



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Análisis metabolómico mediante la técnica del Molecular
Networking y estudio de la actividad antimicrobiana de los
extractos de raíces de *Renealmia thyrsoidea* y *Hedychium
coronarium***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Deyvis Dante SOLIS GOZAR

ASESOR

Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ

César Máximo FUERTES RUITÓN (Coasesor)

Lima, Perú

2023



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

Solis D. Análisis metabolómico mediante la técnica del Molecular Networking y estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de raíces de *Renealmia thyrsoidea* y *Hedychium coronarium* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Deyvis Dante Solis Gozar
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	45866662
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3739-0490
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07760326
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4176-1618
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	César Máximo Fuertes Ruitón
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15289369
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6170-3549
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	María Elena Salazar Salvatierra
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08675623
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Ruben Eduardo Cueva Mestanza

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41232655
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Nelson Bautista Cruz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10260086
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Fritz Fedor Choquesillo Peña
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06203655
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos naturales terapéuticos: (estudios fitoquímicos, estudios toxicológicos, estudios farmacológicos, procesos de su industrialización)
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	No aplica
Ubicación geográfica de la investigación	<ol style="list-style-type: none"> 1. Edificio: Laboratorios de Microbiología y Química Orgánica en la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: La Victoria Latitud: -12.056173 Longitud: -77.023304 2. Edificio: Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Martín Porres Latitud: -12.02376 Longitud: -77.05653

	<p>3. Jardín Botánico de la Comunidad Nativa Yanesha Tsachopen. País: Perú Departamento: Pasco Provincia: Oxapampa Distrito: Chontabamba Latitud: -10.54352 Longitud: -75.44022</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2023
URL de disciplinas OCDE	<p>Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01</p> <p>Ciencias de las plantas, Botánica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.10</p>



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Análisis metabolómico mediante la técnica del Molecular Networking y estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de raíces de *Renalmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

DEYVIS DANTE SOLIS GOZAR

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

-----DIECINUEVE (19) Aprobado con máximos honores -----

de conformidad con el Art. 14.º del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR (R.D. N.º 000799-2022-D-FFB/UNMSM)

- Dra. María Elena Salazar Salvatierra
- Dr. Ruben Eduardo Cueva Mestanza
- Mg. Nelson Bautista Cruz
- Q.F. Fritz Fedor Choquesillo Peña

Lima, 22 de marzo de 2023.

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Presidente

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



INFORME DE EVALUACIÓN DE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD

1	Facultad	FARMACIA Y BIOQUÍMICA
2	Escuela	FARMACIA Y BIOQUÍMICA
3	Autoridad que emite el informe de originalidad	Director de la Escuela Profesional
4	Apellidos y nombres de la autoridad académica	Luis Miguel V. Felix Veliz
5	Operador del programa informático de similitudes	Luis Miguel V. Felix Veliz
6	Documento evaluado	Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico: Análisis metabólico mediante la técnica del Molecular Networking y estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de raíces de <i>Renealmia thyrsoides</i> y <i>Hedychium coronarium</i>
7	Autor(es) del documento	Br. Deyvis Dante SOLIS GOZAR
8	Fecha de recepción del documento	12/03/2023
9	Fecha de aplicación del programa informático de similitudes	13/03/2023
10	Software utilizado	Turnitin
11	Configuración del programa detector de similitudes	Excluye: - Textos entrecomillados - Bibliografía - Cadenas menores de 40 palabras
12	Porcentaje de similitud según programa detector de similitudes	10 % (El % de similitud debe ser \leq 10%)
13	Fuentes originales de las similitudes encontradas	<ul style="list-style-type: none">• Fuentes de internet varias 10 %• Publicaciones 8 %• Trabajo de estudiantes entregados a otras universidades 5 %
14	Observaciones	Realizar la edición final de la tesis. Procede la sustentación.
15	Calificación de originalidad	Documento cumple con los criterios de originalidad.
16	Fecha del informe	13/03/2023

Nota: se adjunta archivo de reporte del sistema Turnitin en el que se resaltan las similitudes detectadas.



UNMSM

Firmado digitalmente por FELIX
VELIZ Luis Miguel Visitacion FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 13.03.2023 16:43:25 -05:00

Dr. Luis Miguel V. Felix Veliz

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a todas las personas que me han ayudado a lo largo de mi vida y que me han permitido llevar a cabo la presente investigación. Quiero resaltar el nombre de Dante Solis Blancas (mi padre) y Sofia Gozar Palomino (mi madre) quienes han sido parte fundamental en mi formación con su ejemplo, sacrificio y mucha confianza en mí y mis capacidades. Mi agradecimiento para con ellos será por siempre.

Quiero dedicar este trabajo, también, a mis hermanos Julio y Ángel quienes me han acompañado incondicionalmente, a Juana Florencia por su gran afecto y cuidados. A Rosa Sofia y Rosa Isabela por alegrarme con sus ocurrencias e inteligencia. A Stephanie Barbachan por su gran cariño y apoyo. Todos ellos son parte de mi motivación a diario.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis, el Dr. Julio Ruiz y el Dr. Cesar Fuertes porque me han ayudado de manera importante a lo largo de la investigación.

A la comunidad Nativa Yanesha de Tsachopen que han ayudado con la recolección de la especie de estudio *Renealmia thyoidea*. Ha sido muy gratificante poder conocerla y compartir experiencias.

A la doctora María Elena Salazar y a los miembros del laboratorio de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada que me han ayudado con consejos durante la ejecución de la tesis.

Al Jardín Botánico de Missouri, sede Oxapampa, que me ha ayudado con la determinación de los nombres científicos de las especies estudiada en este trabajo.

Al SERFOR por la asesoría brindada para obtener los permisos necesarios para el desarrollo de la presente tesis.

A todas las personas que han aportado de diferentes maneras en a lo largo del desarrollo del proyecto.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
SUMMARY	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Planteamiento del problema	1
I.1.1 Formulación del problema.....	2
I.2 Objetivos	2
I.2.1 Objetivo general.....	2
I.2.2 Objetivos específicos	2
I.3 Importancia y alcance de la investigación	3
I.4 Limitaciones de la investigación	5
II. REVISIÓN LITERARIA.....	5
II.1 Antecedentes del estudio	5
II.2 Marco teórico.....	7
II.2.1 Familia Zingiberaceae.....	7
II.2.2 Género <i>Renealmia</i>	8
II.2.3 Género <i>Hedychium</i>	10
II.2.4 Aspectos botánicos de las especies en análisis	13
II.2.4.1 <i>Renealmia thyrsoides</i>	13
II.2.4.2 <i>Hedychium coronarium</i>	15
II.2.5 Biosíntesis de diarilheptanoides, diterpenos tipo labdano y flavanos.	19

II.2.5.1	Biosíntesis de diterpenos tipo labdano.....	19
II.2.5.2	Biosíntesis de diarilheptanoides.....	20
II.2.5.1	Biosíntesis de flavanonas	21
II.2.6	Fragmentación estructural de diarilheptanoides, diterpenos tipo labdano y flavanos por espectrometría de masas.	22
II.2.6.1	Fragmentación estructural de diarilheptanoides.....	22
II.2.6.2	Fragmentación estructural de diterpenos tipo labdano.....	24
II.2.6.3	Fragmentación estructural de flavanos	25
II.2.7	Metabolómica.....	28
II.2.7.1	Enfoques del estudio metabolómico.	28
II.2.8	Método de análisis de resultados MS ² : MZmine 2 y Molecular Networking.....	28
II.2.8.1	Preprocesamiento de datos por MZmine 2	28
II.2.8.2	Principios y objetivos de “Molecular Networking”	29
II.2.9	Análisis de la actividad antimicrobiana por el método de microdilución colorimétrica.	30
II.2.10	Contrato de acceso a recursos genéticos en el estudio de especies silvestres peruanas.	31
II.3	Glosario de términos.....	32
III.	HIPÓTESIS Y VARIABLES	33
III.1	Hipótesis.....	33
III.2	Variables	33
III.3	Operacionalización de variables	33
IV.	PARTE EXPERIMENTAL	34
IV.1	Área de estudio	34
IV.2	Diseño de investigación.....	34
IV.3	Población y muestra	35
IV.3.1	Población	35

IV.3.2	Muestra	35
IV.4	Consideraciones éticas.....	35
IV.5	Unidad de análisis	35
IV.6	Metodología.....	36
IV.6.1	Obtención de los extractos metanólicos.	36
IV.6.1.1	Recolección.....	36
IV.6.1.2	Obtención de los extractos metanólicos.....	36
IV.6.2	Preparación de muestras para el análisis por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y en tándem (MS/MS).....	37
IV.6.2.1	Preparación de las muestras	37
IV.6.2.2	Condiciones de análisis de HPLC.....	37
IV.6.2.3	Condiciones del análisis por espectrometría de masas	38
IV.6.3	Análisis de datos obtenidos por espectrometría de masas.....	39
IV.6.3.1	Preprocesamiento de datos por MZmine2	39
IV.6.3.2	Análisis por GNPS y visualización por Cytoscape.....	41
IV.6.4	Determinación de la actividad antibacteriana	42
IV.6.4.1	Preparación de diluciones.....	42
IV.6.4.2	Preparación del control de esterilidad.....	43
IV.6.4.3	Preparación del inóculo	44
IV.6.4.4	Preparación de ciprofloxacina como control	44
IV.6.4.5	Llenado de microplacas y determinación de la actividad antimicrobiana.	44
V.	RESULTADOS	46
V.1	Metabolitos presentes en los extractos de <i>Renalmia thyrsoides</i> , <i>Hedychium coronarium</i> y <i>Curcuma longa</i>	46
V.2	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de <i>Renalmia thyrsoides</i> , <i>Hedychium coronarium</i> y <i>Curcuma longa</i>	53
VI.	DISCUSIÓN.....	54

VII. CONCLUSIONES	58
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
IX. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de la familia Zingiberaceae ²¹	7
Figura 2. Curcumina (1) ²⁶	8
Figura 3. Repartición geográfica del género <i>Reinealmia</i> ³³	9
Figura 4. Diterpenos labdanos de <i>Reinealmia alpinia</i> : 11-hydroxy-8(17),12(E)-labdadien-15,-16-dial11,15-hemiacetal (2); 16-oxo-8(17),12(E)-labdadien-15-oic acide (3); 8(17),12(E)-labdadien-15,16-dial (4); (+)-zerumin B (5) ^{11, 34}	9
Figura 5. Metabolitos obtenidos de <i>Reinealmia chrysotrycha</i> ³⁶	9
Figura 6. Diterpenos labdanos (10, 11 y 12) ³⁷ y diarilheptanoides (13 y 14) ³⁸ de <i>Reinealmia exaltata</i>	10
Figura 7. Metabolitos purificados de <i>Reinealmia nicolaioides</i> ^{39, 40}	10
Figura 8. Distribución geográfica del género <i>Hedychium</i> ⁴²	11
Figura 9. Diterpenos labdanos de <i>Hedychium forrestii</i> ⁴⁴	11
Figura 10. Estructuras de los compuestos 27-33 purificadas de las raíces de <i>Hedychium gardnerianum</i> ⁴⁵	11
Figura 11. Estructuras de los compuestos 34-38 purificadas de las hojas y tallos de <i>Hedychium malayanum</i> ⁴⁶	12
Figura 12. Compuestos purificados de <i>Hedychium villosum</i> (39) ⁴⁸ y <i>Hedychium yunnanense</i> (40-42) ⁴⁹	12
Figura 13. Rizoma de <i>Reinealmia thyrsoides</i> (fuente propia)	13
Figura 14. Distribución geográfica de <i>Reinealmia thyrsoides</i> ⁵²	14
Figura 15. Moléculas purificadas a partir de las hojas (43-53) y raíces (54-60) de <i>Reinealmia thyrsoides</i> ⁵	15
Figura 16. Distribución geográfica de <i>Hedychium coronarium</i> ⁵⁸	16
Figura 17. Metabolitos encontrados en la raíz de <i>Hedychium coronarium</i> con actividad biológica ^{61, 64}	17
Figura 18. Moléculas extraídas de raíces de <i>Hedychium coronarium</i> . Diterpenos (61-71), diarilheptanoides (72 y 73) y sesquiterpenos (74 y 75) ¹⁴	18

Figura 19. La vía de formación de diferentes terpenos a partir de su precursor isopreno de 5 carbonos ⁶⁶	19
Figura 20. A partir de la protonación de un doble enlace de GGDP se logra formar precursores de labdanos normales y enantiomericos ^{66, 67}	19
Figura 21. La formación de curcuminoides se desarrolla a partir de sustratos iniciales [cinamoil-CoA (1a), <i>p</i> -cumaroil-CoA (2a) y feruloil-CoA (3a)] ⁶⁸	20
Figura 22. Los diversos pasos para la biosíntesis de flavanonas ⁶⁹	21
Figura 23. Fraccionamiento de curcuminoides ¹³	22
Figura 24. ESI-MS/MS (+) fragmentación de tres curcuminoides (1, 2, 3) ⁷¹	23
Figura 25. fragmentación de diterpenos tipo labdano a partir de raíces de <i>H. coronarium</i> ⁷²	24
Figura 26. El fragmento de <i>m/z</i> 239 forma otros iones de <i>m/z</i> 121, 105 y 91 ⁷³	24
Figura 27. Mecanismo de fragmentación de abietanos ⁷³	25
Figura 28. Mecanismo de fragmentación para labdanos ⁷³	25
Figura 29. Formación de iones B y C a partir de un diterpeno tipo labdano desprotonado ⁷⁴	25
Figura 30. Fragmentación de flavanonas por espectrometría de	26
Figura 31. Fragmentación propuesta de narginina e isonarginina por espectrometría de masas en modo negativo ⁷⁶	27
Figura 32. Etapas del procesamiento con MZmine 2 ¹⁷	29
Figura 33. Los elementos constituyentes de una red molecular (fuente propia).	29
Figura 34. Células vivas activas provocan la reducción de resazurina (“purple-blue”) a resorufina (“Pink-colorless”) ⁸⁰	30
Figura 35. Cromatograma formado por la unión de picos con un <i>m/z</i> entre 319.2170 – 319.2308, estos picos se han detectado en un tiempo de retención cercano a 23.14 minutos.	39

Figura 36. Cromatograma de una molécula con un m/z 319.2265 que agrupa posibles isótopos detectados. Se afina la selección al excluir señales consideradas como ruido del análisis.	40
Figura 37. (A) Tabla en la que se observa la molécula con un m/z 317.211 presente tanto en la muestra MA_02 y MD_01. (B) Se confirma la presencia de cada pico en cada una de las muestras citadas con una mínima diferencia en el tiempo de retención	40
Figura 38. Cuadro en el que se numera algunas moléculas y su presencia en los tres extractos analizados (MD_01, MA_02 y MC_03), además de la fórmula bruta de la mayoría de ellos.....	41
Figura 39. Los resultados del preprocesamiento se cargan en la plataforma GNPS para la anotación de moléculas detectadas.	41
Figura 40. Representación de resultados con Cytoscape.	42
Figura 41. Método del llenado de microplacas.....	45
Figura 42. Gráfico producido por Cytoscape donde se ven todos los metabolitos detectados representados en forma de esfera y con su masa/carga (m/z)...	46
Figura 43. Distribución de metabolitos desreplicados en <i>H. coronarium</i> , <i>C. longa</i> y <i>R. thyrsoides</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ficha de recolección de <i>Renealmia thyrsoides</i>	36
Tabla 2. Ficha de recolección de <i>Hedychium coronarium</i>	36
Tabla 3. Variación del sistema de solventes en gradiente.	38
Tabla 4. Parámetros de scan Full MS.....	38
Tabla 5. Parámetros MS ²	38
Tabla 6. Parámetros de fuente de ionización.....	38
Tabla 7. Preparación de la dilución madre.....	42
Tabla 8. Preparación de diluciones intermedias a partir de la dilución madre.	43
Tabla 9. Preparación de diluciones finales (1:50).	43
Tabla 10. Preparación de diluciones sucesivas de ciprofloxacino.....	44
Tabla 11. Tabla resumen de los metabolitos detectados en <i>H. coronarium</i> , <i>C. longa</i> y <i>R. thyrsoides</i> . Se considera por cada molécula un nombre, tiempo de retención (T.R.), masa/carga (m/z), código de identificación asignado por MzMine2 (ID), fórmula bruta y fracciones de estas.	47
Tabla 12. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>Hedychium coronarium</i> , <i>Curcuma longa</i> y <i>Renealmia thyrsoides</i> y ciprofloxacina (control positivo) frente a cepas ATCC Gram-positivas.	53
Tabla 13. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de <i>Hedychium coronarium</i> , <i>Curcuma longa</i> y <i>Renealmia thyrsoides</i> y ciprofloxacina (control positivo) frente a cepas ATCC Gram-negativas.....	53

ABREVIATURAS

IRD: Instituto de Investigación para el Desarrollo
GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking
ICSN: Institut Chimique des Substances Naturelles
TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
MIC: Concentración Mínima Inhibitoria
CcCLS: copal-8-ol difosfato diterpeno sintasa
GGDP: geranilgeranildifosfato
PAL: fenilalanina amino liasa
4CL: 4-cumarato CoA ligasa
C4H: cinamato 4-hidroxilasa
HCT: hidroxicinamoil transferasa
C3H: cinamato 3-hidroxilasa
OMT: *O*-metiltransferasa
DCS: dicétido-CoA sintasa
CURS: curcuminoide sintasa
PAL/TAL: fenilalanina/tirosina amoniaco liasa
CHS: chalcona sintasa
CHI: chalcona isomerasa
MN: Molecular Networking
TSA: Tryptic Soy Agar (Agar Tripticasa de Soya)
ACN: acetonitrilo
UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

RESUMEN

Se determinó el perfil metabolómico y la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*. Las moléculas de los extractos fueron analizadas por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) mediante el método LC-ESI-HRMS (Exactive Plus Orbitrap). El procesamiento de datos se realizó aplicando la técnica del Molecular Networking. Se probó la actividad antimicrobiana de los extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922 empleando el método de microdilución en placa. Se utilizó el extracto metanólico de las raíces de *Curcuma longa* como referencia en el estudio metabolómico y antimicrobiano. Del extracto de *Hedychium coronarium* se desreplicó 22 diterpenos, 1 sesquiterpeno, 1 curcuminoide y 2 dipeptidos; y presentó una CMI de 1000 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* y de 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Del extracto de *Renealmia thyrsoides* se desreplicó 3 diterpenos, 1 sesquiterpeno, 2 curcuminoideos, 1 dihidrobenzofuranona, 1 flavanona y 2 dipeptidos; y presentó una CMI de 2000 µg/mL para *Staphylococcus aureus* y de 1000 µg/mL para *Bacillus subtilis*. Del extracto de *Curcuma longa* se desreplicó 1 diterpeno, 3 sesquiterpenos y 9 curcuminoideos; y presentó una CMI de 500 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* y de 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Ningún extracto fue activo frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Se concluye que las especies con mayor número de diterpenos y/o curcuminoideos en su extracto presentaron mayor actividad antimicrobiana.

Palabras clave: perfil metabolómico, actividad antibacteriana, *Renealmia thyrsoides*, *Hedychium coronarium*, diterpenos, curcuminoideos.

SUMMARY

The metabolomic profile and the antibacterial activity of the methanolic extracts of the roots of *Renealmia thyrsoides* and *Hedychium coronarium* were determined. The molecules of the extracts were analyzed by high-resolution mass spectrometry (HRMS) using the LC-ESI-HRMS (Exactive Plus Orbitrap) method. Data processing was carried out applying the Molecular Networking technique. The antimicrobial activity of the extracts was tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 using the plate microdilution method. The methanolic extract of the roots of *Curcuma longa* was used as a reference in the metabolomic and antimicrobial study. From the *Hedychium coronarium* extract, 22 diterpenes, 1 sesquiterpene, 1 curcuminoid and 2 dipeptides were dereplicated; and presented an MIC of 1000 µg/mL for *Staphylococcus epidermidis* and 250 µg/mL for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. From the extract of *Renealmia thyrsoides*, 3 diterpenes, 1 sesquiterpene, 2 curcuminoids, 1 dihydrobenzofuranone, 1 flavanone and 2 dipeptides were dereplicated; and presented a MIC of 2000 µg/mL for *Staphylococcus aureus* and 1000 µg/mL for *Bacillus subtilis*. From the *Curcuma longa* extract, 1 diterpene, 3 sesquiterpene and 9 curcuminoids were dereplicated; and presented a MIC of 500 µg/mL for *Staphylococcus epidermidis* and 250 µg/mL for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. No extract was active against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. It is concluded that the species with the highest number of diterpenes and/or curcuminoids in their extract presented greater antimicrobial activity.

Keywords: metabolomic profile, antibacterial activity, *Renealmia thyrsoides*, *Hedychium coronarium*, diterpenes, curcuminoids.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Planteamiento del problema

La problemática actual sobre el estudio fitoquímico de la enorme biodiversidad amazónica, andina y costera del Perú radica en la poca utilización de la metabolómica para analizar las especies endémicas de nuestro territorio. Por ejemplo, al contar con un gran material biológico en el Perú, se puede avanzar en la desreplicación y el descubrimiento de nuevas entidades químicas interesantes si es que se aplican técnicas como el Molecular Networking, la resonancia magnética nuclear, la cromatografía a escala preparativa entre otras. Esto lo ha venido realizando Brasil y la información de sus investigaciones la comparte a través de una plataforma llamada NuBBEDB, esta presenta una librería abierta y gratuita que contiene los resultados obtenidos del estudio de la biodiversidad brasileña ¹. Efectos como el cambio climático, introducción de especies exóticas, incendios, la actividad humana y otras han puesto en peligro las especies endémicas ². Es aún más preocupante que toda esa riqueza biológica no pueda estar reportada en estudios metabolómicos, fitoquímicos o de otro tipo. Actualmente existen fondos y organismos internacionales que estudian nuestra biodiversidad apelando a las ideas ya descritas, entre estas está el IRD (Instituto de Investigación para el Desarrollo) de Francia, que ya han realizado estudios etnofarmacológicos ³, estudios de actividad biológica ⁴ y estudios fitoquímicos ⁵ de nuestras especies de plantas nativas y cuyos resultados se encuentran publicados en artículos de grandes revistas científicas o libros ⁶. Ante esta realidad, se hace importante que la universidad pública y privada del país lideré este tipo de estudios.

En estos últimos 10 años, la metabolómica ha intentado mejorar el análisis de muestras biológicas o de sustancias naturales. En el intento de facilitar la desreplicación de metabolitos, existen bases de datos como MassBank ⁷ y ReSpect ⁸ que comparten el espectrograma de masas y el fraccionamiento de miles de moléculas biológicas. Es así como GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) ha creado una plataforma para reunir estas bases de datos y que investigadores de todo el mundo puedan compartir los espectrogramas de masa de las moléculas que van purificando o de los

estándares con los que trabajan, con esta información es posible desreplicar varios metabolitos y relacionarlos gracias a un algoritmo de similitud. En consecuencia, al reagrupar diferentes moléculas según su grado de similitud se establecen familias de moléculas análogas dentro de un extracto ^{9,10}.

Debido a lo expuesto y en el marco del presente proyecto de tesis, la evaluación antimicrobiana y metabolómica de los extractos metanólicos de las raíces de *Hedychium coronarium* y *Renealmia thyrsoides* permitirá conocer el perfil metabolómico de estas plantas y relacionarlas con su actividad antimicrobiana, con la intención de identificar a las probables moléculas responsables de dicha actividad. La elección de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*, dos especies ubicadas en la comunidad nativa Tsachopen en Oxapampa, Pasco se debe a que el extracto etanólico de estas especies tiene una buena acción leishmanicida y potencialmente sus compuestos podrían, además, presentar actividad antimicrobiana ⁴. Entonces, este proyecto es un ejemplo de cómo se puede estudiar la biodiversidad peruana con un enfoque actual y, además, buscar, a través de estudios biológicos, posibles usos para tratar enfermedades infecciosas.

I.1.1 Formulación del problema

- ❖ ¿Cuál es el perfil metabolómico y la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*?

I.2 Objetivos

I.2.1 Objetivo general

- ❖ Determinar el perfil metabolómico y la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*.

I.2.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar el peso molecular de los componentes de los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* por espectrometría de masas.

- ❖ Determinar el perfil metabolómico presente en los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* usando como referencia el extracto de *Curcuma longa*
- ❖ Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* usando como referencia el extracto de *Curcuma longa*

I.3 Importancia y alcance de la investigación

La importancia del trabajo realizado radica en ampliar la información sobre el perfil metabolómico de dos especies: *Hedychium coronarium* y *Renealmia thyrsoides* (especie endémica y poco estudiada). Esta última crece de manera silvestre en la Comunidad Nativa Yanasha Tsachopen en Oxapampa (Pasco). Fue trascendental revalorar tal especie nativa y poco conocida a través del estudio de su composición química y actividad microbiológica. De esta forma, se pudo beneficiar a la Comunidad Nativa Yanasha con una investigación científica de *Renealmia thyrsoides*. Esto motivó a los Yaneshas a cuidar de su único ejemplar presente en el Jardín Botánico de su Comunidad.

La innovación técnica del trabajo consiste en aplicar el procedimiento del Molecular Networking (MN) para comparar el perfil metabolómico de diferentes especies y conocer sus similitudes y diferencias con respecto a la producción de metabolitos secundarios. Se reportó que *Hedychium coronarium* y el género *Renealmia* producen diterpenos tipo labdano ^{11, 12}; sin embargo, no se ha descrito la presencia de estas moléculas en *Renealmia thyrsoides* por lo que resultó interesante buscarlas en esta especie. También, se decidió incluir a *Curcuma longa* como un estándar de comparación debido a que produce una gran variedad de curcuminoides ¹³, tales moléculas han sido encontradas en pequeñas cantidades tanto en *Hedychium coronarium* como en *Renealmia thyrsoides* ^{5, 14}; no obstante, fue importante seguir avanzando y saber si existen más curcuminoides en las especies estudiadas. Es así como el MN logró responder a las necesidades de la investigación y permitió visualizar la presencia de diterpenos tipo labdano, curcuminoides y otras moléculas bioactivas en *H. coronarium* y *R. thyrsoides*. Esto abre una gran cantidad de

oportunidades con respecto al estudio metabolómico de extractos vegetales y la desreplicación de moléculas bioactivas.

El MN no es de uso rutinario en la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM a pesar de que esta institución cuenta con una amplia tradición en el estudio de plantas desde varias aristas de la ciencia (microbiología, farmacología, toxicología, etc.). Muchos extractos de diferentes plantas estudiadas en la Facultad han demostrado excelentes resultados. Por ejemplo, el extracto alcohólico y sus respectivas fracciones obtenidas a partir de las hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. tuvieron efectos citotóxicos, antitumorales y actividad antioxidante, sin embargo, no se ha podido establecer el perfil metabolómico de esta especie, dicha información podría ayudar a entender mejor estos resultados ¹⁵. Es por tal motivo que la presente tesis va a contribuir a brindar una nueva perspectiva en el análisis de plantas a nivel molecular y ayudar al entendimiento de la actividad biológica que presentan.

Los metabolitos secundarios de las plantas han demostrado tener un potencial antimicrobiano importante sean usados solos, en sinergismo o potenciando otro agente, por tal motivo, en la actualidad son probadas para ver su actividad frente a microorganismos drogo resistentes ¹⁶. En ese sentido, *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* son especies amazónicas que se encuentran en zonas geográficas endémicas de malaria y paludismo, en consecuencia, son plantas que pueden producir sustancias antimicrobianas. Por todo lo expuesto, el estudio de los metabolitos y la actividad antimicrobiana de sus extractos resultó notable.

El presente trabajo de investigación marca un hito al ser probablemente la primera tesis de pregrado en Perú que cumpla con el Protocolo de Nagoya al contar con los permisos de investigación y de Acceso a Recursos Genéticos otorgados por SERFOR. Es así como se marca el camino para el estudio de especies nativas como *Renealmia thyrsoides* que necesitan de estos trámites. Se espera que esta experiencia sirva para motivar a otros investigadores a implementar estas normas en su trabajo científico.

I.4 Limitaciones de la investigación

La investigación se limitó a desreplicar los metabolitos de los extractos de las especies estudiadas. La identificación absoluta requiere de técnicas complementarias como la purificación de las moléculas por cromatografía a escala preparativa, la resonancia magnética nuclear, la cristalografía, entre otras.

II. REVISIÓN LITERARIA

II.1 Antecedentes del estudio

Wang et al publicaron un artículo donde detallan el uso de la técnica denominada Molecular Networking (MN) que pueden analizar datos de una gran cantidad de metabolitos. El MN permite mejorar la investigación de productos naturales al hacer uso y compartir información con investigadores de todo el mundo. El mecanismo se desarrolla a través de una plataforma online donde se tiene acceso a múltiples bases de datos; estas serán utilizados para que los resultados obtenidos a través de un análisis por espectrometría de masas de los extractos vegetales estudiados sean procesados y comparados. Después del tratamiento de datos, se obtiene una lista de moléculas que han sido detectados según su espectrograma de masas (proceso llamado desreplicación)⁹. Esta técnica resulta muy útil para evaluar el perfil metabolómico de una especie y compararlo con otras; y si consideramos que en el país existe una gran biodiversidad, se cuenta con el material biológico para realiza múltiples estudios de este tipo.

Olivon et al realizaron mejoras de la técnica del MN que han llevado a conocer en detalle la distribución y cuantificación relativas de los metabolitos de un extracto de planta, así como la presencia de análogos de moléculas conocidas y un conocimiento más concreto del tiempo de retención en el análisis cromatográfico¹⁷.

Valdeau et al estudiaron los extractos etanólicos de las raíces de las especies de *Renalmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* recolectadas en la Comunidad Nativa Yanasha. La actividad leishmanicida fue determinada mediante el ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción

del compuesto MTT perteneciente a la familia de sales de tetrazolio. Ambas obtuvieron interesantes resultados con un IC50 de 10 ± 0.8 y 10 ± 2.6 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente ⁴, sin embargo, no existen muchos estudios de la actividad antimicrobiana para un extracto alcohólico de *Renealmia thyrsoides*.

Para profundizar el conocimiento de los metabolitos presentes en hojas y raíces de *Renealmia thyrsoides*, Cabanillas et al llevaron a cabo un estudio fitoquímico mediante fraccionamiento guiado por bioensayo y las estructuras de las moléculas aisladas se determinaron mediante un análisis espectral detallado. No se encontró las moléculas responsables de la actividad leishmanicida. Los resultados mostraron que un sesquiterpeno, un dihidrobenzofuranona y un flavonoide presentan una actividad leishmanicida moderada con un 36.5 ± 10.5 $\mu\text{g/ml}$, 19.7 ± 2.3 $\mu\text{g/ml}$ y un 23.1 ± 5.3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente ⁵, esto sugiere un cambio de metodología para poder evaluar ampliamente los metabolitos contenidos en esta planta.

Con respecto a *Hedychium coronarium*, Wei et al realizaron una revisión bibliográfica donde detallaban los compuestos químicos producidos por esta planta. Se reportó que las raíces de esta especie producen una gran cantidad de diterpenos tipo labdano ¹⁴.

Liu et al demostraron que las técnicas estándares de microdilución son muy útiles para medir la actividad antifúngica, pero están optimizadas para el análisis de un solo compuesto y no para un extracto vegetal. Por tal motivo ellos han determinado que, para el estudio de un extracto, el uso de un indicador colorimétrico (como es el colorante resazurina) permite tener resultados reproducibles y bien definidos: las células fúngicas provocan la reacción de reducción de resazurina, este colorante pasa de tener un color purpura-azul a uno rosado incoloro (resorufina). Es de esta manera cómo se cuantifica de forma indirecta el metabolismo fúngico y, en consecuencia, no necesita de instrumentos de medición espectrométricas para evaluar el cambio de color y también la actividad antifúngica ¹⁸. Sarker et al han coincidido que para el caso de la evaluación antibacteriana de productos naturales (productos purificados, extractos vegetales y sus fracciones obtenidas por cromatografía), el uso del indicador resazurina ha demostrado gran precisión al medir la

concentración mínima inhibitoria (CMI). Además, se le considera simple, rápida, de alta sensibilidad y robusta ¹⁹.

Finalmente, cada uno de estos trabajos han permitido guiar el desarrollo de la investigación. Tanto Wang et al y Olivon et al han descrito la metodología que hemos utilizado para el análisis de datos del estudio metabolómico. Se han considerado los aportes de Valdeau et al y Cabanillas et al al momento de seleccionar las especies de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*. Los estudios de estos investigadores además han aportado información sobre la comunidad nativa Yanasha quienes nos han entregado una muestra de *Renealmia thyrsoides* para el desarrollo de la presente tesis. Los conceptos y procedimientos con algunas modificaciones de los trabajos de Liu et al y Sarker et al se han empleado en la determinación de la CMI de los extractos analizados.

II.2 Marco teórico

II.2.1 Familia Zingiberaceae

Comprende alrededor de 50 géneros y más de 1300 especies distribuidas en las regiones tropicales de Asia, África y América (**figura 1**). La mayoría de las especies que la conforman presentan un valor comercial importante al ser utilizadas como plantas medicinales, condimentos y plantas ornamentales ²⁰.

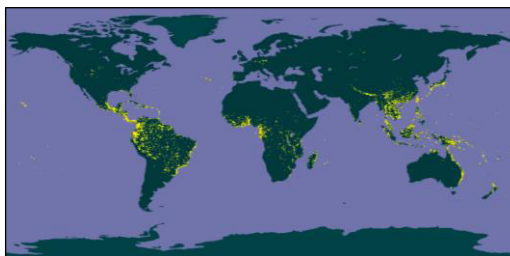


Figura 1. Distribución geográfica de la familia Zingiberaceae ²¹.

Varias especies de esta familia muestran actividades antimicrobianas, por ejemplo, *Aframomum citratum* es usado tradicionalmente para tratar infecciones, la malaria y el cáncer; el extracto metanólico de la corteza de esta planta ha demostrado una actividad moderada y significativa frente a los microorganismos *E. coli*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. stuartii* y *P. aeruginosa* ^{22, 23}.

Los estudios fitoquímicos demuestran que esta familia produce una gran variedad de polifenoles, entre estos destaca el metabolito activo llamado curcumina (1) (**figura 2**) (producido por *Curcuma longa*) que demuestra un efecto positivo en la memoria y la atención, sin embargo, es aún necesario más evidencias para comprender su efecto en la cognición humana ^{24, 25}. Además, este metabolito ha presentado poca actividad frente al protozoo *Leishmania mexicana* ²⁶. De otro lado, *Zingiber officinale*, una especie cuya raíz es muy consumida en nuestro país y conocido como kión es también ampliamente usada tratar el frío, el asma y las bronquitis ^{27, 28}.

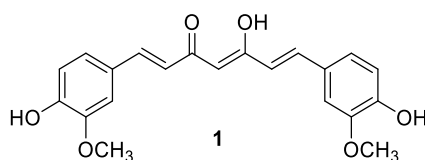


Figura 2. Curcumina (1) ²⁶

Existen varios artículos que describen a un grupo de plantas pertenecientes a esta familia que presentan una actividad antialérgica como son los casos de *Curcuma longa* ²⁹, *Curcuma cedoaria* ³⁰ y *Alpinia Galanga* ³¹.

Finalmente, la familia Zingiberaceae es una buena fuente de especies para desarrollar estudios fitoquímicos con importantes aplicaciones en la industria de la alimentación, cosmética y farmacéutica.

II.2.2 Género *Renealmia*

El género *Renealmia* pertenece a la familia Zingiberaceae y presenta múltiples usos como plantas alimenticias, medicinales y ornamentales. Este género considera 87 especies formalmente registradas ³² y 18 de estas son de uso popular ¹². Es importante tener presente que, a pesar de ser un género con buen potencial comercial, solo se reportan un reducido número de estudios. Por ejemplo, solo seis especies cuentan con estudios fitoquímicos (*R. floribunda*, *R. guianensis*, *R. alpinia*, *R. chrysotricha*, *R. exaltata* y *R. nicolaoides*).

La mayoría de las especies de *Renealmia* están distribuidos en la zona tropical y neotropical del continente americano: desde el norte de Méjico hasta el sur

de Brasil. En el continente africano se ha reportado alrededor de 20 especies (**figura 3**)¹².

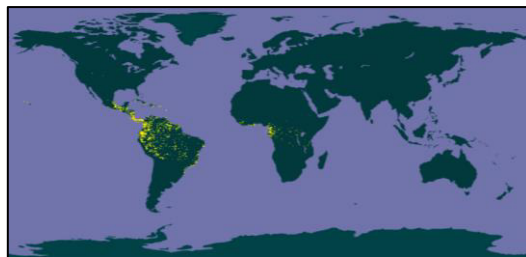


Figura 3. Repartición geográfica del género *Renealmia*³³.

Los estudios químicos del género *Renealmia* han reportado la presencia de diterpenos labdanos (**2-4**) en *Renealmia alpinia*^{34, 11} (**figura 4**) y el estudio del aceite esencial de las hojas muestran como componentes mayoritarios a los siguientes: β -cariofileno (22.9%), β -pineno (12.0%), espatulenol (10.0%), alloaromadendreno (8.3%), ζ -cadineno (5.3%) e germacreno D (5.1%)³⁵.

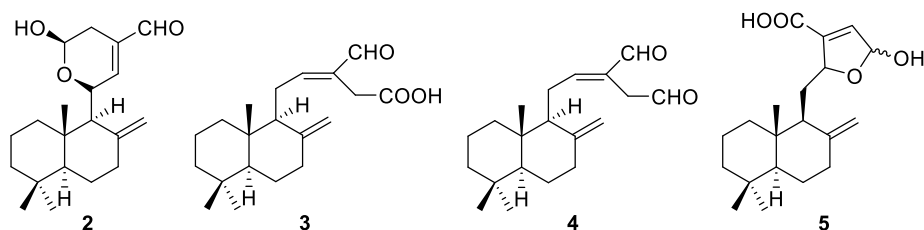


Figura 4. Diterpenos labdanos de *Renealmia alpinia*: 11-hydroxy-8(17),12(E)-labdadien-15,-16-dial11,15-hemiacetal (**2**); 16-oxo-8(17),12(E)-labdadien-15-oic acide (**3**); 8(17),12(E)-labdadien-15,16-dial (**4**); (+)-zerumin B (**5**)^{11, 34}

Del estudio de las hojas de *Renealmia chrysotrycha* se han identificado los siguientes 4 compuestos: ledol (**6**), aromadendrene (**7**), palustrol (**8**) y cis-calamenene (**9**)³⁶ (**figura 5**).

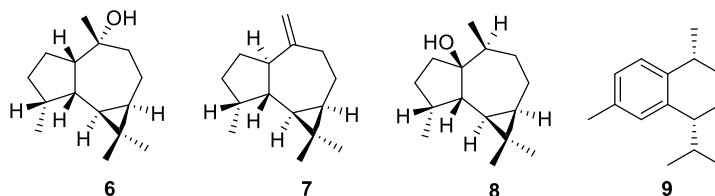


Figura 5. Metabolitos obtenidos de *Renealmia chrysotrycha*³⁶.

Otros estudios fitoquímicos de las semillas de *Renealmia exaltata* han descrito 3 diterpenos labdanos [pacovatinas A (**10**), pacovatinas B (**11**) y pacovatinas C (**12**)]³⁷ y 2 diarilheptanoides [renealtinas A (**13**) y B (**14**)]³⁸ (**figura 6**).

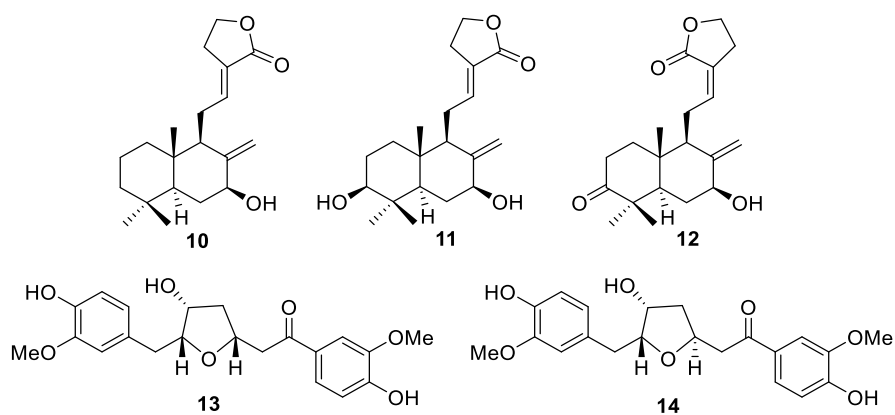


Figura 6. Diterpenos labdanos (**10**, **11** y **12**)³⁷ y diariheptanoides (**13** y **14**)³⁸ de *Renealmia exaltata*.

La raíz de *Renealmia nicolaioides* es otra especie estudiada que ha presentado 3 dihidrochalconas preniladas [nicolaioidesinas A-C (**15-17**)], panduratin A (**18**) 5-styrylfuran-2-carboxylic acid methyl ester (**19**), 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (**20**), (\pm)-5-hydroxy-7-methoxyflavanone (**21**)^{39, 40} (figura 7).

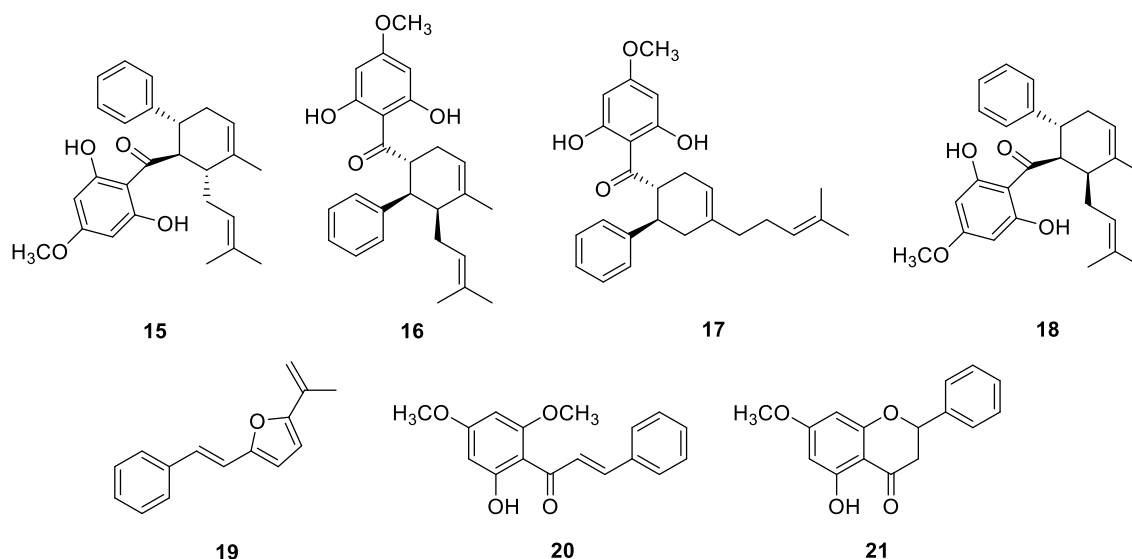


Figura 7. Metabolitos purificados de *Renealmia nicolaioides*^{39,40}.

II.2.3 Género *Hedychium*

Es un género que comprende alrededor de 80 especies⁴¹ distribuidas principalmente en la zonas tropicales y subtropicales de África, Asia y América⁴². Muchas de estas especies son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento del asma, bronquitis, la purificación de la sangre, enfermedades gástricas y como un antiemético⁴³.



Figura 8. Distribución geográfica del género *Hedychium*⁴².

Los estudios fitoquímicos han, también, descrito la presencia de diterpenos labdanos en la raíz de la especie *Hedychium forrestii*: hedyforrestin D (**22**), 15-ethoxy-hedyforrestin D (**23**), yunnancoronarin A-C (**24-26**)⁴⁴.

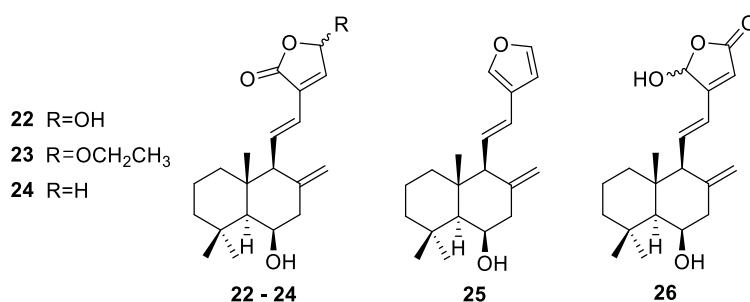


Figura 9. Diterpenos labdanos de *Hedychium forrestii*⁴⁴.

Con respecto a la especie *Hedychium gardnerianum*, se ha reportado un grupo de diterpenos labdanos que se citarán a continuación: coronarin E (**27**), coronarin A (**28**), yunnancoronarin A (**29**), yunnancoronarin B (**30**), hedyforrestin B (**31**), villosin (**32**) y hedyforrestin C (**33**)⁴⁵.

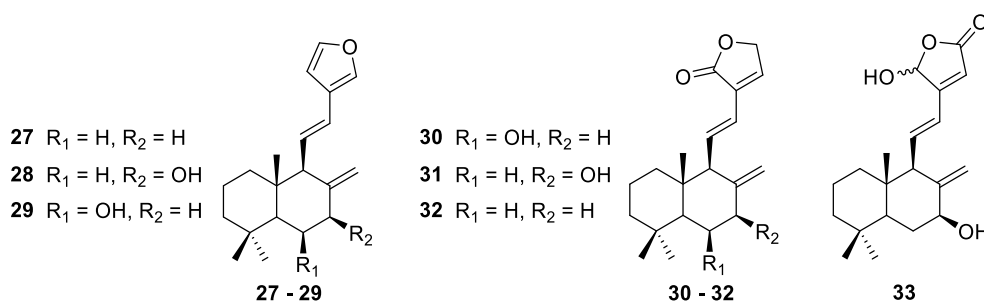


Figura 10. Estructuras de los compuestos **27-33** purificadas de las raíces de *Hedychium gardnerianum*⁴⁵.

De las hojas y tallos de *Hedychium malayanum* se ha purificado 3 esteroides conocidos como stigmasterol (**34**), sitostenone (**35**) y stigmast-4-ene-3,6-dione (**36**); un triterpeno llamado lupenone (**37**); y un sesquiterpeno oxigenado nombrado como oxido de cariofileno (**38**)⁴⁶.

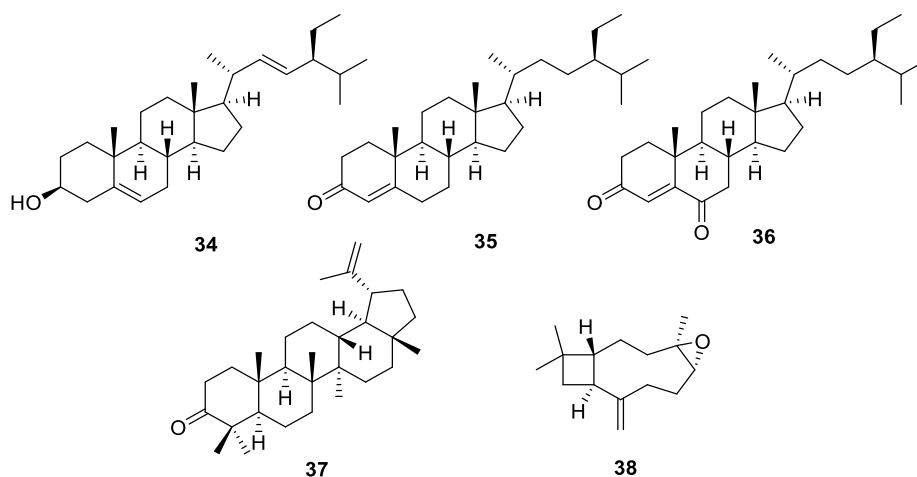


Figura 11. Estructuras de los compuestos **34-38** purificadas de las hojas y tallos de *Hedychium malayanum*⁴⁶.

Las raíces de *Hedychium roxburghii* ha presentado el compuesto coronarin E (**27**)⁴⁷ que también ha sido reportado en la especie *Hedychium gardnerianum*. De otro lado, de las raíces de *Hedychium villosum*, se ha aislado dos diterpenos: un nuevo diterpeno llamado villosumcoronarin (**39**) y un diterpeno muy bien conocido como el ya citado coronarin E (**27**)⁴⁸.

De las raíces de *Hedychium yunnanense* se ha purificado un nuevo sesquiterpeno llamado hedyunchene A (**40**) y dos compuestos conocidos: 6 β -hydroxystigmasta-4,22-dien-3-one (**41**) y 6 β -hydroxystigmast-4-en-3-one (**42**)⁴⁹.

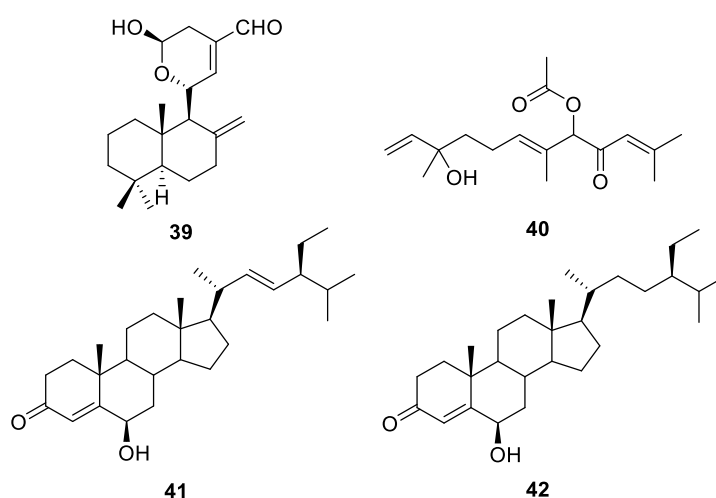


Figura 12. Compuestos purificados de *Hedychium villosum* (**39**)⁴⁸ y *Hedychium yunnanense* (**40-42**)⁴⁹.

II.2.4 Aspectos botánicos de las especies en análisis

II.2.4.1 *Renealmia thyrsoides*

Clasificación taxonómica según Tropicos⁵⁰:

- “Clase: Equisetopsida C. Agardh”
- “Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht”
- “Superorden: Lillanae Takht”
- “Orden: Zingiberales Griseb”
- “Familia: Zingiberaceae Martinov”
- “Género: *Renealmia* L. f”
- “Especie: *Renealmia thyrsoides*”

Sinónimos⁵⁰:

Amomum thyrsoides Ruiz et Pav.

Nombres comunes⁵⁰:

Colombia: Yei'; Ecuador: teentekage, teentemo, unkwisi; Perú: Ahuacnem

Descripción:

Esta especie presenta un tamaño que varía entre 0.8 y 5 metros arriba de la base de los rizomas. Estos rizomas tienen un espesor que miden entre 10 y 30 mm. Presenta limbos foliares de formas estriadas y reticuladas con medidas que van desde 3 hasta 10 mm de ancho y de hasta 35 mm en la base de la planta, están revestidas con pelos simples o bífidas y diseminadas en menos de 0.1 mm de largo. Exhiben frutos cuyos colores varían desde tonos verdosos hasta morados (**figura 13**)⁵¹.



Figura 13. Rizoma de *Renealmia thyrsoides* (fuente propia).

Distribución geográfica:

Renealmia thyrsoides está distribuida en la zona tropical del continente americano. En países como Perú, Colombia, Ecuador, Guyana, Nicaragua, Panamá, Surinam y Venezuela (figura 14) ⁵².



Figura 14. Distribución geográfica de *Renealmia thyrsoides* ⁵².

Usos de la especie:

El rizoma de esta planta se utiliza tradicionalmente para tratar el dolor de cabeza, el dolor de huesos, los resfriados, la picadura de alacranes y de las hormigas conga (*Paraponera spp.*) ⁵³. Diversas formulaciones a base de raíces de esta planta son usadas como contraveneno frente a la mordedura de serpientes. También, se ha descrito el empleo de esta planta como analgésico y para tratar la leishmaniasis. Es posible el consumo de sus frutos y el uso como colorante corporal ⁵¹.

Actividad biológica:

Un estudio de la actividad leishmanicida de plantas medicinales de la comunidad nativa Yanesha en Oxapampa (Pasco) ha demostrado la actividad biológica de los rizomas de *Renealmia thyrsoides* contra el protozoo parásito *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente con un IC₅₀ de 10 ± 0,8 µg/ml ⁴. En una investigación posterior se purificaron moléculas de las raíces y hojas de esta especie. De todas estas moléculas, las que muestran mejor actividad leishmanicida son las siguientes: **48** (CI₅₀ = 36.5 ± 10.5 µM), **49** (CI₅₀ = 19.7 ± 2.3 µM) y **53** (CI₅₀ = 23.1 ± 5.3 µM) ⁵.

Metabolitos presentes en la especie:

En un estudio se han identificado en las hojas de esta especie lo siguiente: 6 sesquiterpenos (**43-48**), un dihidrobenzofuranona (**49**) y 4 flavonoides (**50-53**). Por otro lado, de las raíces, se han purificado 2 flavonoides (**54-55**) y 2 diarilheptanoides (**56-60**) (figura 15) ⁵.

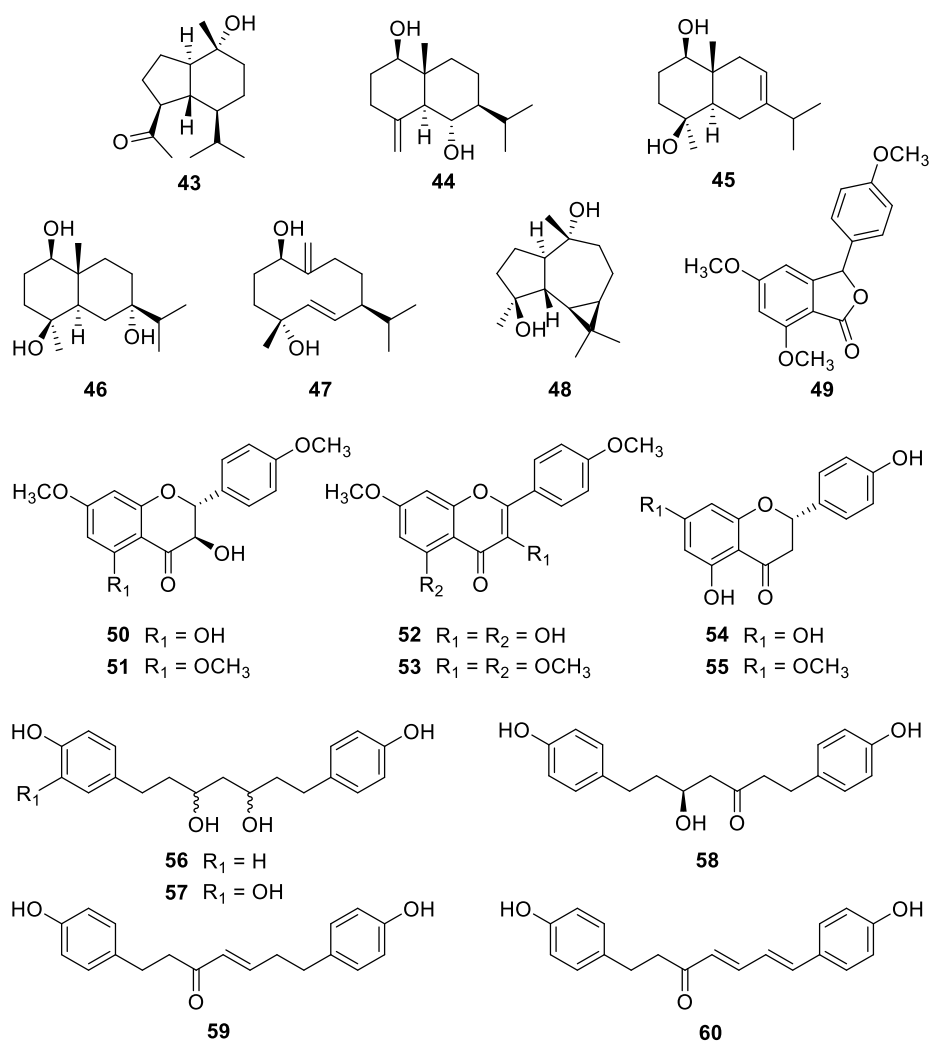


Figura 15. Moléculas purificadas a partir de las hojas (**43-53**) y raíces (**54-60**) de *Renealmia thyrsoides* ⁵.

II.2.4.2 *Hedychium coronarium*

Clasificación taxonómica según Tropicos ⁵⁴ :

- “**Clase:** Equisetopsida C. Agardh”
- “**Subclase:** Magnoliidae Novák ex Takht”
- “**Superorden:** Liliae Takht”
- “**Orden:** Zingiberales Griseb”
- “**Familia:** Zingiberaceae Martinov”
- “**Género:** *Hedychium* J. Koenig”
- “**Especie:** *Hedychium coronarium* J. Koenig”

Sinónimos según The Plant List ⁵⁵ :

“*Amomum filiforme* Hunter ex Ridl, *Gandasulium coronarium* (J.Koenig) Kuntze, *Gandasulium lingulatum* (Hassk.) Kuntze, *Hedychium chrysoleucum* Hook, *Hedychium coronarium* var. *baimao* Z.Y. Zhu, *Hedychium coronarium* var. *chrysoleucum* (Hook.) Baker, *Hedychium coronarium* var. *maximum* (Roscoe) Eichler, *Hedychium gandasulium* Buch.-Ham. ex Wall, *Hedychium lingulatum* Hassk, *Hedychium maximum* Roscoe, *Hedychium prophetae* Buch.-Ham. ex Wall”.

Nombres comunes ⁶ :

Pocoyepar, achira.

Descripción ⁵⁶ :

Hedychium coronarium es una hierba perenne, erecta, que crece hasta 1-2.5 m. de altura, a partir de los rizomas. Los rizomas son carnosos, ramificados y con nudos, con muchos nudos y crecen hasta 2,5 a 5 cm de diámetro, extendiéndose horizontalmente debajo de la superficie del suelo. Las hojas tienen forma de lanza y punta afilada, simples, de 2 rangos, dispuestas alternativamente, de 20 a 61 cm de largo y de 5 a 12,7 cm de ancho. Las frutas son oblongas, la cápsula contiene numerosas semillas.

Distribución geográfica:

Esta especie está ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales de Japón, India, Brasil, el sur de China y el sudeste asiático (figura 16) ⁵⁷.



Figura 16. Distribución geográfica de *Hedychium coronarium* ⁵⁸.

Usos de la especie:

La raíz se lava, se raspa y se golpea con una piedra; enseguida, se la lleva a hervir y se toma el líquido resultante para tratar el reumatismo y dolor de

huesos. La raíz machacada y caliente se emplea como emplasto para tratar zonas adoloridas ⁶. Casi todas las partes de la planta son usadas para el tratamiento de diferentes enfermedades incluyendo la diabetes, fiebre, tumores, dolor de cabeza, hipertensión, inflamación, desordenes estomacales y dolor debido al reumatismo ⁵⁹.

Actividad biológica:

El extracto obtenido con diclorometano a partir de las raíces de *Hedychium coronarium* ha resultado tener mejor actividad antimicrobiana con respecto a extractos obtenidos con acetato de etilo o metanol; sin embargo, los tres tipos de extractos han demostrado una actividad antimicrobiana significativa con una Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en un rango de 8-128 µg/ml ⁶⁰.

Se ha reportado que esta especie produce diterpenos tipo labdano, entre ellos coronarin D (**61**) ⁶¹. Esta molécula ha probado tener actividad antimicrobiana frente a cepas Gram-positivas en una concentración entre 6.25 a 50 µg/ml y ser inactivas frente Gram-negativas ⁶². Diterpenos tipo labdano y un diarilheptanoide purificados a partir de las raíces de *H. coronarium* han evidenciado una actividad citotóxica moderada o potente frente a 4 líneas celulares cancerígenas ⁶³. También, otros diterpenos [15-hydroxylabda-8(17),11,13-trien-16,15-olide (**62**), 16-methoxy-6-oxo-7,11,13-labdatrien-15,16-olide (**63**) y labda-8(17),11,13-trien-16(15)-olide (**64**)] purificados de las raíces presentaron potente actividad antiinflamatoria *in vitro* ⁶⁴ (**figura 17**).

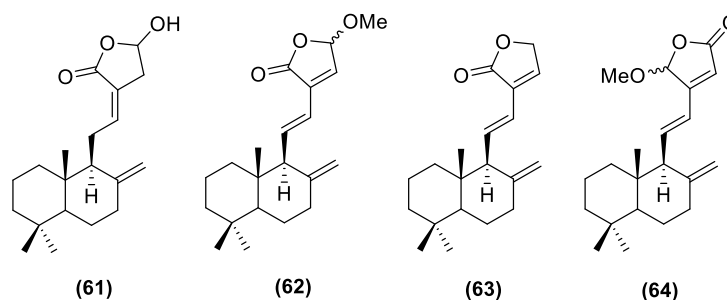


Figura 17. Metabolitos encontrados en la raíz de *Hedychium coronarium* con actividad biológica ^{61, 64}.

Metabolitos presentes en la especie:

A diferencia de *Renalmia thyrsoides*, *Hedychium coronarium* es una especie muy estudiada y se cuenta con decenas de metabolitos purificados a partir de sus raíces. En una revisión bibliográfica de esta especie, se han reportado diversos tipos de metabolitos extraídos de sus raíces. Entre ellos se pueden encontrar diterpenos, sesquiterpenos, diarilheptanoides (**figura 18**), compuestos fenólicos, ácidos grasos y esteroides. Los diterpenos tipo labdanos son muy comunes en las raíces de *Hedychium coronarium*, varios entre ellos han mostrado actividad citotóxica moderada o potente contra líneas celulares ¹⁴.

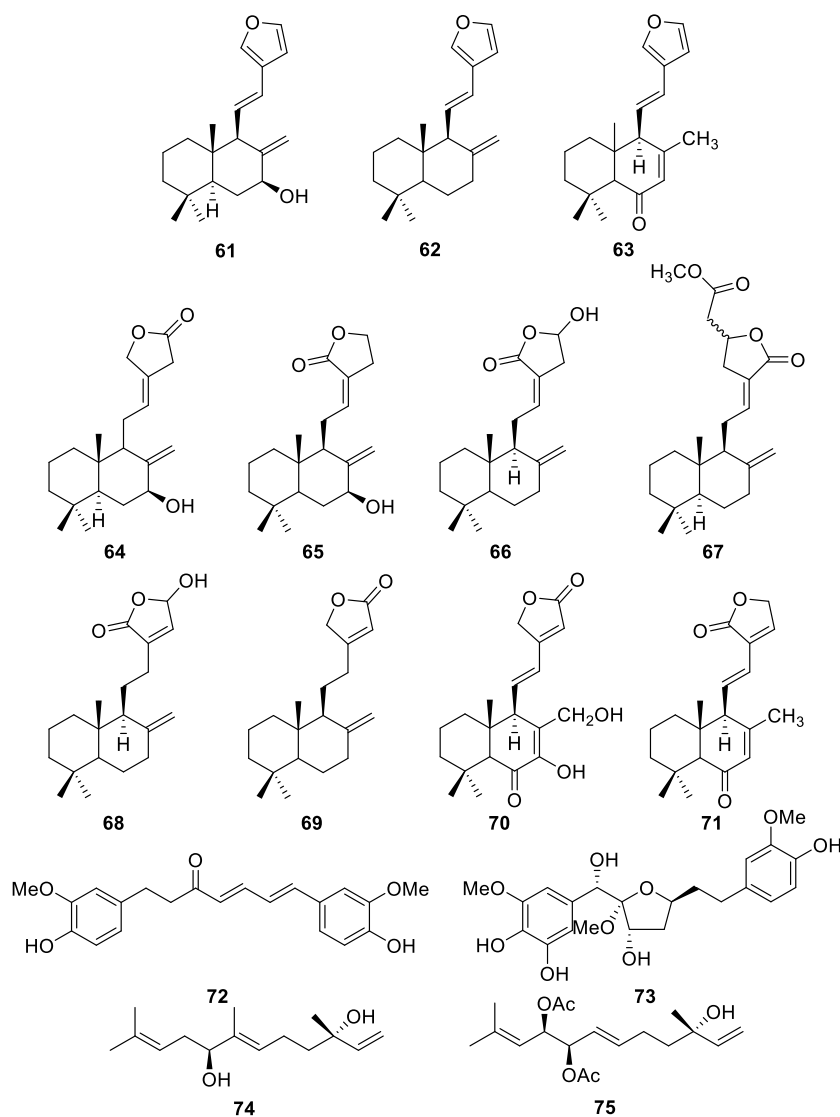


Figura 18. Moléculas extraídas de raíces de *Hedychium coronarium*. Diterpenos (**61-71**), diarilheptanoides (**72 y 73**) y sesquiterpenos (**74 y 75**) ¹⁴.

II.2.5 Biosíntesis de diarilheptanoides, diterpenos tipo labdano y flavanos.

Las distintas especies de plantas se caracterizan por la producción de metabolitos secundarios. Muchos de ellos pueden ser producidos por especies de una misma familia botánica y la quimiodiversidad está asociada a la expresión de diversas enzimas y la mutación de estas ⁶⁵. Como se vio anteriormente, las especies estudiadas pertenecen a la misma familia botánica (Zingiberaceae) y sus raíces son productoras de diferentes moléculas. Las principales son los diterpenos tipo labdano, los diarilheptanoides y flavonoides. A continuación, se describirá la biosíntesis de estos metabolitos.

II.2.5.1 Biosíntesis de diterpenos tipo labdano

Los diterpenos son derivado de la unión de 4 unidades de isopreno (**figura 19**) ⁶⁶. La protonación inicia la ciclización llegando a formar precursores de diterpenos tipo labdano. También, La enzima copal-8-ol difosfato diterpeno sintasa (CcCLS) convierte al geranylgeranildifosfato (GGDP) en una molécula bicíclica intermediaria llamada copal-8-ol difosfato que es un precursor de varios diterpenos tipo labdano (**figura 20**) ^{66, 67}.

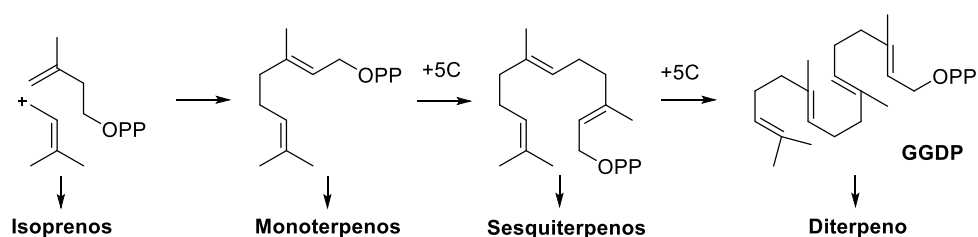


Figura 19. La vía de formación de diferentes terpenos a partir de su precursor isopreno de 5 carbonos ⁶⁶.

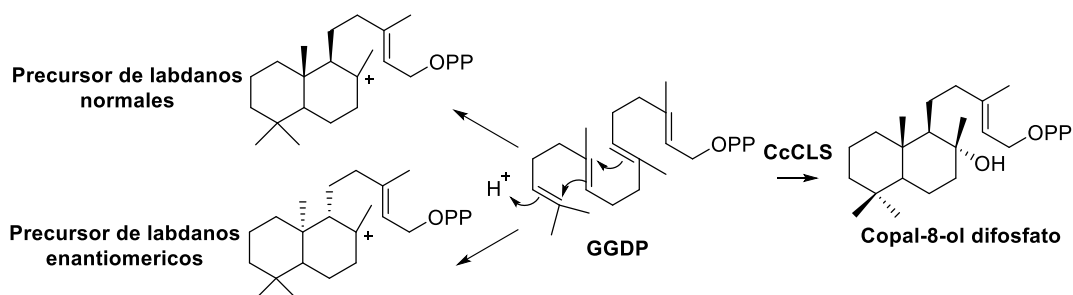


Figura 20. A partir de la protonación de un doble enlace de GGDP se logra formar precursores de labdanos normales y enantioméricos ^{66, 67}.

II.2.5.2 Biosíntesis de diarilheptanoides

Los tres sustratos iniciales en la biosíntesis de diarilheptanoides son los siguientes: cinamoil-CoA (1a), *p*-cumaroil-CoA (2a) y feruloil-CoA (3a). Estos son producidos a partir del aminoácido fenilalanina y con participación de diversas enzimas como la fenilalanina amino liasa (PAL, siglas en inglés), 4-cumarato CoA ligasa (4CL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), hidroxicinamoil transferasa (HCT), cinamato 3-hidroxilasa (C3H) y *O*-metiltransferasa (OMT). En una segunda etapa, la dicétido-CoA sintasa (DCS) cataliza la formación de *p*-coumaroyl-dicetido-CoA y feruloyl-dicetido-CoA con la participación de malonil-CoA. Finalmente, la curcuminoide sintasa (CURS) cataliza la formación de curcuminoides a través de la condensación de *p*-coumaroyl-dicetido-CoA y feruloyl-dicetido-CoA con los sustratos iniciales [*p*-cumaroil-CoA (2a) y feruloil-CoA (3a)] (figura 21) ⁶⁸.

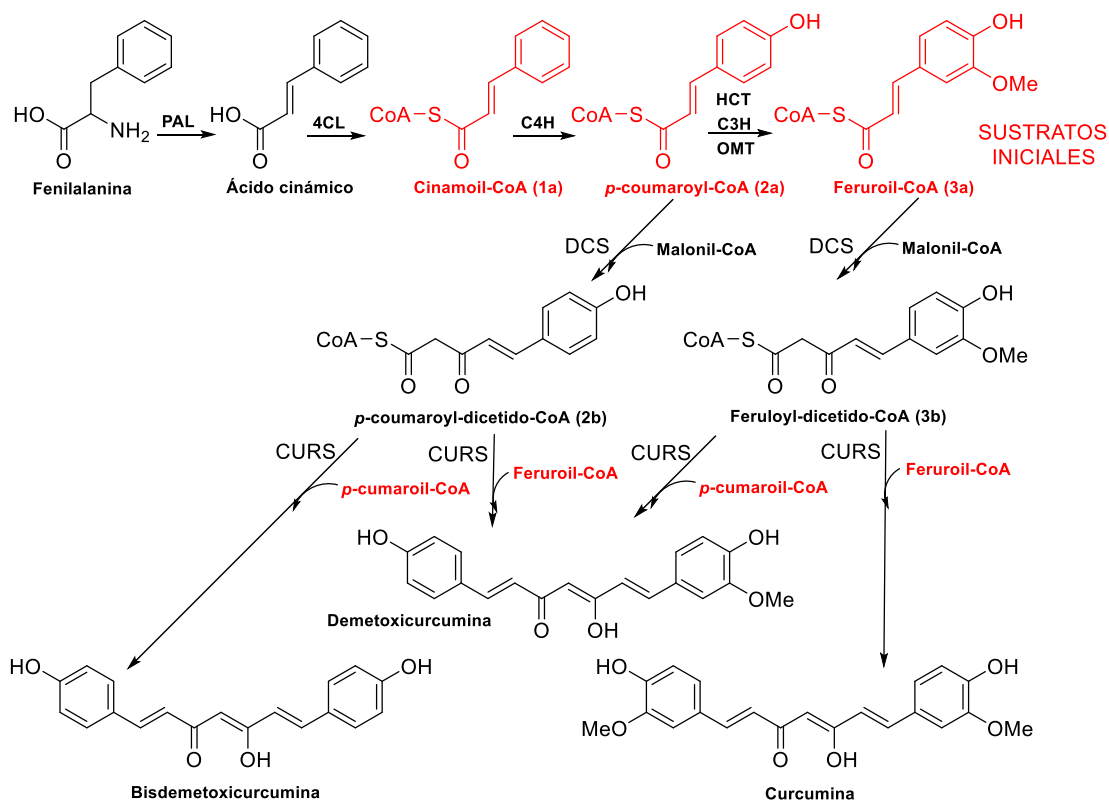


Figura 21. La formación de curcuminoides se desarrolla a partir de sustratos iniciales [cinamoil-CoA (1a), *p*-cumaroil-CoA (2a) y feruloil-CoA (3a)] ⁶⁸.

II.2.5.1 Biosíntesis de flavanonas

En la biosíntesis de flavanonas, el proceso se inicia con dos enzimas claves, la fenilalanina/tirosina amoniaco liasa (PAL/TAL). Estas transforman la fenilalanina y tirosina en ácidos fenilpropanoicos. También, se incluye al C4H que adiciona un grupo 4'-hidroxil al anillo aromático de la fenilalanina. Subsecuentemente, la acción de la 4CL forma ésteres de CoA (complejos ácido-CoA) a partir de los ácidos fenilpropanoicos. La chalcona sintasa (CHS) condensa de manera secuencial un ester de CoA con 3 malonil-CoA para así formar una chalcona. Finalmente, la chalcona es isomerizada en (2S)-flavanonas por acción de la chalcona isomerasa (CHI) ⁶⁹ (figura 22).

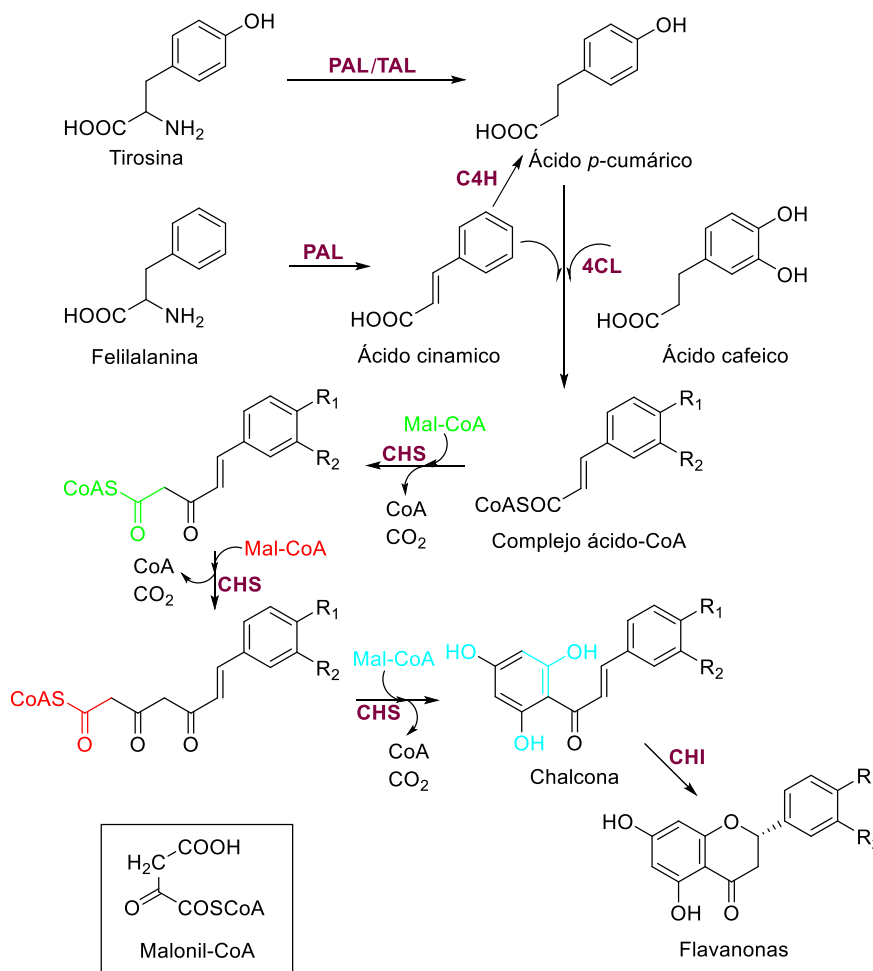


Figura 22. Los diversos pasos para la biosíntesis de flavanonas ⁶⁹.

II.2.6 Fragmentación estructural de diarilheptanoides, diterpenos tipo labdano y flavanos por espectrometría de masas.

El método de análisis por espectrometría de masas de alta resolución y en tándem permite medir la masa de los compuestos de una muestra y a su vez fraccionar estas moléculas para conocer su estructura química ⁷⁰. Bajo la premisa anterior, se ha descrito vías de fragmentación de diarilheptanoides, diterpenos tipo labdano y flavanos que se expone a continuación:

II.2.6.1 Fragmentación estructural de diarilheptanoides

Existen varias propuestas de fragmentación, por ejemplo, la molécula **76** tiene como ion precursor un m/z de 355.154 que corresponde a una fórmula bruta de $C_{21}H_{23}O_5$. Esta presenta fragmentos característicos con m/z de 147.1 y 151.1. También, las moléculas **77** y **78**, son compuestos isobáros (mismas masas, pero diferente estructura química) y el tipo de fraccionamiento que sigue cada una de ellas ayuda a diferenciarlas (**figura 23**) ¹³.

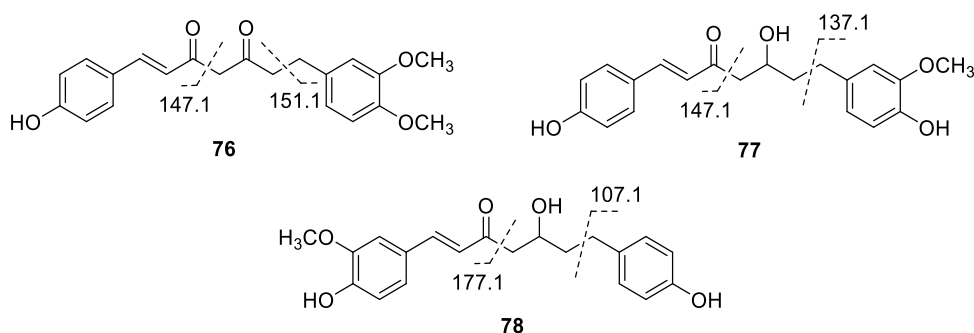


Figura 23. Fraccionamiento de curcuminoides ¹³.

La **figura 24** describe el mecanismo de fraccionamiento de curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina. Las moléculas se protonan a nivel de los grupos cetonas de la cadena heptanoide y forman un ion precursor. Para la formación del fragmento **I**, se observa la pérdida de una molécula de H_2O de este último. El fragmento **J** se forma probablemente por un reordenamiento del grupo cetona del ion **H** y la pérdida posterior de

un dicetociclopropano. El ion **K** se construye por un reordenamiento del ion **H**, pero con la pérdida de 1-hidroxy-3-cetociclobuteno⁷¹.

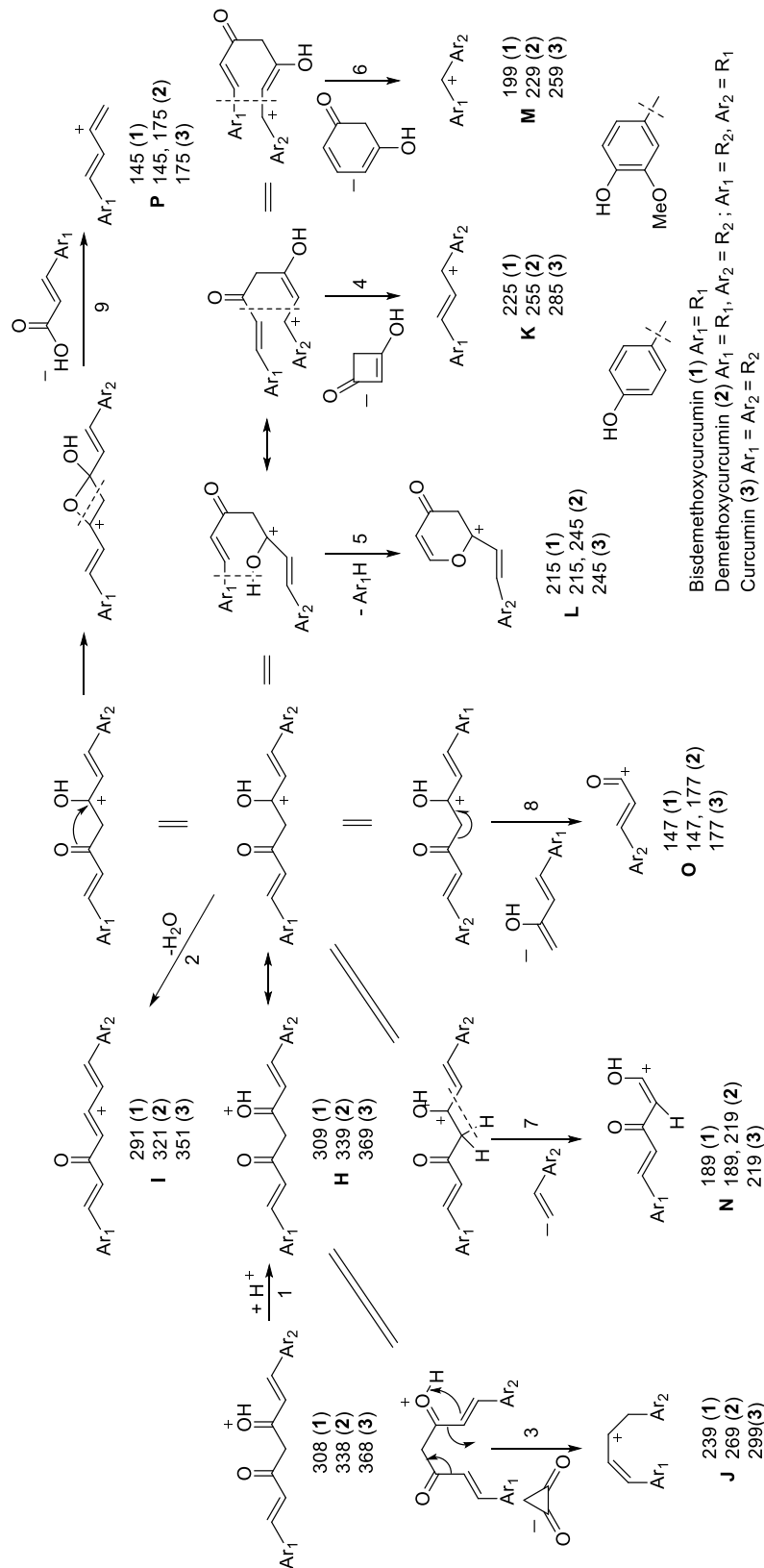


Figura 24. ESI-MS/MS (+) fragmentación de tres curcuminoides (1, 2, 3)⁷¹.

II.2.6.2 Fragmentación estructural de diterpenos tipo labdano

Los diterpenos tipo labdano presentan por lo general una estructura bicíclica con grupos metilos alrededor de ella (2 en posición C4 y una en C10) y un sustituyente importante en la posición C9. En la **figura 25** se observa el fraccionamiento de 2 coronarins que lleva a la formación de un fragmento de m/z 137 que es característico de estos diterpenos ⁷².

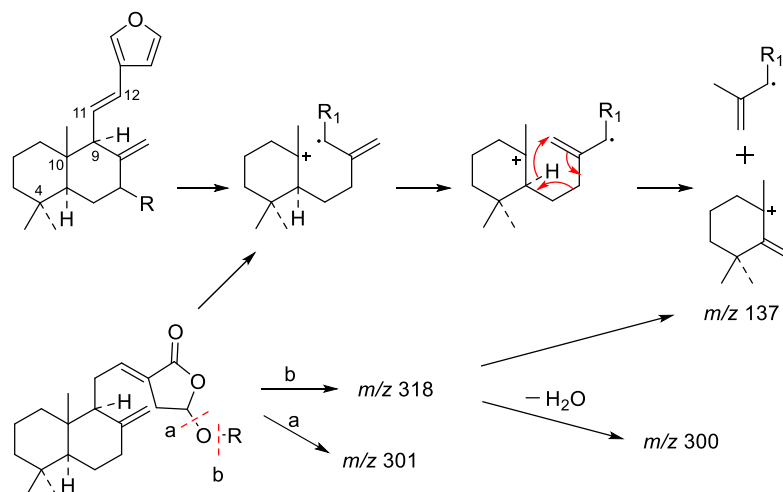


Figura 25. fragmentación de diterpenos tipo labdano a partir de raíces de *H. coronarium* ⁷².

Un análogo del fragmento m/z 137 (el fragmento m/z 239) sigue la ruta descrita en la **figura 26** para formar iones de m/z 121, 105 y 91. Estos tres también son característicos de ciertos diterpenos ⁷³.

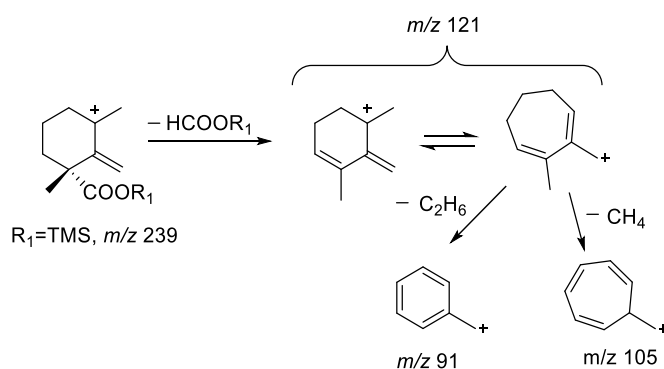


Figura 26. El fragmento de m/z 239 forma otros iones de m/z 121, 105 y 91 ⁷³.

La estructura bicíclica de los diterpenos abietanos pueden fraccionarse con una reacción retro-Diels-Alder de dos maneras diferentes como se muestra en la **figura 27** ⁷³.

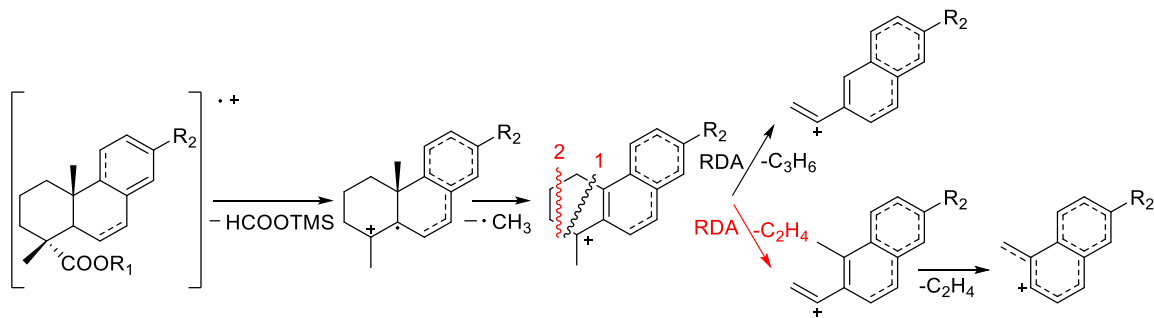


Figura 27. Mecanismo de fragmentación de abietanos ⁷³.

Otros mecanismos de fragmentación son propuestos donde principalmente el sustituyente del C9 es fraccionado (**figura 28**) ⁷³.

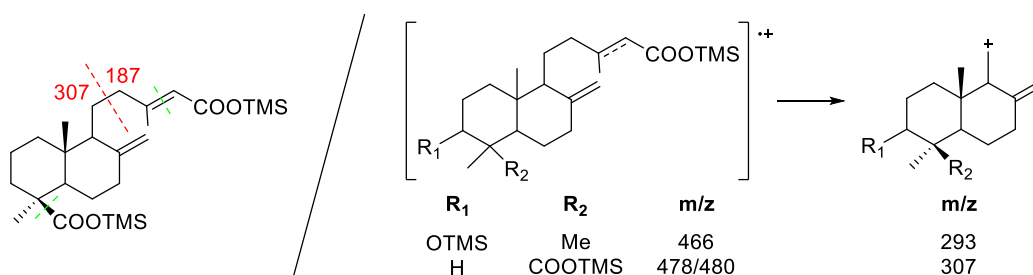


Figura 28. Mecanismo de fragmentación para labdanos ⁷³.

Existen dos mecanismos de reorganización de enlaces de los diterpenos tipo labdano. En un primer mecanismo, se observa la reorganización y eliminación de un anillo del diterpeno y en un segundo mecanismo, el sustituyente del C9 se separa de la estructura general (**figura 29**) ⁷⁴.

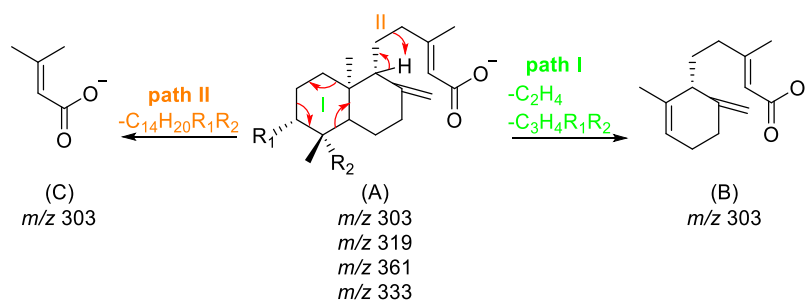


Figura 29. Formación de iones B y C a partir de un diterpeno tipo labdano desprotonado ⁷⁴.

II.2.6.3 Fragmentación estructural de flavanos

Las flavanonas producen fragmentos que son únicos. Por ejemplo, el fragmento $[M-43]^+$ es típico cuando se ve una pérdida de un grupo cetona y un hidrógeno. Sin embargo, el ion $[M-57]^+$ se reporta menos presente en intensidad con respecto al ion $[M-43]^+$. Se evidencia la isomerización de

chalconas a flavanonas y viceversa a causa de la temperatura y una posterior fragmentación que conlleva a la formación del ion $[M-179]^+$ se puede observar en la **figura 30** ⁷⁵.

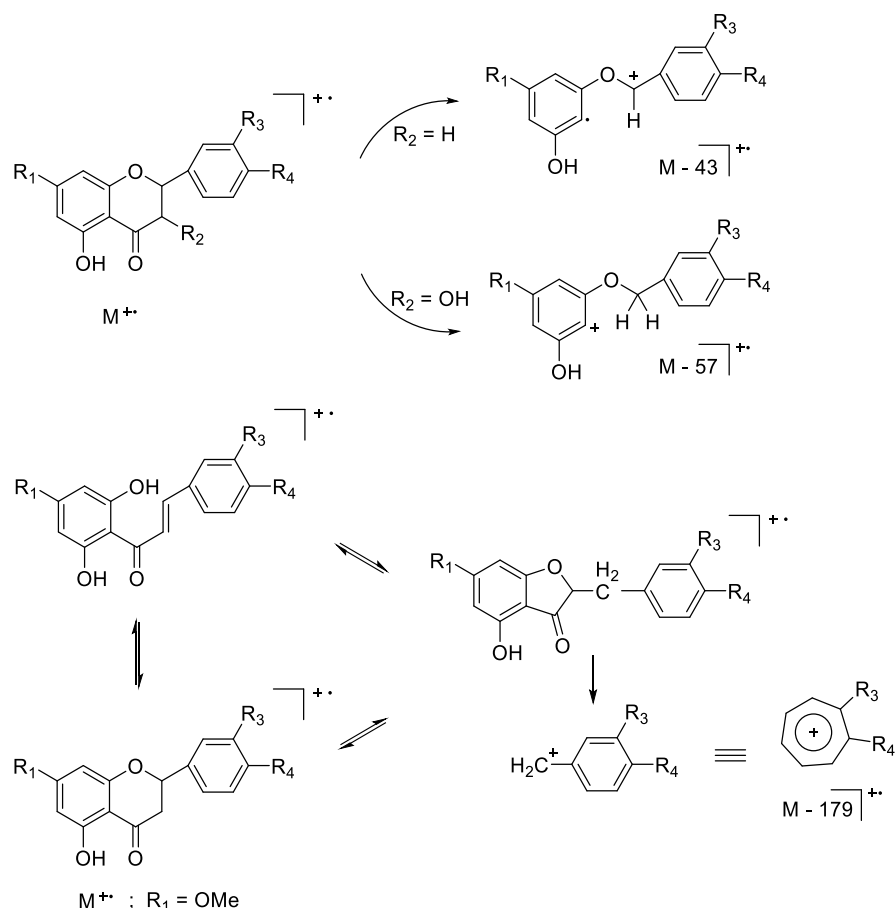


Figura 30. Fragmentación de flavanonas por espectrometría de alta resolución ⁷⁵.

La **figura 31** muestra la vía de fragmentación de narginina e isonarginina. La aglicona de ambas moléculas presenta un m/z de 271. Los fragmentos más dominantes tienen un m/z de 151 y 119. Estos se forman a partir de un ion con m/z de 271 y a través de una reacción de retro-Diels-Alder que va a separar dos enlaces C-C del anillo C de la flavanona. También, el ion con m/z de 151 pierde una molécula de CO_2 para formar un fragmento de m/z de 107. El ion de m/z de 203 es probablemente generado por la pérdida de $-C_3O_2$ y una pérdida posterior de $-C_2H_2O$ en el anillo C para formar un ion de m/z de 161. En general las flavanonas pueden mostrar pérdidas de CO y CO_2 que pueden venir de su anillo C ⁷⁶.

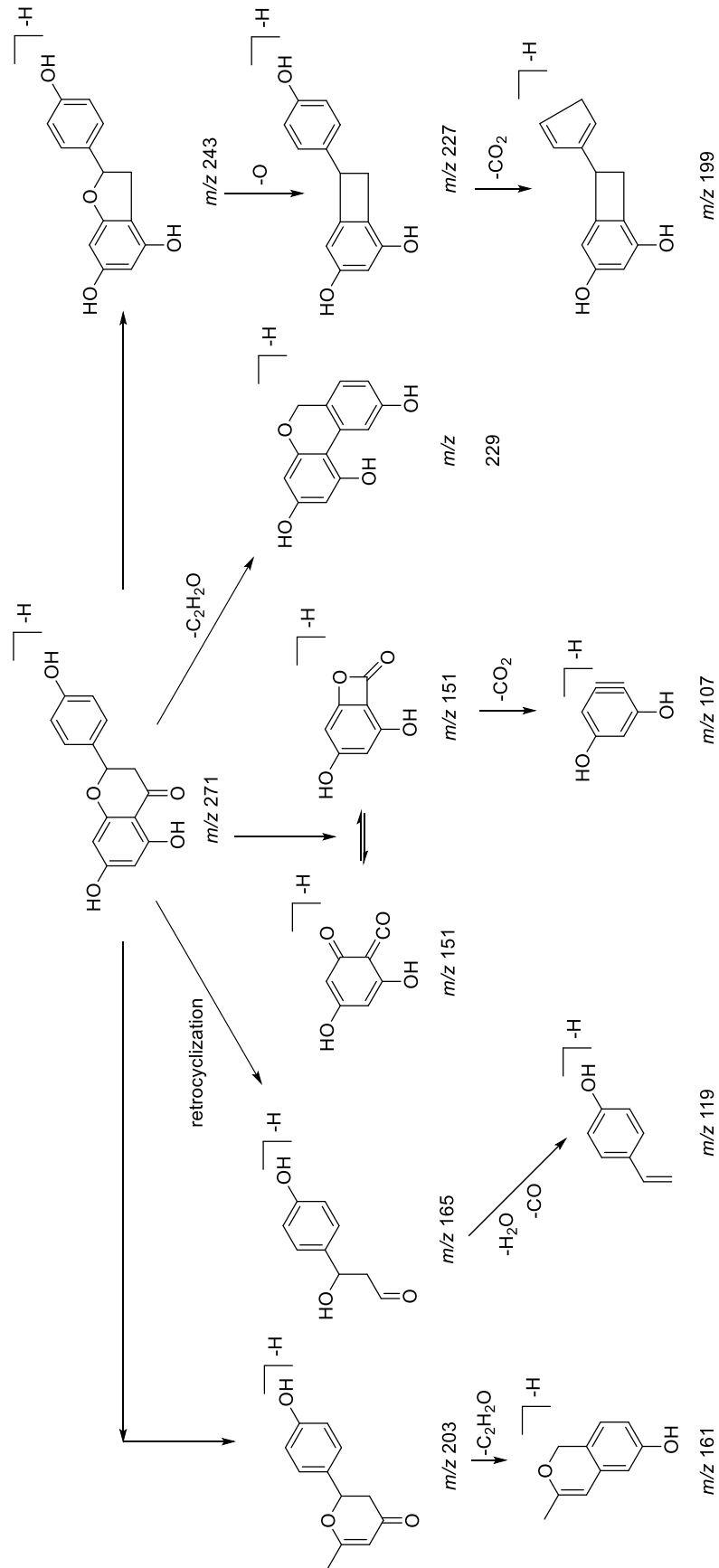


Figura 31. Fragmentación propuesta de narginina e isonarginina por espectrometría de masas en modo negativo ⁷⁶.

II.2.7 Metabolómica.

Fiehn definió la metabolómica como el análisis exhaustivo y cuantitativo de todos los metabolitos de un sistema biológico en estudio ⁷⁷.

II.2.7.1 Enfoques del estudio metabolómico.

El estudio metabolómico presenta dos enfoques: la metabolómica orientada y la metabolómica global. La primera permite dereplicar de manera precisa muchos metabolitos de una muestra para lo cual es necesario conocer el tipo de estructura de las moléculas que se buscan ⁷⁸. En cambio, la metabolómica global busca a todos los metabolitos que puedan ser detectados por la técnica utilizada. Estos son listados y cuantificados de manera relativa, la técnica del Molecular Networking es una estrategia importante para este tipo de objetivos⁷⁹.

II.2.8 Método de análisis de resultados MS²: MZmine 2 y Molecular Networking.

II.2.8.1 Preprocesamiento de datos por MZmine 2

El resultado del análisis de un extracto vegetal con cientos de metabolitos detectados por espectrometría de masas de alta resolución y en tándem permite tener una amplia gama de datos difíciles de procesar. En ese sentido, programas como MZmine 2 ayuda en estudios metabolómicos con gran cantidad de datos. Las ventajas que aporta son las siguiente: realizar una cuantificación relativa, calcular la fórmula bruta y determinar el tiempo de retención de un grupo de los compuestos presentes en un extracto.

En un primer momento, se importan los archivos en formato mzXML en el programa MZmine 2 y se procede a la detección de características de cada ion, para ello se crea una lista de iones por cada análisis (“Mass detection”) y un cromatograma por cada ion listado (“Chromatogram builder”). Después, se buscan picos de m/z (masa/carga) que forme un motivo isotópico y se las reúne y considera cómo partes de una sola entidad química (“Deconvolution y Isotopic Peak Grouper”). Para la semicuantificación es necesario alinear los picos de cada molécula cargada

(“Aligment”) y recuperar cualquier molécula eliminada en los pasos previos (Gap-filling). Finalmente, se procede a calcular la fórmula bruta de cada ion. Todas estas etapas se muestran resumidas en la **figura 32**¹⁷ y son la fase previa para hacer uso del “Molecular Networking”.

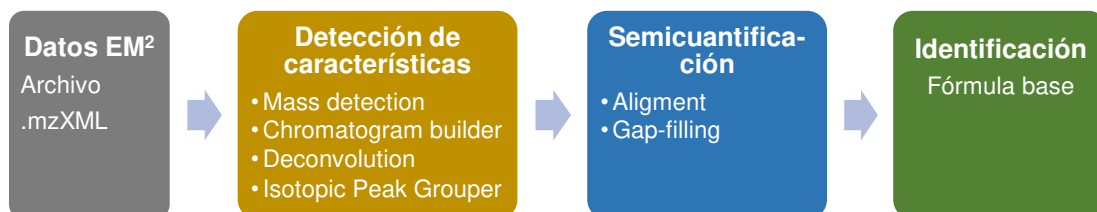


Figura 32. Etapas del procesamiento con MZmine 2¹⁷.

II.2.8.2 Principios y objetivos de “Molecular Networking”

En la actualidad, el “Molecular Networking” (MN) es una herramienta de desreplicación importante. Permite sobre todo cartografiar el contenido de moléculas en una muestra en función de sus datos EM² y de compararlos con aquellos presentes en una base de datos para identificarlas. Con el uso de un algoritmo de similitud, el “Molécula Networking” permite reagrupar moléculas según su grado de similitud. De esta manera es posible establecer familias de moléculas análogas incluidas en una muestra estudiada⁷⁹.

Los 3 elementos que constituye el análisis por MN son los siguientes (**figura 33**):

- El “**cluster**” (constelación).
- El “**node**” (nodo).
- El “**edge**” (enlace).

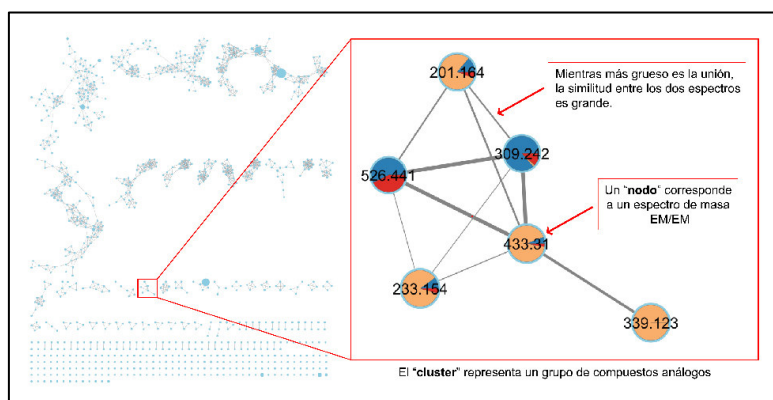


Figura 33. Los elementos constituyentes de una red molecular (fuente propia).

II.2.9 Análisis de la actividad antimicrobiana por el método de microdilución colorimétrica.

Es necesario contar con un extracto seco de una especie vegetal para llevar a cabo el método de microdilución colorimétrica en el caso de bacterias ¹⁹ y hongos ¹⁸. Se utilizarán placas de poliestireno estéril de 96 pozos de fondo en U. El fundamento de esta metodología radica en la inhibición del desarrollo bacteriano y para ello se prueban las diluciones del extracto en estudio. Estas diluciones se agregan a los pocillos de manera ordenada junto con las cepas bacterianas estudiadas y la resazurina como marcador de células vivas. En determinados pozos se incluirán controles de crecimiento y controles de esterilidad. Estas placas serán incubadas a 37°C por 18-24 horas. El cambio de color será evaluado visualmente. El color azul indica que no se ha producido crecimiento bacteriano; sin embargo, si se observa el cambio de color a púrpura-rosado, esto será considerado como positivo para el crecimiento microbiano. Esto se explica porque las bacterias activas reducen el colorante resazurina no fluorescente de color azul y lo transforma a resorufina fluorescente de color rosa (**figura 34**) ⁸⁰. La concentración más baja en la que no se produzca cambio de color se tomará como el valor de CMI ¹⁹. También, junto con los extractos se debe probar la actividad de un antibiótico bajo las mismas condiciones para compararlos (control positivo).

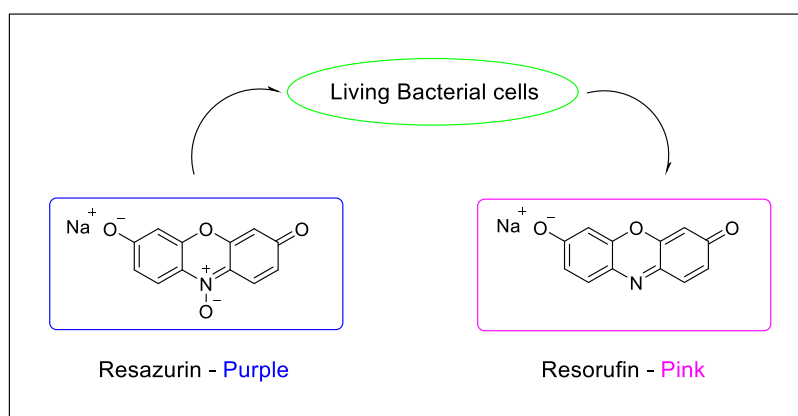


Figura 34. Células vivas activas provocan la reducción de resazurina ("purple-blue") a resorufina ("Pink-colorless") ⁸⁰.

II.2.10 Contrato de acceso a recursos genéticos en el estudio de especies silvestres peruanas.

El Estado es soberano en el aprovechamiento de recursos naturales silvestres del Perú y requiere otorgar contratos de Acceso a Recursos Genéticos cuando se realicen investigaciones científicas que incluyan especies nativas. Esto permite proteger la biodiversidad y crear un marco regulatorio que organice la información científica resultante. De manera resumida, se deben considerar los siguientes pasos al momento de acceder a recursos genéticos ⁸¹:

1. Determinar si la especie a estudiar es considerada silvestre del Perú y está fuera de alguna Área Natural Protegida.
2. Solicitar una autorización con fines de investigación científica con colecta (de ser necesario) a SERFOR. Para ello se debe establecer una lista de requerimientos como la relación de investigadores, plan de investigación (con objetivos, metodologías, etc.), carta de presentación de la institución científica que respalda al investigador solicitante, consentimiento informado previo si se intenta acceder al conocimiento colectivo de una comunidad.
3. Finalmente, se debe firmar un contrato de Acceso a Recursos Genéticos con la institución gubernamental responsable.

Es importante indicar que para el desarrollo de la presente investigación se ha firmado un contrato de Acceso a Recursos Genéticos con SERFOR para el estudio de la especie silvestre *Renealmia thyrsoides*.

II.3 Glosario de términos

Desreplicación: es el uso de la cromatografía y el análisis espectroscópico para reconocer sustancias previamente extraídas y presentes en un extracto ⁸².

Antimicrobiano: sustancia que destruye microorganismos, tales como las bacterias o el moho, o les impide crecer y causar enfermedad ⁸³.

Concentración Mínima Inhibitoria: la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación ⁸⁴.

Fitoquímica: disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales ⁸⁵.

Metabolito: son los productos e intermediarios del metabolismo celular. Los metabolitos pueden tener una multitud de funciones, incluida la conversión de energía, la señalización, la influencia epigenética y la actividad de cofactor ⁸⁶.

Espectrometría de masas: técnica analítica que mide con precisión las masas moleculares de los compuestos químicos encontrados en una muestra determinada. En el análisis de MS, las moléculas de interés se vaporizan y se ionizan, y se determinan las proporciones de masa a carga (m/z) de los iones moleculares ⁸⁷.

Diterpeno: Son moléculas que se derivan de un precursor de isopreno común, el difosfato de geranylgeranilo, mediante la formación y modificación química de esqueletos de carbono ⁸⁸.

Curcuminoide: es el nombre dado a las moléculas lineales de diarilheptanoide que incluyen curcumina y compuestos relacionados ⁸⁹.

Molecular Networking: es una estrategia computacional que puede ayudar a la visualización e interpretación de los datos complejos que surgen del análisis de MS. MN es capaz de identificar similitudes potenciales entre todos los espectros MS/MS dentro del conjunto de datos y permitir la anotación de moléculas desconocidas pero relacionadas ⁹.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1 Hipótesis

- ❖ Los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* presentan perfiles metabolómicos con moléculas bioactivas y muestran actividad antimicrobiana.

III.2 Variables

- ❖ **Variable independiente:** los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*.
- ❖ **Variable dependiente:** la actividad antimicrobiana.

III.3 Operacionalización de variables

La operacionalización de variables se detalla en el **anexo 7**.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 Área de estudio

El estudio se desarrolló en tres lugares que se detallan a continuación:

1. La recolección de especies se realizó en la ciudad de Oxapampa y en la Comunidad Nativa Tsachopen ubicados en la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco.
2. La extracción de metabolitos y la determinación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, en los laboratorios de Química Orgánica y Microbiología respectivamente.
3. El análisis por espectrometría de masas se realizó en la Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

IV.2 Diseño de investigación

El tipo de estudio de la presente investigación es descriptivo y transversal. Esta consta de cuatro etapas:

1. El cálculo de la masa molecular de los compuestos presentes en los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* mediante la espectrometría de masas.
2. La determinación del perfil metabolómico de los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*.
3. La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*.
4. El uso de *Curcuma longa* como especie de referencia tanto en el análisis metabolómico como en el estudio antimicrobiano de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*.

IV.3 Población y muestra

IV.3.1 Población

Como población de estudio se incluye a *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*. Estas se encuentran ubicadas en los distritos de Chontabamba y Oxapampa que pertenecen a la provincia de Oxapampa y el departamento de Pasco.

IV.3.2 Muestra

Como muestra se consideró 300 gramos de raíz seca y molida de las especies de estudio.

IV.4 Consideraciones éticas

La Comunidad Nativa Yanesha Tsachopen otorgó el permiso para la recolección de las raíces de *Renealmia thyrsoides* dentro de su territorio. Al ser considerada especie silvestre, se obtuvo la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre, con colecta de material biológico, fuera de Áreas Naturales Protegidas, correspondiéndole el Código de Autorización **N° AUT-IFL-2020-045**. Posteriormente a la colecta se suscribió un Contrato de Acceso a Recursos Genéticos con Código de Autorización **N° CTO-ARG-2021-0009**. Es importante indicar que *Hedychium coronarium* no es una especie nativa por lo que no se necesitó obtener un permiso especial. Todo el proceso de recolecta se hizo con respeto al medio ambiente, recolectando solo la cantidad suficiente para el estudio. Los laboratorios han cumplido con respeto al medio ambiente.

IV.5 Unidad de análisis

1. Muestras biológicas:

Las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*.

2. Subunidad de análisis:

Los extractos metanólicos de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*.

IV.6 Metodología

IV.6.1 Obtención de los extractos metanólicos.

IV.6.1.1 Recolección

La recolección de las raíces de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* se realizó en la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco. Las dos especies fueron identificadas por el Jardín Botánico de Missouri en Oxapampa. En la **tabla 1** y **2** se detallan los datos de esta actividad.

Las raíces fueron secadas en un secador solar y molidas con un molino tradicional o de granos ⁹⁰. Es importante indicar que para poder comparar de manera más amplia los resultados, se incluyó en el estudio el extracto de *Curcuma longa*, una Zingiberaceae que produce metabolitos muy activos biológicamente como los curcuminoides ⁹¹.

Tabla 1. Ficha de recolección de *Renealmia thyrsoides*.

Nombre científico	<i>Renealmia thyrsoides</i>
Lugar de recolección	Distrito de Chontabamba, provincia de Oxapampa, Departamento de Pasco
Geografía	Selva Alta, suelos húmedos con vegetación secundaria
Altitud	1800 msnm
Usos medicinales	Para dar la sensación de bienestar

Tabla 2. Ficha de recolección de *Hedychium coronarium*.

Nombre científico	<i>Hedychium coronarium</i>
Lugar de recolección	Distrito de Oxapampa, provincia de Oxapampa, Departamento de Pasco
Geografía	Selva Alta, suelos húmedos con vegetación secundaria
Altitud	1800 msnm
Usos medicinales	Para tratar el reumatismo y dolor de huesos

IV.6.1.2 Obtención de los extractos metanólicos

Se realizó una extracción de cada especie con metanol. Se pesaron 50 gramos de polvo de raíces y se mezcló con 250 mL de metanol para dejarlo

en maceración por 72 horas ⁹². Después de filtró y se obtuvo un extracto seco por cada especie gracias a la utilización de un rotavapor a 40 °C para conservar las moléculas presentes en el extracto.

IV.6.2 Preparación de muestras para el análisis por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y en tándem (MS/MS)

IV.6.2.1 Preparación de las muestras

En un vial limpio y seco se pesó 8 mg del extracto de cada especie estudiada incluyendo el extracto de *Curcuma longa*. A cada una de ellas se adicionó 4 mL de la solución Metanol-Acetonitrilo (1:1). Las mezclas fueron sometidas a agitación a temperatura ambiente en equipo de ultrasonido (150W, 0.7 A) durante 5 minutos. Las soluciones resultantes fueron filtradas hacia viales de HPLC utilizando un filtro de disco de 0.25 µm. Para la búsqueda del sistema de separación se empleó una muestra denominada QC, la cual se preparó mezclando 300 µL de cada extracto en un vial HPLC ⁹³.

IV.6.2.2 Condiciones de análisis de HPLC

Se empleó un UHPLC de modelo Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) system (Thermo Scientific). Se inyectó 2 µL de la muestra en una columna cromatográfica Luna® Omega C18 100 Å, Phenomenex (150 x 2.1 mm, 1.6µm) (la temperatura de la columna fue de 40 °C). El sistema de solventes estuvo conformado por H₂O 0.1% HCOOH (**A**) y Acetonitrilo 1% HCOOH (**B**). El flujo de la fase móvil fue de 0.25 mL/minutos. En la **tabla 3** se describe la fase móvil en gradiente que empieza con un porcentaje alto de agua del 90%, este valor va disminuyendo para que incremente el porcentaje y se pueda separar la mayor cantidad de metabolitos. Casi al final de la corrida, se llega a un 100 % de ACN que permite limpiar la columna y después se vuelve a los porcentajes iniciales de los solventes para reequilibrar la columna ⁹³.

Tabla 3. Variación del sistema de solventes en gradiente.

Tiempo (minutos)	%Solvente A	%Solvente B
0	90	10
1	90	10
2	65	35
25	15	85
26	15	85
28	0	100
30	0	100
32	90	10
37	90	10

IV.6.2.3 Condiciones del análisis por espectrometría de masas

Se utilizó un espectrómetro de masas de modelo Q Exactive Plus (Thermo Scientific) con los siguientes parámetros ⁹³:

Tabla 4. Parámetros de scan Full MS.

Rango	120 – 1500 <i>m/z</i>
Resolución	70 000
Microscans	1
AGC target	1 x 10 ⁶
Máximo IT	100 ms

Tabla 5. Parámetros MS².

Resolución	17 500
AGC target	2 x 10 ⁵
Máximo IT	70 ms

Tabla 6. Parámetros de fuente de ionización.

Fuente y modo de ionización	ESI (positivo y negativo)
Voltaje de spray	3.0 / 2.5 KV
Temperatura de capilar	280 °C
Gas transportador	N2 (Sheath gas flow rate: 40, Aux gas flow rate: 10)
Temperatura del gas	350 °C
S-lens RF level	100
Energía de colisión normalizada	Energía de colisión normalizada

IV.6.3 Análisis de datos obtenidos por espectrometría de masas

IV.6.3.1 Preprocesamiento de datos por MZmine2

El procedimiento implica realizar una adaptación de los resultados en un formato más ligero de procesar (mzXML). Con la adaptación realizada, se cargan los archivos en formato mzXML a MZmine2 y se realizó los siguientes pasos ¹⁷:

1. En una primera etapa se realiza la “**Mass Detection**”. Esto consiste en generar una lista de masas a partir del archivo mzXML.
2. Después, la opción “**Chromatogram Builder**” va a conectar los picos de todas las m/z (masa/carga) consecutivas para convertirlas en cromatogramas. En la **figura 35** se puede observar que el programa a unidos los picos de masas aproximadas a 319.2265 para formar un cromatograma para esa molécula.

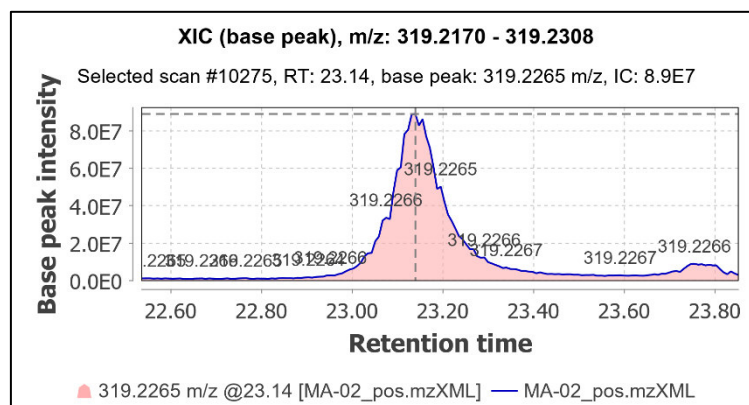


Figura 35. Cromatograma formado por la unión de picos con un m/z entre 319.2170 – 319.2308, estos picos se han detectado en un tiempo de retención cercano a 23.14 minutos.

3. Enseguida, se procede a realizar la “**Chromatographic Deconvolution**” y el “**Isotopic Peak Grouper**” para intentar descubrir picos que formen un motivo isotópico y agruparlos en una misma entidad química. También se logra afinar el cromatograma (**figura 36**).

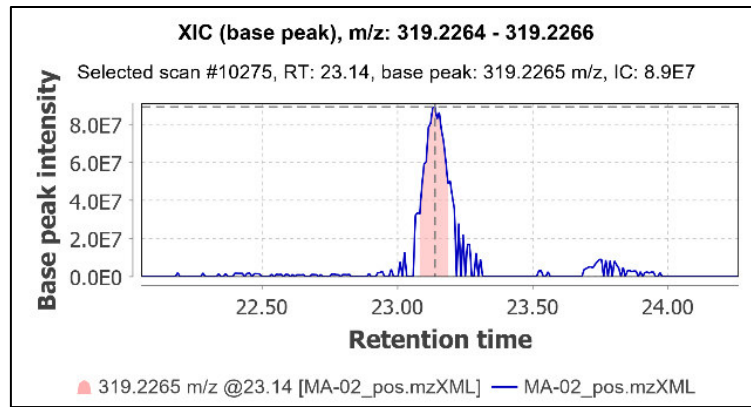


Figura 36. Cromatograma de una molécula con un m/z 319.2265 que agrupa posibles isótopos detectados. Se afina la selección al excluir señales consideradas como ruido del análisis.

- En la etapa de “**Alignment**”, se intenta comparar la lista de picos de diferentes muestras (cada muestra analizada por espectrometría tendrá una lista propia con su propio cromatograma y tiempos de retención). La finalidad es encontrar y alinear las moléculas que presenten masas semejantes y tiempos de retención equivalentes. Con esta información se puede ver la presencia de una entidad química en diferentes muestras (**figura 37**).

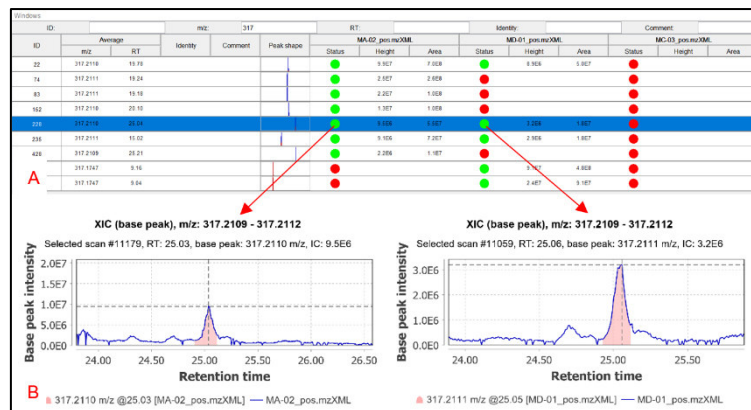


Figura 37. (A) Tabla en la que se observa la molécula con un m/z 317.211 presente tanto en la muestra MA_02 y MD_01. (B) Se confirma la presencia de cada pico en cada una de las muestras citadas con una mínima diferencia en el tiempo de retención

- El algoritmo “**Gap Filling**” va a buscar ciertos picos que pudieron ser eliminados después el alineamiento. También, la lista obtenida hasta ese momento del análisis permite calcular las fórmulas brutas a partir del m/z de los iones detectados (**figura 38**).

ID	Average		Identity	Comment	Peak shape	MA-02_pos.mzXML			MD-01_pos.mzXML			MC-03_pos.mzXML		
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area
1	381.2160	27.59	C20H28O2			●	2.4E9	1.9E10	●	2.0E7	1.1E8	●	6.3E5	6.3E6
2	381.2161	23.13	C20H28O2			●	4.8E8	2.4E9	●	6.5E6	4.3E7	●	7.1E5	6.0E6
3	355.2195	27.59	C19H26			●	4.0E8	2.1E9	●	3.0E6	1.6E7	●	1.5E5	9.7E5
4	163.1480	27.59	C12H18			●	3.9E8	2.8E9	●	3.5E6	2.1E7	●	1.8E5	1.6E6
5	333.2421	27.60	C21H32O3			●	3.8E8	2.3E9	●	3.5E6	1.9E7	●	1.3E5	7.1E5
6	333.2420	27.60	C21H32O3			●	3.7E8	1.1E9	●	3.5E6	7.9E6	●	1.3E5	3.1E5
7	217.1587	20.76	C15H20O			●	3.2E8	2.5E9	●	1.2E8	9.0E8	●	1.2E5	9.9E9
8	381.2160	28.99	C20H28O2			●	2.5E8	2.3E9	●	7.7E5	1.1E7	●	2.1E5	3.8E6
9	191.1793	19.83	C14H22			●	2.5E8	1.4E9	●	7.5E7	5.4E8	●	4.8E5	6.3E6
10	191.1793	23.86	C14H22			●	1.9E8	1.4E9	●	7.7E6	5.3E7	●	7.8E5	6.6E6
11	349.2372	23.88	C21H32O4			●	1.8E8	1.2E9	●	7.4E6	4.9E7	●	1.1E5	3.7E5
12	315.2317	27.58	C21H32O2			●	1.8E8	1.4E9	●	1.9E6	1.7E7	●	9.0E4	6.3E5
13	381.2161	21.76	C20H28O2			●	1.7E8	1.1E9	●	1.5E6	9.9E6	●	8.6E5	5.7E6
14	191.1794	23.14	C14H22			●	1.6E8	8.8E8	●	2.3E6	1.3E7	●	3.2E5	1.7E6
15	335.2215	19.78	C20H30O4			●	1.4E8	9.8E8	●	1.2E7	7.2E7	●	2.7E5	2.1E6
16	383.1954	15.64	C19H28O3			●	1.3E8	9.7E8	●	1.4E8	9.7E8	●	7.5E5	5.0E6
17	381.2161	21.64	C20H28O2			●	1.3E8	4.6E8	●	1.5E6	4.8E6	●	6.0E5	1.9E6
18	383.2317	26.68	C20H30O2			●	1.2E8	8.4E8	●	5.2E7	3.9E8	●	1.0E6	9.1E6
19	331.2265	23.87	C21H30O3			●	1.1E8	7.5E8	●	4.0E6	2.6E7	●	1.8E5	4.1E5
20	219.1743	22.66	C15H20O			●	1.0E8	6.1E8	●	4.2E7	2.5E8	●	1.5E9	9.1E9
21	219.1743	22.74	C15H20O			●	1.0E8	6.9E8	●	3.9E7	3.4E8	●	2.4E9	2.4E10
22	317.2111	19.80	C20H28O3			●	9.9E7	7.0E8	●	8.9E6	5.0E7	●	5.0E5	5.1E6
23	319.2266	23.18	C20H30O3			●	8.8E7	4.4E8	●	1.2E6	5.9E6	●	1.5E5	6.0E5

Figura 38. Cuadro en el que se numera algunas moléculas y su presencia en los tres extractos analizados (MD_01, MA_02 y MC_03), además de la fórmula bruta de la mayoría de ellos.

6. Finalmente, se exporta los resultados en formato .mgf y será utilizado en la plataforma GNPS.

IV.6.3.2 Análisis por GNPS y visualización por Cytoscape

Los datos que fueron preprocesado por MZmine 2 se analizaron por la plataforma online GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp?redirect=auth>).

Para tener acceso, se debe crear una cuenta y posteriormente se carga el archivo obtenido por MZmine 2 (formato .mgf) para que la plataforma analice los espectrogramas de las moléculas detectadas y compararlas entre ellas para ver grados de similitud y compararlas también con una amplia base de datos para así realizar la anotación de las moléculas identificadas ⁹⁴ (figura 39).



Figura 39. Los resultados del preprocesamiento se cargan en la plataforma GNPS para la anotación de moléculas detectadas.

El resultado se descarga de la plataforma y será visualizado por el programa Cytoscape. Esto permite ver un grupo de puntos que representan distintas moléculas relacionadas entre sí por uniones que significan que guardan similitud estructural entre ellas. Además, se puede observar si las moléculas han sido desreplicadas (**Figura 40**).

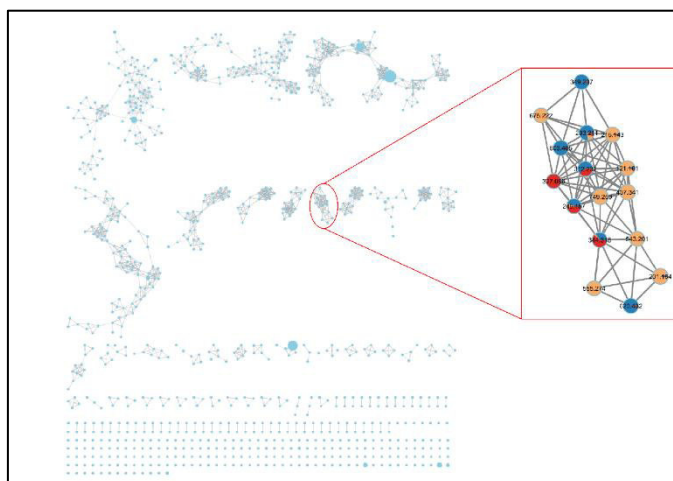


Figura 40. Representación de resultados con Cytoscape.

IV.6.4 Determinación de la actividad antibacteriana

IV.6.4.1 Preparación de diluciones

Todas las diluciones se realizaron con materiales estériles (viales, tips, etc.) y cerca de un mechero para conservar la esterilidad de acuerdo con la técnica modificada de Ruiz et al⁹⁵.

Con el extracto seco se preparó una dilución madre a una concentración de 200000 µg/mL. En la **tabla 7** se asignan los datos de la preparación.

Tabla 7. Preparación de la dilución madre.

Extracto seco	Peso (gramos)	Volumen DMSO (mL)	Concentración (µg/mL)
<i>Renealmia thyrsoides</i>	0.33	1.65	200000
<i>Hedychium coronarium</i>	0.32	1.6	200000
<i>Curcuma longa</i>	0.34	1.7	200000

A partir de la dilución madre, se preparó diluciones intermedias siguiendo las indicaciones de la **tabla 8**.

Tabla 8. Preparación de diluciones intermedias a partir de la dilución madre.

Diluciones Intermedias				
Dilución	Concentración de partida (µg/mL)	Volumen Usado (mL)	+ Volumen DMSO (mL)	= Concentración intermedia (µg/mL)
1	200000	-	-	200000
2	200000	0.3	0.3	100000
3	200000	0.3	0.9	50000
4	200000	0.3	2.1	25000
5	25000	0.3	0.3	12500
6	25000	0.3	0.9	6250
7	25000	0.3	2.1	3125
8	3125	0.3	0.3	1562.5
9	3125	0.3	0.9	781.25
10	3125	0.3	2.1	390.625

Para preparar las diluciones finales, se transvasó 20 µL de cada una de las 10 diluciones intermedias en un vial y se adicionó 980 µL de CMH (Caldo Mueller Hinton) estéril. Finalmente, se obtuvo 1 mL de una dilución de 1:50. La **tabla 9** resume el procedimiento.

Tabla 9. Preparación de diluciones finales (1:50).

Diluciones Finales (1:50)				
Dilución	Concentración intermedia (µg/mL)	Volumen Usado (µL)	+ Volumen DMSO (µL)	= Concentración final (µg/mL)
1	200000	20	980	4000
2	100000	20	980	2000
3	50000	20	980	1000
4	25000	20	980	500
5	12500	20	980	250
6	6250	20	980	125
7	3125	20	980	62.5
8	1562.5	20	980	31.25
9	781.25	20	980	15.625
10	390.625	20	980	7.8215

IV.6.4.2 Preparación del control de esterilidad

En un vial estéril se agregó 2000 µL de CMH estéril y 10 µL de resazurina estéril ⁹⁵ (anexo 2)

IV.6.4.3 Preparación del inóculo

Se sembraron las cepas de estudio en placas de TSA (“Tryptic Soy Agar”) y se incubaron por 24 horas. De cada placa se retiró una muestra con un asa de siembra que se suspendió en un tubo de solución salina hasta llegar a una concentración de 0.5 de McFarland. Del inóculo recién preparado se transvasó 80 μ L en un vial estéril y se agregó 2320 μ L de CMH estéril (dilución 1:30). Después de homogenizar la mezcla, se transvasó 2000 μ L de esta en otro vial estéril y se agregó 8000 μ L de CMH estéril (dilución 1:10). Finalmente, se agregó 50 μ L de resazurina ⁹⁵ (anexo 2)

IV.6.4.4 Preparación de ciprofloxacina como control

Se preparo una solución de ciprofloxacino de 640 μ g/mL; para ello, se pesó en una balanza analítica 6.4 mg de ciprofloxacino y se diluyo en 10 mL de agua estéril. Se transvasó 1 mL de esta solución en un vial estéril y se agregó 4 mL de CMH obteniendo una dilución madre de 128 μ g/mL. Se procedió a realizar 9 diluciones sucesivas según la **tabla 10**.

Tabla 10. Preparación de diluciones sucesivas de ciprofloxacino.

Dilución	Concentración de partida (μ g/mL)	Volumen Usado (mL)	+	Volumen CMH (mL)	=	Concentración intermedia (μ g/mL)
1	128	-		-		128
2	128	0.5		0.5		64
3	128	0.5		1.5		32
4	128	0.5		3.5		16
5	16	0.5		0.5		8
6	16	0.5		1.5		4
7	16	0.5		3.5		2
8	2	0.5		0.5		1
9	2	0.5		1.5		0.5
10	2	0.5		3.5		0.25

IV.6.4.5 Llenado de microplacas y determinación de la actividad antimicrobiana.

Se utilizó microplacas de 96 pocillos con fondo en U estéril y se aplicó los conceptos de Ruiz et al ⁹⁵ con modificaciones.

Las columnas de las placas están numeradas de 1 a 12 de izquierda a derecha y a las filas se le atribuyen letras de A - H de arriba hacia abajo. Cada muestra y el antibiótico de referencia se evalúa por duplicado tomando en cuenta dos filas de la placa. Para ello 100 μ L de las 10 diluciones finales se transvasan desde la columna 2 a 11 ya que la columna 1 está reservado para el control de esterilidad y la columna 12 para el control de crecimiento. En las mismas posiciones donde se agregaron las muestras, se adicionó 100 μ L de inóculo (de acuerdo con el método Liu et al¹⁸). A continuación, se llenó cada pocillo de la columna 12 con 200 μ L de inóculo y de la misma manera la columna 1 se llenó con 200 μ L del control de esterilidad. En la **figura 41** se detalla el proceso.

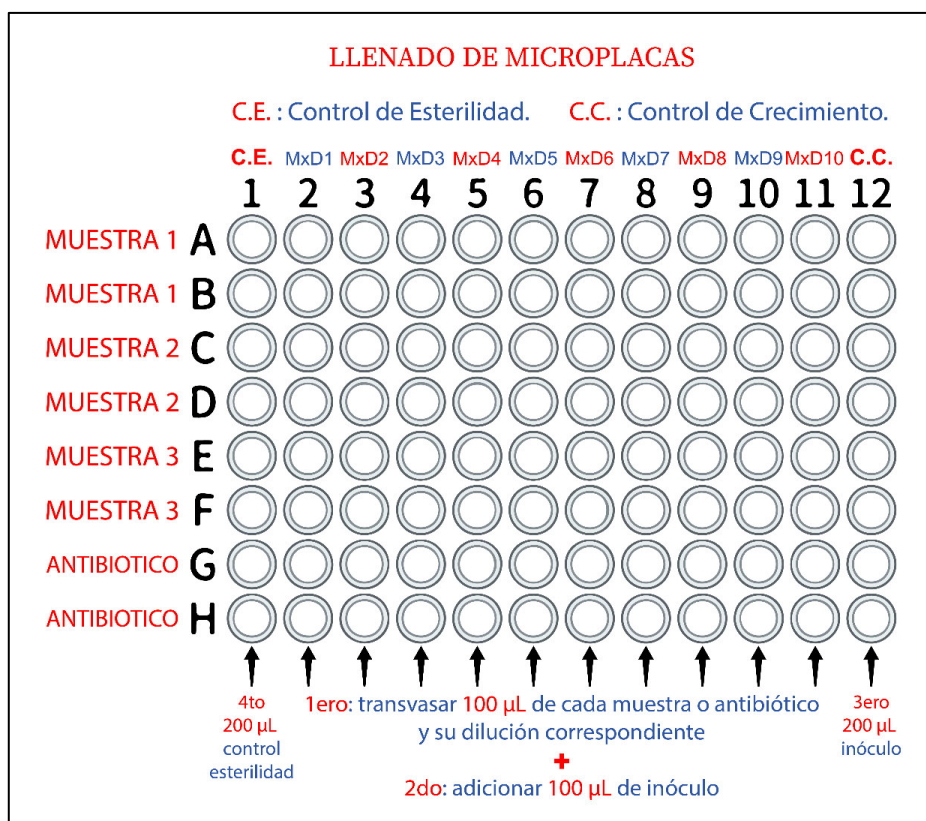


Figura 41. Método del llenado de microplacas.

Las microplacas se incubaron por 24 horas a 37 °C. Todos los pocillos presentaron coloración purpura al inicio debido al uso de resazurina. La no inhibición bacteriana por las muestras se observó con un cambio de color de purpura a rosado (indicador de crecimiento bacteriano). En este sentido, la mínima concentración a la que no se dio el cambio de color se tomó como la Concentración Mínima Inhibitoria.

V. RESULTADOS

V.1 Metabolitos presentes en los extractos de *Renalmia thyrsoides*, *Hedychium coronarium* y *Curcuma longa*.

Por espectrometría de masas y análisis con Molecular Networking se determinaron la distribución general de metabolitos en cada especie como se ve en la **figura 42** gracias al programa de visualización Cytoscape. Cada esfera (molécula) tiene una masa molecular en su centro y los colores de su área corresponde a su presencia en cada planta: el color rojo indica que se localiza en *C. longa*, el color azul en *H. coronarium* y el color naranja en *R. thyrsoides*.

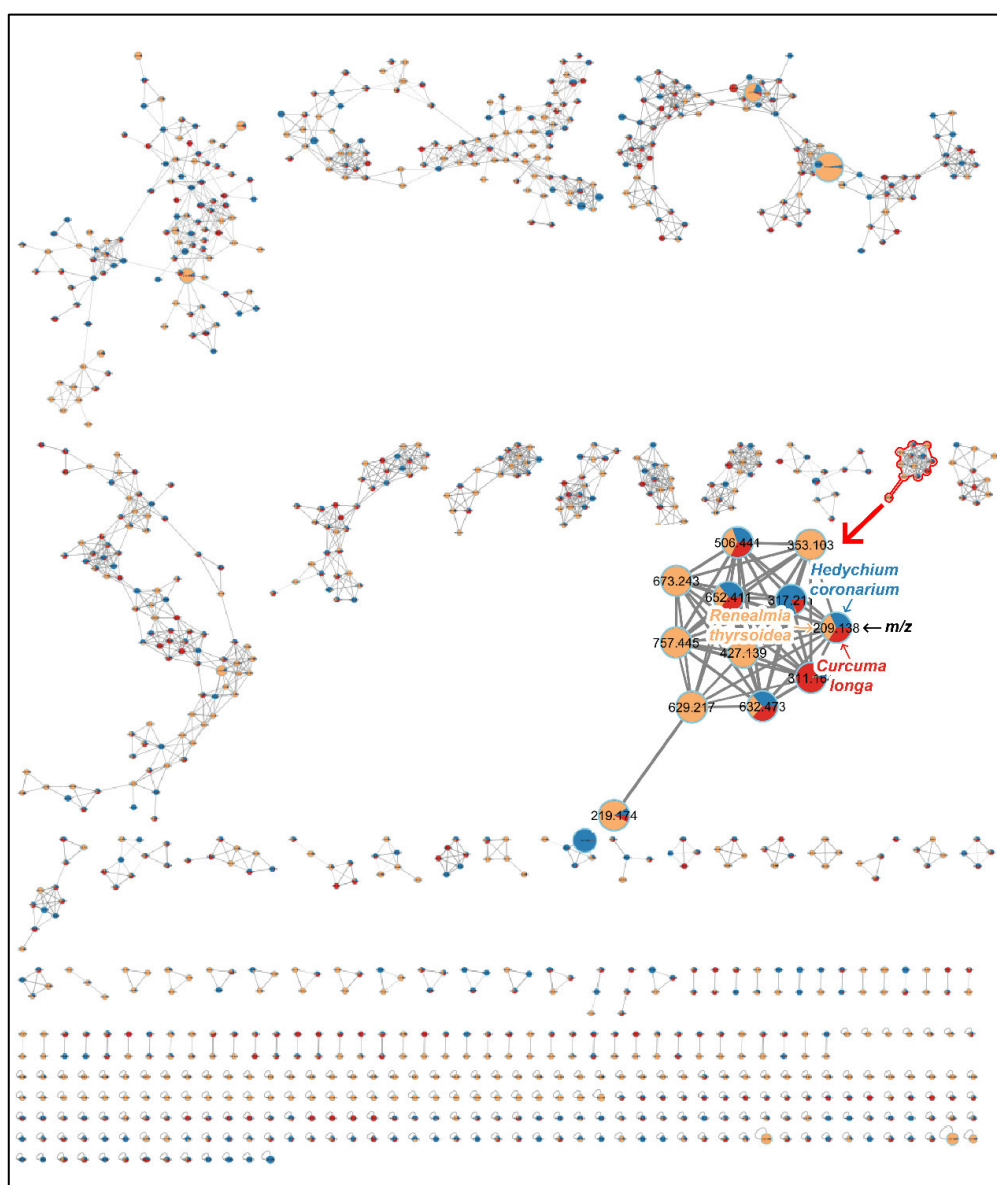


Figura 42. Gráfico producido por Cytoscape donde se ven todos los metabolitos detectados representados en forma de esfera y con su masa/carga (m/z).

Los metabolitos detectados por espectrometría de masas fueron analizados y desreplicados por el sistema Molecular Networking y se justifica en su mayoría mediante los mecanismos de fraccionamientos desarrollados en el marco teórico. Los metabolitos desreplicados se resumen en la **tabla 11**:

Tabla 11. Tabla resumen de los metabolitos detectados en *H. coronarium*, *C. longa* y *R. thyrsoides*. Se considera por cada molécula un nombre, tiempo de retención (**T.R.**), masa/carga (**m/z**), código de identificación asignado por MzMine2 (**ID**), fórmula bruta y fracciones de estas.

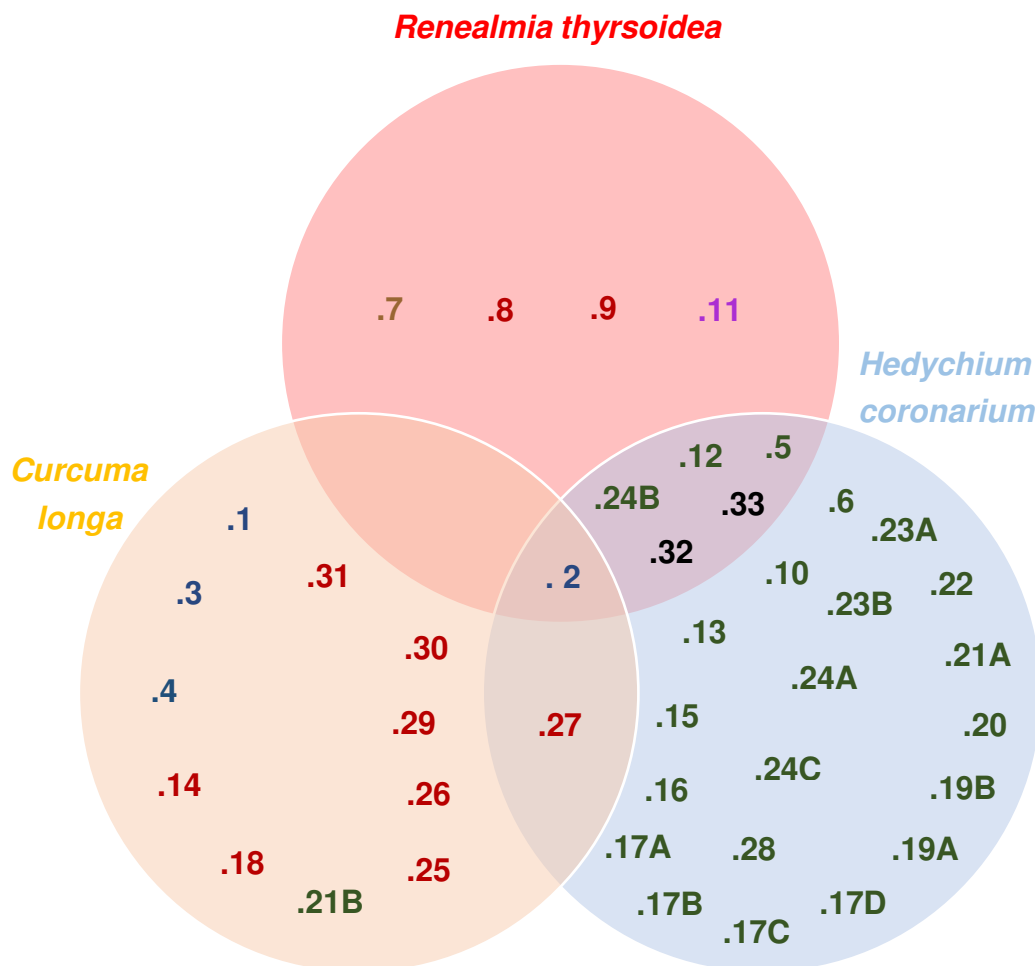
	Nombre m/z (ID)	T.R.	Muestra	Fórmula bruta	Fracciones
1	Germacrone 219.1744 (949)	18.25	<i>C. longa</i>	C ₁₅ H ₂₂ O	201.1646 , 191.18, 173.133 , 162.0992, 159.1172 , 145.1014, 121.1015 , 107.0859, 95.0860
2	Alismol 221.19 (352)	20.35	<i>H. coronarium</i>	C ₁₅ H ₂₄ O	203.1795 , 175.1482, 161.1325 , 147.1168, 133.1013 , 119.0858, 105.0703 , 95.086, 81.0704
			<i>R. thyrsoides</i>		
			<i>C. longa</i>		
3	Curcumenol 235.1690 (416)	14.97	<i>C. longa</i>	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	217.1588 , 199.1481, 189.1637 , 179.107, 161.1326 , 147.1169, 133.1011 , 119.0859, 105.0704 , 93.0704, 83.0498 , 81.0705
			<i>H. coronarium</i>		
4	Curcumol 237.18 (840)	17.01	<i>C. longa</i>	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	219.1743 , 201.1637, 191.1794 , 163.1118, 145.1013 , 135.1169, 121.1014 , 107.0859
5	(E)-15,16-Bisnorlabda- 8(17),11-dien-13-one 261.2212 (184)	26.5	<i>H. coronarium</i>	C ₁₈ H ₂₈ O	243.2107 , 217.1956, 203.1796 , 191.1797, 187.148 , 177.1273, 173.1323 , 137.1223, 121.1013 , 105.0703
			<i>R. thyrsoides</i>		
6	Coronarín E 285.2210 (347)	25.96	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₂₈ O	267.2104 , 241.1942, 217.195 , 211.148, 197.1319 , 191.18, 175.1477 , 137.1324, 121.1012 , 105.0702
7	Sakuranetin 287.0914 (445)	13.83	<i>R. thyrsoides</i>	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	269.0804 , 254.0556, 245.0807 , 193.0495, 185.0444 , 167.0633, 167.034 , 147.0441, 123.0442 , 119.0494, 107.0496

	Nombre m/z (ID)	T.R.	Muestra	Fórmula bruta	Fracciones
8	1,7-bis(4-hydroxyphenyl) hepta-4E,6E-dien-3-one 295.1327 (442)	12.6	<i>R. thyrsoides</i>	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	277.1229 , 225.0912, 189.0910 , 175.0755, 149.0598 , 147.0803, 145.065 , 133.0648, 131.0495 , 107.0495
9	1,7-bis(4- hydroxyphenyl)-4E- hepten-3-one 297.1484 (452)	9.73	<i>R. thyrsoides</i>	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	238.298 , 191.1067, 177.0911 , 133.0648, 107.0495
10	Hedychenone 299.2004 (264)	19.3	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	281.1901 , 271.2057, 257.1913 , 255.1744, 253.2 , 239.1796, 231.1381 , 215.1072, 205.1224 , 189.1275
11	5,6-desmethylenedioxy- 5-methoxy-agla-lactone 301.1068 (532)	10.76	<i>R. thyrsoides</i>	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	285.0766 , 259.0966, 241.0855 , 181.0495, 166.0261 , 151.0387, 147.044
12	Coronarín A 301.216 (1)	27.59	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	283.205 , 255.2105, 241.1584 , 241.12, 233.1543 , 227.14, 213.12 , 207.1372, 199.1118 , 191.1063, 171.1167 , 157.1011
			<i>R. thyrsoides</i>	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	
13	(E)-Labda-8(17),12- diene-15,16-dial) 303.2317 (363)	14.47	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	285.221 , 273.2212, 243.2122 , 229.1588, 215.1423 , 189.1268, 159.1163
14	Bisdemethoxycurcumin 309.1122 (630)	14.85	<i>C. longa</i>	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	291.1006 , 239.1064, 225.0911 , 215.0702, 199.0760 , 189.0548, 147.0442 , 145.0648
15	7-Hydroxyhedychenone 315.1954 (286)	17.31	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	297.1847 , 287.2016, 273.1845 , 269.1897, 255.3718 , 247.1325, 231.1016 , 205.0849, 191.0703 , 163.0753
16	Hedyforrestin C 317.2109	19.19	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	

	Nombre m/z (ID)	T.R.	Muestra	Fórmula bruta	Fracciones
	(74)				299.2005, 289.2173, 271.2056, 253.195, 243.1376, 223.1226, 215.1072
17 A 17 B 17 C 17 D	Coronarín C Coronarín D Pacovatinín A 7-α-Hydroxy-(E)-labda- 8(17),12-diene-15,16- dial Isocoronarín D Hedychilactone A Hedychilactone B Hedycoronál B 15-Hydroxy-11,15- epoxylabda-8(17), 12- dien-16-al 16-oxo-8(17),12(E)- labdadién-15-oic acid 319.2266 (23), (117), (76), (63)	21.63 (63)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	301.2163, 282.7858, 272.7177, 245.1536, 217.1956, 205.1228, 191.1796, 177.0911, 137.1323, 121.1011, 105.0703
		21.75 (76)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	301.2161, 274.4125, 263.1658, 245.1535, 217.1958, 191.1793, 177.0912, 137.1325, 121.1013, 105.0703
		21.83 (117)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	301.2158, 283.2068, 259.1683, 245.1538, 231.1389, 205.1222, 191.1793, 177.0912, 137.1326, 121.1013, 105.0702
		23.16 (23)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	301.2154, 283.2055, 273.2205, 255.2108, 245.1530, 231.1379, 215.1794, 199.1475, 189.1637, 137.1325, 121.1015, 105.0704
18	1,5-bis(4-hydroxy-3- methoxyphenyl)penta- 1,4-dien-3-one 327.1225 (634)	11.75	<i>C. longa</i>	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	309.1125, 203.0702, 177.0546, 149.0597, 137.0597, 123.0443
19 A 19 B	Hedycoronén A Hedycoronén B 331.2266 (19) y (52)	23.87 (19)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	313.2168, 303.2315, 299.2002, 271.2058, 257.1537, 253.1953, 243.1383, 217.949, 191.1792, 173.132, 159.1167, 137.1326, 121.1014, 105.0703
		24.07 (52)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	313.216, 303.2311, 299.2004, 285.2218, 257.153, 253.1953, 243.1384, 217.1951, 215.1075, 191.1793, 173.1325, 159.1168, 137.1325, 121.1014, 105.0702

Nombre <i>m/z</i> (ID)		T.R.	Muestra	Fórmula bruta	Fracciones
20	Pacovatinin C 333.2058 (199)	19.28	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	315.1954, 297.186, 287.1999, 251.1257, 241.1950, 203.1796, 185.1326, 137.1324, 121.1015, 105.0703
21 A 21 B	(E)-7- α -Hydroxy-6-oxo- labda-8(17),12-diene- 15,16-dial Hedychilactone C 333.2055 (246) y (865)	12.97 (246)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	315.1955, 297.1848, 287.2004, 251.127, 233.1163, 227.1795, 191.1063, 163.1481, 137.1322, 121.1014, 105.0703
		16.56 (865)	<i>C. longa</i>	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	315.1954, 297.1848, 287.2, 251.1788, 233.1172, 217.1223, 171.1168, 137.06, 121.1008, 105.0702
22	Coronarins G 333.2422 (162)	25.34	<i>H. coronarium</i>	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	301.2175, 283.205, 255.2113, 215.1793, 177.1635, 163.1487, 121.1015, 105.0702
23 A 23 B	Coronarín D methyl ether Methoxycoronarin D 333.2420 (5) y (36)	27.6 (5)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	301.2172, 287.2365, 255.2115, 215.1795, 177.1639, 163.1481, 105.0701
		28.31 (36)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	315.2313, 301.2159, 287.2368, 255.2109, 215.1799, 191.179, 159.1166, 137.1328, 121.1013, 105.0703
24 A 24 B 24 C	Coronarín B Peroxyconarín D Pacovatinin B 335.2214 (346), (15) y (95)	19.48 (346)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	335.2216, 317.2114, 299.1997, 289.2177, 275.2022, 191.1793, 165.0546, 137.1322, 121.1013, 105.0701
		19.78 (15)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	335.2216, 317.2113, 299.2004, 289.2158, 271.2055, 265.1453, 191.1797, 171.1170, 137.1326, 121.1015, 105.0701
			<i>R. thyrsoides</i>		
20.11 (95)	<i>H. coronarium</i>	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	335.2215, 317.211, 299.2002, 289.2157, 271.2046, 243.138, 229.1221, 205.1953, 191.1071, 177.0912, 137.1325, 121.1014, 105.0703		
25	Demethoxy curcumin 339.122 (670)	11.01	<i>C. longa</i>	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	321.1124, 269.1170, 255.1014, 245.0807, 229.0857, 219.065, 215.0696, 189.0547, 177.0546, 175.0753, 147.0440, 145.0284

Nombre <i>m/z</i> (ID)		T.R.	Muestra	Fórmula bruta	Fracciones
26	2-(3,4-dihydroxyphenyl)methenyl-5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl-3(2H)-furanone 353.1022 (762)	10.62	<i>C. longa</i>	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	338.0779 , 337.0703, 322.0787 , 269.0809, 177.0544 , 163.0386, 161.0234 , 137.06, 123.0442
27	1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-4,6-dien-3-one 355.1538 (142)	13.26	<i>H. coronarium</i>	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	337.1429 , 231.1015, 219.1015 , 187.0745, 179.0702 , 177.0912, 163.0754 , 161.0594, 145.0651 , 137.0598, 122.0364
			<i>C. longa</i>		
28	Coronarín D acetate 361.2371 (253)	22.6	<i>H. coronarium</i>	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	343.2263 , 315.231, 301.2165 , 277.144, 217.1234 , 191.1799, 137.1325 , 121.1015, 105.0703
29	Curcumina 369.1331 (655)	25.94	<i>C. longa</i>	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	351.1277 , 299.1276, 285.112 , 259.0971, 245.0809 , 219.0651, 177.0546 , 175.0753
30	2-(4,5-dihydroxy-3-methoxyphenyl)methenyl-5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl-3(2H)-furanone 383.1124 (701)	10.73	<i>C. longa</i>	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	368.0896 , 350.0784, 299.0904 , 191.0337, 177.0547 , 153.0546, 137.0597
31	5-hydroxy-1-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hept-1-en-3-one (ol) 389.1593 (946)	7.97	<i>C. longa</i>	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	371.1489 , 353.1382, 193.05 , 191.0702, 163.08 , 153.0546, 137.0597
32	Aurantiamide 403.2026 (381)	13.37	<i>H. coronarium</i>	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	403.2074 , 385.1912, 252.1012 , 224.107, 152.107 , 134.0964, 117.0702 , 105.0338
			<i>R. thyrsoides</i>		
33	Aurantiamide acetate 445.212 (54)	16.39	<i>H. coronarium</i>	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₄	385.1904 , 252.1018, 224.1068 , 194.1175, 177.0908 , 134.0965, 105.0338
			<i>R. thyrsoides</i>		



- Dihydrobenzofuranona ■ Sesquiterpeno ■ Diterpeno
- Diarilheptanoide ■ Flavanone ■ Dipéptido

Figura 43. Distribución de metabolitos desreplicados en *H. coronarium*, *C. longa* y *R. thyrsoides*.

La **figura 43** exhibe a las familias moleculares desreplicadas en las tres especies analizadas. El sesquiterpeno alismol (2) está presente en las 3 especies estudiadas. Un gran número de diterpenos fueron encontrados en *H. coronarium* y algunos de ellos en *R. thyrsoides*. También, *C. longa* presenta varios diarilheptanoides desreplicados.

V.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de *Renealmia thyrsoides*, *Hedychium coronarium* y *Curcuma longa*.

Tabla 12. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *Hedychium coronarium*, *Curcuma longa* y *Renealmia thyrsoides* y ciprofloxacina (control positivo) frente a cepas ATCC Gram-positivas.

Extracto metanólico/control	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
<i>Hedychium coronarium</i>	250	1000	250
<i>Curcuma longa</i>	250	500	250
<i>Renealmia thyrsoides</i>	2000	>4000	1000
Ciprofloxacino (control)	0.5	0.5	0.25

En la **tabla 12** se muestra que los extractos de *Hedychium coronarium* y *Curcuma longa* presentaron la menor concentración inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. En cambio, frente a *Staphylococcus epidermidis*, solo *Curcuma longa* presentó la menor CMI. El extracto de *Renealmia thyrsoides* mostró los mayores valores de la CMI frente a las tres cepas estudiadas y los tres extractos mostraron ser activos frente a *Bacillus subtilis*.

Tabla 13. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de *Hedychium coronarium*, *Curcuma longa* y *Renealmia thyrsoides* y ciprofloxacina (control positivo) frente a cepas ATCC Gram-negativas.

Extracto metanólico/control	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Hedychium coronarium</i>	>4000	>4000
<i>Curcuma longa</i>	>4000	>4000
<i>Renealmia thyrsoides</i>	>4000	>4000
Ciprofloxacino (control)	4	0.25

En la **tabla 13** se observa que *Hedychium coronarium*, *Curcuma longa* y *Renealmia thyrsoides* no fueron activos frente a *P. aeruginosa* y *E. coli*.

VI. DISCUSIÓN

Renenalmia thyrsoides es una especie poco estudiada. La escasa información radica en las investigaciones de los aceites esenciales de sus raíces ⁵¹, el estudio fitoquímico de Cabanillas et al ⁵ y el estudio *in vitro* del extracto metanólico frente a *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente ⁴. Cabe destacar que se reportaron dos flavonoides y 5 diarilheptanoides en las raíces de esta especie ⁵. De estas, se pudo desreplicar, en el presente estudio, una flavanona [sakuranetin (**7**)] y dos diarilheptanoides [1,7-bis(4-hidroxyfenil) hepta-4E,6E-dien-3-one (**8**) y 1,7-bis(4-hidroxifenil)-4E-hepten-3-one (**9**)]. Estos últimos no se reportan en el análisis extenso de diarilheptanoides de *Curcuma longa* ¹³ ni en *Hedychium coronarium* lo que implica una posible exclusividad de estas moléculas para *Renenalmia thyrsoides*. Además, ambas moléculas son un potente activador del receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR γ), esto revelaría una importante actividad inmunomoduladora ⁵.

En las raíces se detectaron una dihidrobenzofuranona [5,6-desmetilenedioxi-5-metoxi-agla-lactona (**11**)] que a diferencia de Cabanillas et al ⁵, ellos lo encontraron en las hojas, esto ayuda a proponer la presencia extendida de esta molécula en la planta.

Se ha aislado diterpenos tipo labdano en raíces de varias especies del género *Renenalmia* ¹², pero, hasta la fecha, no se hizo lo mismo para *Renenalmia thyrsoides*. Sin embargo, mediante el análisis de sus metabolitos, se ha desreplicado 3 diterpenos como lo son **5**, **12** y **24B** (ver **tabla 11**) lo que evidencia que esta especie no es la excepción frente a los otros integrantes de su género. Además, estos tres diterpenos han sido reportados en *Hedychium coronarium* ^{14,96}. En consecuencia, se sugiere que ambas especies presentan en común ciertas vías metabólicas.

La Aurantiamide (**32**) y el acetato (**33**) son dipéptidos muy bioactivos con propiedades antineuroinflamatoria, antiinflamatorias, antinociceptivas, etc ^{97,98}. Se conoce de su presencia en diferentes plantas y microorganismos ^{98,99}, pero no se ha descrito que *Renenalmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* las produzcan. Sin embargo, gracias al análisis realizado por Molecular Networking, se las está desreplicando en estas dos especies.

Se decidió integrar a *Curcuma longa* en el análisis metabólico debido a que es una especie productora de terpenos y curcuminoides (diarilheptanoides) principalmente ¹³. Esto ayuda a comparar el perfil metabólico de esta especie con los perfiles de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium* para así enriquecer el análisis. En ese sentido, se detectó por vez primera a alismol (**2**) - un sesquiterpeno con propiedades antihipertensivas ¹⁰⁰ y neuroprotectoras ¹⁰¹ que ha sido aislado de las raíces de *Alisma plantago-aquatica* var ¹⁰² - en los extractos de *Renealmia thyrsoides*, *Hedychium coronarium* y *Curcuma longa*. Otros tres sesquiterpenos como germacrone (**1**), curcumenol (**3**) y curcumol (**4**) con propiedades antiinflamatorias ¹⁰³, antitumorales ¹⁰⁴ y anticancerígenas ¹⁰⁵ respectivamente están presentes en el extracto analizado de *Curcuma longa*, pero no se observa trazas de estos en *Renealmia thyrsoides*. *Hedychium coronarium* solo presentó curcumol.

Wei et al reportó que las raíces de *Hedychium coronarium* producen gran cantidad de diterpenos tipo labdano ¹⁴. En concordancia con la afirmación anterior, en el presente análisis se detectaron 22 diterpenos en esta especie. de los cuales la mayoría presentó fragmentos característicos con *m/z* de 137.13, 121.1 y 105.07 descritos por Itokawa et al y Azemard et al ^{72, 73}. El diterpeno **21B** es una molécula análoga de labda-8(17),12-diene-15,16 dial y fue identificada, también, en *C. longa* ¹⁰⁶. Por otro lado, la reorganización de enlaces en el anillo A de ciertos diterpenos labdanos conlleva a la formación de un nuevo fragmento ⁷⁴. Un ejemplo de lo descrito se evidencia cuando Hedyforrestin C (**16**) de *m/z* 317.2109 forma el fragmento de *m/z* 215.1072.

Los diterpenos **5**, **13** y **28** se reportaron anteriormente en *Hedychium coronarium* por Chimnoi et al; en dicha investigación, **28** mostró buena actividad citotóxica sobre varias líneas celulares (HuCCA-1, MOLT-3, KB, HeLA, MDA-MB231, etc.) ¹⁰⁷.

Los diterpenos **6**, **19 A** y **19 B** fueron extraídos de *H. coronarium* por Kiem et al; de los cuales, **19 A** y **19 B** presentaron actividad antiinflamatoria con buena inhibición de TNF- α , IL-6 y IL-12 ¹⁰⁸.

La acción inhibitoria de la generación del radical anión superóxido por parte de neutrófilos humanos en respuesta al formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina/citoclastina B ha sido evaluado por Chen et al para los diterpenos

12, 21 A, 23 A y 24 B, los dos primeros mostraron una actividad inhibitoria de la respuesta proinflamatoria en neutrófilos ¹⁰⁹.

Los diarilheptanoides son principalmente producidos por *Curcuma longa*. En el caso de *Hedychium coronarium* se desreplicó 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-4,6-dien-3-one (**27**), un curcuminoide que ya había sido reportado en esta especie ¹¹⁰ y en *C. longa* ¹³.

La actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de las raíces de *H. coronarium* ha sido descrito por Abdul et al; en sus resultados se evidencia que el extracto tuvo actividad antibacteriana frente a cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Sarcina lutea*) y Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella shiga* y *Salmonella typhi*) con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 64, 32, 64, 32 µg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente ⁶⁰. Esta información contrasta con los resultados obtenidos en el presente estudio que determinó una CMI de 250 y 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (**Tabla 12**); y no presenta actividad sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (**Tabla 13**). Ho et al estudiaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *H. coronarium* y mostraron que dicho extracto tenía una baja o nula actividad antimicrobiana, en especial frente a Gram-negativas ¹¹¹. Esto último coincide con los resultados obtenidos. En cierta medida, se puede deber a que tanto la investigación de Ho et al y la presente tesis trabajaron en un rango parecido de concentraciones del extracto al momento de evaluar la actividad antimicrobiana. Sin embargo, lo que resulta sorprendente es que Abdul et al obtuvieron mejores resultados de actividad antimicrobiana a pesar de haber evaluado concentraciones mínimas del extracto de *H. coronarium*.

El extracto metanólico de las raíces de *Renealmia thyrsoides* ha reportado actividad leishmanicida ⁴, pero no se ha publicado estudios de actividad antimicrobiana de su extracto metanólico hasta la fecha.

El extracto de *Curcuma longa* mostró mayor actividad frente *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Además, *C. longa* es una especie que produce principalmente metabolitos activos como los curcuminoideos, en especial la curcumina que ha demostrado afectar la división celular de la bacteria al inhibir

la proteína citoesquelética FtsZ y por ende la creación del anillo Z (anillo estructural) ¹¹². Kaur et al utilizó el molecular docking para determinar que los átomos de oxígeno ubicados en los anillos fenólicos, en los grupos metoxilos ligados a los anillos fenólicos y en los grupos carbonilos de la curcumina interactúan en el sitio catalítico de la proteína FtsZ para inhibirla ¹¹³. Se reportó que la curcumina inhibe la formación del anillo Z en *Bacillus subtilis* 168 con un IC₅₀ de 30 µM ¹¹⁴.

Por otro lado, el extracto metanólico de *H. coronarium*, ha sido activo, también, frente a las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (**Tabla 12**), pero no frente a las bacterias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (**Tabla 13**). Como ya se ha descrito, este extracto presenta una gran variedad de diterpenos tipo labdano. Entre los principales se desreplicó el coronarin D. Esta molécula ha demostrado ser muy activo frente bacterias Gram-positivas e inactivas con Gram-negativas ¹¹⁵.

Los curcuminoides y diterpenos son moléculas con buena actividad antimicrobiana ^{116,117}, sin embargo, en la presente tesis, el extracto de *Renealmia thyrsoides* no reportó producir una gran variedad de estas moléculas, ni una mejor actividad antimicrobiana comparado con *H. coronarium* (productora de diterpenos) o *C. longa* (productora de curcuminoides). Esto sugiere que la actividad microbiológica en las especies estudiadas está relacionada con la producción de diterpenos y curcuminoides.

VII. CONCLUSIONES

El análisis por espectrometría de masas de alta resolución permite el cálculo con gran exactitud del peso molecular de las moléculas contenidas en los extractos metanólicos de *Renealmia thyrsoides*, *Hedychium coronarium* y *Curcuma longa* (especie de referencia y productora de curcuminoides).

El análisis de los pesos moleculares y sus fracciones posibilita el estudio metabolómico de los extractos metanólicos de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*. En ese sentido, se revela la presencia principalmente de diterpenos y curcuminoides de la siguiente manera: en *H. coronarium* se exhibe una gran cantidad de diterpenos tipo labdano en comparación con *R. thyrsoides* y *Curcuma longa*. Por otro lado, *Curcuma longa* presenta mayor producción de curcuminoides con respecto a *R. thyrsoides* y *H. coronarium*.

Tanto *Hedychium coronarium* como *Curcuma longa* exhiben mayor actividad antimicrobiana en bacterias Gram positivas comparados con *Renealmia thyrsoides*. Se conoce así que tanto la presencia mayoritaria de diterpenos como la de curcuminoides influyen probablemente en la mayor actividad antimicrobiana de los extractos.

El uso del extracto de *Curcuma longa* como especie de referencia permite verificar la presencia o ausencia de curcuminoides en los extractos de *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*. *Renealmia thyrsoides* aún es una especie que necesita de más estudios porque existe poca data sobre sus metabolitos constituyentes a comparación de *H. coronarium* o *C. longa*. La presencia de flavonoides y curcuminoides en su extracto sugiere una posible actividad antioxidante y antiinflamatoria que puede ser evaluado en futuros estudios. Además, sería oportuno variar el solvente de extracción para poder extraer metabolitos que el metanol no ha podido hacerlo. Así mismo, se recomienda fraccionar los extractos y analizarlos por espectrometría de masas para así mejorar la detección de sus moléculas constituyentes y realizar una búsqueda biodirigida de metabolitos activos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pilon AC, Valli M, Dametto AC, Pinto MEF, Freire RT, Castro-gamboa I, et al. NuBBE DB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-12.
2. Herzog S, Martínez R, Jørgensen P, Tiessen H. Climate Change and Biodiversity in the Tropical Andes. *Mt Res Dev.* 2012;32(2):258.
3. Valadeau C, Castillo JA, Sauvain M, Lores AF, Bourdy G. The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanéscha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(1):175-92.
4. Valadeau C, Pabon A, Deharo E, Castillo A, Estevez Y, Lores F, et al. Medicinal plants from the Yanéscha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *J Ethnopharmacol.* 2009;123(3):413-22.
5. Cabanillas B, le Lamer AC, Olganier D, Castillo D. Leishmanicidal compounds and potent PPAR γ activators from *Renalmia thyrsoides* (Ruiz & Pav.) Poepp. & Endl. *J Ethnopharmacol.* 2014;157:149-55.
6. Bourdy, Geneviève; Valadeau, Céline; Albán Castillo J. Yato'ramuesh: pare'shemats yanéscha. Remanso Ediciones EIRL, editor. Lima; 2008. 329 p.
7. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, et al. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom.* 2010;45(7):703-14.
8. Sawada Y, Nakabayashi R, Yamada Y, Suzuki M, Sato M, Sakata A, et al. RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: A plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry.* 2012;82:38-45.
9. Wang M, Carver JJ, Phelan V v., Sanchez LM, Garg N, Peng Y, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol.* 2016;34(8):828-37.

10. Zatelli GA, Wanke T, A MG de, Kami SA, Lhullier C, Armstrong L, et al. Molecular networking prospection and characterization of terpenoids and C15-acetogenins in Brazilian seaweed extracts. RSC Adv. 2018;8(52):29654-61.
11. Zhou B nan, Baj NJ, Glass TE, Malone S, Werkhoven MCM, Troon F van, et al. Bioactive labdane diterpenoids from *Renalmia alpinia* collected in the Suriname rainforest. J Nat Prod. 1997;3864(97):1287-93.
12. Negrelle RRB. *Renalmia* L.F.: Aspectos botânicos, ecológicos, farmacológicos e agrônômicos. Rev Bras de Plantas Medicinai. 2015;17(2):274-90.
13. Jin S, Song C, Jia S, Li S, Zhang Y, Chen C, et al. An integrated strategy for establishment of curcuminoid profile in turmeric using two LC–MS/MS platforms. J Pharm Biomed Anal. 5 de enero de 2017;132:93-102.
14. Wei E, Chan C, Wong SK. Review Phytochemistry and pharmacology of ornamental gingers , *Hedychium coronarium* and *Alpinia purpurata* : a review. J Integr Med. 2015;13(6):368-79.
15. Fernandez G. Efecto citotóxico, antitumoral, antioxidante in vitro y antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de *Hesperomeles cuneata* Lindl. Y estructura química de sus flavonoides. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
16. Abreu AC, McBain AJ, Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. Nat Prod Rep. 2012;29(9):1007.
17. Olivon F, Grelier G, Roussi F, Litaudon M, Touboul D. MZmine 2 Data-Preprocessing to Enhance Molecular Networking Reliability. Anal Chem. 2017;89(15):7836-40.
18. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. Methods. 2007;42(4):325-9.
19. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its

- application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007;42(4):321-4.
20. Taylor T, Taylor E, Krings M. Flowering plants. En: *Paleobotany: The Biology and Evolution of Fossil Plants*. Segunda edición. San Diego: Academic Press; 2009. p. 873-997.
 21. Zingiberaceae [Internet]. [citado 28 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.gbif.org/species/4687>
 22. Tamokou J de D, Mbaveng AT, Kuete V. Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. En: *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. San Diego: Elsevier Inc.; 2017. p. 207-37.
 23. Fankam AG, Kuete V, Voukeng IK, Kuate JR, Pages JM. Antibacterial activities of selected Cameroonian spices and their synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant phenotypes. *BMC Complement Altern Med*. 2011;11(1):1-11.
 24. Bonetti F, Brombo G, Zuliani G. Nootropics, Functional Foods, and Dietary Patterns for Prevention of Cognitive Decline. En: *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*. Elsevier Inc.; 2017. p. 211-32.
 25. Cox KHM, Pipingas A, Scholey AB. Investigation of the effects of solid lipid curcumin on cognition and mood in a healthy older population. *J Psychopharmacol*. 2015;29(5):642-51.
 26. Changtam C, de Koning HP, Ibrahim H, Sajid MS, Gould MK, Suksamrarn A. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *Eur J Org Chem*. 2010;45(3):941-56.
 27. Gulati K, Rai N, Chaudhary S, Ray A. Nutraceuticals in respiratory disorders. En: *Nutraceuticals*. London: Academic Press; 2016. p. 75-86.
 28. Ram A, Balachandar S, Vijayananth P, Singh VP. Medicinal plants useful for treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Current status and future perspectives. *Fitoterapia*. 2011;82(2):141-51.
 29. Yano S, Terai M, Shimizu K, Futagami Y, Horie S, Tsuchiya S, et al. Antiallergic Activity of *Curcuma longa* (II) Features of inhibitory actions on histamine release from mast cells. *J Nat Med*. 2000;54(6):325-9.

30. Matsuda H, Tewtrakul S, Morikawa T, Nakamura A, Yoshikawa M. Anti-allergic principles from *Thai zedoary*: Structural requirements of curcuminoids for inhibition of degranulation and effect on the release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;12(22):5891-8.
31. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. *J Ethnopharmacol*. 2007;109(3):535-8.
32. The Plant List [Internet]. [citado 28 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=renealmia>
33. Renealmia [Internet]. [citado 28 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.gbif.org/species/9417473>
34. Yang SW, Zhou BN, Malone S, Werkhoven MCM, van Troon F, Wisse JH, et al. A new labdane diterpenoid from *Renealmia alpinia* collected in the Suriname rainforest. *J Nat Prod*. agosto de 1999;62(8):1173-4.
35. Taylor P, Maia JGS, Andrade EHA, Carreira LMM, Silva HL. Essential Oil Composition of *Renealmia alpinia* (Rottb .) Maas. *J Essent Oil Bear Pl*. 2007;10(1):10-4.
36. Kaplan MAC, Pugialli HRL, Lopes D, Gottlieb HE. The stereochemistry of ledol from *Renealmia chrysotrycha*: An NMR study. *Phytochemistry*. 2000;55(7):749-53.
37. Sekiguchi M, Shigemori H, Ohsaki A, Kobayashi J. Pacovatinins A-C, new labdane diterpenoids from the seeds of *Renealmia exaltata*. *J Nat Prod*. 2001;64(8):1102-6.
38. Sekiguchi M, Shigemori H, Ohsaki A, Kobayashi J. Renealtins A and B, new diarylheptanoids with a tetrahydrofuran ring from the seeds of *Renealmia exaltata*. *J Nat Prod*. 2002;65(3):375-6.
39. Gu J qiao, Park EJ, Vigo JS, Graham JG, Fong HHS, Pezzuto JM, et al. Activity-Guided Isolation of Constituents of *Renealmia nicolaioides* with the Potential to Induce the Phase II Enzyme Quinone Reductase. *J Nat Prod*. 2002;65(11):1616-20.

40. Jung EM, Lee YR. First concise total syntheses of biologically interesting nicolaioidesin C, crinatusin C-1, and crinatusin C-2. *Bull Korean Chem Soc.* 2008;29(6):1199-204.
41. Dan M, Sabulal B, George V, Pushpangadan P. Studies on the Rhizome Oils from Four *Hedychium* Species of South India : A Chemotaxonomic Approach. *Gard Bull Singapore.* 2007;59(1):57-64.
42. *Hedychium* J.Koenig [Internet]. [citado 11 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.gbif.org/species/2758595>
43. Joshi S, Chanotiya CS, Agarwal G, Prakash O, Pant AK, Mathela CS. Terpenoid compositions, and antioxidant and antimicrobial properties of the rhizome essential oils of different *Hedychium* species. *Chem Biodivers.* 2008;5(2):299-309.
44. Zhao Q, Qing C, Hao XJ, Han J, Zuo GY, Zou C, et al. Cytotoxicity of Labdane-Type Diterpenoids from *Hedychium forrestii*. *Chem Pharm Bull.* 2008;56(2):210-2.
45. Kumrit I, Suksamrarn A, Meepawpan P, Songsri S, Nuntawong N. Labdane-type diterpenes from *Hedychium gardnerianum* with potent cytotoxicity against human small cell lung cancer cells. *Phytother Res.* 2010;24(7):1009-13.
46. Abdo MY, Wan Ahmad WY, Din L bin, Ibrahim N. Phytochemical study of *Hedychium malayanum* (zingiberaceae). *Sains Malays.* 2017;46(1):83-9.
47. Hartati R, Suganda AG, Fidrianny I. Chemical composition and antimicrobial activity of diterpene and essential oils of *Hedychium roxburghii* blume rhizome. *Asian J Pharm Clin Res.* 2015;8(5):221-6.
48. Qing Z, Cheng Z, Qin Y, Shengding Z, Hongping H, Xiaojiang H. Cytotoxic Active Diterpenoids in Ginger Flowers. *Chem J Chin Univ.* 2012;33(6):1220-5.
49. Li Y, Zhao S, Zeng G, Xu J, Li Y, Tan N. A New Sesquiterpene from the Rhizomes of *Hedychium yunnanense*. *Chem Nat Compd.* 2016;52(6):1026-8.

50. Tropicos | Name - *Renealmia thyrsoides* (Ruiz & Pav.) Poepp. & Endl. subsp. *thyrsoides* [Internet]. [citado 15 de diciembre de 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/34500198>
51. Rivera, Paco Noriega; Paredes, Eryka Alejandra; Diaz Goméz E. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de los rizomas de *Renealmia thyrsoides* (Ruiz & Pav) Poepp. & Eddl (shiwanku muyu). Rev Cuba de Plantas Medicinales. 2017;22(2).
52. *Renealmia thyrsoides* Poepp. & Endl. [Internet]. [citado 13 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.gbif.org/species/5302666>
53. Almeida G, Suarez S. Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial del rizoma de *Renealmia thyrsoides* subsp. *thyrsoides* (Zingiberaceae). [Quito]: Universidad Politécnica Salesiana; 2014.
54. Tropicos | Name - *Hedychium coronarium* var. *elwesii* (Baker) Naik [Internet]. [citado 19 de diciembre de 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/100201771>
55. *Hedychium coronarium* J.Koenig — The Plant List [Internet]. [citado 19 de diciembre de 2018]. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-248115>
56. Pachurekar P, Dixit AK. A Review on Pharmacognostical Phytochemical and Ethnomedicinal Properties of *Hedychium Coronarium* J . Koenig an Endangered Medicine. J Chin Med. 2017;1(2):49-61.
57. Suresh G, Reddy PP, Babu KS, Basha T, Vardhan S. Two new cytotoxic labdane diterpenes from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. Bioorg Med Chem Lett. 2010;20(24):7544-8.
58. *Hedychium coronarium* J.Koenig [Internet]. [citado 19 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.gbif.org/species/7883492>
59. Sayeed M, Mallappa A, Swamy K. Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements. Vol. 2. Singapur: Springer Nature Singapore; 2018.

60. Aziz MA, Habib MR, Karim MR. Antibacterial and Cytotoxic Activities of *Hedychium coronarium* J. Koenig. Res J Agric & Biol Sci. 2009;5(6):969-72.
61. Chimnoi N, Sarasuk C, Khunnawutmanotham N, Intachote P, Seangsai S, Saimanee B, et al. Phytochemical reinvestigation of labdane-type diterpenes and their cytotoxicity from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. Phytochem Lett. 2009;2(4):184-7.
62. Reuk-Ngam N, Chimnoi N, Khunnawutmanotham N, Techasakul S. Antimicrobial activity of coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. BioMed Res Int. 2014;2014.
63. Zhan ZJ, Wen YT, Ren FY, Rao GW, Shan WG, Li CP. Diterpenoids and a Diarylheptanoid from *Hedychium coronarium* with Significant Anti-Angiogenic and Cytotoxic Activities. Chem Biodivers. 2012;9(12):2754-60.
64. van Kiem P, le Tuan Anh H, Xuan Nhiem N, van Minh C, Thi Kim Thuy N, Hai Yen P, et al. Labdane-Type Diterpenoids from the Rhizomes of *Hedychium coronarium* Inhibit Lipopolysaccharide-Stimulated Production of Pro-inflammatory Cytokines in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. Chem Pharm Bull. 2012;60(2):246-50.
65. Firn RD, Jones CG. Natural products - A simple model to explain chemical diversity. Nat Prod Rep. agosto de 2003;20(4):382-91.
66. Demetzos C, Dimas KS. Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. Stud Nat Prod Chem. 2001;25:235-92.
67. Papaefthimiou D, Papanikolaou A, Falara V, Givanoudi S, Kostas S, Kanellis AK. Genus *Cistus*: A model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. Front Chem. 2014;2(35).
68. Katsuyama Y, Kita T, Funa N, Horinouchi S. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. J Biol Chem. 2009;284(17):11160-70.

69. Fowler ZL, Koffas MAG. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;83(5):799-808.
70. Cynthia Fernández-Lainez QFB, Marcela Vela-Amieva D, En M, Ibarra-González I. Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatr de Mex.* 2009;30(5):258-63.
71. Jiang H, Somogyi Á, Jacobsen NE, Timmermann BN, Gang DR. Analysis of curcuminoids by positive and negative electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(6):1001-12.
72. Itokawa H, Morita H, Takeya K, Motidome M. Diterpenes from Rhizomes of *Hedychium coronarium*. *Chem Pharm Bull.* 1988;36(7):2682-4.
73. Azemard C, Menager M, Vieillescazes C. Analysis of diterpenic compounds by GC-MS/MS: contribution to the identification of main conifer resins. *Anal Bioanal Chem.* 1 de septiembre de 2016;408(24):6599-612.
74. Aguiar GP, Crevelin EJ, Dias HJ, Ambrósio SR, Bastos JK, Heleno VCG, et al. Electrospray ionization tandem mass spectrometry of labdane-type acid diterpenes. *J Mass Spectrom.* 1 de noviembre de 2018;53(11):1086-96.
75. Balza F, Grins WJ, Bohm BA, Towers GHN. Mass spectrometry in the differentiation of flavanones and dihydroflavonols. *Phytochemistry.* 1988;27(8):2715-7.
76. Xu F, Liu Y, Zhang Z, Yang C, Tian Y. Quasi-MSⁿ identification of flavanone 7-glycoside isomers in Da Chengqi Tang by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Med.* 24 de julio de 2009;4(1):1-10.
77. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics.* 2001;2(3):155-68.

78. López-Cobo A, Gómez-Caravaca AM, Cerretani L, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Distribution of phenolic compounds and other polar compounds in the tuber of *Solanum tuberosum* L. by HPLC-DAD-q-TOF and study of their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1 de noviembre de 2014;36(1-2):1-11.
79. Yang JY, Sanchez LM, Rath CM, Liu X, Boudreau PD, Bruns N, et al. Molecular Networking as a dereplication strategy. *J Nat Prod*. 2013;76(9):1686-99.
80. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*. 1 de junio de 2016;38(6):1015-9.
81. La ruta para investigar la biodiversidad de flora y fauna silvestre fuera de áreas naturales protegidas - Informes y publicaciones - Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - Gobierno del Perú [Internet]. [citado 15 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/serfor/informes-publicaciones/1124195-la-ruta-para-investigar-la-biodiversidad-de-flora-y-fauna-silvestre-fuera-de-areas-naturales-protegidas>
82. Avery VM, Camp D, Carroll AR, Jenkins ID, Quinn RJ. 3.07 The Identification of Bioactive Natural Products by High Throughput Screening (HTS). En: *Comprehensive Natural Products II*. 2010. p. 177-203.
83. Definición de antimicrobiano - Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. [citado 14 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/antimicrobiano>
84. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48:5-16.
85. Ambientum Portal Lider Medioambiente [Internet]. [citado 14 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.ambientum.com/diccionario-de-terminos-medioambientales-letra/f>

86. Teunissen CE, Verheul C, Willems EAJ. The use of cerebrospinal fluid in biomarker studies. *Handb Clin Neurol*. 2018;146:3-20.
87. Romanova E, Annangudi S, Tai HC, Sweedler J. Mass spectrometry of proteins. En: *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. Elsevier Science Ltd.; 2016. p. 681-7.
88. Toyomasu T, Sassa T. 1.17 Diterpenes. En: *Comprehensive Natural Products II*. Kidlington: Elsevier; 2010. p. 643-72.
89. Subramani P, Panati K, Lebaka V, Reddy D, Narala V. Nanostructures for Curcumin Delivery: Possibilities and Challenges. En: *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication*. Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 393-418.
90. Quave CL, Plano LRW, Pantuso T, Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 13 de agosto de 2008;118(3):418-28.
91. Yoshimatsu K, Zhu S, Komatsu K. MS/MS similarity networking accelerated target profiling of triterpene saponins in *Eleutherococcus senticosus* leaves. *Food Chem*. 15 de julio de 2017;227:444-52.
92. Ruiz JR, Roque M, Salazar ME, Gamarra G, Arias GC, Whu DY, et al. Actividad antiestafilocócica y antibiopelícula de los extractos de *Juglans neotropica* DIELS, *Piper lineatum* Ruíz & Pav. y *Terminalia catappa* L. *Cienc Invest*. 2013;16(1):32-7.
93. Cabanillas B, Espichán F, Estrada R, Neyra E, Rojas R. Metabolomic profile and discrimination of white quinoa seeds from Peru based on UHPLC-HRMS and multivariate analysis. *J Cereal Sci*. 1 de septiembre de 2021;101.
94. Remy S, Solis D, Silland P, Neyts J, Roussi F, Touboul D, et al. Isolation of phenanthrenes and identification of phorbol ester derivatives as potential anti-CHIKV agents using FBMN and NAP from *Sagotia racemosa*. *Phytochemistry*. 1 de noviembre de 2019;167.
95. Ruiz J, Roque M, Salazar M, Gamarra G. Actividad antiestafilocócica y antibiopelícula de los extractos de *Juglans neotropica* DIELS, *Piper*

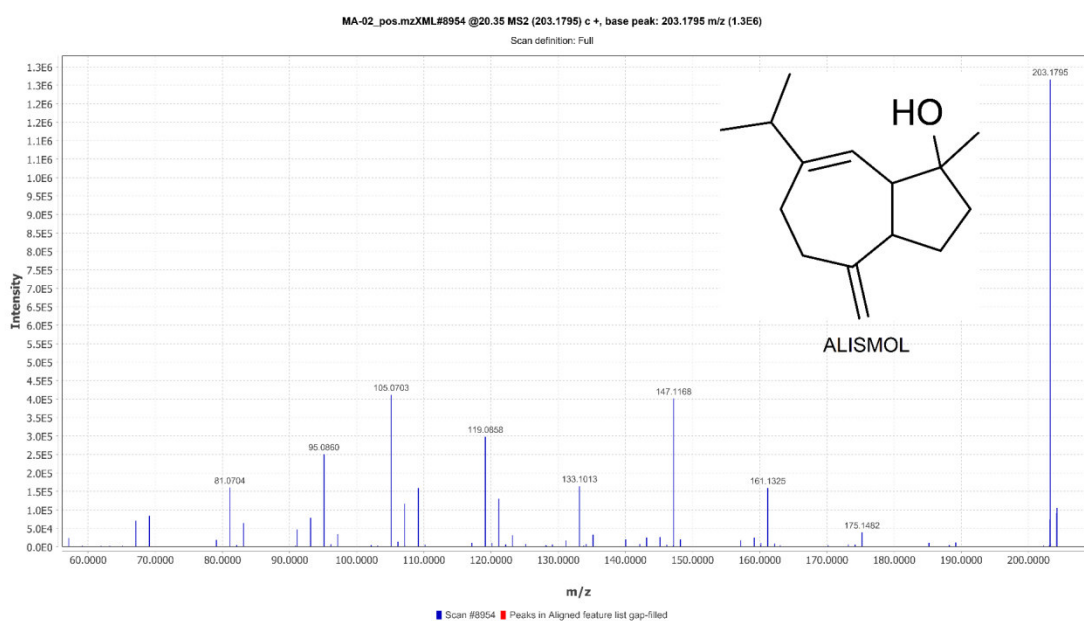
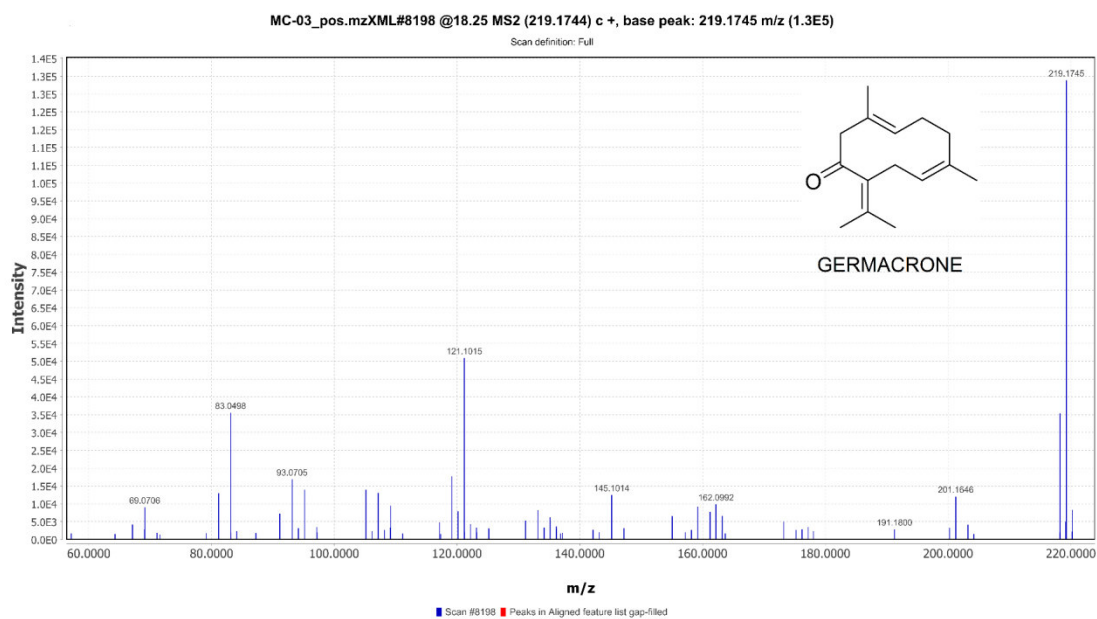
- lineatum* RUIZ&PAV. Y *Terminalia catappa* L. Cienc Investig. 2013;16(1):32-7.
96. Chen J jung, Ting C wei, Wu Y chin, Hwang T long, Cheng M jen. New Labdane-Type Diterpenoids and Anti-Inflammatory Constituents from *Hedychium coronarium*. 2013;0067:13063-77.
 97. Chen L, Liu Y, Jia D, Yang J, Zhao J, Chen C, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of aurantiamide and aurantiamide acetate in rats after oral administration of portulaca oleracea L. extracts. J Agric Food Chem. 4 de mayo de 2016;64(17):3445-55.
 98. Zhou B, Yang Z, Feng Q, Liang X, Li J, Zanin M, et al. Aurantiamide acetate from *Baphicacanthus cusia* root exhibits anti-inflammatory and anti-viral effects via inhibition of the NF-κB signaling pathway in Influenza A virus-infected cells. J Ethnopharmacol. 6 de marzo de 2017;199:60-7.
 99. Yoon CS, Kim DC, Lee DS, Kim KS, Ko W, Sohn JH, et al. Anti-neuroinflammatory effect of aurantiamide acetate from the marine fungus *Aspergillus* sp. SF-5921: Inhibition of NF-κB and MAPK pathways in lipopolysaccharide-induced mouse BV2 microglial cells. Int Immunopharmacol. 2014;23(2):568-74.
 100. Yamaham J, Kobayashi G, Iwamoto M, Matsuda H, Fujimura H. The Effect of Alismol Isolated from *Alisma tis* Rhizoma on Experimental Hypertensive Models in Rats. Phytother Res. 1989;3(2):57-60.
 101. Shi D, Song X, Guo Y, Xu J, Liu Y, Zhang J, et al. Alismol, a Sesquiterpenoid Isolated from *Vladimiria souliei*, Suppresses Proinflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-Stimulated Microglia. J Mol Neurosci. 1 de mayo de 2017;62(1):106-13.
 102. Oshima Y, Iwakawa T, Hikino H. Alismol and alismoxide, sesquiterpenoids of *Alisma* rhizomes. Phytochemistry. 1983;22(1):183-5.
 103. Riaz A, Rasul A, Kanwal N, Hussain G. Germacrone: A potent secondary metabolite with therapeutic potential in metabolic diseases, cancer and viral infections. Curr Drug Metab. 2020;21(14):1079-90.

104. Zhang R, Pan T, Xiang Y, Zhang M, Xie H, Liang Z, et al. Curcumenol triggered ferroptosis in lung cancer cells via lncRNA H19/miR-19b-3p/FTH1 axis. *Bioact Mater.* 1 de julio de 2022;13:23-36.
105. Zhang J, Su G, Tang Z, Wang L, Fu W, Zhao S, et al. Curcumol exerts anticancer effect in cholangiocarcinoma cells via down-regulating CDKL3. *Front Physiol.* 20 de marzo de 2018;9:234.
106. Roth GN, Chandra A, Nair MG. Novel Bioactivities of *Curcuma longa* Constituents. *J Nat Prod.* 1997;61:542-5.
107. Chimnoi N, Sarasuk C, Khunnawutmanotham N, Intachote P, Seangsai S, Saimanee B, et al. Phytochemical reinvestigation of labdane-type diterpenes and their cytotoxicity from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. *Phytochem Lett.* 19 de noviembre de 2009;2(4):184-7.
108. van Kiem P, le Tuan Anh H, Xuan Nhiem N, van Minh C, Thi Kim Thuy N, Hai Yen P, et al. Labdane-Type Diterpenoids from the Rhizomes of *Hedychium coronarium* Inhibit Lipopolysaccharide-Stimulated Production of Pro-inflammatory Cytokines in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *Chem Pharm Bull.* 2012;60(2):246-50.
109. Chen JJ, Ting CW, Wu YC, Hwang TL, Cheng MJ, Sung PJ, et al. New Labdane-type diterpenoids and anti-inflammatory constituents from *Hedychium coronarium*. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):13063-77.
110. Zhan ZJ, Wen YT, Ren FY, Rao GW, Shan WG, Li CP. Diterpenoids and a Diarylheptanoid from *Hedychium coronarium* with Significant Anti-Angiogenic and Cytotoxic Activities. *Chem Biodivers.* 2012;9(12):2754-60.
111. Ho JC. Antimicrobial, Mosquito Larvicidal and Antioxidant Properties of the Leaf and Rhizome of *Hedychium coronarium*. *J Chin Chem Soc.* 2011;58(4):563-7.
112. Silva AC da, Santos PD de F, Silva JT do P, Leimann FV, Bracht L, Gonçalves OH. Impact of curcumin nanoformulation on its antimicrobial activity. *Trends Food Sci Technol.* 1 de febrero de 2018;72:74-82.
113. Kaur S, Modi NH, Panda D, Roy N. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ - A structural insight to unveil

- antibacterial activity of curcumin. *Eur J Org Chem.* septiembre de 2010;45(9):4209-14.
114. Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: An attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem J.* 15 de febrero de 2008;410(1):147-55.
 115. Reuk-Ngam N, Chimnoi N, Khunnawutmanotham N, Techasakul S. Antimicrobial activity of coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. *BioMed Res Int.* 2014;2014:1-8.
 116. Saha P, Rahman FI, Hussain F, Rahman SMA, Rahman MM. Antimicrobial Diterpenes: Recent Development From Natural Sources. *Front Pharmacol.* 28 de febrero de 2022;12.
 117. Singh RP, Jain DA. Evaluation of antimicrobial activity of curcuminoids isolated from turmeric. *Int J of Pharm & Life Sci (IJPLS).* 2012;3(1):1368-76.

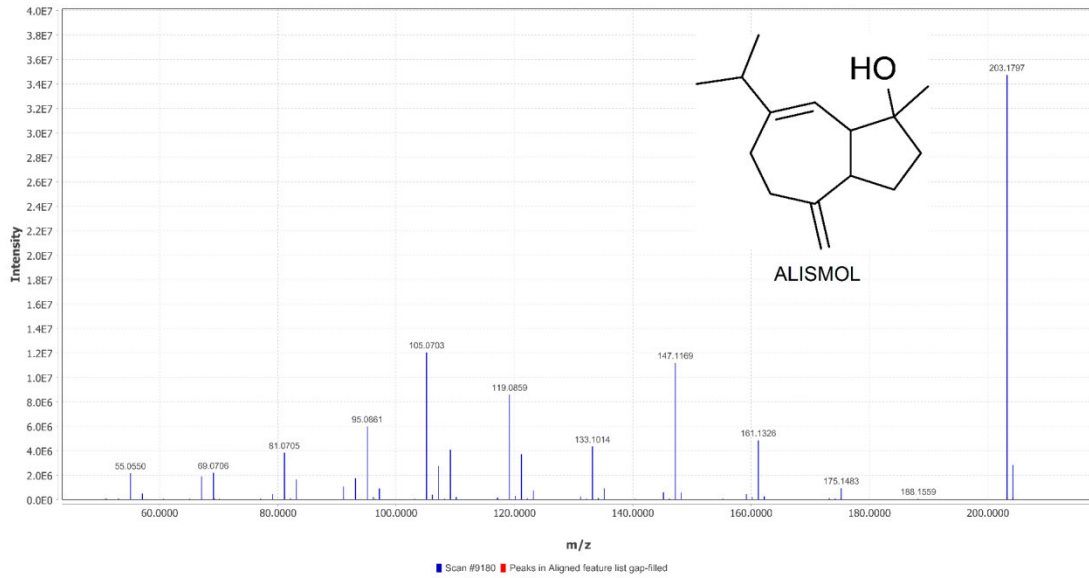
IX. ANEXOS

Anexo 1: Espectro de masas de las moléculas desreplicadas en el presente estudio



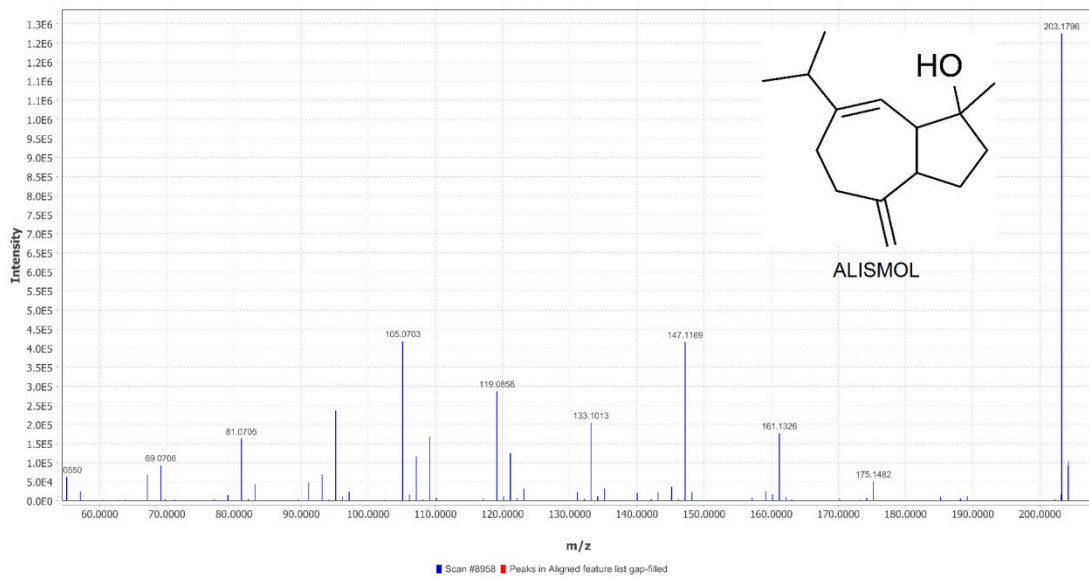
MC-03_pos.mzXML#9180 @20.35 MS2 (203.1795) c +, base peak: 203.1797 m/z (3.5E7)

Scan definition: Full



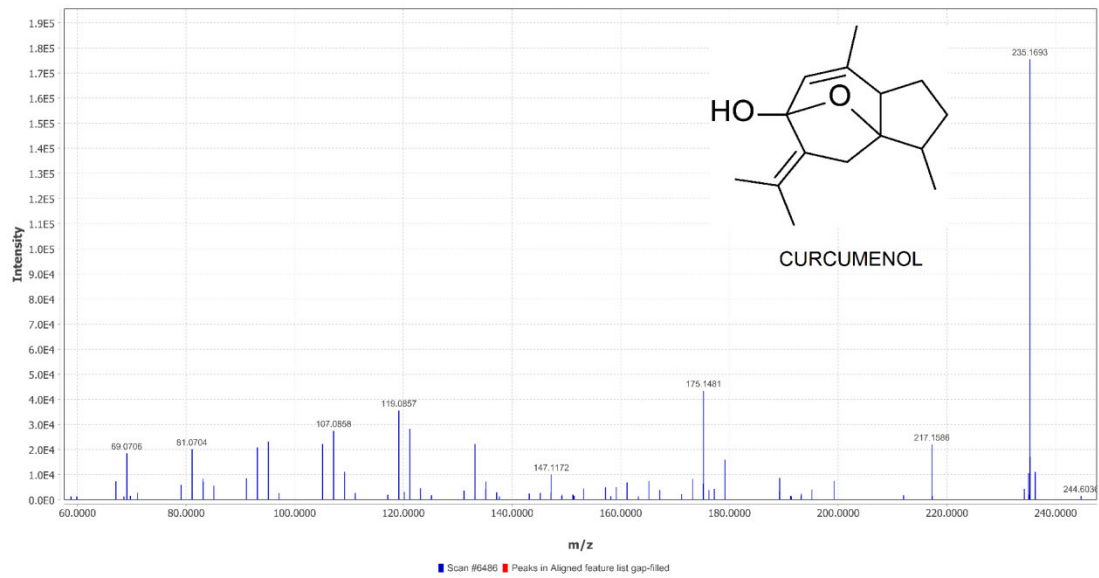
MD-01_pos.mzXML#8958 @20.36 MS2 (203.1795) c +, base peak: 203.1796 m/z (1.2E6)

Scan definition: Full



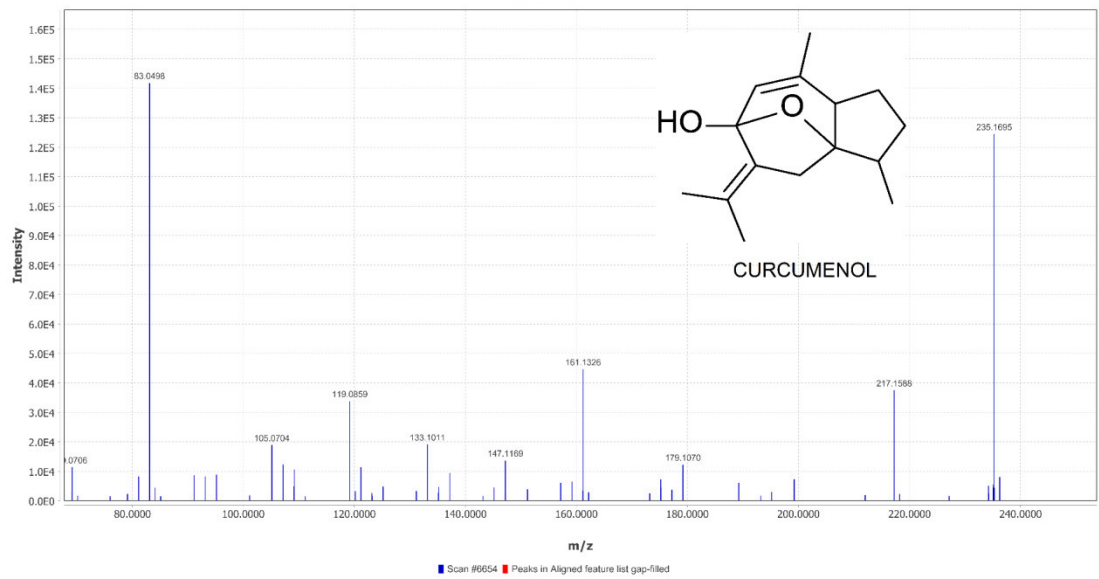
MA-02_pos.mzXML#6486 @14.94 MS2 (235.1692) c +, base peak: 235.1693 m/z (1.8E5)

Scan definition: Full



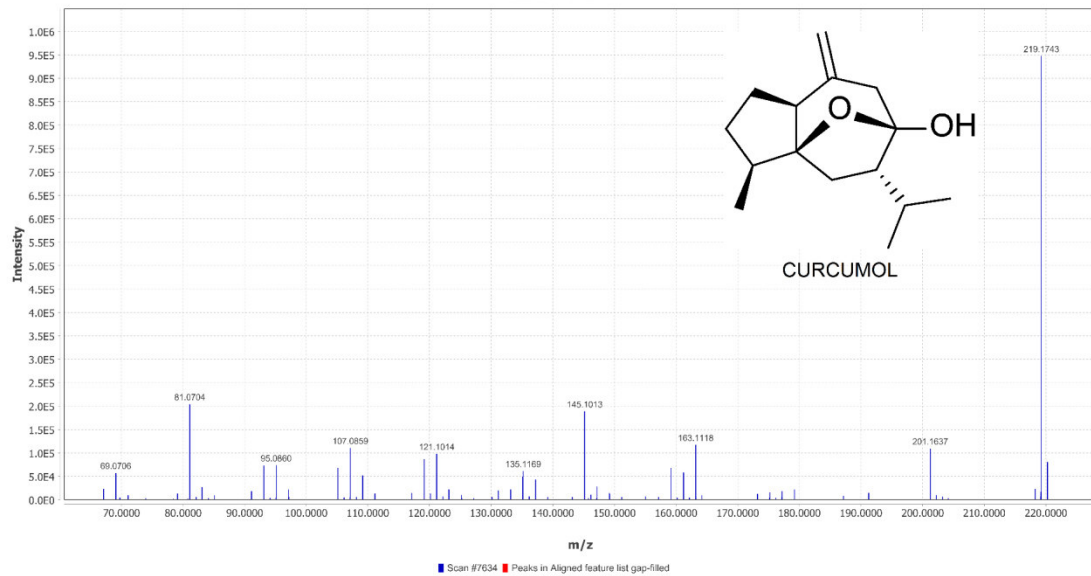
MC-03_pos.mzXML#6654 @14.97 MS2 (235.1693) c +, base peak: 83.0498 m/z (1.4E5)

Scan definition: Full



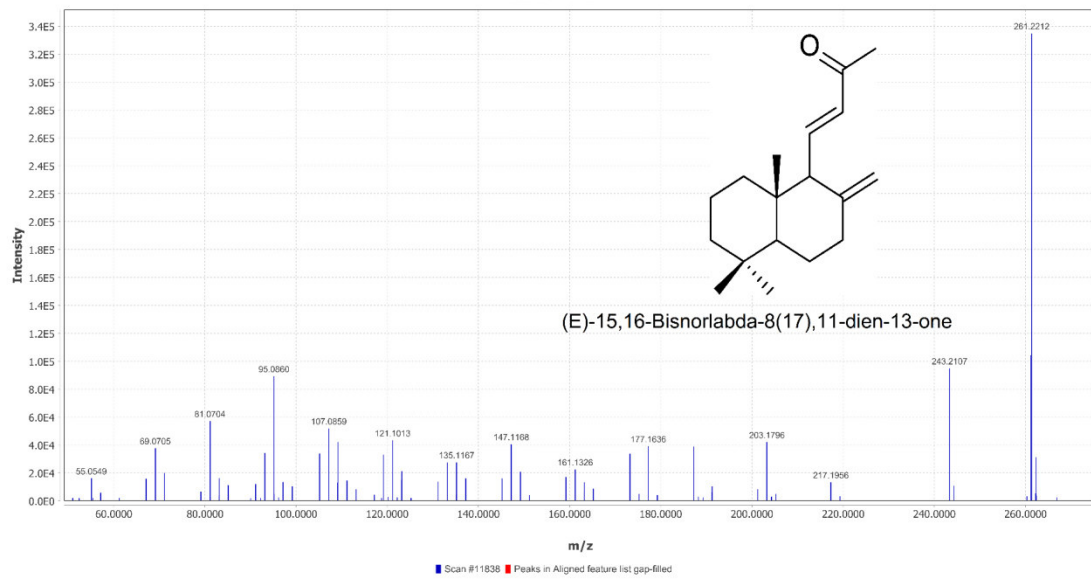
MC-03_pos.mzXML#7634 @17.01 MS2 (219.1744) c +, base peak: 219.1743 m/z (9.5E5)

Scan definition: Full



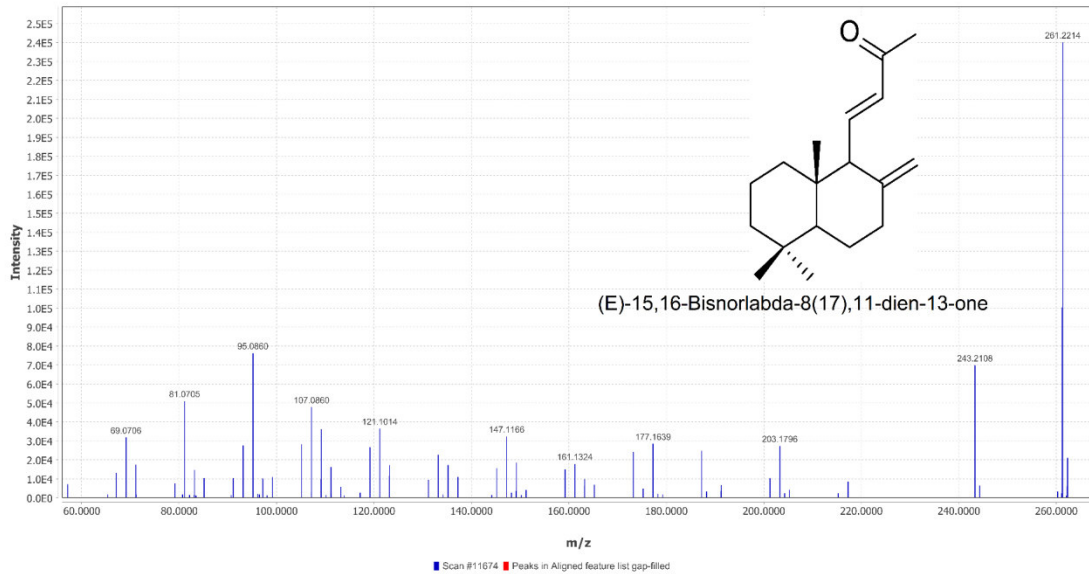
MA-02_pos.mzXML#11838 @26.50 MS2 (261.2211) c +, base peak: 261.2212 m/z (3.3E5)

Scan definition: Full



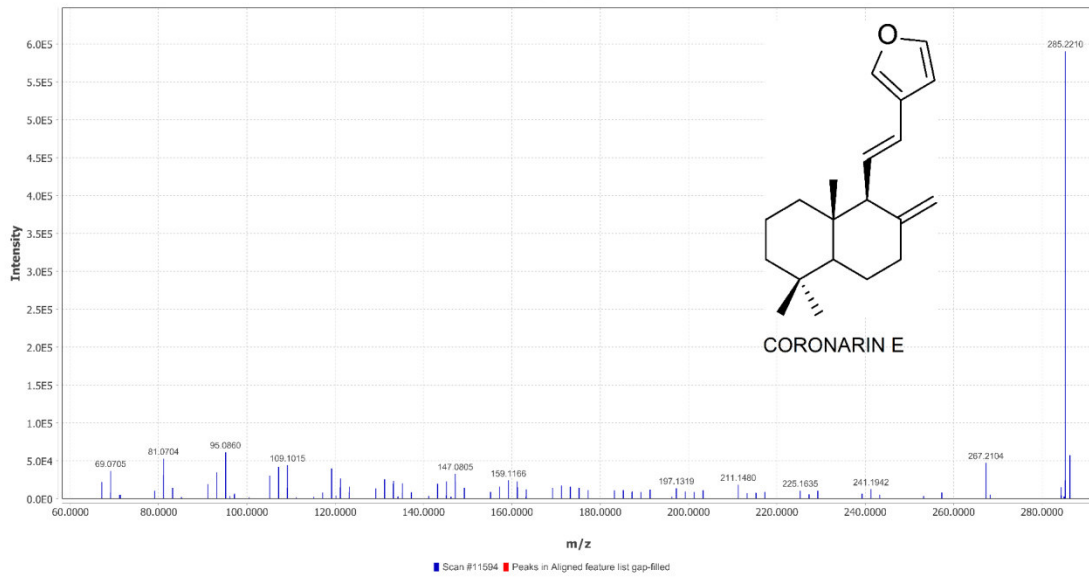
MD-01_pos.mzXML#11674 @26.51 MS2 (261.2213) c +, base peak: 261.2214 m/z (2.4E5)

Scan definition: Full



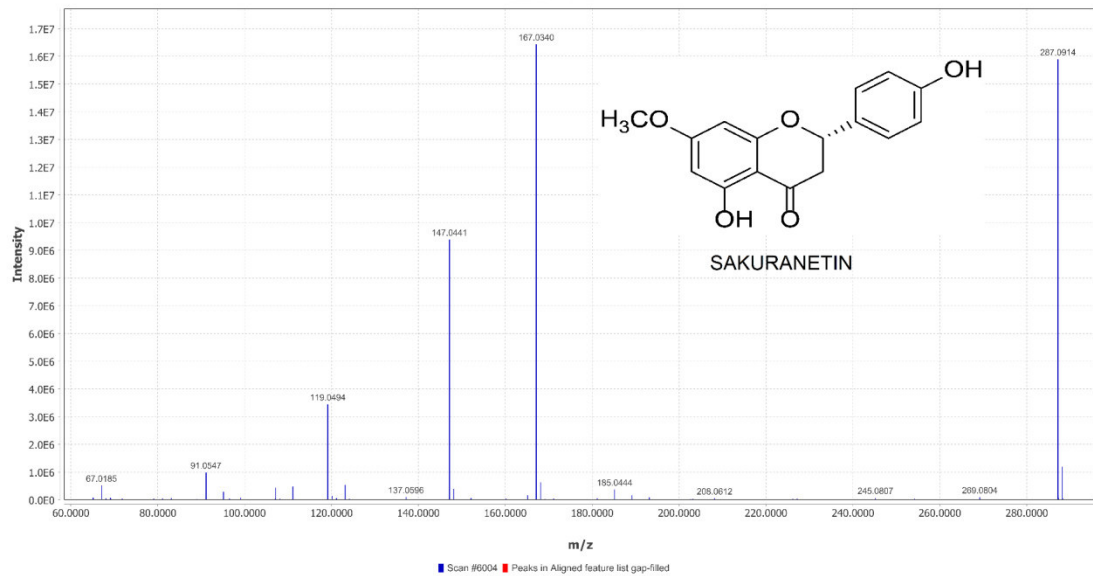
MA-02_pos.mzXML#11594 @25.96 MS2 (285.2210) c +, base peak: 285.2210 m/z (5.9E5)

Scan definition: Full



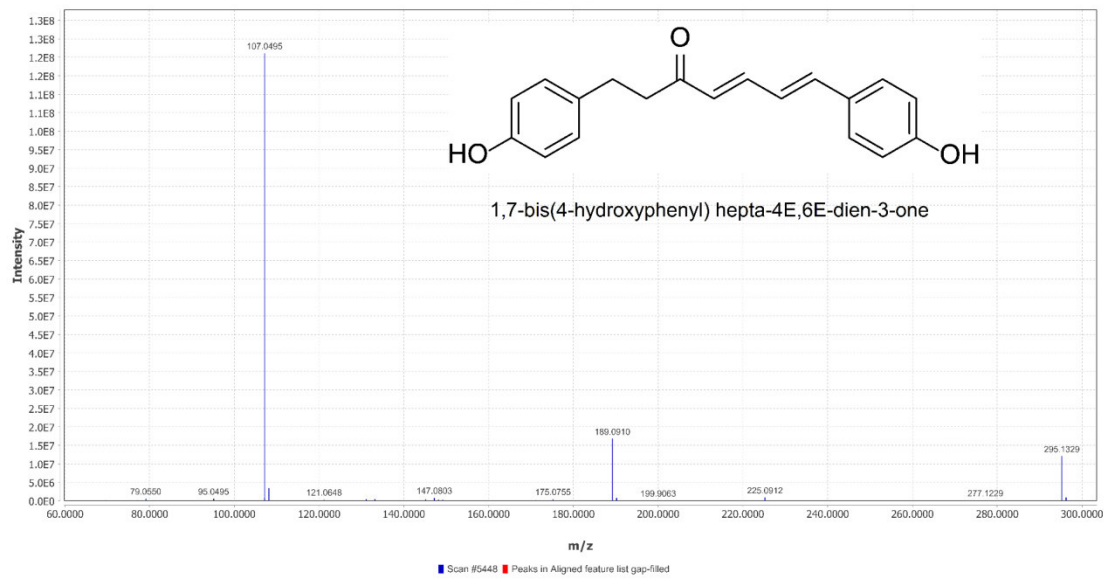
MD-01_pos.mzXML#6004 @13.83 MS2 (287.0913) c +, base peak: 167.0340 m/z (1.6E7)

Scan definition: Full



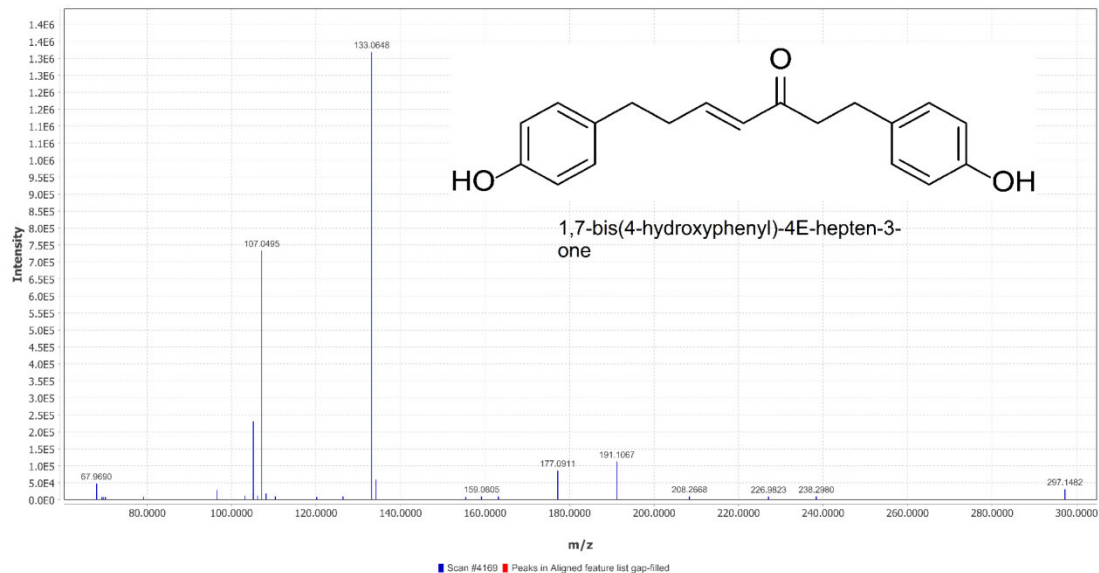
MD-01_pos.mzXML#5448 @12.60 MS2 (295.1327) c +, base peak: 107.0495 m/z (1.2E8)

Scan definition: Full



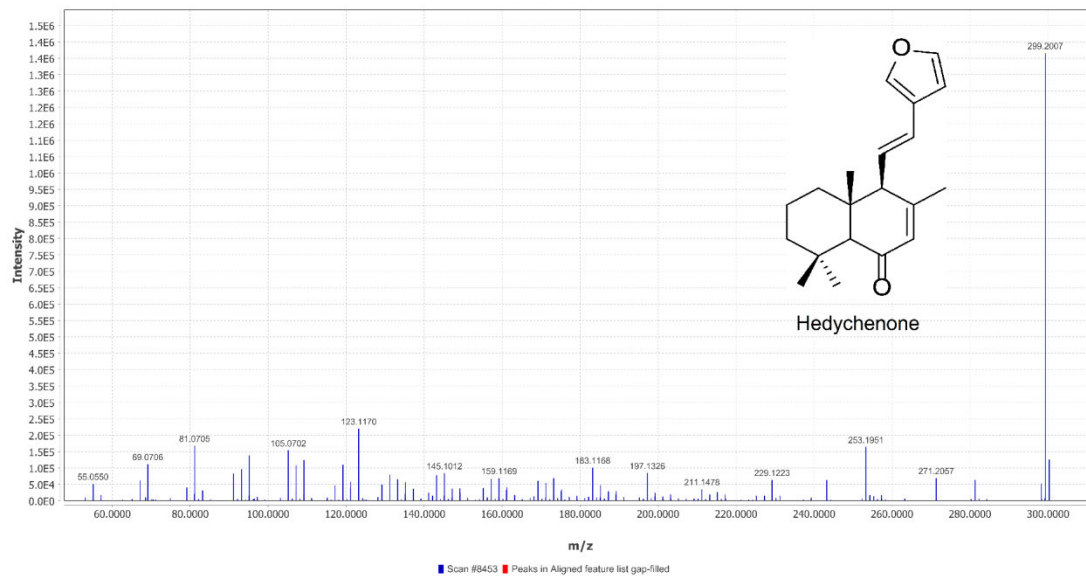
MD-01_pos.mzXML#4169 @9.73 MS2 (297.1484) c +, base peak: 133.0648 m/z (1.3E6)

Scan definition: Full



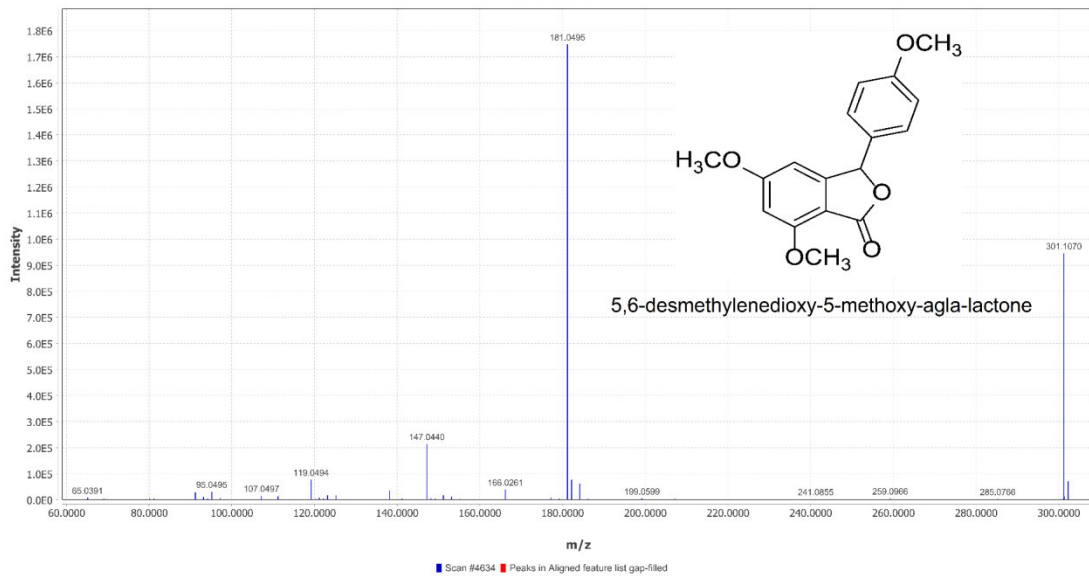
MA-02_pos.mzXML#8453 @19.28 MS2 (299.2004) c +, base peak: 299.2007 m/z (1.4E6)

Scan definition: Full



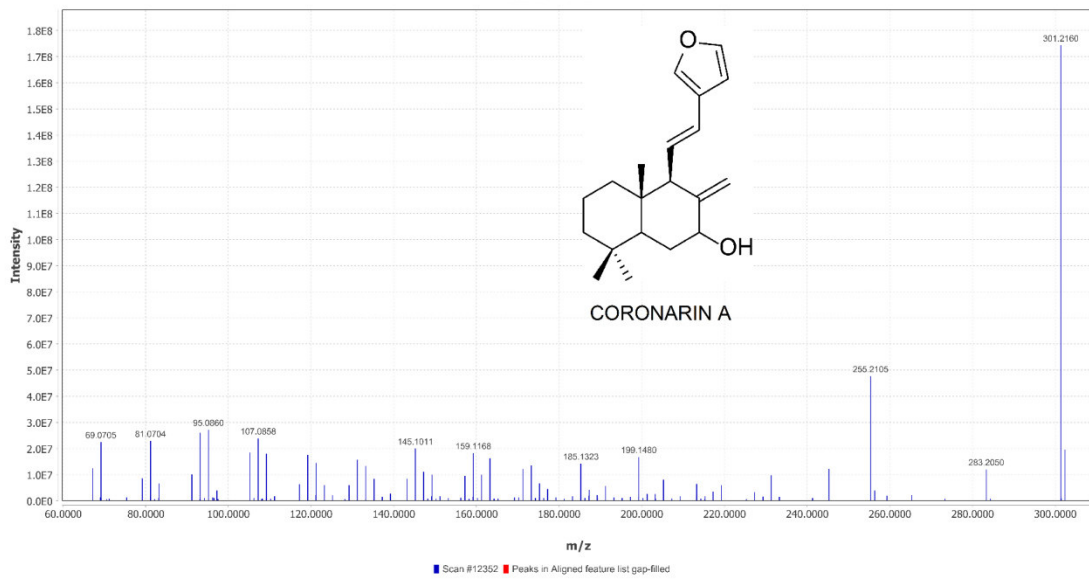
MD-01_pos.mzXML#4634 @10.77 MS2 (301.1070) c +, base peak: 181.0495 m/z (1.7E6)

Scan definition: Full



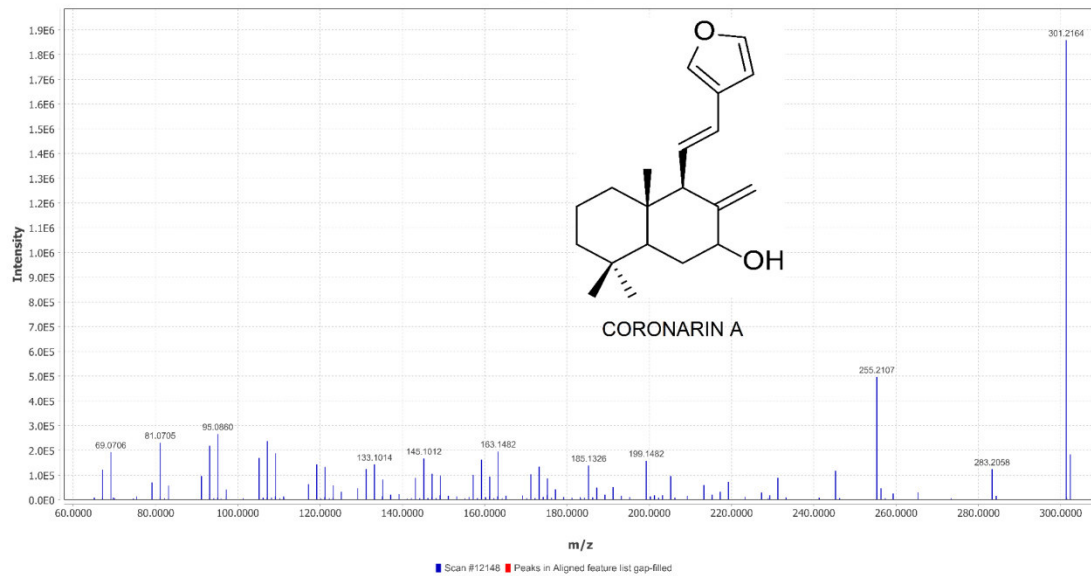
MA-02_pos.mzXML#12352 @27.59 MS2 (301.2158) c +, base peak: 301.2160 m/z (1.7E8)

Scan definition: Full



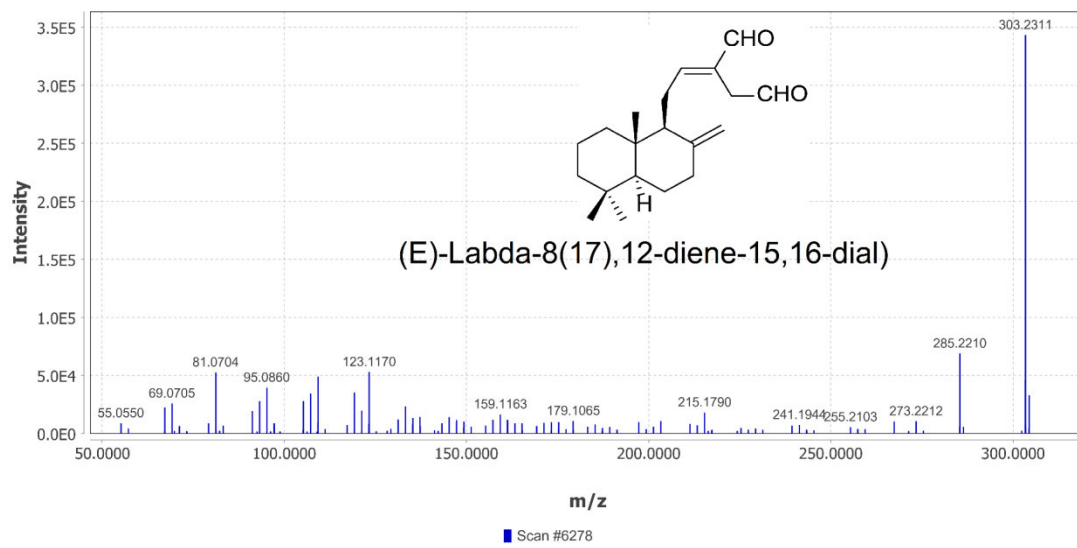
MD-01_pos.mzXML#12148 @27.59 MS2 (301.2162) c +, base peak: 301.2164 m/z (1.9E6)

Scan definition: Full



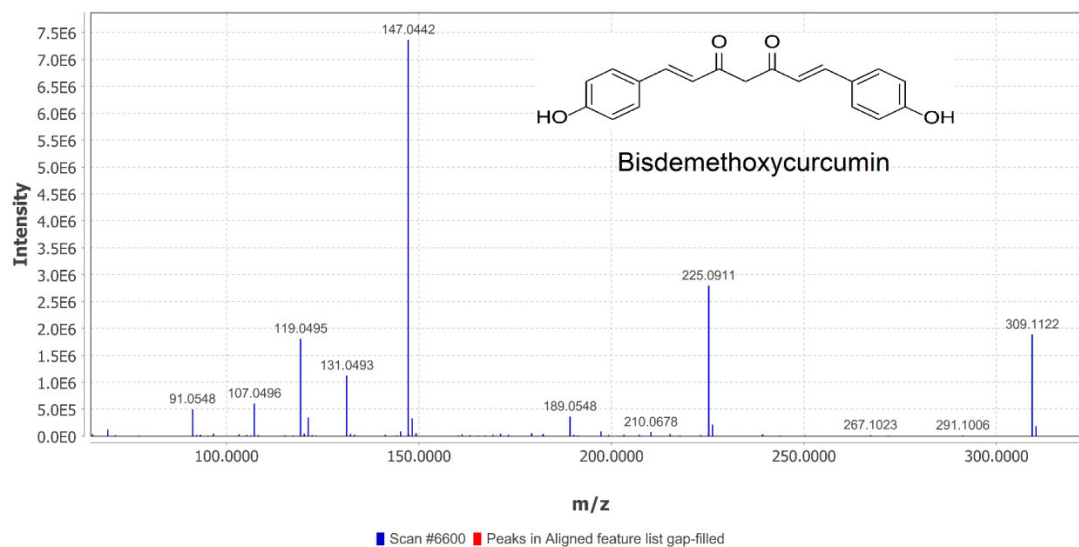
MA-02_pos.mzXML#6278 @14.47 MS2 (303.2317) c +, base peak: 303.2311 m/z (3.4E5)

Scan definition: Full



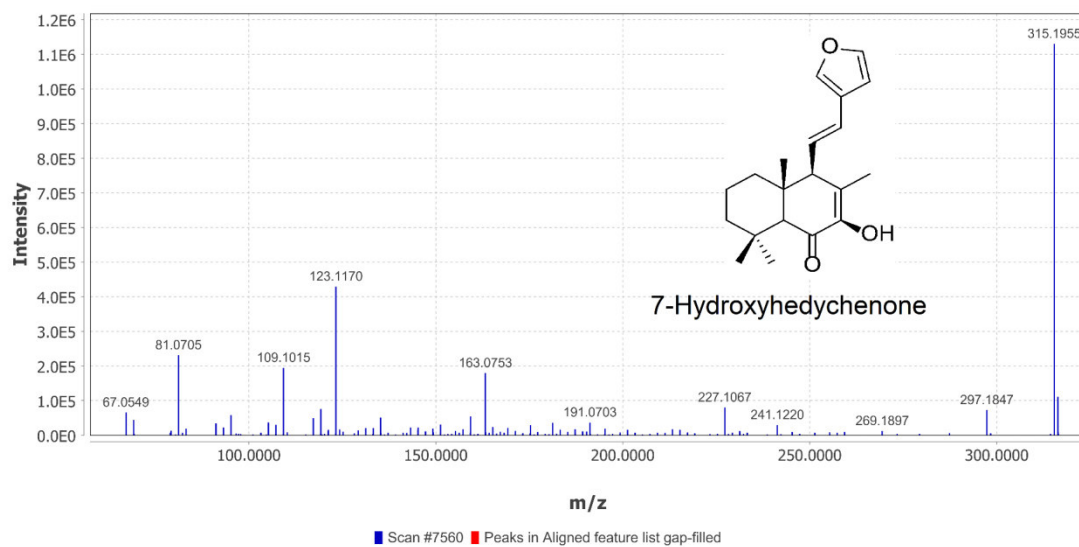
MC-03_pos.mzXML#6600 @14.85 MS2 (309.1122) c +, base peak: 147.0442 m/z (7.4E6)

Scan definition: Full



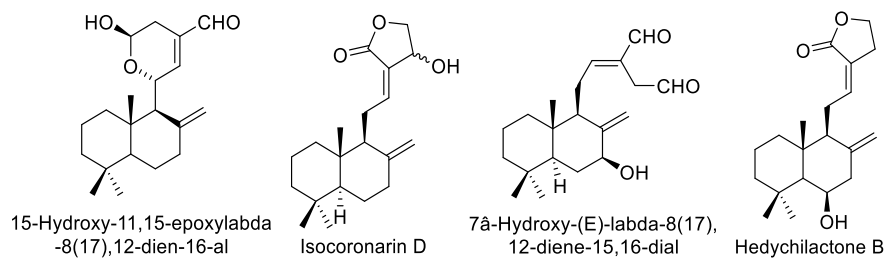
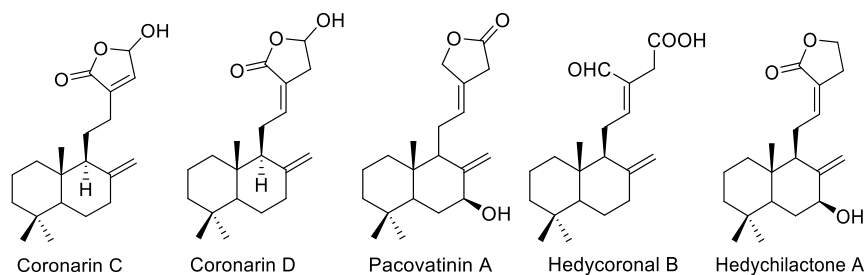
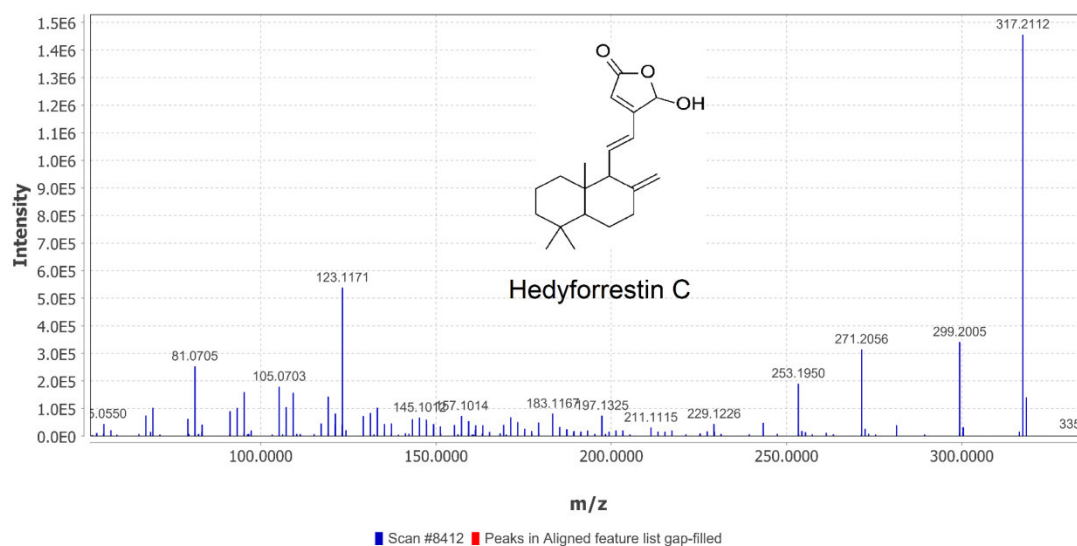
MA-02_pos.mzXML#7560 @17.31 MS2 (315.1955) c +, base peak: 315.1955 m/z (1.1E6)

Scan definition: Full

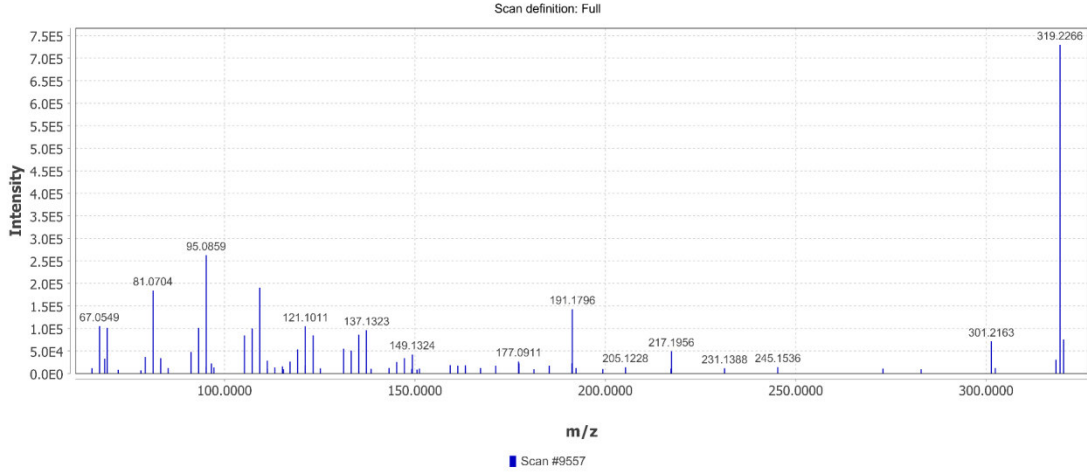


MA-02_pos.mzXML#8412 @19.19 MS2 (317.2111) c +, base peak: 317.2112 m/z (1.5E6)

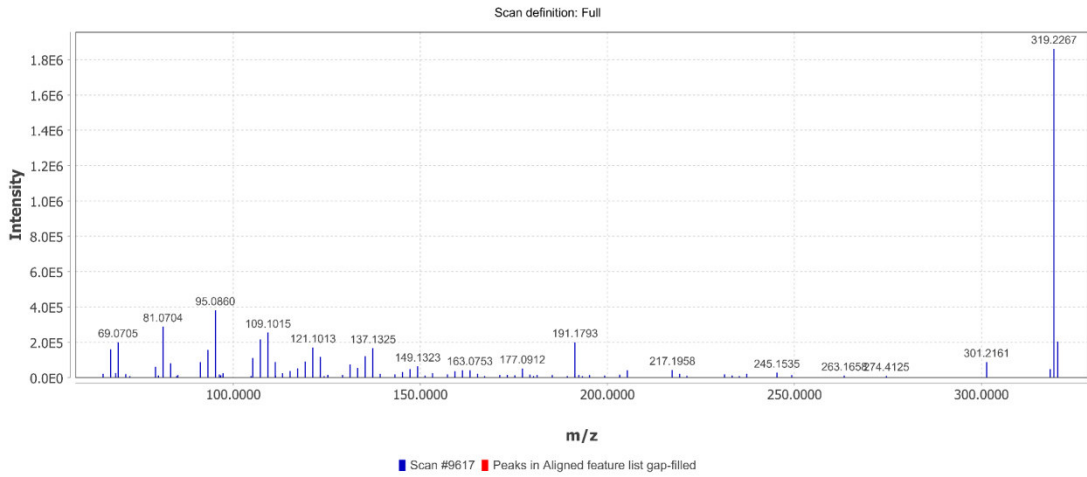
Scan definition: Full



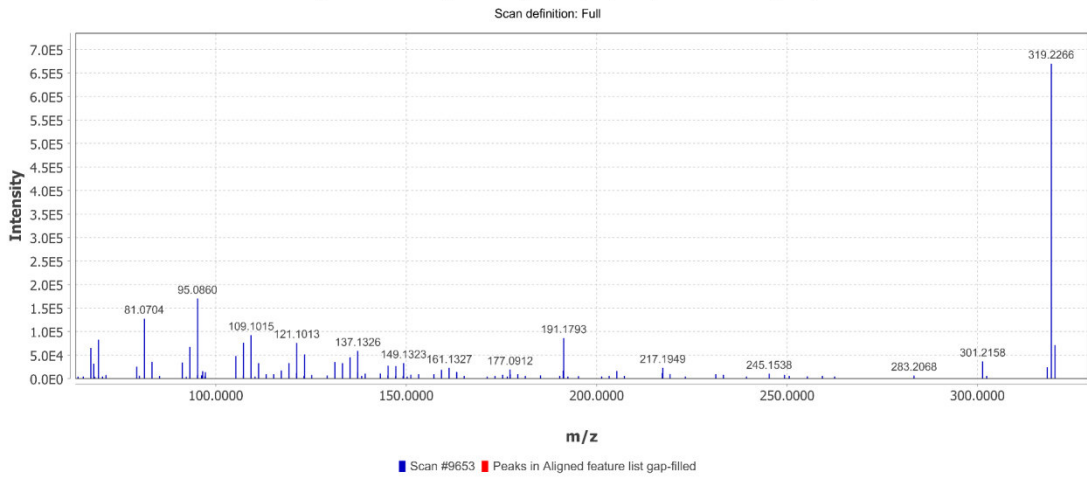
MA-02_pos.mzXML#9557 @21.63 MS2 (319.2267) c +, base peak: 319.2266 m/z (7.3E5)



MA-02_pos.mzXML#9617 @21.75 MS2 (319.2266) c +, base peak: 319.2267 m/z (1.9E6)

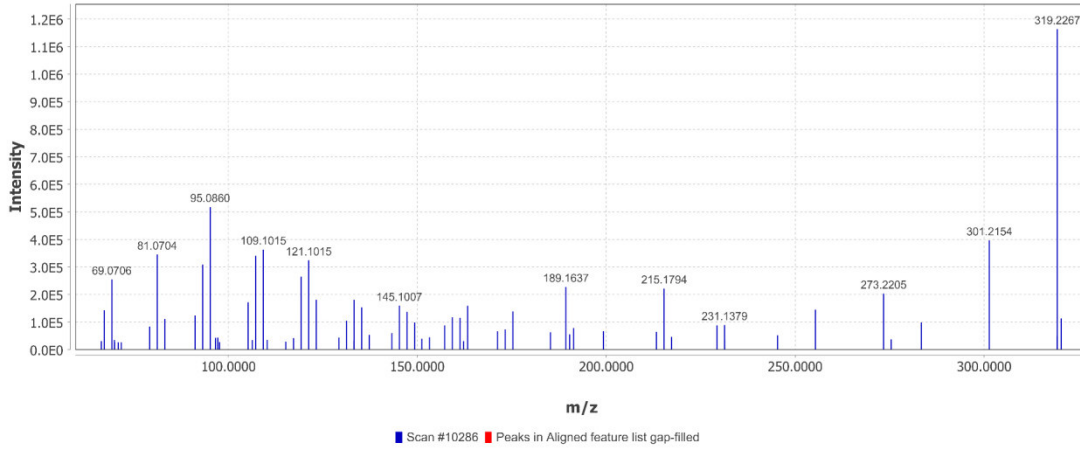


MA-02_pos.mzXML#9653 @21.83 MS2 (319.2266) c +, base peak: 319.2266 m/z (6.7E5)



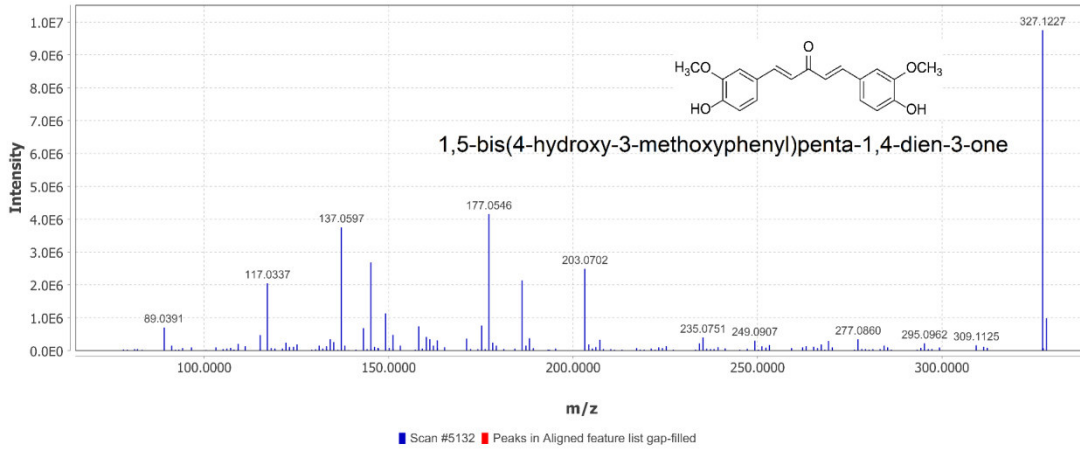
MA-02_pos.mzXML#10286 @23.16 MS2 (319.2265) c +, base peak: 319.2267 m/z (1.2E6)

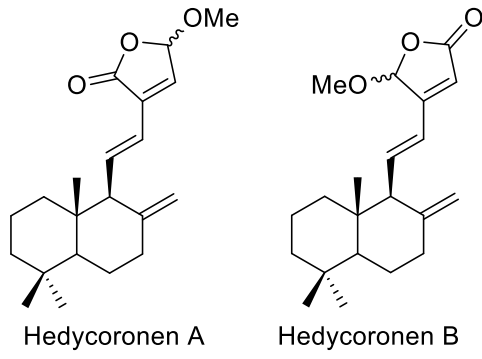
Scan definition: Full



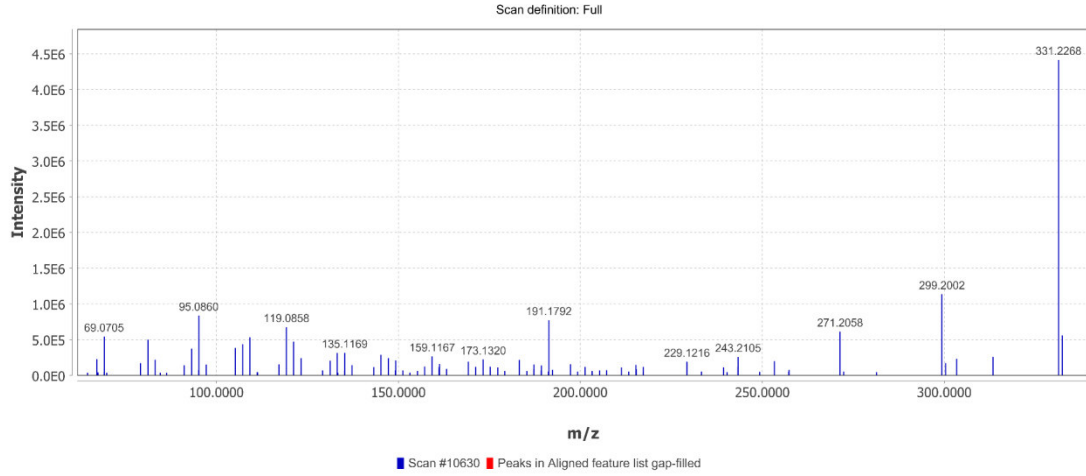
MC-03_pos.mzXML#5132 @11.75 MS2 (327.1227) c +, base peak: 327.1227 m/z (9.8E6)

Scan definition: Full

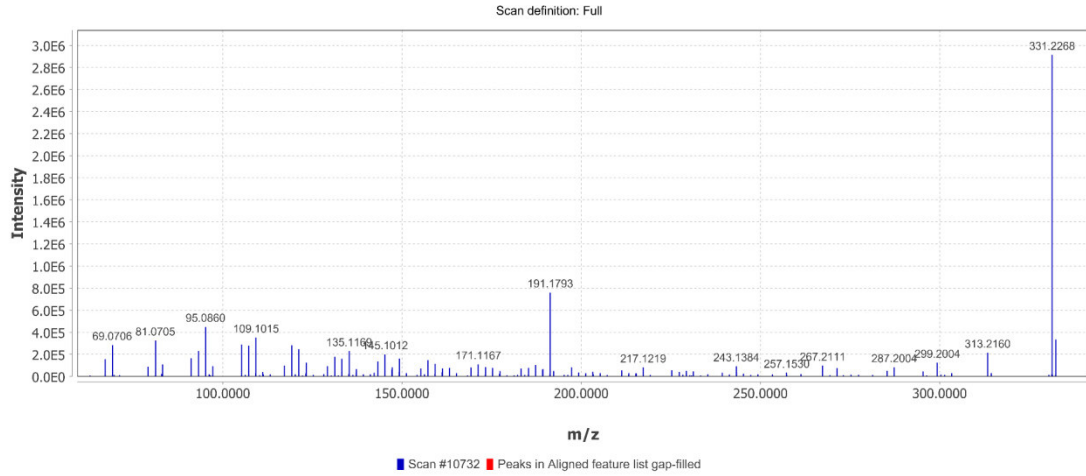




MA-02_pos.mzXML#10630 @23.87 MS2 (331.2265) c +, base peak: 331.2268 m/z (4.4E6)

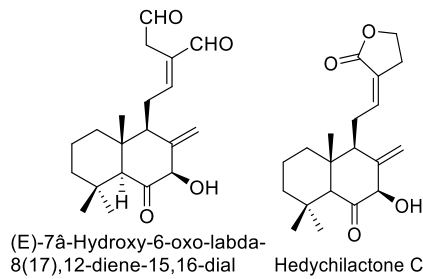
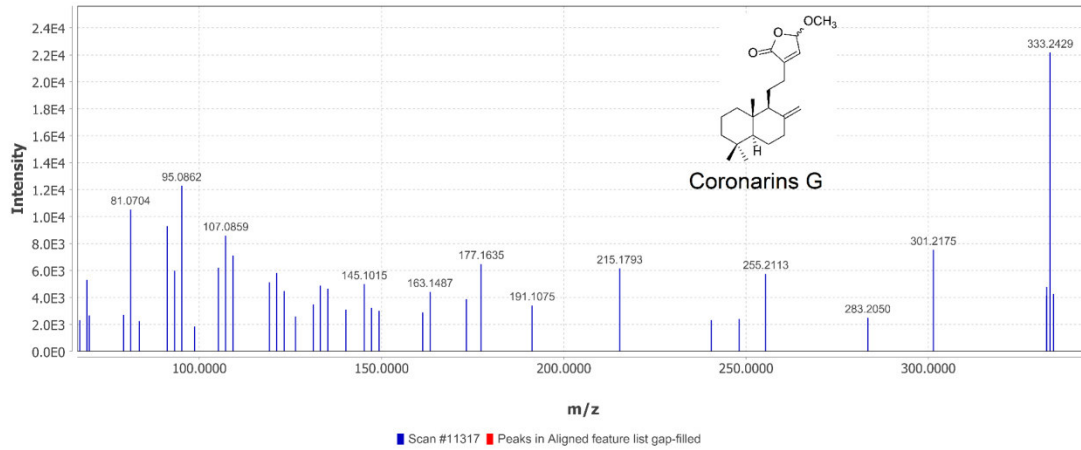


MA-02_pos.mzXML#10732 @24.07 MS2 (331.2267) c +, base peak: 331.2268 m/z (2.9E6)



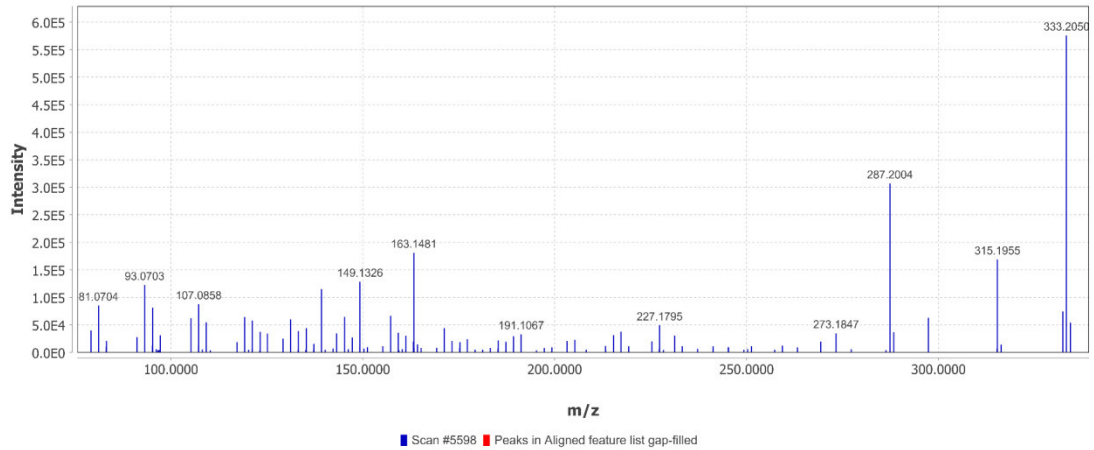
MA-02_pos.mzXML#11317 @25.34 MS2 (333.2421) c +, base peak: 333.2429 m/z (2.2E4)

Scan definition: Full



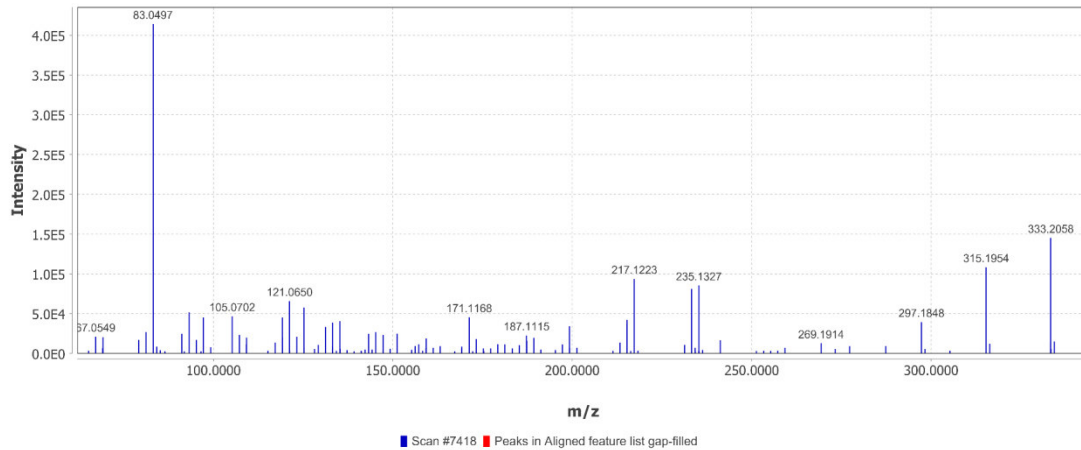
MA-02_pos.mzXML#5598 @12.97 MS2 (333.2059) c +, base peak: 333.2059 m/z (5.8E5)

Scan definition: Full



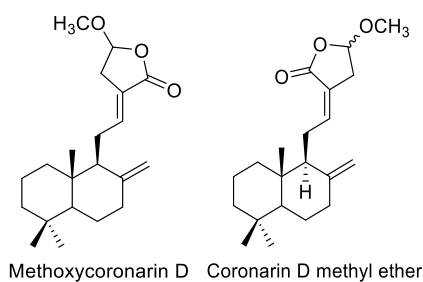
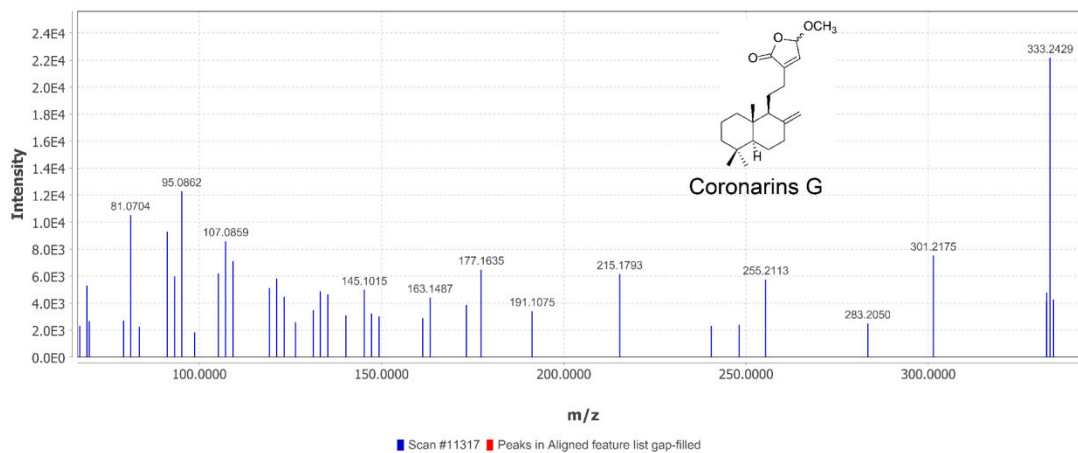
MC-03_pos.mzXML#7418 @16.56 MS2 (333.2059) c +, base peak: 83.0497 m/z (4.1E5)

Scan definition: Full



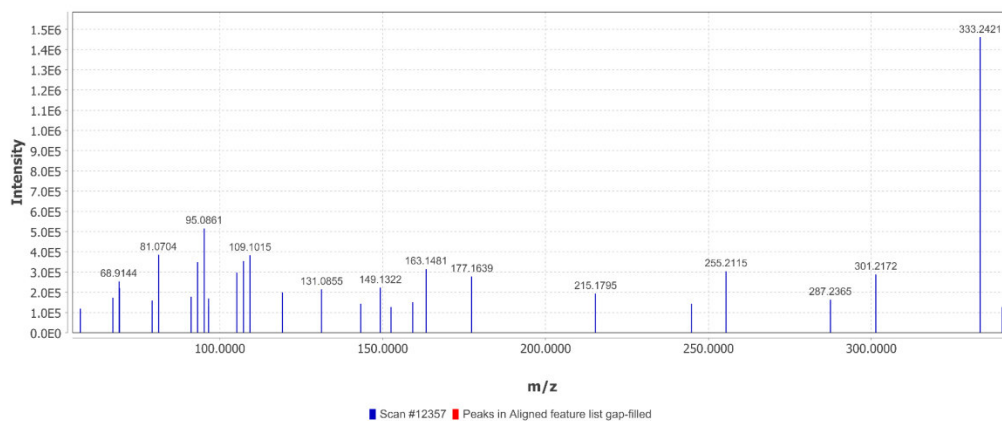
MA-02_pos.mzXML#11317 @25.34 MS2 (333.2421) c +, base peak: 333.2429 m/z (2.2E4)

Scan definition: Full



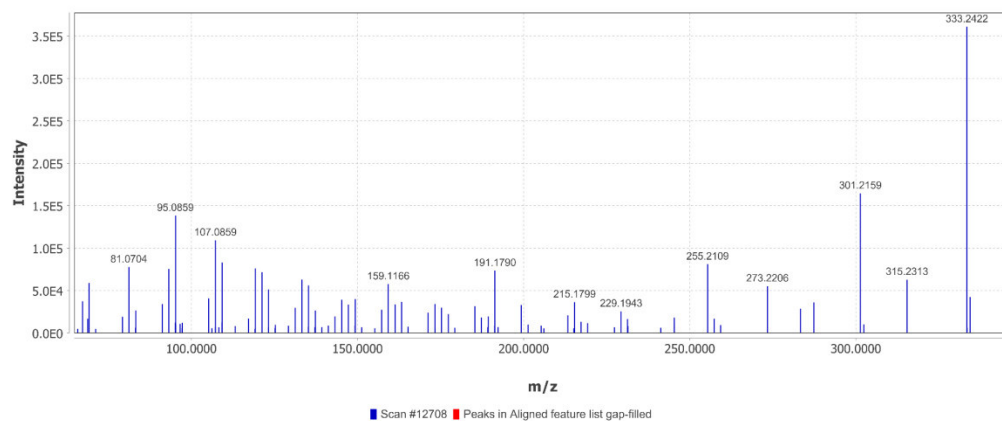
MA-02_pos.mzXML#12357 @27.60 MS2 (333.2420) c +, base peak: 333.2421 m/z (1.5E6)

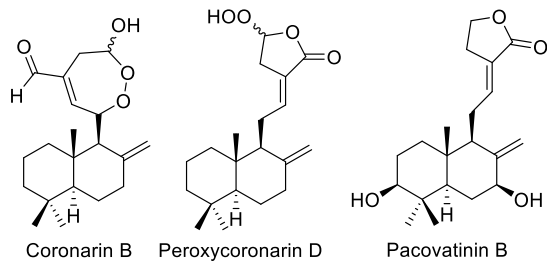
Scan definition: Full



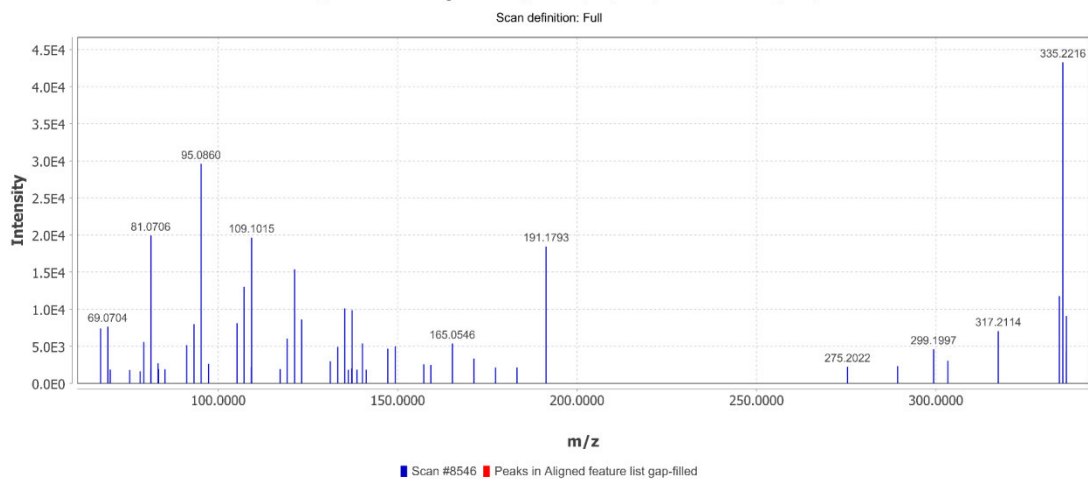
MA-02_pos.mzXML#12708 @28.31 MS2 (333.2422) c +, base peak: 333.2422 m/z (3.6E5)

Scan definition: Full

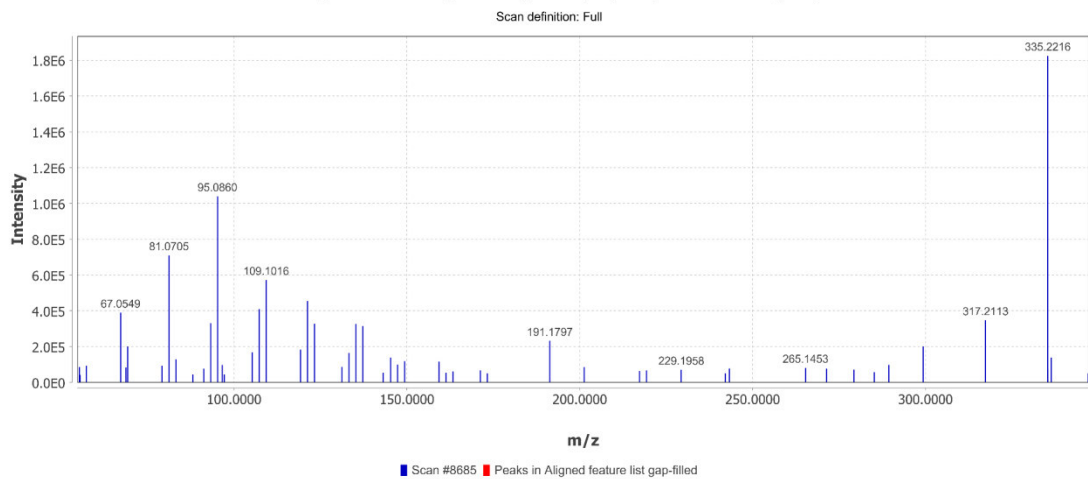




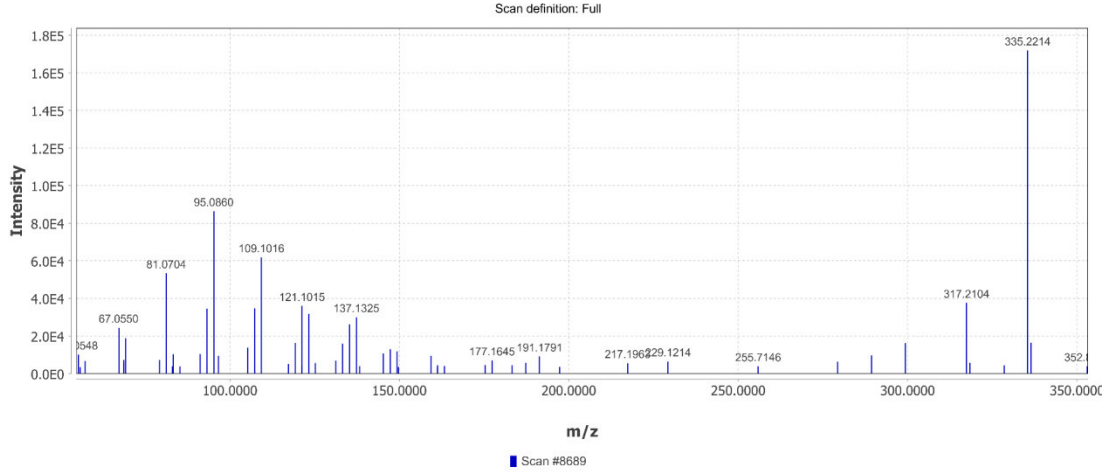
MA-02_pos.mzXML#8546 @19.48 MS2 (335.2215) c +, base peak: 335.2216 m/z (4.3E4)



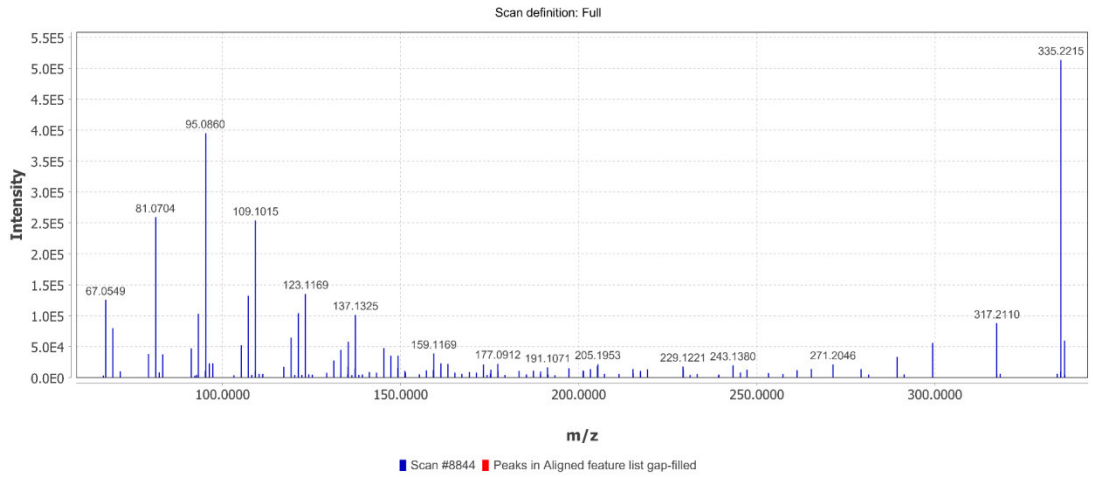
MA-02_pos.mzXML#8685 @19.78 MS2 (335.2213) c +, base peak: 335.2216 m/z (1.8E6)



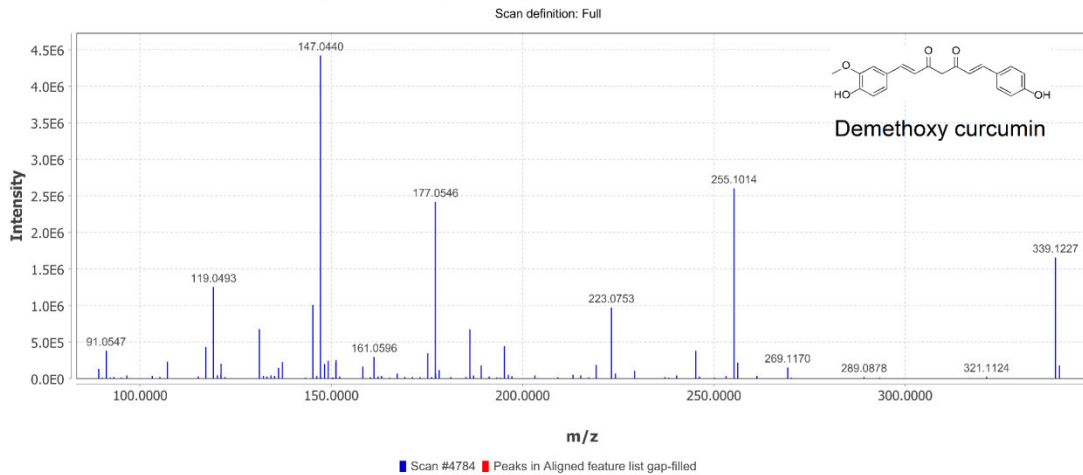
MD-01_pos.mzXML#8689 @19.78 MS2 (335.2215) c +, base peak: 335.2214 m/z (1.7E5)



MA-02_pos.mzXML#8844 @20.11 MS2 (335.2216) c +, base peak: 335.2215 m/z (5.1E5)

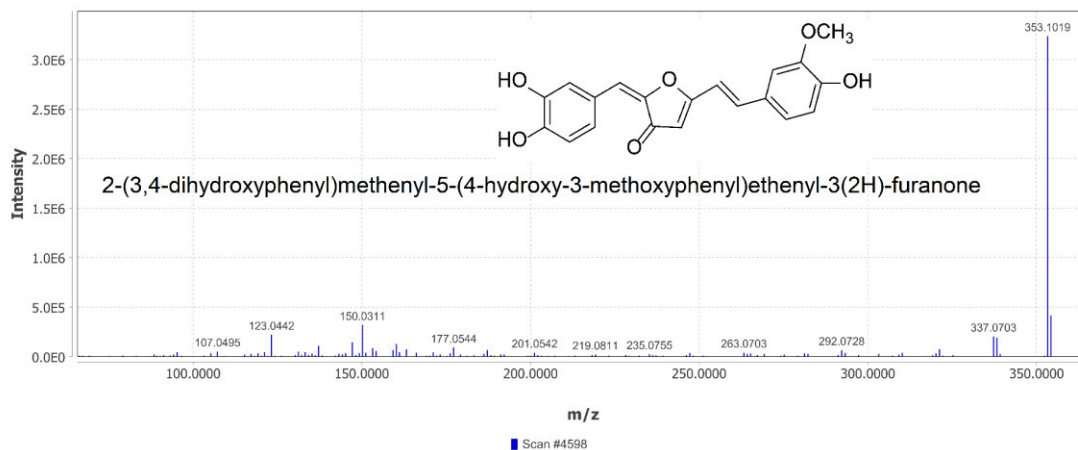


MC-03_pos.mzXML#4784 @11.01 MS2 (339.1227) c +, base peak: 147.0440 m/z (4.4E6)



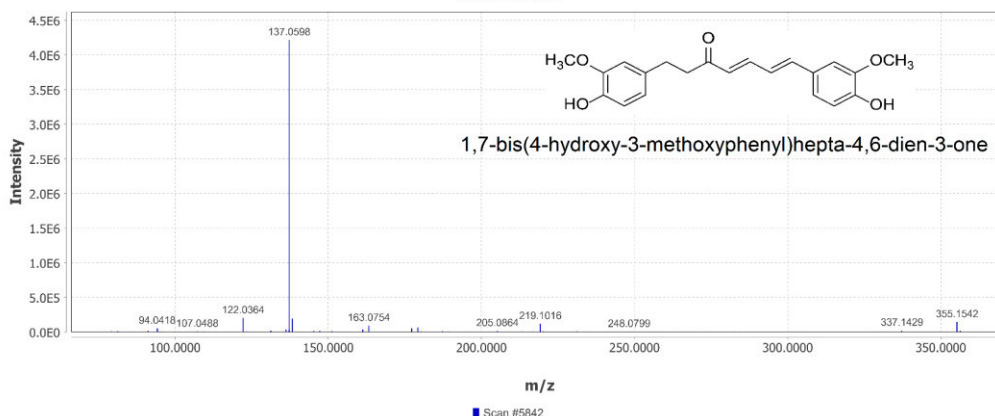
MC-03_pos.mzXML#4598 @10.62 MS2 (353.1018) c +, base peak: 353.1019 m/z (3.2E6)

Scan definition: Full



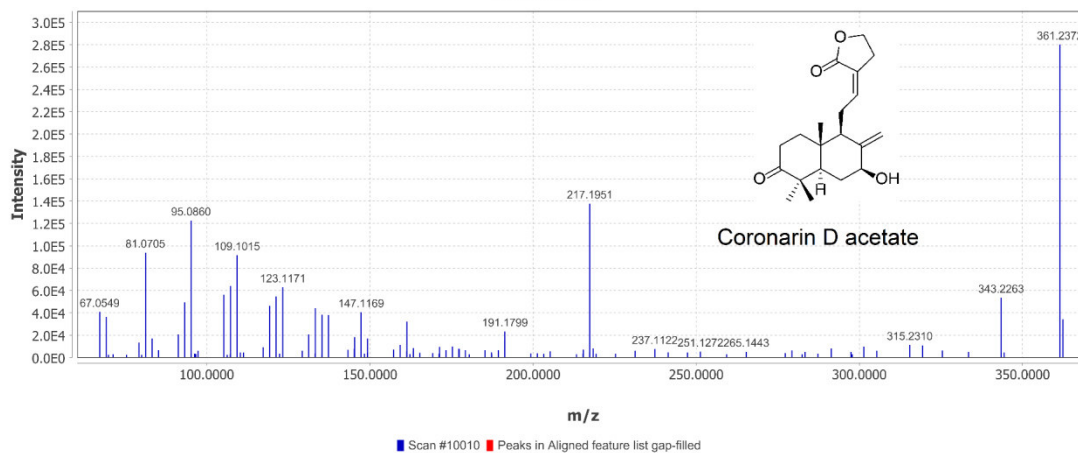
MC-03_pos.mzXML#5842 @13.25 MS2 (355.1538) c +, base peak: 137.0598 m/z (4.2E6)

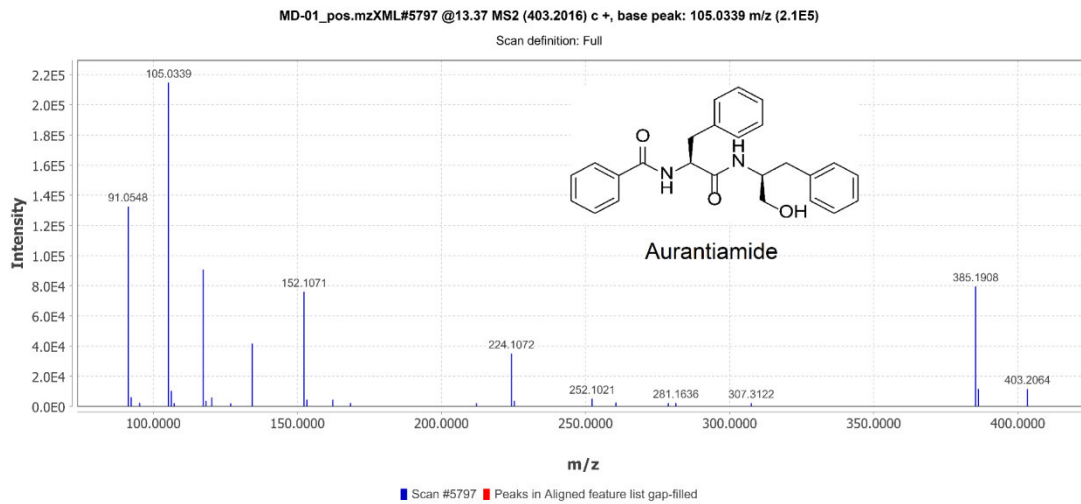
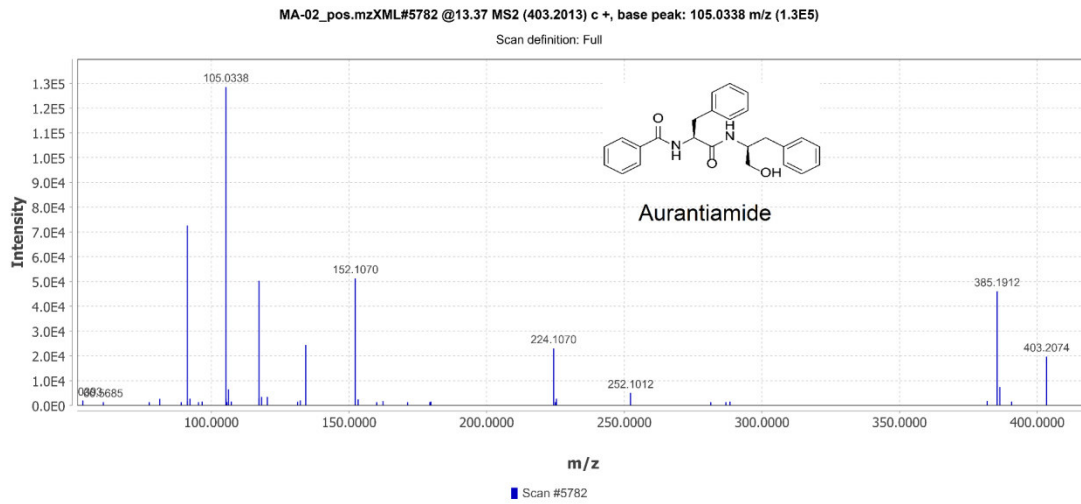
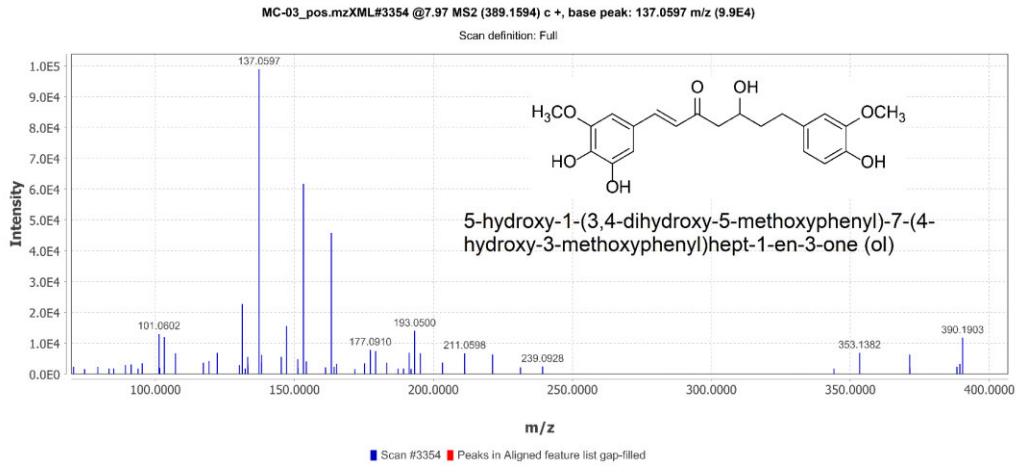
Scan definition: Full



MA-02_pos.mzXML#10010 @22.60 MS2 (361.2371) c +, base peak: 361.2372 m/z (2.8E5)

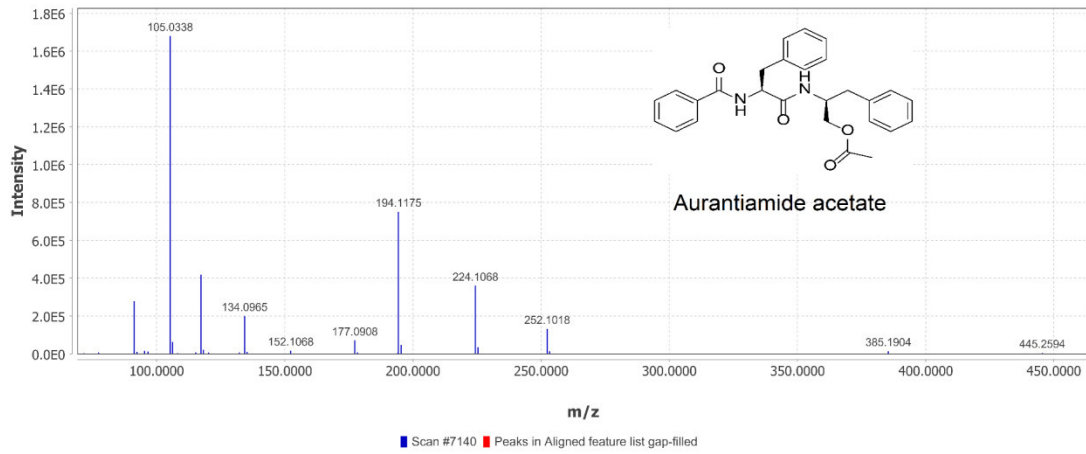
Scan definition: Full





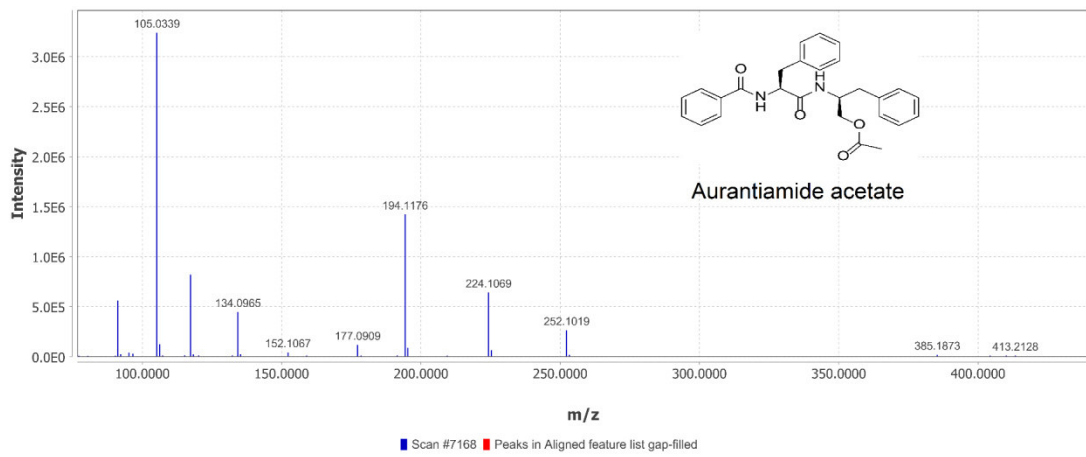
MA-02_pos.mzXML#7140 @16.37 MS2 (445.2121) c +, base peak: 105.0338 m/z (1.7E6)

Scan definition: Full

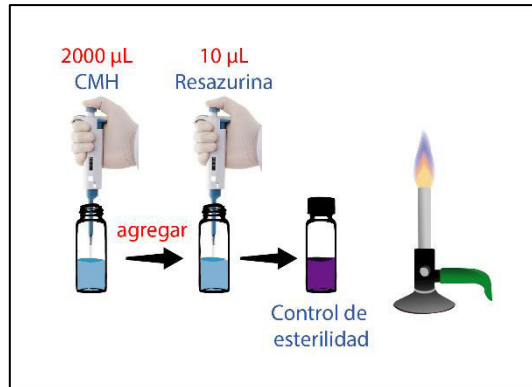


MD-01_pos.mzXML#7168 @16.39 MS2 (445.2121) c +, base peak: 105.0339 m/z (3.2E6)

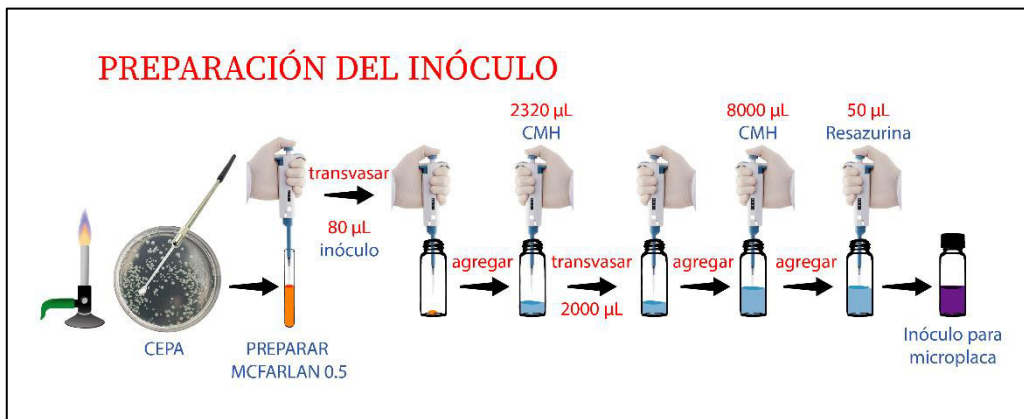
Scan definition: Full



Anexo 2: Etapas de la preparación del control de esterilidad y el inóculo para el llenado en las microplacas.

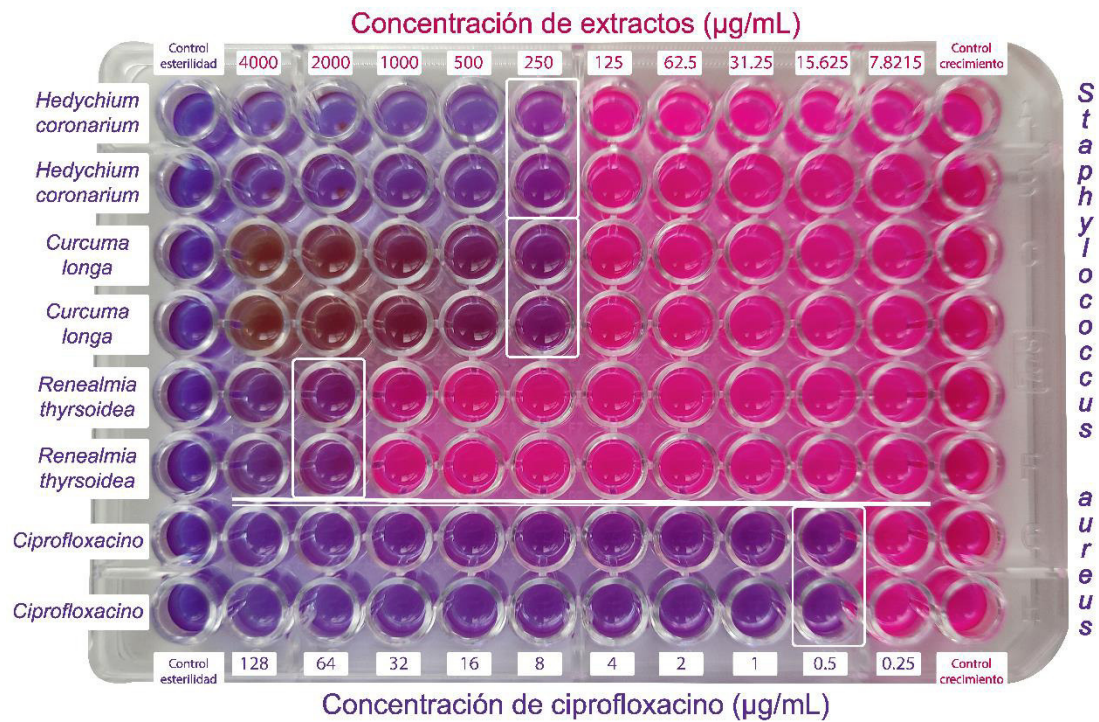


Preparación del control de esterilidad con resazurina.

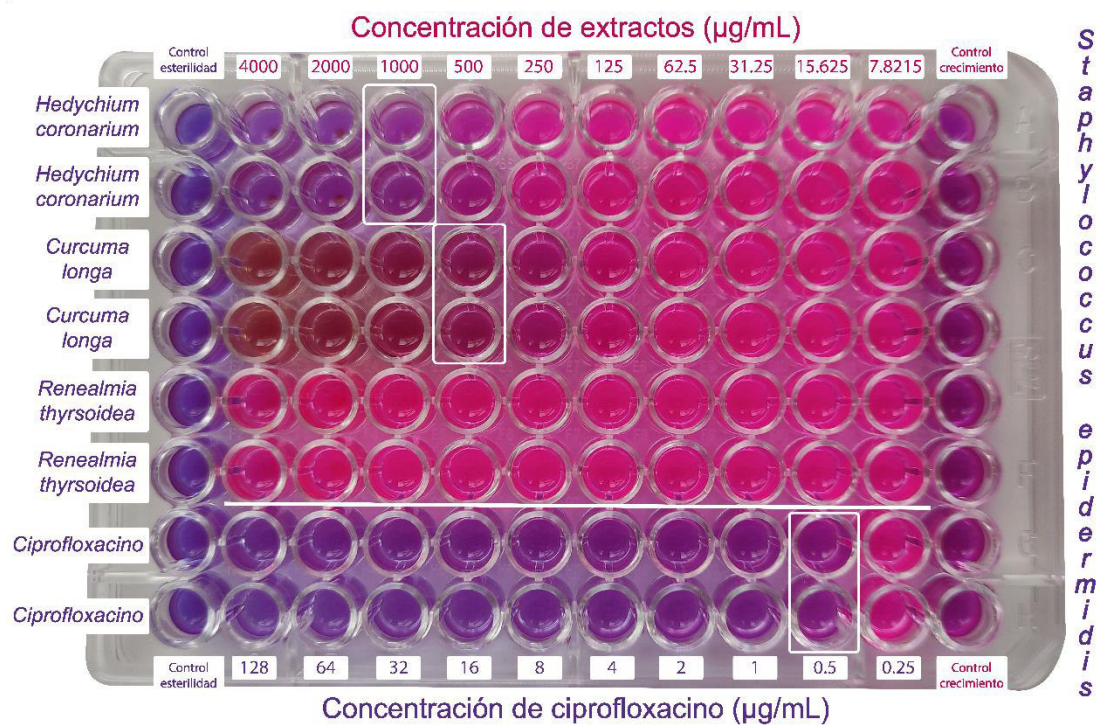


Esquema de preparación del inóculo.

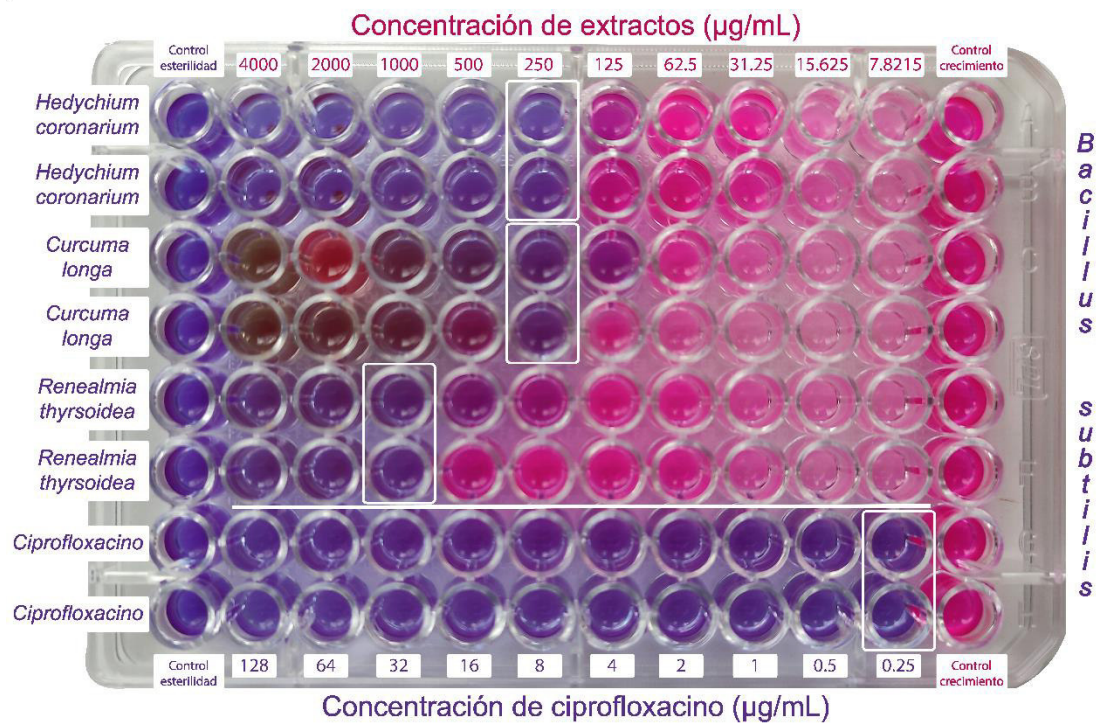
Anexo 3: Microplacas con los resultados de la CMI para los diferentes microorganismos analizados.



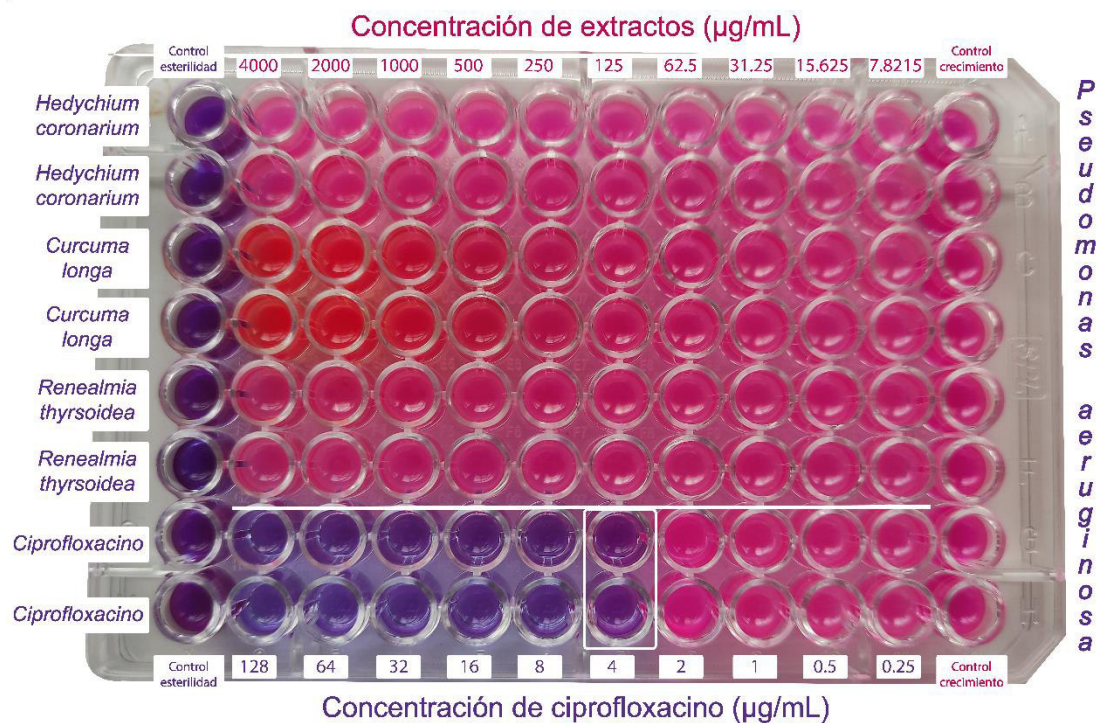
Determinación de las CMI de los 3 extractos y ciprofloxacino contra *Staphylococcus aureus*.



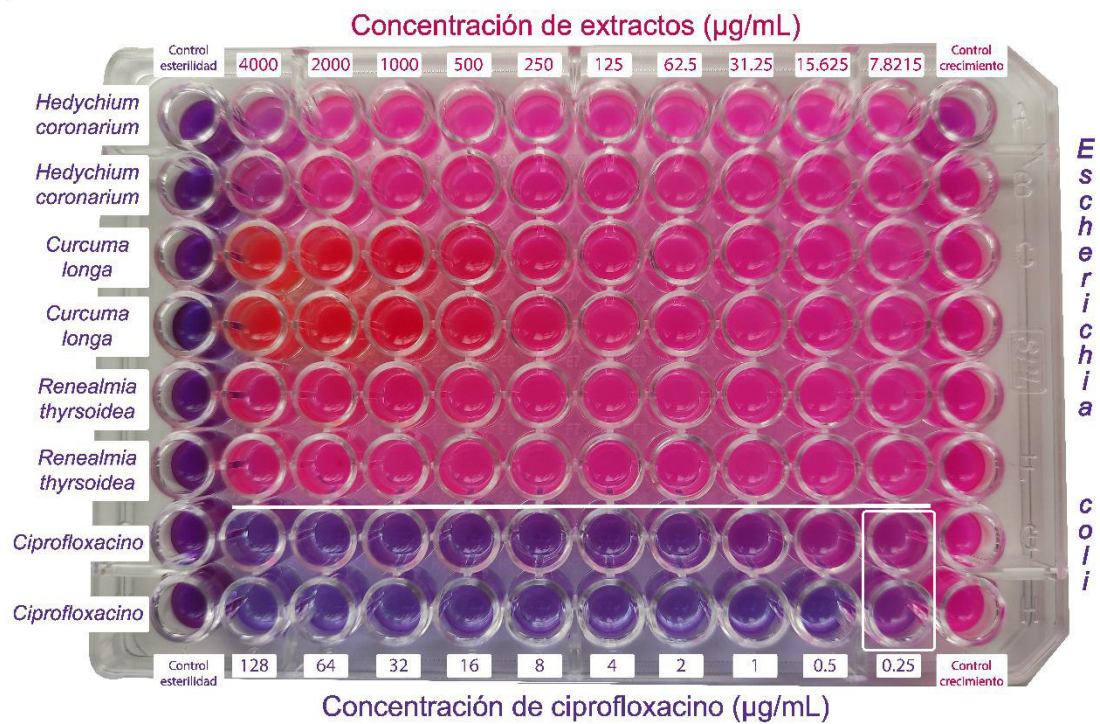
Determinación de las CMI de los 3 extractos y ciprofloxacino contra *Staphylococcus epidermidis*.



Determinación de las CMI de los 3 extractos y ciprofloxacino contra *Bacillus subtilis*.



Determinación de las CMI de los 3 extractos y ciprofloxacino contra *Pseudomonas aeruginosa*.



Determinación de las CMI's de los 3 extractos y ciprofloxacino contra *Escherichia coli*.

Anexo 4: Cabina de flujo laminar donde se desarrolla el llenado de las microplacas de 96 pocillos



Anexo 5: Constancia de depósito de muestra de *Renalmia thyrsoides* en el Herbario Selva Central Oxapampa - HOXA

HOXA

Herbario Selva Central
Oxapampa

CONSTANCIA N° 001

Conste por el presente documento que el Sr. **DEYVIS DANTE SOLIS GOZAR**, responsable del Proyecto de tesis: "*Análisis metabólico mediante la técnica del Molecular Networking y el estudio de la actividad antimicrobiana de las especies Renalmia thyrsoides y Hedychium coronarium*".

Ha depositado en el **Herbario Selva Central Oxapampa - HOXA**, de la Estación Biológica del Jardín Botánico de Missouri, 01 duplicado de la colección botánica, correspondiente al taxón que se indican líneas abajo:

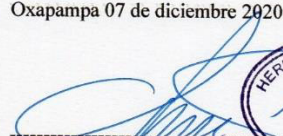
Cabe indicar que el **HOXA**, es una Institución Científica Nacional Depositaria de Material Biológico con Código de Autorización N°AUT-ICND-2016-012.

La muestra botánica ha sido recolectada bajo la autorización siguiente:

1. **RESOLUCION DE DIRECCION GENERAL N° D000272-2020-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS**

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que considere conveniente.

Oxapampa 07 de diciembre 2020


Ing° Rodolfo Vásquez Martínez
DIRECTOR
Herbario Selva Central Oxapampa
HOXA



*Lista del espécimen a depositar en el HOXA

Colector	N° de colecta	Familia	Género / especie	Ejemplares depositados en el HOXA	Autorización (RDG N°)
*Deyvis Solis	S/N	Zingiberaceae	<i>Renalmia thyrsoides</i>	1	N° D000272-2020-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

Anexo 6: Constancia de identificación de las especies de estudio

JARDÍN BOTÁNICO DE MISSOURI

CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que las muestras botánicas, enviadas por el Bachiller **Deyvis Dante Solis Gozar**, al Herbario Selva Central Oxapampa (HOXA), para su identificación botánica, corresponde al nombre científico siguiente:

Código asignado en el papel periódico	Nombre científico de la muestra consignada al código en referencia	Familia
01 Ahuacnem	<i>Renealmia thyrsoides</i> (Ruiz & Pav.) Poepp. & Endl.	Zingiberaceae
02 Palillo	<i>Curcuma longa</i> L.	Zingiberaceae
03 Etchespar	<i>Stigmaphyllon adenodon</i> A. Juss.	Malpighiaceae
04 Achira	<i>Hedychium coronarium</i> J. Koenig	Zingiberaceae

De acuerdo a la información entregada las muestras corresponden al Proyecto de Tesis titulado: "ANÁLISIS METABOLÓMICO MEDIANTE LA TÉCNICA DEL MOLECULAR NETWORKING Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE RAICES DE *Renealmia thyrsoides* y *Hedychium coronarium*"

Se expide la presente para los fines que considere conveniente.

Oxapampa, 01 setiembre del 2019


Ing. Rodolfo Vásquez Martínez



Anexo 7: Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Unidad de medida	Observaciones
Variable independiente: los extractos metanólicos de las raíces de <i>Renealmia thyrsoides</i> y <i>Hedychium coronarium</i> .	Conjuntos de compuestos químicos extraídos de las raíces de <i>Renealmia thyrsoides</i> y <i>Hedychium coronarium</i> con el uso de un solvente químico.	Se evaluó las diluciones a diferentes concentraciones de los extractos metanólicos de <i>Renealmia thyrsoides</i> y <i>Hedychium coronarium</i> .	Concentraciones de los extractos.	4000 µg/mL 2000 µg/mL 1000 µg/mL 500 µg/mL 250 µg/mL 125 µg/mL 62.5 µg/mL 31.25 µg/mL 15.625 µg/mL 7.8215 µg/mL	µg/mL	No require.
Variable dependiente: la actividad antimicrobiana.	Capacidad de una muestra para destruir o evitar el crecimiento de microorganismos.	La actividad antimicrobiana se midió con la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	Concentración Mínima inhibitoria.	µg/mL	La actividad inhibitoria.	Se empleó el método de microdilución colorimétrica.