



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de dos especies de la familia Lycopodiaceae: *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*,

Loja – Ecuador

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTORA: Sotomayor Bastidas, Cristina Nicole

DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio, PhD.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

PhD.

Chabaco Patricio Armijos Riofrío

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración

Que el presente trabajo, denominado: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de dos especies de la familia Lycopodiaceae: *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*, Loja – Ecuador.” realizado por la profesional en formación: Cristina Nicole Sotomayor Bastidas, cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspectos de forma de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, Febrero de 2015

.....

PhD. Chabaco Patricio Armijos Riofrío

Cl.: 1102430509

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Cristina Nicole Sotomayor Bastidas, declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: "Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de dos especies de la familia Lycopodiaceae: *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*, Loja – Ecuador", de la Titulación de Bioquímico y Farmacéutico, siendo PhD. Chabaco Patricio Armijos Riofrío, Director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

.....

Cristina Nicole Sotomayor Bastidas

Cl.:1104606593

DEDICATORIA

El presente trabajo en primer lugar es dedicado con todo mi corazón a Dios, que con su ayuda incondicional me ha ayudado en todo este gran proceso de mi vida, en la elaboración y empeño del mismo.

Con afecto para mis familiares, amigos incondicionales y de manera especial para mi abuelita Lidia Inés y mis padres Sandra y Marlon quienes son la razón de mi existir.

A todos con cariño y afecto.

Cristina Nicole Sotomayor Bastidas

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento de manera especial a la Universidad Técnica Particular de Loja, al departamento de Química - sección Ingeniería de Procesos de la UTPL por su apoyo constante, docente y amiga.

A mi familia por el apoyo incondicional brindado.

De carácter muy concreto al Ing. Chabaco Armijos, por su fundamental apoyo y confianza brindada, por toda la paciencia y tiempo dedicado.

A Claudía Herrera por su espíritu motivador de día a día en el desarrollo de mi presente tesis. A todas las personas que de una u otra forma participaron, a mis amigos, por su amor, paciencia y conocimientos.

Gracias de todo corazón.

Cristina Nicole Sotomayor Bastidas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	7
CAPITULO I	8
FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	8
CAPITULO II	10
MARCO TEÓRICO.....	10
2.1 Medicina tradicional	11
2.2 Familia Lycopodiaceae	12
2.2.1 Género <i>Huperzia</i>	13
2.2.2 Género <i>Lycopodium</i>	13
2.3 Metabolitos Secundarios	14
2.3.1 Flavonoides.....	15
2.3.2 Terpenos.....	17
2.4 Métodos Cromatográficos	18
2.4.1 Cromatografía en columna	18
2.4.2 Cromatografía en capa fina	19
2.5 Técnicas Espectroscópicas	20
CAPÍTULO III	22
METODOLOGÍA	22
3.1 Recolección, selección e identificación de <i>Lycopodium vestitum</i>	23
3.2 Tratamiento de materia vegetal de <i>Lycopodium vestitum</i>	24
3.3 Obtención de extractos de <i>Lycopodium vestitum</i>	24
3.4 Fraccionamiento en cromatografía en columna	25
3.5 Purificación de compuestos obtenidos	26
3.6 Elucidación e identificación de compuestos	26
CAPITULO IV.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 Cromatografía en columna de la <i>Lycopodium vestitum</i>	29
4.1.1 Identificación del compuesto aislado de la <i>L. vestitum</i>	30
4.2 Cromatografía en columna de la <i>Huperzia brevifolia</i>	31
4.2.1 Aislamiento de la flavona tricina de la <i>Huperzia brevifolia</i>	32
4.2.2 Identificación de la flavona tricina de la <i>Huperzia brevifolia</i>	33
CAPITULO V.....	35

CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	42
ANEXO 1	43
Espectros de ¹H y ¹³C RMN de la flavona TRICIN	43
ANEXO 2	45
Espectros de ¹H y ¹³C RNM del posible triterpenoide	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Clasificación taxonómica de las especies *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*.
- Figura 2.** Fotografía de *Huperzia brevifolia*
- Figura 3.** Fotografía de *Lycopodium vestitum*
- Figura 4.** Estructuras básicas y tipos de flavonoides
- Figura 5.** Cromatografía en capa fina
- Figura 6.** Esquema de la metodología aplicada
- Figura 7.** Sector de recolección de la materia vegetal
- Figura 8.** Maceración dinámica, en la ilustración se demuestra la *Lycopodium vestitum*
- Figura 9.** Obtención del extracto seco
- Figura 10.** Técnicas cromatográficas: CC y CCF
- Figura 11.** Purificación del metabolito tricina
- Figura 12.** Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia masas
- Figura 13.** Resonancia magnética nuclear
- Figura 14.** CCF de la flavona tricina aislada de *H. brevifolia*
- Figura 15.** Estructura química de la flavona tricina
- Figura 16.** CCF del posible triterpeno aislado de *L. vestitum*

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación entre el color de la mancha y la estructura del flavonoide

Tabla 2. Fraccionamiento cromatográfico de *H. brevifolia*

Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico de *L. vestitum*

Tabla 4. Características físico-químicas de los compuestos aislados.

ABREVIATURAS

Acetona-d6	Acetona deuterada
AcOET	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl₃	Cloroformo
CG-EM	Cromatografía gases acoplado a espectroscopia de masas
COSY	Espectroscopia de correlación
DCM	Diclorometano
DEPT	Distorsión por transferencia de polarización
DMAPP	Difostato de dimetilalilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
Hex	Hexano
IPP	Isopentenil difostato
MeOH	Metanol
MEP	4-fosfono-2-C-metil-D-eritritol
MHz	Megahertz
MS	Metabolito secundario
MVA	Ruta del ácido mevalónico
NOESY	Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser
Pf	Punto de fusión
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La presente investigación permitió aislar metabolitos secundarios de las especies *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*, plantas usadas tradicionalmente por la etnia Saraguro para el tratamiento del mal de aire y como analgésico para los dolores reumáticos.

Para la obtención de metabolitos secundarios se llevó a cabo una extracción por medio de maceración con diversos disolventes, purificación con técnicas cromatográficas: CC y TLC, y la respectiva caracterización con técnicas espectroscópicas CG-EM y RMN.

En la especie *Huperzia brevifolia* se aisló e identificó la flavona 5,7,4'-tihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (tricina) con actividad antiinflamatoria y quimio preventiva del cáncer. En cuanto al *Lycopodium vestitum* se pudo aislar un compuesto de naturaleza triterpénica del grupo serratenos que está bajo estudio.

PALABRAS CLAVES: Lycopodiaceae, *Huperzia brevifolia*, *Lycopodium vestitum*, metabolitos secundarios, flavona, 5,7,4'-tihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (tricina), triterpenoides serratenos.

ABSTRACT

This research led to the isolation of secondary metabolites from the plant species *Huperzia brevifolia* and *Lycopodium vestitum*, that are traditionally used by Saraguro culture to treat the of “mal aire” and as an analgesic for treating rheumatic pain.

Secondary metabolites obtention was carried out through maceration extraction with various solvents, chromatographic purification techniques: CC and TLC, and the respective spectroscopic characterization with GC-MS and NMR.

In *Huperzia brevifolia* species was isolated and identified 5,7,4'-tihidroxi flavone-3 ', 5'-dimethoxyflavone, commonly referred tricina, recognized by anti-inflammatory activity and prevention of cancer chemotherapy. Regarding *Lycopodium vestitum* was isolated a triterpene compound of serratene nature.

KEYWORDS: Lycopodiaceae, *Huperzia brevifolia*, *Lycopodium vestitum*, secondary metabolites, flavone, 5,7,4'-tihidroxi-3 ', 5'-dimethoxy flavone (tricina), triterpenoids serratene.

INTRODUCCIÓN

Ecuador se caracteriza por ser un país mega diverso, que presenta diversidad de plantas constituidas por centenares de productos naturales, las mismas que son de interés para la prevención y tratamiento de enfermedades.

La naturaleza nos brinda una gran multitud de moléculas con esqueletos químicos muy complejos que han dado lugar a la formulación de medicamentos, de los cuales en algunos casos se conserva su utilización (Cortés, 2010).

Las plantas son la fuente principal de productos naturales de uso medicinal tradicional, para contrarrestar efectos no deseados se está investigando su composición fitoquímica, con lo que se pretende potencializar sus propiedades medicinales y ampliar el espectro de acción (Pino, Prieto, Pérez, & Molina, 2004). Gracias a los análisis fitoquímicos se pueden conocer los compuestos que presenta la planta, con sus técnicas es posible llegar a la identificación de los constituyentes y por ende se correlaciona el uso empírico que le brinda a su composición química, y a su vez se establece criterios químico-taxonomicos (Martínez K. , 1997).

Actualmente han surgido nuevos métodos, técnicas de aislamiento e identificación de compuestos, promovidos por el crecimiento de la biotecnología, la bioingeniería y nuevas demandas en avances en la medicina, lo que conlleva a otras expectativas en la terapia humana. De igual manera, este avance ha producido un aumento en las investigaciones en el área de productos naturales, originando nuevos reportes de compuestos aislados a partir de diversas fuentes (Brizuela, García, Pérez, & Mansur, 1998).

La familia Lycopodiaceae se compone de cuatro géneros: *Huperzia*, *Phylloglossum*, *Lycopodium* y *Lycopodiella*, todos estos géneros presentan una amplia distribución en todo el mundo (Ortega, Agnese, Barboza, & Cabrera, 2007). Lycopodiaceae incluye unas 500 especies de las cuales una minoría son de América tropical y en el Ecuador se reportan 67 especies y en la provincia de Loja 33 especies (Jorgensen & León-Yáñez, 1999) por ello es importante identificar sus componentes químicos de éstas especies por el interés medicinal. Estos constituyentes se determinarán por métodos cromatográficos: cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF), que posteriormente se analizarán por técnicas espectroscópicas. El trabajo se desarrollará en el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

La presente investigación “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de dos especies de la familia Lycopodiaceae: *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*, Loja – Ecuador” pretende aislar e identificar compuestos en estos géneros y aportar a nuevos conocimientos para el avance de la medicina tradicional.

CAPITULO I

FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. Fin del Proyecto

Contribuir con la valorización fitoquímica de dos especies de la familia Lycopodiaceae en el Sur de Ecuador: *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*, para así brindar con estudios científicos de los metabolitos secundarios que posteriormente contribuiría a formulaciones farmacéuticas de los mismos.

1.2. Propósito del Proyecto

Extraer y caracterizar metabolitos secundarios de especies de la familia Lycopodiaceae, ya que según investigaciones previas el género *Huperzia* y *Lycopodium* presentan compuestos de interés, como: ácidos fenólicos y terpenos, debido a sus importantes propiedades biológicas y a su vez correlacionar con la medicina tradicional que se les atribuyen.

1.3. Componentes del Proyecto

- Obtener extractos en diversos solventes en orden creciente de polaridad.
- Aislar metabolitos secundarios mediante técnicas cromatográficas: cromatografía en columna (CC) y cromatografía de capa fina (TLC).
- Identificar los compuestos aislados en las dos especies de la familia Lycopodiaceae.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Medicina tradicional

La medicina tradicional busca métodos terapéuticos que recuperen la salud de forma global, no solamente se trata de mejorar el órgano afectado sino también en el bienestar del resto del organismo, restableciendo el equilibrio de los mecanismos en el cuerpo (Moraes, Ollgaard, Borchsenius, & Balslev, 2006). Además emplea remedios herbolarios, en forma de infusiones, cocciones de raíces y hojas, baños e inmersiones con hierbas, también rituales o combinaciones entre ellas (Indigenista, Instituto Nacional, 1994).

Los conocimientos tradicionales son todos los saberes que poseen las comunidades y son transmitidos de generación en generación, habitualmente de manera oral. La ausencia de manuscritos no permite que se disponga de una información detallada del uso de las plantas medicinales (Moraes, Ollgaard, Borchsenius, & Balslev, 2006). Este tipo de conocimiento comúnmente se encuentra amenazado frente a la investigación científica; por tal motivo, en los últimos tiempos los investigadores pretenden corroborar los saberes tradicionales a través de la ciencia y potencializar su utilización con previo consentimiento de los pueblos indígenas, ya que este tipo de culturas constituyen todo un sistema de saberes.

La Organización Mundial de la Salud identificó que el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para satisfacer las necesidades primarias de la salud, principalmente en el empleo de plantas medicinales (Moraes, Ollgaard, Borchsenius, & Balslev, 2006). Actualmente las autoridades de la Comunidad Andina (CAN): Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia están determinando políticas para la conservación, protección y uso sostenible de los conocimientos ancestrales (Cruz, 2008).

Cabe recalcar que la medicina tradicional clasifica las plantas medicinales de acuerdo a diferentes criterios como cálidas o frescas, género masculino o femenino al que pertenecen y otros aspectos descriptivos, entre estas categorías las plantas están relacionadas al ámbito mágico-espiritual (Ureña, 2001). La FDA ha clasificado algunas plantas como no seguras, debido a su grado de toxicidad en pequeñas cantidades, por lo que no recomiendan emplearlas en alimentos ni brebajes, entre otros. Además ciertas plantas se pueden considerar seguras en mínimas cantidades pero pueden convertirse en tóxicas a dosis elevadas, por ello se debe valorizar químicamente para así reforzar el conocimiento tradicional de las plantas, logrando identificar las sustancias químicas con las propiedades terapéuticas, que posteriormente estos recursos se los podría impulsar en el desarrollo de la medicina.

2.2 Familia Lycopodiaceae

Lycopodiaceae es una familia cosmopolita de 4 géneros con aproximadamente 380 especies (Ollgaard, 1992). *Lycopodiella*, *Lycopodium*, *Huperzia* y *Phylloglossum*, de los cuales los dos primeros géneros se registraron 40 especies, en el tercer género 400 especies con una amplia distribución, principalmente en zonas tropicales y subtropicales y el último género con 1 sola especie proveniente de Tasmania, Australia y Nueva Zelanda (Riba & Lira, 1996). Es considerada una de las familias más antiguas, debido a que sus especies presentan un parecido a los primeros fósiles. Estos géneros presentan caracteres poco diferenciables y por tal motivo presenta gran confusión al tratar de definir los taxones. La evolución de Lycopodiaceae no es muy conocida, por lo que no se evidencia reconocimientos en la filogenética de la familia (Wikstrom & Kenrick, 2000)

Lycopodiaceae son plantas terrestres o epífitas: erectas o péndulas, con tallos dicotómicamente ramificados, ramificaciones de igual longitud (*Huperzia*) o de diferente tamaño (*Lycopodium*, *Lycopodiella*), las hojas son sésiles, generalmente lanceoladas, subuladas u ovaladas, en algunas ocasiones son de menor longitud que el diámetro del tallo; el margen es entero, dentado, ciliado o esclerificado; generalmente son glabras. Los esporangios son axilares, reniformes, sésiles o subsésiles; las esporas son triletas, rugosas (*Lycopodiella*), foveolado-fosuladas (*Huperzia*) o reticuladas (Murillo-Pullido & Murillo-Aldana, 1999).

Esta familia se caracteriza por la diversidad de metabolitos secundarios en su composición, como son: alcaloides, diterpenos y triperenos, flavonas y ácidos fenólicos, algunos de los ellos poseen actividades farmacológicas (Hongmei, et al., 2010)

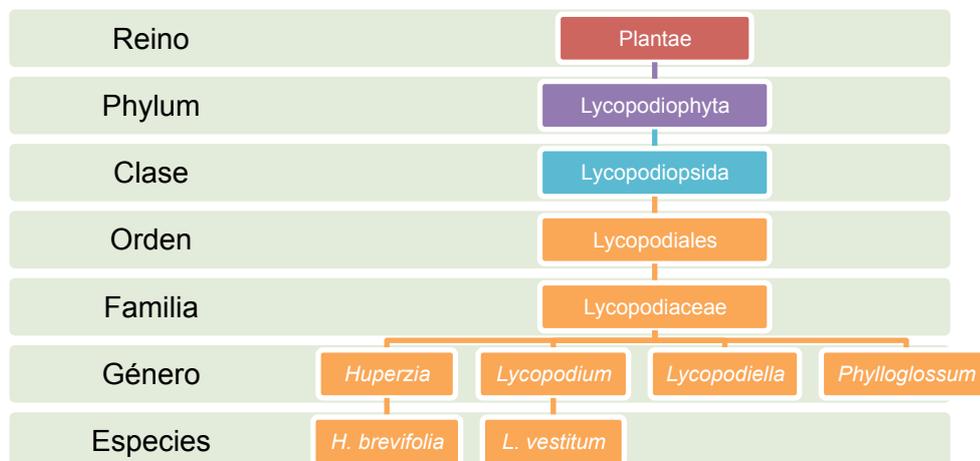


Figura 1. Clasificación taxonómica de las especies *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*.

Fuente: Instituto de Botánica Darwinion, 2013

2.2.1 Género *Huperzia*

Huperzia es el género más diverso de la familia Lycopodiaceae, no son muy abundantes, su crecimiento es lento y solo se encuentran en hábitats muy especializados. (Guamán, 2010) Según la etnomedicina de la sierra ecuatoriana lo emplean para tratar el mal de aire en personas; en Argentina, su uso es debido a las propiedades afrodisíacas; en culturas asiáticas, como analgésico y diurético y en Perú, lo utilizan como talismán dirigida a la fertilidad de los animales domésticos (Andrade, 2007) (Navarrete, 2006) (Wu & Gu, 2005).

En las especies del género *Huperzia* los tallos son ramificados isodicotómicamente. Esporofilos y trofolifos generalmente isomorfos, los primeros no agrupados en estróbilos, presenta esporas ruguladas o foveolado-fosuladas.



Figura 2. Fotografía de *Huperzia brevifolia*

Fuente: Sotomayor, C., 2014

2.2.2 Género *Lycopodium*

Lycopodium es un género cosmopolita de aproximadamente 40 especies, de las cuales 8 son neo-tropicales. Crecen principalmente en los bosques montañosos y en los páramos (Ollgaard, 1992) Los tallos de las especies del *Lycopodium* son ramificados anisodicotómicamente. Esporofilos y trofolifos fuertemente dimorfos, los primeros agrupados en estróbilos sobre ejes subáfilos con esporas reticuladas.

Comúnmente se denominan “licopodios, musgos, pino de suelo, la garra del diablo” y son utilizadas por tribus para mejorar el efecto memoria, así como también analgésico para aliviar dolores reumáticos en las articulaciones y la espalda (Das, Ghosh, Dutta, Nath, & Choudhury, 2011).



Figura 3. Fotografía de *Lycopodium vestitum*
Fuente: Sotomayor, C., 2014

2.3 Metabolitos Secundarios

Las plantas producen una variedad de compuestos orgánicos que no participan directamente en su desarrollo y crecimiento. Estas sustancias se denominan *metabolitos secundarios* y generalmente están distribuidas en un número limitado de grupos taxonómicos. Las plantas presentan vías complejas para la biosíntesis de metabolitos secundarios, los mismo que están involucrados en una multitud de funciones ecológicas, además estos proveen protección contra condiciones abióticas adversas (Kutchan, 1995). Se diferencian de los *metabolitos primarios* porque éstos sí cumplen funciones metabólicas esenciales.

Los metabolitos secundarios son compuestos que, sin ser esenciales para la supervivencia de células individuales, tienen un papel importante en la vida y supervivencia del organismo en su entorno ecológico (Walton, Rhodes, Michael, & Parr, 1999) por tal motivo su presencia en la naturaleza se encuentra limitada en ciertos organismos específicos. Además son los que suministran en mayor parte a las sustancias farmacológicas activas. Actualmente se han reportado más de 100 000 compuestos secundarios, los cuales son derivados de rutas metabólicas y reacciones enzimáticas.

Los metabolitos secundarios se pueden dividir en tres grupos principales:

- **Terpenos:** constituyen el mayor grupo de metabolitos secundarios, insolubles en agua y bio-sintetizados a partir del acetil CoA.
- **Compuestos Fenólicos:** contiene un grupo fenol, un grupo hidroxilo en un anillo aromático, forman un grupo químicamente heterogéneo y son solubles en solventes orgánicos.
- **Compuestos que contienen nitrógeno:** son los comúnmente conocidos alcaloides, glicósidos, cianogénicos, glucosinolatos y aminoácidos no proteicos.

2.3.1 Flavonoides

Son pigmentos naturales presentes en los vegetales, los cuales contribuyen al color amarillo y rojo de las plantas; y además protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes. Se encuentra en vegetales, semillas, frutas y en bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Aherne & O'Brien, 2002)

Biogenéticamente se forman a través de la ruta del shikimato y del mevalonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, y a partir del cual se derivan otras clases de modificaciones que ocurren en varias etapas. Así mismo cada una de estas clases pueden sufrir posteriores metilaciones, isoprenilaciones o glicosidaciones de los grupos hidroxilos, metilaciones de grupos o hidroxilos, dimerizaciones (Martínez A. , 2005) .

La estructura química de los flavonoides es muy definida, son moléculas con un esqueleto hidrocarbonado C₆-C₃-C₆ (difencilpropano), es decir que tienen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono derivado del ácido shiquímico (Martínez A. , 2005).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que confiere una gran capacidad antioxidante (Havsteen, 1983) (Peres, 1994). Como característica general se disuelven en agua y en etanol, por su carácter fenólico poseen una intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. El método de detección, aislamiento e identificación de compuestos fenólicos se fundamentan en sus propiedades ácidas y su polaridad (Martínez A. , 2005).

Se han identificado más de 4 000 flavonoides naturales, los cuales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C₃. De acuerdo a esto los flavonoides se clasifican en varios grupos: Flavonas, flavonoles, flavanonas, flavavonoles, antocianidinas, chalconas, dihidrochalconas, auronas, isoflavonoides, leucoantocianidinas, neoflavonoides, biflavonoides, pterocarpanos, rotenoides.

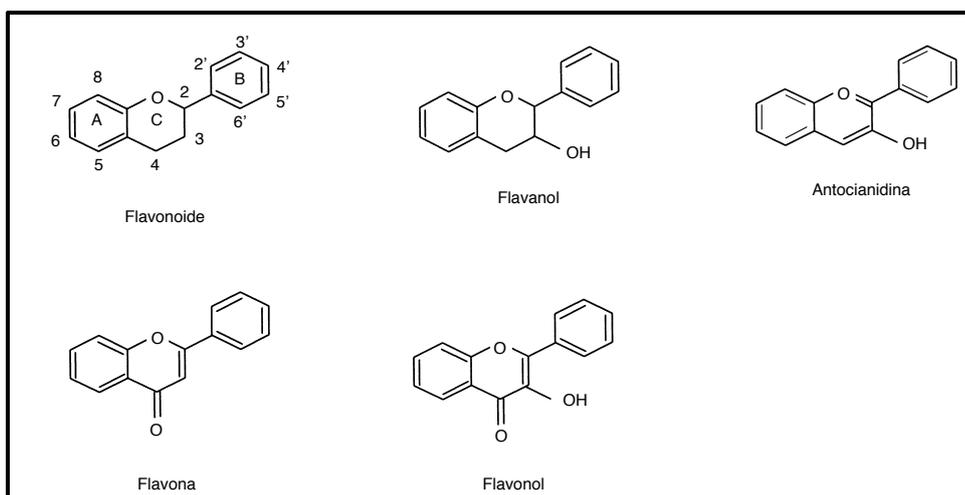


Figura 4. Estructuras básicas y tipos de flavonoides
Fuente: (Martínez, González, Culebras, & Tuñón, 2002)

La detección de flavonoides en cromatografía de capa fina puede hacerse por el color que desarrollan en la lámpara UV, demostrando manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpura, entre otros; los mismos que se pueden intensificar o cambiar de color luego de su exposición a vapores de amoníaco u otros agentes cromogénicos como la vainillina – HCl.

Tabla 1. Relación entre el color de la mancha y la estructura del flavonoide

Color de la Mancha a la Luz UV		Tipo de Flavonoide
Sin NH3	Con NH3	
Púrpura	Amarilla, amarilla verdosa o verde	5-OH flavonas o flavonoles (3-O substituidos) con 4'-OH 5-OH flavanonas
	Sin cambio o con pequeños cambios	6- o 8-OH flavona y 3-O-substituidos flavonoles con 5-OH
		Isoflavonas, dihidroflavonoles y flavanonas con -5-OH
		Flavonas o flavonoides-3-O-substituidos flavonoles con 5-OH
		Chalcona con 2'- o 6'-OH, pero sin 2- o 4-OH libre
	Celeste	5-OH flavanona
Roja o naranja	Chalcona con 2- y/o 4-OH	
Celeste fluorescente	Fluorescente amarilla-verdosa	Flavonas y flavanonas sin 5-OH libre
		Flavonoles sin 5-OH libre y con 3-OH sustituido
	Sin cambio o con pequeños cambios	Isoflavonas carente de 5-OH libre

Invisible	Fluorescentes celeste	Isoflavonas carente de 5-OH libre
Amarilla, amarilla opaca o naranja fluorescente	Sin cambio o pequeño cambio	Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre
Amarilla fluorescente	Amarilla o naranja	Aurona con un 4'-OH libre y algunas chalconas 2- o 4-OH
Amarilla-verdosa, azul-verdosa o verde	Sin cambio o pequeños cambios	Aurona carente de 4'-OH libre y Flavanona carente de un 5-OH libre
		Flavonoles con un 3-OH libre y con o sin 5-OH libre

Fuente: (Geissman, 1962) (Markham, 1982)

Al principio, los flavonoides fueron considerados como sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, posteriormente esto fue contrastado gracias a las investigaciones, que estos presentan, tales como efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Últimos estudios reportan que los flavonoides poseen actividades prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de los análisis la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (Martínez, González, Culebras, & Tuñón, 2002)

2.3.2 Terpenos

Los terpenoides son productos naturales derivados biogenéticamente del ácido mevalónico (MVA) son ampliamente distribuidos en la naturaleza (plantas, hongos, insectos y organismos marinos) y presentan variedades estructurales y comportamientos biológicos de amplio espectro.

Los terpenos, también llamados terpenoides o isoprenoides, tienen como unidad estructural fundamental al compuesto de cinco átomos de carbono llamado isopentenil pirofosfato, el cual es rápidamente interconvertido a dimetilalil pirofosfato. Hasta hace poco tiempo se pensaba que la única ruta de síntesis del isopentenil pirofosfato era la ruta metabólica del ácido mevalónico, a partir de Acetil CoA, sin embargo, hace alrededor de 10 años se descubrió la ruta del metileritriol fosfato, a partir de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato (Almaraz, Ávila, Delgado, Naranjo, & Herrera, 2006) (Dudavera, Pchersky, & Gershezon, 2004). El nombre de isoprenoides fue dado porque éstos compuestos se descomponen a altas temperaturas y producen isopreno.

De acuerdo al número de unidades de isopreno (C5) que contengan, los terpenos se clasifican en monoterpenos (C10), en sesquiterpenos (C15), en diterpenos (C20), en

triterpenos (30), en tetraterpenos (40) y en politerpenos con más de 20 (Almaraz, Ávila, Delgado, Naranjo, & Herrera, 2006)

Los monoterpenos corresponden a estructuras regulares, las cuales se las conoce como aceites esenciales. Los compuestos de estructura irregular son insecticidas del tipo de las piretrinas, que son compuestos biodegradables con la desventaja de que su acción dura poco, debido a que son fotosensibles.

Los sesquiterpenos presentan una actividad farmacológica, las mismas que se manifiestan como citotoxicidad que puede revelar dermatitis. Las lactonas sesquiterpénicas representan un grupo numeroso, alrededor de 3000 estructuras, las cuales se las ha considerado para los tratamientos de migraña, antihelmíntico y antiinflamatorio, inhibiendo a los leucotrienos.

Los triterpenos de tipo serrateno son compuestos biológicamente activos candidatos para su uso clínico como promotores antitumorales. Se asume que estos compuestos pentacíclicos expresan su actividad en parte debido a que el anillo C está constituido por siete miembros con un doble enlace entre los carbonos C-14 y C-15 (Conner, Bhimsen, & Rowe, 1984) (Liu, Chang, & Shan, 2004).

2.4 Métodos Cromatográficos

La cromatografía es un método analítico empleado en su totalidad para la separación, identificación y determinación de los compuestos químicos en mezclas complejas. Los componentes de una mezcla son llevados a través de la fase estacionaria por el flujo de una fase móvil gaseosa o líquida. Las separaciones están basadas en las diferentes afinidades por la fase estacionaria que determinan distintas velocidades de migración entre los componentes de la muestra (Escuela Superior de Salud y Ambiente, 2005).

2.4.1 Cromatografía en columna

Cromatografía en columna (CC) es el método más utilizado para la separación y purificación de compuestos orgánicos, sólidos o líquidos, a escala preparativa. Es fácil de efectuar, no requiere equipo especializado.

La fase estacionaria (adsorbente) se coloca en una columna de vidrio que termina en un estrechamiento con una llave y se impregna con el eluyente (fase móvil). La mezcla a separar se deposita en la parte superior de la columna y la fase móvil atraviesa el sistema. El adsorbente más utilizado en CC es la sílice gel con 60-200 μm de granulometría, luego la alúmina.

El tamaño de partícula del adsorbente es importante para la separación y su elección dependiendo gran medida de la elución de la cromatografía se realice por gravedad o a presión media.

2.4.2 Cromatografía en capa fina

Cromatografía en capa fina (TLC) consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. Es un método simple, eficiente, no necesita equipo sofisticado para su ejecución, esta técnica sirve para identificar la presencia de los componentes en los extractos analizados. Esta técnica presenta múltiples ventajas: su fácil comprensión, rápida ejecución, la versatilidad y su reproducibilidad (Teleguario, 2008) Escoger el disolvente apropiado, es de gran importancia para la buena separación de las sustancias. Esta selección debe hacerse en función de la fase estacionaria empleada y de acuerdo a la naturaleza de los compuestos que van a ser separadas (Sharapin, 2000)

En esta técnica, la muestra disuelta se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílice gel) distribuido uniformemente sobre una placa de aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del disolvente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. Luego la muestra migra por capilaridad, separando por migración diferencial los diversos componentes de la muestra analizada. Después del recorrido de la placa, el disolvente se evapora y se analiza utilizando luz ultravioleta 254 nm y 360 nm, y finalmente se aplican reactivos que resultan reacciones de coloración con los compuestos contenidos en la muestra.

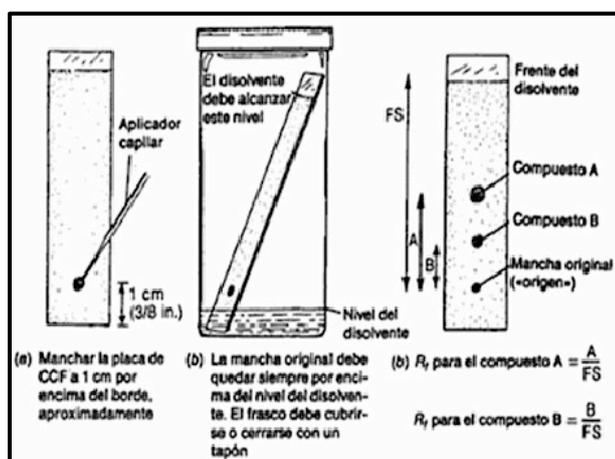


Figura 5. Cromatografía en capa fina

Fuente: (Harris, 2007)

Posteriormente, se calcula el R_f (factor de retención) para posteriormente compararlo con el R_f de referencia, y así obtener un parámetro más, el mismo que se toma en cuenta en la identificación del compuesto. El factor de retención (R_f) es la medida de migración de una sustancia determinada en un solvente dado (Teleguario, 2008). Este valor del R_f puede presentar variaciones dependiendo de la temperatura del medio ambiente, el grado de pureza de los disolventes utilizados y las diferencias en la homogeneidad de las placas de capa fina.

$$\text{Factor de retención (Rf)} = \frac{\text{distancia desde el origen hasta el compuesto}}{\text{distancia desde el origen frente el sovente}}$$

2.5 Técnicas Espectroscópicas

Los compuestos puros obtenidos deben ser identificados según su estructura química, estereoquímica y las propiedades químico-físicas.

La técnica espectroscópica más importante es la *Resonancia Magnética Nuclear* (RMN). Las espectroscopias RMN del protón (RMN ^1H) y del carbono (RMN ^{13}C) son las primeras técnicas de búsqueda a la cual es sometida la muestra. Posteriormente para más información estructural con pruebas NOESY, COSY y DEPT.

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos (Silvertein, Bassler, & T., 1991). EL RMN permite alinear los campos magnéticos de diferentes núcleos en la dirección de un campo magnético externo. Está técnica es aplicable a una variedad de problemas químicos y bioquímicos.

Un espectro RMN brinda la siguiente información:

- La posición de señal (su desplazamiento químico) que indica las características del entorno que rodea al núcleo en cuestión.
- La estructura fina (dada por el acoplamiento spin-spin) que provee información sobre la relación espacial y el número de núcleos acíclicos con spin distinto de cero.
- El área de la señal que es proporcional al número de núcleos que constituyen dicha señal.

La aplicación fundamental de la espectroscopia de RMN es la determinación estructural, ya sea de moléculas orgánicas, organometálicas o biológicas. Para ello es necesaria la realización de diferentes tipos de experimentos de los cuales se obtiene una determinada información.

Desde el punto de vista de la determinación estructural de productos naturales, los núcleos generalmente observados son aquellos más comunes en los compuestos orgánicos, es decir ^1H y ^{13}C . Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos (unidades δ o ppm). Para la elucidación estructural de moléculas orgánicas y organometálicas los experimentos más utilizados son los siguientes:

- *Espectro monodimensional de ^1H* : da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca.
- *Espectro monodimensional de ^{13}C* : Al igual que en H el desplazamiento químico da información de los grupos funcionales. Se utiliza para deducir la estructura del esqueleto carbonado observando los entornos magnéticos de los átomos de hidrógeno, mientras que la espectroscopia de RMN de ^{13}C determina el entorno magnético de los átomos de carbono.

Otras técnicas espectroscópicas que respaldan el NMR son la *espectroscopia de absorción en el infrarrojo* (IR), que permite identificar los grupos funcionales de la molécula, la *espectroscopia de masas* (MS), en la cual se encontrar el peso molecular de los compuestos y otras informaciones estructurales, la *espectrofotometría UV-visible*, que reconoce la presencia en las moléculas de cromóforos particulares gracias a las bandas relativas de absorción.

Junto a las técnicas de búsqueda estructural existen métodos que permiten la identificación de algunas propiedades químico-físicas peculiares de los compuestos, comprende el punto de fusión de los compuestos sólidos.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

El aislamiento de metabolitos secundarios del *Lycopodium vestitum* se realizó con todos los pasos de la metodología: desde la recolección de la materia vegetal hasta la obtención de los compuestos puros; en cambio de la *Huperzia brevifolia* se trabajó a partir de una torta a pH 7 obtenida una extracción de alcaloides proveniente de estudios anteriores. A continuación se detalla la metodología que se llevó a cabo en la presente investigación:

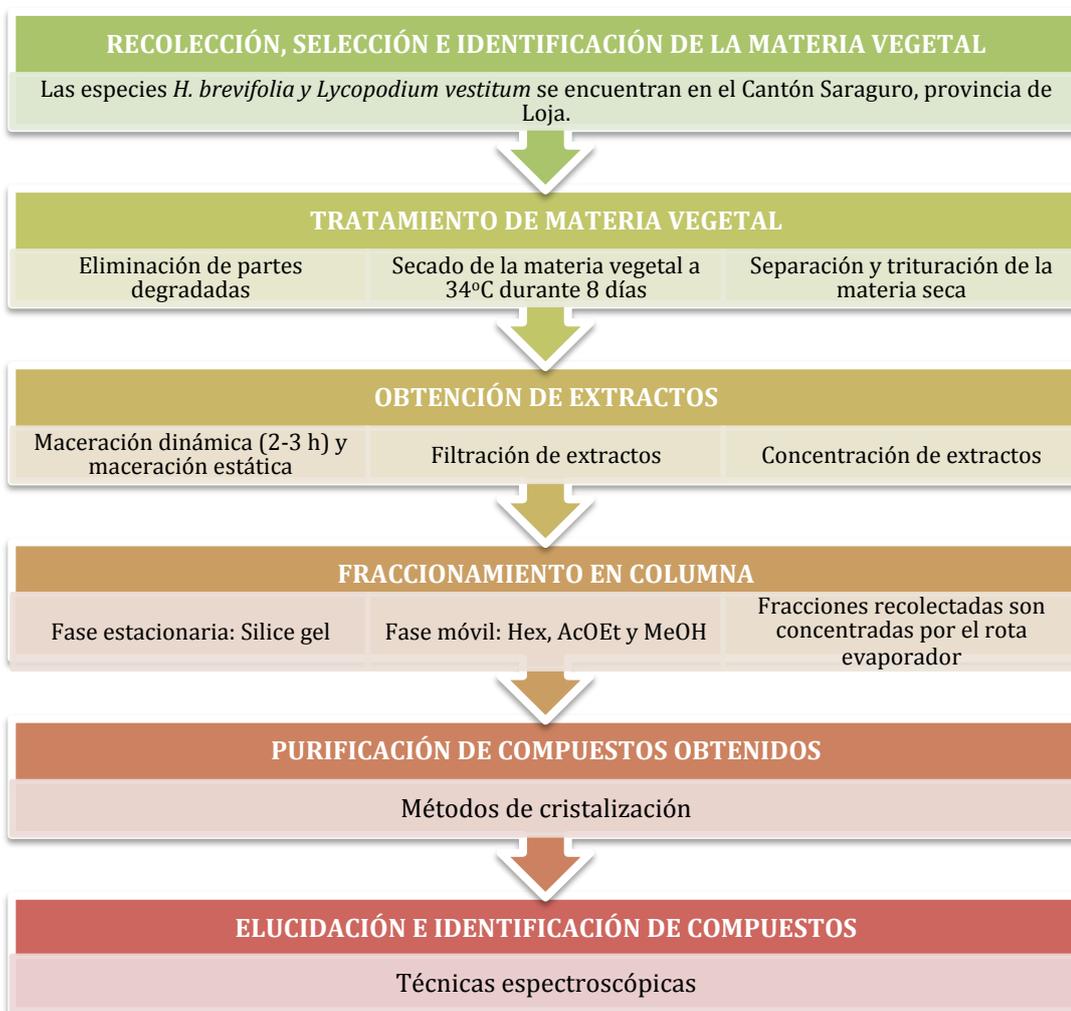


Figura 6. Esquema de la metodología aplicada
Fuente: Sotomayor, C., 2014

3.1 Recolección, selección e identificación de *Lycopodium vestitum*

La recolección de las especies vegetales *Lycopodium vestitum* se la llevó a cabo en la provincia de Loja, en el cantón Saraguro (Fig. 7), con coordenadas geográficas 17697649E – 9590439N y con una altitud de 3219 m s.n.m. Estas especies fueron reconocidas taxonómicamente por Bolívar Merino, curador oficial del Herbario – Loja de la Universidad Nacional de Loja. Un ejemplar de la muestra fue depositado en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con el código voucher Ly-001-008.

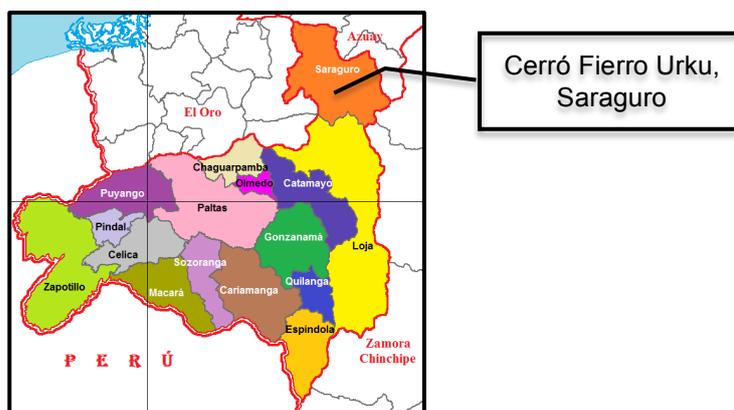


Figura 7. Sector de recolección de la materia vegetal

Fuente: Mapa de cantones de Loja, 2011

3.2 Tratamiento de materia vegetal de *Lycopodium vestitum*

Luego de su recolección se procedió a la elección de la planta en buen estado, eliminando partes degradadas e impurezas, no pertenecientes a la especie. Posteriormente se la mantiene en un cuarto de secado a 34 °C durante 8 días, con la finalidad de eliminar la mayor parte de agua contenida en la planta para así facilitar la extracción de los metabolitos y al mismo tiempo conservar la integridad morfológica de la planta. Una vez seco el material vegetal se continúa con la molienda, triturándose uniformemente todas las partes de la planta.

3.3 Obtención de extractos de *Lycopodium vestitum*

Para la obtención del extracto se procedió a la maceración tanto estática y dinámica de *Lycopodium vestitum* (Fig. 8), con un peso de 744 g, este proceso se realizó en 2-5 horas en maceración dinámica, en varias repeticiones hasta obtener una extracción completa con los diversos disolventes, los mismos que se emplearon de acuerdo al orden creciente de polaridad (Hex, CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH).

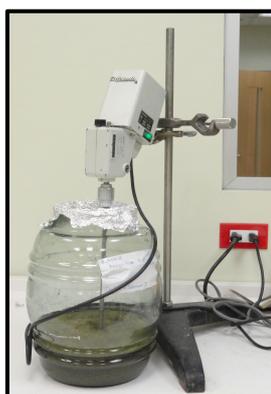


Figura 8. Maceración dinámica, en la ilustración

se demuestra la sp.
Lycopodium vestitum
Fuente: Sotomayor, C., 2014

Luego se filtró al vacío (Fig. 9), para separar el residuo vegetal del líquido extraído. Posteriormente y con ayuda de un rota- evaporador a temperatura de 30 °C a presión reducida se concentró el extracto para evitar la degradación de los constituyentes químicos, obteniéndose un extracto seco.



Figura 9. Obtención del extracto seco
Fuente: Sotomayor, C., 2014

3.4 Fraccionamiento en cromatografía en columna

Lycopodium vestitum se trabajó con el extracto AcOEt, debido a su riqueza en compuestos químicos. Este extracto se lo sometió a cromatografía en columna en una relación muestra-sílice gel 1:50, con los siguientes disolventes Hex 100%, Hex - AcOEt, AcOEt 100%, AcOEt - MeOH y finalmente MeOH 100 (Fig. 10).

En el fraccionamiento de los metabolitos de la *Huperzia brevifolia* se realizó el montaje de la columna con la torta a pH 7, anteriormente comentada.

El eluyente saliente de la cromatografía en columna fue recolectado en volúmenes de 200 ml y etiquetados en forma consecutiva de acuerdo a su elución en los diversos solventes; posteriormente las fracciones fueron sometidas a evaporación por rota evaporador con su respectivo análisis en las placas cromatográficas CCF (fase directa) en placas de aluminio cubiertas de sílice gel 60 F₂₅₄ Merck, observando los componentes que presentan fluorescencia vistos en la Luz UV 254 y 360 nm, y finalmente se concluye con la manifestación de los compuestos con el agente revelador ácido sulfúrico/vainillina 1%.



Figura 10. Técnicas cromatográficas: CC y CCF
Fuente: Sotomayor, C., 2014

3.5 Purificación de compuestos obtenidos

Para la purificación y re cristalización se realizó un lavado de las sustancias cristalinas con Hex y MeOH (grado reactivo), teniendo en cuenta el grado de solubilidad de cada fracción (Fig. 11).

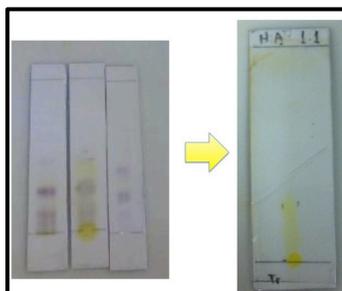


Figura 11. Purificación del metabolito tricíclico
Fuente: Sotomayor, C., 2014

Luego de la re cristalización se determinaron las propiedades químicas:

- a) **Punto de fusión:** se determina con el equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus, serial 40-22 de 50-60 Hz sin corregir, se coloca una pequeña cantidad de la muestra en el lente del equipo y se determina el rango de temperatura a la cual cambia su estado de sólida a líquido.
- b) **Factor de retención:** el R_f de los compuestos químicos se calculó de acuerdo a la fórmula, por medio de este parámetro se evalúa la distancia recorrida de la muestra sobre la fase móvil, fórmula ya mencionada en el cap. 2

3.6 Elucidación e identificación de compuestos

a. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas

La identificación de los compuestos aislados *H. brevifolia* y *L. vestitum* se realizó por medio de la cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM), en un cromatógrafo de gases Agilent, con sus respectivas inyecciones en las columnas capilares de DB-5MS (5%-fenil-metilpolisiloxano) (Fig. 12).



Figura 12. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia masas
Fuente: Sotomayor, C., 2014

b. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de los metabolitos analizados se determinaron mediante resonancia magnética nuclear en el equipo VARIAN N° de serie 21953 (Fig. 13) operando a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , COSY y DEPT a temperatura de 25 °C, usando como disolvente acetona- d_6 y DMSO.



Figura 13. Resonancia magnética nuclear
Fuente: Sotomayor, C., 2014

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallan los resultados sobre el estudio de los metabolitos secundarios de las especie *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*.

4.1 Cromatografía en columna de la *Lycopodium vestitum*

En el fraccionamiento en CC se obtuvieron 350 fracciones, las cuales se agruparon 35 fracciones de acuerdo a la similitud que presentan en la CCF, utilizando placas de sílice gel 60F254 (fase directa).

En la tabla 3 se detalla las proporciones utilizadas de los diversos disolventes con sus respectivas fracciones, y a su vez la apariencia que presentaron.

Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico de *L. vestitum*

Fracciones	Proporción %	Mezcla de disolventes	Apariencia
1	100	Hex	Aceitosa
2-20	95-5	Hex-AcOEt	Aceitosa
21-34	90-10	Hex-AcOEt	Aceitosa
35-58	85-15	Hex-AcOEt	Aceitosa
59-70	80-20	Hex-AcOEt	Sólida
71-80	75-25	Hex-AcOEt	Cristales
81-92	70-30	Hex-AcOEt	Sólida
93-101	65-35	Hex-AcOEt	Sólida
102-123	60-40	Hex-AcOEt	Sólida
124-154	55-45	Hex-AcOEt	Sólida
155-170	50-50	Hex-AcOEt	Sólida
171-175	45-55	Hex-AcOEt	Sólida
176-185	40-60	Hex-AcOEt	Sólida
186-195	35-65	Hex-AcOEt	Sólida
196-200	30-70	Hex-AcOEt	Sólida
200-205	25-75	Hex-AcOEt	Sólida
206-210	20-80	Hex-AcOEt	Sólida
211-215	15-85	Hex-AcOEt	Sólida
216-220	10-90	Hex-AcOEt	Sólida
221-225	5-90	Hex-AcOEt	Sólida
226-235	100	AcOEt	Sólida
236-246	95-5	AcOEt-MeOH	Sólida

247-257	90-10	AcOEt-MeOH	Sólida
258-268	85-15	AcOEt-MeOH	Sólida
269-279	80-20	AcOEt-MeOH	Sólida
280-286	75-25	AcOEt-MeOH	Sólida
287-293	70-30	AcOEt-MeOH	Sólida
294-299	65-35	AcOEt-MeOH	Sólida
300-309	60-40	AcOEt-MeOH	Sólida
310-319	55-45	AcOEt-MeOH	Sólida
320-329	50-50	AcOEt-MeOH	Sólida
330-339	40-60	AcOEt-MeOH	Sólida
340-344	25-75	AcOEt-MeOH	Sólida
345-349	10-90	AcOEt-MeOH	Sólida
350	100	AcOEt-MeOH	Sólida

Fuente: Sotomayor, C., 2014

Un compuesto se obtuvo en las fracciones 71:80 eluidas con Hex: AcOEt (75:25 v/v). El precipitado tuvo la apariencia de cristales blanquecinos, luego de ser lavado sucesivamente con hexano adicionándole pequeñas cantidades de acetato, se obtuvieron 63 mg, es soluble en cloroformo y acetato e insoluble con hexano y metanol. Su cromatografía de capa fina fue corrida con AcOEt: MeOH en proporción 1:1, en el momento de ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina al 1% se observó una mancha color violeta y un Rf de 0,81 (Figura 16).

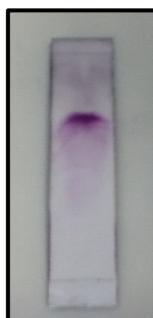


Figura 16. CCF del posible triterpeno aislado de *L. vestitum*
Fuente: Sotomayor, C., 2014

4.1.1 Identificación del compuesto aislado de la *L. vestitum*

Los datos espectrales de compuesto aislado comparados con los de la literatura se muestran a continuación:

Triterpenoide del tipo serratenos reportado por Fang et al. (1991):

¹³C- NMR: (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 38.5, 22.3, 88.5, 38.2, 56.3, 18.8, 45.2, 38.9, 57.0, 36.0, 25.3, 27.2, 62.9, 138.3, 121.9, 24.1, 49.6, 37.1, 36.7, 23.8, 81.1, 37.7, 15.7, 19.8, 28.1, 16.2, 56.0, 13.4, 27.5, 15.7, 57.5, 21.3, 17.0

Compuesto aislado de *L. vestitum*

¹³C- NMR: (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 13.30, 15.87, 18.59, 19.63, 21.70, 22.83, 23.57, 24.69, 25.43, 25.48, 26.82, 28.08, 30.84, 33.09, 35.47, 36.92, 37.05, 37.60, 42.71, 42.81, 45.18, 49.23, 55.95, 56.54, 62.30, 64.03, 68.18, 73.80, 121.78, 138.24.

Los datos espectrales resaltados coinciden con la bibliografía y las mismas corresponden a características específicas del compuesto de naturaleza triterpenoide del tipo serratenos, hay que recalcar que se intentó elucidar el compuesto, sin embargo podemos certificar que la estructura química del metabolito aislado pertenece al grupo del triterpeno.

4.2 Cromatografía en columna de la *Huperzia brevifolia*

En el fraccionamiento en CC se obtuvieron 250 fracciones, las mismas que fueron agrupadas en 26 fracciones según su similitud que presentan en la CCF, utilizando placas de sílice gel 60F254 (fase directa).

A continuación en la tabla 2 se detallan las proporciones utilizadas de los diversos disolventes con sus respectivas fracciones, y a su vez la apariencia física.

Tabla 2. Fraccionamiento cromatográfico de *H. brevifolia*

Fracciones	Proporción %	Mezcla de disolventes	Apariencia
1	100	Hex	Aceitosa
2-20	45-1	Hex-AcOEt	Aceitosa
21-34	40-2	Hex-AcOEt	Aceitosa
35-58	35-3	Hex-AcOEt	Aceitosa
59-70	30-4	Hex-AcOEt	Sólida
71-80	25-5	Hex-AcOEt	Sólida
81-92	20-6	Hex-AcOEt	Sólida
93-101	15-7	Hex-AcOEt	Sólida
102-123	10-8	Hex-AcOEt	Sólida
124-154	5-9	Hex-AcOEt	Sólida
155-170	1-10	Hex-AcOEt	Sólida
171-175	100	AcOEt	Cristales

176-185	95-5	AcOEt-MeOH	Cristales
186-195	90-10	AcOEt-MeOH	Sólida
196-200	85-15	AcOEt-MeOH	Sólida
200-205	80-20	AcOEt-MeOH	Sólida
206-210	75-25	AcOEt-MeOH	Sólida
211-215	70-30	AcOEt-MeOH	Sólida
216-220	65-35	AcOEt-MeOH	Sólida
221-225	60-40	AcOEt-MeOH	Sólida
226-230	55-45	AcOEt-MeOH	Sólida
231-235	50-50	AcOEt-MeOH	Sólida
236-240	40-60	AcOEt-MeOH	Sólida
241-245	25-75	AcOEt-MeOH	Sólida
246-249	10-90	AcOEt-MeOH	Sólida
250	100	AcOEt-MeOH	Sólida

Fuente: Sotomayor, C., 2014

Como se manifestó en la tabla anterior, las fracciones 171-175 y 176-185 presentaron la formación de cristales luego de la evaporación del disolvente, por tal razón se realizaron las respectivas pruebas para facilitar la identificación molecular del compuesto. El análisis de estas fracciones se detalla a continuación:

4.2.1 Aislamiento de la flavona tricina de la *Huperzia brevifolia*

Este compuesto se obtuvo en las fracciones 171-175 eluidas con acetato de etilo (100%). El precipitado tuvo la apariencia de cristales amarillos, luego de ser lavado sucesivamente con metanol y agregar pequeñas cantidades de acetona, se obtuvieron 87 mg. Su punto de fusión fue de 287-289 °C, el compuesto es soluble en DMSO y acetona e insoluble en hexano, acetato, diclorometano y metanol. Su cromatografía de capa fina eluída con Hex:AcOET en proporción 1:1, al ser revelada con Ác. Sulfúrico y Vainillina 1% mostró una mancha amarilla, con un Rf de 0,30 (Figura 14).



Figura 14. CCF de la flavona tricina aislada de *H. brevifolia*
Fuente: Sotomayor, C., 2014

4.2.2 Identificación de la flavona tricina de la *Huperzia brevifolia*

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

^1H - RMN: (400 MHz, acetona- d_6): δ ppm 12.99 (s, 1H), 7.37 (s, 2H), 6.73 (s, 1H), 6.55 (d, 1H), 6.25 (d, 1H), 3.96 (s, 6H).

^{13}C - NMR: (100 MHz, acetona- d_6): δ ppm 183.1 (C-4), 165.0 (C-2 y C-7), 163.3 (C-9), 158.7 (C-5), 149.1 (C-3' y C-5'), 140.9 (C-4'), 122.3 (C-1'), 105.2 (C-2' y C-6'), 104.6 (C-3 y C-10), 99.7 (C-6), 94.8 (C-8), 56.9 (OCH $_3$ x2).

Comparando los resultados de la muestra analizada con los datos espectrales de publicaciones anteriores (Jiao, Zhang, Liu, Wu, & Zhang, 2007) (Kuwabara, Mouri, Otsuka, Kasai, & Yamasaki, 2006) permitió identificar la estructura de una flavona, resaltando así señales características: en el espectro de RMN ^1H δ_{H} 6.55 ppm, corresponde al anillo A de los C-5 y C-7; δ_{H} 7.38 ppm pertenece al anillo B de los C-3', C-4' y C-5'; y en el espectro de RMN ^{13}C δ_{C} 56.93 ppm indica la presencia de dos grupos metoxi de los C-3' y C-5' (Ramos, 2014) el producto aislado se identificó como 5,7,4'- trihidroxi -3', 5'-dimetoxiflavona (figura 15) más conocido como Tricina.

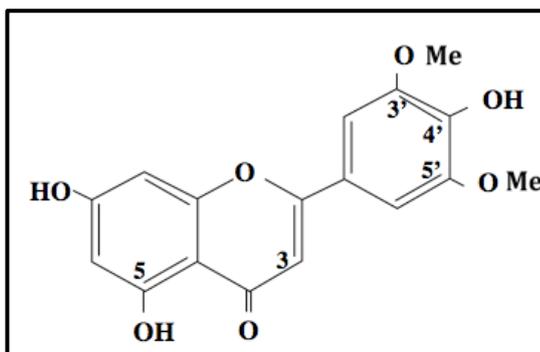


Figura 15. Estructura química de la flavona tricina

Fuente: (Jiao, Zhang, Liu, Wu, & Zhang, 2007)

Cabe mencionar que la flavona tricina forma parte en su estructura fitoquímica en algunas de sus especies de la familia Lycopodiaceae, según bibliografía reportan la presencia en *H. compacta* (Armijos, 2012), en *Lycopodium complanatum* (Herrera, 2013), en *H. tetragona* (Jumbo, 2014) y en *H. kuesteri* (Ramos, 2014)

Tabla 4. Características físico-químicas de los compuestos aislados.

	<i>H. brevifolia</i>	<i>L. vestitum</i>
Características	171-175	71-80
Peso	87 mg	63 mg
Relación de solventes	100% Acetato	75-25 Hex-AcOEt
Apariencia física	Cristales amarillos	Cristales blanquecinos
Factor de retención	0,30	0,81
Punto de fusión	287-289 °C	230-232 °C
RMN	Flavona	Posible terpeno
Nombre	5,7,4'-trihidroxi-3',5'- dimetoxiflavona	Por confirmar

Fuente: Sotomayor, C., 2014

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- En la especie *Huperzia brevifolia* se identificó la flavona 5,7,4'-hidroxi-3',5'-dimetoxiflavona "tricina", compuesto aislado de la unión de fracciones 171-175 del extracto de acetato, su estructura química se determinó por el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear.
- El metabolito aislado de *Lycopodium vestitum* perteneciente de la fracción 71-80 es similar con la estructura de triterpenos del tipo serratenos comunes en la familia Lycopodiaceae.

RECOMENDACIONES

- Continuar con la purificación de las fracciones probando otras técnicas de aislamiento de metabolitos para lograr caracterizar completamente las especies medicinales *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*.
- Realizar una investigación comparativa entre las dos especies *Huperzia brevifolia* y *Lycopodium vestitum*, pertenecientes a la misma familia Lycopodiaceae, para determinar los compuestos mayoritarios y significativos de cada especie; y a su vez analizar si corresponden a las mismas propiedades medicinales. De igual manera se puede generar una base de datos pertenecientes a los metabolitos de cada género tanto de *Huperzia* como de *Lycopodium*.
- Analizar el rendimiento de los compuestos con relación al peso total de la materia vegetal para que posteriormente sea propuesto como producto fitofármaco.
- Validar el uso tradicional de las especies analizadas, es decir, las propiedades medicinales establecidas por la comunidad indígena, con los respectivos metabolitos aislados.

BIBLIOGRAFÍA

- Aherne, S., & O'Brien, N. (2002). *Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism*. Nutrition.
- Almaraz, N., Ávila, J., Delgado, E., Naranjo, N., & Herrera, J. (2006). *El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto*. Repositorio Digital.
- Andrade, J. (2007). *Estudio etnobotánico de las plantas medicinales empleadas por la etnia Saraguro en la parroquia San Lucas, cantón Loja, provincia de Loja*. Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Armijos, C. (2012). Etnobotánica, ecología e aislamiento de metabolitos secundarios de las especies psicoactivas de la familia Lycopodiaceae utilizadas por el Saraguro en el sur del Ecuador. Loja: Universidad degli studi di Pavia (Tesis de doctorado).
- Brizuela, M., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Cuba: Rev. Iberoam Micol.
- Conner, A., Bhimsen, N., & Rowe, J. (1984). *New Serratene Triterpenes from Western White* (Vol. 40). Pine Bark. Tetrahedron.
- Cortés, D. (2010). *La naturaleza, punto de partida en la búsqueda de nuevos esqueletos químicos con interés farmacológico*. (Vol. 26). España: Departamento de farmacología, Universidad de Valencia.
- Cruz, R. (2008). Elementos para la protección Sui Generis de los conocimientos tradicionales colectivos e integrales desde la perspectiva indígena. *Comunidad Andina*, 9-37.
- Das, A., Ghosh, R., Dutta, M., Nath, D., & Choudhury, S. (2011). *A Review on Pteridophyte Antioxidants and their Potential Role in Discovery of New Drugs* (Vol. 7). Assam University Journal of Science & Technology: Biological and Environmental Sciences.
- Dudavera, N., Pchershky, E., & Gershezov, J. (2004). *Biochemistry of plant volatiles*. Plants Physiology.
- Escuela Superior de Salud y Ambiente. (2005). Separación y Purificación de Compuestos Orgánicos. *Química II*.
- Geissman, T. (1962). *The chemistry of flavonoid compounds*. USA: Pergamon Press.
- Guamán, A. (2010). *Aislamiento de alcaloides de cinco especies alucinógenas de la familia Lycopodiaceae usadas en medicina ancestral por los Rikuyhampiyachak (visionarios) de la étnica Saraguro - Ecuador*. Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté, S. A.

- Havsteen, B. (1983). Flavonoids: A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* , 32, 1141-1148.
- Herrera, C. (2013). *Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie Lycopodium complanatum L.* . Loja: Universidad Técnica Particular de Loja (Tesis de grado).
- Hongmei, L., Ying, L., Chao, S., Qiong, W., Jingyuan, S., Yongzhen, S., y otros. (2010). *Comparison of 454-ESTs from Huperzia serratene reveals putative genes involved in lycopodium alkaloid biosynt* (Vol. 10). BMC Planta Biol.
- Indigenista, Instituto Nacional. (1994). La medicina tradicional de los pueblos indígenas de México. *Los Tzeltales* , 3.
- Jiao, J., Zhang, Y., Liu, J., Wu, X., & Zhang, Y. (2007). Separation and Purification of Tricin from an Antioxidant Product Derived from Bambo Leaves. *J. Agric. Food Chem* , 55, 10086-10092.
- Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Ecuador: Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.
- Jumbo, L. (2014). *Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie Huperzia tetragona*. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja (Tesis de grado).
- Kutchan, T. (1995). Alkaloid biosynthesis: the basis the metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell* , 7, 1059-1070.
- Kuwabara, H., Mouri, K., Otsuka, H., Kasai, R., & Yamasaki, K. (2006). *Tricin from a Malagasy Connaraceous plant with potent antihistaminic activity* (Vol. 66). J. Nat. Prod.
- Liu, H., Chang, T., & Shan, J. (2004). Huperzine H, a New Lycopodium Alkaloid from Huperzia Serrata. *Chinese Chemical Letters* , 10 (6), 463-466.
- Martínez, K. (1997). *Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de Bougainvillea glabra, Leucophyllum frutescens y Eriobotrya japónica*. México: Universidad de Nuevo León.
- Markham, K. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. Italia: Academic Press.
- Martínez, A. (2005). *Flavonoides*. Colombia: Facultad de Química Farmacéutica: Universidad de Antioquia.
- Martínez, S., González, J., Culebras, M., & Tuñón, J. (2002). *Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes* (Vol. 27). España: Departamento de Fisiología, Universidad de León.

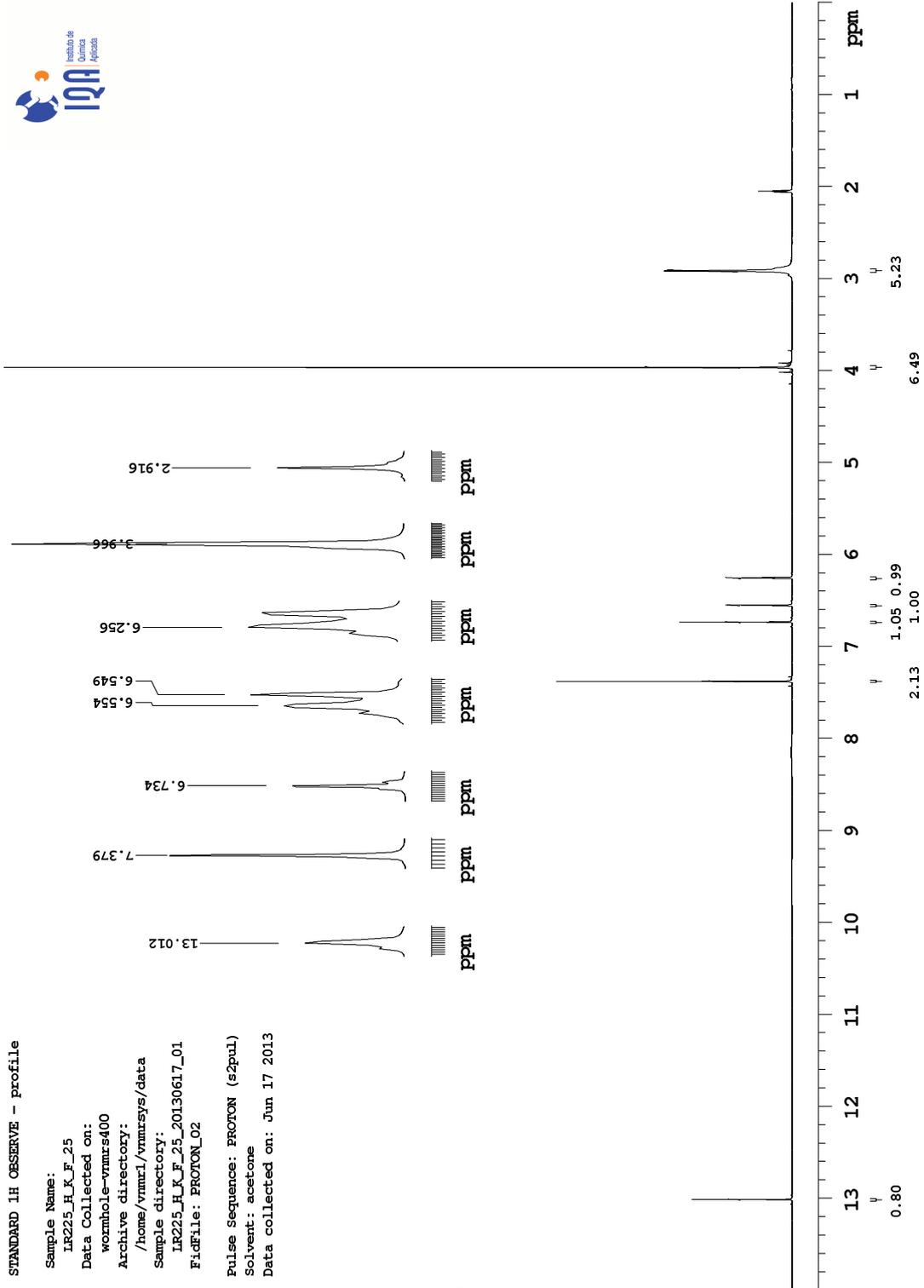
- Moraes, R., Ollgaard, L., Borchsenius, F., & Balslev, H. (2006). *Plantas medicinales en los Andes de Bolivia*. Bolivia: Botánica Económica de los Andes Centrales, Universidad Mayor de San Andrés.
- Murillo-Pullido, M., & Murillo-Aldana, J. (1999). *Pteridófitos de Colombia, composición y distribución de las Lycopodiaceae* (Vol. 23). Colombia: Revi Acad. Colombia Ciencia, Botánica.
- Navarrete, e. a. (2006). *Helechos*. Botánica de los Andes Centrales.
- Ollgaard, B. (1992). *Neotropical Lycopodiaceae-An Overview* (Vol. 79). Ann. Missouri Bot. Gard.
- Ortega, M., Agnese, A., Barboza, G., & Cabrera, J. (2007). Seasonal study of the alkaloid pattern of *Huperzia saururus* with habitat in Córdoba province. *The Journal of Argentine Society*, 95.
- Peres, W. (1994). *Radicais livres em níveis biológicos*. Brasil: Ed Universidade Católica de Pelocas.
- Pino, S., Prieto, S., Pérez, M., & Molina, J. (2004). *Género Erythina: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica*. (Vol. 23). Acta farmacética bonaerense.
- Ramos, J. (2014). *Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie Huperzia kuesteri*. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja (Tesis de grado).
- Riba, R., & Lira, R. (1996). *Pteridophyta sensu R. Sadebeck, familias Equisetaceae DC., Lycopodiaceae Mirb. selaginellaceae Milde*. Instituto de Biología UNAM, Departamento de Botánica.
- Sharapin, N. e. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Silverstein, R., Bassler, G., & T., M. (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (Vol. 30). H. Booth.
- Teleguario, C. (2008). *Caracterización y Cuantificación de flavonoides, sapogeninas esteroidales en extractos de tres plantas mesoamericanas Lippia graveolens, Passiflora edulis y Smilax domingensis*. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Ureña, C. (2001). *Diversidad, clasificación y uso de plantas medicinales en la comunidad de Apillapampa de la provincia Capinota del departamento Cochabamba*. Cochabamba: Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales, Universidad Mayor de San Simón.
- Walton, N., Rhodes, M., Michael, A., & Parr, A. (1999). *Characterisation and control of plant secondary metabolism*. Walton y Brown, eds. Imperial College Press.

- Wikstrom, N., & Kenrick, P. (2000). *Relationships of Lycopodium and Lycopodiella base don combined plastid rbcL gene and trnL Intron Sequence Data* (Vol. 25). American Society of Plant Taxonomists.
- Wu, Q., & Gu, Y. (2005). *Quantification of huperzine A in Huperzia serrata by HPLC-UV and identification of the major constituents in this alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS*. *Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

ANEXOS

ANEXO 1

Espectros de ^1H y ^{13}C RMN de la flavona TRICIN



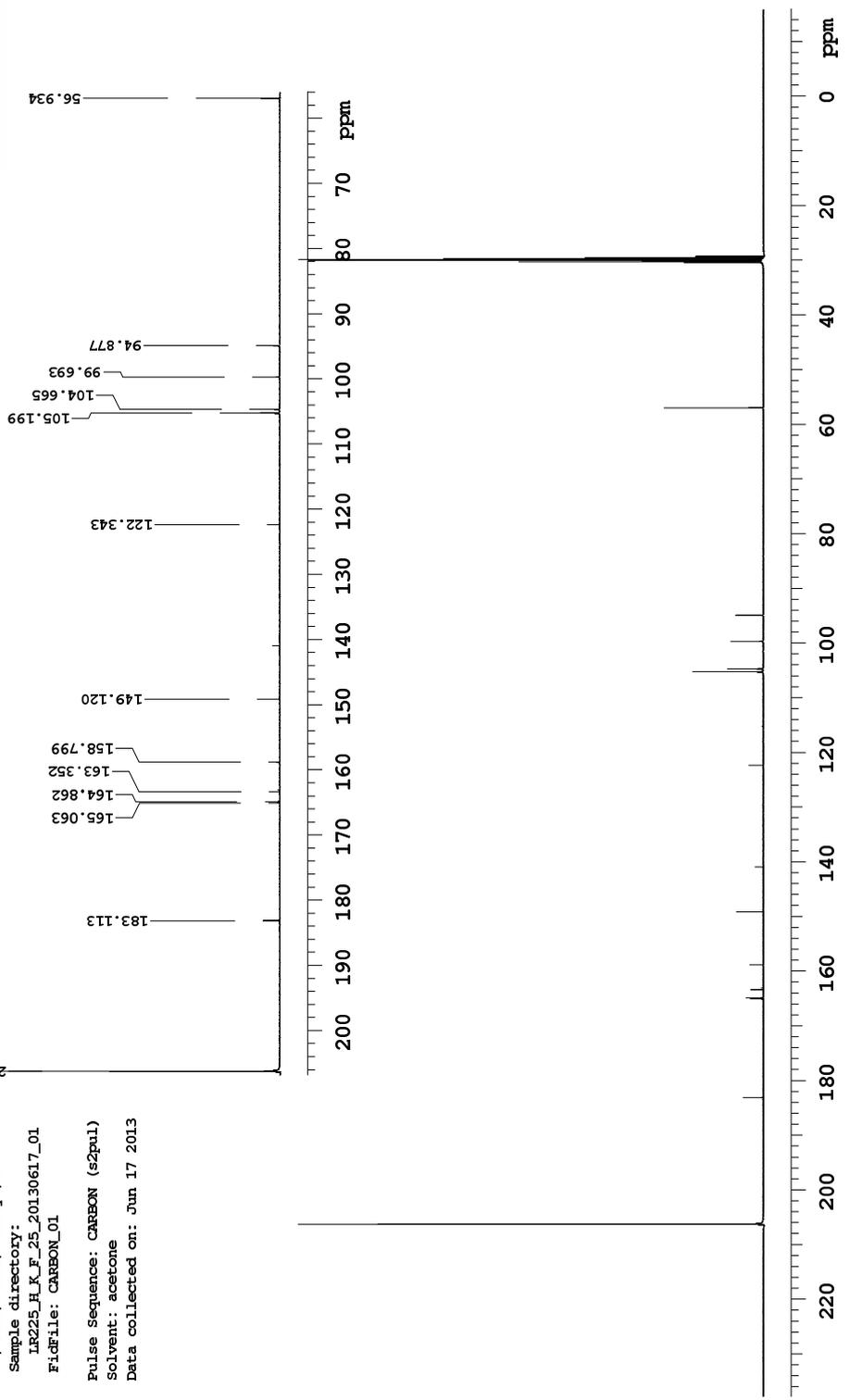
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name: IR225_H_K_F_25
Data Collected on: wormhole-vnmrs400
Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: IR225_H_K_F_25_20130617_01
FidFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: acetone
Data collected on: Jun 17 2013

STANDARD 1H OBSERVE - profile

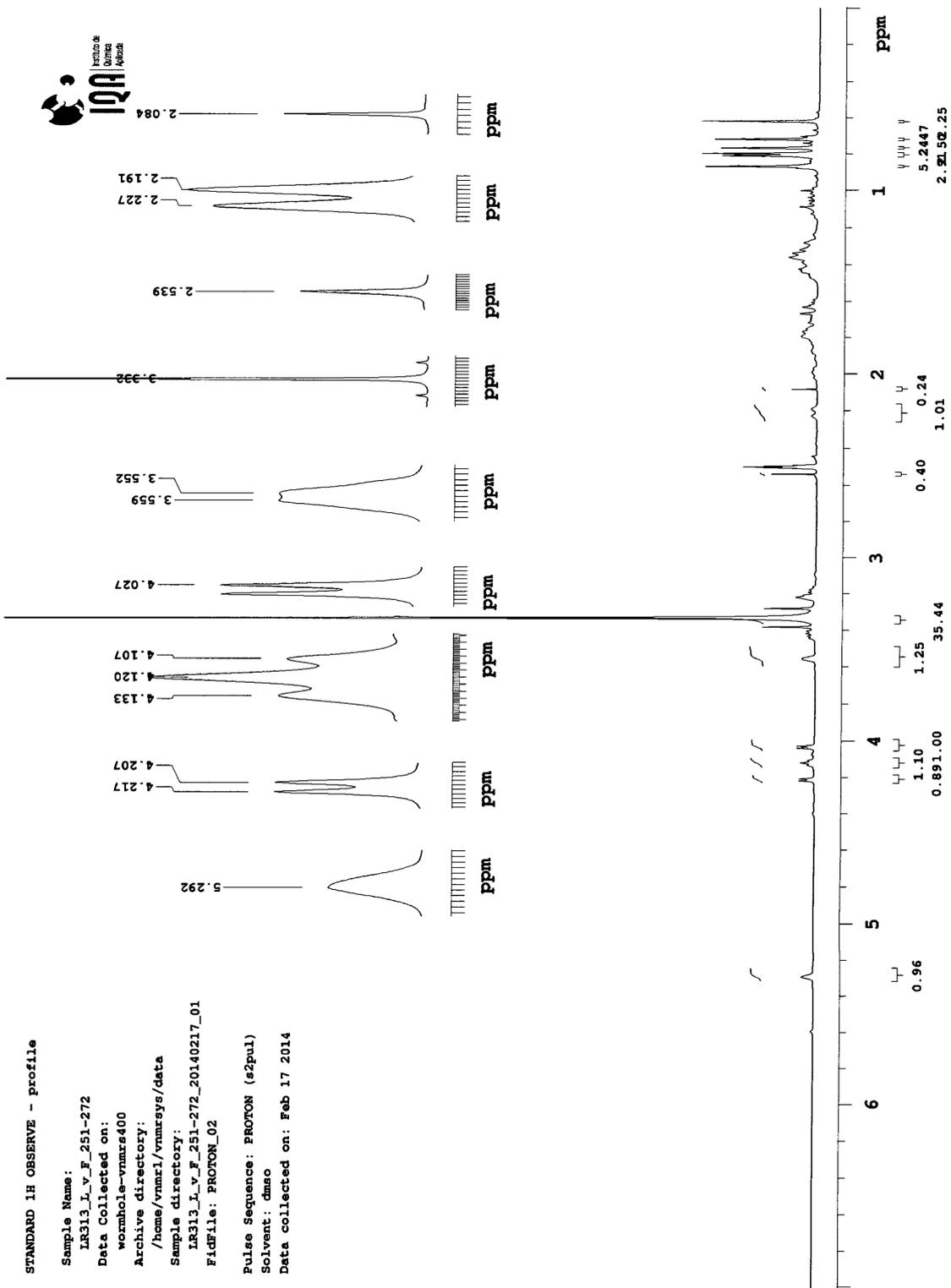
Sample Name:
LR225_H_K_F_25
Data Collected on:
wexmhle-vmrs400
Archive directory:
/home/vmmri/vmrsys/data
Sample directory:
LR225_H_K_F_25_20130617_01
File: CARBON_01
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: acetone
Data collected on: Jun 17 2013



STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
 LR313_L_V_F_251-272
 Data Collected on:
 wormhole-vmr400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vmr400/data
 Sample directory:
 LR313_L_V_F_251-272_20140217_01
 FIDFile: PROTON_02

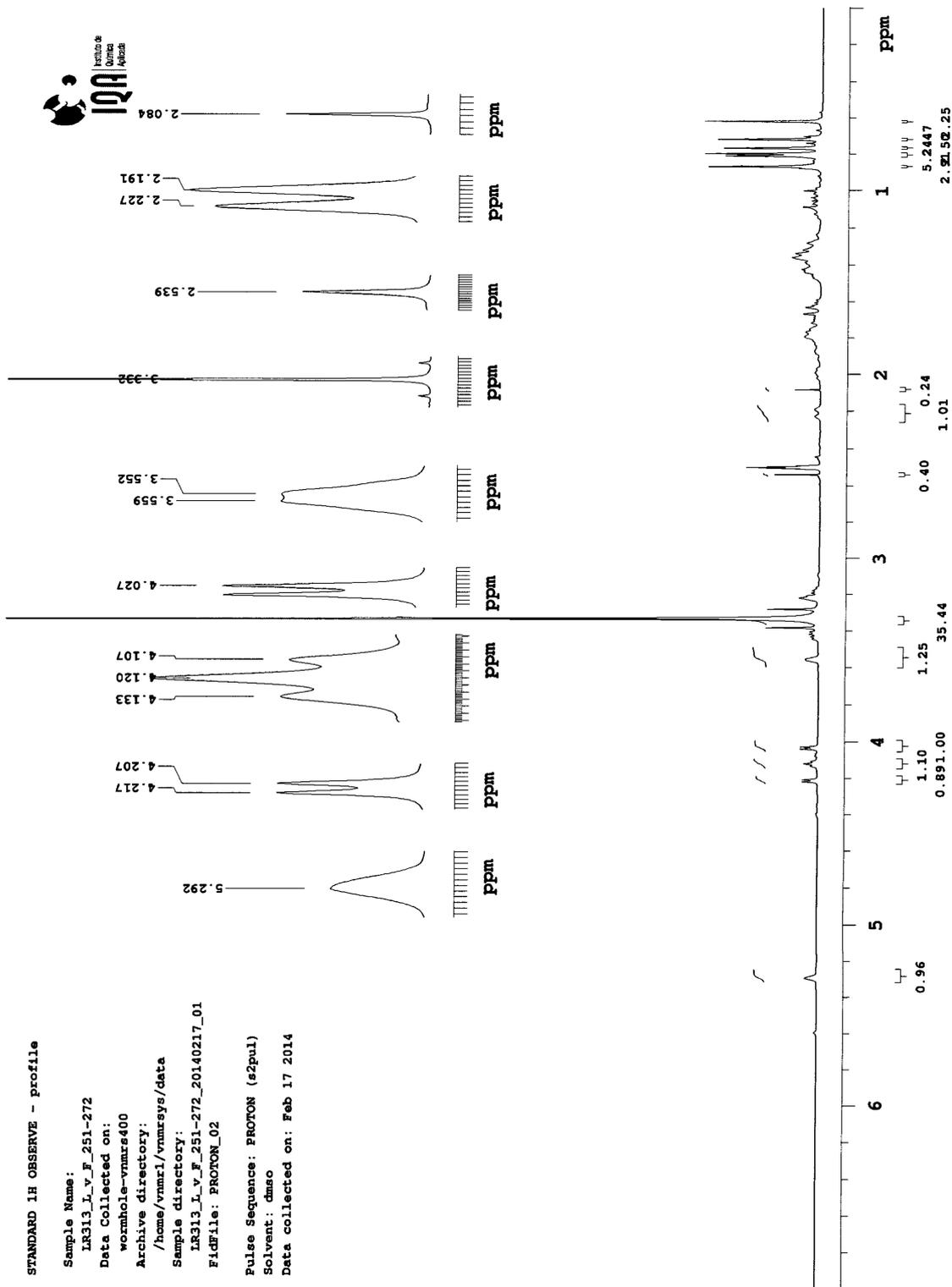
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: dmsd
 Data collected on: Feb 17 2014



STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
 LR313_I_V_F_251-272
 Data Collected on:
 wormhole-vmr400
 Archive directory:
 /home/vmr1/vmrsys/data
 Sample directory:
 LR313_I_V_F_251-272_20140217_01
 FIDFile: PROTON_02

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: dmsc
 Data collected on: Feb 17 2014





STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
IR313_L_v_F_251-272
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
IR313_L_v_F_251-272_20140217_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Feb 17 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.285 sec
Width 25510.2 Hz
10000 repetitions
OBSERVE C13, 100.5382141 MHz
DECOUPLE H1, 399.8353187 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 6 hr, 20 min

