



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO

**AISLAMIENTO BIODIRIGIDO Y
CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* A
PARTIR DE UNA PLANTA USADA EN
LA MEDICINA TRADICIONAL
PERUANA**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

INÉS YOLANDA CASTRO DIONICIO

LIMA-PERÚ

2016

ASESORA

Dra. Valérie Jullian - Instituto de Investigación para el desarrollo (IRD-Francia)

MIEMBROS DEL JURADO

Msc. León Villegas Vílchez

PRESIDENTE

Msc. Ana Colarossi Salinas

SECRETARIA

Msc. Dora Maurtua Torres

VOCAL

DEDICATORIA

A mis padres Dina y Rogelio por su amor, ejemplo, consejos y apoyo incondicional.

A mis hermanos José, Arturo y Juan por estar siempre pendiente de mí.

A toda mi familia y de manera especial a mi tía Yolanda Dionicio y mi abuelo Agapito Dionicio

A mis profesores y amigos Mayer Ganoza, Gonzalo Malca y Gail Willsky por ser parte importante de mi crecimiento profesional.

A mis amigos Esther Ventura, Miguel Miranda, Lidia Ávalos y Rodolfo Hanco, por hacerme parte de su familia durante el desarrollo de mi tesis y mi estadía en Lima

AGRADECIMIENTOS

A Dios en primer lugar, por convertir las bendiciones en oportunidades y colocar en mi camino a las personas correctas en el momento correcto.

Al consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC) por la subvención brindada para la realización de este trabajo a través de la beca de Maestría en el programa de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Al Laboratorio Mixto Internacional LMI-LAVI (UPCH-IRD) y de manera especial agradezco al Dr. Michel Sauvain, a Denis Castillo y a mi asesora la Dra. Valérie Jullian por todo el apoyo académico, científico y tecnológico brindado. Sus aportes fueron invaluable.

A la Dra. Rosario Rojas Duran por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Productos Naturales y por haberme animado a postular a la beca de Maestría. De igual manera agradezco a Candy Ruiz por compartir sus conocimientos y enriquecer mi vida profesional enormemente.

A mis compañeros de estudio Daniela Álvarez y Jesús Guzmán. De igual manera a mis amigos Fabio Espichan y David Condori por sus consejos, apoyo y sincera amistad.

A mis amigos del Laboratorio 208 y miembros del grupo de investigación: Yesenia, Milagros, Maricruz, Manuel, Carlos, Daniel, Romina y Kevin por su apoyo constante.

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	4
2.1 Planteamiento del problema	4
2.2 Marco teórico	6
2.3 Justificación del estudio	29
2.4 Objetivos	31
2.5 Hipótesis	31
III. METODOLOGÍA	32
3.1 Materiales	32
3.2 Métodos	35
3.2.1 Preparación del extracto crudo	36
3.2.2 Cromatografía en capa fina (TLC)	36
3.2.3 Obtención de las fracciones de diferente polaridad	36
3.2.4 Análisis por HPLC	37
3.2.5 Fraccionamiento cromatográfico	38
3.2.6 Determinación de la concentración mínima Inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC)	39
3.2.7 Ensayo de citotoxicidad frente a células RAW 264.7	42

3.2.8	Análisis por UHPLC	43
3.2.9	Elucidación estructural	44
IV.	RESULTADOS	46
4.1	Esquema general del fraccionamiento biodirigido	46
4.2	Fraccionamiento biodirigido	47
4.3	Ensayo de citotoxicidad frente a células RAW 264.7	53
4.4	Análisis por UHPLC	54
4.5	Análisis por RMN	55
4.6	Análisis por LC-ESI-MS	80
V.	DISCUSIÓN	82
VI.	CONCLUSIONES	90
VII.	RECOMENDACIONES	91
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

- Tabla N°1 Factores de mantenimiento presentes en *H. pylori*
- Tabla N°2 Factores de virulencia de *H. pylori*
- Tabla N°3 Guía usada para el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* basada en las directrices del consenso de Maastricht IV-2012
- Tabla N°4 Plantas y extractos con actividad *in vitro* anti- *H. pylori*
- Tabla N°6 Compuestos aislados con actividad anti - *H. pylori in vitro*
- Tabla N°7 Sistema de elución para SPE 1,2 y 3
- Tabla N°8 Concentración mínima inhibitoria (CMI, µg/mL) de los extractos y fracciones obtenidos a partir de *C.lutea*
- Tabla N°9 Concentración mínima inhibitoria (CMI, µg/mL) de las fracciones obtenidas mediante MPLC, a partir del extracto metanólico de *C. lutea*
- Tabla N°10 Fracciones obtenidas utilizando los cartuchos SPE1, SPE2 y SPE3
- Tabla N°11 Concentración mínima inhibitoria (CMI, µg/mL) de las fracciones purificadas a partir de SC1, SC2 y SC3.
- Tabla N°12 Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2) sobre células RAW 264.7
- Tabla N°13 Asignaciones del núcleo esteroidal SC1 (2) “a”
- Tabla N°14 Asignaciones del núcleo esteroidal SC2 (2) “a”
- Tabla N°15 Asignaciones del núcleo esteroidal SC3 (2) “a”
- Asignaciones de los monosacáridos presentes en SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2)

LISTA DE FIGURAS

- Figura N°1 Representación esquemática de la historia natural de la infección con *Helicobacter pylori*.
- Figura N°2 *Cordia lutea* Lam. (Flor de overo)
- Figura N°3 TLC de las fracciones de *C. lutea*
- Figura N°4 Cromatograma (HPLC) del extracto crudo etanólico de *C. lutea*
- Figura N°5 TLC de las fracciones obtenidas a partir de la fracción metanólica
- Figura N°6 TLC de las fracciones SC1, SC2 y SC3
- Figura N°7 TLC de las fracciones SC1 (1), SC1 (2), SC2 (1), SC2 (2) y SC3 (1) y SC3 (2)
- Figura N°8 Cromatogramas (izquierda) y espectro 3D (derecha) de las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3(2) a 201nm
- Figura N°9 Espectro RMN ¹H de SC3 (2)
- Figura N°10 Regiones del espectro RMN ¹H de SC3 (2) y señales que evidencian la mezcla de compuestos
- Figura N°11 Espectro RMN ¹³C de SC3 (2)
- Figura N°12 Correlaciones en el espectro HSQC entre el carbono a 105.68 ppm y los hidrógenos a 5.07 y 4.87 ppm. Compuesto SC3 (2) “a”
- Figura N°13 Correlaciones en el espectro HSQC entre diferentes átomos de carbono e hidrógenos geminales del compuesto SC3 (2) “a”
- Figura N°14 Correlaciones en el espectro HSQC entre el carbono a 44.94 ppm y los hidrógenos a 1.63 y 1.05 ppm del compuesto SC3 (2) “b”
- Figura N°15 Correlaciones en el espectro COSY entre protones carbinólicos del residuo glicosídico de SC3 (2)

- Figura N°16 Elucidación estructural del residuo glicosídico de SC3 (2): α -L-Ramnosa
- Figura N°17 Estructuras parciales del núcleo esteroidal de SC3 (2) “a” obtenidas a partir del espectro COSY.
- Figura N°18 Correlaciones obtenidas a partir del espectro del HMBC para construir parte de la cadena lateral de SC3 (2) “a”.
- Figura N°19 Cadena lateral de SC3 (2) “a” mostrando las correlaciones en HMBC
- Figura N°20 Posición de anclaje del residuo glicosídico a la aglicona en SC3 (2) “a”
- Figura N°21 Región del espectro de HMBC mostrando las correlaciones entre el protón a 2.25ppm y diferentes átomos de carbono de SC3 (2) “a”
- Figura N°22 Correlaciones entre el protón a 2.25ppm y diferentes átomos de
- Figura N°23 carbono de SC3 (2) “a”
- Figura N°24 Correlaciones en HMBC de SC3 (2) “a”
- Figura N°25 Correlaciones COSY (←) y HMBC (→) de SC3 (2) “a”
- Figura N°26 Compuesto SC3 (2) “a”
- Figura N°27 Correlaciones COSY (←) y HMBC (→) de SC3 (2) “b”
- Compuesto SC3 (2) “b”
- Figura N°28 Elucidación estructural del residuo glicosídico de SC2 (2): β -D-Xilopiranososa
- Figura N°29 Compuestos identificados a partir de la fracción metanólica de *C. lutea*
- Figura N°30 Señales de los aductos formados con el anión formiato [M+ HCOO]-
- Figura N°31 Espectro de masas: ESI en modo negativo de los compuestos SC3 (2) “a” y SC3 (2) “b”

LISTA DE ABREVIATURAS

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMB: Concentración mínima bactericida

CI50: Concentración inhibitoria cincuenta

PPI: Inhibidor de bomba de protones

NCCLS: Comité Nacional para la Estandarización Clínica de Laboratorio

CLSI: Clinical and laboratory standar Institute

ATCC: American type culture collection

MS: Mass spectrometry

EIMS: Espectrometría de masas de impacto electrónico

TLC: Thin layer chromatography

MPLC: Medium pressure liquid chromatography

HPLC: High pressure liquid chromatography

HPLC-MS: High pressure liquid chromatography-mass spectrometry

RMN: Resonancia magnética nuclear

¹HRMN: Resonancia magnética nuclear de protón

¹³CRMN: Resonancia magnética nuclear de carbono

COSY: Correlation Spectroscopy

HMBC: Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation

CIP: Collection of Institut Pasteur

DMSO: Dimetilsulfóxido

BHI: Brain-heart infusion medium

SFB: Suero fetal bovino

SPE: Solid phase extraction

RPM: Revoluciones por minuto

UFC: Unidades formadoras de colonia

MTT: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

RESUMEN

Cordia lutea Lam (Flor de Overo) es una planta usada en la medicina tradicional Peruana como remedio para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, hepatitis y dolor de riñones. El fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico obtenido a partir de las flores, utilizando un ensayo de microdilución en caldo, permitió realizar el aislamiento de tres fracciones purificadas: SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2). Estas fracciones presentaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 31.3 µg/mL frente a una cepa de referencia de *Helicobacter pylori* (CIP 193995). Se evaluó la citotoxicidad de SC1 (2), SC2 (2) and SC3 (2) frente a macrófagos murinos (RAW 264.7). Las tres fracciones mostraron una elevada toxicidad en término de concentración inhibitoria media (CI₅₀= 4.2±2.5, 3.8±1.5 y 8.8±3.3, respectivamente). Cada una de las fracciones purificadas SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2) estuvieron conformadas por una mezcla de dos saponinas esteroidales. El análisis realizado mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, en conjunto con métodos espectroscópicos (RMN) permitió la identificación de los compuestos presentes en cada una de las fracciones. Los seis compuestos identificados presentaron un núcleo esteroidal en común (4 α ,14 α -dimetilesterol), por primera vez descrito para *C. lutea*

Palabras claves: *Cordia lutea*, *Helicobacter pylori*, saponinas esteroidales, dimetilesterol.

ABSTRACT

Cordia lutea Lam (Flor de Overo) is a plant used in Peruvian traditional medicine as a remedy for the treatment of gastrointestinal disorders, hepatitis and kidney pain. Bio-guided fractionation of the ethanol extract of the flowers using a broth microdilution assay, led to the isolation of three main purified fractions: SC1 (2), SC2 (2) and SC3 (2). These fractions showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 31.3 µg/mL against a *Helicobacter pylori* reference strain (CIP 193995). Cytotoxicity of SC1 (2), SC2 (2) and SC3 (2) was evaluated using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay against murine macrophages (RAW 264.7). The three fractions showed high cytotoxicity on terms of median inhibitory concentration ($IC_{50}=4.2\pm 2.5$, 3.8 ± 1.5 and 8.8 ± 3.3 , respectively). Each of these purified fractions: SC1 (2), SC2 (2) and SC3 (2), consisted on a mixture of two steroidal saponins. Liquid chromatography coupled to Electrospray ionization mass spectrometry (LC/UV/ESI-MS) combined with spectroscopic methods (NMR) was used for compound identification. All six compounds identified, presented a steroidal nucleus in common (4 α ,14 α -dimethylsterol) for the first time identified in *C. lutea*.

Key words: *Cordia lutea*, *Helicobacter pylori*, steroidal saponins, dimethylsterol

I. INTRODUCCION

Más del 50% de medicamentos que ha sido introducido en el mundo fueron inspirados en productos naturales; sin embargo el interés por el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos obtenidos a partir de fuentes naturales fue dejado de lado por parte de las grandes industrias farmacéuticas, debido principalmente a la aparición de la química combinatoria.(1)

Este enfoque trajo como resultado que desde 1981 hasta el año 2002 ningún compuesto combinatorio fue registrado como medicamento aprobado y el número de nuevos fármacos que entraron al mercado disminuyó a la mitad.(1)La baja tasa de emergencia de nuevos agentes terapéuticos se hace evidente cuando se examina la historia de aprobación de agentes antibacterianos por parte de la FDA (Food and Drug Administration). (2)

Durante los 30 años que siguieron a la introducción de los primeros antibacterianos, se descubrieron y desarrollaron una amplia gama de medicamentos para tratar enfermedades infecciosas. Sin embargo, a partir de los años sesenta el descubrimiento de nueva clases de medicamentos antibacterianos, definidos como fármacos con un mecanismo de acción completamente nuevo, disminuyó preocupantemente. La mayoría de compuestos introducidos desde aquel tiempo fueron modificaciones químicas de clases de drogas descubiertas previamente.(2, 3)

El interés por el estudio de las plantas medicinales como fuente de antimicrobianos ha crecido enormemente durante los últimos años y muchas de ellas cuentan con estudios de actividad *in vitro* que muestran su potencial como agentes terapéuticos. Tomando en cuenta que solo una fracción de plantas medicinales reportadas ha sido investigada químicamente, el estudio multidisciplinario de éstos recursos permitiría descubrir nuevas clases de compuestos que puedan ser usados directamente en su forma química original, como precursores de drogas o derivados sintéticos; además de contribuir con la valoración del uso tradicional de la planta en estudio.(4, 5)

El esquema de aislamiento de compuestos usado en el presente trabajo, está basado en el fraccionamiento biodirigido. Este esquema incluye entre varios aspectos a la identificación y documentación de la planta de estudio, el esquema de extracción, la selección del bioensayo, la obtención de valores representativos de actividad *in vitro* (CI50, CI90, CMI, CMB, etc.) y su comparación con un compuesto de referencia. Todos estos aspectos garantizan la selección del extracto o compuestos aislados con actividad antimicrobiana relevante durante un esquema de aislamiento y que sean dignos de seguimiento.(6)

La información obtenida a partir de encuestas realizadas por el grupo de etnobotánicos del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD-Francia) permitió identificar diferentes especies usadas para tratar problemas gastrointestinales. Del grupo de plantas que presentaron actividad anti-*Helicobacter pylori* se seleccionó a *Cordia lutea* Lam., por presentar buena

actividad *in vitro*. El objetivo del presente trabajo fue realizar el fraccionamiento biodirigido y caracterización de uno o más compuestos anti-*Helicobacter pylori* a partir de esta planta medicinal.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Helicobacter pylori es considerado como el agente causal de la gastritis aguda y crónica y además de ser uno de los factores que contribuyen a la etiología multifactorial de la úlcera péptica, el adenocarcinoma gástrico y el linfoma tipo MALT (Mucosal Atypical Lymphoid Tissue) de bajo grado de malignidad.(7)

La infección causada por este patógeno se presenta a nivel mundial, sin embargo hay diferencias substanciales en la prevalencia de infección entre países industrializados (50% de prevalencia) y países en vías de desarrollo donde se alcanzan valores de hasta 80%.(7)

En el Perú, particularmente en niveles socioeconómicos bajos, el hacinamiento y las pobres condiciones de saneamiento facilitan no solo la transmisión de esta bacteria desde una edad muy temprana, sino que también niveles importantes de recurrencia. Además, la existencia de factores moduladores de carácter nutricional e inmunológico podría determinar una mayor prevalencia de cáncer gástrico, la cual representa la primera causa de mortalidad por cáncer en nuestro país.(8, 9)

Las plantas medicinales como legado de la medicina tradicional peruana, herencia de tiempos precolombinos, sigue siendo la primera instancia de consulta y tratamiento en nuestro país debido a que constituyen recursos ancestrales

enraizados en el propio medio cultural, erigiéndose como una necesidad primaria en el sistema de salud y en la estructura económica de sectores menos privilegiados que no pueden costear el elevado gasto farmacéutico. El esfuerzo por integrar la medicina popular tradicional con el sistema de salud nacional ha dado como resultado en la formación de un programa de medicina complementaria que cuenta en la actualidad con más de cincuenta locales de atención distribuidos por todo el Perú, además de contar con diferentes publicaciones entre las que destacan un Manual de Fitoterapia (respaldada por la Organización Panamericana de Salud) que incluye dentro de sus volúmenes una sección acerca de la enfermedades gastrointestinales y donde se muestra un listado de plantas utilizadas para combatir la enfermedad ulcero-péptica.(10)

El potencial de muchas plantas peruanas utilizadas en la medicina tradicional como fuentes de nuevos compuestos con actividad anti- *Helicobacter pylori* aún falta ser investigado.

Considerando lo anteriormente expuesto, se plantea la siguiente pregunta:

¿Es posible realizar el aislamiento biodirigido y caracterización de uno o más compuestos anti-*Helicobacter pylori* a partir de *Cordia lutea* Lam?

2.2 MARCO TEORICO

2.2.1 *HELICOBATER PYLORI*

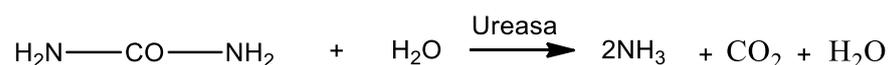
Helicobacter pylori es una bacteria Gram- negativa de forma espiral, de 2 a 4 μm de largo y de 0,5 μm a 1 μm de ancho. Puede aparecer como bastón curvo, mientras que las formas cocoides aparecen luego de un cultivo prolongado *in vitro* o tratamiento con antibióticos. Presenta de 2 a 6 flagelos envainados que le confieren motilidad y le permiten un movimiento rápido en la capa mucosa que recubre las células epiteliales gástricas.(7)

Entre los aspectos más importantes de su metabolismo resaltan su actividad oxidasa y catalasa positiva, características que son frecuentemente usadas en su identificación. Es una bacteria microaerófila que no tolera altas concentraciones de oxígeno en su medio, pero requiere al menos 2% de O_2 para sobrevivir debido a que lo utiliza como aceptor final de electrones. Además de catalasa (KatA), expresa enzimas tales como superóxidodismutasa (SodB) y alquilhidroperóxido reductasa (AhpC) las cuales le confiere resistencia al estrés oxidativo producido por el sistema inmune. (7)

Otro de las componentes claves que caracteriza metabólicamente a *H. pylori* es la presencia de la enzima citoplasmática ureasa, la cual participa no sólo en el metabolismo del nitrógeno (síntesis de aminoácidos) sino que también le confiere resistencia al medio ácido del estómago (permite la colonización) además de ser considerado como un factor de virulencia.(7)

Ésta enzima es vital para el mantenimiento de la homeostasis del pH en el espacio periplásmico de la bacteria, el cual es mantenida a valores de pH alrededor de 6.1 a pesar de presentarse un pH externo tan bajo como de 2.0. Este pH del espacio periplásmico facilita el mantenimiento de un pH citoplasmático de 7.0 y un potencial transmembrana de -100mV ($\Delta\psi$), condiciones que permiten el crecimiento de *H. pylori* en el nicho gástrico.(11, 12)

La enzima ureasa, se trata de una metaloenzima de alto peso molecular que cataliza la hidrólisis de urea como se muestra en la siguiente reacción(7, 13):



El transporte de urea hacia la célula es facilitada gracias a un canal pH dependiente denominado UreI, el cual permite que la urea tenga acceso a la ureasa citoplasmática y de ésta manera se garantiza la producción intrabacteriana de NH_3 y CO_2 . El NH_3 producido migra hacia el espacio periplásmico y junto a otro mecanismo en el que participan anhidrasas carbónicas, ayuda a mantener el pH neutro del espacio periplásmico. También puede alcalinizar en cierto grado el medio externo cuando logra difundir a través de la membrana externa.(12)

2.2.2 DETERMINANTES PATOGENICOS DE *HELICOBACTER PYLORI*

Los determinantes patogénicos de *H. pylori* pueden ser divididos en dos grupos: los factores de mantenimiento, los cuales le permiten a la bacteria colonizar y mantenerse en el hospedero y los factores de virulencia, los cuales contribuyen a la patogenicidad producida por la bacteria. Los factores de virulencia a su vez contribuyen con los tres mayores efectos producidos por *H. pylori*: inflamación gástrica, disrupción de la barrera gástrica y alteración de la fisiología gástrica. Es posible que varios de los factores funcionen tanto como factores de mantenimiento como de virulencia.

Tabla N°1: Factores de mantenimiento presentes en *H. pylori* (7, 14, 15)

Motilidad
- Flagelo: Movimiento activo a través de la mucina
Enzimas adaptativas
- Ureasa: resistencia al medio ácido - Catalasa y Superóxidodismutasa: Resistencia a los leucocitos polimorfonucleares (PMN) - Homólogos de las proteínas de choque térmico
Adhesinas y receptores celulares
- BabA(HopS): Proteína de adhesión mejor caracterizada que media la unión con antígenos sanguíneos fucosilados Lewis b (Le ^b) presentes en las células del hospedero. - OipA(HopH): Asociada con incremento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de IL-8. - SabA(HopP): Unión a antígenos sialil-Le ^x y Sialil Le ^a (inflamación crónica y atrófica).

Evasión del sistema inmune

- Diversidad genética
- Mimetismo molecular-Antígenos Lewis (LPS)
- Evasión de la respuesta innata: Previene la producción de NO a través de la enzima arginasa.
- Citotoxina Vacuolante (VacA): Interfiere con la vía de señalización de IL-2 y por tanto disminuye la proliferación y activación de células T (inmunidad adaptativa). Interfiere también con la presentación de antígenos mediados por MHC II.

Tabla N°2: Factores de virulencia de *H. pylori* (7, 14, 15)

Inducción de la inflamación gástrica persistente

- Lipopolisacáridos: Modulan la actividad inflamatoria, debido principalmente a la inusual estructura del lípido A. Además cadenas laterales presentes en los LPS presentan homología con antígenos Lewis (mimetismo molecular).
- Inducción (BabA y CagA) de la secreción de IL- 8 por parte de células epiteliales y macrófagos: potente mediador inflamatorio responsable del reclutamiento y activación de neutrófilos (Inmunidad innata).
- Inducción de la producción de citoquinas por parte de macrófagos como IL-12 permite el reclutamiento de células T (principalmente) y células B (inmunidad adaptativa).
- Ureasa: Activación de los fagocitos mononucleares y producción de citoquinas pro-inflamatorias en etapas iniciales de la infección.

Disrupción de la barrera mucosa gástrica
<ul style="list-style-type: none"> - Fosfolipasas: <i>H. pylori</i> interrumpe la capa protectora de fosfolípidos en la membrana apical de las células mucosas. - Mucinasas - Citotoxina Vacuolante (VacA): Formación de canales en la membrana, inducción de apoptosis (epitelio gástrico). - Citotoxina asociada al gen A (CagA) y el aparato de secreción tipo IV (PAI): Cambios conformacionales de las células epiteliales, inmuno-modulación (apoptosis de las células T) - Especies reactivas de oxígeno por parte de neutrófilos.
Alteración de la homeostasis gástrica
<ul style="list-style-type: none"> - Disminución de la secreción de somatostatina - Hipergastrinemia - Disminución de la respuesta de las células parietales a la gastrina

2.2.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR *HELICOBACTER PYLORI*

Quando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial que puede permanecer sin mayor complicación durante el resto de la vida o al cabo de años o décadas contribuir con el desarrollo de enfermedades digestivas de diferente gravedad (Ver Figura N°1).(7)

Quando se estudia a un grupo de poblaciones infectadas con *Helicobacter pylori* y que presentan gastritis se pueden diferenciar dos patrones: el primero de ellos afecta preferentemente a la mucosa antral, cursa sin atrofia, es más frecuente

en áreas industrializadas y se relaciona con un elevado riesgo de presentar úlcera duodenal y un bajo riesgo de carcinoma gástrico. El segundo patrón conocido como pangastritis o gastritis atrófica multifocal afecta la totalidad de la mucosa gástrica, es más prevalente en países subdesarrollados y se asocia con una elevada incidencia de adenocarcinoma.(16)

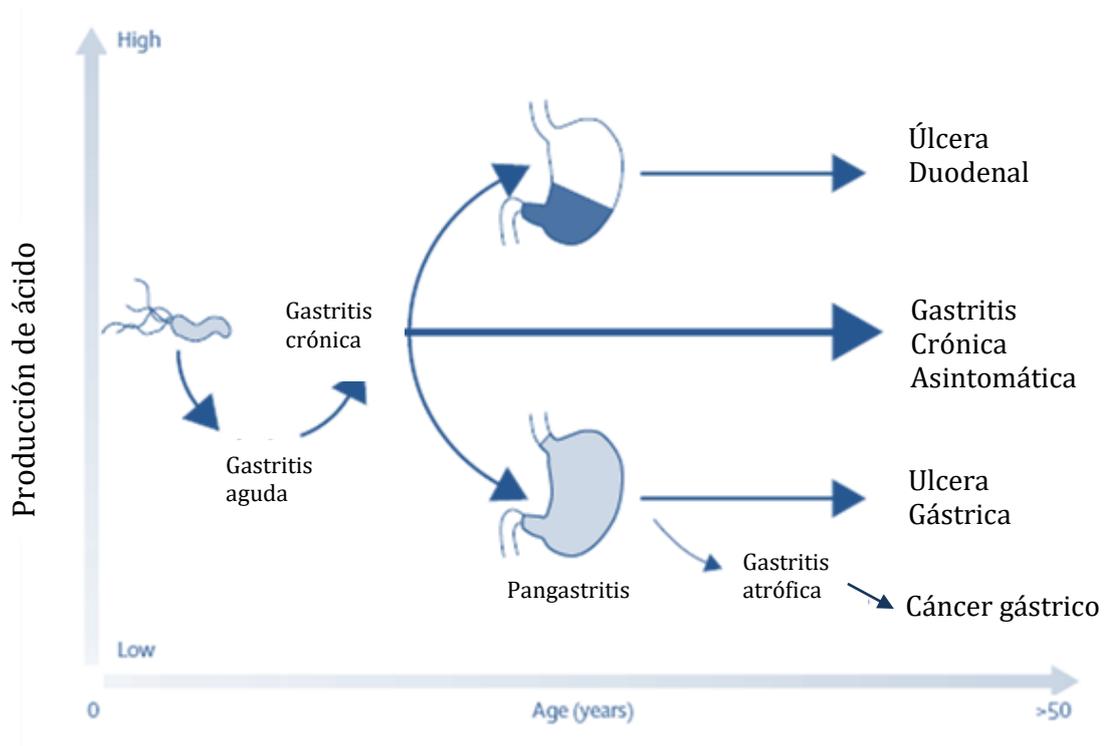


Figura N° 1: Representación de la historia natural de la infección con *Helicobacter pylori*. Fuente: Gerrits M. et al (17)

La aparición de estas diferentes manifestaciones digestivas de diferente gravedad depende de la compleja interacción de factores del hospedero, ambientales y bacterianos.(7-9)

2.2.4 TRATAMIENTO Y RESISTENCIA

Entre las principales indicaciones para la erradicación de *Helicobacter pylori* dadas por el consenso de Maastricht II (2000), se tiene a úlcera gástrica y duodenal, gastritis atrófica y el Linfoma gástrico (MALT).(18, 19)

A diferencia del segundo y tercer consenso de Maastricht, el cuarto consenso (2012) toma en cuenta la prevalencia de resistencia a Claritromicina para la elección del tratamiento de primera y segunda línea. (18-20)

Tabla N°3: Guía usada para el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* basada en las directrices del consenso de Maastricht IV-2012.

Régimen	Regiones con baja prevalencia de resistencia a Claritromicina	Regiones con alta prevalencia de resistencia a Claritromicina
Primera línea	- PPI*+Claritromicina Amoxicilina/Metronidazol ó - Terapia cuádruple con Bismuto	-Terapia cuádruple con Bismuto. Si no está disponible: - Terapia cuádruple (Secuencial o concomitante).
Segunda línea	- Terapia cuádruple con Bismuto ó - PPI*+Levofloxacino/Amoxicilina	- PPI*+Levofloxacino/Amoxicilina
Tercera línea	Basado solamente en Test de susceptibilidad	

Nota: Baja prevalencia de resistencia a Claritromicina: < 20%, alta prevalencia de resistencia a Claritromicina: >20%. PPI*: Inhibidor de bomba de protones.

Un meta-análisis reportó de manera general las tasas mundiales de resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento frente a *H. pylori*: 17%

para claritromicina, 26.7 % para metronidazol, 11.2% para amoxicilina, 16.2% para levofloxacino, 5.9 % para tetraciclina y 1.4% para rifabutina. En promedio, la tasa de prevalencia de resistencia a claritromicina, metronidazol y levofloxacino se incrementó significativamente en Europa, Asia, América y África. Sin embargo se tiene que tomar en cuenta que estos valores reflejan solo un aumento en los porcentajes de resistencia a nivel mundial y tiene que analizarse de acuerdo a cada región geográfica y los factores asociados a cada población.(21)

La efectividad de los tratamientos más recomendados ha disminuido a niveles alarmantes de erradicación (70-85%) debido principalmente al desarrollo de resistencia a claritromicina. El tercer y cuarto consenso de Maastricht recomienda precisamente que el umbral de resistencia a claritromicina en el que este antibiótico no debería ser usado es de 15-20%. Es de suma importancia entonces que los médicos estén al tanto de la prevalencia de resistencia de los antimicrobianos a nivel local o regional, así como la eficacia de los tratamientos en la práctica clínica y las nuevas terapias alternativas que están creciendo en popularidad (de terapias secuenciales, cuádruples, concomitantes así como la combinación de nuevos y los ya comúnmente antibióticos utilizados).(22, 23)

En el Perú, la alta prevalencia de infección por *H.pylori* no es ajena a los porcentajes obtenidos a nivel mundial, sobre todo en zonas de nivel socioeconómico bajo; por lo tanto es necesario evaluar la efectividad de los tratamientos típicamente recomendados. Según dos estudios publicados en el

2003 la combinación típica de omeprazol de 20 mg (PPI), claritromicina de 500mg y amoxicilina de 1g dos veces al día durante 14días, permite porcentajes de erradicación aceptables. Uno de los estudios fue realizado en un pueblo joven de las pampas en San Juan de Miraflores, mientras que el segundo se trató de un estudio multicéntrico realizado en el Policlínico Peruano Japonés y en el Hospital Militar Central.

En el estudio realizado en las Pampas de San Juan, la prevalencia de resistencia “*in vitro*” de *H.pylori* aislado de pacientes con dispepsia fue de 52% (CMI ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$) para metronidazol, 27%(CMI ≥ 0.125 $\mu\text{g/mL}$) para claritromicina y 7% (CMI ≥ 0.037 $\mu\text{g/mL}$) para amoxicilina. A pesar del alto porcentaje de resistencia obtenido tanto para metronidazol como para claritromicina se alcanzó un porcentaje de erradicación en 93% de los pacientes utilizando como régimen de tratamiento la combinación de omeprazol, claritromicina y amoxicilina por catorce días en las dosis recomendadas (Ver Tabla N°3).(8)

Sin embargo, en el segundo estudio realizado en el Policlínico Peruano Japonés y en el Hospital Militar Central se evaluó solo la resistencia “*in vitro*” a claritromicina que fue de 8.82% (CMI ≥ 0.125 $\mu\text{g/mL}$), mientras que se alcanzó un porcentaje de erradicación del 83% con dos tratamientos similares al descrito en el primer estudio.(24)

A pesar que ambos estudios respaldan la efectividad del tratamiento convencional de primera línea, no representan datos actualizados de resistencia a los medicamentos ya mencionados, por lo tanto es prudente realizar un monitoreo del perfil de resistencia en el futuro y continuar con las evaluaciones de eficacia de este esquema de tratamiento en nuestro país, teniendo en cuenta también la alta tasa de recurrencia de infección por *H. pylori* presente en nuestro medio.(8)

2.2.5 PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*.

Dado que el uso y orígenes de la fitoterapia están basados en conocimientos empíricos, durante los últimos años se ha incrementado el interés no sólo por acumular evidencia que respalden la eficacia y seguridad del uso de plantas medicinales; sino que también permitan identificar los principios activos responsables de su actividad.

El estudio de los extractos, fracciones parcialmente purificadas y compuestos aislados a partir de las plantas medicinales es típicamente subdividido en dos grupos. El primer grupo consiste en estudios de actividad *in vivo*, utilizando modelos animales o ensayos clínicos, mientras que el segundo grupo consiste en estudios de actividad *in vitro* usando cultivos puros de *H. pylori* obtenidos a partir de aislados clínicos o cepas de referencia.(25)

Este segundo tipo de estudios son los más abundantes en la literatura y evalúan la inhibición del crecimiento de *H. pylori*, inhibición de la inflamación

(inducida por *H. pylori* en células gástricas, macrófagos o células HeLa), así como el efecto de los extractos, fracciones y/o compuestos aislados en la adherencia de *H. pylori* a células epiteliales.

2.2.5.1 Productos naturales comúnmente consumidos en la dieta

Dentro del grupo de productos naturales que cuentan con estudios clínicos encontrados en fuentes como Pubmed y Scopus se destacan aquellos que son consumidos normalmente en la dieta. Estos productos naturales han sido utilizados desde tiempos inmemorables para aliviar enfermedades gastrointestinales y su mecanismo no está muy bien establecido.(26)

En una revisión realizada por Raman et al, se encontró que el aceite de oliva, el brócoli, el arándano, la canela, el propóleo, la curcumina, así como otras especies consumidas en Asia y el Mediterráneo como *Nigella sativa* y *Prunus mume*; cuentan con estudios de su actividad *in vitro* e *in vivo*, además de estudios clínicos a pequeña escala.

Uno de los productos naturales ampliamente estudiado es el germinado de brócoli. De este producto se ha aislado el sulforafano al que se le ha atribuido mediante experimentos *in vitro*, además de actividad anti-*Helicobacter pylori*, actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena. Con respecto a los estudios realizados con grupos de pacientes, se puede encontrar en la literatura estudios piloto realizados independientemente por Galan et al y Yanaka et al. Los resultados obtenidos por estos estudios, si bien no justifican el efecto terapéutico del consumo del brócoli, sugieren que el consumo regular de este producto

natural puede mejorar la resistencia del sistema gastrointestinal frente a la infección causada por *H. pylori*.(26)

Así como con el brócoli, con los demás productos antes mencionados no se obtiene una erradicación estadísticamente significativa cuando estos productos naturales son usados en ensayos clínicos. Sin embargo, se tiene que tomar en cuenta que sólo existe un número limitado de estudios y la mayoría de estos se realizaron con un número pequeño de pacientes; por lo tanto investigaciones adicionales a mayor escala permitirán evaluar con mayor exactitud su eficacia y seguridad.(25, 26)

2.2.5.2 Plantas medicinales con actividad anti-*Helicobacter pylori*

Incluso mucho antes de la identificación de *H. pylori* en los inicios de año 1980, las plantas fueron y son usadas para tratar enfermedades que hoy son asociadas con la infección de éste patógeno; por lo tanto los esfuerzos por elucidar los mecanismos a través de los cuales la plantas medicinales ejercen su actividad estuvieron enfocados en sus efectos gastro-protectores, antiácidos y antiinflamatorios.(25, 27)

En años recientes se ha incrementado el interés por determinar la acción directa de las plantas y sus compuestos sobre *H. pylori*. Con el objetivo de estandarizar las condiciones necesarias para el cálculo de la actividad mínima inhibitoria de compuestos *H. pylori* se han propuesto dos métodos, uno propuesto por el Comité Nacional para la Estandarización Clínica de Laboratorio (NCCLS actualmente CLSI) y otro propuesto por el Grupo Europeo de estudio de *H. pylori*. A pesar que éstas guías han realizado importantes recomendaciones para

la estandarización los procedimientos de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y muchos estudios han comenzado a aplicarlos, los estudios *in vitro* aún carecen de una normalización que permita realizar un análisis comparativo de la efectividad y por tanto el establecimiento de un intervalo de inhibición significativo. Por otro lado se tiene que considerar que estas guías son propuestas para pruebas con compuestos puros, su estricta utilización debe ser ajustada cuando se trabaja con extractos crudos, principalmente en el caso de que sean apolares, ya que su susceptibilidad está restringida en el método de dilución en agar.(27, 28)

Numerosos estudios han categorizado los resultados de actividad *in vitro* de los extractos de plantas, fracciones parcialmente purificadas y compuestos aislados; de acuerdo a su concentración mínima inhibitoria (CMI): (1) Excelente actividad (CMI:< 10 µg/mL); (2) Buena actividad (CMI: 10-100 µg/mL); (3) Actividad moderada (CMI: 100-1000 µg/mL); y (4) Actividad débil (CMI: >1000 µg/mL). (29)

Tomando en cuenta esta clasificación, se presenta a continuación la Tabla N° 4 (ver ANEXO N°1), en la cual se hizo una recopilación de las plantas cuyos extractos o fracciones obtuvieron valores de CMI (72 horas) < 250 µg/mL. A pesar que se puede encontrar en la literatura numerosos estudios que presentan extractos y fracciones a los que se les podría atribuir una muy buena actividad; sólo se incluyeron en esta lista aquellos que reportaban valores adecuados de actividad de las drogas de referencia (amoxicilina, claritromicina, metronidazol y

en algunos casos ampicilina) frente a por lo menos una cepa de *H. pylori* de referencia (Por ejemplo: ATCC 43504).

Tabla N° 4: Plantas y extractos con actividad *in vitro* anti- *H. pylori*

Nombre científico	Parte usada	CMI µg/mL	Referencia
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Ginger)	Rizomas	10- 160	2006 Nostro et al (30)
<i>Myristica fragrans</i> Houtt	Semillas	3,1-25	2005 Mahady et al (31)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Hojas	12,5-100	
<i>Achillea millefolium</i> L.	Partes aéreas	1,6-100	
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Partes aéreas	50-100	
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Semillas	50-100	
<i>Origanum majorana</i> L.	Partes aéreas	50-100	
<i>Carum carvi</i> L.	Semillas	100	
<i>Elettaria cardamomum</i> L.	Semillas	3,1 - >100	
<i>Gentiana lutea</i> L.	Raíces	3,1 - 100	
<i>Juniper communis</i> L.	Frutos	25 - 100	
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Flores	100 - >100	
<i>Melissa officinalis</i> L.	Hojas	100 - >100	
<i>Mentha piperita</i> L.	Hojas	25 - 100	
<i>Aristolochia paucineris</i> Pomel	Hojas	1 - 32	2001 Gadhi et al (32)
	Rizomas	1 - 64	
<i>Geranium wilfordii</i> Maxim	Toda la planta	~40	2013 Zhang et al (33)
<i>Tephrosia purpurea</i> L.	Toda la planta (sin raíces)	50	2009 Chinniah et al (34)
<i>Abrus cantoniensis</i> Bge.	Partes aéreas	40	2005 Li et al (35)
<i>Saussurea lappa</i> Clarke	Raíces	40	
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb	Flores	40	
<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	Hojas	60	
<i>Fritillaria thunbergii</i> Miq.	Tallos	60	
<i>Magnolia officinalis</i> Reh&Wils.	Corteza	60	
<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Frutos	60	
<i>Corydalis yanhusuo</i> W.T.Wang	Tallos	60	
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Frutos	60	
<i>Bupleurum chinense</i> DC.	Partes aéreas	60	
<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	Raíces	60	
<i>Prunus dulcis</i> D.A. Webb	Almendras	64-128	2013 Bisignano et al (36)
<i>Artemisia douglasiana</i> Besser	Partes aéreas	1-8	2009 Vega et al(37)

Tabla N° 5: Compuestos aislados con actividad anti - *H. pylori in vitro*

Compuesto aislado	CMI µg/mL	Referencia
Epigallocatequingallato, epicatequingallato	12,5-100	2003 Yanagawa et al (38)
12 tipos de flavonoides aislados	12,5 - >50	2002 Fukai et al (39)
GutGard (Extracto estandarizado de flavonoides)	32-64	2013 Asha et al (40)
Sulforafano	0,06 - 8	2002 Fahey et al (41)
6-Gingerol	3,1 - 100	2003 Mahady et al (42)
8-Gingerol	3,1 - 100	
10-Gingerol	0,8 - 50	
6-Shogaol	12,5 - 100	
Psoracorylifols A-E	12,5-25 (96 horas)	2006 Ying et al (43)
Resverastrol comercial	50	2011 Paulo et al (44)
Quercetin 3-metiléter	3,9	2006 Ustun et al (45)
Arjunglucosido I	3,9	2006 De Leo et al (46)
2-(Hidroximetil)anthraquinona	2	2006 Park et al (47)
Anthraquinona-2-ácido carboxílico	8	
Lapachol	4	
Plumbagina	4	
Panaxitriol	50	2001 Bae et al (48)
Dehidroleucodina	2	2009 Vega et al (37)
Ácido clorogénico y Kaempferol 4'-metiléter	6,3	2003 Konstantinopoulou et al(49)
Sivasinólido, Tatridin-A y quercetina 3-metiléter	12,5	
Altissin, desacetyl-B-cyclopyrethrosin, 1-epi-tatridin, Quercetina, Ramnetina, Isoquercetrina, Taxifolina y Eriodictyol	25-50	
Corilagina y 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-b-D-glucose	4	2013 Zhang et al (33)
(Z)- α - R-santalol	15,6 (96 horas)	2005 Ochi et al(50)
(Z)- β -santalol	7,8 (96 horas)	
(Z)-lanceol	62,5 (96 horas)	
Epicatequina, Narigenina y ácido Protocatequico	128-1024	2013 Bisignano et al(36)

2.2.5.3 Compuestos aislados con actividad anti-*Helicobacter pylori*

En la Tabla N° 5 (ver Anexo N°2) se muestra un listado de compuestos aislados a partir de plantas medicinales y con buena actividad anti-*H. pylori*. Es evidente que al tratarse de compuestos purificados, estos presentan valores de CMI mucho más bajos, sin embargo en ningún caso superan a la actividad

mostrada por el antibiótico de referencia. Usando la química médica, la química combinatoria o mediante biosíntesis, estos compuestos se perfilan como moléculas promisorias cuyo uso puede ser optimizado en base a sus actividades biológicas.(29, 51)

2.2.6 *Cordia lutea* Lamarck (Nombre común: Flor de overo)

Cordia lutea Lam. pertenece a la familia Boraginaceae, la cual consiste en cerca de 2500 especies que están distribuidas en regiones tropicales, subtropicales y templadas alrededor del mundo. Está compuesto de 117 géneros y 6 subfamilias: Boraginoideae, Cordioideae, Ehretioideae, Heliotropioideae, Hydrophyllaceae y Lennoaceae. (52)

El género *Cordia* está compuesto de árboles de hoja perenne y arbustos. Cerca de 300 especies de *Cordia* han sido identificadas alrededor del mundo y alrededor de 25 están presentes en Perú. Entre estas especies, se encuentran presentes de forma endémica: *Cordia cicatricosa*, *Cordia lippoides*, *Cordia iguaguana*, *Cordia munda*, *Cordia vargasii* y *Cordia varronifolia*; además de otras especies no endémicas más conocidas como *Cordia alliodora*, *Cordia spinescens*, *Cordia nodosa* y *Cordia lutea*.(52-54)

2.2.6.1 Clasificación Taxonómica(52)

Clase : Magnoliopsida

Subclase : Magnoliidae

Orden : Boraginales

Familia : Boraginaceae

Género :Cordia L.

2.2.6.2 Características y usos tradicionales(55)

- **Descripción morfológica:** *Cordia lutea* Lam. es un arbusto o a veces árbol de hasta 7,50 m de alto. Hojas simples sub-redondeadas a óvalo elípticas con flores de color amarillo (Figura N°2). Fruto baya, globosa, blanquecina, con el mesocarpio globoso y gomoso.
- **Distribución:** Se distribuye entre los países de Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú. En nuestro país se ubica en los departamentos de Tumbes, Piura, Cajamarca, Lambayeque, Amazonas, La Libertad, Ancash, Lima y Loreto. Distribución altitudinal: 0 -1500 m.s.n.m.
- **Hábitat:** Lugares secos y rocosos, también en costa y montañas bajas, aéreas disturbadas, matorrales y en pendientes rocosas. Frecuentemente se encuentra en borde de caminos, carreteras y chacras de cultivos dispersos e inclusive como planta ornamental en parques y jardines.
- **Información Etnomedicinal:** Las flores se usan en forma de cocimiento o infusión para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, hepáticas como la ictericia y en el dolor de riñones.(55, 56)



Figura N° 2: *Cordia lutea* Lam. (Flor de overo)

2.2.6.3 Composición química del género *Cordia*

Entre los compuestos presentes de manera frecuente en el género *Cordia* se tiene a las quinonas terpenoidales (Ver Anexo N°3).

Moir et al aislaron 6 benzoquinonas terpenoidales (cordiacromos A-F) de la madera de la especie africana *C. millenii*; así mismo evaluaron la presencia de estos compuestos en otras 16 especies de *Cordia*. Las 6 benzoquinonass terpenoidales fueron encontradas también en otras dos especies de este género: *C. goeldiana* y *C. platythirsa*; mientras que los cordiacromos A, B y C en otras especies como *C. abyssinica* (*C. africana*), *C. alliodora* y *C. gerascanthus*.(57, 58)

Una especie comúnmente encontrada en América Central, Sudamérica y el Caribe y que ha sido ampliamente estudiada es *C. alliodora*. Stevens et al realizaron el aislamiento de una geranil-hidroquinona conocida como alliodorina;

el cual es propuesto como el precursor inmediato de los cordiacromos descritos para *C. millenni* y otras especies de *Cordia*.(59, 60) También se han encontrado otros seis compuestos del tipo geranil-hidroquinona que fueron aislados a partir del extracto acetónico de esta planta: cordiacromano A, cordiaquinol C, alliodorol, allioquinol C, cordiallinol y cordiol A.(61)

A partir de *C. polycephala* y *C. curassavica* se aislaron quinonas merosesquiterpenoidales (naftoquinonas) presentes en el extracto de las raíces. Hasta ahora las quinonas terpenoidales e hidroquinonas descritas presentan un esqueleto de 16 carbonos. En contraste, las cordiaquinonas A-K aisladas a partir de *C. corymbosa* y *C. curassavica* presentaron 21 átomos de carbono. Además de estos compuestos se han aislado las cordiaquinonas L y M a partir de las raíces de *C. leucocephala*.(62-64)

Además de las benzoquinonas, naftoquinonas y sus formas reducidas (hidroquinonas) descritas hasta ahora, el género *Cordia* es conocido como una fuente diversa de metabolitos secundarios tales como sesquiterpenos, diterpenos, saponinas (triterpenoidales), flavonoides y otros compuestos fenólicos como los ácidos p-hidroxibenzoico, rosmarínico, cafeico, ferúlico y clorogénico.

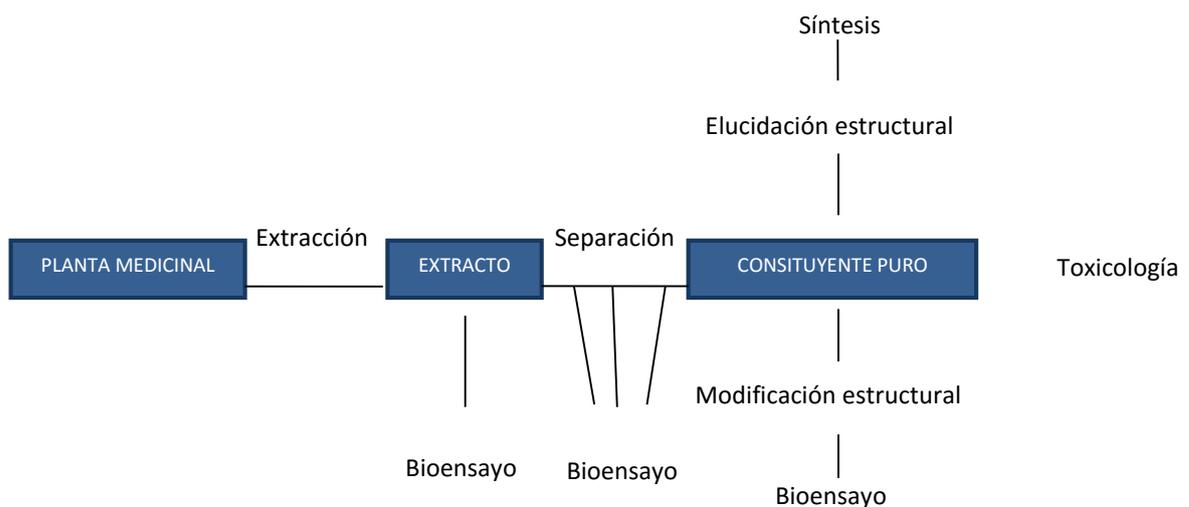
En el Anexo N°3 se presenta una lista de los compuestos antes mencionados y su presencia en distintas especies de *Cordia* que han sido objeto de estudio químico. La mayoría de estos estudios provienen de especies distribuidas en Brasil y La India. En este sentido *C. verbenacea* DC (Brazil) y *C. dichotoma* G. Forst (India) son dos especies que presentan mayor cantidad de estudios no solo

a nivel químico sino que también a nivel farmacológico (debido a su actividad antiinflamatoria, analgésica y antimicrobiana).

En el único estudio químico reportado sobre *C. lutea* Lam., se identificaron como principales componentes de esta especie a rutina, quercetina, ácido linolénico, ácido palmítico (así como su éster de glicerilo). En este mismo estudio, realizado por Mayevych et al en el 2015, se descartó la presencia de alcaloides pirrolizidínicos, reconocidos por ser responsables de la intoxicación de animales y seres humanos debido principalmente a su actividad hepatotóxica.(65)

2.2.7 AISLAMIENTO BIODIRIGIDO

El proceso que conduce a la obtención de constituyentes puros biológicamente activos a partir de la planta es largo por lo que requiere una colaboración multidisciplinaria y usualmente incluye los siguientes pasos:



Esquema N° 1: Procedimiento para obtener principios activos de plantas. Fuente: Hamburger y Hostettman (1991). (66)

En la primera etapa del bioguiaje las fracciones pueden ser divididas físicamente, como las dos fases que se obtienen en una extracción líquido-líquido.(67)

En etapas posteriores del aislamiento biodirigido se hace uso de cromatografía en columna. Para realizar el fraccionamiento de aquellas fracciones que presentaron mayor actividad es aconsejable no generar demasiados sub-fracciones, ya que podría dispersar el o los compuestos activos de modo que se corre el riesgo de evitar su detección. Es más sensato recoger sólo unas pocas sub-fracciones, unir aquellas que tengan un perfil cromatográfico similar y continuar el fraccionamiento cromatográfico con aquellas que tuvieron más actividad.(67)

Se pueden obtener sub-fracciones de tamaño uniforme cuando se ejecuta la separación de las fracciones antes mencionadas a través de una columna cromatográfica, seguido por su análisis mediante el bioensayo para determinar aquellas que contienen los compuestos activos, sin embargo debe tenerse en cuenta que efectos de sinergismo o de adición en las mezclas o extractos frecuentemente causan la pérdida de actividad durante el fraccionamiento biodirigido.

El proceso de elucidación estructural implica tanto la acumulación de la información estructural obtenida de numerosas fuentes como la asimilación de estos datos en la estructura química, que rigurosamente hace encajar la

información estructural disponible. Las siguientes técnicas espectroscópicas se utilizan generalmente para la determinación de la estructura de productos naturales. (67)

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS) proporciona información sobre los cromóforos presentes en la molécula. Algunos productos naturales, por ejemplo, flavonoides, alcaloides de isoquinolina y cumarinas, por nombrar algunos, pueden ser caracterizados primariamente (clase química) por los picos de absorción característicos.

La espectroscopia infrarroja (IR) determina diferentes grupos funcionales, por ejemplo, -C=O , -OH , -NH_2 , Aromaticidad, etc., presentes en una molécula.

La espectrometría de masas (MS) proporciona información acerca de la masa molecular, fórmula molecular y el patrón de fragmentación. Las técnicas más utilizadas para analizar los metabolitos secundarios de plantas medicinales son espectroscopía de masas de impacto electrónico (EIMS), espectroscopía de masas de ionización química (CIMS) y espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESIMS),

La resonancia magnética nuclear (RMN) revela información sobre el número y los tipos de protones y carbonos (y otros elementos como nitrógeno, flúor, etc.) presentes en la molécula, y las relaciones entre estos átomos. Los experimentos de RMN utilizados en la actualidad; se pueden clasificar en dos categorías principales:

- a) Técnicas de una dimensión: ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{13}C DEPT, etc.
- b) Técnicas de dos dimensiones: COSY, HMBC, HMQC, NOESY, etc.

El desarrollo y la aplicación de técnicas acopladas (HPLC-MS, HPLC-RMN, HPLC-MS-DAD-RMN, etc.) han aumentado la velocidad y sensibilidad de la determinación de estructuras

2.3 JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

La terapia triple de erradicación, basada en la utilización de dos antibióticos y un fármaco que disminuya la secreción gástrica, ha sido recomendada por más de una década como la mejor opción para el tratamiento de gastritis crónica y ulcera péptica causadas por *H. pylori*. Sin embargo, el incumplimiento del tratamiento, el desarrollo de resistencia bacteriana junto con la falta de nuevas opciones de tratamiento comprometen negativamente la erradicación de la infección y se prevé que esto pueda conducir a graves problemas para el tratamiento de los trastornos asociados a la infección por este patógeno en un futuro cercano.(7, 17, 23)

Mientras se lleva a cabo el desarrollo y la implementación de nuevas guías de tratamiento frente a la infección con *H. pylori*, se han propuesto nuevos regímenes terapéuticos entre los que destacan el uso de probióticos, agentes nutricionales y plantas medicinales. Una gran variedad de especies han sido analizadas en el mundo (principalmente *in vitro*) sin embargo la mayoría de estudios se han realizado utilizando extractos crudos, por lo que no se tiene claro cuáles son los componentes activos responsables de la actividad anti-*H. pylori*.(25, 29)

Se calcula que el Perú posee unas 25 000 especies de plantas conocidas, con 17 144 especies de plantas con flores (Angiospermas y Gimnospermas), de las cuales 5 354 (31,3%) son especies nativas. *C. lutea* es una especie utilizada en el

Perú y los pocos estudios que existen en la literatura respecto a esta especie tienen que ver con su estudio etnobotánico. (4)

El descubrimiento de nuevos compuestos con actividad *anti-H.pylori*, presentes en una planta medicinal de amplio uso, proporciona las bases científicas para la promoción de su uso como una alternativa mucho más económica a la quimioterapia. Conocer la estructura química de los compuestos activos, así como la cantidad de estos compuestos presentes en la preparación tradicional podría permitir también el desarrollo de extractos con una composición controlada de principios activos conocidos (Fitomedicamentos), de modo que éstos puedan tener participación en el mercado peruano. Todo esto contribuye sin duda alguna a la valorización económica de la biodiversidad y en el desarrollo económico del país.

Por último, este tipo de estudios también ofrece grandes posibilidades para que los compuestos nuevos aislados puedan servir como candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que hagan frente a la infección por éste patógeno.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar el aislamiento biodirigido y caracterización de uno o más compuestos anti-*Helicobacter pylori* a partir de las flores de *Cordia lutea* Lam.

2.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la CMI y la CMB de las fracciones, sub-fracciones aislados a partir de las flores de *Cordia lutea* Lam.
- Caracterizar químicamente los compuestos activos mediante, espectroscopía de masas (MS) y RMN 1D (¹H-RMN, ¹³C-RMN) y 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY).
- Evaluar de la toxicidad *in vitro* de los productos aislados.

2.5 HIPÓTESIS

Es posible realizar el aislamiento biodirigido y caracterización de compuestos anti-*Helicobacter pylori* a partir de las flores de *Cordia lutea* Lam.

III. METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES

3.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.2.1 Material vegetal

Las flores de *C. lutea* fue adquirida el mes de julio en el mercado mayorista de la ciudad de Trujillo, departamento de La Libertad, Perú. La identificación taxonómica fue realizada por el biólogo Severo Baldeón del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y fue depositada en el herbario.

3.1.2.2 Cepa bacteriana

Para la realización de los bioensayos (CMI y CMB) se utilizó una cepa de referencia (CIP 103995) proporcionada por la unidad UMR 152 (IRD-PHARMADEV) de la universidad de Toulouse. Esta cepa es equivalente a la cepa ATCC43504.

3.1.2.3 Línea Celular

Se utilizó una línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7, proporcionada por el Laboratorio de parasitología celular (208) – LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.1.3 MATERIALES Y REACTIVOS DE LABORATORIO

3.1.3.1 Reactivos y solventes

- Etanol comercial de 96°
- Dimetilsulfóxido-DMSO (Sigma)
- Éter de petróleo grado HPLC (JT Baker)
- Diclorometano grado HPLC (JT Baker)

- Metanol grado HPLC (JT Baker)
- Acetato de etilo grado HPLC (JT Baker)
- Acetonitrilo grado HPLC (JT Baker)

3.1.3.2 Materiales utilizados en los bioensayos

- Medio infusión cerebro corazón (BHI-BBL)
- Suplemento selectivo para Campilobacter: skirrow (Oxoid)
- Isovitalex (BBL)
- Suero fetal bovino (SFB)
- Antibióticos: Amoxicilina (A8523), Claritromicina (C9742), Metronidazol (M3761) y Anfotericina B (A2411) (Sigma Aldrich).
- Mezcla de gases: 5% O₂, 10% CO₂, y 85% N₂

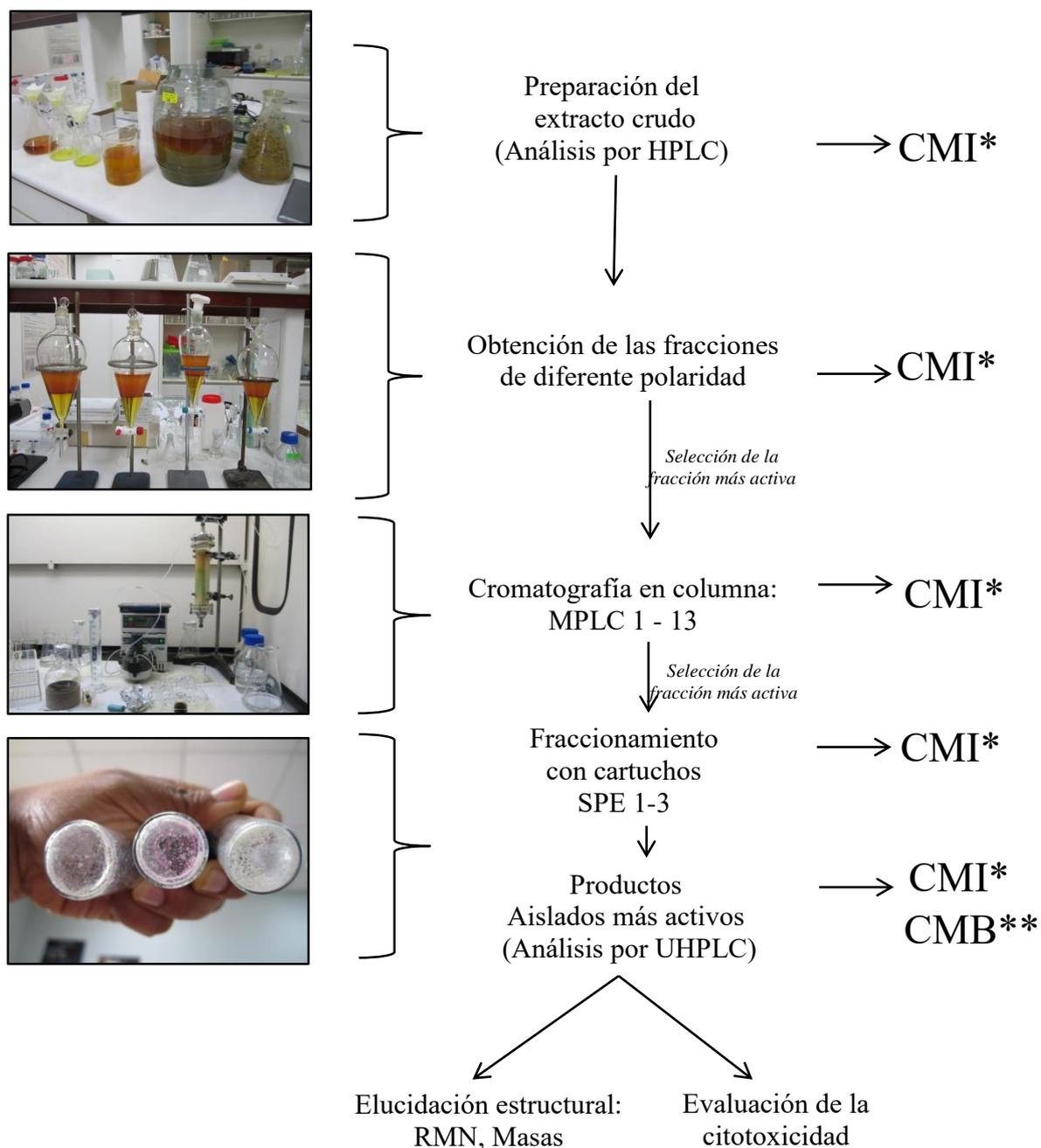
3.1.3.3 Otros

- Sílica gel 60°A (0.0154-0.040 mm, Merck, Germany).
- Cartuchos SPE (Solid Phase Extraction) empacadas con sílica gel de 0.045 mm (Chromabond, Macherey-Nagel).
- Cromatofolios de sílica gel 60°A (0.0154-0.040 mm) con soporte de aluminio e indicador de fluorescencia F254 de 20cm x 20cm (Merck, Germany).
- Jarra de anaerobiosis (Merck)
- Placas de 96 pocillos.

3.1.4 EQUIPOS DE LABORATORIO

- Rota-evaporador Büchi R-200
- Equipo de ultrasonido (Branson 3520)
- Centrífuga (Hettich D 78532)
- Estufa (Venticell)
- Balanza analítica (Ohaus adventurer)
- Bomba Büchi Modulo C-605 (MPLC)
- Controlador Büchi C-615 (MPLC)
- Columnas de borosilicato para MPLC:
 - MPLC 1 : 230 mm de largo x 36 mm de d.i. (Büchi 19675)
 - MPLC 2-10 : 230 mm de largo x 15 mm de d.i. (Büchi 28139)
 - MPLC11-13: 100 mm de largo x 15 mm de d.i. (Büchi 25559)
- Incubadora (NUAIRE)

3.2 MÉTODOS



Esquema N° 2: Metodología del aislamiento bioridigido realizado a partir del extracto crudo hasta la obtención de productos purificados a partir de las fracciones más activas. *CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. **CMB: Concentración Mínima Bactericida

3.2.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Utilizando 786g flores secas y molidas de *C. lutea*, se realizó una extracción por maceración a temperatura ambiente utilizando 8L de etanol de 96°. El extracto obtenido fue filtrado y luego concentrado hasta sequedad. Este procedimiento de extracción se realizó un total de cuatro veces (cada 24 horas) hasta la obtención de 225g del extracto crudo concentrado.

3.2.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Durante todo el proceso de fraccionamiento biodirigido se utilizó el TLC para analizar el perfil de compuestos presentes en cada uno de los extractos o fracciones.

Se aplicaron 2 uL de soluciones de 1 mg/mL de los extractos o fracciones sobre la línea base de una placa (6,7cm largo x 5cm ancho) con ayuda de un capilar. El revelado de las placas de TLC se hizo con ayuda de una lámpara UV (254 nm) y utilizando revelador vainillina-H₂SO₄

3.2.3 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES DE DIFERENTE POLARIDAD (67)

3.2.3.1 Primera partición líquida-líquida con agua y diclorometano

Cada 20 g del extracto crudo fueron re-suspendidos en 250mL de agua destilada y sometidos a sonicación durante 20 minutos. El extracto re-suspendido se dejó reposar a 4°C durante 24 horas con el fin de separar un precipitado amarillo por centrifugación (10 min, 5000 RPM a 10°C). Cada 250 mL de la fase acuosa fue

particionada con 250 mL de diclorometano en un embudo de separación. La fase diclorometánica fue concentrada a presión reducida hasta la obtención de 8.82g de esta fracción.

3.2.3.2 Segunda partición líquida-líquida con éter de petróleo y metanol

La fracción diclorometánica (8.82g) fue particionada con 200mL de éter de petróleo y 200 mL de metanol:agua (9:1); utilizando un embudo de separación. Se separaron las fases y se llevaron a sequedad a presión reducida, hasta la obtención de 4.45g de la fracción éter de petróleo y 3.41 g de la fracción metanólica.

3.2.4 ANÁLISIS POR HPLC

El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), utilizando un equipo HPLC Elite Lachrom (VWR-Hitachi) equipado con una bomba L-2130 y un detector con arreglo de diodos. La separación fue realizada en una columna LiChroCART® Purospher® STAR RP-18(250 mm x 4,6 mm, 5 µm)(Merck), usando una gradiente lineal CH₃CN (A)/ H₂O (B) programada de la siguiente manera: 0–30 min de 10 A/90 B a 100 A/0 B, Se mantuvo esta última proporción por 10 minutos antes de la re-equilibración; luego del minuto 41 al 51 se programó de 100 A/0 B a 10 A/90 B. Finalmente se mantuvo esta última proporción por 9 minutos antes de la siguiente inyección. El flujo fue de 1mL/min. Se inyectaron el extracto crudo, la fracción metanólica y un estándar de

rutina (20uL, 1mg/mL) los cuales fueron analizados a 250 nm. La columna se mantuvo a 40°C durante el análisis.

3.2.5 FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LA FRACCIÓN METANÓLICA (67)

3.2.5.1 Cromatografía líquida de mediana presión (MPLC): columnas del 1 al 13

A partir de la fracción metanólica se procedió con la purificación de las fracciones más activas. Las características de la columna, cantidad de sílica gel, fase móvil y demás características del sistema utilizado para cada una de las columnas se describen en el Anexo N°4.

3.2.5.2 Fraccionamiento con columnas SPE (Solid Phase Extraction)

Se siguió realizando el fraccionamiento a partir de las fracciones SC1, SC2 y SC3, utilizando para cada una de las muestras columnas SPE 1,2 y 3 respectivamente, las cuales fueron eluidas con diclorometano previamente a la colocación de la muestra y se recogieron fracciones de 1mL.

Tabla N°6: Sistema de elución para SPE 1,2 y 3

SPE	Muestras	Peso (mg)	Fase móvil	Proporción	Volumen (mL)
SPE1	SC1	60	Diclorometano: metanol	9.75:0.25	40
SPE2	SC2	73	Diclorometano: metanol*	9.75:0.25	20
				9.5:0.5	30
SPE3	SC3	46	Diclorometano: metanol*	9.75:0.25	20
				9.5:0.5	20

*En estas columnas se empezó con una proporción de fase móvil y luego se le aumentó la polaridad.

El agrupamiento de las fracciones fue realizado de acuerdo a su perfil obtenido en TLC. Estas fracciones fueron concentradas a presión reducida.

3.2.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y BACTERICIDA (CMB)(68)

3.2.6.1 Cepa bacteriana

Se utilizó una cepa de referencia (CIP 103995). El cultivo de la cepa de referencia se realizó en placas de agar Skirrow. La incubación se llevó a cabo durante 7-10 días a 37 °C y en condiciones microaerófilas. La identificación se llevó a cabo de acuerdo a su requerimiento de crecimiento en condiciones microaerófilas, morfología, tinción Gram, pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa) y

amplificación mediante PCR (ARNr 16S). Además fue caracterizada de acuerdo a su perfil de susceptibilidad los antimicrobianos de referencia. Finalmente fue criopreservada en caldo BHI suplementado con 10% de glicerol a -70°C hasta su uso.

3.2.6.2 Preparación del inóculo

El cultivo stock de la cepa de referencia (a -70°C) fue sub-cultivada en placas de agar BHI suplementadas con sangre de cordero (10%), skirrow (Vancomicina 5 mg, Polimixina B 1250IU, Trimetropina 2.5 mg), Anfotericina B (0.025%) e Isovitalax (1%). La incubación se llevó a cabo durante 3 días a 37 °C y en condiciones microaerofílicas descritas anteriormente. A partir de estas placas se prepararon suspensiones bacterianas en caldo BHI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) hasta obtener una concentración final de $\sim 2 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.

3.2.6.3 Determinación de CMI y CMB

La actividad anti-*H. pylori* se evaluó mediante la técnica de microdilución en caldo. Se determinó la CMI por triplicado para extractos y fracciones; mientras que para las fracciones aisladas a partir de *C. lutea*: SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2) se determinó la CMI por triplicado y en tres experimentos independientes.

En una placa de 96 pocillos se realizó una dilución seriada a partir de una solución stock de la muestra y utilizando medio BHI suplementado con 10% de

suero fetal bovino (SFB) hasta obtener un volumen final de 50 μ L por pocillo. Se añadió 50 μ L del inóculo bacteriano (Concentración final de $\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL), de modo que se evaluaron concentraciones finales entre 125-1000 μ g/mL para el extracto y las fracciones, y de entre 3.9-125 μ g/mL fracciones más puras. Para los antibióticos de referencia se trabajó con concentraciones recomendadas por la CLSI. (28)

Las placas se incubaron en condiciones microaerofílicas a 37°C por 72 horas y la CMI se determinó visualmente como la mínima concentración del extracto, fracción o droga de referencia donde se observó la total inhibición del crecimiento bacteriano.

A parte del control positivo (antibióticos de referencia), se preparó un control negativo de crecimiento bacteriano, un control de esterilidad del medio, un control de turbidez (medio más muestra) y un control para el DMSO (concentración final en los pocillos fue de 1%).

También se realizó la determinación de la CMB de las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2). Se sembró 10 μ L del contenido de cada pocillo (de la placa de determinación de CMI) donde se determinó visualmente la inhibición del crecimiento, en una nueva placa con pocillos que contienen 190 μ L de caldo BHI (10% SFB). Finalmente la placa se incubó bajo condiciones microaerofílicas a 37°C por 48 horas. El CMB se determinó de manera visual como la mínima concentración que elimina el crecimiento bacteriano.

3.2.7 EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD (69)

El ensayo de Citotoxicidad fue realizado en el Laboratorio de parasitología celular (208) – LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por el investigador Carlos Alberto Yauri Cruz.

3.2.7.1 Cultivo celular

Se utilizaron células RAW 264.7. Estas células fueron cultivadas utilizando medio M199 completo (20% SFB y 1% glutamina) a 37°C y 5% CO₂. Para el sub-cultivo se removió el medio de cultivo con pipeta serológica estéril y enseguida se añadió 1.5 mL de 0.05% tripsina-EDTA (1X Gibco 25300). Se retiró nuevamente lo añadido y se volvió a añadir 1.5mL de la solución tripsina-EDTA para llevar a incubación a 37°C con 5% de CO₂ por 2 minutos. Pasado el tiempo se resuspendieron las células con medio M199 completo a 4°C. Se recolectaron las células y se separó una alícuota para realizar la cuantificación de células/mL.

3.2.7.2 Ensayo de Citotoxicidad

La citotoxicidad frente a las células RAW 264.7 se determinó utilizando el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio). En una placa de 96 pocillos se sembraron 10⁵ células/pocillo y se cultivaron por 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Cada una de las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2) fueron disueltas en DMSO (concentración inicial de 10 mg/mL) y añadidos a

la placa de manera que se evaluaron concentraciones finales de 100, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$. Pasado un tiempo de incubación de 48 horas en las condiciones antes descritas, se añadió 20 μL de MTT (5mg/mL). Se incubó la placa nuevamente durante 4 horas a 37°C, 5% CO_2 y protegido de la luz. Finalmente se procedió a añadir 100 μL de solución de lisis (50% de isopropanol-10% de SDS). Las sales de tetrazolium del MTT (amarillas) son reducidas por las deshidrogenasas mitocondriales presentes en células metabólicamente activas para formar cristales insolubles de formazán (azul). La absorbancia de las sales de formazán fue determinada a 570 nm con un lector de placas (Chamaleon). La concentración inhibitoria media (CI50) fue determinada a partir de un análisis de regresión lineal (% inhibición vs logaritmo de la concentración). Se usó como control positivo Anfotericina B (Se evaluaron concentraciones de 20, 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$) y los antibióticos de referencia amoxicilina, claritromicina y metronidazol (Se evaluaron concentraciones de 100, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$)

3.2.8 ANÁLISIS POR UHPLC (ULTRA HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY) DE SC1, SC2 Y SC3

El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio Mixto Internacional de Química de la Vida (LMI-LaVi) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), utilizando un equipo UHPLC Elite Lachrom (VWR-Hitachi) equipado con una bomba 2160U y un detector con arreglo de diodos L2455U. La separación fue realizada en una columna Hibar® Purospher® STAR RP-18(100 mm x 2,1 mm, 2 μm , Merck), usando como fase móvil una mezcla de CH_3CN (A)/ H_2O (B) programada de la siguiente manera: durante los primeros tres minutos se mantuvo

5 A/95 B. Luego del minuto 3 al 20 se programó una gradiente lineal de 5 A/95 B a 95 A/5 B. Durante los 2 minutos siguientes (20-22) se realizó el lavado de la columna: 100 A/0 B, manteniéndose esta última proporción por 8 minutos más antes de la re-equilibración. Del minuto 30–35 min se volvió a las condiciones originales partiendo de 100 A/0 B a 5 A/95 B, antes de realizar la siguiente inyección. El flujo fue de 0.4 mL/min. Se inyectaron 10 10uL de los compuestos SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2) (1mg/mL) los cuales fueron monitoreados a 201 nm. La columna se mantuvo a 30°C durante el análisis.

3.2.9 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL (70)

3.2.9.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y 2D: Correlation Spectroscopy (COSY), Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy (HSQC) y Heteromolecular Multiple-Bond Correlation spectroscopy (HMBC), fueron obtenidos utilizando un espectrómetro Bruker AVANCE de 500MHz en el Instituto de Química de Toulouse (Universidad Paul Sabatier Toulouse III). Los desplazamientos químicos fueron reportados en δ (ppm) usando como referencia TMS (Tetrametilsilano).

3.2.9.2 Cromatografía Líquida acoplada a Espectroscopía de Masas (LC-MS)

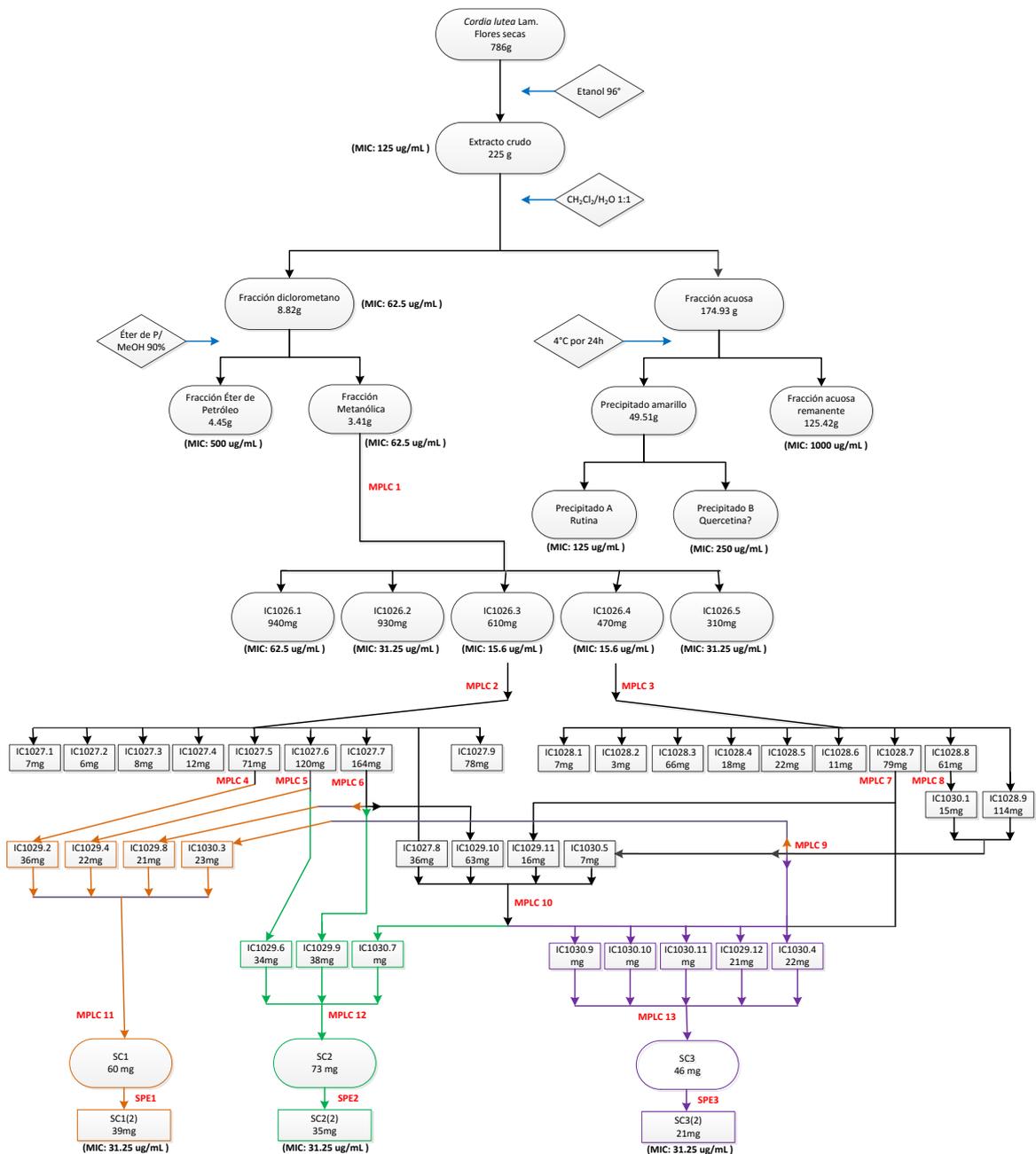
El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema de HPLC Alliance 2695 (Waters)-qTOF-MS en el Instituto de Química de Toulouse (Universidad Paul Sabatier Toulouse III). Se utilizaron las siguientes condiciones experimentales: columna Kinetex EVO RP-18 (100 mm x 2,1 mm, 2,7 μ m, Merck), fase móvil A = Acetonitrilo + 0.1% Acido fórmico, mientras que B = Agua + 0.1% Acido fórmico. El sistema de elución se programó de la siguiente manera: durante los primeros cinco minutos se mantuvo 5 A/95 B. Luego del minuto 5 al 10 se programó una gradiente lineal de 5 A/95 B a 98 A/2 B. Durante los 2 minutos siguientes (10-12) se mantuvo esta última proporción y del minuto 12–12.5 se volvió a las condiciones originales de 5 A/95, las cuales se mantuvieron del minuto 12.5 al minuto 15. Los parámetros ESI (modo negativo) fueron: Voltaje del capilar: 3 κ V, Voltaje del cono: 20 V, Voltaje del extractor: 4 V. Temperatura de la fuente: 120°C, temperatura de desolvatación: 350°C, Flujo del gas de cono: 30L/h y flujo del gas de desolvatación: 750L/h.

IV RESULTADOS

4.1 ESQUEMA GENERAL DEL FRACCIONAMIENTO

A partir del extracto crudo se fueron seleccionando las fracciones con **mayor actividad *in vitro***, es decir aquellas que presentaban menor valor de CMI sobre *H. pylori*

Esquema N°3: Esquema general del fraccionamiento



4.2 FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO

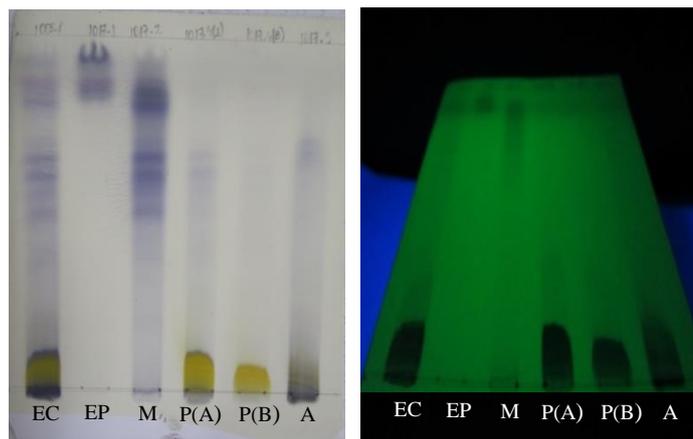
A partir de 786g de flores secas de *C. lutea* se obtuvieron 225g del extracto crudo. Luego de realizada la extracción líquida-líquida se obtuvieron 8.82g de la fracción diclorometánica. A partir de ésta fracción se obtuvieron 3.41g de la fracción metanólica; la cual concentró la actividad anti-*H. pylori*.

4.2.1 PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DEL EXTRACTO CRUDO

Tabla N° 7: Concentración mínima inhibitoria (CMI, $\mu\text{g/mL}$) de los extractos y fracciones obtenidos a partir de *C.lutea*

Extracto o Fracción	Peso obtenido (g)	CMI 72 Horas ($\mu\text{g/mL}$)
Extracto Crudo	225	125
Diclorometano	8.82	62.5
Éter de Petróleo	4.45	500
Metanol	3.41	62.5
Precipitado Amarillo-A*	49.51	125
Precipitado Amarillo-B*		250
Extracto Acuoso	174.93	1000

*: Los precipitados A y B fueron separados a partir del precipitado amarillo obtenido durante la re-suspensión del extracto crudo en agua (Ver Métodos 3.2.3.1). Nota: Valores de CMI para los antibióticos de referencia: Amoxicilina = 0.015 $\mu\text{g/mL}$, Claritromicina = 0.010 $\mu\text{g/mL}$, Metronidazol = 0.25 $\mu\text{g/mL}$.



(1)

(2)

Figura N° 3: TLC de las fracciones de *C. lutea*. EC: Extracto Crudo, EP: Éter de Petróleo, M: Metanólica, PA: Precipitado Amarillo (A y B), A: Acuoso. Fase móvil: acetato de etilo-metanol (9:1). (1)Revelador: Vainillina- H₂SO₄ (2) UV: 254 nm.

4.2.2 HPLC DEL EXTRACTO CRUDO OBTENIDO A PARTIR DE LAS FLORES DE *C. lutea*

Como resultado del análisis por HPLC se pudo verificar la presencia de rutina como compuesto principal presente en las flores de *C. lutea* (65). Durante el fraccionamiento bioguiado se extrajo este compuesto en forma del precipitado (A).

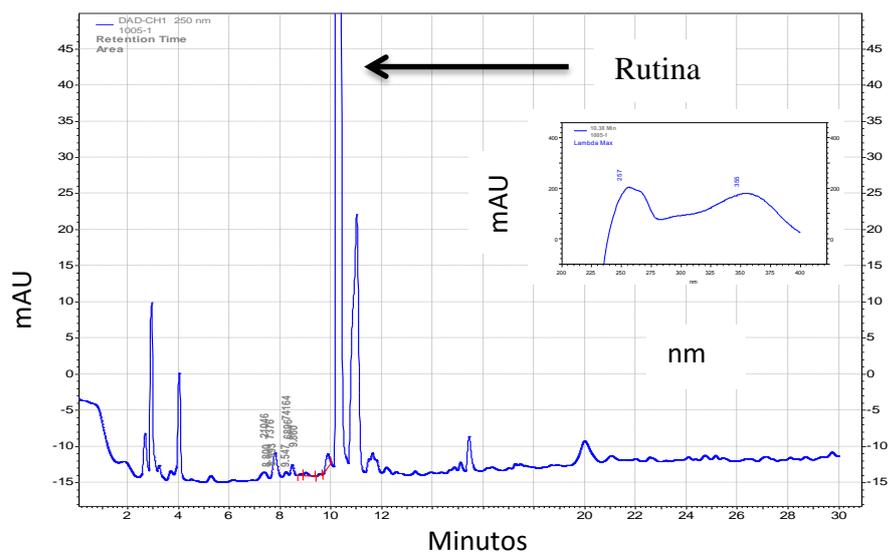


Figura N° 4: Cromatograma (HPLC) del extracto crudo etanólico de *C. lutea*

4.2.3 FRACCIONAMIENTO DE LA FRACCIÓN METANÓLICA: MPLC

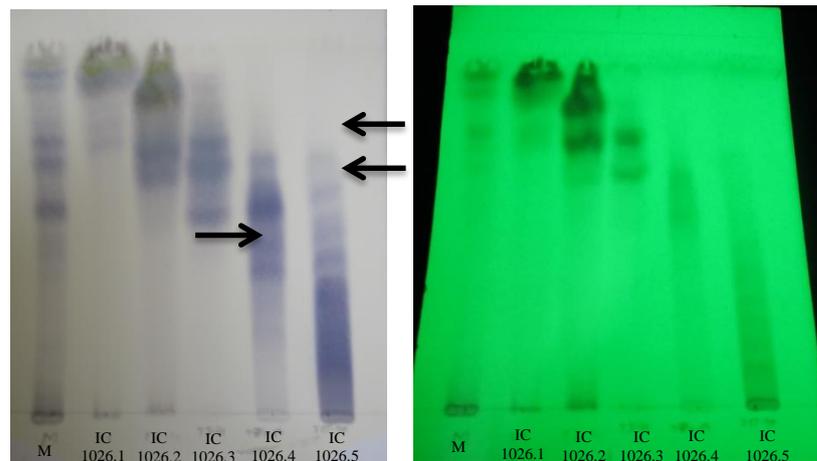
1

A partir de 3.41g de la fracción metanólica se obtuvieron 5 fracciones como se describe en la Tabla N°8. La actividad anti-*H. pylori* se concentró en las fracciones IC1026.3 e IC1026.4. En ambas, se pudieron identificar 3 fracciones que fueron aisladas en fraccionamientos sucesivos.

Tabla N° 8: Concentración mínima inhibitoria (CMI, $\mu\text{g/mL}$) de las fracciones obtenidas mediante MPLC, a partir del extracto metanólico de *C. lutea*

Extracto	Peso obtenido (mg)	CMI 72 Horas ($\mu\text{g/mL}$)
IC1026.1	940	62.5
IC2016.2	930	31.3
IC1026.3	610	15.6
IC1026.4	470	15.6
IC1026.5	310	31.3

Nota: Valores de CMI para los antibióticos de referencia: Amoxicilina = 0.015 $\mu\text{g/mL}$, Claritromicina = 0.010 $\mu\text{g/mL}$, Metronidazol = 0.25 $\mu\text{g/mL}$.



(1)

(2)

Figura N°5: TLC de las fracciones obtenidas a partir de la fracción metanólica. Fase móvil: acetato de etilo-metanol (9:1). M: fracción metanólica. (1) Revelador: Vainillina- H_2SO_4 (2) UV: 254 nm. (→): Fracciones a aislar

4.2.4 FRACCIONAMIENTOS SUCESIVOS : MPLC 2 AL 13

A partir de los MPLC 2-13 se pudieron aislar tres fracciones que se denominaron SC1, SC2 y SC3. Hasta ahora, el fraccionamiento se hizo verificando la pureza de las fracciones mediante TLC y utilizando el sistema acetato de etilo-metanol (9:1); sin embargo, luego de realizada la purificación de SC1, SC2 y SC3 se cambió el sistema de elución del TLC por diclorometano-metanol (9:1) comprobándose las fracciones no estaban puras.

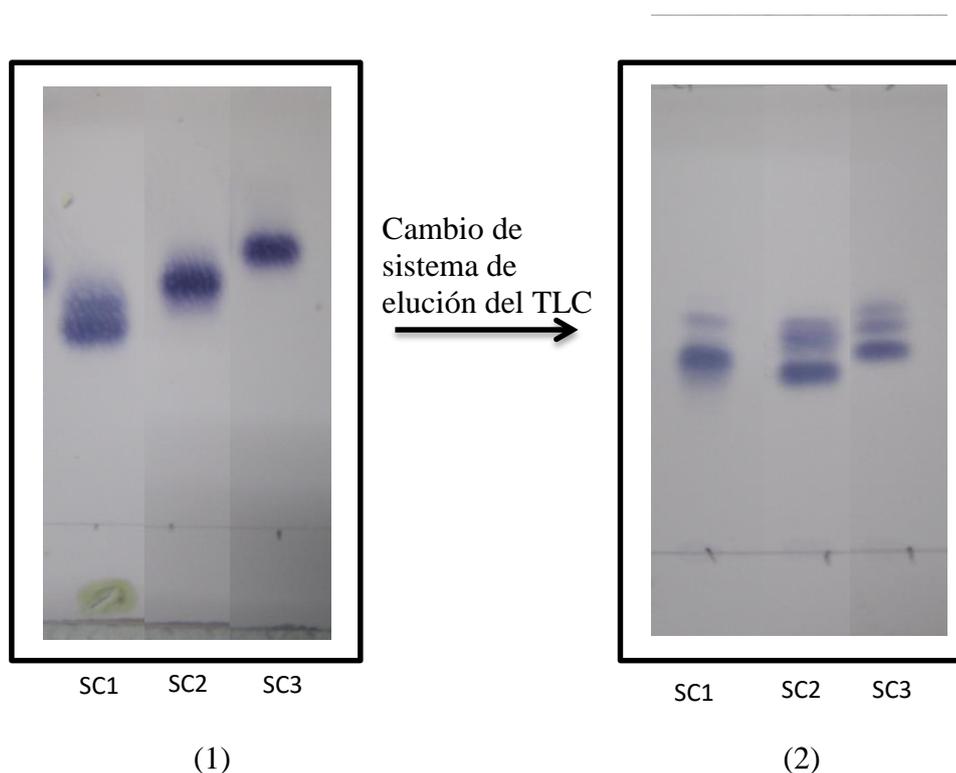


Figura N° 6: TLC de las fracciones SC1, SC2 y SC3. (1): Utilizando como fase móvil: acetato de etilo-metanol (9:1). (2): Utilizando como fase móvil: diclorometano-metanol (9:1) Revelador: Vainillina- H₂SO₄.

4.2.5 ÚLTIMA PURIFICACIÓN UTILIZANDO CARTUCHOS DE SPE

Tabla N°9: Fracciones obtenidas utilizando los cartuchos SPE1, SPE2 y SPE3

Cartucho de SPE	Tubos	Peso (mg)	Código	Nombre
SPE1	1-14	6	IC1034.1	SC1(1)
	15-18	39	IC1034.2	SC1(2)
	19-24	4	IC1034.3	-
SPE2	1-10	26	IC1034.4	SC2(1)
	11-19	35	IC1034.5	SC2(2)
SPE3	1-11	2	IC1034.6	-
	12-15	12	IC1034.7	SC3(1)
	16-23	21	IC1034.8	SC3(2)

Nota: Se obtuvieron 6 fracciones: SC1 (1) y SC1 (2) obtenidos a partir de SC1. Por otro lado SC2 (1) y SC2 (2) fueron obtenidos a partir de SC2, mientras SC3 (1) y SC (2) fueron obtenidos a partir de SC3.

Tabla N° 10: Concentración mínima inhibitoria (CMI, $\mu\text{g/mL}$) de las fracciones purificadas a partir de SC1, SC2 y SC3.

Fracción	Peso obtenido (mg)	*CMI 72 horas ($\mu\text{g/mL}$)	*CMB 48 horas ($\mu\text{g/mL}$)
SC1(1)	6	31.3	No determinado
SC1(2)	39	31.3	31.3
SC2(1)	26	31.3	No determinado
SC2(2)	35	31.3	31.3
SC3(1)	12	31.3	No determinado
SC3(2)	21	31.3	31.3

*Valores obtenidos en 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

Nota: Valores de CMI para los antibióticos de referencia: Amoxicilina = 0.015 $\mu\text{g/mL}$, Claritromicina = 0.010 $\mu\text{g/mL}$, Metronidazol = 0.25 $\mu\text{g/mL}$.

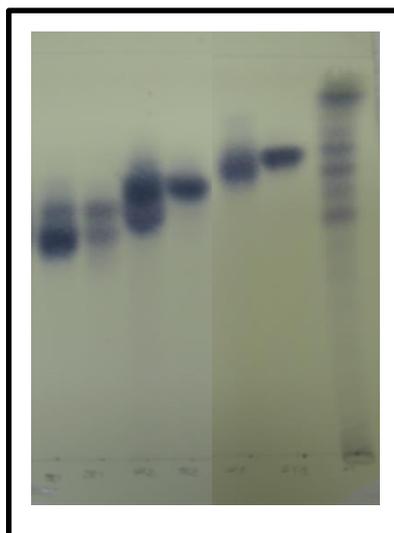


Figura N° 7: TLC de las fracciones SC1 (1), SC1 (2), SC2 (1), SC2 (2) y SC3 (1) y SC3 (2) utilizando como fase móvil: Acetato de etilo-metanol (9:1) M: Fracción metanólica. Revelador: Vainillina-H₂SO₄. Usando la lámpara UV de 254 nm sólo se pudo visualizar las fracciones SC1 (1) y SC2 (1).

4.3 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE SC1 (2), SC2 (2) Y SC3 (2) FRENTE CÉLULAS RAW 264.7

Tabla N° 11: Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2) sobre células RAW 264.7

Fracción	CI ₅₀ (µg/mL)	Fracción	CI ₅₀ (µg/mL)
SC1(2)	4.2 ± 2.5	Anfotericina B	11.4 ± 2.7
SC2(2)	3.8 ± 1.5	Amoxicilina	>100
SC3(2)	8.8 ± 3.3	Claritromicina	>100
-	-	Metronidazol	>100

Nota: Resultados obtenidos de un experimento realizado por triplicado

Estos resultados sugieren que la actividad de los compuestos aislados a partir de la planta en estudio no es selectiva.

4.4 ANÁLISIS POR UHPLC

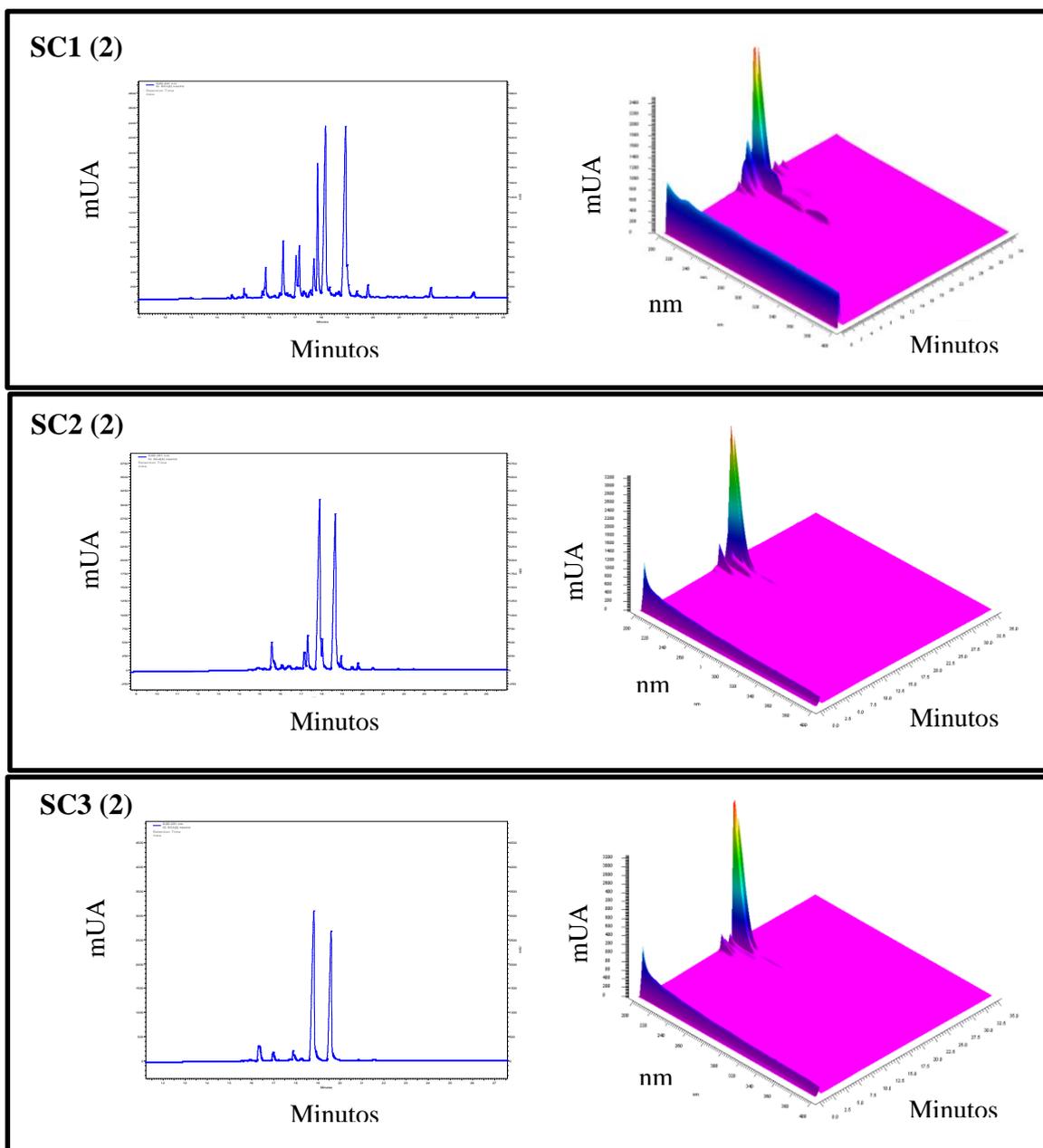


Figura N° 8: Cromatogramas (izquierda) y espectro 3D (derecha) de las fracciones SC1 (2),SC2 (2) y SC3(2) a 201nm. Equipo UHPLC Elite Lachrom Ultra (VWR-Hitachi).

Las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2) que al TLC se visualizaban como compuestos puros, fueron analizadas mediante UHPLC. Como resultado de este análisis se concluyó que cada uno de estas fracciones estuvo conformado por dos compuestos que eluyen a un tiempo cercano en el cromatograma.

4.5 ANÁLISIS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

4.5.1 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE LA FRACCIÓN SC3(2)

El análisis de los espectros de RMN y el análisis mediante UHPLC descrito anteriormente, evidencian la presencia de dos compuestos “a” y “b” en las cada una de las tres fracciones: SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2). Como se verá más adelante los compuestos presentes en las fracciones SC1 (2) y SC2 (2) presentan una estructura base similar a SC3 (2), por lo tanto se realizará primero el análisis detallado de los espectros RMN de SC3 (2) “a” y SC3 (2) “b” y este análisis se aplicarán también para las demás fracciones.

4.5.1.1 Espectro¹H-RMN de SC3 (2)

Al realizar el análisis de los espectros de RMN ¹H de SC3 (2) se pudo identificar señales ubicadas en regiones típicas para ciertos grupos funcionales. Por ejemplo, se observa la presencia de 4 señales correspondientes a hidrógenos olefínicos a 5.54, 5.34, 5.07 y 4.87 ppm. Del mismo modo, las señales que aparecen en la región de 3.2 a 5ppm corresponden a protones carbinólicos. Por último las señales abundantes en campo alto (de 0.5 a 2.5 ppm) complican aún más el análisis del espectro debido a un extenso acoplamiento entre protones; dando como resultado que solo algunas señales puedan ser asignadas como por ejemplo

los singletes correspondientes a grupos metilos angulares y los dobletes correspondientes a grupos metilos en la región 0.6 a 0.95ppm. (71)

Las integraciones de algunas señales presentes en el espectro RMN ^1H presentan valores de integración que no son múltiplo de un número entero. Por ejemplo la señales de los protones olefínicos presentan integraciones de 0.5, 0.7 incluso de 1.2 (ver Figura N°10), por lo tanto algunas de las señales representan hidrógenos presentes en la molécula “a” o “b” de la fracción SC3 (2), mientras que algunas de las señales (integración alrededor de 1) representan a hidrógenos presente en ambas moléculas.

Así mismo, la señal a 1.66 ppm presenta una integración de 1.87 ppm (correspondiente a 2H), sin embargo el análisis del espectro HSQC los vincula a un metilo. De igual manera las señales a 1.11 y 1.03 ppm integran valores menores a 3, cuando deberían tratarse de metilos (de acuerdo a su desplazamiento químico y su análisis del espectro HSQC(72). Todo esto no hace más que confirmar lo obtenido mediante el análisis por UHPLC, es decir, la fracción SC3(2) se trata en realidad de una mezcla de dos compuestos “a” y “b” que solo se diferencian en una pequeña porción de la molécula.

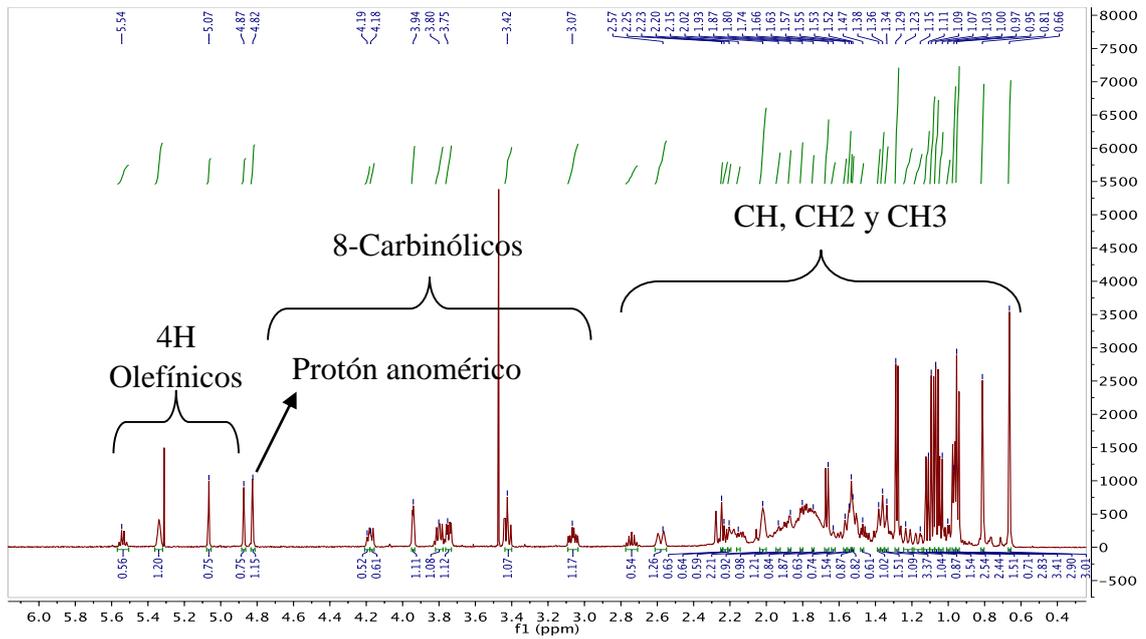


Figura N° 9: Espectro RMN ¹H de SC3 (2)

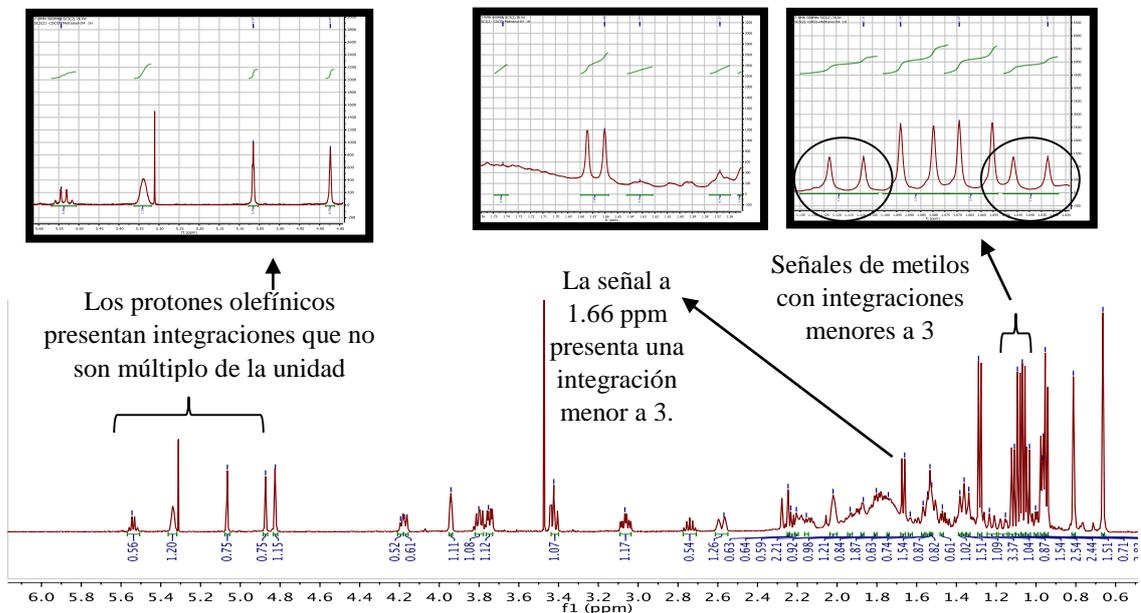


Figura N° 10: Regiones del espectro RMN ¹H de SC3 (2) y señales que evidencian la mezcla de compuestos.

4.5.1.2 Espectro ^{13}C -RMN de SC3(2)

Las señales con desplazamiento mayor a 100 ppm corresponden a carbonos que participan de un doble enlace ya sean cuaternarios (160.55, 149.61 y 136.45 ppm), $\text{CH}=\text{}$ (124.49 y 118.18 ppm) como $\text{CH}_2=\text{}$ (105.68 ppm); mientras que en la región comprendida entre ~60 y ~80 ppm se encuentran señales de metinos hidroxilados.

En la región correspondiente a señales de carbonos anoméricos (92 a 108 ppm), se encuentra una señal a 101.99 ppm. Esto permitió definir la cantidad de monosacáridos (sólo uno) presentes en la estructura final. (70, 71)

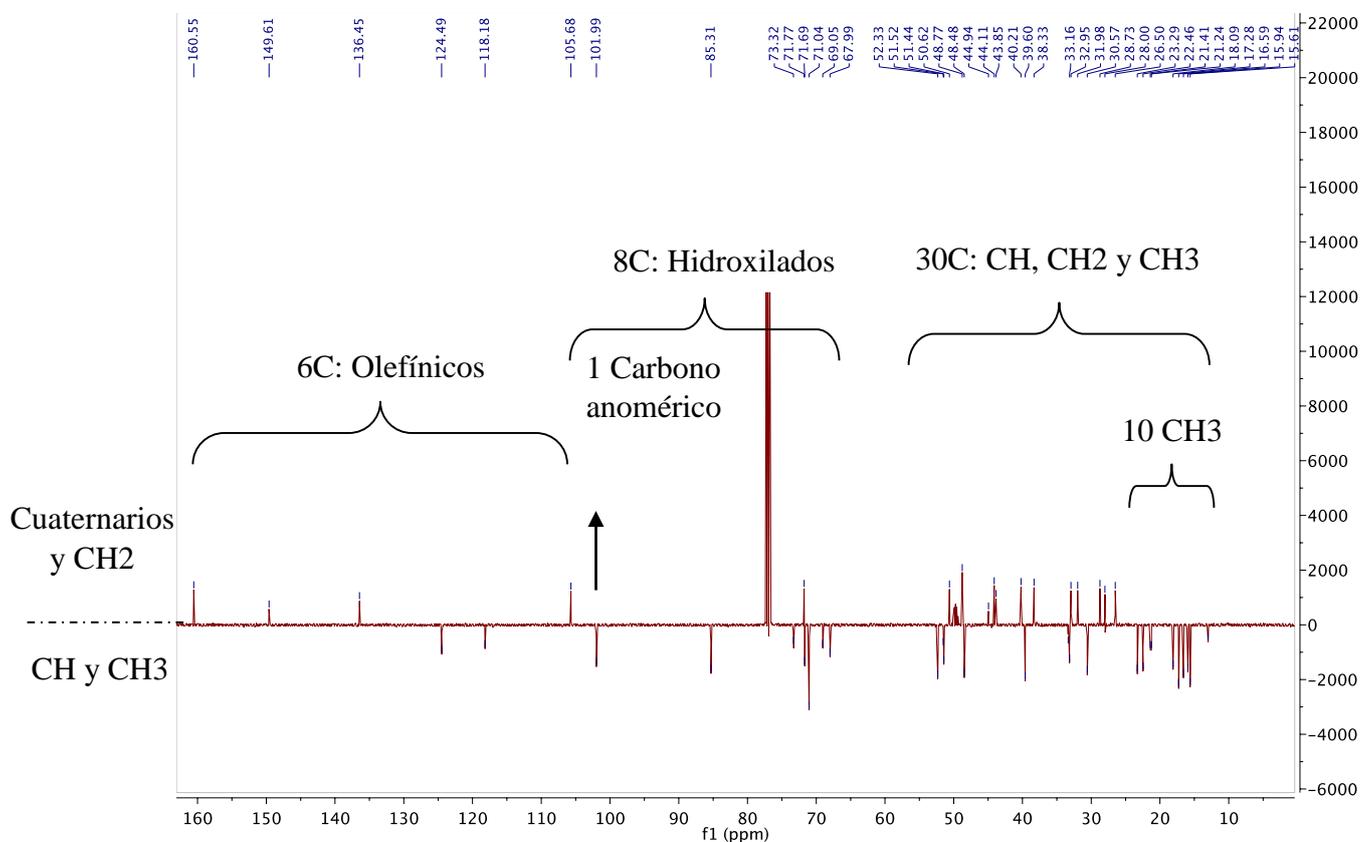


Figura N° 11: Espectro RMN ^{13}C de SC3 (2)

4.5.1.3 Espectro HSQC de SC3(2)

El análisis del espectro del HSQC, permitió confirmar la identidad de diferentes señales de metilos y metinos, los cuales aparecen en la parte inferior del espectro de ^{13}C (Jmod). También se pudo identificar también los hidrógenos geminales pertenecientes a grupos metilenos y que por lo tanto muestran correlaciones hacia un mismo átomo de carbono. Por ejemplo, para el compuesto SC3 (2) “a” se identificó que el carbono olefínico a 105.68ppm se correlaciona con los protones desplazados a 5.07 y 4.87 ppm.

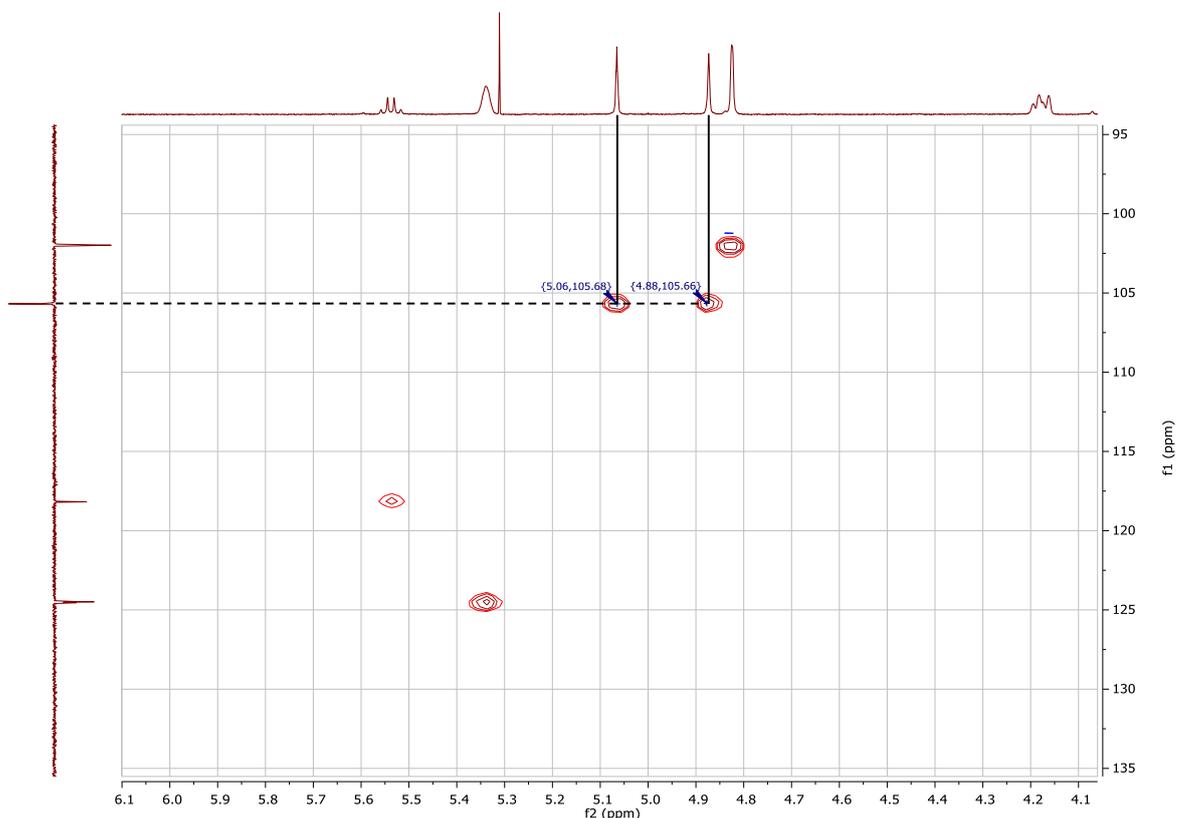


Figura N° 12: Correlaciones en el espectro HSQC entre el carbono a 105.68 ppm y los hidrógenos a 5.07 y 4.87 ppm. Compuesto SC3 (2) “a”

De igual manera, existe una correlación entre los átomos de carbono ubicados a: 50.62 ppm, 43.80 ppm, 31.98 ppm, 28.73 ppm, 26.50 ppm y 28.00 ppm con los siguientes pares de protones respectivamente: (2.57 y 2.25 ppm), (1.15 y 1.57 ppm), (2.15 y 1.23 ppm), (1.87 y 1.80 ppm), (1.52 y 1.34 ppm), (1.93 y 1.36 ppm).

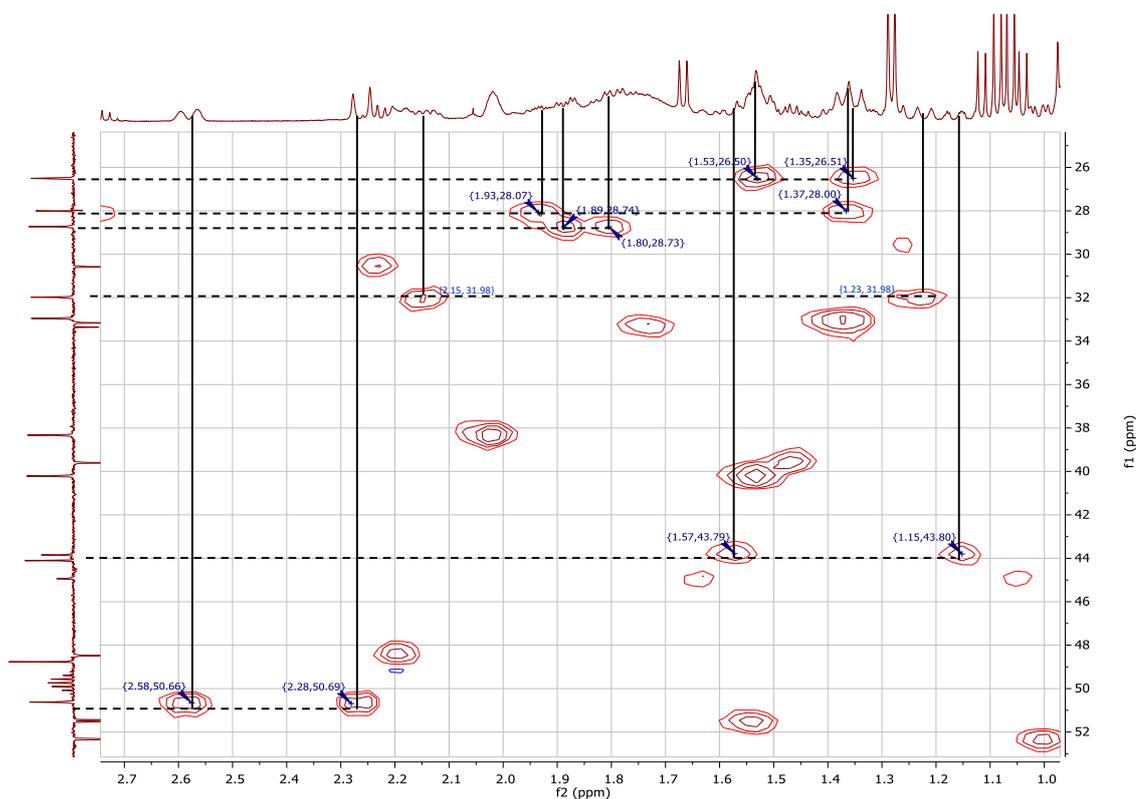


Figura N°13: Correlaciones en el espectro HSQC entre diferentes átomos de carbono e hidrógenos geminales del compuesto SC3 (2) “a”

Adicionalmente se encontró correlaciones muy débiles que pertenecen al compuesto SC3 (2) “b” entre el carbono a 44.94 ppm con los protones a 1.63 ppm y 1.05 ppm. (Ver Figura N°14). Todas estas señales hacen un total de 8 señales de grupos metilenos, que sumados a tres metilenos cuyos protones presentan el

mismo desplazamiento químico (no son geminales) obtenemos un total de 11 grupos metilenos presentes en la molécula.

Hasta este punto, el número total aproximado de átomos de carbonos junto con el número y tipo de metilos (tanto angulares como aquellos presentes en una cadena lateral) indican la presencia de un esqueleto esterooidal y un elemento conjugado (monosacárido). Luego de la identificación de los desplazamientos de los protones y carbonos, tanto el número de átomos de hidrógeno y carbono debería ser conocidos, así como la cantidad de carbonos cuaternarios, CH, CH₂ y CH₃; sin embargo, esto no fue posible porque la cantidad de señales no corresponden a una sola molécula obteniéndose una cantidad superior de número de carbonos e hidrógenos esperados (Total de Carbonos = 44).

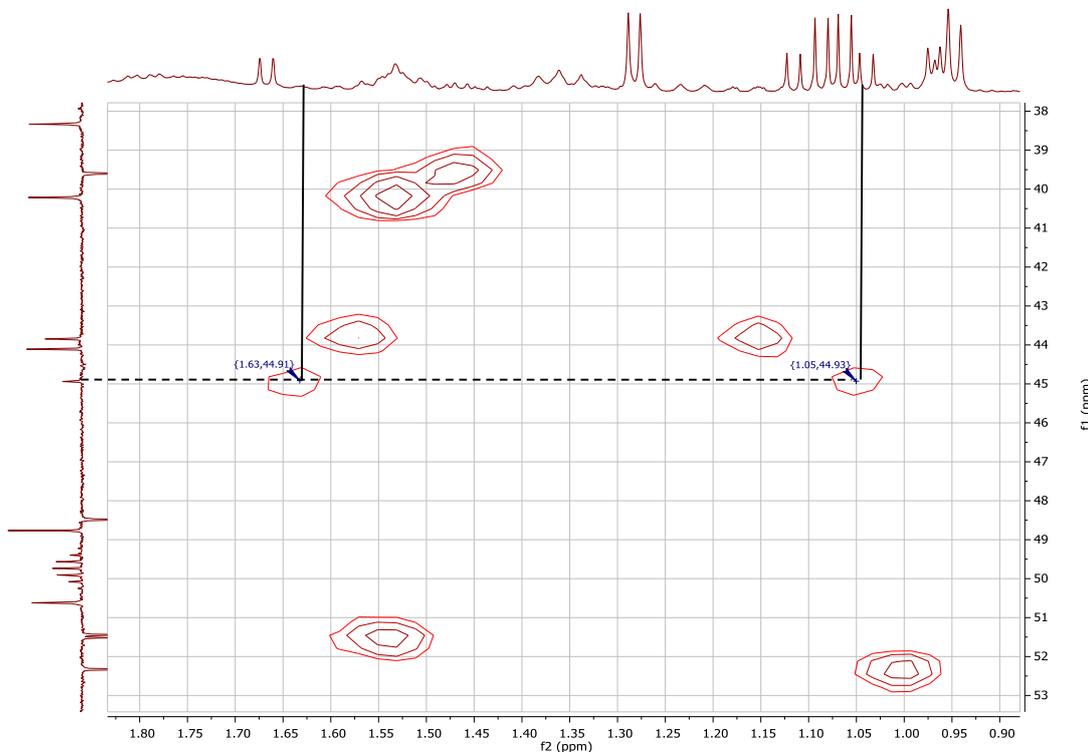


Figura N°14: Correlaciones en el espectro HSQC entre el carbono a 44.94 ppm y los hidrógenos a 1.63 y 1.05 ppm del compuesto SC3 (2) “b”

4.5.1.4 Elucidación estructural de SC3(2) “a”

4.5.1.4.1 Espectro COSY de SC3(2) “a”

Las correlaciones encontradas en el análisis del espectro COSY (Tabla N° 27) permiten correlacionar e identificar algunas porciones importantes del núcleo esteroidal, así mismo, permiten identificar la composición del monosacárido unido a éste.

➤ Residuo glicosídico de SC3(2) “a”

El monosacárido unido a SC3 (2) fue identificado como α -L-Ramnopiranososa, el cual está relacionado esteroquímicamente con la familia de la Lixosa. Entre los criterios tomados en cuenta para su identificación se tienen los siguientes:

- a. Correlaciones en el espectro COSY entre las señales de protones carbinólicos ubicados en la región de 3.2 a 5 ppm (4.82, 3.94, 3.80, 3.75 y 3.42).
- b. La presencia de un doblete a campo alto (1.29 ppm), típico para Ramnosa y Fucosa (ambas deoxialdohexosas).(73)
- c. Pequeño acoplamiento anomérico (El protón H2 ecuatorial se opone a cualquier arreglo transdiaxial). Esto indica también una conformación 1C_4 .(74)
- d. Largo acoplamiento transdiaxial de los protones consecutivos H3, H4 y H5.(74)
- e. Configuración del protón anomérico α (d,J=1.6Hz). La constante de acoplamiento indica una disposición ecuatorial-ecuatorial de H1 y H2.(74-76)
- f. Se encuentra de forma natural en la forma de L-Ramnosa.

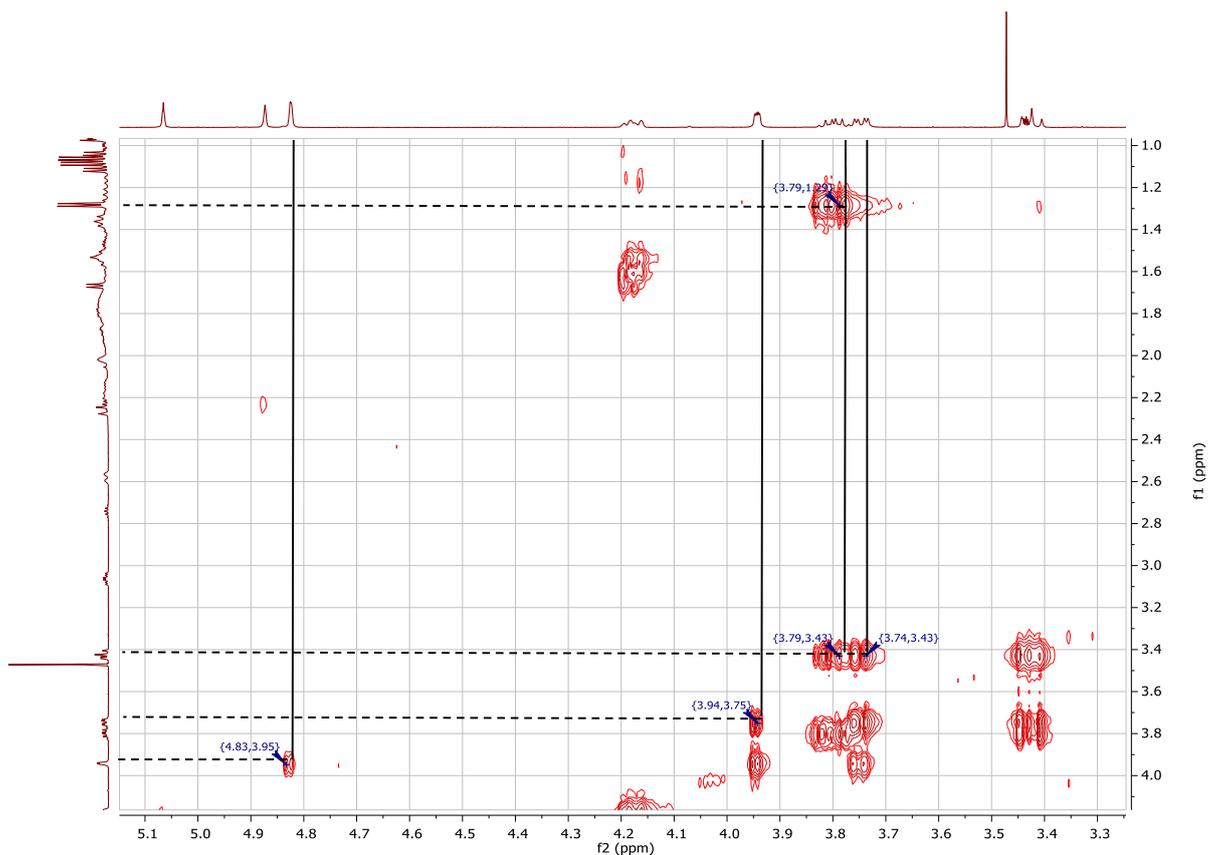


Figura N°15: Correlaciones en el espectro COSY entre protones carbinólicos del residuo glicosídico de SC3 (2)

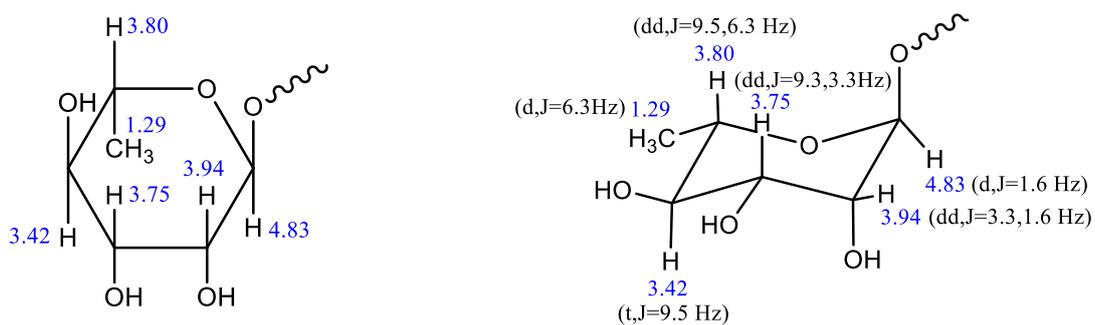


Figura N°16: Elucidación estructural del residuo glicosídico de SC3 (2): α -L-Ramnose

➤ **Núcleo esteroidal de SC3(2) “a”**

La elucidación estructural continuó con el análisis de la señal a 3.07 ppm así como con las señales de protones olefínicos ubicados a 5.34, 5.07 y 4.87 ppm porque presentan desplazamientos químicos evidentes y a partir de estas señales se puede acceder a regiones más internas de la molécula, mediante el análisis del espectro HMBC.(71)

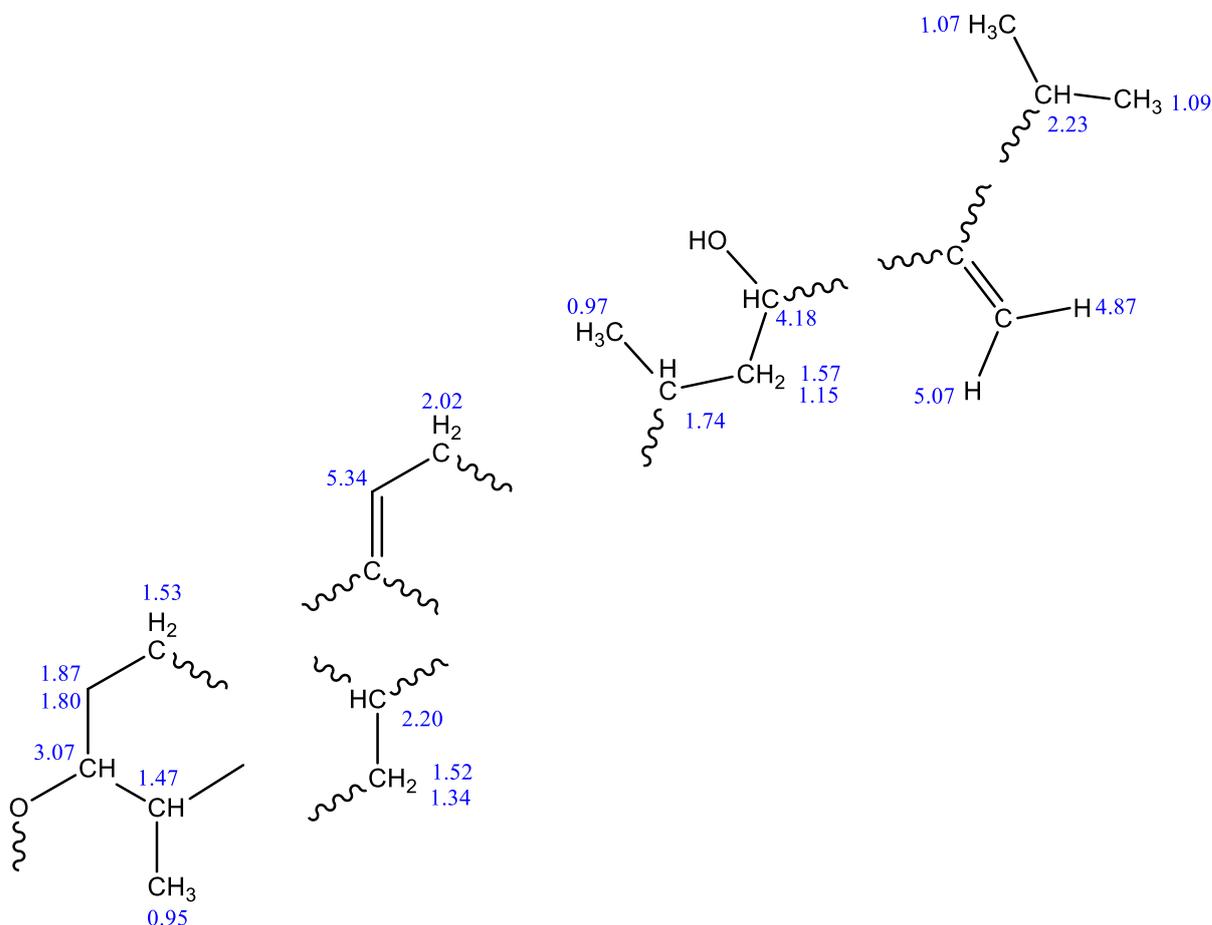


Figura N°17. Estructuras parciales del núcleo esteroidal de SC3 (2) “a” obtenidas a partir del espectro COSY.

4.5.1.4.2 Espectro HMBC de SC3 (2) "a"

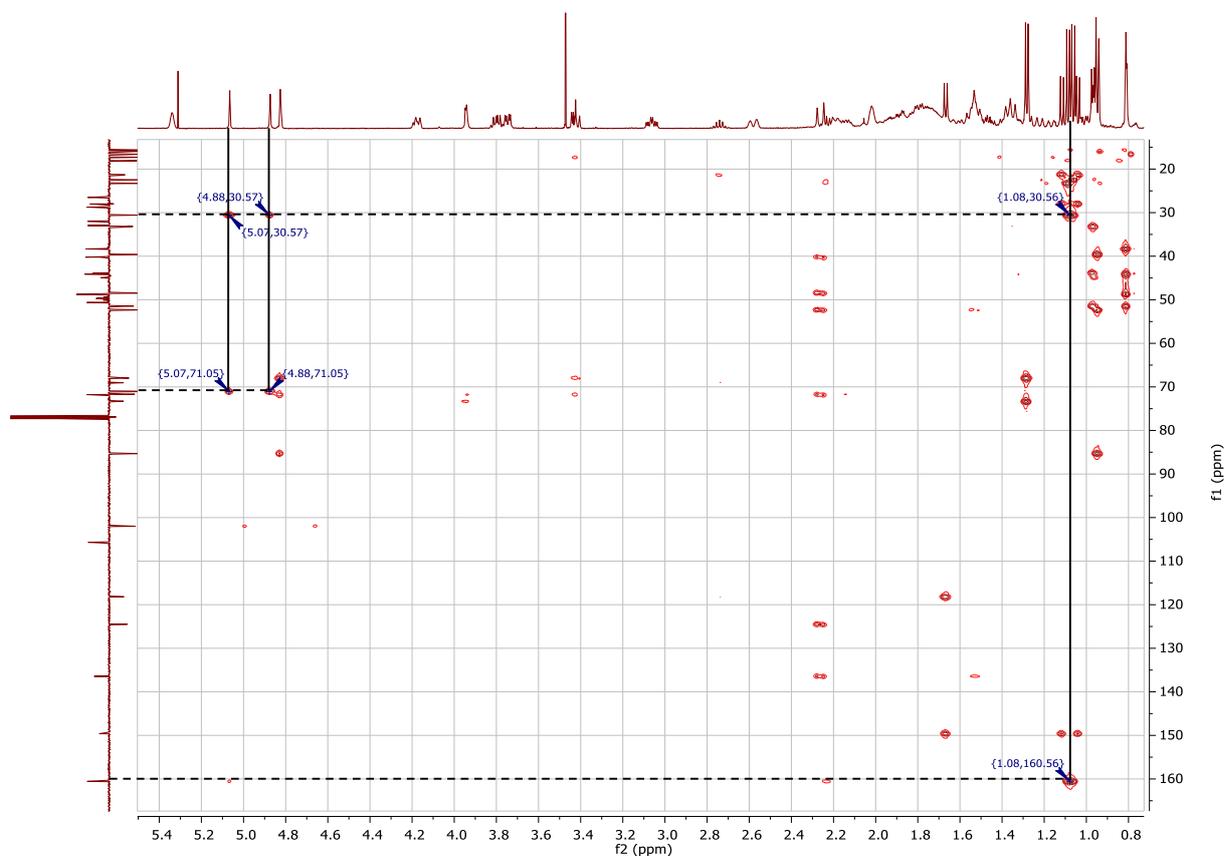


Figura N°18. Correlaciones obtenidas a partir del espectro del HMBC para construir parte de la cadena lateral de SC3 (2) "a".

El espectro de HMBC muestra conexiones de los protones olefinicos ubicados a 5.07 y 4.87 ppm, con un carbono con desplazamiento típico de unión a un grupo hidroxilo (71.94 ppm) así como con un grupo metino (30.57 ppm). También, existen conexiones entre dos metilos (1.07 y 1.09 ppm), que se presentan como dobletes y constantes de acoplamiento $J = 6.8$ Hz; con el metino ya mencionado (30.57 ppm). Si a todas estas correlaciones les sumamos las conexiones entre los dos metilos (1.07 y 1.09 ppm) y un carbono cuaternario olefinico (160.55 ppm),

así como los resultados del análisis del espectro de COSY; podremos construir parte importante de la cadena lateral del núcleo esteroidal (Figura N°19).

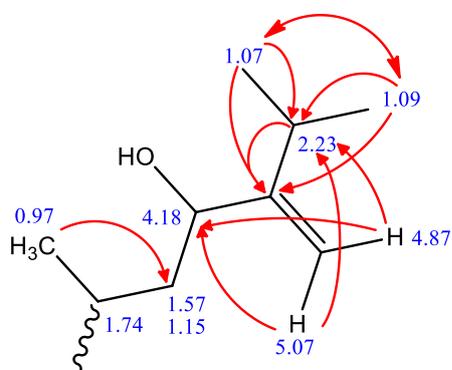


Figura N°19: Cadena lateral de SC3 (2) “a” mostrando las correlaciones en HMBC

Hasta ahora, se han tomado en cuenta todas las señales de metilos que están presentes en la cadena lateral de la molécula. Por lo tanto se continuó con el análisis de las señales correspondientes a metilos angulares con desplazamientos en campo alto (0.95 ppm, 0.81 ppm y 0.66 pm) y que están presentes en el núcleo esteroidal.

Se comenzó con el análisis del metilo ubicado a 0.95ppm (doblete $J= 6.5$), el cual presenta una conexión con un metino con desplazamiento de 3.07 ppm. Este metino es responsable de la unión del núcleo esteroidal a la metil pentosa mediante un enlace glucosídico. Esto se confirma además, por la correlación entre el protón del carbono anomérico del monosacárido y el metino en mención.

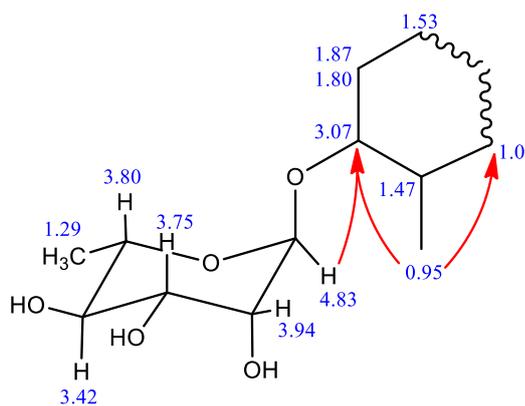


Figura N°20: Posición de anclaje del residuo glicosídico a la aglicona en SC3 (2)
“a”

A partir de este punto se pudo tomar en cuenta la numeración típica de las señales de acuerdo a su ubicación dentro del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno. Por lo tanto, el metino que participa del enlace glicosídico ($\delta=3.07\text{ppm}$), está ubicado en posición 3 del núcleo esteroidal (Anillo A) y presenta correlación según COSY con un protón (1.87 ppm) perteneciente a un grupo metileno en posición 2. Además, el análisis de COSY y HMBC permiten también conectar el metilo angular descrito en el párrafo anterior (0.95ppm) con un metino correspondiente a la posición 4 ($\delta=1.47\text{ppm}$) y un metino con desplazamiento de 1.0 ppm (posición 5).

Existen múltiples correlaciones importantes en HMBC entre un protón a 2.25 ppm (perteneciente a un grupo metileno) con señales de carbono que permiten ubicarlo en la posición 19 del núcleo esteroidal. Entre los carbonos que participan de éstas correlaciones se tiene: dos carbonos cuaternarios ubicado a 136.45 ppm (cuaternario) y 124.49 ppm ($\delta^1\text{H} = 5.34\text{ppm}$), el carbono en posición 5 ya antes descrito ($\delta^1\text{H} = 1.0\text{ppm}$ y $\delta^{13}\text{C}=52.33$ ppm) y finalmente el carbono a 48.48 ppm ($\delta^1\text{H} = 2.20$ ppm) también descrito en el análisis de COSY.

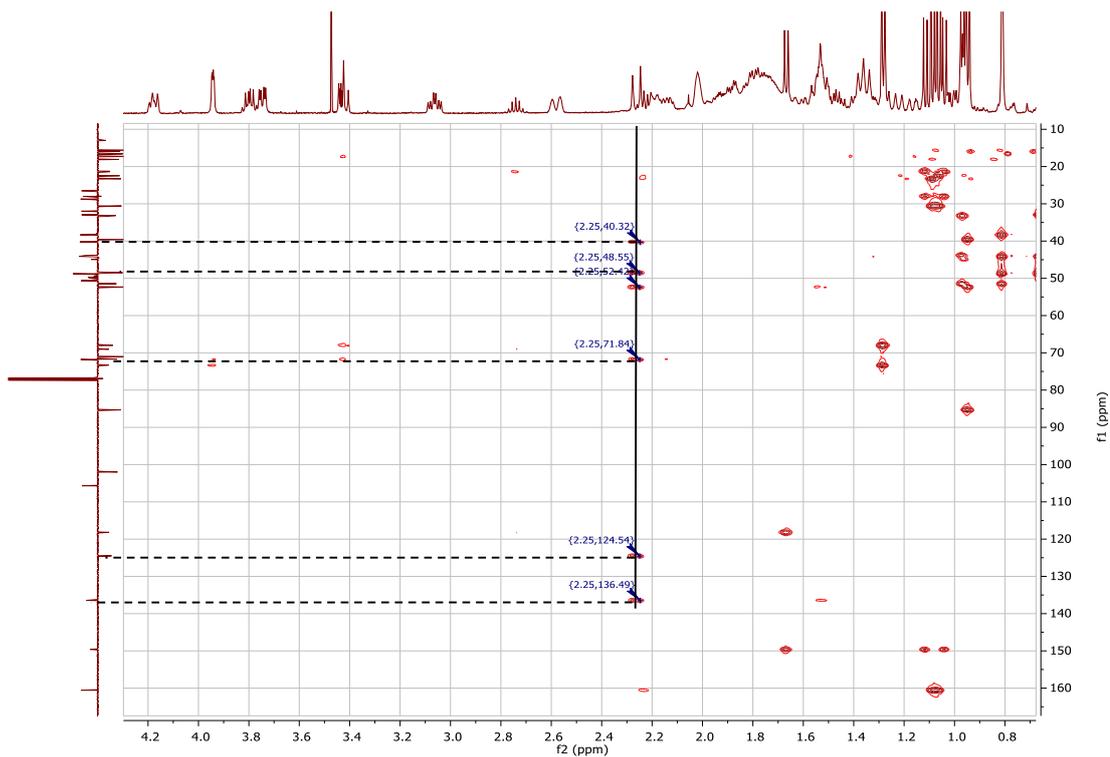


Figura N°21: Región del espectro de HMBC mostrando las correlaciones entre el protón a 2.25ppm y diferentes átomos de carbono de SC3 (2) “a”

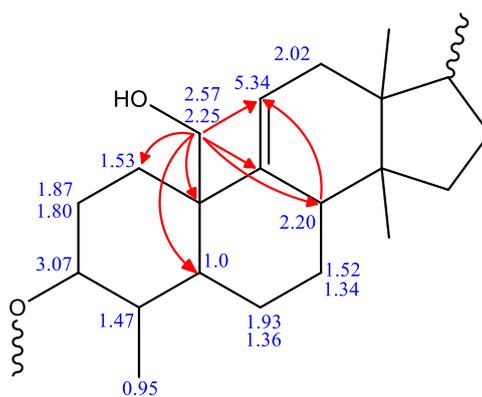


Figura N°22: Correlaciones entre el protón a 2.25ppm y diferentes átomos de carbono de SC3 (2) “a”

Por otro lado la correlación entre el protón a 2.25 ppm (posición 19) y un carbono cuaternario ($\delta^{13}\text{C}=71.77$ ppm), permitió identificar a éste último como el carbono cuaternario presente en posición 10.

Todas estas correlaciones permiten definir la ubicación de un doble enlace entre las posiciones 9 ($\delta^{13}\text{C}=136.45\text{ppm}$) y 11 ($\delta^1\text{H} = 5.34\text{ppm}$ y $\delta^{13}\text{C} 124.49\text{ppm}$). Además la correlación en el espectro COSY entre el protón a 5.34 ppm con el grupo metileno a 2.02 ppm eliminan la posibilidad de tener el enlace doble en discusión entre la posición 7 ($\delta^1\text{H} = 1.52$ y 1.34 ppm y $\delta^{13}\text{C}=26.50$ ppm) y 8 ($\delta^1\text{H} = 2.20$ ppm y $\delta^{13}\text{C}=48.48$ ppm).

Los otros dos metilos angulares que quedan por analizar y que se presentan como singletes a 0.81 y 0.66 ppm, presentan en el espectro de HMBC correlaciones con carbonos cuaternarios correspondientes a las posiciones 13 y 14 entre las intersecciones del anillo C y D del núcleo esteroideal. Además el grupo metilo angular a 0.81 ppm (posición 18) presenta correlaciones con un metino en posición 17($\delta^1\text{H} = 1.55$ ppm, $\delta^{13}\text{C}=51.44$ ppm), el cual a su vez presenta una correlación con el grupo metilo en posición 21 ($\delta^1\text{H}=0.97\text{ppm}$, $\delta^{13}\text{C}=18.09$ ppm) de la cadena lateral.

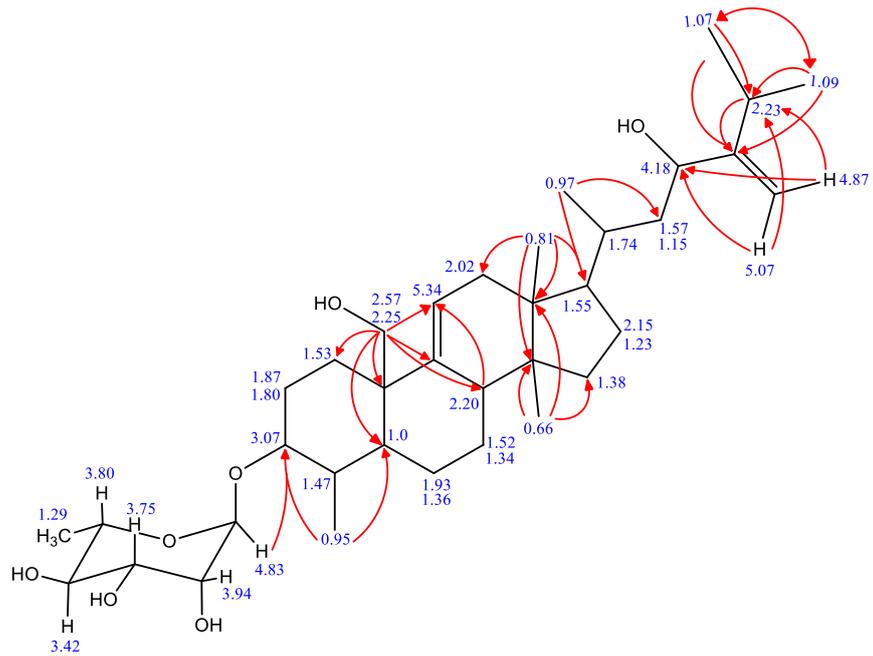


Figura N° 23: Correlaciones en HMBC de SC3 (2) "a"

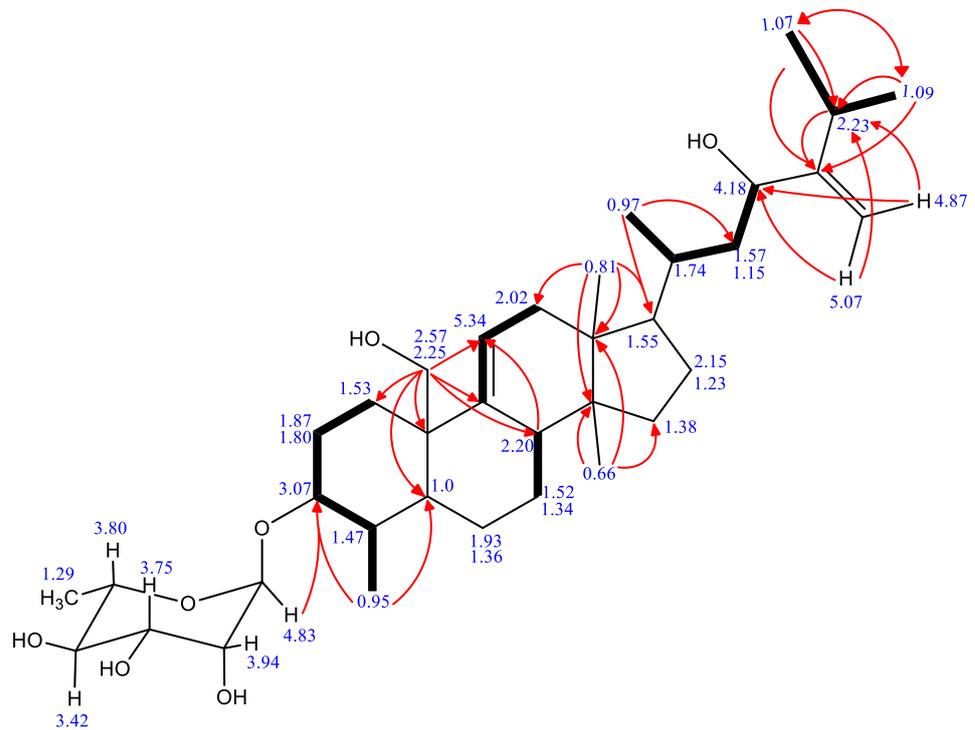


Figura N° 24: Correlaciones COSY (—) y HMBC (→) de SC3 (2) "a"

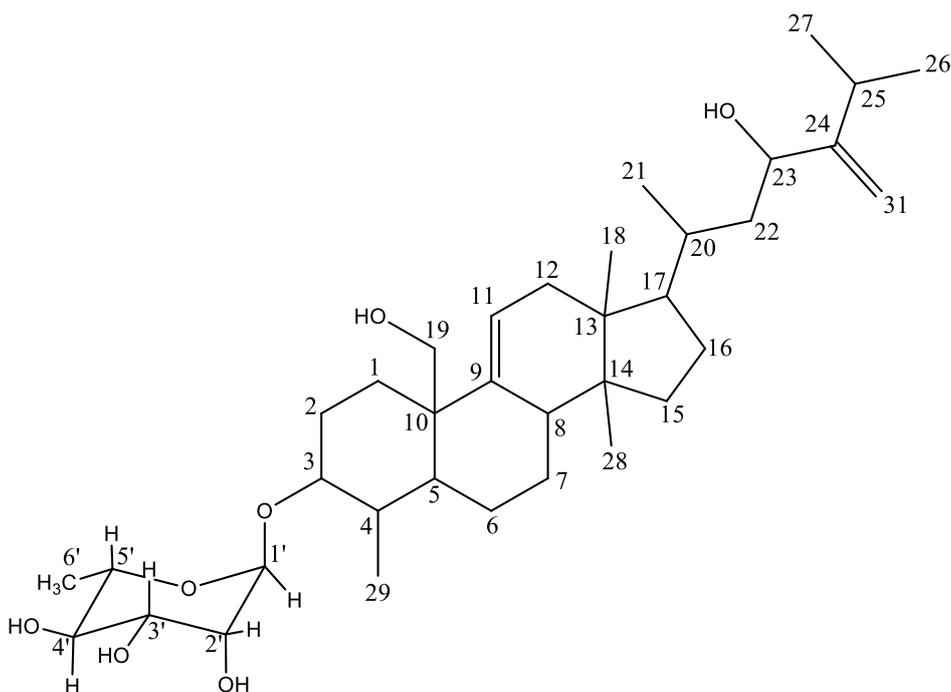


Figura N° 25: Compuesto SC3 (2) “a”

4.5.1.5 Elucidación estructural de SC3(2) “b”

Se pudo identificar la estructura de una segunda molécula SC3 (2) “b”, la cual presenta una estructura similar a SC3 (2) “a”. Como se puede ver en la Figura N° 26, la segunda molécula presente en la mezcla solo se diferenciaría por la ausencia de los dos singuletes correspondientes a los protones en la posición 31; los cuales son reemplazados por un protón (cuadruplete) a 5.54 ppm y un metilo (doblete) a 1.66 ppm. Existe además una correlación COSY entre ambos señales. Esto explicaría la variación en el desplazamiento de ciertas señales (en azul) que presentan correlaciones similares a las encontradas en SC3 (2) “a”.

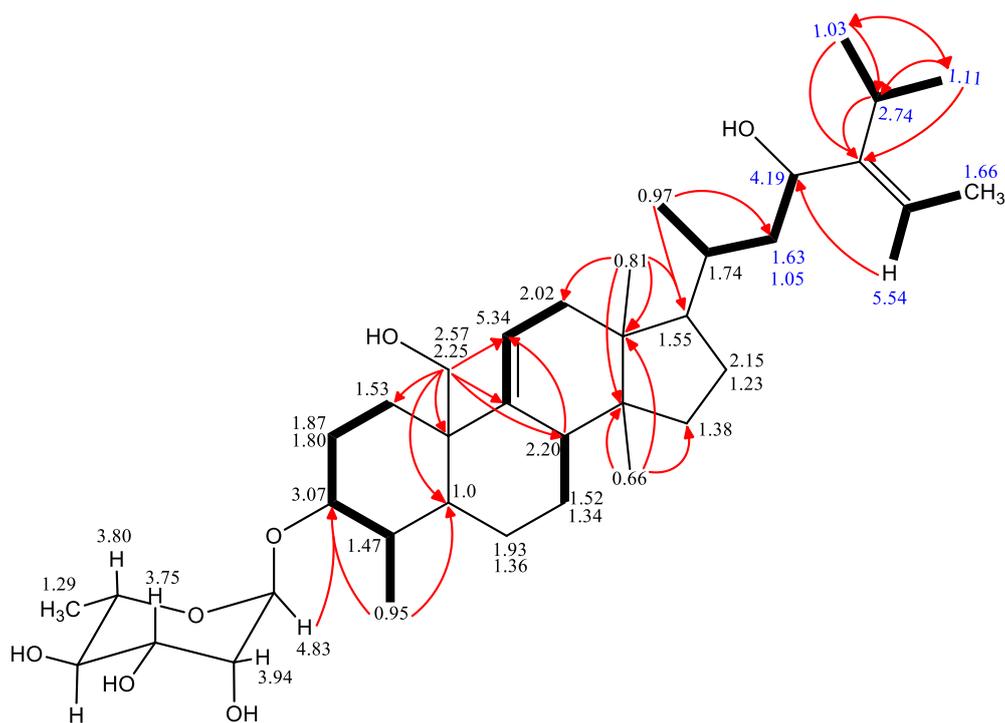


Figura N° 26: Correlaciones COSY (—) y HMBC (---) de SC3 (2) "b"

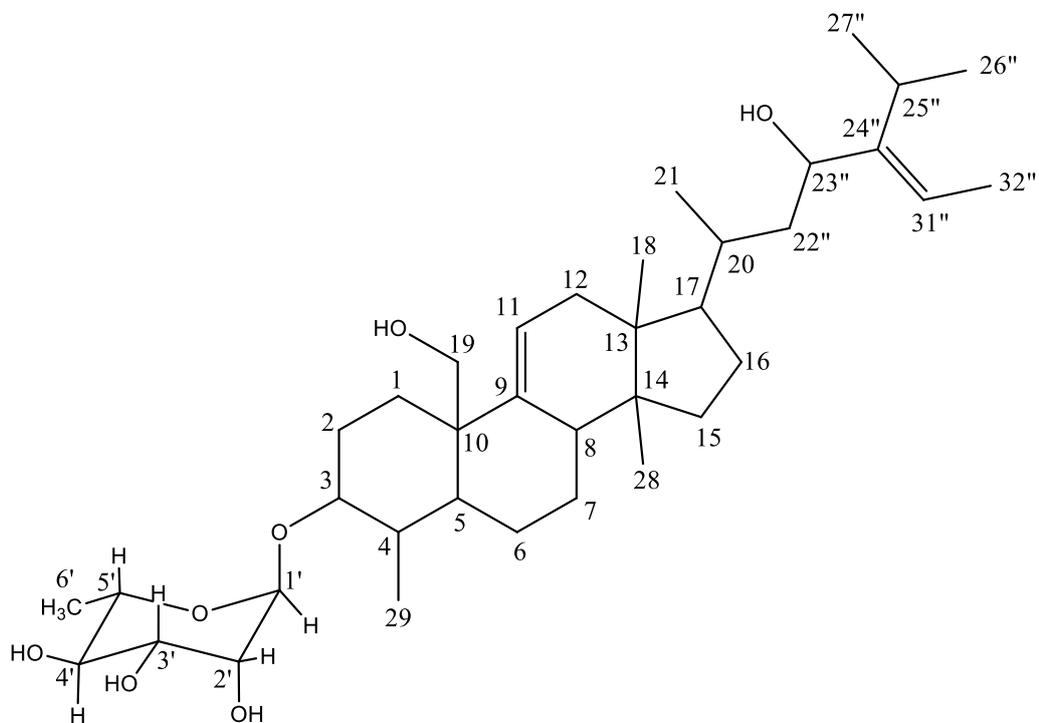


Figura N° 27: Compuesto SC3 (2) "b"

4.5.2 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE LA FRACCIÓN SC1 (2) Y SC2 (2)

La fracción SC3 (2) es una mezcla de dos compuestos esteroidales “a” y “b”, los cuales solo se diferencian entre sí únicamente por la presencia de un metilo más en la cadena lateral del núcleo esteroideal. Las fracciones SC1(2) y SC2(2) presentan también una mezcla de estos mismos compuestos esteroidales “a” y “b”; pero a pesar de esto las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3(2) presentan características cromatográficas distintas debido al tipo de monosacárido unido al núcleo esteroideal en posición 3.

Por lo tanto, tanto los compuestos “a” y “b” de la fracción SC3 (2) está unidos a una Ramnopiranosas; mientras que el monosacárido unido tanto a “a” como a “b” de SC2 (2) fue identificado como β -D-Xilopiranosas. Finalmente, el monosacárido presente en la fracción SC1 (2) se podría tratar de Arabinosa, ya que el compuesto SC2 (2) presenta una masa similar a la del compuesto SC1 (2) pero esta asignación tiene que confirmarse con análisis posteriores.

Entre los criterios tomados en cuenta para la identificación de β -D-Xilopiranosas en SC2 (2) se tienen los siguientes:

- Correlaciones en el espectro COSY entre las señales de protones carbinólicos ubicados en la región de 3.2 a 5 ppm (4.40, 4.00, 3.71, 3.55, 3.51 y 3.36 ppm).
- La conformación 4C_1 es la más común y estable termodinámicamente.(74)
- Largo acoplamiento trans-diaxial de los protones consecutivos H2, H3 y H4.(74)
- Configuración del protón anomérico β (d, J= 6.3 Hz): Los anómeros α presentan constantes de acoplamientos pequeños (< 4Hz), mientras que los anómeros β presentan constantes de acoplamiento más grandes.(74-76)
- Se encuentra de forma natural en la forma de D-Xilopiranososa.

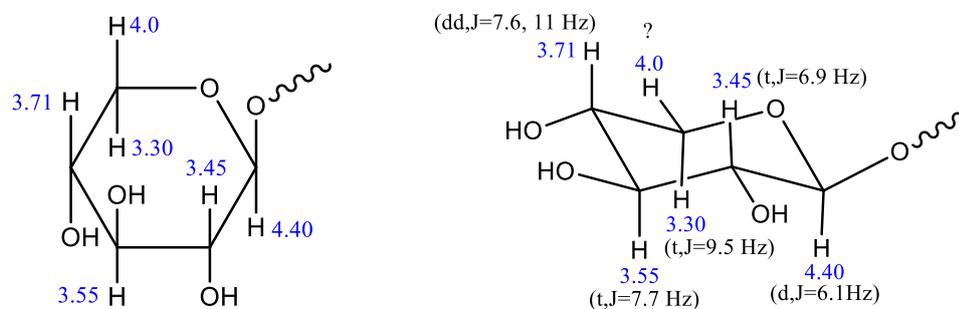


Figura N° 28: Elucidación estructural del residuo glicosídico de SC2 (2): β -D-Xilopiranososa

4.5.3 RESUMEN DE LAS ESTRUCTURAS

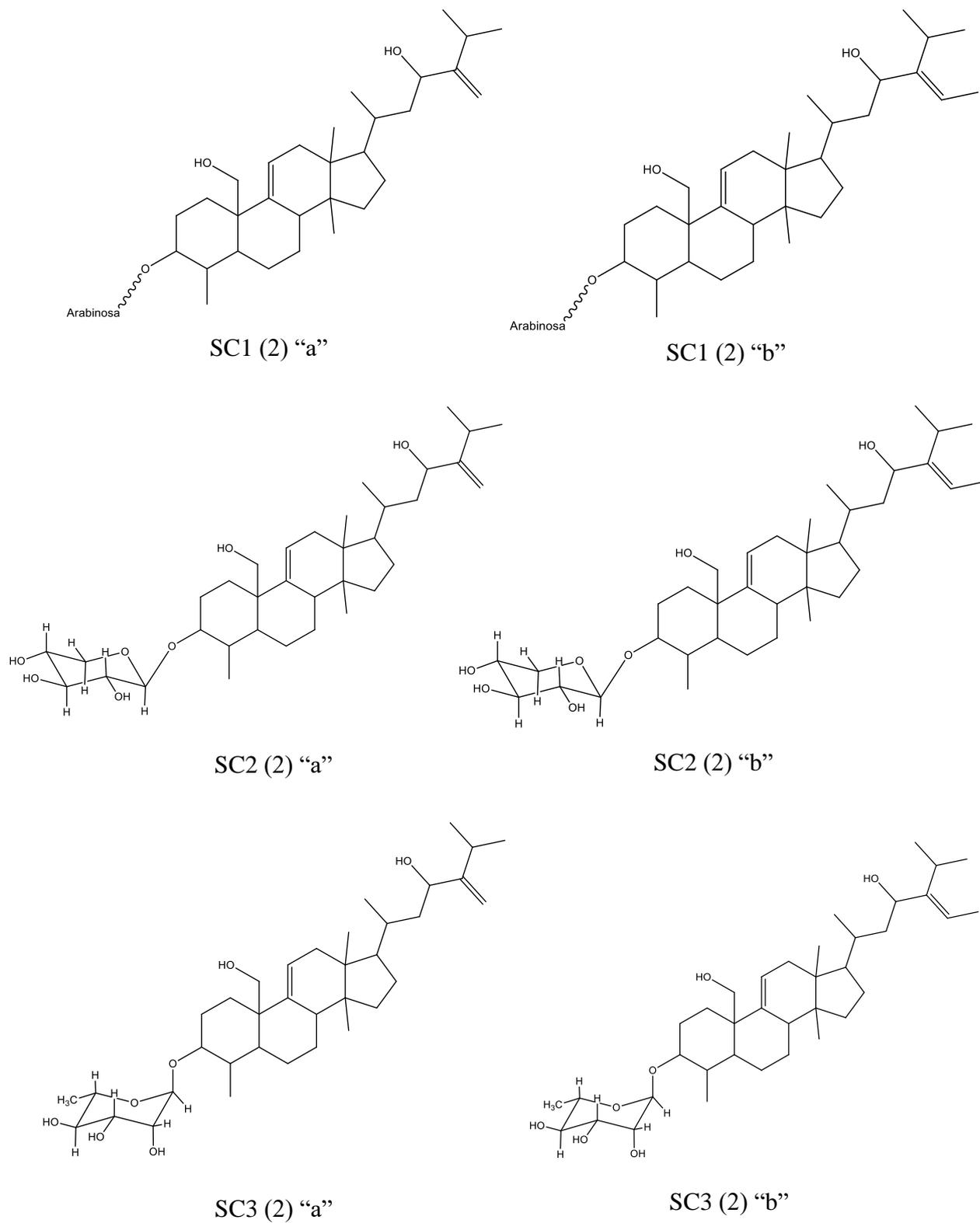


Figura N° 29: Compuestos identificados a partir de la fracción metanólica de *C. lutea*

4.5.4 TABLA DE ASIGNACIONES

Tabla N° 12: Asignaciones del núcleo esteroidal SC1 (2) "a"

Átomo	¹³ C* δ/ppm	¹³ C jmod	¹ H δ/ppm (Mult., J(Hz), H)	COSY ¹ H- ¹ H	HMBC ¹ H- ¹³ C
1	40.28	CH2	1.56 (2H)	1.86	
2	29.22	CH2	1.98 (1H)	3.12, 1.55	
			1.86 (1H)		
3	85.75	CH	3.12 (td,10.6,4.6 Hz, H)	1.86, 1.56	
4	39.56	CH	1.56 (1H)	1.04,3.12	
5	52.59	CH	1.01 (td,11.6,4.1 Hz, H)		
6	28.06	CH2	1.95 (1H)		
			1.39 (1H)		
7	26.59	CH2	1.53 (1H)		
			1.36 (1H)	2.23	
8	48.41	CH	2.23 (1H)	1.36	
9	136.69	Cuaternario			
10	71.80	Cuaternario			
11	124.14	CH	5.33 (s, H)	2.02	
12	38.34	CH2	2.02(2H)	5.33	
13 o 14	44.13	Cuaternario			
13 o 14	48.78	Cuaternario			
15	33.02	CH2	1.37 (1H)		
16	31.88	CH2	2.15 (1H)	1.53, 1.01	
			1.26 (1H)		
17	51.47	CH	1.55 (1H)		
18	16.01	CH3	0.81 (s,3H)		38.34, 44.13, 48.78, 51.47
19	50.66	CH2	2.60 (d,15.3 Hz, H)		
			2.29 (d, 15.5 Hz ,H)		40.28, 52.59, 48.41, 71.80, 124.14, 136.69
20	33.20	CH	1.75 (1H)	0.98, 1.58	
21	18.13	CH3	0.98 (d,6.4 Hz,3H)	1.75	51.47, 43.83
22	43.83	CH2	1.17 (1H)	4.19, 1.75	
			1.58 (1H)		
22"	45.01	CH2	1.64 (1H)	4.21	
			1.07 (1H)		
23	71.11	CH	4.19 (1H)	1.58	
23"	69.13	CH	4.21 (1H)	1.64	
24	160.63	Cuaternario			
24"	149.72	Cuaternario			
25	30.60	CH	2.25 (1H)	1.09, 1.11	160.63
25"	28.02	CH	2.76	1.14, 1.06	
26 o 27	23.32	CH3	1.09 (d,6.8 Hz,3H)	2.25	22.51, 30.60, 160.63
26 o 27	22.51	CH3	1.11 (d,6.8 Hz,3H)	2.25	23.32, 30.60, 160.63
26" o 27"	21.28	CH3	1.06 (d,7.1 Hz,3H)	2.76	21.46, 28.02, 149.72
26" o 27"	21.46	CH3	1.14 (d,7.1 Hz,3H)	2.76	21.28, 28.02, 149.72
28	16.64	CH3	0.68 (s,3H)		48.78, 33.02, 44.13
29	15.67	CH3	1.04 (d,6.5 Hz,3H)	1.56	85.75, 52.59
31	105.70	CH2	5.08 (1H)		30.60, 71.11
			4.89 (1H)		30.60, 71.11
31"	118.15	CH	5.55 (q,6.5Hz,H)	1.68	69.13
32"	13.03	CH3	1.68 (d, 7.0 Hz, 3H)	5.55	

Nota: 22", 23", 24", 25", 26" 27", 31" y 32" son señales que pertenecen a SC1(2) "b".

Tabla N° 13: Asignaciones del núcleo esteroidal SC2 (2) "a"

Átomo	¹³ C* δ/ppm	¹³ C jmod	¹ H δ/ppm (Mult., J(Hz), H)	COSY ¹ H- ¹ H	HMBC ¹ H- ¹³ C
1	40.28	CH2	1.56 (2H)	1.86	
2	29.22	CH2	1.96 (1H)	3.14 , 1.56	
			1.86 (1H)		
3	85.75	CH	3.14 (td,10.6,4.6 Hz, H)	1.86, 1.56	
4	39.59	CH	1.57 (1H)	1.03, 3.14	
5	52.50	CH	1.01 (td,11.6,4.1 Hz, H)		
6	28.05	CH2	1.94 (1H)		
			1.39 (1H)		
7	26.52	CH2	1.56 (1H)		
			1.37 (1H)	2.22	
8	48.48	CH	2.22 (1H)	1.37	
9	136.42	Cuaternario			
10	71.72	Cuaternario			
11	124.57	CH	5.35 (s, H)	2.03	
12	38.35	CH2	2.03 (2H)	5.35	
13 o 14	44.14	Cuaternario			
13 o 14	48.78	Cuaternario			
15	32.99	CH2	1.39 (1H)		
16	31.92	CH2	2.16 (1H)	1.56, 1.01	
			1.26 (1H)		
17	51.46	CH	1.55 (1H)		
18	16.01	CH3	0.83 (s,3H)		38.35, 44.14, 48.78, 51.46
19	50.64	CH2	2.60 (d,15.3 Hz,H)		40.28, 52.50, 48.48, 71.72, 124.57, 136.42
			2.29 (d, 15.5 Hz, H)		
20	33.20	CH	1.75 (1H)	0.98, 1.58	
21	18.13	CH3	0.98 (d,6.4 Hz,3H)	1.75	51.46, 43.92
22	43.92	CH2	1.17 (1H)	4.20, 1.75	
			1.58 (1H)		
22"	45.01	CH2	1.64 (1H)	4.21	
			1.07 (1H)		
23	71.13	CH	4.20 (1H)	1.58	
23"	69.13	CH	4.21 (1H)	1.64	
24	160.61	Cuaternario			
24"	149.72	Cuaternario			
25	30.61	CH	2.25 (1H)	1.08,1.11	160.61
25"	28.02	CH	2.77	1.14, 1.06	
26 o 27	23.31	CH3	1.08 (d,6.8 Hz,3H)	2.25	22.50, 30.61, 160.61
26 o 27	22.50	CH3	1.11 (d,6.8 Hz,3H)	2.25	23.31, 30.61, 160.61
26" o 27"	21.27	CH3	1.06 (d,7.1 Hz,3H)	2.77	21.46, 28.02, 149.72
26" o 27"	21.46	CH3	1.14 (d,7.1 Hz,3H)	2.77	21.27, 28.02, 149.72
28	16.64	CH3	0.68 (s,3H)		48.78, 32.99, 44.14
29	15.67	CH3	1.03 (d,6.5 Hz,3H)	1.57	85.75, 52.50
31	105.73	CH2	5.08 (1H)		30.61, 71.13
			4.89 (1H)		30.61, 71.13
31"	118.18	CH	5.55 (q,6.5Hz,H)	1.69	69.13
32"	13.02	CH3	1.69 (d, 7.0 Hz, 3H)	5.55	

Nota: 22", 23", 24", 25", 26" 27", 31" y 32" son señales que pertenecen a SC2(2) "b".

Tabla N° 14: Asignaciones del núcleo esteroidal SC3 (2) "a"

Átomo	¹³ C* δ/ppm	¹³ C jmod	¹ H δ/ppm (Mult., J(Hz), H)	COSY ¹ H- ¹ H	HMBC ¹ H- ¹³ C
1	40.21	CH2	1.53 (2H)	1.87	
2	28.73	CH2	1.87 (1H)	3.07, 1.53	
			1.80 (1H)		
3	85.31	CH	3.07 (td,10.6,4.6 Hz, H)	1.87, 1.47	
4	39.60	CH	1.47 (1H)	0.95, 3.07	
5	52.33	CH	1.0 (td,11.6,4.1 Hz, H)		
6	28.00	CH2	1.93 (1H)		
			1.36 (1H)		
7	26.50	CH2	1.52 (1H)		
			1.34 (1H)	2.20	
8	48.48	CH	2.20 (1H)	1.34	
9	136.45	Cuaternario			
10	71.77	Cuaternario			
11	124.49	CH	5.34 (s, H)	2.02	
12	38.33	CH2	2.02 (2H)	5.34	
13 o 14	44.11	Cuaternario			
13 o 14	48.77	Cuaternario			
15	32.95	CH2	1.38 (1H)		
			2.15 (1H)		
16	31.98	CH2	1.23 (1H)		
17	51.44	CH	1.55 (1H)		
18	15.94	CH3	0.81 (s,3H)		38.33, 44.11, 48.77, 51.44
19	50.62	CH2	2.57 (d,15.3 Hz, H)		
			2.25 (d, 15.5 Hz, H)	40.21, 52.33, 48.48, 71.77, 124.49, 136.45	
20	33.16	CH	1.74 (1H)	0.97, 1.57	
21	18.09	CH3	0.97 (d,6.4 Hz,3H)	1.74	51.44, 43.85
22	43.85	CH2	1.15 (1H)	4.18 y 1.74	
			1.57 (1H)		
22"	44.94	CH2	1.63 (1H)	4.19	
			1.05(1H)		
23	71.04	CH	4.18 (1H)	1.57	
23"	69.05	CH	4.19 (1H)	1.63	
24	160.55	Cuaternario			
24"	149.61	Cuaternario			
25	30.57	CH	2.23 (1H)	1.07, 1.09	160.55
25"	27.97	CH	2.73	1.11, 1.03	
26 o 27	23.29	CH3	1.07 (d,6.8 Hz,3H)	2.23	22.46, 30.57, 160.55
26 o 27	22.46	CH3	1.09 (d,6.8 Hz,3H)	2.23	23.29, 30.57, 160.55
26" o 27"	21.24	CH3	1.03 (d,7.1 Hz,3H)	2.73	21.41, 27.97, 149.61
26" o 27"	21.41	CH3	1.11 (d,7.1 Hz,3H)	2.73	21.24, 27.97, 149.61
28	16.59	CH3	0.66 (s,3H)		48.77, 32.95, 44.11
29	15.61	CH3	0.95 (d,6.5 Hz,3H)	1,47	85.31, 52.33
31	105.68	CH2	5.07(1H)		30.57, 71.04
			4.87(1H)	30.57, 71.04	
31"	118.18	CH	5.54 (q,6.5Hz,H)	1.66	69.05
32"	13.00	CH3	1.66 (d, 7.0 Hz, 3H)	5.54	

Nota: 22", 23", 24", 25", 26" 27", 31" y 32" son señales que pertenecen a SC3(2) "b".

Tabla N° 15: Asignaciones de los monosacáridos presentes en SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2)

Fracción	Monosacárido	Átomo	¹³ C* δ/ppm	¹³ C jmod	¹ H δ/ppm (Mult., J(Hz), H)	COSY ¹ H- ¹ H	HMBC ¹ H- ¹³ C
SC1 (2)	.	1'	104.58	CH	4.33 (d, J = 6.6 Hz, 1H)	3.75	85.75
		2'	71.60	CH	3.75 (t, J = 7.2 Hz, 1H)	4.33	
		3'	72.77	CH	3.66 (1H)		
		4'	67.80	CH	3.94 (s, 1H)		
		5'	65.12	CH	3.55(1H),3.96(1H)		
SC2 (2)	XILOPIRANOSA	1'	104.25	CH	4.40 (d, J = 6.1 Hz, 1H)	3.51	85.75, 64.06
		2'	71.60	CH	3.45 (t, J = 6.9 Hz, 1H)	4.40	104.25, 74.39
		3'	72.56	CH	3.55 (dd, J = 7.7 Hz, 1H)	3.71	72.56, 69.70
		4'	69.70	CH	3.71 (s, J=7.6, 11, 1H)	4.0, 3.30, 3.55	
		5'	64.06	CH	4.0 (1H),3.30(t, J=9.5,1H)	3.71	104.25
SC3 (2)	RAMNOPIRANOSA	1'	101.99	CH	4.83 (d,1.6 Hz, H)	3.94	67.99, 85.31
		2'	71.04	CH	3.94 (dd, 1.6, 3.3 Hz, H)	4.83, 3.75	
		3'	71.69	CH	3.75 (dd, 9.3, 3.3 Hz, H)	3.42, 3.94	
		4'	73.32	CH	3.42 (t,9.5 Hz, H)	3.75,3.80	17.28
		5'	67.99	CH	3.80 (dd,6.3, 9.5 Hz, H)	3.42, 1.29	
		6'	17.28	CH3	1.29 (d,6.3 Hz,3H)	3.80	73.32, 67.99

4.6 ANÁLISIS POR HPLC-MASAS DE SC3 (2)

4.6.1 ESI: MODO NEGATIVO

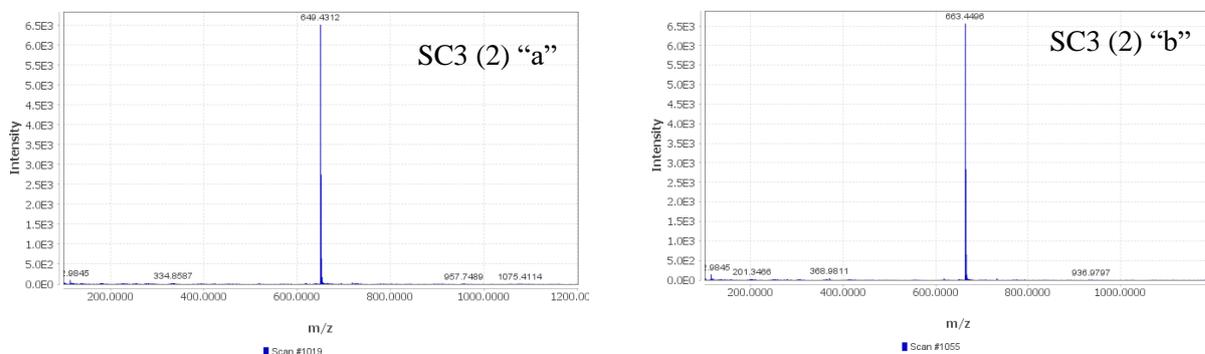


Figura N° 30: Señales de los aductos formados con el anión formiato $[M+HCOO]^-$

El aducto formado a partir de SC3 (2) "a" presenta m/z de 649, mientras que el aducto formado a partir de SC3 (2) "b" presentan m/z de 663.

4.6.2 ESI: MODO POSITIVO

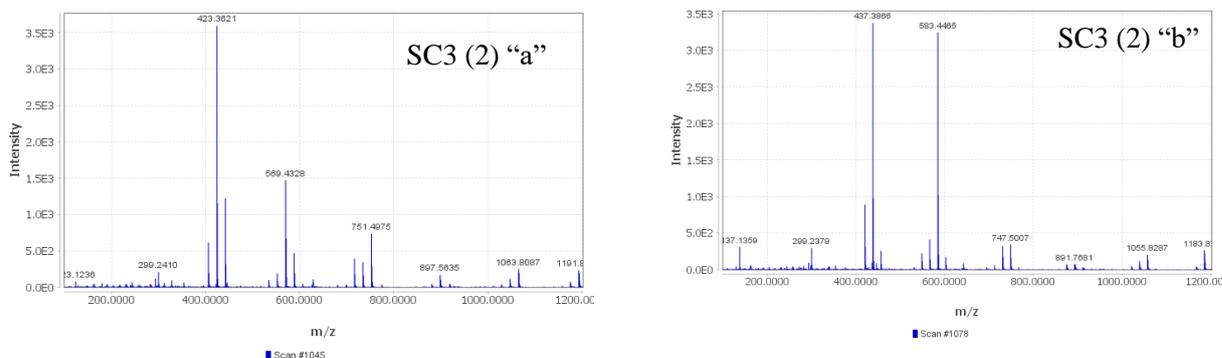


Figura N° 31: Espectro de masas: ESI en modo positivo de los compuestos SC3 (2) "a" y SC3 (2) "b"

Los fragmentos de 569 m/z y 583 m/z para SC3 (2) "a" y SC3 (2) "b" respectivamente son el resultado de la pérdida de masa de 35 um, que corresponde a una molécula de agua y un grupo hidroxilo. Los otros dos

fragmentos de 423 m/z y 437 m/z son el resultado de la misma pérdida incluyendo la pérdida del azúcar.

V. DISCUSIÓN

Los resultados de la actividad anti-*H.pylori* obtenidos a partir del bioguiaje indican que las flores de *Cordia lutea* Lam son una fuente de saponinas esteroidales por primera vez descritas para esta especie.

Durante la etapa inicial de partición líquida-líquida se observó la presencia de una fracción amarilla y mayoritaria (que contiene a su vez los compuestos coloreados A y B), la cual representó el 22% del extracto crudo obtenido a partir de las flores. Utilizando HPLC se pudo confirmar la presencia de rutina (Compuesto coloreado A) en esta fracción. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Mayevich et al, los cuales además de rutina, identificaron quercetina, ácido palmítico y ácido linolénico como compuestos mayoritarios de un extracto metanólico obtenido a partir de las flores.(65)

En el 2003, Konstantinopoulou et al determinaron la actividad anti-*H. pylori* de varios flavonoles identificados en *Anthemis altissima* L. Estos autores encontraron valores de CMI de 12.5 µg/mL para quercetina 3-metiléter y de 50 µg/mL para quercetina. Sin embargo los compuestos presentes en la fracción amarilla obtenida en este estudio solo presentaron una actividad anti-*H. pylori* moderada : CMI del compuesto coloreado A: rutina = 125 µg/mL y compuesto coloreado B = 250 µg/mL. Esto podría deberse a que en el presente trabajo se utilizó una mayor cantidad de inóculo bacteriano final (1×10^6 UFC). (49)

Luego de obtener fracciones de diferente polaridad a través de la partición líquida-líquida del extracto crudo de *C. lutea* (CIM=125µg/mL), se observó que la actividad anti-*H. pylori* se encontró en la fracción metanólica (62.5 µg/mL). A pesar de que existe la posibilidad de que los componentes individuales o activos sean separados unos de otros y pierdan su actividad; los resultados del presente estudio sugieren que, por el contrario, algunos de los compuestos presentes en la fracción metanólica concentran la actividad anti-*H. pylori*.

En la Tabla N° 4 se presentan los resultados de actividad anti-*H. pylori* obtenidos para diferentes extractos de plantas. Numerosos estudios han categorizado los resultados de actividad *in vitro* de los extractos de plantas, fracciones parcialmente purificadas y compuestos aislados. En el presente trabajo se tomó como referencia la categorización realizada por Wang et al: (1) Excelente actividad (CMI:< 10 µg/mL); (2) Buena actividad (CMI: 10-100 µg/mL); (3) Actividad moderada (CMI: 100-1000 µg/mL); y (4) Actividad débil (CMI: >1000 µg/mL). Tomando en cuenta este criterio se puede concluir que la fracción metanólica presenta una buena actividad anti-*H. pylori* a pesar de tratarse de una fracción parcialmente purificada.(29)

A partir de las purificaciones sucesivas realizadas a partir de la fracción metanólica se observó que la actividad antibacteriana se siguió concentrando hasta la obtención de tres sub-fracciones bien definidas: SC1, SC2 y SC3. Luego de una última etapa de purificación utilizando cartuchos de SPE, se obtuvieron las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2); las cuales presentaron valores de CMI de

31.3 ($\mu\text{g}/\text{mL}$); lo que por lo tanto demuestra que a través de todo el proceso de bioguiage se pudo obtener fracciones que serían mediadores de la actividad antibacteriana *in vitro*.

Por otro lado, se obtuvieron resultados de citotoxicidad elevados sobre células RAW 264.7 de 4.2, 3.8 y 8.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Estos valores de citotoxicidad, los cuales son incluso mayores que los obtenidos para el control utilizado (anfotericina B), nos dan un indicio de que las sapogeninas esteroidales aisladas a partir de la planta en estudio no son selectivas y que por lo tanto la actividad que ejercen podría estar relacionada con la propiedad que tienen estos tipos de compuestos de producir una disrupción de la membrana plasmática.(77)

Antes de realizar la caracterización estructural mediante las técnicas espectroscópicas se analizaron los compuestos por UHPLC. Esto permitió identificar que cada uno de los componentes aislados SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2) se trataban en realidad, de una mezcla de dos compuestos “a” y “b” que comparten características estructurales similares pero que varían en una pequeña porción de la molécula (Ver página N° 67). El análisis de por RMN y HPLC-Masas permitió identificar que los compuestos presentes en cada una de las fracciones fueron saponinas esteroidales.

Entre la inmensa variedad de sapogeninas identificadas en plantas medicinales, las del tipo triterpeno se han encontrado en mayor abundancia. En las siguientes especies de *Cordia* estudiadas químicamente: *C. alliodora*, *C.*

verbenácea, *C. spinescens*, *C. plauhiensins*, *C. trichotoma*, *C. multispicata* y *C. myxa*, se han identificado sapogeninas del tipo: oleano, ursano, dammarano y lupano. En muchos de los casos se encontraban de manera libre y en otros se encontraban unidos a un residuo glicosídico (Ver anexo N° 3).

Por otro lado, se ha descrito en la literatura la presencia de sapogeninas esteroidales como β -sisosterol (y sus respectivas saponinas esteroidales) en la corteza de *C. sinensis*, en las semillas de *C. dichotoma* y en la madera de *C. trichotoma*. Así mismo se ha identificado la presencia de estigmasterol y campesterol en las hojas de *C. macleodii*. De manera general, las saponinas del tipo esteroidal presentes en el género *Cordia* se hallan principalmente en la madera, hojas, raíces, frutos y semillas; mientras que los compuestos aislados en el presente trabajo fueron obtenidos a partir de las flores de *C. lutea* (Ver anexo N° 3).

Luego de realizar el análisis de los espectros RMN ^1H , ^{13}C y HSQC se procedió con la elucidación estructural de los compuestos presentes en la fracción SC3 (2). El mismo análisis fue aplicado tanto para la fracción SC1 (2) como SC2 (2).

Para la elucidación estructural del núcleo esteroidal se tomó como punto de partida dos señales típicas para 4α metilesteroles. La primera señal corresponde a un metilo presente a $\delta 0.95$ ppm (d,J = 6.5 Hz, 3H) y que está unido al carbono en posición 4; mientras que la segunda se presenta como un sexteto con un

desplazamiento típico de δ 3.06 ppm (td, J = 10.6, 4.6 Hz) en el espectro de RMN ^1H (78). La constante de acoplamiento de esta última señal sugiere además que se encuentra en posición $3\alpha\text{H}$ con respecto al plano del papel y por lo tanto presenta el OH- en posición β como normalmente ocurre para el común de sapogeninas esteroideas trans-fusionadas.(79-81)

Siguiendo con el análisis de los metilos angulares, se pudo identificar dos singletes a campo alto (0.66ppm y 0.81 ppm) los cuales mostraron correlaciones en HMBC con carbonos cuaternarios angulares (Posición 13 y 14) y con señales de protón de carbonos adyacentes (Posiciones 12,17 y 15). Estas correlaciones permitieron identificar que las geninas presentaban un grupo metilo unido al carbono cuaternario en posición 14.(80)

La importancia de la identificación de estos metilos angulares radica en que los 4α y/o 14α metilesteroles son encontrados de manera específica en cierto grupo de especies de plantas e invertebrados marinos del phylum Echinodermata. Utilizando métodos espectroscópicos se han identificado 4α , 14α -metil esteroleas a partir de *Euphorbia chamaesyce* (Euphorbiaceae), *Musa sapientum* (Musaceae), *Gynostemma pentaphyllum* (Leguminosae) y *Phaseolus vulgaris* (Curcubitaceae). La presencia de estos compuestos en familias de plantas no correlacionadas como Leguminosae y Curcubitaceae sugiere que su distribución es más amplia de la que se pensaba. (81-84)

Generalmente los 4α y/o 14α metilesteroles son componentes minoritarios de la mezcla de esteroides presentes en los organismos y están usualmente presentes como intermediarios en la ruta biosintética de 4-desmetilesteroles. Sin embargo, este tipo de geninas esteroidales podrían estar ocasionalmente presente en cantidades apreciables como resultado de la ausencia de una enzima responsable de la desmetilación en la ruta biosintética de los esteroides o quizás por una regulación estricta de los pasos de desmetilación de los carbonos 4 y 14. Como se verá a continuación, esta última posibilidad se hace plausible por la presencia de un doble enlace en la posición $\Delta^{9(11)}$ del núcleo esteroideal.(81)

En el análisis del espectro de RMN ^1H de la fracción SC3 (2) se identificó una señal con un desplazamiento típico de protones olefínicos a $\delta 5.34$ ppm. Esta señal demuestra la presencia de un doble enlace tri-sustituido y eliminando la posibilidad de un enlace $\Delta^8(9)$. Esto deja a la posición $\Delta^9(11)$ como la posición más probable para la insaturación y se elimina la posibilidad de un enlace Δ^7 ya que un doble enlace en esta posición genera un protón olefínico desplazado a un campo ligeramente más alto (5.15-5.25ppm). Presumiblemente la presencia de este doble enlace evita que se produzca la reacción de 14α demetilación típica de compuestos esteroidales; sin embargo el mecanismo que da origen a este tipo de compuestos no es claro todavía y al parecer no existe evidencia experimental con respecto a su biosíntesis.(80, 81, 85)

Para culminar con el análisis estructural realizado por RMN se tiene que la cadena lateral presente en el compuesto SC3 (2) “a” tiene 9 carbonos y un doble

enlace Δ^{24} (31), el cual está ubicado en la cadena lateral de otros compuestos intermediarios de 24-alkilesteroides presentes en diversos géneros de plantas e invertebrados marinos. De manera alternativa, este doble enlace puede servir como sitio para una segunda reacción de transmetilación en la posición 24 produciendo compuestos con cadena lateral de 10 carbonos como la que presenta SC3 (2) “b”. (81, 83, 85, 86)

A pesar de que los resultados de citotoxicidad disminuyen el potencial terapéutico de los compuestos aislados en el presente trabajo; existe aún un gran interés en la búsqueda de compuestos antibacterianos derivados de las plantas debido a que tales compuestos permiten abordar estrategias no únicamente relacionadas con un mecanismo de acción directo. Por ejemplo la inhibición de los factores de virulencia así como la utilización de agentes que modifican la resistencia a los antibióticos utilizados comúnmente son dos de las estrategias que están ganando considerable atención en los últimos años. Sin embargo, el abordaje de estas estrategias incluye obstáculos tales como la utilización de bioensayos mucho más complejos y costosos, así como la dificultad para interpretar los resultados.(87)

C. lutea es una especie ampliamente usada en la costa norte del Perú; sin embargo presenta solo un estudio de caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en sus flores. Presenta además una solicitud de patente para como componente herbal, junto a *Anona muricata* y *Cúrcuma longa* para la prevención y tratamiento de la hepatitis. Los resultados de este trabajo muestran

que las flores de *C. lutea*, además de presentar compuestos esteroidales, cuentan con una cantidad importante de compuestos fenólicos, a los que se les ha atribuido diferentes propiedades medicinales. Por lo tanto, la realización de una mayor cantidad de estudios tanto químicos como farmacológicos permitirán darle un valor agregado a este recurso natural poco estudiado pero que representan un gran potencial tanto terapéutico como económico.(71, 88)

VI. CONCLUSIONES

- Las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2), obtenidas a partir de las flores de *Cordia. lutea* Lam, tienen buena actividad *in vitro* anti *Helicobacter pylori* al presentar valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de 31.5 µg/mL.
- Los compuestos presentes en cada una de las fracciones fueron caracterizados estructuralmente e identificados como saponinas del tipo esteroideal.
- Las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2), obtenidas a partir de las flores de *Cordia. lutea* Lam, presentan una elevada toxicidad frente a células RAW 264.7, al presentar valores de concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 4.2 µg/mL, 3.8 µg/mL y 8.8 µg/mL respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- Para realizar el aislamiento de las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2), se debe empezar a partir de un extracto diclorometánico de las hojas de *Cordia lutea* Lam, de este modo se podría evitar extraer varios compuestos interferentes.
- Evaluar la citotoxicidad de las fracciones SC1 (2), SC2 (2) y SC3 (2) y antibióticos de referencia en células AGS (línea celular de carcinoma gástrico)
- Realizar la separación de los compuestos “a” y “b” mediante una TLC “argentada” (embebida en Nitrato de Plata).
- Cuantificar la cantidad de las fracciones obtenidas en un preparado tradicional estandarizado.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SL, Duke JA, Briemann HL. Natural Products from Plants. 2 ed. Florida: CRC Press; 2006.
2. Powers JH. Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10:23-31.
3. Song YG. The History of Antimicrobial Drug Development and the Current Situation. *Infect Chemother*. 2012;44(4):263-8.
4. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Locka O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003;88(2-3):199-204.
5. Colegate SM, Molyneux RJ. Bioactive natural products. 2 ed. Florida: CRC Press; 2008.
6. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol*. 2006;106(3):290-302.
7. Kusters JG, van-Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(3):449-90.
8. Soto G, Bautista CT, Roth DE, Gilman RH, Velapatiño B, Ogura M, et al. *Helicobacter pylori* Reinfection Is Common in Peruvian Adults after Antibiotic Eradication Therapy. *Journal of Infectious Diseases*. 2003;188(9):1263-75.
9. León-Barúa R, Berendson-Seminario R, Recavarren-Arce S, Gilman RH. Geographic Factors Probably Modulating Alternative Pathways in

- Helicobacter pylori*-Associated Gastroduodenal Pathology: A Hypothesis. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;25(5):1013-6.
10. Villar-López M, Villavicencio-Vargas O. *Manual de Fitoterapia*. Lima:Essalud: Organización Panamericana de la Salud; 2001.
 11. Sachs G, Weeks DL, Wen Y, Marcus EA, Scott DR, Melchers K. Acid Acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology*. 2005;20(6):429-38.
 12. Krulwich TA, Sachs G, Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Micro*. 2011;9(5):330-43.
 13. Mobley H, Mendz G, Hazell S. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001.
 14. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997;10(4):720-41.
 15. Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Micro*. 2004;2(9):747-65.
 16. Abreu L, Garrido A, Albillos A, Barrios C, Calleja L, Vera M. *Gastroenterología. Endoscopía diagnóstica y terapéutica*. 2 ed. Madrid: Médica Panamericana; 2007.
 17. Gerrits MM, van Vliet AHM, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(11):699-709.
 18. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 2007;56(6):772-81.

19. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin APS, Jones R, Axon A, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—The Maastricht II-2000 Consensus Report. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2002;16(2):167-80.
20. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Atherton J, Axon A, Bazzoli F, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht IV Consensus Report. *Gut*. 2014;61(0):646-64.
21. Francesco VD, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C, et al. Worldwide *H. pylori* Antibiotic Resistance: a Systematic Review. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2010;19(4):409-14.
22. Wu W, Yang Y, Sun G. Recent Insights into Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Eradication. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012;2012:8.
23. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*. 2010 August 1, 2010;59(8):1143-53.
24. Rodríguez W, Pareja-Cruz A, Yushimito L, Ramos AR, Gilman RH, Watanabe-Yamamoto J, et al. Tratamiento del *Helicobacter Pylori* con Omeprazol, Amoxicilina y Claritromicina en esquemas de 7 y 10 días. *Rev Gastroenterol Perú*. 2003;2003(23):177-83.
25. Vale FF, Oleastro M. Overview of the phytomedicine approaches against *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2014;20(19):5594-609.
26. Murali MR, Naveen SV, Son CG, Raghavendran HRB. Current knowledge on alleviating *Helicobacter pylori* infections through the use of some

- commonly known natural products: bench to bedside. *Integrative Medicine Research*. 2014;3(3):111-8.
27. Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;122(2):402-5.
 28. CLSI, NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved standar M45-A2. 2010.
 29. Wang YC. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World J Gastroenterol*. 2014;20(30):103068-82.
 30. Nostro A, Cellini L, Bartolomeo SD, Cannatelli MA, Campli ED, Procopio F, et al. Effects of combining extracts (from propolis or *Zingiber officinale*) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research*. 2006;20(3):187-90.
 31. Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, Hamill FA, Fabricant D, Dietz BM, et al. In Vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytotherapy Research*. 2005;19(11):988-91.
 32. Gadhi CA, Benharref A, Jana M, Lozniewski A. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;75(2-3):203-5.
 33. Zhang X-Q, Gu H-M, Li X-Z, Xu Z-N, Chen Y-S, Li Y. Anti-*Helicobacter pylori* compounds from the ethanol extracts of *Geranium wilfordii*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;147(1):204-7.

34. Chinniah A, Mohapatra S, Goswami S, Mahapatra A, Kar SK, Mallavadhani UV, et al. On the potential of *Tephrosia purpurea* as anti-*Helicobacter pylori* agent. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;124(3):642-5.
35. Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu JY, Tan RX. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;98(3):329-33.
36. Bisignano C, Filocamo A, La Camera E, Zummo S, Fera MT, Mandalari G. Antibacterial activities of almond skins on cagA-positive and-negative clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiology*. 2013;13(1):1-6.
37. Vega AE, Wendel GH, Maria AOM, Pelzer L. Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* and dehydroleucodine against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;124(3):653-5.
38. Yanagawa Y, Yamamoto Y, Hara Y, Shimamura T. A Combination Effect of Epigallocatechin Gallate, a Major Compound of Green Tea Catechins, with Antibiotics on *Helicobacter pylori* Growth In Vitro. *Current Microbiology*. 2003;47(3):0244-9.
39. Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sciences*. 2002;71(12):1449-63.
40. Asha MK, Debraj D, Prashanth Ds, Edwin JR, Srikanth HS, Muruganantham N, et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of a flavonoid rich extract of *Glycyrrhiza glabra* and its probable mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;145(2):581-6.

41. Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, et al. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(11).
42. Mahady GB, Pendland SL, Yun GS, Lu Z-Z, Stoia A. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the Gingerols Inhibit the Growth of Cag A+ Strains of *Helicobacter pylori*. *Anticancer research*. 2003;23(0):3699–702.
43. Yin S, Fan C-Q, Dong L, Yue J-M. Psoracorylifols A–E, five novel compounds with activity against *Helicobacter pylori* from seeds of *Psoralea corylifolia*. *Tetrahedron*. 2006;62(11):2569-75.
44. Paulo L, Oleastro M, Gallardo E, Queiroz JA, Domingues F. Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. *Food Research International*. 2011;44(4):964-9.
45. Ustün O, Özçelik B, Akyön Y, Abbasoglu U, Yesilada E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;108(3):457-61.
46. De-Leo M, Tommasi ND, Sanogo R, D'Angelo V, Germanò MP, Bisignano G, et al. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *Phytochemistry*. 2006;67(24):2623-9.
47. Park B-S, Lee H-K, Lee S-E, Piao X-L, Takeoka GR, Wong RY, et al. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;105(1–2):255-62.

48. Bae E-A, Han MJ, Baek N-I, Kim D-H. In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* activity of Panaxytriol isolated from Ginseng. Archives of Pharmacal Research. 2001;24(4):297-9.
49. Konstantinopoulou M, Karioti A, Skaltsas S, Skaltsa H. Sesquiterpene Lactones from *Anthemis altissima* and Their Anti-*Helicobacter pylori* Activity. Journal of Natural Products. 2003;66(5):699-702.
50. Ochi T, Shibata H, Higuti T, Kodama K-h, Kusumi T, Takaishi Y. Anti-*Helicobacter pylori* Compounds from *Santalum album*. Journal of Natural Products. 2005;68(6):819-24.
51. Safavi M, Shams-Ardakani M, Foroumadi A. Medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Pharm Biol. 2015;53(7):939-60.
52. Singh G. Plant systematics. 3 ed. New Hampshire: Science Publishers; 2010.
53. León B, Sánchez I. Boraginaceae endémicas del Perú. Revista Peruana de Biología. 2006;13 (2):177-81.
54. Macbride JF. Boraginaceae. Flora of Peru. Field Museum of Natural History, Botanical Series. 1960;13(5/2):539-609.
55. Mostacero-León J, Castillo-Picón F, Mejía-Coico FR, Gamarra-Torres OA, Charcape-Ravelo JM, Ramirez-Vargas RA. Plantas medicinales del Perú. Trujillo: Asamblea Nacional de Rectores; 2011.
56. Bussmann RW, Sharon D. Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2006;2(47):1-18.

57. Moir M, Thomson RH, Hausen BM, Simatupang MH. Cordiachromes: a new group of terpenoid quinones from *Cordia* spp. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1972 (6):363-4.
58. Moir M, Thomson RH. Naturally occurring quinones. Part XXII. Terpenoid quinones in *Cordia* spp. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1973 (0):1352-7.
59. Stevens KL, Jurd L, Manners G. Alliodorin, a Phenolic Terpenoid from *Cordia alliodora*. *Tetrahedron Letters*. 1973;31(0):2955-8.
60. Stevens KL, Jurd L. The structure and synthesis of alliodorin. *Tetrahedron*. 1976;32(6):665-8.
61. Manners GD, Jurd L. New natural products from marine borer resistant woods. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1977;25(4):726-30.
62. Bieber LW, Messana I, Lins SCN, da Silva Filho ÁA, Chiappeta AA, De Mélo JF. Meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. *Phytochemistry*. 1990;29(6):1955-9.
63. Bieber LW, Krebs HC, Schäfer W. Further meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. *Phytochemistry*. 1994;35(4):1027-8.
64. Diniz JC, Viana FA, Oliveira OF, Maciel MAM, Torres MdCdM, Braz-Filho R, et al. ¹H and ¹³C NMR assignments for two new cordiaquinones from roots of *Cordia leucocephala*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2009;47(2):190-3.

65. Mayevych I, López-Romero M, Cabanillas J. Chemical Composition of *Cordia lutea* L. :Absence of Pyrrolizidine Alkaloides. *Natural Products Chemistry & Research*. 2015;3(6):1-2.
66. Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: The link between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry*. 1991;30(12):3864-74.
67. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. *Natural Products Isolation*. 2 ed. New Jersey: Human Press; 2006.
68. Lemos LMS, Martins TB, Tanajura GH, Gazoni VF, Bonaldo J, Strada CL, et al. Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;141(1):432-9.
69. Pinheiro MMG, Fernandes SBO, Fingolo CE, Boylan F, Fernandes PD. Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;146(1):324-30.
70. Waller GR, Yamasaki K. *Saponins used in food and agriculture*. New York: Plenum Press; 1996.
71. Hostettmann K, Marston A. *Saponins*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
72. Makin H, Gower D. *Steroid Analysis*. New York: Springer; 2010.
73. Yu SS, Yu DQ, Liang XT, Cai P. NMR studies on sugar moieties of some new triterpenoid saponins from *Aralia spinifolia* and *Nothopanax davidii*. In: Chong-Ren Y, Osamu T, editors. *Studies in Plant Science*. Volume 6: Elsevier; 1999. p. 43-51.

74. El-Khadem HS. Carbohydrate chemistry. San Diego: Academic Press; 1998.
75. Agrawal PK, Jain DC, Pathak AK. NMR spectroscopy of steroidal saponins and steroidal saponins: An update. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 1995;33(12):923-53.
76. Agrawal PK. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 1992;31(10):3307-30.
77. Waller GR, Yamasaki K. Saponins used in traditional and modern medicine. New York: Springer US; 1996.
78. Bohlin L, WCM K, Fenical W, Djerassi C. 4 α -methyl-24S-ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol and 4 α -methyl-24S-ethyl-5 α -cholest-8(14)-en-3 β -ol, two new sterols from a cultured marine dinoflagellate. *Phytochemistry*. 1981;20(0):2397-401.
79. Makin HLJ, Gower DB. Steroid Analysis. Holanda: Springer 2010.
80. Goad LJ, Garneau FX, Simard JL, ApSimon JW, Girard M. Isolation of $\Delta^9(11)$ -sterols from the sea cucumber *Psolus fabricii*. Implications for holothurin biosynthesis. *Tetrahedron Letters*. 1985;26(29):3513-6.
81. Goad J, Akihisa T. Analysis of Sterols. London: Chapman & Hall; 1997.
82. Akihisa T, Thakur S, Rosenstein FU, Matsumoto T. Sterols of Cucurbitaceae: The configurations at C-24 of 24-Alkyl- Δ^5 -, Δ^7 - and Δ^8 -sterols. *Lipids*. 1986;21(1):39-47.
83. Akihisa T, Kokke WCMC, Yokota T, Tamura T, Matsumoto T. 4 α ,14 α -Dimethyl-5 α -ergosta-7,9(11),24(28)-trien-3 β -ol from *Phaseolus vulgaris* and *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochemistry*. 1990;29(5):1647-51.

84. Akihisa T, Shimizu N, Tamura T, Matsumoto T. (24 S)-14 α ,24-dimethyl-9 β ,19-cyclo-5 α -cholest-25-en-3 β -ol: A new sterol and other sterols in *Musa sapientum*. *Lipids*. 1986;21(8):494-7.
85. Itoh T, Ishii T, Tamura T, Matsumoto T. Four new and other 4 α -methylsterols in the seeds of Solanaceae. *Phytochemistry*. 1978;17(5):971-7.
86. Akihisa T, Tamura T, Matsumoto T. 14 α -methyl-5 α -ergosta-9(11)24(28)-dien-3 β -ol a sterol from *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochemistry*. 1987;26(8):2412-3.
87. Heinrich M, Jäger AK. *Ethnopharmacology*. UK: Wiley; 2015.
88. Coral JGC. *Herbal compositions and methods for treating hepatic disorders*. Google Patents; 2009.
89. Parks J, Gyeltshen T, Prachyawarakorn V, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. Glutarimide Alkaloids and a Terpenoid Benzoquinone from *Cordia globifera*. *Journal of Natural Products*. 2010;73(5):992-4.
90. Dettrakul S, Surerum S, Rajviroongit S, Kittakoop P. Biomimetic Transformation and Biological Activities of Globiferin, a Terpenoid Benzoquinone from *Cordia globifera*. *Journal of Natural Products*. 2009;72(5):861-5.
91. Chen TK, Ales DC, Baenziger NC, Wiemer DF. Ant-repellent triterpenoids from *Cordia alliodora*. *The Journal of Organic Chemistry*. 1983;48(20):3525-31.
92. Ioset J-R, Marston A, Gupta MP, Hostettmann K. Antifungal and Larvicidal Compounds from the Root Bark of *Cordia alliodora*. *Journal of Natural Products*. 2000;63(3):424-6.

93. Manners GD. The hydroquinone terpenoids of *Cordia elaeagnoides*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. 1983 (0):39-43.
94. Ioset J-R, Marston A, Gupta MP, Hostettmann K. Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnael*. Phytochemistry. 1998;47(5):729-34.
95. Ioset J-R, Marston A, Gupta MP, Hostettmann K. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. Phytochemistry. 2000;53(5):613-7.
96. Alencar de Menezes JES, Lemos TLG, Pessoa ODL, Braz-Filho R, Montenegro RC, Wilke DV, et al. A Cytotoxic Meroterpenoid Benzoquinone from Roots of *Cordia globosa*. Planta Med. 2005;71(01):54-8.
97. Silva SASd, Rodrigues MSL, Agra MdF, Da-Cunha EVL, Barbosa-Filho JM, Silva MSd. Flavonoids from *Cordia globosa*. Biochemical Systematics and Ecology. 2004;32(0):359-61.
98. Velde VV, Lavie D, Zelnik R, Matida AK, Panizza S. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. 1982 (0):2697-700.
99. Michielin EMZ, Salvador AA, Riehl CAS, Smânia Jr A, Smânia EFA, Ferreira SRS. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. Bioresource Technology. 2009;100(24):6615-23.
100. Domínguez XA, Escarria S, Butruille D. Dimethyl-3,4'-kaempferol de *Cordia boissieri*. Phytochemistry. 1973;12(3):724-5.

101. Marston A, Zagorski MG, Hostettmann K. Antifungal Polyphenols from *Cordia goetzei* Gürke. *Helvetica Chimica Acta*. 1988;71(5):1210-9.
102. Jamkhande PG, Barde SR, Patwekar SL, Tidke PS. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of *Cordia dichotoma* (Indian cherry): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013;3(12):1009-12.
103. Basu N, Ghosal P, Thakur S. Structural studies on a polysaccharides fraction from the fruits of *Cordia dichotoma* Forst. *Carbohydrate research*. 1984 (131):149-55.
104. Lim YA, Kojima S, Nakamura N, Miyashiro H, Fushimi H, Komatsu K, et al. Inhibitory effects of *Cordia spinescens* extracts and their constituents on reverse transcriptase and protease from human immunodeficiency virus. *Phytotherapy Research*. 1997;11(7):490-5.
105. Nakamura N, Kojima S, Lim YA, Meselhy MR, Hattori M, Gupta MP, et al. Dammarane-type triterpenes from *Cordia spinescens*. *Phytochemistry*. 1997;46(6):1139-41.
106. Santos RP, Viana FA, Lemos TLG, Silveira ER, Braz-Filho R, Pessoa ODL. Structure elucidation and total assignment of ¹H and ¹³C NMR data for a new bisdesmoside saponin from *Cordia piauhiensis*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2003;41(9):735-8.
107. Santos RP, Silveira ER, Uchôa DEdA, Pessoa ODL, Viana FA, Braz-Filho R. ¹H and ¹³C NMR spectral data of new saponins from *Cordia piauhiensis*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2007;45(8):692-4.

108. Menezes JESA, Lemos TLG, Silveira ER, Braz-Filho R, Pessoa ODL. Trichotomol, a New Cadinenediol from *Cordia trichotoma*. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2001;12:787-90.
109. Seikel MK, Rowe JW. Eudesmol isomers from *Cordia trichotoma* wood. Phytochemistry. 1964;3(1):27-32.
110. Geller F, Schmidt C, Göttert M, Fronza M, Schattel V, Heinzmann B, et al. Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia americana*. Journal of Ethnopharmacology. 2010;128(3):561-6.
111. Al-Musayeb N, Perveen S, Fatima I, Nasir M, Hussain A. Antioxidant, Anti-Glycation and Anti-Inflammatory Activities of Phenolic Constituents from *Cordia sinensis*. Molecules. 2011;16(12):10214.
112. Firdous S, Khan K, Zikr-Ur-Rehman S, Ali Z, Soomro S, Ahmnd VU, et al. Isolation of Phytochemicals from *Cordia rothii* (Boraginaceae) and Evaluation of their Immunomodulatory Properties. Record of Natural Products. 2014;8(1):51-4.
113. Kuroyanagi M, Seki T, Hayashi T, Nagashima Y, Kawahara N, Sekita S, et al. Anti-androgenic Triterpenoids from the Brazilian Medicinal Plant, *Cordia multispicata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2001;49(8):954-7.
114. Kuroyanagi M, Kawahara N, Sekita S, Satake M, Hayashi T, Takase Y, et al. Dammarane-Type Triterpenes from the Brazilian Medicinal Plant *Cordia multispicata*. Journal of Natural Products. 2003;66(10):1307-12.
115. Begum S, Perwaiz S, Siddiqui BS, Khan S, Fayyaz S, Ramzan M. Chemical Constituents of *Cordia latifolia* and Their Nematicidal Activity. Chemistry & Biodiversity. 2011;8(5):850-61.

116. Dai J, Sorribas A, Yoshida WY, Williams PG. Sebestenoids A-D, BACE1 inhibitors from *Cordia sebestena*. *Phytochemistry*. 2010;71(17-18):2168-73.
117. Nariya P, Shukla V, Acharya R, Nariya M, Bhatt P, Pandit C, et al. Isolation and characterization of phytosterols from *Cordia macleodii* (Hook f. and Thomson) bark by chromatographic and spectroscopic method. *Asian Journal of Pharmaceutical and clinical research*. 2014;7(5):86-8.

ANEXOS

ANEXO 1: Plantas y extractos con actividad *in vitro* anti-*Helicobacter pylori*

Nombre científico	Parte usada	Tipo de Extracto	Nº de cepas de pacientes	MIC ug/mL cepa de referencia	MIC ug/ mL global (todas las cepas)	MIC Antibiótico	Referencia
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Rizomas	Extracto etanólico 96%	24	10	10- 160	Claritromicina = 0,0625 (ATCC 43504)	2006 Nostro et al (30)
		Extracto metanólico 95%	14	No indica	6,25-50		
<i>Myristica fragrans</i> Houtt	Semillas	Extracto metanólico 95%	14	No indica	3,125-25	Amoxicilina = 0,002-0,06 (Global) Metronidazol = 64-128 (Global)	2005 Mahady et al (31)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Hojas	Extracto metanólico 95%	14	No indica	12,5-100		
<i>Achillea millefolium</i> L.	Partes aéreas	Extracto metanólico 95%	14	No indica	1,56-100		
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Partes aéreas	Extracto metanólico 95%	14	No indica	50-100		
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill	Semillas	Extracto metanólicos 95%	14	No indica	50-100		
<i>Origanum majorana</i> L.	Partes acéreas	Extracto metanólico 95%	14	No indica	50-100		
<i>Carum carvi</i> L.	Semillas	Extracto metanólico 95%	14	No indica	100		
<i>Elettaria cardamomum</i> L.	Semillas	Extracto metanólico 95%	14	No indica	3,125 - >100		
<i>Gentiana lutea</i> L.	Raíces	Extracto metanólico 95%	14	No indica	3,125 - 100		
<i>Juniper communis</i> L.	Berries	Extracto metanólico 95%	14	No indica	25 - 100		
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill	Flores	Extracto metanólico 95%	14	No indica	100 - >100		

ANEXO 1: Plantas y extractos con actividad *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* (continuación)

Nombre científico	Parte usada	Tipo de Extracto	Nº de cepas de pacientes	MIC µg/mL cepa de referencia	MIC µg/ mL global (todas las cepas)	MIC Antibiótico	Referencia
<i>Melissa officinalis</i> L.	Hojas	Extracto metanólico 95%	14	No indica	100 - >100	Amoxicilina = 0,002-0,06 (Global) Metronidazol = 64-128 (Global)	2005 Mahady et al (31)
<i>Mentha piperita</i> L.	Hojas	Extracto metanólico al 95%	14	No indica	25 - 100	Amoxicilina = 0,002-0,06 (Global) Metronidazol = 64-128 (Global)	
<i>Aristolochia paucineris</i> Pomel	Hojas	Fracción hexánica	20	4	1 - 32	Clarithromicina = 0,06 (CIP 101260) Metronidazol = 0,5 (CIP 101260)	2001 Gadhi et al (32)
	Rizomas	Fracción hexánica	20	16	1 - 64		
<i>Geranium wilfordii</i> Maxim	Toda la planta	Extracto etanólico 96%	5	No indica	40	Ampicilina = 2 (ATCC 43504)	2013 Zhang et al (33)
		Fracción acetato de etilo	5	No indica	30		
<i>Tephrosia purpurea</i> L.	Toda la planta sin raíces	Fracción hexánica	1	50	50	Amoxicilina = 0,025 (ATCC 43504) Clarithromicina = 0,04 (ATCC 43504) Metronidazol = 50 (ATCC 43504)	2009 Chinniah et al (34)
		Fracción clorofórmica	1	50	50		
<i>Abrus cantoniensis</i> Bge.	Partes aéreas	Extracto etanólico 95%	5	No indica	40	Ampicilina = 2 (Global)	2005 Li et al (35)
<i>Saussurea lappa</i> Clarke	Raíces	Extracto etanólico 95%	5	No indica	40		
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb	Flores	Extracto etanólico 95%	5	No indica	40		
<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	Hojas	Extracto etanólico 95%	5	No indica	60		
<i>Fritillaria thunbergii</i> Miq.	Tallos	Extracto etanólico 95%	5	No indica	60		
<i>Magnolia officinalis</i> Reh & Wils.	Corteza	Extracto etanólico 95%	5	No indica	60		
<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Frutos	Extracto etanólico 95%	5	No indica	60		
<i>Corydalis yanhusuo</i> W.T.Wang	Tallos	Extracto etanólico 95%	5	No indica	60		
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Frutos	Extracto etanólico 95%	5	No indica	60		
<i>Bupleurum chinense</i> DC.	Partes aéreas	Extracto etanólico 95%	5	No indica	60		
<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	Raíces	Extracto etanólico 95%	5	No indica	60		

ANEXO 1: Plantas y extractos con actividad *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* (continuación)

Nombre científico	Parte usada	Tipo de Extracto	Nº de cepas de pacientes	MIC µg/mL cepa de referencia	MIC µg/ mL Global (todas las cepas)	MIC Antibiótico	Referencia
<i>Prunus dulcis</i> D.A. Webb	Almendras	Extracto de la cáscara rico en flavonoides	32	No indica	64-128	Amoxicilina = 0,016 - 0,25 (Global) Claritromicina = 0,016 - 4 (Global)	2013 Bisignano et al (36)
<i>Artemisia douglasiana</i> Besser	Partes aéreas	Clorofórmico	6	2	1-8	Claritromicina = 0,125 (NCTC 11638) Metronidazol = 0,5 (NCTC 11638)	2009 Vega et al (37)

ANEXO 2: Compuestos aislados con actividad *in vitro* anti-*Helicobacter pylori*

Nombre científico	Parte usada	Cepas de pacientes	Compuesto aislado	MIC µg/mL cepa de referencia (72 horas)	MIC µg/mL global (72 horas)	Antibiótico (Cepa de referencia)	Referencia
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Compuestos comprados	56	Epigallocatequina gallato, Epicatequin gallato,	No indica	12,5-100	No indica	2003 Yanagawa et al (38)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	Raíces	3	12 tipos de flavonoides	12,5 - >50	6.25 - >50	Amoxicilina = 0.025 Claritromicina = 0,0063-0,125	2002 Fukai et al (39)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	No se indica	2	GutGard (Extracto estandarizado de flavonoides)	32-64	64	Amoxicilina = 0.03 Tetraciclina = 0,125 -0,25	2013 Asha et al (40)
<i>Brassica oleracea</i> L.	Semillas	45	Sulforafano	No indica	0,06 - 8	No indica	2002 Fahey et al (41)
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Raíces	18	6-Gingerol	No indica	3.125 - 100.0	No indica	2003 Mahady et al (42)
			8-Gingerol	No indica	3.125 - 100.0		
			10-Gingerol	No indica	0.78 - 50.0		
			6-Shogol	No indica	12.5 - 100.0		
<i>Psoralea corylifolia</i> L.	semillas	0	Psoracorylifols A-E	12.5-25 (96 horas)	No cepa de pacientes	Metronidazol = 128	2006 Ying et al (43)
<i>Vitis rotundifolia</i> Michx	No aplica	15	Resverastrol comercial	50	25-100	Metronidazol, Claritromicina y Ciprofloxacino de acuerdo a CLSI	2011 Paulo et al (44)
<i>Cistus laurifolius</i> L.	Hojas	0	Quercetin 3-methyl eter	3,9	No cepa de pacientes	Calritromicina = 0,12 Ampicilina = 0.06	2006 Ustun et al (45)
<i>Pteleopsis suberosa</i>	Corteza	3	Arjunglucosido I	3,9	1,9 - 7,8	Claritromicina =0.06 Metronidazol = 7.8	2006 De Leo et al (46)

ANEXO 2: Compuestos aislados con actividad *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* (continuación)

Nombre científico	Parte usada	Cepas de pacientes	Compuesto aislado	MIC µg/mL cepa de referencia (72 horas)	MIC µg/mL global (72 horas)	Antibiótico (Cepa de referencia)	Referencia
<i>Tabebuia impetiginosa</i> <i>Martius ex DC</i>	Corteza	0	2-(Hydroxymethyl) anthraquinona	2	No cepa de pacientes	Amoxicilina = 0,63 Tetraciclina = 0,5 Metronidazol = 32	2006 Park et al (47)
			2-(ácido carboxílico) anthraquinona	8			
			Lapachol	4			
			Plumbagina	4			
<i>Panax ginseng C.A.Mey.</i>	No aplica	2	Panaxatriol	50	50	Ampicilina = 1	2001 Bae et al (48)
<i>Artemisia douglasiana Besser</i>	Partes aéreas	6	Dehidroleucodino	2	1 - 8	Claritromicina = 0,125 Metronidazol = 0,5	2009 Vega et al (37)
<i>Anthemis altissima L.</i>	Partes aéreas	13	Ácido clorogénico y Kaempferol 4'-metiléter	No indica	6,25	Ampicilina = 1	2003 Konstantino-poulou et al (49)
			Sivasinolido, Tatridin-A y quercetina 3-metiléter	No indica	12,5		
			Altissin, desacetyl-B-cyclopyrethrosin, 1-epi-tatridin, Quercetina, Ramnetina, Isoquercetrina, Taxifolina y Eriodictyol	No indica	25-50		
<i>Geranium wilfordii Maxim</i>	Toda la planta	5	Corilagina y 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-b-D-glucose	4	2-8	Ampicilina = 2	2013 Zhang et al (33)
<i>Santalum album L.</i>	duramen	3	(Z)- α -R-santalol	15,6 (96 horas)	7,8 - 31,3	Amoxicilina = 0,06 Claritromicina = < 0,06	2005 Ochi et al (50)
			(Z)- β -santalol	7,8 (96 horas)	7,8 - 31,3		
			(Z)-lanceol	62,5 (96 horas)	31,3 - 125		
<i>Prunus dulcis D.A. Webb</i>	Almendras	32	Epicatequina, Narigenina y Ácido Protocatechuic	No se indica	128-1024	No se indica	2013 Bisignano et al (36)

ANEXO 3: Compuestos químicos identificados en el género Cordia

Región	Nombre científico	Usos	Parte de la planta (aislamiento)	Compuesto químico	Tipo de compuestos	Fuente
Tailandia	<i>Cordia globifera</i> W.W. Smith	Resistencia al ataque de organismos marinos, "termitas" y hongos terrestres.	Raíces	Globiferina	Benzoquinona terpenoidal	2010 Parks et al (89) 2009 Dettrakul et al (90)
				Cordiacromos B y C	Benzoquinona terpenoidal	
				Cordiaquinol C, Alliodorina, Eleagina, Cordiacromano A	Geranil Hidroquinona	
				Cordiarimidias A y B	Alkaloides glutarimidias	
África	<i>Cordia millenii</i> Baker	Alergias adquiridas por el manejo de su madera	Madera	Cordiacromo A-F	Benzoquinona terpenoidal	1972 Moir et al (57, 58)
Myanmar	<i>Cordia fragrantissima</i> Kurz	Resistencia al ataque de organismos marinos, "termitas" y hongos terrestres.	Madera	Cordiacromo A-C	Benzoquinona terpenoidal	1973 Mori et al (58)
				Cordiaquinol C,I,J,K	Geranil hidroquinona	
				Alliodorina	Geranil hidroquinona	
Centroamérica, Sudamérica y el Caribe	<i>Cordia alliodora</i> (Ruiz & Pav.) Oken	Resistencia al ataque de organismos marinos, "termitas" y hongos terrestres.	Madera	Cordiacromo A-C	Benzoquinona terpenoidal	1973 Moir et al (58)
				Alliodorina	Geranil hidroquinona	1976 Stevens et al (59, 60)
				Cordiacromano A, Cordiaquinol C, Alliodorol, Allioquinol C, Cordiallinol y Cordiol A	Geranil hidroquinona	1977 Manners et al (61)
			Hojas	Derivados de 3α-hydroxyolean-12-en-27-oico	Triterpeno tipo oleano	1983 Chen et al (91)
			Raíces	1-(3'-methoxypropanoyl)-2,4,5- trimethoxybenzene	Fenilpropanoide	2000 Ioset et al (92)
2-(2Z)-(3-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-1,4-benzenediol	Hidroquinona					
México	<i>Cordia elaeagnoides</i> D.C.	Resistencia al ataque de organismos marinos, "termitas" y hongos terrestres.	Madera	Alliodorato de metilo, elaegina, Cordallinal, Ciclocrallinol, dehidroelaegina	Geranil hidroquinona	1983 Manners et al (93)
Brasil	<i>Cordia polycephala</i> (Lam) I.M. Johnst Sinónimos: <i>Cordia corymbosa</i> G. Don y <i>Cordia linnaei</i> Stearn	La decocción de las hojas es usada como remedio para la fiebre y enfermedades del hígado.	Raíces	Cordiaquinonas A-K	Naftoquinona	1990 y 1994 Bieber (62, 63) et al 1988 Ioset et al (94)

ANEXO 3: Compuestos identificados en el género Cordia (continuación)

Región	Nombre científico	Usos	Parte de la planta (aislamiento)	Compuesto químico	Tipo de compuestos	Fuente
Centroamérica y el Caribe	<i>Cordia curassavica</i> Roemer and Schultes	Diarrea	Raíces	Cordiaquinonas A,B, J, K	Naftoquinona	2000 Ioset et al (95)
Brasil	<i>Cordia leucocephala</i> Moric	No definido	Raíces	Cordiaquinonas L y M	Naftoquinona	2009 Diniz et al (64)
Brasil, Centroamérica	<i>Cordia globosa</i> (Jacq.) Kunth	Hojas :Reumatismo, dispepsia y dolores menstruales	Raíces	Microfilaquinona	Naftoquinona	2005 Alencar et al (96)
				"Compuesto 1"	Benzoquinona terpenoidal	
			Partes aéreas	7-methoxyflavone, Quercetin 3-methyl ether, narigenin-4',7-dimethyl ether, and eriodictyol.	Flavonoide	2004 Silva et al (97)
Brasil	<i>Cordia verbenacea</i> DC	Hojas: Antiinflamatorio, antiulcerogénico, cicatrizante,expectorante, astringente y diurético	Hojas	Cordialina A y B	Triterpeno tipo dammarano	1982 Velde et al (98) 2009 Michielin et al (99)
			Hojas	Artermetina	Flavonoide	
			Hojas	α -pinene, β -felandrene, citronelol acetate, β -elemene, β -caryophyllene, β -gurjunene, α -humulene, dcaadinene,aloaromadendrene, bicyclogermacrene, spatulenol y epoxycariophyllene	Terpenos	
Mexico	<i>Cordia boissieri</i> A.D.C	Afección de los bronquios y el sistema respiratorio, diurético y tónico general	Flores	Dimetil-3,4'-kaempferol	Flavonoide	1973 Dominguez et al (100)
			Flores	Alantoina	Compuesto nitrogenado	
			Frutos	p-hidroxibenzaldehido	Aldehido	
Africa	<i>Cordia goetzei</i> Gurke	Infusión de las raíces: malaria, lepra. Extracto de la corteza: para taratar heridas.	Corteza	Cordigona, Cordigol	Polifenoles	1988 Marston et al (101)

ANEXO 3: Compuestos identificados en el género Cordia (continuación)

Región	Nombre científico	Usos	Parte de la planta (aislamiento)	Compuesto químico	Tipo de compuestos	Fuente	
India	<i>Cordia dichotoma</i> G. Forst. Sinónimos: <i>Cordia latifolia</i> Roxb, <i>Cordia obliqua</i> Willd	Decocto de la corteza: dispepsia, fiebre, abscesos, tumores, colitis. Polvo de corteza: úlceras de la boca. Mezcla con granada: disentería. Mucílago del fruto: tos y dolores de pecho. La planta es diurética y laxativa.	Frutos	Arabinoglucano, D-Glucosa, L-Arabinosa	Azúcares	2013 Jhamkande et al (102) 1984 Basu et al (103)	
			Semillas	β-sitosterol, β-sitosterol-3-glucoside,	Fitoesterol y saponina esteroidal		
				α-amyrins, betulin, lupeol-3-rhamnoside	Triterpeno tipo ursano y lupano		
				Ácido clorogénico y ácido caféico	Derivados fenólicos		
				Taxifolin-3-5-dirhamnoside, hesperitin-7-rhamnoside, apigenina, rutina, robonina, diaticoside, dihidrobenetina	Flavonoides		
				Hentricontanol, hentricontane, octacosanol	Hidrocarburos		
Corteza	Alantoina	Compuesto nitrogenado					
Centroamérica y Sudamérica	<i>Cordia spinescens</i> L.	Infusión de las raíces: fiebre y dolor de cabeza. Polvo de la corteza: cicatrizante	Hojas	Litospermató de magnesio	Sales de derivados fenólicos	1977 Lim et al (104)	
				Rosmarinato de magnesio			
				Rosmarinato de calcio			
				3α,6β,25-trihydroxy-20(S),24(S)-epoxydammarane	Triterpeno tipo dammarano		1997 Nakamura et al (105)
				3α-acetoxy-6β,25-dihydroxy-20(S),24(S)-epoxydammarane			
				Cabraleadiol.			
Brasil	<i>Cordia plauhiensis</i> Fresen. Sinónimo: <i>Cordia rufescens</i> A.DC	No definido	Tallos	Saponinas derivadas del ácido pomólico; así como del ácido quinóico y ácido cinchólico (y sus respectivas geninas). Derivados bidesmosido del ácido ursólico y oleanólico	Saponina triterpénica tipo ursano y oleano	2003 y 2007 Santos et al (106, 107)	
Sudamérica	<i>Cordia trichotoma</i> (Vell.) Arráb. ex Steud.	No definido	Madera	Cordiacromo C	Benzoquinona terpenoidal	2001 Menezes et al (108) 1964 Seiket et al (109)	
				Alantoina	Compuesto nitrogenado		
				Ácido oleanólico	Triterpeno tipo oleano		
				β-sitosterol, sitosterol-β-D-glucoside	Fitoesterol y saponina esteroidal		
				Oncocalyxone A	Parabenzoquinina		

ANEXO 3: Compuestos identificados en el género Cordia (continuación)

Región	Nombre científico	Usos	Parte de la planta (aislamiento)	Compuesto químico	Tipo de compuestos	Fuente
Brasil	<i>Cordia americana</i> (L.) Gottschling & J.E. Mill	Decocto de las hojas: antiinflamatorio y cicatrizante.	Hojas	Ácido rosmarínico	Derivado fenólico	2010 Geller et al (110)
Arabia Saudita, África e India	<i>Cordia sinensis</i> Lam. Sinónimo: <i>Cordia Rothi</i>	Corteza: desórdenes estomacales y dolor de pecho	Toda la planta	Ácido protocatechuico, ácido trans-caféico, metilrosmarinato, ácido rosmarínico y diferentes flavonoides	Derivados fenólicos y flavonoides	2011 Nawal et al (111)
			Hojas	β-sitosterol, stigmast-5-en-3-O-β-D-glucoside	Fitoesterol y saponina esteroidal	2014 Firdous et al (112)
Brasil	<i>Cordia multispicata</i> Cham.	Expectorante y para contusiones	Hojas	Cordiaketol A y B, Cordianol A,B y C, Cordianona	Triterpeno tipo ursano	2001 y 2003 Kuroyanagi et al (113, 114)
				Cordianol A-I y cordialina A	Triterpeno tipo dammarano	
India	<i>Cordia myxa</i> Sinónimo: <i>Cordia latifolia</i> Wall. ex G.Don	Frutos: infecciones urinarias, enfermedades respiratorias, astringente, antihelmíntico, diurético y demulcente. Jugo de la corteza: gripe. Decocto de la corteza: dispepsia y fiebre. Hojas: úlceras y dolor de cabeza	Hojas y Tallos	Ácido cordinoico	Triterpeno tipo ursano	Begum et al (115)
				cordicilina	Fenilpropanoide	
				cordinol	Monoterpeno	
				cordicinol	Aromático	
			Corteza	Ácido cordioico, ácido cordifolico	Diterpeno	
			Frutos	Latifolicina A-D y Acido rosmarinico	Fenilpropanoide	
¿?	Macrofilina	Alkaloides pyrrolidónicos				
Hawai	<i>Cordia sebestena</i> (L.)	No definido	Frutos	Sebesteniodes A-D, ácido caféico, netpetoidina A-B, ácido rosmarínico y metilrosmarinato	Fenilpropanoide	Dai et al (116)
India	<i>Cordia macleodii</i> (Hook F. & Thomson)	Hojas y corteza: Ictericia, cicatrizante, Hojas: úlceras de la boca	Corteza	Stigmasterol, Camphesterol	Fitoesterol	Nariya et al (117)

ANEXO 4: Metodología y resultados de las columnas MPLC 1 al 13

MPLC 1

La columna de vidrio fue empacada por vía seca con 70 g de sílica gel y luego compactada con 200 mL de Acetato de etilo: éter de petróleo (9:1). Luego de colocar la muestra (fracción metanólica), se recogieron fracciones de 10 mL siguiendo el siguiente sistema de elución:

Sistema de elución para el MPLC 1

Muestra	Peso (g)	Fase móvil	Proporción	Volumen (mL)	Flujo
Fracción metanólica	3.41	Acetato de etilo: Éter de petróleo	1:9	300	10 mL/min
		Acetato de etilo	100%	500	
		Acetato de etilo: metanol	9:1	200	
		Acetato de etilo: metanol	8:2	100	
		Acetato de etilo: metanol	5:5	100	
		Metanol	100%	100	

El agrupamiento de las fracciones fue realizado de acuerdo a su perfil obtenido en TLC. Además estas fracciones fueron concentradas a presión reducida, obteniéndose cinco muestras como se describe a continuación

Fracciones obtenidas del MPLC 1

Tubos	Peso (mg)	Código
1	940	IC1026. 1
2-4	930	IC1026. 2
5-73	610	IC1026. 3
74-84	470	IC1026. 4
85-91	310	IC1026. 5

MPLC 2

La columna de vidrio fue empacada por vía seca con 15 g de sílica gel y luego compactada con éter de petróleo. Luego de colocar la muestra (IC1026.3), se recogieron fracciones de 5 mL siguiendo el siguiente sistema de elución:

Sistema de elución para el MPLC 2

Muestra	Peso (mg)	Fase móvil	Proporción	Volumen (mL)	Flujo
IC1026.3	610	Acetato de etilo: Éter de petróleo	9:1	500	5 mL/min
		Acetato de etilo	100%	100	
		Acetato de etilo: metanol	9:1	100	
		Acetato de etilo: metanol	5:5	100	
		Metanol	100%	100	

El agrupamiento de las fracciones fue realizado de acuerdo a su perfil obtenido en TLC. Además estas fracciones fueron concentradas a presión reducida, obteniéndose nueve muestras tal como se describe a continuación:

Fracciones obtenidas del MPLC 2

Tubos	Peso (mg)	Código
1- 4	7	IC1027. 1
5-11	6	IC1027. 2
12-20	8	IC1027. 3
21-27	12	IC1027. 4
28-43	71	IC1027. 5
44-78	120	IC1027. 6
79-139	164	IC1027. 7
140-147	36	IC1027. 8
148-156	78	IC1027. 9

MPLC 3

La columna de vidrio fue empacada por vía seca con 15 g de sílica gel y luego compactada con diclorometano. Luego de colocar la muestra (IC1026.4), se recogieron fracciones de 5 mL siguiendo el siguiente sistema de elución:

Sistema de elución para el MPLC 3

Muestra	Peso (mg)	Solventes	Proporción	Volumen (mL)	Flujo
IC1026.4	470	Diclorometano: metanol	9.5:0.5	500	8 mL/min
		Diclorometano: metanol	9:1	200	10 mL/min
		Diclorometano: metanol	8:2	200	

El agrupamiento de las fracciones fue realizado de acuerdo a su perfil obtenido en TLC. Éstas fracciones fueron concentradas a presión reducida, obteniéndose nueve muestras tal y como se describe a continuación.

Fracciones obtenidas del MPLC 3

Tubos	Peso (mg)	Código
1-34	7	IC1028. 1
35-43	3	IC1028. 2
44-75	66	IC1028. 3
76-83	18	IC1028. 4
84-107	22	IC1028. 5
108-118	11	IC1028. 6
119-157	79	IC1028. 7
158-247	61	IC1028. 8
248-265	114	IC1028. 9

MPLC 4,5 y 6

La columna de vidrio utilizada en cada caso fue empacada por vía seca con 8 g de sílica gel y luego compactada con éter de petróleo. Luego de colocar las respectivas muestras, se recogieron fracciones de 5 mL siguiendo el siguiente sistema de elución:

Sistema de elución para MPLC 4,5 y 6

MPLC	Muestra	Peso (mg)	Fase móvil	Proporción	Volumen (mL)	Flujo
MPLC4	IC1027.5	71	Acetato de etilo: éter de petróleo	8:2	300	5 mL/min
MPLC5	IC1027.6	120				
MPLC6	IC1027.7	164				

El agrupamiento de las fracciones fue realizado de acuerdo a su perfil obtenido en TLC. Además estas fracciones fueron concentradas a presión reducida, obteniéndose las siguientes fracciones.

Fracciones obtenidas del MPLC 4,5 y 6

MPLC	Tubos	Peso (mg)	Código
MPLC4	1-17	18	IC1029. 1
	18-50	36	IC1029. 2
MPLC5	1-8	3	IC1029. 3
	9-13	22	IC1029. 4
	14-17	24	IC1029. 5
	18-36	34	IC1029. 6
MPLC6	1-11	4	IC1029. 7
	12-18	21	IC1029. 8
	19-25	38	IC1029. 9
	26-53	63	IC1029. 10

MPLC 7,8 y 9

La columna de vidrio utilizada en cada caso fue empacada por vía seca con 8 g de sílica gel y luego compactada con acetato de etilo. Luego de colocar las respectivas muestras, se recogieron fracciones de 5 mL siguiendo el siguiente sistema de elución:

Sistema de elución para MPLC 7,8 y 9

MPLC	Muestra	Peso (mg)	Fase móvil	Proporción	Volumen (mL)	Flujo
MPLC 7	IC1028.7	79	Acetato de etilo	100%	300	5 mL/min
MPLC 8	IC1028.8+ IC1028.5	83				
MPLC 9	IC1028.9 + IC1030.1	129				

El agrupamiento de las fracciones fue realizado de acuerdo a su perfil obtenido en TLC. Además estas fracciones fueron concentradas a presión reducida, obteniéndose las siguientes muestras.

Fracciones obtenidas del MPLC 7,8 y 9

MPLC	Tubos	Peso (mg)	Código
MPLC7	2-13	16	IC1029.11
	14-28	21	IC1029.12
MPLC8	1-12	15	IC1030.1
	13-18	25	IC1030.2
MPLC9	1-10	23	IC1030.3
	11-13	22	IC1030.4
	14-18	7	IC1030.5
	19-22	11	IC1030.6

MPLC 10

La columna de vidrio utilizada en cada caso fue empacada por vía seca con 8 g de sílica gel y luego compactada con acetato de etilo. Luego de colocar las respectivas muestras, se recogieron fracciones de 5 mL siguiendo el siguiente sistema de elución:

Sistema de elución para MPLC 10

Muestra	Peso (mg)	Fase móvil	Proporción	Volumen (mL)	Flujo
IC1027.8 + IC01029.10 + IC 1029.11 + IC1030.5	115	Acetato de etilo	100%	300	5 mL/min

El agrupamiento de las fracciones fue realizado de acuerdo a su perfil obtenido en TLC. Estas fracciones fueron concentradas a presión reducida, obteniéndose las siguientes muestras:

Fracciones obtenidas del MPLC 10

Tubos	Código
1-16	IC1030.7
17	IC1030.8
18-20	IC1030.9
21	IC1030.10
22-40	IC1030.11

MPLC 11, 12 y 13

A partir de los perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas hasta ahora se identificaron 3 fracciones mayoritarias las cuales fueron denominadas SC1, SC2 y SC3. Estas fracciones fueron purificadas a través de los MPLC 11, 12 y 13 respectivamente.

La columna de vidrio utilizada en cada caso fue empacada por vía seca con 6 g de sílica gel. Luego de colocar las respectivas muestras, se recogieron fracciones de 5 mL siguiendo el siguiente sistema de elución:

Sistema de elución para MPLC 11,12 y 13

MPLC	Muestras	Peso (mg)	Fase móvil	Proporción	Volumen (mL)	Flujo
MPLC11	IC1029. 2 + IC 1029.4 + IC1029. 8 + IC 1030. 3	~100	Acetato de etilo: metanol	9.8:0.2	200	5 mL/min
MPLC12	IC1029. 6 + IC 1029.9 + IC1030. 7	~100	Acetato de etilo	100%	200	
MPLC13	IC1029. 12 + IC 1030.4 + IC 1030.9 + IC1030.10 + IC 1030.11	~100	Acetato de etilo: éter de petróleo	8:2	200	

Estas fracciones fueron concentradas a presión reducida, obteniéndose las siguientes muestras:

Fracciones obtenidas del MPLC 11,12 y 13

MPLC	Tubos	Peso (mg)	Código	Nombre
MPLC11	1-11	5	IC1032.1	-
	12-24	60	IC1032.2	SC1
MPLC12	5-9	2	IC1032.3	-
	12-14	26	IC1032.4	-
	15-40	73	IC1032.5	SC2
MPLC13	1-16	14	IC1032.6	-
	17-32	46	IC1032.7	SC3
	33-38	3	IC1032.8	-