Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Química e Ingeniería Química
Escuela Profesional de Química

Aislamiento y elucidación estructural (espectroscopía de RMN 1D y 2D) de metabolitos de la planta Stachys pusilla (Wedd.) Briquet ("hierba de cáncer"), análisis fitoquímico y antibacteriano del extracto hidroalcohólico

TESIS

Para optar el Título Profesional de Química

AUTOR

Irene VALDEZ CHIRINOS

ASESOR

Dr. Olivio Nino CASTRO MANDUJANO

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Valdez, I. (2024). *Aislamiento y elucidación estructural (espectroscopía de RMN 1D y 2D) de metabolitos de la planta Stachys pusilla (Wedd.) Briquet ("hierba de cáncer"), análisis fitoquímico y antibacteriano del extracto hidroalcohólico*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Química]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Irene Valdez Chirinos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	48965794
URL de ORCID	**https://orcid.org/0009-0008-2797-889X**
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Olivio Nino Castro Mandujano
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07683880
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6592-6934
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Julio Cesar Santiago Contreras
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08505549
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Juana Maria Huamán Malla
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25603015
Datos de investigación	
Línea de investigación	Química e Ing. Química C.0.1.1. Productos Naturales
Grupo de investigación	Agrobiotecnología Ambiental (UNMSM-Perú) Química Orgánica de los Productos Naturales (UdeA-Colombia)
Agencia de financiamiento	VRIP-UNMSM- Proyecto C23070012
Ubicación geográfica de la investigación	Lima-Perú Medellín-Colombia

Año o rango de años en que se realizó la investigación	Septiembre 2022 - Mayo 2024
URL de disciplinas OCDE	1.04.01 -- Química orgánica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.01 1.04.07 -- Química analítica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.07

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima1

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Química, bajo la Presidencia del **Dr. Julio César Santiago Contreras** (Presidente), la **Quím. Juana María Huamán Malla** (Miembro) y el **Dr. Olivio Nino Castro Mandujano** (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS,** titulada **"AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL (ESPECTROSCOPÍA DE RMN 1D Y 2D) DE METABOLITOS DE LA PLANTA STACHYS PUSILLA (WEDD.) BRIQUET("HIERBA DE CÁNCER"), ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO"** después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborado por la Bachiller en Química: **Irene Valdez Chirinos;** para optar el **TÍTULO PROFESIONAL** de **QUÍMICA,** acordaron calificarla con la **NOTA** de:

Veinte	20
(LETRA)	**(NÚMERO)**

Ciudad Universitaria, 19 de diciembre de 2024.

Quím. JUANA MARÍA HUAMÁN MALLA
MIEMBRO

Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS
PRESIDENTE

Dr. OLIVIO NINO CASTRO MANDUJANO
ASESOR

Dr. JOSÉ LUIS PAZ ROJAS
Director de la E.P. de Química

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA
Facultad de Química e Ingeniería Química

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Olivio Nino Castro Mandujano en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N° 000031-2025-D-FQIQ/UNMSM de la tesis, cuyo título es **"AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL (ESPECTROSCOPÍA DE RMN 1D Y 2D) DE METABOLITOS DE LA PLANTA *STACHYS PUSILLA* (WEDD.) BRIQUET ("HIERBA DE CÁNCER"), ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO"**, presentado por la bachiller **IRENE VALDEZ CHIRINOS** para optar el título de **QUÍMICA**.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 20% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Lima, 20 de enero de 2025

Firma del Asesor _____

Nombres y Apellidos del asesor: Olivio Nino Castro Mandujano.

DNI 07683880

Dedicatoria

A mis hermanos, Omar y Bianca.
Sigo cumpliendo mi rol de dar el ejemplo;
ya los veré, emocionada, pasando por este momento.
Sigan adelante, vayan por más. Siempre.

Los quiero mucho; los quiero ver brillar.

.

Agradecimientos

Agradezco al grupo de investigación de Química Orgánica de los Productos Naturales de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) por recibirme, orientarme y brindarme todo lo posible para desarrollar la parte experimental de mi tesis.

Al VRIP-UNMSM por el apoyo en esta investigación a través de la aprobación, por la RR N° 012179-R-23, del Proyecto C23070012.

Al grupo de investigación Agrobiotecnología Ambiental de la Facultad de Química e Ingeniería Química (UNMSM) por incluirme en el proyecto que me permitió darle inicio a mi tesis.

Al Mg. Nelson Bautista Cruz de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM por el apoyo brindado para realizar la evaluación de la actividad antibacteriana de mi extracto; a la Dra. Sara Robledo de la Universidad de Antioquia por la evaluación de la actividad antiparasitaria; y a la Dra. Silvia Ponce de la Universidad de Lima por el apoyo en recursos.

Y también, particularmente a mis dos queridos asesores, el Dr. Nino Castro (UNMSM) y el Dr. Fernando Echeverri (UdeA), por el tiempo, la paciencia, el apoyo emocional y su plena disposición en enseñarme y mostrarme las aplicaciones que hay en el área de Productos Naturales.

Por último, doy gracias a mi familia y a todas aquellas personas que estimo mucho, por su apoyo continuo, sus ánimos y acompañamiento durante mi carrera; no fue fácil, pero se logró.

Resumen

La planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet (“hierba de cáncer”) de la familia Lamiaceae, es tradicionalmente conocida para asistir heridas complicadas de curar y debido a su escasa información química, se realizó un estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico con la finalidad de aislar y elucidar por espectroscopía RMN (1D y 2D) los metabolitos secundarios mayoritarios; además, analizar la actividad antibacteriana del extracto, elaborar una crema a base del extracto y evaluar su actividad fotoprotectora. Las muestras fueron recolectadas en Cusco, e identificadas taxonómicamente en el Museo de Historia Natural (UNMSM). Se utilizó toda la planta y, por maceración estática, se obtuvieron extractos con hexano y etanol. El extracto hidroalcohólico se lavó con una mezcla de Hex:DCM:MeOH (2:1:1); de la parte insoluble se realizó una serie de cromatografía en columna y capa delgada para aislar sus metabolitos mayoritarios. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por RMN; según la definición e intensidad de las señales de los espectros, se purificaron aquellas de interés. Por otra parte, se preparó una crema de tipo O/W, a base de una fracción acuosa del extracto hidroalcohólico, a la cual se evaluó su actividad fotoprotectora. De los espectros de RMN (^{1}H y ^{13}C, DEPT 135, HSQC, HMBC, COSY) de las fracciones SFIM-3, BR9M-15 y BR9M-18 se determinó la propuesta estructural de tres moléculas diferentes: ácido clorogénico, verbascósido y diosmetina-7-O-2″-O-[6‴-O-acetil-β-D-alopiranosil-(1→2)]-β-D-glucopiranósido. La última sería reportada por primera vez en el género *Stachys*. Las actividades fotoprotectoras y antimicrobianas son dependientes de la cantidad de fenoles totales, que fue 94.05 mg AGE/mL de extracto; y con la actividad antioxidante, 0.7357 mg TE/mL extracto y IC_{50} de 3.3797 mg/mL por el método tradicional de DPPH·. Estos últimos no expresaron valores mayores en comparación a otras especies; no obstante, la crema exhibió 88.25% de fotoprotección, sugiriendo ser un posible protector solar con mejoras pendientes; mientras que, no resultó prometedor su actividad antimicrobiana, la cual fue moderada frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* con 40-42% de inhibición.

Palabras clave: *Stachys*, cromatografía, RMN, antibacteriana, fotoprotección

Abstract

The plant *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet (“cancer herb”) of the Lamiaceae family is traditionally known to assist wounds that are difficult to heal and due to its scarce chemical information, a phytochemical study of the hydroalcoholic extract was carried out in order to isolate and elucidate by NMR spectroscopy (1D and 2D) the major secondary metabolites; in addition, to analyze the antibacterial activity of the extract, to prepare a cream based on the extract and to evaluate its photoprotective activity. The samples were collected in Cusco, and taxonomically identified at the Natural History Museum (UNMSM). The entire plant was used, and, by static maceration, extracts were obtained with hexane and ethanol. The hydroalcoholic extract was washed with a mixture of Hex:DCM:MeOH (2:1:1); a series of column and thin layer chromatography were performed on the insoluble part to isolate its major metabolites. The fractions obtained were analyzed by NMR; according to the definition and intensity of the spectral signals, those of interest were purified. On the other hand, an O/W cream was prepared, based on an aqueous fraction of the hydroalcoholic extract, which was evaluated for its photoprotective activity. From the NMR spectra (^{1}H and ^{13}C, DEPT 135, HSQC, HMBC, COSY) of the SFIM-3, BR9M-15 and BR9M-18 fractions, the structural proposal of three different molecules was determined: chlorogenic acid, verbascoside and diosmetin-7-O-2″-O-[6‴-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)]-β-D-glucopyranoside. The last one would be reported for the first time in the *Stachys* genus. The photoprotective and antimicrobial activities are dependent on the amount of total phenols, which was 94.05 mg AGE/mL of extract; and with the antioxidant activity, 0.7357 mg TE/mL extract and IC_{50} of 3.3797 mg/mL by the traditional DPPH method. The latter did not express higher values compared to other species; however, the cream exhibited 88.25% photoprotection, suggesting it to be a possible sunscreen with pending improvements; while its antimicrobial activity was not promising, which was moderate against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomona aeruginosa* strains with 40-42% inhibition.

Keywords: *Stachys*, chromatography, NMR, antibacterial, photoprotection

Tabla de contenido

Resumen 4

Abstract 5

Capítulo I: Introducción 21

1.1 Justificación del trabajo 21

1.2 Objetivos 22

1.2.1 Objetivo general 22

1.2.2 Objetivos específicos 22

1.3 Hipótesis 22

1.4 Antecedentes 22

1.4.1 Especie *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet 22

1.4.2 Género *Stachys* 23

Capítulo II: Marco teórico 35

2.1 Estudio fitoquímico 35

2.2 Métodos cromatográficos 37

2.2.1 Cromatografía de exclusión molecular 38

2.2.2 Cromatografía en capa delgada 38

2.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) 39

2.4 Metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el género *Stachys* 40

2.4.1 Flavonoides 40

2.4.2 Ácido clorogénico 41

2.4.3 Verbascósido (o acteósido) 42

2.5 Crema a base de extractos naturales 43

2.6 Actividad antibacteriana 43

2.7 Actividad antiparasitaria: Leishmaniasis 44

Capítulo III: Metodología 45
3.1 Recolección, acondicionamiento de la muestra y obtención de extractos 45
3.2 Análisis fitoquímico de la especie *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet 45
3.2.1 Marcha fitoquímica 45
3.2.2 Evaluación de fenoles totales del extracto crudo 46
3.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto crudo 46
3.3 Aislamiento (Extracción, Separación, Purificación) y elucidación de los metabolitos secundarios 46
3.4 Preparación y caracterización de la crema 52
3.5 Evaluación de la actividad antibacteriana, fotoprotectora y leishmanicida del extracto hidroalcohólico 53
3.5.1 Evaluación de la actividad antibacteriana 53
3.5.2 Evaluación de la actividad fotoprotectora de la crema 53
3.5.3 Evaluación de la actividad leishmanicida del metabolito aislado 54
Capítulo IV: Resultados y discusiones 55
4.1 Recolección, acondicionamiento de la muestra y obtención de extractos 55
4.2 Análisis fitoquímico de la especie *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet 57
4.2.1 Análisis cualitativo del extracto hexánico e hidroalcohólico 57
4.2.2 Evaluación de fenoles totales del extracto crudo 60
4.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso (FSA) por el método clásico de DPPH· 61
4.3 Aislamiento (Extracción, Separación, Purificación) y elucidación de los metabolitos secundarios 64
4.3.1 Separación e identificación del extracto hexánico por diferencia de solubilidad 64

4.3.2 Aislamiento de metabolitos a partir del extracto hidroalcohólico por cromatografía en columna: Extracto soluble en Hex:DCM:MeOH 69
4.3.3 Aislamiento de metabolitos a partir del extracto hidroalcohólico por cromatografía en columna: Extracto insoluble en Hex:DCM:MeOH 71
4.3.4 Elucidación estructural de los metabolitos aislados por espectroscopía de RMN 1D y 2D 81
4.3.4.1 Molécula 1 81
4.3.4.2 Molécula 2 89
4.3.4.3 Molécula 3 97
4.4 Caracterización de la crema a base del extracto acuoso FSA 105
4.5 Evaluación de bioactividades del extracto hidroalcohólico 106
4.5.1 Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico 106
4.5.2 Evaluación de la actividad fotoprotectora de la crema 108
4.5.3 Evaluación de la actividad leishmanicida del metabolito aislado 109
Capítulo V: Conclusiones 111
Capítulo VII: Referencias 112
Capítulo VIII: Anexos 131

Lista de tablas

Tabla 1. Relación de los metabolitos secundarios aislados y la bioactividad evaluada según la especie de *Stachys* y la literatura encontrada 29

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de algunas técnicas de elucidación estructural de metabolitos, adaptada de Zhuo y col. [34] 36

Tabla 3. Formulación de la crema preparada a base del extracto acuoso (FSA) de *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet 52

Tabla 4. Valores de E(λ)×I(λ) para las longitudes de onda de 290-320 nm 54

Tabla 5. Compuestos fitoquímicos encontrados de la especie Stachys pusilla (Wedd.) Briquet 57

Tabla 6. Compuestos fitoquímicos referenciales de una planta del mismo género *Stachys* 59

Tabla 7. Actividad antioxidante de las muestras FSA analizadas 63

Tabla 8. Prueba de solubilidad de cristales 2 65

Tabla 9. Manchas observadas perteneciente a la muestra del vial IV-V.31. 66

Tabla 10. Posibles metabolitos que puedan resultar del producto del vial IV-V.31 67

Tabla 11. Señales identificadas de los espectros de RMN de la molécula 1 85

Tabla 12. Desplazamientos químicos identificados de los espectros HSQC y HMBC (RMN 2D) de la molécula 1 88

Tabla 13. Señales identificadas de los espectros de RMN (1D) de la molécula 2 93

Tabla 14. Desplazamientos químicos identificados en los espectros HSQC y HMBC (RMN 2D) de la molécula 2 95

Tabla 15. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C experimentales y reportadas en artículos 96

Tabla 16. Señales identificadas de los espectros de RMN de la molécula 3 101

Tabla 17. Desplazamientos identificados en los espectros HSQC y HMBC (RMN 2D) de la molécula 3 103

Tabla 18. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN 13C del metabolito aislado con los registrados en la literatura. 104

Tabla 19. Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la crema preparada 106

Tabla 20. Resultados de la evaluación antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet..... 107

Tabla 21. Resultados de la evaluación leishmanicida de la molécula 3 (metabolito aislado) de *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet 109

Lista de figuras

Figura 1. Metodología general como alternativa para la purificación de metabolitos, tomada de Zhuo y col. [34] 37

Figura 2. Ejemplo del proceso que ocurre en una columna de cromatografía 38

Figura 3. Distancias para considerar en el cálculo del R_f (factor de retención) 39

Figura 4. Esquema general sobre la técnica de RMN 40

Figura 5. Estructura molecular de los flavonoides y sus derivados 41

Figura 6. Estructura molecular del ácido clorogénico 42

Figura 7. Estructura molecular del verbascósido, tomada de Mantovska y col. [10] 42

Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de extracción con hexano 47

Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de extracción con etanol 47

Figura 10. Diagrama de flujo del proceso de aislamiento por diferencia de solubilidad del extracto hexánico 48

Figura 11. Metodología aplicada para la obtención y el aislamiento del metabolito mayoritario. 49

Figura 12. Procedimiento para la obtención de fracciones del extracto hidroalcohólico 50

Figura 13. Fracciones obtenidas a partir de la parte insoluble resultante del lavado del extracto hidroalcohólico con la mezcla Hex:DCM:MeOH 51

Figura 14. Planta recolectada 55

Figura 15. Diagrama de la obtención de los extractos hidroalcohólicos y hexánicos 56

Figura 16.Espectro UV-Vis del extracto hidroalcohólico crudo 60

Figura 17. Espectro UV-Vis del extracto hexánico crudo 60

Figura 18. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales 61

Figura 19. Curva de calibración para la determinación de antioxidantes 62

Figura 20. Porcentaje de inhibición de las muestras de la fracción FSA 63

Figura 21. Cromatoplaca del precipitado del vial IV-V.31 bajo luz visible (izq.), longitud de onda corta (medio) y larga (der.) 67

Figura 22. Espectro UV-Vis del precipitado reservado en el vial N° 32 68

Figura 23. Espectro UV-Vis del precipitado reservado en el vial N° 26 68

Figura 24. Fracción retenida en columna correspondiente a FIN 72

Figura 25. Cromatoplacas de las fracciones de FIN 3-9 bajo UV onda larga (izq.), vainillina (medio) y $FeCl_3$ (der.) 72

Figura 26. Espectro de RMN de ^1H de la fracción FIN-4 73

Figura 27. Cromatoplaca de la fracción FIN-4 bajo UV onda larga (izq.), vainillina (medio) y $FeCl_3$ (der.) 74

Figura 28. Espectro de RMN de ^1H de la fracción SFIM-3 75

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H de la fracción BI3-5..... 75

Figura 30. Cromatoplacas de las fracciones de RIN, IST y SRIM bajo UV onda larga (A,C,F), vainillina (B,D,E) y $FeCl_3$ (G)..... 76

Figura 31. Espectro de RMN de ^1H de las fracciones BR9M-15 (izq.) y BR9M-18 (der.) 77

Figura 32. Cromatoplacas de las fracciones SB15 y SB18 bajo UV onda larga (A,D), vainillina (B,E) y $FeCl_3$ (C) 78

Figura 33. Espectros de RMN de 1H de las fracciones SB15-5M (izq.) y SB18-4M (der.) 79

Figura 34. Cromatoplacas de la fracción BL3-M bajo UV onda corta (izq.), onda larga (medio) y vainillina (der.) 80

Figura 35. Espectro de RMN de 1H de la fracción BL3-M 80

Figura 36. Diagrama general de los aislamientos de metabolitos realizados 81

Figura 37. Espectro de RMN de 1H de la molécula 1..... 82

Figura 38. Espectro de RMN de DEPT 135 (arriba) y ^{13}C (abajo) de la molécula 1 83

Figura 39. Espectro de RMN de HSQC de la molécula 1 84

Figura 40. Espectro de RMN de COSY de la molécula 1 85

Figura 41. Espectro de RMN de HMBC de la molécula 1..... 86

Figura 42. Estructura propuesta de la molécula 1 89

Figura 43. Espectro de RMN de ^{1}H de la molécula 2 90
Figura 44. Espectro de RMN de DEP 135 (arriba) y ^{13}C (abajo) de la molécula 2 91
Figura 45. Espectro de RMN de HSQC de la molécula 2 92
Figura 46. Espectro de RMN de COSY de la molécula 2 92
Figura 47. Espectro de RMN de HMBC de la molécula 2 94
Figura 48. Estructura propuesta de la molécula 2 97
Figura 49. Espectro de RMN de ^{1}H de la molécula 3 98
Figura 50. Espectro de RMN de DEPT 135 (arriba) y ^{13}C (abajo) de la molécula 3 99
Figura 51. Espectro de RMN de HSQC de la molécula 3 100
Figura 52. Espectro de RMN de COSY de la molécula 3 100
Figura 53. Espectro de RMN de HMBC de la molécula 3 102
Figura 54. Estructura propuesta de la molécula 3 105

Siglas, acrónimos y abreviaturas

[LC-(-)ESI/HRMS^n]	Liquid Chromatography- Liquid Chromatography- Electrospray Ionization - High Resolution - Mass Spectrometry
1D	1 Dimensión
2D	2 Dimensiones
ABTS	2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]- sal de diamonio
AcOEt:MeOH	Acetato de Etilo:Metanol
AGE	Equivalente de ácido gálico
CC	Cromatografía en Columna
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CE_{50}	Concentración efectiva media
$CHCl_3$:MeOH	Cloroformo:Metanol
CL_{50}	Concentración letal media
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COSY	Homonuclear correlation spectroscopy
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DCM:MeOH	Diclorometano:Metanol
DEPT 135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH $^{\cdot}$	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
DS	Desviación estándar
EE	Espectro Eritemal
EtOH	Etanol
Ext.	Extracto
$FeCl_3$	Cloruro férrico
FPS	Factor de Protección Solar
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
H_2O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico

Hex:AcOEt	Hexano:Acetato de Etilo
Hex:DCM:MeOH	Hexano:Diclorometano:Metanol
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPLC-UV/Vis	High-Performance Liquid Chromatography- ultraviolet-visible
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
I	Espectro de intensidad solar
IC_{50}	Concentración Inhibitoria Media
KOH	Hidróxido de potasio
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MeOH:H_2O	Metanol:agua
MHz	Megahertz
NA	No aplicable
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH_3	Amoníaco
O/W	Aceite en agua
pH	Potencial de hidrógeno
QE	Equivalente de quercetina
RE	Equivalente de rutina
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^{1}H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP-HPLC-DAD	Ion-pair reversed phase-high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector
Rx	Reacción
SI	Índice de selectividad
TE	Equivalente de trolox
UdeA	Universidad de Antioquia

UHPLC-ESI-HR- MS	Ultra-high-performance liquid chromatography- Electrospray Ionization - High Resolution - Mass Spectrometry
ULima	Universidad de Lima
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de San Marcos
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B

Lista de anexos

Anexo 1. Constancia emitida por el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural de la UNMSM 131

Anexo 2. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones LMT 131

Anexo 3. Cromatoplacas de las fracciones LMT 1-4 y 5-8 132

Anexo 4. Cromatoplacas de las fracciones LMT anteriores mezcladas según sus características 132

Anexo 5. Columna de cromatografía en sílica gel de las fracciones FSO 133

Anexo 6. Fracciones FSO recogidas, antes de su evaporación a sequedad 133

Anexo 7. Cromatoplacas de las fracciones FSO 1-4 133

Anexo 8. Cromatoplacas de las fracciones FSO 5-8 134

Anexo 9. Cromatoplacas de las fracciones FSO 9-11 134

Anexo 10. Cromatoplacas de las fracciones LMT anteriores mezcladas según sus características en común 134

Anexo 11. Cromatoplacas de la fracción FSO-11 135

Anexo 12. Columna de cromatografía en sílica gel de las fracciones SNS 135

Anexo 13. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones FSO-2 (izq.) y FSO-4 (der.) ... 135

Anexo 14. Cromatoplacas de las fracciones SNS 1-5 136

Anexo 15. Cromatoplacas de las fracciones SNS 6-8 136

Anexo 16. Cromatoplacas de las fracciones SNS 8-10 136

Anexo 17. Columna de cromatografía en sílica gel de las fracciones MSN 137

Anexo 18. Cromatoplacas de las fracciones MSN 1-4 137

Anexo 19. Columna de cromatografía en sílica gel de las fracciones SML 137

Anexo 20. Cromatoplacas de las fracciones SML 1-5 138

Anexo 21. Cromatoplacas de las fracciones SFTM 138

Anexo 22. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones SFTM-1 (izq.), SFMTM-2U (medio) y PFOM-1 (der.) 138

Anexo 23. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones PFO-5 (izq.), MSNJ-6 (medio) y FOM-5 (der.) 139

Anexo 24. Espectros de RMN de ^{1}H de la fracción FOM-9 139

Anexo 25. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones FIN 139

Anexo 26. Cromatoplacas de las fracciones FIN 1-4 140

Anexo 27. Cromatoplacas de las fracciones FIN 5-8 140

Anexo 28. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones FINN-3 (izq.) y FIN-8 (der.) 140

Anexo 29. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones SFI 141

Anexo 30. Cromatoplacas de las fracciones SFI 1-4 141

Anexo 31. Cromatoplacas de las fracciones SFI 5-8 141

Anexo 32. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones SFI-2LE (izq.) y SFI-2LA (der.) 142

Anexo 33. Espectros de RMN de ^{1}H de la fracción SFIM-6 142

Anexo 34. Cromatoplacas de las fracciones SFI y SFI lavados 142

Anexo 35. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones SFIM-3 143

Anexo 36. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones RIN 143

Anexo 37. Cromatoplacas de las fracciones RIN 4-8 144

Anexo 38. Cromatoplacas de las fracciones RIN 9-13 144

Anexo 39. Cromatoplacas de las fracciones RINN 144

Anexo 40. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones IST 145

Anexo 41. Cromatoplacas de las fracciones IST 4-8 145

Anexo 42. Cromatoplacas de las fracciones IST 9-13 145

Anexo 43. Cromatoplacas de las fracciones IST 14-18 146

Anexo 44. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones RSM-3 146

Anexo 45. Cromatoplacas de las fracciones SRI 9-13, 14-18 y 19-23) 146

Anexo 46. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones BI3-6 (izq.) y SRIM-1 (der.) 147

Anexo 47. Espectro de RMN de ^{1}H de la fracción SRIM-18 147

Anexo 48. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BR9 148

Anexo 49. Cromatoplacas de las fracciones BR9 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30 bajo UV onda corta..... 148

Anexo 50. Cromatoplacas de las fracciones BR9 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30 bajo UV onda larga..... 149

Anexo 51. Cromatoplacas de las fracciones BR9 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30 revelado con vainillina 149

Anexo 52. Cromatoplacas de las fracciones BR9 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30 revelado con $FeCl_3$ 149

Anexo 53. Cromatoplacas de las fracciones BR9 vs BI3-5 y BI3-6 150

Anexo 54. Espectros de RMN de ^{1}H de la fracción BR9M-19 150

Anexo 55. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BR9M-15..... 150

Anexo 56. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BR9M-18..... 151

Anexo 57. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones SOL..... 151

Anexo 58. Cromatoplacas de las fracciones SOL 1-6 y 7-12 152

Anexo 59. Cromatoplacas de las fracciones SOL 13-16 152

Anexo 60. Cromatoplacas de las fracciones SOL-...M 152

Anexo 61. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BL2 153

Anexo 62. Cromatoplacas de las fracciones BL2 153

Anexo 63. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BL3 154

Anexo 64. Cromatoplacas de las fracciones BL3 1-8 154

Anexo 65. Cromatoplacas de las fracciones BL3 9-15 y 15-21 154

Anexo 66. Cromatoplacas de las fracciones BL3 22-28 y 29-35 155

Anexo 67. Crema preparada de tipo O/W a base de la fracción acuosa FSA 155

Anexo 68. Prueba de dilución (izq.) y prueba de centrifugación (der.) de la crema preparada 155

Anexo 69. Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico soluble en mezcla triple frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (izq.) y *Pseudomona aeruginosa* (der.) 156

Anexo 70. Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico soluble en mezcla triple frente a cepas de *Escherichia coli* (izq.) y *Bacillus subtilis* (der.)..... 156

Capítulo I: Introducción

Los productos naturales han sido empleados, desde tiempos antiguos, en función de la experimentación empírica y de la obtención de resultados positivos, generalmente, frente a diversas enfermedades y afecciones. De aquellos, los metabolitos son los que brindan a la planta, por ejemplo, las capacidades de ser antifúngicas, antibacterianas, antiinflamatorias, entre otras. Y según la estructura molecular y los grupos funcionales que posean, estos metabolitos son los agentes encargados de combatir las dolencias actuando solos o en "sinergia" (en conjunto con otros), incrementando su potencial. Finalmente, a partir de este conocimiento, nos permite innovar en la ciencia, aprovechando los recursos naturales, buscando nuevas alternativas y estrategias que contribuyan y satisfagan las demandas de la sociedad y del medio ambiente [1,2].

La planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briq., tradicionalmente conocida como "hierba de cáncer" [3], corresponde a la familia Lamiaceae presentando 536 especies [4], siendo el género *Stachys* uno de los más extensos [5] y llamado como "hierba de la herida" [6]. En Latinoamérica, la especie se ha encontrado en Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, alrededor de 2650-3800 msnm, ubicándose mayormente en regiones montañosas [7]. La infusión de la planta ha sido utilizada para desinfectar heridas; otros usos medicinales fueron para el tratamiento de golpes, moretones, contusiones y tumores, habiendo registro de su empleo por el personal de salud de Cusco (La Quebrada) [8]. En base a la búsqueda bibliográfica y debido a los escasos estudios químicos de la planta, se buscará lograr el aislamiento y la determinación estructural de alguno de sus metabolitos mayoritarios, con el cual se pueda ensayar y corroborar el uso medicinal tradicional.

1.1 Justificación del trabajo

El presente trabajo será de gran utilidad como aporte científico a la investigación en el área de productos naturales, debido a que no existen estudios donde hayan aislado e identificado estructuralmente los metabolitos secundarios de la planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet por espectroscopía de RMN, utilizando cromatografía en columna como método de separación de los extractos. Mediante la evaluación de la actividad antioxidante y la actividad antibacteriana se buscará confirmar alguno de los usos tradicionales de la planta. De esta manera, se otorgará la valoración correspondiente al

uso de las plantas medicinales contribuyendo a la literatura científica del Perú, y aprovechando los principios activos de la planta que, en un futuro, nos permitiría proponer una alternativa de curación de heridas de bajo costo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto hidroalcohólico de la planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet, analizar fitoquímicamente y evaluar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Aislar e identificar por espectroscopía de RMN (^{1}H y ^{13}C, DEPT 135, HSQC, HMBC, COSY) los metabolitos secundarios de la planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet.
2. Analizar fitoquímicamente (actividad antioxidante, fenoles totales) el extracto hidroalcohólico de la planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet
3. Preparar y caracterizar una crema a partir del extracto hidroalcohólico de la planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet.
4. Evaluar la actividad antibacteriana, fotoprotectora y antiparasitaria de la planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet.

1.3 Hipótesis

Se logrará la obtención de una crema que exhiba actividad fotoprotectora, antibacteriana y/o antiparasitaria a partir del extracto hidroalcohólico de la planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet.

1.4 Antecedentes

1.4.1 Especie Stachys pusilla (Wedd.) Briquet

Rodriguez [3] reportó que la planta *Stachys pusilla* (Wedd.) Briq., conocida como “hierba de cáncer”, es utilizada para tratar heridas que fácilmente no se curan; de manera que obtuvo un extracto etanólico al 70% mediante maceración, el cual, a partir del análisis fitoquímico por reacciones de coloración, identificó la presencia mayoritaria de

flavonoides, compuestos fenólicos y resinas. Asimismo, determinó el contenido de fenoles totales, resultando 157.1 mg ácido gálico/g de extracto; y el contenido de flavonoides totales, 77.3 mg quercetina dihidratada/g de extracto. Evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto frente a cepas estándar de *Staphylococcus aureus*, a través del método turbidimétrico logrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 25 mg/mL; mientras que, por el método de pozo excavado con agar Muller Hinton, obtuvo como dosis efectivas desde 25 mg/mL hasta 1250 mg/mL. Por otro lado, identificó y cuantificó las estructuras principales de los flavonoides presentes mediante espectroscopía HPLC-UV/Vis, consiguiendo espectros con señales a 320 nm, y porcentajes de área de los flavonoides abundantes entre 23.89 % y 13.26 %.

1.4.2 Género Stachys

El género *Stachys* pertenece a la familia Lamiaceae y contiene 536 especies [4], siendo considerado uno de los géneros más extensos [5]. Se encuentra distribuida en regiones de climas templados y tropicales, ubicándose en la mayoría de los continentes a excepción de Australia y Nueva Zelanda [9]. Tradicionalmente, el género *Stachys* se lo conoce como “hierba de la herida” [10] y es utilizado para múltiples afecciones: inflamaciones de la piel, trastornos estomacales, estrés, tumores genitales [4], tos, úlceras [10], fiebre, resfriado común, gripe, trastornos menstruales, mareos, calambres, heridas, infección [6], inhibir el desarrollo de tumores genitales y úlceras cancerosas, disminuir los dolores de oído y síntomas de asma [9]. Según los estudios quimiotaxonómicos, se caracterizan por presentar los siguientes metabolitos: iridoides, polifenoles, flavonoides, taninos, ácidos fenólicos, glucósidos de feniletanoide, diterpenos, saponinas triterpénicas [10,11], fitoesteroles, fenilpropanoides, glucósidos, Acetofenonas, ácidos grasos, alcaloides, triterpenos, lignanos y polisacáridos [12]. Asimismo, se han obtenido aceites esenciales de diversas especies [10,11]. En la Tabla 1 se registraron los diferentes metabolitos encontrados y actividades evaluadas de diferentes especies del género *Stachys*, con el objetivo de poder identificar compuestos y comportamientos en común.

Napolitano *y col.* [4] trabajaron con el extracto metanólico de las partes aéreas de la especie *Stachys spreitzenhoferi* Heldr. perteneciente a la isla de Kythira en Grecia. Mediante los estudios por cromatografía líquida acoplado con ionización por electropulverización y espectrometría de masas de alta resolución [LC-(-)ESI/HRMS^n], encontraron 36 compuestos: flavonoides, glucósidos de feniletanoide, iridoides, derivados del ácido quínico, glucósidos de alcoholes alifáticos y oligosacáridos, entre otros. Evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos frente a las cepas Grampositivas y negativas, presentando únicamente actividad en las primeras, correspondientes a *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Evaluaron la actividad antioxidante *in vitro*, observando una disminución de los radicales DPPH ·, y la actividad antiproliferativa contra la leucemia mieloide aguda provocando el 50% de la muerte celular a una concentración de 0.75 mg/mL. Adicionalmente, los autores mencionan que en las especies *S. candida, S. chrysantha* y *S. iva* presentan metabolitos en común: flavonoides, glucósidos de feniletanoide, derivados fenólicos e iridoides, entre otros. Mientras que, a las especies *Stachys anisochila Vis. & Pancic, S. beckeana Dorfler & Hayek, S. plumosa Griseb*. *y S. alpina L. ssp. dinarica* demostraron una alta actividad anti-DPPH ·.

Bursal *y col.* [5] trabajaron con los extractos metanólico y acuoso de la especie *Stachys annua*, de la cual identificaron los compuestos fenólicos por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), y evaluaron su contenido de fenoles y flavonoides totales, actividades anticolinérgicas, antidiabéticas y antioxidantes. Detectaron 90.83 mg AGE/g extracto para fenoles, y 39.05 mg QE/g extracto para flavonoides, indicando que la planta posee una mayoría de estos compuestos, los cuales manifestarían una alta capacidad antioxidante. Se identificaron como componentes principales en el extracto metanólico, a la quercetagetina-3,6-dimetiléter, ácido clorogénico y ácido fumárico; mientras que, para el extracto acuoso, el ácido fumárico, la apigenina y el ácido clorogénico. Por métodos de eliminación de radicales, determinaron que ambos extractos manifestaron una alta capacidad antioxidante comparada con los estándares.

Sarikurkcu *y col.* [9] investigaron a las especies *Stachys byzantina* y *S. iberica subsp. iberica var. densipilosa*, de las cuales determinaron sus contenidos fenólicos por HPLC donde encontraron que había una ligera cantidad superior de fenoles, flavonoles y saponinas en la segunda especie que en la primera. Obtuvieron extractos con acetato de etilo, metanol y agua de *S. byzantina*, hallando una cantidad significativa de flavonoides, donde el extracto metanólico fue el que presentó un mayor valor de 47.70 mg RE/g extracto. De manera similar, la segunda especie presentó un contenido de 39.24 mg RE/g extracto en el extracto metanólico, también siendo el de cantidad superior. En cuestión a los compuestos fenólicos totales, para ambas especies se encontró que el extracto acuoso era el que presentaba un mayor número, donde la segunda presentó 55.86 mg AGE/g extracto, y la primera, 53.55 mg AGE/g extracto. A pesar de que *S. iberica subsp. iberica var. densipilosa* manifestó una mayor cantidad de fenoles, flavonoles y saponinas que *S. byzantina*, no exhibió una alta actividad antioxidante que se esperaba. Esta última fue la que demostró una actividad antioxidante superior.

Mantovska *y col.* [10] estudiaron la especie *Stachys thracica Davidov*. Encontraron que trabajar en condiciones asépticas (cultivadas *in vitro*), disminuyó de forma significativa la cantidad de fenoles y flavonoides totales y, consecuentemente, el potencial antioxidante y antiinflamatorio. Por otra parte, el cálculo, para las de cultivo *in situ*, del contenido de fenoles totales resultó ser el de mayor valor dando 171 µg AGE/mg extracto; pero para flavonoides se encontró que las de cultivo *ex vitro*, el mayor contenido fue de 41.7 µg QE/mg extracto. Los autores también mencionan, según otras investigaciones, que las especies *Stachys sp., S. affinis* y *S. mucronate* presentaron una alta actividad antioxidante debido a su alto contenido de polifenoles; mientras que *S. inflata, S. chrysantha, S. candida, S. athorecalix, S. beckeana, S. anisochila, S. plumose, S. alpina, S. germanica, S. officinalis, S. recta*, y *S. schtschegleevii* manifestaron tener actividad antiinflamatoria gracias a la presencia de iridoides y glucósidos feniletanoides.

Bouasla *y col.* [6] reportaron que las hojas de la especie *Stachys marrubiifolia Viv.* presentaba, mediante ensayos cualitativos, fenoles, flavonoides, taninos gálicos, taninos catequínicos, antocianinas, mucílagos, esteroles y terpenos; mientras que todos los

extractos preparados (crudo, acetato de etilo y n-butanol) demostraron una alta actividad antioxidante. En cuestión a los fenoles totales, se determinó un contenido de 0.47 mg AGE/ g extracto para el extracto de butanol, y 2.64 mg AGE/g extracto para el de acetato; mientras que, para flavonoides totales, se encontró 0.61 mg QE/g extracto, y 0.80 mg QE/g extracto respectivamente.

Sadeghi *y col.* [12] estudiaron a la especie *Stachys pilifera* Benth, cuyos compuestos que se hallaron comprenden a compuestos fenólicos, monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, alcaloides y terpenoides, los cuales manifiestan actividades antioxidantes, nefroprotectoras, antiinflamatorias, antimicrobianas, hepatoprotectoras y anticancerígenas. Los autores señalan que el extracto butanólico ha exhibido una leve actividad antimicrobiana contra *Bacillus pumilus , Escherichia coli, Kocuria varians, Listeria monocytogenes, Salmonella typhi, Aspergillus niger, Aspergillus flavus* y *Candida glabrata*; mientras que el extracto metanólico dio resultados débiles frente a bacterias gran positivas y negativas, *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis y Bacillus subtilis* (gram positivas),y *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* (gram negativas). Por otra parte, se determinó el contenido total de fenoles resultando 25 mg AGE/g extracto.

Bahadori *y col.* [13] investigaron tres especies, *Stachys byzantina, Stachys inflata y Stachys lavandulifolia*, de las cuales se identificaron el perfil de fenoles por RP-HPLC-DAD, y evaluaron su actividad antioxidante integral. Hallaron 14 compuestos fenólicos, pero como principales componentes fueron el ácido clorogénico y ácido rosmarínico. Todas exhibieron un fuerte poder reductor en CUPRAC y ensayos FRAP (métodos de capacidad reductora); mientras que solo *S. inflata* manifestó un alto potencial de eliminación de radicales DPPH· (141.39 mg TE/g decocción). Reportaron que, para fenoles totales, S*. byzantina, S. inflata* y *S. lavandulifolia* se obtuvieron 58.06, 52.16 y 52.21 mg AGE/g decocción respectivamente; y para flavonoides totales, se consiguieron 34.70, 26.70, y 30.22 mg ER/g decocción.

Paun *y col.* [14] analizaron a la especie *Stachys officinalis*, de la cual identificaron los componentes de mayor cantidad como los ácidos fenólicos y flavonoides, que permitieron manifestar una alta capacidad antioxidante; mientras que otros metabolitos que la constituyen son alcaloides y saponinas. Asimismo, evaluaron y confirmaron la capacidad antiinflamatoria promovida por la presencia de los compuestos ácido ursólico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, quercetina y genistina.

Tundis *y col.* [11] revelaron que obtuvieron extractos de hexano, diclorometano, metanol (sin y con soxhlet) y etanol 70% de la especie *Stachys lavandulifolia Vahl*, la cual contenía iridoides, acteósido de glicósido feniletanoide y la hidroquinona arbutina glucósido. El contenido de fenoles totales mayoritario se halló en el extracto de metanol por soxhlet, 50.8 mg ácido clorogénico/g muestra; mientras que el contenido de flavonoides totales mayoritario también resultó ser el del extracto metanólico por soxhlet, 10.4 mg QE/g muestra. Por otro lado, las propiedades antioxidantes fueron investigadas por cuatro métodos *in vitro* (DPPH·, ABTS, FRAP y pruebas de blanqueo de β-caroteno), donde los extractos más polares se caracterizaron por manifestar una mejor actividad de captación de radicales.

Stegăruș *y col.* [15] investigaron el contenido de polifenoles totales, actividad antibacteriana y actividad antioxidante de tres especies *S. byzantina, S. officinalis* y *S. sylvatica*. Estas presentaron 222, 232 y 197 mg AGE/g extracto respectivamente, siendo la segunda especie la que presentó mayor contenido fenólico total; mientras que, los tres extractos de *Stachys* manifestaron una actividad antioxidante significativa y una actividad antibacteriana contra microorganismos Grampositivos, donde particularmente las especies *S. byzantina* y *S. sylvatica* exhibieron frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Proteus mirabilis*.

Gerçek *y col.* [16] estudiaron la especie *Stachys rizeensis R.Bhattacharjee*, de la cual realizaron un perfil fenólico mediante LC-MS/MS obteniendo 32 compuestos diferentes. Se obtuvieron extractos de metanol, agua, etanol, acetato de etilo y hexano, y determinaron su contenido de fenoles y flavonoides totales, resultando: 62.04, 9.43,

2.23, 0.27, y 0.27 mg AGE/g extracto y 4.60, 3.19, 2.25, 4.43, 0.02 mg QE/g extracto respectivamente. También evaluaron la actividad antioxidante utilizando los métodos DPPH· y CUPRAC, hallando que el extracto con mayor capacidad antioxidante fue el de metanol.

Pritsas *y col.* [17] realizaron el perfil fitoquímico de *S. iva Griseb* a partir de extractos (ciclohexano, diclorometano, metanol y metanol:agua 5:1), de la decocción e infusión tradicional, bajo la aplicación de espectroscopía RMN, el cual lo utilizaron como una guía para el proceso de aislamiento. Los metabolitos objetivos fueron iridoides y compuestos polifenólicos, de manera que obtenían espectros de RMN de los extractos crudos para tener un análisis rápido de lo que iban aislando. Así, seleccionaban los extractos y fracciones con los que continuarían trabajando por CC y CCD. Consiguieron diecisiete compuestos conocidos: siete iridoides, cinco flavonoides, un flavonoide acilado, tres glucósidos feniletanoides y un ácido fenólico. Entre ellos encontraron el metabolito de interés, la estaquisetina, la cual fue sometida a pruebas de actividad antidiabéticas dando resultaos positivos.

Afouxenidi *y col.* [18] trabajaron con las partes aéreas de *Stachys tetragona Boiss. & Heldr. ex-Boiss*, de la cual obtuvieron extractos de diclorometano y metanol aislando espectroscópicamente por RMN dieciséis metabolitos secundarios: tres flavonoides, un ácido fenólico, seis glucósidos feniletanoides, un neolignan, dos iridoides, un ácido triterpénico y dos esteroles. Para la identificación estructural compararon los espectros de RMN 1D y 2D con los de otras especies.

Di Stasi *y col.* [19] lograron el aislamiento de veintitrés metabolitos de *Stachys sylvatica* obtenidos de los extractos de cloroformo, cloroformo-metanol (9:1) y metanol. A través de espectroscopía de RMN 1D y 2D y espectrometría de masas identificaron seis derivados fenólicos simples, seis fenilpropanoides glicosilados, cuatro flavonoides, tres iononas y un derivado fenólico. La separación de los extractos fue realizada por cromatografía líquida de rendimiento ultra alto acoplada a un espectrómetro de masas con fuente de ionización por electropulverización (UHPLC-ESI-HR- MS).

Michailidou *y col.* [20], estudiaron la *especie Stachys candida Bory & Chaubard* aislando nueve flavonas, un glucósido feniletanoide y un ácido fenólico del extracto metanólico. Destacaron que esta especie no presentaba iridoides.

Tabla 1. Relación de los metabolitos secundarios aislados y la bioactividad evaluada según la especie de *Stachys* y la literatura encontrada

Fuente: Elaboración propia

Referencia	**Especie**	**Identificación del metabolito secundario**		**Bioactividades**
Napolitano *y col.* [4]	*Stachys spreitzenhoferi*	flavonoide	4′- O -methylisoscutellarein diglucósido 4′- O -metilisoscutellareínamonoaceotildiglucósido/crisoeriol monoaceoetildiglucósido 4′- O -metilisoscutellareína monoaceoetildiglucósido/ crisoeriol monoaceoetildiglucósido, Dimetoxiflavonaglucósido, Trimetoxiflavonaglucósido Estaquisetina, Apigeninacumaroilglucósido Naringenina(cumaroilglucósido), 4′- O -Metilisoscutellare n/Crisoeriol, Dicumaroilglucósido de apigenina, Trimetoxiflavona, Tetrametoxiflavona	Antimicrobiana Antioxidante Antiproliferativa
		Glucósido feniletanoide	Dihidroxifeniletanol hexosildesoxihexósido Dihidroxifenil-hidroxietanol(caffeoil)hexosil-desoxihexósido Dihidroxifeniletanol(caffeoil)hexosildesoxihexosil-pentósido Dihidroxifeniletanol(caffeoil)hexosildesoxihexósido Dihidroxifeniletanol(caffeoil)hexosildesoxihexosil-pentósido	
		Iridoides	Melitósido, Gardósido, Harpagida, Ácido geniposídico, Ácido 8-epilogánico, Ácido 10-desaceoetilasperulosídico Ácido 7- O -Aceoetil-8-epilogánico	

		Derivados del ácido quínico	Ácido 3-cafeoilquínico, Cafeoilhexosadesoxihexósido Ácido 5-cafeoilquínico, Ácido 4-cafeoilquínico	
		Glucósido de alcohol alifático	Octenol-(dihexosil)hexóxido, Octenol-(hexosil)hexósido	
		Oligosa-cárido	Tetrasacárido	
Bursal *y col.* [5]	*Stachys annua*	Quercitrina, ácido gálico, epigalocatequina, epicatequina, Cianidina-3-O-Glu, Cloruro de cianidina, catequina, Ácido ascórbico, apigenina, ácido cafeico, Ácido clorogénico, ácido elágico, Kaempferol, salvigenina, Ácido fumárico, pirogalol, ácido t-ferúlico, luteolina, isorhamnetina, Quercetagetin-3,6-dimetiléter, ácido rosmarínico, Luteolin-7-O-glucósido, Luteolin-5-O-glucósido, Kaempferol-3-O-Rutinósido, Rutina		Antioxidante Inhibición de enzimas
Sarikurkcu *y col.* [9]	*Stachys byzantina y S. iberica* subsp. variedad ibérica densipilosa	Compo-nentes fenólicos	ácido protocatequiico, (+)-catequina, ácido p-hidroxibenzoico, Ácido clorogénico, ácido cafeico, (-)-Epicatequina, Ácido ferúlico, Ácido benzoico, Rutina, ácido rosmarínico, apigenina	Antioxidante Inhibidoras de enzimas
Mantovska *y col.* [10]	*Stachys thracica* Davidov	Ácidos orgánicos	Ácido acético, Ácido láctico, Ácido succínico, Ácido fórmico, Ácido málico	Antioxidante Antiinflama-toria
		Ácidos fenólicos	Ácido clorogénico	
		Glucósidos feniletanoi-des	Verbascoside, Leucoseptósido A	
		Alcaloides	Trigonelina	
Bouasla *y col.* [6]	*Stachys marrubiifolia* Viv.	fenoles, flavonoides, taninos gálicos, taninos catequínicos, antocianinas, mucílagos, esteroles y terpenos		Antioxidante
Sadeghi *y col.* [12]	*Stachys pilifera* Benth	Hexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-ol, 3,7,11,16-tetrametil; timol, ácido linolénico, acetato de mirtenilo, alfa-curcumeno, Óxido de		Antibacterial

			cariofileno, Beta-cariofileno, espatulenol, 1,8-cineol; limoneno, Crisantenol, Beta-cariofileno, Cis-crisantenol, acetato de cis-crisantenilo, Linalol, Terpinen-4-ol, Trans-verbenol, viridiflorol, Trans-cariofileno	Antioxidante Antitumoral Antiinflama-toria Efecto hepatoprot-ector y nefroprotec-tor
Bahadori *y col.* [13]	*Stachys byzantina, Stachys inflata y Stachys lavandulifolia*	Flavonoi-des	(+)-catequina, Luteolina, Kaempferol, Apigenina	Antioxidantes Inhibidora de enzimas
		Ácidos fenólicos	Ácido gálico, Ácido protocatequiico, Ácido p -hidroxibenzoico, Ácido clorogénico, Ácido cafeico Ácido siríngico, p -ácido cumárico, Ácido ferúlico, o -ácido cumárico, Ácido rosmarínico	
Paun *y col.* [14]	*Stachys officinalis*	Compues-tos polifenóli-cos	ácido ursólico, Ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, umbeliferona, quercetina, luteolina, apigenina,Rutina, ácido elágico, quercetina 3-β-D-glucósido (Isoquercitrina)	Antiinflama-torio Antioxidante
		Antociani-na y antociani-dina	Peonidina 3-O-glucosida, Malvidín, Cianidina, Genistina	
Tundis *y col.* [11]	*Stachys lavandulifolia* Vahl	Monoter-penos	α-pineno, β-pineno, β-mirceno, β-felandreno, (Z)-β-ocimeno, (E)-β-ocimeno, Carvacrol	Antioxidante
		Sesquiter-penos	trans-cariofileno,α-humuleno, Germacreno, γ-cadineno, δ-cadineno, Espatulenol	
		Diterpeno	Neofitadieno, 8,13-epoxi-15,16-dinorlab-12-eno. trans-Phytol, Óxido de manoilo	
		Ácidos grasos	Palmitato de metilo, Ácido palmítico, Linoleato de metilo, Linolenato de metilo, Ácido linoleico	
		Esteroles	Campesterol, Estigmasta-5,22-dien-3-ol, β-sitosterol	
		Triterpeno	β-amirina, α-amirina	
Stegăruș *y col.* [15]	*S. byzantina, S. officinalis , S. sylvatica*	Ácidos grasos y compues-	docosano, ácido hexadecanoico, ácido tetradecanoico, Tricosano, Hexadecan-1-ol, 1-hexanol, ácido decanoico, octano, 5-Amino-1-etilprazol, alilbenceno,	Antibacteria-na Antioxidante

		tos derivados	Ninal, 2-tujeno, canfeno, limoneno, α-terpineno, B-mirceno, B-pineno, lavandulol, Linalol, acetato de linalool, Nerol, nerolidol, Óxido de cariofileno, Germacreno D, α-copaeno, α-humuleno, β-bourboneno, β-cariofileno, β-copaeno, β-cubeneno, β-farneseno, β-gurjuneno	
Gerçek *y col.* [16]	*Stachys rizeensis* R. Bhattacharjee	Compues-tos fenólicos	ácido 2,5-dihidroxibenzoico; ácido 2-hidroxitranscinámico; apigenina; ácido cafeico; ácido clorogénico; ácido elágico; epicatequina; galato de etilo; ácido gálico; ácido gibarélico; ácido indol-3-aceoetil; isorhamnetina; ácido jasmónico; kaempferol; lutoleína; miricetina; naringina; oleuropeína; ácido p-cumárico; florizina; galato de propilo; ácido protocatequiico; quercetina; resveratrol; rutina; ácido salicílico; ácido sinápico; ácido siríngico; ácido transferrúlico; verbascoside	Antioxidante
Pritsas *y col.* [17]	*Stachys iva*. Griseb	Iridoides	Harpágida, 8-aceoetil-harpagida, ácido 8-epilogánico, 8-epi-loganina, gardosida, monomelitosido, melitosido	Actividad antidiabética
		Flavonoi-des	Apigenina, isoscutellarein-7-O-[6''-O-aceoetil- β -D-alopiranosil-(1→2)]- β -D-glucopiranósido; 4'-metilisoscutellarein-7-O-[6''-O-aceoetil- β -D-alopiranosil-(1→2)]- β -D-glucopiranósido; isoscutellarein-7-O-[6''-O-aceoetil- β -D-alopiranosil-(1→2)]-6''-O-aceoetil- β -D-glucopiranósido; 4'-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-aceoetil-β-D-alopiranosil-(1→2)]- β -D-glucopiranósido	
		Flavonoid e acilado	diapigenin-7-O-(6''-trans,6''-cis-p,p'-dihidroxi-l-truxinil)glucósido (estaquisetina)	
		Glucósido fenileta-noide	Acteosido, eucosceptósido A, lavandulifoliosido	
		Ácido fenólico	Ácido clorogénico	
Afouxenidi *y col.* [18]	*Stachys tetragona* Boiss. & Heldr. ex-Boiss	Flavonoi-des	isoscutellareína 7-O-(6‴-O-aceoetil-β-D-alopiranosil (1 → 2)-β-D-glucopiranósido); isoscutellareína-7-O-(6‴-O-aceoetil-β-D-alopiranosil (1 → 2)-6″-O-aceoetil β-D-glucopiranósido); kaempferol	-

		Ácido fenólico	E -ácido cafeico	
		Glucósido fenileta-noide	Acteosido, leucosceptósido A, forsitosidi B, estaquisósido D, lamioflomisida A, betoniósido F	
		Neoligna-no	(7S,8R)-urolignósido	
		Ácido triterpéni-co	Ácido oleanólico	
		Esteroles	β -sitosterol y estigmasterol	
Di Stasi *y col.* [19]	*Stachys sylvatica*	Derivados fenólicos	ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p -cumárico éster metílico, ácido niduloico, hidroxitirosol, tirosol	
		alcohol alifático glicosila-do	Ebracteatosido B	
		Fenilpro-panoides glicosila-dos	lavandulifoliosido, betaniósido F, verbascósido, isoactósido, cistanósido D	
		flavonoide	estaquispinósido, crisoeriol 7-O-β-D-glucopiranósido, naringenina 7-O-(6''-E+ Z-p-cumaroil)-β-D-glucopiranósido, apigenina 7-O-(6''-E+ Z-p-cumaroil)- β - D -glucopiranósido	
		lignanos	syringaresinol 4'-O-β-D-glucopiranósido, pinoresinol 4-O-β-D-glucopiranósido, 2-episesaminol 2-O-β-D-glucopiranósido	
		iononas	loliolida, vomifoliol, (3S, 5R, 6 R, 7E, 9R)-3,5,6,9-tetrahidroxi-7-megastigmeno	
		derivado fenólico	cafeato de etilo	
Michailidou *y col.* [20]	*S. candida silvestre*	flavonas	Calicopterina, apigenina 7-O-β-D-glucopiranósido, crisoeriol, crisoeriol 7-O-β-D-glucopiranósido, crisoeriol 7-O-β-D-(3''-E- p -cumaroil)-glucopiranósido, isoscutellareína 7-O- [6‴-O-aceoetil-β-D-alopiranosil-(1 → 2)]-β-D-glucopiranósido, isoscutellareína 7-O- [6‴-	-

		O-aceoetilo-β-D-alopiranosil-(1 → 2)]-6''-O-aceoetil-β-D-glucopiranósido, 4′-metil-isoscutellareína 7-O-[6‴-O-aceoetil-β-D-alopiranosil-(1 → 2)]-β-D-glucopiranósido, 4′- O -metil-hipolaetina 7- O-[6‴-O-aceoetil-β-D-alopiranosil-(1 → 2)]-β-D-glucopiranósido
	glucósido fenileta-noide	Acteosido
	ácido fenólico	ácido clorogénico

Capítulo II: Marco teórico

2.1 Estudio fitoquímico

El análisis fitoquímico tiene por objetivo la obtención y caracterización de los metabolitos secundarios de una planta o fuente natural; consta de diferentes etapas: extracción de los compuestos de una muestra, separación y aislamiento, purificación, identificación y caracterización de los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas [21]. Una vez elucidadas las estructuras químicas; si se desconoce su actividad biológica, se la evalúa para luego estudiar la relación experimental estructura-actividad para identificar qué sección o grupo funcional es la encargada de manifestar el comportamiento observado [22]. Los metabolitos secundarios son componentes que se obtienen en el extracto de las plantas y se encargan de participar en el proceso de comunicación que experimenta la planta con el ambiente [23]. Estos se clasifican según su origen biosintético, características de la estructura química, y la solubilidad que manifiestan en diversos solventes [21].

Por lo tanto, se puede realizar un análisis cualitativo de las clases de los metabolitos para determinar su presencia en el extracto de un producto natural, mediante la reacción con diversos reactivos y la manifestación de colores y/o precipitados: Reactivo de Liebermann-Burchard, Salkowski, Borntrager, Shinoda, Rosemheim, Dragendorff, reacción con cloruro férrico, acetato de plomo, formaldehído, NaOH, entre otros [24,25]. También existen análisis cuantitativos mediante una técnica colorimétrica usando el espectrofotómetro UV-Vis; de manera que se determina la cuantificación de los metabolitos aplicando diversas metodologías. Por ejemplo, para la determinación de fenoles totales se emplea el ensayo de Folin-Ciocalteau midiendo la absorbancia a 760 nm de la muestra, elaborando previamente una curva de calibración con ácido gálico como estándar; para flavonoides totales, se utiliza el mismo ensayo, pero se mide a 415 nm y la quercetina es el patrón interno [25]; para las antocianinas totales se emplea el método de diferencial de pH utilizando buffers de pH 1 y pH 4.5 y midiendo a 520 y 700 nm [26]; para las saponinas totales, se mide a 540 nm teniendo que realizar unas reacciones con vainillina, ácido acético glacial y ácido perclórico [27]; entre otras.

En la actualidad, aún hay interés en obtener metabolitos aislados por sus potenciales bioactividades [28,29] y/o características que les permitirían usarse en nuevos productos

o reemplazar los compuestos actuales. Por ejemplo, hay una variedad de metabolitos con actividad antibacteriana que podrían manifestar una mayor efectividad frente a los patógenos con resistencia bacteriana [28]; otros podrían ser utilizados como biocolorantes evitando impactar ambientalmente [30]; bioactivos anticancerígenos y antiparasitarios como nuevos fármacos optimizando la administración adaptándose a condiciones no especializadas y facilitando el acceso a los habitantes de bajo recursos o de zonas lejanas [31]; etc.

Para lograr el aislamiento de los metabolitos a partir de los extractos, se aplican técnicas clásicas [32] como la cromatografía en columna y cromatografía en capa delgada [28,29,33]; o equipos más sofisticados y automatizados como el LC [32], HPLC, UHLPC, GC [34]. Con estos sistemas también es posible la cuantificación y/o la elucidación de los metabolitos mediante su acoplamiento con un detector: por UPLC-MS/MS [35], GC/MS [29], LC-NMR, LC-MS [32], entre otros. Finalmente, para determinar la estructura molecular de los compuestos aislados se requiere del empleo de técnicas espectroscópicas y espectrofotométricas (ver Tabla 2): el FTIR [30] permite la identificación de grupos funcionales; el UV-VIS, de aquellos que tengan grupos cromóforos; MS/HRMS, la masa total de la molécula; y NMR mono y bidimensional, con el que se relacionan de diferentes formas los espines nucleares de los átomos de hidrógeno y carbono (también flúor, nitrógeno, fósforo, etc.) según el entorno químico de un grupo funcional de la molécula [31,34]. Para el análisis por estos dispositivos, generalmente se debe incorporar el metabolito purificado, con la menor cantidad de impurezas, que permita detectar sus propias señales (ver Figura 1).

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de algunas técnicas de elucidación estructural de metabolitos, adaptada de Zhuo y col. [34]

Técnicas	Ventajas	Limitaciones
Espectro-metría de masas	• Información estructural de metabolitos •Se consigue una alta precisión de la masa según el análisis HRMS •Procesamiento de los datos mediante software •Se puede realizar análisis cuantitativo mediante la comparación con estándares de metabolitos •Alta sensibilidad y especificidad	•Disponibilidad de los estándares para el análisis cuantitativo •Usualmente, es utilizada como única fuente de elucidación estructural, generando ambigüedad •Afectada por la matriz

Detección por UV	•Localiza moléculas con cromóforos •Posible semicuantificación •Alta sensibilidad	•No se puede cuantificar totalmente •Aparición de interferencias por sensibilidad a los rayos UV
Espectroscopía de RMN	•Elucidación definitiva de la estructura •Apto para metabolitos isoméricos	•Se requiere del aislamiento y purificación de los metabolitos •Necesita de una cantidad aceptable del metabolito para su análisis de RMN 2D •Consume demasiado tiempo y recursos

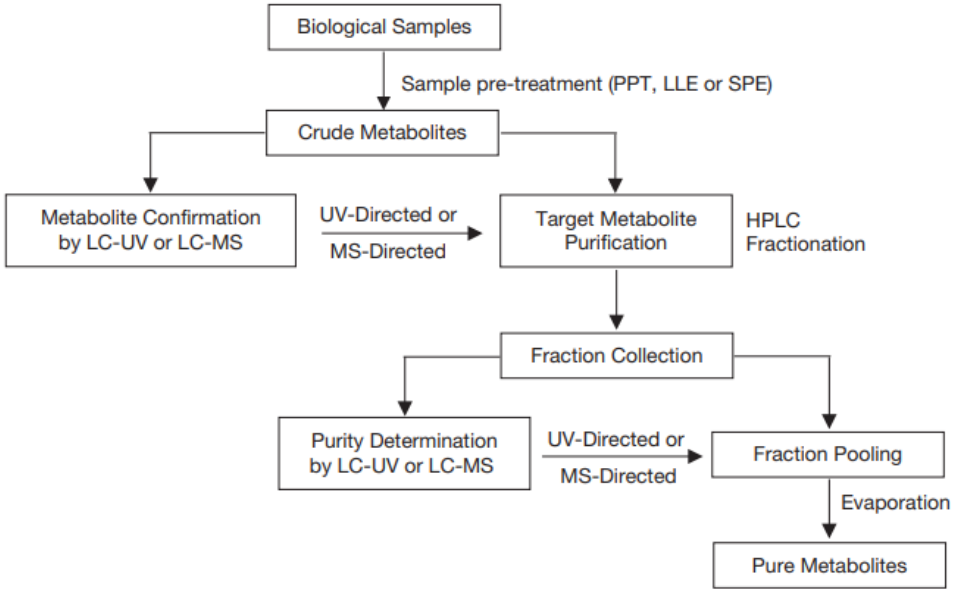


Figura 1. Metodología general como alternativa para la purificación de metabolitos, tomada de Zhuo y col. [34]

2.2 Métodos cromatográficos

La cromatografía es un método de separación de analitos, lo cual permite su identificación y elucidación de estos mediante su aislamiento. El sistema se integra por una columna cromatográfica, que tiene en su interior una fase estacionaria, por la cual pasa la muestra mezclada en una fase móvil (líquida o gaseosa). El comportamiento consiste en la retención, por afinidad e interacción, de los componentes a la fase estacionaria, por la que se desplazarán lentamente permitiendo su separación; mientras que aquellos que presenten una afinidad débil, se desplazarán con mayor rapidez [36].

2.2.1 Cromatografía de exclusión molecular

El principio se fundamenta (ver Figura 2) en la separación de los compuestos según el tamaño molecular, utilizando una fase estacionaria porosa de una dimensión particular de poro permitiendo el desplazamiento selectivo; los que tengan un tamaño igual o inferior al poro, podrán ser retenidas más tiempo que las demás de mayor peso molecular, que pasarán rápidamente [37,38].

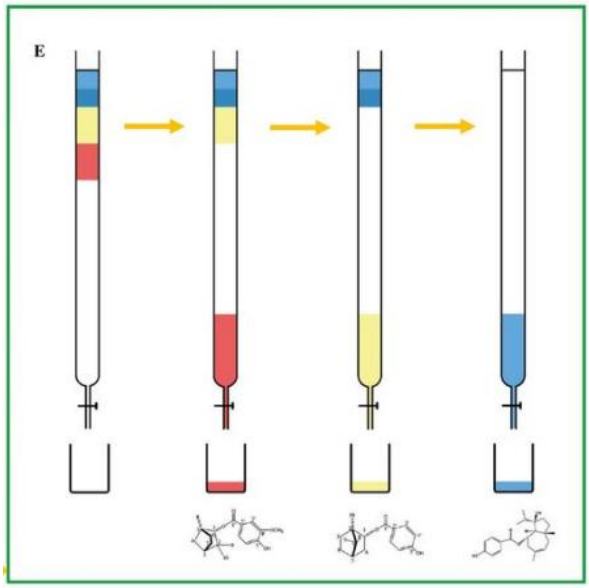


Figura 2. Ejemplo del proceso que ocurre en una columna de cromatografía
Fuente: Figura adaptada de Zare y col. [39]

2.2.2 Cromatografía en capa delgada

Es un método rápido y de bajo costo que permite la separación e identificación de compuestos según su factor de retención (ver Figura 3), visualización por UV de onda corta o larga, o su reacción con reveladores manifestando características diferenciales. Los analitos son desplazados a través de una placa recubierta por una fase estacionaria (sólida, por ejemplo, sílica gel) mediante la elución de una fase móvil (líquido puro o mezcla); según la polaridad y afinidad que presente con respecto a la fase estacionaria, el analito se desplazará a mayor o menor velocidad, quedándose distanciado de los demás compuestos. Este método facilita el análisis cualitativo realizando una selección preliminar de los compuestos de interés [40].

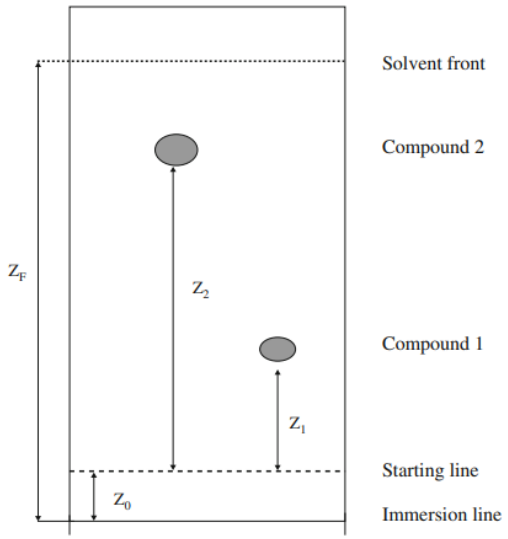


Figura 3. Distancias para considerar en el cálculo del R_f (factor de retención)
Fuente: Figura tomada de Spangenberg y col. [41]

2.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Es una técnica útil (ver Figura 4) para determinar la estructura de las moléculas a partir de la interpretación de los espectros mono (1D) y bidimensionales (2D), en los cuales se identifican las señales de los hidrógenos y carbonos, y sus acoplamientos, según los desplazamientos provocados por el entorno químico [42]. De los espectros de ^{1}H RMN se detectan los grupos funcionales, el tipo de hidrógeno, las integrales correspondientes a la cantidad de hidrógenos, y los tipos de hidrógenos vecinos; de manera que es posible recolectar una primera información básica sobre la estructura molecular. A partir de los espectros de ^{13}C RMN, cuyo rango de desplazamiento químico es mayor al de ^{1}H, se distinguen las señales de los carbonos que incluso no están enlazados con hidrógenos, así como los grupos funcionales. Por otra parte, de los espectros de RMN 2D se registran las relaciones y distancia entre enlaces ya sea de ^{1}H-^{1}H (COSY, NOESY, ROESY) o ^{1}H-^{13}C (HMQC, HMBC) permitiendo su ubicación y proximidad con otros grupos y átomos de la estructura [34], donde

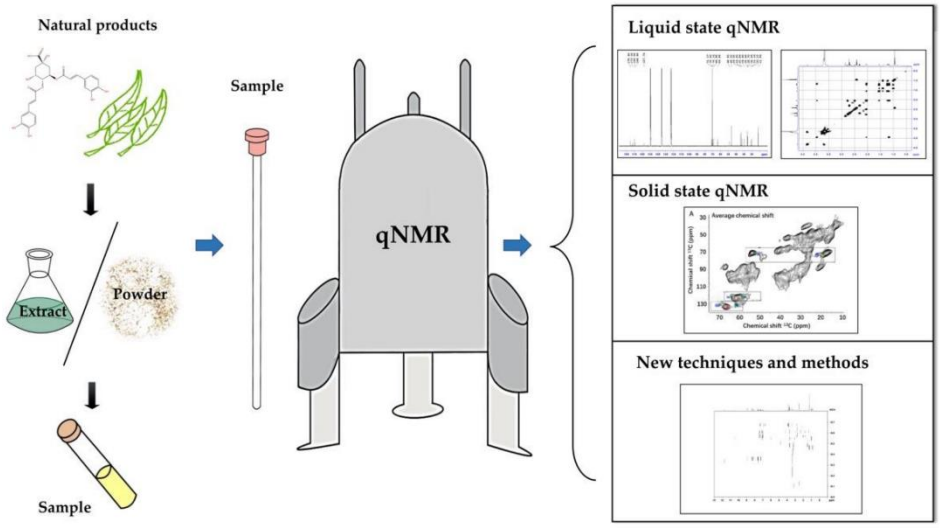


Figura 4. Esquema general sobre la técnica de RMN

Fuente: Figura tomada de Wang y col. [43]

2.4 Metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el género *Stachys*

2.4.1 Flavonoides

Se caracterizan por presentar una estructura base de dos anillos bencénicos (A y B) unidos por un puente de tres átomos que, generalmente, forman un tercer anillo heterociclo (C), cuyo grado de saturación [21,44], así como la ubicación de los grupos OH [45] permite la obtención de diversas estructuras (ver Figura 5). Se clasifican según las sustituciones introducidas en el anillo C. Manifiestan una amplia localización en toda la planta, siendo encontradas en la fruta, semillas, flores, hojas, entre otros [46]. Estos compuestos afines al agua, por su ubicación en las vacuolas celulares, cumplen la función de pigmentos dando coloración (rojo, azul, violeta, rosado, blanco, amarillo) a las flores o diferentes órganos de la planta (fruto, hoja y corteza) [21,47]. Se han reportado que cumplen actividades biológicas, como actividades antiinflamatorias, antioxidantes por sus propiedades quelantes de hierro y capacidad de capturar radicales libres, antimicrobianas, propiedades curativas de heridas, propiedades protectoras frente a diversos patógenos y actúan como agentes polinizadores [44,46]. Los flavonoides se encargan de incrementar la cicatrización de heridas ya que el oxígeno en su estructura aromática le otorga propiedades antimicrobianas, antioxidantes y astringentes [48].

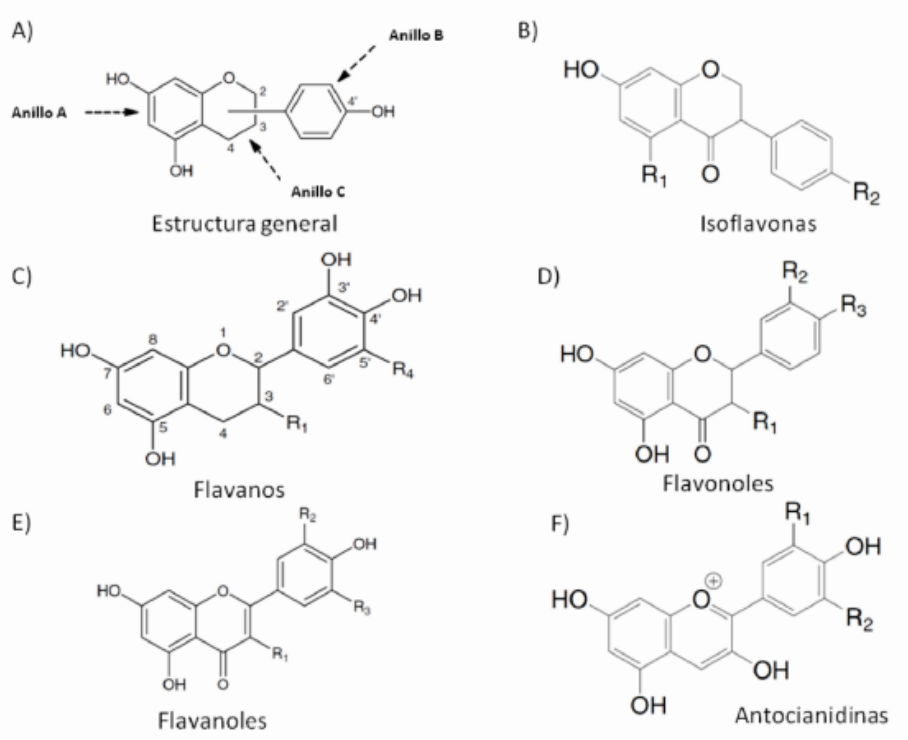


Figura 5. Estructura molecular de los flavonoides y sus derivados

Fuente: Figura tomada de Limon y col. [45]

2.4.2 Ácido clorogénico

Es uno de los metabolitos mayoritarios de las familias Asteraceae y Lamiaceae (ver Figura 6). Pertenece al grupo de los compuestos fenólicos y presenta una serie de bioactividades de gran ventaja; han manifestado actividades antioxidantes, cardioprotectoras, antiobesidad, anticancerígenas, neuroprotectoras [49], antidiabéticos [50], hepatoprotector, antipirético, antihipertensivo, antibacteriales [10] y antivirales [50]. Aislada de otras especies, como *Eucommia ulmoides*, ha presentado actividad antiinflamatoria, teniendo un efecto mayor al de la aspirina [51]. También es uno de los metabolitos mayoritarios considerado para evaluar la calidad del café, siendo parte de la conformación del color, aroma, amargor y astringencia [50].

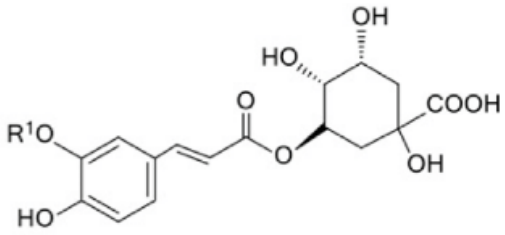


Figura 6. Estructura molecular del ácido clorogénico
Fuente: Figura tomada de Mantovska y col. [10]

2.4.3 Verbascósido (o acteósido)

Es un metabolito (ver Figura 7) que ha sido registrado en numerosas especies del género *Stachys*; corresponde a un glucósido feniletanoide [10] y su primera extracción reportada fue de la especie *Verbascum thapsus* L., adoptando el nombre de “acteósido” [52]. Ha manifestado una serie de actividades biológicas como antioxidante, antiinflamatoria, citotóxica, antimicrobiana, antitrombótica y cicatrizante [10]. Otros estudios han señalado su aplicación como antibacterial, bajo la forma de aditivo alimentario, para la prevención de contaminación bacteriana y preservación de carne fresca [53]. Actuando en sinergia con otras moléculas, reportaron que presentaba actividad citotóxica en las líneas de cáncer de próstata y cervical [54]. Asimismo, en la literatura se demuestra su actividad frente a diferentes líneas celulares de cáncer: cerebral, colorectal, pulmonar, de hígado, hematológico y de piel [55].

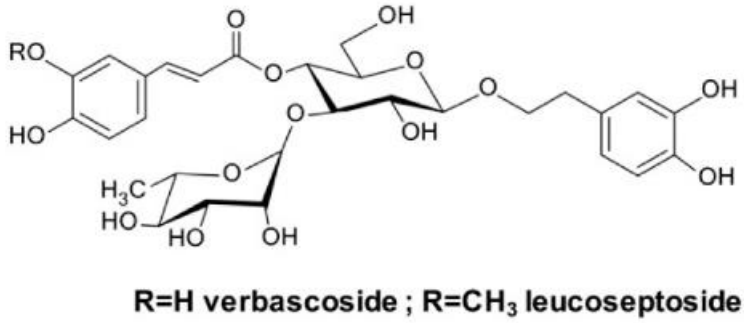


Figura 7. Estructura molecular del verbascósido, tomada de Mantovska y col. [10]

2.5 Crema a base de extractos naturales

La aplicación de extractos de fuentes naturales, así como metabolitos aislados de los mismos, en la industria cosmética le brinda al consumidor una impresión más natural, no peligrosa y sana del producto [56]. Entre los metabolitos de mayor interés, se encuentran los compuestos polifenólicos debido a sus propiedades antioxidantes [57], convirtiéndose en una mejor alternativa [58] sostenible y ecológica [59], frente a los componentes sintetizados que generalmente se utilizan [56].

2.6 Actividad antibacteriana

Se encuentran tres grupos de métodos para evaluar la actividad antibacteriana; estos son de difusión, dilución y ensayo de bioautografía, donde para el primero se ha sugerido aplicarlos ante compuestos polares y para el segundo, para compuestos tanto polares como no polares. Cada grupo está conformado por técnicas de discos, de pozos ya sea en agar (Kirby-Bauer), en caldo, en tubos; y corresponden a estudios *in vitro* [60]. El efecto antibacteriano se manifiesta según el tipo de fuente utilizada, la funcionalización, el aislamiento y ante qué clase de bacteria es evaluada.

Los fitoquímicos se convirtieron en una nueva fuente de obtención de compuestos antibacterianos, ubicándose dentro de la industria farmacológica y siendo considerados como una alternativa frente a la resistencia antibacteriana. De esta manera, entre los antibióticos, actualmente los de origen de productos naturales superan en número a los sintetizados [61]. Algunos de los metabolitos que exhibieron actividad antibacteriana fueron los taninos, alcaloides y flavonoides, siendo los polifenoles los más estacados [62]. Estos actúan deteriorando la membrana de la bacteria (nivel bacteriano) [62,63], de manera que impiden el metabolismo energético y la producción de toxinas, con las que reaccionan modificando su estructura y eficacia (nivel de toxina); por último, incrementan la resistencia de la célula diana (nivel de célula diana) [62]. El proceso de la actividad que exhiben los metabolitos es complejo, a comparación del método de acción de los fármacos convencionales, lo cual evita que las bacterias desarrollen resistencia [64]. Se ha demostrado que la efectividad antibacteriana de los metabolitos varía según numerosas variables: por ejemplo, los taninos se ven afectados por la concentración, método de extracción, pH, temperatura, clase de bacteria, y el tiempo de acción [62]. El

uso de estos nuevos bactericidas es ventajoso por su fácil acceso y la diversidad de bioactividades que un solo compuesto puede expresar [64].

2.7 Actividad antiparasitaria: Leishmaniasis

Un parásito es un organismo que se encuentra sobre o dentro de otro organismo huésped, del cual o a través de él consigue su alimento. Existen tres clases de parásitos que se encargan de enfermar a los humanos: protozoos, helmintos y ectoparásitos [65]. Entre los parásitos de interés por su búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas más eficaz y de menor costo, se encuentran los protozoos tripanosomátidos del género *Leishmania*, de los cuales existen diversas especies que producen la enfermedad leishmaniasis (visceral, mucocutánea y cutánea) [66]. Se ha encontrado que los flavonoides (chalcona, flavonoide glicosidado [67]) han sido uno de los fitoquímicos que exhibieron actividad, ya que puede interferir en una de las formas de transporte de la Leishmania [68]; asimismo existen reportes que confirman presentar actividad antiparasitaria [69]. Otros metabolitos como los alcaloides, quinonas, terpenos, diterpenos, entre otros, también han exhibido actividad leishmanicida [70]. Por lo tanto, los fitoquímicos se han convertido en una alternativa como potenciales antiparasitarios.

Capítulo III: Metodología

En la sección de Anexos se encuentran imágenes y diagramas que complementan los resultados hallados durante el desarrollo experimental.

3.1 Recolección, acondicionamiento de la muestra y obtención de extractos

Las muestras fueron recolectadas por un botánico en el mercado Ccascaparo de la ciudad de Cusco, durante el mes de julio de 2022, antes de su temporada de florecimiento. Fueron enviadas al Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Orgánica de la Facultad de Química e Ingeniería Química correspondiente a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en agosto, donde se colocaron para secarlo en una estufa a 40°C, hasta lograr un peso constante [71]. Un ejemplar completo se entregó al herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM para que le efectúen su identificación taxonómica.

Para la obtención de extractos, se utilizó la planta completa (raíces, tallos, hojas), que había sido previamente secada. Se consideró una proporción 1:5, donde por cada gramo de planta seca y molida, se utilizó alrededor de 5 mL- 6 mL del solvente a utilizar (etanol al 96% y hexano). La muestra se molió con ayuda de un molino manual y se tamizó en un tamiz N°20, consiguiendo una cantidad mayor de 700 g de muestra seca. Se obtuvo tres lotes de extractos diferentes. El primero fue exclusivamente empleando etanol al 96% y 80 g de muestra, la cual se maceró por ultrasonido por intervalos de 30 minutos; el segundo se consiguió macerando estáticamente [4,15] al resto de la muestra total (620 g aproximadamente) con hexano hasta decoloración completa; y el tercer lote, se adquirió continuando la extracción de la muestra, bajo la misma técnica, empleando etanol al 96% [6], hasta decoloración de los extractos [6]. Se contempló el uso total de alrededor de 3.5 L de hexano y 3.5 – 4L de etanol al 96 % para las tres extracciones.

3.2 Análisis fitoquímico de la especie *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet

3.2.1 Marcha fitoquímica

La marcha fitoquímica se desarrolló mediante una serie de ensayos que, a través de los extractos hidroalcohólicos y hexánicos obtenidos de la especie *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet, permitieron determinar cualitativamente los posibles metabolitos

secundarios mayoritarios. Por lo tanto, se efectuaron reacciones químicas [6] caracterizadas por la aparición de colores y/o precipitaciones para la identificación de los compuestos fitoquímicos: saponinas, triterpenoides y saponinas triterpenoidales, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, cumarinas, antraquinonas y quinonas, antocianinas. betalaínas, y alcaloides, según la literatura consultada [24,72,73].

3.2.2 Evaluación de fenoles totales del extracto crudo

Se determinó el contenido de fenoles totales utilizando el método de Folin-Ciocalteau y ácido gálico como estándar [74,75]. Para ello, se construyó una curva de calibración, donde el estándar y las muestras se dejaron reaccionar por una hora en oscuridad y a temperatura ambiente; luego se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro UV-Visible Genesys 10. El contenido de fenoles totales se expresó como mg AGE/mL extracto hidroalcohólico.

3.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto crudo

Para la evaluación de la actividad antioxidante se aplicó el método convencional de captación de radicales del DPPH· con la medición por UV-Vis a 516.60 nm [74,76]; para el cual se preparó una curva de calibración con trolox, como reactivo estándar.

3.3 Aislamiento (Extracción, Separación, Purificación) y elucidación de los metabolitos secundarios

Revisar la sección de Anexos para visualizar las figuras en detalle del desarrollo experimental.

Para estudiar los metabolitos que integran la planta, se decidió trabajar tanto con el extracto hexánico, como con el hidroalcohólico obtenido (ver Figura 9). El primero inició concentrándose por el rotavapor Buchi 100 (ver Figura 8). Durante el proceso de evaporación o por influencia de un descenso de temperatura [24,77] se fue observando presencia de partículas suspendidas o posibles cristales en las paredes. Entonces, para aislar los compuestos aparentemente diferentes, a los sólidos se realizaron pruebas de solubilidad con solventes de distinta polaridad (hexano, acetona, etanol), y se iba registrando su comportamiento. En caso hubiera algún precipitado, se filtraba y se

repetían las pruebas tanto del sólido como del líquido filtrado. De esta forma, se fue separando los metabolitos a través de la evaporación, filtración, adición de solventes, entre otros (ver Figura 10).

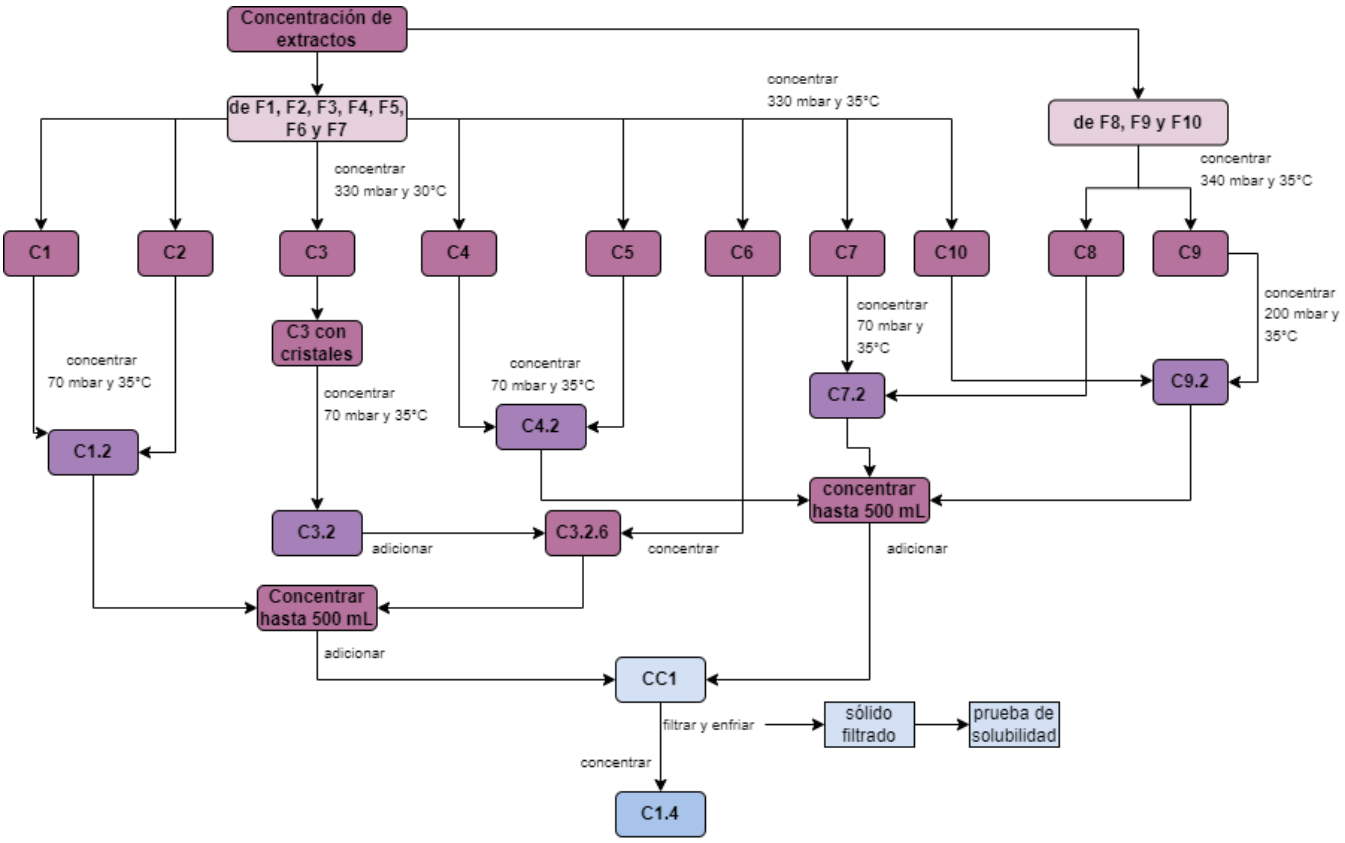


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de extracción con hexano

Fuente: Elaboración propia

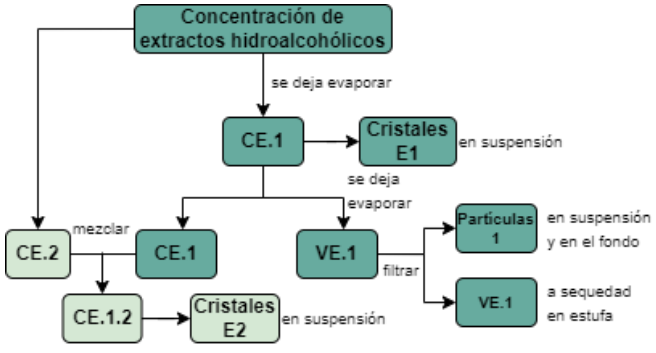


Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de extracción con etanol

Fuente: Elaboración propia

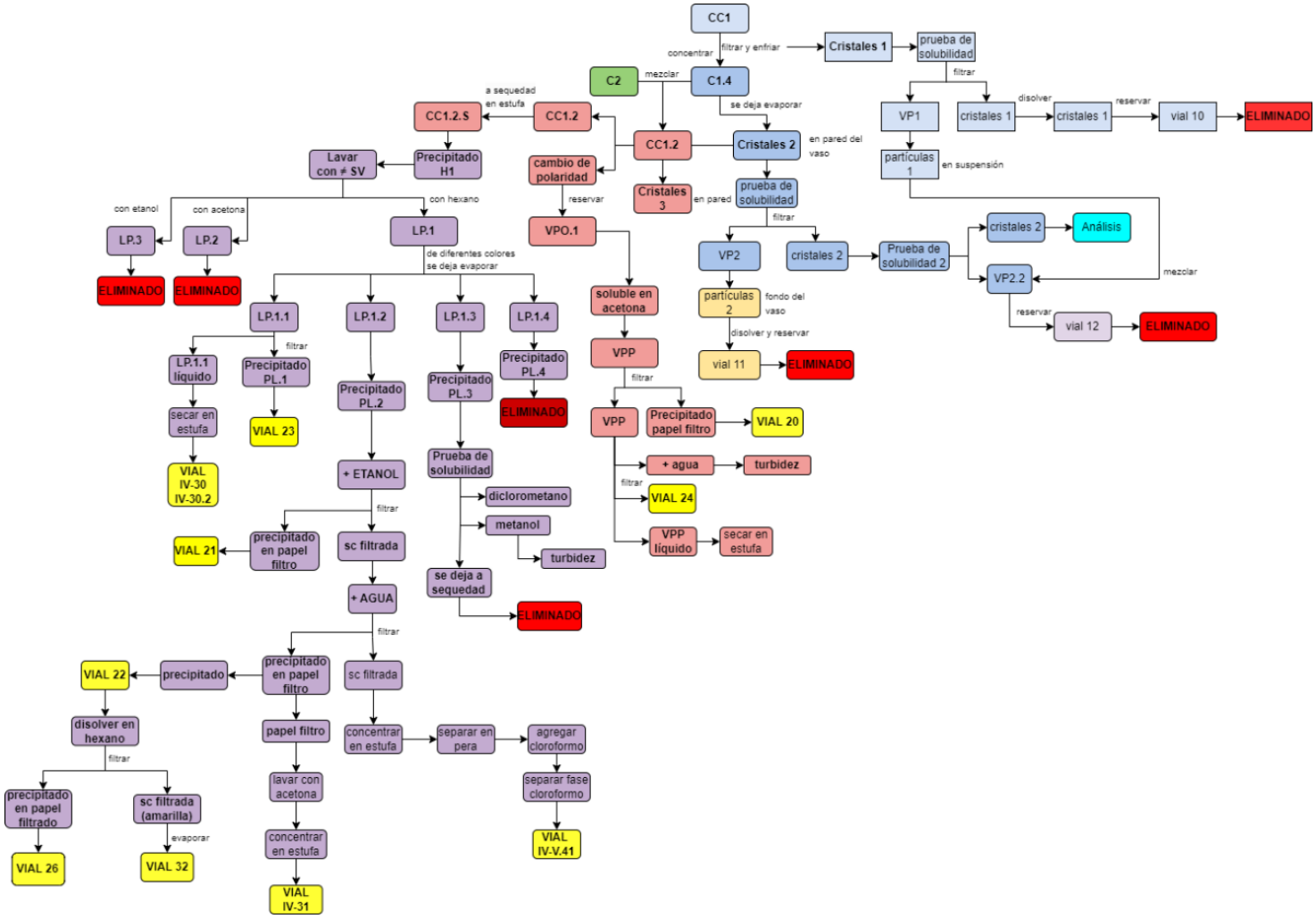


Figura 10. Diagrama de flujo del proceso de aislamiento por diferencia de solubilidad del extracto hexánico

Fuente: Elaboración propia

Con el extracto hidroalcohólico, se decidió emplear la técnica de separación por cromatografía en columna (CC) para obtener un metabolito mayoritario. Para ello, al extracto se le realizó un lavado inicial con una mezcla de Hex:DCM:MeOH (2:1:1) [78], de la cual se obtuvo una fracción insoluble y otra soluble en ella. Con ambas se realizó una serie de CC utilizando como fase estacionaria al sephadex LH-20 o la sílica gel, al igual que diversas fases móviles (mezcla Hex:DCM:MeOH (2:1:1), Hex:AcOEt modificando las proporciones). De cada columna se obtuvieron fracciones, las cuales fueron evaluadas mediante cromatografía en capa delgada (CCD) bajo onda de luz UV (corta y larga) y reveladores químicos (vainillina, $FeCl_3$, Dragendorff). Durante la

observación de las cromatoplacas se seleccionaron aquellas que presentaban características significativas (mayor intensidad, tamaño, definición, coloración, fluorescencia y menor cantidad de manchas totales), para luego analizarlas por espectroscopía de RMN ^{1}H y ^{13}C [79] en el espectrofotómetro RMN Fourier 300 MHz BRUKER. De los espectros se continuaba con la fracción que hubiera presentado señales definidas e intensas, para proseguir con su purificación [80] por CC, monitoreando por CCD, utilizando los otros eluyentes según la polaridad mayoritaria de los metabolitos (Hex:AcOEt, MeOH:H_2O, MeOH puro), de manera que permitieran el arrastre de los metabolitos. Este procedimiento se realizó hasta conseguir el aislamiento del metabolito de interés [17], reflejado a través del espectro de RMN con la menor cantidad de impurezas. En la Figura 11 se refleja el método general que se aplicó para la selección de la fracción de interés; mientras que en la Figura 12 se visualiza el procedimiento realizado para la obtención de fracciones del extracto hidroalcohólico, y en la Figura 13 se muestra la cantidad de fracciones obtenidas por cada purificación, así como las fracciones de interés, de las cuales se obtuvieron los espectros de RMN 1D y 2D.

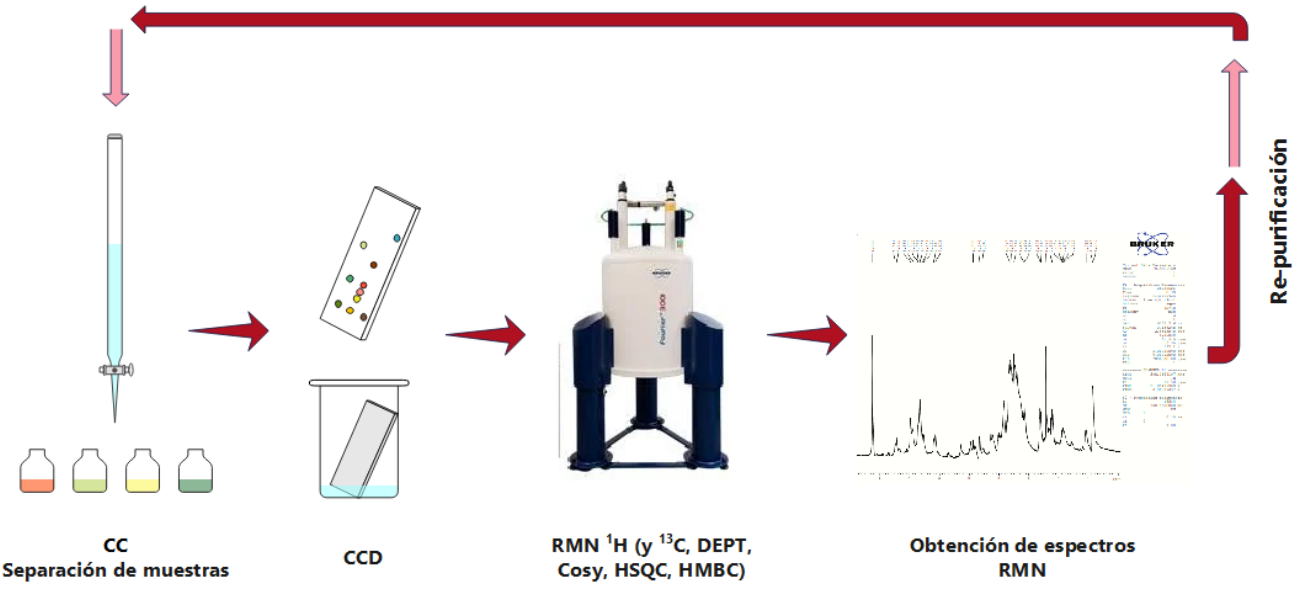


Figura 11. Metodología aplicada para la obtención y el aislamiento del metabolito mayoritario.

Fuente: Elaboración propia

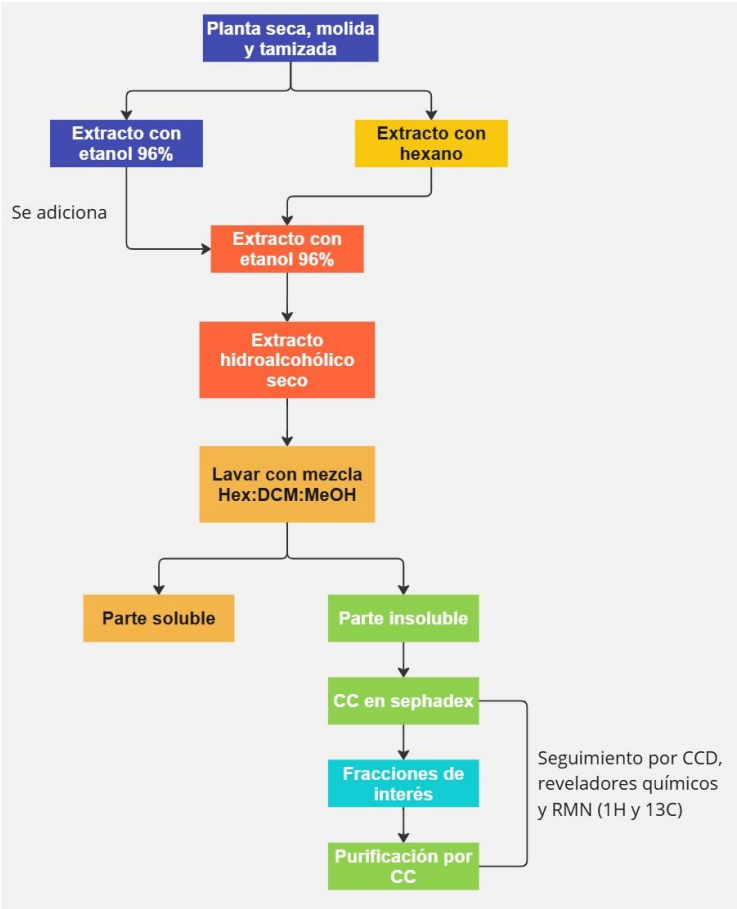


Figura 12. Procedimiento para la obtención de fracciones del extracto hidroalcohólico

Fuente: Elaboración propia

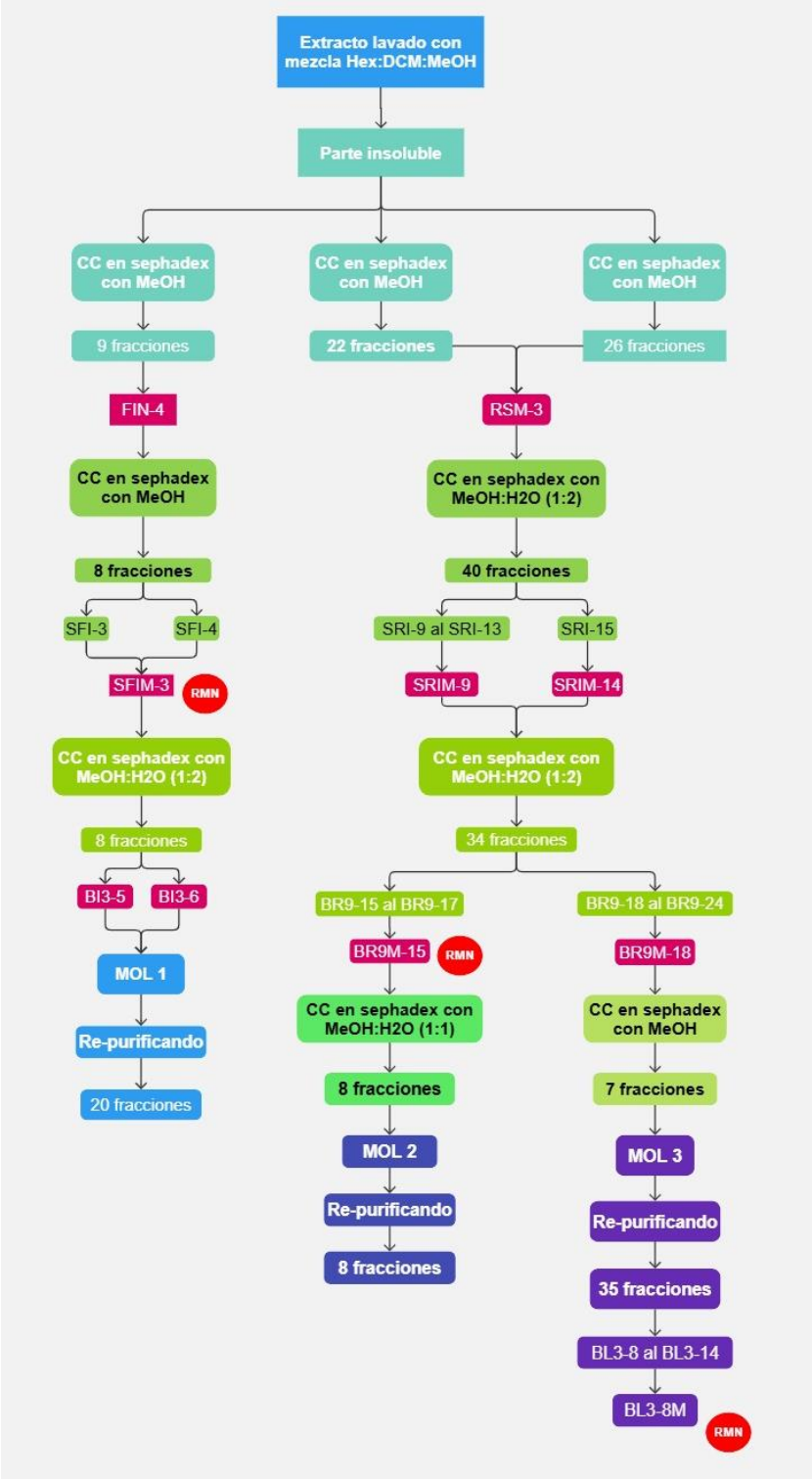


Figura 13. Fracciones obtenidas a partir de la parte insoluble resultante del lavado del extracto hidroalcohólico con la mezcla Hex:DCM:MeOH

Fuente: Elaboración propia

Finalmente, a partir del análisis de los espectros de RMN ^{1}H, ^{13}C, DEPT 135, HSQC, COSY y HMBC, se definió una propuesta de la estructura molecular de los metabolitos aislados [81,82].

3.4 Preparación y caracterización de la crema

Se elaboró una crema a base del extracto hidroalcohólico de la planta y se caracterizaron sus propiedades organolépticas (color, textura, aroma) y fisicoquímicas (pH, prueba de centrifugación, porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas, densidad y prueba de dilución) según la metodología referenciada con algunas modificaciones [83,84]. Se preparó por separado la fase acuosa y oleosa, cuya formulación se encuentra en la Tabla 3.

Tabla 3. Formulación de la crema preparada a base del extracto acuoso (FSA) de *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet

Fuente: Elaboración propia

Crema al 1% de extracto, a base de 50 g			
Fase acuosa		**Fase oleosa**	
agua destilada	22.40 g	cera lanette 50	5.00 g
propilenglicol	2.50 g	vaselina líquida	8.52 g
metilparabeno	0.10 g	monoestearato de glicerilo	0.50 g
extracto FSA	0.50 g	trietanolamina	0.50 g

Cada fase fue calentada entre 75-80°C bajo continua agitación manual hasta lograr una mezcla homogénea. Luego, en caliente a 40°C, se vertió pausadamente la fase acuosa sobre la oleosa y se mezcló con bagueta de vidrio y agitación vigorosa, por diez minutos, para acelerar la formación de la crema. Finalmente, se utilizó el equipo homogenizador durante tres minutos para completar el proceso y obtener una crema completamente homogenizada.

3.5 Evaluación de la actividad antibacteriana, fotoprotectora y leishmanicida del extracto hidroalcohólico

3.5.1 Evaluación de la actividad antibacteriana

La evaluación se realizará bajo el método de difusión en pozo de agar [85] utilizando las cepas *Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis,* y gentamicina como control positivo. En condiciones estériles, consistió en la preparación de un inóculo de cada bacteria, a través del método con el estándar de McFarland, y placas de Petri con agar de soja-TSA. Se sembraron diferentes concentraciones (12.5, 25, 50 y 70 µg/mL) del extracto soluble la mezcla triple de Hex:DCM:MeOH (2:1:1) utilizando DMSO como diluyente inerte, siendo incubadas por 24 h para revisar los resultados al día siguiente.

3.5.2 Evaluación de la actividad fotoprotectora de la crema

Para determinar el factor de protección FPS se utilizó un método espectrofotométrico. Primero se preparó la muestra diluyendo 1 g de crema elaborada en etanol [83], cuya solución filtrada sirvió para medir sus absorbancias entre 290-320 nm (región UV-B). Mediante el cálculo con la ecuación de Mansur y los valores tabulados del producto $E(\lambda) \times I(\lambda)$ [57,86], se obtuvo el valor de FPS:

$$FPS = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Donde:

CF= Factor de corrección,10

EE = Efecto eritmogénico de la radiación según la longitud de onda medida

I=Espectro de intensidad solar

Abs= Absorbancia espectrofotométrica según la longitud de onda medida

El factor de corrección corresponde a la dilución de 1 g de la muestra en 10 mL de etanol; EE e I son valores constantes que se encuentran tabulados (ver Tabla 4) para las longitudes de onda de 290 a 320 nm, con un incremento de 5 nm. Estos valores se multiplican con la absorbancia medida de la muestra para cada longitud de onda; y la sumatoria resultante se multiplica con el facto de corrección, obteniendo el FPS.

Tabla 4. Valores de E(λ)×I(λ) para las longitudes de onda de 290-320 nm

Fuente: Elaboración propia

Longitud de onda (λ nm)	Valores de $E(\lambda) \times I(\lambda)$
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0837
320	0.0180

3.5.3 Evaluación de la actividad leishmanicida del metabolito aislado

Se realizaron ensayos *in vitro* del tercer metabolito aislado sobre amastigotes de *Leishmania brazilensis* a concentraciones de 50 µg/mL, según la metodología referenciada [66].

Capítulo IV: Resultados y discusiones

4.1 Recolección, acondicionamiento de la muestra y obtención de extractos

El Mg. Hamilton Beltrán Santiago, botánico del Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, identificó la taxonomía de la fuente vegetal (ver Figura 14). Las muestras correspondieron al orden Lamiales, familia Lamiaceae, género *Stachys* y especie, *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet (ver Anexo 1).



Figura 14. Planta recolectada

Se obtuvo un total de 745 g de muestra tamizada de un tamaño de partícula alrededor de 203 mm de diámetro, el cual iba a permitir conseguir un macerado adecuado, evitando la formación de aglomeraciones. Se decidió obtener extractos usando hexano y etanol al 96% (ver Figura 15), ya que eran los solventes disponibles en el laboratorio. Un primer lote del extracto hidroalcohólico resultó de la maceración por ultrasonido de 80 g de muestra en el equipo Elmasonic S10H, a 40°C, hasta alcanzar la decoloración completa de la planta, recogiendo un total de trece extracciones en un mes. El resto de la muestra (665 g aproximadamente) se usó para la obtención de los extractos hexánicos, mediante maceración estática. Se ubicaron entre 50-25 g en cada frasco a utilizar, siendo diez en total (F1-F10); de estos, se realizaron extracciones cambiando periódicamente el solvente por filtración hasta decoloración. Así, se recogieron doce extractos de los frascos F1 al F3; catorce de F4 al F7; y once de F8 al F10. Finalizada esta extracción, se reutilizó la muestra de los frascos F3-F10 para macerarlos estáticamente con etanol al 96% (ver Figura 15) y obtener un segundo lote de extractos hidroalcohólicos, los cuales pasaron por el mismo procedimiento de maceración, filtración

del solvente, y reposición de este hasta decoloración de la planta, durante un período de dos meses.

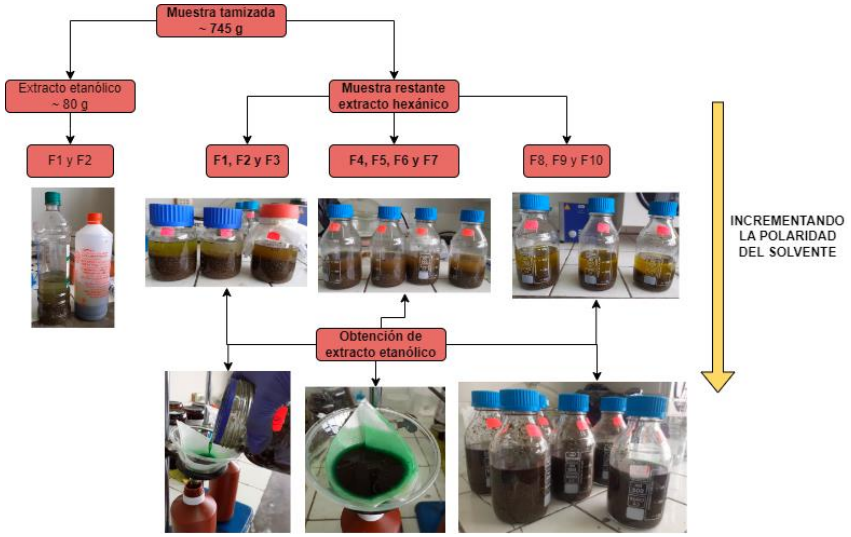


Figura 15. Diagrama de la obtención de los extractos hidroalcohólicos y hexánicos

Fuente: Elaboración propia

Los extractos hexánicos fueron evaporados (ver Figura 8) a través del evaporador rotativo Buchi Heating Bath B-100. Durante el proceso, se efectuaron modificaciones en la temperatura, con ayuda de la refrigeradora, para visualizar algún cambio en los extractos e indicar, de esa forma, la presencia de un posible metabolito particular. De esta manera, el frasco CC1 manifestó partículas pequeñas suspendidas; se filtró para recolectar el sólido, del cual se probó su solubilidad. Y nuevamente se concentró consiguiendo C1.4. Por otra parte, el primer lote del extracto hidroalcohólico, luego de ser concentrado (ver Figura 9), se observaron partículas suspendidas (Cristales E1, Partículas 1), quedando finalmente CE.1.2 con los Cristales E2.

Finalmente, se concentró el segundo lote del extracto hidroalcohólico y se almacenó para su separación y aislamiento por diferencia de solubilidad y cromatografía en columna.

4.2 Análisis fitoquímico de la especie *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet

4.2.1 Análisis cualitativo del extracto hexánico e hidroalcohólico

En la Tabla 5 se registraron los resultados obtenidos de la marcha fitoquímica, en la que se puede observar la presencia y positividad para saponinas, saponinas triterpenoidales, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, antraquinonas, compuestos quinónicos y betalaínas, donde los que tuvieron positividad en más de una reacción de coloración/precipitación fueron compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, y quinonas.

Tabla 5. Compuestos fitoquímicos encontrados de la especie *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet

Fuente: Elaboración propia

Metabolito analizado	**Método**	**Resultados de los extractos**		**Obtención**	
		Hidroalco-hólico	Hexánico	Hidroalcohólico	Hexánico
Saponinas	Prueba de la espuma	**-**	**-**	negativo	negativo
	Liebermann-Burchard	**+++**	**+++**	saponinas esteroidales	saponinas triterpenoidales
Triterpenoides y saponinas triterpenoidales	Reactivo de Salkowski	**-**	**-**	negativo	negativo
	Reactivo de Salkowski variante A (con anhídrido acético y muestra en cloroformo)	**-**	**+**	negativo	saponinas esteroidales
	Reactivo de Salkowski variante B (muestra en cloroformo)	**-**	**-**	negativo	negativo
Flavonoides y compuestos fenólicos	Borntrager	**+**	**-**	Antraquinonas y naftoquinonas	negativo
	Gelatina - NaCl	**-**	**-**	negativo	negativo
	Shinoda	**-**	**+**	negativo	flavonoides
	Shinoda con solo HCl (solo para ext. etanólico)	**-**		negativo	
	Rosemheim	**+++**	**-**	catequinas	negativo

	Rx con cloruro férrico	**+++**	**-**	compuestos fenólicos y taninos	negativo
	Rx con NaOH 20%	**++**	**-**	flavonoides	negativo
Taninos	Rx cloruro férrico	**+++**	**-**	compuestos fenólicos y taninos	negativo
	Rx gelatina – NaCl	**-**	**-**	negativo	negativo
	Rx de precipitación con agua de bromo	**-**	**-**	negativo	negativo
	Rx con formaldehído	**+**	**-**	Tanino pirogálico	negativo
	Rx con Acetato de plomo	**+**	**-**	taninos	negativo
Cumarinas	Papel Whatman + NaOH 10% + baño de agua	**+**	**-**	Cumarinas volátiles	negativo
	Papel Whatman + NaOH 10%	**+**	**+**	Furanocuma-rinas	Furanocuma-rinas
	método de ext. + KOH 5%	**-**	**-**	negativo	negativo
	ext. en EtOH + KOH 5%+ NH3	**+**	**-**	xantonas	negativo
Antraquinonas y quinonas	Rx con NaOH 5%	**+++**	**++**	Compuestos quinónicos	Compuestos quinónicos
	Rx de Bornträger	**-**	**-**	negativo	negativo
	HCl cc + $FeCl_3$ 3% + NaOH 5%	**++**	**++**	Antraquinonas	Antraquinonas
Antocianinas	Reactivo de Fehling A con previa hidrólisis	**-**	**-**	negativo	negativo
Betalaínas	Rx con NaOH 20%	**+**	**-**	betacianina	negativo
	Reacidificación con HCl	**-**	**-**	negativo	negativo
	Adición de NH_3	**-**	**-**	negativo	negativo
	Distribución entre alcohol isoamílico y H_2O	**-**	**-**	negativo	negativo
	Adición de acetato de plomo 5%	**-**	**-**	negativo	negativo
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	**-**	**-**	negativo	negativo
	Reactivo de Mayer	**-**	**-**	negativo	negativo
	Reactivo de Wagner	**-**	**-**	negativo	negativo

Reactivo de Otto	-	-	negativo	negativo

(+) : Cantidad de trazas; (++): Cantidad moderada ; (+ + +); Cantidad apreciable;
(-): Ausencia.

Comparando los resultados experimentales con los referenciales [6] (ver Tabla 6), se puede estimar una obtención similar de compuestos fitoquímicos, ya que, según la literatura, las especies del género *Stachys* presentan metabolitos secundarios similares entre sí [11,12,87]; aunque esto no excluye que no existan nuevos metabolitos que se encuentren presentes únicamente en una sola especie. Por ejemplo, los iridoides se han manifestado en múltiples especies, más no en la *Stachys candida Bory & Chaubard* [20].

Tabla 6. Compuestos fitoquímicos referenciales de una planta del mismo género *Stachys*

Fuente: Elaboración propia

Método	**Fitoconstituyentes**	***Stachys marrubiifolia*** [6]	***Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet**
Rx con cloruro férrico	fenoles totales	**+**	**+++**
Rx con cloruro férrico	Taninos Catequínicos	**+**	**+++**
Prueba de la espuma	saponinas	**++**	**-**
Reactivo de Salkowski variante A	Esteroles y terpenos	**+++**	**+**
Reactivo de Mayer	Alcaloides	**-**	**-**

(+): Cantidad de trazas; (+) (+): Cantidad moderada; (+) (+) (+); Cantidad apreciable; (-): Ausencia.

Con el fin de tener un primer avistamiento sobre los posibles metabolitos, que se encontrarían en mayor proporción, se midió por espectroscopía UV-Vis los extractos crudos hidroalcohólicos y hexánico.

Para el extracto hidroalcohólico se identificaron tres señales máximas (ver Figura 16), denominadas 6, 7 y 8, ubicadas a 290, 415, y 446 nm respectivamente. Revisando el análisis cualitativo, habría una posible presencia de flavonoides; entonces, de la literatura, se trató de reconocer la ubicación de las señales con sus intervalos característicos. En general, los flavonoides presentan dos bandas máximas, una entre

240-285 nm y otra a 300-550 nm [24]; y aunque el espectro no está definido por la cantidad de señales, se podría predecir un posible flavonoide debido a los picos 290 y 415 o 446 nm. Compuestos como quinonas, taninos, cumarinas y xantonas manifiestan señales a partir de los 200 nm [24], las cuales en el espectro aún resultaba muy complejo de identificar.

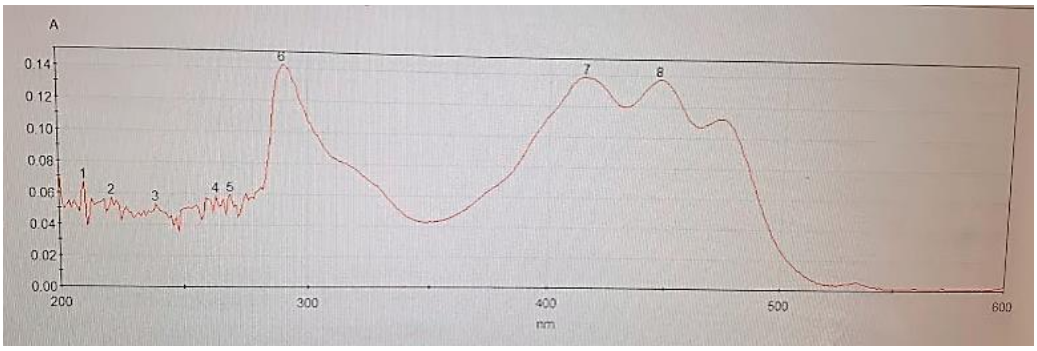


Figura 16.Espectro UV-Vis del extracto hidroalcohólico crudo

Del extracto hexánico (ver Figura 17), se identificó una banda máxima a 335 nm con un hombro a 280 nm aproximadamente. Según la literatura [88], un posible metabolito que podría corresponder a las bandas obtenidas sería una flavona.

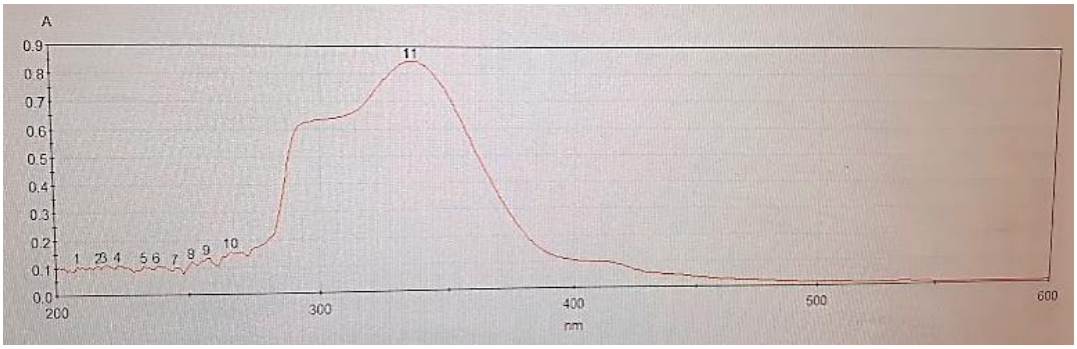


Figura 17. Espectro UV-Vis del extracto hexánico crudo

4.2.2 Evaluación de fenoles totales del extracto crudo

Para determinar fenoles totales se obtuvo una curva de calibración (ver Figura 18) de ecuación lineal *y=0.0094x-0.0021* con $R^2 = 0.9975$, lo que indica la posibilidad de obtener resultados confiables y representativos. Para el extracto hidroalcohólico analizado, se obtuvo 94.05 mg AGE/mL de extracto hidroalcohólico crudo. Este resultado

difiere del referencial [3], 157.1 mg AG/g extracto, posiblemente debido al uso del solvente durante la extracción de los metabolitos, donde utilizaron etanol al 70%; mientras que, en este trabajo se empleó etanol al 96%. La diferencia en las concentraciones del alcohol podría haber sido un factor significativo durante la extracción de los compuestos fenólicos debido a su mayor afinidad. Otras posibles causas podrían haber sido las condiciones experimentales, el método de maceración, los tiempos durante las mediciones de las absorbancias; así como algunas referentes a la especie de la planta en sí, como la etapa de recolección (antes o después del florecimiento), estadio de maduración, ubicación geográfica de la muestra, uso de toda la planta o partes de ella, entre otras.

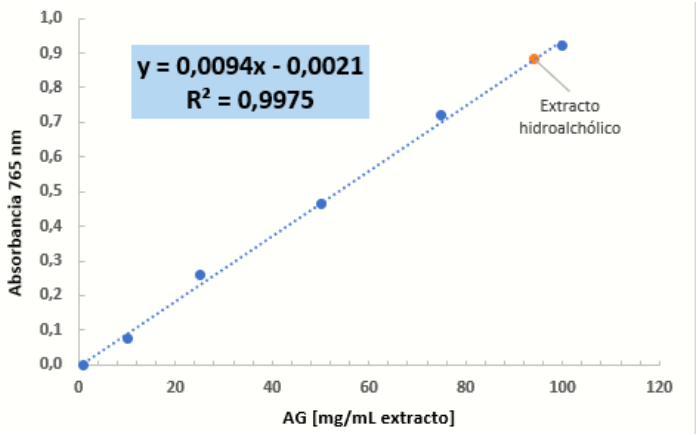


Figura 18. Curva de calibración para la determinación de fenoles totales

Fuente: Elaboración propia

4.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso (FSA) por el método clásico de DPPH·

Para obtener resultados más precisos, se extrajo una nueva fracción a través de una columna con fase estacionaria Amberlite XAD16N y como fase móvil, agua y etanol. Esta resina permitiría adsorber selectivamente analitos hidrófobos con grupos fenilos, los cuales se encontraban en las moléculas aisladas. Así, el análisis ya no se realizó en función del extracto crudo, sino de una fracción donde posiblemente podrían encontrarse las moléculas identificadas por RMN. El procedimiento inició con la hidratación de la

resina durante un día, bajo agitación moderada; y se armó la columna donde la fase móvil fue administrada con una bomba peristáltica. Se sembró 1.0017 g de extracto insoluble en mezcla triple diluido en agua ultrapura; primero, se corrió con agua para eliminar los componentes que no eran deseados, quedando retenida la fracción de interés en la resina. Luego, se agregó etanol para recuperar la fracción, recogiendo en tres viales, donde el segundo presentó una coloración marrón oscuro indicando una posible alta concentración. Esta fue evaporada hasta sequedad, para suspenderla en agua. Se colocaron las disoluciones en tubos de eppendorf, y se centrifugaron a 20238 rpm para recuperar el sobrenadante sin partículas remanentes, con el cual se iban a realizar los ensayos. La fracción fue nombrada FSA.

Se realizó una curva de calibración utilizando equivalente trolox (TE), como estándar, a diferentes concentraciones conocidas (0.02, 0.04, 0.08, 0.16 y 0.2 mM) para las cuales se tomaron alícuotas de una solución madre 0.4mM completando un volumen total de 400 µL con metanol. También se preparó una solución de DPPH· al 0.96 mM. De la fracción FSA, se tomaron tres volúmenes diferentes (20, 25 y 30 µL) que fueron diluidos en metanol a un volumen total de 400 µL. Tanto a los estándares como a las muestras problema se agregaron 3 mL de DPPH· bajo agitación con vortex para que, luego, se mantuvieran en reposo y oscuridad durante 1h. Posteriormente se midieron las absorbancias y concentraciones a 516.60 nm, valor medido previamente.

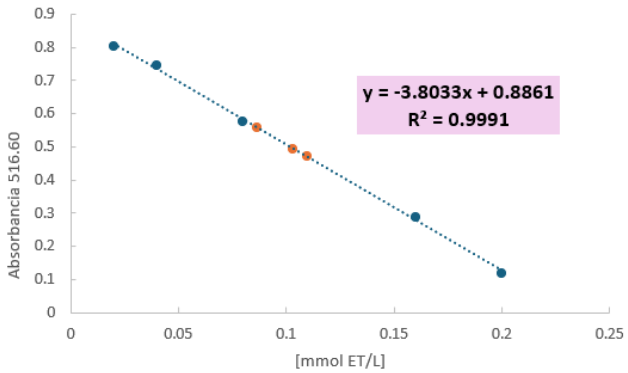


Figura 19. Curva de calibración para la determinación de antioxidantes

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 19 se observa la ecuación de la curva obtenida *y= -3.8033+0.8861*, con R^2*=0.9991* donde los marcadores azules corresponden a los estándares, y los naranjas, a las muestras evaluadas. Se confirmó el proceso de reducción del DPPH·, debido a la disminución lineal de la absorbancia con respecto a la concentración del estándar [75]. De la ecuación, las absorbancias medidas y la concentración de la fracción utilizada (34 mg/mL), se determinaron las concentraciones para cada volumen analizado de la fracción FSA en función a los equivalentes trolox (ver Tabla 7).

Tabla 7. Actividad antioxidante de las muestras FSA analizadas

Fuente: Elaboración propia

	$V_{extracto}$ [µL]	Concentración [mM TE/L]	Absorbancia	mgTE/g extracto	%Inhibición	IC_{50} [mg/mL]
1	20	0.0868	0.556	0.6389	46%	
2	25	0.1034	0.493	0.7609	52%	3.3797
3	30	0.1097	0.469	0.8073	54%	

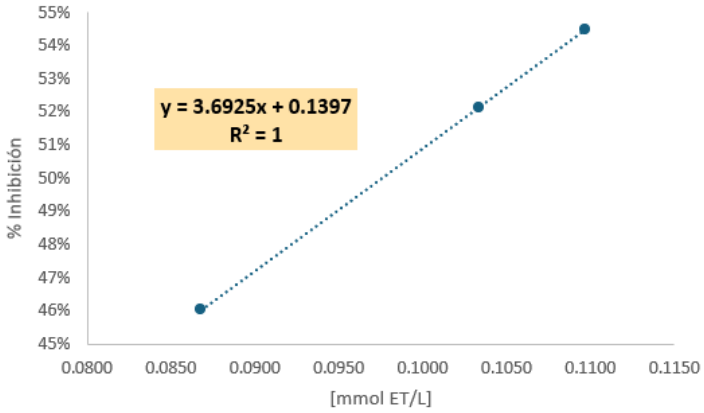


Figura 20. Porcentaje de inhibición de las muestras de la fracción FSA

De la Tabla 7, se estableció que la muestra manifiesta una capacidad antioxidante promedio de 0.7357 mg TE/g extracto; mientras que la concentración mínima necesaria (IC_{50}) que inhibirá al 50% de DPPH fue 3.3797 mg/mL, la cual se calculó mediante la Figura 20 y la absorbancia control (1.030), medida previamente.

Los resultados se compararon con otros referenciales, donde para los extractos acuosos y etanólicos de la especie *Stachys byzantina* K. Koch presentaron 2.638 y 2.818 µmol Trolox/g extracto respectivamente [89], siendo valores significativamente mayores al experimental (0.003 µmol TE/g extracto); un comportamiento similar se encontró con los extractos acuosos de las especies *S. byzantina, S. inflata* y *S. lavandulifolia* que exhibieron actividad de 139.15, 141.39 y 130.44 mg TE/g decocción [13], mostrando una gran diferencia con el obtenido. De igual forma con los extractos de acetato de etilo, metanol y agua de la especie *Stachys cretica* subsp. *mersinaea*. que manifestaron 32.54, 151.64 y 176.21 mg TE/g extracto [90]. Utilizando los mismos extractos, pero de la especie *Stachys germanica* subsp. *heldreichii* (Boiss.) Hayek presentaron alrededor de 5, 82 y 83 mg TE/g extracto, y un IC_{50} de 51.84, 3.11 y 3.07 mg/mL [91]; con respecto a los resultados en función del trolox, reportaron mayor valor que el experimental, pero frente a los de IC_{50}, los dos últimos fueron cercanos al experimental (3.3797 mg/mL). Por lo tanto, no solo es necesario conocer la capacidad antioxidante según la concentración de trolox, sino del IC_{50} debido a que, menor sea el valor de este, el extracto exhibirá una mayor actividad [92,93]; e incluso, si el IC_{50} es menor a 100 µg/mL, el agente antioxidante expresa una buena actividad, pero si es menor a 50 µg/mL, es considerado que altamente potente [94]. Entonces, siguiendo el ejemplo anterior y según la última premisa, por más que los extractos de *Stachys germanica* subsp. *heldreichii* (Boiss.) Hayek superen en número de mgTE/g extracto a *Stachys Pusilla* (Wedd.) Briquet, ninguna de las dos sería ni buenos ni altamente potenciales agentes antioxidantes.

4.3 Aislamiento (Extracción, Separación, Purificación) y elucidación de los metabolitos secundarios

4.3.1 Separación e identificación del extracto hexánico por diferencia de solubilidad

Para efectuar la separación de los extractos y conseguir el aislamiento de algún metabolito mayoritario, se inició con el método de separación mediante diferencia de solubilidad; ver Figura 10 para visualizar el diagrama de trabajo completo realizado. Iniciando por el extracto concentrado CC1, en frío, se observaron partículas en suspensión (cristales 1); se filtró y al residuo se le realizó una prueba de solubilidad, de

la cual con acetona se obtuvo una solubilidad parcial y con etanol, una solubilidad prácticamente completa. Entonces, se decidió disolver toda la muestra con etanol, se filtró y el residuo retenido se guardó en un vial (N° 10); mientras que, la solución filtrada (VP1) también presentó partículas y se dejó evaporar a temperatura ambiente.

El frasco CC1 se concentró en rotavapor (C1.4) y se dejó evaporar a temperatura ambiente, formándose posibles cristales amarillos en la pared del vaso. A este, se agregó C2 (CC1.2), para saturar más la solución y lograr una mayor cantidad. Nuevamente, aparecieron cristales amarillos de forma acicular y se les realizó una prueba de solubilidad (ver Tabla 8).

Tabla 8. Prueba de solubilidad de cristales 2

Fuente: Elaboración propia

Hexano	Cloroformo	Diclorometano	Acetona	Etanol
parcialmente soluble	+ parcialmente soluble	++ parcialmente soluble	+++ parcialmente soluble	+++ parcialmente soluble

Se filtró consiguiendo la solución filtrada (VP2) y el residuo (cristales 2), al cual se probó su solubilidad con acetato de etilo, decolorando la solución al igual que con el etanol y la acetona, pero aun advirtiendo partículas en suspensión. Se interpretó que podría haber dos compuestos de polaridad diferente, los que tornaban amarillento a la solución al disolverse en acetato de etilo, y los blanquecinos suspendidos que no solubilizaron. A VP2.2 se adicionó la solución VP1 y se reservó en el vial N° 12. La solución VP2 se evaporó por estufa formando partículas (partículas 2), que fueron reservadas en el vial N°11.

En el frasco CC1.2 (ver Figura 10) aparecieron posibles cristales de color amarillo y forma acicular (cristales 3); por lo que se tomó una parte para separar por polaridad agregando etanol, esperando observar alguna precipitación. Como no ocurrió algún cambio inmediato, se vertió la solución en una placa de Petri (VPO.1) dejándolo evaporar a temperatura ambiente. A este se adicionó acetona, con la cual se formó una fase blanquecina en la solución amarilla; se filtró y el residuo fue reservado en el vial N°20. A la solución filtrada se le agregó agua destilada para separar las partículas que

proporcionaban la tonalidad blanquecina y amarilla; al presentar una turbidez significante, se filtró y el residuo se ubicó en el vial N°24.

El frasco CC1.2 se dejó evaporar en estufa (CC1.2.S) hasta sequedad (ver Figura 10) quedando un precipitado (precipitado H1) de aspecto gomoso y amarillento. Se lavó con diferentes solventes para recoger posibles compuestos de diferente polaridad. La mayor parte se disolvió con hexano (LP1), consiguiendo soluciones de diferente intensidad de amarillo por cada lavado (LP.1.1, LP.1.2, LP.1.3, LP.1.4); mientras que, lo restante fue lavado con acetona y etanol. Todos se dejaron evaporar a temperatura ambiente. En LP.1.1 apareció un precipitado blanquecino; en LP.1.2, pequeños cristales aciculares; LP.1.3 no presentó algún precipitado de interés; LP.1.4 y LP.2 tuvieron escasas precipitaciones; y LP.3 permaneció transparente. Entonces, el vaso LP.1.1 fue filtrado y el precipitado (precipitado PL.1) se guardó en el vial N° 23; en tanto al papel de filtro Whatman 42 que quedó teñido de amarillo, se lavó y fue agregado a la solución filtrada, la cual se colocó en dos viales (IV-30 y IV-30.2), dejándolo secar en estufa. Para LP.1.2, se consiguieron los residuos que fueron almacenados en los viales N°21, 22, 26, 32, IV-31 y IV-V.41.

Finalmente, por la limitada cantidad de precipitado, se decidió descartar las muestras de los vasos LP.1.3, LP.1.4, LP.2, LP.2, vial 10, vial 11 y vial 12. Solamente los viales IV-31, N°26 y 32 pasaron por análisis de CCD y/o espectroscopía UV-Vis. La CCD de IV-31 se realizó con éter de petróleo:acetona (4:1) como fase móvil, a una distancia de recorrido de 6 cm (d). A la luz visible, se observaron cuatro manchas (1,2,3,4); bajo luz UV de onda corta (luz verde) y larga (violeta), se obtuvieron las manchas 5, 6, 7 y 8. Los datos correspondientes a las manchas obtenidas se encuentran en la Tabla N°9 y Figura 22.

Tabla 9. Manchas observadas perteneciente a la muestra del vial IV-V.31.
Fuente: Elaboración propia

Mancha N°	**Observación**			**R_f**
	Luz visible	Onda corta	Onda larga	
1	No	Ligeramente oscura	Rojo muy opaco	0.25
2	No	Ligeramente oscura	Intenso rojizo	0.40

3	No	Ligeramente oscura	Intenso rojizo	0.47
4	Naranja-amarillento	No	No	0.92
5	No	No	Rojizo poco intenso	0.30
6	No	No	Ligeramente naranja	0.52
7	No	No	Verde claro	0.57
8	No	No	Azul claro	0.72

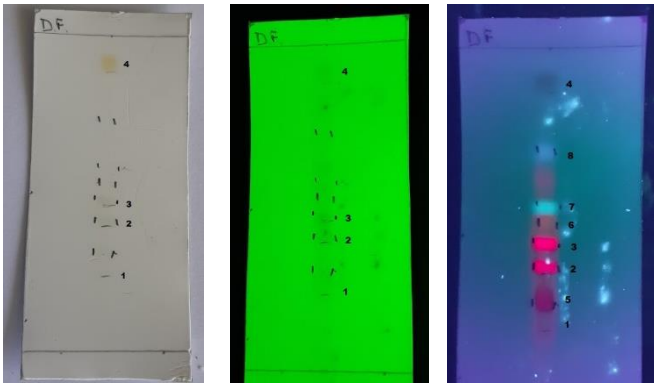


Figura 21. Cromatoplaca del precipitado del vial IV-V.31 bajo luz visible (izq.), longitud de onda corta (medio) y larga (der.)

En función a la literatura encontrada, [24] se podría inferir que algunos de los colores obtenidos puedan corresponder a determinados metabolitos (ver Tabla 10).

Tabla 10. Posibles metabolitos que puedan resultar del producto del vial IV-V.31
Fuente: Elaboración propia

Mancha N°	Posible metabolito
2	Alcaloides, antraquinonas, flavonoides y cumarinas [95–97]; taninos [96]
3	Alcaloides, antraquinonas, flavonoides y cumarinas [95–97]; taninos [96]
6	Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre [24] ; flavonoides [96]
7	Aurona carente de 4’-OH libre y flavanona carente de 5-OH libre [24] Flavonoles con un 3-OH libre, con o sin 5-OH libre [24]
8	Alcaloides, antraquinonas, flavonoides y cumarinas [95–97]

La muestra N° 32 (ver Figura 22) presentó dos señales máximas contiguas a 330 y 408 nm. Según la referencia [24], se podría estimar que el compuesto se trata de una flavona o un flavonol por la forma similar de las señales del espectro, pero no coincidiendo completamente en sus longitudes de onda.

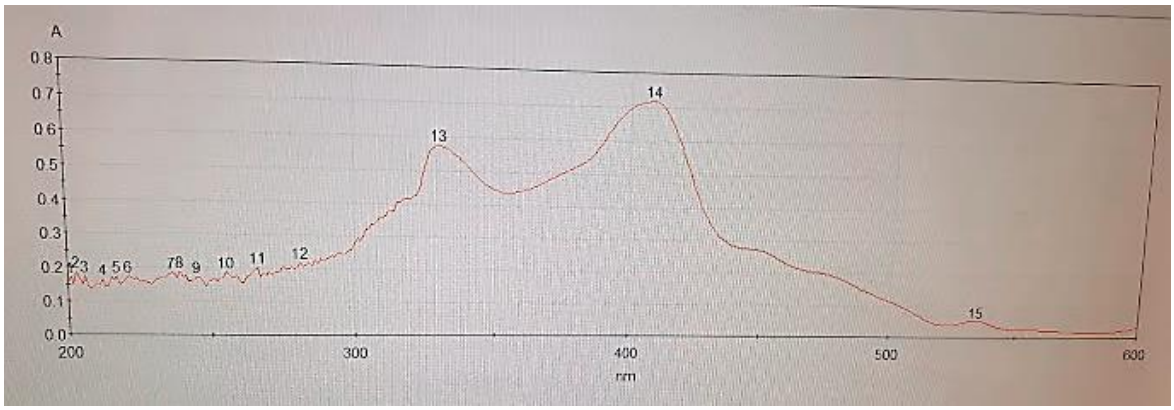


Figura 22. Espectro UV-Vis del precipitado reservado en el vial N° 32

Mientras que, el precipitado del N° 26 (ver Figura 23) se diluyó en acetona, y en su espectro se observó una señal máxima a 293 nm. Según la referencia [24], el compuesto podría resultar ser una isoflavona por la forma y posición del pico.

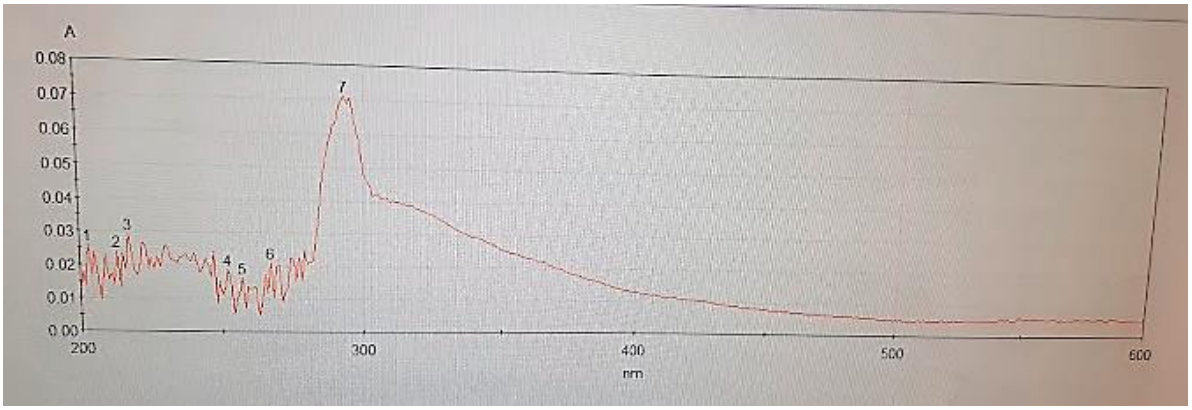


Figura 23. Espectro UV-Vis del precipitado reservado en el vial N° 26

4.3.2 Aislamiento de metabolitos a partir del extracto hidroalcohólico por cromatografía en columna: Extracto soluble en Hex:DCM:MeOH

El extracto hidroalcohólico crudo, que había sido almacenado, se evaporó hasta llegar a sequedad, y se realizó una primera separación por solubilidad adicionando una mezcla triple de Hex:DCM:MeOH (2:1:1) al frasco, logrando obtener 10.98 g del extracto crudo soluble en la mezcla.

Se realizó una CC en sephadex LH-20 con la mezcla triple utilizando 3.125 g del extracto soluble, del cual se colectaron diez fracciones de código **LMT** (ver Anexo 2). La última fracción fue recuperada con metanol como fase móvil. Las muestras se analizaron por CCD (ver Anexo 3), empleando una fase móvil de Hex:AcOEt* (3:1), bajo luz visible, luz UV de onda corta y larga, con revelador vainillina y $FeCl_3$. Primero se revisó qué fracciones presentaban manchas similares para poder unirlas e incrementar la cantidad de muestra; entonces se decidió juntar las fracciones LMT-2 y -3, LMT-5 y -6 (LMTN-2 y LMTN-5 respectivamente). Nuevamente se corrieron las CCD (ver Anexo 4) utilizando el mismo eluyente y fuentes. Observando las manchas de cada fracción, se eligió aquella que presentaba una coloración y fluorescencia más intensa indicando una posible mayor concentración de algún metabolito. Esta fue la fracción LMTN-2 y se reservó para una próxima separación en columna.

Por otra parte, se consideró realizar una CC con sílica gel, fase móvil Hex:AcOEt (9:1) y 2.2642 g de muestra. Para sembrar la muestra se preparó una “cabeza” con sílica y muestra, ya que fue difícil de solubilizar en el eluyente. Se obtuvieron quince fracciones de código **FSO** (ver Anexo 5 y 6). A medida que eran recogidas, según las bandas de colores, se advirtió que debía modificarse la fase móvil cambiando sus proporciones para incrementar el desplazamiento de los metabolitos en la columna según polaridad. Se inició aumentando la proporción del hexano utilizando 7:1, 4:1 y 1:1; luego del acetato de etilo bajo las proporciones de 1:3, 1:6, 1:9 y puro. Finalmente, se usó una mezcla de AcOEt:MeOH para forzar el desplazamiento, logrando obtener una fracción más; pero aún había quedado muestra en la sílica, demostrando que los metabolitos remanentes se caracterizaban por su fuerte polaridad.

Las fracciones fueron evaluadas bajo CCD (ver Anexo 7, 8 y 9), con Hex:AcOEt (3:1). La fracción FSO-3 presentó una mancha fluorescente significativa bajo UV onda larga; y las fracciones FSO-5 y -11, una mancha azul oscura con el revelador $FeCl_3$; se decidió llevar a RMN las fracciones FSO-1, -2 y -4 que fueron las que mostraron señales más definidas y coloreadas indicando una posible abundancia de metabolitos. Mientras que, se unieron las fracciones FSO-5 al -8 (FSON-5), FSO-9 y -10 (FSON-9), FSO-11 y -12 (FSON-11), FSO-13 al -15 (FSO-13) debido a su similitud entre sí. Nuevamente se realizó una CCD (ver Anexo 10) para compararlas, donde para FSON-11 (ver Anexo 11) se utilizó $CHCl_3$:MeOH (4.7:0.3) como eluyente, porque había manifestado ser más polar que las demás. Posteriormente, se lavaron las muestras con hexano para probar una separación por solubilidad ya que tenía una textura gomosa que resultó difícil de disolver en acetato de etilo. Se obtuvieron los lavados de las fracciones FSO-3, -5, -9 y -11 (FSO-3L, FSON-5L, -9L y -11L respectivamente). Se analizó por RMN ^1H las fracciones de interés: FSO-3L, FSON-5 y FSON-5L, y FSON-11.

Con el objetivo de poseer una cantidad de muestra mayor uniendo nuevas fracciones con las de FSO, se determinó ejecutar una nueva CC en sílica gel empleando Hex:AcOEt (3:1). Las fracciones se denominaron **MSN** (ver Anexo 17) y se recogieron diez, las cuales se evaluaron mediante CCD (ver Anexo 18). Comparando las manchas de cada una se juntaron las fracciones similares quedando MSNJ-1; MSNJ-4, MSNJ-6; FOM-5; FOM-9; FOM-13.

Continuando con la fracción LMTN-2; se efectuó una CC con sílica gel, Hex:AcOEt (9:1) y 61 mg de extracto, preparando una “cabeza” con sílica para evitar pérdidas. La columna se corrió mediante diferentes proporciones de solvente, del menos polar al más polar; primero incrementando las proporciones del hexano a 7:1, 4:1, y 1:1; y luego del acetato de etilo con 1:2, 1:4, 1:7, 1:9 y puro. Por último, se realizaron corridas con AcOEt:MeOH (9:1 y 9:2). Se recogieron diez fracciones llamadas **SNS** (ver Anexo 12). Estas fueron evaluadas por CCD (ver Anexo 14, 15 y 16) usando Hex:AcOEt (3:1); mientras que, las fracciones SNS-8 al -10 con $CHCl_3$:MeOH (4.7:0.3 y 4.5:10 gotas). A partir de los resultados en la placa, solamente se decidió juntar las fracciones SNS-7 y SNS-8 (SNSJ-7). Como la muestra obtenida de las fracciones SNS (CC de LMTN-2) no

resultó ser suficiente para ser analizada por RMN, se volvió a realizar una CC con las mismas condiciones reuniendo cinco fracciones con nombre **SML** (ver Anexo 19). Se efectuaron sus respectivas CCD (ver Anexo 20) con Hex:AcOEt (2:1). Según la comparación de las fracciones SNS y SML, se juntaron obteniendo las fracciones resultantes: SFTM-1, SFMTM-2U y SNS-9 (ver Anexo 21).

Solo FSO-2 (ver Anexo 13), FSO-3L, FSO-4 (ver Anexo 13) y FSON-5 presentaron señales de intensidad significativa que resultaron ser ácidos grasos por sus picos representativos alrededor de 1-3 ppm y 5-6 ppm [98,99]. Se llevó a analizar por RMN ^{1}H (ver Anexo 22, 23 y 24) las fracciones: SFTM-1, SFTM-2U, PFOM-1, PFO-5 en $CDCl_3$.; MSNJ-6, FOM-5 y FOM-9 en MeOD; pero los espectros indicaron que no existía una cantidad suficiente de muestra que permitiera la aparición de señales; por lo que no fueron consideradas para futuros análisis.

4.3.3 Aislamiento de metabolitos a partir del extracto hidroalcohólico por cromatografía en columna: Extracto insoluble en Hex:DCM:MeOH

Se realizó una primera CC del extracto crudo insoluble en mezcla triple, utilizando 3.0132 g y metanol como fase móvil. Se asignó **FIN** (ver Anexo 25) como código de las fracciones, que fueron recogidas según las bandas de colores que presentaba la columna. Para evitar posibles pérdidas de metabolitos que no poseían coloración, se continuó corriendo la columna hasta dejarla lo más limpia posible. Como se observó que la columna aún presentaba un color amarillento claro (ver Figura 24); se siguió agregando fase móvil, la cual se cambió por MeOH:H_2O (1:1) para mejorar el desplazamiento de los metabolitos que pudieran ser muy polares.

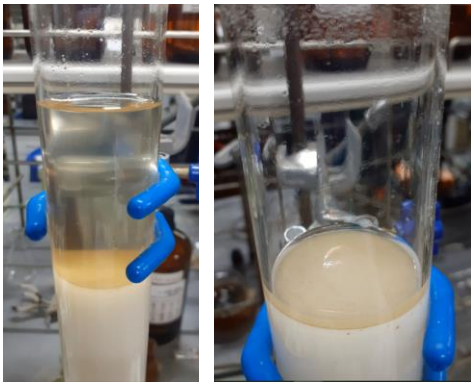


Figura 24. Fracción retenida en columna correspondiente a FIN

Para realizar las CCD (ver Anexo 26 y 27) de las muestras se utilizó $CHCl_3$:MeOH (4.7:0.3). De los resultados (ver Figura 25), se juntaron las fracciones obteniendo FINN-3 y FINN-5 y se volvió a realizar la CCD. Las muestras de interés de esta columna, según los resultados de las placas, fueron FIN-4 y FINN-5, ya que ambas particularmente presentaron tonalidades azules con el revelador $FeCl_3$, pudiendo ser fenoles. Estas manchas se caracterizaron por tener tonalidades verdes claro parcialmente fluorescentes (UV onda larga) y amarillo-pardo en la zona de siembra (revelador vainillina). Estas fueron analizadas por RMN ^1H (ver Anexo 28) utilizando MeOD; así como las fracciones FINN-3 y FIN-8. Similar al caso de las fracciones FSON, se lavaron las muestras FINN-3, FIN-4, FINN-5 y FIN-8 con hexano para realizar una separación por solubilidad (FINN-3L, FIN-4L, FINN-5L, y FIN-8L respectivamente).

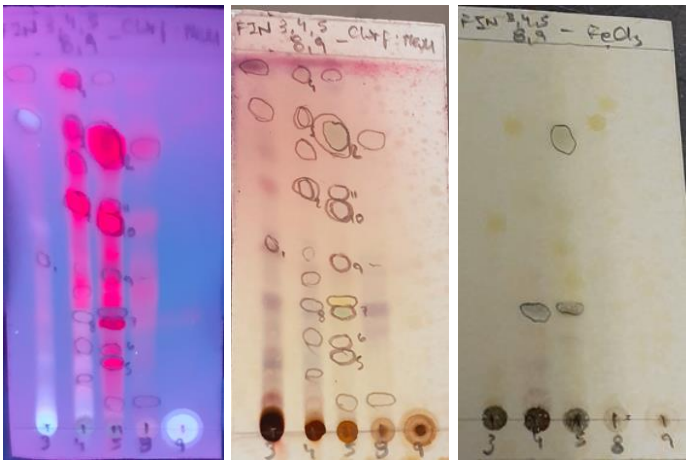


Figura 25. Cromatoplacas de las fracciones de FIN 3-9 bajo UV onda larga (izq.), vainillina (medio) y $FeCl_3$ (der.)

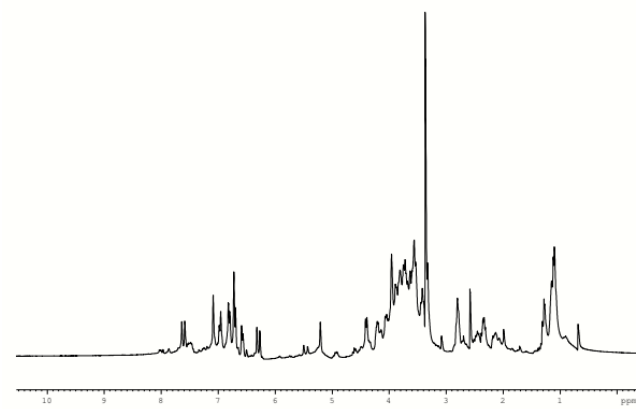


Figura 26. Espectro de RMN de ^{1}H de la fracción FIN-4

El espectro de RMN ^{1}H de FIN-4 (ver Figura 26) manifestó señales definidas y de intensidad significativa en sectores característicos de grupos funcionales (ejemplo, zona aromática) convirtiéndose en una potencial opción para el aislamiento de una molécula. Se realizó una CCD con $CHCl_3$:MeOH (4.5:10 gotas) para observar y confirmar la magnitud en que la muestra se encontraba mezclada con otros compuestos. Los resultados determinaron que se debía purificar para lograr una mejor separación, ya que la fracción de interés fenólico (ver Figura 27) manifestaba una gran polaridad, quedándose concentrado en la siembra de la muestra (color azul oscuro en la placa con el revelador de $FeCl_3$). Entre los metabolitos que se buscaba retirar era la clorofila porque se encontraba en mayor proporción; esta se identificó por el color verde en la columna y las manchas rojas fluorescentes visualizadas en la cromatoplaca bajo onda corta (254 nm) de UV teniendo un R_f semejante al de la literatura, entre 0.3-0.7 [24].

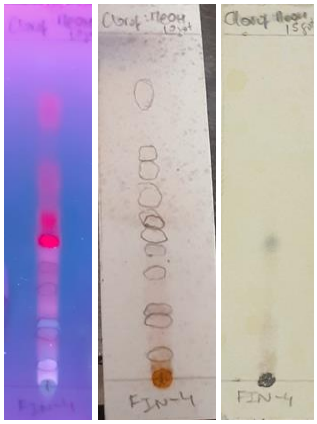


Figura 27. Cromatoplaca de la fracción FIN-4 bajo UV onda larga (izq.), vainillina (medio) y $FeCl_3$ (der.)

Entonces la fracción FIN-4 se purificó por CC en columna pequeña, utilizando MeOH puro. A la muestra se le añadió FINN-5 ya que expresaba señales parecidas, pero de menor intensidad; se obtuvieron ocho fracciones llamadas **SFI** (ver Anexo 29). Se realizó su respectiva CCD (ver Anexo 30 y 31) con $CHCl_3$:MeOH (4.5:10 gotas). SFI-1 y SFI-2 no llegaron a desplazarse en la placa por su alta polaridad, entonces se lavaron con metanol obteniendo una parte soluble e insoluble quedando SFI-1LE y SFI-2LE (soluble en metanol) y SFI-2LA (soluble en agua). De la misma forma, se realizó con la fracción SFI-5 resultando SFI-5LE (soluble) y SFI-5LA (insoluble), el cual formó un precipitado. También se unieron las fracciones por coincidencia de manchas resultando SFIM-3 y SFIM-6. Para su análisis por RMN ^{1}H (ver Anexo 32 y 33) se enviaron SFIM-3, SFI-2LE, SFI-2LA, SFIM-6, SFI-5LE, SFI-5LA en MeOD. A partir de los espectros, el de mayor interés fue SFIM-3 (ver Figura 28) representando a la primera molécula aislada (**molécula 1**). Para confirmarlo se realizó una CCD (ver Anexo 34) de las muestras enviadas donde se advirtió que era necesario purificar, ya que contenía mucha clorofila y el metabolito de interés se encontraba en la zona de la siembra. También se obtuvieron los espectros de RMN ^{13}C, DEPT 135, y los bidimensionales HMBC, COSY, HSQC de SFIM-3.

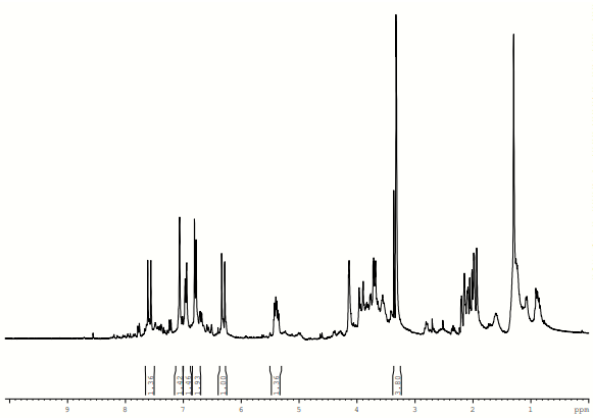


Figura 28. Espectro de RMN de ^{1}H de la fracción SFIM-3

Se decidió purificar la muestra SFIM-3 por CC con MeOH:H_2O (1:2), recolectando ocho fracciones de código **BI3** (ver Anexo 35). La cantidad de muestra recogida fue escasa y no se pudo realizar una CCD; entonces se las utilizaron para su análisis por RMN ^{1}H directamente. Se enviaron las fracciones, de las cuales la muestra BI3-5 resultó ser una de interés ya que manifestaba señales de intensidad y definición relevante (ver Figura 29).

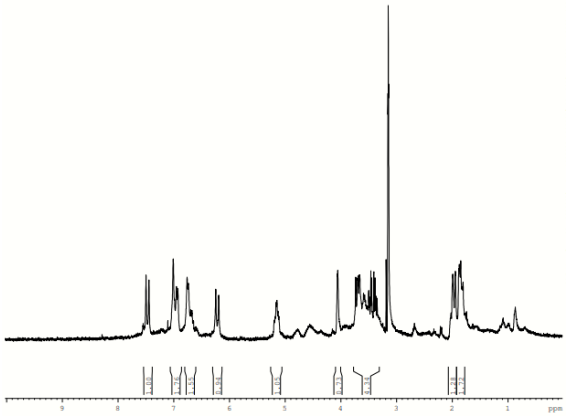


Figura 29. Espectro de RMN de ^{1}H de la fracción BI3-5

Como se encontraron fracciones interesantes (FIN-4, SFIM-3, BI3-5), se realizaron dos CC adicionales del extracto insoluble en metanol, para obtener mayor cantidad de las muestras de importancia. Para la segunda CC se utilizó 5.3081 g del extracto y MeOH; se recolectaron veintidós fracciones de código **RIN** (ver Anexo 36). Se realizaron las CCD (ver Anexo 37 y 38) de las fracciones utilizando $CHCl_3$:MeOH (4.7:0.3) y se mezclaron las semejantes entre sí (ver Figura 30 y Anexo 39) quedando RINN-1, RINN-7, RINN-12

y RINN-14. La tercera CC tuvo fracciones con el nombre **IST** (ver Anexo 40), siendo veintiséis en total. Se evaluaron y unieron las muestras por CCD (Anexo 41, 42 y 43) con $CHCl_3$:MeOH (4.7:0.3) adquiriendo (ver Figura 30) ISTN-1, ISTN-4, ISTN-8, ISTN-14, ISTN-19 y ISTN-25. Entre estas, se observó que el posible metabolito de interés radicaría en ISTN-8; se añadió RINN-7 y tomó el nuevo código RSM-3 (0.8302 g). También, se combinaron las demás fracciones RINN e ISTN: RSM-1, EIM-2, EIM-3, RSM-5, y RSM-6.

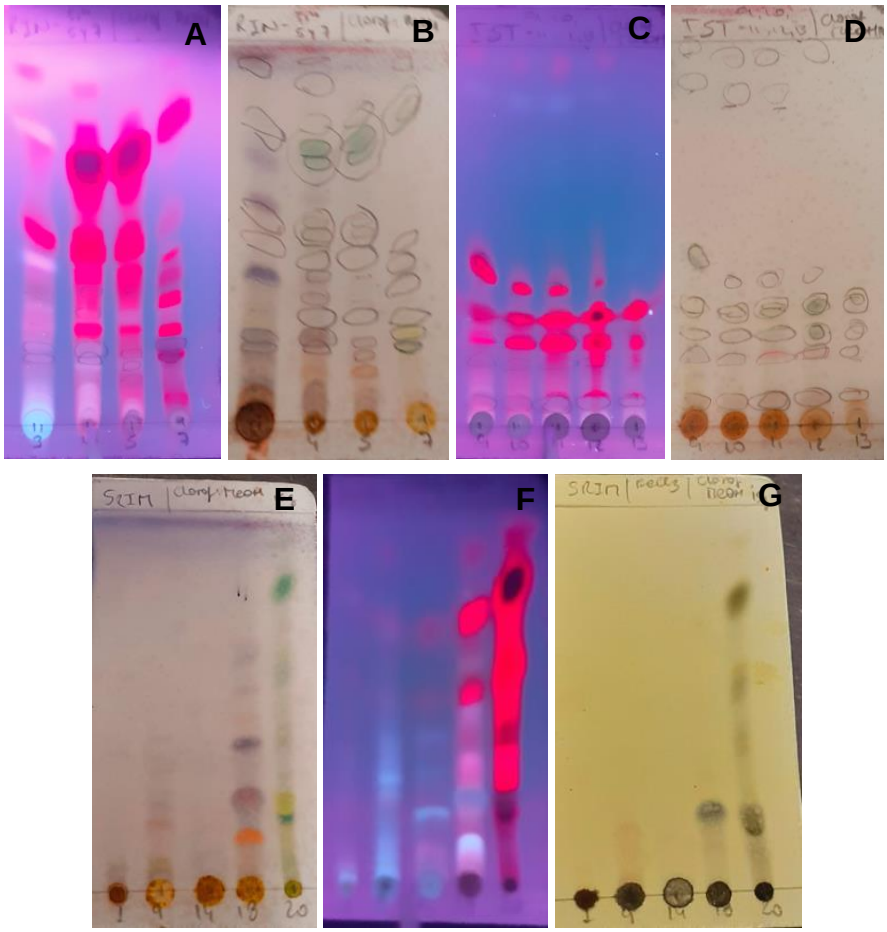


Figura 30. Cromatoplacas de las fracciones de RIN, IST y SRIM bajo UV onda larga (A,C,F), vainillina (B,D,E) y $FeCl_3$ (G)

La purificación de RSM-3 (ver Anexo 44) se realizó usando MeOH y **SRI** como código, recolectando cuarenta fracciones. Mediante la CCD (ver Anexo 45) se redujeron (ver Figura 30) a SRIM-1, SRIM-9, SRIM-14, SRIM-18, y SRIM-20. De estas, las más

importantes fueron SRIM-9 y -14, que se mezclaron para purificarlas con MeOH:H_2O (1:1) consiguiendo treinta y cuatro fracciones de código **BR9** (ver Anexo 48).

Para las CCD (ver Anexo 49, 50, 51 y 52) se usó $CHCl_3$:MeOH (4.7:15 gotas), pero como las fracciones no llegaban a desplazarse por su alta polaridad, se eligió otro eluyente, DCM:MeOH (45 gotas:5 gotas) logrando la separación de los compuestos. Se efectuó la CCD (ver Anexo 53) comparándolas con BI3-5 y BI3-6; se juntaron BR9M-15, BR9-18, BR9M-19 ya que presentaron manchas definidas y con presencia de fenoles. Las enviaron para su análisis por RMN ^1H (ver Anexo 46 y 54), donde BR9M-15 (ver Figura 31) resultó ser una segunda potencial molécula aislada (**molécula 2**) debido a la aparición de nuevas señales. Por otra parte, se decidió mezclar BR9M-19 y BR9-18 (BR9M-18, ver Figura 31) para purificarlos por la similitud de sus señales con la segunda molécula, convirtiéndose en una potencial tercera molécula aislada (**molécula 3**). De manera que, se solicitaron espectros de ^{13}C, DEPT 135, y bidimensionales para certificar que estas dos fracciones correspondían a estructuras diferentes a la de la molécula 1. Entonces, se continuó con su purificación.

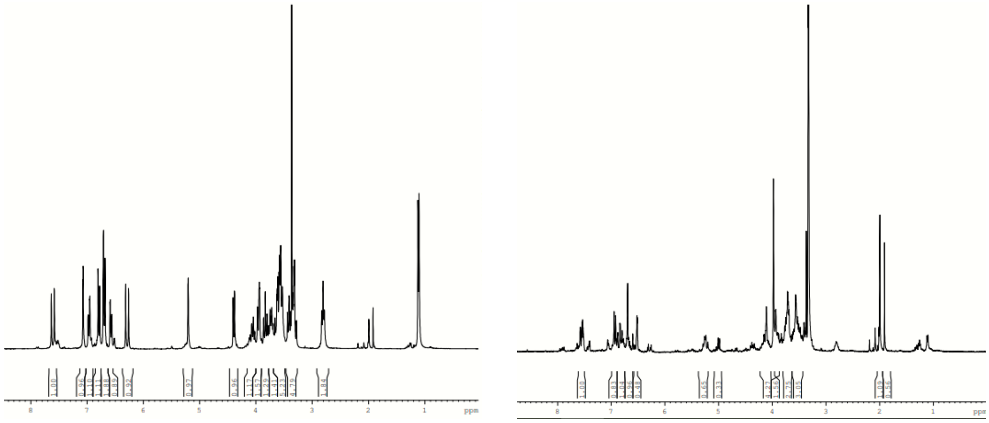


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H de las fracciones BR9M-15 (izq.) y BR9M-18 (der.)

De la CC de BR9M-15 de **SB15** (ver Anexo 55), se recolectaron ocho fracciones. En la CCD se utilizó DCM:MeOH (45 gotas:5 gotas), advirtiendo que SB15-4 era diferente a las fracciones SB15-5, -6 y -7 ya que mostraba la presencia de dos compuestos “a” y “b” (ver Figura 32) donde uno tiene un R_f mayor que el otro. SB15-5 y -6 manifestaron

una mayor presencia del compuesto “b”, observada en todas las placas por la coloración intensa; entonces se mezclaron (SB15-5M). En SB15-7 se observó que estaba constituida por el compuesto “b”. La fracción SB15-5M (ver Figura 33) se envió a evaluar por RMN ^{1}H, la cual demostró ser una nueva molécula aislada (**molécula 2**); por lo que se continuó con su purificación. Para la CC de BR9M-18 se utilizó MeOH y las fracciones se codificaron como **SB18** (ver Anexo 56), recogiendo nueve. La CCD (ver Figura 32) se realizó empleando DCM:MeOH (45 gotas:5 gotas); luego de unir las fracciones, se enviaron a RMN ^{1}H, resultando interesante la muestra SB18-4M (ver Figura 33) que confirmó representar a la tercera molécula aislada (**molécula 3**).

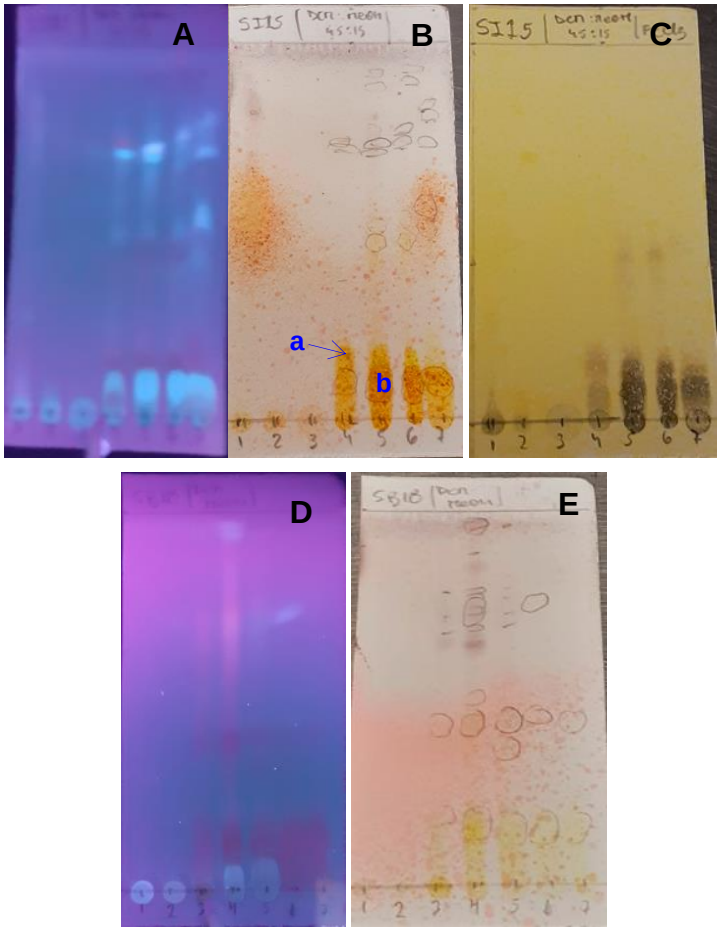


Figura 32. Cromatoplacas de las fracciones SB15 y SB18 bajo UV onda larga (A,D), vainillina (B,E) y $FeCl_3$ (C)

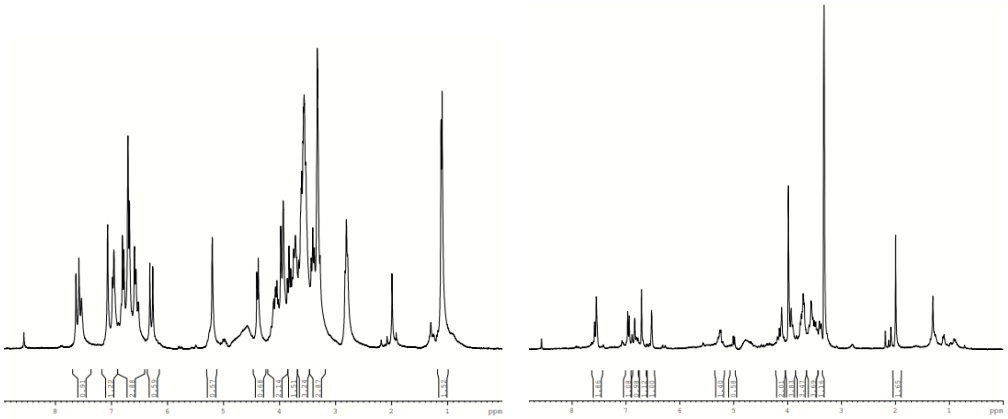


Figura 33. Espectros de RMN de 1H de las fracciones SB15-5M (izq.) y SB18-4M (der.)

Se unieron las muestras (BI3-5, BI3-6, SFI-5LE, FIN-4 y SFIM-3) que expresaron a la molécula 1 para conseguir una mayor cantidad con una masa de 127.2 mg, denominada **MOL 1.** De su purificación, se consiguieron veinte fracciones con código **SOL** (ver Anexo 57) que se evaluaron por CCD (ver Anexo 58, 59 y 60) con DCM:MeOH (45 gotas:5 gotas). Mientras que, para la segunda molécula (**MOL 2**) se unieron las fracciones SB15-5M, BR9M-15, SB15-4, SB15-7 y SB15-8 presentando una masa de 72 mg; y para su re-purificación se utilizó MeOH obteniendo ocho fracciones de nombre **BL2** (ver Anexo 61), que fueron analizadas por CCD (ver Anexo 62) con DCM:MeOH (45 gotas:5 gotas). Los ejemplares de ambos aislamientos fueron analizados por RMN, pero la cantidad de muestra fue insuficiente para obtener espectros definidos; de manera que la elucidación estructural se desarrolló a partir de los espectros de las fracciones iniciales, SFIM-3 y BR9M-15.

En cuestión a la re-purificación de la molécula 3 (**MOL 3**), se utilizó MeOH:H_2O (1:1) obteniendo treinta y cinco fracciones como **BL3** (ver Anexo 63). La CCD (ver Anexo 64, 65, 66 y Figura 34) también se realizó con el mismo eluyente que las muestras anteriores. De estas, se enviaron las muestras BL3-8M (IV-62), BL3-29M (IV-68), BL3-36 (IV-73) para su análisis por RMN ^{1}H, utilizando DMSO. Los resultados espectroscópicos señalaron que correspondían a una misma molécula, siendo **BL3-8M (IV-62)** (ver Figura 35) la de mejor definición y aislamiento, y de la cual se realizó su elucidación estructural en la siguiente sección.

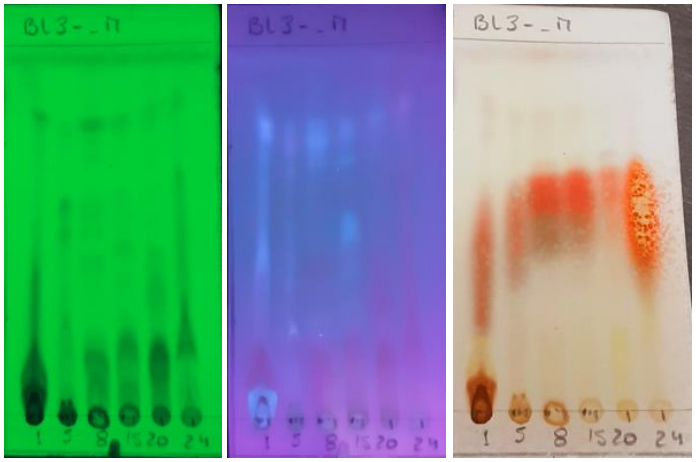


Figura 34. Cromatoplacas de la fracción BL3-M bajo UV onda corta (izq.), onda larga (medio) y vainillina (der.)

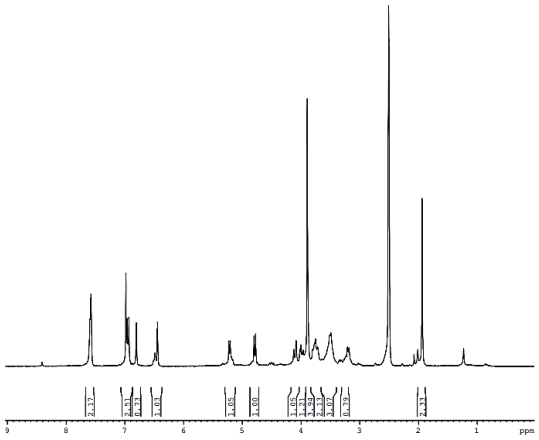


Figura 35. Espectro de RMN de 1H de la fracción BL3-M

Finalmente, se presenta un resumen del diagrama general (ver Figura 36) especificando las fracciones que se utilizaron para aislar a las tres moléculas.

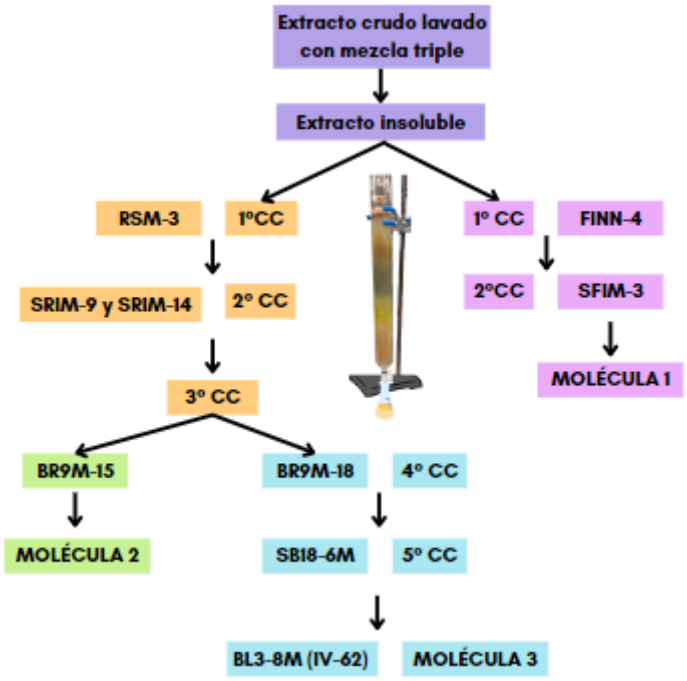


Figura 36. Diagrama general de los aislamientos de metabolitos realizados

Fuente: Elaboración propia

4.3.4 Elucidación estructural de los metabolitos aislados por espectroscopía de RMN 1D y 2D

4.3.4.1 Molécula 1

La elucidación estructural de la primera molécula se analizó a partir de la fracción SFIM-3, de la cual se obtuvieron los espectros 1D y 2D utilizando MeOD como solvente en el espectrómetro RMN Fourier 300 MHz BRUKER de la Universidad de Antioquia.

Con el fin de obtener un primer avistamiento y según la metodología comentada, el espectro de ^{1}H (ver Figura 37) fue útil para identificar las señales de áreas características [81,82] como la zona aromática (6.2-7.7 ppm), posibles azúcares (3.4-4.7 ppm) [100–102], un posible alqueno de tipo trans (5.4 ppm), y posibles grupos metilos y metilenos (1-2.3 ppm). También se observó la presencia de etanol remanente, con el que se utilizó para lavar los tubos de RMN y no llegaron a eliminarse completamente por evaporación. Por ello, la presencia de un pico intenso a 1.3 ppm, característico del carbono primario, y un pico a 3.35 ppm del grupo metileno, encontrándose muy cercana a la señal del solvente deuterado (3.3 ppm). En los grupos aromáticos se visualizó que

un par de dobletes (6.3 y 7.6 ppm) se encontraban acoplados entre sí manifestando un "efecto tejado" en los picos, pudiendo ser una sustitución de tipo "para"; mientras que los demás picos de la zona corresponderían a otro posible anillo aromático con otro tipo de sustitución. Por último, se podría considerar una presencia probable de grupos hidroxilo en los laterales de A, E, G debido a que se estarían ubicando en la zona entre 5-8 ppm, pudiendo también confundirse con posibles impurezas por su muy baja intensidad [82].

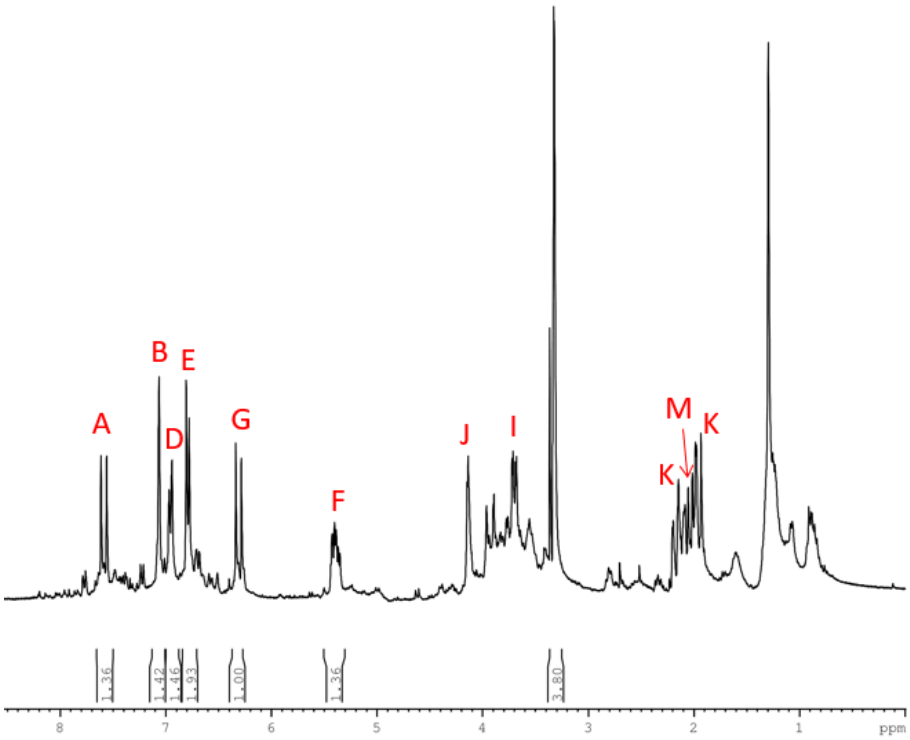


Figura 37. Espectro de RMN de 1H de la molécula 1

Continuando con la determinación de las señales y del grupo funcional al que correspondían, se evaluó el espectro de ^{13}C donde se señaló cada pico por diferentes letras (ver Figura 38), resultando ser 16 carbonos. Se encontraron nuevas señales que indicaban la presencia del carbonilo de un ácido carboxílico (T, 179 ppm), el carbonilo de un éster (S, 168 ppm), un posible alqueno (Q,A, 148 -144 ppm), 5 carbonos ubicados en la zona aromática (P,D,E,G,B, 110-125 ppm) indicando la presencia de 1 anillo aromático, posibles grupos alifáticos (CH_3-$C_{terciario}$, CH_2-$C_{secundario}$) y/o O-CH (N,J,I,F 70–80 pm; y M,K 41–38 ppm). En paralelo, se obtuvo el espectro DEPT 135 (ver Figura 38) para asociar

los tipos de carbonos del espectro de ^{13}C, donde las señales de los primarios ($-CH_3$) y terciarios (CH) se ubican para arriba, de los secundarios ($-CH_2$) para abajo y de los cuaternarios (-C) no se observan. Al superponer ambos espectros se reconoció que los carbonilos del ácido carboxílico y del éster eran de tipo cuaternario ya que sus señales no se visibilizaban en el DEPT; de manera similar, los picos Q, P, N. Las señales M y K se encontraban direccionados hacia abajo siendo identificados como carbonos secundarios; mientras que las demás señales podrían referirse a carbonos terciarios o primarios.

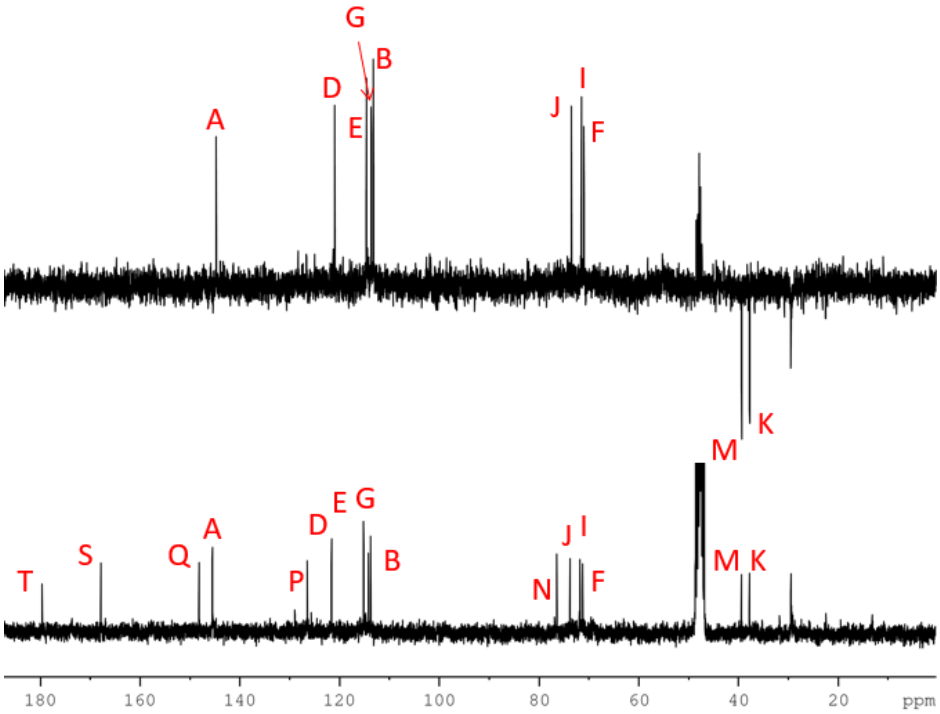


Figura 38. Espectro de RMN de DEPT 135 (arriba) y ^{13}C (abajo) de la molécula 1

Entonces, para adquirir una mayor información, confirmar las señales identificadas anteriormente, y determinar la estructura de la molécula se obtuvieron los espectros bidimensionales HMBC, HSQC y COSY. El primero asocia los núcleos hidrógeno con los carbonos que se encuentran a dos o tres enlaces de distancia de aquél; el segundo, los núcleos hidrógenos y carbonos directamente relacionados; y el último, el acoplamiento de espines de hidrógeno que están a dos o tres enlaces de distancia.

El espectro HSQC (ver Figura 39) confirmó la relación directa entre los carbonos y protones de la molécula. El ácido carboxílico y el éster, al ser carbonos cuaternarios,

no se presentaban en el espectro; por eso, la escala máxima del eje vertical (^{13}C) fue hasta 150 ppm indicando los carbonos primarios y terciarios hacia arriba, y los secundarios hacia abajo, similar al DEPT. Los carbonos A, D, E, G, B (144, 123, 115, 114.5, 114 ppm en ^{13}C) tienen asociados, en el eje horizontal (^{1}H), un doblete (7.6, 7, 6.8, 6.3, 7.1 ppm) señalando la presencia de un hidrógeno vecino; el carbono J (74 ppm ^{13}C) es un multiplete (3.7 ppm); el carbono I (72 ppm ^{13}C) pareciera ser un triplete (4.1 ppm) con 2 posibles hidrógenos vecinos. El carbono F (71 ppm ^{13}C) parece ser un multiplete (5.4 ppm) no definido pudiendo tener varios hidrógenos vecinos; de forma similar, los carbonos M y K (39 y 37ppm ^{13}C). A esta información, se la puede complementar con las integrales registradas en el espectro de ^{1}H, donde las señales del hidrógeno de los carbonos A, B, D, E, J, F y G representan la posesión de un solo hidrógeno. Con el COSY (ver Figura 40) se observaron los acoplamientos ^{1}H-^{1}H siendo las señales A y G (7.6 y 6.3 ppm), F e I (5.4 y 3.7 ppm), F y M (5.4 y 2.15 ppm), J y K (4.1 y 2.2 ppm), y J e I (4.1 y 3.7 ppm).

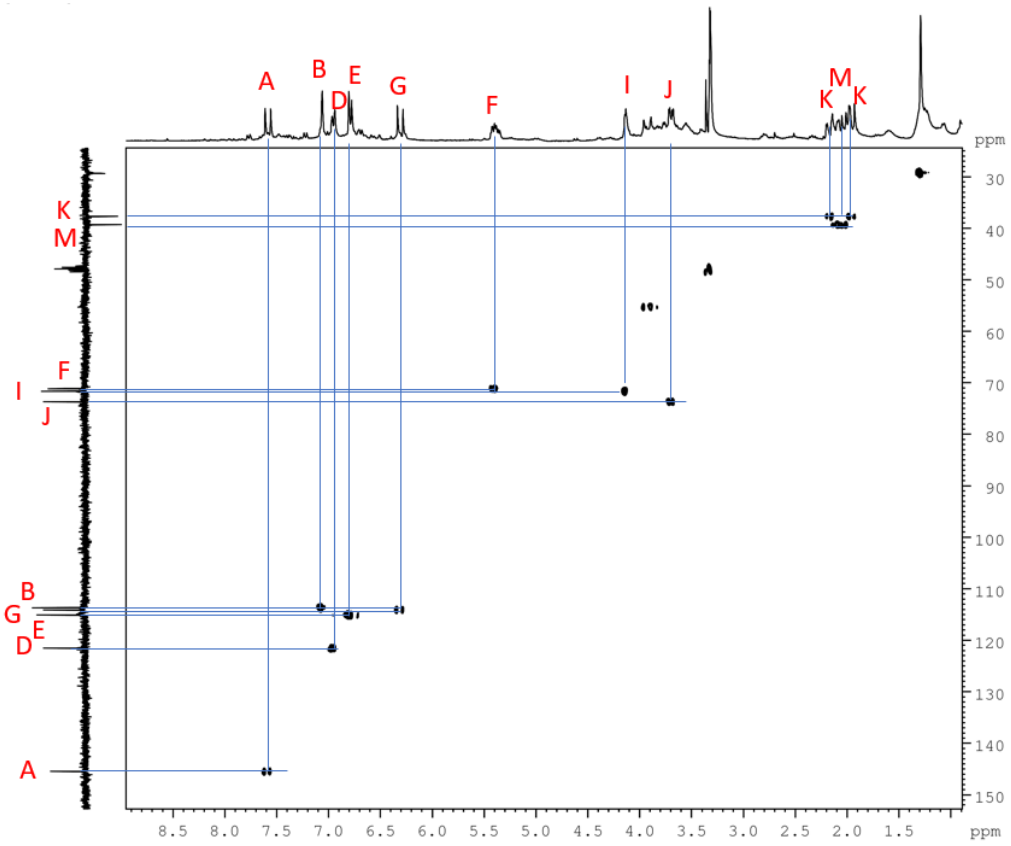


Figura 39. Espectro de RMN de HSQC de la molécula 1

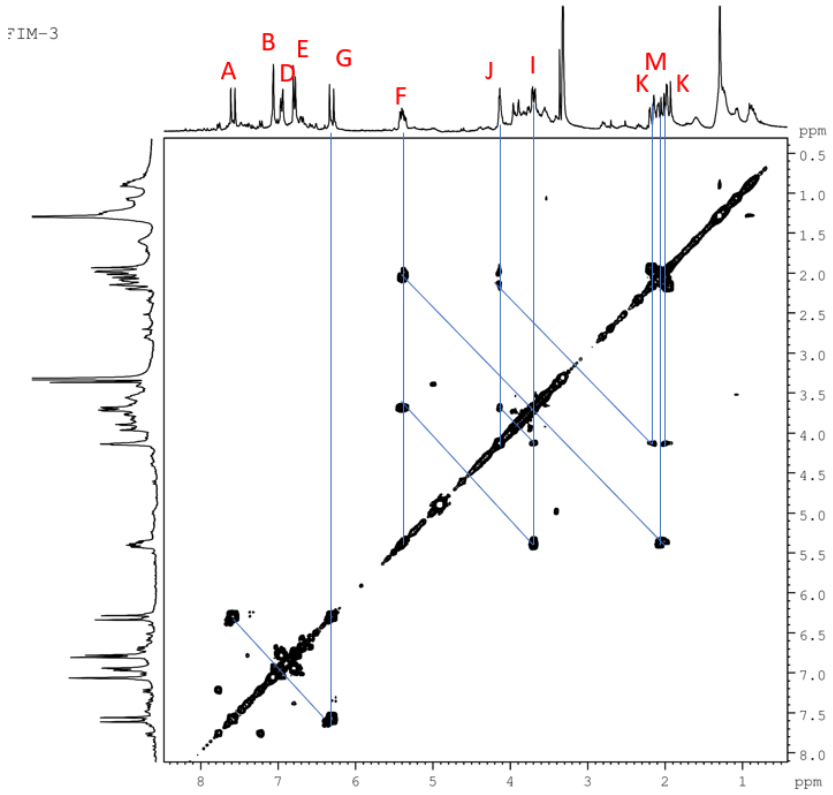


Figura 40. Espectro de RMN de COSY de la molécula 1

Con la información recibida se elaboró la Tabla 11, donde se fueron definiendo las características de cada señal de carbono. Las señales A y G compartían valores de desplazamientos similares a los aromáticos y alquenos, de manera que se debía determinar a qué grupo funcional pertenecían. El COSY indica que son vecinos entre sí, donde cada uno está enlazado a un carbono cuaternario, configurándose como un alqueno. Por lo que el anillo aromático estaría conformado por las señales P, Q (cuaternarios), D, E y B (primarios), donde una de ellas se encontraría duplicada por ser similar y cercana en desplazamiento. Con el COSY también se ubican las señales de la zona de alifáticos armando la cadena M-F-J-I-K.

Tabla 11. Señales identificadas de los espectros de RMN de la molécula 1

Fuente: Elaboración propia

Letra	$\delta^{13}C$ (ppm)	C propuesto	$\delta^{1}H$ (ppm)	Integral	Multiplicidad	H propuesto
T	179.0	COOH	-	-	-	-C-

S	168.0	éster	-	-	-	-C-
A	144.0	alqueno	7.6	1H	doblete	-CH
G	114.5	alqueno	6.3	1H	doblete	-CH
P	125.0	aromático	-	-	-	-C-
Q	148.0	aromático	-	-	-	-C-
D	123.0	aromático	7.0	1H	doblete	-CH
E	115.0	aromático	6.8	1H	doblete	-CH
B	114.0	aromático	7.1	1H	doblete	-CH
N	80.0	alifático	-	-	-	-C-
J	74.0	alifático	3.7	1H	multiplete	-CH
I	72.0	alifático	4.1	-	triplete	-CH
F	71.0	alifático	5.4	1H	multiplete	-CH
M	41.0	alifático	2.0	-	multiplete	$-CH_2$
K	38.0	alifático	2.2 y 2.0	-	multiplete	$-CH_2$

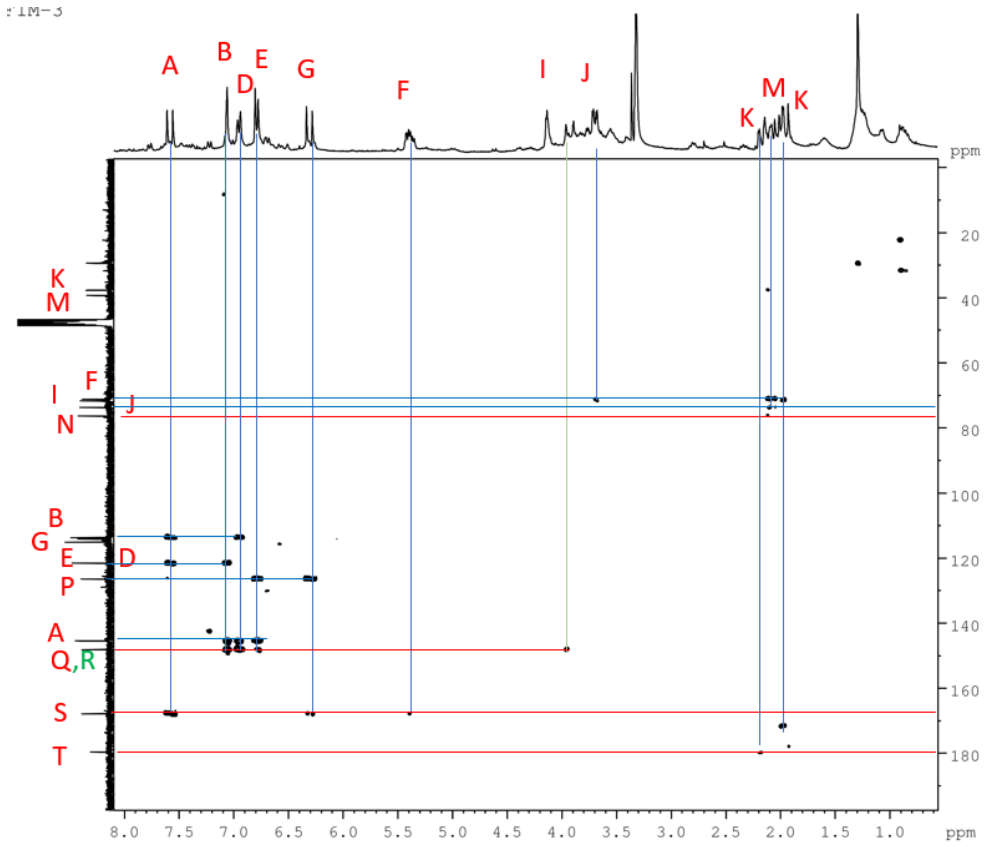


Figura 41. Espectro de RMN de HMBC de la molécula 1

Con el HMBC (ver Figura 41) se comienza a unir las estructuras encontradas para determinar la molécula propuesta, para la cual se armó la Tabla 12. Empezando con el anillo aromático, mediante P se unirá con el resto de la molécula, Q se encuentra en la posición *para* y a su costado está duplicado bajo la letra R, E y B están opuestos entre sí por el "efecto tejado". El puente que une las dos estructuras de la molécula está conformado por el doble enlace (A y G); unido a este se ubica el éster, el cual está enlazado a un ciclo hexano, siendo N el que está ligado al ácido carboxílico cerrando la cadena anteriormente identificada. Por otra parte, se observa que el ácido carboxílico, T, no presenta una relación directa con su respectivo hidrógeno (ver Figura 41). Esto puede haber ocurrido por una posible interacción (proceso de intercambio) entre el deuterio del solvente deuterado (MeOD) con el hidrógeno, lo cual promovería su desaparición como señal en el espectro de RMN ^{1}H; pero siendo aún observable en el espectro de ^{13}C a 179 ppm. Se puede corroborar que en la literatura [103] tampoco han reportado el respectivo valor experimental en el espectro de RMN ^{1}H, utilizando el mismo solvente deuterado y habiendo aislado el compuesto de un producto natural también. De igual manera sucede con los grupos hidroxilos del resto de la molécula. Es posible que haya ocurrido un intercambio con el deuterio del solvente durante el análisis, de manera que no lograron ser apreciables en el espectro de hidrógeno; pero igual se identificaron los carbonos que se encuentran unidos a los grupos hidroxilos u oxígenos en el anillo alifático entre 50-90 ppm (F, J, I, N) y en el aromático 150-160 ppm (Q, R) [81], donde los valores variarían según el entorno químico. De todas formas, habría sido más preciso confirmar la presencia, si se hubiera tenido las ampliaciones del espectro en las zonas de las posibles señales de hidroxilo. Por otra parte, comparando con resultados de ^{13}C de otros autores [103], la parte del ácido quínico de la molécula, la identificaron según: los dos metilenos presentes (M,K) ubicados a 41.5 y 36.7 ppm; los carbonos F, I, J a 68.3, 73.0 y 74.8 ppm respectivamente; el carbono cuaternario N a 75.4 ppm y el carbono del ácido carboxílico a 178.3 ppm. Estos datos son relativamente cercanos a los obtenidos en el espectro de RMN ^{13}C de SFIM-3.

Tabla 12. Desplazamientos químicos identificados de los espectros HSQC y HMBC (RMN 2D) de la molécula 1

Fuente: Elaboración propia

HSQC			HMBC			
^{13}C enlazado directamente	**δ^{13}C (ppm)**	**δ^{1}H (ppm) ^{1}H-^{13}C**	**^{13}C > 2 enlaces**	**δ^{13}C (ppm)**	**δ^{1}H (ppm) > 2 enlaces**	**Distancia a enlaces**
A	144.0	7.6	T	179.0	2.2 (^{1}H $_{K1}$)	3
G	114.5	6.3	S	168.0	7.6 (^{1}H $_{A}$) 6.3 (^{1}H $_{G}$) 5.4 (^{1}H $_{F}$)	3 2 3
D	123.0	7.0	A	144.0	7.1 (^{1}H $_{B}$) 7.0 (^{1}H $_{D}$) 6.8 (^{1}H $_{E}$)	3 3 4
E	115.0	6.8	P	125.0	6.8 (^{1}H $_{E}$) 6.3 (^{1}H $_{G}$)	3 3
B	114.0	7.1	Q	148.0	7.1 (^{1}H $_{B}$) 7.0 (^{1}H $_{D}$) 6.8 (^{1}H $_{E}$)	3 3 2
J	74.0	3.7	D	123.0	7.6 (^{1}H $_{A}$) 7.1 (^{1}H $_{B}$)	3 3
I	72.0	4.1	B	114.0	7.6 (^{1}H $_{A}$) 7.0 (^{1}H $_{D}$)	3 3
F	71.0	5.4	N	80.0	2.0 (^{1}H $_{M}$)	2
M	41.0	2.0	J	74.0	2.0 (^{1}H $_{M}$)	3
K	38.0	2.2 y 2.0	I	72.0	3.7 (^{1}H $_{J}$) 2.0(^{1}H $_{K2}$)	2 2
			F	71.0	2.0 (^{1}H $_{M}$)	2

Por lo tanto, la estructura molecular propuesta podría corresponder al ácido clorogénico (ver Figura 42).

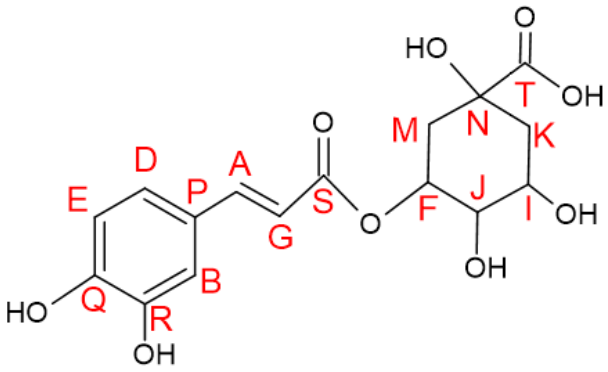


Figura 42. Estructura propuesta de la molécula 1

Fuente: Elaboración propia

4.3.4.2 Molécula 2

La segunda molécula aislada se recuperó de la fracción BR9M-15 utilizando MeOD para su análisis por RMN. Su espectro de ^{1}H (ver Figura 43) refleja señales similares a la de la Molécula 1, presentando la zona aromática (6.3-7.7 ppm), un posible alqueno (5.2 ppm), posibles grupos alifáticos como -CH_3 (1.1 y 2.8 ppm), una zona más grande de azúcares (3.2-4.5 ppm) las cuales se debería corroborar si están o no enlazadas con la molécula [81,82]; y posibles protones anoméricos de los azúcares (4.4-5.2 ppm) [104]. Nuevamente se observa un posible efecto “tejado” entre los picos 6.3 y 7.6 ppm, 7 y 6.6 ppm dentro de la zona aromática; así como el etanol residual utilizado para lavar los tubos de RMN y que no fue eliminado por completo. Este manifiesta señales a 1.1 y 3.3 ppm aproximadamente, los cuales podrían solaparse con un posible pico de la molécula generando una saturación de las señales y, por ende, que no se logre visualizar el valor de la integral del pico a 1.1 ppm (V) siendo de alta intensidad; otra causa podría ser a nivel operario, donde al momento de delimitar la integral no se consideró a la señal V, creyendo que era una posible impureza debido a que el metabolito aislado no fue completamente purificado. Por otra parte, se observan picos de muy baja intensidad que se encuentran en el lateral de los picos T, I y K, pudiendo probablemente corresponder a posibles grupos hidroxilos, que al ser analizados en MeOD y al haber interactuado con este, se redujeron en intensidad.

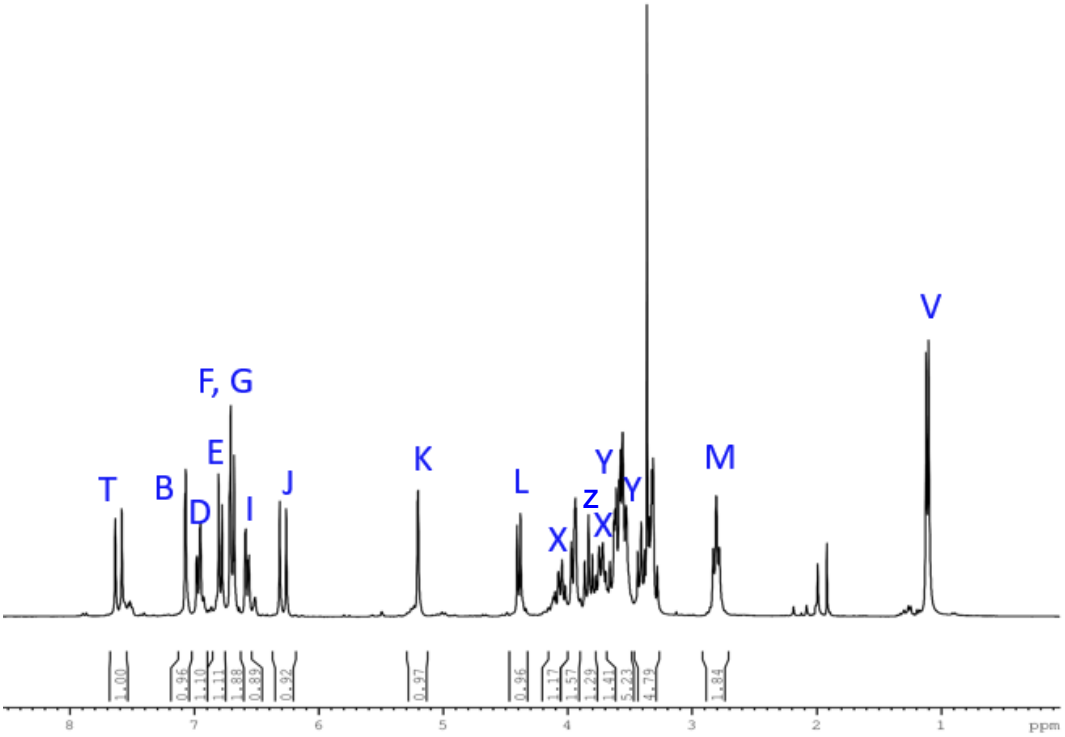


Figura 43. Espectro de RMN de ^{1}H de la molécula 2

En el espectro ^{13}C (ver Figura 44) se diferencian los carbonos que comparten la estructura de la Molécula 1, y los nuevos. De igual forma, se asignaron nuevas letras a las señales características. Se identifica el éster del ácido cafeico de la Molécula 1, donde U (167 ppm) es el carbono del éster, el doble enlace lo conforma A y J (149 y 113 ppm), y el anillo aromático N, D, E, S, T y B (126, 122, 116, 146, 147 y 114 ppm). Por otro lado, las señales P, F/G, I, Q y R podrían representar a otro anillo aromático (130, 115, 120, 145, 143 ppm); mientras que, posibles grupos alifáticos (CH_3-$C_{terciario}$, CH_2-$C_{secundario}$) y/o O-CH podrían ser Z, X, Y, M y V (80.5, 71, 61, 35 y 17 ppm). A través del DEPT (ver Figura 44) se determinaron si eran carbonos cuaternarios, secundarios o primarios/terciarios. Los picos T, D, I, E, F/G, B, J, L, K, Z, y V son carbonos que podrían ser primarios o terciarios; mientras que X, Y y M refieren a carbonos secundarios; por último, U, A, S, R, Q, P y N son cuaternarios.

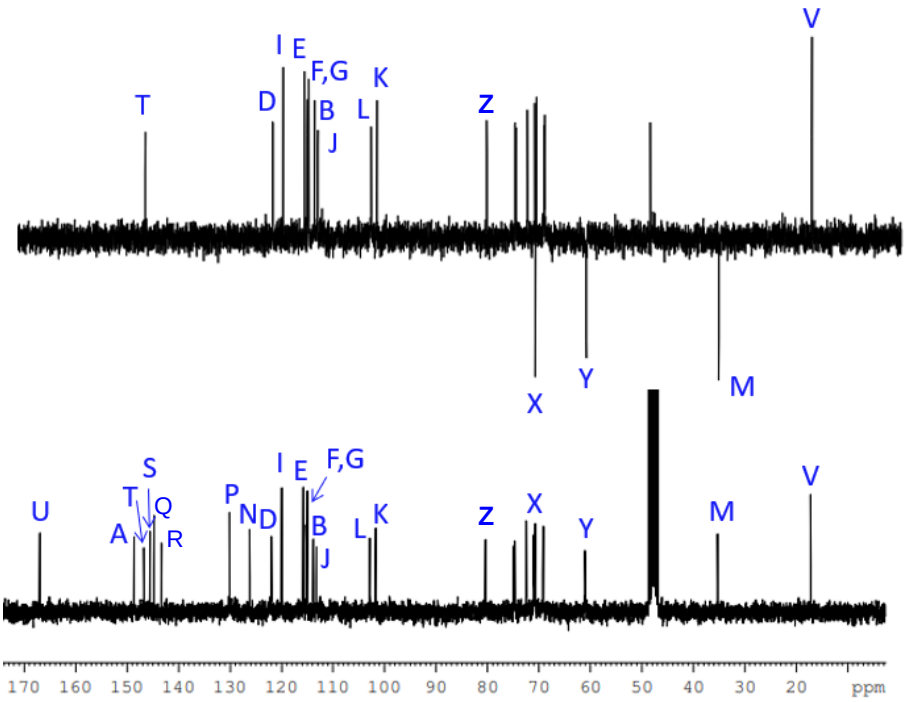


Figura 44. Espectro de RMN de DEP 135 (arriba) y ^{13}C (abajo) de la molécula 2

Con ayuda del HSQC (ver Figura 45), se asocian las señales de los carbonos y los hidrógenos, con los que están enlazados; esta información fue ubicada en la Tabla 13. A través del COSY (ver Figura 46) se observan los acoplamientos de las señales T y J (7.6 y 6.3 ppm), T y D (7.6 y 6.95 ppm), X_1 y M (4.1 y 2.8 ppm), X_2 y M (3.75 y 2.8 ppm); y junto con la información de las integrales y las multiplicidades del espectro ^{1}H se logra completar la anterior tabla.

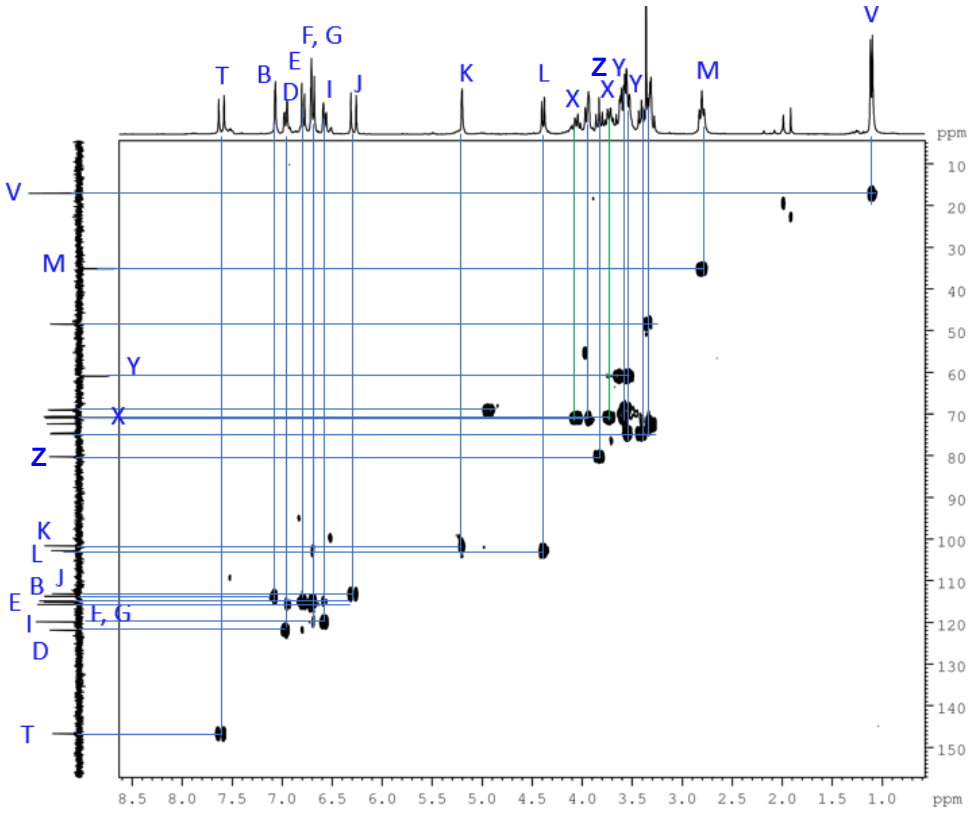


Figura 45. Espectro de RMN de HSQC de la molécula 2

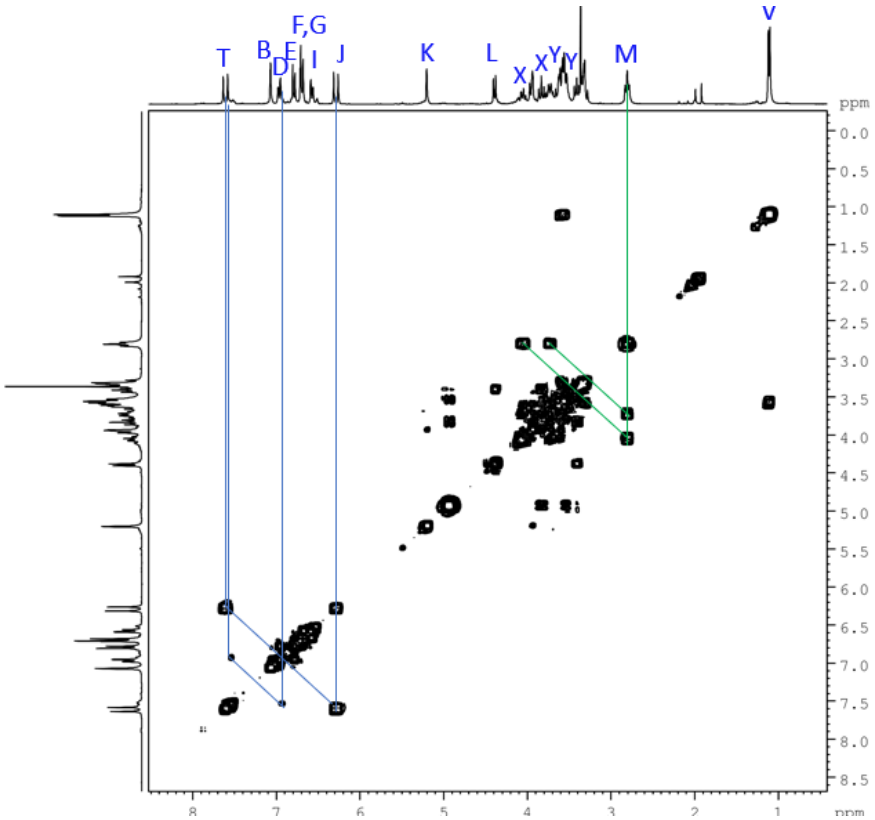


Figura 46. Espectro de RMN de COSY de la molécula 2

Tabla 13. Señales identificadas de los espectros de RMN (1D) de la molécula 2

Fuente: Elaboración propia

Letra	$\delta^{13}C$ (ppm)	C propuesto	$\delta^{1}H$ (ppm)	Integral	Multiplicidad	H propuesto
U	167.00	éster	-	-	-	-C-
T	149.00	alqueno	7.60	1H	doblete	-CH
J	113.00	alqueno	6.30	1H	doblete	-CH
N	126.00	aromático	-	-	-	-C-
D	122.00	aromático	6.95	1H	doblete	-CH
E	116.00	aromático	6.80	1H	doblete	-CH
S	146.00	aromático	-	-	-	-C-
A	147.00	aromático	-	-	-	-CH
B	114.00	aromático	7.05	1H	doblete	-CH
L	103.00	alifático	4.40	1H	doblete	-CH
Z	80.50	alifático	3.80	1H	doblete	-CH
Y_1, Y_2	61.00	alifático	3.60 y 3.55	-	multiplete	$-CH_2$
K	102.00	alifático	5.20	1H	doblete	-CH
V	17.00	alifático	1.10	-	doblete	$-CH_3$
X_1, X_2	71.00	alifático	4.10 y 3.75	1H, 1H	multiplete	$-CH_2$
M	35.00	alifático	2.80	2H	triplete	$-CH_2$
P	130.00	aromático	-	-	-	-C-
F/G	115.00	aromático	6.70	2H	doblete	-CH
I	120.00	aromático	6.60	1H	multiplete	-CH
Q	145.00	aromático	-	-	-	-C-
R	143.00	aromático	-	-	-	-C-

Como se había comentado, parte de la molécula 2 propuesta se encuentra conformada por el éster del ácido cafeico reconocido en la molécula 1; con el espectro HMBC (ver Figura 47) se busca construir el resto de la molécula y se elabora la Tabla 14.

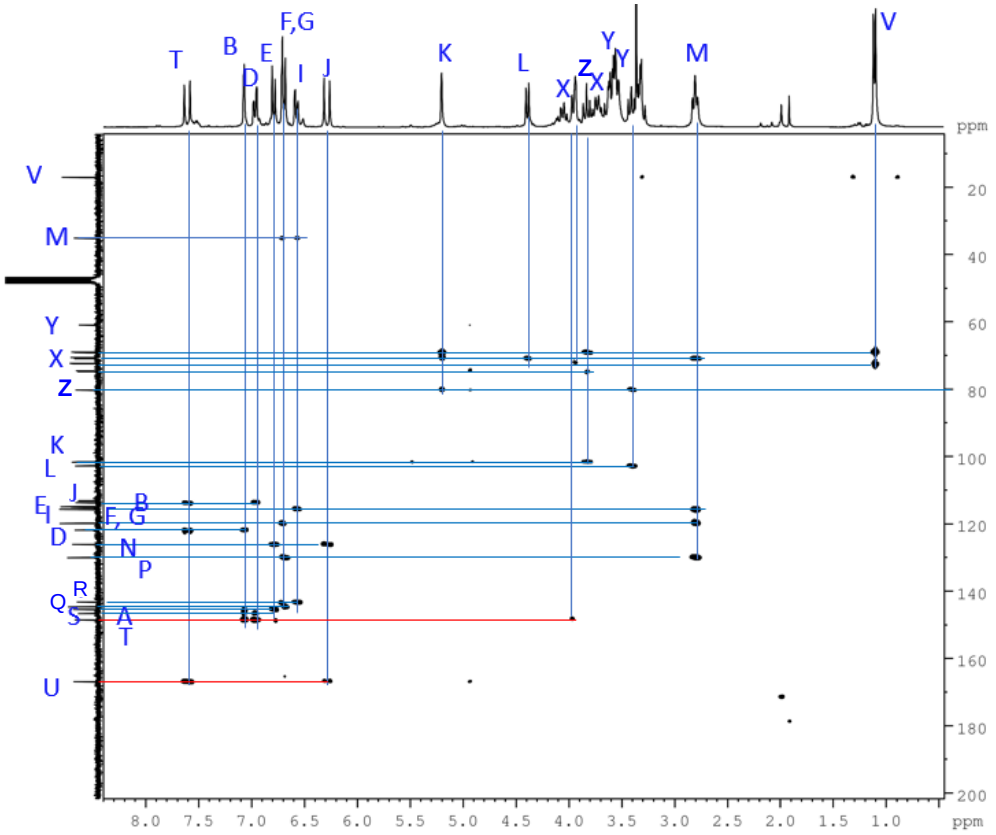


Figura 47. Espectro de RMN de HMBC de la molécula 2

El carbonilo del ácido cafeico se convertiría en un éster al unirse posiblemente los carbonos de la zona de azúcares. La ramnosa se destacó por el C-1 de la posición α (K) ubicándose a 102 ppm, valor similar al referencial (104.4 ppm) [105] su grupo metilo (V) alrededor de los 17 ppm [105–107] (^{13}C) y 1.1 ppm (^{1}H) [106]. Asimismo, L y K (102 y 103 ppm) son los carbonos de mayor desplazamiento que los demás de sus estructuras, ya que están afectados por el gran efecto inductivo donde ambos comparten un mismo entorno químico, estando enlazados a dos oxígenos y a un grupo hidroxilo. Mientras que, para la glucosa, Y y Z (61 y 80.5 ppm) se sitúan en valores cercanos (60.5-100.36 ppm) a los reportados que permiten determinar su presencia, así como del hidrógeno de Y (3.6 y 3.55 ppm) es similar al de la literatura (3.72 ppm) [108]; también se comparó la señal de Y (61 ppm), así como de sus hidrógenos (3.6 y 3.55 ppm) con respecto a valores computacionales (61.79; 3.67-3.74 ppm respectivamente) [109]. El carbono a 80 ppm posiblemente corresponda al C-3 de la glucosa, debido a que sería la siguiente señal con desplazamiento mayor debido a su enlace con el oxígeno de la ramnosa; asimismo en el

HMBC se corrobora el acoplamiento entre Z y K. Por otro lado, del COSY se confirma el enlace entre X y M, donde este último está relacionado con F/G e I según el HMBC, señalando que el otro anillo aromático, integrado por F/G, Q, R, I y P, está unido a él. Mientras tanto, con respecto a los grupos hidroxilos de la molécula, estaría posiblemente ocurriendo el mismo fenómeno de intercambio debido al solvente deuterado utilizado, MeOD. De manera que, en el espectro de RMN ^{1}H se dificulta la identificación de estos picos, más no los correspondientes al espectro de RMN ^{13}C. En la zona de los 50-90 ppm (ver Figura 40) se observa una variedad de señales que podrían pertenecer a los carbonos alifáticos de los azúcares unidos a grupos hidroxilo. Mientras que, los -OH de los carbonos aromáticos se estarían ubicando aproximadamente 150-160 ppm; valor que varía según el entorno químico de la molécula, como podría ocurrir en este caso, donde S, A, Q y R se ubican relativamente cerca (140-150 ppm). Según la literatura [110,111], los carbonos unidos a grupos hidroxilo se localizaron entre 70-76 ppm; estas señales son observables en el espectro de RMN ^{13}C (ver Figura 44), confirmando su presencia. De todas formas, se habría podido realizar un análisis más preciso si se hubiera adquirido ampliaciones de las regiones con señales de baja intensidad o acoplamiento de las mismas.

Tabla 14. Desplazamientos químicos identificados en los espectros HSQC y HMBC (RMN 2D) de la molécula 2

Fuente: Elaboración propia

HSQC			HMBC			
^{13}C enlazado directamente	**$\delta^{13}C$ (ppm)**	**$\delta^{1}H$ (ppm) ^{1}H-^{13}C**	**^{13}C > 2 enlaces**	**$\delta^{13}C$ (ppm)**	**$\delta^{1}H$ (ppm) > 2 enlaces**	**Distancia a enlaces**
T	149.00	7.60	**U**	167.00	7.60 ($^{1}H_{T}$)	3
					6.30 ($^{1}H_{J}$)	2
J	113.00	6.30	**T**	149.00	7.05 ($^{1}H_{B}$)	3
					6.95 ($^{1}H_{D}$)	3
					6.80 ($^{1}H_{E}$)	4
D	122.00	6.95	**J**	113.00	7.60 ($^{1}H_{T}$)	2
					6.95 ($^{1}H_{D}$)	4
E	116.00	6.80	**N**	126.00	6.80 ($^{1}H_{E}$)	3
					6.30 ($^{1}H_{J}$)	3

B	114.00	7.05	**D**	122.00	7.60 (^1H_T) 7.05 (^1H_B)	3 3
L	103.00	4.40	**I**	120.00	2.80 (^1H_M)	4
Z	80.50	3.80	**Z**	80.50	5.20 (^1H_K)	3
Y_1, Y_2	61.00	3.60 y 3.55	**S**	146.00	7.05 (^1H_B) 6.80 (^1H_E)	3 2
K	102.00	5.20	**A**	147.00	6.95 (^1H_D)	4
V	17.00	1.10	**B**	114.00	7.60 (^1H_T) 6.95 (^1H_D)	3 3
X_1, X_2	71.00	4.10 y 3.75	**L**	102.00	2.90	-
M	35.00	2.80	**K**	103.00	3.90	-
F/G	115.00	6.70	**X_1, X_2**	71.00	5.20 (^1H_K) 4.40 (^1H_L) 2.80 (^1H_M)	7 6 2
I	120.00	6.60	**M**	35.00	6.70 ($^1H_{F/G}$) 6.60 (^1H_I)	3 4
			P	130.00	6.70 ($^1H_{F/G}$) 2.80 (^1H_M)	2 2
			F/G	115.00	6.70 ($^1H_{F/G}$) 2.80 (^1H_M)	3 3
			Q	145.00	6.70 ($^1H_{F/G}$)	3
			R	143.00	6.70 ($^1H_{F/G}$) 6.60 (^1H_I)	2 3

Por lo tanto, la segunda molécula propuesta corresponde al verbascósido (también conocido como acteósido) (ver Figura 48). Adicionalmente, en la Tabla 15 se registraron los desplazamientos de RMN ^{13}C del metabolito aislado comparados con los que han sido reportados en la literatura [110,111], donde ambos resultaron ser similares entre sí; de manera que se confirma la propuesta de la molécula aislada.

Tabla 15. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C experimentales y reportadas en artículos

Letra	**$\delta^{13}C$ (ppm) experimental**	**$\delta^{13}C$ (ppm) reportada** [111]	**$\delta^{13}C$ (ppm) reportada** [110]
U	167.0	168.4	166.8
T	149.0	148.2	146.6

J	113.0	114.8	115.0
N	126.0	127.8	126.2
B	114.0	115.3	114.8
A	147.0	147	145.4
S	146.0	149.9	148.4
E	116.0	116.6	115.6
D	122.0	123.4	121.8
L	103.0	104.3	101.6
K	102.0	103.2	102.7
Y	61.0	62.5	60.9
V	17.0	18.6	17.0
X	71.0	72.4	72.3
M	35.0	36.7	35.1
P	130.0	131.6	130.0
F,G	115.0	117.2/121.4	121.8/113.7
R	143.0	146.3	144.7
Q	145.0	144.8	143.2
I	120.0	116.4	115.0

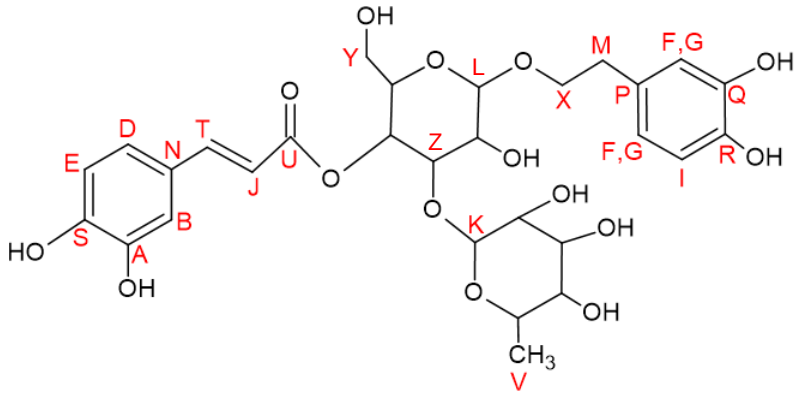


Figura 48. Estructura propuesta de la molécula 2

Fuente: Elaboración propia

4.3.4.3 Molécula 3

Finalmente, la molécula 3 se analizó a partir de la fracción BL3-8M (IV-62), utilizando DMSO. En el espectro de ^{1}H (ver Figura 49), se observaron señales en la zona

aromática (6.4-7.6 ppm), posibles protones anoméricos (4.7-5.2 ppm), zona de azúcares (3.1-4.2 ppm), posibles grupos alifáticos (1.8-2.2 ppm) [81,82] y del solvente deuterado utilizado (2.5 ppm) [81].

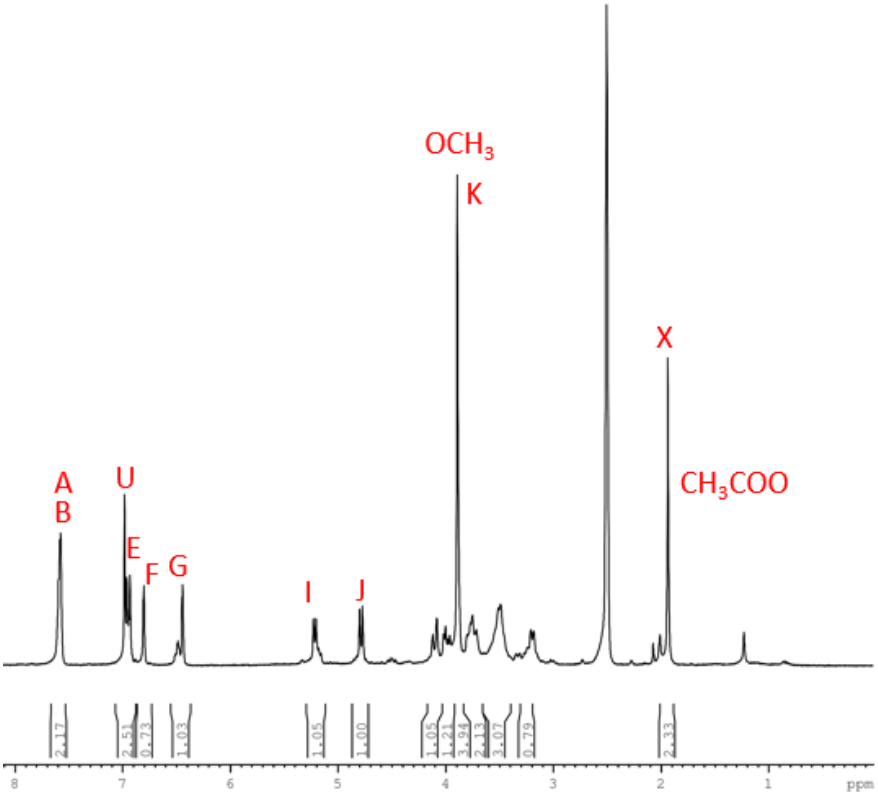


Figura 49. Espectro de RMN de ^{1}H de la molécula 3

En el espectro de ^{13}C (ver Figura 50) se asignan letras a las señales significativas, observando un posible ácido carboxílico o aldehído o cetona (H, 182 ppm), un posible éster (T, 171 ppm), una zona aromática y/o heteroaromática y/o dobles enlaces (N,M,Q,L,R,P,S,B,E,A,D,J,U,G,I,F, 95-165 ppm), azúcares (55-83 ppm), y algún grupo alifático (X, 21 ppm). Del DEPT 135 (ver Figura 50), se registró que las señales B, E, A, J, U, G, I, F, K y X corresponden a carbonos primarios o terciarios; mientras que H, T, N, M, Q, L, R, P, S y D son carbonos cuaternarios.

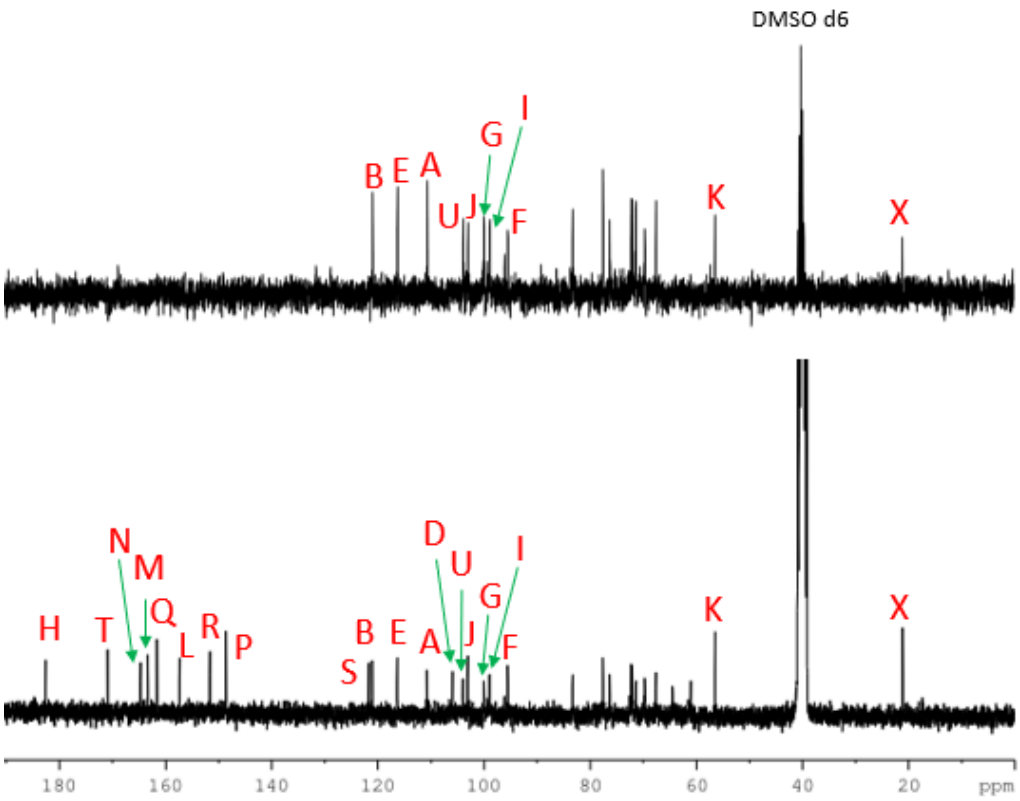


Figura 50. Espectro de RMN de DEPT 135 (arriba) y ^{13}C (abajo) de la molécula 3

Del espectro HSQC (ver Figura 51), se identifican los enlaces directos de los carbonos que no son cuaternarios con sus respectivos hidrógenos, y junto con las integrales y multiplicidad relacionadas se logra completar la Tabla 16 con la información adquirida. A partir de esto, se determina que H no puede ser ni ácido carboxílico ni aldehído ya que no le corresponde algún protón, de manera que se refiere a una cetona; y además los picos de la zona aromática tampoco manifiestan alguna integral con 2 hidrógenos señalando que ninguno era un alqueno, por ende, son aromáticos o heteroaromáticos. K se refiere a un grupo metoxilo por sus desplazamientos característicos y cumple con la presencia de 3 hidrógenos, cuyo singlete se ubica entre 3.3-4 ppm y el carbono, entre 50-90 ppm según tablas de la literatura [82]. Del COSY (ver Figura 52), se obtuvo que A y B se encuentran acoplados con E; F con G; I, J y K con protones de la zona de azúcares (3 y 3.2 ppm).

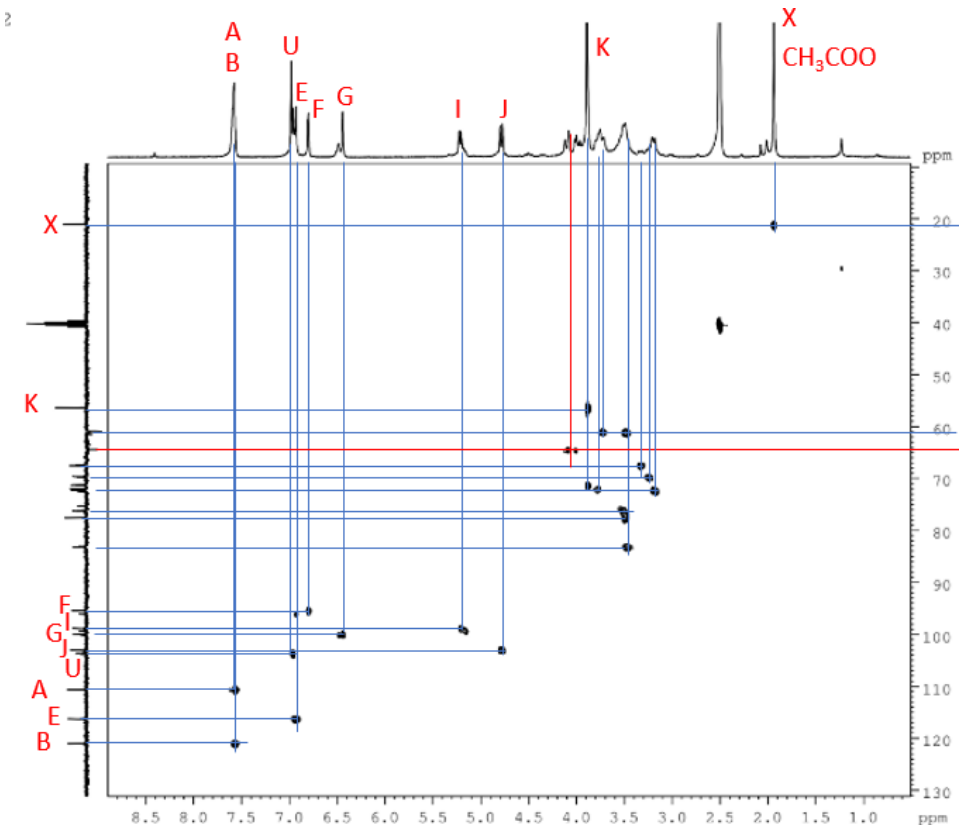


Figura 51. Espectro de RMN de HSQC de la molécula 3

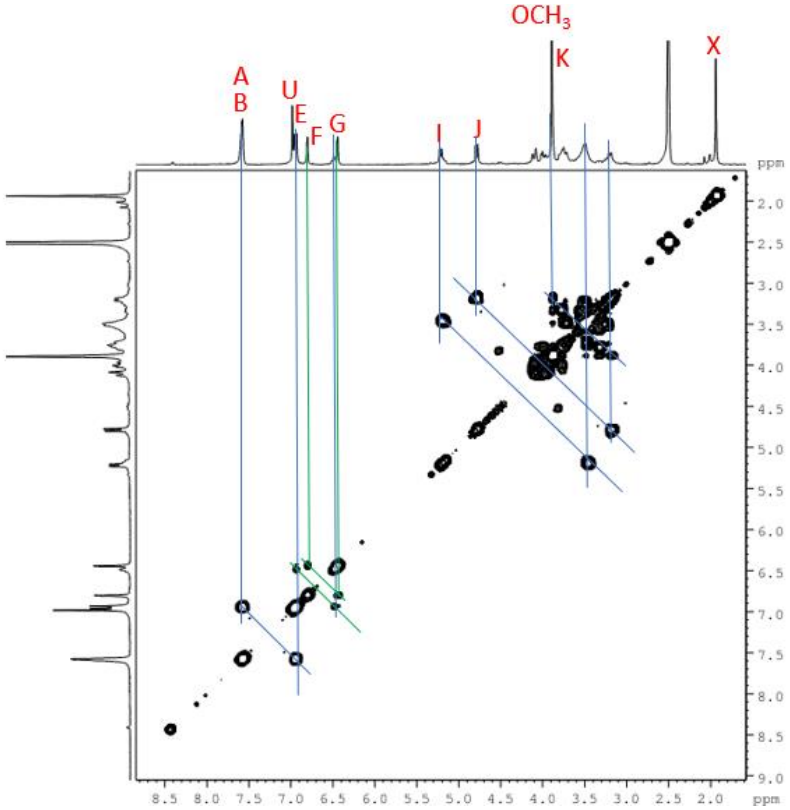


Figura 52. Espectro de RMN de COSY de la molécula 3

Tabla 16. Señales identificadas de los espectros de RMN de la molécula 3

Fuente: Elaboración propia

Letra	$\delta^{13}C$ (ppm)	C propuesto	$\delta^{1}H$ (ppm)	Integral	Multiplicidad	H propuesto
H	182	cetona	-	-	-	-C-
D	106.00	aromático/ heteroátomo	-	-	-	-C-
U	104.00	aromático/ heteroátomo	7.00	1H	singlete	-CH
Q	161.50	aromático/ heteroátomo	-	-	-	-C-
R	151.50	aromático/ heteroátomo	-	-	-	-C-
M	163.00	aromático	-	-	-	-C-
G	100.00	aromático	6.45	1H	singlete	-CH
L	157.00	aromático	-	-	-	-C-
F	95.00	aromático	6.80	1H	singlete	-CH
T	171.00	éster	-	-	-	-C-
X	21.00	alifático	1.95	3H	singlete	$-CH_3$
J	103.00	azúcar	4.80	1H	doblete	-CH
I	99.00	azúcar	5.20	1H	doblete	-CH
K	56.00	metoxilo	3.90	3H	singlete	$-CH_3$
P	148.00	aromático	-	-	-	-C-
N	165.00	aromático	-	-	-	-C-
B	121.00	aromático	7.60	1H	singlete	-CH
E	116.00	aromático	6.95	1H	doblete	-CH
S	122.00	aromático	-	-	-	-C-
A	111.00	aromático	7.60	1H	singlete	-CH

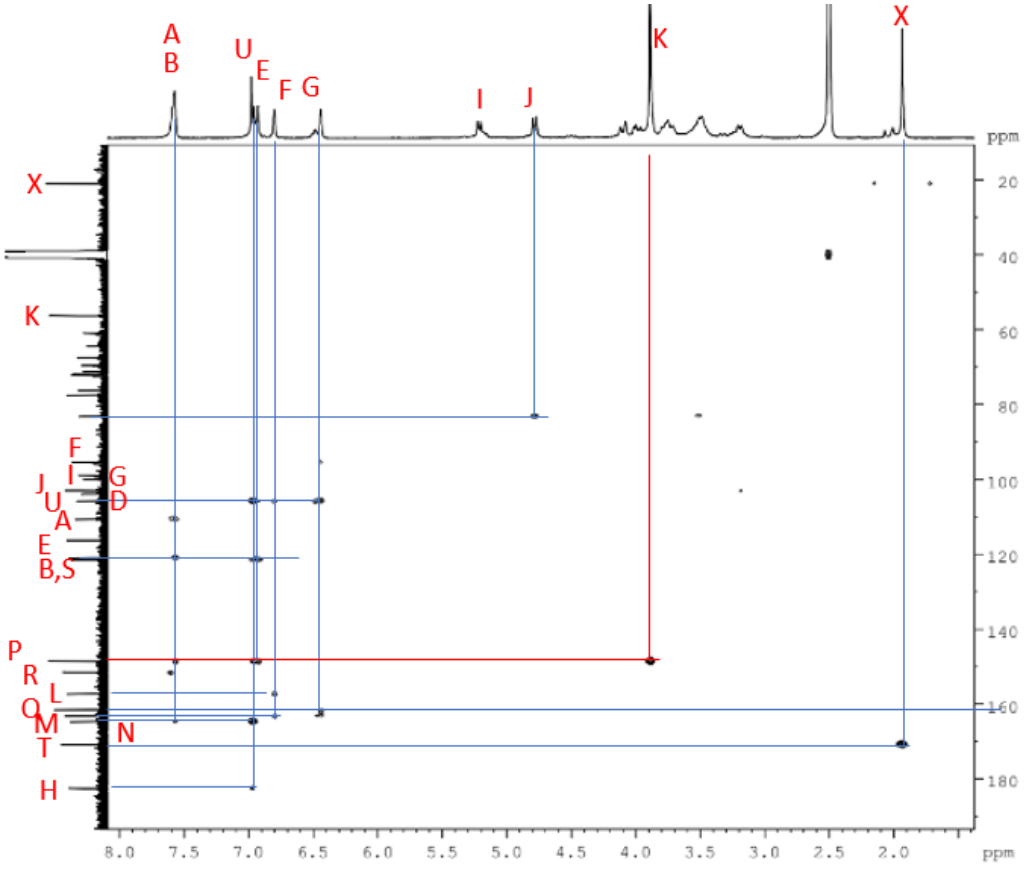


Figura 53. Espectro de RMN de HMBC de la molécula 3

Se construyó la Tabla 17 para registrar las señales que permitieron la identificación de la molécula. Del HMBC (ver Figura 53), las señales de los carbonos de Q y R se diferencian significativamente de D y U, indicando que existe un elemento dentro de la estructura que los desplaza por efecto inductivo; entonces, Q y R se encontrarían unidos a un oxígeno formando un éter. En la misma estructura, U se encuentra acoplado a H (cetona), cuyo desplazamiento (104 ppm) es cercano al de D (106 ppm); ambos carbonos están enlazados a H completando el anillo heteroátomo. Asimismo, D está acoplado a F y G, manifestando la integración de otra estructura, pero de tipo aromática. Entre sus carbonos, se observa que M (163 ppm) tiene un desplazamiento alto en comparación con F (95 ppm) y G (100 ppm), cuya similitud indicaría que sería equidistante a M; con lo cual, M se estaría viendo influenciada por un posible átomo de electronegatividad elevada, como el oxígeno, convirtiéndolo como posible enlace con los azúcares presentes. Por otro lado, A, B, S, E, N señalan acoplamientos entre sí denotando que comparten otra

estructura aromática; siendo P el que determina una posible distancia a la que se encontrarían A y E, los cuales se ubicarían aproximadamente equidistante (111 y 116 ppm respectivamente); asimismo, P se encuentra acoplado con K.

Los azúcares se reconocieron como alosa y 6-O-aceoetil-β-D-glucosa debido a sus picos característicos [112]. Entre los protones anoméricos, I y J (5.2 y 4.8 ppm), se designa que el de mayor desplazamiento debería corresponder al que se encuentre en un entorno químico más electronegativo; lo cual se encontraría en la 6-O-aceoetil-β-D-glucosa, debido a su cercanía a los oxígenos de la estructura y grupos OH de la diosmetina. Esto coincide con la literatura [112], donde el protón anomérico se encuentra entre 5.10-5.17 ppm, después de 5 ppm; mientras que el de la alosa, 4.92-4.94 ppm antes de 5 ppm. Del COSY también se puede confirmar el acoplamiento y posición de I y J con los protones del C-2 de sus estructuras (3.49 y 3.18 ppm), siendo similares a las referenciales (3.60 y 3.25 ppm [112]) donde cumplen con ser una de mayor desplazamiento que la otra. Por otra parte, se observa el acoplamiento entre el grupo acetato del éster (T) con los hidrógenos del metilo X. Los carbonos anoméricos, I y J (99 y 103 ppm) también cumplen en proximidad con los valores referenciales (99.3 y 102.5 ppm [112]). Según el HMBC, el C-2 (83 ppm) de la alosa, donde ocurre el enlace con el otro azúcar, advierte un acoplamiento con el protón anomérico de la misma.

Tabla 17. Desplazamientos identificados en los espectros HSQC y HMBC (RMN 2D) de la molécula 3

Fuente: Elaboración propia

HSQC			HMBC			
^{13}C enlazado directamente	**δ^{13}C (ppm)**	**δ^{1}H (ppm) ^{1}H-^{13}C**	**^{13}C > 2 enlaces**	**δ^{13}C (ppm)**	**δ^{1}H (ppm) > 2 enlaces**	**Distancia a enlaces**
U	104.00	7.00	**H**	182.00	6.95 ($^{1}H_{E}$)	5
G	100.00	6.45	**D**	106.00	6.45 ($^{1}H_{G}$)	5
F	95.00	6.80	**R**	151.50	7.60 ($^{1}H_{A}$) 7.60 ($^{1}H_{B}$)	3 4
X	21.00	1.95	**M**	163.00	6.80 ($^{1}H_{F}$)	2
J	103.00	4.80	**L**	157.00	6.80 ($^{1}H_{F}$)	2
I	99.00	5.20	**T**	171.00	6.80 ($^{1}H_{X}$)	2
K	56.00	3.90	**X**	21.00	1.95 ($^{1}H_{T}$)	2

B	121.00	7.60	**P**	148.00	7.60 (^1H_A)	3
					7.60 (^1H_B)	2
					6.95 (^1H_E)	3
					3.90 (^1H_K)	3
E	116.00	6.95	**N**	165.00	7.60 (^1H_A)	2
					7.60 (^1H_B)	3
					6.95 (^1H_E)	4
A	111.00	7.60	**B**	121.00	7.60 (^1H_A)	4
					6.95 (^1H_E)	2
			S	122.00	7.60 (^1H_A)	2
					7.60 (^1H_B)	3
					6.95 (^1H_E)	2
			A	111.00	7.60 (^1H_B)	4

Finalmente, a la molécula aislada tiene por nombre propuesto diosmetina-7-O-2″-O-[6‴-O-acetil-β-D-alopiranosil-(1 → 2)]-β-D-glucopiranósido (ver Figura 54), la cual aún no ha sido reportada en el género *Stachys* [113]. Por lo tanto, se compararán (ver Tabla 18) los desplazamientos experimentales con moléculas similares al metabolito aislado: Chrysoeriol 7-O-[6‴-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1→ 2)]-β-D-glucopyranoside, que se diferencia en el carbono N (unido a un metilo), P (enlazado a un grupo hidroxilo) y en el carbono G (enlazado a un grupo hidroxilo) [114]; y la molécula stachyspinoside, que presenta los mismos sustituyentes en N y P de la molécula anterior, pero G solo está enlazado a un H resultando más parecido al metabolito aislado [115]. Los desplazamientos de N y P no fueron considerados ya que no generan un entorno químico similar al experimental. En consecuencia, los valores registrados manifiestan valores muy cercanos entre sí, a excepción de los carbonos correspondientes al anillo B de la flavanona, los cuales sí presentan una ligera diferencia; por lo tanto, se confirma la compatibilidad de la propuesta estructural de la molécula 3.

Tabla 18. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN 13C del metabolito aislado con los registrados en la literatura.

Letra	**δ^{13}C (ppm) experimental**	**δ^{13}C (ppm) reportada** [115]	**δ^{13}C (ppm) reportada** [114]
R	151.5	165.2	164.2

U	104.0	104.2	102.6
H	182.0	182.8	182.0
D	106.0	106.1	105.4
L	157.0	157.8	156.8
F	95.0	95.8	99.5
M	163.0	163.4	162.8
G	100.0	100.3	-
Q	161.5	161.4	161.1
S	122.0	122.2	121.0
A	111.0	110.7	110.3
K	56.0	58.9	55.9
B	121.0	116.5	115.8
E	116.0	121.5	120.6
J	103.0	99.1	98.5
I	99.0	102.8	102.6
T	171.0	171.7	170.3
X	21.0	21.2	20.5

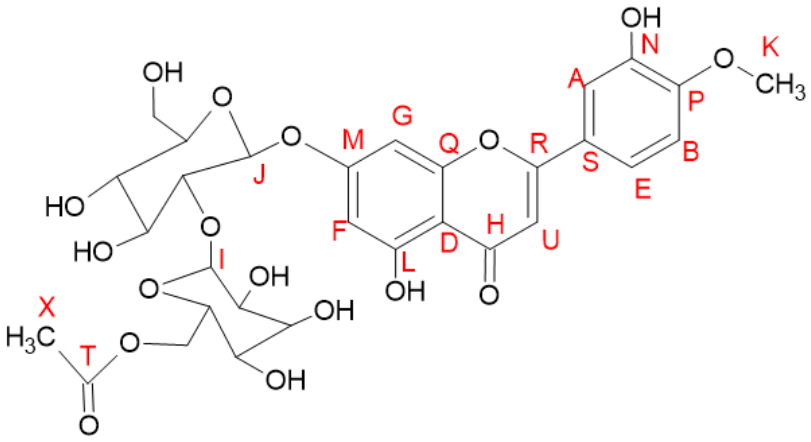


Figura 54. Estructura propuesta de la molécula 3

Fuente: Elaboración propia

4.4 Caracterización de la crema a base del extracto acuoso FSA

Preparada la crema (ver Anexo 67), se caracterizaron sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas, las cuales se registraron en la Tabla 19.

Tabla 19. Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la crema preparada

Fuente: Elaboración propia

Propiedades		Resultados
Organolépticas	Color	Blanco amarillento claro
	Textura	Parcialmente adherente
	Aroma	No tiene
Fisicoquímicas	pH (a 25°C)	7.76
	Densidad	1.00 g/mL
	Porcentaje de humedad	6.49%
	Porcentaje de cenizas	1.24%
	Prueba de dilución	Sí se diluyó
	Prueba de centrifugación	1 fase (homogénea)

Con respecto al pH, se encuentra ligeramente por encima del valor ideal para un protector solar [116]. Mediante la prueba de dilución [83] (ver Anexo 68), se obtiene una emulsión lechosa pudiendo clasificar a la crema preparada como de tipo aceite en agua (O/W). También se lo puede comprobar mediante la prueba del lavado [83] que consiste en aplicar un poco en la piel seca, y retirarla con agua; esto ocurre debido a la estructura de las micelas donde la parte hidrofílica se encuentra externamente logrando su afinidad con el agua. Por último, de la prueba de centrifugación (ver Anexo 68) se determina la obtención de una crema homogénea ya que no presentó separación de dos fases, ni precipitación, ni gotas de aceite visibles, lo cual permitiría realizar una próxima prueba de estabilidad [116].

4.5 Evaluación de bioactividades del extracto hidroalcohólico

4.5.1 Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico

El Mgtr. Nelson Bautista Cruz de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos brindó apoyo para realizar las evaluaciones. Se utilizó como muestra al extracto hidroalcohólico soluble en una mezcla triple de Hex:DCM:MeOH (2:1:1), frente a las cepas de *Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa, Escherichia coli* y *Bacillus subtilis;* se obtuvieron los resultados ubicados en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados de la evaluación antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet

Fuente: Elaboración propia

Bacteria Gram (+)	**N° pozo**	**Concen-tración (µg/mL)**	**Halo de inhibición (mm)**	**Bacteria Gram (-)**	**N° pozo**	**Concen-tración (µg/mL)**	**Halo de inhibición (mm)**
Staphylococcus aureus	1	75	13.059	***Pseudomona aeruginosa***	1	75	11.429
	2	50	12.706		2	50	10.625
	3	25	12.471		3	25	-
	4	12.5	-		4	12.5	-
	C(+)	82	31.059		C(+)	82	26.429
	B	-	-		B	-	-
Bacillus subtilis	**N° pozo**	**Concen-tración (µg/mL)**	**Halo de inhibición (mm)**	***Escherichia coli***	**N° pozo**	**Concen-tración (µg/mL)**	**Halo de inhibición (mm)**
	1	75	10.893		1	75	-
	2	50	10.357		2	50	-
	3	25	-		3	25	-
	4	12.5	-		4	12.5	-
	C(+)	82	35.804		C(+)	82	27.439
	B	-	-		B	-	-

C (+): Gentamicina; (-): No presenta; B: Blanco

De la Tabla 20, se observa que la muestra evaluada solamente presentó una actividad moderada frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* (Gram +) y *Pseudomona aeruginosa* (Gram -) (ver Anexo 69), donde el primero logró un porcentaje de inhibición del 40.15, 40.91 y 42.05% para 25, 50 y 75 µg/mL respectivamente; y el segundo, manifestó 39.90 y 42.92% bajo 50 y 75 µg/mL. Mientras que, para *Bacillus subtilis* (Gram +) (ver Anexo 70) su actividad fue baja en comparación con el control positivo (28.93 y 30.42% a 50 y 75 µg/mL); por último, manifestó actividad nula frente a *Escherichia coli* (Gram -) (ver Anexo 70). Entonces, para las concentraciones evaluadas del extracto, se podría sugerir que la especie presenta metabolitos que otorgarían cierta actividad antimicrobiana; de todas formas, si fueran utilizadas para generar un producto, se debería adicionar algún compuesto que permitiera potenciar la actividad. En la

literatura se anunció que el género manifestaba una serie de actividades como antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatorias [117]. De la misma especie [3], el extracto etanólico demostró actividad a partir de una concentración de 25 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus*. Otras especies del género, como *Stachys spreitzenhoferi* Heldr. [4], su extracto metanólico también reportó actividad con la misma bacteria; los extractos butanólicos y metanólicos de *Stachys pilifera* Benth. exhibieron leve y nula actividad, respectivamente, frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* [12]; el extracto metanólico de *S. spreitzenhoferi* manifestó no ser activo en cepas de Gram negativas (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Shighella sonnei* y *Salmonella tiphymurium*), pero sí con las Gram positivas particularmente *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* presentando formación de halos de inhibición con 10, 15 y 25 mg de extracto [117]. Los extractos etanólicos de *S. annua* demostró una actividad alta frente a *Staphylococcus aureus*, más no con los extractos acuosos y metanólicos, en los que fue nula su presencia [118].

4.5.2 Evaluación de la actividad fotoprotectora de la crema

Se calculó el factor de protección solar (FPS) con la ecuación de Mansur [57], en la cual se debían obtener las absorbancias (290-320 nm) de la crema diluida en etanol y las constantes *EE* e I [86]. Para la crema preparada, con un 1% de extracto, se obtuvo un FPS de UV-B de 8.51, encontrándose dentro de los valores requeridos para poder ser empleado como artículo cosmético con fotoprotección (FPS≥6) [57,116]. El valor de FPS se relaciona directamente con la cantidad de compuestos fenólicos con anillos aromáticos [119] particularmente de los flavonoides [120]; y estos, a su vez, con su capacidad antioxidante [57]. Asimismo, se han encontrado otros metabolitos que también manifiestan actividad como los carotenoides, alcaloides, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido clorogénico, entre otros [119]. Por lo tanto, la crema exhibe un 88.25% de protección UV, pudiendo bloquear alrededor de un 98% de rayos UVB [86,120]; más no brindaría alguna protección mínima frente a los rayos UVA, los cuales generan radicales libres en la dermis y epidermis provocando el envejecimiento prematuro de la piel, así como la aparición de arrugas y de manchas [120]. Comparando con otras formulaciones de diferentes extractos, se observa la relación mencionada (compuestos fenólicos-SPF-

antioxidantes) y se podría sugerir que la crema elaborada es un potencial producto fotoprotector, cuyo efecto será variado según la concentración de extracto que se haya incorporado ya que mantienen una relación proporcional [116,120].

4.5.3 Evaluación de la actividad leishmanicida del metabolito aislado

A través del apoyo de la Dra. Sara M. Robledo de la Universidad de Antioquia, se evaluó la actividad leishmanicida de la molécula 3 (BL3-8M, BL3-29 y BL3-36), uno de los metabolitos aislados de *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet. Los resultados que se obtuvieron fueron registrados en la Tabla 21, donde se observan que los valores obtenidos de CE_{50} indican que las fracciones analizadas no muestran actividad frente a la cepa de *Leishmania brazilensis*; pero, si se observa el CL_{50}, tampoco manifestarían toxicidad.

Tabla 21. Resultados de la evaluación leishmanicida de la molécula 3 (metabolito aislado) de *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet

Fuente: Elaboración propia

Fracciones	CL_{50}		CE_{50}		IS
	x	DS	x	DS	
BL3-8M	1243.67	395.96	>50	NA	<24.87
BL3-29	1773.02	74.34	>50	NA	<35.46
BL3-36 (1)	502.62	72.35	>50	NA	<10.05
BL3-36 (2)	>200	NA	>50	NA	>4

González-Matos y col. [67] indicó que en la literatura se encuentran estudios donde compuestos de tipo flavonoides glicosidados, como la fisetina, 3-hidroxiflavona, luteolina, quercetina y verbascósido, habrían demostrado actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *L. donovani* para las primeras tres, ante *Leishmania spp.* para la quercetina y para el último ante *L. amazonensis*. Para la molécula 3 evaluada, por más que correspondía a este tipo de flavonoide, no logró exhibir actividad reflejando un comportamiento distinto a la referenciada. Dentro del género, el extracto acuoso de la especie *Stachys nivea* Labill. presentó actividad ante *Leishmania spp.* [121]. Maciel y col. [121] comentan que un extracto/fracción puede manifestar actividad frente a una especie de *Leishmania*, pero no

necesariamente exhibirá frente a otras especies; por lo tanto, es necesario realizar evaluaciones ante varias especies para confirmar su eficacia y, así, continuar con los siguientes estudios *in vivo* y preclínicos. Similar sucede incluso con los medicamentos que convencionalmente se utilizan para los tratamientos, donde algunos han evidenciado nula eficacia contra algunas especies de *Leishmania*.

Capítulo V: Conclusiones

La especie *Stachys pusilla* (Wedd.) Briquet presentó compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas y saponinas como metabolitos mayoritarios. Se logró el aislamiento de tres metabolitos por cromatografía en columna y se elucidaron por RMN 1D y 2D proponiendo sus estructuras moleculares para las moléculas 1, 2 y 3 como ácido clorogénico, verbascósido, y diosmetina-7-O-2″-O-[6‴-O-acetil-β-D-alopiranosil-(1 → 2)]-β-D-glucopiranósido respectivamente.

El análisis fitoquímico realizado al extracto hidroalcohólico expresa un contenido de fenoles totales de 94.05 mg AG/mL de extracto; la actividad antioxidante manifestó 0.7357 mg TE/g extracto y IC_{50} de 3.3797 mg/mL a través del método tradicional de DPPH·.

La crema preparada es de tipo O/W, inolora, a base del extracto acuoso (FSA), la cual presentó un pH ligeramente básico de 7.76, 6.49% de humedad y 1.24% de cenizas. La actividad fotoprotectora de la crema exhibió un 88.25% de protección en el espectro UVB, pudiendo compartirse en un potencial protector solar.

Por otra parte, la actividad antimicrobiana fue moderada frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* con un porcentaje de inhibición de alrededor 40 y 42% utilizando 50 y 75 µg/mL de extracto; y la molécula 3 no manifestó actividad leishmanicida sobre los amastigotes de *Leishmania brazilensis* a concentraciones de 50 µg/mL.

Capítulo VI: Referencias

[1] Gastaldi B, González SB, Catalán C. Análisis de los compuestos fenólicos y volátiles de plantas medicinales y aromáticas del noroeste de la Patagonia Argentina, estudio de las actividades antioxidante y citotóxica. [Tesis doctoral]. Tierra del Fuego, Argentina: Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco; 2019. Recuperado de: https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/82836.

[2] Rivas Morales C, Oranday Cárdenas MA, Verde Star MJ. Investigación en plantas de importancia médica [Internet]. México: OmniaScience; 2016 [revisado 17 de junio 2024].

[3] Rodriguez Torres LM. Actividad antibacteriana frente a Staphylococcus aureus y determinación por HPLC de flavonoides de *Stachys pusilla* (Wedd.) Briq. [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco; 2016. Recuperado de: https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/2851.

[4] Napolitano A, Di Napoli M, Castagliuolo G, Badalamenti N, Cicio A, Bruno M, y col. The chemical composition of the aerial parts of *Stachys spreitzenhoferi* (Lamiaceae) growing in Kythira Island (Greece), and their antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative properties. Phytochemistry [Internet]. 2022;203:113373. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2022.113373.

[5] Bursal E, Taslimi P, Gören AC, Gülçin İ. Assessments of anticholinergic, antidiabetic, antioxidant activities and phenolic content of *Stachys annua*. Biocatal Agric Biotechnol [Internet]. 2020;28:101711. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101711.

[6] Bouasla I, Hamel T, Barour C, Bouasla A, Hachouf M, Bouguerra OM, y col. Evaluation of solvent influence on phytochemical content and antioxidant activities of two Algerian endemic taxa: *Stachys marrubiifolia* Viv. and *Lamium flexuosum* Ten. (Lamiaceae). European

Journal of Integrative Medicine [Internet]. 2021;42:101267. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.EUJIM.2020.101267.

[7] Global Core Biodata Resource (GBIF). Stachys pusilla (Wedd.) Briq. [Internet]. Dinamarca; s.f. [revisado 17 de junio 2024]. Recuperado de: https://www.gbif.org/es/species/3904380.

[8] Roersch C. Plantas medicinales en el Sur Andino del Perú. 1ra ed. Cusco: Koenigstein: Koeltz Scientific Books; 1994.

[9] Sarikurkcu C, Kocak MS, Uren MC, Calapoglu M, Sihoglu Tepe A. Potential sources for the management global health problems and oxidative stress: *Stachys byzantina* and *S. iberica* subsp. *iberica* var. densipilosa. European Journal of Integrative Medicine [Internet]. 2016;8:631–7. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.EUJIM.2016.04.010.

[10] Mantovska DI, Zhiponova MK, Georgiev MI, Alipieva K, Tsacheva I, Simova S, y col. Biological Activity and NMR-Fingerprinting of Balkan Endemic Species *Stachys thracica* Davidov. Metabolites [Internet]. 2022;12:251. Recuperado de: https://doi.org/10.3390/METABO12030251/S1.

[11] Tundis R, Peruzzi L, Menichini F. Phytochemical and biological studies of *Stachys* species in relation to chemotaxonomy: A review. Phytochemistry [Internet]. 2014;102:7– 39. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2014.01.023.

[12] Sadeghi H, Rostamzadeh D, Panahi Kokhdan E, Asfaram A, Doustimotlagh AH, Hamidi N, y col. *Stachys pilifera* Benth: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Therapeutic Potential, and Toxicology. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine [Internet]. 2022;2022. Recuperado de: https://doi.org/10.1155/2022/7621599.

[13] Bahadori MB, Zengin G, Dinparast L, Eskandani M. The health benefits of three Hedgenettle herbal teas (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*) - profiling phenolic and antioxidant activities. European Journal of Integrative Medicine [Internet].

2020;36:101134. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.EUJIM.2020.101134.

[14] Paun G, Neagu E, Moroeanu V, Albu C, Ursu T-M, Zanfirescu A, y col. Anti-inflammatory and antioxidant activities of the Impatiens noli-tangere and *Stachys officinalis* polyphenolic-rich extracts. Revista Brasileira de Farmacognosia [Internet]. 2018;28:57–64. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.10.008.

[15] Stegăruș DI, Lengyel E, Apostolescu GF, Botoran OR, Tanase C. Phytochemical Analysis and Biological Activity of Three *Stachys* Species (Lamiaceae) from Romania. Plants [Internet]. 2021;10:2710. Recuperado de: https://doi.org/10.3390/PLANTS10122710.

[16] Gerçek YC, Acar Şahin A, Ecem Bayram N, Çelik S, Sefalı A, Gıdık B, y col. Anatomy, trichome micromorphology and phytochemical profile of *Stachys rizeensis* R.Bhattacharjee from Turkey. South African Journal of Botany y [Internet]. 2022;149:19– 28. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2022.05.046.

[17] Pritsas A, Tomou EM, Tsitsigianni E, Papaemmanouil CD, Diamantis DA, Chatzopoulou P, y col. Valorisation of stachysetin from cultivated *Stachys iva* Griseb. as anti-diabetic agent: a multi-spectroscopic and molecular docking approach. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics [Internet]. 2021;39:6452–66. Recuperado de: https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1799864.

[18] Afouxenidi A, Milošević-Ifantis T, Skaltsa H. Secondary metabolites from *Stachys tetragona* Boiss. & Heldr. ex Boiss. and their chemotaxonomic significance. Biochemical Systematics and Ecology [Internet]. 2018;81:83–5. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BSE.2018.09.011.

[19] Di Stasi M, Dolci D, Peruzzi L, Braca A, De Leo M. Phytochemical study of *Stachys sylvatica* (Lamiaceae) aerial parts. Plant Biosystems [Internet]. 2023;157:569–83. Recuperado de: https://doi.org/10.1080/11263504.2023.2165572.

[20] Michailidou AM, Tomou EM, Skaltsa H. Phytochemical study of *Stachys candida* Bory & Chaubard (Lamiaceae). Biochemical Systematics and Ecology [Internet]. 2021;94:104208. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BSE.2020.104208.

[21] Ringuelet J, Viña S. Productos Naturales Vegetales [Internet]. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata; 2013.

[22] Rostagno MA, Prado JM. Natural Product Extraction: Principles and Applications [Internet]. Cambridge: RSC Publishing; 2013.

[23] Ojito Ramos K, Portal O. Metabolitos secundarios de las plantas Una alternativa para el manejo de enfermedades en cultivos de interés económico. [Internet] Madrid: Editorial Académica Española; 2017.

[24] De Ugaz OL. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda edición. 1994.

[25] Farag RS, Abdel-Latif MS, Abd El Baky HH, Tawfeek LS. Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. Biotechnology Reports [Internet]. 2020;28:e00536. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2020.E00536.

[26] Abdolmaleki F, Mokarram RR, Daneshniya M, Maleki MH. Foods and Raw Materials. Foods and Raw Materials [Internet]. 2025;13:202–10. Recuperado de: https://doi.org/10.21603/2308-4057-2025-1-634.

[27] Zhang Y, Pang J, Yao L, Wang C, Chen B, Zheng Q, y col. A comparison of chemical composition, bioactive components and hypoglycemic activity of *Stigma maydis* obtained from different growing times. Cogent Food & Agriculture [Internet]. 2024;10. Recuperado de: https://doi.org/10.1080/23311932.2024.2338650.

[28] Kamlo Kamso VF, Dongmo Melogmo YK, Tchegnitegni BT, Tchatat Tali MB, Dize D, Ngansop CN, y col. New lignan glycosides from *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae) with antimicrobial and antiparasitic properties. Heliyon [Internet]. 2023;9:e22897. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E22897.

[29] Awad NE, Kassem HA, Hamed MA, El-Feky AM, El-Naggar MAA. Hepatoprotective evaluation and isolation of the major secondary metabolites from the ethyl acetate extract of liquid culture filtrate of *Chaetomium globosum*. Biomedicine & Pharmacotherapy [Internet]. 2018;97:174–80. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.10.120.

[30] Batool F, Iqbal N, Adeel S, Azeem M, Mumtaz S, Hussaan M. Exploration of natural colourant of (*Solanum melongena* L.) brinjal plant residues for fabric dyeing: a novel approach towards textile processing. Natural Product Research [Internet]. 2023. Recuperado de: https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2280164.

[31] Tawfike AF, Romli M, Clements C, Abbott G, Young L, Schumacher M, y col. Isolation of anticancer and anti-trypanosome secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus flocculus* via bioactivity guided isolation and MS based metabolomics. Journal of Chromatography B [Internet]. 2019;1106–1107:71–83. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2018.12.032.

[32] Rahman M. Application of Computational Methods in Isolation of Plant Secondary Metabolites. Computational Phytochemistry [Internet]. 2018:107–39. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812364-5.00004-3.

[33] Gecibesler IH, Disli F, Bayindir S, Toprak M, Tufekci AR, Sahin Yaglıoglu A, y col. The isolation of secondary metabolites from *Rheum ribes* L. and the synthesis of new semi-synthetic anthraquinones: Isolation, synthesis and biological activity. Food Chemistry [Internet]. 2021;342:128378. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.128378.

[34] Zhuo X, Zheng N. Drug Metabolism: Metabolite Isolation and Identification. Encyclopedia of Analytical Science [Internet]. 2019:232–9. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14303-3.

[35] Qingyang L, Ruohui W, Shiman S, Danyu S, Runhong M, Yihua L. Comparison of different drying technologies for walnut (*Juglans regia* L.) pellicles: Changes from phenolic composition, antioxidant activity to potential application. Food Chemistry X [Internet]. 2023;20:101037. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2023.101037.

[36] Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principios de Análisis Instrumental. 6ta ed. México: Cengage Learning Editores; 2008

[37] Mensah EO, Nadtochii L, Adadi P, Agyei D. Chia derived bioactive peptides: Extraction, characterization, pharmacological activities and potential food applications. Food Bioscience [Internet]. 2024;59:103975. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2024.103975.

[38] Mayolo-Deloisa K, Martínez LM, Rito-Palomares M. Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. Revista Mexicana de Ingeniería Química [Internet]. 2012;11:415–29. Recuperado de: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000300006

[39] Mirakabad HZ, Khorramizadeh MR. Introduction to the potential of *Ferula ovina* in dental implant research due to estrogenic bioactive compounds and adhesive properties. PLoS One [Internet]. 2022;17. Recuperado de: https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0262045.

[40] Custodio-Mendoza JA, Aktaş H, Zalewska M, Wyrwisz J, Kurek MA. A Review of Quantitative and Topical Analysis of Anthocyanins in Food. Molecules [Internet]. 2024;29:1735. Recuperado de: https://doi.org/10.3390/MOLECULES29081735.

[41] Spangenberg B, Poole CF, Weins C. Theoretical Basis of Thin Layer Chromatography (TLC). Quantitative Thin-Layer Chromatography [Internet]. 2010:13–52. Recuperado de: https://doi.org/10.1007/978-3-642-10729-0_2.

[42] Dong SH, Duan ZK, Bai M, Huang XX, Song SJ. Advanced technologies targeting isolation and characterization of natural products. TrAC Trends in Analytical Chemistry [Internet]. 2024;175:117711. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2024.117711.

[43] Wang ZF, You YL, Li FF, Kong WR, Wang SQ. Research Progress of NMR in Natural Product Quantification. Molecules [Internet]. 2021;26:6308. Recuperado de: https://doi.org/10.3390/MOLECULES26206308.

[44] Gutiérrez-Venegas G. Flavonoides en el tratamiento de la hipertensión en pacientes gástricos. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social [Internet]. 2018;56:91-101. Recuperado de: https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im2018/ims181l.pdf

[45] Limon D, Díaz A, Mendieta L, y col. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. Mensaje bioquímico [Internet]. 2010;34:143- 154. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/259344548_LOS_FLAVONOIDES_MECANISMO_DE_ACCION_NEUROPROTECCION_Y_EFECTOS_FARMACOLOGICOS.

[46] Chalannavar RK, Hurinanthan V, Singh A, Venugopala KN, Gleiser RM, Odhav B. The antimosquito properties of extracts from flowering plants in South Africa. Tropical Biomedicine [Internet]. 2013;30:559–69. Recuperado de: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24522123/

[47] Evaluación farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal [Tesis doctoral]. España: Universidad de La Laguna; 2006. Recuperado de: https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/21047.

[48] Budovsky A, Yarmolinsky L, Ben-Shabat S. Effect of medicinal plants on wound healing. Wound Repair and Regeneration [Internet]. 2015;23:171–83. Recuperado de: https://doi.org/10.1111/WRR.12274.

[49] Akram W, Ahmed S, Rihan M, Arora S, Khalid M, Ahmad S, y col. An updated comprehensive review of the therapeutic properties of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). International Journal of Food Properties [Internet]. 2024;27:133–64. Recuperado de: https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2293661.

[50] Wale K, Tolessa K, Atlabachew M, Mehari B, Alemayehu M, Mengistu DA, y col. Level of caffeine, trigonelline and chlorogenic acids in green coffee (*Coffea arabica* L.) beans from Amhara region, Ethiopia. Journal of Agriculture and Food Research [Internet]. 2024;16:101082. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2024.101082.

[51] Wang X, Gong X, Lin B. Optimization of ultrasonic pretreatment and analysis of chlorogenic acid in potato leaves. Scientific Reports [Internet]. 2024 14:1 2024;14:1–7. Recuperado de: https://doi.org/10.1038/s41598-024-61139-7.

[52] Liu J, Li T, Zhong G, Pan Y, Gao M, Su S, y col. Exploring the therapeutic potential of natural compounds for Alzheimer's disease: Mechanisms of action and pharmacological properties. Biomedicine & Pharmacotherapy [Internet]. 2023;166:115406. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.115406.

[53] Nxumalo KA, Aremu AO, Fawole OA. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial properties of four medicinal plants from Eswatini and their relevance in food preservation. South African Journal of Botany [Internet]. 2023;162:719–29. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2023.10.008.

[54] Orabi MA, Ibrahim N, Gad HA, Choucry MA. Comparative study of the antioxidant and cytotoxicity activities of organs of Kigelia africana and their topoisomerase I inhibitory activities. South African Journal of Botany [Internet]. 2023;162:838–46. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2023.10.001.

[55] Khalaf HAA, Jasim RA, Ibrahim IT, Khalaf HAA, Jasim RA, Ibrahim IT.

Verbascoside—A Review of Its Antitumor Activities. Pharmacology & Pharmacy [Internet]. 2021;12:109–26. Recuperado de: https://doi.org/10.4236/PP.2021.126011.

[56] Charoenkul K, Phromyothin D. Development and characterization of nano-cream preparation containing natural extract using nanoemulsion techniques. Materials Today: Proceedings [Internet]. 2017;4:6105–10. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2017.06.101.

[57] Sharma T, Tyagi V, Bansal M. Determination of sun protection factor of vegetable and fruit extracts using UV–Visible spectroscopy: A green approach. Sustainable Chemistry and Pharmacy [Internet]. 2020;18:100347. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.SCP.2020.100347.

[58] Muthukumarasamy R, Sekar M. Formulation and evaluation of natural antioxidant cream comprising methanolic peel extract of *Dimocarpus longan*. International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research [Internet]. 2016; 8:1305-1309. Recuperado de: http://impactfactor.org/PDF/IJPCR/8/IJPCR,Vol8,Issue9,Article8.pdf

[59] Savic Gajic IM, Boskov IA, Savic IM. Black locust flowers as a natural source of antioxidants: Sustainable production of high-quality oil from plum by-product and its incorporation in the moisturizing cream. Cleaner Engineering and Technology [Internet]. 2021;3:100135. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.CLET.2021.100135.

[60] Ramirez LS, Marin Castaño D. Metodologias para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica [Internet]. 2009;15:263-268. Recuperado de: https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf

[61] Wang Y, Liang Z, Cao Y, Hung CH, Du R, Leung ASL, et al. Discovery of a novel class of rosmarinic acid derivatives as antibacterial agents: Synthesis, structure-activity relationship and mechanism of action. Bioorganic Chemistry [Internet]. 2024;146:107318. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2024.107318.

[62] Solihat NN, Hidayat AF, Ilyas RA, Thiagamani SMK, Azeele NIW, Sari FP, y col. Recent antibacterial agents from biomass derivatives: Characteristics and applications. Journal of Bioresources and Bioproducts [Internet]. 2024;9:283–309. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.JOBAB.2024.02.002.

[63] Khataybeh B, Jaradat Z, Ababneh Q. Anti-bacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities of honey: A review. Journal Ethnopharmacol [Internet]. 2023;317:116830. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.JEP.2023.116830.

[64] Zou X, Cai S, Wang T, Zheng S, Cui X, Hao J, y col. Natural antibacterial agent-based nanoparticles for effective treatment of intracellular MRSA infection. Acta Biomaterialia [Internet]. 2023;169:410–21. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2023.08.004.

[65] Ismail FMD, Nahar L, Zhang KY, Sarker SD. Antiparasitic natural products. Annual Reports in Medicinal Chemistry [Internet]. 2020;55:115–51. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/BS.ARMC.2020.03.001.

[66] Robledo SM, Murillo J, Arbeláez N, Montoya A, Ospina V, Jürgens FM, y col. Therapeutic Efficacy of *Arnica* in Hamsters with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* and *L. tropica*. Pharmaceuticals [Internet]. 2022;15:776. Recuperado de: https://doi.org/10.3390/PH15070776/S1.

[67] González-Matos M, Aguado ME, Izquierdo M, Monzote L, González-Bacerio J. Compounds with potentialities as novel chemotherapeutic agents in leishmaniasis at preclinical level. Experimental Parasitology

[Internet]. 2024;260:108747. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2024.108747.

[68] Kamaraj C, Ragavendran C, Kumar RCS, Ali A, Khan SU, Mashwani Z ur R, y col. Antiparasitic potential of asteraceae plants: A comprehensive review on therapeutic and mechanistic aspects for biocompatible drug discovery. Phytomedicine Plus [Internet]. 2022;2:100377. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.PHYPLU.2022.100377.

[69] Elagib SM. Antiparasitic activity of *Eichhornia crassipes* leaves extract. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology [Internet]. 2020;24:101556. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101556.

[70] Murillo JA, Echeverri F, Quinones W, Torres F, Isaza L, Robledo SM, y col. Synthesis, Cytotoxicity, and Leishmanicidal Evaluation of Ent-beyerene and Ent-kaurene Derivatives. European Journal of Organic Chemistry [Internet]. 2021;2021:3386–97. Recuperado de: https://doi.org/10.1002/EJOC.202001424.

[71] Kirkan B. Antioxidant potential, enzyme inhibition activity, and phenolic profile of extracts from *Stachys cretica* subsp. *vacillans.* Industrial Crops and Products [Internet]. 2019;140:111639. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.111639.

[72] Castro O. Investigación Fitoquímica de los líquenes. 1ra ed. España: Editorial Académica Española; 2016.

[73] Essack H, Odhav B, Mellem JJ. Screening of traditional South African leafy vegetables for specific anti-nutritional factors before and after processing. Food Science and Technology [Internet]. 2017;37:462–71. Recuperado de: https://doi.org/10.1590/1678-457X.20416.

[74] Gonzales Uscamayta, M. Determinación de ácidos grasos, compuestos fenólicos y efecto gastroprotector de semillas de uva (Vitis vinífera) variedad Malbec, subproducto de la industria vitivinícola, Ica-Perú. [Tesis de maestría]. Lima: Pontificia Universidad Católica del

Perú; 2018. Recuperado de: https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/12826

[75] Gonzales M, Villena GK, Kitazono AA. Evaluation of the antioxidant activities of aqueous extracts from seven wild plants from the Andes using an *in vivo* yeast assay. Results in Chemistry [Internet]. 2021;3:100098. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.RECHEM.2021.100098.

[76] Sharon K, Guerra L. Determinación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del aceite de uva (*Vitis vinífera*) obtenido con y sin tratamiento enzimático. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2017. Recuperado de: https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3005/Q02-L49- T.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

[77] Ocmin LM, Mandujano ONC. Aislamiento y elucidación estructural de un alcaloide de la resina de *Maquira coriacea* (Karsten) Cc.Berg. Revista de La Sociedad Química Del Perú [Internet]. 2022;88. Recuperado de: https://doi.org/10.37761/RSQP.V88I3.399.

[78] Ceballos S, Guillén A, Muñoz DL, Castaño A, Echeverri LF, Acín S, y col. Immunometabolic regulation by triterpenes of *Eucalyptus tereticornis* in adipose tissue cell line models. Phytomedicine [Internet]. 2018;50:109–17. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2018.03.059.

[79] Mixomicete EL, Oblonga P, Herrera N, Echeverrl LF, Franco-Molano AE, Quiñones W. Algunos metabolitos presentes en el mixomicete *Physarella oblonga* Sociedad Micológica de Madrid [Internet]. 2010,34. Recuperado de: https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/31012

[80] Castillo-Arroyave J, Fuentes B, López-Mayorga B, Álvarez-Toledano C. Aislamiento y elucidación estructural por resonancia magnética nuclear (RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, DEPT135, COSY y HSQC) del compuesto (E)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno extraído de hojas de *Piper*

patulum. Revista Científica [Internet]. 2022;30:2022. Recuperado de: https://doi.org/10.54495/REV.CIENTIFICA.V30I2.279.

[81] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ, Bryce DL. Spectrometric identification of organic compounds. 5ta ed. New York: Wiley; 2005

[82] Pretsch E, Bühlmann P, Badertscher M. Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data. 4ta ed. Berlin: Springer; 2009.

[83] Castro O, Baustista JA. El quitosano en cosmética: crema fotoprotectora. 1ra ed. España: editorial académica Española; 2019.

[84] Castro Mandujano ON. Estudio fitoquímico del líquen *Everniopsis trulla* y preparación de una crema protectora solar a base de quitosano con el extracto del liquen. [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2020. Recuperado de: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/item/ae787169-7024-4417-a9fa5a701b51b8ef

[85] Huanca Miranda C, Castro Mandujano N, López Rodilla J, Bautista Cruz N, Huanca Miranda C, Castro Mandujano N, y col. Actividad antibacterial y composición química del aceite esencial de la *Aloysia aloysioides* Loes. Revista de La Sociedad Química Del Perú 2021;87:195–206. https://doi.org/10.37761/RSQP.V87I3.347.

[86] Bailore NN, Sarojini BK, Harshitha KR. Fabrication and Determination of the Sun Protection Factor and Ultraviolet Protection Factor for Piscean Collagen/Bischalcone Derivative (B1) Composite Films with Wide-Range UV Shielding. ACS Omega a [Internet]. 2022;7:27876–85. Recuperado de: https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.2C00772.

[87] Biluši´c V, Vunda´cvunda´c B. Taxonomical and Phytochemical Characterisation of 10 *Stachys* Taxa Recorded in the Balkan Peninsula Flora: A Review. Plants [Internet]. 2019;8:32. Recuperado de: https://doi.org/10.3390/PLANTS8020032.

[88] Salazar Díaz JJ. Contribución al Estudio Químico y Farmacológico de la Gentianella umbellata (G. Don) Fabris [tesis de maestría]. Lima:

Pontificia Universidad Católica del Perú; 2011. Recuperado de: https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/549

[89] Sbieh R, Al-Lahham S, Jaradat N. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of four different extracts derived from the aerial parts of *Chiliadenus iphinoides*. European Journal of Integrative Medicine [Internet]. 2022;54:102149. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.EUJIM.2022.102149.

[90] Bahadori MB, Kirkan B, Sarikurkcu C, Ceylan O. Metabolite profiling and health benefits of *Stachys cretica* subsp. mersinaea as a medicinal food. Industrial Crops and Products [Internet]. 2019;131:85–9. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.01.038.

[91] Sarikurkcu C, Ceylan O, Benabdallah A, Tepe B. *Stachys germanica* subsp. *heldreichii* (Boiss.) Hayek: Phytochemical analysis, antioxidant and enzyme inhibitory activities. South African Journal of Botany [Internet]. 2021;143:291–300. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2020.11.009.

[92] Brighente IMC, Dias M, Verdi LG, Pizzolatti MG. Pharmaceutical Biology Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species Pharmaceutical Biology [Internet]. 2008;45:156-161. Recuperado de: https://doi.org/10.1080/13880200601113131.

[93] Olugbami JO, Gbadegesin MA, Odunola OA. *In vitro* evaluation of the antioxidant potential, phenolic and flavonoid contents of the stem bark ethanol extract of *Anogeissus leiocarpus*. African Journal of Medicine and Medical Sciences [Internet]. 2014;43:101. Recuperado de: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26681826/

[94] Lebeloane MM, Famuyide IM, Kgosana KG, Elgorashi E, Ndivhuwo KK, Maharaj V, y col. Anti-inflammatory activity of seven plant species with potential use as livestock feed additives. South African Journal of

Botany y [Internet]. 2024;167:322–32. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2024.02.017.

[95] Pascual ME, Carretero ME, Slowing K V., Villar A. Simplified Screening by TLC of Plant Drugs. Pharmaceutical Biology [Internet]. 2008;40:139–43. Recuperado de: https://doi.org/10.1076/PHBI.40.2.139.5849.

[96] Yahyaoui O El, Sammama A, Bouabid B, Bakkall M El, Quyou A, Bengueddour R, y col. Phytochemical screening and thin layer chromatography of two medicinal plants: *Adansonia digitata* (Bombacaceae) and *Acacia raddiana* (Fabaceae). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry [Internet]. 2017;6:10-15. Recuperado de: https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue1/PartA/5-6-16-956.pdf

[97] Loescher CM, Morton DW, Razic S, Agatonovic-Kustrin S. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*—Advantages and limitations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [Internet]. 2014;98:52–9. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2014.04.023.

[98] Siudem P, Zielińska A, Paradowska K. Application of ^{1}H NMR in the study of fatty acids composition of vegetable oils. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [Internet]. 2022;212:114658. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2022.114658.

[99] Andrew. Characterizing Fatty Acids with advanced multinuclear NMR methods [Internet]. Magritek; 2018. [Revisado 18 de junio 2024]. Recuperado de: https://magritek.com/2018/04/06/characterizing-fatty-acids-with-advanced-multinuclearnmr-methods/

[100] Wheeler HL, Soong R, Courtier-Murias D, Botana A, Fortier-Mcgill B, Maas WE, y col. Comprehensive multiphase NMR: a promising

technology to study plants in their native state. Magnetic Resonance in Chemistry [Internet]. 2015;53:735–44. Recuperado de: https://doi.org/10.1002/MRC.4230.

[101] Farag MA, Porzel A, Mahrous EA, El-Massry MM, Wessjohann LA. Integrated comparative metabolite profiling via MS and NMR techniques for Senna drug quality control analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry [Internet]. 2015;407:1937–49. Recuperado de: https://doi.org/10.1007/S00216-014-8432-1/METRICS.

[102] Zanatta AC, Vilegas W, Edrada-Ebel RA. UHPLC-(ESI)-HRMS and NMR-Based Metabolomics Approach to Access the Seasonality of *Byrsonima intermedia* and *Serjania marginata* From Brazilian Cerrado Flora Diversity. Frontiers in Chemistry [Internet]. 2021;9:710025. Recuperado de: https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.710025/BIBTEX.

[103] Nakatani N, Kayano SI, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry [Internet] 2000;48:5512–6. Recuperado de: https://doi.org/10.1021/JF000422S.

[104] Puyada A, Nuevas L, Garrido R. Caracterización del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 18C mediante la combinacion de metodos cromatograficos y RMN ^{1}H. Revista CENIC Ciencias Químicas [Internet]. 2013;44:1-11. Recuperado de: https://revista.cnic.cu/index.php/RevQuim/article/view/396

[105] Fracasso AF, Perussello CA, Carpiné D, Petkowicz CL de O, Haminiuk CWI. Chemical modification of citrus pectin: Structural, physical and rheologial implications. International Journal of Biological Macromolecules [Internet]. 2018;109:784–92. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.060.

[106] Zebiri I, Jacquette B, Francezon N, Herbaut M, Latigui A, Bricaud S, y col. The Polysaccharidic Nature of the Skeleton of Marennine as

Determined by NMR Spectroscopy. Marine Drugs [Internet]. 2023;21:42. Recuperado de: https://doi.org/10.3390/MD21010042/S1.

[107] Miranda BM, Di-Medeiros MCB, Batista KA, Carbonero ER, Fernandes KF, Silva FA. A galactose-rich heteropolysaccharide extracted from “jaboticaba” (*Plinia cauliflora*) peels. Carbohydrate Polymers [Internet]. 2020;249:116821. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116821.

[108] Hernández Medel M, Solís Fuentes JA, Méndez Ventura LM. Antraquinonas de Picramnia polyantha. Revista Cubana de Química [Internet]. 2016;28:2224–5421. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212016000300006

[109] Human Metabolome Database: 1H NMR Spectrum (1D, 1000 MHz, D2O, predicted) (HMDB0000122). [Internet]. s.f. [Revisado 18 de junio 2024]. Recuperado de: https://hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/142312

[110] Chima NK, Nahar L, Majinda RRT, Celik S, Sarker SD. Assessment of free-radical scavenging activity of *Gypsophila pilulifera*: assay-guided isolation of verbascoside as the main active component. Revista Brasileira de Farmacognosia [Internet]. 2014;24:38–43. Recuperado de: https://doi.org/10.1590/0102-695X20142413391.

[111] Saidi I, Baccari W, Teka S, El Oudi M, Alsaif B, Mohamed N, y col. Verbascoside and rare flavone glucosides from Citharexylum spinosum L. flowers as antihyperglycemic agents: Isolation, α-amylase inhibition, molecular docking and drug-likeness prediction. Journal of Molecular Structure [Internet]. 2024;1312:138529. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2024.138529.

[112] Lenherr A, Mabry TJ. Acetylated allose-containing flavonoid glucosides from *Stachys anisochila*. Phytochemistry [Internet]. 1987;26:1185–8. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82375-4.

[113] Ulubelen A, Topcu G, Kolak U. Labiatae Flavonoids and their Bioactivity. Studies in Natural Products Chemistry [Internet].

2005;30:233–302. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/S1572-5995(05)80035-3.

[114] Karioti A, Kukić-Marković J, Bilia AR, Niketić M, Petrović S. Chemical profiling of six *Stachys* taxa from Balkan Peninsula. Biochemical Systematics and Ecology [Internet]. 2022;104:104482. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BSE.2022.104482.

[115] Kotsos M, Aligiannis N, Mitaku S, Skaltsounis AL, Charvala C. Chemistry of Plants from Crete: Stachyspinoside, a New Flavonoid Glycoside And iridoids from *Stachys spinosa*. Natural Product Letters [Internet]. 2001;15:377–86. Recuperado de: https://doi.org/10.1080/10575630108041307.

[116] Costa SCC, Detoni CB, Branco CRC, Botura MB, Branco A. *In vitro* photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. Revista Brasileira de Farmacognosia [Internet]. 2015;25:413–8. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.BJP.2015.07.013.

[117] Napolitano A, Di Napoli M, Castagliuolo G, Badalamenti N, Cicio A, Bruno M, y col. The chemical composition of the aerial parts of *Stachys spreitzenhoferi* (Lamiaceae) growing in Kythira Island (Greece), and their antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative properties. Phytochemistry [Internet]. 2022;203:113373. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2022.113373.

[118] Yildirim AB, Karakas FP, Turker AU. *In vitro* antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine [Internet]. 2013;6:616–24. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60106-6.

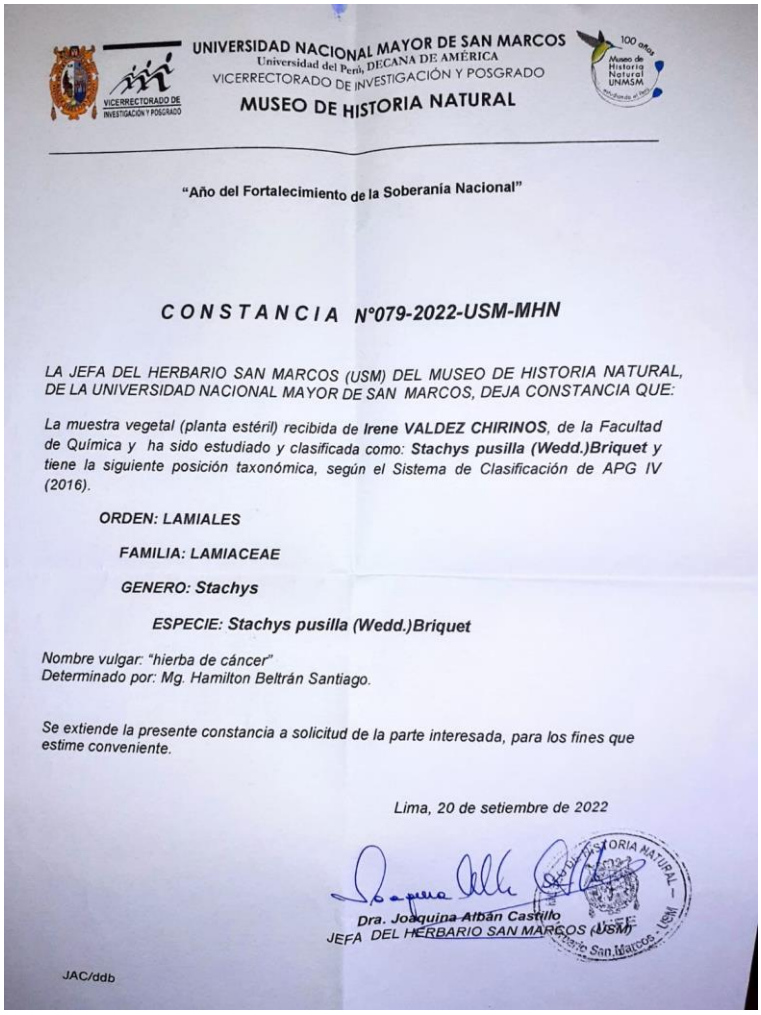
[119] Torres-Contreras AM, Garcia-Baeza A, Vidal-Limon HR, Balderas-Renteria I, Ramírez-Cabrera MA, Ramirez-Estrada K. Plant Secondary Metabolites against Skin Photodamage: Mexican Plants, a Potential Source of UV-Radiation Protectant Molecules. Plants [Internet].

2022;11:220. Recuperado de: https://doi.org/10.3390/PLANTS11020220.

[120] Olayemi O, Okoh J, Gbate MA, Emeje M, Isimi C, Ekere K. Determination of sun protection factor number: an emerging *in-vitro* tool for predicting UV protection capabilities. International Journal of Herbal Medicine [Internet]. 2017;5:6-9. Recuperado de: https://www.florajournal.com/archives/2017/vol5issue1/PartA/5-4-10-788.pdf

[121] Maciel MSP, Reis AS dos, Fidelis QC. Antileishmanial potential of species from the family Lamiaceae: chemical and biological aspects of non-volatile compounds. Acta Tropica [Internet]. 2022;228:106309. Recuperado de: https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2022.106309.

Capítulo VII: Anexos



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

CONSTANCIA N°079-2022-USM-MHN

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta estéril) recibida de **Irene VALDEZ CHIRINOS**, de la Facultad de Química y ha sido estudiado y clasificada como: **Stachys pusilla (Wedd.)Briquet** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de APG IV (2016).

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: Stachys

ESPECIE: Stachys pusilla (Wedd.)Briquet

Nombre vulgar: "hierba de cáncer"
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago.

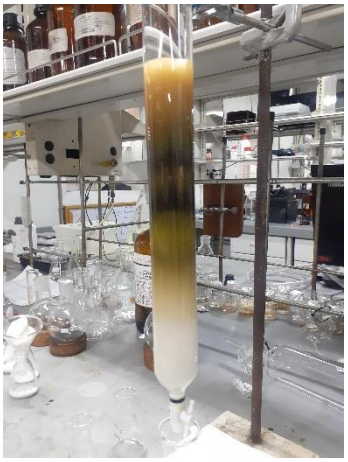
Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 20 de setiembre de 2022

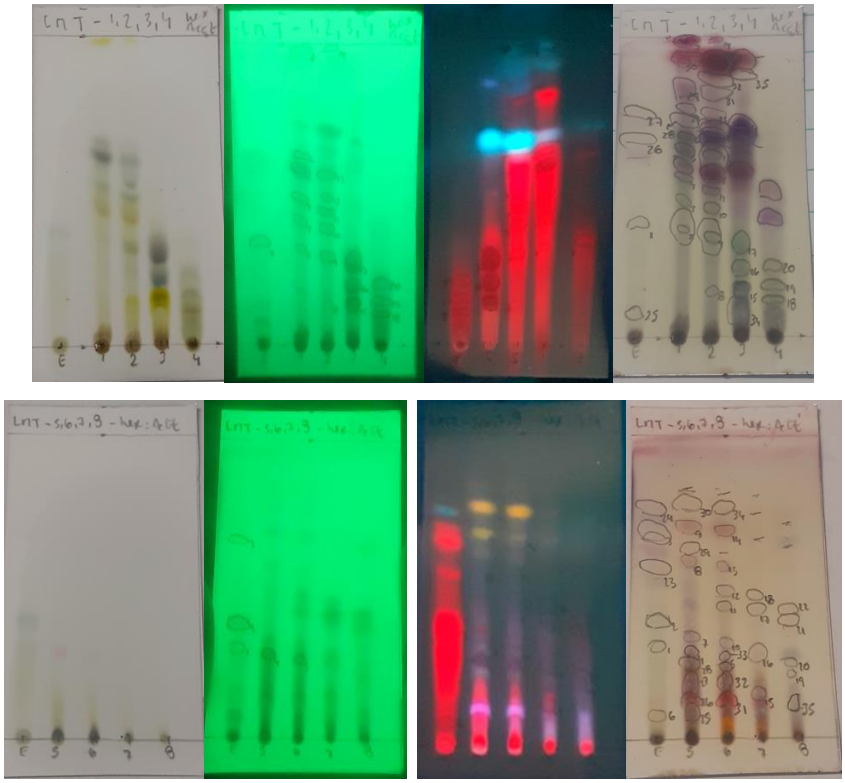
Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

JAC/ddb

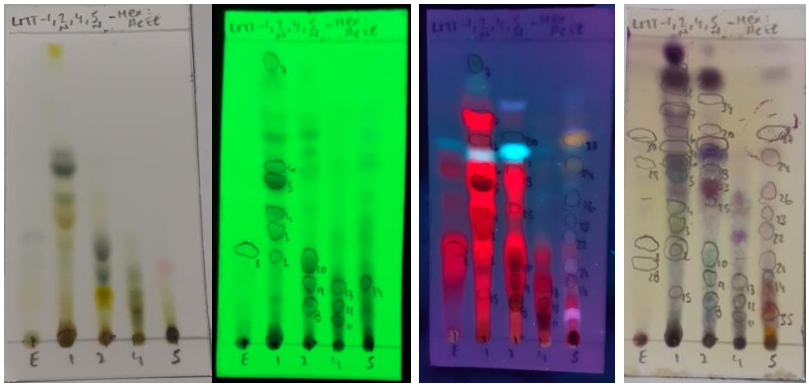
Anexo 1. Constancia emitida por el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural de la UNMSM



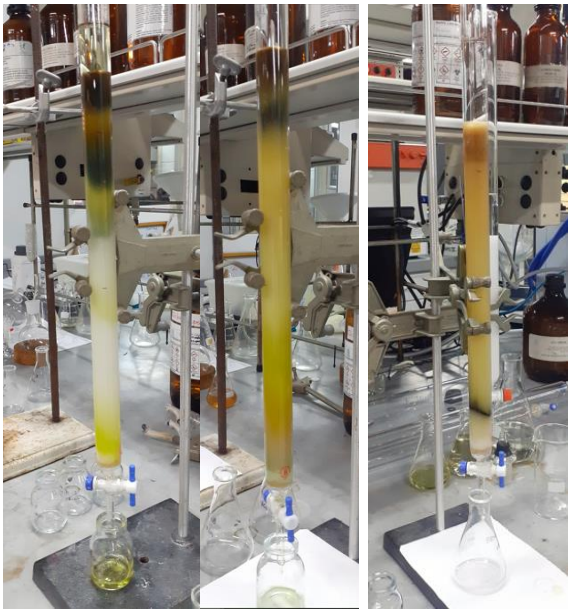
Anexo 2. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones LMT



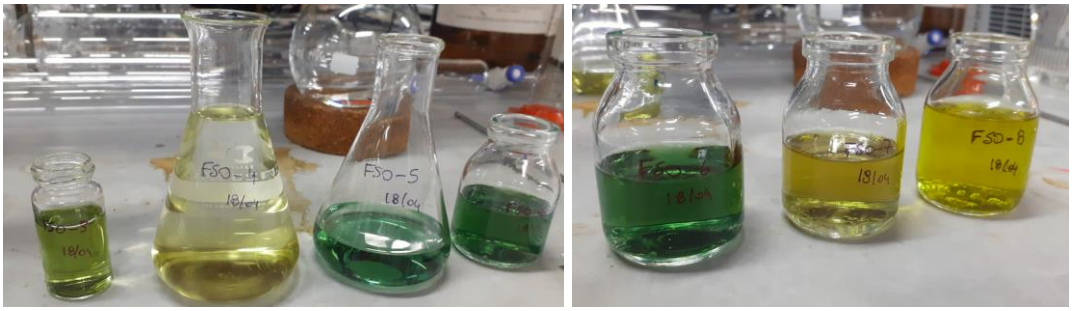
Anexo 3. Cromatoplacas de las fracciones LMT 1-4 y 5-8



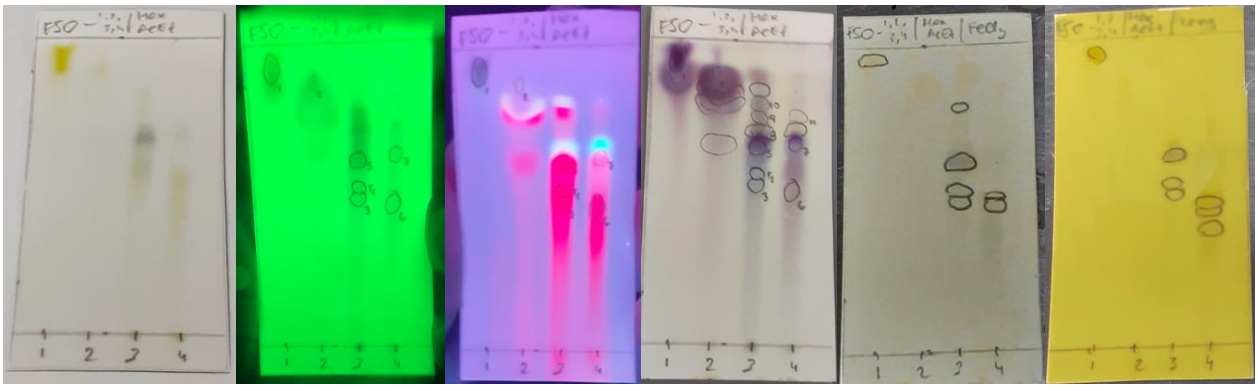
Anexo 4. Cromatoplacas de las fracciones LMT anteriores mezcladas según sus características



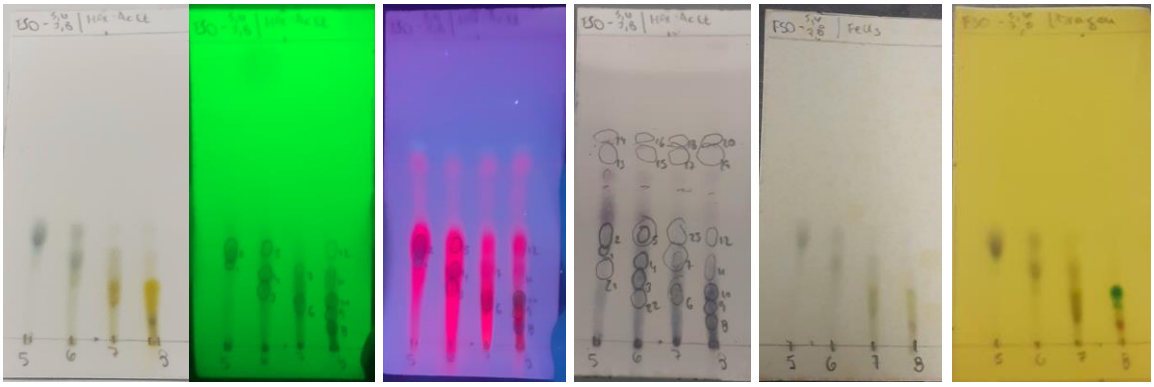
Anexo 5. Columna de cromatografía en sílica gel de las fracciones FSO



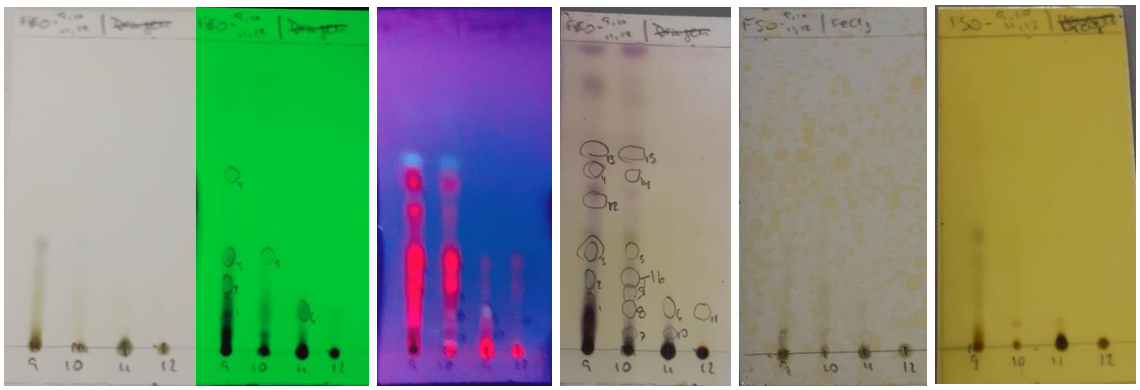
Anexo 6. Fracciones FSO recogidas, antes de su evaporación a sequedad



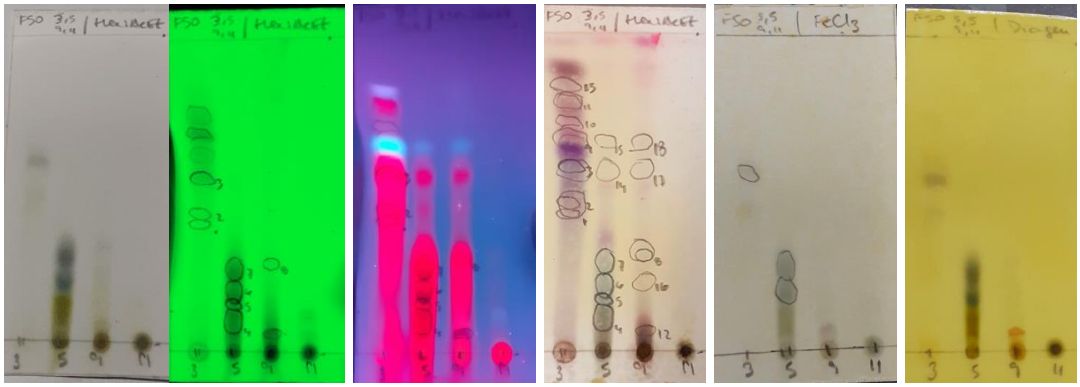
Anexo 7. Cromatoplacas de las fracciones FSO 1-4



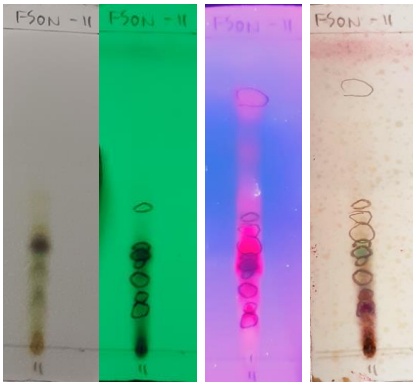
Anexo 8. Cromatoplacas de las fracciones FSO 5-8



Anexo 9. Cromatoplacas de las fracciones FSO 9-11



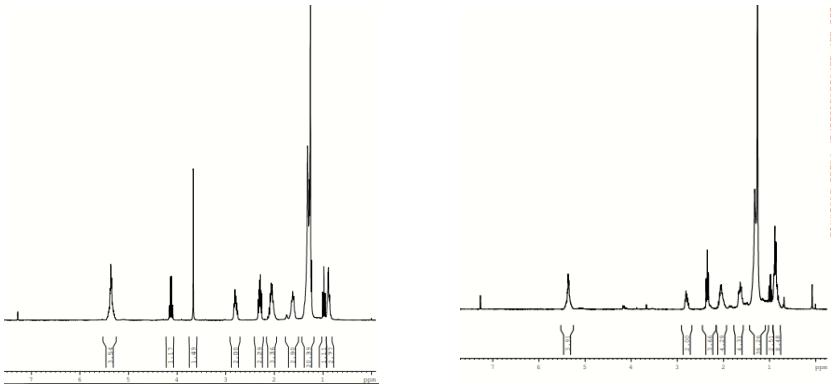
Anexo 10. Cromatoplacas de las fracciones LMT anteriores mezcladas según sus características en común



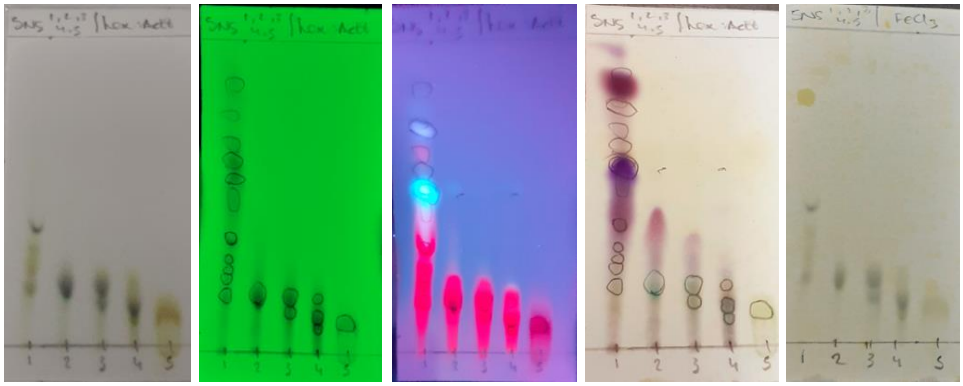
Anexo 11. Cromatoplacas de la fracción FSO-11



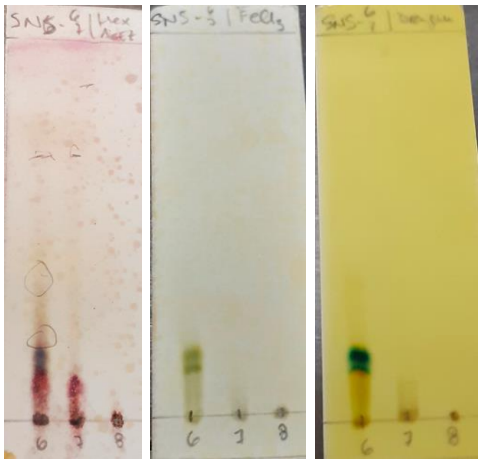
Anexo 12. Columna de cromatografía en sílica gel de las fracciones SNS



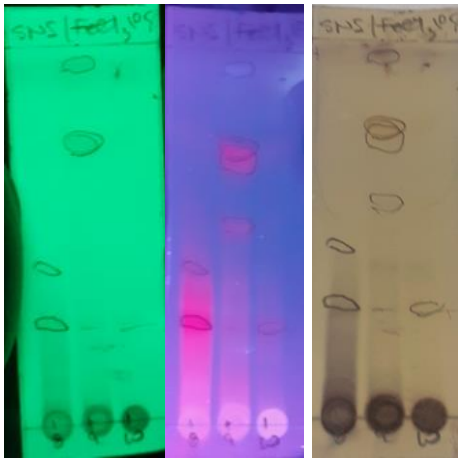
Anexo 13. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones FSO-2 (izq.) y FSO-4 (der.)



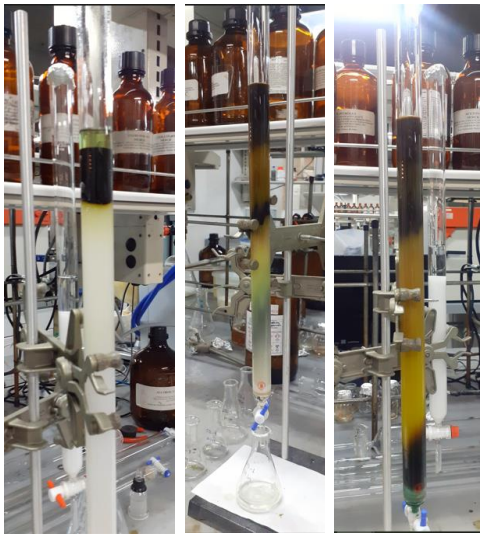
Anexo 14. Cromatoplacas de las fracciones SNS 1-5



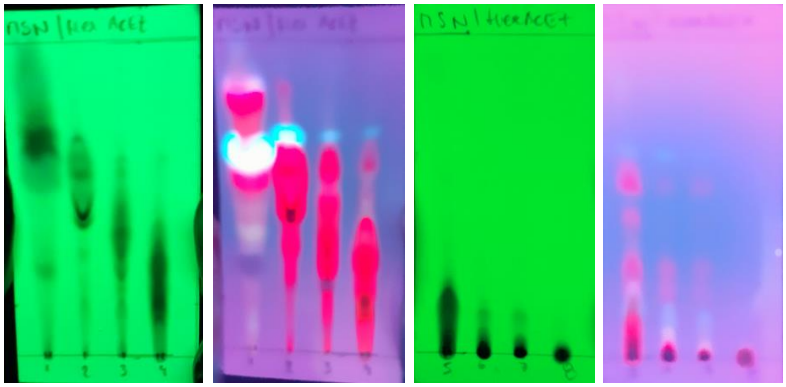
Anexo 15. Cromatoplacas de las fracciones SNS 6-8



Anexo 16. Cromatoplacas de las fracciones SNS 8-10



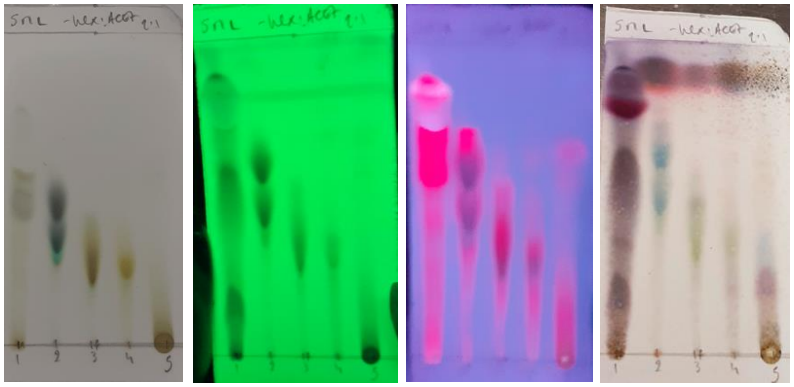
Anexo 17. Columna de cromatografía en sílica gel de las fracciones MSN



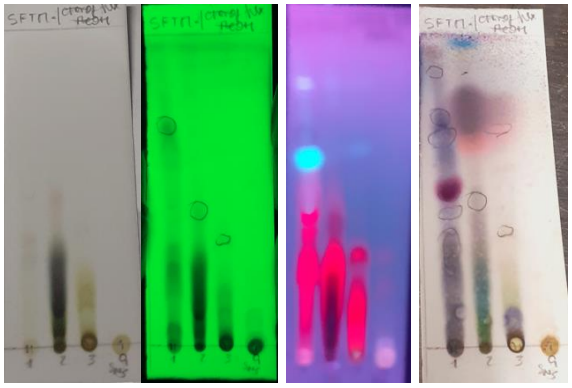
Anexo 18. Cromatoplacas de las fracciones MSN 1-4



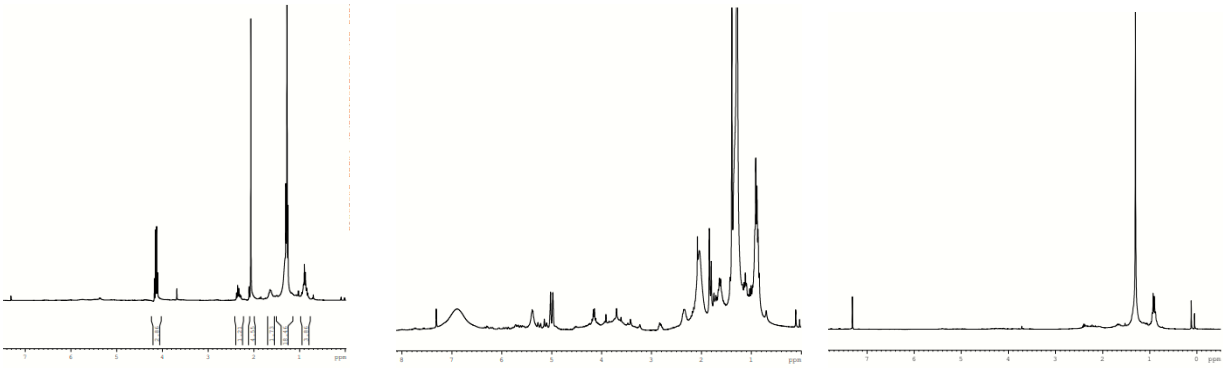
Anexo 19. Columna de cromatografía en sílica gel de las fracciones SML



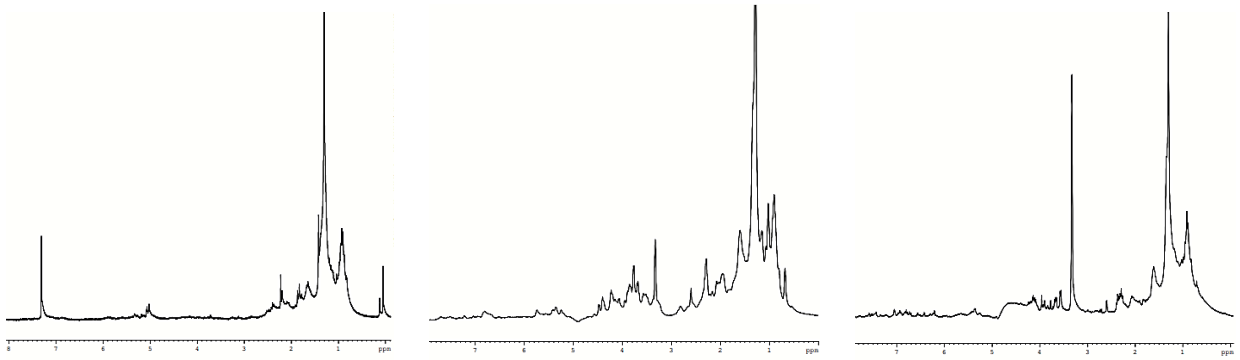
Anexo 20. Cromatoplacas de las fracciones SML 1-5



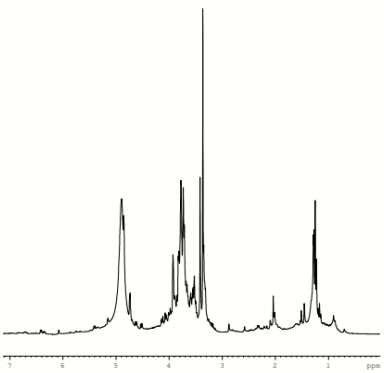
Anexo 21. Cromatoplacas de las fracciones SFTM



Anexo 22. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones SFTM-1 (izq.), SFMTM-2U (medio) y PFOM-1 (der.)



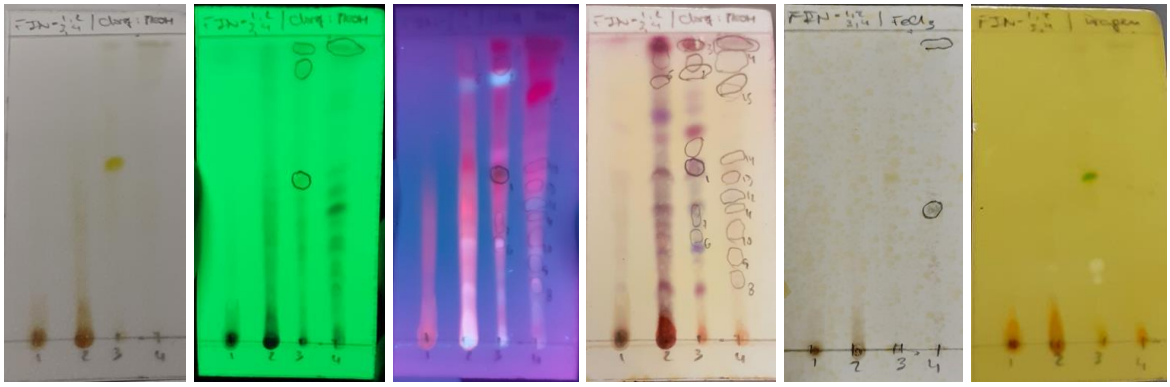
Anexo 23. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones PFO-5 (izq.), MSNJ-6 (medio) y FOM-5 (der.)



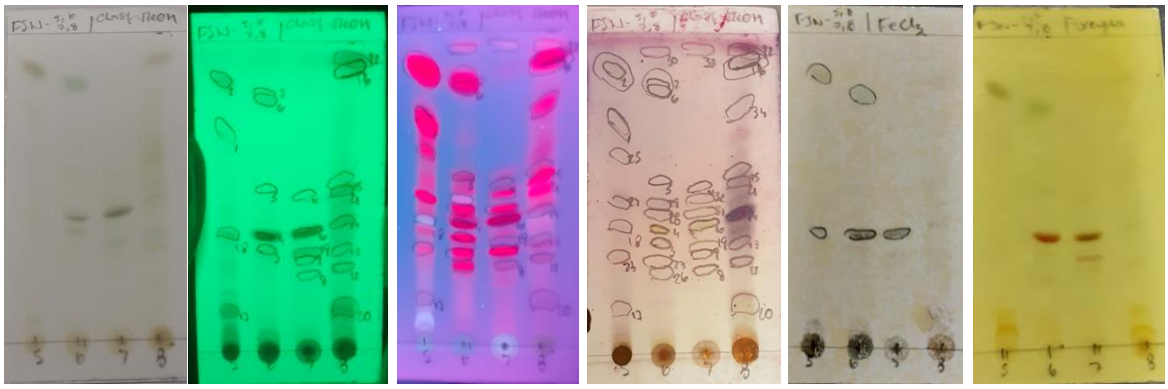
Anexo 24. Espectros de RMN de ^{1}H de la fracción FOM-9



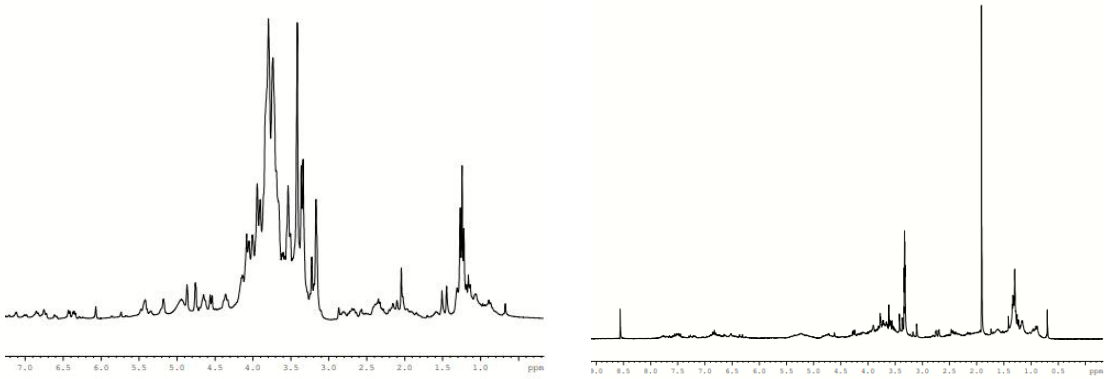
Anexo 25. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones FIN



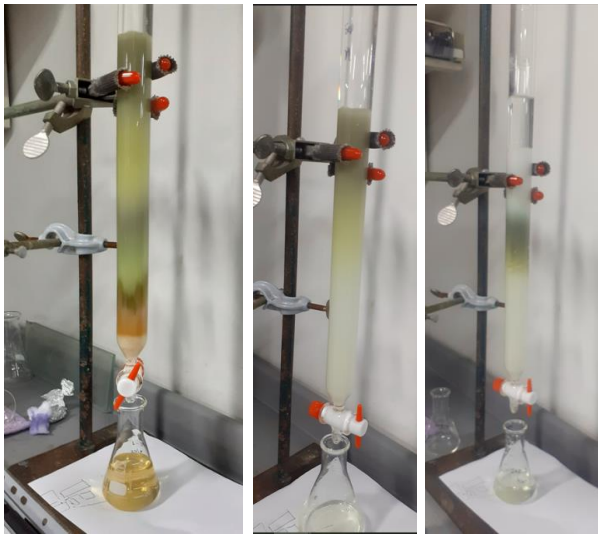
Anexo 26. Cromatoplacas de las fracciones FIN 1-4



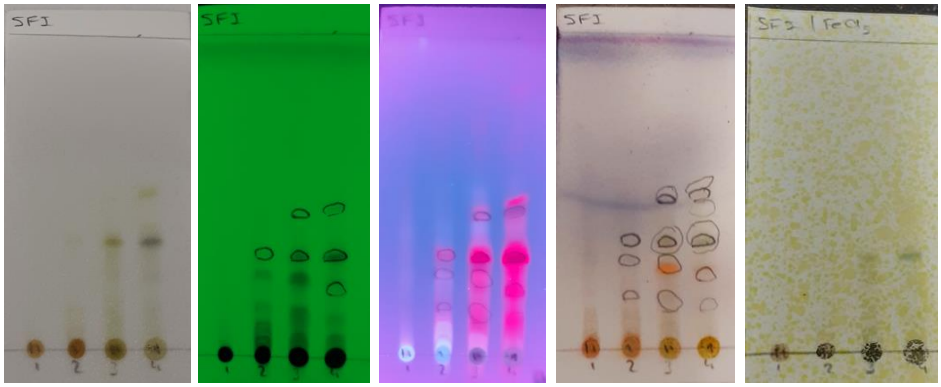
Anexo 27. Cromatoplacas de las fracciones FIN 5-8



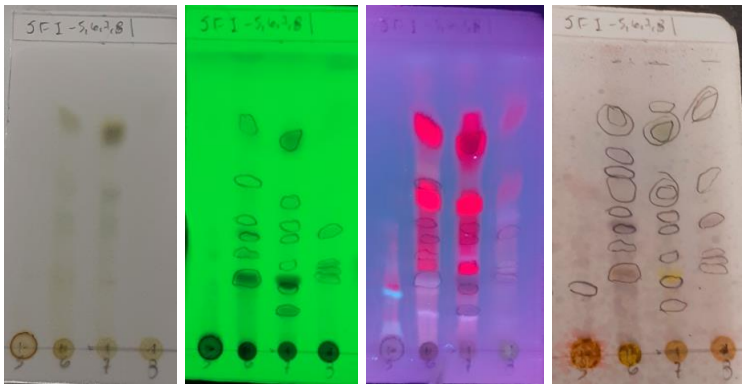
Anexo 28. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones FINN-3 (izq.) y FIN-8 (der.)



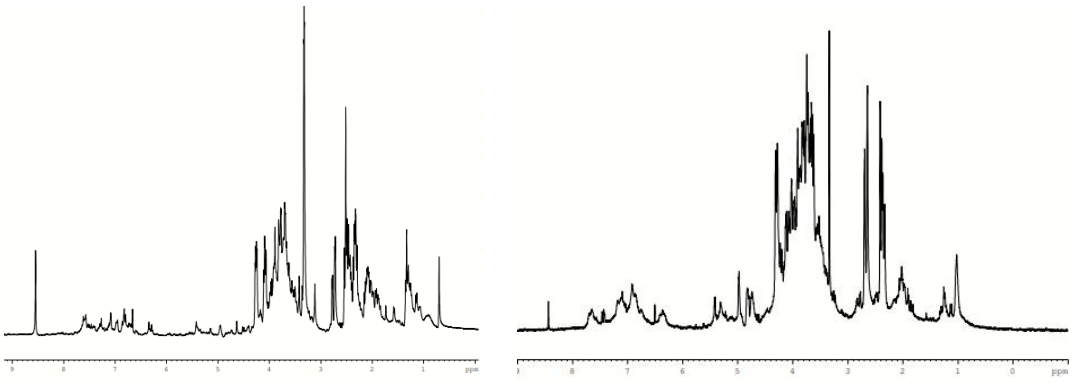
Anexo 29. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones SFI



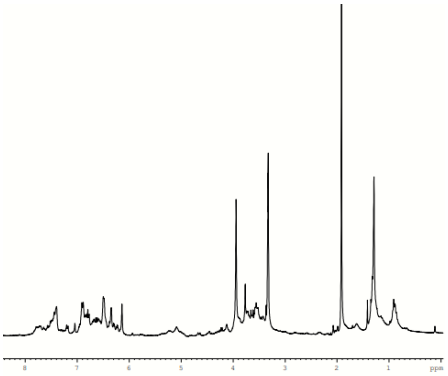
Anexo 30. Cromatoplacas de las fracciones SFI 1-4



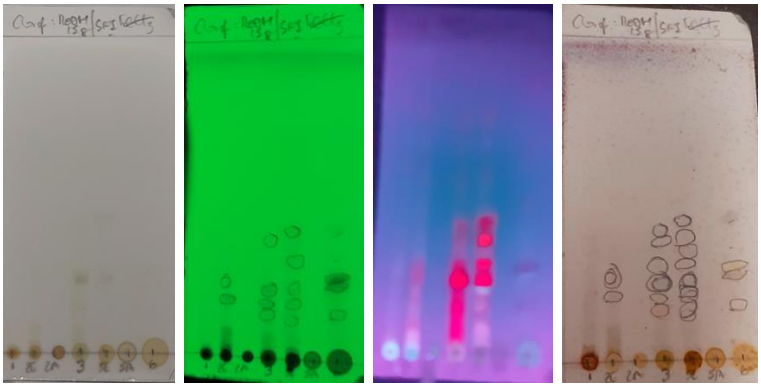
Anexo 31. Cromatoplacas de las fracciones SFI 5-8



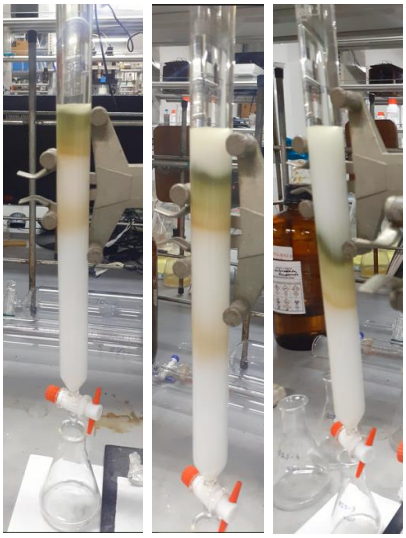
Anexo 32. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones SFI-2LE (izq.) y SFI-2LA (der.)



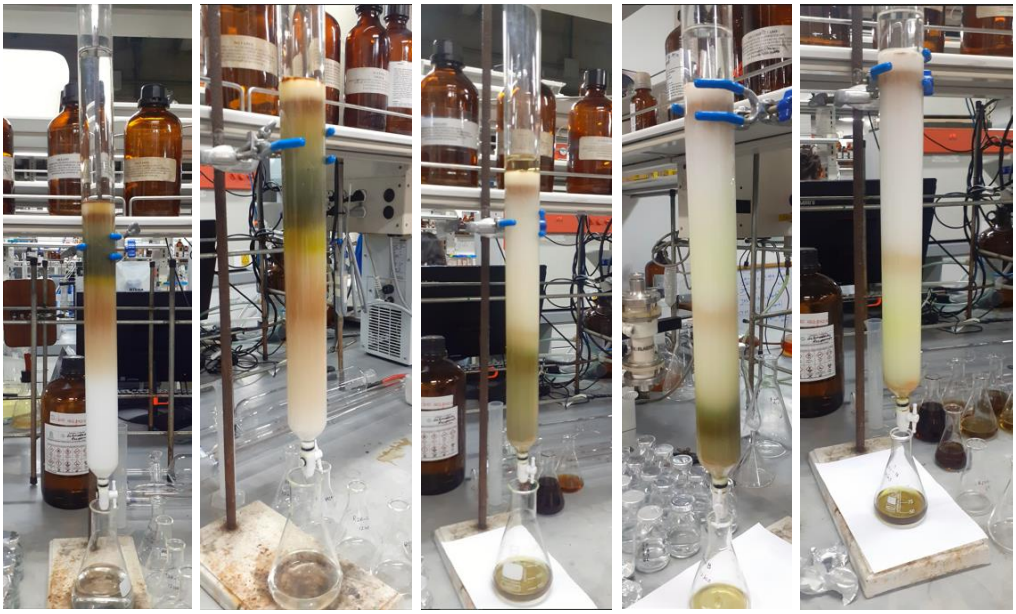
Anexo 33. Espectros de RMN de ^{1}H de la fracción SFIM-6



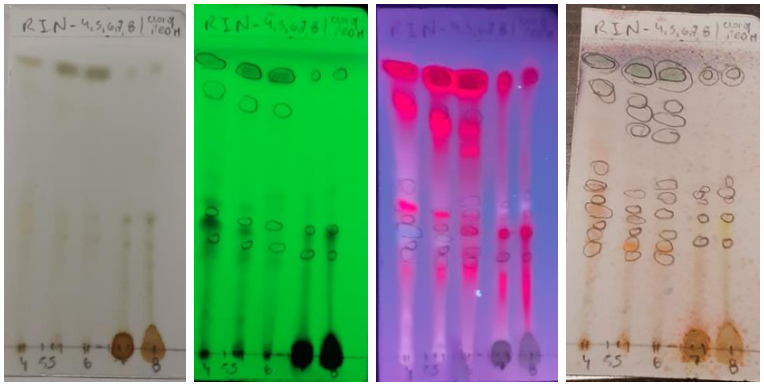
Anexo 34. Cromatoplacas de las fracciones SFI y SFI lavados



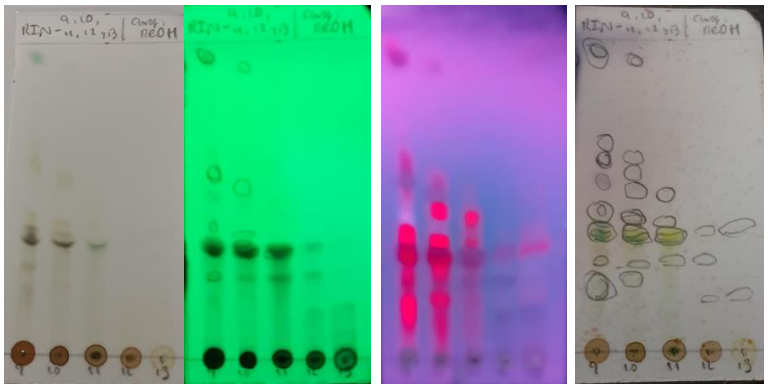
Anexo 35. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones SFIM-3



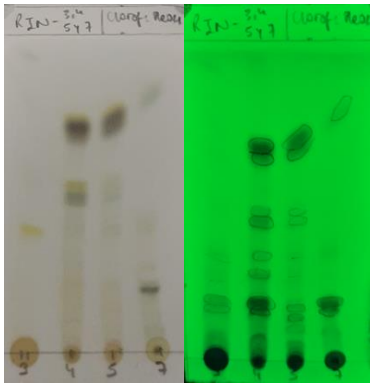
Anexo 36. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones RIN



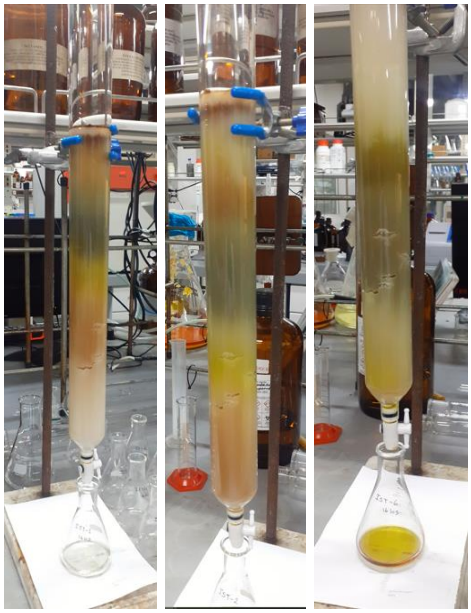
Anexo 37. Cromatoplacas de las fracciones RIN 4-8



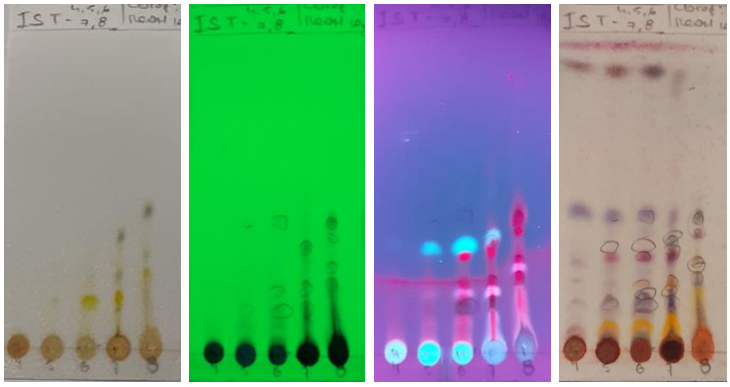
Anexo 38. Cromatoplacas de las fracciones RIN 9-13



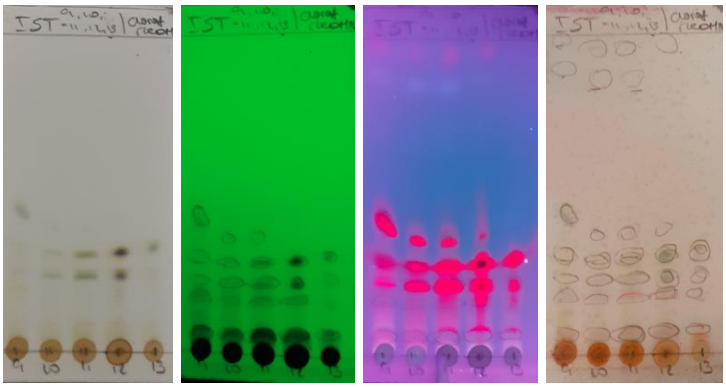
Anexo 39. Cromatoplacas de las fracciones RINN



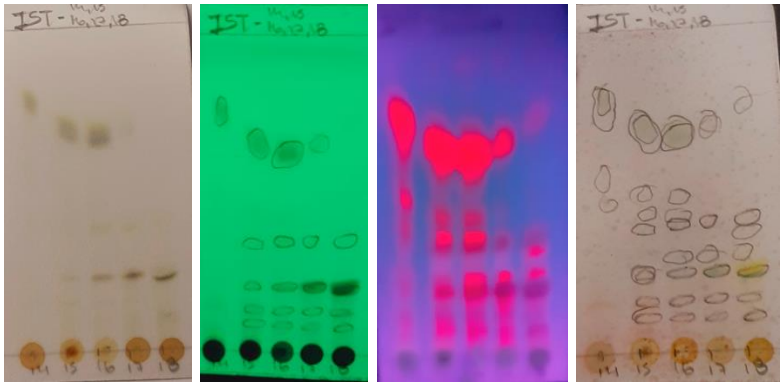
Anexo 40. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones IST



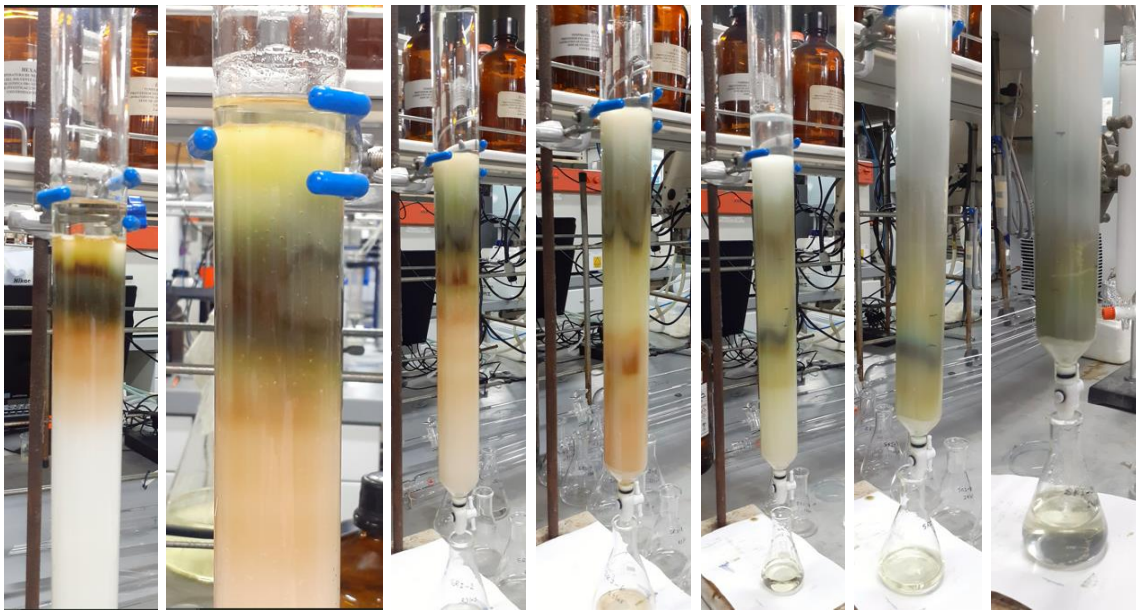
Anexo 41. Cromatoplacas de las fracciones IST 4-8



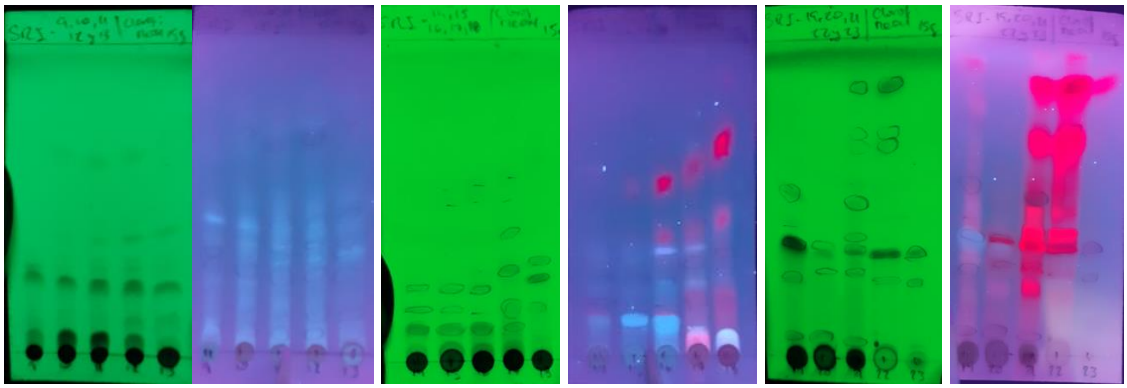
Anexo 42. Cromatoplacas de las fracciones IST 9-13



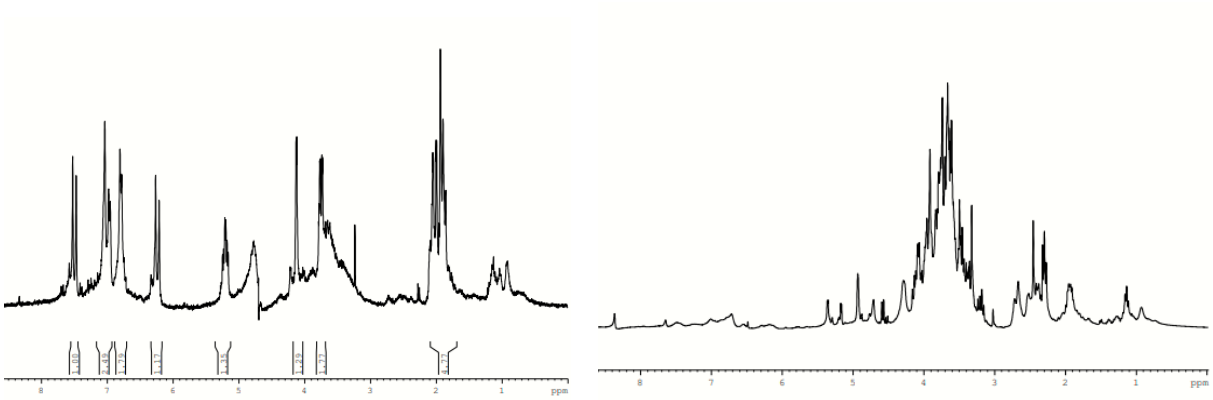
Anexo 43. Cromatoplacas de las fracciones IST 14-18



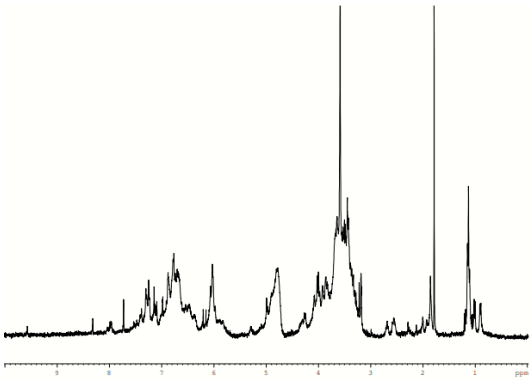
Anexo 44. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones RSM-3



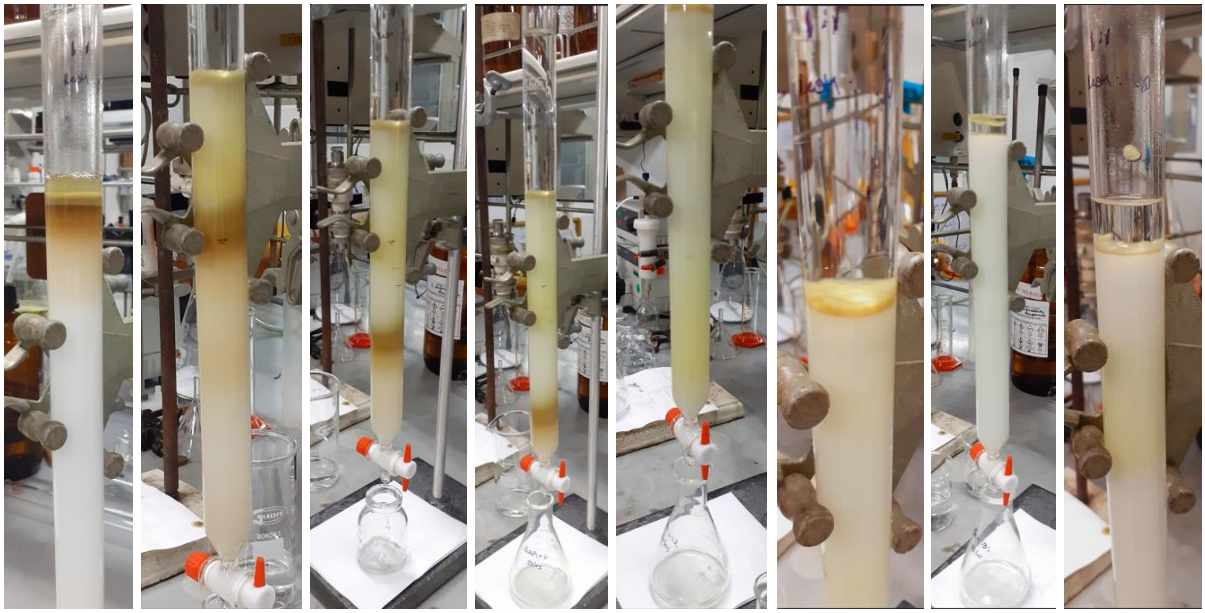
Anexo 45. Cromatoplacas de las fracciones SRI 9-13, 14-18 y 19-23)



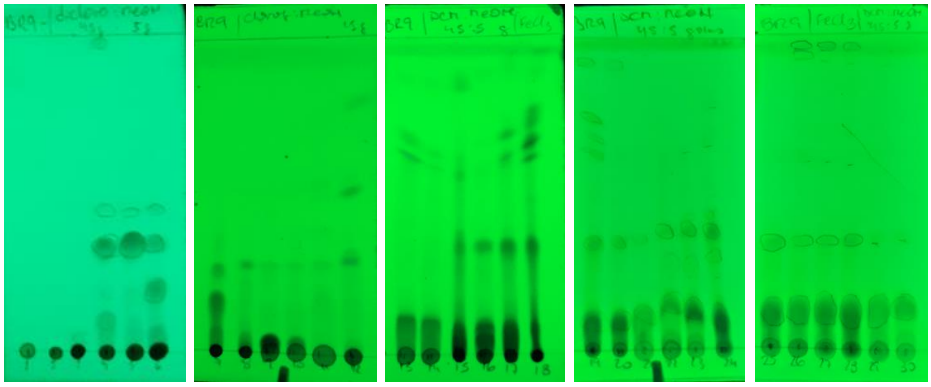
Anexo 46. Espectros de RMN de ^{1}H de las fracciones BI3-6 (izq.) y SRIM-1 (der.)



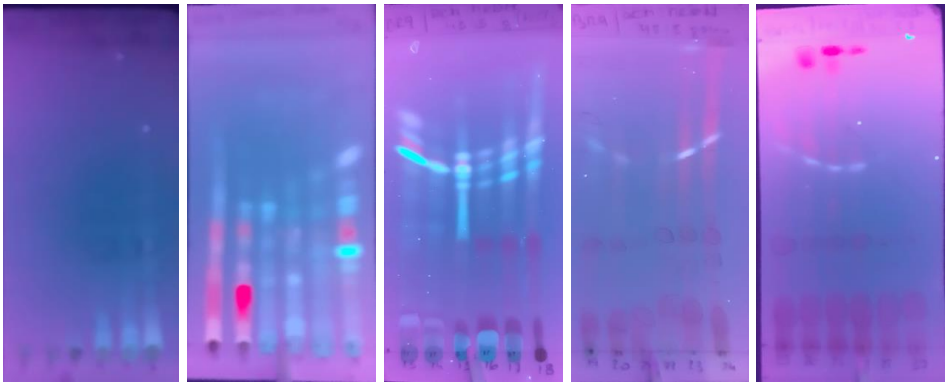
Anexo 47. Espectro de RMN de ^{1}H de la fracción SRIM-18



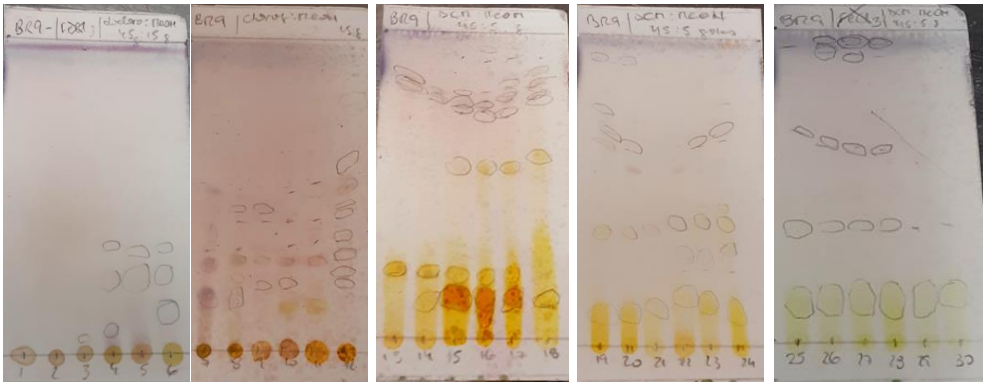
Anexo 48. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BR9



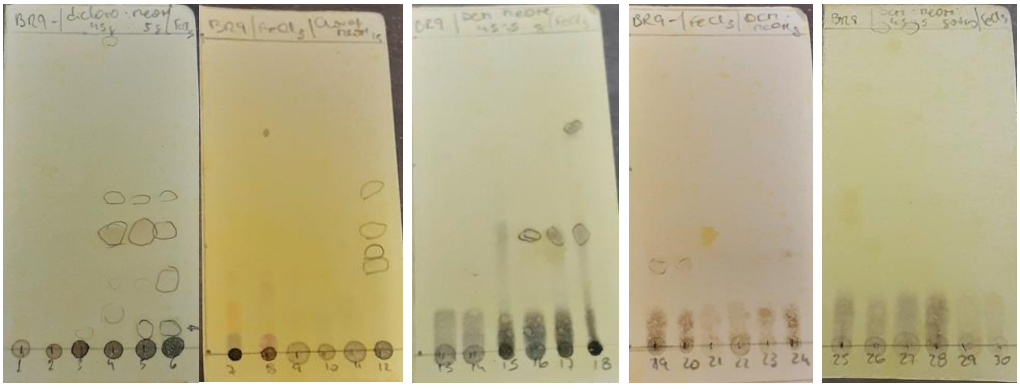
Anexo 49. Cromatoplacas de las fracciones BR9 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30 bajo UV onda corta



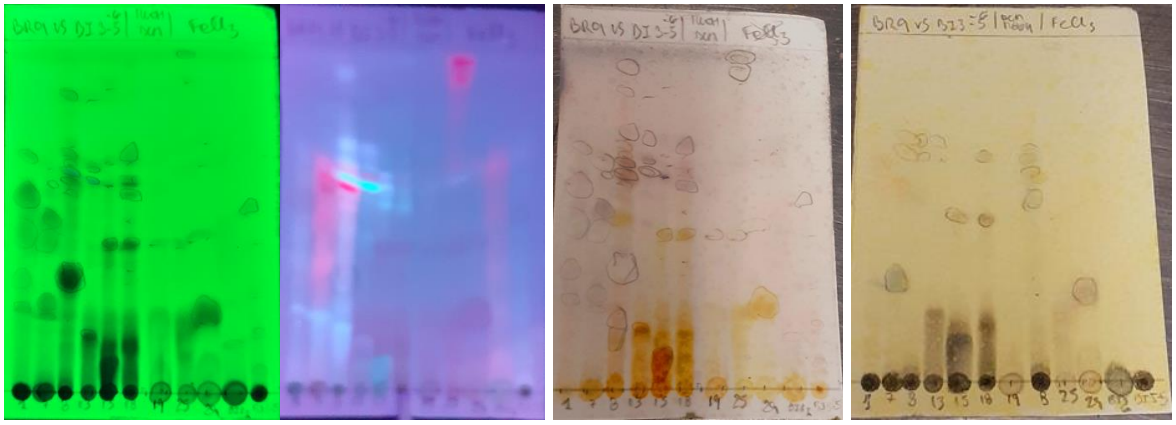
Anexo 50. Cromatoplacas de las fracciones BR9 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30 bajo UV onda larga



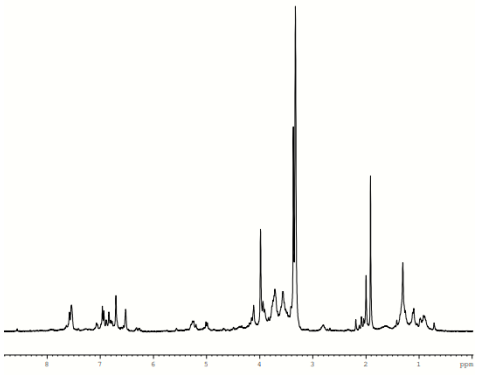
Anexo 51. Cromatoplacas de las fracciones BR9 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30 revelado con vainillina



Anexo 52. Cromatoplacas de las fracciones BR9 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30 revelado con $FeCl_3$



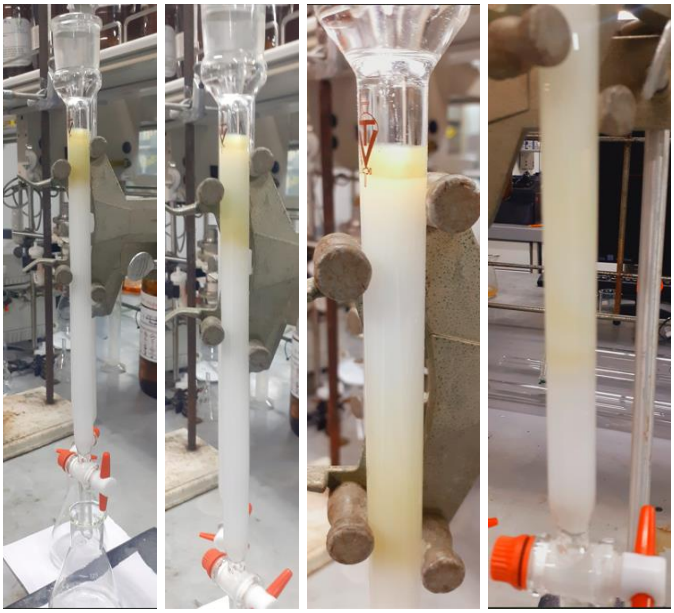
Anexo 53. Cromatoplacas de las fracciones BR9 vs BI3-5 y BI3-6



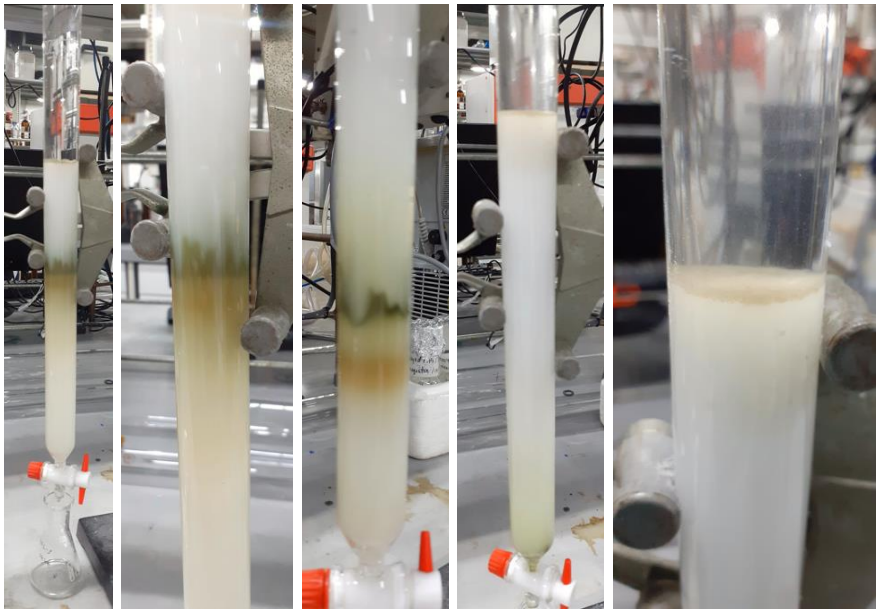
Anexo 54. Espectros de RMN de ^{1}H de la fracción BR9M-19



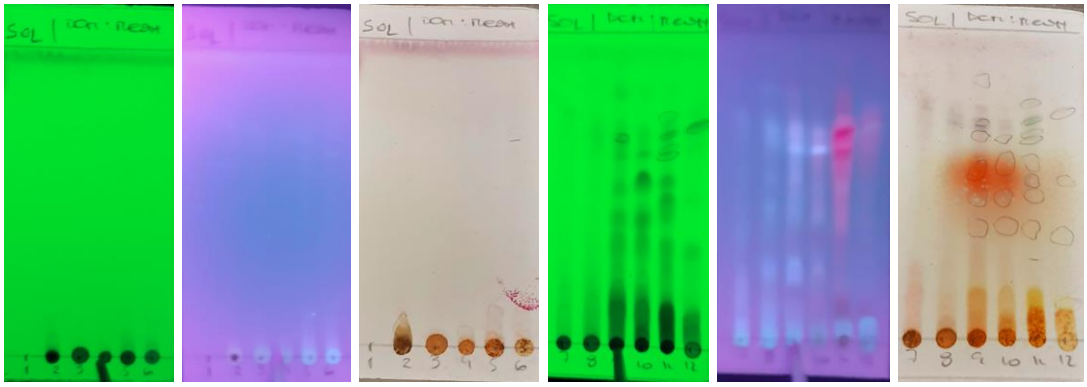
Anexo 55. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BR9M-15



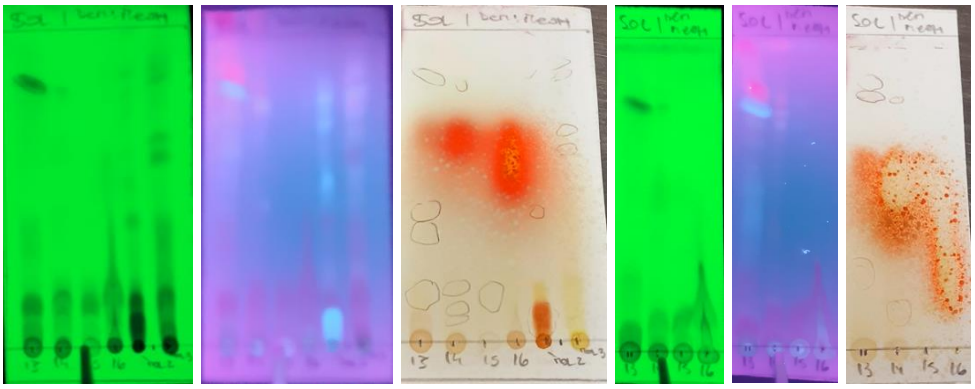
Anexo 56. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BR9M-18



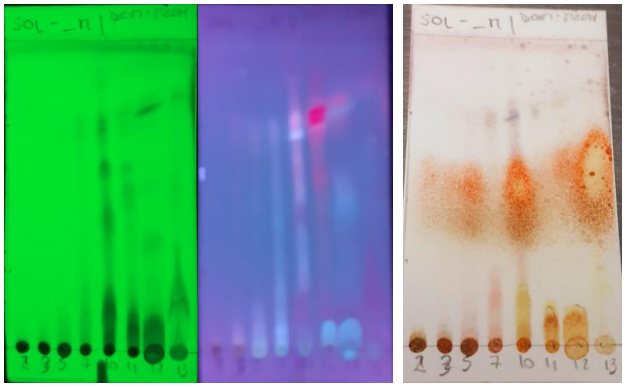
Anexo 57. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones SOL



Anexo 58. Cromatoplacas de las fracciones SOL 1-6 y 7-12



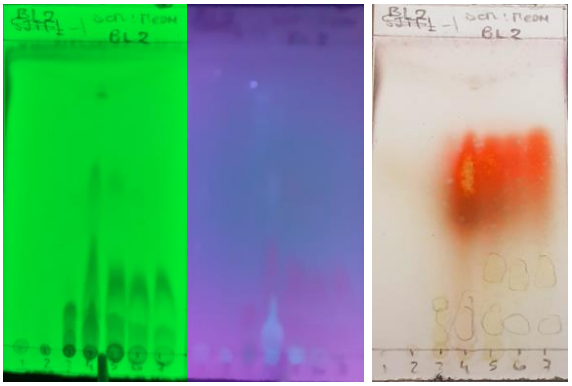
Anexo 59. Cromatoplacas de las fracciones SOL 13-16



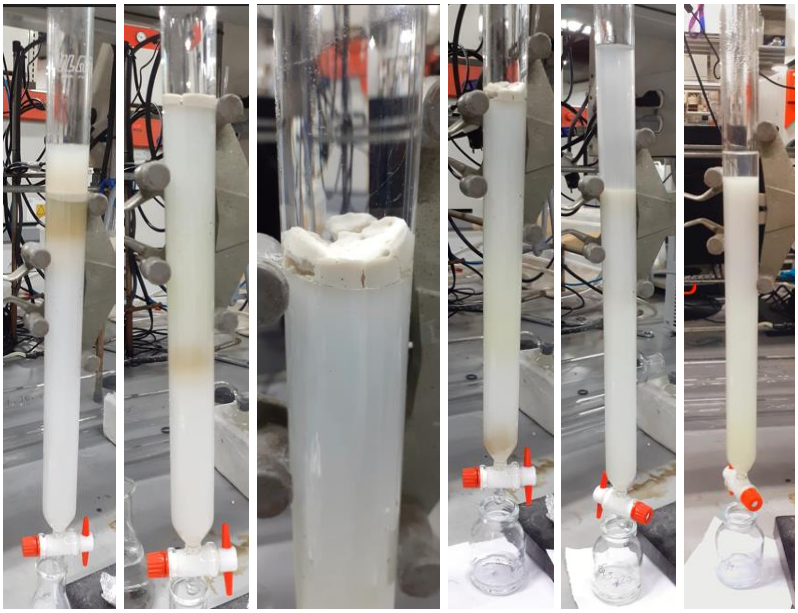
Anexo 60. Cromatoplacas de las fracciones SOL-...M



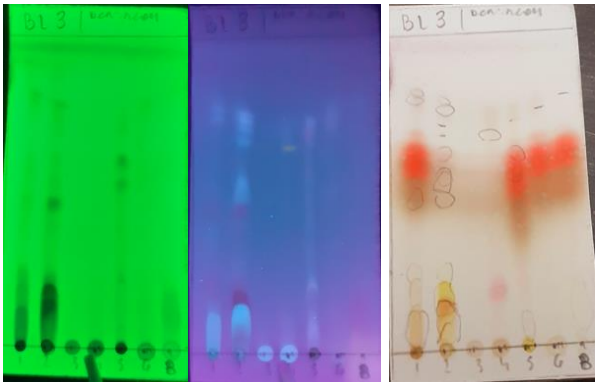
Anexo 61. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BL2



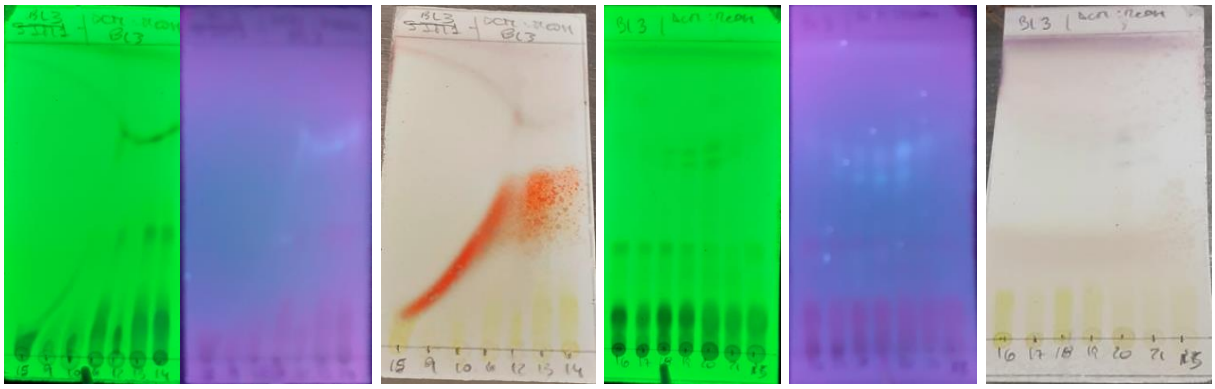
Anexo 62. Cromatoplacas de las fracciones BL2



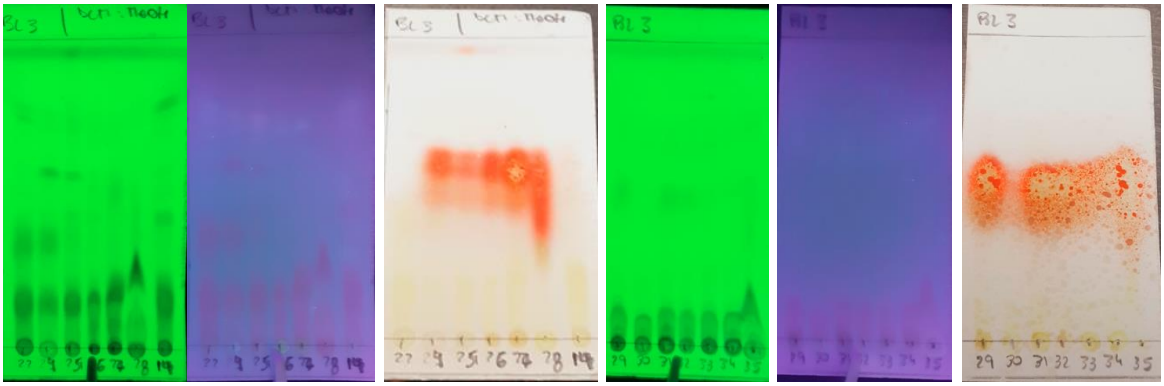
Anexo 63. Columna de cromatografía en sephadex de las fracciones BL3



Anexo 64. Cromatoplacas de las fracciones BL3 1-8



Anexo 65. Cromatoplacas de las fracciones BL3 9-15 y 15-21



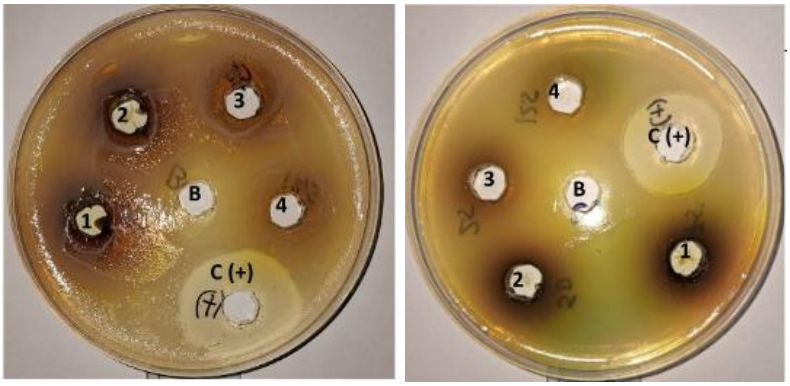
Anexo 66. Cromatoplacas de las fracciones BL3 22-28 y 29-35



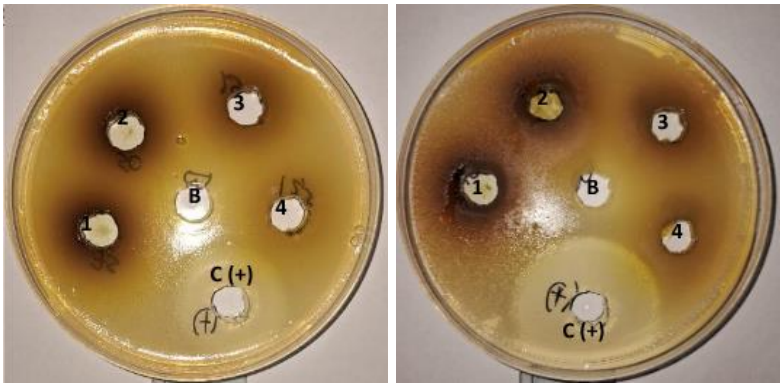
Anexo 67. Crema preparada de tipo O/W a base de la fracción acuosa FSA



Anexo 68. Prueba de dilución (izq.) y prueba de centrifugación (der.) de la crema preparada



Anexo 69. Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico soluble en mezcla triple frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (izq.) y *Pseudomona aeruginosa* (der.)



Anexo 70. Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico soluble en mezcla triple frente a cepas de *Escherichia coli* (izq.) y *Bacillus subtilis* (der.)