



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad católica de Loja*

ÀREA BIOLÓGICA

TITULO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de la especie *Erythrina smithiana*.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Aguilar Jaramillo, Hermes Leonardo

DIRECTOR: Romero Benavides, Juan Carlos, Ing.

LOJA – ECUADOR

2015



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

Septiembre, 2015

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniero.

Juan Carlos Romero Benavides.

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de la especie *Erythrina smithiana* con actividad antiparasitaria”, realizado por Hermes Leonardo Aguilar Jaramillo, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2015

f) \_\_\_\_\_

Ing. Romero Benavides Juan Carlos

C.I. 1103018477

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.

Yo, Hermes Leonardo Aguilar Jaramillo, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: “Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de la especie *Erythrina smithiana* con actividad antiparasitaria”, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo el Ing. Juan Carlos Romero Benavides, director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f) \_\_\_\_\_

Hermes Leonardo Aguilar Jaramillo  
C.I. 1104966641

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación va dedicado a DIOS por haberme dado salud, para poder lograr este objetivo propuesto, además por brindarme su infinita bondad y amor. A mis padres GEOVANNY Y GREYZ por haberme apoyado en todo momento por todos sus consejos, valores, por toda esa motivación, por sus ejemplos de perseverancia y constancia y sobre todo por todo el amor brindado. A mi hija LUCIANA MARTINA por ser el principal motivo de terminar mi carrera profesional. A GABRIELA por todo su apoyo y compañía durante toda la carrera. A mis hermanos TATIANA SALOME y RONNY SEBASTIAN por brindarme todo su cariño y apoyo día a día. A mi padre de crianza JACINTO JUVENAL que fue un pilar fundamental en mi formación tanto espiritual como humana y por ver en él, un ser humano luchador y emprendedor.

Hermes Leonardo Aguilar Jaramillo.

## **AGRADECIMIENTO**

Mi agradecimiento va muy especialmente a mis padres, por su apoyo durante estos años, por sus consejos para poder salir adelante y ser un hombre de bien, además por su paciencia para poder culminar mi carrera profesional.

Agradezco al Ing. Juan Carlos Romero B. por brindarme su amistad, confianza y conocimientos y por toda la orientación brindada para el normal desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Departamento de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, y a cada uno de los que lo integran, por su confianza, amistad y apoyo brindado durante el tiempo que se empleó durante esta investigación.

A todos mis compañeros y amigos que de una u otra manera, fueron personas importantes, estos años de vida estudiantil, agradezco a todos ellos por compartir momentos incomparables; por haberme ayudado y por haberme motivado día a día.

A la Dra. Alirica Suarez, por impartirme sus conocimientos referentes a la identificación de compuestos. A los Bioquímicos Ronald Silva y Paola Castillo por su ayuda y sus conocimientos en las técnicas de aislamiento de metabolitos secundarios.

Gracias.

## Tabla de contenido

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
LISTA DE TABLAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCION.....	3
CAPÍTULO I.....	5
1. Fin, propósito y componentes del proyecto.....	6
1.1. Fin del proyecto.....	6
1.2. Propósito del proyecto.....	6
1.3. Componentes del proyecto.....	6
CAPÍTULO II.....	7
2. Aspectos generales.....	8
2.1 Antecedentes y biodiversidad.....	8
2.2 Fitoquímica.....	10
2.3 Metabolitos secundarios.....	10
2.4 Descripción del genero <i>Erythrina</i> .....	11
2.5 Descripción de la especie <i>Erythrina smithiana</i> Krukoff.....	13
2.6 Cromatografía.....	14
2.6.1 Cromatografía en capa fina (CCF).....	15
2.6.2 Cromatografía columna.....	15
2.6.3 Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).....	15
2.7 Resonancia magnética nuclear (RMN).....	16
2.8 Cristalización.....	16
2.9 Punto de fusión.....	17
CAPITULO III.....	18
3. METODOLOGÍA.....	19
3.1 Selección y recolección de la materia vegetal.....	19
3.2 Obtención de extractos.....	20
3.3 Desclorofilación del extracto.....	21

3.4	Fraccionamiento del extracto desclorofilado.....	21
3.4.1	<i>Cromatografía en columna.</i> .....	21
3.4.2	<i>Cromatografía en capa fina.</i> .....	22
3.5	Microcolumna. ....	22
3.6	Unión y purificación. ....	22
3.7	Caracterización de metabolitos secundarios.....	22
3.7.1	<i>Punto de fusión.</i> .....	22
3.7.2	<i>Solubilidad.</i> .....	23
3.7.3	<i>Factor de retención.</i> .....	23
3.7.4	<i>Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (CG/EM).</i> 24	
3.7.5	<i>Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).</i> .....	24
CAPITULO IV. ....		25
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	26
4.1.	Extractos obtenidos de la especie <i>Erythrina smithiana.</i> .....	26
4.2.	Extracto hexánico. ....	26
4.2.1	Elución mediante cromatografía en columna abierta extracto hexánico. ...	26
4.2.2	G3H – Mezcla 1.....	29
4.2.3	G5H – Mezcla 2.....	30
4.2.4	G9H.....	31
4.2.5	G19H – Mezcla 3.....	32
4.2.6	G21H – Mezcla 4.....	33
4.2.7	G26H – Mezcla 5.....	36
4.2.8	G31H – Mezcla 6.....	37
4.3	Extracto Acetato de Etilo.....	37
4.3.1	Desclorofilación del extracto de acetato de etilo. ....	37
4.3.2	G11A – Mezcla 7.....	38
4.4	Extracto de metanol. ....	39
CONCLUSIONES .....		40
RECOMENDACIONES.....		41
BIBLIOGRAFÍA.....		42
ANEXOS.....		47

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Taxonomía de <i>Erythrina smithiana</i> .....	14
<b>Tabla 2:</b> Unión de fracciones del extracto hexánico y apariencia.....	27
<b>Tabla 3:</b> Datos espectroscópicos de <sup>13</sup> C RMN (CDCl <sub>3</sub> ) correspondientes al triterpeno pentacíclico acetato β amirina (13).....	34
<b>Tabla 4:</b> Datos espectroscópicos de <sup>13</sup> C RMN (CDCl <sub>3</sub> ) correspondientes al Lupeol (14).....	34
<b>Tabla 5:</b> Datos espectrales de <sup>1</sup> H RMN (CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto de Lupeol .....	35
<b>Tabla 6:</b> Datos de la desclorofilación del extracto de acetato de etilo. ....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principales familias químicas reportadas para las especies del género <i>Erythrina</i> .....	13
<b>Figura 2:</b> Esquema de la metodología a ser investigada.....	19
<b>Figura 3:</b> Mapa del lugar de la recolección de <i>Erythrina smithiana</i> .....	20
<b>Figura 4:</b> Equipo de Rotaevaporación.....	21
<b>Figura 5:</b> Equipo Fisher Johns.....	23
<b>Figura 6:</b> Calculo de factor de retención.....	24
<b>Figura 7:</b> Extractos obtenidos de la especie <i>Erythrina smithiana</i> .....	26
<b>Figura 8:</b> Cromatografía en columna abierta.....	28
<b>Figura 9:</b> CCF con visualización en la luz UV.....	28
<b>Figura 10:</b> CCF con visualización en la luz UV.....	29
<b>Figura 11:</b> G3H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 1 correspondiente al extracto en Hexano Heneicosano (1), Octacosano (2), Docosano (3), Nonacosano (4), Heptacosano (5).....	29
<b>Figura 12:</b> G5H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 2 correspondiente al extracto en Hexano: Octadecano (6), Nonacosano (4), Hexacosanol (7), Heptadecano (8), Hentriacontano (9).....	31
<b>Figura 13:</b> G9H. Estructura del compuesto identificado como: Escualeno (10) correspondiente al extracto en hexano. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 14:</b> G19H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 3 correspondiente al extracto en Hexano: 24(S)-Ethil-3-alpha-5-alpha ciclocholest-22(E)-en-6-ona (11); Stigmasterol-4-en-3-ona (12).....	33
<b>Figura 15:</b> G21H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 4 correspondiente al extracto en Hexano: Acetato de $\beta$ amirina (13); Lupeol (14). ....	36
<b>Figura 16:</b> G26H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 5 correspondiente al extracto en Hexano: Fitol (15).....	37
<b>Figura 17:</b> G11A. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 1 correspondiente al extracto en Acetato de Etilo: Acido 1,2-Benzenodicarboxilico (16) y 1-Heneicosano (17). ....	39

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
CC	Cromatografía en Columna
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido.
EM	Espectrometría de masas
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
Pf	Punto de fusión
RMN	Resonancia Nuclear Magnética
TLC	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta
CG	Cromatografía de Gases.

## RESUMEN

La especie *Erythrina smithiana*, perteneciente a la familia Fabaceae fue recolectada en el barrio Landangui, perteneciente a la parroquia de Malacatos del canton de Loja, de las partes aereas se obtuvieron extractos en Hex, AcOEt y MeOH, con el fin de aislar e identificar metabolitos secundarios. El extracto que mostro mayor rendimiento fue el de MeOH con 4.96%. Se analizaron por cromatografía en columna todos los extractos obtenidos utilizando para su elución diversos disolventes en polaridad ascendente, del extracto de Hexano se aisló un compuesto puro identificado como Escualeno, y 6 mezclas de alcanos, triterpenos y ácidos que al ser analizados por Cromatografia de Gases acoplada a masas podrían ser: mezcla 1: Heneicosano, Octacosano, Docosano, Nonacosano y Heptacosano; mezcla 2: Octadecano, Nonacosano, Hexacosanol, Heptadecano y Hentriacontano; mezcla 3: 24(S)-Ethyl-3-alpha, 5-alpha ciclo cholest-22(E)-en-6-ona y Estigma-4-en-3-ona; mezcla 4: acetato de  $\beta$ -amirina y Lupeol; mezcla 5 se aisló varios metabolitos secundarios pero el único que fue posible su identificación fue Fitol. Del extracto de Acetato de Etilo se identificó una mezcla, mezcla 7: Acido 1,2-Benzenedicarboxilico y 1-Heneicosanol. Para la elucidación de estos metabolitos secundarios se emplearon técnicas espectroscópicas y espectrométricas como: RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , y CG/EM.

**Palabras claves:** *Erythrina smithiana*, Fabaceae, Escualeno, Lupeol, Fitol, acetato de  $\beta$  amirina.

## ABSTRACT

The species *Erythrina smithiana*, belonging to the family Fabaceae was gathered in the neighborhood Landangui, belonging to Malacatos's parish of the province of Loja, of the air parts extracts were obtained in Hex, AcOEt and MeOH, in order to isolate and to identify metabolitos secondary. The extract that mostro major performance was that of MeOH with 4.96 %. All the obtained extracts were analyzed by chromatography in column using for his diverse solvent elución in ascending polarity, of Hexano's extract a pure compound identified as Escualeno was isolated, and 6 mixtures of alcanos, triterpenos and acids that on having been analyzed by Gas chromatography connected to masses might be: mixes 1: Heneicosano, Octacosano, Docosano, Nonacosano and Heptacosano; mixes 2: Octadecano, Nonacosano, Hexacosanol, Heptadecano and Hentriacontano; mixes 3: 24 (S)-Ethyl-3- $\alpha$ , 5- $\alpha$  cycle cholest-22 (E)-en-6-ona and Estigmasterol-4-en-3-ona; mixes 4: acetate of  $\beta$ -amirina and Lupeol; mixture 5 isolated several secondary metabolitos but the only one that was possible his identification was Fitol. Of the extract of Acetate of Ethyl a mixture, mixture identified 7: Acid 1,2-Benzenedicarboxilico and 1-Heneicosanol. For the elucidation of these secondary metabolitos spectroscopic technologies were used and espectrométricas as: RMN 1H, 13C, and CG/EM.

**Key words:** *Erythrina smithiana*, Fabaceae, Escualeno, Lupeol, Fitol. Acetato de  $\beta$  amirina.

## INTRODUCCION

La utilización de plantas, a nivel mundial, constituye la aplicación primaria en la atención de la salud por sus propiedades farmacológicas, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos para el tratamiento de diversas enfermedades (Cos *et al*, 2008).

Las plantas medicinales se utilizan para tratar diversas enfermedades como: afecciones de la piel, caída del pelo, caspa, sarna, entre otros así como analgésicos en general, para dolor de dientes y de cabeza, etc. e incluso para enfermedades culturales como aire, espanto y mal de ojo, padecimientos del sistema circulatorio como anemia, circulación, várices y presión arterial; del sistema digestivo como bilis, cálculos biliares y cólicos, del sistema endocrino como la diabetes, del sistema nervioso como epilepsia e insomnio, del sistema reproductor como trastornos en la matriz, para la fertilidad y para ayudar al parto; del sistema respiratorio como catarro, dolor de garganta, tos, dolor de pecho y dolor de pulmón y del sistema urinario como cálculos renales y dolor de riñones. Traumatismos como golpes, heridas y torceduras y otros padecimientos como cansancio, gangrena, heridas internas y hernias. También se utilizan para tratar el cáncer (Aguilar *et al*, 1994).

Las propiedades farmacológicas de las plantas se deben principalmente a que contienen metabolitos o compuestos secundarios, los cuales ejercen sus efectos una vez que han sido ingeridos o aplicados los contenidos en infusiones, cataplasmas y otras preparaciones (Cortés, 2005).

*Erythrina* es un gran género de aproximadamente 115 especies con un amplia gama de variación morfológica y ecológica. La mayor concentración de especies de *Erythrina* se encuentra en el sur de México y Centroamérica, además de encontrarse también en Ecuador, Bolivia, Perú y Colombia. *Erythrina* se observa cada vez más en la literatura como una productor de forraje, abono verde, la medicina y la madera para artesanías, un árbol de apoyo a los cultivos que suben de valor, un árbol de sombra para el café, el cacao y otros cultivos, los árboles de *Erythrina* pueden producir biomasa que mejora la estructura del suelo, añade nitrógeno, ayuda a controlar las malezas, reduce la erosión (Neill, 1988).

Las especies de *Erythrina* se ubican taxonómicamente en la familia Fabaceae. La familia posee alrededor de 950 géneros y unas 20.000 especies, incluyendo plantas

cultivadas. La mayoría son árboles y arbustos, pero solo unas pocas son hierbas perennes con raíces leñosas.

Las especies de *Erythrina* ocurren en una amplia variedad de hábitats, desde el bosque tropical lluvioso de tierras bajas a desiertos subtropicales muy áridos. Y hasta bosques montanos de coníferas arriba de los 3000 m.s.n.m. (Neill, 1993).

La especie *Erythrina smithiana* se caracteriza por ser un árbol pequeño, atractivo con flores tubulantes en racimos terminales, vainas maduras tuercen abiertas exponiendo una exhibición ordenada de las semillas de color rojo brillante (Gómez, 2012). Hasta el momento no se han encontrado reportes sobre metabolitos secundarios aislados de esta especie; se ha considerado para el presente estudio por los metabolitos secundarios aislados a partir de otras especies del mismo género.

Este proyecto de fin de carrera es parte del *Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador (PROPAD)*, Proyecto 5: *Resistencia antiparasitaria y perspectivas del uso de extractos de plantas nativas en ensayos preclínicos, perteneciente al Instituto Nacional de Investigación en salud Pública (INSPI)*, que cuenta con el financiamiento de la SENESCYT y está siendo desarrollado en colaboración entre el INSPI, la Universidad Central del Ecuador (UCE) y la UTPL, pretendemos la obtención, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Erythrina smithiana* con posible actividad antiparasitaria. En la UCE se evaluará la actividad antiparasitaria de los metabolitos aislados y posteriormente en una segunda fase se realizarán modificaciones químicas y demás tratamientos para potencializar su actividad.

## **CAPÍTULO I.**

## **1. Fin, propósito y componentes del proyecto.**

### **1.1. Fin del proyecto.**

Contribuir con el estudio fitoquímico, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de la especie *Erythrina smithiana*, los mismos pueden ser utilizados como principios activos para la elaboración de nuevos fármacos u otros productos que contribuyan al enriquecimiento industrial.

### **1.2. Propósito del proyecto.**

Obtención de extractos, identificación y caracterización de metabolitos secundarios a partir de la especie *Erythrina smithiana*.

### **1.3. Componentes del proyecto.**

- Recolección de las partes aéreas (hojas y tallos) de *Erythrina smithiana*.
- Obtención de extractos con disolventes en orden de polaridad ascendente hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH).
- Aislamiento, identificación y caracterización de los metabolitos secundarios que se obtengan.

## **CAPÍTULO II.**

## **2. Aspectos generales.**

### **2.1 Antecedentes y biodiversidad.**

Las plantas han desempeñado un papel fundamental en la vida de hombre, quien las ha utilizado para suplir necesidades básicas como alimento, medicina, vivienda, y vestido, incluso en actos rituales. El uso de las plantas es una práctica que existe desde los inicios de la especie humana (Pino y Valois, 2004). Las plantas y sus derivados han mostrado efectos controladores contra: ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos (Grainge y Ahmed, 1988). La utilización de plantas, a nivel mundial, constituye la atención primaria en la atención de la salud, por sus propiedades farmacológicas, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos para el tratamiento de diversas enfermedades (Cos *et al*, 2008).

El hombre utilizó diversas plantas para satisfacer sus más urgentes necesidades como la alimentación y la medicina, originando el interés de algunos por el estudio químico de las plantas, permitiendo la formación de la fitoquímica, una disciplina científica que emplea diversas técnicas que le permiten aislar extractos y fraccionarlos sucesivamente hasta obtener metabolitos secundarios. Estas sustancias están presentes en pequeñas cantidades, sin embargo, es posible reconocer su estructura molecular (Badawy *et al*, 1999). Las drogas derivadas de las plantas son las más importantes para la salud (Beecher *et al*, 1989).

Actualmente, los productos naturales gozan de amplia aceptación y reemplazan, cada vez más, a los productos sintéticos o materiales generados artificialmente (Pino *et al*, 2009).

Se estima que en el mundo existen entre 315000 y 400000 especies de plantas, encontrándose en los bosques tropicales cerca de 125000 especies (Pitman *et al*, 2002). Sin embargo, se calcula que menos del 10 % de ellas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica (Harvey, 2005). Como parte de su metabolismo, las plantas producen una diversidad de compuestos orgánicos, de los cuales la mayoría no parece tener participación directa en su crecimiento y desarrollo. A estos componentes se les conoce como metabolitos secundarios y sus propiedades químicas se han investigado ampliamente desde mediados del siglo XX (Croteau *et al*, 2000).

Ecuador dispone de una inmensidad de conocimiento de uso de plantas medicinales gracias al saber ancestral. En Ecuador han sido reportadas 5172 especies útiles de las

cuales el 60% son medicinales, 30% son comestibles y el 10% se las utiliza para usos sociales (Skoog *et al*, 2003). Se conoce que existen alrededor de 3118 especies pertenecientes a 206 familias usadas con fines medicinales (De la Torre *et al*, 2008). Así Loja y Zamora poseen el 36 % del total de las especies del Ecuador (Ordoñez *et al*, 2006).

En el Sur de Ecuador se registraron hasta ahora 142 plantas medicinales diferentes de 64 familias. De todas las plantas, 39 familias estaban representadas por una sola especie. La medicina tradicional hace uso de una gran parte de la biodiversidad, y que no se concentra solo en un par de familias de plantas. No obstante, solo 70% de las especies usadas son nativas de la zona, mientras una tercera parte representa especies introducidas, la mayoría de Europa (Jørgensen, 2003).

Los bosques montañosos relictos de los Andes del sur de Ecuador y del norte del Perú han sido recientemente reconocidos como uno de los más importantes centros de diversidad florística del mundo, y como hot spots en relación con su prioridad de conservación (Richter *et al*, 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a las plantas medicinales como: "La planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos" (Farnsworth *et al*, 1986). Además las plantas medicinales se han empleado en el tratamiento de múltiples enfermedades que van desde las infecciosas hasta el cáncer.

Las plantas medicinales son las que se han estudiado con mayor intensidad en la región andina ecuatoriana, muchas investigaciones acerca del uso medicinal de especies vegetales andinas se han llevado a cabo con la intención de que los ecuatorianos las incorporen en su cotidianidad y usen las plantas como sustitutas a las medicinas convencionales. Las partes de la planta más utilizadas son hojas (30%), planta entera (10%), y las flores o inflorescencia (6%) (De la Torre *et al*, 2008).

Se ha demostrado además que los medicamentos naturales son muy complejos y actúan de manera combinada haciendo más difícil para los agentes infecciosos desarrollar resistencia frente a estos compuestos (Trejos, 2009).

Se han identificado algunas especies con propiedades medicinales que se han empleado tradicionalmente por los distintos grupos étnicos a nivel mundial y que en la actualidad se comercializan fácilmente. Entre ellas destacan las siguientes: la sangre de drago (*Croton lechleri*), con propiedades cicatrizantes y vigorizantes, la uña de gato (*Uncaria guianensis*, *U. tomentosa*), con propiedades antiinflamatorias y para combatir

dolencias renales, y el chukchuwasu (*Maytenus krukovii*), con propiedades antirreumáticas, antidiarreicas y vermífugas, además de plantas usadas como estimulantes como la guayusa (*Ilex guayusa*) (Buitrón, 1999).

Las propiedades biológicas de estos compuestos son muy diversas: antitumoral, antibiótica, citostática, antifúngica, antioxidante, insecticida o antiinflamatoria (Oliveira *et al*, 2005).

## **2.2 Fitoquímica.**

El análisis fitoquímico tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, por ejemplo en las plantas medicinales aplicando para ello una serie de técnicas de extracción de separación y purificación y de determinación estructural (ultravioleta, infrarrojo, resonancia magnética nuclear) (Lock, 1994).

Los estudios fitoquímicos en las últimas décadas, han seguido el modelo de fraccionamiento biodirigido; los extractos crudos y parcialmente purificados, así como los metabolitos secundarios aislados, son probados frente a la actividad biológica esperada, de estas actividades las de mayor interés son la antioxidante y la anticancerígena (Rageau, 1973).

## **2.3 Metabolitos secundarios.**

Ha sido ampliamente reconocido que las plantas constituyen un inmenso reservorio de metabolitos secundarios biológicamente activos para el control de diversas enfermedades (Grayer y Harborne, 1994).

Los metabolitos secundarios también ayudan a las plantas a protegerlos de algunos patógenos. Dadas sus características medicinales e industriales, dichos metabolitos también son de gran importancia para el ser humano. Sin embargo, el estudio de estos compuestos en plantas tropicales a nivel bioquímico, molecular y genético, es aun limitado. 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 *et al*, 1999).

Las plantas han desarrollado vías complejas para la biosíntesis de metabolitos secundarios. Hasta la fecha se conocen más de 100000 compuestos secundarios (Goossens *et al*, 2003).

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario, presentes en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa, estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben la denominación de productos naturales (Avalos y Perez-Urria, 2009). En general, los principios activos son metabolitos secundarios que no tienen un papel esencial en los fenómenos vitales de una planta (Gomez *et al*, 1999).

El descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos puede satisfacer las necesidades de tratamientos terapéuticos, ya que muchos de estos se realizan con medicamentos que siguen siendo insuficientes ante enfermedades como el cáncer, e infecciones virales, fúngicas, bacterianas etc. (Parra, 2011).

Hoy en día se desarrollan y aplican metodologías para fraccionar y aislar metabolitos secundarios presentes en especies con antecedentes terapéuticos entre los cuales tenemos las técnicas: cromatografía en columna y de capa fina, que permiten separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas (Skoog *et al*, 2003).

Los metabolitos secundarios también denominados productos secundarios o productos naturales 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. (Zhang *et al*, 2005).

En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos, todavía no se conocen mucho de los principios activos a los que deben sus extraordinarias cualidades (Parra, 2011).

#### **2.4 Descripción del genero *Erythrina*.**

El género *Erythrina* pertenece a la familia *Fabaceae* (*Leguminosae*) y comprende un amplio rango de variación morfológica y una gran diversidad ecológica. Se han

descrito alrededor de 115 especies en el planeta y se distribuyen en Sudamérica, Centroamérica, Las Antillas y África occidental (Pino-Rodríguez *et al*, 2004). El mayor número de especies de *Erythrina* se encuentra en el suroeste de México con 27 (Wanjala y Majinda, 2000).

El origen del nombre de *Erythrina* viene de la palabra griega "erythros", que significa rojo, en alusión a las flores rojas brillantes de los árboles de este género. A los arboles de este género también se los conoce como "árbol de coral" (Araujo-Junior *et al*, 2012).

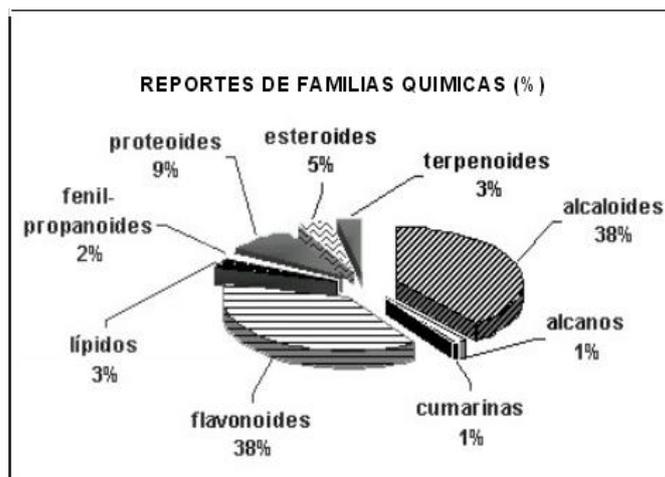
Los órganos vegetales de la especie de *Erythrina* más utilizados por la medicina tradicional son la corteza y las hojas, los cuales se reportan casi en igual porcentaje (33 y 31% respectivamente). Las raíces, las semillas y las flores son órganos también utilizados por la población, aunque con menor frecuencia (12, 10 y 8% respectivamente). Otras partes empleadas son las ramas, el tallo con sus cortezas y la planta entera (Rageau, 1973).

Algunas especies endémicas de *Erythrina* de México han sido estudiadas, y uno de los principales alcaloides identificados es  $\beta$ -eritroidina. En general, la  $\beta$ -eritroidina y sus derivados presentan actividad antiparasitaria, además han sido utilizados en la medicina clínica y la anestesia. (Hargreaves *et al*, 1974).

Con respecto a la actividad antibacteriana, es importante señalar el gran número de bacterias que se ensayaron, en extractos (etanol, agua, metanol, acetona, acetato de etilo, éter y cloroformo), acuosos y orgánicos de 19 especies de *Erythrina*. Las bacterias empleadas fueron: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y *el Micrococcus luteus* (14, 14, 12, 10, 9, 9 y 8% respectivamente). El 84% de las especies probadas dieron resultados positivos, y del total del ensayos realizados, un 60% de ellos resultaron positivos (Pino-Rodríguez *et al*, 2004).

A este género se le ha adaptado varios usos como: postes para cercos, sombras para cultivos perennes como el café y el cacao, cultivo intercalado, forraje para el ganado y aun semillas comestibles en algunos casos y algunas características común de este género como: rápido crecimiento, alta producción de biomasa, fácil propagación por medios vegetativos hacen de la *Erythrina* un género bastante atractivo e importante para ser investigado y analizado (Russo *et al*, 1993).

Un gran número de metabolitos secundarios han sido aislados, tales como alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, lectinas y los proteoides (aminoácidos, proteínas y lectinas), a partir de las especies del género. Los alcaloides isoquinolínicos, son los más predominantes en el género *Erythrina*. Dichos metabolitos presentan actividades biológicas importantes: actividad antiviral, antiinflamatoria, actividad citotóxica, cicatrizante, analgésica, antipirética, antifúngica, antiulcerosa, antioxidante (Pino-Rodríguez *et al*, 2004) (Tanaka *et al*, 2002).



**Figura 1:** Principales familias químicas reportadas para las especies del género *Erythrina*.

**Fuente:** Pino-Rodríguez *et al*, 2003.

Cada una de las partes, de este género han sido consideradas por sus propiedades como: raíces-sudoríficas, hojas-emenagogas, la decocción de las flores se utiliza en afecciones respiratorias y el jugo de los tallos se aplica en el lugar de la picadura de alacrán (Pino-Rodríguez *et al*, 2004).

## 2.5 Descripción de la especie *Erythrina smithiana*.

*Erythrina smithiana* es originaria de Ecuador y Colombia, popular en suelos secos y por ser una especie caducifolia. Su floración se da especialmente en la época seca y en forma muy intensa. Dicha especie se la puede utilizar para el arte de bonsái, para el paisajismo en lugares pequeños, como jardines (Gómez, 2012).

La especie *Erythrina smithiana* se caracteriza por ser un árbol pequeño ornamental, puede llegar a medir hasta 6.5 m. de largo, sus hojas trifoliadas con inflorescencia terminal en color rojo intenso, las semillas son de color rojo escarlata, su tronco es de color marrón con pequeñas espinas cortas y dispersas, la madera es suave y poco resistente (Gómez, 2012).

**Tabla 1:** Taxonomía de *Erythrina smithiana*.

Reino:	Plantae
División:	Angiosperma
Clase:	Dicotyledoneae
Subclase:	Archichlamydeae
Orden:	Rosales
Familia:	Fabaceae
Sub-familia:	Papilionoideae
Tribu:	Phaseoleae
Genero:	<i>Erythrina</i>
Especie:	<i>Erythrina smithiana</i>



**Fuente:** Araujo, 2005.

Hasta el momento no se han encontrado reportes sobre metabolitos secundarios aislados, su investigación se ha enfocado en forma generalizada, pero se la ha considerado para el presente estudio por los metabolitos secundarios aislados a partir de otras especies del mismo género.

## 2.6 Cromatografía.

La cromatografía es uno de los métodos más utilizados para la separación de los componentes de una mezcla compleja, esto debido a los efectos contrapuestos como: retención y desplazamiento. La cromatografía es un método físico basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles: una fija o estacionaria y otra móvil, esta separación se puede realizar en función de sus cargas, masas, tamaños moleculares o polaridad de sus enlaces (Mosquera, 2012).

En todas las separaciones cromatografías la muestra se disuelve en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmiscible, la cual se mantiene fija en una superficie sólida. Las fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria (Jhoson y Pasto, 1977).

### **2.6.1 Cromatografía en capa fina (CCF).**

Es una herramienta para determinar el número de componentes de una mezcla y como una prueba preliminar para realizar una cromatografía en columna.

Es una forma fácil, rápida y ampliamente utilizada para el análisis y aislamiento de compuestos, se aplica las muestras sobre un soporte activado que recubre una lámina de vidrio, plástico o aluminio. La placa se eluye dentro de una cámara de elución y la muestra asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando los componentes de la mezcla a diferentes velocidades lo que provoca su separación, luego se secan totalmente y se observan las manchas separadas, con luz ultravioleta (UV) a diferentes longitudes de onda y también se emplean reveladores específicos que reaccionan con los compuestos dando coloraciones específicas (Douglas, 2001).

La ventaja de Cromatografía en capa fina es que las muestras no tienen que someterse a amplias medidas de limpieza, y la capacidad para detectar una amplia gama de compuestos, utilizando reactivos de pulverización (Tesso, 2005).

### **2.6.2 Cromatografía columna.**

Es la técnica más utilizada para la separación de compuestos orgánicos. Dicha técnica cuenta con dos fases una estacionaria y otra móvil, además su separación puede ser líquido/sólido mejor conocido como adsorción y líquido/líquido conocido como partición. La fase estacionaria se coloca en el interior de una columna, que por lo general es de vidrio o de plástico y que termina con una placa porosa que impide su paso y un estrechamiento con una llave. La mezcla a procesar se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria, mientras que la fase móvil atraviesa este sistema. Los compuestos van saliendo por separado de la columna, y se recogen en fracciones, de acuerdo con la separación requerida, los más polares quedan aún retenidos y para que salgan hace falta aumentar la polaridad del/los disolventes. El adsorbente más utilizado en la cromatografía en columna es gel de sílice, aunque también se puede emplear alúmina (Mikes, 1979) (Guiochon, 2001).

### **2.6.3 Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).**

Son técnicas que constituyen una herramienta para separar, identificar y cuantificar, los componentes volátiles o semivolátiles de mezclas simples o complejas (Gutiérrez, 2000). Son dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.

La mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas (Jhonson y Pasto, 1977).

## **2.7 Resonancia magnética nuclear (RMN).**

Con la espectroscopia de RMN se puede identificar moléculas, estudiar su estructura o estudiar procesos dinámicos. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse solo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones, neutrones o ambos. Esta situación se da en los átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ . este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva, y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hacen que se comparten como si fueren pequeños imanes.

## **2.8 Cristalización.**

Un compuesto orgánico cristalino está constituido por un empaquetamiento tridimensional de moléculas unidas principalmente por fuerzas de Van der Waals, que originan atracciones intermoleculares débiles. La cristalización es un proceso de purificación bastante selectivo, ya que en el crecimiento del cristal, el empaquetamiento regular de moléculas de un mismo tipo, forma y tamaño, tienden a excluir la presencia de impurezas. La cristalización es el método más adecuado para purificar compuestos sólidos, se basa en el hecho de que los sólidos orgánicos son más solubles en un disolvente caliente que en frío.

La cristalización implica disolver el sólido a purificar en una mínima cantidad del disolvente apropiado en caliente, con lo que se obtiene una disolución saturada, al enfriar, la disolución se sobresatura con respecto al sólido, que empieza a formar pequeños núcleos de cristalización en la superficie del líquido. Una vez que los núcleos se han formado, otras moléculas llegan a la superficie y se unen dando lugar al retículo cristalino. Las impurezas solubles permanecen en la disolución ya que no están suficientemente concentradas como para saturar a la disolución y cristalizar. Los cristales obtenidos se recogen por filtración, separándose así por las aguas madres,

se lavan varias veces con el mismo disolvente frío para eliminar las impurezas adheridas a la superficie del líquido, y finalmente se secan.

La cristalización idónea es aquella que tiene lugar lentamente, ya que se conduce a cristales muy puros.

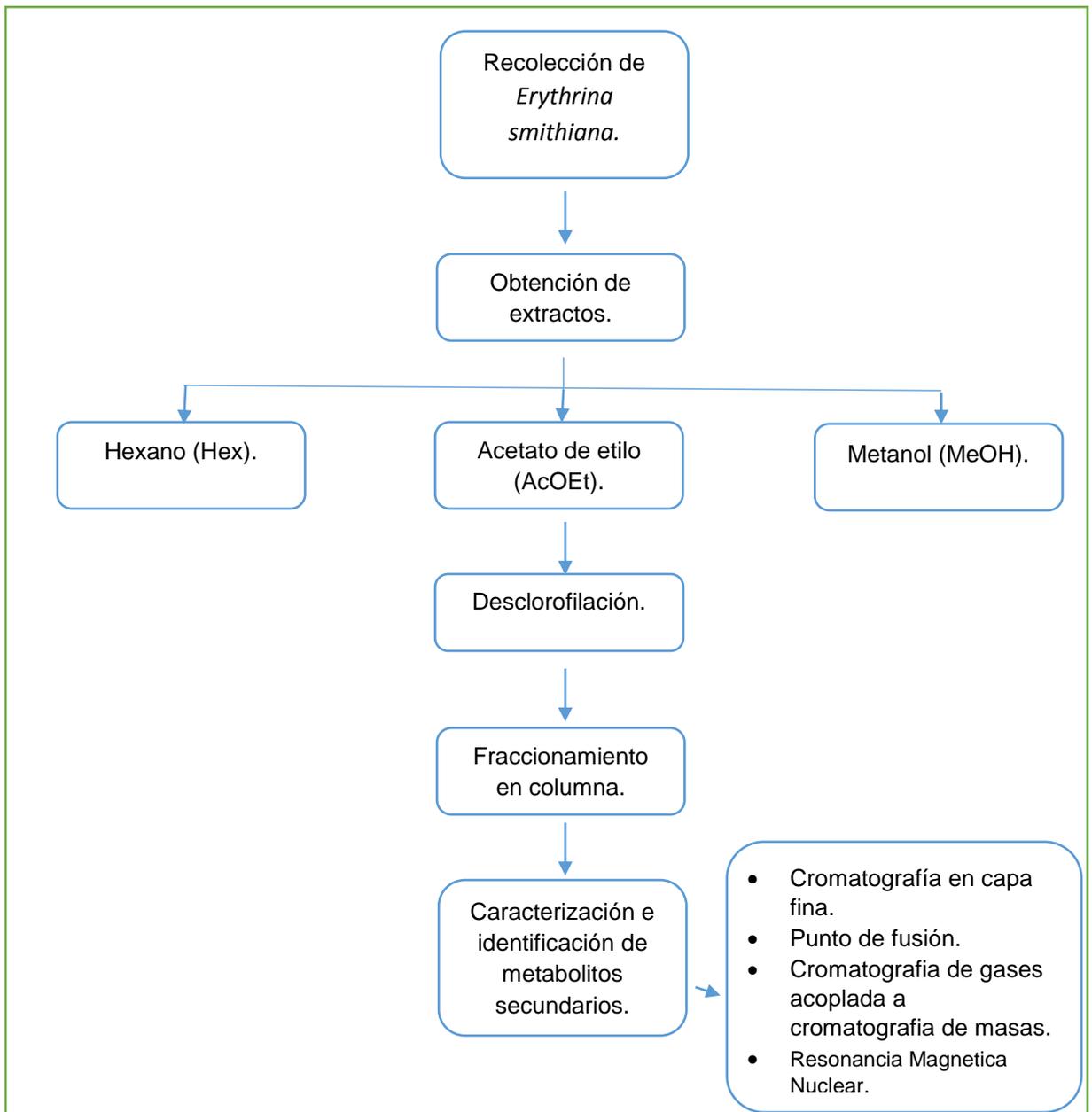
## **2.9 Punto de fusión.**

El punto de fusión de un compuesto sólido cristalino es el cambio a estado líquido a una presión determinada. El rango de temperaturas de fusión es una herramienta útil para establecer la pureza de las sustancias (De la Cruz, 2004).

### **CAPITULO III.**

### 3. Metodología

En la figura 2 mostramos la metodología a ser empleada en el presente trabajo investigativo.



**Figura 2:** Esquema de la metodología a ser investigada.  
**Fuente:** El autor.

#### 3.1 Recolección de la materia vegetal.

La recolección de la materia vegetal, se la realizó en el mes de agosto de 2014, en el barrio Landagui, parroquia Malacatos, cantón de Loja en la zona sur del Ecuador, con coordenadas: 04°12' 11.99"; 79°13'35.25" y altitud de 1470 m.s.n.m. La identificación de la especie fue realizada por la Dra. Fani Tinitana. Una muestra fue almacenada en el herbario de la UTPL con el voucher HUTPL9014.



**Figura 3:** Mapa del lugar de la recolección de *Erythrina smithiana*.

**Fuente:** Mapas del Ecuador.

### 3.2 Obtención de extractos.

Se recolectó 22 kg. de las partes aéreas de la especie *Erythrina smithiana*, la cual fue limpiada para la eliminación de impurezas y microorganismos que puedan causar interferencia en este estudio.

Esta materia vegetal fue colocada en un cuarto de secado a una temperatura de 37°C por aproximadamente 7 días con el objetivo de eliminar la humedad.

Luego de ello se llevó a maceración estática empleando disolventes en polaridad creciente: Hex – AcOEt – MeOH. La materia vegetal se colocó en 6 recipientes y se cubrió con 10L del disolvente respectivo por 3 días, se realizó 3 repeticiones con cada

disolvente, seguido de ello se procedió al filtrado y concentrado al vacío mediante un rotaevaporador. Finalmente se pesó y se etiquetó cada extracto.



**Figura 4:** Equipo de Rotaevaporación.  
**Fuente:** El autor.

El rendimiento de los extractos que se obtuvieron se calculó empleando la fórmula que se muestra a continuación:

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{Peso de extracto}}{\text{Peso de materia seca}} \times 100$$

### **3.3 Desclorofilación del extracto.**

De los extractos obtenidos en Acetato de Etilo y Metanol se procedió a su correspondiente desclorofilación empleando columnas cromatográficas con diferentes dimensiones, primera columna 60 mm de ancho y 70 cm de largo, segunda columna 60 mm de ancho y 100 cm de largo y tercera columna 42 mm de ancho y 50 cm de alto, empacadas con sílice de fase inversa C18 15-20 $\mu$ m. Se utilizó como eluyente mezclas de MeOH-H<sub>2</sub>O en diferentes proporciones.

### **3.4 Fraccionamiento del extracto desclorofilado.**

#### **3.4.1 Cromatografía en columna.**

Se fraccionó por cromatografía en columna abierta utilizando sílice gel 60 F<sub>254</sub>, para la elución de las columnas se utilizó disolventes como: Hexano, Acetato de Etilo, Metanol y mezclas de los mismos, obteniendo fracciones de 100 ml aproximadamente. Luego de ello cada fracción se llevó a rotaevaporación para la eliminación del disolvente utilizado y se realizó cromatografía en capa fina a cada una de ellas.

### **3.4.2 Cromatografía en capa fina.**

Cada fracción que fue obtenida de cromatografía en columna se sometió a cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de aluminio cubiertas de sílice gel 60 F<sub>254</sub> y sílice gel C18, la visualización se la realizó en luz UV 254 y 365 nm, luego de ello cada placa se reveló con ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

### **3.5 Microcolumna.**

Se utilizó las fracciones que presentaron las condiciones adecuadas para este tipo de fraccionamiento, se utilizó sílice gel 60 F<sub>254</sub> y, el empacamiento se realizó en una proporción de 20:1. Para la elución se empleó mezclas de: hexano, acetato de etilo, metanol y mezclas de las mismas, obteniendo fracciones de aproximadamente 50 ml, las mismas que fueron sometidas a rotaevaporación para eliminar los disolventes y posterior a ello se realizó cromatografía de capa fina de cada una, para evaluar su riqueza fitoquímica.

### **3.6 Unión y purificación.**

Para la unión de las diferentes fracciones se tomó en cuenta: la similitud física en cada uno de los viales, la altura de las manchas correspondientes a los diferentes compuestos presentes en la placa de cromatografía en capa fina que se reflejaron en la luz ultravioleta tanto de 254 como de 365 nm, y la similitud visual del revelador utilizando ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

La purificación se realizó haciendo un lavado de los compuestos, tomando en cuenta el grado de solubilidad de cada fracción utilizando el disolvente más apropiado para cada una de ellas.

### **3.7 Caracterización de metabolitos secundarios.**

#### **3.7.1 Punto de fusión.**

El punto de fusión es la temperatura a la cual se encuentra el equilibrio de las fases solido líquido, es decir la materia que pasa de estado sólido a estado líquido se funde. Este cambio ocurre a temperatura constante. El punto de fusión de una sustancia pura es siempre más alto y tiene un rango pequeño de variación

Para el presente trabajo de investigación el punto de fusión se realizó calentando una pequeña muestra del material sólido, por aproximadamente 1 minuto en el equipo Fisher Johns.

En la figura 5 mostramos el equipo Fisher Johns con el cual se realizaba el punto de fusión de los metabolitos y mezclas aisladas.



**Figura 5:** Equipo Fisher Johns.  
**Fuente:** El autor.

### **3.7.2 Solubilidad.**

Se define como una medida de la capacidad de una sustancia para disolverse en un líquido, algunas veces puede sobrepasarla llamándose así sobresaturada. Para que una sustancia se disuelva en otra debe existir semejanza en las polaridades de las moléculas. Los disolventes empleados para la solubilidad fueron: hexano, acetato de etilo, metanol, diclorometano, éter, cloroformo, dimetil sulfóxido y mezclas entre ellos.

### **3.7.3 Factor de retención.**

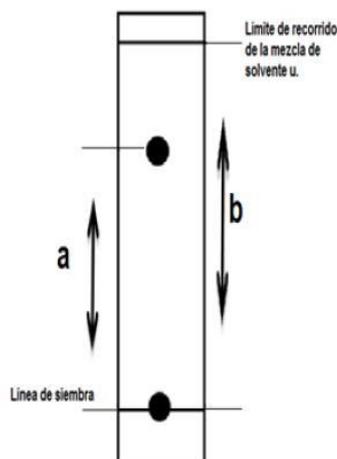
Es la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación-distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente (Choma, 2005).

$$Rf = \frac{a}{b}$$

Donde:

a= Distancia que recorre el compuesto desde la línea de siembra.

b= Distancia que recorre la mezcla de solvente utilizada, desde la línea de siembra hasta el límite de recorrido superior.



**Figura 6:** Cálculo de factor de retención.

**Fuente:** Choma, 2005.

El valor puede ser obtenido a través de la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida (muestra)}}{\text{Distancia recorrida (solvente)}}$$

### 3.7.4 Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (CG/EM).

La identificación de los compuestos aislados a partir de la especie *E. smithiana*, se hizo mediante un cromatógrafo de gases, (Agilent Technologies 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert) con una columna cromatográfica BSNS, las respectivas inyecciones se realizaron en columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil-Metilpolisiloxano).

### 3.7.5 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

Es un fenómeno que se produce cuando los núcleos de ciertos átomos se encuentran inmersos en un campo magnético estático y se expanden a un segundo campo magnético oscilante. Para obtener un espectro de RMN, se colocó una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en medio mililitro de disolvente deuterado en un tubo de vidrio que se encuentra dentro del campo magnético del equipo. Dicho tubo se gira en su eje, el ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte los datos en intensidad respecto a la frecuencia, generando representaciones gráficas.

Los espectros de RMN fueron obtenidos utilizando un equipo de resonancia magnética nuclear Varian 400 MHz-Premium Schelded,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron a 400 MHz y 100 MHz respectivamente.

## **CAPITULO IV.**

## 4. Resultados y análisis

### 4.1. Extractos obtenidos de la especie *Erythrina smithiana*.

Los pesos de los extractos obtenidos de hexano, acetato de etilo y metanol con sus respectivos rendimientos a partir de 7,8 kg de materia vegetal seca se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2:** Pesos y rendimiento con cada disolvente de los extractos obtenidos a partir de *Erythrina smithiana*.

Especie	Disolvente	Peso (g)	Rendimiento (%)
<i>Erythrina smithiana</i>	Hexano	79,04	1,01
	Acetato de etilo	69,33	0,89
	Metanol	387,40	4,97

**Fuente:** El autor.

En la figura 7 se muestran los extractos obtenidos con su respectiva ficha técnica (Nombre de la especie, Disolvente, Cantidad, Fecha de elaboración, Estudiante e investigador).



**Figura 7:** Extractos obtenidos de la especie *Erythrina smithiana*.

**Fuente:** El autor.

### 4.2. Extracto hexánico.

#### 4.2.1 Elución mediante cromatografía en columna abierta extracto hexánico.

En la tabla 3 se muestran los datos correspondientes a la elución de la columna cromatográfica de los 30 g que se trabajaron del extracto de Hexánico.

Las fracciones con el mismo perfil cromatografico se reunión.

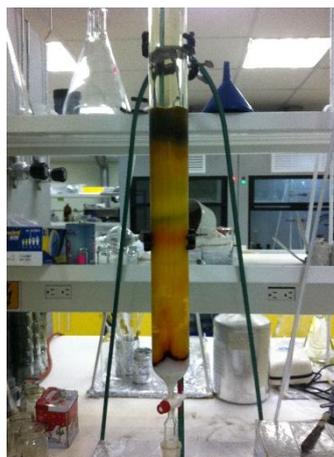
**Tabla 3:** Unión de fracciones del extracto hexánico y apariencia.

Fracciones	Fracciones con el mismo perfil cromatográfico.	Proporción (%)	Disolventes	Apariencia
1-4	G1H	100	Hex	Cristales amarillos
5	G2H	100	Hex	Cristales amarillos
6	G3H	100	Hex	Cristales amarillos
7	G4H	100	Hex	Cristales amarillos
8-9	G5H	100	Hex	Cristales amarillos
10-11	G6H	95:5	Hex:AcOEt	Líquida
12-13	G7H	95:5	Hex:AcOEt	Líquida
14	G8H	95:5	Hex:AcOEt	Líquida
15-17	G9H	95:5	Hex:AcOEt	Líquida
18	G10H	95:5	Hex:AcOEt	Sólida
19-21	G11H	95:5	Hex:AcOEt	Sólida
22	G12H	90:10	Hex:AcOEt	Sólida
23	G13H	90:10	Hex:AcOEt	Sólida
24	G14H	90:10	Hex:AcOEt	Semisólida
25	G15H	90:10	Hex:AcOEt	Semisólida
26-28	G16H	90:10	Hex:AcOEt	Semisólida
29-30	G17H	90:10	Hex:AcOEt	Semisólida
31-33	G18H	90:10	Hex:AcOEt	Líquida
34-35	G19H	90:10	Hex:AcOEt	Sólida
36	G20H	85:15	Hex:AcOEt	Sólida
37-38	G21H	85:15	Hex:AcOEt	Sólida
39	G22H	85:15	Hex:AcOEt	Sólida
40-42	G23H	85:15	Hex:AcOEt	Cristales amarillos
43	G24H	85:15	Hex:AcOEt	Cristales amarillos
44	G25H	85:15	Hex:AcOEt	Sólida
45-46	G26H	80:20	Hex:AcOEt	Sólida
47-49	G27H	80:20	Hex:AcOEt	Sólida
50-51	G28H	80:20	Hex:AcOEt	Sólida
52	G29H	80:20	Hex:AcOEt	Sólida
53-54	G30H	80:20	Hex:AcOEt	Sólida
55-56	G31H	80:20	Hex:AcOEt	Sólida
57-59	G32H	80:20	Hex:AcOEt	Sólida
60	G33H	75:25	Hex:AcOEt	Sólida
61-63	G34H	75:25	Hex:AcOEt	Sólida
64	G35H	75:25	Hex:AcOEt	Sólida
65-70	G36H	75:25	Hex:AcOEt	Sólida
71-75	G37H	70:30	Hex:AcOEt	Sólida
76	G38H	70:30	Hex:AcOEt	Sólida
77	G39H	70:30	Hex:AcOEt	Sólida
78-79	G40H	70:30	Hex:AcOEt	Sólida
81-82	G41H	60:40	Hex:AcOEt	Sólida
83-85	G42H	60:40	Hex:AcOEt	Sólida
86-89	G43H	50:50	Hex:AcOEt	Sólida
90	G44H	50:50	Hex:AcOEt	Cristales
91	G45H	40:60	Hex:AcOEt	Cristales
92	G46H	40:60	Hex:AcOEt	Cristales
93	G47H	40:60	Hex:AcOEt	Sólida
94	G48H	40:60	Hex:AcOEt	Sólida

95-96	G49H	40:60	Hex:AcOEt	Sólida
97	G50H	100	AcOEt	Sólida
98	G51H	100	MeOH	Líquida

Fuente: El autor.

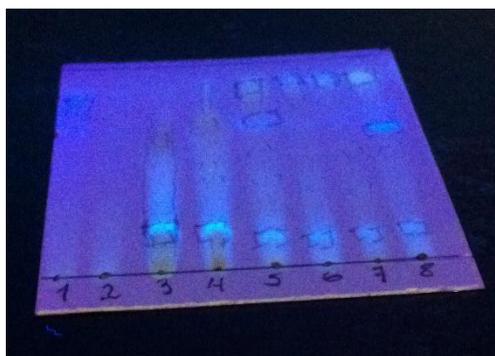
En la figura 8 podemos observar la elución de columna cromatográfica del extracto hexánico para la separación de los posibles metabolitos secundarios. Los diferentes colores que presenta la columna son posiblemente metabolitos secundarios.



**Figura 8:** Cromatografía en columna abierta.

Fuente: El autor.

En las figuras 9 y 10 se muestran las placas de cromatografía en capa fina visualizadas bajo la luz UV.



**Figura 9:** CCF con visualización en la luz UV

Fuente: El autor.

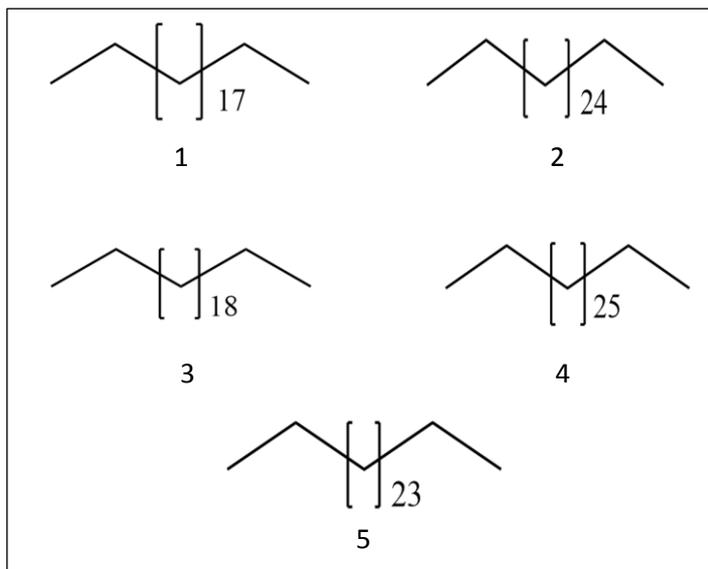


**Figura 10:** CCF con visualización en la luz UV  
Fuente: El autor.

#### 4.2.2 Fracción G3H

A partir del G3H eluida en cromatografía en columna, en polaridad 100% Hex se obtuvo 108,7 mg. de un polvo de color blanquecino con punto de fusión de 40-42°C, un  $R_f$  correspondiente a 0,64, soluble en diclorometano o cloroformo. En los perfiles obtenidos mediante CG/EM se muestran seis tiempos de retención diferentes: Heneicosano (**1**) ( $t_R = 23,84$  min) cuyo peso molecular es de 296,58 g/mol, Octacosano (**2**) ( $t_R = 24,61$  min) peso molecular es de 394,77 g/mol, Docosano (**3**) ( $t_R = 25,37$  min) peso molecular es de 310,61 g/mol, Nonacosano (**4**) ( $t_R = 27,28$  min) peso molecular es de 408,80 g/mol, Heptacosano (**5**) ( $t_R = 30,17$  min) peso molecular es de 380.76 g/mol; para el tiempo de retención restante  $t_R = 26,23$  min, no fue posible su identificación. Su posible identificación se la realizó por medio de CG/EM con el empleo de la base de datos Wiley 7n.l. También se tuvo en cuenta los patrones de fragmentación observados y reportes previos en la literatura que apoyan la estructura propuesta. (Delange *et al*, 2014; García, 2006; Rosales, 2013; Isaza *et al*, 2007; Martínez, 2014).

En la figura 11 mostramos las estructuras de los metabolitos secundarios identificados del extracto hexánico G3H. Tales metabolitos no han sido reportados anteriormente en otras especies del genero *Erythrina*. El metabolito Heneicosano ha sido aislado en la especie *Petiveria alliacea* del extracto de éter y se reportan sus propiedades analgésicas y antibacterianas (Delange *et al*, 2014). Los metabolitos Octacosano, Docosano, Nonacosano y Heptacosano han sido aislados apartir del extracto de éter de *Coffea arabica* y han sido probados como antidiuréticos y antidepresivos (Monroig, 2008).



**Figura 11:** G3H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 1 correspondiente al extracto en Hexano: Heneicosano (1), Octacosano (2), Docosano (3), Nonacosano (4) y Heptacosano (5).  
**Fuente:** El autor.

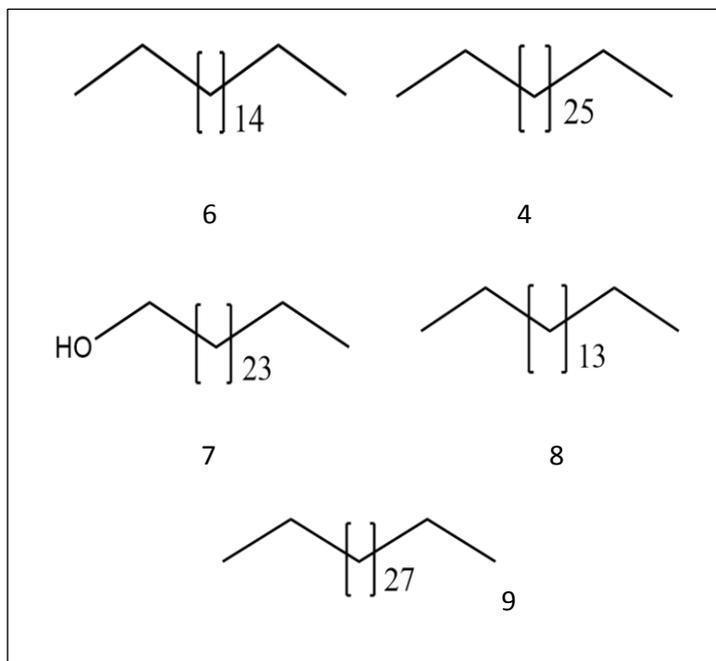
En los anexos podemos observar el espectro (Nº 1) de cromatografía de gases y de (Nº 2- Nº6) espectrometría de masas que corresponden al: Heneicosano (1), Octacosano (2), Docosano (3), Nonacosano (4), Heptacosano (5) respectivamente.

#### 4.2.3 Fracción G5H

A partir del G5H y de la elución en cromatografía en columna, correspondiente al extracto en hexano, en polaridad 100% Hex se obtuvo 67,2 mg de un polvo de color blanquecino con punto de fusión de 30-32°C, un  $R_f$  correspondiente a 0,62, soluble en diclorometano o cloroformo. En los perfiles obtenidos mediante CG/EM se muestran cinco tiempos de retención diferentes: Octadecano (6) ( $t_R = 23,84$  min) cuyo peso molecular es de 254,50 g/mol, Nonacosano (4) ( $t_R = 25,37$  min) peso molecular es de 408,80 g/mol, Hexacosanol (7) ( $t_R = 26,20$  min) peso molecular es de 382,70 g/mol, Heptadecano (8) ( $t_R = 27,29$  min) peso molecular es de 240,47 g/mol, Hentriacontano (9) ( $t_R = 30,18$  min) peso molecular es de 436,85 g/mol. La identificación se la realizó por medio de CG/EM con el empleo de la base de datos Wiley 7n.l. También se tuvo en cuenta los patrones de fragmentación observados y previos reportes en la literatura que apoyan la estructura propuesta. (Abou, 1998; Cabrera y Cabrera, 2005; Isaza *et al*, 2007 Escrig, 2014; Delange, *et al*, 2014; Cabrera y Cabrera 2005).

En la figura 12 mostramos las estructuras de los metabolitos secundarios identificados del extracto hexánico G5H. Tales metabolitos no han sido reportados anteriormente en otras especies del género *Erythrina*. Octadecano y Heptadecano han sido

identificados en las hojas de la especie *Petiveria alliceae* en el extracto de éter de petróleo y se la ha utilizado por sus propiedades antiinflamatorio (Delange, 2013). Hexacosanol y Hentriacontano fue identificado en la especie *Agave furcroydes* en un extracto etanol: agua (1:1) se reportan sus propiedades atioxidantes y como reductor de las concentraciones séricas de colesterol (Mendez *et al*, 2002).



**Figura 12:** G5H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 2 correspondiente al extracto en Hexano: Octadecano (6), Nonacosano (4), Hexacosanol (7), Heptadecano (8), Hentriacontano (9).  
Fuente: El autor.

En los anexos podemos observar el espectro (Nº 7) de cromatografía de gases y de (Nº 8- Nº11) espectrometría de masas que corresponden al: Octadecano (6), Nonacosano (4), Hexacosanol (7), Heptadecano (8), Hentriacontano (9) respectivamente.

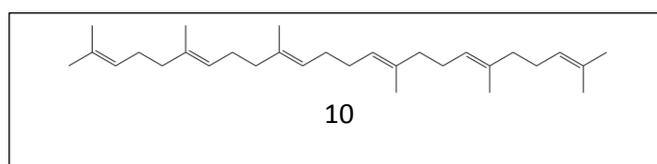
#### 4.2.4 Fracción G9H (Escualeno)

A partir del G9H eluidas en cromatografía en columna, correspondiente al extracto en hexano, en polaridad 95:05 Hex: AcOEt se obtuvo 6 mg de semilíquido de color translucido, un *Rf* correspondiente a 0,46, soluble en cloroformo. En los perfiles obtenidos mediante CG/EM se muestran un tiempo de retención de ( $t_R= 26,49$  min).

La identificación se realizó mediante comparación de espectros reportados en literatura (Keh-Feng y Chin-Joung, 2001). Identificándolo como Escualeno (10), compuesto que ha sido aislado en el género *Erythrina*, más específicamente en la del

extracto hexánico de la especie *Erythrina arborescens* (Keh-Feng y Chin-Joung, 2001). Su fórmula química es  $C_{30}H_{50}$ , con un peso molecular 410,73 g/mol. (Kelly, 1999).

En la figura 13 mostramos la estructura del metabolito secundario aislado del extracto hexánico G9H. Tal metabolito ya ha sido reportado anteriormente en otras especies del genero *Erythrina* por ejemplo en *E. variegata* ha sido identificado a partir del extracto de acetato de etilo obtenido de la maceración de sus hojas utilizando como disolventes diclorometano/metanol (1/1) y ha sido utilizado por su actividad antihelmíntica, anticancerígena, antimalárica y antifertilizante (Herlina *et al*, 2011).



**Figura 13:** G9H. Estructura del compuesto identificado como: Escualeno (10) correspondiente al extracto en hexano.

**Fuente:** El autor.

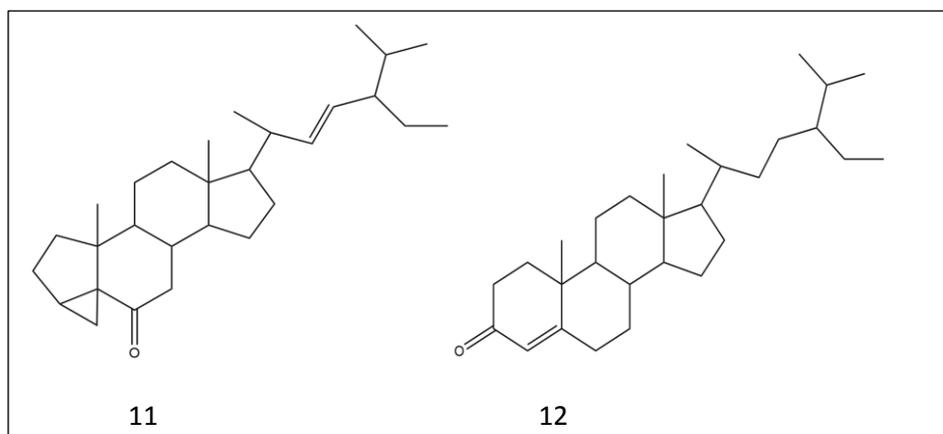
En los anexos podemos observar el espectro (Nº 12) de cromatografía de gases y (Nº 13) espectrometría de masas que corresponden al: Escualeno (10).

#### 4.2.5 Fracción G19H3

A partir de G19H eluidas en cromatografía en columna, correspondiente al extracto en hexano, en polaridad 90:10 Hex: AcOEt, se obtuvo 11 mg de un polvo de color blanquecino con punto de fusión de 56-62°C, un *Rf* correspondiente a 0,85, soluble en diclorometano. En los perfiles obtenidos mediante CG/EM se muestran siete tiempos de retención diferentes: 24(S)-Etil-3- $\alpha$ -5- $\alpha$  ciclocholest-22(E)-en-6-ona (11) ( $t_R$ = 35,97 min) peso molecular es de 410,67g/mol; Estigmasterol-4-en-3-ona (12) ( $t_R$ = 37,84 min) peso molecular es de 412,69 g/mol, para los tiempos de retención restantes:  $t_R$ = 20,52;  $t_R$ = 35,07 min;  $t_R$ = 35,19;  $t_R$ = 35,97 min;  $t_R$ = 38,11 min; no fue posible su identificación. La identificación se la realizó por medio de CG/EM con el empleo de la base de datos Wiley 7n.l. También se tuvo en cuenta los patrones de fragmentación observados y previos reportes en la literatura que apoyan la estructura propuesta (Chandrakanthan *et al*, 2014).

En la figura 14 se muestra las estructuras de los metabolitos secundarios aislados del extracto hexánico G19H. Dichos metabolitos no han sido reportados anteriormente en otras especies del genero *Erythrina*. Estigmasterol-4-en-3-ona ha sido aislado en

especies como *Miconina aeruginosa* y *Tibouchina ciliaris* ambas en el extracto de acetato de etilo y se reporta efecto hipoglucemiante (Hipolito, J. *Et al*, 2007).



**Figura 14:** G19H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 3 correspondiente al extracto en Hexano: 24(S)-Ethil-3- $\alpha$ -5- $\alpha$  ciclocholest-22(E)-en-6-ona (11); Estigmasterol-4-en-3-ona (12).  
**Fuente:** El autor.

En los anexos podemos observar el espectro (Nº 14) de cromatografía de gases y de (Nº 15 - Nº16) espectrometría de masas que corresponden al: 24(S)-Ethil-3- $\alpha$ -5- $\alpha$  ciclocholest-22(E)-en-6-ona (11); Estigmasterol-4-en-3-ona (12) respectivamente.

#### 4.2.6 Fracción G21H

Obtenida de la elución en cromatografía en columna, correspondiente al extracto en hexano, en polaridad 85:15 Hex: AcOEt se obtuvo 8,2 mg de un polvo de color blanquecino con punto de fusión de 160-165°C, un *Rf* correspondiente a 0,57, soluble en cloroformo.

La identificación se realizó mediante comparación de espectros reportados en literatura (Feleke y Brehane 2005; Jamal *et al*, 2008). Identificando los compuestos como: acetato de  $\beta$  amirina (13) ( $t_R$ = 35,47 min) cuyo peso molecular es de 468,75 g/mol y fórmula química  $C_{32}H_{52}O_2$ , Y Lupeol (14) ( $t_R$ = 37,03 min) cuyo peso molecular es de 426,72 g/mol de fórmula química  $C_{30}H_{50}O$ .

En la tabla 4 se muestran los datos espectroscópicos correspondientes  $^{13}C$  del metabolito acetato de  $\beta$  amirina aislado e identificado a partir de G21H.

**Tabla 4:** Datos espectroscópicos de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) correspondientes al triterpeno pentacíclico acetato  $\beta$  amirina (13).

Acetato de $\beta$ amirina		
Asignación de C	Desplazamiento químico $^{13}\text{C}$	
	Espectro $^{13}\text{C}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ )	Referencia bibliográfica (Feleke, S. y Brehane, A. 2005)
1	39.5	39.6
2	27.4	27.9
3	79.2	80.8
4	30.5	39.5
5	55.3	55.6
6	18.5	18.6
7	33.5	33.6
8	38.7	38.3
9	47.4	47.4
10	34.9	35.0
11	23.7	23.5
12	121.8	121.5
13	145.3	145.1
14	41.9	42.0
15	28.3	28.2
16	27.1	27.9
17	32.7	32.5
18	63.8	59.0
19	-----	40.2
20	41.9	41.4
21	31.1	31.0
22	-----	42.0
23	28.6	29.5
24	15.5	15.8
25	15.7	15.8
26	16.9	16.8
27	23.9	23.5
28	29.8	28.8
29	17.0	17.6
30	-----	21.2
31	-----	170
32	-----	21.2

**Fuente:** El autor.

En la tabla 5 se muestran los datos espectroscópicos correspondientes  $^{13}\text{C}$  del metabolito Lupeol asilado e identificado a partir de G21H.

**Tabla 5:** Datos espectroscópicos de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) correspondientes al Lupeol (14).

Lupeol		
Asignación de C	Desplazamiento químico $^{13}\text{C}$	
	Espectro $^{13}\text{C}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ )	Referencia bibliográfica (Jamal et al, 2008) (hexano).
1	38.2	38.2
2	25.3	25.3

3	79.1	79.1
4	38.9	38.9
5	55.5	55.5
6	18.5	18.5
7	34.4	34.5
8	41.0	41.0
9	50.6	50.6
10	37.3	37.3
11	21.1	21.1
12	27.5	27.5
13	39.0	39.0
14	42.9	43.0
15	27.6	27.6
16	35.7	35.8
17	43.2	43.2
18	48.5	48.5
19	48.1	48.1
20	151.2	151.1
21	29.8	30.0
22	40.2	40.2
23	28.1	28.2
24	15.6	15.6
25	16.3	16.3
26	16.2	16.2
27	14.7	14.7
28	18.2	18.2
29	109.5	109.5
30	19.5	19.5

**Fuente:** El autor.

En la tabla 6 se muestran los datos espectroscópicos correspondientes  $^1\text{H}$  del metabolito Lupeol asilado e identificado a partir de G21H.

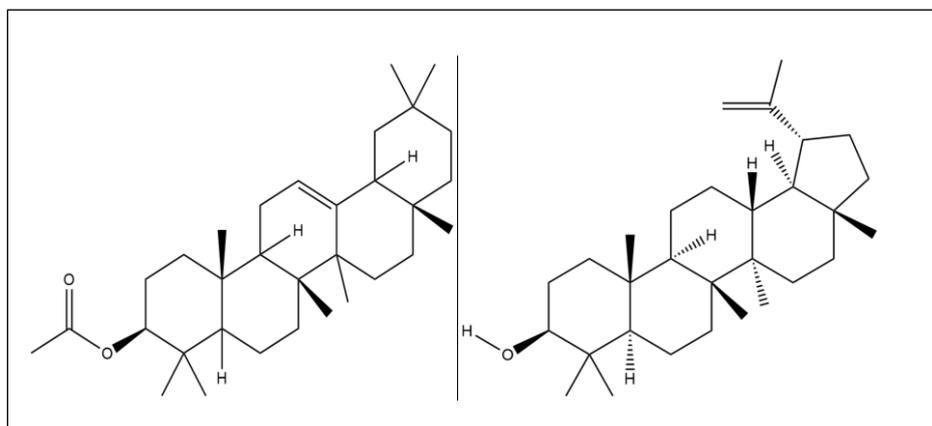
**Tabla 6:** Datos espectrales de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto de Lupeol.

Lupeol			Referencia		
Desplazamiento químico	Multiplicidad	Asignación	Desplazamiento químico	Multiplicidad	Asignación
<b>3.17</b>	M	H-3	3.16	dd	H-3
<b>2.39</b>	S	H-12	2.35	S	H-12
<b>3.16</b>	S	H-19	3.18	S	H-19
<b>0.94</b>	D	H-22	0.92	S	H-22
<b>0.94</b>	D	H-24	0.95	S	H-24
<b>0.99</b>	S	H-25	0.98	S	H-25
<b>1.03</b>	S	H-26	1.05	S	H-26
<b>0.79</b>	S	H-27	0.77	S	H-27

0.87	S	H-28	0.89	S	H-28
4.69-4.56	S	H-29	4.68-4.56	S	H-29
1.68	S	H-30	1.66	S	H-30

Fuente: El autor

A continuación podemos ver las estructuras de los metabolitos secundarios aislados e identificados a partir de G21H. El metabolito identificado como Acetato de  $\beta$  amirina ya ha sido identificado anteriormente en otras especies del genero *Erythrina*, específicamente en *E. Velutina*, mostrando actividad anticancerígena (Virtuoso, S. 2005). Y el metabolito identificado como Lupeol igualmente ya ha sido identificado en otras especies del genero *Erythrina* específicamente *E. excelsa* (Kwamou, G. 2005). Para este compuesto se reporta actividad antimalarica contra *P. falciparum* (Srinivasan *et al*, 2002).



**Figura 15:** G21H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 4 correspondiente al extracto en Hexano: Acetato de  $\beta$  amirina (13); Lupeol (14).  
Fuente: El autor.

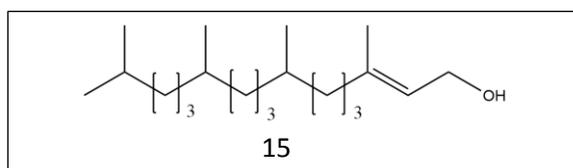
En los anexos podemos observar el espectro (Nº 17) de cromatografía de gases y de (Nº 18 - Nº19) espectrometría de masas que corresponden al: acetato  $\beta$  amirina (13), Lupeol (14). En el espectro (Nº 20 - Nº21) corresponden al espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de los dos metabolitos antes identificados.

#### 4.2.7 Fracción G26H

A partir de G26H eluidas en cromatografía en columna, correspondiente al extracto en hexano, en polaridad 80:20 Hex:AcOEt, se obtuvo 20 mg de un semi-liquido color blanquecino con punto de fusión de 47-49°C, un  $R_f$  correspondiente a 0,67, soluble en diclorometano. En los perfiles obtenidos mediante CG/EM se muestran siete tiempos de retención diferentes: Fitol (15) ( $t_R$ = 20,52 min) peso molecular es de 296,53g/mol;

para los tiempos de retención restantes:  $t_R= 21,20$  min,  $t_R= 23,00$ ;  $t_R= 23,30$  min;  $t_R= 30,26$ ;  $t_R= 30,78$  min;  $t_R= 43,39$  min; no fue posible su identificación. La identificación se la realizó por medio de CG/EM con el empleo de la base de datos Wiley 7n.I. También se tuvo en cuenta los patrones de fragmentación observados y previos reportes en la literatura que apoyan la estructura propuesta. (Pongprayoon, 1992).

En la figura 16 mostramos la estructura del metabolito secundario aislados e identificado del extracto hexánico G26H. El metabolito identificado como Fitol se ha reportado anteriormente en otras especies del genero *Erythrina* como en *E. mulungu* y se la ha utilizado para elaborar vitaminas E y K (Flausino, 2006).



**Figura 16:** G26H. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 5 correspondiente al extracto en Hexano: Fitol (15).

**Fuente:** El autor.

En los anexos podemos observar el espectro (Nº 22) de cromatografía de gases y (Nº 23) espectrometría de masas que corresponden al: Fitol (15).

#### 4.2.8 Fracción G31H

A partir G31H eluidas en cromatografía en columna, correspondiente al extracto en hexano, en polaridad 75:25 Hex:AcOEt, se obtuvo 15 mg de un polvo de color blanquecino con punto de fusión de 55-60°C, un *Rf* correspondiente a 0,77, soluble en diclorometano. En los perfiles obtenidos mediante CG/EM se muestran tres tiempos de retención diferentes:  $t_R= 14,48$ min,  $t_R= 27,24$  min,  $t_R= 45,58$  min, no fue posible su identificación con el empleo de la base de datos Wiley 7n.I.

En los anexos podemos observar el espectro (Nº 24) de cromatografía de gases de la mezcla antes mencionada.

### 4.3 Extracto Acetato de Etilo.

#### 4.3.1 Desclorofilación del extracto de acetato de etilo.

Se realizó una única desclorofilación, obteniendo 26 fracciones, las que fueron evaluadas y reunidas de acuerdo a su perfil cromatorafico mostrado en CCF, obteniendo 11 fracciones de desclorofiladas (G1A-G11A).

En la tabla 7 se muestra los grupos con sus respectivas fracciones y la proporción que fueron eluidas cada una de ellas del extracto de acetato de etilo.

**Tabla 7:** Datos de la desclorofilación del extracto de acetato de etilo.

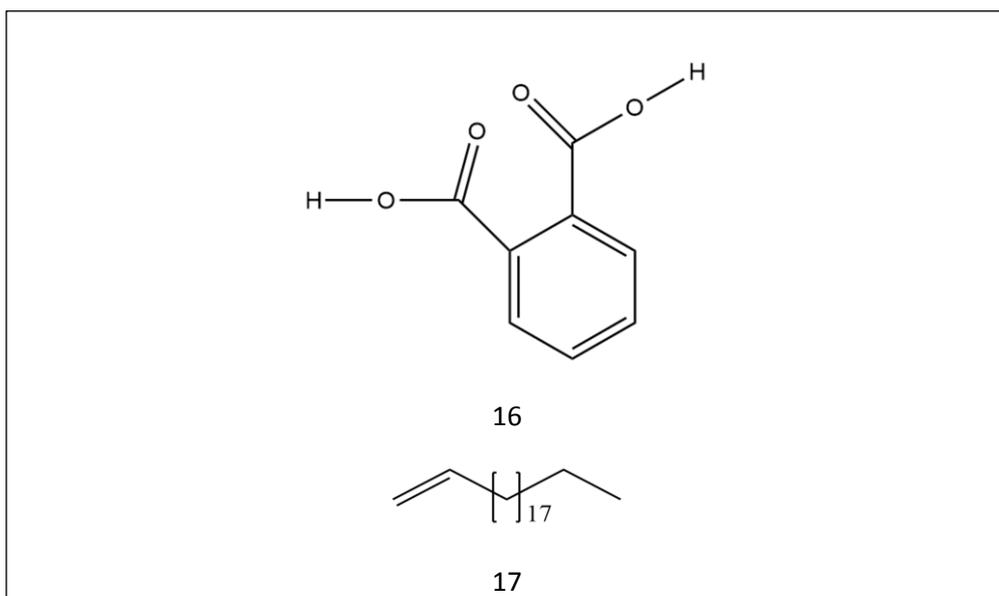
Fracciones	Fracciones con el mismo perfil cromatográfico	Proporción (%)	Disolventes	Apariencia
1-1B-1C	G1A	80:20	MeOH:H <sub>2</sub> O	Cristales amarillos
1A-1D-1E-2	G2A	80:20	MeOH:H <sub>2</sub> O	Cristales amarillos
3-5	G3A	80:20	MeOH:H <sub>2</sub> O	Cristales amarillos
6-7	G4A	80:20	MeOH:H <sub>2</sub> O	Líquida
8	G5A	80:20	MeOH:H <sub>2</sub> O	Líquida
9-10	G6A	80:20	MeOH:H <sub>2</sub> O	Líquida
11-13	G7A	80:20	MeOH:H <sub>2</sub> O	Sólida
14	G8A	100	MeOH	Sólida
15-17	G9A	100	MeOH	Sólida
18-24	G10A	100	AcOEt	Semisólida
25-26	G11A	100	AcOEt	Semisólida

Fuente: El autor.

#### 4.3.2 Fracción G11A

Obtenida de la elución en cromatografía en columna, correspondiente al extracto en acetato de etilo, en polaridad 94:6 Hex:AcOEt se obtuvo 3 mg. de un polvo de color blanquecino con punto de fusión de 22-24°C, un *R<sub>f</sub>* correspondiente a 0,36, soluble en cloroformo. En los perfiles obtenidos mediante CG/EM se muestran cuatro tiempos de retención diferentes: Ácido 1,2-Benzenodicarboxílico (**16**) (*t<sub>R</sub>*= 24,13 min) peso molecular es de 166,13 g/mol, 1-Heneicosano (**17**) (*t<sub>R</sub>*= 32,71 min) peso molecular es de 296,58 g/mol; para los tiempos de retención restantes *t<sub>R</sub>*= 28,84 min, y *t<sub>R</sub>*= 38,81, no fue posible su identificación. La identificación se la realizó por medio de CG/EM con el empleo de la base de datos Wiley 7n.l. También se tuvo en cuenta los patrones de fragmentación observados y previos reportes en la literatura que apoyan la estructura propuesta. (Cunha, *et al*, 2008; Salinas y Garcia, 1985; Melo, 2014).

En la figura 17 se muestra las estructuras de los metabolitos secundarios aislados del extracto de acetato de etilo G11A. Dichos metabolitos no han sido reportados anteriormente en otras especies del género *Erythrina*. El Ácido 1,2-benzenodicarboxílico y 1-Heneicosano han sido identificados en la especie del hongo *Aspergillus ochraceus* en extracto hexánico y han sido utilizados por sus propiedades antioxidantes (Armas *et al* 2009).



**Figura 17:** G11A. Estructuras de los compuestos presentes en la mezcla 1 correspondiente al extracto en Acetato de Etilo: Acido 1,2-Benzenodicarboxilico (16) y 1-Heneicosano (17).

**Fuente:** El autor.

En los anexos podemos observar el espectro (Nº 25) de cromatografía de gases y de (Nº 26 - Nº27) espectrometría de masas que corresponden al: Acido 1,2-Benzenodicarboxilico (16) y 1-Heneicosano (17) respectivamente.

#### 4.4 Extracto de metanol.

Se realizó el procedimiento de desclorofilación por cuatro ocasiones, se obtuvo de esta manera 4 grupos de desclorofilación, en primero se obtuvo 25 fracciones, del segundo 13 fracciones. Del tercer grupo 16 fracciones y del cuarto grupo 12 fracciones, obteniendo en total 66 fracciones, las que fueron evaluadas y reunidas de acuerdo a su perfil cromatografico mostrado en CCF, obteniendo 32 fracciones de desclorofiladas (G1M-G32M).

## CONCLUSIONES

De los extractos obtenidos Hexano, Acetato de Etilo y Metanol a partir de la especie *Erythrina smithiana*, el que mostró mayor rendimiento fue el de Metanol con un 4.96%, seguido del extracto de Hexano con 1.01% y finalmente el extracto de Acetato de Etilo con 0.89%.

Del extracto de AcOEt se obtuvo una mezcla: G11A, (Acido 1,2-Benzenedicarboxílico y Heneicosano), a pesar no encontrarse en la especie *Erythrina smithiana*, se ha logrado identificar en la especie *Aspergillus ochraceus*.

Del extracto de Hexano se aisló aislar el compuesto Escualeno de la fracción G9H en polaridad 95:05 Hex:AcOEt.

Del extracto de Hexano se obtuvieron cinco mezclas: G3H eluida en 100% Hexano: Heneicosano, Octacosano, Docosano, Nonacosano y Heptacosano; G5H eluida en 100% Hexano: Octadecano, Nonacosano, Hexacosanol, Heptadecano y Hentriacontano; G19H eluida en Hexano:Acetato de Etilo 90:10 (v/v): 24(S)-Ethyl-3-alpha-5-alpha ciclocholest-22(E)-en-6-ona y Stigmasterol-4-en-3-ona; G21H eluida en Hexano: Acetato de Etilo 85:15 (v/v) Acetato de  $\beta$ -amirina y Lupeol; G26H eluida en Hexano: Acetato de Etilo 80:20 (v/v): Fitol y otros 4 metabolitos secundarios no identificados.

## **RECOMENDACIONES**

Buscar nuevas técnicas de aislamiento y separación para tratar de obtener compuestos puros, además seguir realizando búsquedas con evidencias que corroboren su actividad biológica.

Recolectar la especie en otra época del año y seguir con las investigaciones de la especie trabajada, ya que no se han encontrado metabolitos secundarios específicos, y puede ser una buena alternativa para la medicina tradicional.

Realizar pruebas biológicas con cada compuesto identificado, con el fin de determinar todas sus propiedades.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abou, A. 1998. Análisis GC/MS y actividad antimicrobiana de los constituyentes volátiles de las flores y hojas de algunas especies de Musa. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 277(288), 39.
- Aguilar, A., Camacho, J., Jacquez, P. y Lopez, M. 1994. Plantas medicinales del herbario IMSS. Mexico. Mexico D. F. p. 218
- Araujo-Junior., De Oliveira, M., Aquino, P., Alexandre-Moreira, M., y Santana, A. 2012. A Phytochemical and Ethno pharmacological review of the genus *Erythrina*. Brazil. Edt. Dr. Venketeshwer Rao. Toronto. 3-18.
- Araujo, V. 2005. Estudio taxonómico e histológico de seis especies del género *Erythrina* l. Familia: *Fabaceae*. Peru. Universidad Mayor de San Marcos. 3-10.
- Armas, H., Castiilo, I., Noguera, T. y Quintero, M. Evaluación química del hongo *Aspergillus ochraceus* 3M CM C3 aislado de raíces de *Rhizophora mangle*. 2009. Venezuela.
- Avalos, A., y Perez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario en plantas. Reduca (Biología) Serie Fisiología vegetal. España. 1-12.
- Badawy, M., Kinghorn, D., Cordell, G., y Farnsworth, N. 1980. Potential anti-cáncer agent constituent of *Amyris Pinnata*. Estados Unidos. 331-334.
- Beecher, C., Farnsworth, N., y Gyllenhaal, C. 1989. Pharmacologically active secondary metabolites from Wood. Estados Unidos. 1.
- Buitron, X. 1999. Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. TRAFFIC International. Reino Unido: Edigraf.31–35.
- Cabrera, I., y Cabrera, C. 2005. Las plantas y sus usos en las islas de Providencia y Santa Catalina. Universidad del Valle. Colombia.
- Chandrakanthan, M., Stanislaus, A., Krishnakumar, S., Karuppiah, V., Kambattan, S., y Alagumuthu, T. 2014. Antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of solvent extracts of *Tiliacora acuminata*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(9).
- Cortés, J. 2005. Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec. Colombia. p. 45.
- Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A., y Pieters, L., 2008. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection – an update 1998 – 2007. *Planta Med.* 2008: 1323-1337.
- Croteau, R., Kutchan, T., y Lewis, N. 2000. Natural products (secondary metabolites). *In* *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.B.; Grissem, W.; Jones, R.L. (Editors). American Society of Plant Physiologists. Rockville, US. p. 1250-1318.

- Cunha, C., Lima, S., De Barros, R., y Vieira, F. 2005. Análise dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas e cascas do caule de *Copaifera luetzelburgii*. Brasil.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., y Balsle, H. 2008. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA y Herbario AAU. Quito y Aarhus, p.p. 105–114.
- Delange, D., Bode, T., Cuéllar, A., Lizama, R., y Olive, E. 2014. Estudio por CG-EM de los componentes volátiles de las hojas de *Petiveria alliacea*. Revista CENIC. Ciencias Químicas, 45, 48-51.
- Douglas, A., Skoog, J., Holler, A., y Nieman, P. 2001. Principios de análisis instrumental. 5ta edición. MC Graw-Hill Interamericana. Colombia. 4-8.
- Farnsworth, R., Akerele, O., Bingel, S., Soejarto, D., y Guo, Z. 1986. "Place des plantes médicinales dans la thérapeutique". *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Sante*. 64 (2) 159-175.
- Flausino, A. 2006. "Análise fitoquímica e estudo biomonitorado da atividade ansiolítica de *Erythrina mulungu* (Leguminosae-Papilionaceae) em camundongos submetidos a diferentes modelos animais de ansiedade". (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- García, I. 2006. Caracterización química de fibras de plantas herbáceas utilizadas para la fabricación de pastas de papel de alta calidad. España.
- Gómez, A. 2012. Caracterización con marcadores moleculares RAM'S (Random Amplified Microsatellites) de alguna especie del genero *Erythrina* presentes en Colombia. Editorial Palmira. 15-32.
- Gómez, G., Villamarino, T., y Rodríguez, J. 1999. Las plantas de extractos, bases para un plan de desarrollo del sector. Editorial mundi-prensa libros, S.A. España.
- Goossens, A., Hakkinen, S., Laakso, I., Seppanen, T., Biodi, S., de Sutter V. Lammertyn, F. Nuutila, A: soderlund, H. Zabeau, H. Oksman-CAldentay K. 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells.
- Grayer, R., y Harborne, J. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants. 1982-1993. *Phytochemistry* 37(1): 19-35.
- Grainge, M., y Ahmed, S. 1988. Handbook of plant with pest-control properties. Estados Unidos. 470.
- Guiochon, G. 2001. Basic principles of chromatography in: Handbook of *Anal. Tech.* Alemania Eds. Günzler, H. and Williams, A.1, 173-198.
- Guitierrez, C. 2000. Droguett identificación por compuestos volátiles por CG-MS. Boletín Intexter (U.P.C.) 122.
- Harvey, A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. 294-300.

- Hargreaves, T., Johnson, R., Millington, D., Mondal, M., Beavers, W., Becker, L., Young, C. y Rinehart, K. 1974. Alkaloids of american species of *Erythrina*. *Lloydia* 37.
- Hipólito, J., Orozco, L., Zuleta, L., Rivera, D., Tapias, L., Veloza, L., Ramirez. Luz. Profile cromatográficos preliminares por GC/MS de algunas especies de plantas melastomátáceas. Brasil. 2007.
- Isaza, M., Hipólito, J., Orozco, L., Rivera, D., Tapias, L., Ramírez, A., y Zuleta, L. 2007. Perfiles cromatográficos preliminares por GC-MS de algunas especies de plantas melastomátáceas. *Scientia*.
- Jamal, A., Yaacob, W., y Din, L. 2008. A chemical study on *Phyllanthus reticulatus*. *Journal of Physical Science*, 19(2), 45-50.
- Jamaluddin, F., Mohameda, S., y Lajis, M. 1995. Hypoglycaemic effect of stigmast-4-en-3-one, from *Parkia speciosa* empty pods. *Food Chemistry*, 54(1), 9-13.
- Jhoson, C., y Pasto, D., 1977. Determinación de estructuras orgánicas. España editorial reverté. S.A.
- Jørgensen, P. 2003. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. St. Louis: Missouri Botanical Garden.
- Kelly, G. 1999. Squalene and its potential clinical uses. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 4(1), 29-36.
- Kwamou, G., Sandjo, L., Kuete, V., Wandja, A., Tankeo, S., Efferth, T., y Nkengfack, A. 2015. Unprecedented new nonadecyl para-hydroperoxycinnamate isolated from *Erythrina excelsa* and its cytotoxic activity. *Natural product research*, 29(10), 921-925.
- Martínez, P. 2014. Actividad antifúngica de aceites esenciales aislados de plantas nativas del sur de Chile contra hongos filamentosos de importancia clínica. Chile.
- Melo, A. 2014. Uso de SPME y hidrodestilación en el estudio de compuestos orgánicos, especies volátiles, *Plectranthus grandis*, Análisis citotóxico y métodos para la validación GC-MS. Brasil.
- Mendez, E., Blanco, M., Laguna, A. y Garcia, E. 2002. Isolation and characterization of a mixture of higher primary aliphatic alcohols of high molecular weight from henequen (*Agave furcroydes*). Cuba.
- Mikes, O. 1979. Laboratory handbook of chromatographic and allied methods. England. Ellis. Horwood.
- Mosquera, D. 2012. Estandarización de un método para la cuantificación de pesticidas organoclorados y organofosforados en suelos por cromatografía de gases con detectores FID y ECD. Colombia.
- Oliveira, M., Velázquez, D., y Bermúdez, A. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Revista de ciencia y tecnología de América*. 30 (8): 453-459.
- Ordoñez, L., Ambrose, K., Borja, R., Cueva, K., y Gonzales, L. 2006. Proyecto "La biodiversidad como sustento de vida en los bosques de ceja andina: uso sustentable

de la agrobiodiversidad de los bosques de ceja de montaña del Carchi- Ecuador”, Anexos 1- 4 Informe final del Proyecto Ceja Andina.

Parra, J. 2011. Contribución al estudio fitoquímico de la parte Aéreas de *Piper cf. Cumanense kunth* (Piperaceae). Tesis de Maestría. Universidad nacional de Colombia. Bogotá.

Pino, N., Melendez, E., y Stashenko, E. 2009. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (4), 301–304.

Pino, N., y Valois, H. 2004. Ethnobotanical of four black communities of municipality of Quibdó, Choco-Colombia. Lyona J. Ecol. Application 7(2).

Pino-Rodríguez, S., Prieto-González, S., Perez-Rodriguez, M., Molina-Torres, J. 2004. Genero *Erythrina*: Fuente de Metabolitos secundarios con Actividad Biológica. Cuba 23 (2); 252-258.

Pitman, N., y Jorgensen, P. 2002. Estimating the size of the world's threatened flora. Science. 5595, 298- 989.

Pongprayoon, U., Baeckström, P., Jacobsson, U., Lindström, M., y Bohlin, L. 1992. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. Planta médica, 58(1), 19-21

Puentes, L. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. RET. Revista de estudios transdisciplinarios, 1(2), 32-55.

Rageau, J. 1973. “Les Plantes Medicinales de la Nouvelle-Caledonie”, Editorial. Trav y Doc de Lorstom, Paris, N° 23.

Rosales, C., y Mónica, M. 2013. Aislamiento, Caracterización y Actividad Biológica de Flavonoides y Otros Constituyentes de la Planta *Conocliniopsis prasiifolia* (Asteraceae).

Richter, M., y Moreira-Muñoz, A. 2005. Heterogeneidad climática y diversidad de la vegetación en el sur de Ecuador: un método de fitoindicación. Rev. Peru Biol, 12(2), 217-238.

Russo, R. 1993. The use of *Erythrina* species in the Americas In: Sidney BW and Powell M. Editors. Nitrogen Fixing Tree Association. Estados Unidos. 45-67.

Salinas, J., y García, R. 1985. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. CIAT. Colombia.

Srinivasan, T., Srivastava, G. K., Pathak, A., Batra, S., Raj, K., Singh, K., y Kundu, B. (2002). Solid-phase synthesis and bioevaluation of lupeol-based libraries as antimalarial agents. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 12(20), 2803-2806.

Skoog, D., Holler, J., y Nieman, T. 2003. Principios de análisis Instrumental. España. pag.730.

Tanaka, H., Sato, M., Fujiwara, S., Hirata, M., Etoh, H., y Takeuchi, H. 2002. Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina vagiegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Japón. Resv. Med. Biológica Japón. 35 (2); 494-498.

Tesso, H. 2005. Isolation and Structure Elucidation of Natural Products from Plants. Hamburg: Institute of Organic Chemistry University of Hamburg. 126-13.

Trejos, E. 2009. Evaluación de Parámetros Para Pruebas De Susceptibilidad Antifúngica En Hongos Filamentosos Mediante La Técnica de Difusión en Agar. Pontificia universidad de Javeriana. Colombia.

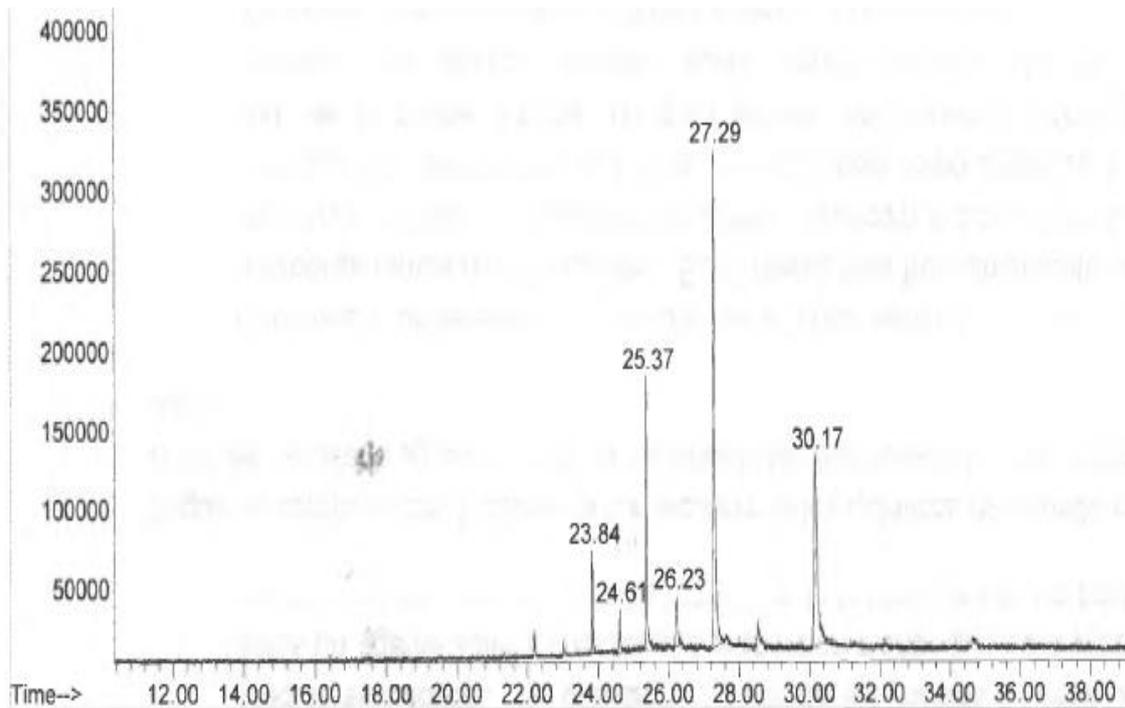
US National Library of Medicine. 2002. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>.

Virtuoso, S., Davet, A., Dias, J., Cunico, M., Miguel, M., Oliveira, A., y Miguel, O. 2005. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2), 137-142.

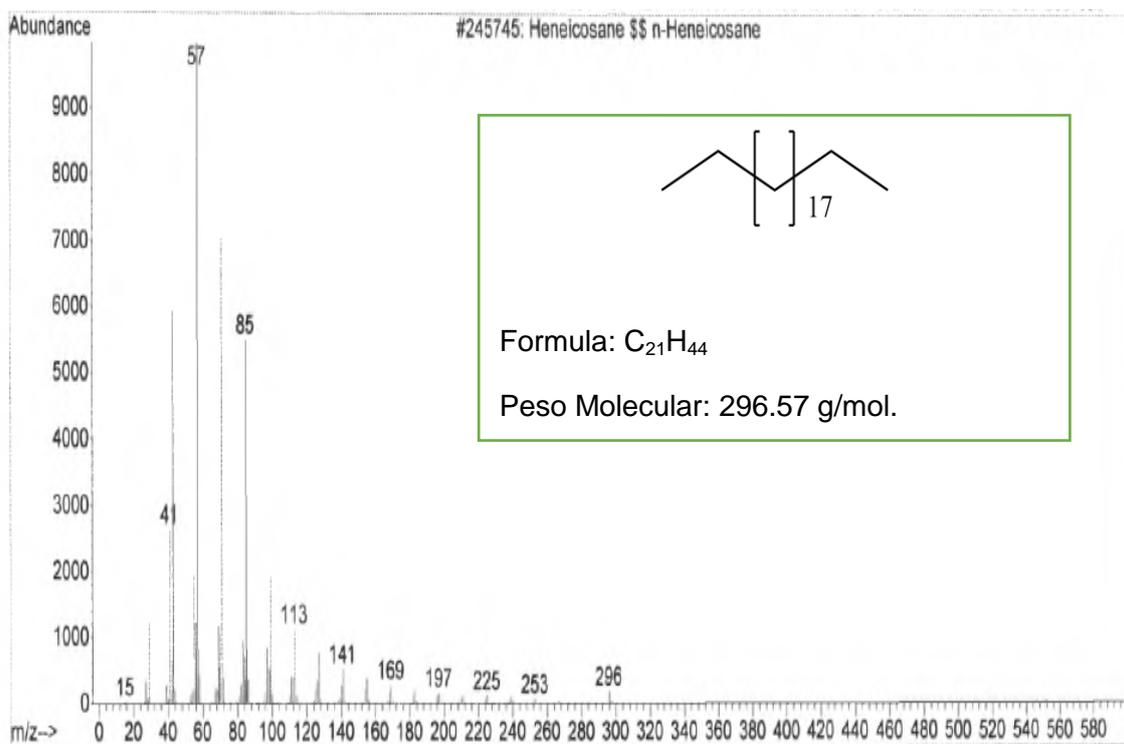
Walton, N., Rhodes, M., Michael, A., y Parra, A. 1999. Characterisation and control of plant secondary metabolism. Edition Walton y Brown, Chemicals from plants. London Imperial College Press. 27 90.

Zhang, J., Cao, Y., Xu, Z., Sun, H., An, M., Yan, L., Chen, H., Gao, R., Wang, Y., Jia, X., y Jiang, Y. 2005. In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulusterrestris l.* with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 2211-2215.

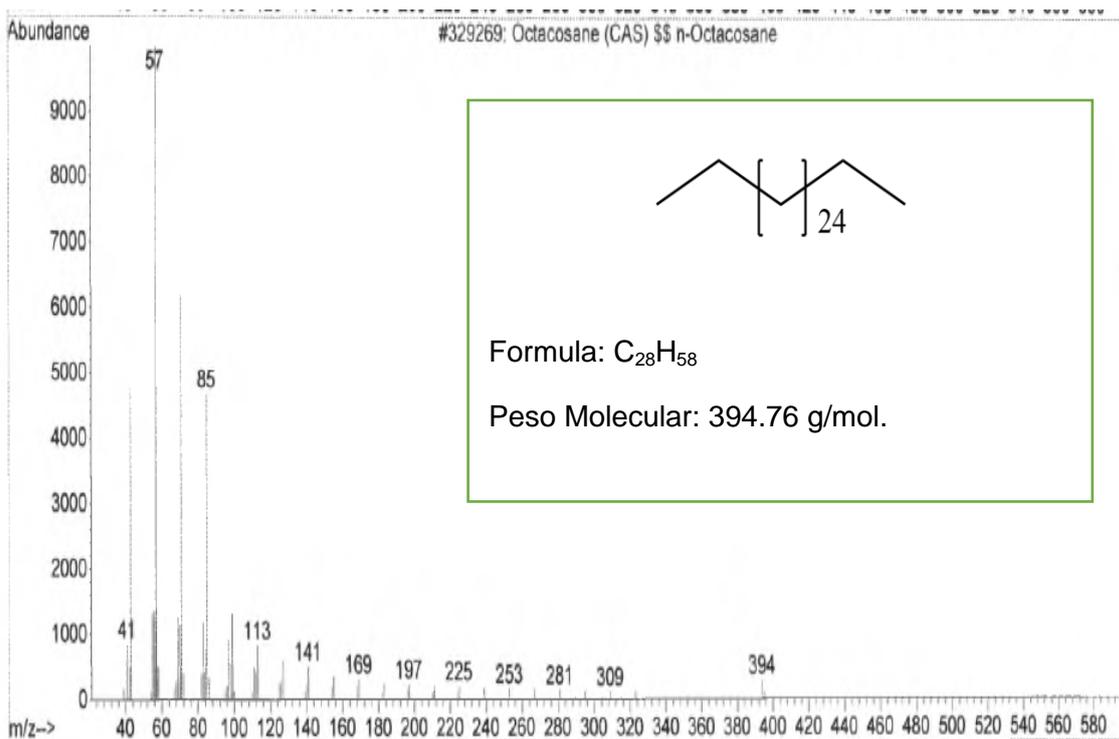
## **ANEXOS**



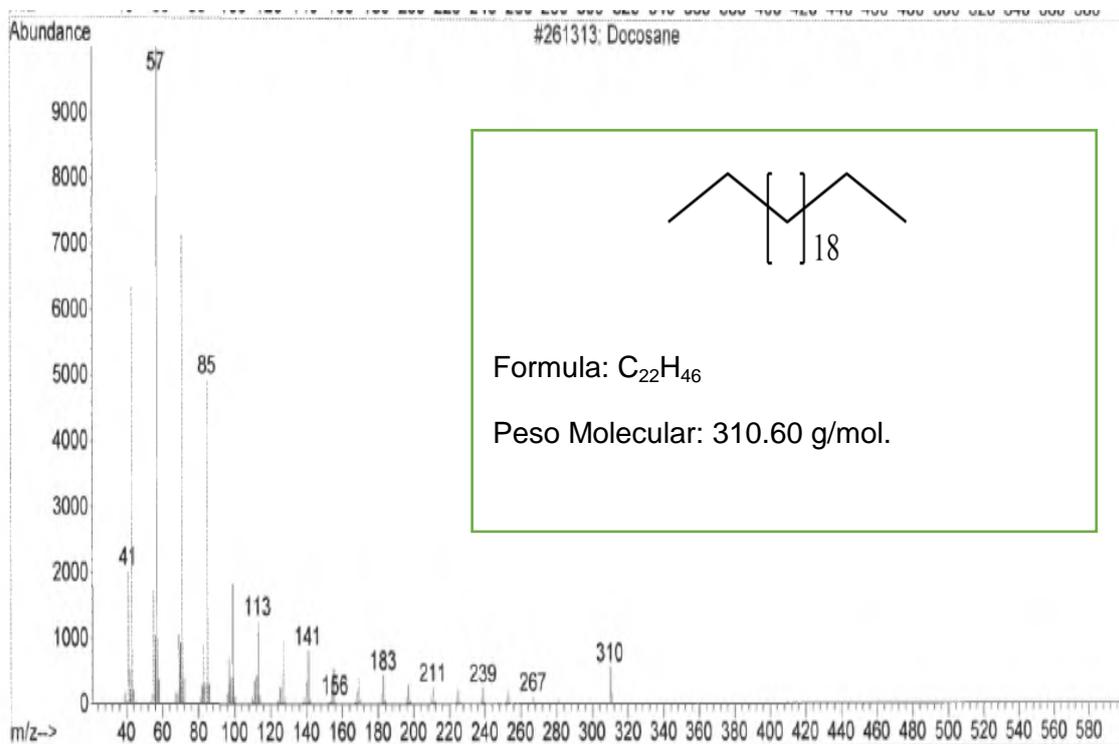
**Espectro N° 1.** Espectro de CG correspondiente al G3H del extracto hexánico. Se muestran los seis tiempos de retención detectados:  $t_R = 23,84$  min,  $t_R = 24,61$  min,  $t_R = 25,37$  min,  $t_R = 26,23$  min,  $t_R = 27,29$  min y  $t_R = 30,17$ .



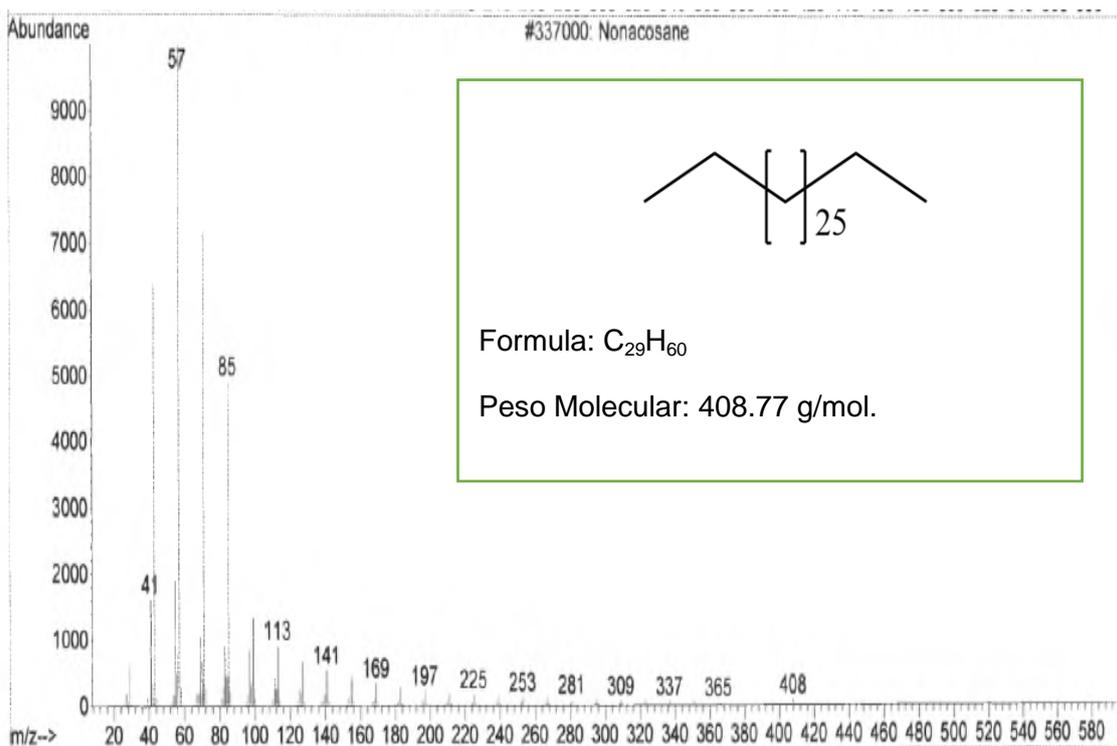
**Espectro N° 2.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Heneicosano con  $t_R = 23,84$  min, del C3H, de la mezcla 1.



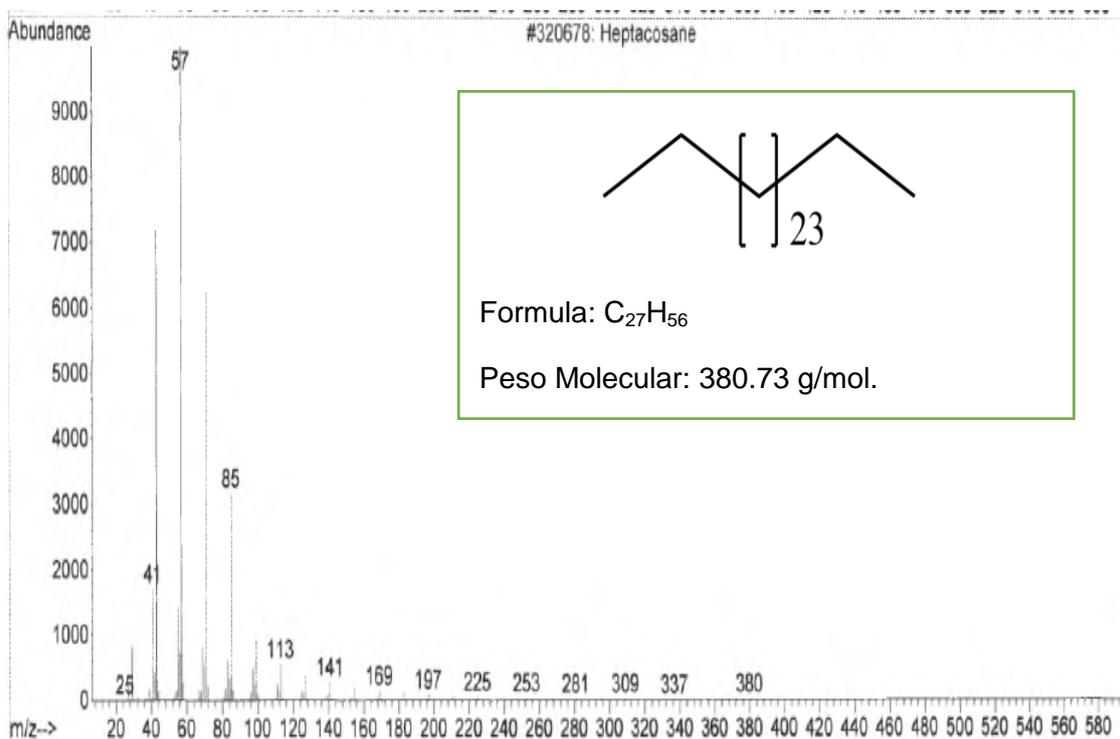
**Espectro N° 3.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Octacosano con  $t_R=24,61$  min, del G3H, de la mezcla 1.



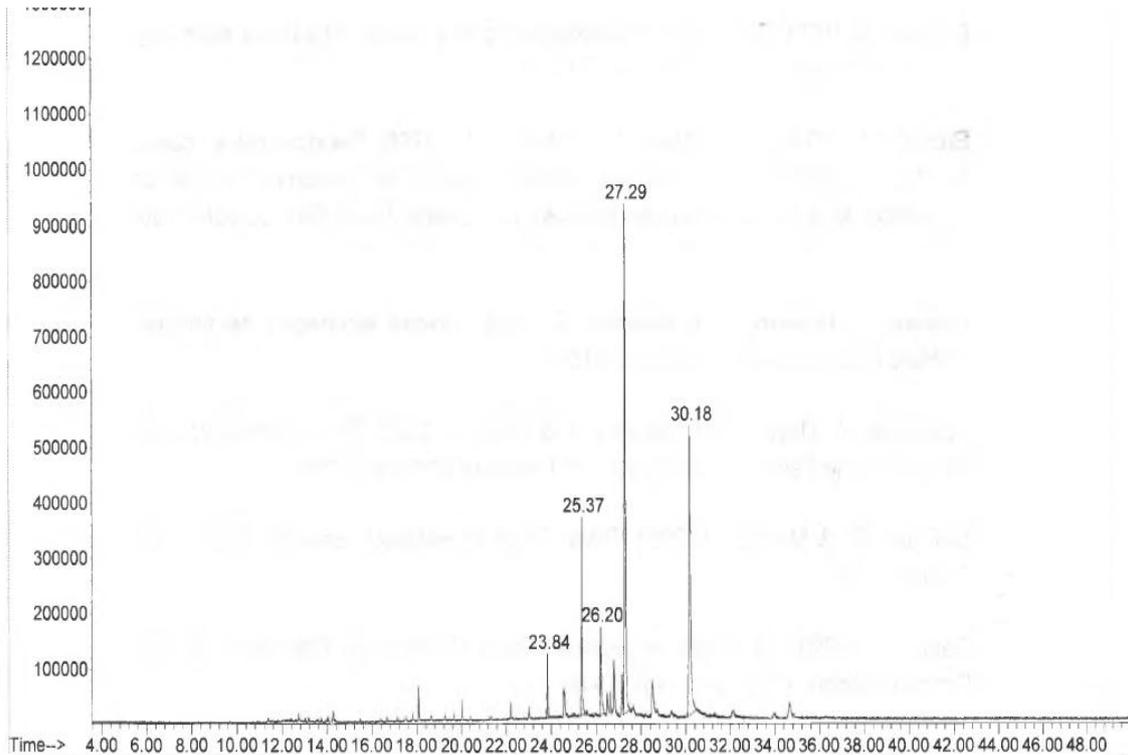
**Espectro N° 4.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Docosano con  $t_R=25,27$  min, del G3H, de la mezcla 1.



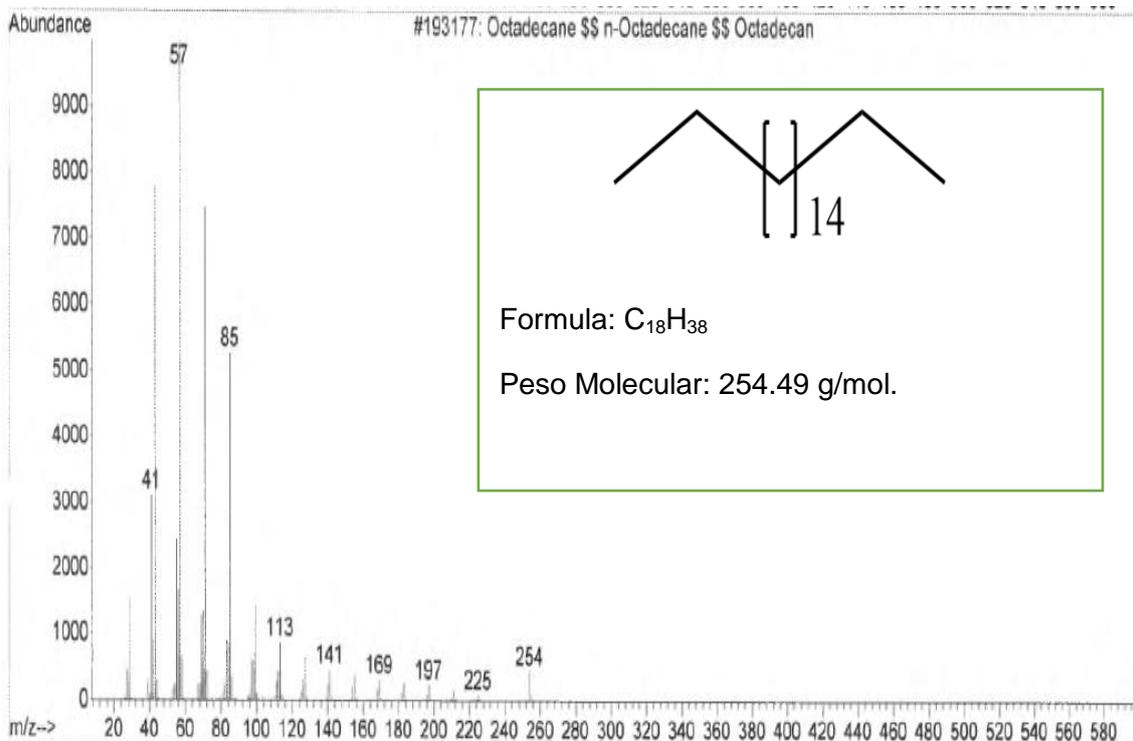
**Espectro N° 5.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Nonacosano con  $t_R = 26,23$  min, del G3H, de la mezcla 1.



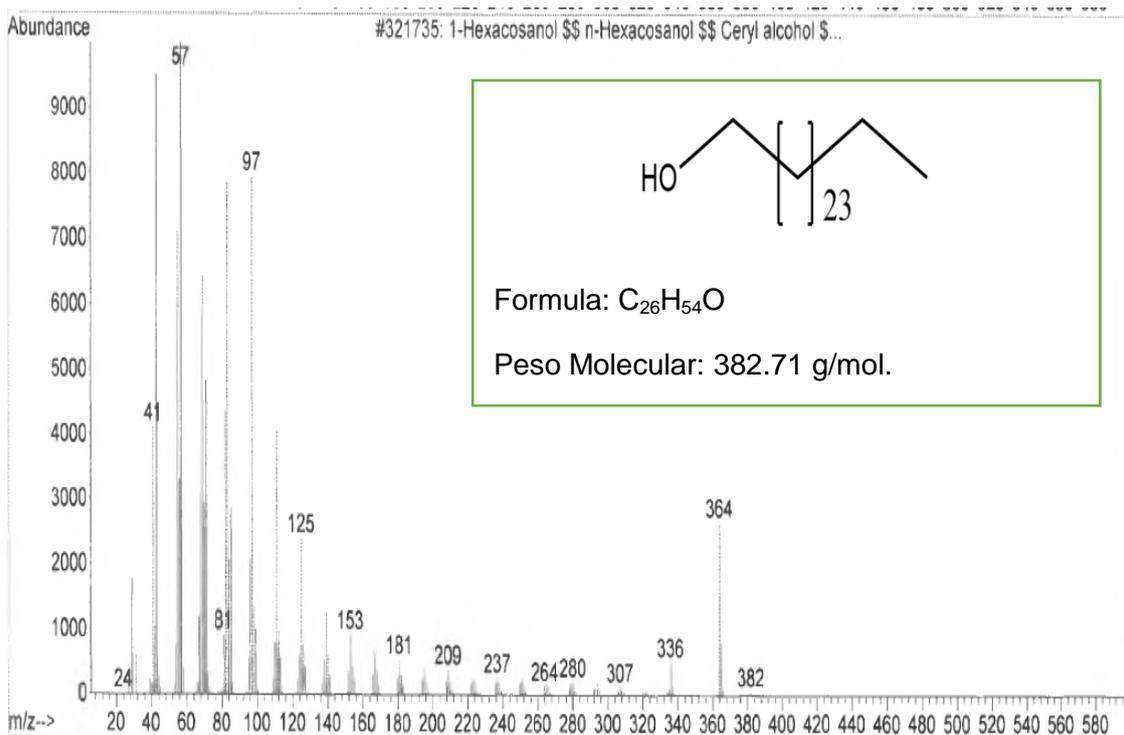
**Espectro N° 6.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Heptacosano con  $t_R = 30,17$  min, del G3H, de la mezcla 1.



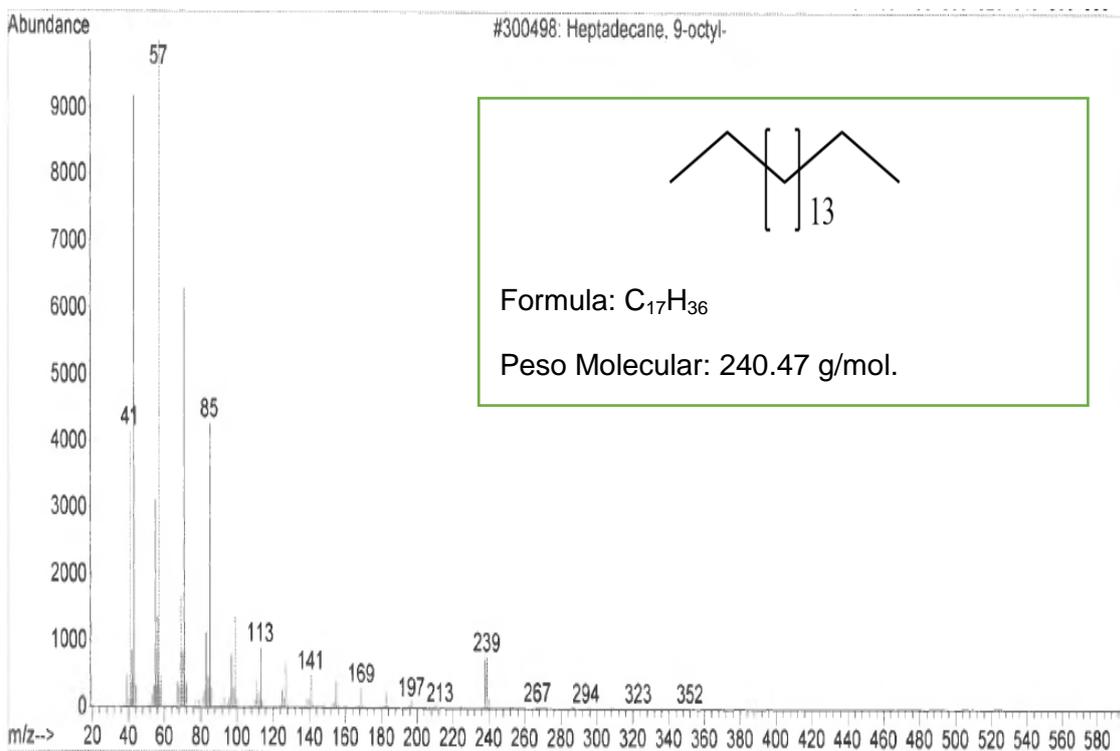
**Espectro N° 7.** Espectro de CG correspondiente al G5H del extracto hexánico. Se muestran los cinco tiempos de retención detectados:  $t_R = 23,84$  min,  $t_R = 25,37$  min,  $t_R = 26,20$  min,  $t_R = 27,29$  min y  $t_R = 30,18$ .



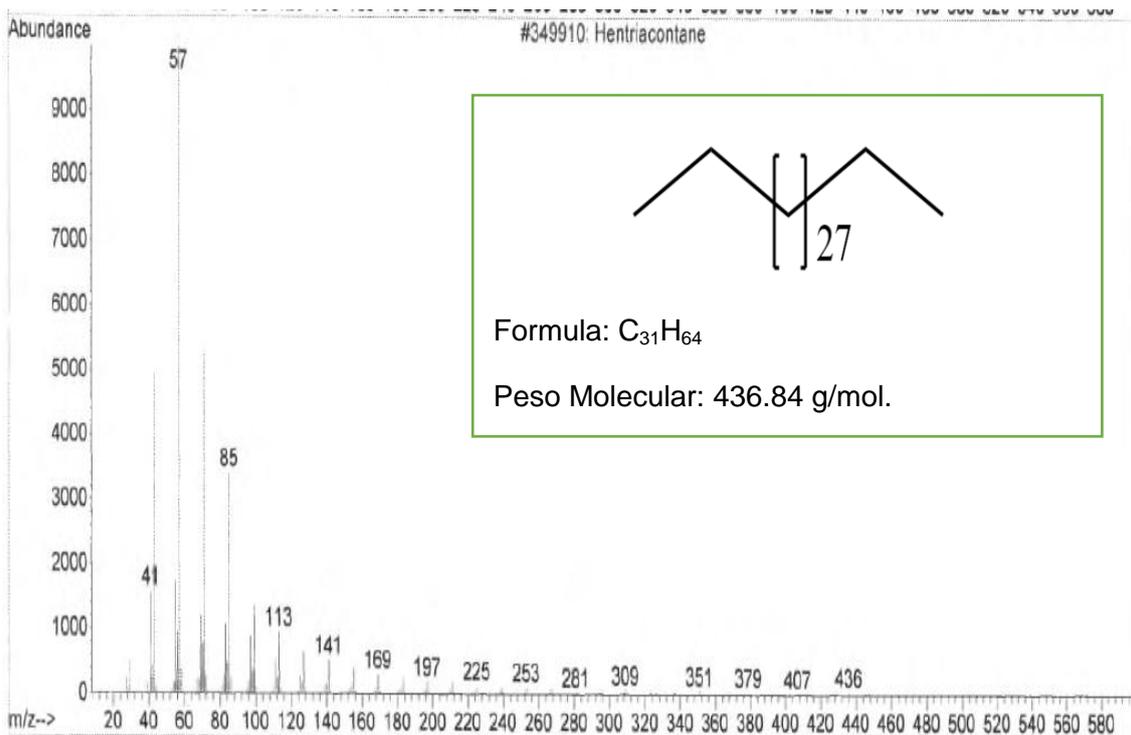
**Espectro N° 8.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Octadecano con  $t_R = 23,84$  min, del G5H, de la mezcla 2.



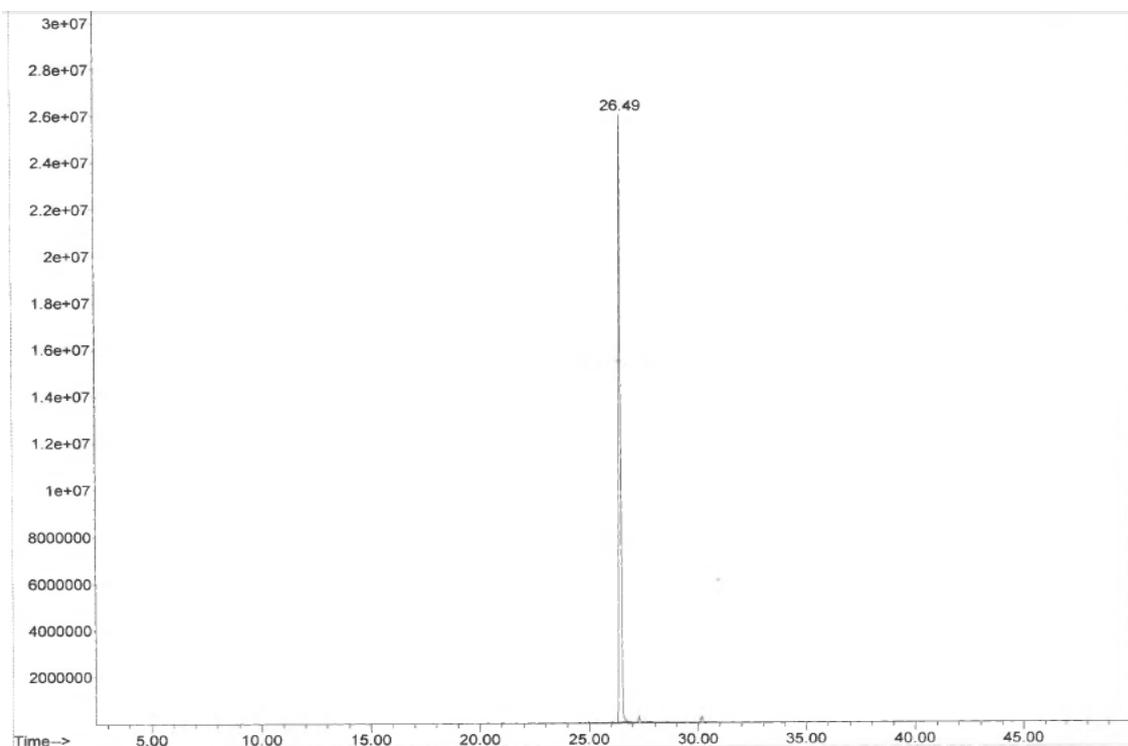
**Espectro N° 9.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como 1-Hexacosanol con  $t_R = 26,20$  min, del G5H, de la mezcla 2.



**Espectro N° 10.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Heptadecano con  $t_R = 27,29$  min, del G5H, de la mezcla 2.

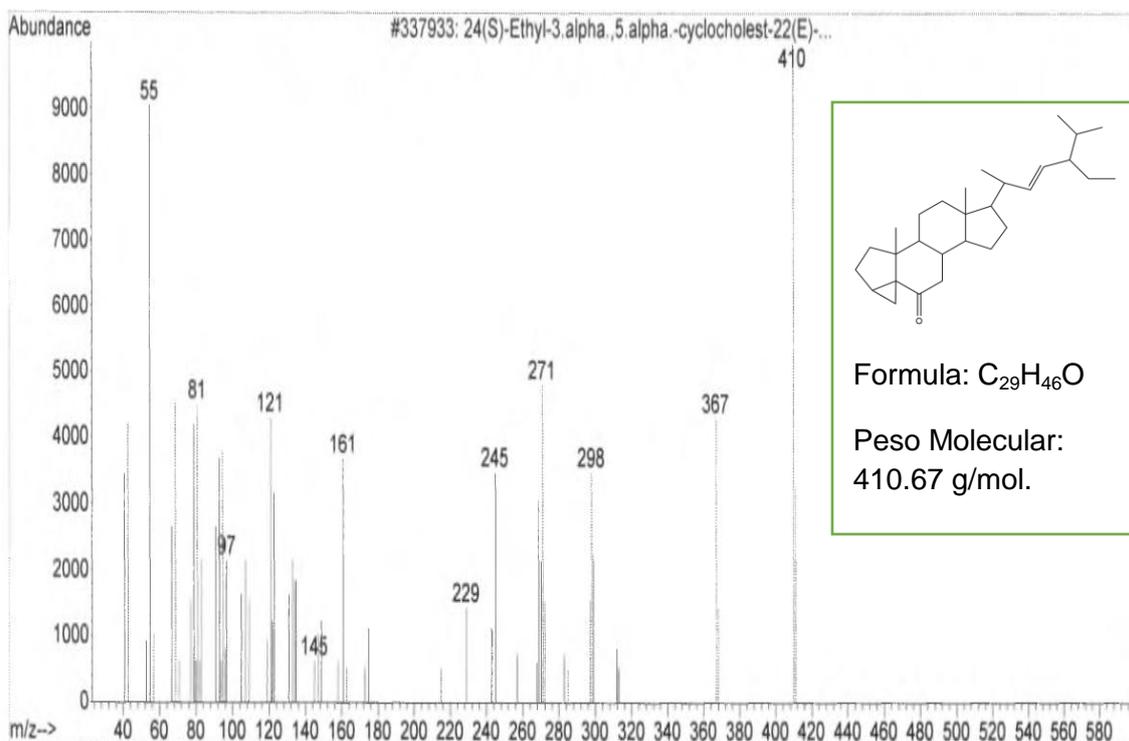


**Espectro N° 11.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Hentriacontano con  $t_R = 30,18$  min, del G5H, de la mezcla 2.

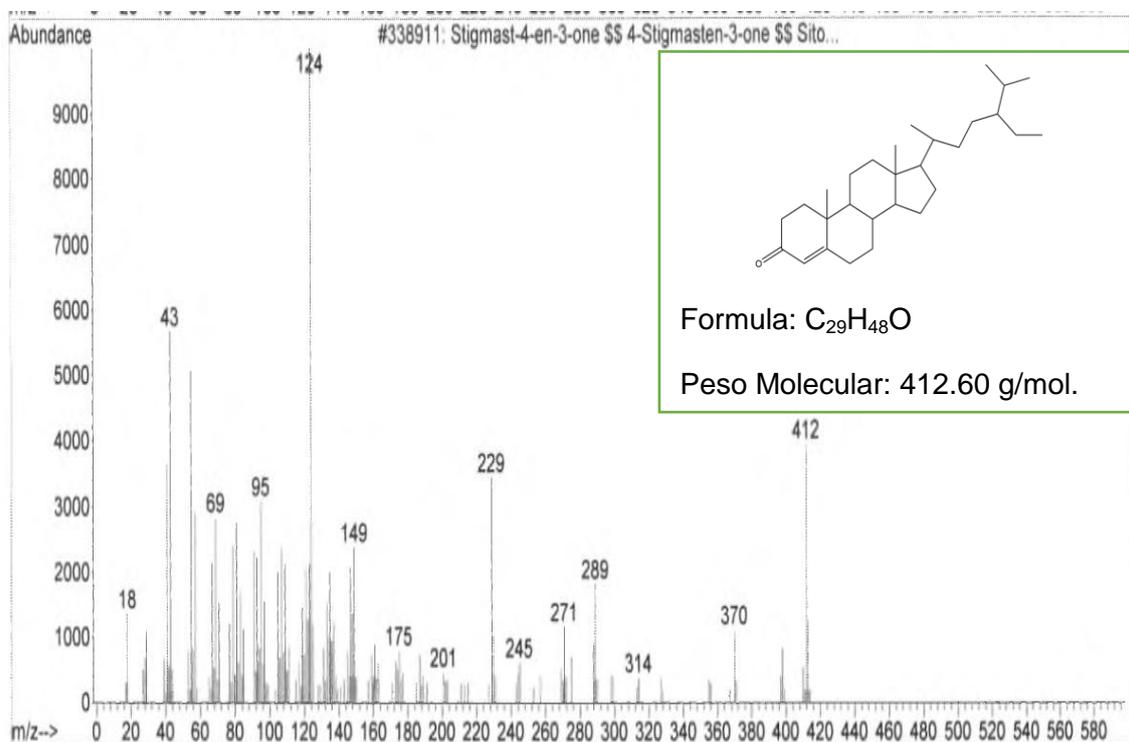


**Espectro N° 12.** Espectro de CG correspondiente al G9H del extracto hexánico. Se muestra un tiempo de retención detectado:  $t_R = 26,49$  min.

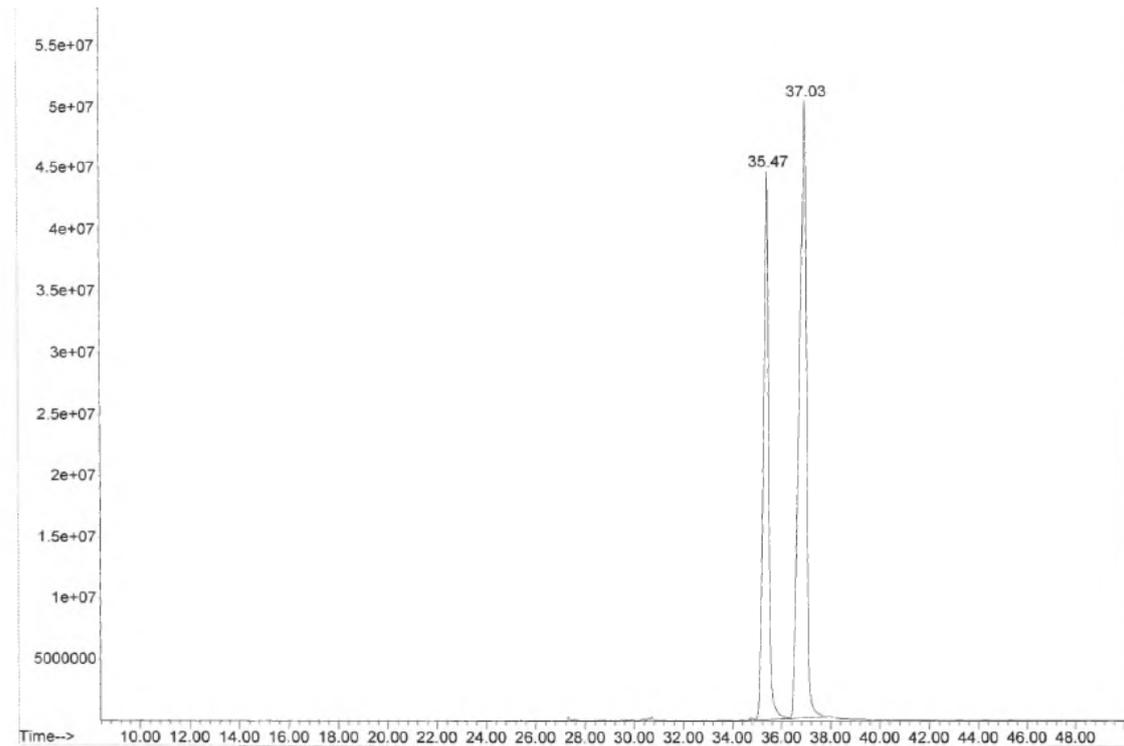




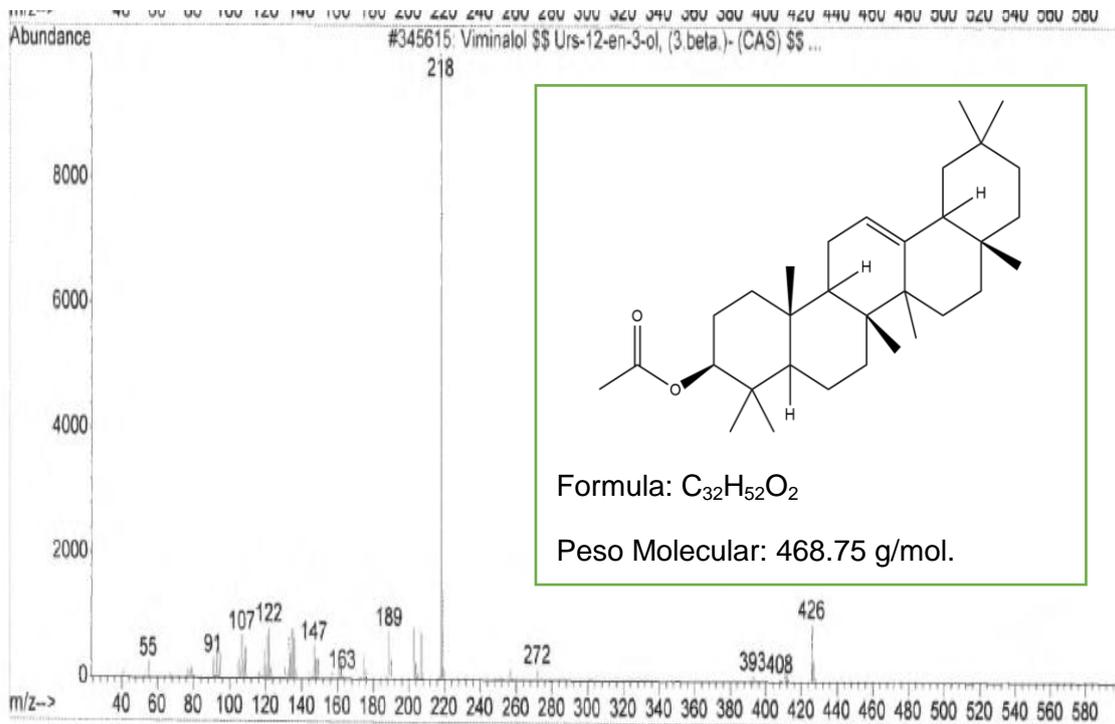
**Espectro N° 15.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como 24(S)-Ethyl-3.alpha.,5.alpha.-cyclocholest-22(E)-en-6-ona con  $t_R = 35,97$  min, del G19H, de la mezcla 3.



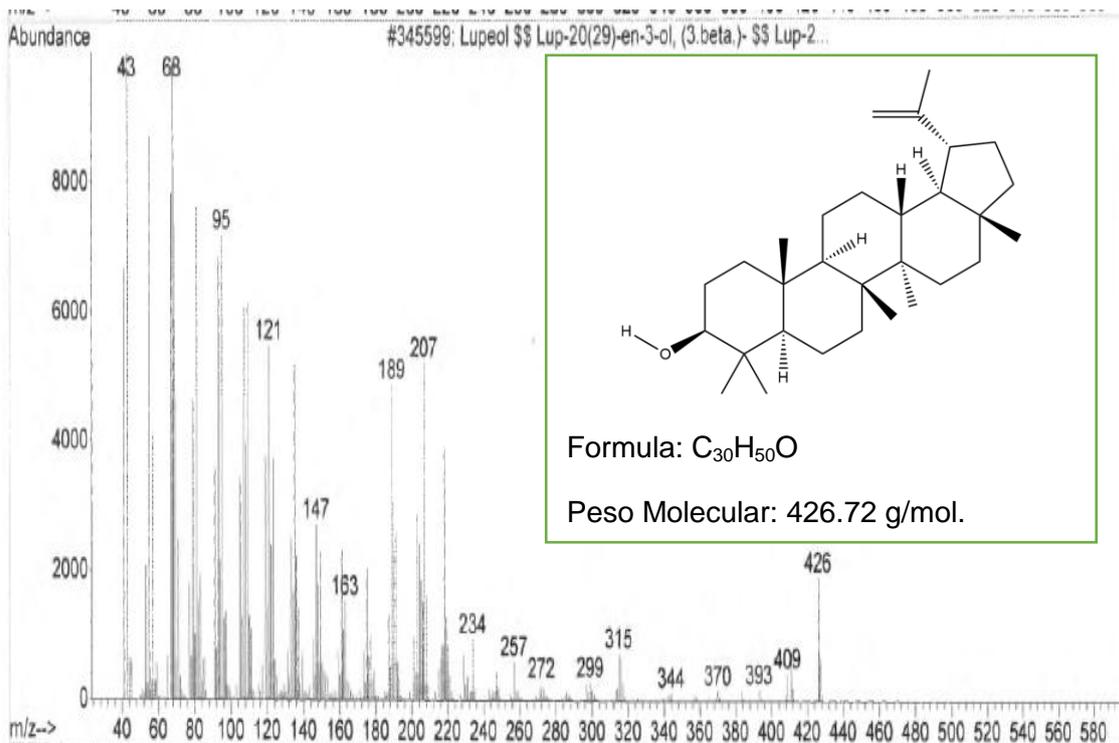
**Espectro N° 16.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Estigma-4-en-3-ona con  $t_R = 37,83$  min, del G19H, de la mezcla.



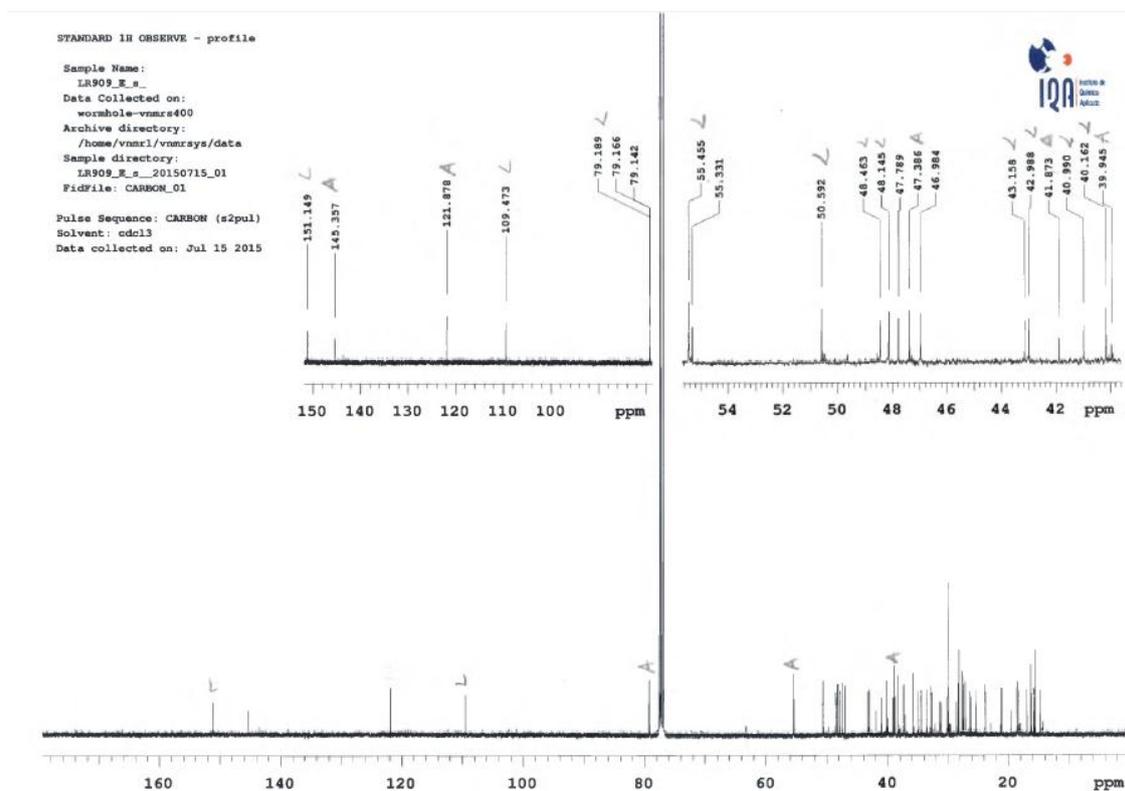
**Espectro N° 17.** Espectro de CG correspondiente al G21H. Se muestran los dos tiempos de retención detectados:  $t_R = 35,47$  min y  $t_R = 37,03$  min.



**Espectro N° 18.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como acetato de  $\beta$ -amirina con  $t_R = 35,47$  min, del G21H, de la mezcla 4.



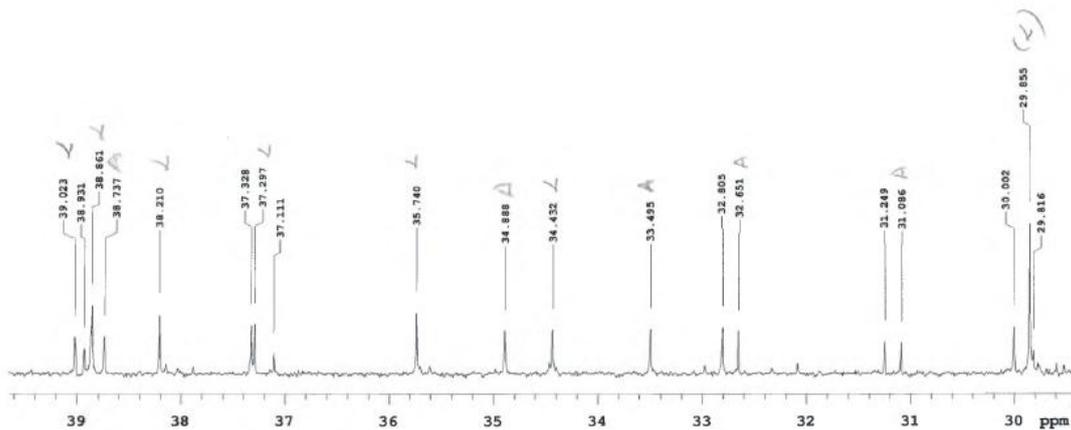
**Espectro N° 19.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Lupeol con  $t_R = 37,03$  min, del G21H, de la mezcla 4.



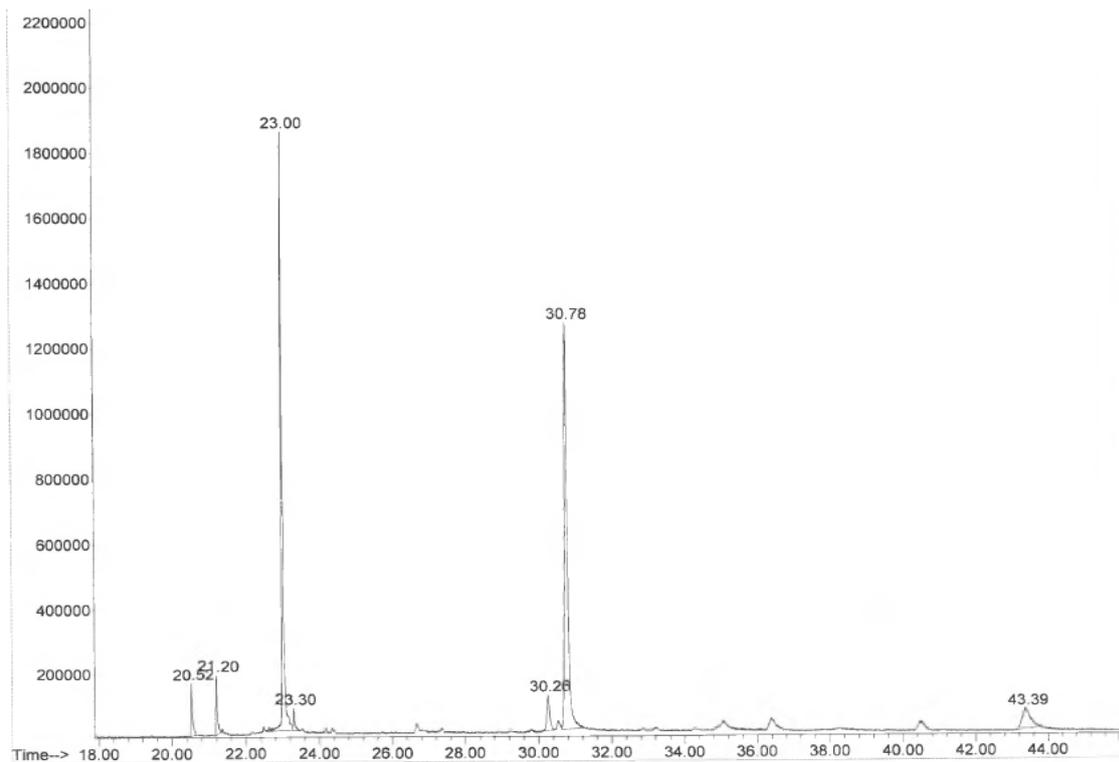
**Espectro N° 20.** Espectro de RMN  $^{13}C$  correspondiente al G21H de la mezcla 4.

STANDARD IN OBSERVE - profile

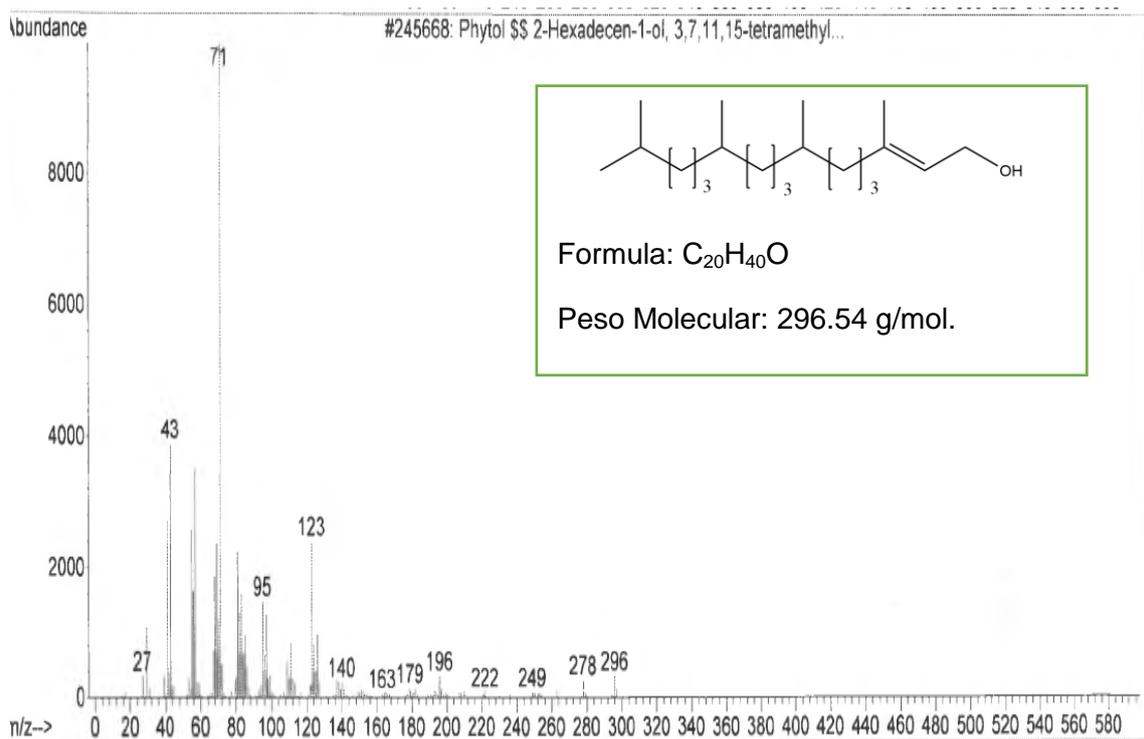
Sample Name:  
LR909\_E.s  
Data Collected on:  
wormhole-vmax400  
Archive directory:  
/home/vnmr1/vnmrsys/data  
Sample directory:  
LR909\_E.s\_20150715\_01  
FidFile: CARBON\_01  
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)  
Solvent: cdcl3  
Data collected on: Jul 15 2015



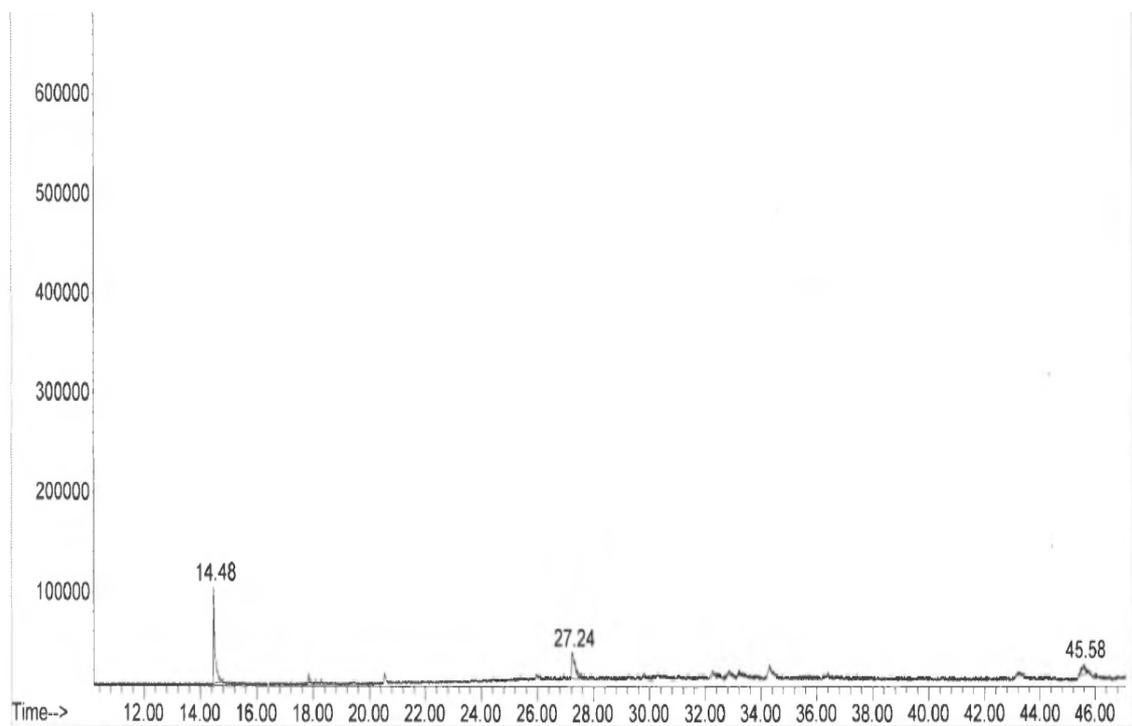
**Espectro N° 21.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C correspondiente al G21H de la mezcla 4.



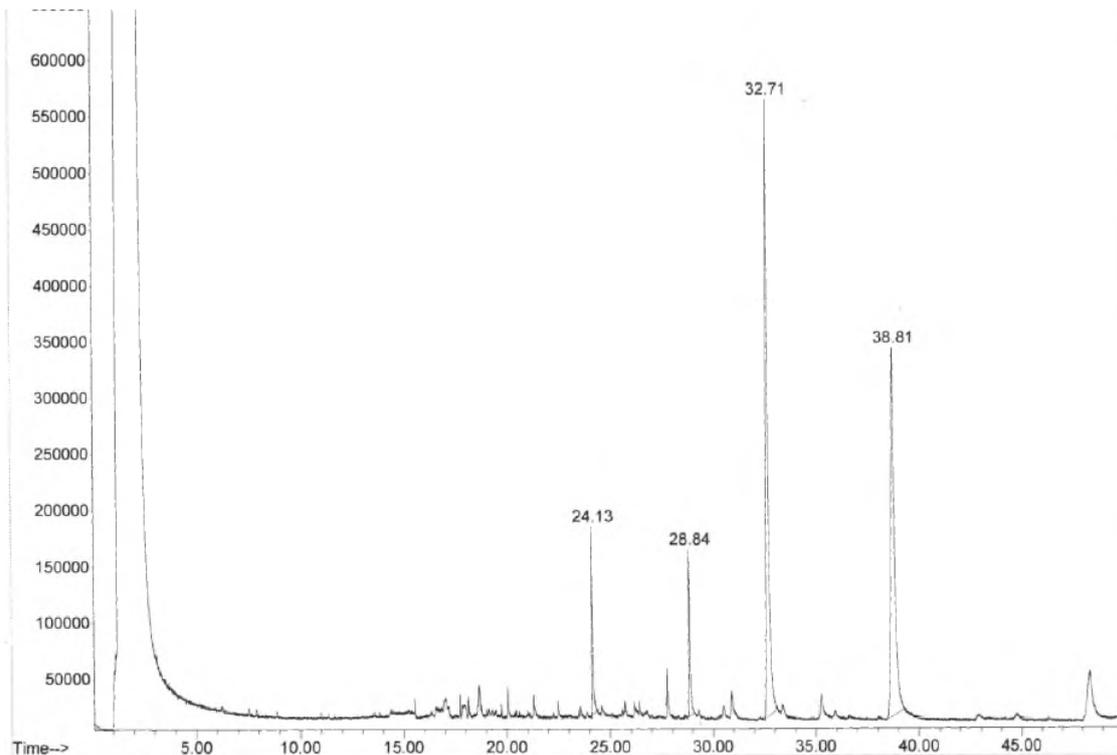
**Espectro N° 22.** Espectro de CG correspondiente al G26H. Se muestran los siete tiempos de retención detectados:  $t_R = 20,52$  min,  $t_R = 21,20$  min,  $t_R = 23,00$  min,  $t_R = 23,30$  min,  $t_R = 30,26$  min,  $t_R = 30,78$  min y  $t_R = 43,39$  min.



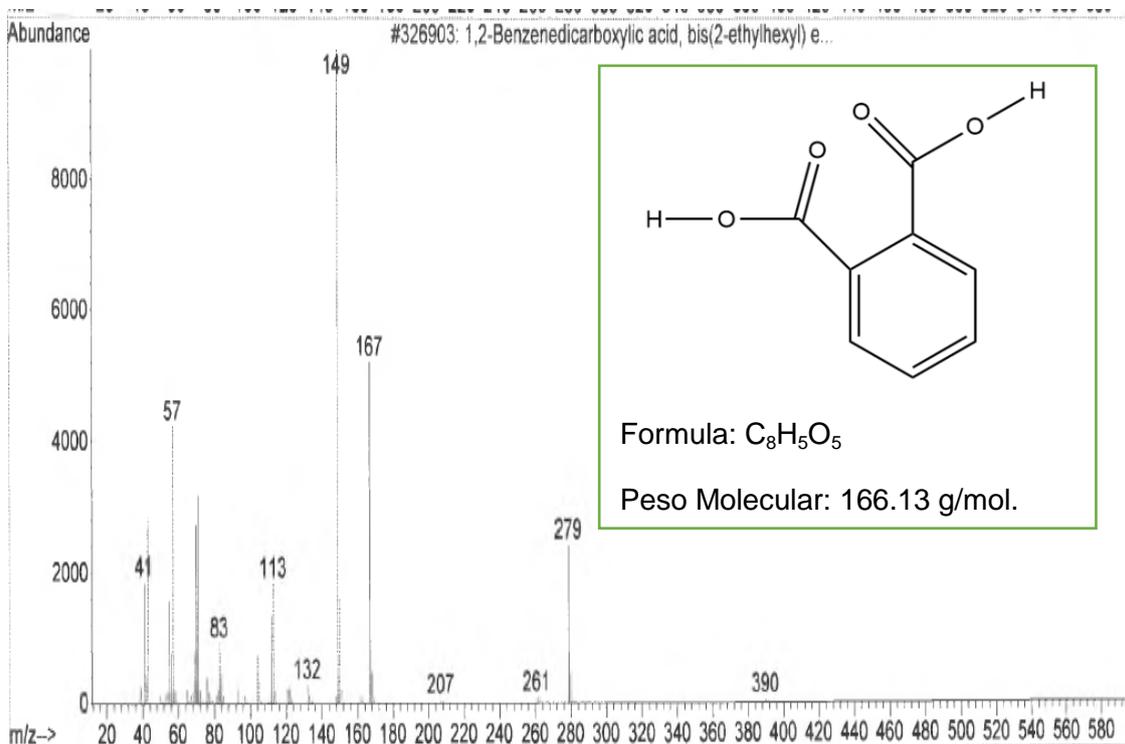
**Espectro N° 23.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Fitol con  $t_R = 20,52$  min, del G26H, de la mezcla 5.



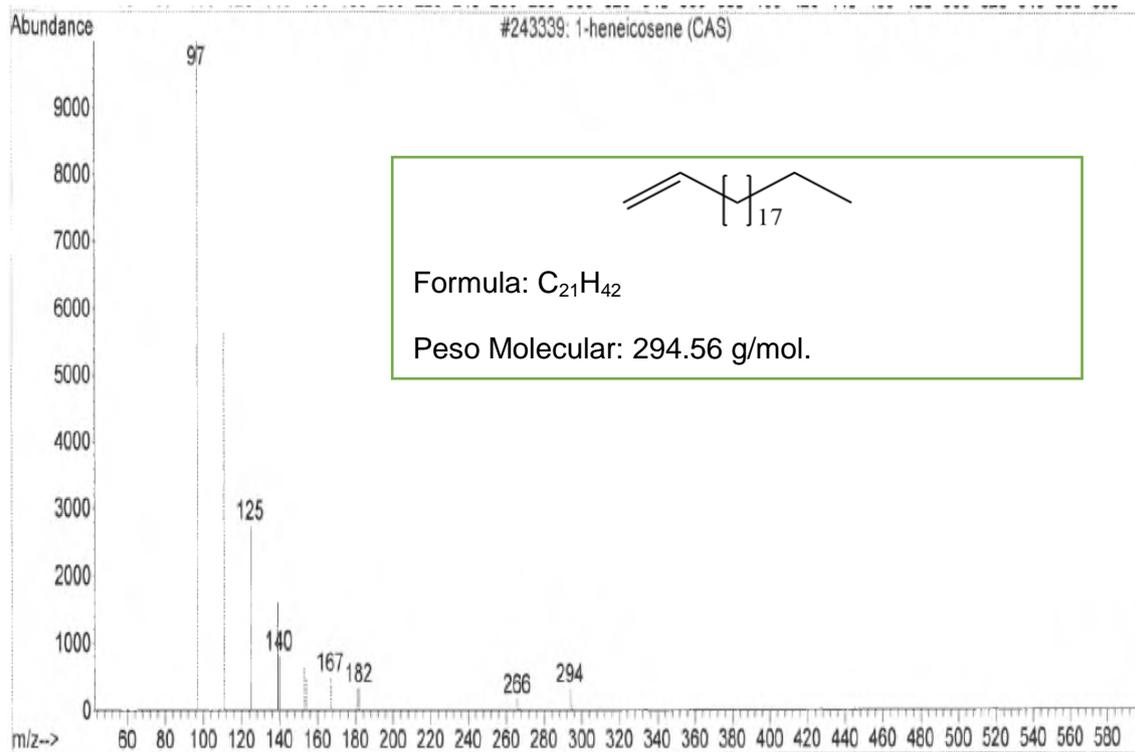
**Espectro N° 24.** Espectro de CG correspondiente al G31H. Se muestran los tres tiempos de retención detectados:  $t_R = 14,48$  min,  $t_R = 27,24$  min y  $t_R = 45,58$  min.



**Espectro N° 25.** Espectro de CG correspondiente al G11A. Se muestran los cuatro tiempos de retención detectados:  $t_R=24,13$  min,  $t_R=28,84$  min,  $t_R=32,71$  min y  $t_R=38,81$  min.



**Espectro N° 26.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Acido 1, 2.Benzenedicarboxílico con  $t_R=24,13$  min, del G11A, de la mezcla 6.



**Espectro N° 27.** Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como 1-Heneicoseno con  $t_R = 32,71$  min, del G11A, de la mezcla 6.