol

En base a la información analizada, ha sido posible asignar los desplazamientos de los 30 átomos de carbono del lupeol y de la mayoría de los hidrógenos de la misma molécula. Siendo éste estudio un aporte a los pocos estudios preexistentes de esta molécula, según la literatura revisada. Estas asignaciones se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6:** Desplazamientos de señales de carbono e hidrógeno en RMN del Lupeol.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ , ppm	$\delta^1\text{H}$ , ppm
1	38,7	n.a
2	27,4	1,78-1,58
3	71,1	3,2
4	38,9	-
5	55,3	0,71
6	18,3	n.a
7	34,3	n.a
8	40,8	-
9	50,4	n.a
10	37,2	-
11	20,9	n.a
12	25,1	1,82
13	38,0	1,92
14	42,8	-
15	27,4	1,64-1,04
16	35,6	n.a
17	43,0	-
18	48,3	1,35
19	48,0	2,38
20	151,0	-
21	29,8	2,00-1,32
22	40,0	n.a
23	28,0	0,98
24	15,4	0,77
25	16,1	0,84
26	16,0	1,01
27	14,9	0,96
28	18,0	n.a
29	109,3	4,58-4,67
30	19,3	1,66

n.a: no asignado



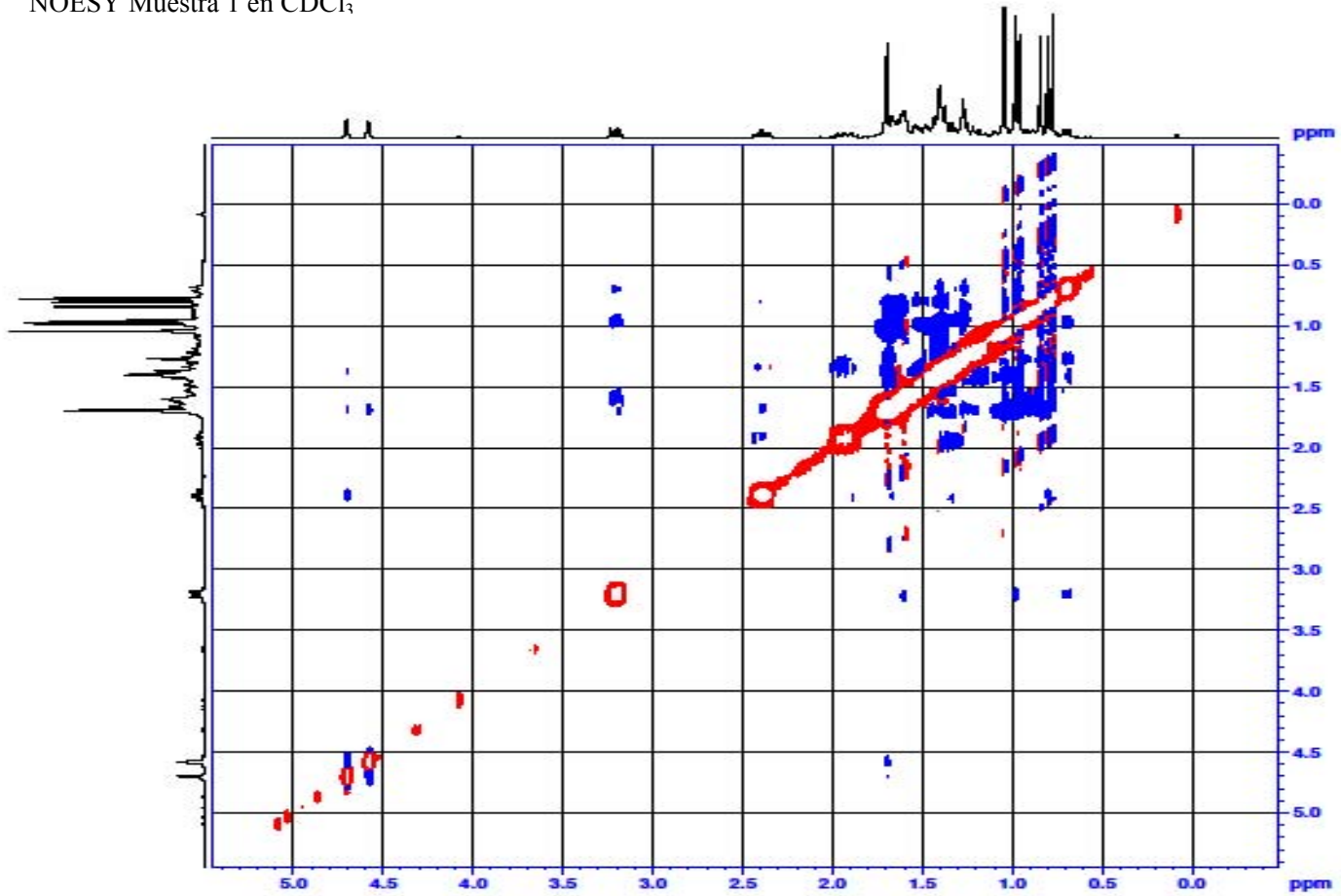
**Figura 28:** Estructura del lupeol



El espectro NOESY, presentado en la figura 29 nos permitió diferenciar entre lupeol y  $\alpha$ -lupeol, los cuales son epímeros en la posición 3. Al reconocerse acoplamiento entre el H-5 y el H-3, se demuestra que la disposición del H es del tipo  $\alpha$  por quedar ambos grupos del mismo lado. Se concluye que el metabolito aislado corresponde al lupeol. Con esto se confirma que el grupo OH presenta posición ecuatorial, disposición  $\beta$ , lo cual concuerda con la estructura natural. Las señales más importantes en este espectro se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7:** Correlaciones reconocidas en el espectro NOESY del lupeol

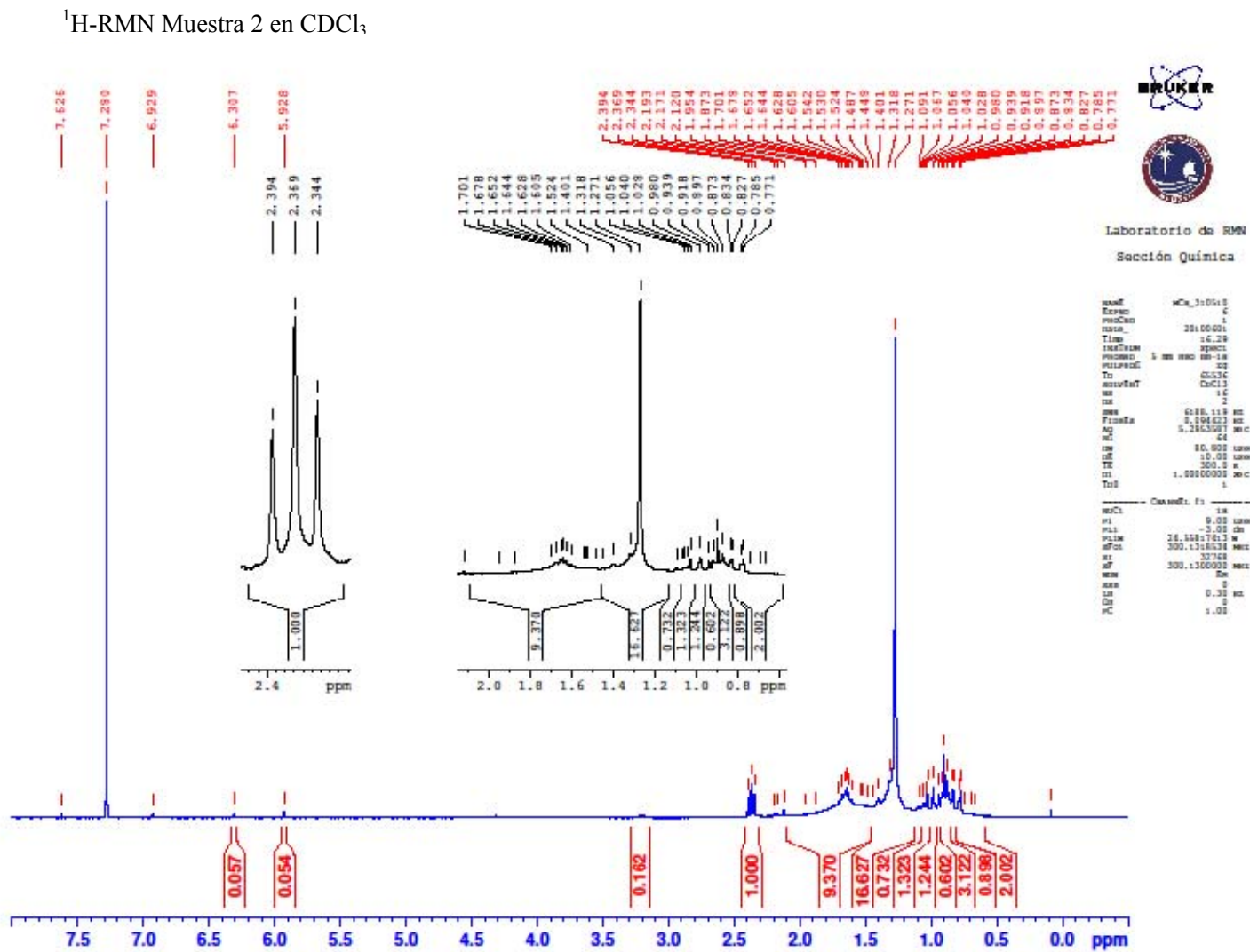
$\delta$ H ppm	Acopla con
4,70 (H-29b)	H-29a, H-19, H-30, H-21
3,20 (H-3)	H-2, H-5, Me-23
2,38 (H-19)	H-21, H-18, H-22, H-28
2,00 (H-21 $\alpha$ )	H-18, H-21 $\beta$
1,32 (H-21 $\beta$ )	H-30

NOESY Muestra 1 en  $\text{CDCl}_3$ *Figura 29: Espectro NOESY del lupenol*

Los compuestos 2 y 3 fueron aislados en poca cantidad. Se reconoció que eran derivados de ácidos grasos, pero no se pudieron realizar todas las pruebas espectroscópicas requeridas. Sin embargo la figura 29 muestra el  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto 2, el cual presenta ausencia de insaturación, se observa una señal muy intensa centrada a 1,4 ppm característica de metilenos en hidrocarburos de cadena larga, alrededor de 1 ppm estarían los metilos terminales y por encima de 1,5 ppm, los hidrógenos afectados por la función ácido.



Figura 30: Espectro <sup>1</sup>H-RMN del lupedi  
46



### 3.6 Actividad biológica del aceite esencial

El método de la bioautografía<sup>(42)</sup> permitió reconocer cualitativamente la inhibición del halo de diferentes bacterias por acción del aceite esencial de *Capparis ovalifolia*. El ensayo se hizo a 2 concentraciones diferentes del aceite: a 1,5  $\mu\text{L}$  y 2,5  $\mu\text{L}$ . Los resultados se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8:** Ensayo de bioactividad del aceite esencial

Aceite Esencial de <i>Capparis ovalifolia</i>	1,5 $\mu\text{L}$ (AV)	2,5 $\mu\text{L}$ (AV)
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-

[+] – ocurrió inhibición

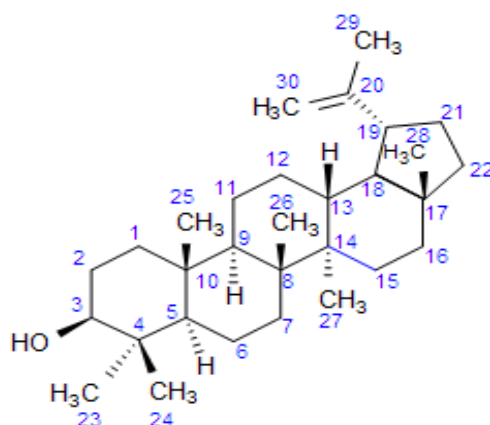
[-] – no ocurrió inhibición

En base a los resultados presentados se puede confirmar que el aceite esencial estudiado actúa como antimicrobiano frente a *Escherichia coli*. En el caso de *Staphylococcus aureus*, la inhibición es efectiva a la más alta concentración ensayada. En este caso se logró una buena reducción del halo, a la concentración de 2,5  $\mu\text{L}$ .

Esto confirma los estudios previos realizados en *Capparis spinosa* que presentan actividad antimicrobiana<sup>11</sup>. Cabe resaltar que es el primer estudio reportado de esta actividad en la especie *C. ovalifolia*.

## IV Conclusiones

- 1) Las hojas de *Capparis ovalifolia* contienen flavonoides, taninos, esteroides y triterpenoides todos ellos confirmados por la marcha fitoquímica.
- 2) Por hidrodestilación se obtuvo el aceite esencial de las hojas de *Capparis ovalifolia* con un rendimiento de 0,15 %.
- 3) Entre los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial se encontró mentol, acetato de metilo, 3-octenona, viridiflorol, neo-mentol, piperitona, mentona e isomentona. El contenido de mentol en el aceite esencial es de 51,7 %, por lo que se puede considerar a esta planta como una fuente natural de mentol.
- 4) Se aisló el compuesto 1, del extracto de las hojas de *Capparis ovalifolia*, el cual es soluble en acetato de etilo, cloroformo y etanol. Como resultado de su elucidación espectroscópica le corresponde la fórmula  $C_{30}H_{50}O$  cuya estructura es reconocida como lupeol y es la siguiente:



Se asignaron las señales de RMN del lupeol en base a RMN mono- y bi- dimensionales

- 5) Se identificaron derivados de ácidos grasos, del extracto de las hojas de *Capparis ovalifolia*, mediante espectroscopía  $^1H$ -RMN.
- 6) Se presume actividad antioxidante de las hojas de *Capparis ovalifolia* en función al contenido del lupeol, sustancia reconocida como un antioxidante natural, así como

compuesto activo con efectos antiurólíticos al cual también se le atribuyen otras propiedades farmacológicas importantes como antiinflamatorio, hepatoprotector y antilipídémico.<sup>(41)</sup>

- 7) Se comprobó actividad antibacteriana del aceite esencial de *Capparis ovalifolia* frente a *E. coli* y *S. aureus*, debido posiblemente a la presencia del mentol como compuesto mayoritario del aceite esencial.

## V Recomendaciones

- Se recomienda continuar con el estudio de las hojas de *Capparis ovalifolia*, especialmente con el extracto polar, ya que se las usa tradicionalmente bajo esta forma.
- Ampliar cuantitativamente los estudios de actividad antibacteriana al haberse confirmado que sí posee este tipo de actividad.
- Realizar ensayos biológicos para comprobar la actividad insecticida y antioxidante de la planta.
- Investigar la posibilidad de aislamiento a mayor escala del lupeol o de un extracto de la planta enriquecido con lupeol, para su uso como nutraceutico.



## Bibliografía

1. Badawy M., Kinghorn D., Cordell G., Farnsworth N. Potential anti-cancer agent constituent of *Amyris Pinnata*. *Journal of Natural products*. **1980**; 44(3), 331-334.
2. Mathur S., Gonzalez L. Identification of terpenoid from the leaves of *Pitocarpha paradoxa* and their biological activities. *Journal of Natural Products*. **1982**; 5(4), 495-496.
3. Lopes R., Agostini-Costa T., Gimenes M. Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**; 59(9), 4321-4330.
4. Noratto G., Bertoldi M., Krenek K. Anticarcinogenic Effect of polyphenolics from Mango (*Mangifera indica*) Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**; 58(7) 4104-4112.
5. Rao N. Bioactive phytochemicals in Indian food and their potential in health promotion and disease prevention. *Journal of Clinical Nutrition*. **2003**; 12(1), 9-22.
6. Pezzuto M. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. Combinatorial Chemistry and High throughput screening. **1998**; 1, 35-46.
7. Nöthlings U., Murphy S., Wilkens L., Flavonols and Pancreatic Cancer Risk. *Journal of Epidemiology*. **2007**; 166, 924-931.
8. Schlaepfer L., Mendoza-Espinoza J. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **2010**; 41(4), 18-27.

9. Giner R., Bayas de Goji E. (*Lycium barbarum* L.): aspectos farmacológicos y de eficacia. *Revista de Fitoterapia*. **2010**; 10(1), 23-33.
10. Astudillo-Vázquez A., Matab R., Navarrete A. El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos. *Revista Latinoamericana de Química*. **2009**; 37(1), 7-43.
11. Germano M., Pasquale R., D'Angelo V. Evaluation of extract and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. Buds as an antioxidant source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**; 50 (5), 1168-1171.
12. Hanson, James Y Ralph Terpenoids and steroids. London The Royal society of chemistry. **1981**
13. Fernandez A., Nogueiras C., Carballo C. Estudio fitoquímico preliminar y actividad fungicida de corteza de *maytenus urquiolae* mory (Celastraceae). *Journal de Fitosanidad*. **2010**; 14 (4), 247-252.
14. Soares M., Rezende M., Ferreira H. Pharmacognostic characterization of the leaves of *Davilla elliptica* St.-hil. (Dilleniaceae). *Revista brasileira farmacognóstica*. **2005**; 15(4), 352-360.
15. Caballero P. the isolation and molecular structure of Lupeol from *cnidosculus elasticus*. *Journal of Natural Products*. **1984**; 47 (5), 819-821.
16. Oliveira A., Silva L., Andrade P. Further insight into the latex metabolite profile of *ficus carica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**; 58 (29), 1855-1863.
17. Varatharajan S., Coothan K., Palaninathan. effect of Lupeol and Lupeol linolate in experimental Hyperoxaluria. *Journal of Natural Products*. **2008**, 71(9), 1509-1512.

18. Refrencia A Tod F. Stuessy. Plant Taxonomy. The Systematic evaluation of comparative data. Second edition. Columbia University Press New York **2009**.
19. Roz Denni. *El gourmet vegetariano*. Editorial-Agata. Buenos Aires-Argentina. **1996**.
20. Zhou H., Xie C., Jian R. Biflavonoids from caper (*Capparis spinosa* L.) Fruits and their effect in inhibitin NF-kappa Bactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**; 59(7), 3060-3065.
21. Germano M., Pasquale R., V. d'Angelo. Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. Buds as an Antioxidant source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**; 50, 1168-1171.
22. Zargari A. Medicinal Plant, Teheran University publication; Tehran, Iran, **1986**, 249-258.
23. zcan M., Akgül A., Picling. process of cappers flower buds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**; 50, 94-96.
24. Gupta, A. Chakrabarty, M. Composition of the seed fat of the Capparidaceae family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1964**; 15, 69-73.
25. Akgül A. Özcan, M. Some compositional characteristic of cappers seed and oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .**1999**; 50, 49-52.
26. George H., Lawrence M., Center for new Crops & Plant Products, Purdue University U.S.A. **1951**.
27. Mitchell J.C. British Contact dermatitis from plants of the caper family, Capparidaceae. *Journal of Dermatology*. **1974**. 91:13-20.

28. Ribaski J., Red Latinoamericana de Cooperación Técnica en Sistemas Agroforestales, **1997**.
29. Brack A., Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú, CBC (Centro de Estudios Regionales Andinos) Lima. **1999**; 100-101.
30. Chávez H. "Estudio botánico y análisis químico por la marcha de Castañeda y Paladino aplicado a los frutos de *Capparis ovalifolia*"; tesis de licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, **1964**.
31. Vidaurre M., Quecevalú L., De los Ríos E., Ruiz S. Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis Avicennifolia*. *Revista Médica Vallejana*. **2007**; 4(2), 121-131.
32. Matthäus B., Özcan, M. Glucosinolates and fatty acid, sterol, and tocopherol composition of seed oils from *Capparis spinosa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**; 53, 7136-7141.
33. Rajesh P. Selvamani P. Latha S. Chemical and medicobiological application of capparidaceae family. Bharanthidasan University, India. **2009**; 3(6), 378-387.
34. Prathan L., Kaoru U., Toshio M. Antistrogenic constituent of the Thai Medicinal Plants *Capparis flavicans* and *Vitex glabrata*. *Journal of Natural Products*. **2009**; 72, 1954-1959.
35. Tesoriere L., Butera D., Gentile C., Livrea M. Bioactive compound of capper (*capparis spinosa L.*) from Sicily and antioxidant effect in a red meat simulated gastric digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**; 55(21), 8465-8471.
36. Eddouks M., Lemhadri A., Lemhadri. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**; 98, 345-350.

37. Eddouks M., Lemhadri A., Lemhadri. *Journal of Ethnopharmacology*. **2004**; 94, 143-148.
38. Panico A., Cardile V., Garufi F., Protective effect of *Capparis spinosa* on chondrocytes. *Life Sciences*. **2005**; 77(20), 2479-2488.
39. Viqar A., Nargis I; Shois A, Aziz-Ur-Rehman, A. Two new N-Acetylated spermidine alkaloid from *Capparis decidua*. *Journal of Natural Products*. **1992**; 55(10), 1509-1512.
40. Angelini G., Vena G., Filotico R., et al. Allergic contact dermatitis from *Capparis spinosa* L. applied as wet compresses. **1991**; 24(5), 382-383.
41. Schmourloa G., Mendonc R. Celuta Sales Alvianob, Sonia S. Costaa, Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**; 96, 563–568.
42. Choma I., Grzelak E., Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*. **2011**; 1218(19), 2684-2691.
43. Monica Gil D. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a la meticilina. *Revista Chilena de Infectología*. **2000**; 17(2), 145-152.
44. Diekema D. AQL. Antimicrobial Resistance among Gram-Negative Bacilli Causing Infections in Intensive Care Unit Patients in the United States between 1993 and 2004. *Clinical infectious Diseases*. **1999**; 29, 595-607.
45. Arias I., Cáceres O., Figueroa M., Huguet J., Camiña M. *Escherichia coli* enteroagregativa en niños con diarrea de un hospital de Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. **2004**; 21(3), 176-178.

46. Parkhill J., Dougan K., y Thompson D. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature International weekly Journal of Science*. **2001**; 413, 848-852.
47. Greenblat C., Baun J., S. Cano. 2004 *Micrococcus luteus* survival in amber. *Microbial ecology*. **2004**, 48,120-127.
48. Real Farmacopea Española. 1era ed. Ministerio de Sanidad y Consumo Secretaria General Técnica. Madrid- España. **1996**; 22-23.
49. Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS) & Instituto Peruano de Medicina Tradicional (INMETRA). **1997**.
50. Lock, O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales, Fondo editorial PUCP, **1994**, 2° edición; 3(22),114-135.
51. Adams. Wiley/NIST Mass Spectral Library, **2008** .
52. Romeo, V. Ziino, M. Giuffrida D. Conduro, C. Verzeraa, A. Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME-GC-MS. *Journal Food Chemistry*. **2007**;101(3), 1272-1278.
53. Gokalp. Antimicrobial screening of *menta piperita* Essentials oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**; 50(14), 3943-3946.
54. Fotie J., Bohle S., Lupeol long/chain fatty acid esters with antimalarial activity from *holarrhena floribunda*. *Journal of Natural Products*. **2006**; 69 (1), 62-67.



- (a) Tomado de: “National tropical botanical garden”  
<<http://www.ntbg.org/plants/imageonly.php?rid =906&plantid=3652.>>  
Fecha de acceso: 15-2-2011
- (b) Tomado de: “flora ornamental española”  
<<http://www.arbolesornamentales.es/Cydoniaoblonga.htm>>  
Fecha de acceso: 30-12-2010
- (c) Tomado de : “plantes-botaniques.org”  
<[http://www.plantes-botanique.org/espece\\_Steriphoma\\_paradoxum](http://www.plantes-botanique.org/espece_Steriphoma_paradoxum)>  
Fecha de acceso: 03-06-2011
- (d) Tomado de : “Orígenes SRL-argentina”  
<<http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agroindustria/alcaparras/origenes/default.htm>. >  
Fecha de acceso: 03-06-2011
- (e) Tomado de : “hierbas medicinales”  
< <http://hierbamedicinal.es/tag/alcaparras.>>  
Fecha de acceso: 11-08-2011
- (f) Tomado de : “Missouri botanical garden”  
<<http://www.missouribotanicalgarden.org/gardens-gardening/your-garden/plant-finder/plant-details/kc/a572/cleome-hassleriana.aspx>>  
Fecha de acceso: 10-09-2011
- (g) Tomado de : “ El nuevo agro-Argentina”  
<<http://www.elnuevoagro.com.ar/noticia/alcaparras-pequenas-fortachonas-/118>>  
Fecha de acceso: 16-06-2010



- (h) Tomado de : “Royal botanical garden”  
<<http://www.kew.org/science/tropamerica/peru/Ficha%20de%20plantas%20importantes%20de%20lca.pdf>>  
Fecha de acceso: 04-11-2010
- (i) Tomado de : “EHA consulting group inc”  
<<http://www.ehagroup.com/resources/pathogens/pseudomonas-aeruginosa/>>  
Fecha de acceso: 20-01-2012
- (j) Tomado de : “EHA consulting group inc”  
<<http://www.ehagroup.com/resources/pathogens/e-coli-O157-H7-escherichia-coli/>>  
Fecha de acceso: 20-01-2012
- (k) Tomado de : “Diario aleman Spiegel online”  
<<http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,295445,00.html>>  
Fecha de acceso: 21-01-2012
- (l) Tomado de : “Microbewiki”  
<<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Micrococcus>>  
Fecha de acceso: 17-11-2011
- (m) Tomado de : “Google maps”  
<[http://www.google.com/mapmaker?ll=-6.569118,-79.825287&spn=0.582544,1.352692&t=m&z=10&vpsrc=6&q=localidad+de+batan+grande,+peru&hl=en&source=gm\\_el](http://www.google.com/mapmaker?ll=-6.569118,-79.825287&spn=0.582544,1.352692&t=m&z=10&vpsrc=6&q=localidad+de+batan+grande,+peru&hl=en&source=gm_el)>  
Fecha de acceso: 30-1-2012.