

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN
SKYTANTHUS ACUTUS

Trabajo de Titulación para optar
al Título de Técnico Universitario
en QUÍMICA MENCIÓN QUÍMICA
ANALÍTICA

Alumna:
Valeria Isabel Guzmán Núñez

Profesor Guía:
Dr. Lautaro Taborga Morales

Profesional Correferente:
Ing. Gonzalo Sepúlveda Ramírez

2018

Para ti, querida Julita.

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar quiero agradecer a todos los docentes que fueron parte de mi formación académica durante este largo proceso, por su compromiso y paciencia frente al alumnado.

Agradezco también el apoyo de la universidad en especial al Proyecto interno de línea USM 116.13.12 de la Universidad Técnica Federico Santa María por gestionar aportes y beneficios para la realización de investigaciones tanto fuera como dentro del país.

Mi más sincero agradecimiento a mi profesor guía Dr. Lautaro Taborga Morales por la grata acogida en su grupo de investigación, por el apoyo durante mi instancia como tesista y practicante en Casa Central, además, por el afecto y lazos creados durante este proceso.

Quiero agradecer a todos los que estuvieron involucrados en la realización de este proyecto de investigación. Primeramente, debo destacar al profesor Jorge González quien generó el contacto que permitió desarrollar esta tesis en Casa Central. Agradezco la acogida que tuve por parte del Dr. Luis Espinoza Catalán para trabajar en el departamento de química, específicamente en el área de productos naturales. Como mencioné anteriormente, agradezco a Dr. Lautaro Taborga por la hospitalidad para poder desarrollar esta investigación en su laboratorio. Es necesario destacar el apoyo de César González, quien compartió sus conocimientos durante todo el proceso práctico y me orientó en todo momento mientras realizaba esta investigación. También es necesario nombrar a Karen Catalán por la ayuda prestada al proyecto tras realizar las lecturas de las muestras con el equipo de Resonancia Magnética Nuclear. Por último, es necesario recordar a Nicol López y Ernesto Valdés por el trabajo previo al que yo realicé, tanto en la recolección de la muestra como en la maceración de los extractos.

No puedo dejar de agradecerle a mis padres por todo el esfuerzo que han realizado para que pudiera cumplir cada una de mis metas y sueños. Pese a la adversidad lograron darme todas las herramientas para poder desarrollarme y poder, con eso, llegar hasta donde me encuentro ahora y eso, lo voy a recordar siempre. Y por qué no agradecerles por el cariño y la paciencia durante todos estos años, que no fueron pocos.

Finalmente quiero agradecer el apoyo de mis amigos. A todos aquellos que me acompañaron durante mi formación y, también, a quienes han llegado a mi vida a darme un empujón para seguir adelante durante este camino. No puedo dejar de destacar a Laura Gamboa y nuevamente a Ernesto Valdés, quienes con su aprecio y ayuda desinteresada permitieron, en un determinado momento, la continuidad de mis estudios.

RESUMEN

KEYWORDS: *SKYTANTHUS ACUTUS*, FITOQUIMICA, METABOLITOS SECUNDARIOS.

El trabajo que se presenta a continuación es una investigación fitoquímica de metabolitos secundarios en la planta *Skytanthus acutus*, especie endémica de Chile la cual es recolectada en Vallenar en el km 146 de la región de Coquimbo.

Para el análisis se utiliza la parte aérea de la planta, la que pasa por procesos de molienda, extracción con solvente de alta polaridad como el etanol y técnicas de separación cromatográfica por medio de cromatografía en columna.

Una vez efectuado el aislamiento de metabolitos y purificación de los mismos, se realizan estudios espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT-135, ^1H selectivos, unidimensionales y bidimensionales para determinar la estructura molecular del compuesto químico aislado.

Los metabolitos secundarios obtenidos para esta especie son:

- Ácido oleanólico
- Compuesto A
- Compuesto B
- Compuesto C

ÍNDICE

RESUMEN

SIGLAS Y SIMBOLOGÍA

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Familia Apocynaceae

1.2. ANTECEDENTES TAXONÓMICOS

1.2.1 *Skytanthus acutus*

1.2.1.1 Monografía de *S. acutus*

1.3. ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS

1.3.1 Metabolitos primarios

1.3.2 Metabolitos secundarios

1.3.3 Metabolitos secundarios de interés

1.3.3.1 Terpenos

1.3.3.2 Compuestos fenólicos

1.3.3.3 Glicósidos

1.3.3.4 Alcaloides

1.3.4 Fitoquímica de *Skytanthus acutus*.

1.4. TÉCNICAS FÍSICAS EMPLEADAS EN ANÁLISIS FITOQUÍMICO

1.4.1. Recolección

1.4.2. Extracción

1.4.3. Técnicas cromatográficas de separación

1.4.3.1 Cromatografía en columna

1.4.3.2 Cromatografía en capa fina

1.5. DERIVATIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

1.5.1 Reacción de metilación o alquilación

1.5.2 Reacción de acetilación

1.6. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN

1.6.1 Cristalización

1.7. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

1.7.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

1.7.1.2 ¹³C-RMN

1.7.1.3 RMN ¹³C por DEPT

1.7.1.4 RMN bidimensional

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2.1 EQUIPOS Y MATERIALES

2.1.1 Equipos

2.1.2 Materiales

2.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES

2.2.1 Reactivos

2.2. Soluciones

2.3 SEPARACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

2.3.1 Recolección y tratamiento previo

2.3.2 Extracción

2.3.3 Separación de metabolitos secundarios

2.3.3.1 Cromatografía en columna (CC)

2.3.3.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

2.4 EXTRACCION, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN *S. ACUTUS*

2.5 ESPECTROSCOPIA DE COMPUESTOS AISLADOS

2.5.1 Vial 87 (C2)

2.5.2 Vial 28 (C4)

2.5.3 Fracción 40-42 (C5)

2.5.4 Vial 110 (C8) sobrenadante2

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 VIAL 87 (C2)

3.2 VIAL 28 (C4)

3.3 FRACCIÓN 40-42 (C5)

3.4 VIAL 110 (C8) SOBRENADANTE2

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ANEXO A: GLOSARIO

ANEXO B: ^1H , ^{13}C y DEPT135 para VIAL 87 (C2)

ANEXO C: 2D-HSQC Y 2D-HMBC para VIAL 87 (C2)

ANEXO D: ^1H , ^{13}C y DEPT135 para VIAL 28 (C4)

ANEXO E: 2D-HSQC Y 2D-HMBC para VIAL 28 (C4)

ANEXO F: ^1H , ^{13}C y DEPT135 para FRACCIÓN 40-42 (C5)

ANEXO G: 2D-HSQC Y 2D-HMBC para FRACCIÓN 40-42 (C5)

ANEXO H: Espectros selectivos NOESY para FRACCIÓN 40-42

ANEXO I: ^1H , ^{13}C y DEPT135 para VIAL 110 (C8) SOBRENADANTE2

ANEXO J: 2D-HSQC Y 2D-HMBC para VIAL 110 (C8) SOBRENADANTE2

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1-1. Clasificación de terpenos.
- Tabla 1-2. Estructura de núcleos de alcaloides básicos.
- Tabla 1-3. Naturaleza de la fase móvil.
- Tabla 1-4. Naturaleza de la fase estacionaria.
- Tabla 2-1. Fracciones obtenidas de la columna 1.
- Tabla 2-2. ¹H-RMN para vial 87 (C2).
- Tabla 2-3. ¹³C-RMN y DEPT 135 para vial 87 (C2).
- Tabla 2-4. ¹H-RMN para vial 28 (C4).
- Tabla 2-5. ¹³C-RMN y DEPT 135 para vial 28 (C4).
- Tabla 2-6. ¹H-RMN para fracción 40-42 (C5).
- Tabla 2-7. ¹³C-RMN y DEPT 135 para fracción 40-42 (C5).
- Tabla 2-8. ¹H-RMN para vial 110 (C8) sobrenadante2.
- Tabla 2-9. ¹³C-RMN y DEPT 135 para vial 110 (C8) sobrenadante2.
- Tabla 3-1. Actividad biológica del ácido oleanólico.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-1. *Skytanthus acutus* florecido.
- Figura 1-2. Fruto maduro o cacho de cabra.
- Figura 1-3. Beneficios en la planta que son generados por la producción de metabolitos secundarios.
- Figura 1-4. Mecanismo de acción de metabolitos secundarios en las plantas, editado.
- Figura 1-5. Estructura del isopreno.
- Figura 1-6. Ruta metabólica de terpenos.
- Figura 1-7. Estructura química de monoterpenos: α-pireno (A), β-pireno (B) y piretrina (C).
- Figura 1-8. Estructura de la clorofila α y β.
- Figura 1-9. Estructura molecular de escualeno (A), estigmastisol (B) y sitosterol (C).
- Figura 1-10. Estructura molecular de ecdisoma.
- Figura 1-11. Estructura molecular del fenol.
- Figura 1-12. Ruta sintética del ácido shikímico.
- Figura 1-13. Ruta sintética del ácido mevalónico.
- Figura 1-14. Estructura molecular de saponinas.
- Figura 1-15. Estructura de alcaloides ternarios.
- Figura 1-16. Ejemplos de alcaloides oxigenados.
- Figura 1-17. Estructura de algunos alcaloides verdaderos.

Figura 1-18. Ejemplos de estructuras protoalcaloides.

Figura 1-19. Pseudoalcaloide aconitina.

Figura 1-20. Estructura molecular de skytanthine.

Figura 1-21. Procedimiento de cromatografía en columna (CC).

Figura 1-22. Procedimiento de cromatografía en capa fina (CCF).

Figura 1-23. Reacción de metilación de un ácido carboxílico.

Figura 1-24. Primera etapa de la reacción de metilación.

Figura 1-25. Segunda etapa de la reacción de metilación.

Figura 1-26. Reacción de acetilación utilizando anhídrido acético y DMPA como catalizador.

Figura 1-27. Alineación del campo magnético.

Figura 1-28. Diagrama del proceso realizado por el equipo de RMN.

Figura 1-29. Esquema general de la frecuencia de pulsos en un espectro 2D.

Figura 1-30. Esquema general de la frecuencia de pulsos en el espectro HSQC.

Figura 2-1. Maceración de *S. acutus*.

Figura 2-2. Separación por cromatografía en columna.

Figura 2-3. Cromatopla de los 3 extractos revelados con H₂SO₄ al 10% y con Dragendorff.

Figura 2-4. Esquema de la extracción realizada con acetato de etilo del extracto etanólico.

Figura 2-5. Cromatopla de la fase orgánica obtenida en la extracción líquido-líquido revelada con H₂SO₄ y Dragendorff respectivamente.

Figura 2-6. Cromatopla de viales obtenidos de la columna 2.

Figura 2-7. Cromatopla de viales obtenidos de la columna 4.

Figura 2-8. Cromatopla de viales pertenecientes a la cristalización.

Figura 2-9. Separación de la fase orgánica y acuosa del extracto básico.

Figura 3-1. Estructura molecular del ácido oleanólico.

Figura 3-2. Asignación de carbonos en la molécula.

Figura 3-3. Estructura molecular de (2R,3R,4S,5S)-5-((R)-1-acetoxy-2-((8-methoxy-1-oxo-1H-isochromen-4-yl)oxy)ethyl)tetrahydrofuran-2,3,4-triyl triacetate.

Figura 3-4. Asignación de carbonos en la molécula.

Figura 3-5. Interacción entre protón-carbono de acuerdo a espectro 2D-HMBC.

Figura 3-6. Estructura molecular de (2R,3S,4S,5R)-5-((R)-1-acetoxy-2-((3-acetoxy-6,7-dimethoxy-9-oxo-9H-xanthen-2-yl)oxy)ethyl)tetrahydrofuran-2,3,4-triyl triacetate.

Figura 3-7. Asignación de carbonos en la molécula.

Figura 3-8. Interacción protón-carbono de acuerdo a 2D-HMBC y NOESY.

Figura 3-9. Estructura molecular de 2-((4-hidroxy-5,8-dimethoxynaphthalen-2-yl)oxy)-6-(hidroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol.

Figura 3-10. Asignación de carbonos en la molécula.

Figura 3-11. Interacción protón-carbono de acuerdo a 2D-HMBC.

ÍNDICE DE FÓRMULAS

Fórmula 1-1. Valor R_f del compuesto con relación al frente del solvente.

Fórmula 1-2. Valor de R_x de la muestra con relación al patrón utilizado.

Fórmula 1-3. Determinación del Campo (B) efectivo.

SIGLAS Y SIMBOLOGÍA

SIGLAS

B	Campo magnético
B ₀	Campo magnético externo
BPC	Cromatografía de fase ligada
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMAPP	Dimetilalildifosfato
GC	Cromatografía de gases
GLC	Cromatografía líquido-gas
GGPP	Geranilgeranildifosfato
GPP	Geranildifosfato
HPLC	Cromatografía de alta performance
IEC	Cromatografía de intercambio iónico
IPP	Isopentildifosfato
IR	Espectroscopia Infrarrojo
LLC	Cromatografía líquido-líquido
LSC	Cromatografía sólido-líquido
MEP	Metileritritol fosfato
PH	Potencial hidrógeno
R _f	Factor de retención o Índice de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
UV	Radiación Ultravioleta

SIMBOLOGÍAS

°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
g	Gramos
kg	Kilogramo
mg	Milígramo
mm	Milímetros
m	Metros
m ²	Metros cuadrados
mL	Mililitro

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos, las plantas han sido capaces de adaptarse, sobrevivir a condiciones adversas, como por ejemplo protegerse de plagas incluso antes de que se utilizaran compuestos químicos elaborados por el hombre para su perfecto crecimiento [1].

Las especies vegetales son capaces de adaptarse al ambiente que las rodea al generar compuestos químicos que le sirven de escudo protector. Estos compuestos reciben el nombre de metabolitos secundarios [1].

Los metabolitos secundarios otorgan características específicas a las plantas. Por ejemplo, las características organolépticas y visuales como el color y aroma de la flor. Por otra parte, son los encargados de otorgarle a la planta resistencia a condiciones extremas como la falta de luz o agua. Es por esto que la importancia de estos compuestos es de gran envergadura. La presencia de ciertos metabolitos secundarios permite conocer la síntesis natural que ocurre dentro de las plantas y esta información puede ser utilizada por el hombre para la fabricación de sustancias de origen vegetal como pesticidas o medicamentos [1].

La presente investigación tiene por objetivo extraer metabolitos secundarios de *Skytanthus acutus* utilizando técnicas de separación cromatográfica como cromatografía en columna y cromatografía en capa fina, posteriormente realizar la caracterización con técnicas de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.

El estudio previo de esta especie en especial data desde hace más de cinco décadas, por lo tanto, se pretende corroborar la información de metabolitos encontrados en el estudio de 1962, además de la identificación de nuevos compuestos gracias al avance tecnológico que es utilizado en la actualidad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar un estudio químico de la especie *Skytanthus acutus* con el fin de ampliar el conocimiento de la especie a través de la identificación de metabolitos secundarios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener extractos de la especie en estudio mediante solventes de distintas polaridades.
- Aislar, separar y caracterizar metabolitos secundarios de la especie *Skytanthus acutus*.
- Identificar estructuralmente los metabolitos secundarios aislados mediante técnicas analíticas espectroscópicas.

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Familia Apocynaceae

La familia *Apocynaceae* pertenece al orden de gentianales (Endress & Bruyns, 2000). Corresponde a un conjunto de plantas angiospermas y su distribución es mayoritaria en sectores tropicales y subtropicales, sin embargo, existen especies que germinan en zonas templadas [2].

De acuerdo con Endress & Bruyns (2000) esta familia consta de 424 géneros y alrededor de 4600 especies que se encuentran divididas en 5 subfamilias; *Rauvolfioideae*, *Apocynoideae*, *Periplocoideae*, *Secamonoideae* y *Asclepiadoideae*. Esta última ha demostrado en repetidas ocasiones poseer una morfología derivada de las *Apocynaceae* por lo tanto se ha recomendado la inclusión de *Asclepiadaceae* a la familia, sin embargo, no se ha logrado establecer una clasificación integral y unificada.

En América, se estima que el país con mayor diversidad específica de *Apocynaceae* es Brasil, con aproximadamente 75 géneros y 759 especies nativas y cultivadas, mientras que la diversidad más baja se encuentra en Chile, donde apenas 19 especies nativas son conocidas [3].

Pese a ser una familia numerosa, en Chile se encuentra representada por solo dos especies nativos:

- a. *Skytanthus Acutus*: Arbusto derecho con corolas amarillas.
- b. *Elytropus*: Arbusto voluble con corolas blancas-purpureas.

De acuerdo a datos bibliográficos, estas plantas se caracterizan por ser arbustivas o arbóreas, con menos frecuencia herbáceas, a menudo trepadoras, generalmente provistas de látex blanco. Sus hojas pueden encontrarse con o sin estípulas que están, a veces, unidas para formar una estructura anular a nivel del nodo, simples y enteras; comúnmente opuestas, en otras ocasiones alternas o verticiladas. Las inflorescencias son cimosas o racemosas, a menudo modificadas o compuestas, a veces reducidas a una o a unas pocas flores; éstas hermafroditas y más o menos perfectamente actinomorfas, típicamente pentámeras, rara vez tetrámeras; divisiones del cáliz llevando con frecuencia escamitas en su superficie interna. La corola es simpétala, por lo general infundibuliforme o hipocraterimorfa, con frecuencia vistosa, típicamente de prefloración contorta y con los lóbulos más o menos notablemente dispuestos a manera de rehilete. Contiene, además, estambres del mismo número que los lóbulos de la corola y alternando con ellos, epipétalos, anteras tetraloculares, libres o conniventes alrededor del estilo, de dehiscencia longitudinal, el conectivo a menudo agrandado. De ovario súpero o a veces semi-ínfero, por lo general formado por 2 carpelos libres, o bien, éstos más o menos unidos, óvulos 2 a numerosos en cada carpelo, de placentación axilar o parietal, estilo casi

siempre uno solo, estigma de forma variable; el ovario a menudo rodeado por 5 (a veces 2) nectarios individuales o a veces confluentes en una sola pieza; fruto con frecuencia en forma de folículos, otras veces capsular, drupáceo o abayado; semillas a menudo provistas de un penacho de pelos, a veces aladas o rodeadas por arilo carnoso, endosperma presente [4].

Todas las especies de esta familia, silvestres y cultivadas, suelen ser muy peligrosas por los alcaloides, látex y sustancias tóxicas que contienen. La existencia de estos compuestos venenosos para animales de sangre caliente, tan característicos de las Apocináceas, se interpreta como el desarrollo de una estrategia para la defensa contra la herbivoría [5].

1.2. ANTECEDENTES TAXONOMICOS

1.2.1 Skytanthus Acutus

Se caracteriza por ser un arbusto de baja altura de no más de un metro de alto, con flores amarillas las que crecen en las puntas de sus ramas, ver figura1-1 [6].

Es comúnmente llamado "Cacho de cabra". Esto se debe a que da un fruto que en un comienzo es blando y con el paso del tiempo, una vez maduro, se endurece tomando la forma de un cacho de cabra. Estos cachos se desprenden de la planta una vez secos y son arrastrados por el viento dispersando las semillas, ver figura 1-2. Las semillas son aladas lo que permite que el viento las distribuya para que germinen posteriormente con la lluvia.

Debido a su eficiente propagación natural y baja presión del hombre sobre sus poblaciones, esta especie se encuentra fuera de peligro [7].

1.2.1.1 Monografía de S. acutus

Orden: Gentianales

Familia: Apocynaceae

Origen: Endémico de Chile

Estado de Conservación: Fuera de Peligro

Distribución en Chile: Desde la Región de Atacama a la Región de Coquimbo. Crece en el litoral bajo, en terrenos arenosos (Acevedo & Olivares, 2012).

Tamaño: Arbusto de 0,5-1 m de alto, de forma globosa o expandida.

Hojas: Carnosas color verde claro, alternas, linear-oblongas, uninervias, ápice mucronado, glabras, de márgenes algo enroscados, de 3-6 cm de largo por 5-9 mm de ancho, atenuadas en un corto pecíolo.

Flores: Agrupadas al final de las ramas, más cortas que las hojas acompañantes, formadas por un cáliz de 5 divisiones lanceoladas, agudas, pilosas, de 5 mm de largo;

Corola: Campanulada amarilla, con tubo de 6-8 mm de largo y limbo de 15-17 mm de largo, con 5 divisiones;

Estambres: 5 estambres sobresalientes de la garganta de la corola;

Ovario: ovario súpero de 2 lóculos, estilo terminado en estigma claviforme, cortamente bífido en el ápice.

Fruto: consiste en 2 folículos cilíndricos de color café, hasta 20 cm de largo, coriáceos, leñosos, que se enroscan; contiene semillas comprimidas, angostamente aladas [8].



Fuente: http://www.sci.sdsu.edu/plants/chile/plants/Apocynac/Skytanthus_acutus.html

Figura 1-1. *Skytanthus acutus* florecido.



Fuente: http://www.sci.sdsu.edu/plants/chile/plants/Apocynac/Skytanthus_acutus.html

Figura 1-2. Fruto maduro o "Cacho de cabra".

De acuerdo a Chile Flora, las condiciones de crecimiento de *S. acutus* están determinadas por ciertos factores tales como:

a. Elevación:

- Elevación baja, valles del interior.
- Cordillera de la costa, 500 - 2000 m.
- Costa, 0 - 500 m

b. Agua:

- Áreas de secano, donde el período seco sin precipitaciones dura 6 - 10 meses. Las precipitaciones alcanzan 100 - 300 mm anuales, concentrándose en invierno.
- Humedad costera/camanchaca: las plantas reciben agua principalmente desde el aire por condensación.

c. Luz:

- Expuesto. Pleno sol sin ninguna protección. Partes planas o laderas de exposición norte.
- Planta expuesta, pero con protección contra la luz directa por la niebla costera (camanchaca).

1.3. ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS

Un tejido vegetal, como toda materia viva, se encuentra en un estado dinámico-estacionario desde el punto de vista químico. Existe una constante síntesis y degradación de biomoléculas o metabolitos que determina la dinámica de un sistema biológico y a su vez mantiene un equilibrio de la síntesis o aparición con la degradación de sustancias, tanto así que, las concentraciones de estas se mantienen prácticamente constantes [1].

El término fitoquímica es el conjunto de operaciones que estudia cada grupo químico presente en una planta, desde su estructura química molecular hasta las propiedades biológicas de los vegetales [9].

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo y es el conjunto de reacciones que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples [10] Existen más de 2.000 fitoquímicos en las plantas que se agrupan en clases de acuerdo a su función y sus características estructurales y pueden ser estudiados mediante técnicas de extracción e identificación tales como RMN, UV, IR, etc. [9]

Los compuestos químicos celulares (metabolitos) pueden ser clasificados en primarios y secundarios [1].

1.3.1 Metabolitos primarios

Los metabolitos primarios son aquellos compuestos que son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener la vitalidad y permitir el crecimiento, desarrollo y la reproducción. Comprenden los glúcidos o hidratos de carbono, los lípidos, las

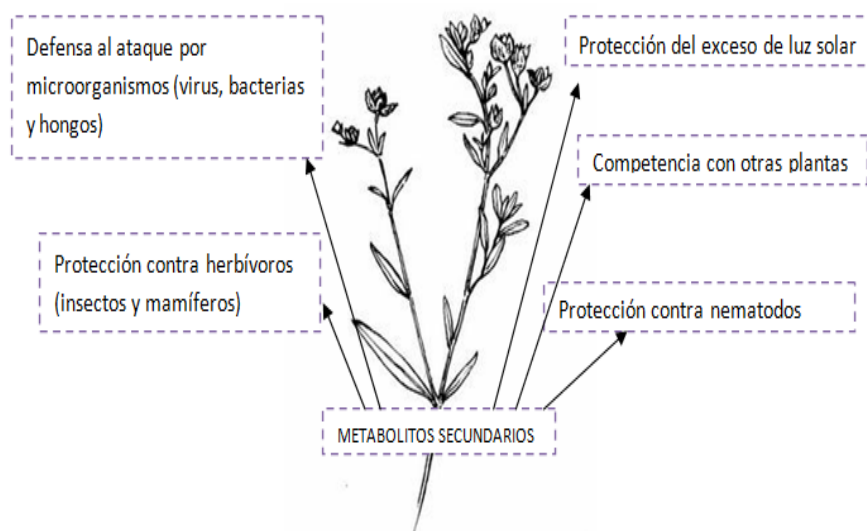
proteínas y los ácidos nucleicos. Los glúcidos representan compuestos útiles como reserva energética (glucosa, sacarosa y almidón en plantas, glucógeno en animales), como material estructural y cementante (celulosa, pectinas, hemicelulosa en vegetales). Muchos de ellos son altamente solubles en agua y otros totalmente insolubles en agua y demás solventes, como es el caso de la celulosa. Los lípidos son típicos compuestos de reserva energética y de carbono, componentes estructurales fundamentales de las membranas biológicas, solubles en solventes no polares.

Las proteínas son quizás los compuestos más versátiles, esenciales por sus actividades catalíticas, estructurales, hormonales y una gran diversidad de otras funciones. Los ácidos nucleicos, en cambio, cumplen la primordial función de ser las moléculas depositarias de la información genética y permitirles a los seres vivos transmitir sus características a la descendencia [1].

1.3.2 Metabolitos secundarios

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos denominados metabolitos secundarios [10].

Los compuestos secundarios cumplen funciones que no resultan estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo. Muchos de ellos son aprovechados por la planta que los sintetiza para interactuar con el medio, ya sea para atraer insectos y otros polinizadores, repeler predadores o seres dañinos, impedir la competencia con otras plantas, adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima, etc. Es decir que cumplen preferentemente funciones ecológicas (véase figura 1-3) [1].



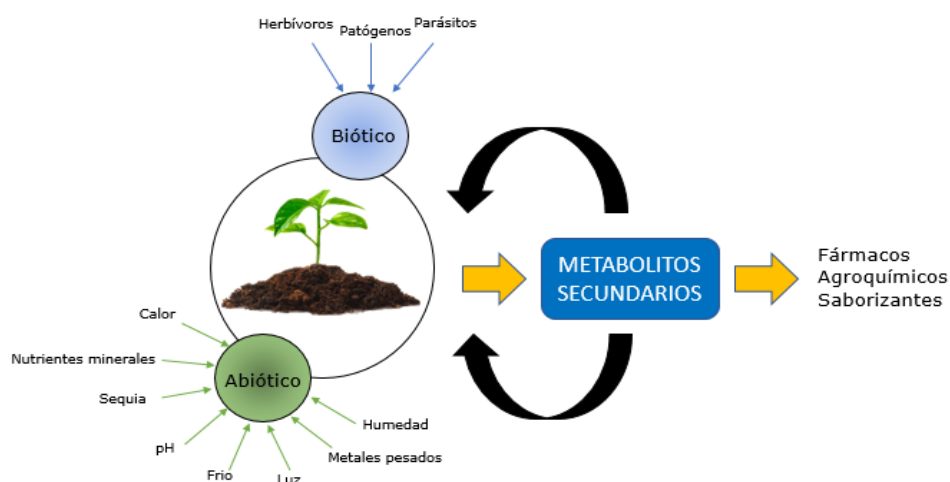
Fuente: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>

Figura 1-3: Beneficios en la planta que son generados por la producción de metabolitos secundarios.

Un sinnúmero de estos compuestos químicos han sido y son utilizados por el hombre para aplicarlos en la industria farmacéutica, terapéutica de cultivos, perfumística, alimenticia (como suplementos, aditivos o colorantes), en el curtido de cueros, etc. Éstos son los comúnmente llamados productos naturales vegetales y representan moléculas con variadas estructuras, diferentes propiedades de solubilidad y distintos orígenes biosintéticos.

En muchos casos los metabolitos secundarios pueden ser materia prima para sintetizar otros compuestos útiles, originando productos de semisíntesis. La utilidad de los mismos está solamente limitada por la imaginación humana o por el avance de los conocimientos científicos [1].

En la figura 1-4 se ilustra el mecanismo de acción que poseen los metabolitos secundarios en las plantas.



Fuente: <http://biofermt.blogspot.cl/2013/11/cultivo-de-celulas-vegetales-en.html>

Figura 1-4. Mecanismo de acción de metabolitos secundarios en las plantas, editado.

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida. Se diferencian de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies [10].

1.3.3 Metabolitos secundarios de interés

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos fundamentales de las plantas difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas es por esto que es difícil clasificarlos. Se sintetizan en pequeñas

cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies [10].

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas [10].

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales [10].

Estos metabolitos secundarios pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Terpenos. Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos. Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos. Saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc [10].

1.3.3.1 Terpenos

Los terpenos o también conocidos como terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con alrededor de 40.000 moléculas diferentes.

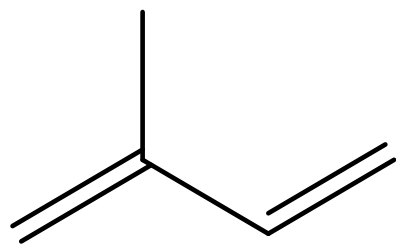
La ruta biosintética de estos compuestos químicos da lugar a metabolitos tanto primarios como secundarios que son altamente importantes para el desarrollo de organismos vegetales [10]; algunos en el crecimiento, otros en el metabolismo, o en funciones ecológicas de las plantas [1]. Dentro de los compuestos químicos primarios se encuentran las hormonas; giberelinas, ácido abscísico y citoquininas.

Además, se pueden encontrar metabolitos tales como carotenoides, clorofilas y plastoquinonas que corresponden sustancias generadas debido a la fotosíntesis. Existen también moléculas relacionadas a la respiración y la estructura de membranas como es el caso de ubiquinonas y esteroides respectivamente [10].

Estos metabolitos suelen ser insolubles en agua [10]. Son considerados liposolubles, por lo tanto, tienen gran afinidad a solventes orgánicos, aunque algunos

se encuentran solubles en el contenido celular por estar formando parte de glicósidos o poseer alguna transformación estructural [1]

Los terpenoides derivan de la unión de unidades de moléculas que presentan solo 5 átomos de carbono denominados isopreno representado en la siguiente figura:



Fuente: "Productos naturales vegetales" pagina 154, editado.

Figura 1-5. Estructura del isopreno.

Los terpenos que contienen en su estructura dos unidades de isoprenos o 10C se denominan monoterpenos; los de 15C tienen 3 unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos; aquellos que poseen 20C o cuatro unidades de isopreno corresponden a diterpenos.

Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (ver tabla 1-1) [10].

Tabla 1-1. Clasificación de terpenos.

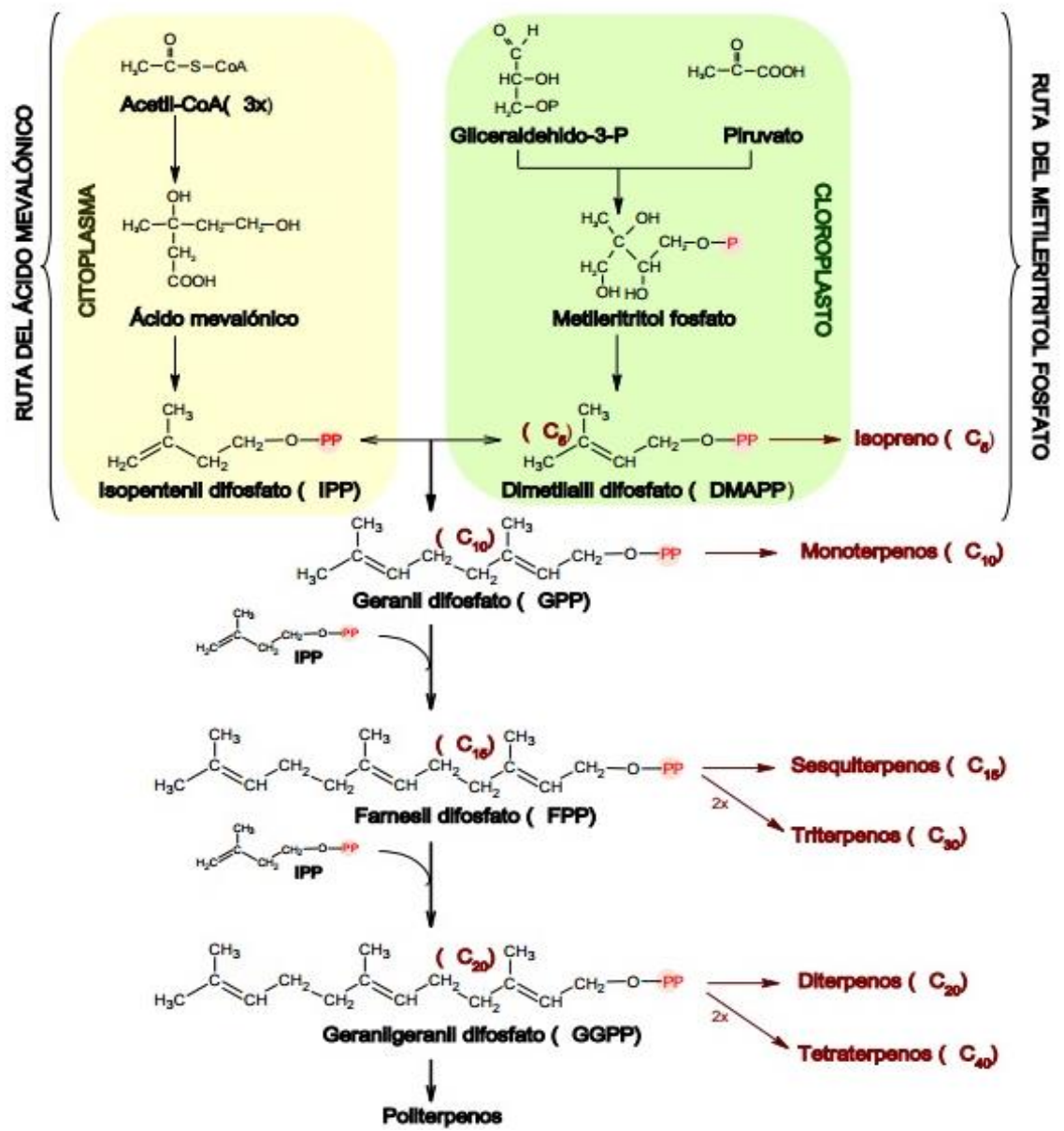
N° unidades de isopreno	N° C	Nombre o clase	Ejemplos
1	5	Hemiterpenos	Isovaleraldehído en esencia de <i>Eucaliptus spp.</i> Componentes de aceites esenciales
2	10	Monoterpenos	Mentol, mirceno, limoneno, pineno. Otros componentes de aceites esenciales.
3	15	Sesquiterpenos	Ácido abscísico (hormona)
4	20	Diterpenos	Ácidos diterpénicos en resinas (ácido abiético) Fitol. Componentes de algunas esencias. Giberelinas. Steviósido. Diterpenos tóxicos.
5	25	Sesterpenos	En hongos. Escasos y poco importantes hasta el presente.
6	30	Triterpenos	Esteroles (colesterol). Triterpenos verdaderos: amirina, limonina
8	40	Tetraterpenos	Carotenoides (carotenos y xantófilas)
n	n	Politerpenos	Caucho en <i>Hevea brasiliensis</i> .

Fuente: "Productos naturales vegetales" pagina 155.

La síntesis de la cual se obtienen los metabolitos terpenoides es por medio de dos rutas (ver figura 1-6): la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona

hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP.

El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos [10].

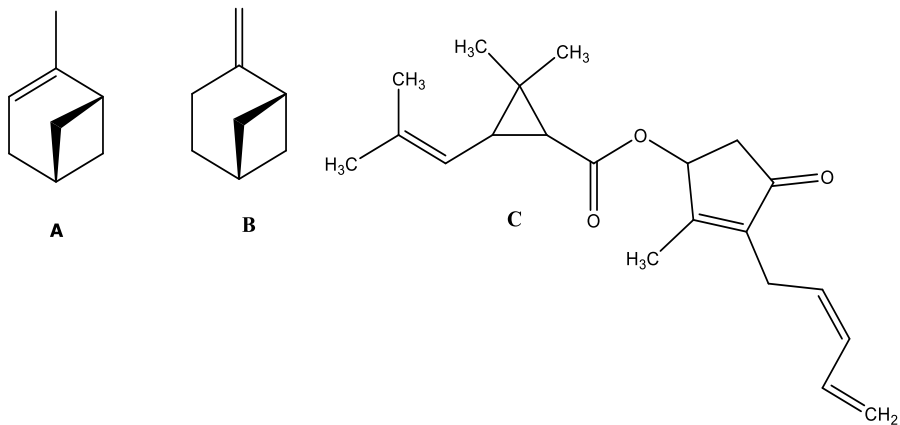


Fuente: "Metabolismo secundario en plantas" página 124

Figura 1-6. Ruta metabólica de terpenos.

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. [10]

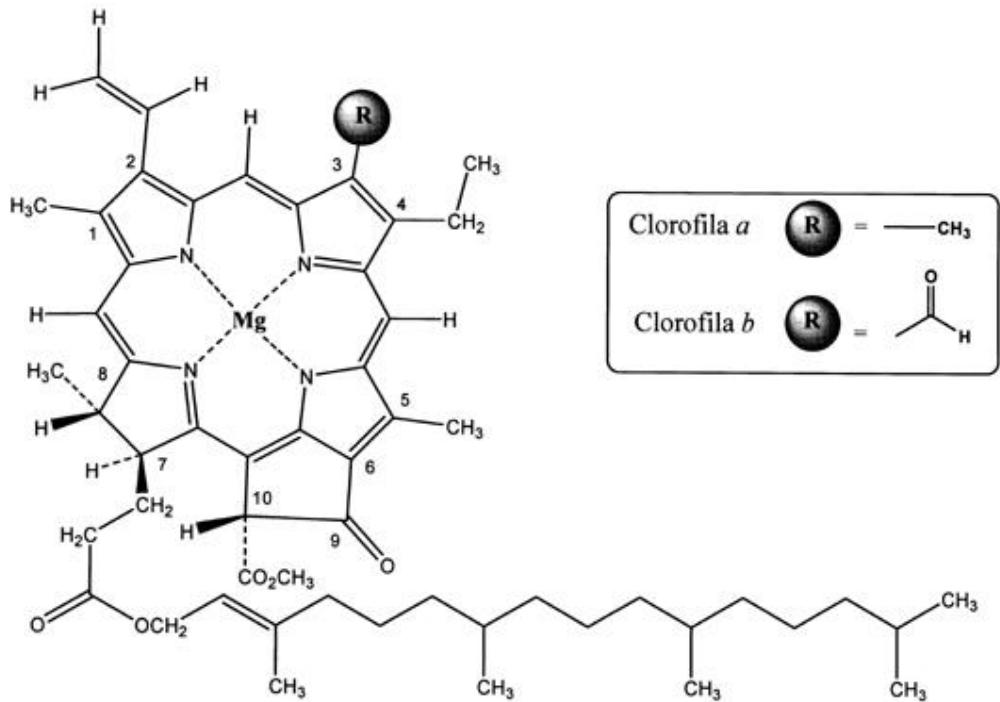
La resina de ciertas coníferas contiene monoterpenos que actúan como insecticidas. Es el caso de los metabolitos pineno y piretrina (ver figura 1-7) [10].



Fuente: "Metabolismo secundario en plantas" pagina 126, editado.

Figura 1-7. Estructura química de monoterpenos; α-pineno (A), β-pineno (B) y piretrina (C).

Entre los diterpenoides se encuentran las giberelinas y el fitol, un diterpeno de cadena abierta que forma parte de la estructura de las clorofilas ilustrado en la siguiente figura [10].

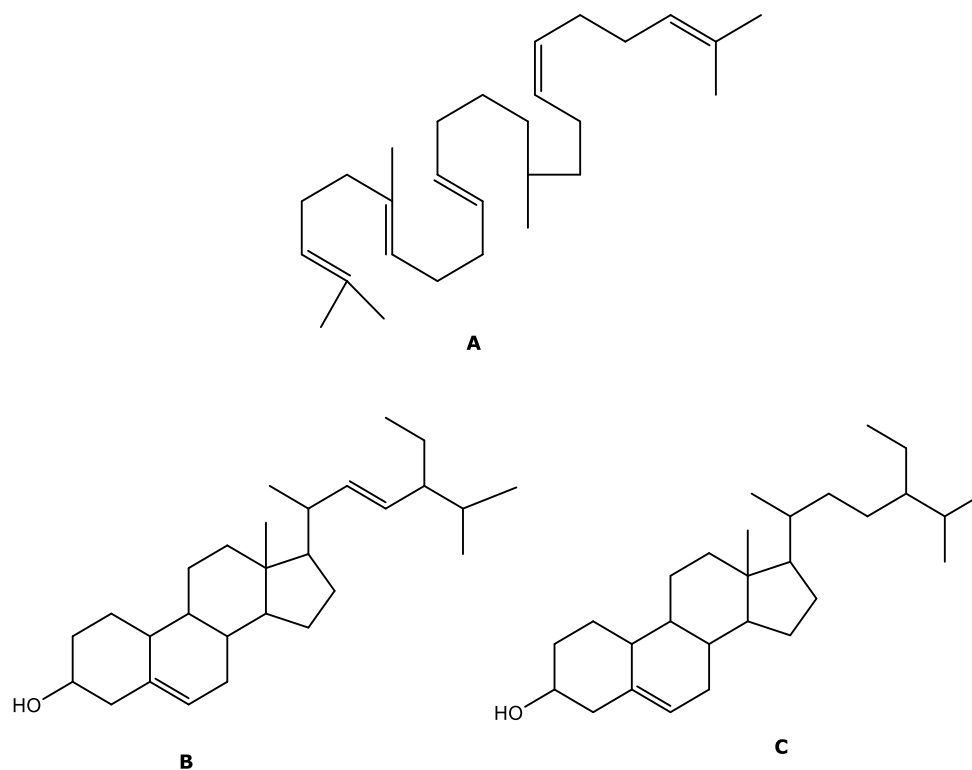


Fuente: "The chlorophylls" página 3.

Figura 1-8. Estructura clorofila a y β.

Entre los triterpenos se encuentran esteroides y esterolés derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 C de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de

casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroides. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, que sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre C 22 y C 23 [10].

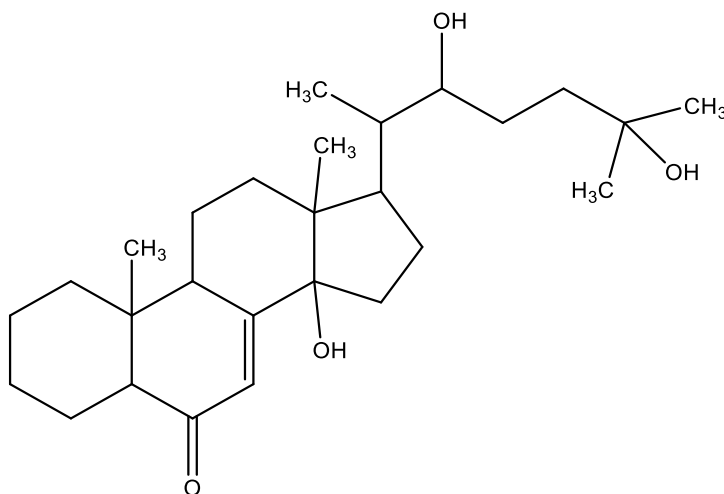


Fuente: "Metabolismo secundario en plantas" página 127

Figura 1-9. Estructura molecular de escualeno (A), estigmasterol (B) y sitosterol (C).

El esteroide más abundante en animales es el colesterol y se encuentra presente también en las plantas, aunque en trazas, razón por la cual los aceites vegetales se etiquetan como "libres de colesterol"

La principal función de los esteroides en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad. Algunos esteroides tienen funciones protectoras frente a insectos como en el caso de la ecdisona (figura 1-10) aislada del helecho común [10].

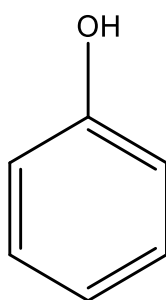


Fuente: "Metabolismo secundario en plantas" pagina 128.

Figura 1-10. Estructura molecular de ecdisoma.

1.3.3.2 Compuestos Fenólicos

Los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol en su estructura (véase figura 1-11). Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo.



Fuente: "Metabolitos secundarios en plantas" pagina 130, editado.

Figura 1-11. Estructura molecular del fenol.

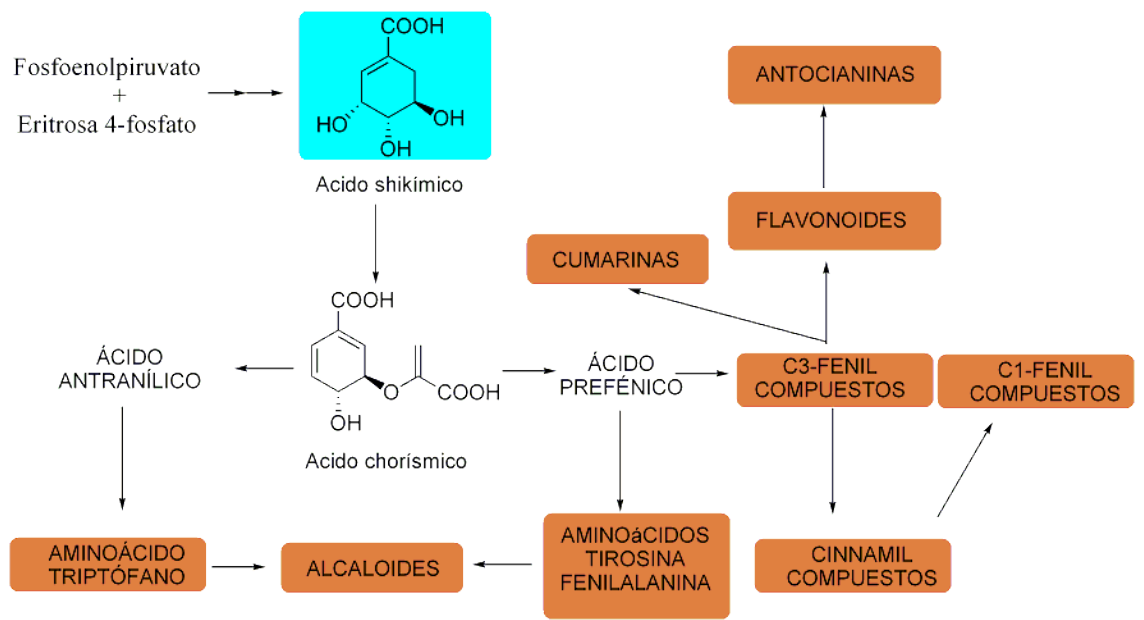
Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides, muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro [10].

La mayoría de los compuestos fenólicos son hidrosolubles, solubles en solventes polares. La solubilidad en agua aumenta generalmente al aumentar el número de grupos hidroxilo. Además, en muchos casos los compuestos fenólicos se encuentran combinados con azúcares formando glicósidos, favoreciendo la afinidad con el agua. Si bien gran parte de los integrantes del grupo son hidrosolubles, hay algunas excepciones: la subclase de los fenilpropenos se caracteriza por ser soluble en solventes no polares mientras que la lignina, un polímero fenólico de estructura compleja, es una sustancia prácticamente insoluble, que se desarrolla como una impregnación de las paredes celulares vegetales [1].

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido mevalónico. La ruta del ácido mevalónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores (véase figura 1-12). La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de

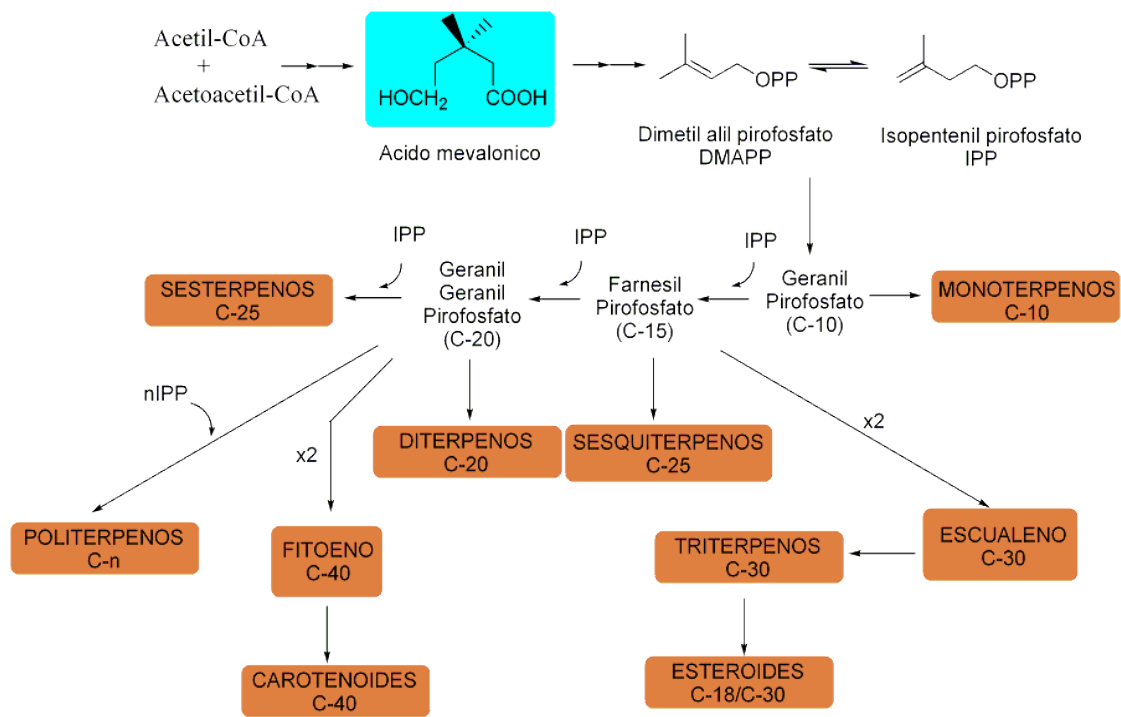
eritrosa-4-fosfato y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) la cual se encuentra ilustrada en la figura 1-13.

La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. La fenilalanina y el triptófano se encuentran entre los aminoácidos esenciales para los animales que se incorporan en la dieta. La tirosina no es esencial en el sentido de que los animales pueden sintetizarla por hidroxilación de fenilalanina [10].



Fuente: <http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/fig/rutashikimi.gif>

Figura 1-12. Ruta sintética del ácido shikímico.



Fuente: <http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/fig/rutamevalo.gif>

Figura 1-13. Ruta sintética del ácido mevalónico.

En las flores también se encuentran flavonas y flavonoles que absorben a longitudes de onda más cortas que las antocianinas por lo que no son visibles para el ojo humano. Sin embargo los insectos que ven en el rango del UV responden a flavonas y flavonoles como señales de atracción [10].

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (en el curtido, se unen al colágeno aumentando su resistencia al calor, al agua y a microorganismos). Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables.

Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados, pero sí oxidados por un ácido fuerte para rendir antocianidinas [10].

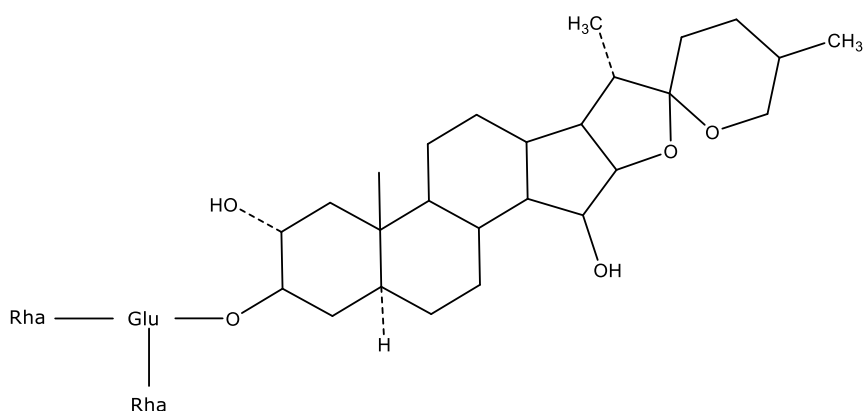
Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas. También actúan como repelentes alimenticios de muchos animales que evitan, en el caso de los mamíferos, plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos [10].

1.3.3.3 Glicósidos

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos

de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos.

Las saponinas (véase figura 1-14) se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas.



Fuente:

<https://image.jimcdn.com/app/cms/image/transf/dimension=540x1024:format=jpg/path/sdfe89444e1286f7a/image/i292c977ee172598d/version/1415554267/digitonina-saponina-estructura-qu%C3%ADmica.jpg>

Figura 1-14. Estructura molecular de saponinas, editado.

Los glicósidos cardiacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas.

Los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN). Un ejemplo es la amigdalina que se encuentra en las semillas de almendra, albaricoque, cereza o melocotón [10].

Los glicósidos cianogénicos normalmente no se degradan cuando la planta está intacta. Tienen un papel protector en algunas especies frente a herbívoros. El cianuro de hidrógeno es una toxina de acción rápida que inhibe metaloproteínas como citocromo oxidasa, enzima clave en la respiración mitocondrial. Sin embargo, algunos herbívoros llegan a adaptarse a alimentarse de plantas cianogénicas y tolerar más altas dosis de HCN.

Los glucosinolatos al igual que los glicósidos cianogénicos, están separados espacialmente de las enzimas hidrolíticas que los degradan y actúan también como repelentes de herbívoros [10].

1.3.3.4 Alcaloides

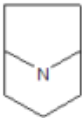
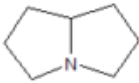
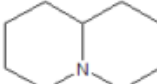
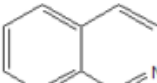
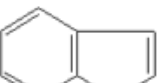
Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas.

A los valores normales de pH del citosol y de la vacuola (7,2 y 5-6, respectivamente) (Ávalos & García, 2009). Esta basicidad que poseen varía enormemente, dependiendo de la estructura molecular del alcaloide y de la presencia y localización de grupos funcionales. El átomo de nitrógeno hace que los alcaloides puedan protonarse en medio ácido y formar sales; pero si el alcaloide presenta grupos funcionales adyacentes que cedan electrones (por ejemplo, grupos alquilo), la disponibilidad de electrones aumenta y el compuesto resulta más básico.

Algunos alcaloides son neutros porque en su estructura se presentan grupos funcionales que atraen electrones, haciendo que los del nitrógeno se deslocalicen y no formen sales (por ejemplo, la papaverina, la ricinina y la colchicina). Unos pocos como la morfina, cocaína, pilocarpina y cafeína se disuelven en soluciones alcalinas porque son ligeramente ácidos. Por lo anteriormente expuesto pueden entonces presentarse libres (al estado de bases), como sales o como N-óxidos [1].

Los núcleos nitrogenados de los alcaloides cíclicos en general son sencillos, como se muestra en la Tabla 1-2:

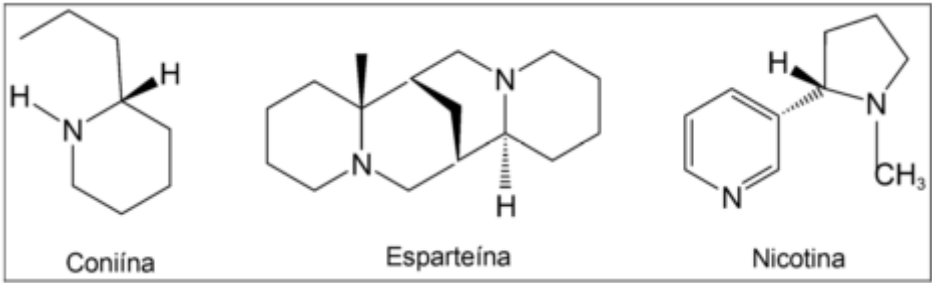
Tabla 1-2. Estructura de núcleos de alcaloides básicos.

NÚCLEO ALCALOÍDICO	ESTRUCTURA	PRECURSOR BIOSINTÉTICO	EJEMPLO
PIRROLIDINA		ORNITINA	NICOTINA
TROPANO		ORNITINA	ATROPINA COCAÍNA
PIPERIDINA		LISINA	CONIÍNA
PIRROLIZIDINA		ORNITINA	RETRONECINA
QUINOLIZIDINA		LISINA	LUPININA
ISOQUINOLEÍNA		TIROSINA	CODEÍNA MORFINA
INDOL		TRIPTOFANO	PSILOCIBINA RESERPINA ESTRICNINA

Fuente: "Productos naturales vegetales" pagina 19.

Según la composición elemental, los alcaloides pueden clasificarse en ternarios o cuaternarios.

a. Ternarios o no oxigenados: por lo general se presentan como líquidos oleosos, volátiles y arrastrables por vapor de agua, características que se tienen en cuenta para su determinación cuantitativa a través de una destilación (ver ejemplos en la figura 1-15).

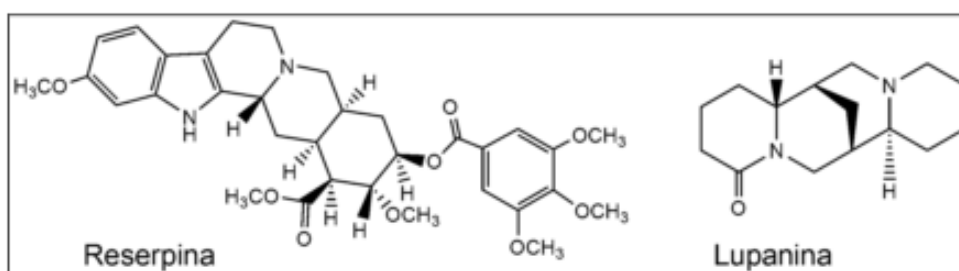


Fuente: "Productos naturales vegetales" pagina 20.

Figura 1-15. Estructura de alcaloides ternarios.

Se puede verificar la ausencia de átomos de oxígeno en las estructuras de la coniína en la cicuta (*Conium maculatum*), la esparteína en retama (*Spartium junceum*) y la nicotina en tabaco (*Nicotiana tabacum*) [1].

b. Oxigenados o cuaternarios: alcaloides formados por C, H, N y O. Son sólidos a temperatura ambiente, fijos y cristalizables. A este grupo corresponden la mayoría de los alcaloides. Como ejemplo de estos compuestos tenemos la reserpina en *Rawolfia spp* y lupanina en diferentes especies de lupines (*Lupinus spp*) [1] representados en la figura 1-16:

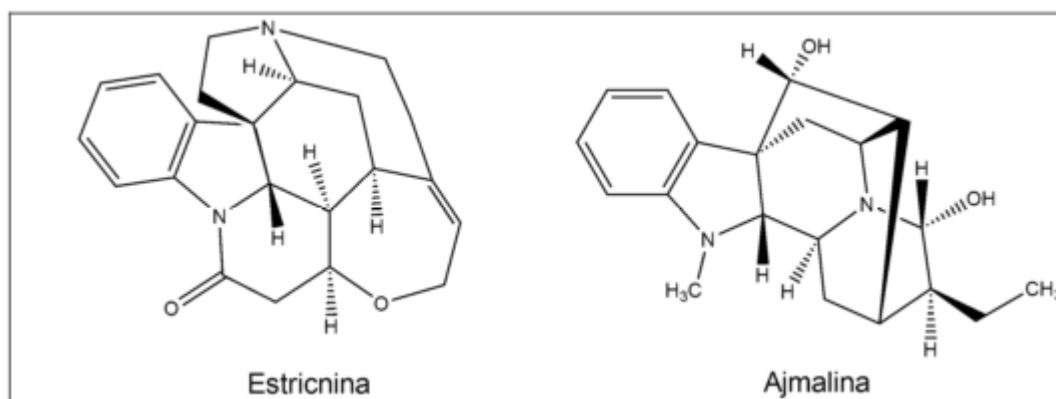


Fuente: "Productos naturales vegetales" pagina 21.

Figura 1-16. Ejemplos de alcaloides oxigenados.

De acuerdo con la estructura molecular y su ruta biosintética, los alcaloides se dividen en tres grupos:

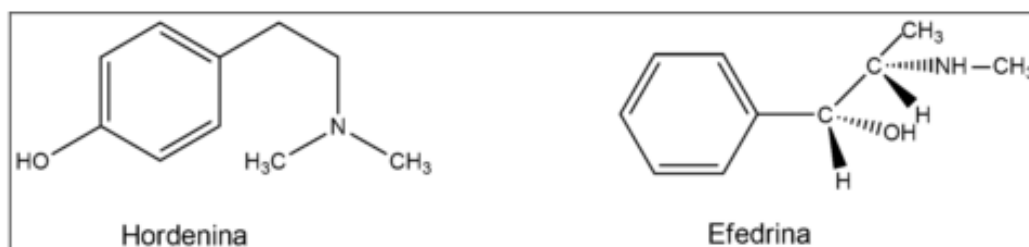
1. Verdaderos o alcaloides propiamente dichos, que constituyen el grupo principal. Cumplen estrictamente con las características de la definición de alcaloides: tienen siempre un nitrógeno intracíclico, son de carácter básico y se presentan en la naturaleza normalmente formando sales con el ácido acético, oxálico, láctico, málico, tartárico y cítrico y tal vez lo que más lo diferencia de los demás grupos es que se forman a partir de un aminoácido [1]. A continuación (figura 1-17) se muestran dos ejemplos de alcaloides verdaderos:



Fuente: "Productos naturales vegetales" pagina 21.

Figura 1-17. Estructura de algunos alcaloides verdaderos.

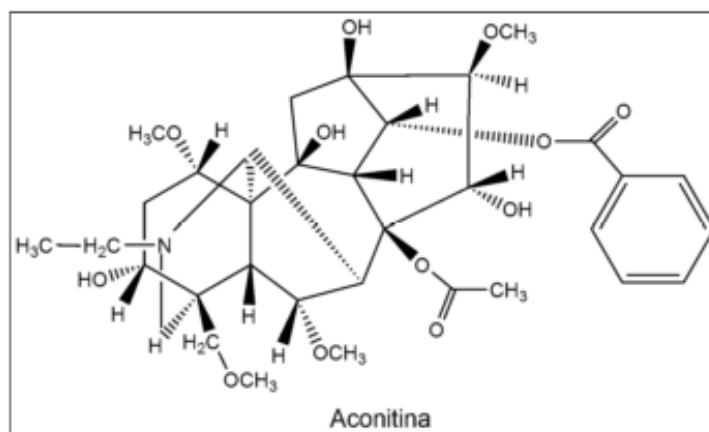
2. Protoalcaloides: pueden ser considerados aminas simples, poseen reacción básica y se forman in vivo a partir de aminoácidos, pero a diferencia de los alcaloides verdaderos, poseen el nitrógeno en una cadena lateral de la molécula (extracíclico); es decir que no está formando parte del núcleo heterocíclico; por ejemplo, la muscarina (en setas del hongo *Amanita muscaria*), la mescalina (en cactus), la efedrina (en *Ephedra spp*) y la hordenina presente en cebada (*Hordeum vulgare*) en germinación [1]. En la figura 1-18 se ilustran dos ejemplos de protoalcaloides.



Fuente: "Productos naturales vegetales" página 22.

Figura 1-18. Ejemplos de estructuras protoalcaloides.

3. Pseudoalcaloides: poseen normalmente todas las características de los alcaloides verdaderos, pero no se forman a partir de aminoácidos. En la mayoría de los casos conocidos se trata de isoprenoides, de allí que se los nombre como alcaloides terpénicos; por ejemplo, los alcaloides monoterpénicos, como la β -esquitantina en *Skytanthus acutus* (cuerno de cabra); alcaloides diterpénicos, como la aconitina en tubérculos de *Aconitum napellus* (acónito); triterpenoides, como la tomatidina en *Solanaceae* y sesquiterpénicos en nenúfares (*Nymphaeaceae*). Igualmente se conocen sustancias nitrogenadas heterocíclicas que provienen del metabolismo del acetato, como la coníina, principio tóxico de la cicuta [1]. A continuación, se ilustra un ejemplo de pseudoalcaloide.



Fuente: "Productos naturales vegetales" pagina 22.

Figura 1-19. Pseudoalcaloide aconitina.

Con referencia a la nomenclatura y debido a que a veces las estructuras son complicadas, sus nombres suelen estar relacionados con el origen botánico, como por ejemplo la atropina por el género que se encuentra, como en el caso de la cocaína en el *Erythroxylon coca*. Otras veces se Atropa o por la especie en la los relaciona por el nombre de la droga (ergotamina del ergot), por su acción farmacológica (emetina por los efectos eméticos) o en algunos casos el nombre de su descubridor. En el idioma español se ha aceptado que los alcaloides tengan una terminación "ina" [1].

1.3.4 Fitoquímica de *Skytanthus acutus*

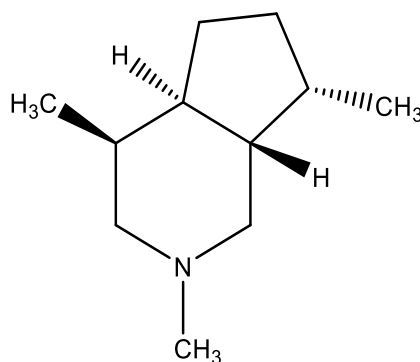
Los estudios fitoquímicos de la familia Apocynaceae son de gran interés ya que la mayoría de las plantas pertenecientes a este grupo contienen en su estructura moléculas de alta toxicidad como lo son los alcaloides. (Xifreda, Lopez, & Novara, 2007), es por esto que se realizan estudios latinoamericanos de la especie *Skytanthus acutus*, planta endémica de nuestro país [11].

La investigación previa a este trabajo data del año 1962. En la investigación realizada por Djerassi, Carl, Kutney, J.P. & Shamma, M. se logra aislar un nuevo alcaloide no reportado al cual se le denomina Skytanthine. Se trata de un alcaloide líquido ópticamente activo que posee una composición elemental de C, H y N que posee dos funciones C-metilo y un grupo N-metilo.

La técnica realizada en este estudio se basa en la extracción de la corteza de *S. acutus* (5 kg) la cual es depositada en un equipo Soxhlet durante cinco días utilizando metanol como solvente. Se realizan repetidas extracciones con cambios de pH y se destila el extracto básico de la planta obteniendo el alcaloide con un rendimiento del 0,03% en base seca.

Luego de un sinnúmero de estudios físicos y químicos realizados por este grupo de investigación se obtiene la fórmula molecular de este alcaloide: $C_{11}H_{21}N$.

La siguiente imagen (figura 1-20) representa la estructura del compuesto.



Fuente: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.390973.html>

Figura 1-20. Estructura molecular de skytanthine.

Pese a la antigüedad del descubrimiento de esta molécula, esta es la única estructura que se ha reportado para la especie *Skytanthus acutus*. No se han realizado más estudios de metabolitos secundarios presentes en esta planta.

1.4. **TÉCNICAS FÍSICAS EMPLEADAS EN ANÁLISIS FITOQUÍMICO**

1.4.1. Recolección

Para la recolección es recomendable que la especie esté joven y se encuentre completamente desarrollada para su análisis de clasificación taxonómico. Es por esto que el proceso de obtención de la muestra se realiza, generalmente, en época de floración (entre primavera y verano).

1.4.2. Extracción

La extracción y separación de metabolitos se realiza mediante solventes que poseen una relación análoga entre lo que se desea extraer y el disolvente que se utiliza para dicho proceso. Principalmente se realiza en maceradores.

La maceración permite la extracción de metabolitos mediante la separación sólido-líquido, donde el disolvente (líquido) extrae compuestos del material vegetal (sólido) dependiendo exclusivamente de la polaridad del solvente y la relación de este con la solubilidad de los compuestos a extraer.

El procedimiento más utilizado para este tipo de extracciones se lleva a cabo mediante solventes en polaridad creciente. Los solventes fuertemente polares disuelven solutos iónicos o altamente polares, mientras que los solventes poco polares no disuelven de manera eficiente los solutos iónicos, pero sí a los solutos de baja polaridad [1].

Los disolventes más utilizados en este proceso son:

- Solventes polares: agua, alcoholes (etanol, metanol), dimetilfomamida (DMF) y algunos acidos.
- Solventes medianamente polares: éter etílico, cloroformo.
- Solventes apolares: hexano, ciclo hexano, éter de petróleo, tetracloruro de carbono [1].

1.4.3. Técnicas cromatográficas de separación

La cromatografía es un método que puede definirse como la separación de una mezcla de solutos, basándose en la velocidad de migración de cada uno a través de un medio poroso, arrastrados por el movimiento de un disolvente [12].

La separación se basa en un reparto múltiple o en un proceso de adsorción-desorción. Se ve favorecida por la diferencia en el coeficiente de reparto de los componentes presentes en el soluto que se van multiplicando a lo largo de la columna. Mientras mayor sea esta multiplicación, los componentes se separan con mayor facilidad, lo que genera una mayor resolución cromatográfica [13].

Existen variadas clasificaciones relacionadas con aspectos físicos, tanto de la fase móvil como de la fase estacionaria, que fundamentalmente cumplen con el mismo principio de separación. Estas se ven reflejadas a continuación en la Tabla 1-3 y Tabla 1-4:

Tabla 1-3. Naturaleza de la fase móvil

FASE MOVIL	CROMATOGRAFÍA	EJEMPLO
GAS	GASEOSA (GC)	-
LIQUIDO	LIQUIDA (LC)	- Cromatografía capa delgada (TLC) - Cromatografía liquida de alta performance (HPLC)

Fuente: creación propia

Tabla 1-4. Naturaleza de la fase estacionaria.

CROMATOGRAFIA	FASE MOVIL	FASE ESTACIONARIA
LSC	LIQUIDO	SOLIDO
LLC	LIQUIDO	LIQUIDO
GLC	GAS	LIQUIDO
GC	GAS	SOLIDO

Fuente: creación propia

Existen, además, otras formas de cromatografía líquida que se mencionan a continuación:

Formas de cromatografía líquida (LC)

1. Cuando la fase móvil es un disolvente o una mezcla de ellos y la fase estacionaria es un sólido que interactúa con el analito se le conoce con el nombre de cromatografía sólido-líquido (LSC) o cromatografía de adsorción.
2. En los casos que la fase estacionaria sea un líquido inmiscible con la fase móvil se denomina cromatografía líquido-líquido (LLC) o cromatografía de partición.
3. Cromatografía de fase ligada (BPC)
4. Cromatografía de intercambio iónico (IEC)
5. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) [14].

1.4.3.1 Cromatografía en columna (CC)

La cromatografía en columna (CC) se utiliza para la separación de muestras complejas o para purificar compuestos y se rige, principalmente, por la separación por adsorción (ver figura 1-21). Como fase estacionaria se utiliza un sólido inerte como gel de sílice o alúmina que son depositadas dentro de una columna y cuya función es permitir la separación de compuestos de acuerdo a la afinidad que posean con la fase y del tiempo de retención. Existen un sinnúmero de columnas con diferente grosor, la elección de una de ellas depende exclusivamente de la cantidad de muestra que se desee separar.

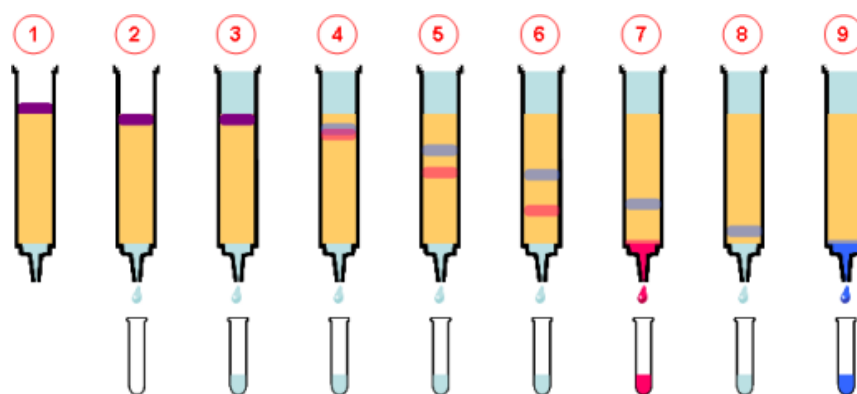
La elección del disolvente es fundamental a la hora de la separación ya que depende de la polaridad que posea el compuesto de interés, para esto es necesario realizar experimentos a menor escala como cromatografía en capa fina [15].

La preparación de la columna comienza poniendo algodón o lana de vidrio en el fondo. La utilización de esta última depende de la polaridad de los compuestos a separar (se utiliza en compuestos muy polares). El uso de uno de estos elementos en el fondo evita que parte del relleno de la columna baje por el extremo inferior de esta, se deposite en el compuesto puro y lo contamine. Luego se adiciona a la columna el

soporte de columna que evita el efecto de cuello de botella haciendo que una vez separados los compuestos de la fase estacionaria, estos no se vuelvan a juntar en la boquilla de la columna. Posteriormente se coloca la fase estacionaria y sobre esta, una película delgada de arena como filtrante de sólidos que puedan encontrarse suspendidos. Finalmente se introduce la muestra por la parte superior de la columna y se eluye con el disolvente adecuado, recogién dose en tubos de ensayo o matraces.

A veces se utilizan mezclas de disolventes para una elución denominada gradiente aumentando ligeramente la polaridad para poder separar compuestos que tienen mayor R_f . Esta polaridad va en aumento hasta separar la mayor cantidad de compuestos que puedan quedar retenidos en la columna [15].

La siguiente imagen (Figura 1-21) muestra el comportamiento de una columna cromatográfica.



Fuente: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/crom/inicio.htm>

Figura 1-21. Procedimiento cromatografía en columna (CC).

1.4.3.2 Cromatografía en Capa fina (CCF)

Esta técnica es utilizada para una determinación cualitativa de componentes presentes en un determinado extracto. Indica, mediante coloración o mancha, la identificación de compuestos que presentan ciertas características en la placa (fase estacionaria) al momento de ser reveladas con el solvente (fase móvil).

En la cromatografía de capa fina (CCF), la fase estacionaria está compuesta de sílica o alúmina ubicadas sobre un soporte de aluminio, plástico o vidrio [15]. La separación se genera a partir de la acción del disolvente cuando entra en contacto con el analito sembrado al inferior de la placa. La fase estacionaria es un componente polar, por lo tanto, la elección de la fase móvil se ve modificada de acuerdo con la afinidad que posee el compuesto con la sílica o alúmina (véase figura 1-22).

Las ventajas de CCF son variadas. La existencia del patrón de una muestra permite realizar un análisis simultaneo, en cambio, en la cromatografía en columnas las muestras deben ser analizadas por separado y de manera secuencial. Otra de las ventajas es que el análisis no destruye la muestra por lo que se pueden utilizar

condiciones severas que, en otras técnicas, como en CC, provocan daños en el relleno o la destrucción de la columna [16].

La aparición de la mancha en la placa tiene completa relación con la distancia recorrida por el solvente y la distancia desde la siembra del analito hasta donde se posiciona el compuesto terminada la cromatografía. Este efecto es conocido como factor de retención o de retardo conocido como R_f [15].

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

Fuente: Abbot & Andrews. 1968 , Introduccion a la cromatografia.

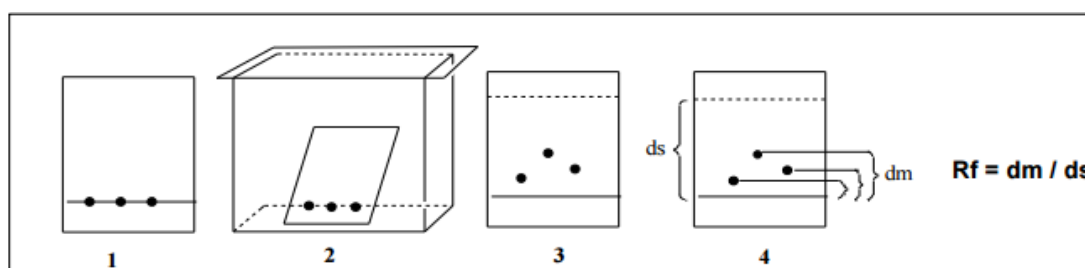
Fórmula 1-1. Valor de R_f del compuesto en relación al frente del solvente.

$$R_x = \frac{\text{desplazamiento de muestra } x}{\text{desplazamiento de patrón}}$$

Fuente: Abbot & Andrews. 1968 , Introduccion a la cromatografia.

Fórmula 1-2. Valor de R_x de la muestra en relación con el patrón utilizado.

La distancia de migración se mide desde el punto de siembra hasta donde se ubica la mancha del compuesto al ser arrastrado por la fase móvil [17].



Fuente: Guía práctica de farmacognosia, Dra. Carla Delporte, Universidad de Chile, 2014.

Figura 1-22. Procedimiento cromatografía en capa fina (CCF).

1.5. DERIVATIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

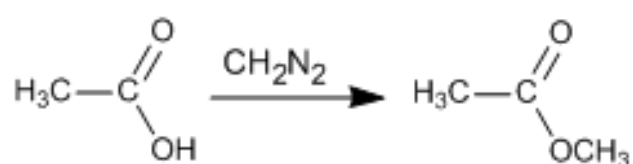
1.5.1 Reacción de metilación o alquilación

La metilación o también conocida como alquilación reduce la polaridad de una molécula al reemplazar los hidrógenos activos por grupos alquilo. Se utiliza para modificar compuestos con algún hidrógeno ácido, como los ácidos carboxílicos y los fenoles. Una vez realizada la reacción se generan ésteres, éteres, alquil aminas y alquil amidas.[18]

El Diazometano es un compuesto orgánico de elevada reactividad y toxicidad. Reacciona con ácidos carboxílicos para formar ésteres metílicos, con haluros de alcanoílo forma cetonas halogenadas y con carbonilos epóxidos.

El diazometano utilizado en este proceso es el método más limpio para la metilación de ácidos. La reacción es general y actúa en presencia de compuestos muy impedidos que no pueden ser metilados por el sulfato de metilo o yoduro de metilo, sin embargo, su uso requiere cierto cuidado al ser considerado como una sustancia peligrosa [19].

La reacción de diazometano con ácidos carboxílicos se realiza a temperatura ambiente y en ausencia de ácido. A continuación, se ilustra la reacción química del proceso de metilación.

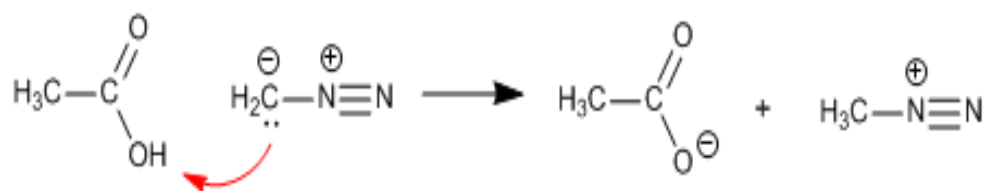


Fuente: <http://www.quimicaorganica.net/diazometano-reactividad.html>

Figura 1-23. Reacción de metilación de un ácido carboxílico.

Mecanismo:

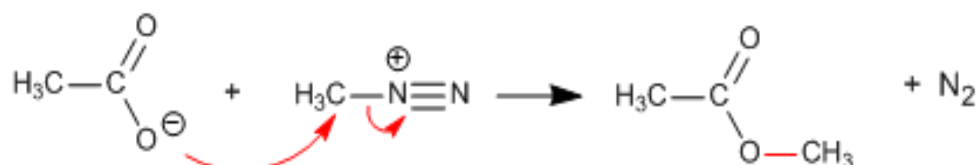
Etapa 1: Formación del carboxilato



Fuente: <http://www.quimicaorganica.net/diazometano-reactividad.html>

Figura 1-24. Primera etapa de la reacción de metilación.

Etapa 2: Ataque nucleófilo del carboxilato a la sal de diazonio

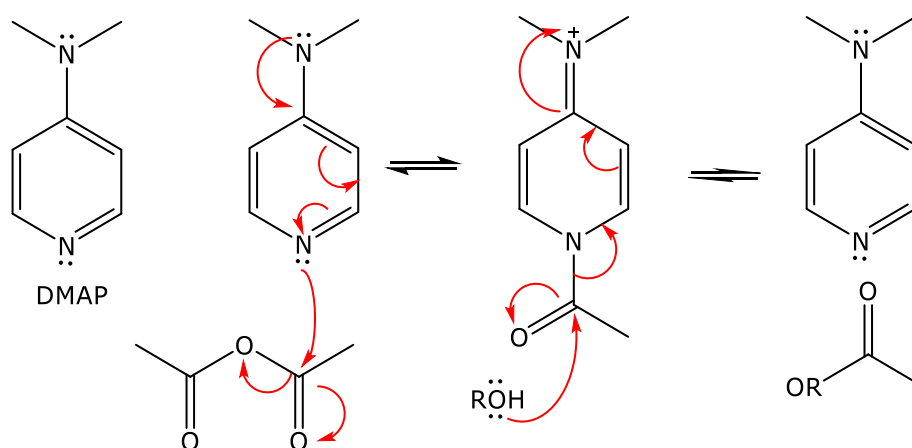


Fuente: <http://www.quimicaorganica.net/diazometano-reactividad.html>

Figura 1-25. Segunda etapa de la reacción.

1.5.2 Reacción de acetilación

La reacción de acetilación es una transformación utilizada comúnmente en síntesis orgánica para obtener derivados de ácidos carboxílicos y para proteger hidróxidos en reacciones de varios pasos. Esta reacción suele llevarse a cabo en presencia de piridina como catalizador a pesar de la toxicidad de esta misma. La baja nucleofilicidad de los grupos hidroxilo en los carbohidratos conduce a la necesidad de activación de los agentes acilantes mediante la adición de derivados de piridina como co-catalizadores para acelerar la reacción, tal como 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (véase figura 1-26) [20]



Fuente: Organic Chemistry - J Clayden, página 1153

Figura 1-26. Reacción de acetilación utilizando anhídrido acético y DMAP como catalizador.

El DMAP (4-dimetilaminopiridina) cumple un papel fundamental como catalizador de la reacción de acetilación incluso siendo más efectivo que la propia piridina. Actúa colocando el grupo amino para reforzar, así, la naturaleza nucleofílica del átomo de nitrógeno. [21]

1.6. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN

1.6.1 Cristalización

Esta técnica es ampliamente utilizada para purificar mezclas químicas y su uso se extiende desde la industria química hasta la industria farmacéutica.

El proceso se basa en la solubilidad que posee la muestra a determinados solventes a cierta temperatura y presión. La modificación de alguno de estos factores permite la menor solubilidad de la muestra por lo tanto la formación del cristal se hace efectiva. Los cristales formados poseen una estructura interna muy regular y

ordenada lo que desfavorece la incorporación de moléculas extrañas a la red. El sólido obtenido a partir de la cristalización es de alta pureza.

Todos los procesos de formación de cristales están destinados a elaborar una solución sobresaturada. La sobresaturación es la fuerza bajo cuya influencia se forman los nuevos cristales.

La ventaja de esta técnica es la completa purificación del analito de interés con alguna impureza que haya en el medio que lo contiene lo que permite un análisis mucho más óptimo para su posterior identificación.

Esta técnica, sin embargo, ha sido poco estudiada pese a que se ha realizado desde hace años con la producción de sal o de azúcar. Esto se debe principalmente a que es muy difícil monitorear el proceso cuando ocurre la cristalización y, en definitiva, cuando se forma el cristal. [22]

1.7. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

1.7.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

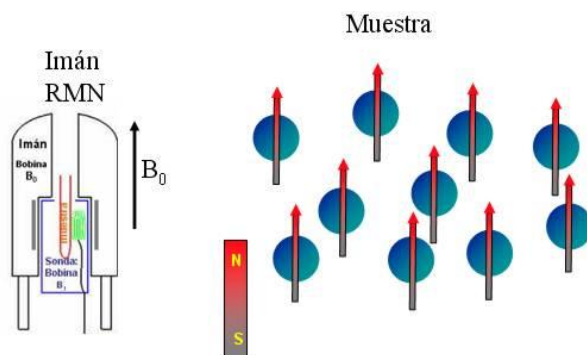
La espectroscopía de Resonancia Magnética nuclear (RMN) se utiliza para la determinación de estructuras orgánicas donde no es necesario utilizar una gran cantidad de muestra y esta, a la vez, no se ve modificada ni dañada. El espectro de RMN permite obtener un sinnúmero de información relacionada a estructuras orgánicas por lo que es posible obtener moléculas extremadamente complejas utilizando solo técnicas de RMN, sin embargo, este experimento se complementa con otras formas espectroscópicas como IR y espectroscopía de masas.

El RMN se desarrolla mediante el estudio de distintos tipos de núcleos siendo los más utilizados: ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{19}F y ^{31}P . En química orgánica se estudian principalmente moléculas orgánicas que contienen carbono e hidrogeno en su estructura por lo tanto se utiliza, en su mayoría, RMN de protón (^1H) y de carbono 13 (^{13}C).

La técnica de RMN se basa en la observación de núcleos atómicos impares o número másico impar en cualquier espectrómetro de RMN. La importancia de que el núcleo sea impar radica en que el protón del elemento posee un giro magnético o spin. Este protón se comporta como una esfera giratoria por lo tanto genera una corriente eléctrica o un campo magnético. El campo generado (B) se denomina momento magnético y tiene semejanza a un imán (véase figura 1-27).

Cuando se enfrentan dos imanes de distintos tamaños, el pequeño tiende a alinearse con el campo del imán más grande. Este mismo efecto ocurre cuando se utiliza un campo magnético externo (B_0) sobre un protón, este se ve obligado a alinearse con el campo externo o contra él. Una vez alineado, el estado de menor

energía se denomina estado de spin α y el estado de mayor energía se denomina estado de spin β [23].



Fuente: <http://www.usc.es/gl/investigacion/riaidt/rm/rmn/introduccion.html>

Figura 1-27. Alineación del campo magnético en equipo de RMN.

Si los núcleos orientados se someten a radiación electromagnética a una frecuencia adecuada se observa una absorción de energía y el estado α voltea su spin al estado de mayor energía. Una vez ocurrido el giro se puede deducir que se encuentran en resonancia con la radiación aplicada. La frecuencia necesaria para que ocurra la resonancia depende de factores como la intensidad del campo magnético externo y la identidad de los núcleos.

Todos los núcleos de las moléculas poseen electrones que giran a su alrededor. Al aplicar un campo magnético, estos electrones desarrollan por cuenta propia campos magnéticos locales diminutos. Estos campos magnéticos diminutos se oponen al campo magnético aplicado por lo tanto el campo magnético percibido por el núcleo es menor al que se está aplicando realmente comportándose como una protección para el núcleo.

$$B_{\text{efectivo}} = B_{\text{aplicado}} - B_{\text{local}}$$

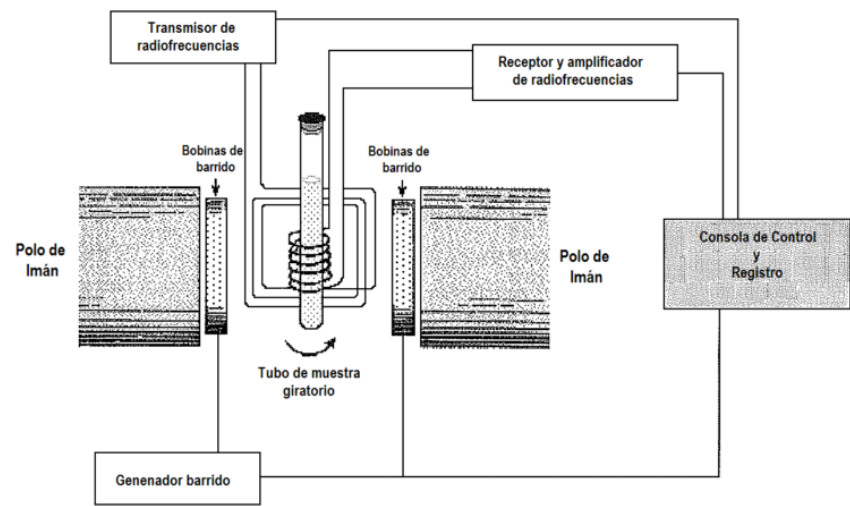
Fuente: Química Organica, Mcmurry Sexta edición.

Formula 1-3. Determinación del Campo (B) efectivo.

A continuación, se ilustra el funcionamiento de un equipo de RMN (figura 1-28). La muestra se coloca en un tubo, que, algunas veces, se gira rápidamente para ganar homogeneización en la señal, aunque actualmente está en discusión el uso del giro, pues puede introducir errores. El tubo, a su vez, está situado entre dos polos magnéticos que son los que generan el campo magnético. Hay un emisor y un receptor de radiofrecuencia. La señal del emisor puede ser controlada para hacer un barrido de frecuencias. Con las bobinas de barrido se puede controlar un barrido del campo

La muestra se deposita en un tubo que ocasionalmente puede tener movimiento giratorio para lograr la homogeneización de la señal. El tubo se encuentra

ubicado entre dos polos magnéticos que generan el campo magnético. Posee un emisor y receptor de radiofrecuencia [24].



Fuente: Resonancia Magnética Nuclear. Departamento de Química Física, Universidad de Valencia, 2012.

Figura 1-28. Diagrama del proceso realizado por el equipo de RMN.

Para la homogenización completa de la muestra se aconseja utilizar solventes deuterados y de elevada pureza para disminuir así señales que son impurezas. En los espectros de ^1H -RMN aparecen siempre las señales del solvente sin deutar, por ejemplo, agua. En los espectros de ^{13}C -RMN aparecen todas las señales de los átomos de carbono del disolvente desdobladas por el acoplamiento con deuterio. [25]

1.7.1.2. ^{13}C -RMN

La Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C es utilizada como complemento de ^1H -RMN y se basa en determinar el entorno magnético de los átomos de carbono presentes en una muestra orgánica.

Cerca del 99% de los átomos de carbono se encuentran en la naturaleza como ^{12}C . Como vimos anteriormente, para que se genere el campo magnético es necesario un número impar de protones es por esto que no se puede estudiar carbono 12 en RMN por poseer un número par de protones y neutrones.

Para lograr realizar el estudio de los átomos de carbono en una muestra es necesario utilizar otro isotopo de carbono menos abundante como el ^{13}C , este posee un número impar de protones por lo tanto es capaz de generar un campo magnético que posteriormente es registrado por el equipo. Sin embargo, la utilización de este isotopo hace que el ensayo sea menos sensible que ^1H ya que la abundancia de carbono 13 es cercana al 1%, además, la frecuencia de resonancia utilizada para un

campo magnético dado es el 25% de lo que se utiliza en experimentos de ^1H . La disminución del giro magnético genera una menor sensibilidad [23].

1.7.1.3. RMN ^{13}C por DEPT

El núcleo de ^{13}C está acoplado de manera magnética a los protones cercanos a él. Este acoplamiento magnético permite la transferencia de polarización de los protones al núcleo de carbono. El número de protones unidos al núcleo determina como ocurre la transferencia de polarización. Al realizar un experimento de DEPT se incluyen principalmente tres escaneos espectrales:

1. Escaneo normal en el que cada tipo de núcleo ^{13}C aparece como singlete
2. Escaneo DEPT 90, donde solo aparecen los grupos metinos (CH) unidos a un protón.
3. Escaneo DEPT 135, donde aparecen los grupos metilos (CH_3) junto a los grupos metinos (CH). Los grupos CH_2 aparecen en el espectro, pero con señal negativa. Los carbonos cuaternarios (carbonos que no se encuentran unidos a un protón) no aparecen.

Estos experimentos permiten saber cuándo un carbono de la molécula se encuentra unido a uno o más hidrógenos.

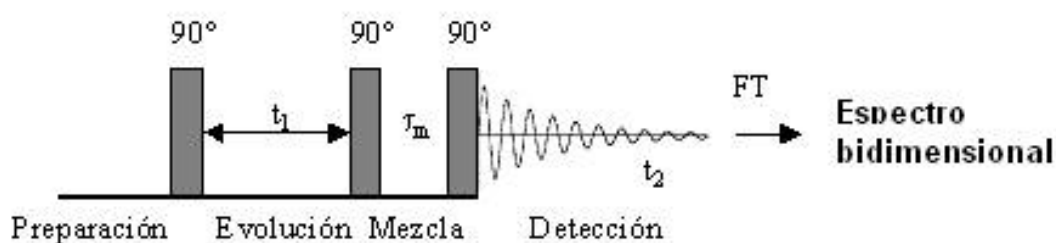
- Los carbonos sin H solo aparecen en un espectro normal pero no en los experimentos DEPT (carbonos cuaternarios).
 - Los carbonos con un solo protón (CH) dan señales positivas en los tres espectros.
 - Los carbonos con dos protones asociados (CH_2) dan señales en un espectro normal, ninguna en DEPT 90 y negativas en espectros de DEPT 135.
 - Los carbonos con tres enlaces con protón (CH_3) dan señales en un espectro normal, ninguna en DEPT 90 y señales normales en DEPT 135.
- [23]

1.7.1.4 RMN bidimensional

Los primeros experimentos realizados con RMN en dos dimensiones se desarrollaron en los años 80 sin embargo, las investigaciones sobre estos ensayos comenzaron en la década de los 70. Actualmente se habla de un gran conjunto de ensayos que presentan estas características, pero todos se rigen bajo el mismo

principio básico; el espectro mono dimensional se expande en dos dimensiones para aliviar el efecto de solapamiento de señales.

El experimento típico de RMN-2D tiene varias etapas separadas por pulsos de radio frecuencia: preparación, evolución después de la excitación de núcleos durante un determinado tiempo (t_1), mezcla en un intervalo "x" y detección en un tiempo " t_2 ". La segunda dimensión se origina en el intervalo " t_1 ", durante el cual el núcleo está sujeto a determinadas condiciones. La amplitud de " t_2 " es una función de lo que sucede durante el periodo de evolución en " t_1 ", véase figura 1-29. El experimento se repite para un determinado número de valores de " t_1 " con lo que se obtiene un conjunto de espectros en el que las amplitudes de las resonancias vienen moduladas con las frecuencias que existían en el período de evolución. Una transformación Fourier con respecto a " t_1 " define las frecuencias de modulación y da como resultado el espectro 2D representado en la figura 1-30 [26].

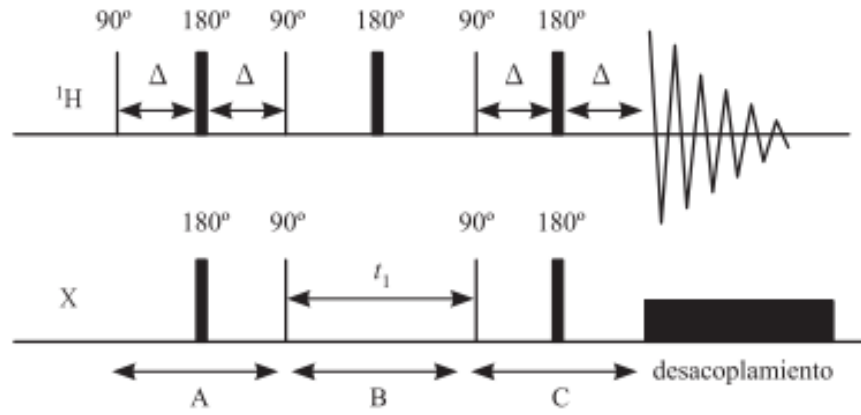


Fuente: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución: una herramienta fundamental en Química y Biología Estructural, 2011, página 48.

Figura 1-29. Esquema general de la frecuencia de pulsos en un espectro 2D.

Los principales y más usados experimentos 2D homonucleares ($1H-1H$) son: COSY (correlation spectroscopy), TOCSY (total spectroscopy) y NOESY. En el primero de ellos, se obtienen correlaciones cruzadas (picos fuera de la diagonal) entre señales correspondientes a protones acoplados escalarmen- te. En el segundo, mediante una combinación adecuada de pulsos de rf, se consigue crear una situación de fuerte acoplamiento entre protones acoplados entre sí, lo que da lugar a la observación de señales entre sistemas completos de spines, de gran utilidad en la asignación de segmentos moleculares que se extienden a lo largo de tres o más átomos de carbono. Por último, en el espectro NOESY se observan correlaciones cruzadas entre protones cercanos en el espacio cuya intensidad proporciona información acerca de la distancia que los separa.

Del mismo modo que se obtiene un espectro de correlación homonuclear, es posible plantear la obtención de espectros de correlación del $1H$ con algún heteronúcleo, por ejemplo, ^{13}C o ^{15}N . El experimento más corrientemente utilizado es el denominado HSQC (heteronuclear single-quantum correlation) [26].



Fuente: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución: una herramienta fundamental en Química y Biología Estructural, 2011, página 49.

Figura 1-30. Esquema general de la frecuencia de pulsos en el espectro HSQC.

Los experimentos en 2D realizados en esta investigación son:

- HSQC: Correlación de núcleos heteronucleares por su acoplamiento químico a un enlace de distancia (^1J)
- HMBC: Correlación heteronuclear a dos y tres enlaces de distancia (^2J Y ^3J respectivamente) [27].

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 EQUIPOS Y MATERIALES

2.1.1 Equipos

- Balanza analítica SARTORIUS, modelo 2462
- Balanza granataria OHAUS
- Calefactor eléctrico HEIDOLPH, modelo MR-1
- Estufa eléctrica MEMMERT
- Rotavapor BÜCHI, modelo R-100
- Espectrómetro de RMN ^1H , ^{13}C , BRUKER, modelo Ac-400
- Plancha calefactora CIENTEC, modelo Nuova II
- Centrífuga

2.1.2 Materiales

- Balones de vidrio con boca esmerilada
- Cámara de vidrio para cromatografía en capa fina
- Capilares de vidrio
- Columnas de vidrios de diferentes diámetros y largos
- CCF Sílica gel 60 F254 MERCK
- CCF Alúmina tratada (determinación de alcaloides)
- Pipetas Pasteur glass, 145 mm ISOLAB
- Matraz Erlenmeyer 50 y 250 mL
- Embudo de decantación
- Mortero de porcelana
- Viales de vidrio
- Material usual de laboratorio.

2.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES

2.2.1 Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado p.a, MERCK

- Ácido clorhídrico concentrado p.a, MERCK
- Hidróxido de sodio p.a, MERCK
- Acetona técnica, purificada por destilación a 56.5 °C
- Diclorometano técnico, purificado por destilación a 40°C
- Metanol técnico, MERCK, purificado por destilación a 65°C
- Acetato de Etilo, purificada por destilación a 77.1°C
- Hexano, purificado por destilación a 80.7°C
- Sílica gel 60 (0,040 – 0,063), MERCK
- Alúmina MERCK
- Anhídrido Acético p.a, MERCK
- DMAP (dimetilaminopiridina)
- Piridina p.a, FLUKA.

2.2.2 Soluciones

- Solución reveladora de H₂SO₄ al 10% v/v
- Solución eluyente de acuerdo a distintas polaridades
- Solución reveladora de Drogendorff
 - Solución stock A: 0,85 g nitrato de bismuto + 10 ml de ácido acético concentrado + 40 ml de agua
 - Solución stock B: 8 g de yoduro de potación en 20 ml de agua
 - Solución reveladora: 1 ml de (A+B) + 2ml de ácido acético concentrado + 10 ml de agua [28]

2.3 **SEPARACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

2.3.1 Recolección y tratamiento previo

- La muestra es recolectada en Vallenar, III Región de Chile en la época de floración correspondiente al año 2015.
- Para el análisis fitoquímico se utiliza la parte aérea vegetativa de la planta sin incluir las vainas y sus semillas (cachos).
- La parte aérea se deja secar a temperatura ambiente.
- Una parte de la muestra es llevada al herbario institucional para la confirmación de la especie.
- Se realiza la limpieza de la planta de ciertos vegetales que no

correspondan a la especie.

- Finalmente se realiza la trituración de la muestra.

2.3.2 Extracción

Una vez triturada la muestra, esta es depositada en maceradores. El proceso de maceración permite la extracción de los compuestos de interés mediante la afinidad que estos posean frente a un determinado solvente.

Se deposita la muestra en un macerador con tapa y se realiza la maceración con solventes de polaridad creciente comenzando con hexano (apolar), luego diclorometano (medianamente polar) y finalmente etanol (polar). El contacto de la muestra con cada solvente tiene una duración de tres días. Pasado este límite de tiempo es necesario retirar el solvente abriendo la llave del macerado.

Posteriormente se realiza la evaporación a sequedad del solvente utilizado en el rotavapor. Una vez terminado este proceso se obtiene el extracto crudo por cada solvente, el cual está listo para el análisis.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 2-1. Maceración de *S. acutus*.

2.3.3 Separación de metabolitos

En esta investigación se utilizan dos técnicas cromatográficas las cuales son:

- a) Cromatografía en columna (CC)
- b) Cromatografía en capa fina (CCF)

2.3.3.1 Cromatografía en columna (CC)

Esta técnica se emplea para la separación y purificación de compuestos presentes en extractos de acuerdo con la afinidad que posean con el eluyente.

Previo a esta técnica es necesario realizar un estudio a menor escala para determinar condiciones cromatográficas que se puedan replicar en CC. La CCF es capaz de soportar condiciones cromatográficas complejas por lo cual permite conocer también la elución adecuada para una separación óptima.

Procedimiento:

- a) Para comenzar es necesario determinar la cantidad de muestra a separar. Esta permite escoger el diámetro adecuado de la columna a utilizar.
- b) Una vez escogida la columna, se monta en el soporte universal de manera tal que esté completamente derecha con la ayuda de pinzas. Esto permite que no haya dificultades en la elución ni en el depósito del relleno de la columna.
- c) Antes de agregar el relleno se coloca una bola de algodón o lana de vidrio en la boquilla de la columna. Esto actúa como filtro e impide que la muestra separada se contamine con el relleno de la columna. La lana de vidrio se utiliza cuando los compuestos a extraer son muy polares.
- d) Luego de poner el algodón se adiciona el soporte en la columna. La función que cumple es evitar que se genere lo que se denomina como cuello de botella lo que permite que una vez separados los compuestos, estos no se vuelvan a juntar.
- e) Una vez finalizada la adición del soporte es momento de incorporar a la columna la fase estacionaria. Para este análisis se utiliza gel de sílice o alúmina lo que permite la separación de compuestos mediante el tiempo de retención de cada uno.
- f) En este momento es necesario compactar la columna. Este proceso se realiza para retirar el aire entre las partículas de sílica ya que estas intervienen en la elución. Este punto se realiza generalmente con hexano 100%.
- g) Luego se adiciona arena como medio filtrante y como soporte para sembrar la muestra.
- h) Una vez realizado este proceso es momento de adicionar la muestra. Esta puede añadirse a la columna en forma de papilla (muestra disuelta en sílica) o líquida (muestra disuelta en solvente)
- i) Finalmente se cubre la muestra con unos pequeños cm de sílica con el fin de proteger la muestra y se deposita sobre esto una bola de algodón que permite que no se dañe el sembrado al adicionar el eluyente además de que mantiene la columna húmeda.
- j) Por último, se adiciona el eluyente adecuado para la elución de los

compuestos presentes en la muestra, se abre la llave de salida y se recoge en viales de vidrio.

k) Una vez eludida la columna se utiliza una bomba de vacío para secar la sílica que posteriormente es depositada en un contenedor especial para ese tipo de desechos.

En la figura 2-2 se aprecia una columna cromatográfica en elusión.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 2-2. Separación por cromatografía en columna

2.3.3.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina es una de las principales técnicas cualitativas para establecer parámetros a menor escala que favorezcan la separación de compuestos dependiendo de una serie de factores como el disolvente a utilizar.

A grandes rasgos, lo que rige esta técnica es la separación por polaridad. La placa cromatográfica tiene adherida una película fina de sílica gel en la cual se siembra la muestra y se eluye con el disolvente adecuado. que permite la separación de analitos.

Procedimiento:

1. Se siembran la muestra a separar en la línea base de siembra con un capilar fino.

2. La placa es depositada en la cámara de elusión que posee el disolvente que se utilizara para la separación. Es necesario que el solvente no sobrepase la línea de siembra base de sembrado al momento de depositar la placa dentro de la cámara. Se deja secar o bien puede utilizarse un secador.

3. Se verifican los compuestos que revelan a ultravioleta.

4. Se revela la cromatoplaca en H_2SO_4 al 10% v/v.

5. Finalmente la placa es quemada sobre una plancha calefactora para provocar la carbonización y poder observar los compuestos.

2.4 EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN *S. ACUTUS*

Se realiza la maceración de los extractos de hexano, diclorometano y etanol obteniendo una masa total de:

- Extracto de hexano: 28,6 g
- Extracto de diclorometano: 46,9 g
- Extracto etanólico:
 - Extracto acetato de etilo/etanol stock: 35,9 g
 - Extracto acetato de etilo/etanol básico: 3,2g
 - Extracto acetato de etilo/etanol ácido: 8,9 g

De acuerdo con datos bibliográficos, el estudio se realiza en busca, como primera instancia, de caracterizar metabolitos nitrogenados reportados utilizando una técnica distinta a la utilizada en 1976.

Para esto se realiza un análisis cualitativo con TLC de los 3 extractos utilizando el reactivo de Dragendorff como solución reveladora como se observa en la figura 2-3.

Se determina así, que la presencia de alcaloides se concentra en el extracto etanólico.

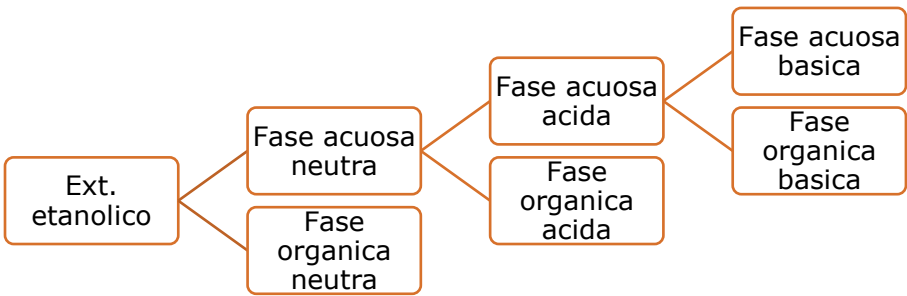


Fuente: Elaboración propia

Figura 2-3. Cromatopla de los 3 extractos revelada con H₂SO₄ al 10% y con Dragendorff.

Como el extracto etanólico se encuentra en solución sin concentrar y con presencia de agua se realiza una extracción con acetato de etilo para evitar que el agua dañe la separación posterior. Además, estas extracciones se realizan modificando el pH porque los alcaloides tienden tanto a soluciones acidas como básicas.

Se extraen los compuestos con acetato de etilo obteniendo la parte orgánica (fase orgánica stock o neutra), la acuosa es llevada a pH ácido (pH=2) realizando nuevamente extracción obteniendo una nueva fase orgánica, pero acida. Finalmente se realiza la última extracción llevando la fase acuosa anterior a pH 10 obteniendo una fase orgánica básica. El procedimiento se ve resumido en la figura 2-4.

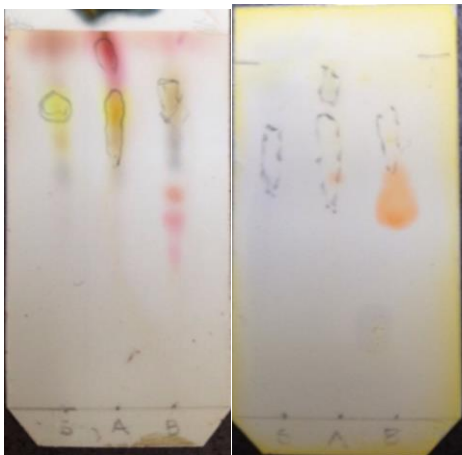


Fuente: elaboración propia

Figura 2-4. Esquema de la extracción realizada con acetato de etilo del extracto etanólico.

Mediante el estudio de estas extracciones con TLC se determina la presencia de alcaloides en el extracto orgánico básico (véase figura 2-5), sin embargo, para realizar la separación de estos metabolitos se requiere de tiempo de estudio

experimental adicional para desarrollar una técnica efectiva que permita la separación ya que la cantidad de muestra obtenida no es tan elevada.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 2-5. Cromatopla de la fase orgánica obtenida en la extracción liquido - liquido revelada con H₂SO₄ Y Dragendorff respectivamente.

Es por esto que se trabaja primeramente con el extracto orgánico stock ya que presenta compuestos relevantes para la investigación de acuerdo a la cromatopla.

La primera separación cromatográfica se realiza tomando 10 g del extracto orgánico stock los cuales depositan en una columna cromatográfica y se eluyen con cambios de polaridad creciente.

- 50% acetato de etilo/ hexano
- 100% acetato de etilo
- 20% acetona/ acetato de etilo

Se obtiene un total de 120 viales que se separan en 11 fracciones descritas a continuación:

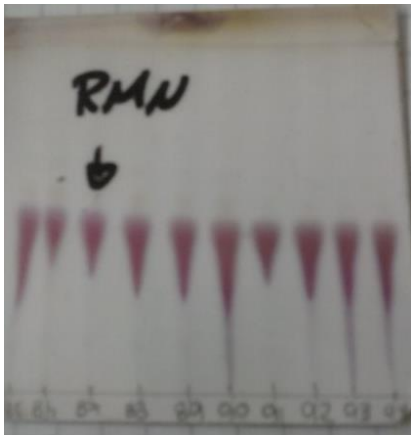
Tabla 2-1. Fracciones obtenidas de la columna 1

FRACCIONES COLUMNA 1	
F1C1	2.5890 g
F2C1	0.5817 g
F3C1	0.1271 g
F4C1	0.0705 g
F5C1	0.0963 g
F6C1	0.0897 g
F7C1	0.0897 g
F8C1	0.0653 g
F9C1	0.4386 g
F10C1	0.7474 g
F11C1	0.1255 g

Fuente: Elaboración propia

A partir de estas fracciones se realizan las siguientes separaciones cromatográficas purificando metabolitos de interés.

La purificación de F1C1 (2.5890 g) se efectúa mediante CC eluyendo la columna al 20% acetato de etilo/hexano logrando la separación de un metabolito de interés en el vial 87 (ver figura 2-6) el cual se envía a análisis de RMN con el rotulo "vial87 (C2)".



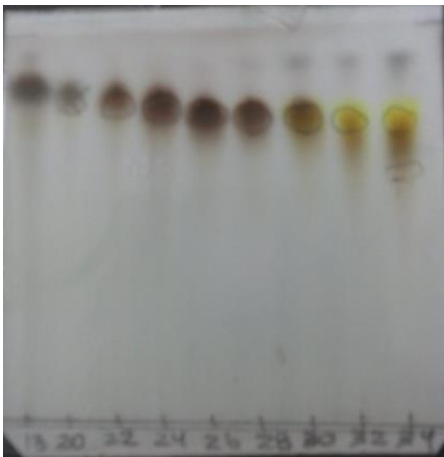
Fuente: Elaboración propia

Figura 2-6. Cromatoplaqa de viales obtenidos en la columna 2.

Se realiza la siguiente columna utilizando F10C1 la cual es derivatizada realizando una acetilación de la fracción.

Inicialmente se tienen 747.4 mg de la fracción los cuales pasan por reacciones de derivatización con CH₂Cl₂ más anhídrido acético y DMAP como catalizador obteniendo 1036.5 mg como producto final la cual es separada cromatográficamente eluyendo la columna 50% acetato de etilo/hexano.

De esta columna (C4) se obtienen 114 viales. El vial 28 presenta mediante TLC gran interés (véase figura 2-7) por lo cual es enviado a análisis completo de RMN rotulado como "vial 28 (C4)".



Fuente: Elaboración propia

Figura 2-7. Cromatoplaqa de viales de la columna 4.

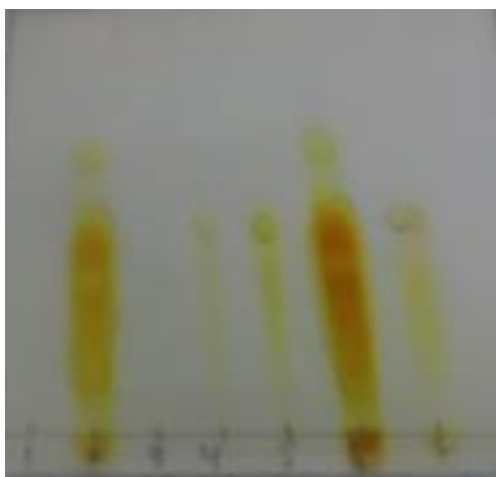
Las características similares de los siguientes viales frente a la cromatoplaque permiten la agrupación de estas masas en una fracción denominada F12C4 (desde el vial 43 hasta el 108) la cual es purificada por cristalización.

Inicialmente la masa de la F12C4 es de 446,9 mg a la cual se le realiza el proceso de cristalización probando la solubilidad que esta posee con distintos solventes.

Primeramente, se trata con éter caliente obteniendo un sobrenadante (2) y una parte insoluble (1). Se recrystaliza 1 con hexano/acetato 50% en caliente obteniendo un sobrenadante (3) y una parte insoluble que sigue siendo 1.

Se lava el cristal 1 con éter frío obteniendo un sobrenadante (4) y una parte insoluble que sigue estando en 1. Se realiza una recrystalización del sobrenadante (4) y del producto insoluble (1) obteniendo un vial (5) y (6) respectivamente. Finalmente se limpia el compuesto insoluble con éter y se separa en un vial 7.

Se realiza una cromatoplaque para el seguimiento de la purificación concluyendo que la cristalización no logra separar los metabolitos por lo que es necesario realizar una nueva columna cromatográfica (ver figura 2-8).



Fuente: Elaboración propia

Figura 2-8. Cromatoplaque de los viales pertenecientes a la cristalización.

Se realiza la purificación vía cromatografía en columna de F12C4 utilizando 326.1mg de muestra la cual se eluye con 50% acetato/hexano obteniendo un total de 158 viales. De acuerdo a la cromatoplaque se juntan en viales y la fracción X que corresponde a los viales desde el 40 al 42 la cual es enviada a un análisis completo de RMN rotulada como "fracción 40-42 (C5)".

Una vez realizados estos análisis se trabaja con el extracto etanólico básico para la obtención de alcaloides por cromatografía.

Se tienen 3,2g de muestra la cual se realiza nuevamente una extracción ácido-base con acetato de etilo como solvente para lograr purificar aún más el extracto que se analiza.

La extracción a distintos pH provoca que compuestos presentes inicialmente en el extracto orgánico básico se separaran de los alcaloides y así facilitar la extracción, es por esto que se realiza una 8ava columna en la cual hay metabolitos de interés que son atractivos ópticamente.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 2-9. Separación de la fase orgánica y acuosa del extracto básico.

Se realiza la columna cromatográfica de la fase orgánica ácida de la extracción de alcaloides de la fracción básica inicial utilizando 628,5 mg de extracto eluyendo la columna primeramente con 50% acetato de etilo/hexano, 100% acetato de etilo, 2% acetato de etilo/metano y finalmente utilizando gradiente hasta llegar a 15% acetato de etilo/ metano. Se obtiene un total de 121 viales los cuales se agrupan en fracciones de acuerdo a características frente a la cromatopla. Se realiza la purificación del vial 110 ya que presenta solo dos manchas en la cromatopla: una debido a partículas sólidas blancas y otra debido a un adherente amarillo. Se limpia con metanol utilizando un centrifuga para lograr la decantación del sólido y se separa en sobrenadante1 y sobrenadante 2. Se concluye que el sobrenadante 2 presenta una muestra alto grado de pureza por lo tanto es enviado a un estudio completo de RMN con la rotulación "vial 110 (C8) sobrenadante2"

Finalizando el trabajo experimental se realiza separación de compuestos nitrogenados. De acuerdo con experimentos de TLC de sílica el compuesto no sube de la línea de sembrado con solventes altamente polares como metanol por esto, se realiza el análisis de TLC con alúmina comprobando que se logran separar 3 manchas reveladas con Dragendorff a elusión de polaridad baja.

Es por esto que la columna cromatográfica se realiza en condiciones diferentes a las realizadas anteriormente. El relleno de la columna se realiza con alúmina para lograr la separación que indican las cromatoplas. Se utiliza una masa de 249,7mg y se eluye con 100% hexano, avanzada la cromatografía se eluye con 50% acetato de etilo/ hexano, 100% acetato de etilo, 5% metanol/acetato de etilo y desde esa relación se trabaja en gradiente hasta eluir con 10% metanol/acetato de etilo.

Lamentablemente no se logra una buena separación cromatográfica ya que la masa utilizada para la purificación de analitos no era la suficiente para obtener metabolitos que pudieran ser analizados por RMN.

2.5 **ESPECTROSCOPIA DE COMPUESTOS AISLADOS**

2.5.1 Vial 87 (C2)

- El compuesto presente en vial presenta una coloración rosa en la cromatoplaça en forma de cometa al ser revelada con ácido sin embargo no revela a UV.
- Soluble en acetato de etilo por lo tanto el análisis espectroscópico se mide en cloroformo deuterado.

Tabla 2-2. ¹H-RMN para vial 87 (C2)

Señal	δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)
a	5,28	1	t	3,5
b	3,22	1	dd	4,6-11,2
c	2,82	1	dd	3,8-13,7
d	1,98	1	td	4,0-13,7
e	1,88	2	td	3,6-6,9
f	1,72	1	dd	4,2-10,1
g	1,65	2	m	-
h	1,60	6	m	-
i	1,54	5	m	-
j	1,43	2	m	-
k	1,36	2	dd	3,4-12,7
l	1,29	2	dd	2,9-12,7
m	1,24	2	d	9,1
n	1,13	3	s	-
ñ	0,98	4	s	-
o	0,91	10	s	-
p	0,77	3	s	-
q	0,75	4	s	-

Fuente: elaboración propia

Tabla 2-3. ¹³C-RMN y DEPT 135 para vial 87 (C2)

Señal	Asignación	δ (ppm)	DEPT 135
1	28	182,62	-
2	13	143,57	-
3	12	122,64	CH
4	3	79,02	CH
5	5	55,20	CH
6	9	47,62	CH
7	17	46,50	-
8	19	45,86	CH ₂
9	14	41,60	-
10	18	41,00	CH
11	8	39,26	-
12	4	38,75	-
13	1	38,39	CH ₂
14	10	37,07	-
15	21	33,78	CH ₂
16	29	33,05	CH ₃
17	7	32,61	CH ₂
18	22	32,42	CH ₂
19	20	30,66	-
20	23	28,09	CH ₃
21	15	27,67	CH ₂
22	2	27,17	CH ₂
23	24	25,92	CH ₃
24	30	23,56	CH ₃
25	11	23,39	CH ₂
26	16	22,93	CH ₂
27	27	18,29	CH ₂
28	26	17,08	CH ₃
29	6	15,53	CH ₃
30	25	15,31	CH ₃

Fuente: elaboración propia

2.5.2 Vial 28 (C4)

- El metabolito presente en este vial es un compuesto proveniente de una columna previamente acetilada.
- Se presenta en la cromatoplaca como una mancha de color café al ser revelada con H₂SO₄ al10% y la cual revela en UV.

- Soluble en acetato de etilo por lo tanto se envía a un análisis completo de RMN utilizando cloroformo deuterado para la toma de espectros.

Tabla 2-4. ¹H-RMN para vial 28 (C4)

Señal	δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)
a	7,67	1	dd	4,4-5,1
b	7,24	1	s	-
c	7,23	1	d	1,0
d	5,32-5,30	1	dd	1,0-7,1
e	5,29	1	s	-
f	5,28-5,26	0,52+0,22	d	9,4
g	5,15	1	t	9,5
h	5,06	1	d	7,3
i	4,28	1	dd	12,3-5,2
j	4,17	1	dd	12,3-2,4
k	3,88	1	m	-
l	3,86	3	s	-
m	2,66	0,70	s	-
n	2,31	3	d	3,8
ñ	2,26	0,77	d	3,6
o	2,07	3	d	2,0
p	2,04	3	s	-
q	2,02	3	d	5,8
r	2,00	3	s	-
s	1,64	1	s	-

Fuente: elaboración propia

Tabla 2-5. ¹³C-RMN y DEPT 135 para vial 28 (C4)

Señal	Asignación	δ (ppm)	DEPT 135
1	1	170,48	-
2	-	170,10	-
3	9	169,45	-
4	-	169,36	-
5	-	168,84	-
6	8	164,55	-
7	4	149,38	-
8	-	140,38	-
9	7	126,13	CH
10	6	125,39	CH
11	-	124,88	-
12	5	119,80	CH
13	1'	101,45	CH
14	10	99,02	CH
15	3'	72,46	CH
16	2'	72,10	CH
17	2	70,58	CH
18	4	68,19	CH
19	3	61,80	CH ₂
20	-	52,32	OCH ₃
21	-	30,05	-
22	-	20,69	-
23	-	20,64	CH ₃
24	-	20,62	CH ₃
25	-	20,56	CH ₃
26	-	20,43	CH ₃

Fuente: elaboración propia

2.5.3 Fracción 40-42 (C5)

- Proveniente de una columna que pretende separar 3 metabolitos secundarios que revelan en amarillo frente a la cromatoplaca y además revelan frente a luz UV.
- Se logra la separación de uno de estos compuestos en la fracción 40-42 el cual es soluble en acetato de etilo por lo tanto se realiza el estudio espectroscópico completo de RMN con cloroformo deuterado.

Tabla 2-6. ¹H-RMN para fracción 40-42 (C5)

Señal	δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)
a	7,31	2	s	-
b	6,69	1	s	-
c	6,45	1	s	-
d	5,47	1	d	7,9
e	5,34	1	d	3,0
f	5,30	1	dd	8,1-10,4
g	5,11	1	dd	10,6-3,4
h	3,94	6	s	-
i	3,89	2	d	6,0
j	3,79	1	t	6,7
k	2,42	3	s	-
l	2,38	3	s	-
m	2,36	3	m	-
n	2,13	3	s	-
ñ	2,10	3	s	-
o	1,99	3	s	-
p	1,91	3	s	-
q	1,67	11	s	-

Fuente: elaboración propia

Tabla 2-7. ¹³C-RMN y DEPT 135 para fracción 40-42 (C5)

Señal	Asignación	δ (ppm)	DEPT 135
1	-	172,00	-
2	-	170,29	-
3	-	170,25	-
4	-	170,03	-
5	-	169,77	-
6	-	168,87	-
7	-	160,86	-
8	10	157,48	-
9	-	155,12	-
10	6-7	151,71	-
11	3	150,45	-
12	-	136,03	-
13	-	130,52	-
14	-	128,45	-
15	-	110,83	-
16	4	108,86	CH
17	1	106,16	CH
18	5-8	101,25	CH
19	9	99,65	CH
20	-	70,77	CH
21	-	70,57	CH
22	-	69,04	CH
23	-	66,93	CH
24	-	60,55	CH ₂
25	-	56,37	2 x OCH ₃
26	2	21,17	CH ₃
27	-	20,93	CH ₃
28	-	20,56	CH ₃
29	-	20,51	CH ₃
30	-	20,44	CH ₃

Fuente: elaboración propia

2.5.4 Vial 110 (C8) sobrenadante2

- La purificación del vial 110 con metanol logro la separación de dos compuestos que aparecían en la cromatoplaca y se estudió solo es de mayor interés.
- El metabolito revela frente al ácido sulfúrico como una mancha amarilla

en la cromatoplaaca y además revela frente a la luz UV.

- La solubilidad del metabolito aislado es elevada por lo tanto se realiza el estudio espectroscópico en RMN con metanol deuterado como solvente.

Tabla 2-8. ¹H-RMN para vial 110 (C8) sobrenadante2

Señal	δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)
a	7,57	2	S	-
b	6,42	1	D	2,1
c	6,20	1	D	2,1
d	5,41	1	D	7,8
e	3,93	6	S	-
f	3,82	3	DD	8,7-2,1
g	3,79		S	-
h	3,65	1	DD	11,1-5,7
i	3,61	1	D	6,4
j	3,57	1	m	-
k	3,48	1	T	6,1
l	3,26	7	T	1,5

Fuente: elaboración propia

Tabla 2-9. ¹³C-RMN y DEPT 135 para vial 110 (C8) sobrenadante2

Señal	Asignación	δ (ppm)	DEPT 135
1	2	164,6	-
2	4	161,7	-
3	-	157,0	-
4	8	147,4	-
5	5	134,2	-
6	-	120,5	-
7	6-7	106,7	CH
8	2'	102,7	CH
9	3	98,4	CH
10	1	93,3	CH
11	6'	75,9	CH
12	4'	73,6	CH
13	3'	71,8	CH
14	5'	68,6	CH
15	-	60,9	CH ₂
16	-	55,8	2 X OCH ₃

Fuente: elaboración propia

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

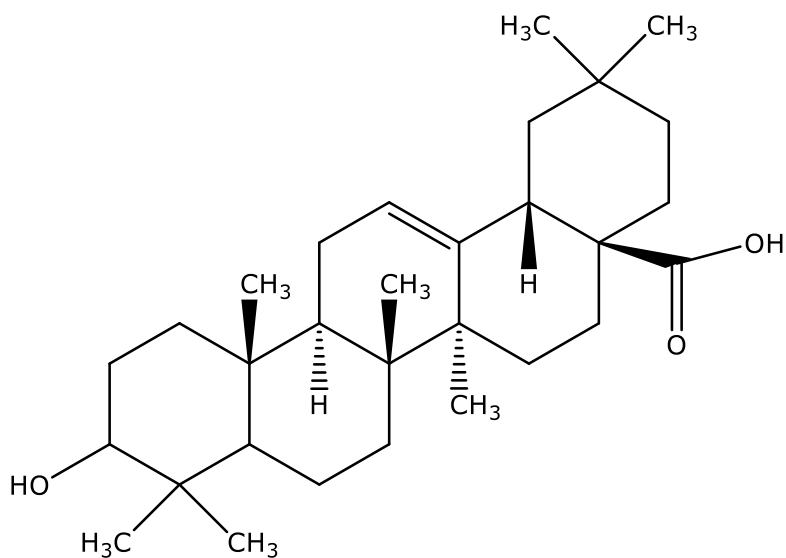
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. VIAL 87 (C2)

El compuesto aislado en esta columna proviene de la fracción 1 de la columna 1 (F1C1) del extracto etanólico.

Para la separación cromatografica se utilizó, como fase móvil hexano/acetato de etilo en la razón 8:2. Se obtiene un total de 242 viales los cuales se plaquean utilizando cromatografía en capa fina la cual permite reconocer una mancha en la placa de coloración púrpura con forma característica a la de un cometa en varios viales. Se envía a análisis de Resonancia Magnética Nuclear completo el vial más puro con el rótulo de "vial 87 (C2)".

De acuerdo a los datos obtenidos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT135, 2D-HSQC, 2D-HMBC complementados con información bibliográfica se determina que la muestra corresponde al metabolito secundario *ácido oleanólico* que tiene como estructura molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (ver figura 3-1).



Fuente: elaboración propia

Figura 3-1. Estructura molecular del ácido oleanólico.

De acuerdo a las señales en ^1H -RMN, el rango de desplazamiento químico de los pics va desde los 5,00 a 0,90 ppm. La primera señal aparece a δ 5,28 ppm como triplete integrando para 1 con constante de acoplamiento de 3,5 Hz. La siguiente señal aparece a un desplazamiento químico de δ 3,22 ppm como doble doblete integrando para 2 con una constante de acoplamiento de 4,6-11,2 Hz. A desplazamiento δ 2,82 ppm se encuentra un doble doblete con integración de 1.

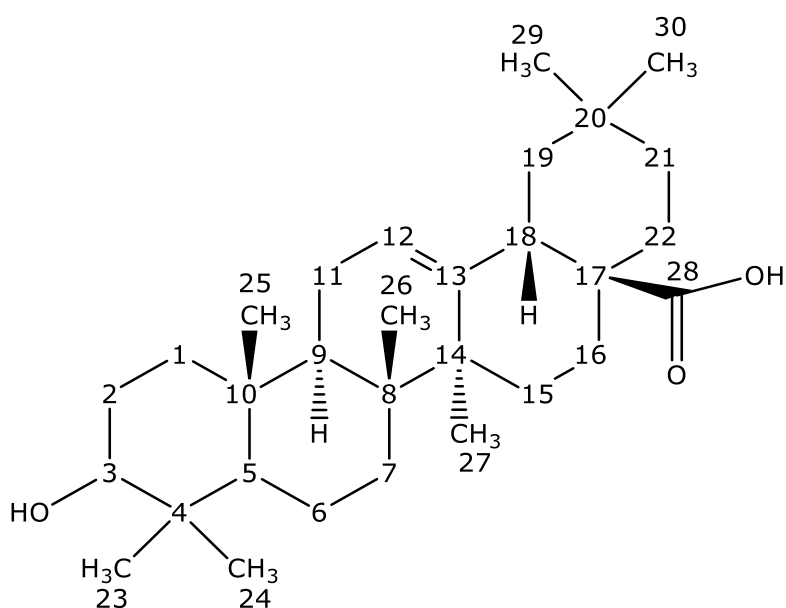
La siguiente señal aparece como triple doblete a un desplazamiento químico de δ 1,98 ppm integrando para 4,0-13,5 Hz. A δ 1,88 ppm se encuentra un siguiente triple doblete el cual presenta integración de 1 con constante de acoplamiento de 3,6-6,9 Hz. Posteriormente a δ 1,72 ppm se encuentra la siguiente señal como doble doblete integrando para 1 con constante de acoplamiento de 4,2-10,1 Hz.

Entre 1,65 ppm y 1,24 ppm existen señales complejas que dificultan la lectura del espectro identificado como multiplete.

Finalmente aparecen en el espectro 7 pics significativos que corresponden a la presencia de metilos en la estructura que están desplazados entre 1,13 y 0,90 ppm en forma de singletes.

De acuerdo al espectro de ^{13}C -RMN y DEPT 135 la primera señal del espectro corresponde a un carbono cuaternario a desplazamiento químico de δ 182,62 por lo que se le atribuye a la presencia de un carbonilo en la molécula. Los demás carbonos cuaternarios se encuentran ubicados a δ 143,57 ppm; δ 46,50 ppm; δ 41,60 ppm; δ 39,26 ppm; δ 38,75 ppm; δ 37,07 ppm; δ 30,66 ppm los cuales se encuentran ubicados en la molécula de tal manera que sostengan a las señales metilo. La estructura presenta, además, 5 carbonos terciarios (-CH), 10 carbonos secundarios (-CH₂) y 7 carbonos primarios (ramificaciones -CH₃)

Según información bibliográfica reportada anteriormente por el grupo de investigación del laboratorio [29] se determina mediante la similitud de espectros y señales que la molécula aislada corresponde a un triterpeno que presenta un grupo carbonilo y un grupo OH en su estructura. Esta información concuerda con la reportada anteriormente para la asignación de carbonos en la molécula (véase figura 3-2).



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-2. Asignación de carbonos en la molécula.

El ácido oleanólico (peso molecular: 456,7) es un triterpeno pentacíclico el cual está distribuido en una gran variedad de plantas en forma de ácido libre o gliconas formando parte de las saponinas. Se ha demostrado que estos metabolitos tienen un amplio espectro en el área de farmacología por lo que se han convertido en medicamentos promisorios de origen natural.

A continuación, se presenta la actividad biológica que posee el ácido oleanólico y el modelo de estudio que se desarrolló para verificar tal actividad (ver Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Actividad biológica del ácido oleanólico.

Actividad	Modelo de estudio
Anti-inflamatoria	Varios.
Cicatrizante	Lesiones gástricas crónicas en ratas macho Sprague- Dawley inducidas con ácido acético. Ratones macho con incisión de 1 cm.
Antitumoral	Línea celular de leucemia meloidal humana (HL60). Ratones macho ICR inoculados con células tumorales de sarcoma 180.
Hepatoprotectiva	Lesiones hepáticas inducidas con tetracloruro de carbono en ratones BALB/c machos.
Anti VIH	Línea de células T H9 infectadas con virus HIV-I.
Anticariogénica	<i>Streptococcusmutans</i> .
Anti-angiogénica	Embriones de pollo.
Anti-hipertensiva	Ratas Dalh macho sensibles a hipertensión (sal-sensibles).
Inmunomoduladora	Ratones BALB/c machos.

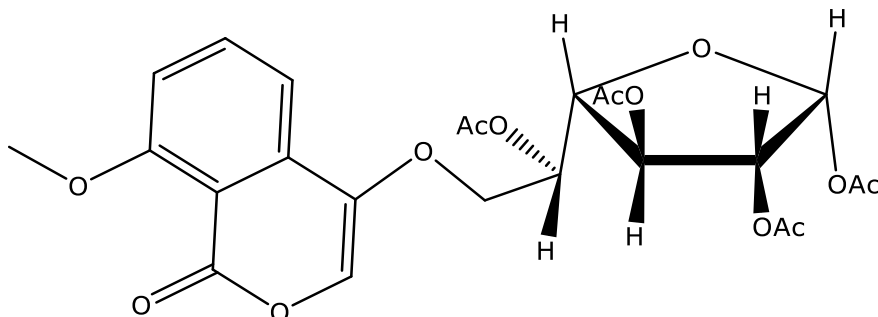
Fuente: Determinación de la cantidad de óxido nítrico mediante la técnica de Griess producido en células cancerígenas de mama (MCF-7) expuestas con ácido oleanólico de hiedra (*Hedera helix*) y valeriana (*Valeriana officinalis*)

3.2. VIAL 28 (C4)

El compuesto fue aislado de una fracción obtenida de la columna 1 (F10C1) del extracto etanólico mediante columna cromatográfica. Antes de realizar la columna 4, la fracción es acetilada ya que presenta alta polaridad lo que complica el aislamiento del compuesto.

Una vez realizada la derivatización de la fracción, esta se separa mediante una columna cromatográfica utilizando como fase móvil acetato de etilo/hexano en una razón de 1:1. Finalizada la separación se obtienen un total de 108 viales los cuales se plaquean en TLC obteniendo, de uno de ellos, una mancha llamativa de coloración café la cual es analizada espectroscópicamente con el rótulo de Vial 28 C4. El compuesto aislado es completamente soluble en acetato de etilo por lo que el análisis de RMN se realiza en cloroformo deuterado.

De acuerdo a los análisis realizados de ^1H -RMN, ^{13}C RMN, DEPT 135, 2D-HSQC y 2D-HMBC se determina que la estructura molecular de este compuesto es $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ y corresponde a un compuesto denominado "Compuesto A" de unidad principal Cromeno, el cual posee sustitución de un grupo metoxi y se encuentra adherido a un azúcar. A continuación, se ilustra de estructura molecular del compuesto (figura 3-3).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-3. Estructura molecular de "Compuesto A"

De acuerdo con el espectro de ^1H -RMN se observan 3 primeras señales a un desplazamiento químico entre δ 7,20– δ 7,70 ppm. La primera señal en el espectro se encuentra ubicada a δ 7,67 ppm y representada como doblete, integrando para uno, con una constante de acoplamiento de 4,4–5,1 Hz. La segunda señal aparece a δ 7,24 ppm como singlete con integración para uno. Finalmente encontramos a un desplazamiento químico de δ 7,23 ppm una señal de características de doblete integrando para 1 con constante de acoplamiento de 1 Hz. Con esta información se puede pensar, en una primera instancia, que la estructura molecular posee un anillo aromático, ya que, la región donde aparecen estas señales corresponde a la zona típica en la que se encuentran protones aromáticos.

Posteriormente se aprecian señales entre δ 5,00- δ 5,40 ppm donde cada una integra para uno. La primera se encuentra ubicada a δ 5,32- δ 5,30 ppm como doble doblete con una constante de acoplamiento de 1-7,7 Hz. La señal que está más próxima aparece a un desplazamiento químico de δ 5,29 ppm como singlete integrando para uno.

Se observan tres señales que poseen características similares a δ 5,28; δ 5,15; δ 5,06 ppm, pero cada una presenta distinta constante de acoplamiento 9,4; 9,5; 7,3 respectivamente. Para poder obtener una parte de la estructura a partir de estas señales es necesario realizar un estudio a fondo de las señales complementando la información de ^1H -RMN con ^{13}C -RMN, 2D-HSQC, 2D-HMBC.

En el espectro se observan además dos señales ubicadas en δ 4,17 y δ 3,88 ppm las cuales se encuentran desdobladas acoplando entre si integrando cada una para uno por lo que se podría tratar de la presencia de un carbono secundario en la molécula, hipótesis que se confirma con el espectro DEPT 135.

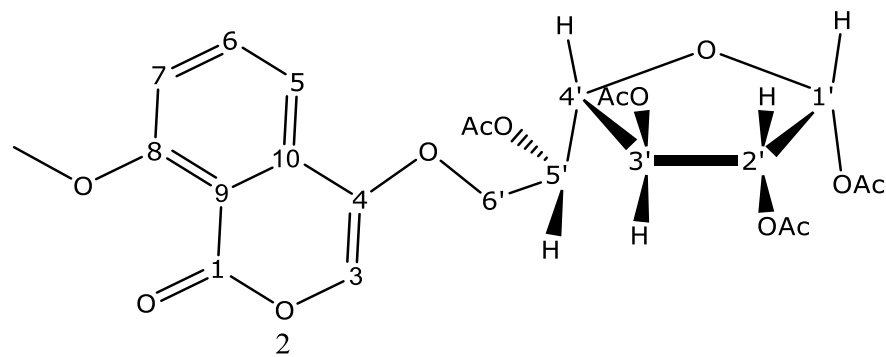
A la altura de δ 3,86 ppm aparece una señal característica de la presencia de un metoxi ya que esta se muestra como singlete integrando para dos que se encuentra desplazado por la presencia del oxígeno. Finalmente aparecen 4 señales de metilos en un rango de δ 2,30- δ 2,00 ppm cada uno integrando para 3 que corresponden al proceso de acetilación de la muestra.

El espectro de ^{13}C -RMN en conjunto con DEPT 135 indican la presencia de 9 carbonos cuaternarios desplazados entre δ 170 y δ 140 ppm. Luego aparecen tres señales de carbonos aromáticos a desplazamiento químico de δ 126, δ 125 y δ 119 ppm por lo que se confirma la presencia de un anillo aromático en la estructura tal como se menciona en ^1H -RMN. A δ 124 ppm se observa la presencia de un nuevo carbono cuaternario.

Posteriormente aparecen señales de carbonos terciarios ubicados en δ 119 y δ 101 ppm. Las señales que aparecen a continuación en el espectro ratifican la presencia de un azúcar ya que hay 4 señales que se encuentran en la región típica de carbonos carbinólicos (entre δ 72 y δ 68 ppm). A un desplazamiento de δ 62 ppm se observa en el espectro DEPT 135 una señal negativa por lo que se confirma lo mencionado en el espectro de protón ya que este carbono corresponde a un carbono secundario.

Finalmente se observan 5 señales correspondientes a metilos, sin embargo, una de estas señales se encuentra desplazada ubicándose en δ 30 ppm por lo que se confirma la presencia de un metoxi en la estructura. Las otras 4 señales se encuentran ubicadas alrededor de δ 20 ppm y corresponden a las señales de metilos provenientes de la acetilación.

Una vez obtenida esta información, más la descrita en el espectro de 2D-HSQC y 2D-HMBC se propone la siguiente estructura y numeración (ver figura 3-4).



Fuente: Elaboración propia.

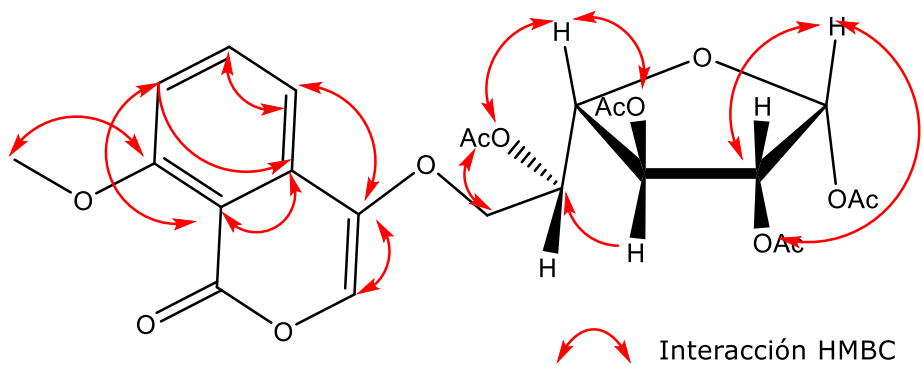
Figura 3-4: Asignación de carbonos en la molécula.

La confirmación de la molécula se realiza utilizando los espectros 2D-HSQC y 2D-HMBC mediante las interacciones a uno, dos, tres o cuatro enlaces (^1J , ^2J , ^3J , ^4J).

Se determina la posición del anillo aromático de acuerdo a la interacción entre los protones. El protón 6H muestra interacción a ^1J con el carbono 5. El protón 7H presenta interacción ^2J y ^3J con los carbonos cuaternarios que se encuentran uniendo ambos anillos y estos carbonos presentan relación entre sí. El protón 5H presenta interacción a ^2J con el carbono C4 por lo que confirma la posición de ambos anillos. Finalmente, la estructura aromática se confirma con los protones del metoxilo que presenta interacción ^3J con el carbono C8.

Las interacciones del azúcar se encuentran representadas en la figura 3-5. Cabe destacar que las interacciones de los protones ocurren con los carbonos cuaternarios del grupo acetilo.

La unión de ambas partes de la molécula se confirma con la interacción a ^3J que presentan los protones del carbono secundario con el carbono cuaternario del primero grupo acetilo de la molécula.



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-5: Interacción entre protón-carbono de acuerdo a espectro 2D-HMBC.

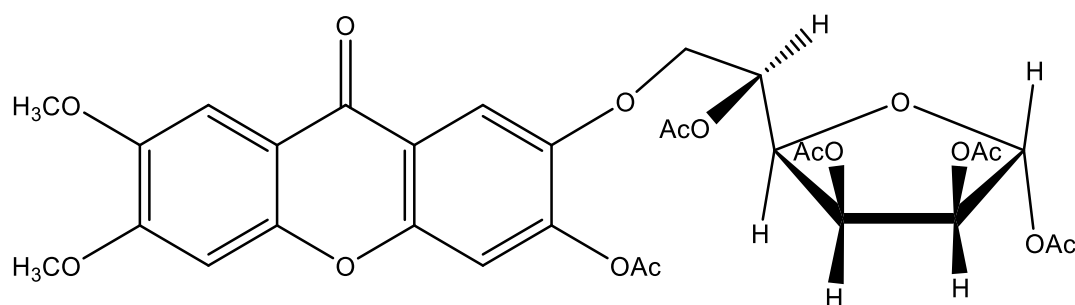
3.3. FRACCIÓN 40-42 (C5)

El compuesto es aislado a partir de una fracción proveniente de la columna 4 (F12C4) del extracto etanólico mediante cromatografía en columna. Cabe recordar que antes de realizar la columna 4 se realiza una derivatización por lo que la fracción aislada en la columna 5 esta acetilada.

Se realiza la separación cromatográfica utilizando como fase móvil acetato de etilo y hexano en razón 1:1 obteniendo un total de 159 viales los cuales se agrupan de acuerdo a características cualitativas de acuerdo a TLC.

Una de estas fracciones presenta una mancha de coloración amarilla que, además, revela en UV por lo que es enviada a análisis espectroscópico completo de RMN rotulada como "fracción 40-42 (C5)". Esta muestra es completamente soluble en acetato de etilo por lo que se realizan los análisis en cloroformo deuterado como solvente.

Una vez realizados los análisis de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT135, 2D-HSQC, 2D-HMBC y NOESY se concluye que la estructura molecular del compuesto es $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ y corresponde al compuesto denominado "Compuesto B" y su unidad principal Xanteno que se encuentra disustituido por dos grupos metoxi. Además, posee una sustitución de un grupo acetilo y un azúcar. La estructura se ve representada en la figura 3-6.



Fuente: elaboración propia.

Figura 3-6. Estructura molecular de "Compuesto B"

De acuerdo con los experimentos realizados se obtienen protones y carbonos correspondiente a la molécula utilizando espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

Primeramente, se realiza el estudio de ^1H -RMN observando la presencia de tres señales en un rango de δ 6,40 – δ 7,30 ppm. La primera de ellas se ubica a desplazamiento químico de δ 7,31 ppm, se encuentra integrando para dos y aparece en el espectro como singlete. Esta información es relevante ya que se puede intuir la posición de estos dos protones, si la señal se ve como singlete es muy probable que en la posición en la que se encuentran no posean vecinos por lo que los protones podrían estar rodeados por ramificaciones de la molécula. A la vez, si solo se ve una

señal para ambos protones se puede pensar en que la molécula posee simetría lo que provoca que ambos protones se vean iguales y aparezca en el espectro como un solo pic.

La segunda señal se encuentra en δ 6,69 ppm y aparece en el espectro como singlete integrando para uno. La tercera señal se ubica a un desplazamiento químico de δ 6,45 ppm apareciendo en el espectro como singlete integrando para 1.

El desplazamiento químico de estas señales hace pensar que la molécula presenta en su estructura más de un anillo aromático. Primeramente, la zona de desplazamiento químico típico de estructuras aromáticas se encuentra entre δ 6 y δ 8 ppm, por lo que, la cantidad de protones de estas características que posee la molécula y su ubicación dentro de la misma permite estimar al menos la presencia de dos anillos.

Posteriormente aparecen 4 señales entre δ 5,47 y δ 5,11 ppm las cuales integran todas para uno, por lo que se puede deducir a que corresponden primeramente a protones carbinólicos por el desplazamiento químico típico de estas señales. En segundo lugar, la integración de pics indica que cada señal corresponde a 4 carbonos terciarios por lo que esta molécula, al igual que la anterior, posee un azúcar en su estructura (información que debe ser contrarrestada con más ensayos).

Luego se tiene una señal a desplazamiento químico de δ 3,94 ppm que tiene multiplicidad de singlete e integra para 6. De esta información se puede deducir la presencia del grupo metoxi en la estructura molecular, ya que, el desplazamiento químico de la señal ronda los valores típicos de desplazamiento para este tipo de grupos. Además, se puede deducir que la molécula posee dos grupos metoxi, ya que la integración indica el doble de protones. Esta hipótesis puede confirmarse con información obtenida desde ^{13}C -RMN.

A δ 3,89 ppm se observa una señal que aparece como doblete integrando para dos por lo que se puede pensar en la presencia de un carbono secundario en la estructura molecular, información que se confirma con ^{13}C -RMN y DEPT135.

Finalmente aparecen señales correspondientes a metilos provenientes de la derivatización de la muestra siendo estos, 5 singletes que integran para 3 cada uno.

En el espectro de ^{13}C -RMN se aprecian primeramente 14 carbonos cuaternarios (información que se complementa con el espectro de DEPT 135). El primero de estos se ubica en δ 172 ppm y corresponde al primer carbonilo que forma parte de la estructura aromática ya que se encuentra en la zona típica de este tipo de enlaces y se diferencia de los carbonilos de los acetilos ya que se encuentra levemente desplazado. Las siguientes 5 señales se encuentran ubicadas dentro de un rango de δ 169 y δ 170 ppm, corresponden a carbonos cuaternarios provenientes de la acetilación de la muestra.

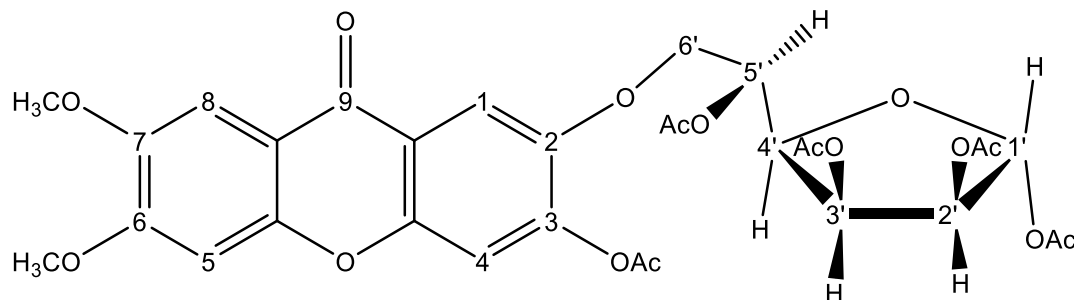
Complementando la información con el espectro 2D-HMBC se determina que las siguientes 8 señales corresponden a las uniones de los anillos y las ramificaciones que presenta la molécula (unión con el grupo metoxi, el azúcar y el grupo acetilo) Estas se encuentran ubicadas a desplazamiento químico entre δ 160 y δ 128 ppm.

Las siguientes 4 señales se encuentran entre δ 108 y δ 99,95 ppm, corresponden a carbonos aromáticos por lo que se confirma la presencia de más de un anillo en la estructura. Posteriormente se observa un carbono ubicado a 77,25 ppm y corresponde a un carbono terciario que se encuentra en una cadena ya que se encuentra desplazado en una zona típica de este tipo de enlaces.

Entre δ 70 y δ 66 ppm se encuentran 4 señales correspondientes a carbonos carbinólicos por lo que se confirma la presencia del azúcar en la molécula. A δ 60 ppm aparece una señal que corresponde a un carbono secundario, esta información de complementa con el espectro DEPT135 ya que esta señal aparece como un pic negativo. Se observa la presencia de la señal de un carbono a desplazamiento δ 56,37 a la que se le asocia el grupo metoxi, ya que, el desplazamiento químico es característico en este tipo de señales, además, el pic se ve el doble de alto respecto al resto de señales por lo que se confirma la presencia de dos grupos metoxi en la molécula que se encuentran solapados entre sí.

Finalmente aparecen 5 señales de metilos entre δ 21 y δ 20 ppm correspondientes a los acetilos de la derivatización de la muestra.

Toda esta información complementada con los espectros de 2D-HSQC y 2D-HMBC permite proponer una estructura y realizar la asignación de las señales como se observa en la siguiente figura.



Fuente: elaboración propia

Figura 3-7. Asignación de carbonos en la molécula.

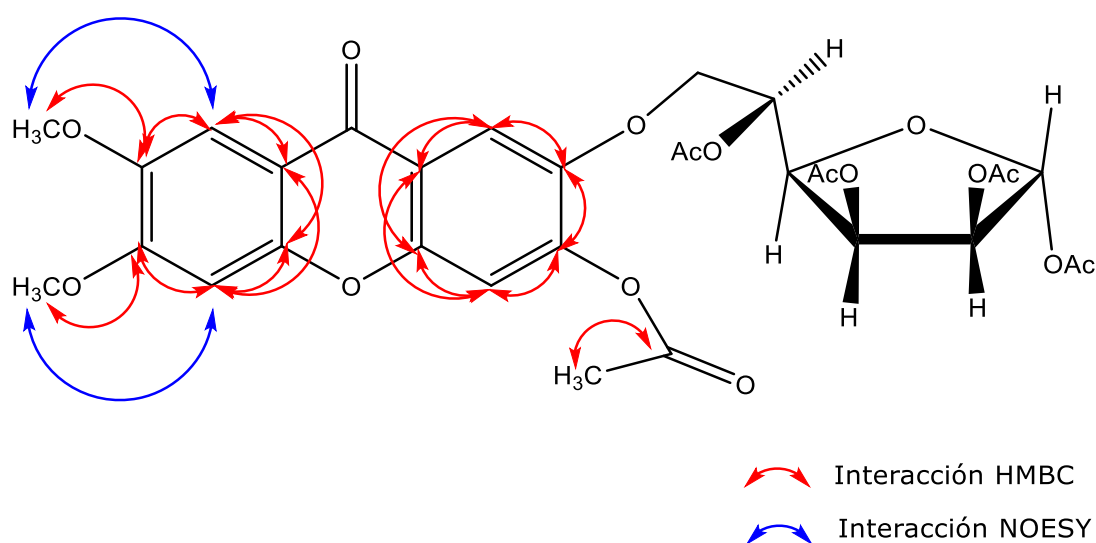
Para la asignación de carbonos y confirmación de la molécula se utilizan los espectros de 2D-HSQC, 2D-HMBC y NOESY los que entregaron información que se ilustra en la siguiente imagen (ver Figura 3-8). En ella se muestra la interacción protón-carbono hasta a 3 enlaces de distancia.

Como se observa en la figura, el protón H8 presenta interacción a ^2J con el C7 y con dos carbonos cuaternarios (a ^2J y ^3J) correspondiente a la unión con otro anillo. Igualmente, el protón H5 presenta interacción a ^2J con el carbono C6 y con dos carbonos cuaternarios (a ^2J y ^3J) por lo que se confirma la posición asignada para estos protones. Los protones de ambos grupos metoxi se encuentran interactuando a ^2J con el C6 Y C7 por lo que estas serían dos ramificaciones del anillo aromático antes

mencionado. Esto se confirma mediante el espectro NOESY el cual ilustra la interacción de las señales de protón con las del protón H5 Y H8.

Se observan también, interacciones a ^1J y ^2J en otro anillo de la estructura sin tener contacto con el anillo anterior por lo que se plantea y se confirma la presencia de un tercer anillo ubicado en el centro de ambos anillos aromáticos.

Finalmente se observa la molécula de azúcar, sin embargo, no se puede obtener información clara de esta parte de la estructura por que los espectros arrojan señales muy cercanas entre sí. Posteriormente no se pueden realizar más estudios ya que la muestra presenta deterioro por mal mantenimiento de la misma, aunque se puede confirmar que se trata de una pentosa por la cantidad de grupos acetilos que posee la muestra los cuales se ven reflejados en el espectro de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.



Fuente: elaboracion propia

Figura 3-8. Interacciones protón-carbono de acuerdo a 2D-HMBC y NOESY.

3.4. VIAL 110 (C8) SOBRENADANTE2

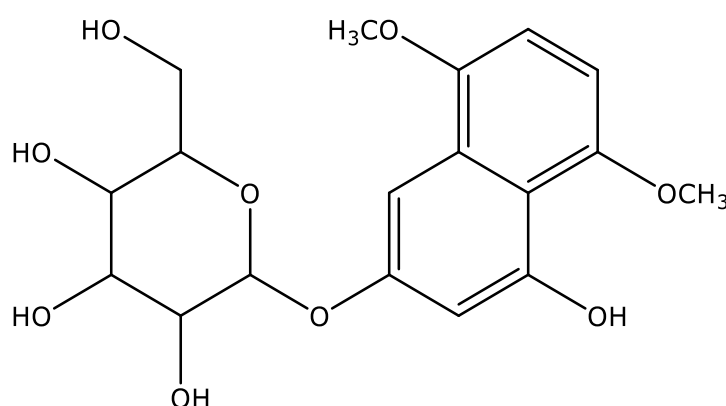
El siguiente compuesto se aísla a partir de la extracción de la fase orgánica básica. Se realiza el estudio mediante cromatografía en capa fina de la fase orgánica básica, la cual se extrae con acetato de etilo/agua generando cambios de pH para la purificación de la fracción obteniendo así una fracción de fácil separación, proceso que se realiza mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil, en una primera instancia acetato de etilo/hexano en razón 1:1. Luego se continua eluyendo con acetato de etilo 100%, posteriormente la elusión se realiza en gradiente con metanol hasta llegar a concentración del 2% metanol/acetato de etilo. Para finalizar se eluye a 5, 10 y 15% metanol/acetato de etilo progresivamente.

A partir de esta columna se obtienen un total de 121 viales logrando la separación de una mancha que revela en TLC de color amarillo. Este vial se envía a Resonancia Magnética Nuclear para ser analizado espectroscópicamente con el rótulo

de vial 110 (C8) sobrenadante². La polaridad del compuesto obtenido es alta por lo que el análisis en RMN se realiza usando metanol deuterado.

Según los análisis realizados de ^1H -RMN, ^{13}C RMN, DEPT 135, 2D-HSQC y 2D-HMBC se concluye que la estructura molecular de este compuesto es $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_9$ y corresponde al compuesto denominado "Compuesto C" el cual posee como estructura principal al Naftaleno que se encuentra disustituido por dos grupos metoxi y esta adherido a una azúcar.

El compuesto mencionado se representa en la siguiente imagen.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-9. Estructura molecular de "Compuesto C"

Se puede observar en el ^1H -RMN la presencia de tres señales ubicadas en desplazamiento químico típico correspondiente a protones aromáticos. El primero de estos se encuentra ubicado a δ 7,53 ppm con integración para 2 por lo que podemos pensar que la estructura posee cierta simetría. La siguiente señal aparece en el espectro a un desplazamiento de δ 6,40 ppm con integración 1 y constante de acoplamiento de 2,1 Hz. El último protón aromático se encuentra a desplazamiento δ 6,15 ppm con una constante de acoplamiento de 2,1 Hz por lo que se puede concluir que los dos protones anteriormente mencionados se encuentran acoplados entre sí y la posición dentro del anillo es asignación meta.

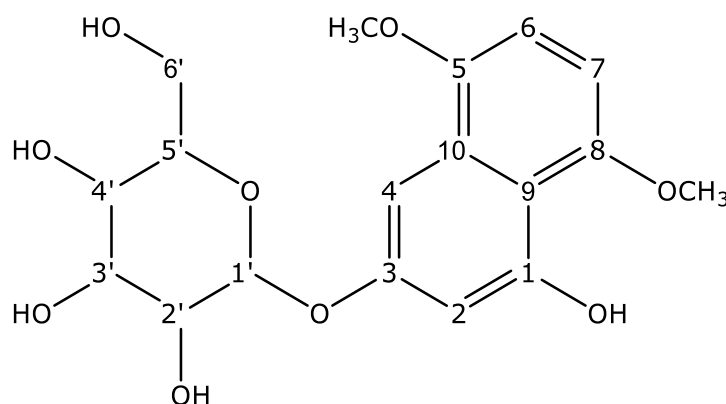
Se puede apreciar, además, una señal que aparece en el espectro como singlete a desplazamiento δ 3,93 ppm integrando para 6. Esta señal se puede asociar directamente a la presencia de metilos, sin embargo, la señal se encuentra desplazada por la presencia de oxígeno en la estructura.

Existen otras señales ubicadas entre δ 3,62 y δ 3,42 ppm las cuales requieren un estudio más a fondo para determinar a qué parte de la estructura corresponde. La información descrita en ^1H -RMN debe complementarse con ^{13}C -RMN u otro análisis.

De acuerdo a las señales de ^{13}C -RMN se aprecian señales a alto campo, siendo estos, asignados como carbonos cuaternarios lo cual se contrarresta con el espectro DEPT 135. Estos carbonos se encuentran entre desplazamientos de δ 165 y δ 120

ppm y corresponden a C1, C3, C5, C8. También se puede extraer del espectro que la molécula posee 4 carbonos aromáticos los cuales se encuentran en desplazamientos entre δ 107 y δ 93 ppm los cuales fueron asignados como C2, C4, C6 Y C7. Los carbonos asignados como C1', C2', C3', C4', C5', C6' poseen desplazamiento de entre δ 76 y δ 68 ppm y contrarrestado con las señales de ^1H -RMN se puede pensar a que se deben a la presencia de un azúcar en la molécula ya que las señales se encuentran en la regio típica de hidrógenos y carbonos carbinólicos (señales entre δ 3 y δ 4 ppm para ^1H -RMN; desplazamientos entre δ 60 y δ 80 ppm para ^{13}C -RMN). Para la identificación del CH_2 se utiliza el espectro de DEPT 135 ya que este indica claramente que la señal corresponde a un carbono secundario el cual es completamente visible en este ensayo. Para finalizar se tienen las dos señales de metoxi las cuales se encuentran super puestas en un desplazamiento de δ 55.8 ppm. Estos fragmentos se ubican en la molécula tras analizar los ensayos 2D.

La asignación de todos los carbonos en la molécula puede apreciarse en la siguiente figura.

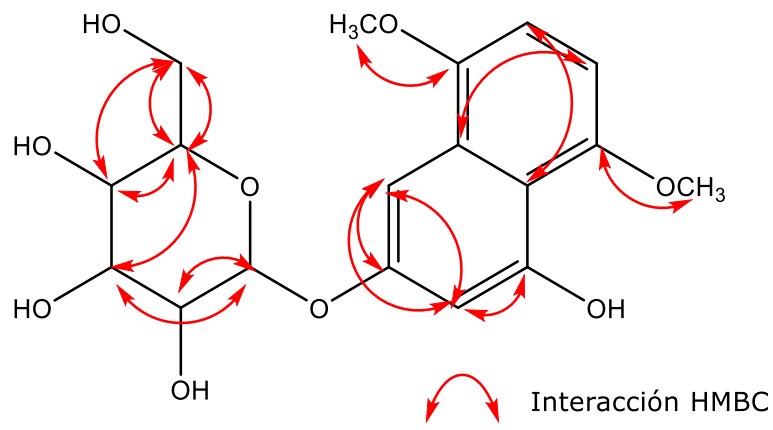


Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-10: Asignación de carbonos en la molécula.

En el espectro 2D-HMBC se aprecian las interacciones protón-carbono a ^1J ^2J y ^3J (a uno, dos o tres enlaces) lo que permite la confirmación de la estructura molecular. El protón ubicado en el C4 tiene interacción a ^3J y ^2J con el C2 y C3 respectivamente por lo tanto se confirma la presencia de los dos anillos y la ubicación de estos. Los protones ubicados en el C6 y C7 presentan interacción a ^3J con los carbonos cuaternarios ubicados en la unión de ambos anillos aromáticos. Las señales de protón que corresponden a metoxi presenta interacción a ^3J con el C5 y C8.

La confirmación de la hexosa se realiza mediante la interacción en HMBC tal como ilustra la Figura 3-12. El carbono secundario presenta interacciones con el azúcar de manera tal que los protones de este se encuentran a ^2J y ^3J con C5' y C6' respectivamente, información que se confirma con el espectro 2D-HMBC.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3-11: Interacción protón-carbono de acuerdo a 2D-HMBC.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La investigación realizada en este trabajo permite obtener compuestos de gran interés, ya que, están involucrados con el desarrollo de una especie. Estos compuestos pueden ser beneficiosos para el ser humano como, por ejemplo, que un metabolito posea capacidad antioxidante o insecticida.

De acuerdo con los objetivos planteados en una primera instancia se logra extraer, separar, aislar y caracterizar cuatro metabolitos secundarios pertenecientes a *S. acutus*. Estos compuestos no han sido reportados para la especie por lo que es necesario realizar estudios posteriores. Cabe destacar que tres de estos metabolitos no han sido estudiados con anterioridad.

Actualmente se conoce un sinnúmero de beneficios que genera el ácido oleanólico en el ser humano. Es de gran conocimiento el poder que ejerce este compuesto en la salud ya que es utilizado como antiinflamatorio, precursor para el mejoramiento del control muscular, regulador de la respuesta inmune, entre otros beneficios.

Los compuestos "Compuesto A", "Compuesto B" y "Compuesto C" no han sido estudiados por lo que se desconocen los beneficios que ejercen sobre las plantas y sobre los aportes al ser humano que estos podrían tener.

Para continuar con esta investigación se recomienda realizar un estudio a fondo de los metabolitos encontrados ya que es primordial determinar las funciones que cumplen estos en la planta, además, es necesario realizar estudios biológicos para orientar una futura investigación y para finalizar, se recomienda realizar estudios en los otros extractos debido a que se pueden caracterizar metabolitos nuevos que no fueron abarcados en esta investigación.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Ringuelet and S. Viña, *Productos naturales vegetales*. 2013.
- [2] E. González-Rocha and R. Cerros-Tlatilpa, "La familia Apocynaceae (Apocynoideae Y Rauvolfioideae) en el Estado De Morelos, México," *Acta Bot. Mex.*, vol. 110, pp. 21–70, 2015.
- [3] K. Reiche, *Estudios criticos sobre la flora de Chile*. 1903.
- [4] P. J. Rzedowski and G. Calderon de Rzedowski, "Apocynaceae," *Flora del Bajío y Reg. Adyacentes*, pp. 1–64, 1998.
- [5] C. Xifreda, M. Lopez, and L. J. Novara, "A P O C Y N A C E A E Juss .," no. 1900, 2007.
- [6] C. Acevedo and F. Olivares, "Guía Descriptiva. Flora y fauna de la región de Atacama," 2012.
- [7] I. Santos Sanz, C., "Especies Amenazadas," *Ambienta*, pp. 67–68, 2003.
- [8] G. Arancio, M. Muñoz, and F. A. Squeo, "Descripción de Algunas Especies con Problemas de Conservación en la IV Región de Coquimbo , Chile," *Ediciones Univ. La Serena*, vol. 6, pp. 63–103, 2001.
- [9] M. Aponte *et al.*, "Fitoquímicos," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2013.
- [10] A. Ávalos and E. García, "Metabolismo secundario de plantas," *Reduca Biol. Ser. Fisiol. Veg.*, vol. 2, no. 3, pp. 119–145, 2009.
- [11] C. Djerassi, J. P. Kutney, and M. Shamma, "Studies on skytanthus. The structure of the monoterpenoid alkaloid skytanthine," vol. 18, no. 1961, pp. 183–188, 1962.
- [12] D. Abbott and R. S. Andrews, *Introducción a la cromatografía*. 1966.
- [13] Skoog, West, Holler, and Crouch, *Fundamentos de la química analítica 9 edición*. 2014.
- [14] O. A. Quattrocchi, S. I. Abelaira, and R. F. Laba, "Introduccion a la HPLC," *Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica*. p. 405, 1992.
- [15] R. Levinson, "Chromatography," *Mod. Chem. Tech.*, pp. 116–159, 2001.
- [16] Unam, "Técnicas Cromatográficas," *Quim. Anal. Instrum. II*, pp. 1–123, 2007.
- [17] C. Meditsiiniline, "Chromatography," no. Figure 2, pp. 2–5, 2015.
- [18] O. Pindado, R. Pérez, S. García, and A. I. Barrado, "Desarrollo de Metodologías para la Determinación de Componentes Orgánicos del Aerosol Atmosférico," p. 78, 2006.
- [19] N. L. Allinger, *Química Orgánica Vol1*. 1979.
- [20] M. B. Colombo, C. C. Santiago, and A. Ponzinibbio, "Actividad catalítica de PEG-SO 3 H en reacciones de acetilación," 2015.
- [21] J. Clayden, *Organic Chemistry*, vol. second edi. 2001.
- [22] P. E. II, "Crystallization," pp. 1–9, 2014.
- [23] L. G. Wade, *Química orgánica, 9e. Vol. I*. 2017.
- [24] Departamento de Química y Física., "Resonancia Magnética Nuclear," *Qfiii*, vol.

- 1, pp. 1–36, 2012.
- [25] A. G. C. Maria Angeles Martinez Grau, "Técnicas experimentales en síntesis orgánica." p. 112, 2012.
- [26] M. Rico, "Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución : una herramienta fundamental en Química y Biología Estructural," *An. Quím.*, vol. 107, pp. 46–57, 2011.
- [27] F. del R. Portilla, "RMN en dos dimensiones," pp. 1–28, 2008.
- [28] E. Stahl, *Thin-Layer Chromatograph*. 2013.
- [29] K. Leon and C. Araya, "ESTUDIO QUÍMICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CALCEOLARIA UNIFLORA Y CALCEOLARIA VALDIVIANA," 2017.

ANEXOS

ANEXO A: GLOSARIO

Abayado: Semejante a la baya, de fruto carnosos y jugosos como la baya.

Actinomorfas: Se aplica a cualquiera de las partes u órganos de un vegetal que está dividido en dos partes simétricas por cualquier plano que pase por su eje y por la línea media de un sépalo o pétalo.

Angiospermas: Grupo de plantas fanerógamas cuyos carpelos forman una cavidad cerrada u ovario, dentro del cual están las semillas, las cuales, a su vez, se desarrollan protegidas en el interior del fruto.

Anteras: Parte del estambre de las flores, en forma de saquito, donde está el polen.

Cáliz: Conjunto de sépalos, normalmente de tono verdoso, que forman el envoltorio de una flor a la que protegen antes de abrirse.

Carpelo: Órgano reproductor femenino de las flores que contiene los óvulos.

Cimosas: Inflorescencia definida. Son aquellas cuyo eje principal produce una flor igual que los ejes secundarios que van naciendo a su costado.

Contorta: Tipo de prefoliación donde cada elemento del perianto cubre al siguiente y es cubierto por el anterior.

Corola: Conjunto de pétalos de las flores que les dan colorido y vistosidad.

Connivente: Hoja u órgano de una planta que está más o menos separado de otro por la base pero que por el extremo está muy próximo a él o incluso en contacto, aunque sin llegar a soldarse.

Dehiscencia: Apertura espontánea de un órgano llegado un momento. Existen en los frutos varios tipos de dehiscencia: loculicida, septicida, etc.

Drupáceo: aspecto de drupa. Fruto carnosos indehiscente, en general con forma globosa, que envuelve al hueso donde contiene la semilla.

Endosperma: Tejido nutritivo interno de las semillas.

Epipétalos: Dicho de un estambre, estaminodio, etc., que se encuentra dispuesto sobre un pétalo, que está inserto sobre él.

Estambre: Órgano masculino de una flor. Está compuesto de un filamento y una antera donde está depositado el polen.

Estipulas: Apéndice con forma de hoja que está situada en la base del peciolo, habitualmente suelen estar en parejas.

Hipocraterimorfa: Corola gamopétala y tubulosa, pero con un limbo patente como un platillo.

Inflorescencia: Conjunto de flores que tiene una planta dispuestas ordenadamente sobre un mismo eje.

Infundibuliforme: Dicho de una flor que tiene forma de embudo.

Lóbulos: Porción saliente y redondeada de una hoja u otro órgano de los vegetales.

Ovario: Parte basal del pistilo que contiene los primordios seminales donde se forman las semillas.

Ovario supero: Es el ovario localizado por encima del cáliz y de la corola.

Ovario semi-ífero: Dicho de un ovario, que está parcialmente inmerso en el eje floral.

Pantámeras: Estructura o verticilo formado por 5 piezas, o de la flor compuesta de corola y de cáliz integrados por 5 pétalos y 5 sépalos respectivamente.

Penacho: Conjunto de pelos presentes en la semilla que nacen del ápice de la testa.

Perianto: Conjunto de piezas estériles de una flor (cáliz y corola), las cuales dan cobijo y protección a las reproductoras (estambres y pistilos).

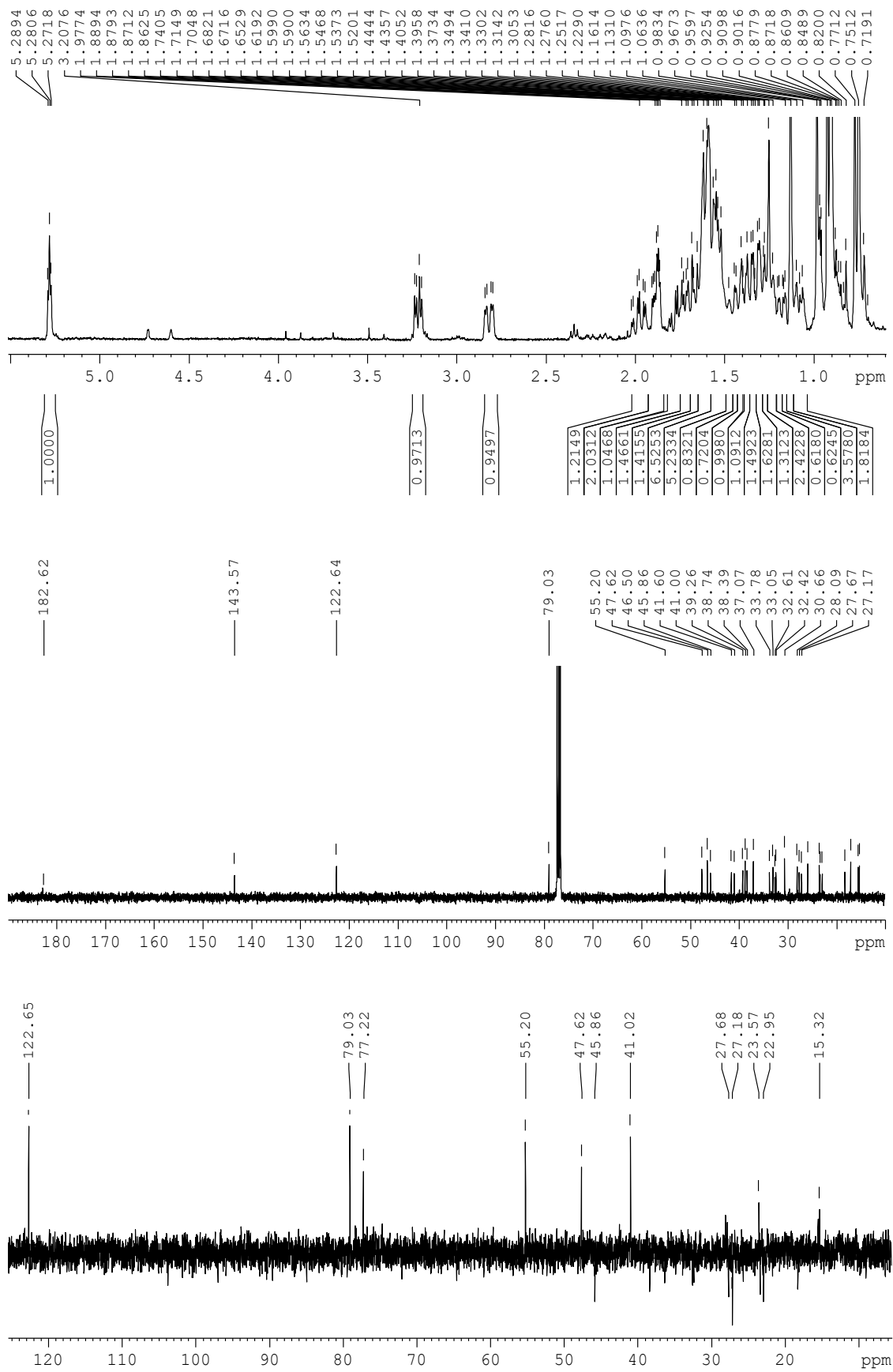
Placentación: Disposición de los óvulos en la cavidad del ovario de las angiospermas

Racemosas: Inflorescencia indefinida. Se produce cuando el ápice del eje no remata en una flor, y tiene un crecimiento indefinido.

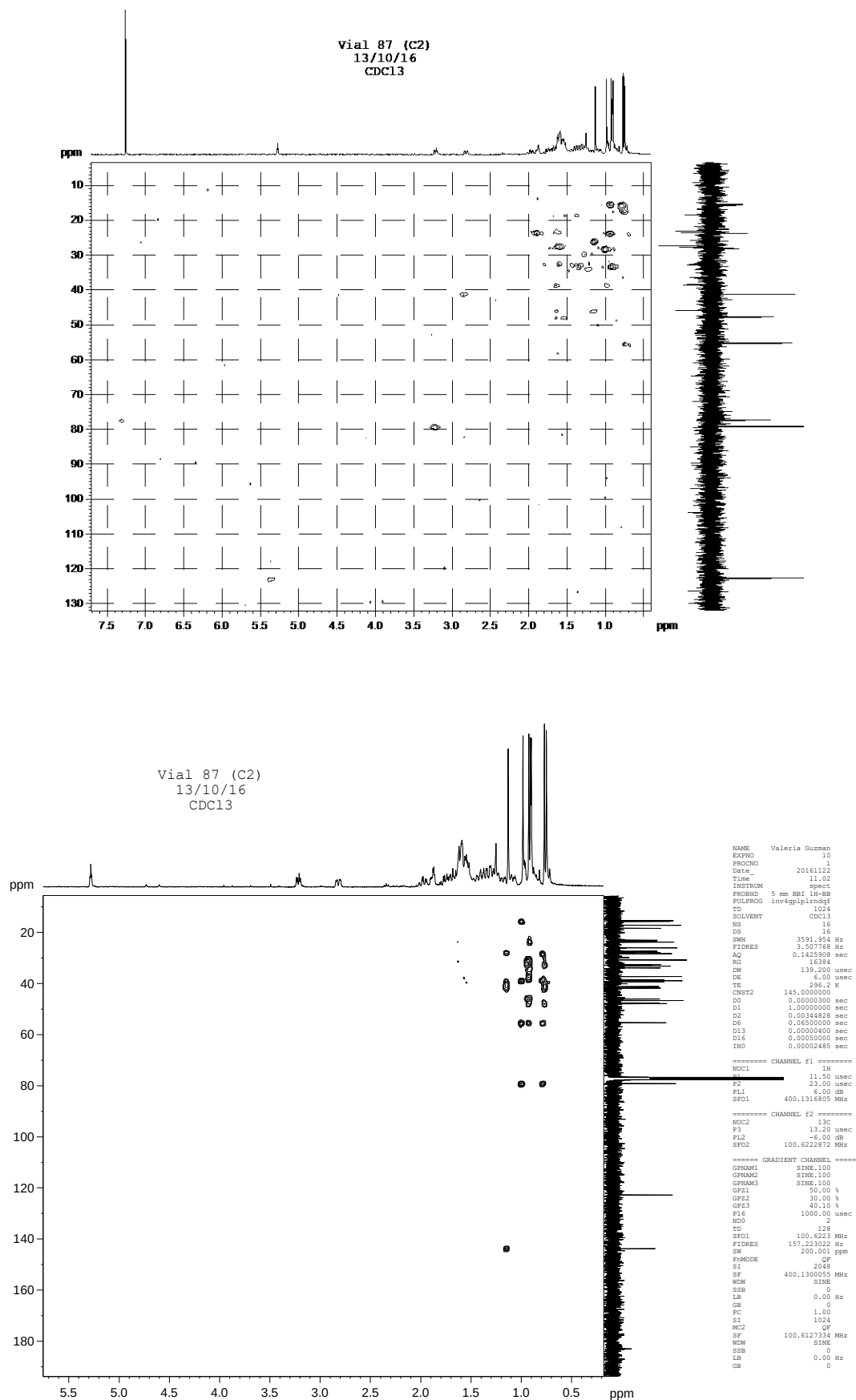
Simpétala: Que tiene los pétalos soldados.

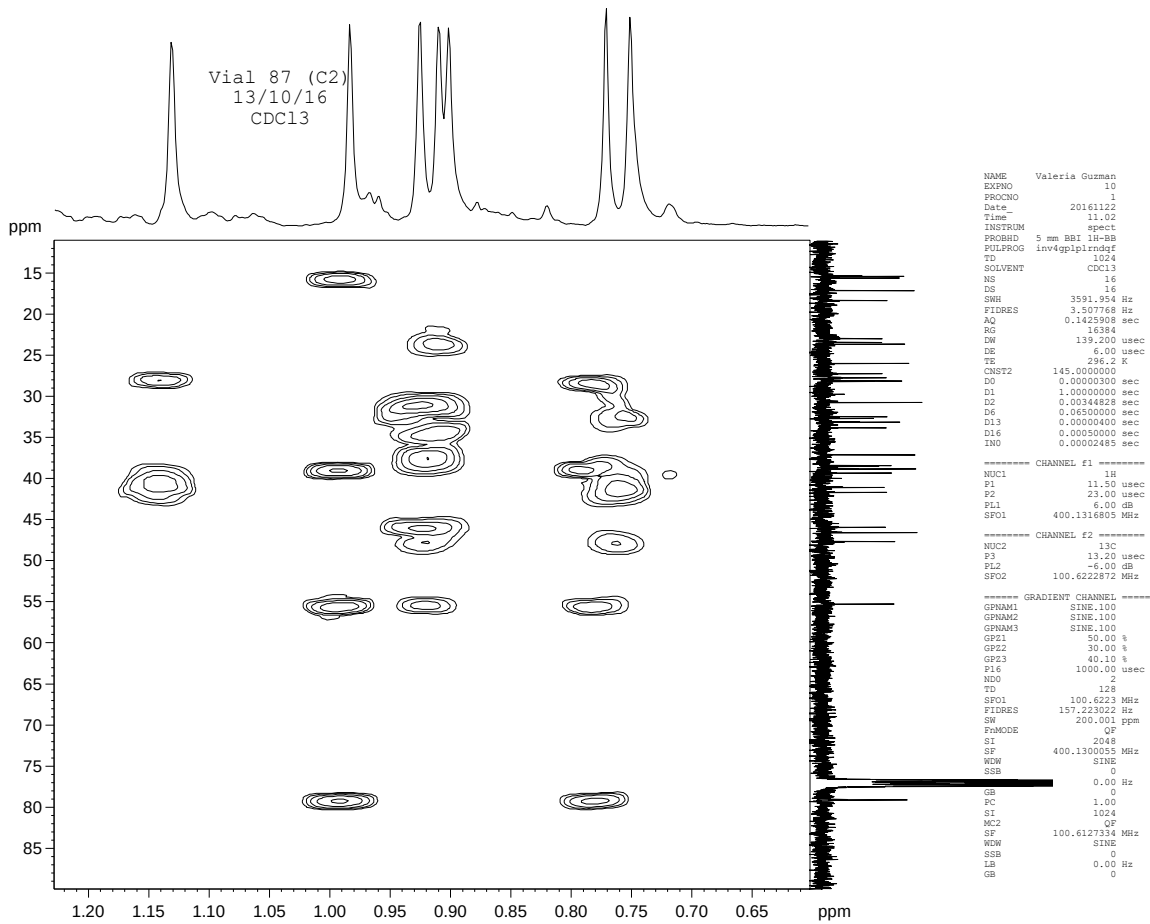
Tetrámeras: Se aplica al verticilo que está compuesto por cuatro piezas.

ANEXO B: ¹H, ¹³C y DEPT135 para VIAL 87C2

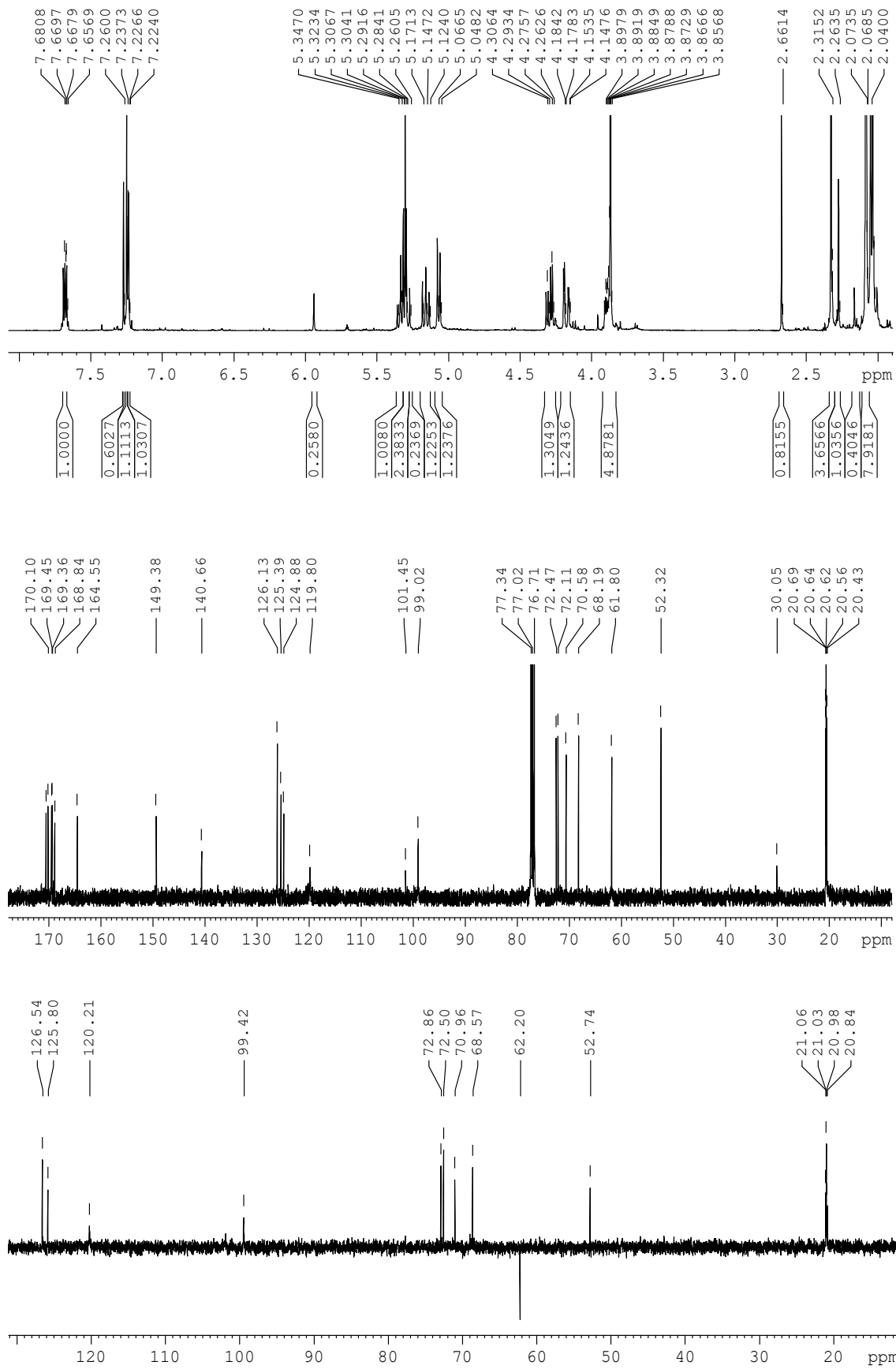


ANEXO C: 2D-HSQC Y 2D-HMBC para VIAL 87 (C2)

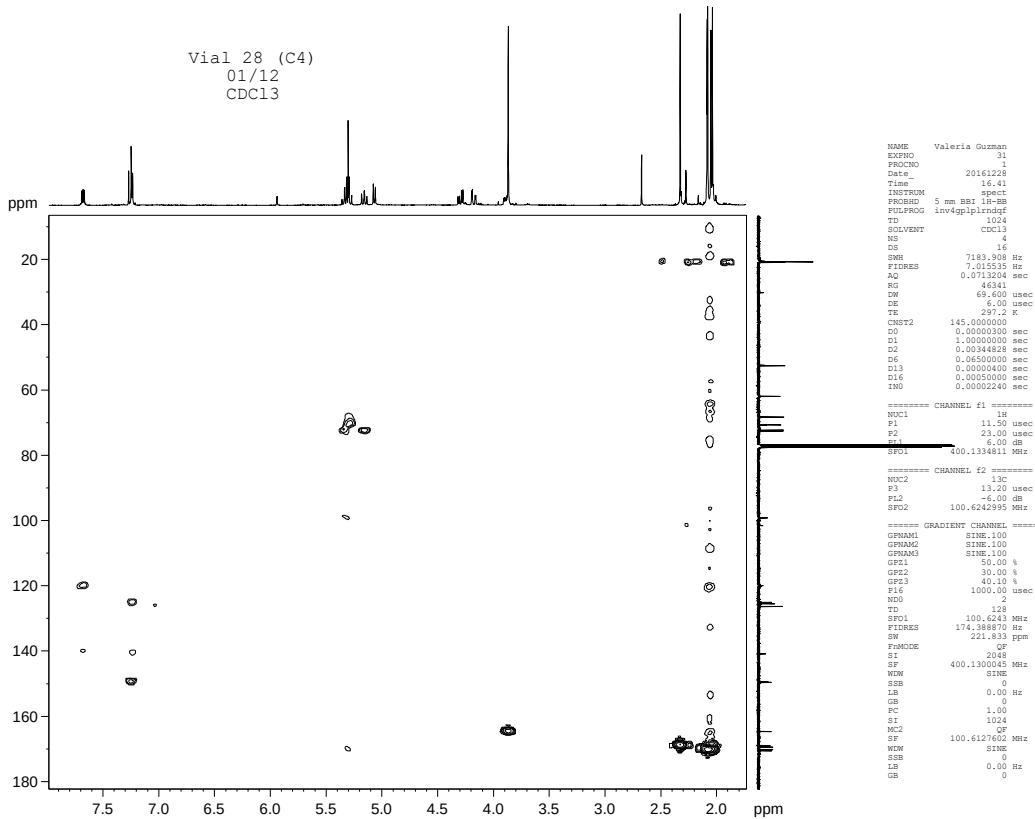
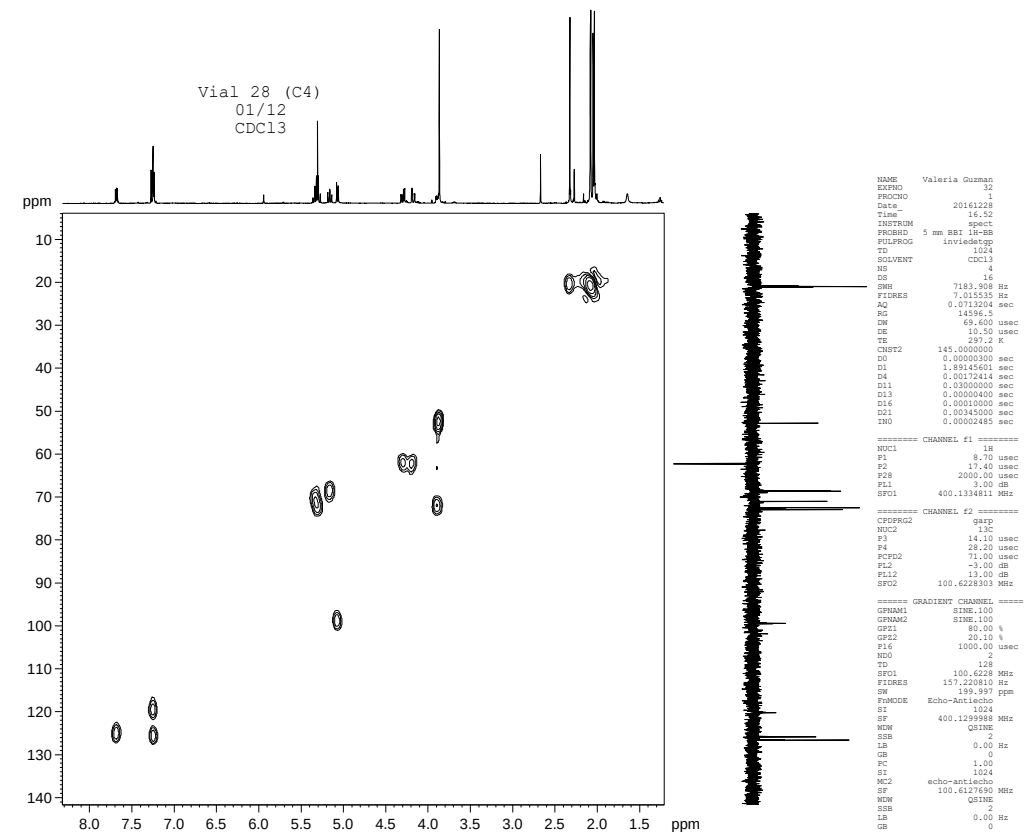




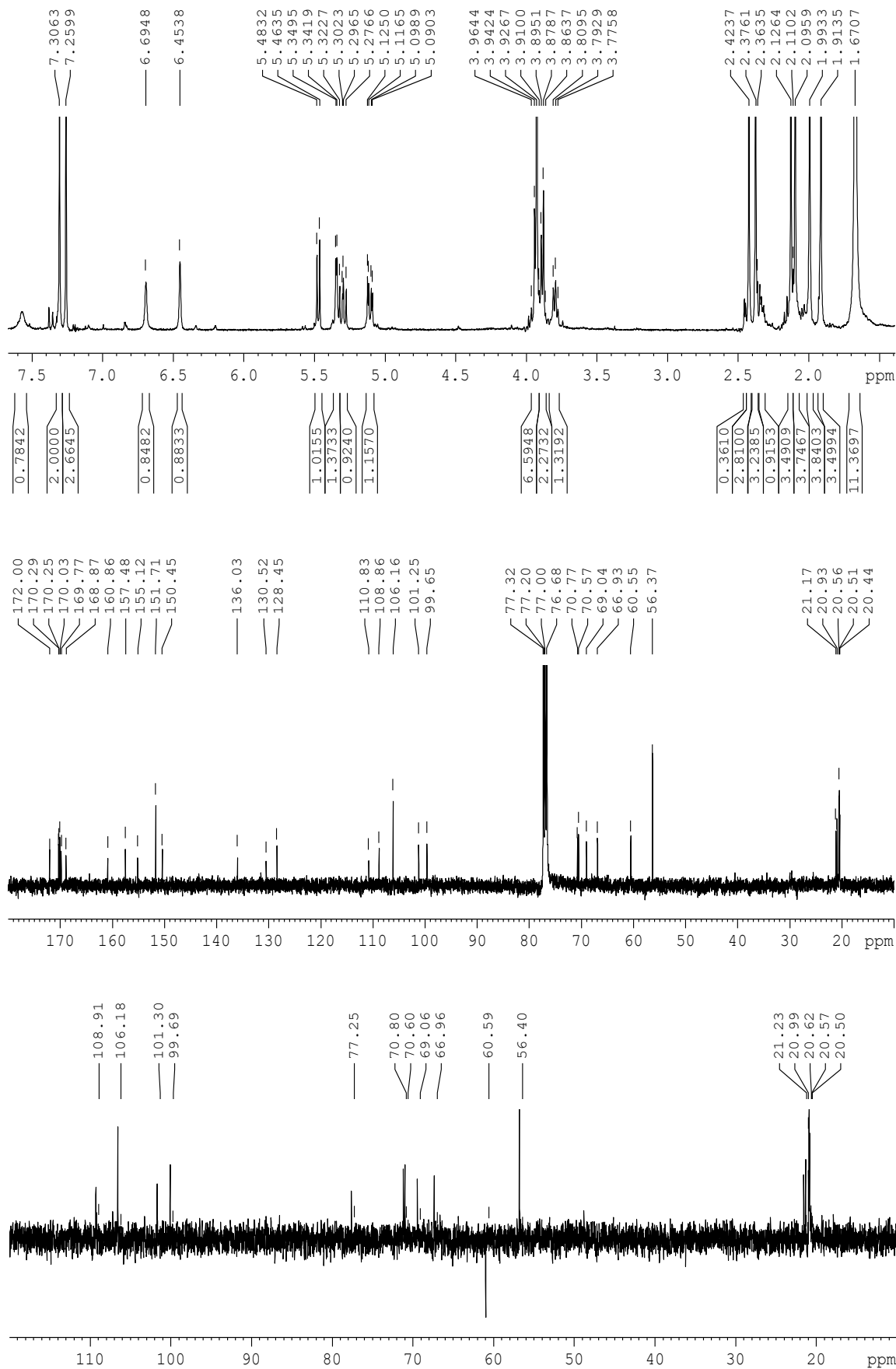
ANEXO D: ¹H, ¹³C y DEPT135 para VIAL 28 (C4)



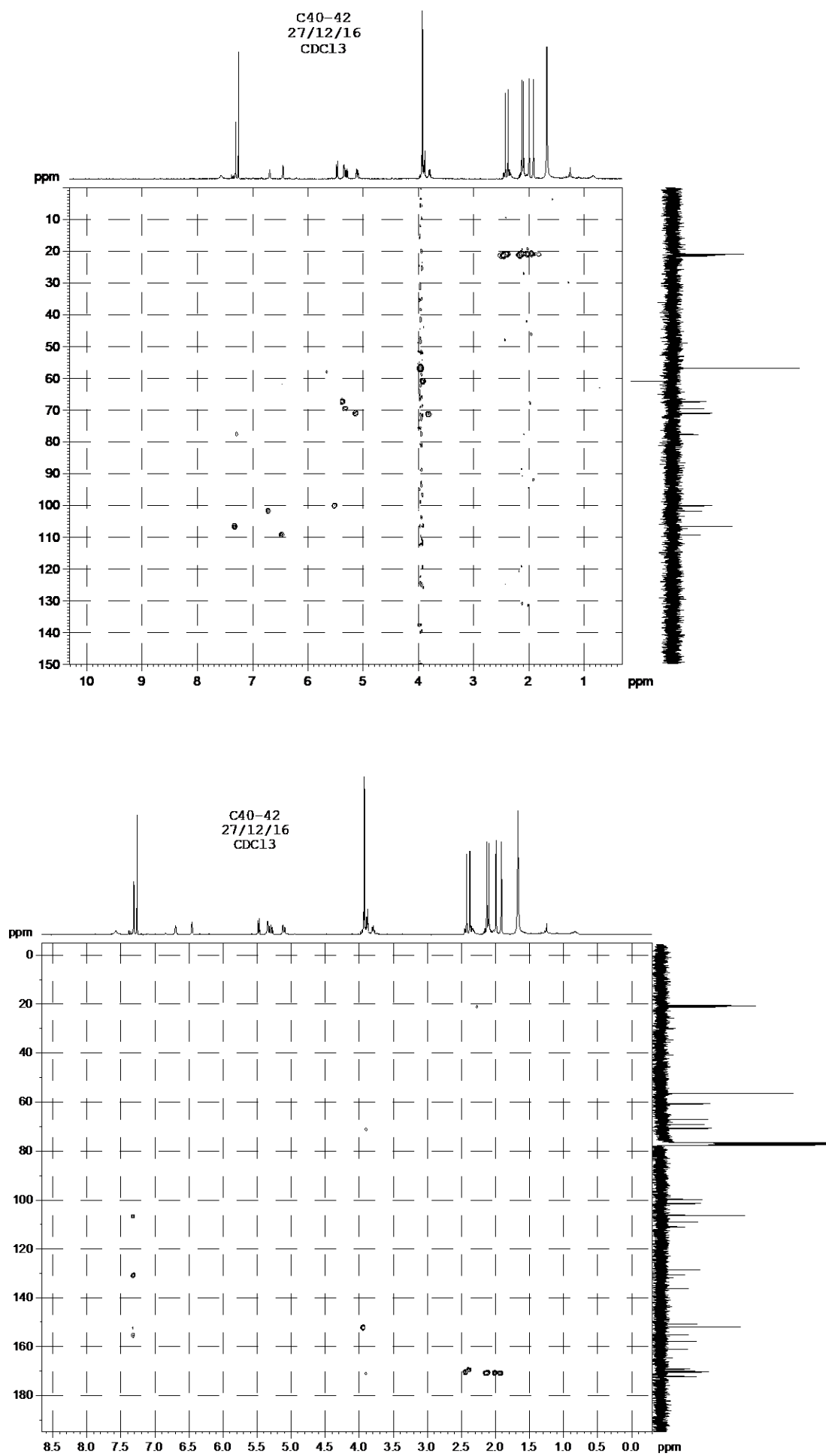
ANEXO E: 2D-HSQC Y 2D-HMBC para VIAL 28 (C4)



ANEXO F: ¹H, ¹³C y DEPT135 para FRACCIÓN 40-42 (C5)

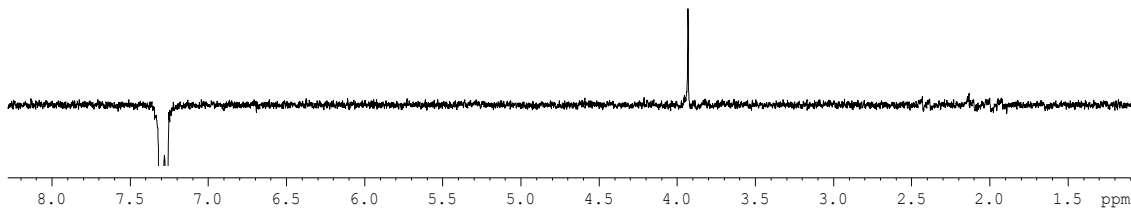


ANEXO G: 2D-HSQC Y 2D-HMBC para FRACCIÓN 40-42 (C5)

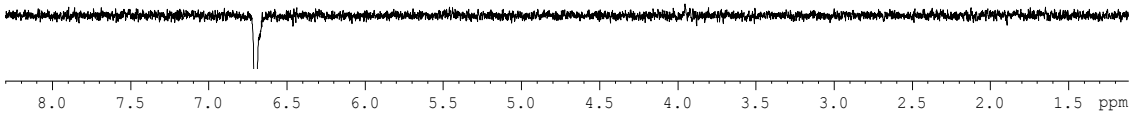


ANEXO H: Espectros selectivos NOESY para FRACCIÓN 40-42

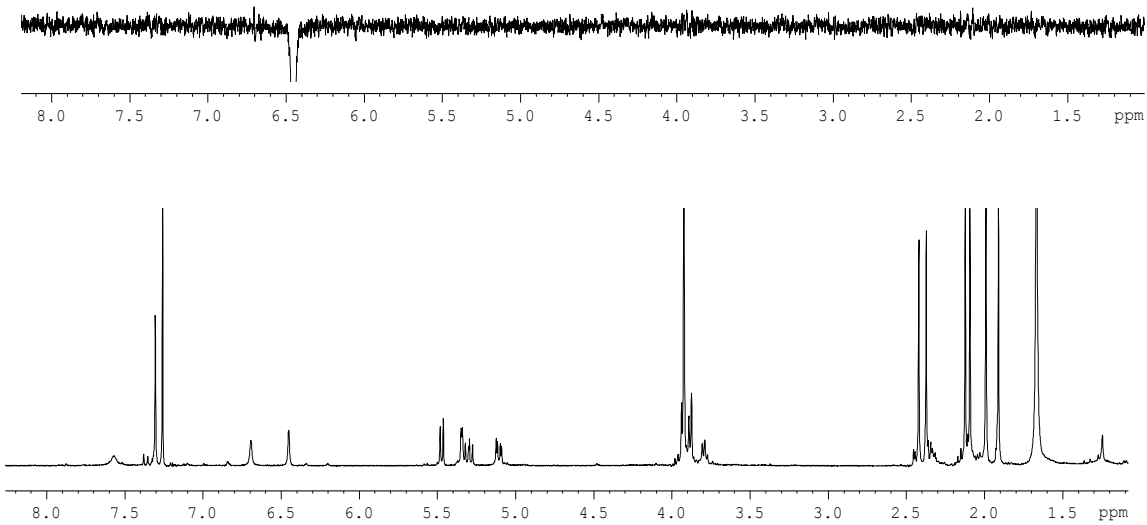
83



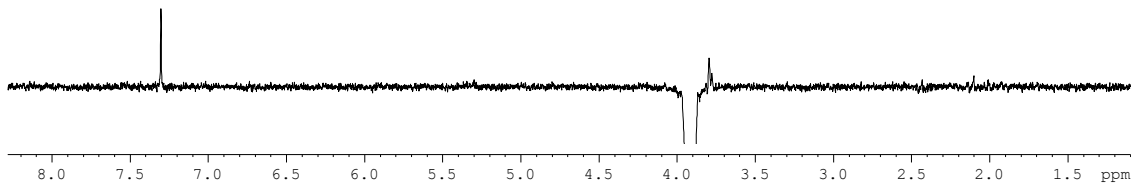
84



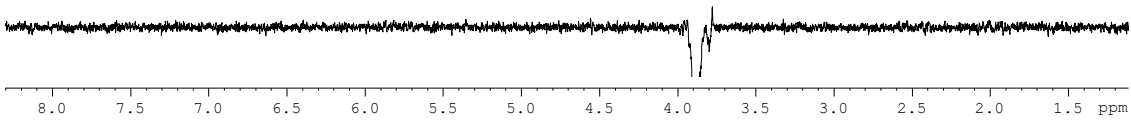
85



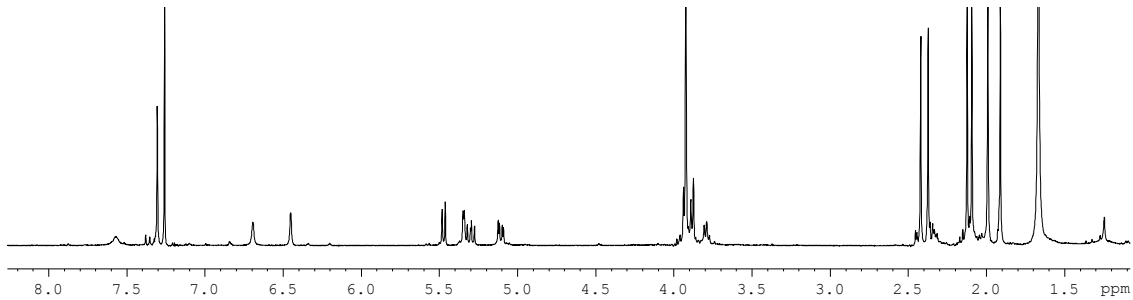
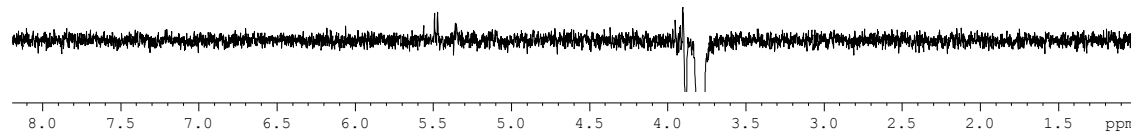
86



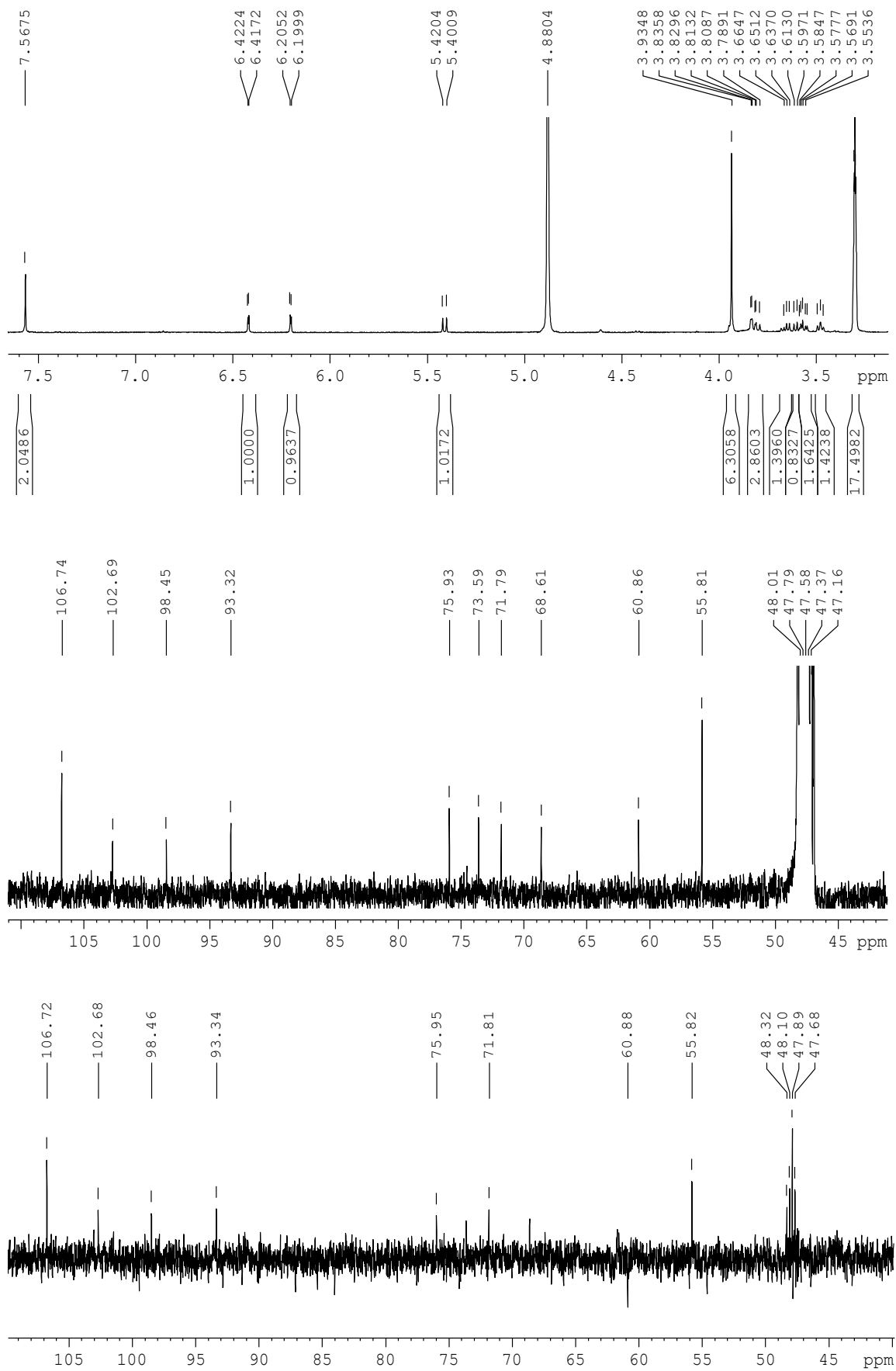
87



88



ANEXO I: ¹H, ¹³C y DEPT135 para VIAL 110 (C8) SOBRENADANTE 2



ANEXO J: 2D-HSQC Y 2D-HMBC para VIAL 110 (C8) SOBRENADANTE2

