



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento y caracterización de compuestos obtenidos por extracción

ácida de la especie *Macrocarpaea lenae* J.R. Grant

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Iñiguez Iñiguez, Nathaly Juliana

DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio, PhD.

LOJA-ECUADOR

2015



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

PhD.

Chabaco Patricio Armijos Riofrío

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Aislamiento y caracterización de compuestos obtenidos por extracción ácida de la especie *Macropaea lenae* J.R. Grant**” realizado por: Nathaly Juliana Iñiguez Iñiguez ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2015

.....

PhD. Chabaco P. Armijos Riofrío

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Nathaly Juliana Iñiguez Iñiguez declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Aislamiento y caracterización de compuestos obtenidos por extracción ácida de la especie *Macrocarpaea lenae* J.R. Grant de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo PhD. Chabaco Patricio Armijos Riofrío director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.).....

Iñiguez Iñiguez Nathaly Juliana

CI. 1105224156

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme guiado siempre por buen camino y por permitirme llegar a esta etapa tan importante de mi formación profesional. A mi madre por ser el pilar fundamental de mi vida y demostrarme su cariño, apoyarme en todo momento, por ser mi ejemplo a seguir y haberme educado con buenos valores. A mi hermana Cecibel por brindarme su ternura y compartir conmigo buenos y malos momentos. A mi familia en general porque siempre me han motivado a seguir mejorando y luchar por cumplir mis sueños.

A Darwin por su paciencia, afecto y apoyo incondicional, por animarme a seguir adelante y darme palabras de aliento.

A mis amig@s porque siempre estuvieron a mi lado apoyándome he hicieron que esta experiencia sea muy amena y enriquecedora.

Nathaly Juliana Iñiguez Iñiguez

AGRADECIMIENTO

Agradezco principalmente a Dios por protegerme, cuidarme y darme fuerza para superar todos los obstáculos que se han presentado a lo largo de mi vida.

A mi madre, que me ha demostrado ser una madre ejemplar, me ha enseñado a no rendirme ante las dificultades, siempre escuchando sus sabios consejos que con amor me han sabido guiar. A mi hermana, por acompañarme durante este arduo camino.

A Darwin por su apoyo y amor incondicional, gracias por compartir mis alegrías y fracasos, pero sobre todo por estar siempre a mi lado.

De manera muy especial agradezco a PhD. Gianluca Gilardoni, PhD. Chabaco Armijos y Bq. Claudia Herrera por su valiosa guía y asesoramiento a la realización de este trabajo. Un agradecimiento muy sincero para el Dr. Massimo Boiocchi y el Prof. Giovanni Vidari, quienes aportaron con información valiosa para el desarrollo de esta investigación.

A mis amig@s por la gran calidad humana que me han demostrado con su amistad.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, Departamento de Química, Sección de Química Básica y Aplicada, a todos los docentes que a lo largo de mi carrera me han brindado sus conocimientos y consejos.

Finalmente agradezco de manera muy sincera a todas las personas que supieron colaborar directa e indirectamente para que esta sentida aspiración llegue hoy a su feliz culminación.

Nathaly Juliana Iñiguez Iñiguez

TABLA DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
TABLA DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ESQUEMAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I.....	5
FIN. PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO.....	5
1.1. Fin del Proyecto	6
1.1. Propósito del Proyecto	6
1.2. Componentes del proyecto	6
CAPITULO II.....	7
MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes.....	8
2.2. Plantas Medicinales	8
2.3. La Flora en el Ecuador	9
2.4. Descripción botánica.....	10
2.4.1. Familia Gentianaceae.....	10
2.4.1.1. Metabolitos secundarios de la familia Gentianaceae.....	11

2.4.2.	Género <i>Macrocarpaea</i>	13
2.4.3.	Especie <i>Macrocarpaea lenae</i>	14
2.4.3.1.	Taxonomía <i>M. lenae</i> (Tabla 2).....	15
2.5.	Metabolitos secundarios: Alcaloides.....	15
2.5.1.	Definición.....	15
2.5.2.	Propiedades de los alcaloides	16
2.5.3.	Funciones de los alcaloides en las plantas.....	16
2.5.4.	Clasificación de los alcaloides.....	17
2.5.5.	Extracción e identificación de alcaloides.....	19
2.6.	Cromatografía.....	21
2.6.1.	Cromatografía en capa fina (TLC).....	22
2.6.2.	Cromatografía en columna (CC).....	23
2.6.3.	Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG/MS).....	24
2.7.	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	25
2.8.	Difracción de Rayos X	26
2.9.	Actividad antibacteriana	27
2.9.1.	Bacterias.....	27
2.9.2.	Bacterias Grampositivas	27
2.9.3.	Bacterias Gramnegativas	28
CAPITULO III.....		30
METODOLOGÍA		30
3.1.	Recolección de la materia vegetal	32
3.2.	Tratamiento de la materia vegetal <i>Macrocarpaea lenae</i>	33
3.3.	Obtención de los extractos de <i>M. lenae</i>	33
3.4.	Desclorofilación.....	35
3.5.	Fraccionamiento cromatografía en columna.....	35
3.6.	Purificación de fracciones.....	36
3.7.	Elucidación e identificación de compuestos	36
3.7.1.	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	36

3.7.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	37
3.7.3. Difracción de Rayos X.	37
3.8. Actividad antibacteriana.....	37
Preparación del cultivo bacteriano (overnight).....	37
3.8.1. Ensayo.....	38
CAPITULO IV.....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Rendimiento de extractos obtenidos.....	40
4.2. Cromatografía en columna de ML-FT-1/4.	41
4.3. Identificación de los metabolitos secundarios aislado de <i>M. lenae</i>	43
Identificación del compuesto Gentianine mediante Cromatografía de gases y Espectrometría de masas.	43
4.3.1. Identificación del compuesto Hirsutanine A mediante Resonancia Magnética Nuclear.....	44
4.3.2. Confirmación de la identificación del alcaloide Hirsutanine A por medio de: Difracción de Rayos X.....	47
4.4. Actividad Biológica.	47
4.4.1. Actividad Antibacteriana.	47
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS	56
Anexo 1. Espectro de CG-MS del alcaloide gentianine	57
Anexo 2. Espectros de Resonancia Magnetica Nuclear (DMSO).....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución mundial de los géneros de la familia Gentianaceae	11
Tabla 2. Clasificación taxonómica	15
Tabla 3. Pesos y Rendimientos de los extractos de <i>Macroparaea lenae</i>	40
Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico de <i>Macroparaea lenae</i>	42
Tabla 5. Comparación de los datos obtenidos de ¹³ C RMN de Hirsutanine.....	45
Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria de la muestra ML-27/5 frente a bacterias Gram+ y Gram-	47
Tabla 7. Resultados de la Actividad antioxidante y Fenoles Totales.	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de a) amarogentina, b) gentianina, c) bellidifolina, d) swertianina, e) swerósido f) genciopicrosido	12
Figura 2. Distribución de <i>M. apparata</i> , <i>M. bubops</i> , <i>M. jensii</i> , <i>M. lenae</i> , <i>M. luna-gentiana</i> y <i>M. noctiluca</i> en Loja y Zamora Chinchipe.....	13
Figura 3. Flor de <i>Macrocarpaea lenae</i>	14
Figura 4. Morfología <i>M. lenae</i>	14
Figura 5. Reacciones de precipitación	21
Figura 6. Cromatografía en capa fina.....	22
Figura 7. Medida de los Rf en la placa de sílica gel 60 F ₂₅₄	23
Figura 8. Diagrama de un cromatógrafo de gas	24
Figura 9. Difractómetro de rayos X para monocristal	26
Figura 10. Lugar de recolección de la materia vegetal.....	32
Figura 11. <i>Macrocarpaea lenae</i>	32
Figura 12. Tratamiento de la materia vegetal	33
Figura 13. Obtención de Extractos: a) Maceración dinámica, b) Maceración estática, c) Filtración al vacío, d) Rotaevaporación.....	34
Figura 14. Extracción de la fracción alcaloidea	35
Figura 15. Cromatografía en Columna.....	35
Figura 16. CCF fase directa sobre la muestra ML-FT	40
Figura 17. Cromatografía de capa fina revelada con H ₂ SO ₄ /vainillina 1%.....	41
Figura 18. Cromatografía de capa fina ML-27/5 y la fracción 261-265.....	42
Figura 19. Cromatografía de capa fina de ML-27/5 usando como fase móvil DCM: MeOH (20:1)	43
Figura 20. Estructura química del alcaloide Gentianine	44
Figura 21. Estructura química del alcaloide Hirsutanine A	46
Figura 22. Espectro de masas del alcaloide Hirsutanine	46

ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema de la Biosíntesis de los Alcaloides	18
Esquema 2. Esquema de la metodología	31
Esquema 3. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica	36

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CG-SM	Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopia de Masas
C₂H₅OH-H₂O	Etanol- agua
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
DMSO	Dimertil-sulfoxido
DCM	Diclorometano
MeOH	Metanol
ML-FT	Fracción total de alcaloides
ML-FT-1/4	Fracción total de alcaloides sin clorofilas
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta
¹³C RMN	Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13
¹H RMN	Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13

RESUMEN

El Ecuador cuenta con una gran riqueza vegetal por lo que se considera una fuente importante de estudio para obtención de nuevos metabolitos secundarios que pueden ser utilizados para el desarrollo de productos farmacéuticos.

El propósito de la presente investigación fue aislar, purificar (empleando técnicas cromatográficas: CCF, CC) e identificar (analizando por técnicas espectroscópicas CG-SM, RMN y Cristalografía de Rayos X) metabolitos secundarios: alcaloides de la especie *Macrocarpaea lenae*. Se obtuvo la fracción total de alcaloides por medio de extracción ácida, se pudo identificar dos compuestos de naturaleza alcaloidea: Gentianine y Hirsutanine A que son alcaloides monoterpénicos, que están biosintéticamente relacionados con la secologanina.

Además se realizó el análisis de actividad antibacteriana del alcaloide Hirsutanine A, el mismo que no presentó actividad frente a las cepas bacterianas usadas en este ensayo.

PALABRAS CLAVES: *Macrocarpaea lenae*, *Gentianine*, *Hirsutanine A*.

ABSTRACT

Ecuador has a large vegetable wealth which is considered an important source of study to obtain new secondary metabolites that can be used for the development of pharmaceuticals.

The purpose of this study was to isolate, purify (using chromatographic techniques: TLC, CC) and identify (analyzed by spectroscopic techniques: CG-MS and RMN) secondary metabolites: alkaloids *Macrocarpaea lenae* species. Total alkaloid fraction was obtained by acid extraction, it was possible to identify two alkaloid compounds nature Gentianine and Hirsutanine A are monoterpene alkaloids are derived starting from the secologanin.

In addition analysis of antibacterial activity of the alkaloid Hirsutanine A the same as no activity against bacterial strains used in this test was performed.

Keywords: *Macrocarpaea lenae*, *Gentianine*, *Hirsutanine A*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales siempre han estado envueltas en una aureola de misterio y espejismo en muchos grupos sociales, como solución a problemas de salud o facilitadoras de estados especiales del ser humano. Las comunidades campesinas de los Andes tienen en su territorio una gran diversidad de especies silvestres, que son utilizadas como plantas medicinales por sus propiedades curativas. Las plantas silvestres constituyen una fuente valiosa de prevención y curación para la mayoría de los pobladores rurales de la sierra andina y, para algunos campesinos, suponen una fuente complementaria a sus ingresos (De Felipe, 2014)

Hoy en día las plantas medicinales, como parte de las terapias alternativas, tiene gran aceptación en todo el mundo, su uso con fines terapéutico es cada vez más frecuente, sus numerosas propiedades proporcionan importantes beneficios en el campo de la salud, el medioambiente y la economía, además de tener una amplia aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Cruz, 2009).

No hay duda de que la ciencia y la tecnología pueden ayudar a descubrir y utilizar las propiedades terapéuticas de las plantas de forma mucho más efectiva. Por otra parte no hay que olvidar el conocimiento empírico desarrollado por diferentes culturas y que han sido un aporte importante para la medicina (UPI, 2012). La búsqueda de drogas de origen vegetal involucra una combinación de técnicas botánicas, fitoquímicas, biológicas y moleculares. (Parra, 2006).

***Macropaea lenae* J.R. Grant** es una planta que pertenece a la familia Gentianaceae, El género *Macropaea* cuenta 75 especies reconocidas, más de 30 de los cuales están presentes en Ecuador. Esta especie fue clasificada por primera vez en el año 2003, después de ser recolectada en el Parque Nacional Podocarpus, en la provincia de Zamora Chinchipe, es un arbusto de 3-4m de altura, escasamente ramificado, presenta una inflorescencia triangular, tallos cilíndricos o ligeramente triangular, hojas elípticas, oblongas u ovalas y pecioladas de base oblicua y ápice agudo (Grant, 2003).

Esta planta es usada en la medicina tradicional de Saraguro con el nombre de **Tabaco de Cerro**, se emplea para tratar el “mal aire”, para ello se usa las ramas que mezclada con otras plantas para realizar las “limpias”, también se secan las hojas de la planta para sahumar la casa (Andrade et al., 2008).

Los metabolitos más característicos de la familia de la Gentianaceae son los glucósidos iridoideos los cuales se relacionan con el sabor amargo de estas plantas, además se ha

identificado la presencia de xantonas que se encuentran casi exclusivamente en las familias Guttiferae y Gentianaceae y la presencia de algunos alcaloides; metabolitos de diferente actividad biológica como antiinflamatoria, antiasmática, anticonvulsivante, citoprotectora, diurética, hipoglucemiante entre otras, por tal razón existe el interés de realizar investigaciones sobre actividad que poseen estos metabolitos y que pueden ser usados en beneficio del ser humano (Dinda, Debnath, & Harigaya, 2007; Singh, 2008).

CAPITULO I

FIN. PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. Fin del proyecto

Aportar un análisis fitoquímico de la especie vegetal *Macrocarpaea lenae*, por medio del aislamiento de alcaloides que puedan ser de utilidad en el desarrollo de fitofármacos

1.1. Propósito del proyecto

Aislar e identificar alcaloides de la especie *Macrocarpaea lenae* por medio de métodos cromatográficos y espectroscópicos.

1.2. Componentes del proyecto

- ✓ Aislamiento de alcaloides usando cromatografía en columna.
- ✓ Purificación de los compuestos obtenidos mediante técnicas de cristalización.
- ✓ Elucidación de los compuestos por medio de: RMN (Resonancia Magnética Nuclear); CG-MS (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) y Difracción de Rayos X.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El uso de plantas con fines medicinales es una práctica que se ha desarrollado desde la antigüedad. Durante mucho tiempo la medicina natural sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso que disponían los médicos (Fonnoegra & Jiménez, 1999). Dada la variedad de flora a nivel mundial, cada región desarrolló su forma de curar a partir de plantas medicinales, que es única y característica de cada lugar, puesto que se utilizaban especies endémicas de las regiones en cuestión. Conforme a transcurrió el tiempo estas terapias locales pasaron a ser parte de lo que hoy se conoce como medicina tradicional, que recoge información sobre los usos, formas de preparación, administración, dosis, entre otros parámetros farmacológicos modernos. (Bodeker, & Kronenberg, 2002). Si bien la medicina moderna está bien desarrollada en la mayor parte del mundo, grandes sectores de la población de los países en desarrollo todavía dependen de las plantas medicinales y los medicamentos herbarios para su atención primaria (López, 2012).

Gracias a las investigaciones se ha podido conocer ciertas propiedades biológicas que tienen usos medicinales. Estos estudios han cobrado importancia porque nos permiten conocer y profundizar el valor terapéutico de las plantas (Ríos, de la Cruz, & Mora, 2008). La ciencia nos ha permitido confirmar la presencia de algunos compuestos químicos que tienen una acción farmacológica, a estos se los ha denominado principios activos, en muchas ocasiones estos compuestos son usados como punto de partida en el desarrollo de formas farmacéuticas (López, 2012).

2.2. Plantas Medicinales

La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para síntesis de nuevos fármacos.

Se entiende por **fitoterapia** a la “utilización de los productos de origen vegetal, con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico” (Vanaclocha & Cañigüeral, 2003).

La combinación de la fitoterapia en la terapéutica no solo tiene una base histórica, sino que ambas comparten ciertos criterios como: base química que hace mención a la estructura de los principios activos, independientemente de que sean de origen natural o sintético; ya que una parte importante de los fármacos utilizados actualmente derivan, directamente o indirectamente, de principios activos que inicialmente fueron aislados de plantas (Cañigüeral, 2002).

Hoy en la actualidad las plantas medicinales, forman parte de las terapias alternativas y tienen gran aceptación a nivel mundial, su uso con fines terapéuticos es cada vez más frecuente, sus numerosas propiedades proporcionan importantes beneficios en el campo de la salud, el medioambiente y la economía, además de tener una extensa aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Cruz, 2009).

2.3. La Flora en el Ecuador

La convención del Patrimonio Cultural Inmaterial de 2003 manifiesta: Ecuador por su diversidad biológica y cultural adquiere un carácter simbólico y sagrado que particulariza al país, ya que en su reducido espacio geográfico es poseedor de una de las riquezas biológicas más altas del planeta. La ubicación geográfica del Ecuador y las condiciones topográficas y climáticas han resultado en un rico mosaico ecológico. Esta amplia gama de condiciones ambientales crea una importante diversidad de ecosistemas naturales, a los cuales se han adaptado distintas especies y variedades de plantas y animales (Suárez & Ulloa, 1993).

La flora en el Ecuador es muy rica y variada debido a la diversidad de los medios ecológicos. Ecuador es uno de los 17 países megadiversos del mundo (Jørgensen & León, 1999, Ulloa & Neil, 2005). Posee más de 17.058 especies de plantas vasculares o plantas con flor, como lo señala el Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica (Ministerio de Turismo, 2014). Según estudios hechos en nuestro país se han registrado 148 familias y 744 géneros de plantas vasculares que incluyen especies endémicas y en nuestro país no se han registrado ninguna familia endémica, pero posee 22 géneros endémicos (Carrión, 2009).

Con relación a la distribución de flora del país, Jørgensen y León (1999) indican que la mayor diversidad florística del Ecuador está en la Región Sierra con 64% del total de plantas registradas; la segunda región en importancia, aunque no muy diferente con la tercera, es la Amazonía con 31,7% y la Región Costa con 30%. Cabe indicar que los porcentajes no son exactos debido a que estas tres zonas comparten especies entre ellas. De estas plantas 5172 son especies útiles, el 60% son medicinales, el 55% son fuente de materiales como los usados en la construcción, el 30% son comestibles y el 20% son utilizadas en los llamados usos sociales, los cuales incluyen ritos religiosos y prácticas similares. La suma de esos porcentajes sobrepasa el 100%, lo que significa que muchas de las especies tienen múltiples usos. El 75% de las especies medicinales son plantas nativas y el 5% de ella son endémicas, mientras que el 11% son introducidas en el Ecuador (De la Torre et al., 2008).

“Se estima que el país tiene más especies de plantas por unidad de área que cualquier otro país de América del Sur” (MAE, 2008). Es decir Ecuador siendo uno de los países más megadiversos del mundo, posee una amplia vegetación y se tiene que estar en constante

estudio para informar sobre las condiciones en que se encuentran los páramos y que los gobiernos cuiden estos atributos ecológicos (Carrión, 2009).

2.4. Descripción botánica.

2.4.1. Familia Gentianaceae.

“La familia Gentianaceae tiene una distribución cosmopolita, más común en regiones templadas y subtropicales y montañas tropicales” (Rivas, 2009). “Se reporta que esta familia incluye 87 géneros y aproximadamente 1615-1688 especies” (Struwe & Albert, 2002).

Son hierbas a menudo micorrizicas (rara vez fuertemente micotróficas, con hojas reducidas y sin clorofila), tal vez semiarbusculos, arbutos o incluso pequeños árboles, glabros o con varios tipos de pelos de simples y variados a veces pelos glandulares. Hojas opuestas o rara vez verticiladas, muy rara vez alternas, simples y generalmente enteras, reducidas a escamas, estípulas ausentes. Flores solitarias o a menudo en inflorescencias cimosas, rara vez racemosas, generalmente vistosas, hermafroditas o unisexuales, actinomorfas o casi zigomorfas. Cáliz con un corto tubo bien desarrollado 4-5 lóbulos, rara vez reducidos o libre, corola simpétala, con 4 -5, lóbulos, al menos con escamas; estambres tantos como lóbulos de la corola; gineceo: de 2 carpelos unidos, ovario supero, estilo terminal, simple con un estigma entero lobulado, papilado, primordios seminales más o menos numerosos. Fruto en forma de cápsula septicida o rara vez una baya (Rivas, 2009).

Resulta que la familia de las Gentianaceae pertenece a la división **Magnoliophyta**, clase **Magnoliopsida**, orden de las **Gentianales**, subclase de **Asteridae**; y presenta una clasificación filogenética las especies, subespecies y géneros. La familia de las Gentianaceae está dividida en 6 especies: Exaceae, Chironieae, Gentianeae, Helieae, Potalieae, Saccifolieae (Struwe & Albert, 2002).

El género más amplio es *Gentiana* con unas 400 especies. En el Ecuador están representados 9 géneros, 2 géneros leñosos se encuentran en la zona andina (Jørgensen & Ulloa, 1993).

En la Tabla 1 que se muestra a continuación se indica la distribución mundial de los géneros de la familia Gentianaceae.

Tabla 1. Distribución mundial de los géneros de la familia Gentianaceae

	Número de géneros presentes	Porcentaje %
Centro y Sudamérica	47	34,5
Asia	26	19,5
África	21	15,4
Norteamérica	15	11
Europa	10	7,36
Madagascar	10	7,36
Australia, Nueva Zelanda	7	5,1

Fuente: Struwe et al., 2002

2.4.1.1. Metabolitos secundarios de la familia Gentianaceae.

La mayor parte de los estudios fitoquímicos de las Gentianaceae están relacionados a las investigaciones sobre la actividad que pueden poseer sus metabolitos para posibles usos terapéuticos. Los compuestos más característicos parecen ser las xantonas, los alcaloides y los glucósidos iridoides (Singh, 2008). Las especies de la familia Gentianaceae poseen principios amarogénicos y colorantes bien conocidos, ampliamente utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica (Jensen & Schripsema 2002).

El estudio “Fitoquímica de las Gentianaceae: revisión de las propiedades farmacológicas (2008)”, describe sobre los metabolitos secundarios: glucósidos secoiridoides y xantonas. Amarogentina, bellidifolina, gentianina y swertianina (Fig. 1) se ha informado que poseen propiedades antiinflamatoria, analgésico, antiasmático, anticonvulsivo, antihistamínica, antimalárico, antiambianas, citoprotector, diurético, hepatoprotector y propiedades hipoglucemiantes.

Investigaciones en varias especies de los géneros *Gentianella*, *Swertia* y *Gentiana* (Gentianaceae) revelan la presencia de algunos metabolitos secundarios como: xantonas, flavonoides, alcaloides y ciertos triterpenos característicos de esta familia; sobre estos compuestos aislados, se han llevado a cabo experimentos in-vivo, y se ha identificado varias propiedades como: antiinflamatoria, antiasmática, anticonvulsiva, antihistamínica, citoprotectora, diurética, hepatoprotectora, hipoglucemiante, entre otras. En la familia Gentianaceae se han reconocido algunos metabolitos considerados como marcadores quimiotaxonómicos; entre estos se encuentran los denominados iridoides, las xantonas y los C-glucoflavonoides. Estas plantas se caracterizan por tener un sabor amargo, el cual se relaciona con la presencia de iridoides, como la amarogentina clasificada como la sustancia más amarga que se conoce. Los principios amargos han sido utilizados en remedios tradicionales para la pérdida de apetito y la fiebre (Struwe & Albert, 2002).

En todas las especies investigadas en la familia Gentianaceae se han encontrado iridoides, principalmente secoiridoides, entre los que predominan el swerosido, la swertiamarina y el genciopicrosido (Fig. 1) (Dinda et al., 2007).

El estudio fitoquímico de la especie *Enicostemma littorale* que pertenece a la familia Gentianaceae, ha demostrado la presencia de metabolitos secundarios como son: alcaloides, catequinas, saponinas, esteroides, triterpenoides, ácidos fenólicos, flavonoides y xantonas. También contiene minerales como hierro, potasio, sodio, calcio, magnesio, sílice, fosfato, cloruro, sulfato y carbonato (Abirami & Gomathinayagam, 2011). Otro estudio denominado: “Género *Gentianella* Moench: una revisión fitoquímico y etnofarmacológica (2010)”, menciona la presencia de irioides, xantonas, glucoflavonoides y otros componentes, que le confieren propiedades antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, hipoglucemiante y actividad antitumoral, que proporcionan una base empírica para la utilización tradicional de las plantas de este género.

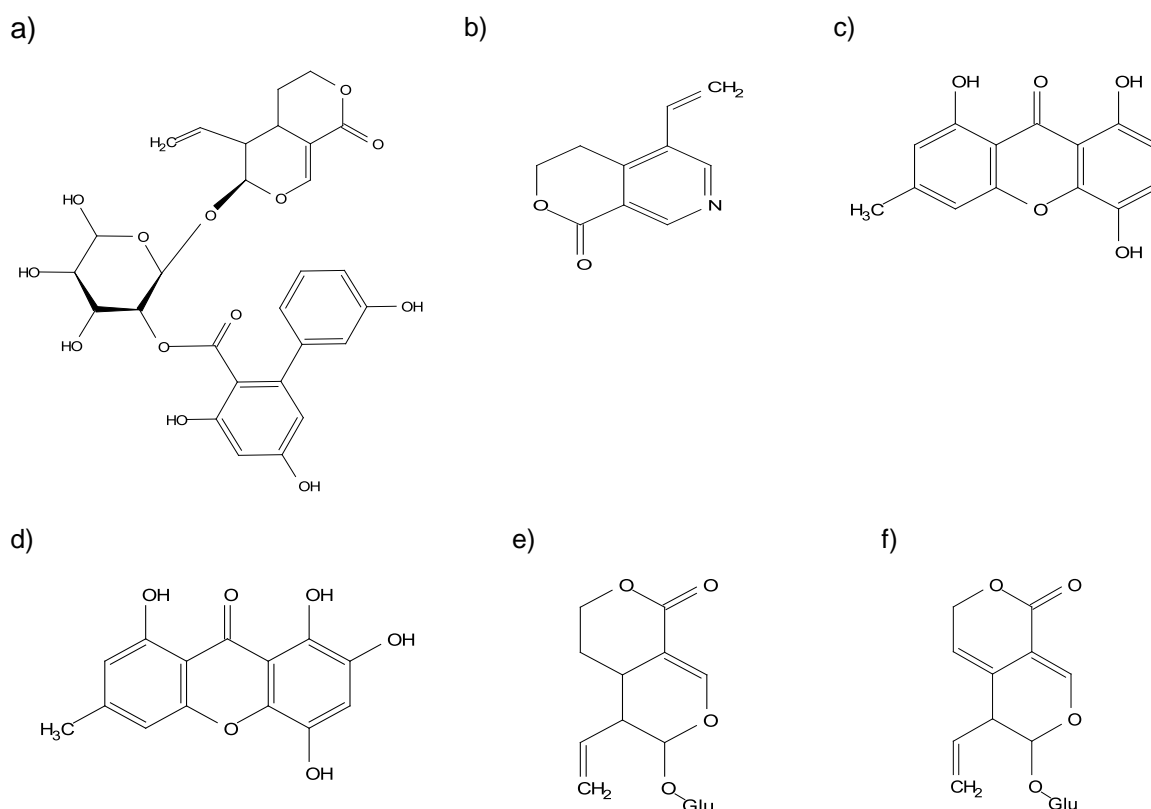


Figura 1. Estructura de a) amarogentina, b) gentianina, c) bellidifolina, d) swertianina, e) swerósido f) genciopicrosido

Fuente: Nadinic et al., 2002

2.4.2. Género *Macroparpaea*.

Macroparpaea es un género que tiene una extensa distribución en las regiones montañosas de los Neotrópicos. El género se encuentra fundamentalmente en cinco grandes regiones geográficas: los Andes [que van desde Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, a Bolivia] (85 especies), el sur de Mesoamérica [Costa Rica y Panamá] (6 especies), las Antillas Mayores del Caribe [Cuba, República Dominicana, Jamaica] (3 especies), la Pantepui del Escudo de Guayana [Venezuela y regiones adyacentes en Brasil y Guyana] (6 especies), y el sureste de Brasil (5 especies). Son hierbas perennes o más típicamente arbustos o incluso árboles pequeños. Este género es uno de los pocos de la familia Gentianaceae que presenta una especie de pelos en sus hojas (Grant, 2003).

En Ecuador el género *Macroparpaea* cuenta con 21 especies que se encuentran distribuidas en las provincias de Zamora Chinchipe, Loja, Azuay, Pichincha, Napo, Carchi y Pastaza (Ulloa Ulloa & Neil, 2005).

Algunas especies que se encuentran dentro de este género están presentes en nuestro país, en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe como se puede apreciar en la Fig. 2.

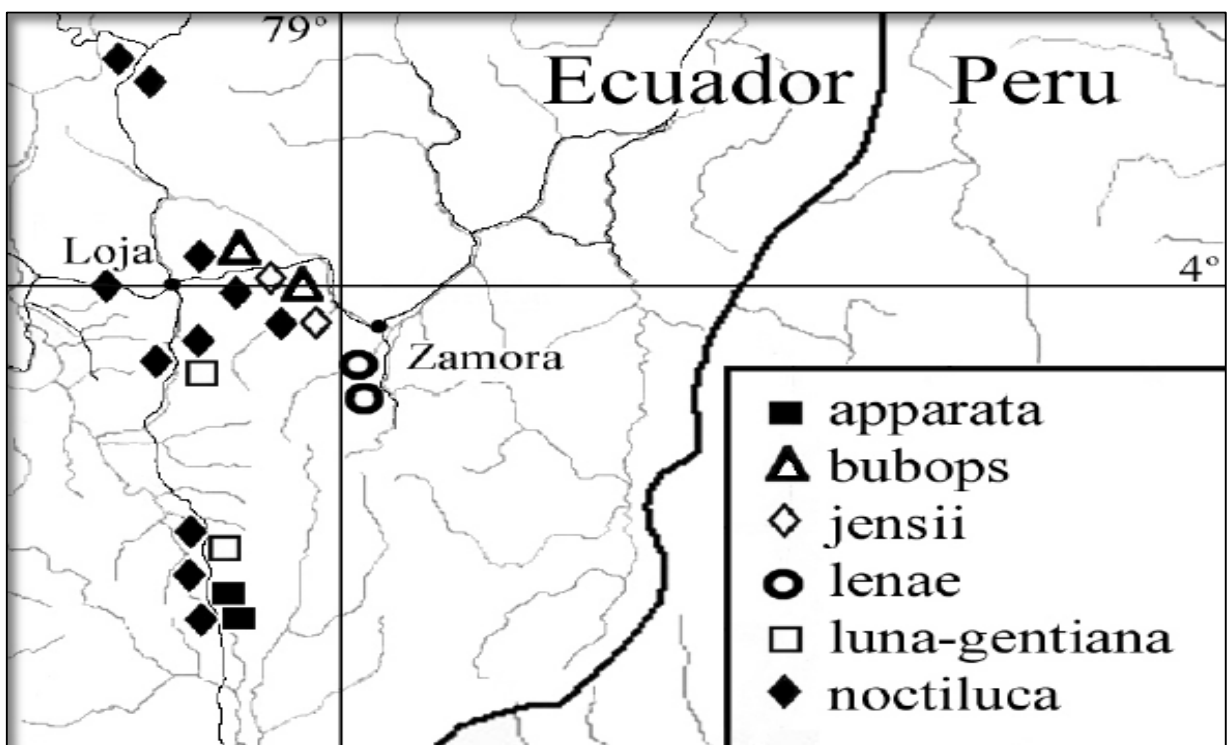


Figura 2. Distribución de *M. apparata*, *M. bubops*, *M. jensii*, *M. lenae*, *M. luna-gentiana* y *M. noctiluca* en Loja y Zamora Chinchipe.

Fuente: Grant & Struwe, 2003

2.4.3. Especie *Macrocarpaea lenae*

Macrocarpaea lenae J.R. Grant es una planta que pertenece a la familia Gentianaceae, crece en Colombia, Ecuador y Perú. Esta especie fue recolectada por Grant y Struwe por primera vez el 13 de febrero de 2001, a 5 Km del Sur de Zamora Chinchipe hacia el Parque Nacional Podocarpus, 04°06'31"S, 78°57'49"W, 1030m.s.n.m. (Fig. 3) (Grant & Struwe, 2003).



Figura 3. Flor de *Macrocarpaea lenae*

Fuente: Grant, 2003

Es un pequeño árbol de 2-3 m de altura, escasamente ramificado, presenta una inflorescencia triangular, tallos cilíndricos o ligeramente triangular hueco, hojas elípticas, oblongas u ovas y pecioladas de base oblicua y ápice agudo de color verde oscuro, flores pediculadas y de color verde, las semillas son aplanadas, triangular en su contorno y de un color anaranjado tenue (Fig. 4) (Grant & Struwe, 2003).

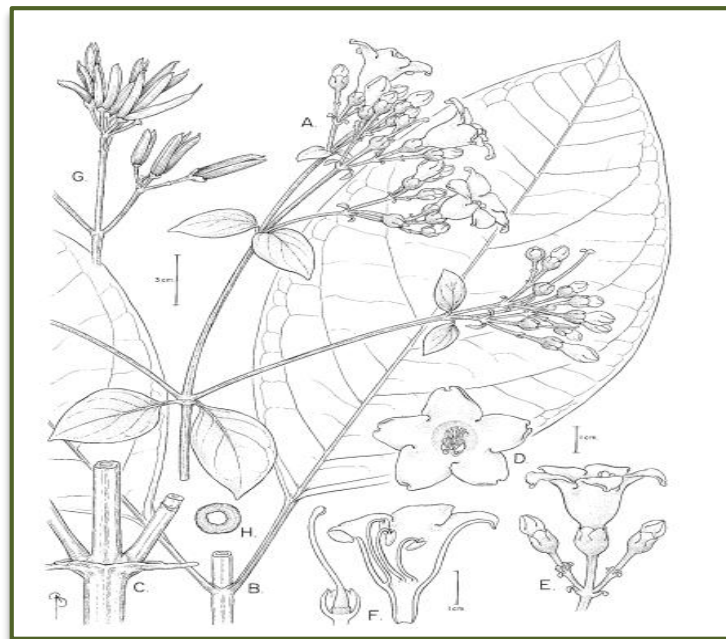


Figura 4. Morfología *M. lenae*

Fuente: Grant & Struwe, 2003

2.4.3.1. Taxonomía *M. lenae* (Tabla 2)

Tabla 2. Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
División	Tracheopyta
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliopsida
Orden	Gentianales Juss.
Familia	Gentianaceae
Genero	<i>Macrocarpaea</i>
Especie	<i>Macrocarpaea lenae</i>

Fuente: Grant, 2003

Cabe mencionar que no se ha encontrado datos bibliográficos que reporten el estudio químico de la especie *M. lenae* y por esta razón consideramos que su estudio aportaría una información importante por ello se decidió trabajar sobre alcaloides ya que estos son uno de los metabolitos secundarios que han mostrado mayor actividad biológica. En primera instancia se decidió hacer de manera selectiva un ensayo para ver la presencia de alcaloides y como la planta arrojó un resultado positivo a esta prueba se empezó a trabajar con estos compuestos alcaloideos.

2.5. Metabolitos secundarios: Alcaloides

Las sustancias activas que se encuentran en las plantas se conocen como **metabolitos secundarios**, estas sustancias son el resultado de la fotosíntesis y se encuentran involucrados en los procesos biológicos de la plantas como la defensa frente a patógenos, y protección a los rayos UV, entre otros, es decir estos compuestos actúan frente a los estímulos del entorno (Vivanco et al., 2005).

Los metabolitos secundarios dependiendo del orden genético pueden ser biosintetizados siguiendo diversas rutas metabólicas, así podemos encontrar compuestos de la familia fenólica, terpénica, alcaloidea, esteroidea y polímeros heterogéneos (Bruneton, 2000).

2.5.1. Definición

La Real Academia Española define a los alcaloides como cada uno de los compuestos orgánicos nitrogenados de carácter básico producidos casi exclusivamente por vegetales.

En la naturaleza, suelen encontrarse formando sales y su biosíntesis generalmente es a partir de aminoácidos. Son de gran interés terapéutico puesto que frecuentemente están provistos de actividad farmacológica a baja dosis (Cordell et al., 2001).

La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica, de los alcaloides hacen que estos compuestos sean de interés terapéutico. Un gran número de medicamentos se han obtenido de plantas que contienen alcaloides, estos se han aislado principalmente en plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de Fanerógamas, en menor proporción en Criptógamas y en animales como peces y ranas del género *Phyllobates* cuyos alcaloides constituyen algunas de las sustancias más venenosas para el hombre. Su actividad biológica a nivel del sistema nervioso, dio pie a las primeras investigaciones, siendo los alcaloides las primeras sustancias naturales estudiadas (Arango, 2008).

2.5.2. Propiedades de los alcaloides

En lo que se refiere a las propiedades, la mayoría de los alcaloides son de carácter básico (el nitrógeno tiene un par de electrones no compartidos), cristalinos, aunque algunos forman precipitados amorfos y unos pocos son líquidos a temperatura ambiente; no tienen olor y en general son incoloros. Su peso molecular oscila entre 100 y 900. La mayoría son ópticamente activos (levógiros), por presentar al menos un carbono asimétrico en su estructura. Precipitan de sus soluciones acuosas con sales de metales pesados (mercurio, cadmio, plomo), ácido pícrico y taninos (Henning, 2013).

Los alcaloides se caracterizan por tener un sabor amargo, estos compuestos se forman a partir de aminoácidos. Cuando se encuentran como bases libres son solubles en disolventes orgánicos (polares y apolares) e insolubles en agua, en forma de sal son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas, pero insolubles en disolventes orgánicos apolares, dicha solubilidad depende del pH. Los alcaloides se obtienen mediante extracción con disolventes (Kuklinski, 2000).

2.5.3. Funciones de los alcaloides en las plantas

Los alcaloides en vegetales están presentes en Angiospermas especialmente en Dicotiledóneas herbáceas y son más escasos en Monocotiledóneas y Gimnospermas. La función de los alcaloides en las plantas no se encuentra aún esclarecida, pero existen algunas hipótesis sobre el papel que desarrollan estas sustancias en las plantas. La actividad biológica que cumplen estos metabolitos secundarios en el organismo animal es muy amplia. Algunos poseen acciones fisiológicas, ya sean tóxicas o curativas para el ser humano, y por ello este grupo de compuestos han atraído tanto la atención de los investigadores que buscan innovar

en la ciencia utilizando para ello los recursos naturales. Farmacológicamente interesan por su acción toxicológica (efectos hepatotóxicos y cancerígenos, efectos alucinógenos, etc.), por actuar como antifibrilantes, bloqueantes espasmolíticos, neuromusculares, antimalárico, antineoplásicos, etc. (Ringuelet & Viña, 2013).

Ringuelet & Viña (2013) cita a (Villarreal et al., 2009) y (Özçelik et al., 2011), mencionando que la mayoría de los alcaloides presentan acciones fisiológicas marcadas sobre el organismo animal, pueden ser tóxicos para los insectos; es decir que estarían vinculados con funciones de defensa, esto no sólo se debe a su toxicidad sino también por su sabor amargo.

Además los alcaloides presentan un efecto inhibitorio, evitando el crecimiento de microorganismos patógenos, esto lo hace gracias a que tienen la capacidad de intercalarse con el DNA, detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir enzimas del metabolismo de carbohidratos (Wink & Schimmer, 1999). La gran mayoría de los alcaloides están asociados con ácidos orgánicos lo que les facilita el transporte en la planta y pueden servir como productos de almacenamiento del nitrógeno no metabolizado o para transporte del mismo. También tienen una actividad alelopática, es decir que podrían cumplir funciones como reguladores del crecimiento (Ringuelet & Viña, 2013).

Se conocen algunos alcaloides con actividad antiviral (esparteína), bactericidas (lupinina, angustifolina), nematocidas (anagirina, matrina y citisina), atrayentes o repelentes (Ringuelet & Viña, 2013).

2.5.4. Clasificación de los alcaloides

Generalmente los alcaloides han sido clasificados en función de su estructura, distinguiéndose principalmente los compuestos heterocíclicos de los no heterocíclicos, actualmente existen varias formas de clasificarlos (Paris, 1998).

Bruneton (1987) menciona un método para poder clasificarlos:

- ❖ De acuerdo a sus propiedades farmacológicas.
- ❖ De acuerdo a su distribución botánica.
- ❖ De acuerdo a su origen biosintético.

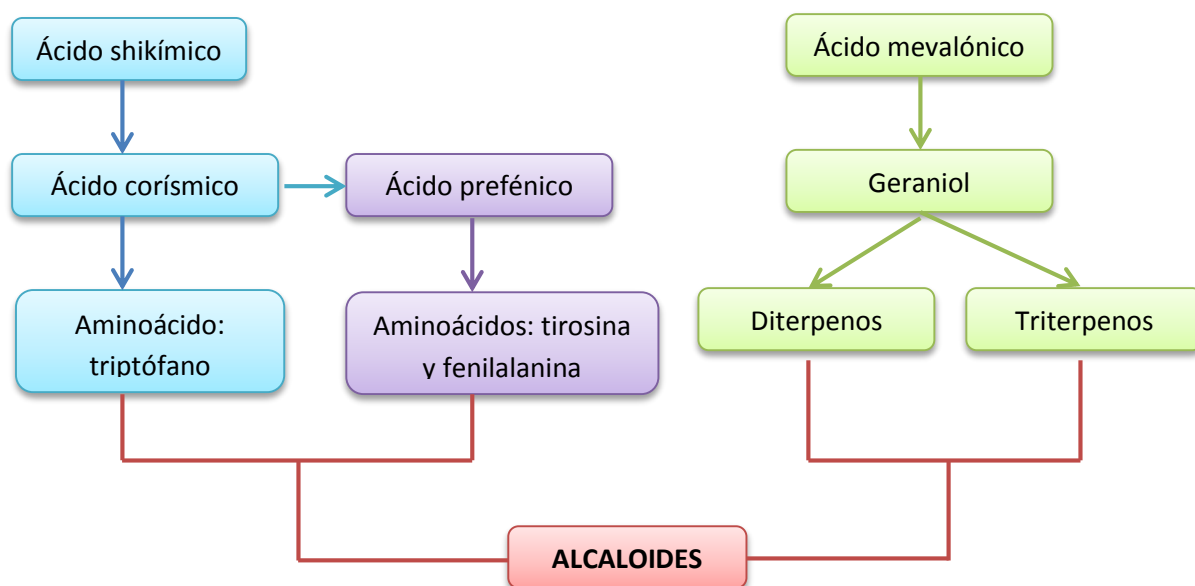
En este trabajo haremos énfasis en esta última forma de clasificación, donde se muestra una gran diversidad estructural y bioquímica, es decir, podemos agrupar todos los alcaloides naturales conocidos por ser originados por un número de aminoácidos o de precursores biogénicos conocidos.

Biosíntesis de los alcaloides

Los alcaloides tienen fórmulas químicas complejas y múltiples carbonos asimétricos, tanto el esclarecimiento de sus estructuras químicas como el estudio de su síntesis han sido relativamente nuevas y difíciles de resolver, y en algunos casos permanecen aún incompletas (Ringuelet & Viña, 2013).

Las rutas biosintéticas son diversas y los precursores que utilizan las plantas son los aminoácidos: L-ornitina, L-arginina, L-lisina, histidina, L-fenilalanina, L-triptófano o L-tirosina; y en menor proporción otros compuestos que pueden intervenir como la L-prolina, el ácido antranílico, el ácido nicotínico, y otros (Bruneton, 2001).

En general la estructura carbonada del aminoácido es mantenida intacta en la estructura del alcaloide, mientras que el carbono del ácido carboxílico sufre descarboxilación. En algunos casos la molécula requiere carbonos suplementarios, y éstos pueden ser proporcionados por grupos, es decir que, el resto de la molécula deriva de otras vías (la vía del acetato, la vía del ácido shikímico o la vía del ácido mevalónico) (Esquema 1). Las variaciones estructurales encontradas en los diferentes alcaloides, que se han ido sumando al screening o mapa alcaloídico, surgen de reacciones de oxidación, esterificación, acoplamientos, etc. (Ringuelet & Viña, 2013).



Esquema 1. Esquema de la Biosíntesis de los Alcaloides

Fuente: La Autora

2.5.5. Extracción e identificación de alcaloides

Uno de los criterios que se debe considerar es la solubilidad de los alcaloides, porque las diferencias de solubilidad entre los mismos dan lugar a los diferentes métodos para su aislamiento a partir del material vegetal y para su separación de las sustancias no alcaloídicas también presentes en los extractos. También se tiene en cuenta, para la separación y purificación de alcaloides, si son o no oxigenados ya que los alcaloides más volátiles como los del tabaco pueden extraerse por métodos de destilación. Los métodos de extracción varían según la magnitud y la finalidad de la operación, así como de la materia prima. Generalmente luego de terminado el proceso de extracción, sobre mezclas impuras de alcaloides se realiza un proceso de separación y purificación ya sea por precipitación o cromatografía (Ringuelet & Viña, 2013).

La materia prima y el objetivo que se quiera cumplir con la extracción de alcaloides determinará la metodología a seguir. En general los procedimientos a implementarse se separan por etapas así lo menciona Ringuelet & Viña (2013):

-Operaciones previas: en esta etapa se prepara el material antes de ser sometido a la extracción, dentro de esta fase se llevan a cabo el secado, pulverizado, desengrasado, etc. El proceso de secado tiene como finalidad reducir el contenido de humedad, con el fin de conservar la materia prima recién cosechada, en el caso de no poder hacer la extracción en el momento de corte; con el secado generalmente se evita la pérdida o degradación de los alcaloides. El triturado de la materia vegetal permite que al momento de la extracción los disolventes, puedan tener un mayor contacto con el material facilitando su aislamiento.

-Extracción: en este paso la variedad en las estructuras químicas y la solubilidad juegan un papel crucial para escoger el método adecuado de extracción. (Lock de Ugaz, 1994)

Tomando en cuenta el carácter básico y las características de solubilidad de cada alcaloide se utilizan diferentes disolventes, como por ejemplo: solventes orgánicos en medio básico, alcohol en medio neutro o levemente ácido, agua en medio ácido o vapor de agua para las extracciones por destilación. Puede realizarse por maceración, mezcla, agitación, extracción continua, etc. A modo de ejemplo se plantean dos formas de llegar a un extracto alcaloídico:

- ✓ Procedimiento A: La materia prima pulverizada se macera con agua o alcohol débilmente acidificados (con ácido diluido como el HCl 1N, H₂SO₄ 1N, o ácidos acético o tartárico al 10%). El extracto que contiene a los alcaloides se encuentra en estado de sal, luego alcalinizado con una base (amoníaco, hidróxido de calcio o carbonato de sodio) para liberar a los alcaloides de su combinación salina y puedan finalmente ser

extraídos con solventes orgánicos como el cloroformo, diclorometano, éter etílico, entre otros, obteniéndose por separación en una ampolla de decantación el llamado “extracto crudo”.

Para purificar este extracto se lo agita con agua acidulada y se deja reposar para su separación en capas. Las sales de los alcaloides se encuentran ahora en el líquido acuoso, mientras que en la fase orgánica permanecen las impurezas (compuestos que no forman parte de la fracción alcaloídica). Este procedimiento se repite varias veces para asegurar la purificación del extracto.

- ✓ **Procedimiento B:** La materia prima, pulverizada, se humedece con soluciones diluidas de amoníaco o carbonato de sodio para liberar a los alcaloides. Posteriormente se realiza una extracción con disolventes orgánicos como cloroformo, diclorometano, éter etílico, acetato de etilo, etc., que no sólo disolverán a los alcaloides al estado libre. Al extracto se le adiciona agua acidificada para que los alcaloides libres de la fracción orgánica formen sales y pasen así a la fracción acuosa. Las impurezas (pigmentos y otros compuestos liposolubles) no se solubilizarán en el extracto acuoso por poseer diferente solubilidad y se eliminan por separación de capas en un embudo de decantación. Los alcaloides son precipitados seguidamente por adición de un exceso de bicarbonato sódico o amoníaco, separándose por filtración o extracción con disolventes orgánicos.

“Cabe mencionar que estos dos procedimientos son generales, y debe tenerse en cuenta que cada material vegetal tiene su metodología de extracción” (Sharapin, 2000).

- Purificación: Los métodos para la obtención de alcaloides puros, se basan principalmente en procesos que permitan eliminar las impurezas y la metodología utilizada consiste en hacer extracciones sucesivas (por cambio de disolventes), de cristalización o técnicas cromatográficas: en capa fina (CCF), cromatografía gaseosa (CG), en columna (CC), o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

-Identificación y valoración: Los alcaloides no pueden ser identificados y valorados por un simple y único método ya que constituyen un grupo muy amplio y heterogéneo. En general es difícil identificar alcaloides de una nueva especie si no se tiene alguna idea aproximada del tipo de alcaloide que se pretende aislar. Una vez extraídos los alcaloides se los somete a pruebas de detección preliminar. La mayoría de los alcaloides en soluciones neutras o ligeramente ácidas, precipitan o dan coloraciones con una serie de reactivos que, por tal motivo, han sido denominados reactivos generales de alcaloides (Fig. 5). Ellos son:

- El reactivo de Mayer - Valser (solución acuosa de tetrayodomercuriato de potasio)

- El reactivo de Wagner (solución de yodo en yoduro potásico)
- El de Dragendorff (solución de yoduro potásico bismúctico)

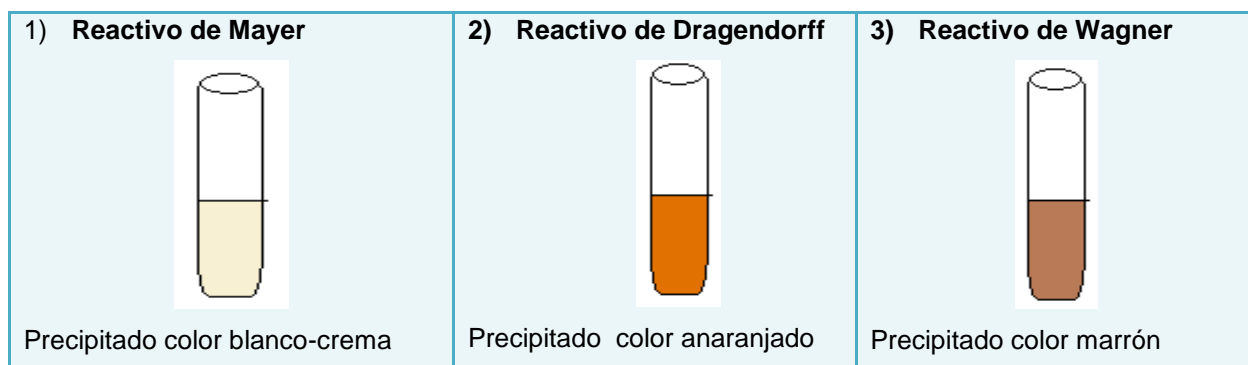


Figura 5. Reacciones de precipitación

Fuente: Soto, 2008

Cuando se habla sobre la valoración o cuantificación de alcaloides, se pueden aplicar métodos volumétricos, gravimétricos, colorimétricos, cromatográficos, espectrofotométricos; muchas veces específicos para cada tipo de alcaloide.

-Caracterización de estructuras: Por la diversidad estructural que presentan los alcaloides, el hecho de contar como referencia la familia y el género de la planta del cual ha sido aislado, reduce el problema de su identificación a un número menor de posibilidades y clasifica al alcaloide dentro de un determinado tipo. Luego se aplican pruebas cromatográficas, junto con registros de espectroscopia UV e IR, Espectroscopia de Masas; RMN de protón, RMN de carbón; Difracción de Rayos X, etc. Estos métodos ayudarán a elucidar cual es el compuesto aislado.

2.6. Cromatografía

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos: **retención** es el efecto producido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido; **desplazamiento** es el efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas. El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil, recibe el nombre de elución (Álabos et al, 2010).

“La cromatografía es un método muy utilizado que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía” (Skoog et al., 2005).

2.6.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana (Sharapin et al., 2000).

En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc.) distribuido uniformemente. El eluyente apropiado es de gran importancia para que exista una buena separación de las sustancias. Este debe ser seleccionado en función de la fase estacionaria empleada y en función de la naturaleza de las sustancias que van a ser separadas (Sharapin et al., 2000). Como resultado de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas distanciadas que pueden analizarse cualitativa y cuantitativamente, este es un método muy utilizado que nos ayuda a la caracterización de las sustancias (Fig. 6).

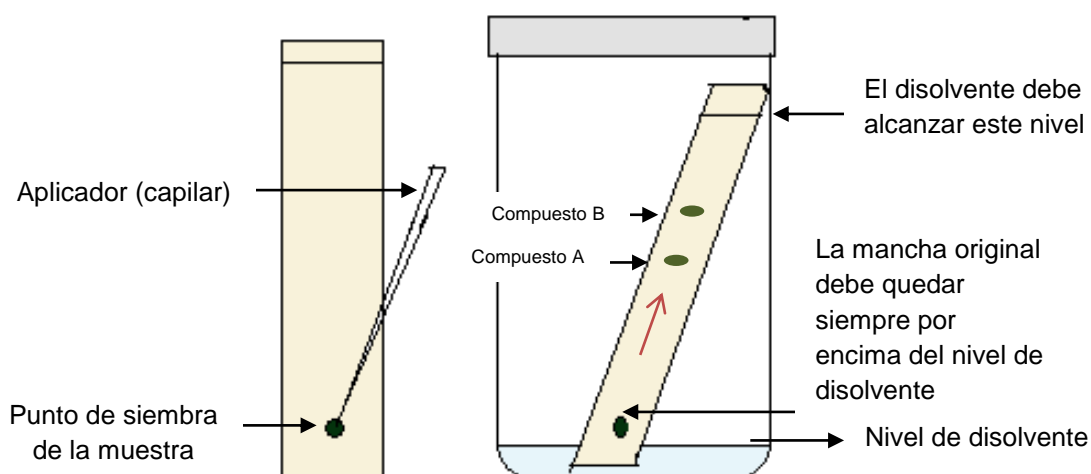


Figura 6. Cromatografía en capa fina

Fuente: Modificado de Harris, 2007

Como medida en cromatografía de capa fina se utiliza el R_f (Factor de Retención), el cual se define como el cociente de dividir el recorrido de la sustancia por el disolvente, esto es, la distancia media desde el origen hasta el centro de la mancha dividido para la distancia media desde el origen hasta el frente del disolvente (Uman, 2007), como se indica el Figura 7.

$$R_f = \frac{\text{distancia media desde el origen hasta el centro de la mancha}}{\text{distancia media desde el origen hasta el frente del disolvente}}$$

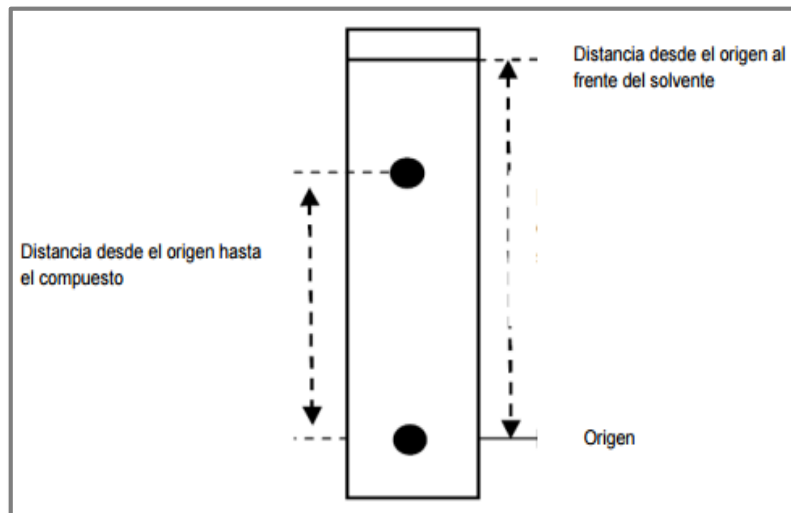


Figura 7. Medida de los Rf en la placa de sílica gel 60 F₂₅₄

Fuente: Silvia, 2008

Las ventajas del uso de la cromatografía en capa fina pueden ser resumidas de la siguiente manera (Shaparin et al., 2000):

- Se necesita equipo simple y de bajo costo.
- Es fácil su comprensión y ejecución.
- Rapidez, reproductibilidad y versatilidad en el análisis.
- Utilización de una pequeña cantidad de solvente y de muestra a ser analizada.
- Posibilidad de analizar varias muestras en una sola placa cromatográfica.
- Posibilidad de revelar las placas con reactivos cromogénicos, lo cual hace posible detectar sustancias que no absorben en la región UV/ visible.
- Posibilidad de efectuar separaciones en escala semi-preparativa.

2.6.2. Cromatografía en columna (CC)

La cromatografía líquida en columna es una variedad de la cromatografía en la que la fase móvil es líquida y pasa a través de la fase estacionaria, sólida o líquida, que esta retenida en un recinto cilíndrico, la modalidad clásica de la cromatografía líquida en columna consiste en hacer pasar mediante gravedad la fase líquida sobre un soporte sólido (de diámetro de partícula grande), retenido en una columna recta, generalmente de vidrio de varios centímetros de diámetro y una altura de 5 a 10 veces el diámetro y recogida del eluido en fracciones (Trujillo et al., 2005).

2.6.3. Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG/MS)

La cromatografía de gases es una técnica que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos (Gutiérrez & Droguet, 2002).

En la cromatografía de gases una fase se mantiene fija y otra se mueve a través de ella, en esta fase móvil el disolvente que desciende por la columna es un gas generalmente helio u otros como son el nitrógeno (N_2) o hidrógeno (H_2); la fase estacionaria es la que se encuentra fija en la columna es regularmente un líquido no volátil. El reparto de solutos entre la fase estacionaria y la fase móvil da lugar a la separación (Harris, 2007).

La muestra a ser analizada se inyecta a través de un septo (Diagrama de silicona) en un inyector caliente, en su interior la muestra se evapora rápidamente, dicho vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador y los analitos luego de ser separados llegan al detector y cuyo resultado se observa en un registrador (computadora). Para obtener unos resultados confiable se debe tomar en cuenta ciertos parámetros como son que la columna debe estar lo suficientemente caliente para que los analitos alcancen una presión de vapor adecuada y eluyan en un tiempo razonable (Fig.8) (Harris, 2007).

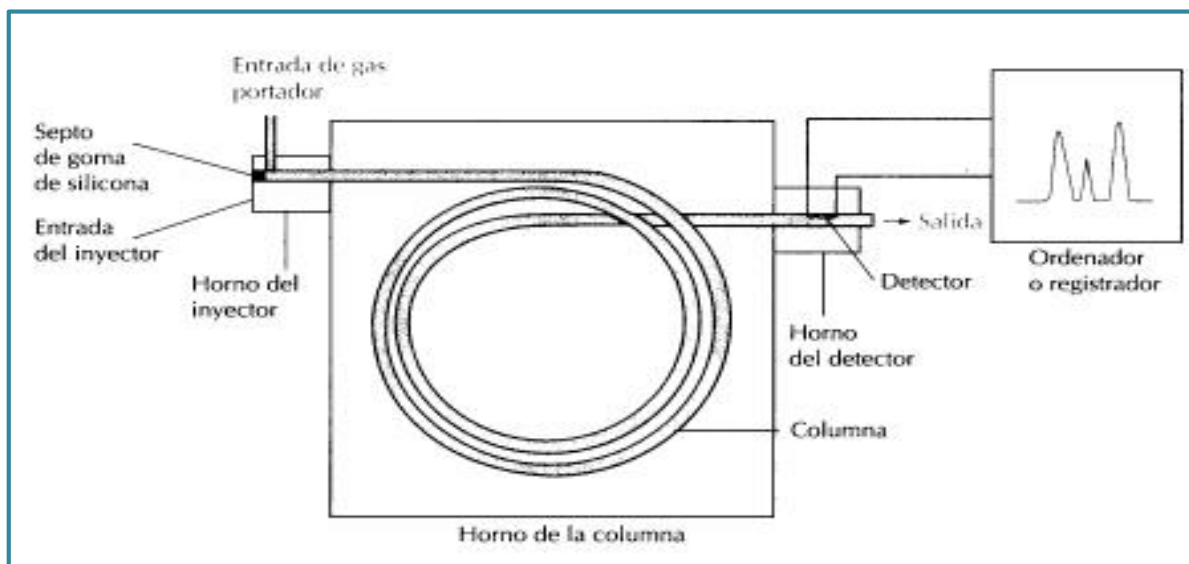


Figura 8. Diagrama de un cromatógrafo de gas

Fuente: Harris, 2007

La espectrometría de masas puede identificar muchas sustancias puras conocidas, para obtener un resultado mucho más confiable se hace un análisis que consiste en la asociación

de dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos métodos que trabajan en fase gaseosa y necesitan una mínima cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles (Gutiérrez & Droguet, 2002).

2.7. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La Resonancia Magnética Nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y en su aplicación más común, las propiedades del núcleo de hidrógeno. Una señal de RMN se caracteriza por cuatro propiedades: posición, multiplicidad, intensidad y anchura a media altura (Elguero et al., 2011).

Espectroscopia de RMN es uno de los métodos analíticos más relevantes con los que se cuenta hoy en día. Las razones son múltiples: se aplica por los químicos y los físicos a los gases, líquidos, cristales líquidos y sólidos (incluyendo polímeros). En bioquímica es utilizada de forma frecuente para determinar las estructuras de las proteínas, y también es ampliamente utilizado en la medicina (Terence & Burkhard, 2007).

Dependiendo de las características de la muestra encontramos dos tipos de espectro NMR, cuyas representaciones vendrán determinadas por las interacciones magnéticas dominantes actuando sobre la muestra. Las principales interacciones que describe Larraona & Majanvacas (2008) citado por Quituisaca (2015) son las siguientes:

- 1) **El desplazamiento químico:** interacción entre los espines nucleares y su entorno dentro de la muestra.
- 2) **El acoplamiento J:** interacción dipolar indirecta entre los espines de dos núcleos vecinos a través de sus electrones. El efecto de este acoplamiento sobre el espectro NMR es el desdoblamiento de las líneas que corresponden a una determinada ν en dos o más.
- 3) **La interacción dipolo-dipolo:** interacción directa entre los momentos magnéticos de espín de dos núcleos vecinos. Tiene sentido para moléculas bien localizadas como en el caso de los sólidos.

Dentro del análisis de RMN se realiza experimentos en una dimensión y dos dimensiones estos son:

Una dimensión

¹H: este experimento nos permite conocer el número de protones, desplazamientos químicos y acoplamientos H-H (Fina, 2009).

¹³C: esta técnica se utiliza para deducir la estructura del esqueleto carbonado.

2.8. Difracción de Rayos X

La cristalografía es la ciencia que estudia la estructura y propiedades del estado cristalino. Los cristales tienen frecuentemente formas poliédricas, limitadas por caras planas, sin embargo, estas caras pueden no ser lisas, o pueden destruirse, y no son esenciales para que se considere por esta propiedad que es un cristal o no (Sands, 1993). La espectroscopia de rayos X se fundamenta en la medida de emisión, absorción, dispersión, fluorescencia y difracción de la radiación electromagnética. Los rayos X se definen como una radiación electromagnética de longitud de onda corta producida por desaceleración de los electrones de elevada energía o por transiciones electrónicas que implican electrones de los orbitales internos de los átomos (Skoog & Leary, 1994).

Cuando los rayos X impactan sobre un objeto, los átomos del objeto dispersan los rayos. Mediante la determinación de estas direcciones y de la intensidad de los haces dispersados, se puede conseguir una imagen tridimensional de la estructura atómica del cristal (Fig. 9). Los cristales son materiales ideales para el estudio de la estructura de la materia a nivel atómico o molecular, debido a tres características principales: son sólidos, son tridimensionales y están contruidos a partir de un arreglo de átomos muy regular y en general altamente simétrico (UNESCO, 2014).

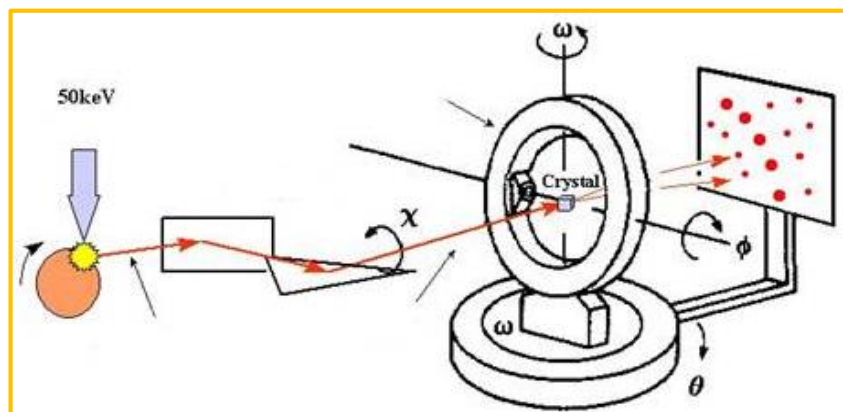


Figura 9. Difractómetro de rayos X para monocristal

Fuente: Unam, 2003

Conocer la estructura tridimensional a nivel atómico supone poder individualizar los átomos que la constituyen. Es decir, que en realidad queremos distinguir distancias interatómicas que están en el rango de 10^{-10} metros o un Armstrong (Å: 0.1 nm). Las radiaciones electromagnéticas que se encuentran en esa zona del espectro son precisamente los rayos X. Es decir, que la utilización de los rayos X viene condicionada por el objeto de estudio, ya que pretendemos visualizar distancias interatómicas en macromoléculas (Bravo, 2012).

2.9. Actividad antibacteriana

“Un extracto con actividad antibacteriana es aquel que es capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o estimular su eliminación”. (Magidan et al., 2003). “Se presentan cuando el antimicrobiano lograr inhibir una población bacteriana, esta puede medirse de forma cuantitativa mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos frente a patógenos concretos” (Tello, 2009).

2.9.1. Bacterias

Las bacterias poseen un tamaño medio de va de 2-10 μ m. Su citoplasma está lleno de ribosomas, el material genético, constituido por ácido desoxirribonucleico (DNA); la membrana citoplasmática está rodeada externamente por una pared dura y elástica, de peptidoglicano que le confiere la forma a la célula.

De acuerdo a su morfología las bacterias se clasifican en cocos, cuando tienen forma redondeada y bacilos, cuando muestran una morfología alargada. Además dependiendo de la estructura de su pared se pueden clasificar en **grampositivas**, sólo poseen peptidoglicano y **gramnegativas**, si presenta por fuera de la capa de peptidoglicano una membrana rica en polisacáridos (Prats, 2005).

2.9.2. Bacterias Grampositivas

Staphylococcus aureus son células esféricas grampositivas de aproximadamente 1 μ m de diámetro dispuestas en racimos irregulares. Es un microorganismo de gran importancia clínica ya que es considerado como un patógeno importante para el ser humano. Este microorganismo coloniza e infecta a pacientes hospitalizados con defensas bajas y pacientes inmunocompetentes.

Produce diversas patologías desde una intoxicación alimentaria hasta el síndrome de choque tóxico (Brooks, 2010).

Enterococcus faecalis son parte de la microflora intestinal normal, se desarrollan bien a temperaturas entre 10 y 45°C, este microorganismo causa 85 al 90% de las infecciones

enterocólicas, son la causa más frecuente de las infecciones intrahospitalarias. Los enterococos se transmiten de un paciente a otro principalmente en las manos del personal hospitalario, algunos de los cuales son portadores de enterococos en el tubo digestivo. En los pacientes los lugares de infección más comunes son el sistema urinario, las heridas el sistema biliar y la sangre (Brooks, 2010).

2.9.3. Bacterias Gramnegativas

Klebsiella pneumoniae está presente en el sistema respiratorio y las heces de casi el 5% de las personas sanas. Produce una pequeña parte de las neumonías bacterianas, puede producir una consolidación pulmonar necrosante por hemorragia extensa, produce infecciones urinarias y bacteriemia con lesiones focales en pacientes débiles. Estas bacterias figuran entre las 10 principales bacterias patógenas que ocasionan infecciones hospitalarias (Brooks, 2010).

Pseudomona aeruginosa, tiene forma de bastón, es móvil, muestra una disposición en bacterias individuales, en pares y a veces en cadenas cortas. Es el principal microorganismo patógeno del ser humano es invasiva y toxígena, tiene una amplia distribución en la naturaleza y suele estar presente en medios húmedos en los hospitales. También puede colonizar al ser humano normal en quien es un saprófito; la bacteria se adhiere a las mucosas o a la piel y las coloniza, produce invasión local y enfermedad sistémica. Causa enfermedades en personas con un sistema inmunológico alterado (Brooks, 2010).

Escherichia coli son bacterias entéricas forman colonias circulares, convexas y lisas con bordes distintos, es un miembro de la microflora intestinal normal. Esta bacteria es la causa más frecuente de infecciones de vías urinarias y contribuye a casi el 90% de las primeras infecciones urinarias en mujeres jóvenes, además produce diarreas, cuando las defensas normales del hospedador son inadecuadas, este microorganismo puede llegar al torrente sanguíneo y producir septicemia (Brooks, 2010).

Proteus vulgaris este tipo de bacterias produce infección solo una vez que sale del tubo digestivo. Se encuentran presentes en infecciones urinarias, producen bacteriemia, neumonía y lesiones focales en pacientes débiles o en los que reciben infusiones intravenosa. Las bacterias de este género producen ureasa, que resulta de una hidrólisis rápida de la urea con liberación de amoníaco, por lo tanto la orina se vuelve alcalina lo que favorece la formación de cálculos (Brooks, 2010).

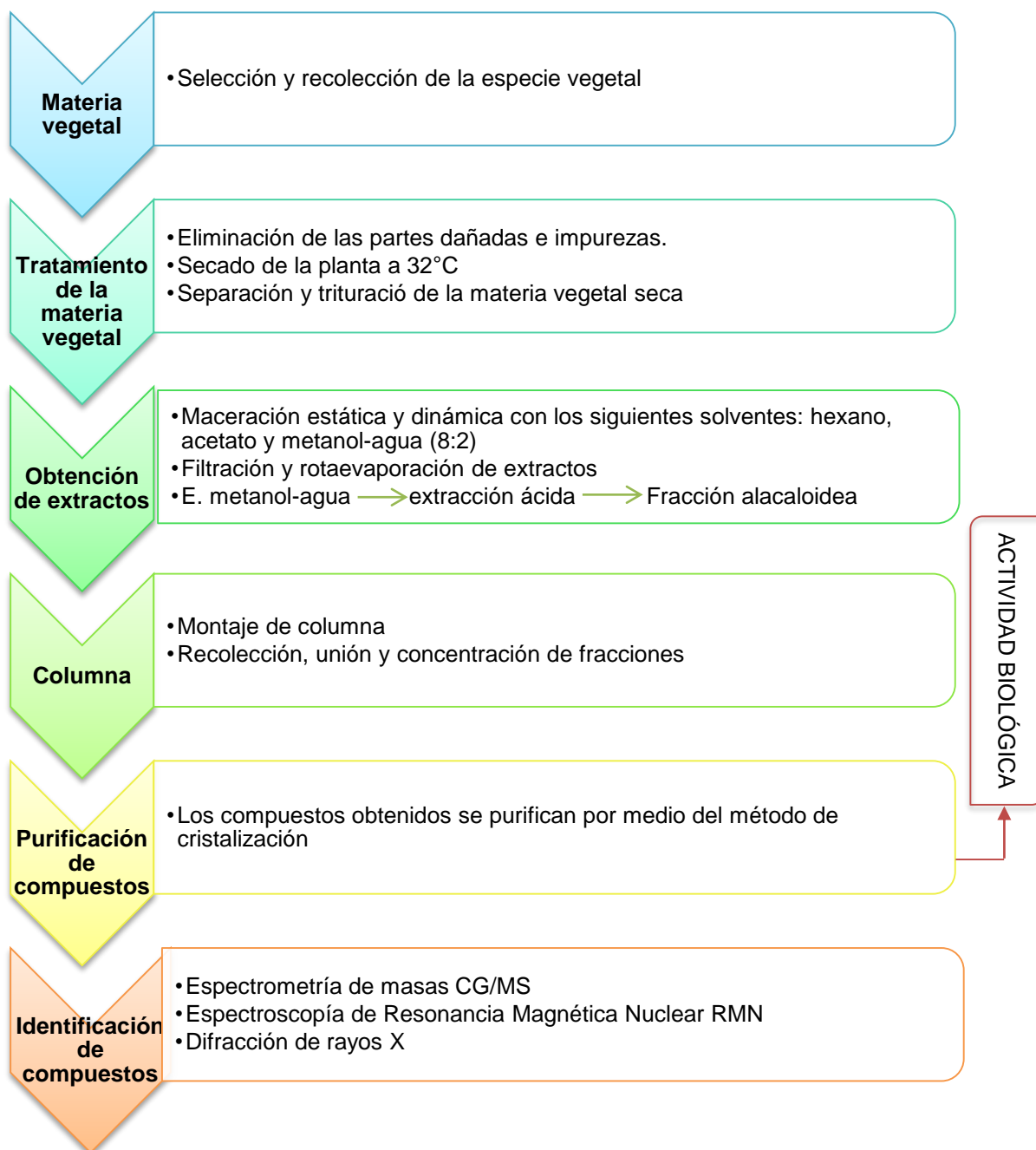
Salmonella typhimurim son bacilos, que presentan una longitud variable, se multiplican fácilmente en medios simples. La enterocolitis es una de las manifestaciones más frecuentes

causadas por este microorganismo. Después de 8-48 horas de la ingestión de la bacteria los síntomas que presenta el paciente son náusea, cefalea, vómito y heces abundantes con escasos leucocitos en las heces (Brooks, 2010).

CAPITULO III

METODOLOGÍA

La parte experimental de la presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja. A continuación se detalla la metodología que se realizó para la Extracción e Identificación de alcaloides en la especie *Macrocarpaea lenae*.



Esquema 2. Esquema de la metodología

Fuente: La Autora

3.1. Recolección de la materia vegetal

La materia vegetal (hojas) de *Macrocarpaea lenae* se recolectó en el sector Cerro Acacana, de la parroquia San Lucas perteneciente al cantón Saraguro, provincia de Loja, con las siguientes coordenadas 17692602E y 9590410N (Fig. 10).



Figura 10. Lugar de recolección de la materia vegetal

Fuente: Modificado de: Fundación Ecológica WAYRA, 2004

La identificación botánica de la planta fue realizada por Ing. Bolívar Merino, curador del Herbario de la Universidad Nacional de Loja. Una muestra botánica se encuentra depositada en el Herbario de Universidad Técnica Particular de Loja con el código PPN-GN-003. En la fotografía que se muestra a continuación se indica la especie *M. lenae* (Fig. 11).



Figura 11. *Macrocarpaea lenae*

Fuente: Armijos, 2011

3.2. Tratamiento de la materia vegetal *Macrocarpaea lenae*

Luego que se realizó la recolección de la materia vegetal, se procedió a la selección de la planta (hojas) que se encuentra en buen estado, eliminando partes deterioradas e impurezas que pudieran interferir con el análisis.

Posteriormente el material vegetal fue sometido a la cámara de secado con flujo de aire a una temperatura aproximada de 32° C durante 7 días, con la finalidad eliminar la mayor parte de agua contenida en las hojas para de esta forma facilitar la extracción de los alcaloides y de igual manera conservar su integridad morfológica. El siguiente paso una vez obtenido el material vegetal seco es la trituración uniforme de las hojas (Fig. 12)



Figura 12. Tratamiento de la materia vegetal

Fuente: La Autora

3.3. Obtención de los extractos de *M. lenae*

Las hojas secas, previamente trituradas de forma mecánica con un triturador (814,42g) fueron sometidas a extracciones continuas en maceración dinámica por un período de 2 horas y luego maceración estática por un tiempo de 22 horas, utilizando para este proceso disolventes de acuerdo al orden creciente de polaridad: hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt).

Para el siguiente paso de maceración con etanol-agua ($C_2H_5OH-H_2O$) (9:1) la materia vegetal se secó y posteriormente se pesó (758,01g) la relación planta: disolvente fue 1:10 (p/v); esto se colocó en un recipiente de vidrio cerrado y protegido de la luz. Posteriormente se filtró al vacío, para separar el residuo vegetal del líquido extraído, se recolectó todos los filtrados en un solo recipiente de acuerdo a cada uno de los disolventes usados. T5En el caso de la extracción con $C_2H_5OH-H_2O$ el proceso de maceración se repitió hasta ensayo negativo al reactivo de Dragendorff.

Por último, el líquido extraído se concentró a presión reducida en un rotaevaporador marca Heidolph a temperatura de 30°C para evitar la degradación de los constituyentes químicos (Fig. 13)



Figura 13. Obtención de Extractos: a) Maceración dinámica, b) Maceración estática, c) Filtración al vacío, d) Rotaevaporación

Fuente: La Autora

Extracción de la Fracción alcaloidea

El siguiente paso a realizado fue la extracción de la fracción alcaloidea, para ello al extracto de $C_2H_5OH-H_2O$ se le añadió agua acidulada (H_2SO_4 2%), se agitó hasta que haya una mezcla uniforme, luego se filtró al vacío, el líquido extraído se almacenó en un frasco cerrado y se comprobó la presencia de alcaloides mediante el ensayo de Dragendorff.

El líquido filtrado que contenía a los alcaloides fue alcalinizado (pH 11) con NH_3 acuoso, lo que permitió la liberación de los alcaloides de su combinación salina y finalmente fueron extraídos con cloroformo obteniéndose por separación en un embudo de decantación, una vez que se separaron en dos fases, se recogió la fracción de la parte inferior del embudo que es la fracción de interés (Fig. 14), esta se concentró hasta total sequedad y se obtuvo la fracción total de alcaloides la cual se denominó ML-FT.

El proceso con cloroformo se repitió varias veces hasta ensayo negativo al reactivo de Dragendorff.

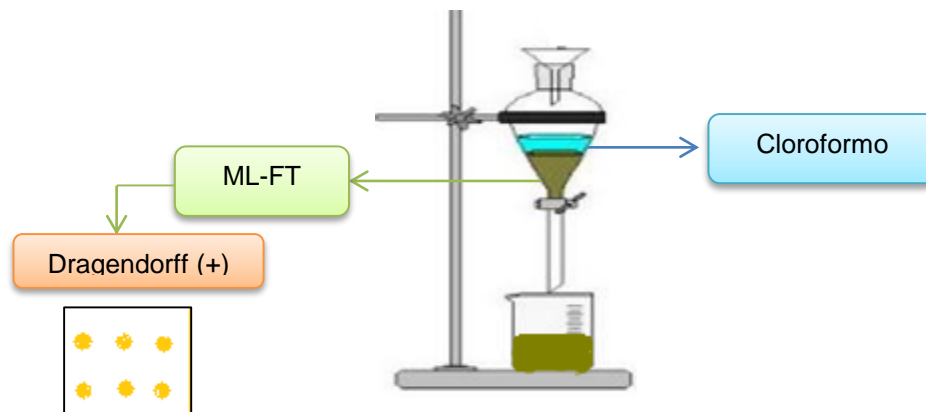


Figura 14. Extracción de la fracción alcaloidea

Fuente: La Autora

3.4. Desclorofilación.

Se realizó CCF de la fracción total de alcaloides (ML-FT) utilizando para ello silicagel Merck GF 254 y como fase móvil la mezcla MeOH:H₂O en proporción 8:2 (v/v) y para revelar la placa cromatográfica se usó H₂SO₄/Vainillina 1%. Finalmente con el resultado obtenido de la placa CCF, se observó que había gran cantidad de clorofilas por lo que se decidió desclorofilar la muestra. Para realizar el procedimiento de desclorofilación se utilizó una columna de vidrio, 100 g de sílice fase inversa C18 (Fi) y 9,61g de ML-FT, en relación 10:1 (sílice:muestra) eluyendo con una polaridad isocrática de MeOH:H₂O en proporción 5:5 (v/v).

3.5. Fraccionamiento cromatografía en columna.

La muestra (4g de ML-FT-1/4) fue cargada en una columna absorbida sobre 14g de sílice fase directa; para su fraccionamiento en una relación 1:100 (muestra:sílice). Se eluyó según un gradiente creciente de fuerza eluotrópica, aplicando mezclas de disolventes (DCM y MeOH), se concentró las fracciones por evaporación espontánea y se realizó placas de CCF para el control cromatográfico.

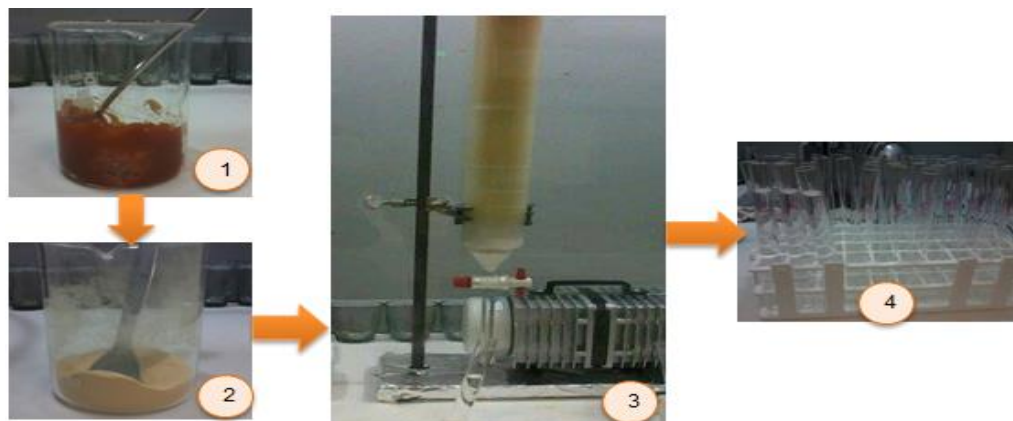


Figura 15. Cromatografía en Columna

Fuente: La Autora

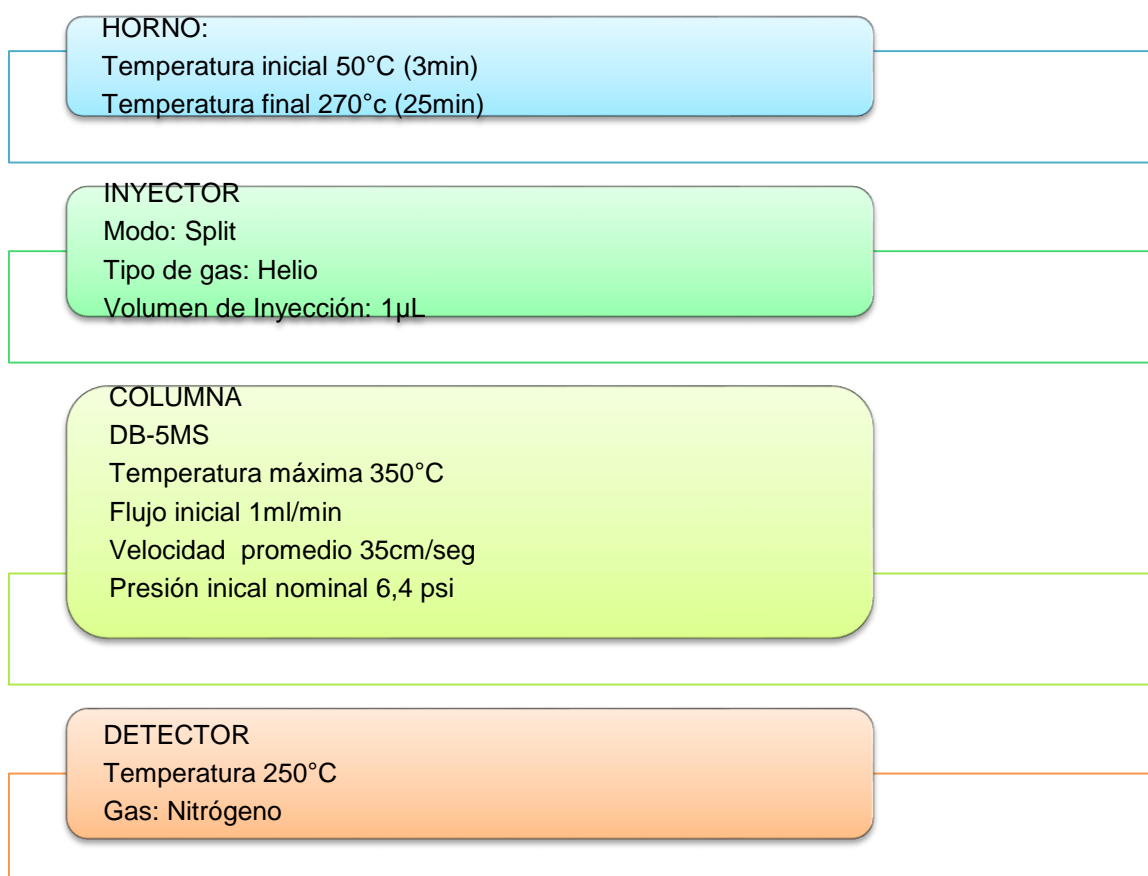
3.6. Purificación de fracciones.

Para la purificación y re-cristalización las fracciones 156 a la 195 se unieron y se denominó ML-27/5, esta muestra se disolvió en el mínimo volumen de MeOH (grado reactivo) a temperatura ambiente y se dejó reposar la muestra a cristalizar por evaporación espontánea del disolvente, los cristales se separaron de la fase líquida y se repitió el proceso hasta obtención de la máxima cantidad de producto puro

3.7. Elucidación e identificación de compuestos

3.7.1. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Los espectros de masas se registraron en un aparato Agilent 6890N Cromatografía de Gases acoplada a espectroscopia de masa (Agilent 5973 Inert), con columnas capilares de DB-5MS (5%-fenil-Metilpolisiloxano), la muestra fue diluida en DCM. La muestra ML-FT fue analizada en el equipo de Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas bajo las siguientes condiciones (Esquema 3):



Esquema 3. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica

Fuente: La Autora

3.7.2. Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros de los metabolitos analizados se registraron en el equipo de RMN Varian Agilent con No. de serie 21953, que opera a 400 MHz para RMN ^1H y a 100 MHz para RMN ^{13}C , como también COSY y DEPT a una temperatura de 25°C. Los compuestos se disolvieron en CDCl_3 , CD_3OD y DMSO. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los datos obtenidos se analizaron en el programa MestRenova 10.0.2.

3.7.3. Difracción de Rayos X.

El ensayo se realizó en el Centro Grandi Strumenti de la Universidad de Pavia-Italia; lo desarrollaron el Dr. Massimo Boiocchi y el Prof. Giovanni Vidari.

3.8. Actividad antibacteriana.

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Bioensayos, perteneciente al Departamento de Química Aplicada de la UTPL; ejecutado por el Bq. Luis Cartuche. Se evaluó la actividad antibacteriana de ML-27/5 por el método de Microdilución en Caldo, que determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra las cepas de bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Para disolver la muestra, se diluyó 1,3mg de muestra en 260 μL de Dimetil-sulfoxido (DMSO). Se utilizó el ultrasonido para disolver completamente la muestra.

Preparación del cultivo bacteriano (overnight).

El cultivo overnight se preparó 24 horas antes de iniciar el análisis correspondiente, esto a partir de los microorganismos que se encontraban en reserva criogénica a -80 °C.

Del cultivo overnight se tomaron 150-300 μL en 7mL de suero fisiológico, de esta suspensión se tomó 140 μL y se inoculó en 7mL de caldo Muller-Hinton ajustado a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/mL. Se utilizó 100 μL de esta suspensión para completar a 200 μL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajustó la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL.

3.8.1. Ensayo.

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos utilizando el procedimiento de dilución de doble seriada; como se describe a continuación:

Se colocó 180µL de caldo Muller Hinton al primer pocillo y 100µL a los pocillos restantes, luego se adicionó 20µL de la muestra diluida en DMSO en los pocillos de la fila A, el siguiente paso fue realizar diluciones seriadas tomando 100µL del primer pocillo de la fila A y se diluyeron en los pocillos de la fila B y se continúa hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se siguió el mismo proceso para el control de esterilidad (180µL de caldo Muller Hinton + 10µL de extracto diluido), control negativo (DMSO), y para el control positivo (180µL de caldo de Muller Hinton + 20µL de Gentamicina ® (1mg/ml para Gram -) (4mg/ml para Gram +)). Luego de preparada la placa se inoculó todos los pocillos con 100µL de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200µL en la placa de cultivo. Se sellaron las placas y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

El ensayo se realizó una sola vez con las cepas bacterianas antes mencionadas.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a la metodología antes mencionada a continuación se detallan los resultados conseguidos durante el proceso de aislamiento y caracterización de compuestos obtenidos por extracción ácida de la especie *Macrocarpaea lenae*.

4.1. Rendimiento de extractos obtenidos.

A partir de la materia vegetal seca se obtuvo 3 extractos: hexano, acetato de etilo y C₂H₅OH-H₂O (etanol-agua), estos presentaron una consistencia semi-sólida, de un color verde oscuro, el extracto de hexano es el que presenta mayor rendimiento.

No se pudo obtener el peso exacto del extracto hidroetanólico puesto que posteriormente a este se le adicionó agua acidulada, por lo que era innecesario secar completamente. En la tabla se indica también los resultados obtenidos del proceso de Desclorofilación.

Tabla 3. Pesos y Rendimientos de los extractos de *Macrocarpaea lenae*

<i>Macrocarpaea lenae</i>		Extracto	Peso (g)	Rendimiento %
Materia vegetal seca (g)	814,42g	Hexano	42,94	5,27
		Acetato de etilo	41,85	5,13
	758,01g	Fracción total de alcaloides ML-FT	9,61	1,26
Desclorofilación de la especie <i>M. lenae</i>				
Fracción total de alcaloides ML-FT (g)	9,61g	Fracción total de alcaloides sin clorofilas ML-FT-1/4	4,30	44,75

Fuente: La Autora

La cromatografía de capa fina que se realizó a la muestra ML-FT, mostró la presencia de una gran cantidad de clorofilas como se indica en la Figura 16, por lo que se decidió desclorofilar la muestra.

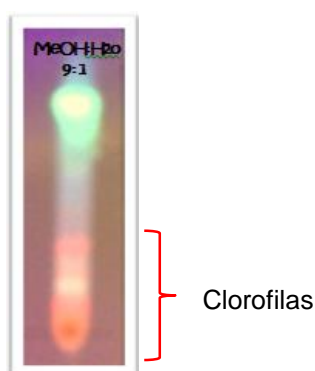


Figura 16. CCF fase directa sobre la muestra ML-FT

Fuente: La Autora

4.2. Cromatografía en columna de ML-FT-1/4.

La fracción ML-FT-1/4 se purificó en una columna cromatográfica, para desarrollar el proceso se utilizó un sistema de disolventes de polaridad ascendente DCM: MeOH (99:1), DCM: MeOH (98:2), DCM: MeOH (95:5), DCM: MeOH (90:10) hasta llegar a MeOH (100%) y finalmente MeOH: H₂O (90:10).

Como resultado del fraccionamiento en columna se obtuvieron 331 fracciones. Cada fracción fue analizada por cromatografía de capa fina, para ello se utilizó una placa de silicagel Merck GF 254 (Fase directa) y como disolventes para la fase móvil DCM:MeOH 9:1 (v/v); luego fueron observadas a la luz ultravioleta de 254 y 365nm y reveladas con una solución de H₂SO₄ /vainillina 1% (Fig. 17), como el ensayo se realizó por duplicado la otra placa se reveló con el reactivo de Dragendorff.

Finalmente se combinaron las fracciones que cromatográficamente eran similares dando como resultado 14 fracciones como se detalla en la Tabla 4.

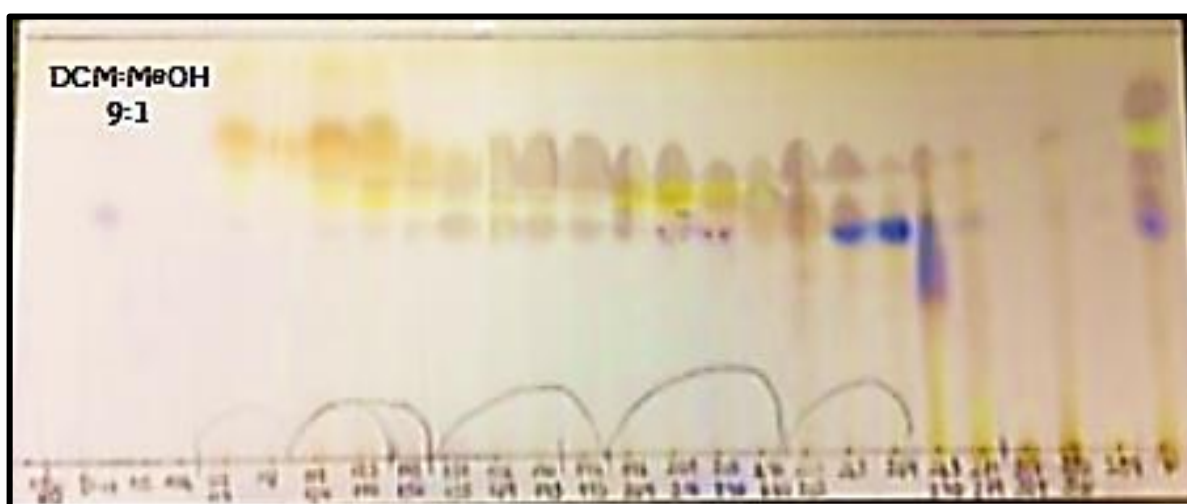


Figura 17. Cromatografía de capa fina revelada con H₂SO₄ /vainillina 1%

Fuente: La Autora

Resultado de la cromatografía de capa fina realizada para comparar las dos fracciones cristalinas: ML-27/5 y la fracción 261-265 se observó que eran iguales por que se decidió unir las y denominarlas a las dos como **ML-27/5** (Fig. 18)

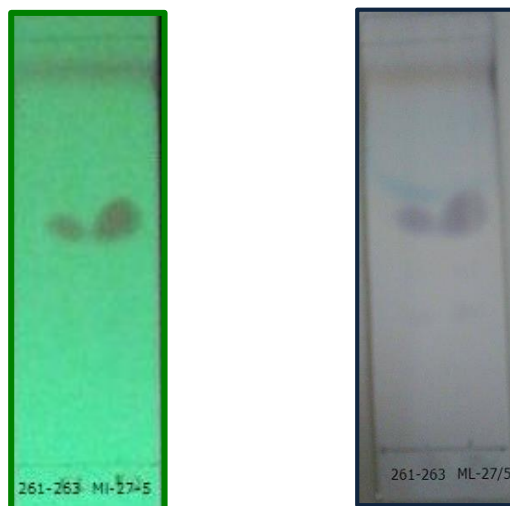


Figura 18. Cromatografía de capa fina ML-27/5 y la fracción 261-265

Fuente: La Autora

Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico de *Macroparaea lenae*

Unión de fracciones				
Nº	FRACCIÓN	DENOMINACIÓN	ASPECTO	Peso (mg)
1	1-80	ML-1/4	Naranja Viscoso	3,6
2	81-104	ML-2/4	Naranja Viscosa	41,9
3	105	ML-3/4	Naranja Viscosa	5,5
4	106	ML-4/4	Naranja Viscosa	37,6
5	107-118	ML-28/6	Naranja Viscosa	94,3
6	119-150	ML-29/6	Naranja Viscosa	126,1
7	151-155	ML-10/4	Naranja Viscosa	49,8
8	156-195 261-263	ML-27/5	Sólido cristalino blanco	533,6
9	196-204	ML-14/4	Naranja Viscosa	93,7
10	205-260	ML-30/6	Naranja Viscosa	467,7
11	264	ML-20/4	Amarillo Viscoso	98,3
12	265-316	ML-31/6	Amarillo Viscoso	1391,8
13	317-327	ML-24/4	Anaranjado-marrón Viscoso	48,9
14	328-331	ML-32/6	Marrón Viscoso	280,5

Fuente: La autora

Para purificar la muestra ML-27/5, se usó Metanol grado reactivo, lavando sucesivamente con pequeñas cantidades de disolvente, luego de extraer el MeOH, se obtuvo 533,6mg de un sólido cristalino blanco, posteriormente se procedió a realizar CCF usando como fase móvil una mezcla de DCM: MeOH (20:1), al ser revelada la placa con ácido sulfúrico y vainillina 1% se observó la presencia de una mancha color violeta, que tiene un Rf de 0,55. Para conocer que se trata de un alcaloide se realizó otra placa cromatográfica y se utilizó las condiciones antes descritas pero en este caso se reveló con el reactivo de Dragendorff, dando como resultado una mancha de color anaranjado. En la Figura 19 que se muestra a continuación se observa las placas cromatográficas de ML-27/5.

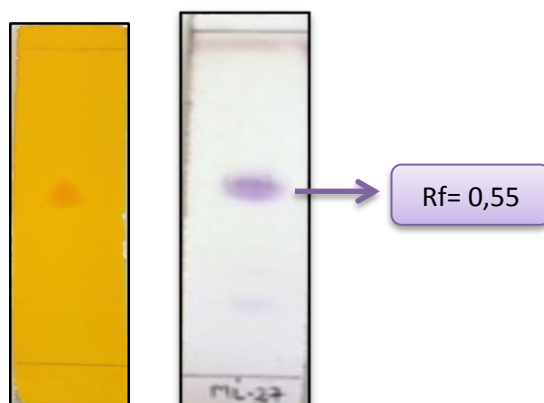


Figura 19. Cromatografía de capa fina de ML-27/5 usando como fase móvil DCM: MeOH (20:1)

Fuente: La Autora

4.3. Identificación de los metabolitos secundarios aislado de *M. lenae*.

Identificación del compuesto Gentianine mediante Cromatografía de gases y Espectrometría de masas.

El estudio se realizó bajo las condiciones de operación establecidas en el sistema CG-MS, la muestra analizada fue ML-FT, según la Base de Datos MSD-Chemstation 0.01 SP1, Wiley 7n.l del equipo, se determinó que en la fracción total de alcaloides (ML-FT) posiblemente se encuentra el alcaloide **Gentianine** con un tiempo de retención de 10,69 minutos.

El espectro de masas presento un ion molecular a 175 m/z, compatible con la fórmula molecular $C_{10}H_9NO_2$ (Figura 20) por lo que se puede decir que probablemente se trate del alcaloide Gentianine, el espectro fue comparado con la Base de Datos NIST 2011(Anexo 1).

Consideramos que se trate del compuesto Gentianine presente en la fracción total de alcaloides ya que existen reportes de la presencia de este alcaloide en la Familia Gentianaceae como el estudio titulado: "Phychemicals of Gentianaceae: A Review of

Pharmacological Propertes”, que menciona que este alcaloide es muy común dentro de esta familia y que por sus propiedades terapéuticas es de interés en la investigación y que ha sido aislado en especies como *Gentiana lutea* L., *Gentiana macrophylla*, *Gentiana marginata*, *Swertia chirayita*, *Swertia marginata* entre otras especies de la familia Gentianaceae.

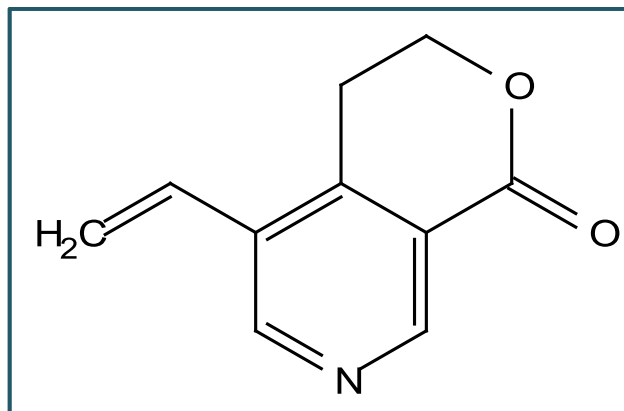


Figura 20. Estructura química del alcaloide Gentianine

Fuente: La Autora, 2015

Gentianine: Nombre IUPAC 5-etenil-3,4-dihidro-1H-pirano [3,4-c] piridin-1-ona, peso molecular de 175,18g/mol, densidad de 1,23, punto de fusión 84-86°C, se disuelve MeOH, DCM, CHCl₃, AcOEt, Acetona; según bibliografía obtenida de la Base de Datos Pubchem (2005) y Chemblink (2015).

Gentianine es un alcaloide monoterpénico que tiene propiedades antiinflamatorias, anestésicas, antihistamínicas reportado por Song Zhen Yu et al. (1958), Geng Tao et al. (1959) y Kwak et al. (2005) Y también considerado como hipotensor, antipsicótico (Bhattacharya SK et al., 1974) diurético (Mansoor & Malghani, 2005) contra la malaria, propiedades antiamebianos y antibacterianas (Natarajan et al., 1974).

4.3.1. Identificación del compuesto Hirsutanine A mediante Resonancia Magnética Nuclear.

El compuesto Hirsutanine A fue obtenido utilizando una mezcla de solventes DCM: MeOH 90:10. La estructura fue asignada en base a su análisis por métodos espectrométricos, difracción de rayos x y por los datos obtenidos en bibliografía. La Hirsutanina A se trata de un alcaloide monoterpénico aislado por primera vez de las partes aéreas de *Uncaria hirsuta* Haviland (Rubiaceae) en China. (Jian et al., 2014) y por segunda vez desde su descubrimiento es aislado en la especie *Macrocarpaea lenae* (Tabla 5).

El compuesto se encuentra en forma sólida y un aspecto de cristales blanquecinos, posee la fórmula molecular C₁₁H₁₅NO₃.

Los datos espectrales del análisis de RMN ^1H y ^{13}C se muestran a continuación (Anexo 2).

^1H - NMR: (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 4.16 (1H, m, H-1), 8.06 (1H, t, 4.8 Hz, H-2), 7.37 (1H, dd, $J=6.0, 1.9$ Hz, H-3), 2.72 (1H, m, H-5), 1.64 (1H, m, H-6 α), 1.46 (1H, qd, $J=12.6, 4.5$ Hz, H-6 β), 4.18 (1H, m, H-7), 5.26 (1H, td, $J=17.4, 8.7$ Hz, H-8), 2.46 (1H, m, H-9), 5.20 (1H, dd, $J=17.4, 3.0$ Hz, H-10a), 5.13 (1H, dd, $J=9.0, 3.6$ Hz, H-10b), 3.23 (3H, s, H-12)

^{13}C - NMR: (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 83.5 (C-1), 141.6 (C-3), 92.8 (C-4), 28.7 (C-5), 25.3 (C-6), 66.6 (C-7), 134.3 (C-8), 41.5 (C-9), 118.8 (C-10), 166.0 (C-11), 53.6 (C-12).

Tabla 5. Comparación de los datos obtenidos de ^{13}C RMN

Carbón	Hirsutanine A <i>Macrocarpaea lenae</i>	Hirsutanine A Jian et al, (2014).
C-1	83.5	83.5
C-3	141.6	141.6
C-4	92.8	92.8
C-5	28.7	28.7
C-6	25.3	25.3
C-7	66.6	66.6
C-8	134.3	134.3
C-9	41.5	41.5
C-10	118.8	118.8
C-11	166.0	166.0
C-12	53.5	53.6
Espectro obtenido a 100 MHz		

Fuente: La Autora

Los datos espectrales coinciden con la bibliografía (Jia et al., 2014) y las mismas corresponden a características específicas del compuesto de naturaleza alcaloidea (Fig. 22)

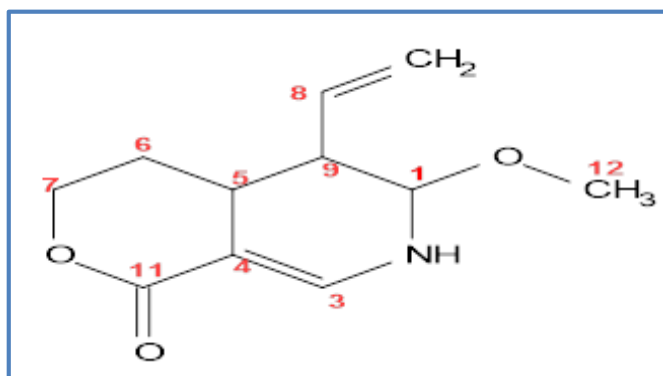


Figura 21. Estructura química del alcaloide Hirsutanine A

Fuente: La Autora

En la Figura 22 se indica el cromatograma correspondiente a la contribución de los iones de masa: 175, 147, 117, 90 que son característicos del compuesto gentianine; del cromatograma se puede deducir que el pico corresponde al alcaloide gentianine y su forma irregular podría deberse a la descomposición térmica de otro compuesto en el equipo. Aunque no se puede comprobar existe la posibilidad que la gentianine sea un producto de la descomposición térmica del alcaloide hirsutanine A, puesto que no se evidencian señales compatibles con la estructura de la gentianine en el espectro de RMN realizado al compuesto hirsutanine A, ni en las fracciones correspondientes a las otras manchas presentes en el Extracto de alcaloides.

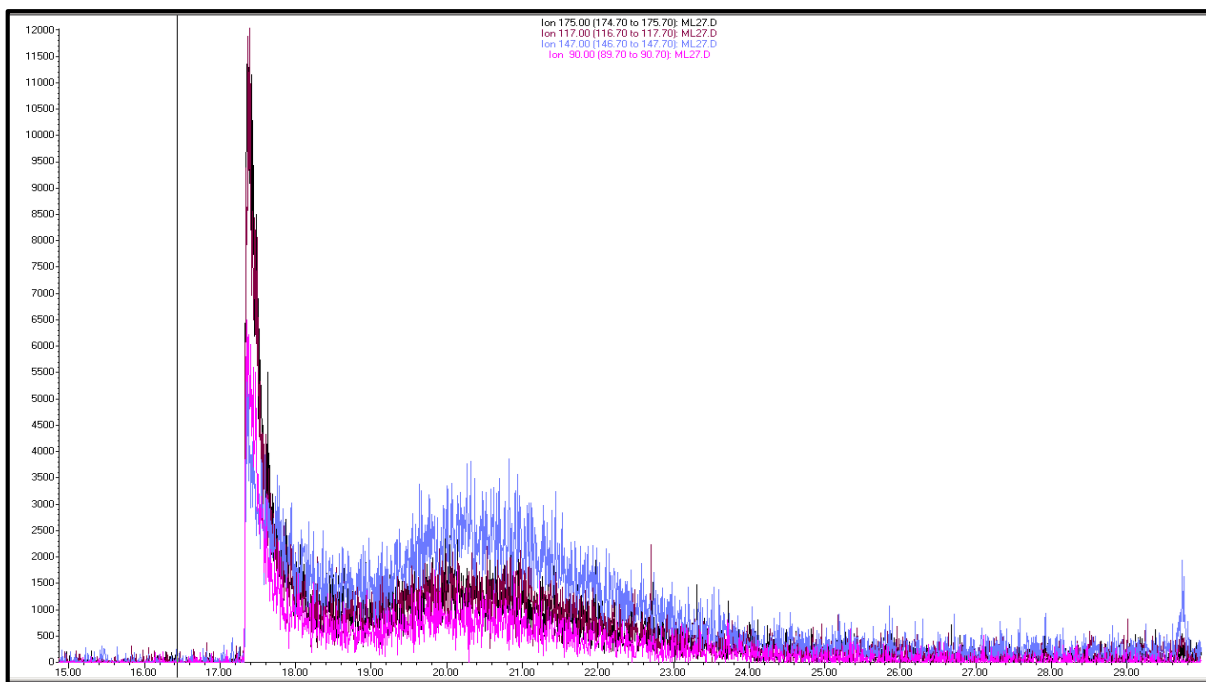


Figura 22. Espectro de masas del alcaloide Hirsutanine

Fuente: Investigación Experimental

4.3.2. Confirmación de la identificación del alcaloide Hirsutanine A por medio de: Difracción de Rayos X.

Los datos cristalográficos preliminares hechos por difracción de rayos X de monocristal se compararon con los datos cristalográficos de la base de datos y se encontró que estos eran similares con los descritos en la literatura en el estudio realizado por Jia en China en el año 2014.

Promover la investigación sobre extractos vegetales resulta un análisis muy interesante, teniendo en cuenta que aportan compuestos que poseen una amplia variedad de bioactividad, y dado que estos son de origen natural le confieren un valor especial. La investigación sobre extractos y compuestos puros abre un campo ilimitado de oportunidades para el desarrollo de nuevos fármacos de origen natural. Los resultados obtenidos en este estudio son promisorios dado que se podría encontrar una aplicación farmacéutica, como se ha descrito en bibliografía de estudios que respaldan la presencia de irioides, xantonas, glucoflavonoides y otros componentes, que le confieren propiedades antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, hipoglucemiante y actividad antitumoral (Li et al., 2010), además estudios fitoquímicos sobre la familia Gentianaceae se ha informado que poseen propiedades antiinflamatoria, analgésico, antiasmático, anticonvulsivo, antihistamínica, antimalárico, antiamebianas, citoprotector, diurético, hepatoprotector y propiedades hipoglucemiantes (Singh, 2008).

4.4. Actividad Biológica.

4.4.1. Actividad Antibacteriana.

La metodología empleada con la que se evaluó la actividad antibacteriana, permitió medir la susceptibilidad in vitro de los microorganismos frente a agentes antibacterianos dando como resultado la capacidad de inhibición de estos. Los resultados de CMI del alcaloide hirsutanine A se exponen en la tabla 6.

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria de la muestra ML-27/5 frente a bacterias Gram+ y Gram-

MUESTRA	GRAM POSITIVAS					GRAM NEGATIVAS	
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Hirsutanine A	>250µg/ml	>250µg/ml	>250µg/ml	>250µg/ml	>250µg/ml	>250µg/ml	>250µg/ml
Control positivo TETRACICLINA	7,81µg/ml	3,91µg/ml	15,63µg/ml	7,81µg/ml	3,91µg/ml	15,63µg/ml	1,95µg/ml
Control negativo (DMSO)							

Fuente: La Autora

Scorzoni et al. (2007) menciona que una sustancia para ser considerada con actividad antibacteriana elevada debe presentar un CMI menor a 75µg/ml, de moderada actividad en un rango de 75-150µg/ml y sin actividad mayor a 250µg/ml. Al comparar estos resultados con los descritos en bibliografía se puede decir que la muestra analizada no presentó actividad contra las cepas bacterianas usadas en este ensayo, dado que su valor de CMI fue mayor a 250µg/ml.

Estos resultados difieren con otros estudios realizados en la familia de esta especie vegetal que si han demostrado una actividad antimicrobiana, como el estudio “Aislamiento de los Compuestos con Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae)” (2002) que menciona que los extractos acuoso, hidroalcohólico y metanólico resultaron activos frente a *Bacillus subtilis*; los microorganismos *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Micrococcus luteus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans*; *Aspergillus niger*; *Mucor sp* resultaron resistentes. Se pudo determinar que los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana fueron los secoiridoides genciopicrosido y swerósido y la xantona demetilbellidifolina dicha actividad fue comprobada por medio del método de bioautografía (Nadinic et al., 2002) .En este estudio también mencionan que muchos glucósidos iridoides y secoiridoides son conocidos por no presentar actividad antimicrobiana como tales sino solamente en presencia de sus respectivas glicosidasas. Esto significa que los glicósidos podrían considerarse pro-drogas y que los correspondientes aglicones o sus intermediarios relacionados serían los responsables de la actividad biológica (Nadinic et al., 2002), esta podría ser una explicación de porqué en esta investigación la muestra estudiada no presentó actividad antimicrobiana.

CONCLUSIONES

Desde el punto de vista bibliográfico, este es el primer estudio químico en la especie *Macrocarpaea lenae*; además el género *Macrocarpaea* solamente cuenta con un estudio fitoquímico, sobre la extracción de las xantonas de la especie *Macrocarpaea glabra*.

Mediante Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas realizada a la Fracción total de alcaloides (ML-FT) se pudo decir que los espectros obtenidos posiblemente corresponden al alcaloide Gentianine, ya que existen antecedentes de la presencia de este compuesto en los géneros *Gentiana*, *Swertia* entre otros de la familia *Gentianaceae*

La separación cromatográfica de la Fracción total de alcaloides sin clorofilas (ML-FT/1-4) de la especie *Macrocarpaea lenae* permitió el aislamiento e identificación del alcaloide Hirsutanine A mediante los sistemas de Resonancia Magnética Nuclear y Difracción de Rayos X. Se trata de un alcaloide monoterpénico aislado por primera vez en la especie *M. lenae* y por segunda vez desde su descubrimiento en el año 2014.

La evaluación de la actividad antibacteriana del compuesto Hirsutanine A, no presenta actividad con respecto al ensayo efectuado.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio fitoquímico de la especie *Macrocarpaea lenae*, con la finalidad de obtener una validación química completa de la especie.
- Probar nuevas técnicas que permitan aislar e identificar otros compuestos de esta especie, que en la presente investigación no se pudieron elucidar, debido a que los compuestos se degradan con facilidad.
- Realizar ensayos biológicos como actividad antitumoral con los alcaloides identificados para determinar su acción farmacológica específica, ya que existen estudios como el realizado en el año 2010 en el género *Gentianella* Moench (Gentianaceae) que han mostrado actividad frente a este ensayo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, M. (2010, marzo). *Plantas Medicinales: del uso tradicional al criterio Científico*. Discurso leído en el acto de ingreso de la Académica de Farmacéuticos de Barcelona, Barcelona. Recuperado de: http://www.fitoterapia.net/biblioteca/pdf/MJ_Alonso_RAFC.pdf
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana A., Peñaherrera, E., Tobar, V. & de Witte, P. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*. 23(1), 89-97.
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Avello, M. & Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Med Chile*. 138: 1288-1293.
- Barajas, C. (2011). *Propuesta de mejora utilizando diseño de experimentos en el desarrollo de técnicas analíticas en un laboratorio farmacéutico*. Tesis de grado para obtener el título de Maestro en Ingeniería Industrial. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Ciencias Sociales y Administrativa, Sección de estudios de postgrado. México.
- Bodeker, G., & Kronenberg, F. (2002). A Public Health Agenda for Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. *AJPH*. 92: 1582-1591.
- Geo, B., Karen, C., Janet, B., Stephen, M., & Timothy, M. (2010). *Microbiología médica* (25a. edición). México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A.
- Castro, A., Choquecillo, F., Félix, L., Milla, H., Bell, C., Castro, N., Palomini, R., Armas, S., Ramos, N. & Calderón A. (2002). Investigación de metabolitos secundarios en plantas medicinales con efecto hipoglucemiante y determinación del cromo como factor de tolerancia a la glucosa. *Ciencia e Investigación*. 5 (1), 1-5.
- Cañigueral, S. (2002). Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista de Fitoterapia*. 2(2), 101-121.

- Cañigueral, S., Dellacassa, E. & Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Farmacéutica bonaerense*. 22(3), 265-277.
- Cuenca, M. (2015). “*Determinación de la actividad antioxidante de especies medicinales de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe*”. Tesis de grado previa a la obtención de Título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Loja - Ecuador.
- Duque, J. F. S., Lombo, O., Perea, E. M., & Arteaga, J. J. M. (2011). Valoración del potencial antioxidante de *Mollinedia racemosa* (romadizo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(2), 151–163.
- Stashenko, E. (2012). La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como herramienta de alta selectividad para caracterizar fósiles químicos en el petróleo. *Scientia Chromatographica*, 4(2), 44–57. <http://doi.org/10.4322/sc.2012.010>
- Estrada, E. I., Sánchez, M. P., Mateos, R. G., Chávez, R. S. M., Valverde, G. R., & Marcos Soto Hernández, R. (2012). Antioxidant activity of *Erythrina americana miller* alkaloids. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(4), 241–246. Recuperado de: <https://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84865417481&partnerID=40&md5=8481a1ec0eddb4d8d5c124852ecfa86>
- Fuster, S. B. (n.d.). Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. “in vitro” de *Narcissus confusus* Unidad de Fisiología Vegetal Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología Universidad de Barcelona.
- Grant, J.R. & Struwe, L. (2003). De *Macrocarpaea* Grisebach (Ex *Gentianaceis*) *Speciebus* NOVIS III: Six New Species of Moon-Gentians (*Macrocarpaea*, *Gentianaceae*: *Helieae*) From Parque Nacional Podocarpus, Ecuador. *Harvard Papers in Botany*, 8(1), pp. 61-81
- Gutiérrez, M., Droguet, M., & Odeur, U. N. E. M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas : Resume : 35–41.
- Han, H., Zeng, W., He, C., Bligh, S. W. A., & Liu, Q. (2014). Characterization of metabolites of sweroside in rat urine using ultra-high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and NMR spectroscopy, (March), 1108–1116. Recuperado de: <http://doi.org/10.1002/jms.3429>

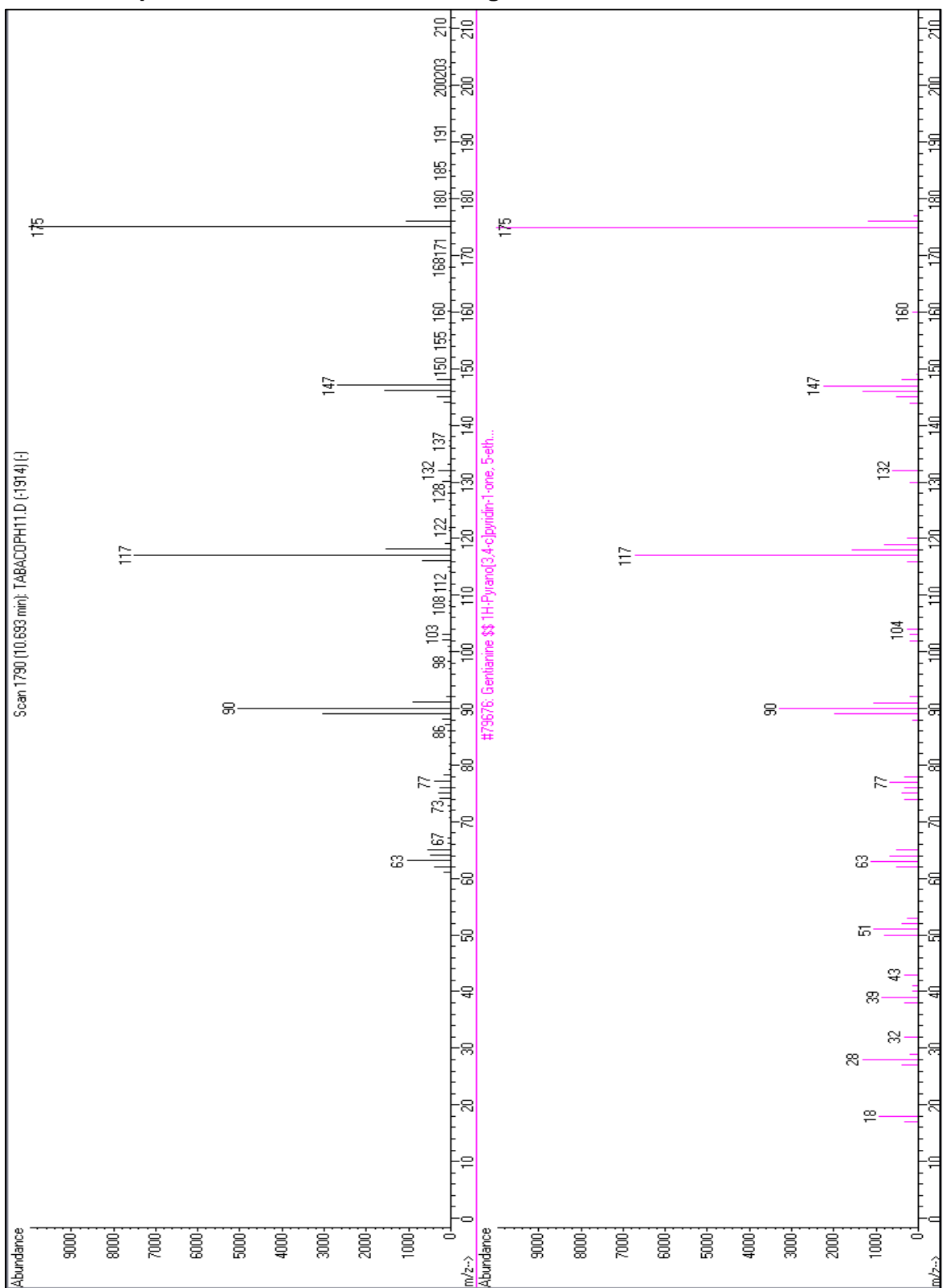
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (3 edición ed.). Editorial Reverté.
- Jaime, G., & Acosta, A. (2002). Universidad de Antioquia alcaloides y compuestos nitrogenados.
- Jia, J., Zhang, Y., Huang, X., & Zhang, S. (n.d.). New monoterpenoid alkaloids from the aerial parts of *Uncaria hirsuta* New monoterpenoid alkaloids from the aerial parts of *Uncaria hirsuta*.
- Jiménez, G., Porta, H. & Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(003), 355-363.
- Kwak, W.-J., Kim, J.-H., Ryu, K.-H., Cho, Y.-B., Jeon, S.-D., & Moon, C.-K. (2005). Effects of gentianine on the production of pro-inflammatory cytokines in male Sprague-Dawley rats treated with lipopolysaccharide (LPS). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(4), 750–753. Recuperado de: <http://doi.org/10.1248/bpb.28.750>
- Khokhar, S. & Magnusdottir, S. 2002. Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 565-570.
- López, N., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición Clínica Y Dietética Hospitalaria*, 32(3), 81–91.
- Mesa, A., Rincón, D., Toro, J., Tamayo, A., Blair, S., & Rojano, B. (2011). Actividad antioxidante de *Piper Piedecuestanum* Tre. & Yunck. Y *Piper Subpedale* Trel. & Yunck. *Revista latinoamericana de química*, 39,91-99
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2010). *Cuarto Informe Nacional para el convenio sobre la Diversidad Biológica*. Quito.
- Mitchell, T., & Costisella, B. (2007). *NMR—From Spectra to Structures: an experimental approach*. Springer. <http://doi.org/10.5860/CHOICE.41-6544>
- Nigenda, G., Mora, G., Aldama, S. & Orozco, E. (2001). La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. *SciELO*.43 (1).
- Nadinic, E. L., Penna, C., Saavedra, C. L., Coussio, J. D., Gutkind, G., & Debenedetti, S. L. (2002). Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de extractos de

- Gentianella achalensis (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21(2), 123–130.
- Oleaga, L. & Lafuente, J. (2006) *Aprendiendo los fundamentos de la resonancia magnética*. Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana.
- Pacheco, R. (2012). *Los Alcaloides*. Monografía previo a la obtención de título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Católica de Cuenca. Unidad académica de Ingeniería Química, Biofarmacia, Industrias y Producción. Cuenca- Ecuador.
- Padilla, F., Rincón, A., & Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(1), 303–308.
- Pedreño, Y. (2012). Los antioxidantes polifenólicos, un complemento alimenticio saludable. *Revista Eubacteria*. 28: 1-4.
- Portal, J., Proaño, P. & Villacis, S. (2013). Experiencia comunitaria con el uso de la planta medicinal conocida como “matico”, en el cantón Ambato, en el período marzo-julio del 2012. *Revista Investigación y Desarrollo*. 5(1), 7-12.
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica* (Primera ed). Madrid: EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA.
- Puy, L., & Arévalo, M. M. (2008). Resonancia Magnética Nuclear (Nmr), 10–19
- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). *Productos naturales vegetales*. Recuperado de: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/27885>
- Rivas, K. (2009). *Compendio de Bótanica* (Primera Ed). Cuenca-Ecuador: Imprenta Rocafuerte.
- Schwartz, A., Podhnyi, B., & Works, C. (1997). Chemistry of Secologanin. Part3. Graph Analysis of the Acidic Deglycosylation of Secologanin Derivatives, 53(30), 10489–10502.
- Silva, C. (2010). “*Cuantificación de los alcaloides de Berberis hallii “Cascarilla” sector La Josefina San Isidro del cantón Guano provincia de Chimborazo*”. Tesis de grado previa a la obtención de Título de Bioquímico Farmaceutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba- Ecuador

- Singh, A. (2005). Phytochemicals of Gentianaceae : A Review of Pharmacological Properties. *Journal of Liquid Chromatography*, 33–36.
- Ulloa, C., & Neil, D. (2005). *CINCO AÑOS DE ADICIONES A LA FLORA DEL ECUADOR 1999-2004*. (E. UTPL, Ed.). Quito-Ecuador.
- Unam. (2007). Técnicas Cromatográficas. *Química Analítica Instrumental II*, 1–123.
- Vivanco, J., Cosio, E., Loyola, V. & Flores, H. Mecanismos Químicos de Defensa en las Plantas. INVYCIE. Prensa Científica, S.A. Versión on-line. España: 2005; p. 1-8.
- Vidari, G. & Vitafinzi, P. (2010). “Las Gentianaceae: botánica, fitoquímica y actividad biológica”. *La granja*. Criste y Departamento de química orgánica. Universidad de Pavia. Pavia. Italia.

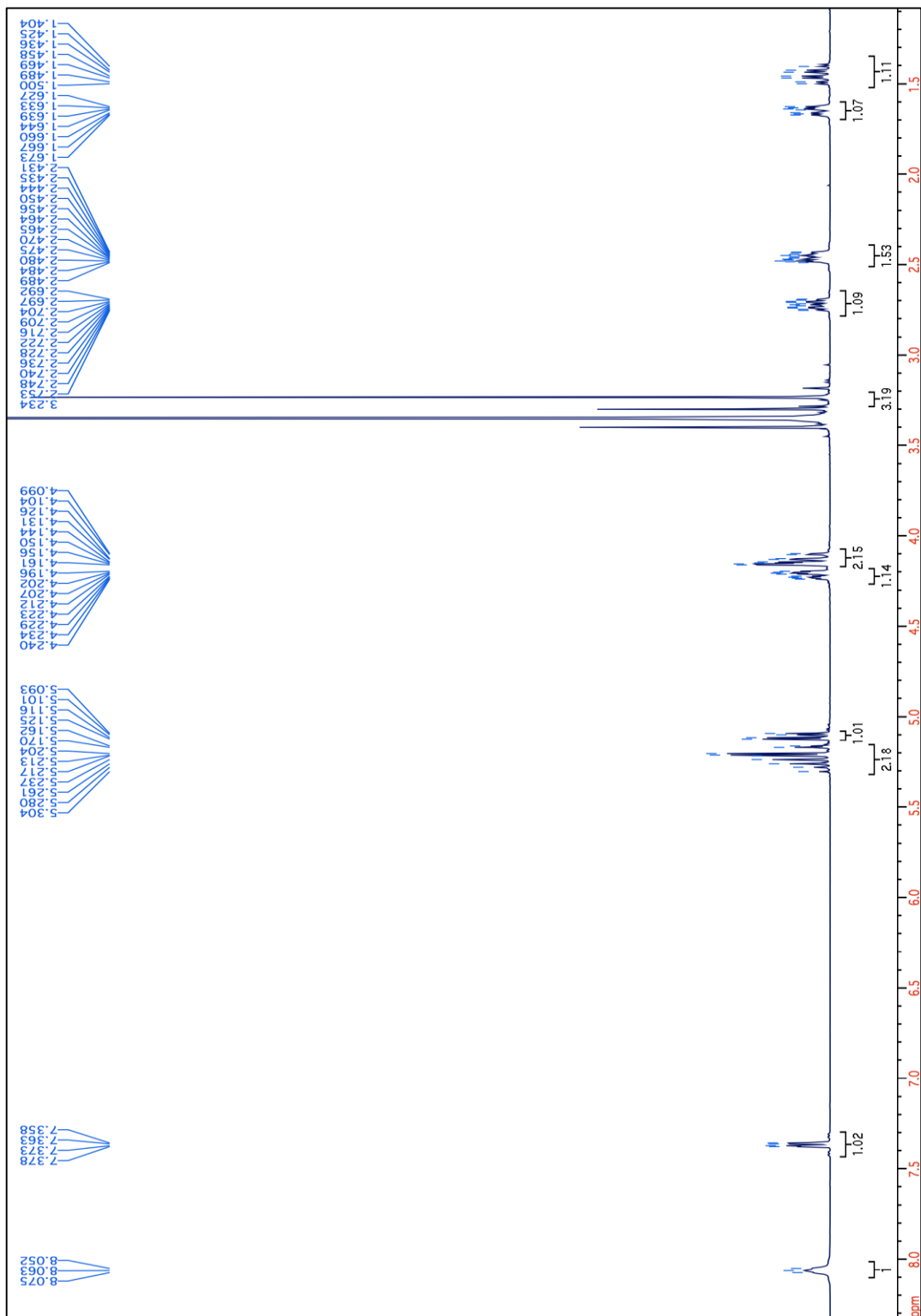
ANEXOS

Anexo 1. Espectro de CG-MS del alcaloide gentianine



Anexo 2. Espectros de Resonancia Magnetica Nuclear (DMSO)

Anexo 2a Espectro de ^1H RMN: Alcaloide Hirsutanine A



Anexo 2b Espectro de ^{13}C RMN: Alcaloide Hirsutanine A

