



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMEDICA**

TÍTULO DE BIOQUIMICO FARMACÉUTICO

**“Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de  
la especie *Macrocarpaea lenae*”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**AUTORA:** Herrera Toro, Mariuxi Fernanda

**DIRECTOR:** Gilardoni, Gianluca Ph.D.

LOJA - ECUADOR

2016

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Gianluca Gilardoni

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de la especie *Macrocarpaea lenae* realizado por Mariuxi Fernanda Herrera Toro, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2016

.....  
Ph.D. Gianluca Gilardoni

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Mariuxi Fernanda Herrera Toro declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de la especie *Macrocarpaea lenae*, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Ph.D. Gianluca Gilardoni director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f) .....

Mariuxi Fernanda Herrera Toro

CI: 0706047214

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mis padres Lic. Mónica Sandra Toro Blacio y Arq. Manolo Fernando Herrera Camacho, por el amor y confianza que siempre me han brindado, su apoyo incondicional, ha sido mi fuerza para seguir adelante; a mis hermanos Mónica y Matheus por su cariño y amistad, a mi familia por sus sabios consejos en los momentos más trascendentales, y a mis amigos porque en el día a día compartieron momentos importantes de mi vida universitaria.*

## AGRADECIMIENTO

*A Dios, por la vida y la fuerza que me ha dado, a mis padres por ser ese ejemplo lleno de valores que me han inspirado a hacer de mí un ejemplo de vida, por el sacrificio que han hecho a lo largo de toda mi existencia para ayudarme a conseguir la profesión que he elegido; a mis hermanos por haberse convertido en mi punto de apoyo y sostenimiento en los momentos más duros que hasta hoy he debido superar.*

*A mis profesores, de manera singular al Ph. D. Gianluca Gilardoni, que con su paciencia supo compartir sus conocimientos y ofrecerme consejos que resultaron esenciales en el desarrollo de este trabajo académico; al Ph. D. Omar Malagón, a la Ph. D. Paola Ordóñez y a la Ph. D. Silvia González, por cada uno de los aportes dedicados para la culminación de este proyecto. Finalmente quiero dejar sentado también mi agradecimiento al Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, por proporcionarme todas las facilidades para llevar a feliz término esta investigación.*

*Mariuxi Fernanda Herrera Toro*

## 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
INTRODUCCIÓN .....	3
CAPITULO I .....	5
MARCO TEÓRICO .....	5
1.1. Plantas medicinales .....	6
1.2. Plantas medicinales en el Ecuador .....	6
1.3. Medicina tradicional en el Ecuador .....	7
1.4. Familia Gentianaceae .....	7
1.4.1. Terpenos .....	8
1.4.2. Flavonoides .....	11
1.4.3. Alcaloides .....	14
1.4.4. Xantonas .....	15
1.4.5. Descripción del género <i>Macroparpea</i> .....	16
1.4.6. Descripción de la especie <i>Macroparpea lenae</i> .....	17
1.5. Metabolitos secundarios de las plantas .....	18
1.6. Cromatografía .....	19
1.6.1. Cromatografía en capa fina .....	19
1.6.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) .....	20
1.7. Resonancia magnética nuclear .....	20
1.8. Espectrometría de infrarrojo (IR) .....	20
1.9. Métodos computacionales .....	21
1.10. Ensayos biológicos .....	21
1.10.1. Inhibición de Monoamina oxidasa .....	21
CAPITULO II .....	23
MATERIALES Y METODOS .....	23
2.1. Esquema metodológico .....	24

2.2.	Recolección de la planta .....	25
2.3.	Obtención de los extractos.....	25
2.4.	Desclorofilación del extracto .....	26
2.5.	Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de acetato.....	26
2.5.1.	Cromatografía en columna .....	26
2.5.2.	Cromatografía en capa fina .....	27
2.5.3.	Unión de fracciones.....	27
2.6.	Purificación cromatográfica.....	27
2.6.1.	Purificación de MH-19 (P).....	27
2.6.2.	Purificación de MH-11/12 (P).....	27
2.6.3.	Purificación de MH-10 (P).....	28
2.6.4.	Purificación de MH-3 (P).....	28
2.7.	Caracterización de compuestos purificados .....	28
2.7.1.	Caracterización con métodos físicos. ....	28
2.7.2.	IR.....	30
2.7.3.	Métodos computacionales.....	31
2.7.4.	Ensayos biológicos. ....	32
CAPITULO III.....		33
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....		33
3.1.	Extractos obtenidos de la especie <i>Macrocarpaea lenae</i> .....	34
3.2.	Cromatografía en columna de U2-7 .....	35
3.3.	Purificación e identificación de los compuestos aislados.....	39
3.3.1.	Compuesto 1 – MH-19 (P).....	39
3.3.2.	Compuesto 2 – MH-11/12 (P).....	41
3.3.3.	Compuesto 3 – MH-10 (P).....	42
3.3.4.	Compuesto 4 – MH-3 (P).....	45
3.4.	Cálculos computacionales .....	47
3.5.	Ensayos de inhibición de monoamino oxidasa (IMAO) .....	50
CONCLUSIONES.....		51
RECOMENDACIONES .....		52
BIBLIOGRAFÍA.....		53
ANEXOS.....		56

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Clasificación de flavonoides

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Macrocarpaea lenae*

**Tabla 3.** Especificaciones del equipo de GC - MS de muestras MH-10 (P) y MH-3 (P)

**Tabla 4.** Cantidades usadas en el ensayo de IMAO

**Tabla 5.** Pesos de los extractos

**Tabla 6.** Uniones de Columna 1 (U2-7)

**Tabla 7.** Uniones de Columna 2 (U2-7)

**Tabla 8.** Escala de factores para corrección de datos RMN

**Tabla 9.** Comparación de datos RMN, experimentales y computacionales corregidos.

**Tabla 10.** Resultados del ensayo de inhibición de MAO



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Niveles del conocimiento médico tradicional en el Ecuador
- Figura 2.** Estructura química del Isopreno
- Figura 3.** Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno
- Figura 4.** Molécula de Swerchirina
- Figura 5.** Estructura de secoiridoide
- Figura 6.** Estructura de iridoide glucósido
- Figura 7.** Molécula de Gentialutina
- Figura 8.** Molécula de Swertiaperenina
- Figura 9.** Molécula de Gentianine
- Figura 10.** Molécula de Hirsutanine A
- Figura 11.** *Macrocarpaea lenae*
- Figura 12.** *Macrocarpaea lenae*
- Figura 13.** Esquema del desarrollo de la investigación
- Figura 14.** Columna 2 de muestra U2-7
- Figura 15.** A) Equipo para actividad óptica, B) Celda y C) Muestras diluidas
- Figura 16.** Fórmula para determinar actividad óptica
- Figura 17.** Fórmula para corrección de datos de RMN
- Figura 18.** CCF de extractos de acetato de etilo y hexano: fase directa Hex-AcOEt 1:1
- Figura 19.** CCF de U2-7: fase directa: fase directa Hex – DCM – MeOH 45:45:10
- Figura 20.** CCF de uniones de columna 1 de muestra U2-7
- Figura 21.** CCF de uniones de columna 2 de muestra U2-7
- Figura 22.** Esquema de cromatografía del extracto de acetato
- Figura 23.** Estructura molecular de Swerosido
- Figura 24.** Estructura molecular de Amplexine (Djalonenol)
- Figura 25.** Estructura molecular de MH-10 (P)
- Figura 26.** Estructura molecular de MH-3 (P)
- Figura 27.** Estructura molecular de MH-10 (P) con ambas isomerías visto de dos formas diferentes.

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
DFT	Teoría del funcional de la densidad
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Correlation
IMAO	Inhibición de Monoaminoxidasa
IR	Espectrometría de infrarrojo
R <sub>f</sub>	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón

## RESUMEN

En el sur del Ecuador, en la comunidad de Saraguro se recolectó una especie llamada *Macrocarpaea lenae*, comúnmente conocida como tabaco de cerro, por sus diferentes beneficios, se realizó un estudio fitoquímico para el aislamiento y caracterización de sus metabolitos secundarios.

Este procedimiento inició con la recolección de la especie en el cantón de Saraguro. Se obtuvieron tres extractos, con el fin de elegir el extracto de acetato de etilo que mostraba contener mayor cantidad de compuestos, basándose en la riqueza de compuestos dada por cromatografía en capa fina. Se continuó con el fraccionamiento por cromatografía en columna, y las fracciones resultantes fueron purificadas mediante microcolumnas.

Durante el estudio se aisló cuatro compuestos de naturaleza iridoide; dos no se habían aislado anteriormente considerándolos como compuestos nuevos, derivados de los otros dos compuestos conocidos como: Swerosido y Djalonenol. Para su identificación estructural se empleó técnicas como: CG-MS, IR, RMN y cálculos computacionales que permitirán confirmar la estereoquímica de los compuestos nuevos.

**PALABRAS CLAVES:** *Macrocarpaea lenae*, Swerosido, Djalonenol, RMN.

## ABSTRACT

A species called *Macrocarpaea lenae* was collected in the south of Ecuador, near Saraguro town. In the traditional medicine of the Saraguro people, the plant is called "Tabaco de cerro". A phytochemical analysis was made to isolate and characterize its secondary metabolites

The process started by picking up the species' sample in the canton of Saraguro. Three extracts were obtained, in order to choose the ethyl acetate extract that shows to have the highest compounds amount, based in the riches of compounds gave in the thin layer chromatography. The process continued with a column chromatography breaking up and the resulting parts were purified through microcolumn.

During the research four compounds of iridoid nature were isolated; two of them haven't been isolated before and they were considered new compounds, derivative of the other two known as: Sweroside and Djalonenol. For its structural purification it was used techniques like: GC-MS, IR, RMN and computational operations that let verify the new compounds stereochemistry.

**KEYWORDS:** *Macrocarpaea lenae*, *Sweroside*, *Djalonenol*, *NMR*.

## INTRODUCCIÓN

Muchas de las aplicaciones que se hacen de las plantas medicinales se relacionan con prácticas mágico-religiosas. A menudo, el resultado ha sido una sobrevaloración de ciertas plantas medicinales; es decir, asignarles una multitud de propiedades que en realidad no poseen. En la actualidad existe un interés creciente por el estudio y la utilización de las plantas medicinales, tanto en países desarrollados como en aquellos en desarrollo. No obstante, las causas principales son diferentes en cada uno de ellos (García & Morales, 2005).

Al Ecuador se le considera como un país megadiverso, donde la población aún mantiene sus costumbres tradicionales en el uso de remedios ancestrales. Loja y Zamora Chinchipe son consideradas como las provincias del sur con una biodiversidad abundante y una tradición etnobotánica rica (Andrade, Armijos, Malagón, & Lucero, 2009).

Los metabolitos secundarios son sustancias presentes en los vegetales que al ser ingeridas, pueden presentar un potencial para modular el metabolismo humano de una manera favorable para la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas. Por esta razón se realizan muchos estudios para buscar compuestos fitoquímicos o metabolitos secundarios que pueden tener importantes efectos fisiológicos (Tripoli, Guardia, Giammanco, Majo, & Giammanco, 2007).

El estudiar los metabolitos secundarios de las plantas, nos permite estandarizar el uso de estas en la medicina tradicional, el descubrir nuevas moléculas con posibles beneficios para la salud. De esto se encarga la fitoquímica, y para conseguir su objetivo, utiliza diferentes herramientas como, la cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía en columna (CC), técnicas espectrométricas, entre otras.

Las investigaciones fitoquímicas en varias especies de familias como Gentianaceae han permitido identificar flavonoides y ciertos triterpenos característicos de esta familia, entre ellos los secoiridoides del tipo swerósido son los constituyentes principales. La característica principal de estos compuestos es su gran capacidad amarogénica, es decir, son responsables del gusto amargo que poseen todas las Gentianaceae, por lo que todas las especies utilizadas en medicina popular están asociadas con una actividad tónica y estimulante estomacal (Nadinic et al., 2002).

*Macrocarpaea* posee un número limitado de ejemplares observados en el herbario. En el Sur de Ecuador y en particular las provincias de Loja y Zamora-Chinchipe se ha

encontrado que el Parque Nacional Podocarpus, representa una de las áreas de mayor diversidad de especies en *Macrocarpaea* (Grant & Struwe, 2003).

Entre estas encontramos la especie *Macrocarpaea lenae*, la que representa el objetivo del presente estudio, el cual se basa en realizar un aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios presentes en esta especie, mediante técnicas de maceración para obtención de extractos, cromatografía en columna, métodos espectroscópicos, computacionales y biológicos para la caracterización de los metabolitos aislados.

**CAPITULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

## **1.1. Plantas medicinales**

Son plantas medicinales, todas aquellas que contienen en alguna de sus partes, principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de la especie humana. El número de plantas vasculares que existe en la tierra varía según distintas estimaciones, entre 260,000 y 320,000 especies, siendo la mayoría plantas con flores o angiospermas (Front, 1980).

Las plantas son laboratorios naturales donde se biosintetiza una gran cantidad de sustancias químicas, debido a que poseen principios activos localizados dentro de los metabolitos secundarios, brindando diferentes usos dentro de la comunidad (Aguilar, Rodríguez, Saavedra, Espinosa, & Yero, 2012).

Debido a que las plantas son una alternativa actual para buscar nuevos agentes terapéuticos, estas han sido utilizadas desde tiempos remotos con fines curativos. Los usos particulares se han transmitido en forma oral o escrita y de generación en generación a lo largo de la historia, hasta nuestros días. Muchas de las aplicaciones que se hacen de las plantas medicinales se relacionan con prácticas mágico-religiosas (García & Morales, 2005).

## **1.2. Plantas medicinales en el Ecuador**

En el Ecuador existen más de 17000 especies de plantas vasculares. Esta gran diversidad de plantas proviene de las zonas tropicales y subtropicales de América, Asia, Malasia y África, así como zonas templadas de los hemisferios boreal y austral. A lo largo de la historia ecuatoriana se han realizado varias investigaciones sobre las plantas y sus usos, con el fin de proporcionar productos comerciales, como también para poner a disposición de la comunidad en general, el conocimiento ancestral que está en riesgo de perderse, por un afán de documentar sitios inexplorados o peculiares, o bien para profundizar en el uso y manejo de especies o grupo de plantas ofreciendo mejoras o alternativas de explotación (Front, 1980)

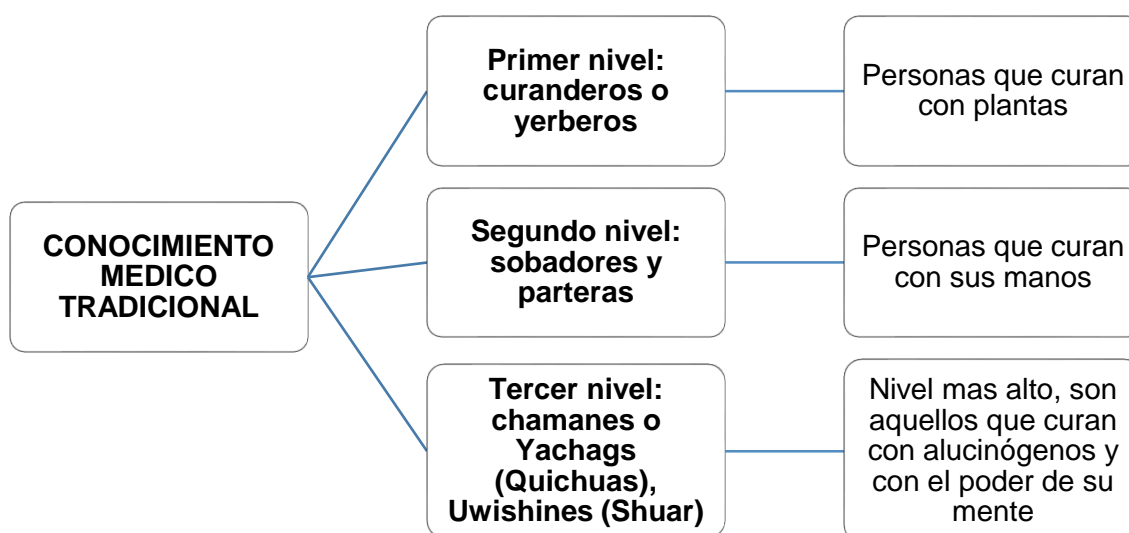
Ecuador por su alta diversidad biológica y cultural constituye uno de los países con un gran potencial en medicina tradicional. Los estudios de plantas medicinales y etnobotánica han sido desarrollados principalmente en la región central andina y en la Amazonía, consistiendo mayormente en la enumeración de las plantas que conoce y usa la gente local y la descripción de los sistemas de salud tradicional en comunidades indígenas (Zambrano, Buenaño, Mancera, & Edwin, 2015).



### 1.3. Medicina tradicional en el Ecuador

La medicina tradicional en el tratamiento de enfermedades, es una práctica que se ha llevado a cabo desde tiempos ancestrales y ha demostrado que es una de las mejores opciones en el cuidado de la salud para las personas y comunidades que la mantienen y conservan. Además, la reducida capacidad económica de las comunidades de estas zonas hace que no siempre tengan fácil acceso a los medicamentos modernos, por lo que continúan utilizando la medicina tradicional mediante el uso de sustancias derivadas de las plantas medicinales (Zambrano et al., 2015).

El conocimiento médico tradicional en el Ecuador tiene tres niveles, los cuales se detallan en la figura 1:



**Figura 1.** Niveles del conocimiento médico tradicional en el Ecuador

**Fuente:** (Ortega & Gualavasi, 2008)

**Elaborado por:** La autora, 2016

### 1.4. Familia Gentianaceae

La familia de las Gentianaceae fue descrita por primera vez en el año 1789 por el francés Antoine - Laurent de Jussieu. Esta familia incluye muchos árboles, matorrales y hierbas de zonas tropicales y templadas con diversos tipos de flores de distintas coloraciones que son muy apreciados en las poblaciones por sus colores y su belleza. Tiene una distribución cosmopolita con una mayor diversidad de taxones en las regiones templadas y subtropicales y sobre las montañas tropicales.

Tienen una función fisiológica y biológica importante para el organismo en que están presentes, son además la base de muchos preparados de tipo herborísticos y licuorísticos, en general a ellos se deben los efectos de las plantas utilizadas en la medicina tradicional. Su estudio fitoquímico se ha basado en el uso tradicional, empleando las plantas endémicas de cada pueblo. Al experimentar en animales con los compuestos aislados, se han identificado varias propiedades como la antiinflamatoria, antiasmática, anticonvulsiva, antihistamínica, entre otras. (Vidari & Vita finzi, 2010).

Se conoce que las especies de la familia Gentianaceae, tienen una función fisiológica importante para el organismo, por ejemplo, los flavonoides tienen como propiedad atraer insectos polinizadores, alcaloides como defensa contra depredadores, terpenos especialmente iridoides que otorgan el sabor amargo que las caracteriza y las xantonas que proveen de gran homogeneidad a la familia y podrían ser consideradas como un carácter distintivo (Nadinic et al., 2002).

Las investigaciones fitoquímicas en varias especies de la familia gentianaceae, permitieron aportar conocimiento acerca de moléculas de diferente naturaleza, tales como: un compuesto de naturaleza iridoide llamado Swerchirina (figura 4) aislado de los extractos alcohólicos y hexánicos que tiene la propiedad de bajar la tasa de azúcar en la sangre; una xantona extraída del extracto metabólico llamada Swertiaperenina (figura 8), y un alcaloide llamado Gentialutina (figura 7) (Vidari & Vita finzi, 2010)

#### **1.4.1. Terpenos.**

Los terpenos forman un conjunto enormemente amplio de sustancias naturales, más de 30.000 descritas hasta la fecha encontradas en mayor o menor proporción en todos los tipos de organismos vivos. Su denominación proviene de trementina, y pueden ser tanto sustancias volátiles como no volátiles (Marco, 2010).

La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas.

Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas como: giberelinas, ácido abscísico y citoquininas; carotenoides, clorofilas y plastoquinonas, ubiquinonas y esteroides. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (figura 2) que son las unidades formadas por cinco carbonos C<sub>5</sub>, de esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno: los terpenos

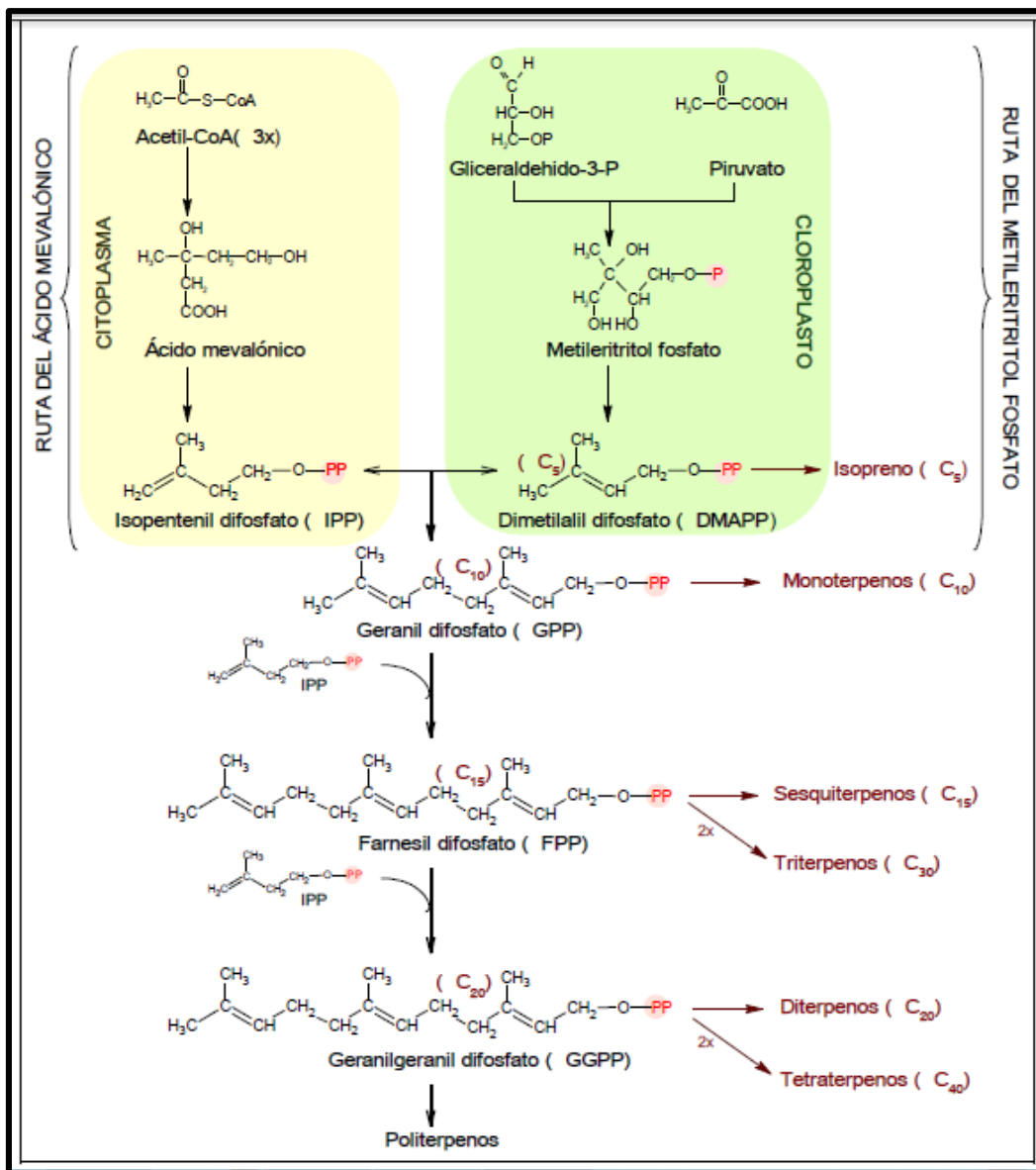
de C10 se llaman monoterpenos; los de C15, sesquiterpenos, los de C20 son los diterpenos, los triterpenos tienen C30, los tetraterpenos tienen C40 y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Ávalos & Pérez, 2009).

La síntesis de terpenos (Figura 3) ocurre a partir de dos precursores universales de naturaleza isoprenoide: IPP y DMAPP, que son los bloques activados de C5, conocido como pirofosfato de isopentenilo (IPP) o isopreno activo, el cual puede ser sintetizado tanto por la ruta clásica, citosólica, del mevalonato que parte de Acetil CoA o por la ruta alternativa, plastídica, que consiste en la condensación de gliceraldehído-3-P e hidroxietiltiamina.

En este proceso el IPP se isomeriza a dimetil alil pirofosfato (DMAPP), y este actúa como “donante” a una molécula de IPP y forma el geranil pirofosfato (GPP) mediante una reacción de condensación “cabezacola”, el cual a su vez, actúa como donante para otra molécula de IPP y forma el farnesil pirofosfato (FPP). Este tipo de condensaciones de pirofosfatos alílicos con el IPP produce los pirofosfatos prenílicos de mayor tamaño (Marco, 2010).



**Figura 2.** Estructura química del Isopreno  
**Fuente:** La autora, 2016

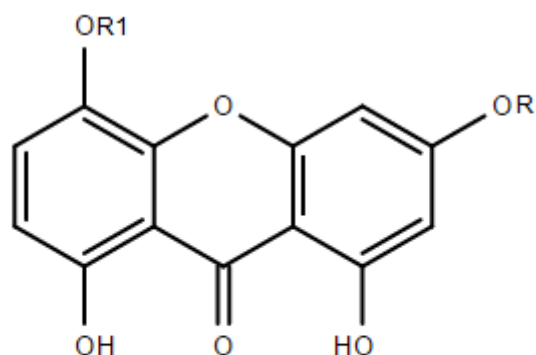


**Figura 3.** Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno  
**Fuente:** (Ávalos & Pérez, 2009)

Una clase de terpenos son los iridoides (figura 4), los cuales pueden encontrarse como estructuras abiertas como los secoiridoides (figura 5), o cerradas, y generalmente aparecen en forma de heterósidos, como glucósidos (figura 6). Estos compuestos presentan propiedades beneficiosas sobre la función hepática y biliar, tienen actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antiviral (López, Migue, & Aleixandre, 2012).

Son monoterpenos que se caracterizan por un esqueleto ciclopenta piránico denominado iridano. La mayoría son glucósidos y poseen un pequeño número de estructuras en las cuales la parte azucarada de la molécula es un oligosacárido, los iridoides no heterosídicos pueden ser alcaloídicos, policíclicos, ésteres internos. La

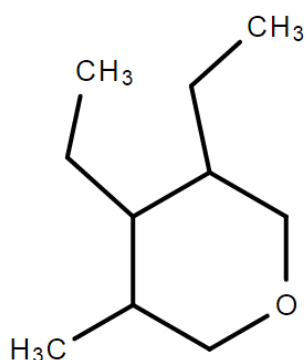
extracción de estos se da con disolventes polares y una primera separación se obtiene con frecuencia por reextracción del residuo extractivo disuelto en agua con ayuda de disolventes no miscibles de polaridad creciente (Bruneton, 2001).



- (a) Swerchirina R = R<sub>1</sub> = Me  
 (b) Bellidifolina R = MeR<sub>1</sub> = H  
 (c) Bellidina R = R<sub>1</sub> = H

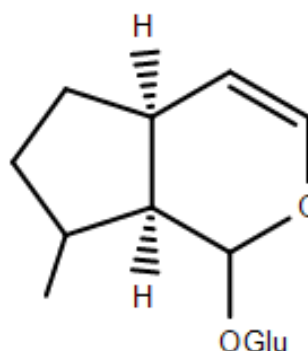
**Figura 4.** Molécula de Swerchirina

**Fuente:** La autora, 2016



**Figura 5.** Estructura de secoiridoide

**Fuente:** La autora, 2016



**Figura 6.** Estructura de iridoide glucósido

**Fuente:** La autora, 2016

#### 1.4.2. Flavonoides.

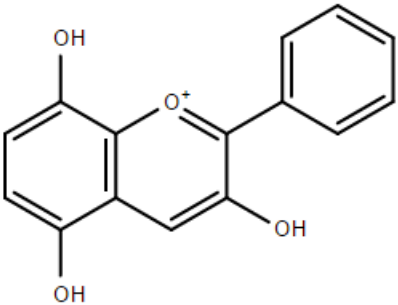
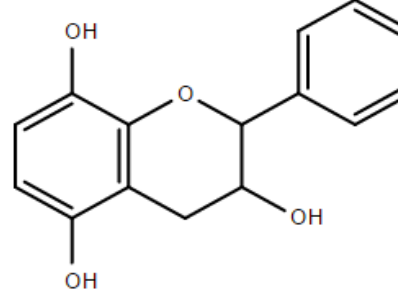
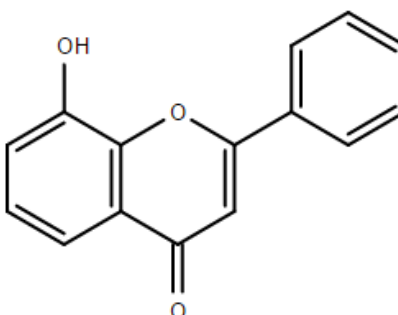
Los flavonoides son grupos aromáticos, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno, constituyen la mayor parte de pigmentos amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas.

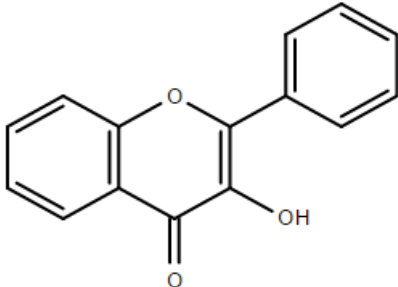
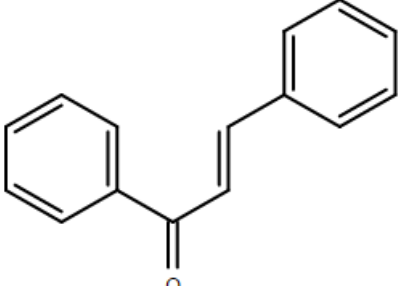
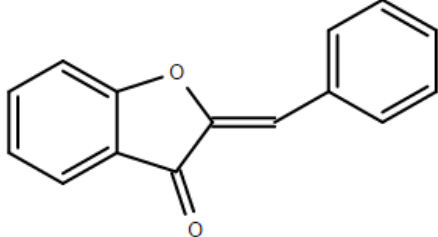
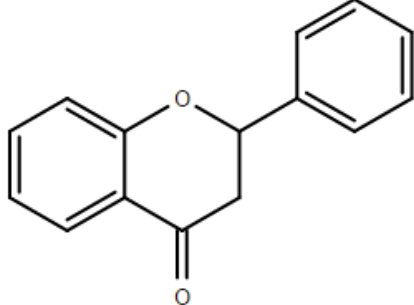
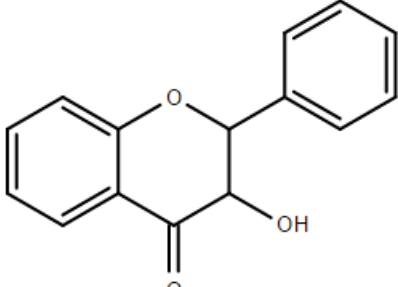
Las principales propiedades que podemos obtener de ellos son: antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes.

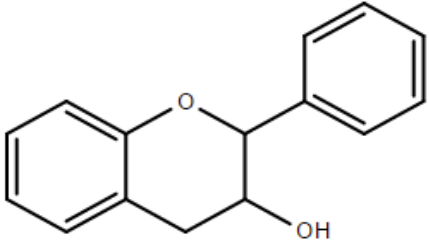
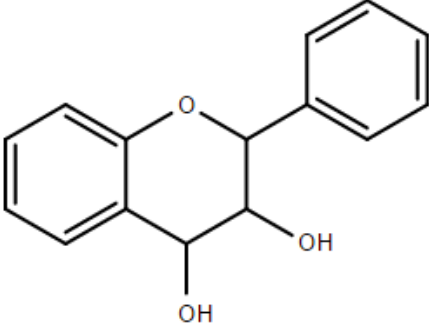
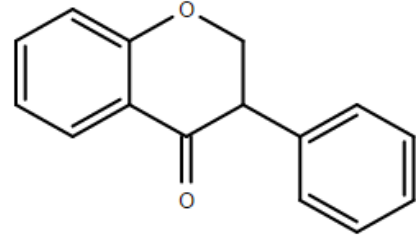
Están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos, común en la mayoría de los flavonoides. La síntesis de los flavonoides se da en las plantas a partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. Después, estas dos últimas, dan lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico; que al condensarse con las unidades de acetato originan la estructura cinamol de los flavonoides (Escamilla Jiménez, Cuevas Martínez, & Guevara Fonseca, 2009).

Debido a las variaciones del pirano, los flavonoides se clasifican como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación de flavonoides

NOMBRE	ESTRUCTURA
Antocianidinas	
Flavanos	
Flavonas	

Flavonol	
Chalconas	
Auronas	
Flavanonas	
Flavanonol	

Catequina	
Leucoantocianidina	
Isoflavona	

Fuente: La autora, 2016

### 1.4.3. Alcaloides.

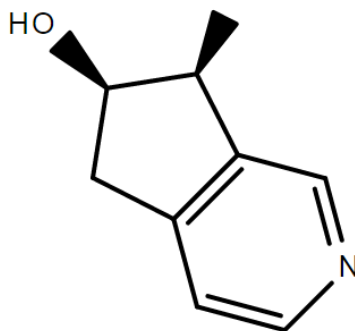
Son compuestos orgánicos cíclicos que contiene nitrógeno en un estado de oxidación negativo con una distribución limitada entre los organismo vivos (figura 7). Se consideran como metabolitos secundarios que se encuentran fundamentalmente en plantas y que tienen actividad farmacológica e incluyen todos los productos naturales que contienen nitrógeno que no son clasificados como péptidos, aminoácidos no proteicos, aminas, glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, cofactores, fitohormonas o metabolitos primarios (Marco, 2010).

Existen tres tipos principales de alcaloides:

- **Alcaloides verdaderos:** en ellos el átomo de nitrógeno forma parte de un anillo heterocíclico, poseen una significativa actividad farmacológica y biosintéticamente derivan de aminoácidos.



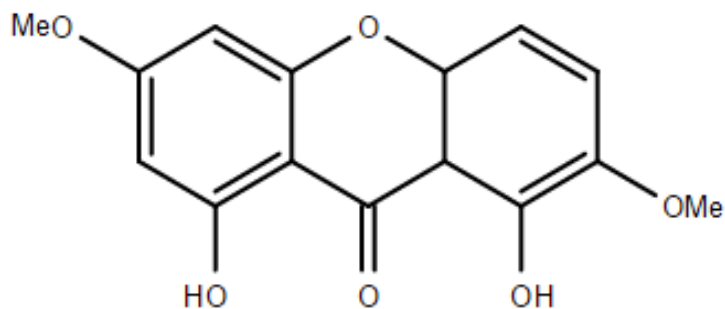
- **Protoalcaloides:** son aminas simples en las que el átomo de nitrógeno no forma parte de un anillo heterocíclico, son básicos y son elaborados in vivo a partir de aminoácidos.
- **Pseudoalcaloides:** Presentan las características de los alcaloides verdaderos, tienen un anillo heterocíclico con N, pero no derivan de aminoácidos.



**Figura 7.** Molécula de Gentialutina  
**Fuente:** La autora, 2016

#### 1.4.4. Xantonas.

Son compuestos aromáticos muy difundidos en ciertas familias vegetales, gutíferas y gencianaceas. En las xantonas aisladas de plantas superiores, uno de los anillos procede del ácido shikimico, mientras que el otro es de origen policetídico (figura 8). Los sustituyentes de los anillos pueden ser simples hidroxilos, o más elaborados y de diversos tipos como los que tienen restos de isoprenilo o C-glicosilo (Marco, 2010).



**Figura 8.** Molécula de Swertiaperenina  
**Fuente:** La autora, 2016

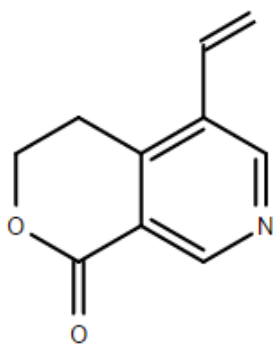
#### 1.4.5. Descripción del género *Macrocarpaea*.

El género *Macrocarpaea* posee un número limitado de ejemplares observados en el herbario, tiene una alta e inesperada cantidad de endemismo de especies en Colombia, Ecuador y Perú, en especial en las laderas andinas orientales entre 1000-3500 m.

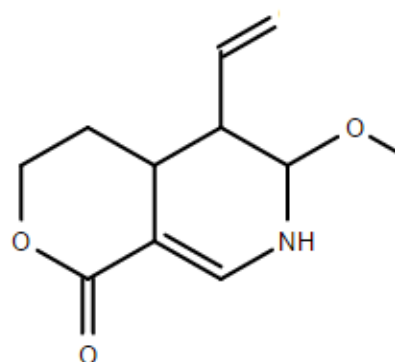
En el Sur de Ecuador y en particular las provincias de Loja y Zamora-Chinchipec se ha encontrado que el Parque Nacional Podocarpus representa una de las áreas de mayor diversidad de especies en *Macrocarpaea*, 16 especies se encuentran en la región. Muchos son comunes en toda la zona, mientras que otros sólo se conocen básicamente en una sola localidad.

Después de una cuidadosa investigación, se consideró anunciar "luna de genciana" o "genciana de luna" para el género *Macrocarpaea*. El nombre es apropiado ya que todas las especies conocidas hasta la fecha son la noche en flor, bañado en el resplandor de la luna. Tienen color amarillo pálido, corolas con lóbulos en forma de media luna de color luz verdoso o blanco (Grant & Struwe, 2003).

A través de las investigaciones fitoquímicas realizadas en las diferentes especies del género *Macrocarpaea*, se han encontrado algunos compuestos, que en su mayoría son iridooides glucósidos, así también alcaloides como gentianine (figura 9) e Hirsutanine A (figura 10), y xantonas.



**Figura 9.** Molécula de Gentianine  
**Fuente:** La autora, 2016



**Figura 10.** Molécula de Hirsutanine A  
**Fuente:** La autora, 2016

#### 1.4.6. Descripción de la especie *Macrocarpaea lenae*.

Esta especie se llama "*Lena's moon-gentian*". El nombre *Macrocarpaea lenae* es en honor a la coautora botánica sueca Karin Elisabet Lena Struwe que participó en el descubrimiento de esta especie.

*Macrocarpaea Lenae J. R. Grant*, es una planta perteneciente a la familia Gentianaceae, crece en Colombia, Ecuador y Perú entre 1000-3500 msnm, principalmente en las laderas orientales de los Andes. El género *Macrocarpaea* cuenta 75 especies reconocidas, más de 30 de los cuales están presentes en Ecuador. Es un árbol ramificado, con 2-3 m de altura; tronco de 2,7 cm de diámetro de madera hueca, anillos de crecimiento apenas visibles, corteza parecida al papel fino aproximadamente de 0,05 mm, la superficie exterior de lisa a rugosa. Tallos de cilíndricos a cuadrangulares, ligeramente huecos, de 4-6 mm de diámetro.

La especie *Macrocarpaea Lenae J. R. Grant* fue clasificada por primera vez en 2003, fue recogida en el Parque Nacional Podocarpus, en la provincia de Zamora-Chinchipe; sin embargo, las muestras empleadas en este estudio se recolectaron cerca del pueblo de Saraguro, en la provincia de Loja (Grant & Struwe, 2003).

*Macrocarpaea Lenae J. R. Grant*, no posee gran información bibliográfica sobre su fitoquímica, anteriormente se realizó una investigación fitoquímica de esta especie, donde se encontró dos alcaloides conocidos como gentianine (figura 9) e hirsutanine A (figura 10); por lo tanto se considera que este es el primer estudio fitoquímico realizado para aislamiento de metabolitos secundarios no alcaloideos.

Entre los pueblos que utilizan esta planta, en la medicina tradicional, el pueblo de Saraguro la utiliza para el mal de aire, esta puede ser usada sola o mezclando con otras plantas que tienen la misma función, mientras que las hojas secas son para saumar la casa (Andrade et al., 2009).

#### 1.4.6.1. Clasificación taxonómica.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Macrocarpaea lenae*

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División :</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Equisetopsida
<b>Orden:</b>	Gentianales
<b>Familia:</b>	Gentianaceae
<b>Genero:</b>	<i>Macrocarpaea</i>
<b>Especie:</b>	<i>Lenae</i>

Fuente: <http://www.tropicos.org/Name/50236528?tab=images>



Figura 11. *Macrocarpaea lenae*

Fuente: <http://www.tropicos.org/Image/22177>



Figura 12. *Macrocarpaea lenae*

Fuente: <http://www.tropicos.org/Image/100289918>

### 1.5. Metabolitos secundarios de las plantas

A diferencia de las rutas metabólicas primarias que contienen compuestos comúnmente encontrados en todos los organismos, existen compuestos que tienen una distribución mucho más limitada en la naturaleza, ellos son conocidos como metabolitos secundarios, encontrados en organismos específicos que indican una expresión de la individualidad de las especies. La mayor parte de metabolitos secundarios no poseen un papel vital en el bienestar del productor, por lo que en el caso de la mayor parte de estos compuestos la función y su beneficio para el organismo no son conocidas (Dewick, 2009).

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes, protectores o repelentes de animales, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestivas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos & Pérez, 2009).

## **1.6. Cromatografía**

En 1906, el botánico Ruso M. Tswett realizó un experimento que condujo al descubrimiento de lo que hoy conocemos como cromatografía. Colocó un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Al agregar éter, observó que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas que descendían a través de la columna a diferentes velocidades.

La cromatografía es esencialmente un método físico de separación en que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una inmóvil (lecho estacionario), y otra móvil (fase móvil) la cual percola a través de la primera. El proceso cromatográfico se da como resultado de repetidos procesos de sorción-desorción durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionario y la móvil. A la distribución final de los componentes en función de su posición sobre el lecho estacionario, o del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma (Faraldos & Goberna, 2011).

### **1.6.1. Cromatografía en capa fina**

La cromatografía en capa fina (CCF) es uno de los métodos cromatográficos más utilizados, es el más simple de realizar, es de análisis rápido, sensible, económico y se puede utilizar para el análisis cualitativo y cuantitativo de diversas sustancias orgánicas e inorgánicas. Es una técnica de cromatografía de líquidos que se realiza en una fase estacionaria, que ayuda a predecir el comportamiento de la retención de sustancias diferentes. El sistema de CCF se compone de tres elementos: la fase estacionaria que es un sorbente, la fase móvil que es el disolvente de revelado, un líquido que comprende uno o más disolventes., y la sustancia separada (un analito o soluto). Los absorbentes de CCF, es decir, materiales sólidos porosos con relativamente una alta superficie específica, están en forma de una capa delgada situada sobre una superficie plana comúnmente vidrio, metal o una placa de plástico (Milojković-Opsenica & Andrić, 2014).

### **1.6.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).**

Son dos técnicas, que permiten la separación e identificación de mezclas complejas, en donde se utiliza un gas como fase móvil. En la CG-MS los solutos se desplazan a través del sistema cromatográfico a velocidades determinadas por sus afinidades por la fase estacionaria. La resolución es en función de las velocidades diferenciales de desplazamiento de zonas que tienden a separar sus centros y de los procesos de ensanchamientos de zonas que tienden a juntarlas, mientras que la EM, proporciona espectros, ya que detecta iones y se basa en la relación masa-carga (Connors, 1981).

### **1.7. Resonancia magnética nuclear**

Es la técnica que mayor información estructural ofrece, ya que en ella se observan los núcleos de los átomos y se puede conocer la influencia de cada entorno molecular sobre cada uno de los átomos. Para el C, se observa el isótopo  $^{13}\text{C}$ , mientras que, para el H es el isótopo  $^1\text{H}$ . En la técnica de RMN, los núcleos se someten a un campo magnético, cuyo comportamiento puede verse influido de diferentes maneras, dando diferentes tipos de información:

- Desplazamiento: frecuencia a la que sale cada núcleo en concreto.
- Integral: número de núcleos de cada tipo.
- Multiplicidad: número y disposición de los núcleos próximos(Connors, 1981).

### **1.8. Espectrometría de infrarrojo (IR)**

Es un tipo de espectrometría de absorción que aprovecha la radiación del espectro electromagnético, para ser usada en la identificación de un compuesto o en la investigación de la composición de una muestra; esta se divide en tres zonas: IR cercano:  $12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ , IR medio:  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  e IR lejano:  $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ . Esta espectrometría se basa en las frecuencias de vibración específicas (niveles de energía de la molécula) que poseen los enlaces químicos de las sustancias, las cuales dependen de factores como: forma de superficie de energía potencial de la molécula, geometría molecular, masa atómica y acomplamiento vibracional (McMurry, 2008).

En la interpretación del espectro de infrarrojo de un compuesto se observa la superposición de bandas de absorción de sus grupos funcionales específicos, así

también, permite establecer que algunos de ellos se encuentren presentes o ausentes en el material analizado (Willard, Merritt, Dean, & Settle, 1991)

### **1.9. Métodos computacionales**

Se conoce como química computacional, a la obtención de información estructural de sistemas químicos por medio de cálculos matemáticos basados en leyes fundamentales de la física. Los cálculos matemáticos se sostienen en fundamentos teóricos.

La mecánica cuántica es la única teoría que ayuda a interpretar las ecuaciones de movimiento de sistemas del tamaño de las moléculas. Mediante esta teoría conocemos como obtener de forma exacta la información estructural de un sistema molecular; sin embargo de acuerdo a Dirac, es también necesario recurrir a las matemáticas y a diversas aproximaciones (Andrés & Beltrán, 2000).

Entre los métodos para calcular la estructura electrónica, encontramos que las energías de excitación de sistemas moleculares, DFT y TD-DFT son de particular interés, debido a que estos procesos proporcionan resultados constantemente satisfactorios, ya que permiten realizar experimentos por un bajo costo entre los métodos computacionales de cálculo.

### **1.10. Ensayos biológicos**

Mediante estos ensayos se puede comprobar si los compuestos que se encuentran experimentalmente, poseen actividad biológica.

#### **1.10.1. Inhibición de Monoamina oxidasa.**

La Monoaminoxidasa (MAO) es una flavoproteína encontrada en la membrana externa de la mitocondria, que contiene un dinucleótido de flavina adenina unida covalentemente (FAD) como una coenzima y que tiene interés fisiológico y farmacológico debido a su papel central en el metabolismo de los neurotransmisores de monoamina.

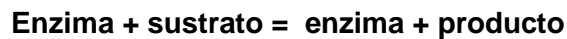
Esta flavoproteína existe en dos isoformas, MAO-A y MAO-B, que comparten aproximadamente el 70% de identidad de secuencia de aminoácidos y se diferencian

en su especificidad de sustrato, sensibilidad a los inhibidores específicos, y la estructura tridimensional.

Las dos isoformas catalizan la biotransformación por oxidación de monoaminas neurotransmisoras endógenas y también la metabolización de diversos exógenos primarios, secundarios, y aminas terciarias en el sistema nervioso central, así como en los tejidos periféricos.

En este ensayo las catecolaminas son hidrolizadas por monoaminooxidasa, por lo tanto, se conoce que las monoaminas son sustratos de la MAO y pasan a aldehídos, para después llegar a amionácidos gracias a otras enzimas. La MAO-A desamina preferentemente noradrenalina y serotonina y la MAO-B tiene un espectro más amplio.

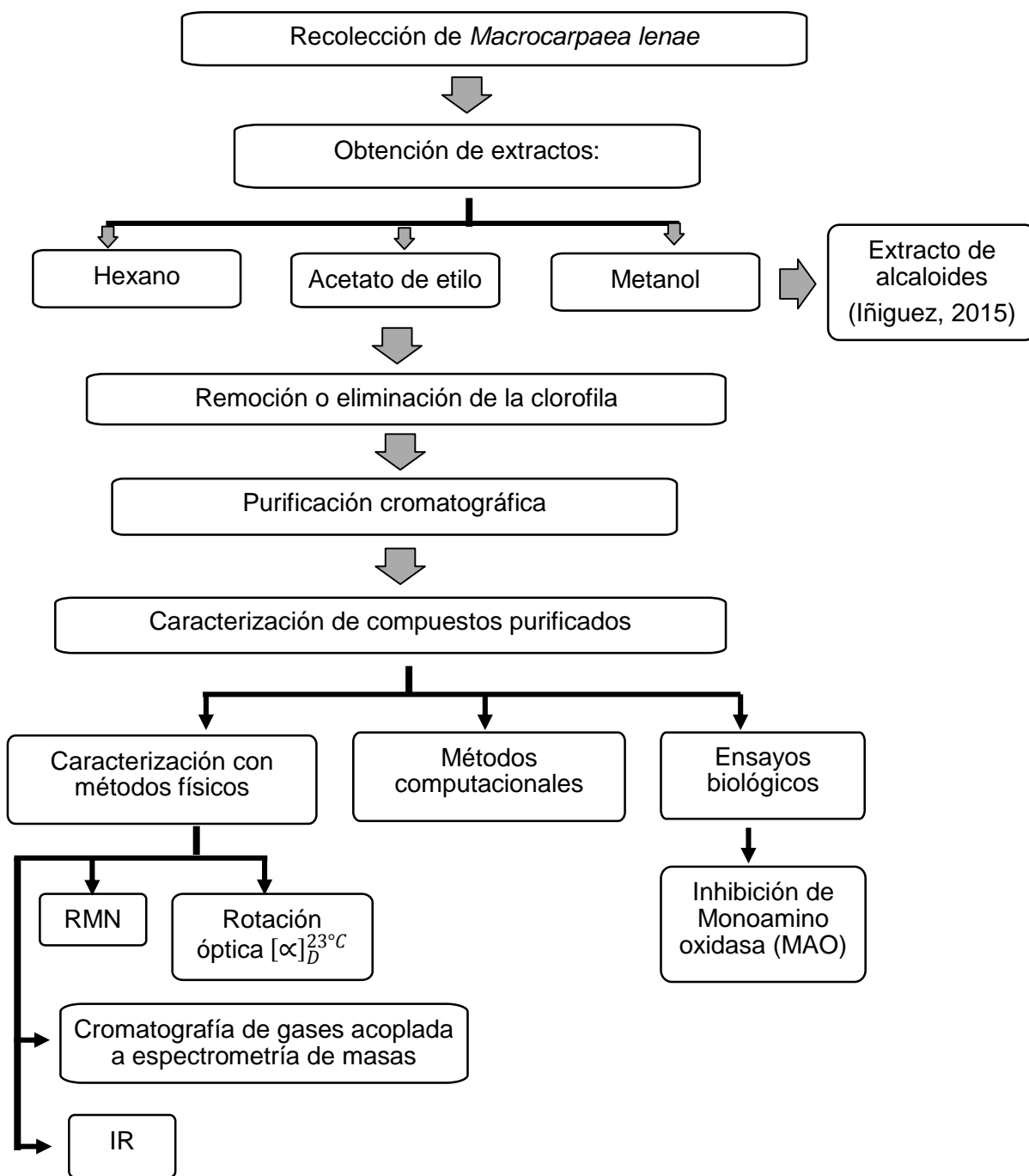
MAO se considera como una técnica colorimétrica ya que absorbe una longitud de onda, donde se usa un sustrato llamado Kynuramine, el cual no da color pero al producirse la siguiente reacción química, se libera un producto y este tiene color, para medir la absorbancia:





**CAPITULO II**  
**MATERIALES Y METODOS**

## 2.1. Esquema metodológico.



**Figura 13.** Esquema del desarrollo de la investigación

**Fuente:** La autora, 2016

**Elaborado por:** La autora

## **2.2. Recolección de la planta**

Las hojas de *Macropipaea lenae* se recolectaron en junio de 2009, con la autorización N°001-IC-FLO-DBAP-VS-DRLZCH-MA concedida por el Ministerio de Ambiente del Ecuador (MAE), en el sector de Cerro Acacana, perteneciente a la parroquia de San Lucas, cantón Saraguro, provincia de Loja, Ecuador.

La especie fue identificada por Bolívar Merino, curador del herbario de la Universidad Nacional de Loja, de acuerdo con un ejemplar conservado en la misma institución. Una muestra de herbario se conserva en el herbario de la UTPL con el código de voucher: PPN-GN-003.

Las hojas se secaron a 32°C, durante siete días, posteriormente se procedió a triturar y mantener al vacío en un lugar oscuro y fresco hasta el momento de la extracción, obteniéndose como resultado del proceso 814,24 g de material vegetal picado seco, que se guardó hasta el momento de estudio.

## **2.3. Obtención de los extractos**

Para la obtención de los extractos se sometieron las hojas secas, trituradas y pesadas a maceración dinámica y estática. En maceración dinámica se la dejó por un periodo de 2 horas, para luego en maceración estática dejarla por un tiempo de 22 horas, usando disolventes en orden creciente de polaridad como hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y etanol; a cada uno de ellos se los utilizó hasta conseguir su agotamiento.

Para los extractos de acetato de etilo y hexano, se procedió a separar el residuo vegetal y el líquido extractivo utilizando filtración al vacío, para luego concentrar este líquido empleando un equipo rota-evaporador a una temperatura entre 30-35°C, hasta obtener tres extractos totalmente secos.

Se realizaron CCF comparativas de los extractos de acetato y hexano, para decidir utilizar el extracto de acetato por su gran cantidad de compuestos. El extracto de etanol fue utilizado en la realización de otra tesis para extracción de alcaloides (Iñiguez, 2015).

## 2.4. Desclorofilación del extracto

Partiendo de un peso total de 35g, en una columna de vidrio, usando sílica gel fase reversa (RP18) se colocaron 5g del extracto y en forma isocrática, con una proporción 30:1 (gramos de sílica-gramos de muestra) en una polaridad MeOH-H<sub>2</sub>O 8:2, se realizó la desclorofilación del extracto.

## 2.5. Fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto total de acetato

### 2.5.1. Cromatografía en columna.

Partiendo de la fracción U2-7 del extracto sin clorofila, se realizaron dos grandes columnas:

Para la primera columna se tomaron 2g de muestra, y en una proporción 1:200 gramos de muestra-gramos de sílica, se compactó y sembró la muestra en la columna, para lo cual se utilizó un gradiente de polaridades: Hex – DCM - MeOH (60:30:10 - 55:35:10 - 45:45:109) y DCM - MeOH (90:10). Se obtuvieron 320 fracciones a las cuales se las sometió a CCF, para su control cromatográfico.

Para la segunda columna (figura 14) se tomaron 3,64 gramos de muestra, y se la realizó en las misma proporción que la columna anterior, a diferencia de que esta se realizó en condiciones isotrópicas, es decir, utilizando una polaridad: Hex – DCM - MeOH (70:20:10) y DCM - MeOH (90:10). De ella salieron 542 fracciones a las cuales se les realizó un control cromatográfico.



**Figura 14.** Columna 2 de muestra U2-7  
**Fuente:** La autora, 2016

### **2.5.2. Cromatografía en capa fina.**

Tanto a la muestra de extracto total de alcaloides como a las fracciones de las columnas fueron sometidas a cromatografía en capa fina, lo cual se realizó mediante la utilización de placas de aluminio cubiertas de sílica gel 60F<sub>254</sub>. Para este proceso se sembraba la muestra con una referencia, utilizando diferentes disolventes en polaridades distintas, revelarlo con ácido sulfúrico al 5% y vainillina, para luego someterlo a calor y observar las manchas con sus colores distintivos.

### **2.5.3. Unión de fracciones.**

Para la unión de fracciones, fue necesario realizar CCF, usando como eluyentes hexano – DCM – metanol (45:45:10), de esta manera se pudo relacionar la altura y la similitud visual de las manchas características que cada fracción poseía.

## **2.6. Purificación cromatográfica.**

Para la purificación de las uniones, se realizó un control cromatográfico previo, en donde al observar el lugar del compuesto, se procedía a realizar la purificación mediante cromatografía en columna (CC), en condiciones isocráticas, y en una relación 200:1 sílica – muestra. Luego de unir y verificar las fracciones recogidas, se aisló el compuesto deseado y se lo sometió a las pruebas necesarias para su caracterización.

### **2.6.1. Purificación de MH-19 (P).**

Al contar con 650,1 mg, se realizó una CC en fase inversa utilizando como eluyente: acetonitrilo – agua, en una proporción 1:1. Se recogieron las fracciones se unió como correspondía y finalmente se obtuvo 644,9 mg del compuesto purificado.

### **2.6.2. Purificación de MH-11/12 (P).**

Para la purificación de este compuesto, se realizó por separado las columnas, es decir, para MH-11 se realizó CC en condiciones: Hex – DCM - isopropanol (65:25:10) obteniéndose finalmente 3,9 mg de compuesto puro; mientras que para MH-12, se realizaron varias CC, siendo la final: acetato – hexano (9:1), de esta se obtuvo 3,1 mg de compuesto puro. Ambas cantidades fueron unidas consiguiéndose un total de 7 mg.

### **2.6.3. Purificación de MH-10 (P)**

Para purificar la fracción MH-10 (137,1 mg) con una CC en fase directa, se utilizó como eluyente: Hex – DCM – MeOH (70:20:10), y se obtuvo finalmente 79,6 mg de compuesto puro.

### **2.6.4. Purificación de MH-3 (P).**

Se contaba con 67,6 mg de la fracción obtenida de la columna, para realizar su purificación en una CC de fase directa, fue necesario utilizar como solvente: hexano - acetato (1:1), para que al finalizar con todo el proceso adquirir 6,7 mg de compuesto puro.

## **2.7. Caracterización de compuestos purificados**

Posterior a la purificación de los metabolitos aislados, se obtuvo su peso para proceder a caracterizar cada uno, utilizando diferentes métodos.

### **2.7.1. Caracterización con métodos físicos.**

#### *2.7.1.1. RMN.*

Los espectros de RMN:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HMBC, HSQC y NOESY, fueron realizados en un equipo de resonancia magnética nuclear VARIAN Agilent 400 MHz – Premium Shielded con modelo del magneto MR Y 0021953, estos espectros se elaboraron a 400 MHz y 100 MHz. Como disolventes se utilizó metanol deuterado y cloroformo deuterado; finalmente los resultados fueron expresados en ppm y se informaron en Hz.

#### *2.7.1.2. CG – MS.*

Para la obtención de los pesos moleculares de los compuestos se empleó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para lo cual se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5937 inerte, en donde se realizaron las inyecciones de las muestras de los compuestos a analizar. Los detalles se observan en la tabla 3.

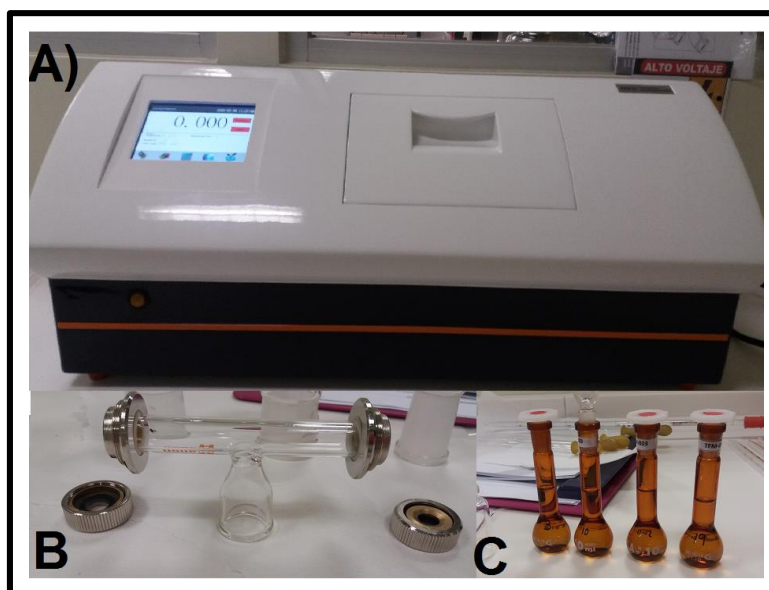
**Tabla 3.** Especificaciones del equipo de GC - MS de muestras MH-10 (P) y MH-3 (P)

<b>CROMATOGRAFÍA DE GASES</b>					
<b>Horno</b>		<b>Inyección</b>		<b>Columna</b>	
Temperatura inicial	60°C	Modo	Split	Numero de modelo	Agilent 122-5532
Temperatura final	270°C	Radio Split	50:1	Temperatura máxima	350 °C
Tiempo de ejecución	44 min	Flujo de Split	49.7 mL/min	Diámetro	250 um
		Tipo de gas	Helio	Flujo inicial	1.0 mL/min
<b>ESPECTROMETRÍA DE MASAS</b>					
<b>Parámetros de exploración</b>		<b>Zonas de MS</b>			
Masa mínima	45.0	MS Quad	200 C	Máximo 200 C	
Masa máxima	580.0	MS Source	230 C	Máximo 280 C	

Fuente: La autora, 2016

### 2.7.1.3. Rotación óptica ( $[\alpha]_D^{23^\circ C}$ ).

Para determinar la rotación óptica de los compuestos aislados fue necesario utilizar un polarímetro digital MRC Automatic Polarimeter P810 y una celda de 1dm de longitud. En el procedimiento de este experimento, fue necesario diluir la muestra en 10 ml de metanol grado HPLC y usar como blanco metanol puro (figura 15). Al final de este proceso, el valor que el equipo proporciona se lo reemplaza en la fórmula observada en la figura 16.



**Figura 15.** A) Equipo para actividad óptica, B) Celda y C) Muestras diluidas  
**Fuente:** La autora, 2016

$$[\alpha]_D^T = \frac{100 \times \alpha}{l \times C}$$

$T = 23^\circ C$   
 $D = \text{línea } D \text{ del espectro del Na}$   
 $\alpha = \text{ángulo medido}$   
 $l = \text{longitud de la celda en dm}$   
 $C = \text{concentración en gramos diluido en 100 ml}$

**Figura 16.** Fórmula para determinar actividad óptica

**Fuente:** (Galilei, 2016)

**Elaborado por:** La autora, 2016

### 2.7.2. IR.

El experimento se realizó en la Universidad de Turin, gracias a la colaboración del Ph.D. Carlo Bicchi en Italia, donde las muestras fueron analizadas en un FT-IR (Perkin Elmer SPECTRUM BXII).

Su procedimiento inicia diluyendo las muestras con cloroformo, se deposita esta solución sobre una celda de NaCl sólido y se deja que el cloroformo se evapore en el aire.

A continuación, la película líquida de la muestra permanece entre dos cristales de NaCl, y se procede a analizar. Cuando termina el análisis, se recupera las muestras mediante lavado con cloroformo.



### 2.7.3. Métodos computacionales.

Estos métodos fueron realizados con éxito gracias a la colaboración de la Ph.D. Silvia González, docente de la UTPL.

Para el cálculo de la energía de la estructura molecular del compuesto MH-10 (P), se utilizó el programa Gaussian versión 09. Para el modelo se utilizó la geometría de la molécula inferida de los resultados del RMN, y el método de cálculo involucra la teoría conocida como teoría del funcional de la densidad (DFT), en particular se utilizó el funcional B3LYP.

La función de onda fue construida con las funciones de base de Ahlrichs, y para la obtención del resultado exacto se realizaron correcciones de los datos teóricos del RMN con ayuda de una página web de la Universidad de California llamada CHESHIRE, la cual aporta factores de corrección para cualquier molécula dependiendo del solvente y la función base, para ser reemplazados en la fórmula correspondiente, la cual se conoce que parte de la ecuación de la recta, es decir:

Las constantes de la regresión lineal: slope (pendiente de la recta) e intercept (ordenada al origen) de la ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Que en este caso se aplica a los datos de la siguiente forma:

$$\sigma = \text{slope } \delta + \text{intercept}$$

Finalmente, como se desea despejar  $\delta$  (*chemical shift* corregido), la fórmula queda de la siguiente forma (figura 17):

$\delta = \frac{\text{intercept} - \sigma}{-\text{slope}}$	<p><math>\delta</math> = <i>chemical shift</i> corregido <math>\sigma</math> = valores isotrópicos del <i>chemical shift</i> calculados <b>slope</b> = pendiente de la recta <b>intercept</b> = ordenada al origen</p>
--	--

**Figura 17.** Fórmula para corrección de datos de RMN

**Fuente:** <http://cheshirenmr.info/Instructions.htm>

#### 2.7.4. Ensayos biológicos.

El análisis biológico se realizó mediante el ensayo de inhibición de monoaminooxidasa, este procedimiento fue realizado por el Ph.D. Christian Larroque, en el Instituto de Cáncer de Montpellier, Francia. Para este experimento se prepararon soluciones Stock como PBS y DMSO a diferentes concentraciones. Se tomó entre 2.3 – 2.7mg de muestra, a las cuales se les agregó cantidad suficiente de solución DMSO, para conseguir una dilución final de 50mg/mL (tabla 4).

Finalmente para proceder a la medición de la actividad selectiva de MAO-A y MAO-B, se coloca lo siguiente:

**Vehículo** (DMSO + molécula) + **Fración mitocondrial** (MAOA + MAOB) + **Sustrato** (Kynuramine) + **CLO** (inhibidor selectivo de MAOA)

**Tabla 4.** Cantidades usadas en el ensayo de IMAO

<b>Muestra</b>	<b>Peso</b>	<b>vol, µl DMSO</b>	<b>mg/mL</b>
MH-3 (P)	2,4	48	50
MH-10 (P)	2,7	54	50
MH-19 (P)	2,3	46	50

**Fuente:** La autora, 2016

**CAPITULO III**  
**RESULTADOS Y ANÁLISIS**

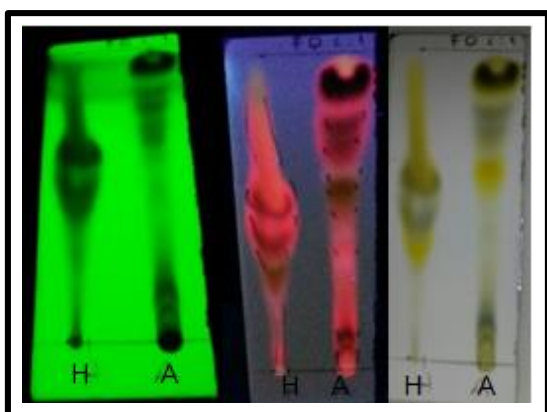
### 3.1. Extractos obtenidos de la especie *Macrocarpaea lenae*

En la tabla 5 se detallan los pesos tanto de ambos extractos, como del extracto de acetato sin clorofila. En la figura 18, se observa la comparación de los dos extractos de la especie vegetal, en ella podemos ver que hay una mayor cantidad de compuestos presentes en el extracto de acetato, por lo cual, se decidió usar este para la realización del proyecto, sometiendo a un proceso de desclorofilación. Posterior a este proceso, el extracto terminó dividido en tres partes, siendo el U2-7 la parte que estaba totalmente libre de clorofila, por lo que se la eligió para realizar la CC (figura 19).

**Tabla 5.** Pesos de los extractos

Extracto	Peso en gramos
Acetato de etilo	35
Hexano	32,3
<b>Extracto de acetato libre de clorofila</b>	
U1-7	10,4
U2-7	6,6
U3-7	2,2

Fuente: La autora, 2016



**Figura 18.** CCF de extractos de acetato de etilo y hexano: fase directa  
Hex - AcOEt 1:1

Fuente: La autora, 2016



**Figura 19.** CCF de U2-7: fase directa  
Hex - DCM - MeOH  
45:45:10

Fuente: La autora, 2016

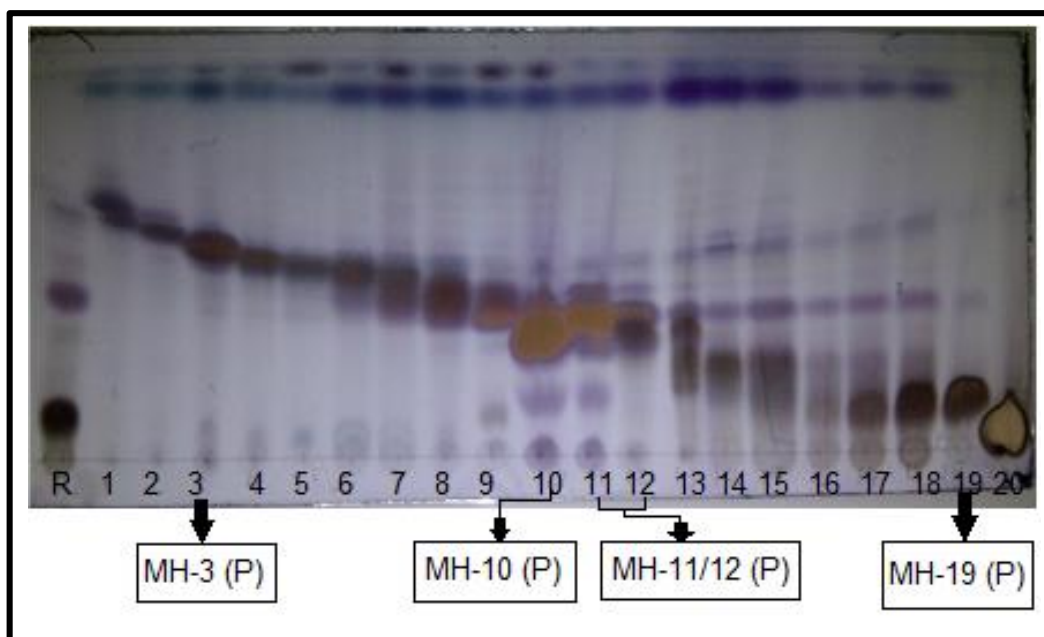
### 3.2. Cromatografía en columna de U2-7

La fracción U2-7, se purificó mediante cromatografía en columna, sin embargo se la dividió en dos partes. Toda la purificación de este fraccionamiento se puede observar de manera resumida en la figura 22.

Para la primera columna que se decidió realizar se utilizó un sistema de polaridad ascendente, iniciando con Hex – DCM – MeOH (60:30:10), Hex – DCM – MeOH (55:35:10), Hex – DCM – MeOH (45:45:10), DCM – MeOH (90:10) y finalmente etanol puro. Como resultado se obtuvo un total de 320 fracciones a las que al someterlas a CCF se decidió la manera de unir, teniendo finalmente 20 fracciones, a estas se les asignaron un nombre específico, se las secó, pesó y guardó a oscuras en una refrigeradora a -4°C (tabla 6). A cada una de estas uniones se las analizó mediante CCF en una placa de silicagel Merck GF 254 (fase directa), usando como eluyente: Hex– DCM – MeOH (45:45:10). En la figura 20 se observan las 20 uniones resultantes y se especifica en que uniones se obtuvieron compuestos puros.

**Tabla 6.** Uniones de Columna 1 (U2-7)

COLUMNA 1 (U2-7)					
Fracciones	Nombre	Peso	Fracciones	Nombre	Peso
7-11	MH-1	7 mg	70-76	MH-11	25 mg
12-15	MH-2	5 mg	77-103	MH-12	35 mg
16-28	MH-3	67,6 mg	104-143	MH-13	60,3 mg
29-33	MH-4	42,9 mg	144-161	MH-14	11,5 mg
34-35	MH-5	38,4 mg	162-178	MH-15	4,5 mg
36-39	MH-6	42 mg	179-183	MH-16	230,1 mg
40-42	MH-7	106,7 mg	184-188	MH-17	110,6 mg
43-48	MH-8	10,4 mg	189-196	MH-18	115,2 mg
49-54	MH-9	6,1 mg	197-260	MH-19	650,1 mg
55-69	MH-10	137,1 mg	261-320	MH-20	220,8 mg
Fuente: La autora, 2016			Lavado	MH-L	73,7 mg



**Figura 20.** CCF de uniones de columna 1 de muestra U2-7

**Fuente:** La autora, 2016

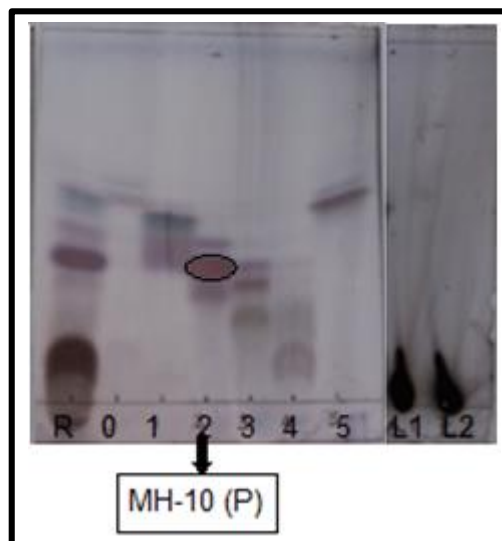
En la segunda CC se usó más cantidad de muestra, y esta fue con el fin de obtener mayor cantidad de los compuestos que se aislaron de la primera columna, esta se la realizó en un sistema isocrático, utilizando como eluyente: Hex – DCM – MeOH (70:20:10) y DCM – MeOH (90:10). De ella se tomaron 2000 ml inicialmente y luego se recogió 542 fracciones las cuales mediante CCF se las unió, obteniéndose un resultado de 6 fracciones. En la tabla 7, se puede observar el nombre que se le asignó a cada unión, su peso y la manera de unión.

En la figura 21, observamos la CCF de las 6 uniones de que salieron como resultado de esta columna, podemos observar también que la fracción MH-U2(2) F2, es exactamente igual al compuesto aislado de la fracción MH-10, por lo cual se decidió almacenarlo en una refrigeradora a oscuras y a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

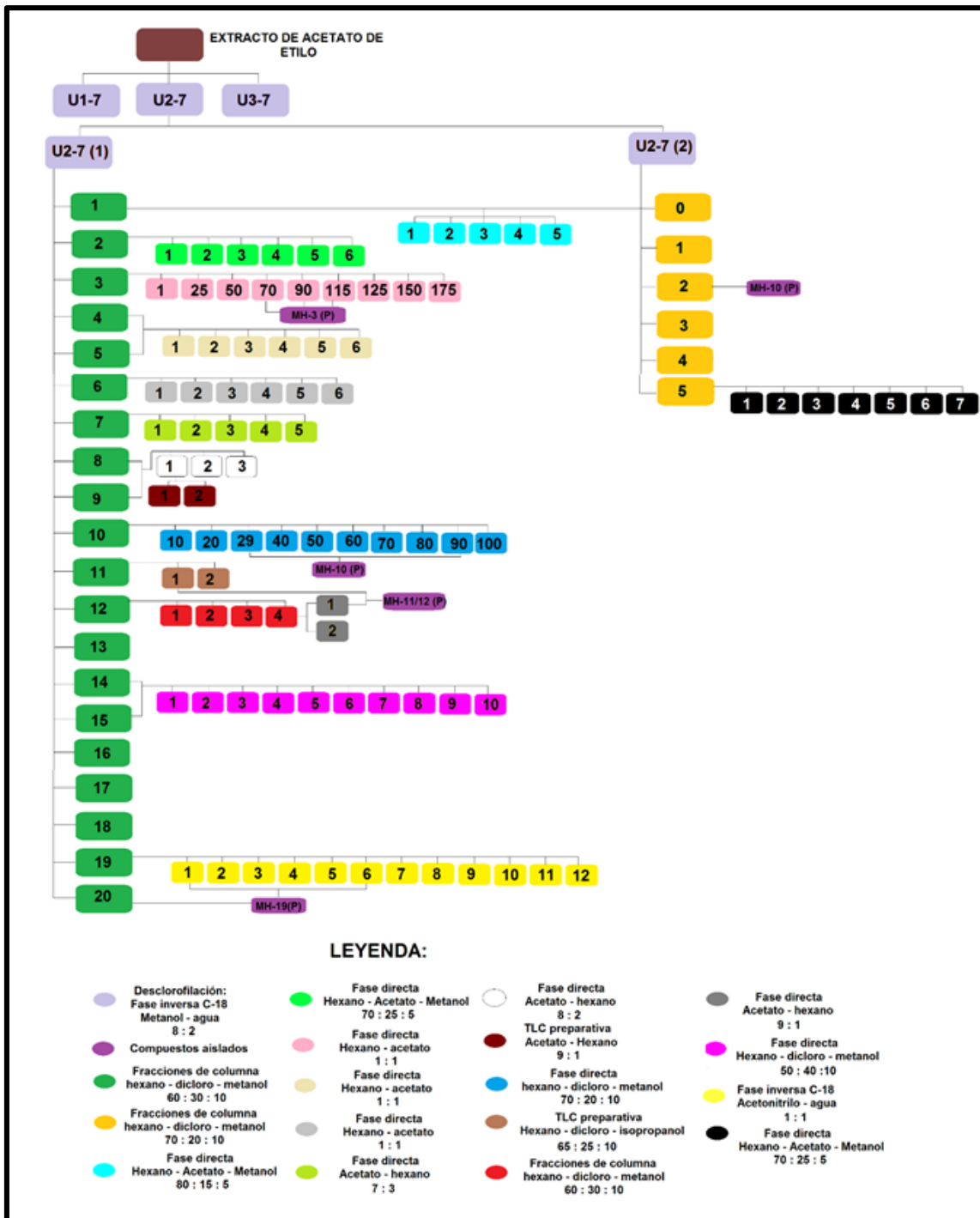
**Tabla 7.** Uniones de Columna 2 (U2-7)

<b>COLUMNA 2 (U2-7)</b>		
<b>Fracciones</b>	<b>Nombre</b>	<b>Peso</b>
2000 ml iniciales	MH-U2(2) F0	30,9 mg
26-89	MH-U2(2) F1	59,4 mg
90-385	MH-U2(2) F2	268,7 mg
386-525	MH-U2(2) F3	180,0 mg
526-542	MH-U2(2) F4	54,7 mg
1-25	MH-U2(2) F5	55,9 mg
Lavado	MH-U2(2) L	2,5 g

**Fuente:** La autora, 2016



**Figura 21.** CCF de uniones de columna 2 de muestra U2-7  
**Fuente:** La autora, 2016



**Figura 22.** Esquema de cromatografía del extracto de acetato  
**Fuente:** La autora, 2016



### 3.3. Purificación e identificación de los compuestos aislados

#### 3.3.1. Compuesto 1 – MH-19 (P).

Al realizar todas las pruebas a este compuesto, se obtuvo una estructura molecular, en donde se reconoció que este es un compuesto conocido, el cual de acuerdo a Hiroyuki, Shinichi, & Yushin, 2015, fue aislado por primera vez en 1927, denominándolo Swerosido.

Los espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY y DEPT que se obtuvieron de la Resonancia Magnética Nuclear, pueden ser observados en los anexos 1,2 y 3. Sin embargo, todos los datos que se obtuvieron como resultado de la parte experimental de este trabajo se observa a continuación:

**Nombre:** Swerosido

**Formula molecular:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_9$

**Peso molecular:** 358.13 g/mol

**Aspecto físico:** Sólido amorfo

**Peso:** 644.9 mg

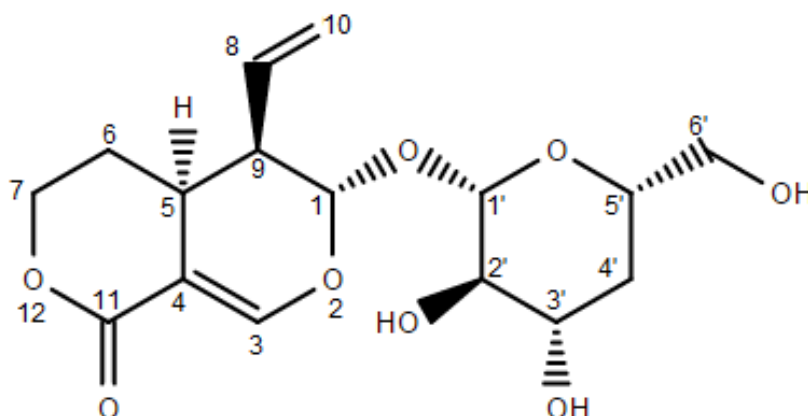
**Rf** (fase directa: Hex – DCM - MeOH 45:45:10): 0.11

**$^1\text{H}$ -RMN** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 5.45 (H-1, d,  $J=1.9$ , 1H), 7.50 (H-3, d,  $J=2.6$ , 1H), 3.10 (H-5, dddd,  $J=13.8$ , 5.3, 2.6, 2H), 1.69 (H-6 $\beta$ , dddd,  $J=13.8$ , 5.1, 2.6, 2H), 1.59 (H-6 $\alpha$ , ddd,  $J=13.6$ , 12.6, 4.3, 2H), 4.36 (H-7 $\alpha$ , ddd,  $J=11.1$ , 4.3, 2.2, 2H), 4.28 (H-7 $\beta$ , ddd,  $J=11.8$ , 11.3, 2.8, 2H), 5.45 (H-8, dt,  $J=9.9$ , 17.1, 2H), 2.61 (H-9, ddd,  $J=9.6$ , 5.5, 1.7, 1H), 5.21 (H-10 $\beta$ , dd,  $J=17.1$ , 1.9, 2H), 5.19 (H-10 $\alpha$ , dd,  $J=10.2$ , 1.9, 2H), 4.59 (H-1', d,  $J=7.9$ , 1H), 3.10 (H-2', dt,  $J=9.1$ , 8.0, 2H), 3.29 (H-3', t,  $J=8.8$ , 1H), 3.21 (H-4', t,  $J=9.6$ , 9.0, 2H), 3.20 (H-5', ddd,  $J=9.6$ , 5.9, 2.2, 4H), 3.8 (H-6 $\alpha$ , dd,  $J=11.9$ , 2H), 3.57 (H-6 $\beta$ , dd,  $J=11.9$ , 2H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 96.6 (C-1, CH), 152.6 (C-3, CH), 104.6 (C-4,  $\text{CH}_2$ ), 27.0 (C-5, CH), 24.5 (C-6,  $\text{CH}_2$ ), 68.3 (C-7,  $\text{CH}_2$ ), 131.8 (C-8, CH), 42.3 (C-9, CH), 119.4 (C-10,  $\text{CH}_2$ ), 167.1 (C-11, C), 98.3 (C-1', CH), 73.2 (C-2', C-H), 76.9 (C-3', CH), 70.1 (C-4', CH), 76.4 (C-5', CH), 61.2 (C-6',  $\text{CH}_2$ ).

$[\alpha]_D^{23^\circ\text{C}}$  (MeOH c = 1,53 g/100ml): -183,7

IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) film líquido: 3384, 2916, 1694, 1615, 1405, 1280, 1204, 1073, 987, 930, 901, 840, 757.



**Figura 23.** Estructura molecular de Swerosido  
Fuente: La autora, 2016

Comparando con la bibliografía, encontramos los datos espectrales resultantes de este trabajo, coinciden con los que se observan en Pauli, Nauman, & Fischer, 1995, (Machida, Asano, & Kikuchi, 1995) y (Naggar & Beal, 1980). Las posiciones correspondientes a las señales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, nos indican que la estructura del compuesto coincide con la que se encuentra propuesta en bibliografía, así también, el DEPT coincidió con el número de CH y CH<sub>2</sub>, mientras que espectro COSY, permitió observar los acoplamientos entre protones presentes en la molécula.

Se conoce que Swerosido ha sido utilizado en la medicina tradicional china para el tratamiento de la osteoporosis, ya que tiene un efecto osteogénico directo en la proliferación y diferenciación de células humanas cultivadas MG-63, y en osteoblastos de rata, razón por la que Swerosido ha sido sugerido para ser un producto natural terapéutico en el tratamiento de la osteoporosis (Sun et al., 2013).

### 3.3.2. Compuesto 2 – MH-11/12 (P).

Como resultado del aislamiento de las fracciones MH-11 y MH-12, se obtuvo el compuesto MH-11/12 (P), el cual al someterlo a diversas pruebas, entre ellas RMN, se observó que en estos espectros (anexos 5 y 6); tanto el  $^1\text{H}$  como el  $^{13}\text{C}$ , coincidían con una molécula ya conocida, llamada Amplexine (Djalonenol).

**Nombre:** Amplexine (Djalonenol)

**Formula molecular:**  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4$

**Peso molecular:** 200.23g/mol

**Aspecto físico:** líquido viscoso marrón

**Peso:** 7mg

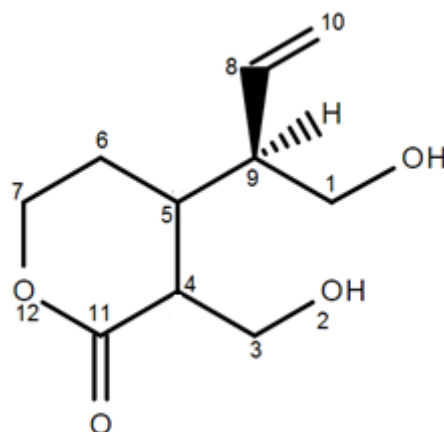
**Rf** (Fase directa: Hex – DCM - MeOH 45:45:10): 0.3

**$^1\text{H}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.75 – 5.66 (H-8, m, 1H), 5.29 – 5.18 (H-10, m, 2H), 4.37 (H-7 $\alpha$ , ddd, J = 11.2, 6.1, 3.9 Hz, 1H), 4.29 (H-7 $\beta$ , ddd, J = 11.2, 8.6, 3.4 Hz, 1H), 4.00 (H-3 $\beta$ , dd, J = 11.1, 4.2 Hz, 1H), 3.76 (H-3 $\alpha$ , ddd, J = 21.3, 11.0, 6.0 Hz, 2H), 3.68 – 3.63 (H-1, m, 1H), 2.75 (H-4, ddd, J = 8.0, 5.6, 4.2 Hz, 1H), 2.45 – 2.37 (H-9, m, 1H), 2.24 – 2.16 (H-5, m, 1H), 1.96 (H-6 $\beta$ , dtd, J = 14.4, 6.2, 3.4 Hz, 1H), 1.81 (H-6 $\alpha$ , dtd, J = 14.4, 8.7, 3.9 Hz, 1H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 62.8 (C-1,  $\text{CH}_2$ ), 63.0 (C-3,  $\text{CH}_2$ ), 46.1 (C-4, CH), 33.6 (C-5, CH), 26.5 (C-6,  $\text{CH}_2$ ), 67.5 (C-7,  $\text{CH}_2$ ), 136.2 (C-8, CH), 49.5 (C-9, CH), 119.6 (C-10,  $\text{CH}_2$ ), 174.5 (C-11, C).

$[\alpha]_D^{23^\circ\text{C}}$  (MeOH): ND

**IR**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) film líquido: 3396, 3080, 2925, 2361, 1714, 1640, 1478, 1405, 1267, 1196, 1076, 1004, 926, 756, 667, 510, 494, 488, 484, 462, 436, 402.



**Figura 24.** Estructura molecular de Amplexine (Djalonenol)  
**Fuente:** La autora, 2016

En comparación con los datos que presentan (Onocha, Okorie, Connolly, & Roycroft, 1995), se puede confirmar los resultados obtenidos en la práctica, debido a que al comparar los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , con los de bibliografía, nos indican que estos resultados son correctos y que la estructura de la molécula dibujada (figura 16) es la misma que se encuentra en bibliografía. Al comparar los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , del compuesto 1 y 2, se nota que existe una analogía entre el sistema de señales de los dos espectros, lo que conlleva a deducir que son compuestos estructuralmente relacionados, por lo tanto, el Djalonenol es un derivado del Swerosido.

Las diferencias que se presentan en los desplazamientos se deben a que en el Djalonenol el azúcar ya no está presente, la molécula se abre, y presenta dos OH. Se conoce que el Amplexine en distintas concentraciones inhibe el crecimiento in vitro de las formas sanguíneas del parásito de la malaria (Rocha e Silva et al., 2013).

### 3.3.3. Compuesto 3 – MH-10 (P).

Posterior al aislamiento del compuesto MH-10 (P) a partir de la fracción MH-10, todas las pruebas de RMN, IR y CG-MS, que se realizaron para su caracterización se pueden observar en los anexos 8 - 15.

**Nombre:** MH-10 (P)

**Formula molecular:**  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$

**Peso molecular:** 182.0 g/mol

**Aspecto físico:** líquido viscoso amarillo

**Peso:** 79.6mg

**Rf** (Fase directa: Hex – DCM - MeOH 70:20:10): 0.2

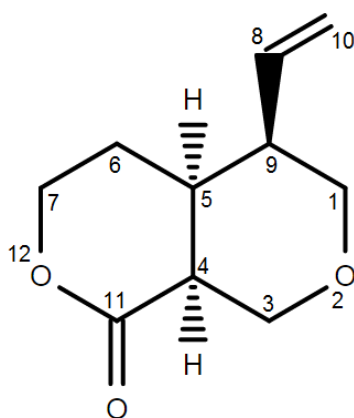
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.65 (H-1α, dd, J=12.4, 6.4, 2H), 3.68 (H-1β, dd, J=12.4, 6.8, 2H), 3.97 (H-3α, dd, J=10.8, 4.4, 2H), 3.77 (H-3β, dd, J=10.8, 5.2, 2H), 2.74 (H-4, dt, J=7.6, 4.8, 1H), 2.27-2.19 (H-5, m, 1H), 1.93 (H-6α, ddt, J=14.8, 6.0, 3.2, 1H), 1.77 (H-6β, ddt, J=14.8, 9.2, 4.0, 1H), 4.28 (H-7α, ddd, J=11.6, 9.2, 3.2, 2H), 4.36 (H-7β, ddd, J=11.6, 5.2, 4.0, 2H), 5.68 (H-8, ddd, J=17.2, 10.4, 8.8, 1H), 2.38 (H-9, dt, J=14.4, 6.4, 1H), 5.18 (H-10α, dd, J=17.2, 1.2, 2H), 5.23 (H-10β, dd, J=10.4, 1.2, 2H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 62.6 (C-1, CH<sub>2</sub>), 62.9 (C-3, CH<sub>2</sub>), 46.0 (C-4, CH), 33.4 (C-5, CH), 26.4 (C-6, CH<sub>2</sub>), 67.6 (C-7, CH<sub>2</sub>), 136.1 (C-8, CH), 49.3 (C-9, CH), 119.2 (C-10, CH<sub>2</sub>), 174.6 (C-11, C).

$[\alpha]_D^{23}$  (MeOH c=0,321 g/100ml): -4.98

**IR** ν (cm<sup>-1</sup>) film líquido: 3397, 2926, 2361, 1714, 1478, 1405, 1267, 1217, 1076, 1003, 956, 757, 668, 503, 492, 484, 473, 441, 426, 419, 404.

**EI-MS** m/z (%): 182 (M, 1), 171 (11), 163 (2), 152 (20), 137 (36), 127 (74), 122 (18), 118 (5), 112 (21), 107 (27), 100 (59), 91 (45), 87 (3), 83 (28), 79 (100), 72 (16), 67 (52), 54 (75), 45(7).



**Figura 25.** Estructura molecular de MH-10 (P)  
**Fuente:** La autora, 2016

Los resultados que presenta los espectros de RMN, se parecían mucho a los del Swerosido, no obstante, el compuesto aislado, no se ha encontrado en bibliografía considerándose como un compuesto nuevo, sin embargo, se sostiene que su estructura se deriva del compuesto anterior MH-19 (P) (Swerosido), lo cual se fundamenta comparando los espectros de ambos compuestos.

El espectro de  $^1\text{H}$  del MH-10 (P) en comparación con el del Swerosido, permite que lo primero que notemos es que todas las señales correspondientes al azúcar que van desde 3.1 – 4.6 ppm, en el MH-10 (P) desaparecen, por lo que entendemos que la estructura molecular de este compuesto ya no posee un azúcar, debido a esto, las señales del H-1, en el MH-10 (P) aparece en campos diferentes, es decir, en el Swerosido estaba a 5.5 ppm, mientras que en el MH-10 (P) cambió a 3.7. Mediante la comparación de los espectros de  $^{13}\text{C}$  y DEPT, observamos que el CH del C-1 a 96.5 ppm del Swerosido desaparece y en MH-10 (P) aparece un  $\text{CH}_2$  correspondiente a el C-1 a 62.6 ppm. Mediante el COSY, se observa que las correlaciones de los hidrógenos cambian, es decir, en el Swerosido existe una correlación entre los H-1 y del H-1 a 5.45 ppm con el H-10 a 5.2 ppm, a diferencia de que en el MH-10 (P) además de la correlación entre H-1, el H-1 a 3.7 ppm correlaciona con H-9 a 2.2 ppm. Finalmente debido a la ausencia del azúcar el espectro HMBC nos indica que el H-1 a 3.7 ppm se acopla con los C-8 a 136 ppm, C-9 a 49.3 ppm y C-5 a 33.4 ppm.

En el Swerosido la señal observada en el espectro de  $^1\text{H}$ , del H-3 se encuentra a 7.5 ppm, mientras que, en el MH-10 (P) desaparece y aparece una nueva señal en campos más bajos entre 3.8 – 4.0 ppm; en el espectro  $^{13}\text{C}$  en el Swerosido desaparece el carbono cuaternario del C-4, y el CH del C-3, y en su lugar aparece un CH (C-4) a 46 ppm y un  $\text{CH}_2$  (C-3) a 62.9 ppm. En el espectro COSY observamos las correlaciones de los nuevos acoplamientos: en el Swerosido existía una correlación entre los H-3 a 7.5 ppm, y entre el H-3 a 7.5 ppm con el H-5 a 3.10 ppm, sin embargo, por la desaparición del doble enlace, en el MH-10 (P) aparecen dos hidrógenos con otras correlaciones, es decir, entre los H-3  $\alpha$  y  $\beta$  a 3.97 y 3.77 ppm respectivamente, y entre el H-4 a 2.7 ppm con los H-3  $\alpha$  y  $\beta$  y también con el H-5 a 2.2 ppm.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  nos muestra los desplazamientos que se dan de los C-3 y 4, donde, el C-3 de 152 ppm en el Swerosido cambia a 62.9 ppm en el MH-10 (P) y el C-4 de 104.5 ppm a 46.0 ppm; con HSQC se observa los acoplamientos de estos con sus respectivos hidrógenos. Finalmente con el espectro HMBC se observa los acoplamientos que estos carbonos poseen: el C-3 a 62.9 ppm se acopla con los H-3  $\alpha$  y  $\beta$  a 3.97 y 3.77 ppm respectivamente, con el H-4 a 2.7 ppm y con el H-5 a 2.2 ppm,

mientras que, el C-4 se acopla con el H-5 a 2.2 ppm, con el H-9 a 2.3 ppm y con los H-3  $\alpha$  y  $\beta$  a 3.97 y 3.77 ppm respectivamente.

Estos datos espectrales nos confirman la desaparición del doble enlace que existía en el Swerosido entre el C-3 y el C-4. Además de estos espectros se observó el NOESY (anexo 13), en donde notamos que existe un efecto NOE entre el H-5 y el H-4, lo que nos hace suponer que la molécula tenga una configuración *cis*, sin embargo, aún se tiene algunas dudas sobre ella, por lo que se espera que mediante cálculos computacionales, se pueda designar si la isomería final de esta es *trans* o *cis*.

### 3.3.4. Compuesto 4 – MH-3 (P).

De la fracción MH-3, se consiguió aislar el compuesto MH-3 (P), este no se lo encontró en bibliografía, sin embargo, su estructura se deriva del MH-11/12 (P) (Djalonelol o Amplexine). Todos los datos físicos y espectrales del RMN (anexos 16 - 20), IR (anexo 21) y CG-MS (anexo 22) se detallan a continuación:

**Nombre:** MH-3 (P)

**Formula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>

**Peso molecular:** 242.0 g/mol

**Aspecto físico:** líquido viscoso transparente

**Peso:** 7.6mg

**R<sub>f</sub>** (Fase directa: Hex – DCM - MeOH 70:20:10): 0.2

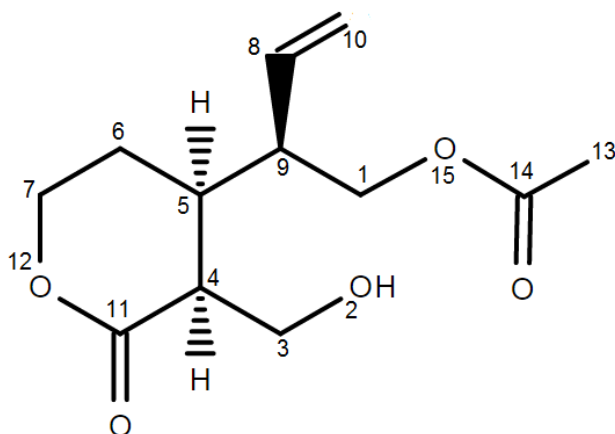
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 4.14 (H-1 $\alpha$ , d, J= 1.2, 1H), 4.16 (H-1 $\beta$ , d, J= 0.8, 1H), 4.01 (H-3 $\alpha$ , d, J= 10.8, 1H), 3.80-3.70 (H-3 $\beta$ , m, 1H), 2.53 (H-4, dt, J= 14.4, 6.0, 1H), 2.14 (H-5, ddt, J= 8.8, 6.0, 6.0, 1H), 1.98 (H-6 $\alpha$ , ddt, J= 14.4, 6.4, 3.6, 1H), 1.77 (H-6 $\beta$ , ddt, J= 14.4, 8.0, 4.0, 1H), 4.34 (H-7 $\alpha$ , ddd, J= 17.2, 11.2, 4.0, 2H), 4.31 (H-7 $\beta$ , ddd, J= 19.6, 11.2, 3.2, 2H), 5.71 (H-8, ddd, J= 17.2, 10.4, 8.4, 1H), 2.67 (H-9, ddd, J= 8.4, 5.6, 3.6, 1H), 5.23 (H-10 $\alpha$ , dd, J= 10.4, 1.2, 2H), 5.17 (H-10 $\beta$ , dd, J= 17.2, 1.2, 2H), 2.05 (H-13, s, 1H), 2.62 (OH, bs).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 64.0 (C-1, CH<sub>2</sub>), 62.5 (C-3, CH<sub>2</sub>), 45.6 (C-4, CH<sub>2</sub>), 34.2 (C-5, CH), 25.8 (C-6, CH<sub>2</sub>), 67.2 (C-7, CH<sub>2</sub>), 135.8 (C-8, CH), 46.1 (C-9, CH), 118.8 (C-10, CH<sub>2</sub>), 174.0 (C-11, C), 20.9 (C-13, CH<sub>3</sub>), 170.8 (C-14, C).

$[\alpha]_D^{23}$  (MeOH): ND

IR  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) film líquido: 3444, 2924, 2361, 1733, 1403, 1367, 1239, 1075, 930, 536.

El-MS m/z (%): 242 (M, 12), 224 (3), 211 (19), 200 (7), 197 (8), 194 (4), 184 (4), 182 (6), 178 (2), 172 (2), 170 (86), 167 (20), 164 (100).



**Figura 26.** Estructura molecular de MH-3 (P)  
Fuente: La autora, 2016

De acuerdo a los estudios realizados, observando los espectros de RMN notamos que el compuesto MH-3 (P) es muy parecido al Djalonenol, sin embargo, se presentaban ciertas diferencias que difieren en ciertas partes de su estructura molecular.

Al comparar el espectro de  $^1\text{H}$  de ambos compuestos, los H-8, H-10, H-7, H-5, H-6 H-1, H-3, H-4 y H-9, no se mueven a diferentes campos, por lo que la estructura de la molécula es la misma, sin embargo, se puede observar que en el espectro de  $^1\text{H}$  del MH-3 (P), existe la aparición de una nueva señal en campos bajos; a 2.05 ppm, se observa un singulete, el cual es indicador de que esta molécula contiene un grupo acetilo.

Esta hipótesis se confirma observando los demás espectros  $^{13}\text{C}$ , COSY y HSQC; ya que observando el espectro de  $^{13}\text{C}$  se nota la presencia de dos carbonos más, que corresponden a las señales de los C-14 y el C-13, encontrados a 170 y 20 ppm respectivamente; la posición a 170 ppm del C-14, nos indica que es el átomo de un carbono carboxílico de éster.



Finalmente el espectro HMBC, me confirma que el grupo acetilo se encuentra cerca del C-1 y no del C-3, ya que observando las señales del C-14 que se encuentra a 170 ppm, notamos que se acopla con el H-1 a los 4.1 ppm, además también se observa el acoplamiento con el H-13 a los 2.05 ppm, no obstante, para confirmar la estereoquímica de los centros de los C-4 y C-5, se deben continuar realizando estudios.

### 3.4. Cálculos computacionales

Para la corrección de los datos calculados computacionalmente del RMN del compuesto MH-10 (P), se utilizaron los factores presentados en la tabla 8 los cuales dependen tanto de la base como con el disolvente.

**Tabla 8.** Escala de factores para corrección de datos RMN

<b>Disolvente:</b> Cloroformo			
<b>Geometría (opt &amp; frec)</b>	<b>RMN (método)</b>	<b><sup>1</sup>H</b>	<b><sup>13</sup>C</b>
B3LYP/6-31+G(d,p) (gas phase)	B3LYP/aug-cc-pVDZ (giao, scrf)	slope: -1.0562 intercept: 31.7009	slope: -0.9974 intercept: 190.9642

**Fuente:** La autora, 2016

Esta escala de factores nos permitió reemplazar en la fórmula (figura 21) los valores del *chemical shift* tanto del <sup>13</sup>C como del <sup>1</sup>H dados por el programa Gaussian, los cuales al no ser comparables con los experimentales fueron corregidos. De este modo se obtuvieron los valores rectificados para comprobar si se trata de una estructura *cis* o una *trans* (tabla 9).

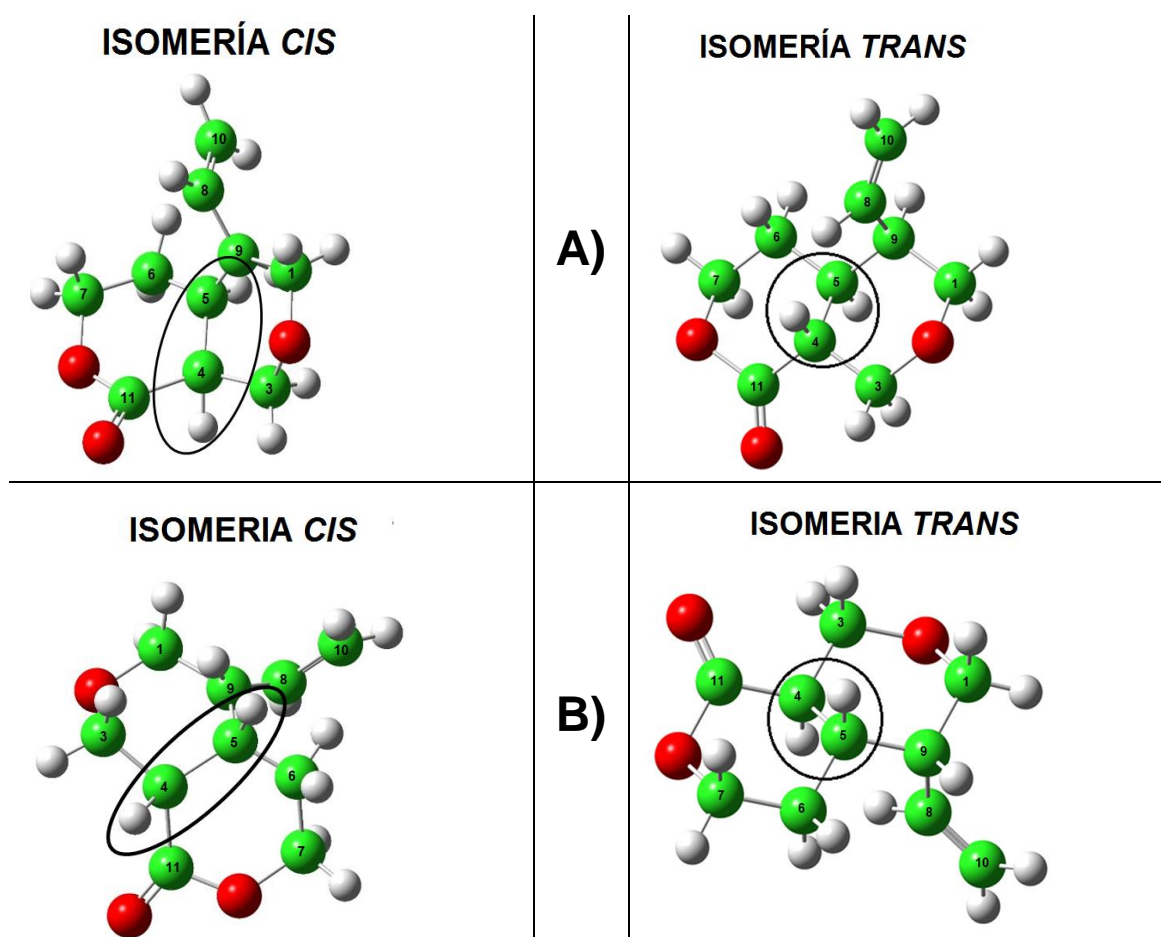
**Tabla 9.** Comparación de datos RMN, experimentales y computacionales corregidos.

Disolvente: CDCl <sub>3</sub>						
	EXPERIMENTAL		TRANS		CIS	
Posición	<sup>13</sup> C, δ	<sup>1</sup> H, δ, J	<sup>13</sup> C, δ	<sup>1</sup> H, δ, J	<sup>13</sup> C, δ	<sup>1</sup> H, δ, J
1a	62.6	3.65 (12.4, 6.4)	72.6	3.74 (12.4, 1.6)	67.8	3.47 (12.6, 10.9)
1b		3.68 (12.4, 6.8)		3.61 (12.4, 2.8)		3.56 (12.6, 5.3)
3a	62.9	3.97 (10.8, 4.4)	68.1	4.29 (12.7, 5.5)	66.2	3.79 (12.5, 6.5)
3b		3.77 (10.8, 5.2)		3.27 (12.7, 10.2)		3.51 (12.5, 10.8)
4	46.0	2.74 (7.6, 4.8)	44.9	2.38 (12.5, 5.5, 10.2)	47.1	2.82 (6.2, 10.8, 6.5)
5	33.4	2.23 (14.8, 6.0, 3.6)	43.7	1.92 (12.5, 5.0, 12.2, 3.2)	42.2	2.18 (6.2, 6.0, 12.9, 3.7)
6a	26.4	1.93 (14.8, 6.0, 3.2)	30.5	1.73 (15.0, 12.2, 6.4, 13.2)	21.6	2.05 (14.8, 5.5, 12.2, 12.9)
6b		1.77 (13.6, 9.2, 4.0)		1.50 (15.0, 3.2, 1.0, 4.1)		1.59 (14.8, 2.1, 3.5, 3.7)
7a	67.6	4.28 (11.6, 9.2, 3.2)	69.4	4.22 (12.7, 13.2, 4.1)	69.1	4.09 (12.6, 12.2, 3.5)
7b		4.36 (11.6, 5.2, 4.0)		4.40 (12.7, 6.4, 1.0)		4.39 (12.6, 5.5, 2.1)
8	136.1	5.68 (17.2, 10.4, 8.8)	138.4	6.35 (10.2, 11.5, 17.3)	139.2	5.86 (10.2, 11.3, 16.9)
9	49.3	2.38 (14.4, 6.4)	49.4	2.15 (10.2, 5.0, 1.6, 2.8)	48.7	2.42 (6.0, 10.2, 10.9, 5.3)
10a	119.2	5.18 (17.2, 1.2)	114.7	5.17 (17.3, 1.6)	116.0	5.25 (11.3, 1.5)
10b		5.23 (10.4, 1.2)		5.28 (11.5, 1.6)		5.29 (16.9, 1.5)
11	174.6	-	172.4	-	172.3	-

Fuente: La autora, 2016

De acuerdo a los valores obtenidos se calcularon dos posibles isómeros configuracionales *cis* o *trans* de la molécula, en las cuales se observa que la variación para que se de cualquiera de estas estructuras, se presenta en el C-4 y C-5 (figura 27). En los resultados de estos carbonos, al comparar los valores interpretamos de la siguiente manera:

Tanto el C-4 como el C-5 en sus valores del *chemical shift* del  $^{13}\text{C}$  y del  $^1\text{H}$ , tienen una variación más pequeña en la conformación *cis* que en la *trans*, por lo que se sospecha que la estructura de la molécula podría ser *cis*. Sin embargo, a pesar de todos los datos reunidos no se ha confirmado completamente cuál de las dos estructuras es la final para el compuesto, por lo que se continúan realizando estudios.



**Figura 27.** Estructura molecular de MH-10 (P) con ambas isomerías visto de dos formas diferentes

Fuente: La autora, 2016

### 3.5. Ensayos de inhibición de monoamino oxidasa (IMAO)

Este ensayo se lo realizó a los compuestos MH-10(P), MH-3(P) Y MH-19(P), en donde se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 10.** Resultados del ensayo de inhibición de MAO

Endpoint 316-357, 0-180min, 50ug/ml	Promedio	Forma estándar	A1	A2	B1	B2	%inh MAO-A	%inh MAO-B
DMSO vs MAO-A+B	100%	1%						
DMSO vs MAO-B (+CLO)	56%	1%	44%		56%			
MH-3(P) vs MAO-A+B	97%	3%		49%			-10%	
MH-3(P) vs MAO-B	49%	1%				49%		13%
MH-10(P) vs MAO-A+B	95%	1%		42%			6%	
MH-10(P) vs MAO-B	54%	7%				54%		3%
MH-19(P) vs MAO-A+B	100%	2%		49%			-9%	
MH-19(P) vs MAO-B	51%	0%				51%		7%

Fuente: La autora, 2016

Los resultados obtenidos del ensayo de inhibición de MAO dieron negativo, es decir, que ninguna de las tres moléculas inhibe estas enzimas de manera significativa, por lo tanto no son inhibidores importantes.

## CONCLUSIONES

- Del fraccionamiento en cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo, se identificó mediante RMN, 4 compuestos de naturaleza iridoide, dos de ellos conocidos como Swerosido y Djalonenol, mientras que los otros dos al no ser encontrados en bibliografía se los considera como compuestos nuevos, a los que se identificó como MH-10(P) y MH-3 (P) que son derivados de los dos ya conocidos.
- A través de los cálculos computacionales, se realizó diversos cálculos para determinar la estructura estereoquímica del compuesto MH-10(P), sin embargo, a pesar de que estos demuestran que lo más probable es que sea configuración *cis*, aún no se descarta la configuración *trans*, por lo que se continuará realizando pruebas para esta confirmación.
- Los ensayos de MAO realizados en MH-10(P), MH-3(P) Y MH-19(P), dieron resultados negativos dándonos a conocer que ninguna de estas tres moléculas inhibe dichas enzimas.

## RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de *Macrocarpae lenae*, realizando el aislamiento e identificación del extracto de hexano, ya que de este no se ha realizado ningún estudio.
- Confirmar la estructura molecular de los compuestos nuevos mediante cálculos computacionales.
- Asegurar la pureza de los disolventes, previo a su uso, para que de esta manera no afecte cuando se verifique la estructura de los compuestos en los espectros de RMN.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, Y., Rodríguez, F., Saavedra, M., Espinosa, R., & Yero, O. (2012). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 320–329.
- Andrade, M., Armijos, C., Malagón, O., & Lucero, H. (2009). *Plantas medicinales silvestres empleadas empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas, Provincia de Loja-Ecuador*. (G. León, Ed.) (Primera ed). Loja: 2009-05.
- Andrés, J., & Beltrán, J. (2000). *Química teórica y computacional* (Primera ed). España.
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia - Fitoquímica de plantas medicinales*. (A. Fresno, E. Carretero, & M. Rebuerta, Eds.) (Tercera ed). España: Editorial Acribia.
- Connors, K. (1981). *Curso de análisis farmacéutico*. (M. Guzmán & A. Asuero, Eds.) (Segunda ed). España: Editorial Reverté.
- Dewick, P. (2009). *Medicinal Natural Products* (Tercera ed). Chennai, India.
- Escamilla Jiménez, C. I., Cuevas Martínez, E. Y., & Guevara Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Fac Med UNAM*, 52(2), 73–75.
- Faraldos, M., & Goberna, C. (2011). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales* (Segunda ed). Madrid-España.
- Front, P. (1980). *Plantas medicinales* (Sexta edic). España: Editorial labor.
- Galilei, G. (2016). *Potere rotatorio e concentrazione zuccherina*. Retrieved from [http://www.itis.arezze.it/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=1478&Itemid=105](http://www.itis.arezze.it/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=1478&Itemid=105)
- García, M., & Morales, C. (2005). Análisis de la Literatura Sobre Plantas Medicinales en Costa Rica. *Lankesteriana*, 5(1), 3–40.
- Grant, J. R., & Struwe, L. (2003). De Macrocarpaeae Grisebach ( Ex Gentianaceis ) Speciebus Novis Iii: Six New Species of Moon-Gentians ( Macrocarpaea ,

- Gentianaceae : Helieae ) From Parque Nacional Podocarpus , Ecuador. *Harvard Papers in Botany*, 8(1), 61–81.
- Hiroyuki, I., Shinichi, U., & Yushin, N. (2015). Summary for Policymakers. In Intergovernmental Panel on Climate Change (Ed.), *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (Vol. 43, pp. 1–30). Cambridge: Cambridge University Press.
- Iñiguez, N. (2015). *Aislamiento y caracterización de compuestos obtenidos por extracción ácida de la especie Macrocarpaea lenae J.R. Grant*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- López, N., Migue, M., & Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutricion Clinica Y Dietetica Hospitalaria*, 32(3), 81–91.
- Machida, K., Asano, J., & Kikuchi, M. (1995). Caeruleosides A and B, bis-iridoid glucosides from *Lonicera caerulea*. *Phytochemistry*, 39(1), 111–114.
- Marco, A. (2010). *Química de los productos naturales* (Primera ed). Madrid-España: Editorial Síntesis.
- McMurry, J. (2008). *Química Orgánica*. (S. Cervantes, Ed.) (Séptima ed). México.
- Milojković-Opsenica, D. M., & Andrić, F. (2014). High performance thin-layer chromatography. *Green Chromatographic Techniques: Separation and Purification of Organic and Inorganic Analytes*, 9789400777, 81–101.
- Nadinic, E. L., Penna, C., Saavedra, C. L., Coussio, J. D., Gutkind, G., & Debenedetti, S. L. (2002). Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21(2), 123–130.
- Naggar, L., & Beal, J. (1980). Iridoids. a review. *Journal of Natural Products*, 43(6), 649–707.
- Onocha, P. A., Okorie, D. A., Connolly, J. D., & Roycroft, D. S. (1995). Monoterpene diol, iridoid glucoside and dibenzo-a-pyrone from *Anthocleista djalensis*. *Phytochemistry*, 40(4), 1183–1189.
- Ortega, F., & Gualavasi, L. (2008). *Creacion e introduccion del manejo de la historia*

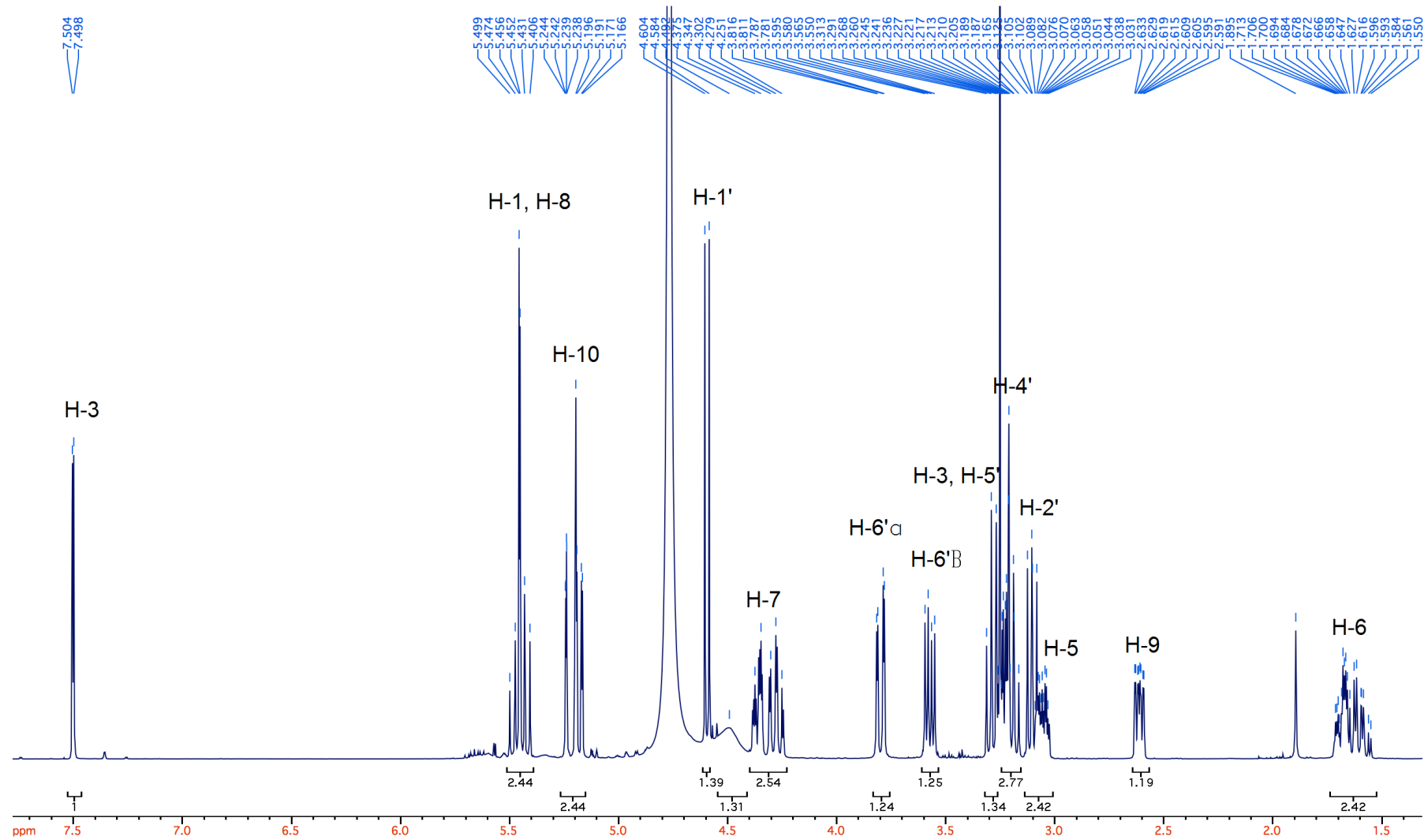


*clínica, el parte diario y el concentrado mensual de Medicina Tradicional Andina, en su servicio de salud del Ministerio de Salud Pública.* Universidad “San Francisco de Quito.”

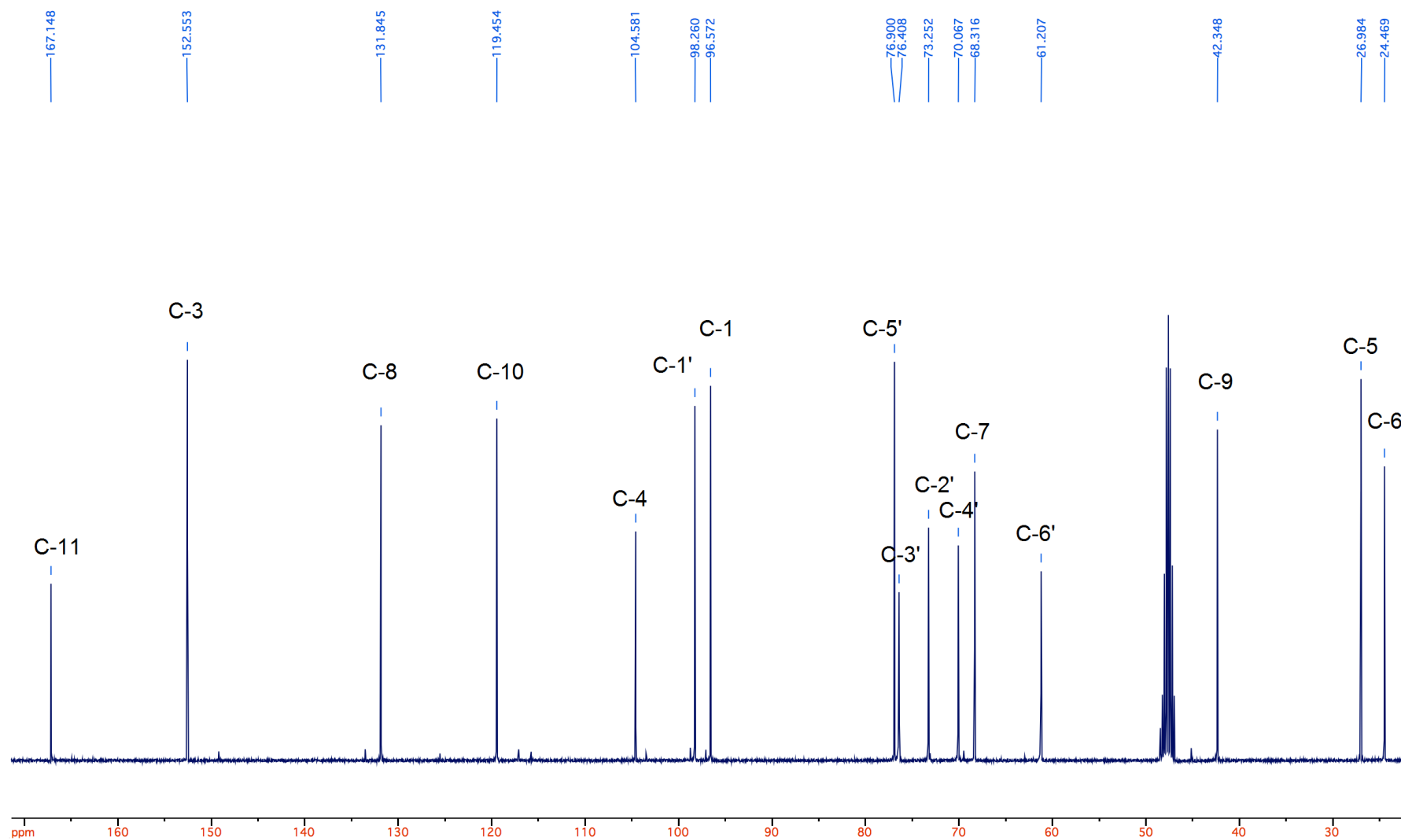
- Otsuka, S., & Kobayashi, Y. (1964). Radioisotopic Assay for Monoamine Oxidase Determinations in Human Plasma. *Biochemical Pharmacology*, 13, 995–1006. [http://doi.org/10.1016/0006-2952\(64\)90096-6](http://doi.org/10.1016/0006-2952(64)90096-6)
- Pauli, G. F., Nauman, M., & Fischer, N. H. (1995). Application of Soft Pulse 1D NMR: Sweroside from a Potential Native American Anti-TB Drug. *Spectroscopy Letters*, 28(6), 903–913.
- Rocha e Silva, L. F., Silva Lima, E., Carvalho De Vasconcellos, M., Pereira Aranha, E. S., Siqueira Costa, D., Vieira Mustafa, E., ... Martin Pohlit, A. (2013). In vitro and in vivo antimalarial activity and cytotoxicity of extracts, fractions and a substance isolated from the amazonian plant *tachia grandiflora* (Gentianaceae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 501–507.
- Sun, H., Li, L., Zhang, A., Zhang, N., Lv, H., Sun, W., & Wang, X. (2013). Protective effects of sweroside on human MG-63 cells and rat osteoblasts. *Fitoterapia*, 84(1), 174–179.
- Tripoli, E., Guardia, M. La, Giammanco, S., Majo, D. Di, & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466–479.
- Vidari, G., & Vita finzi, P. (2010). La Granja botánica , fitoquímica y actividad biológica botany , phytochemistry and biological activity Vidari y VitaFinzi. *La Granja*, 11(1), 3–14.
- Willard, H., Merritt, L., Dean, J., & Settle, F. (1991). *Métodos instrumentales de análisis.* (N. Grepe, Ed.) (Séptima ed). Mexico.
- Zambrano, L., Buenaño, M., Mancera, N., & Edwin, J. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos , Quevedo , Ecuador, 1(17), 97–111.

## **ANEXOS**

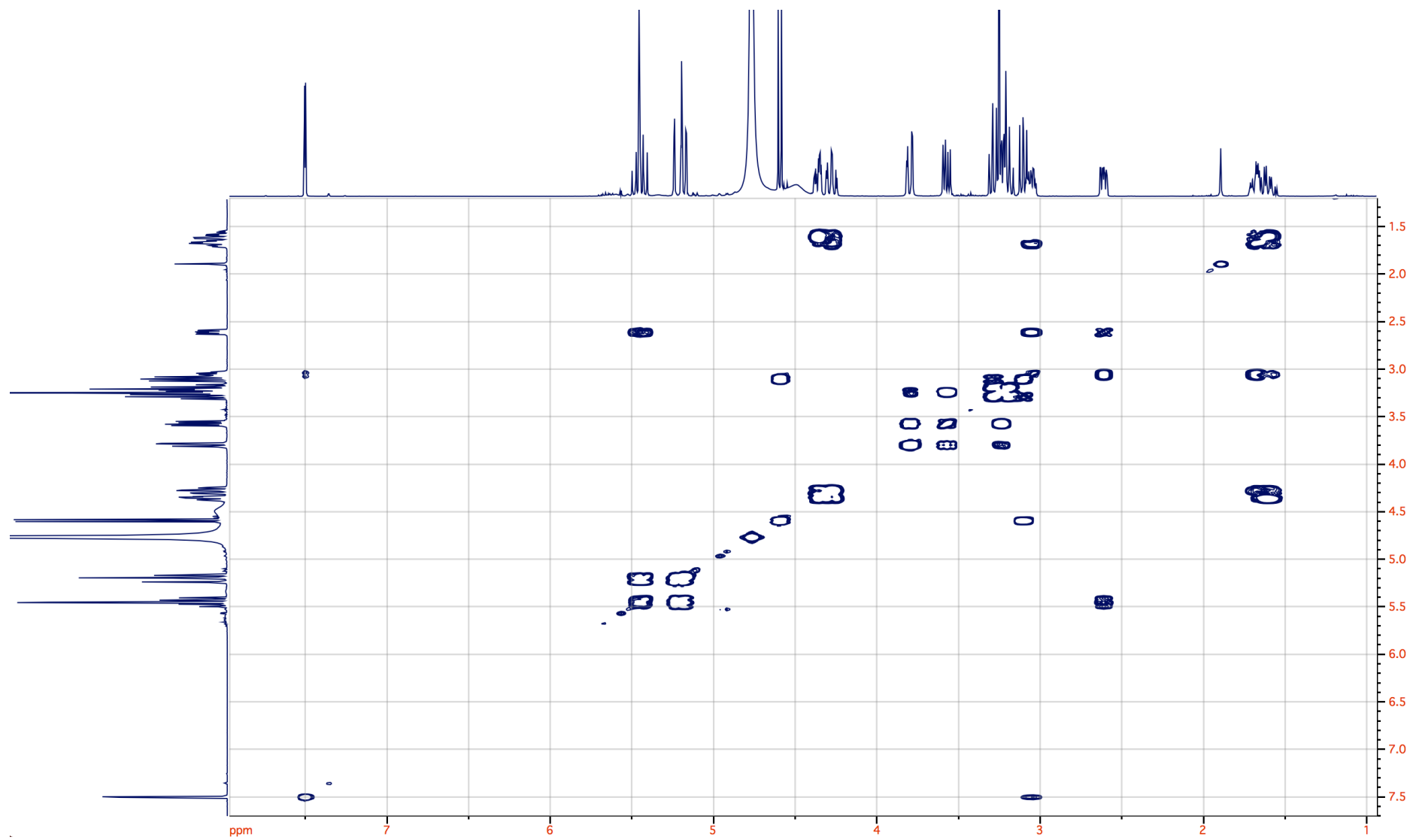
Anexo 1. Espectro de  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 1 (Sweroside)



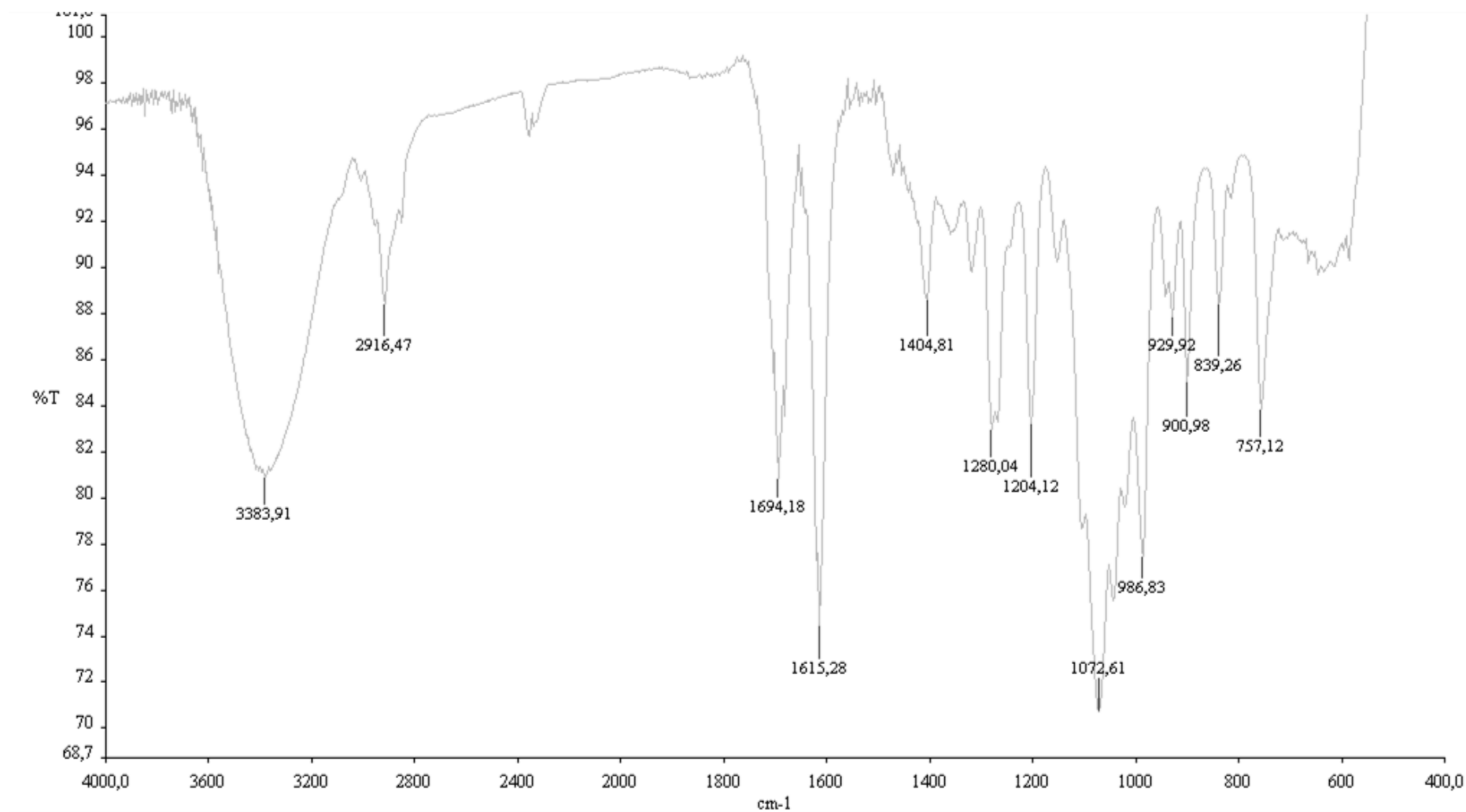
Anexo 2. Espectro de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto 1 (Sweroside)



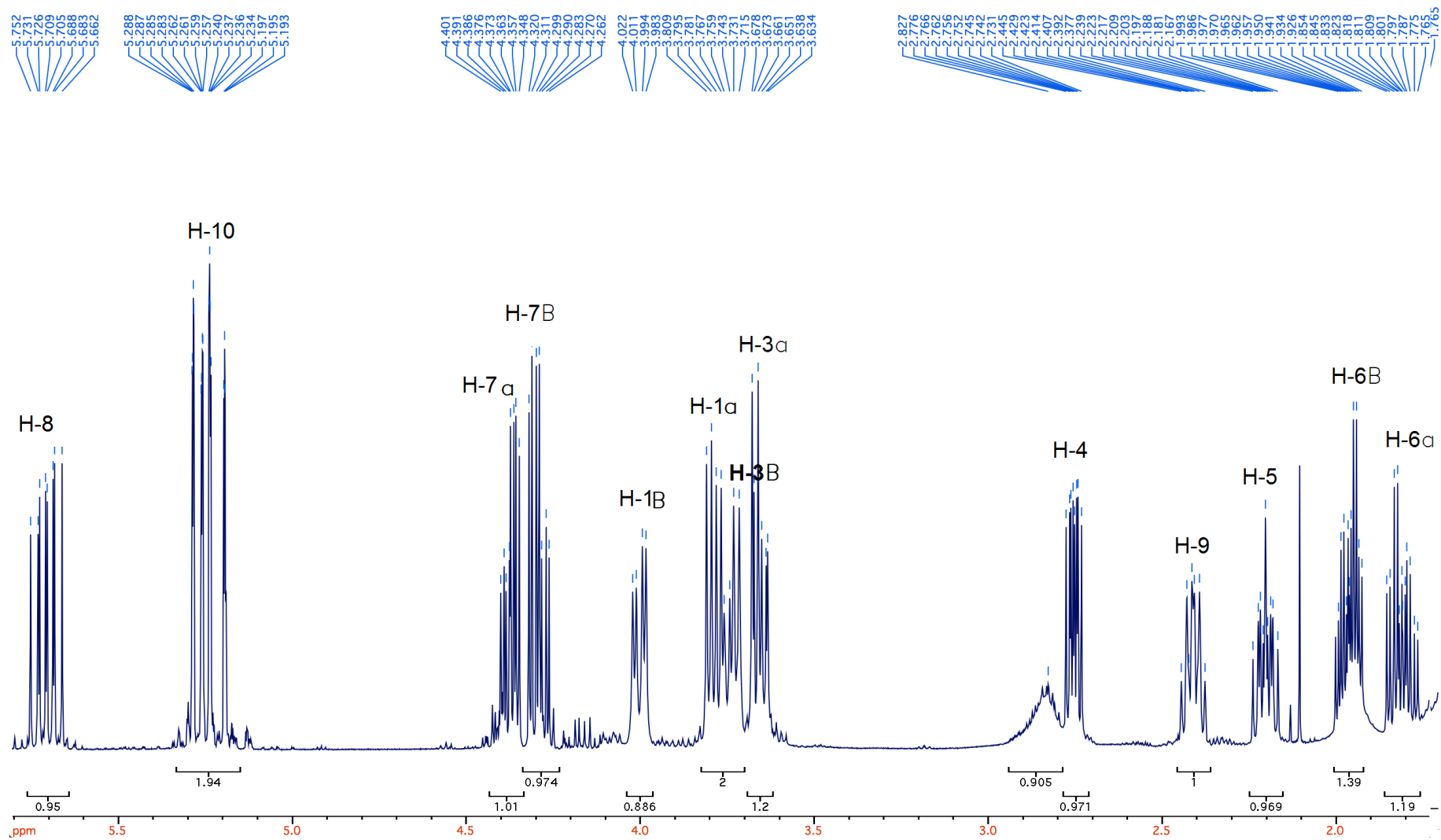
Anexo 3. Espectro COSY en CD<sub>3</sub>OD del compuesto 1 (Sweroside)



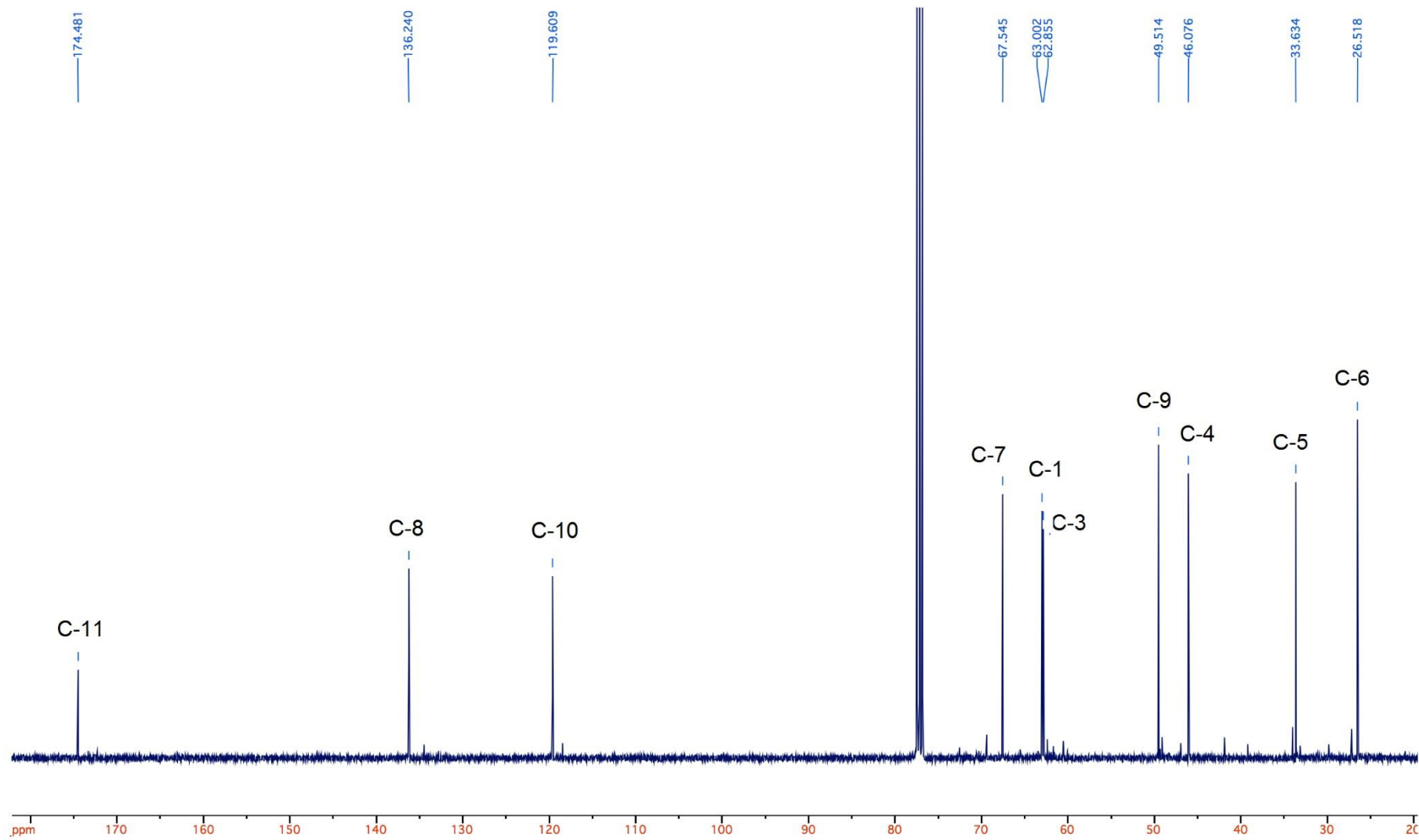
Anexo 4. IR del compuesto 1 (Sweroside)



Anexo 5. Espectro de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2 (Djalonenol)

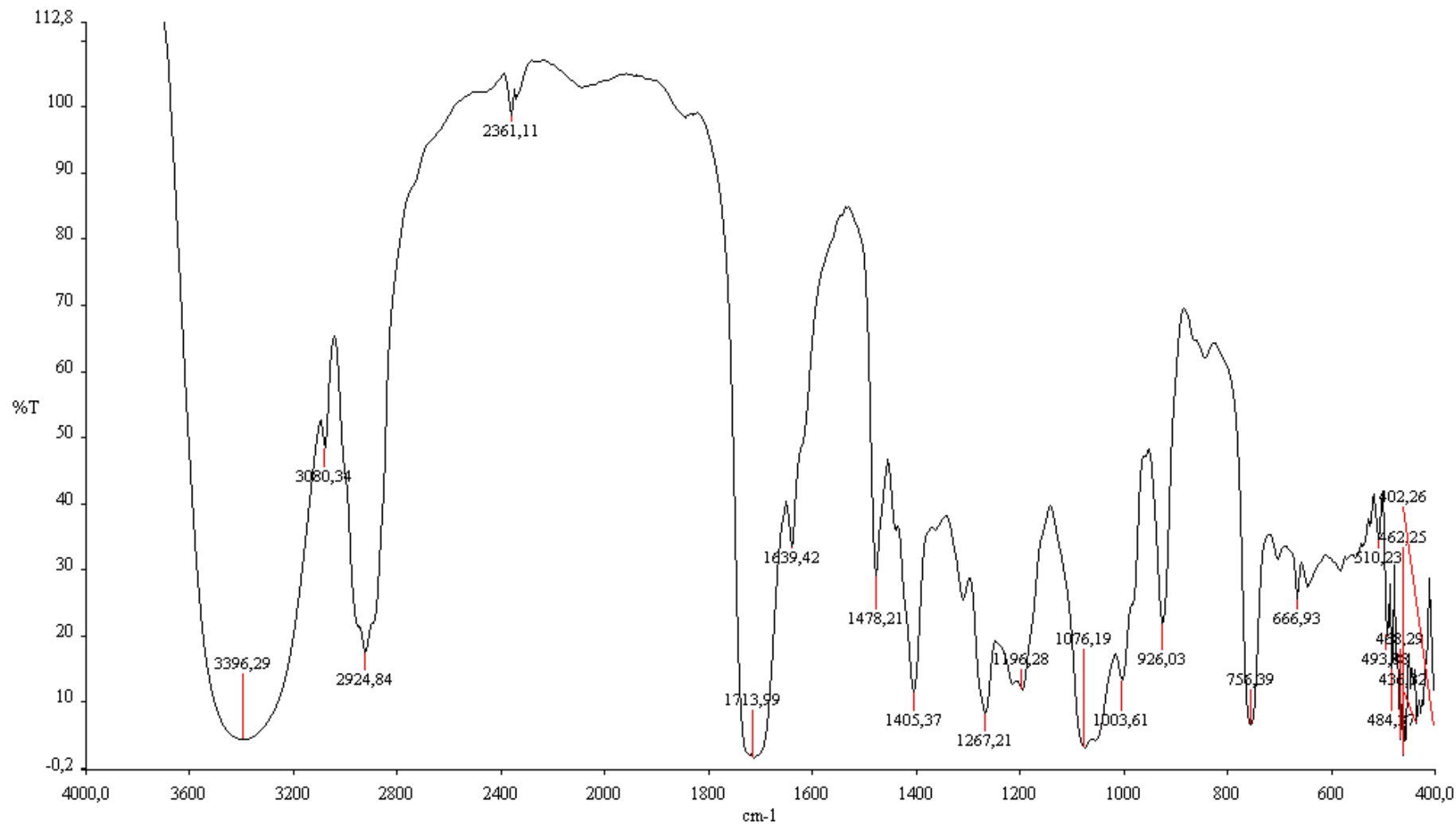


Anexo 6. Espectro de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2 (Djalonenol)

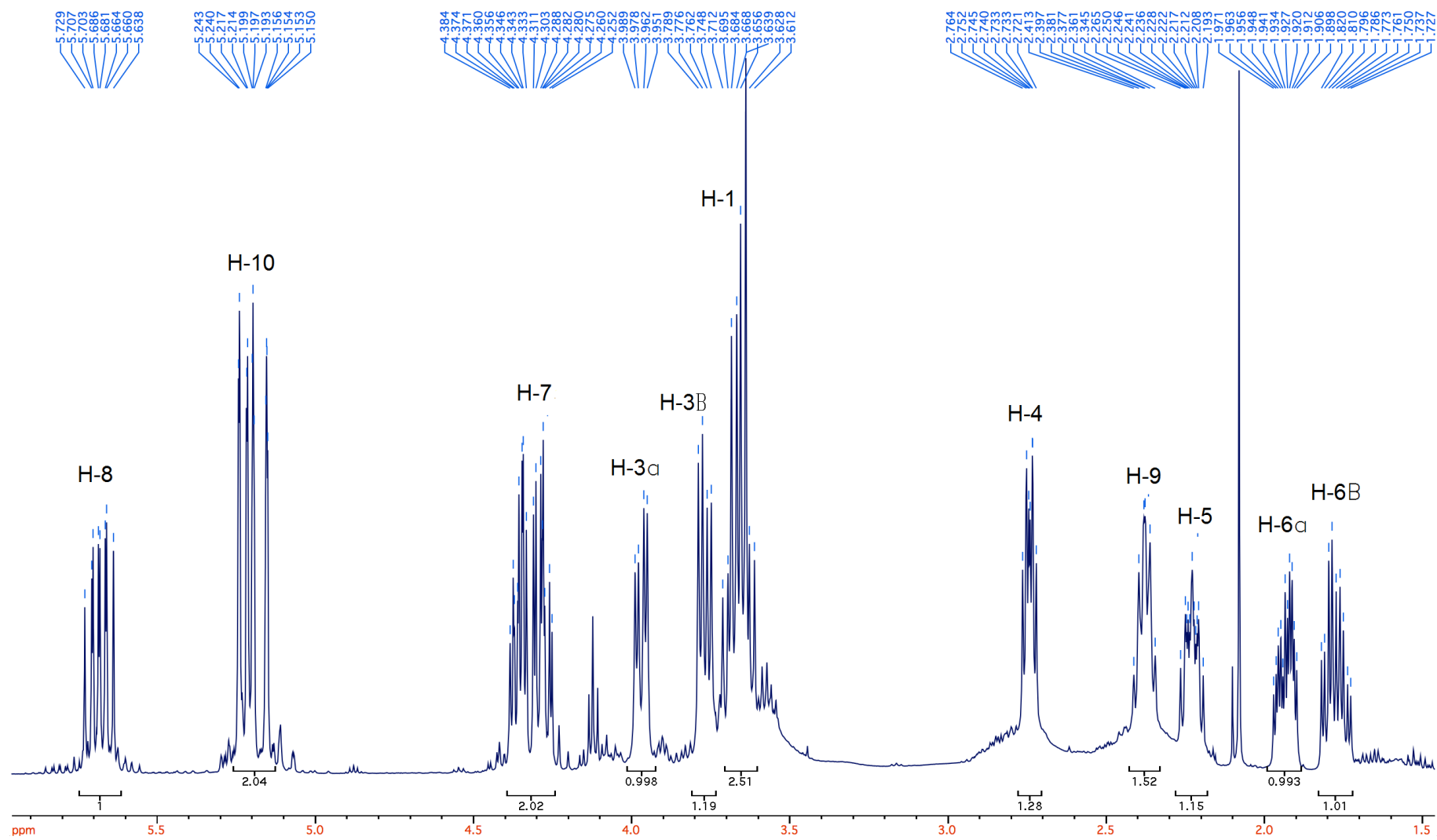




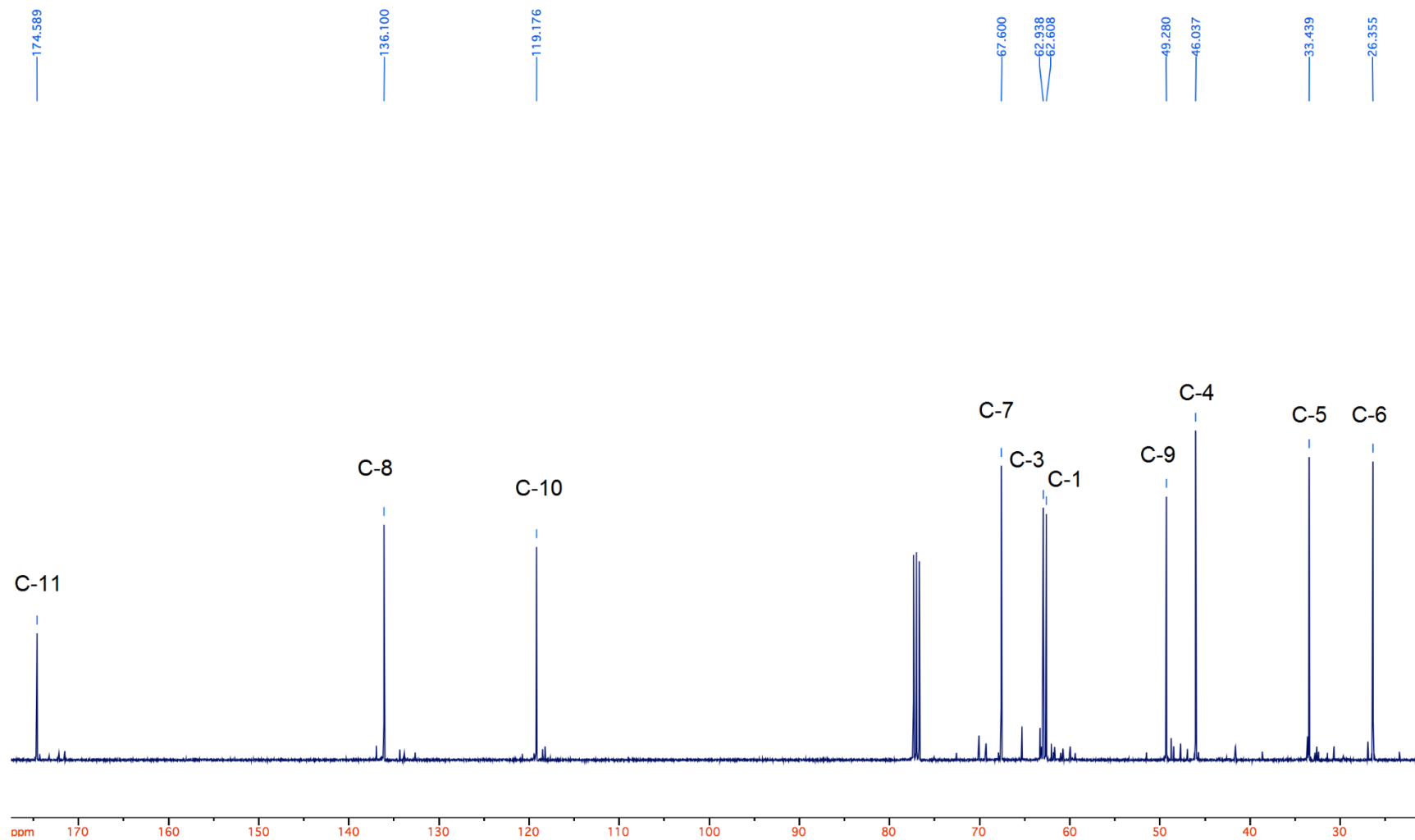
### Anexo 7. IR del compuesto 2 (Djalonenol)



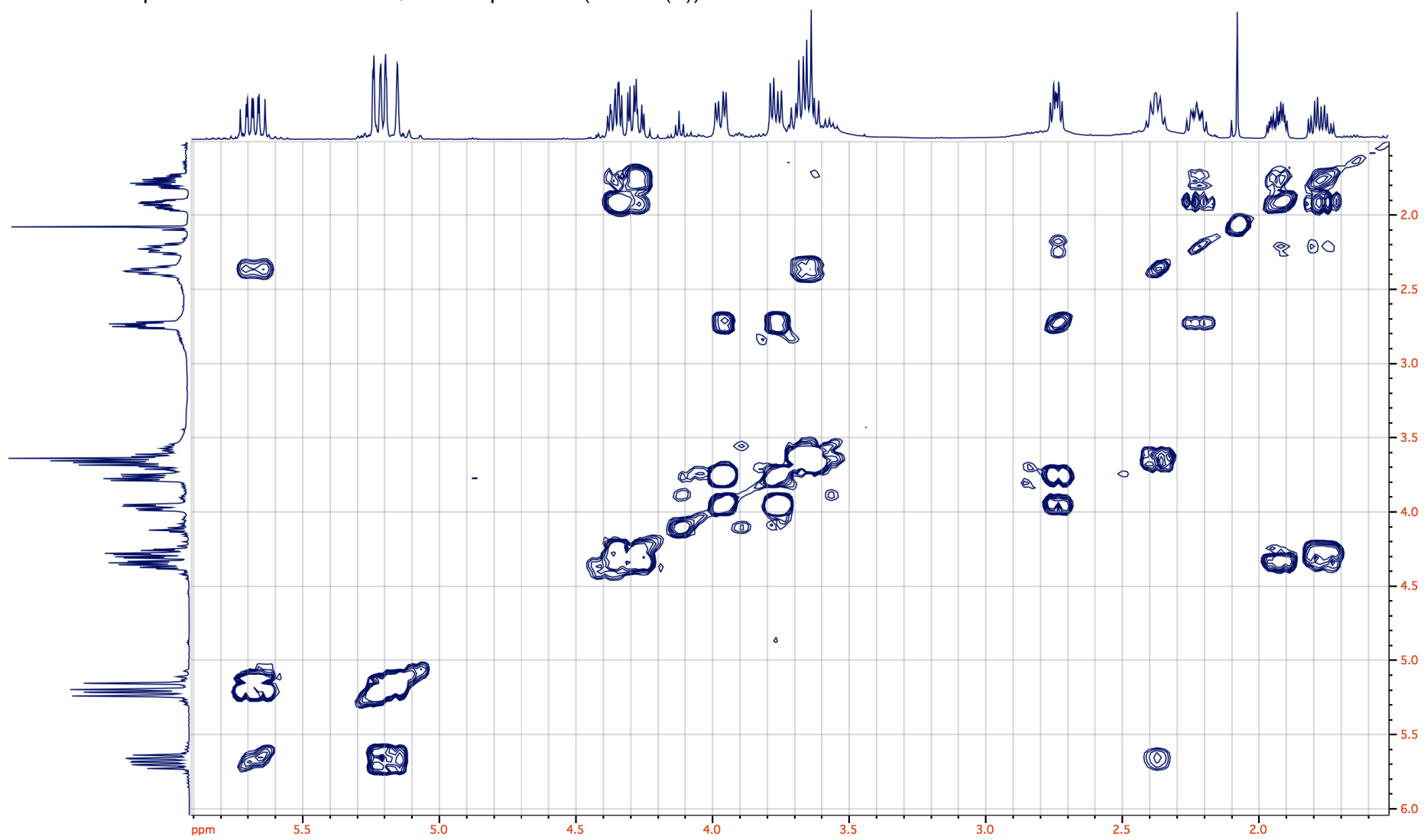
Anexo 8. Espectro de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 3 (MH-10(P))



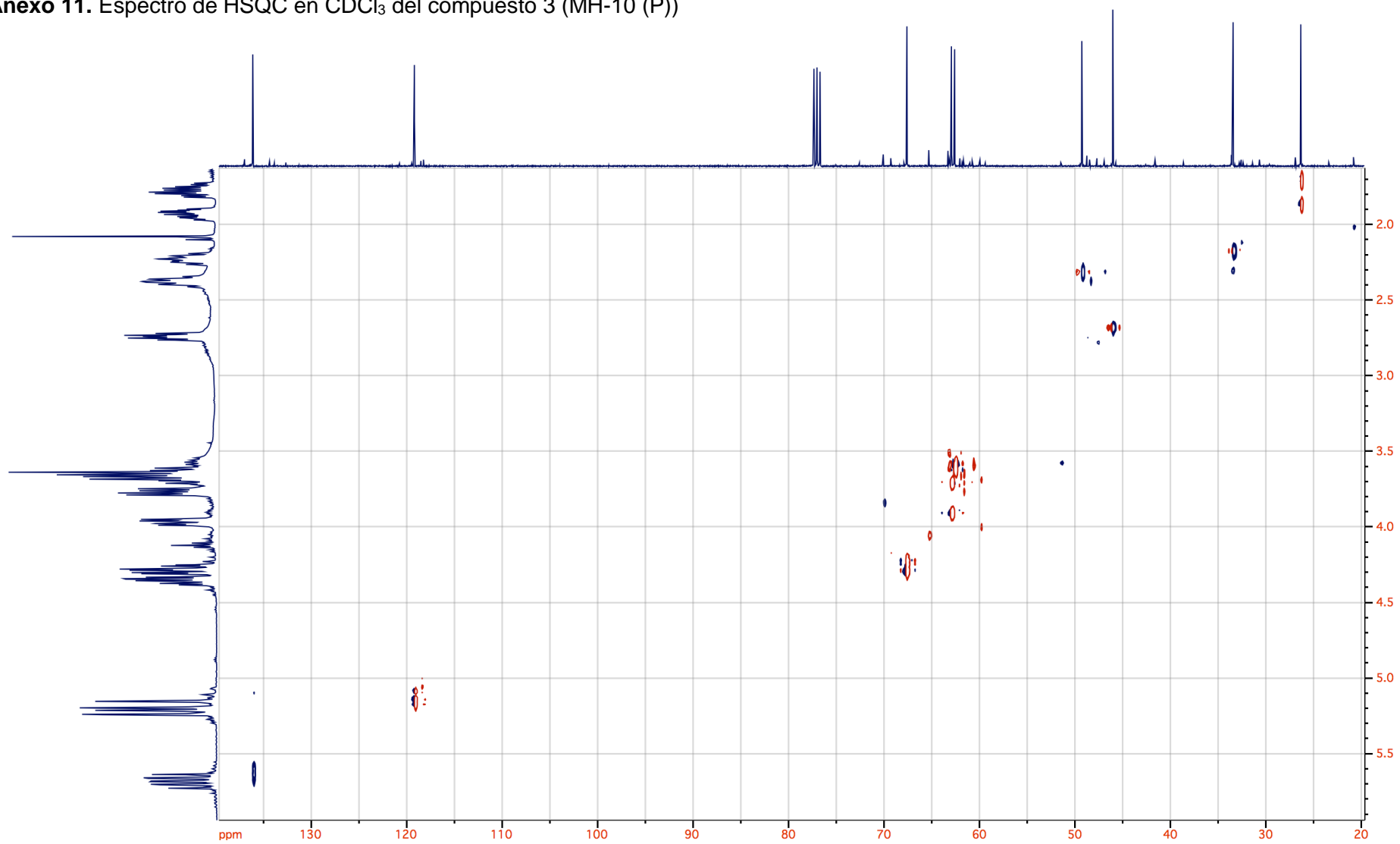
Anexo 9. Espectro de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 3 (MH-10 (P))



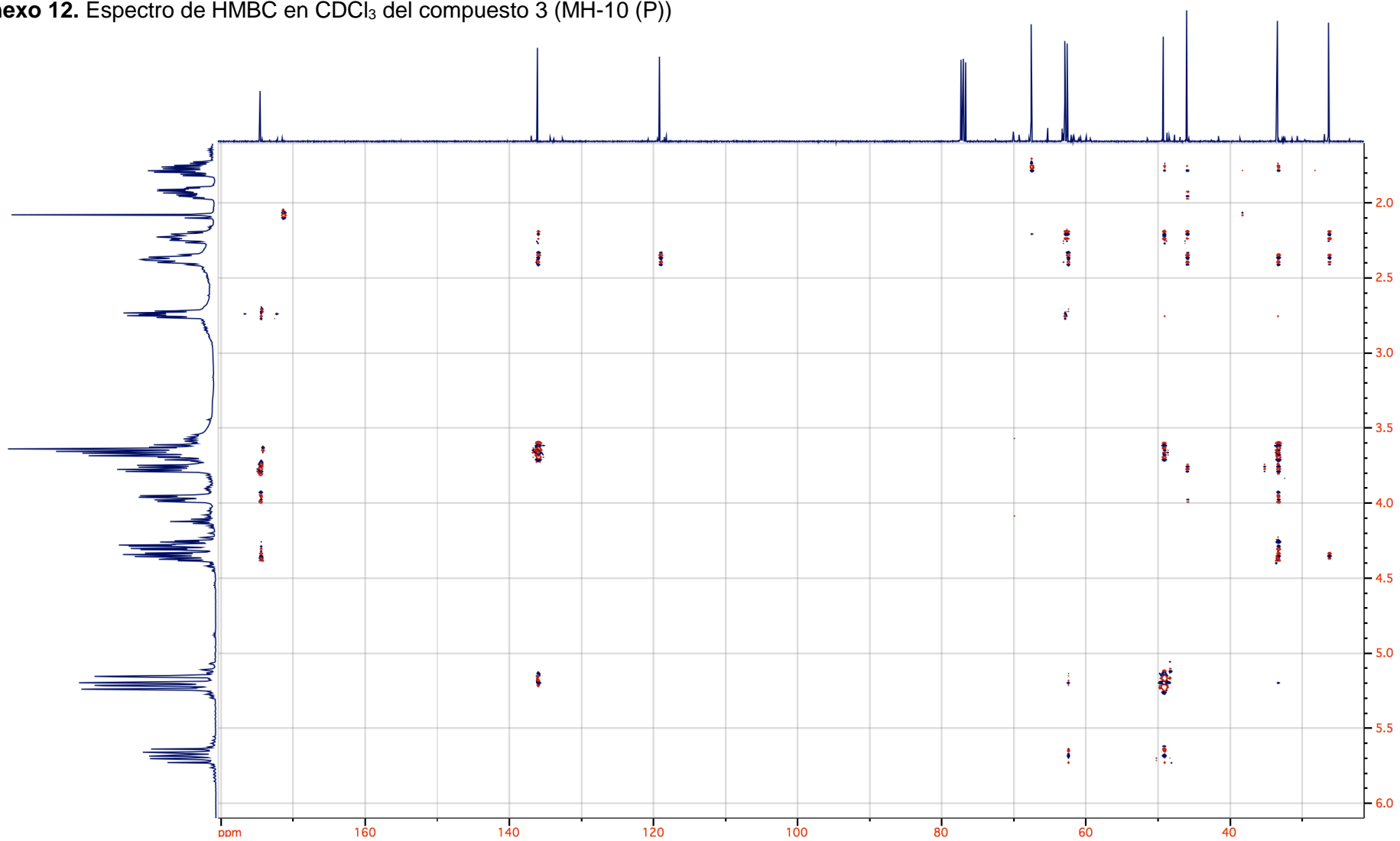
Anexo 10. Espectro de COSY en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 3 (MH-10 (P))



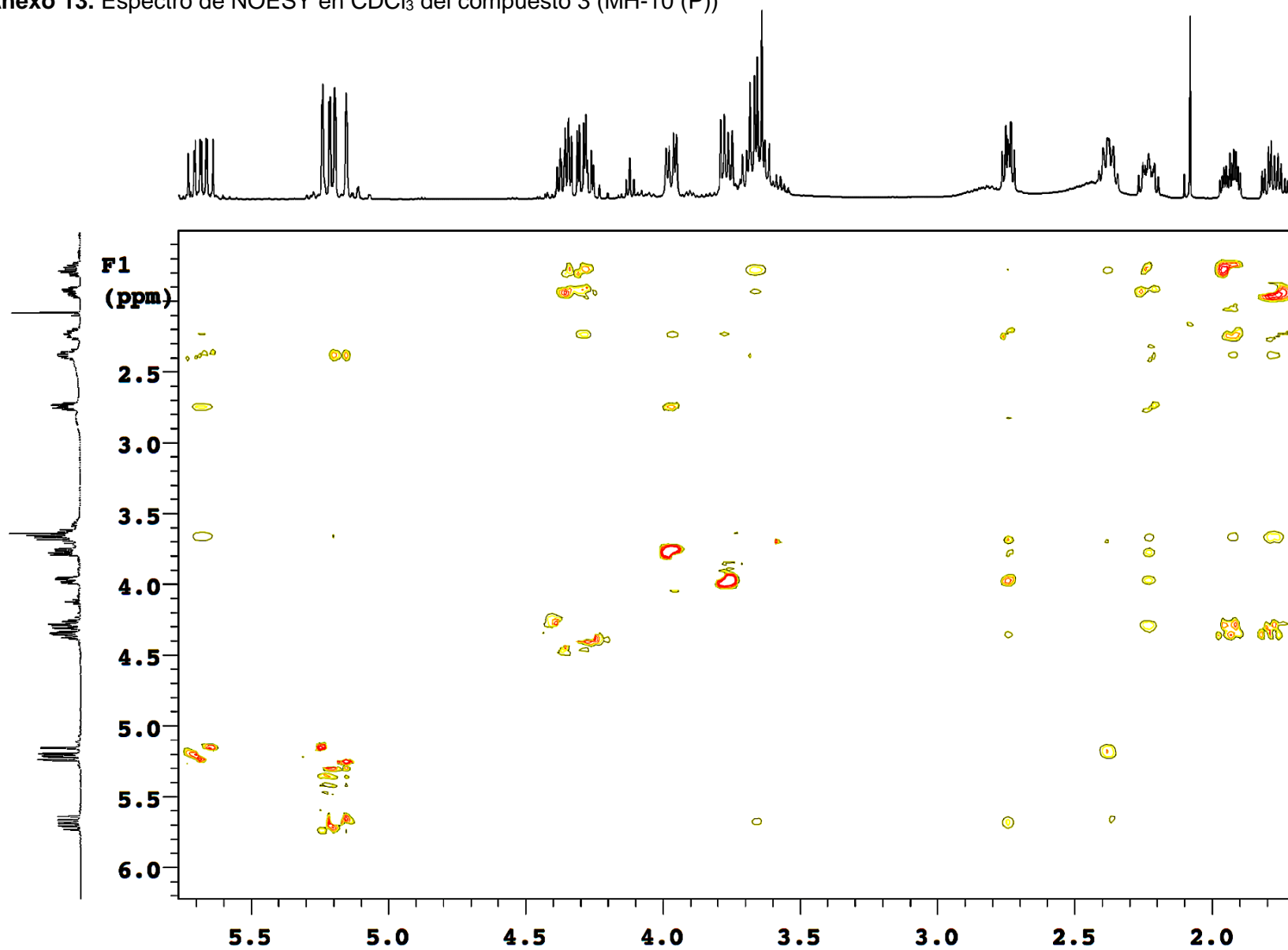
Anexo 11. Espectro de HSQC en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 3 (MH-10 (P))



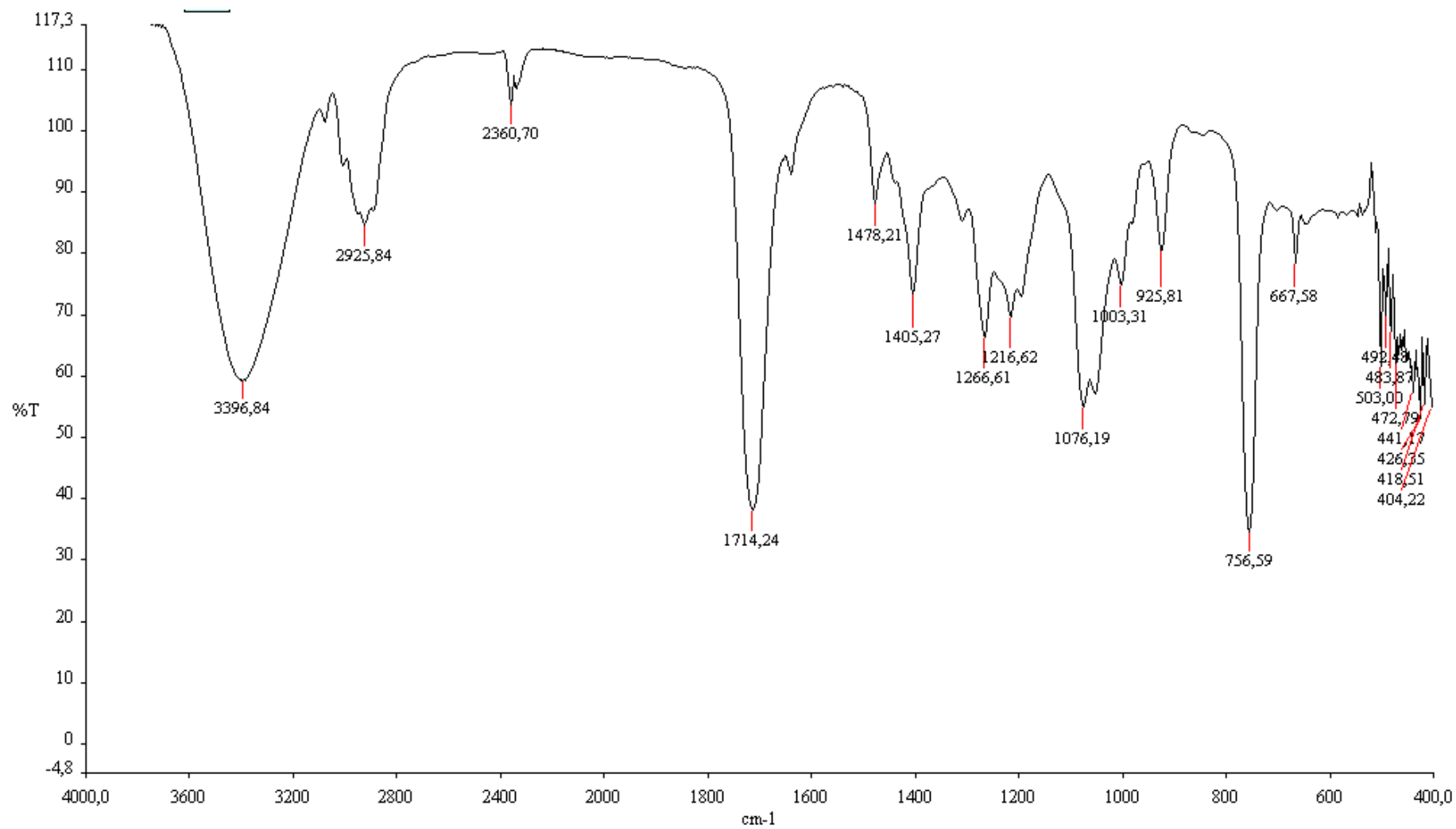
Anexo 12. Espectro de HMBC en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 3 (MH-10 (P))



Anexo 13. Espectro de NOESY en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 3 (MH-10 (P))

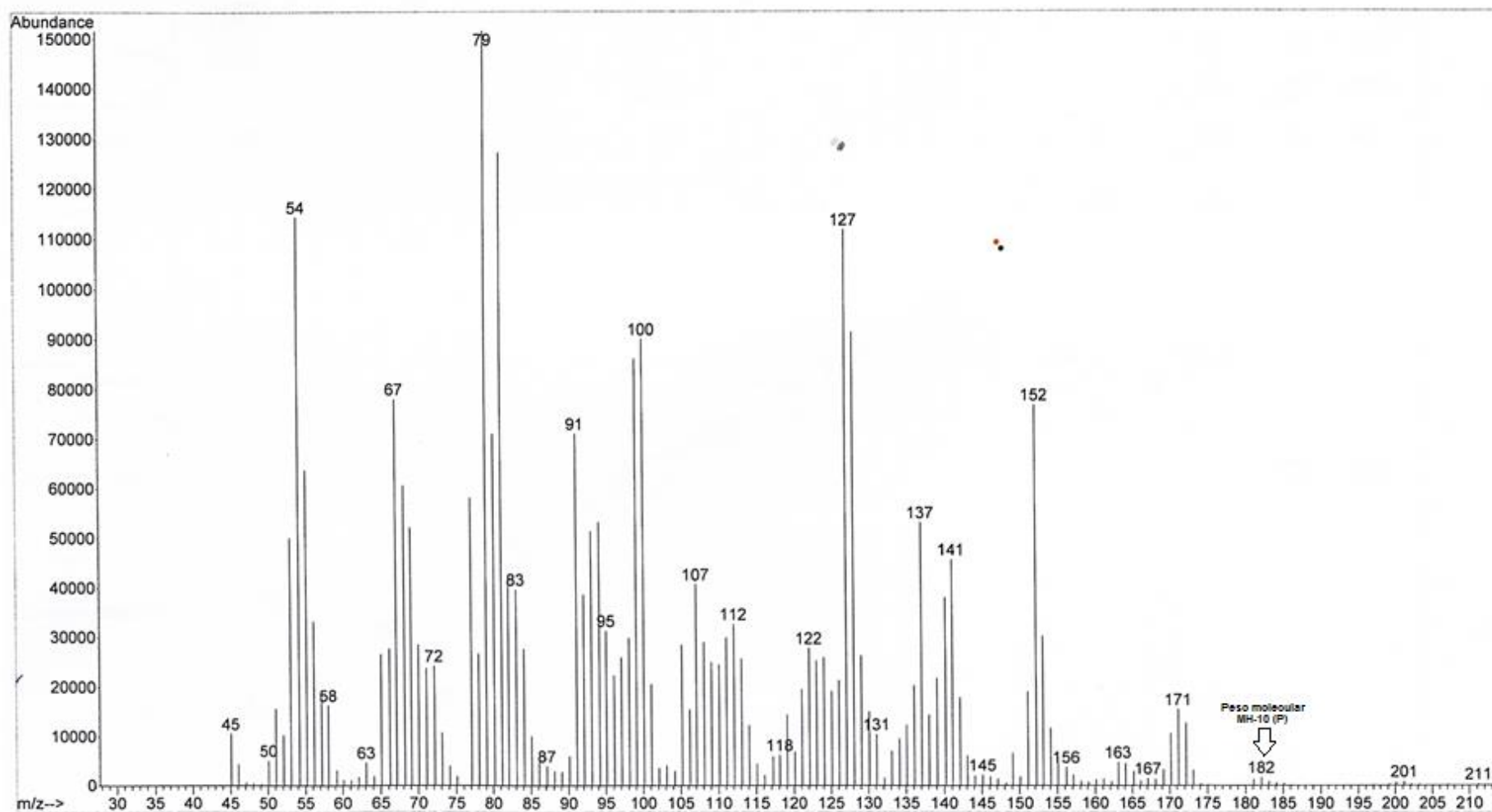


Anexo 14. IR del compuesto 3 (MH-10 (P))

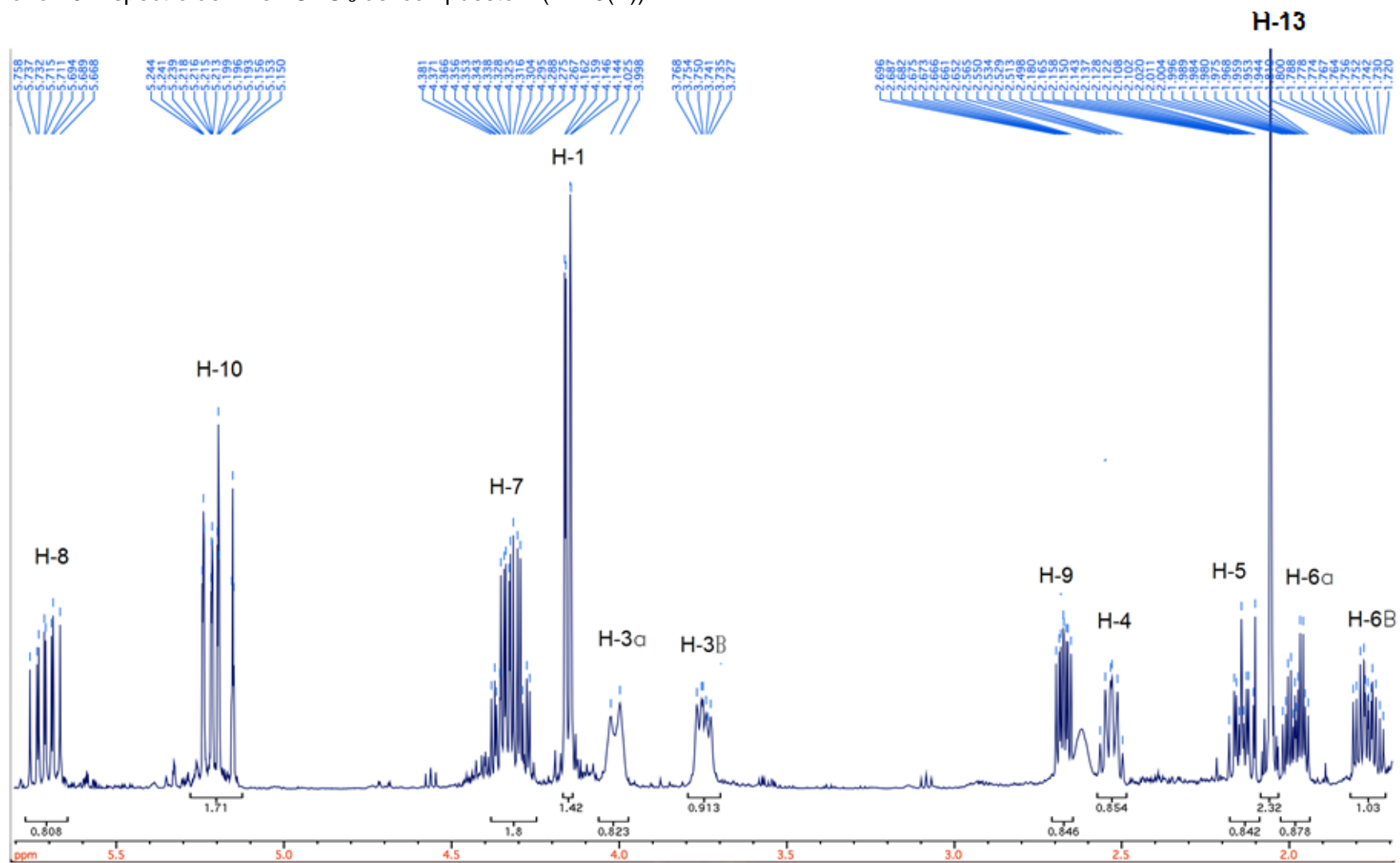




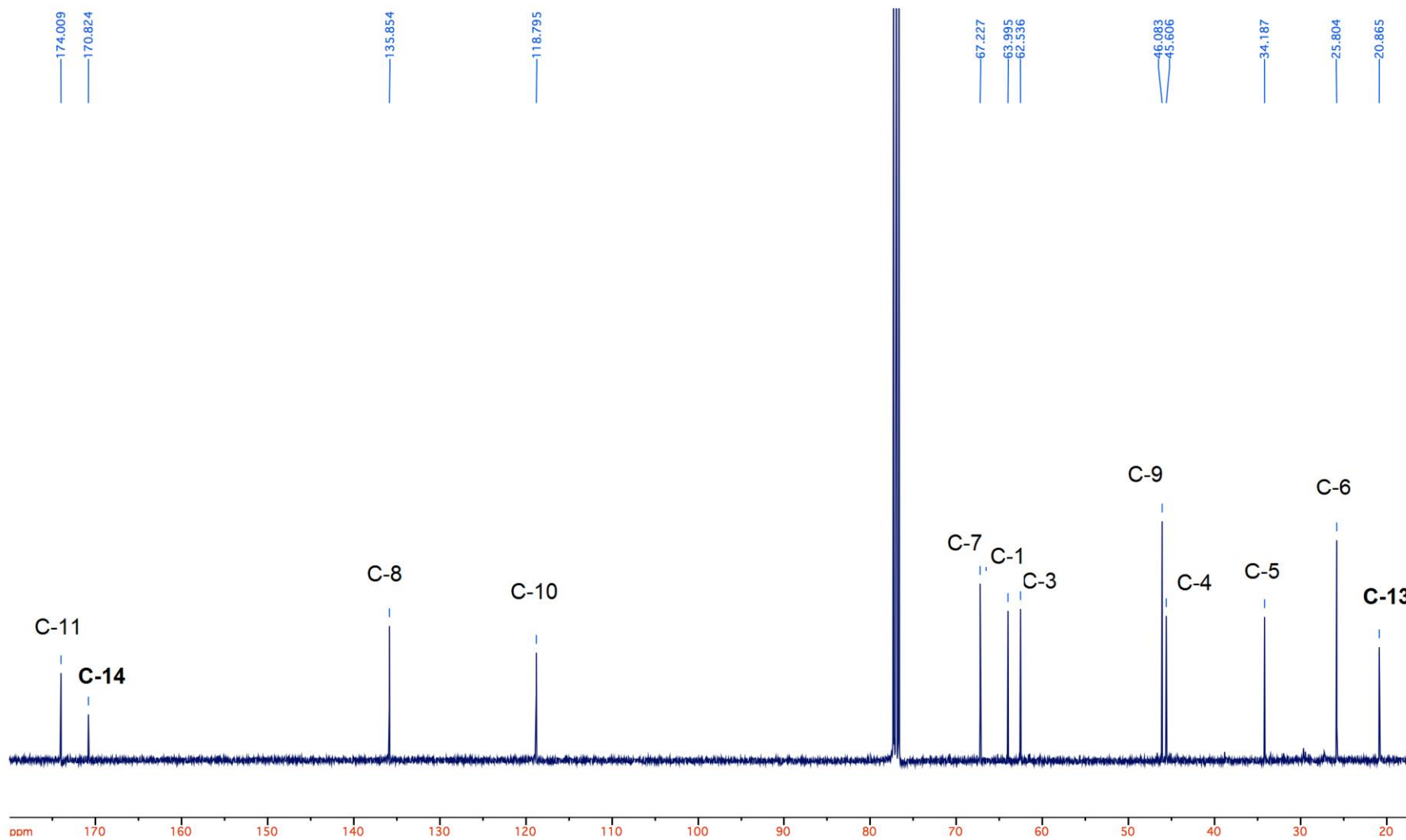
Anexo 15. Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas del compuesto 3 (MH-10 (P))



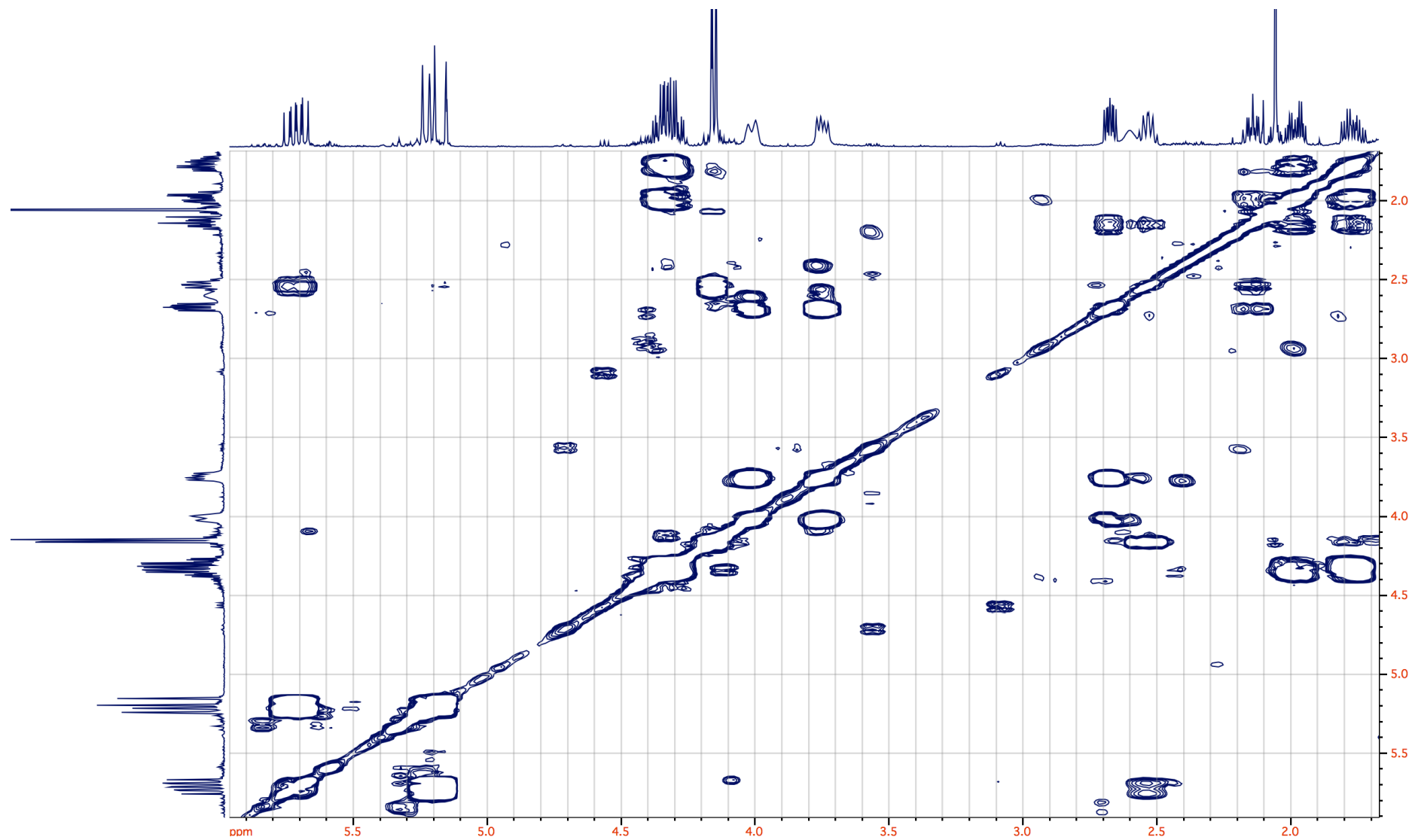
Anexo 16. Espectro de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 4 (MH-3(P))



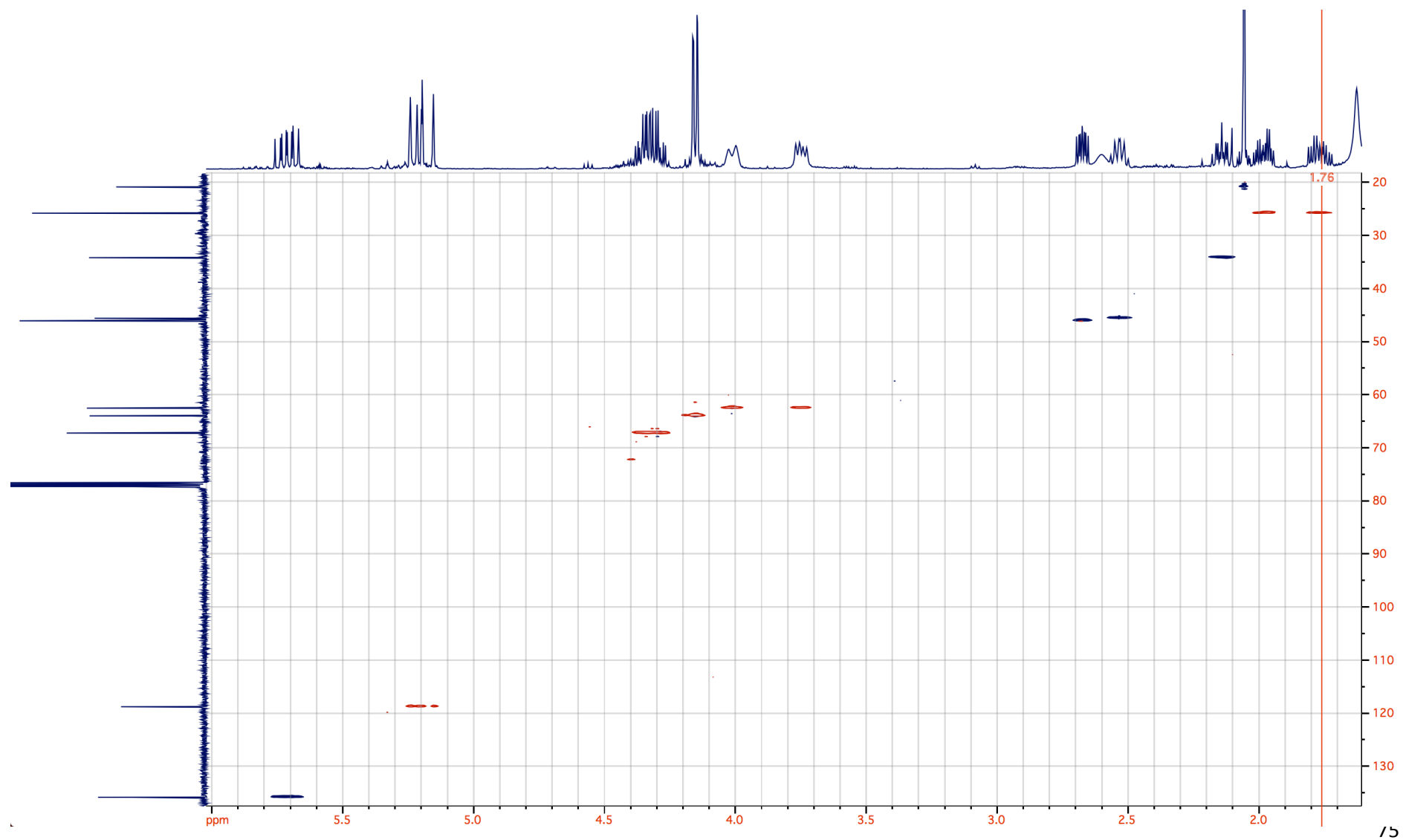
Anexo 17. Espectro de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 4 (MH-3 (P))



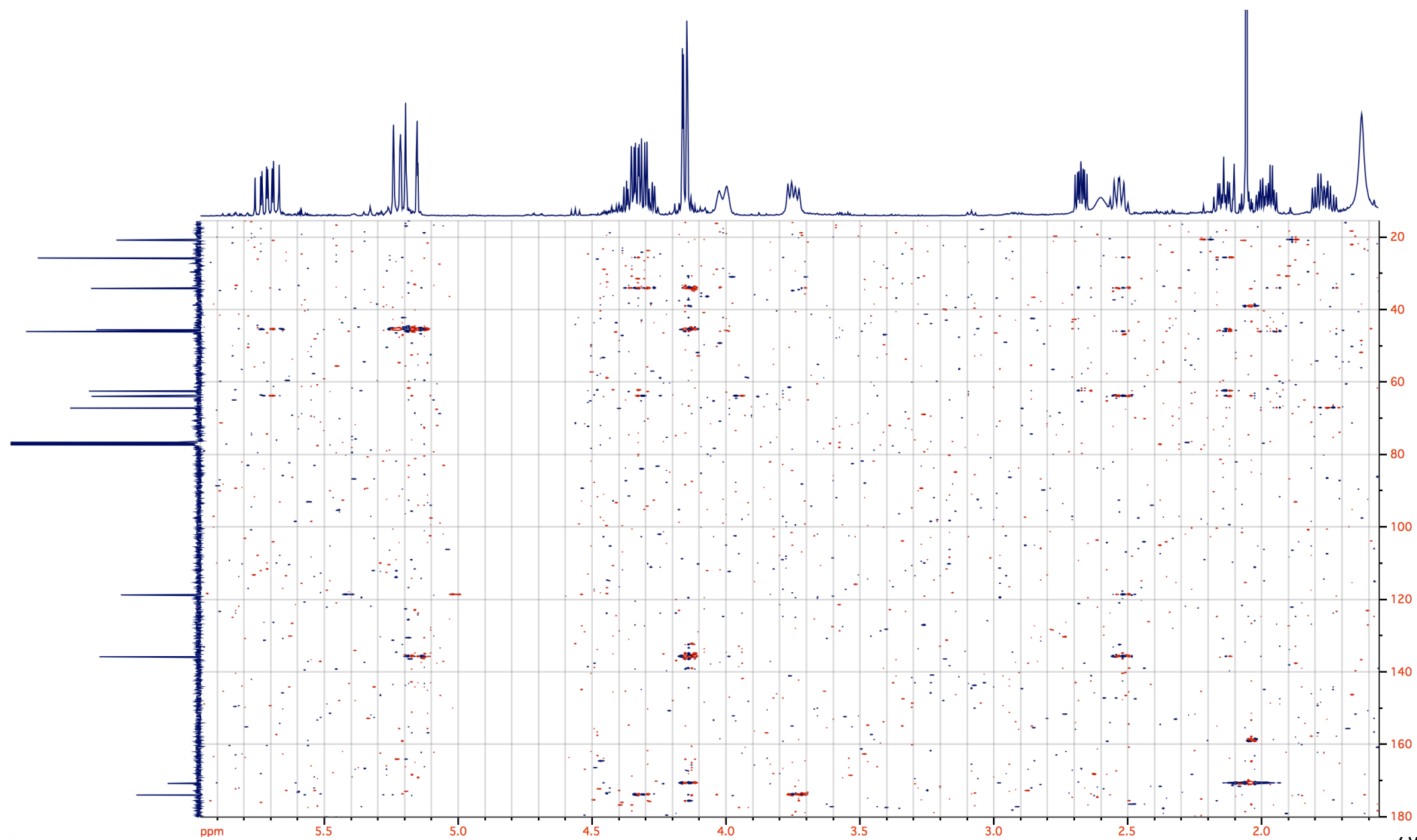
Anexo 18. Espectro de COSY en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 4 (MH-3 (P))



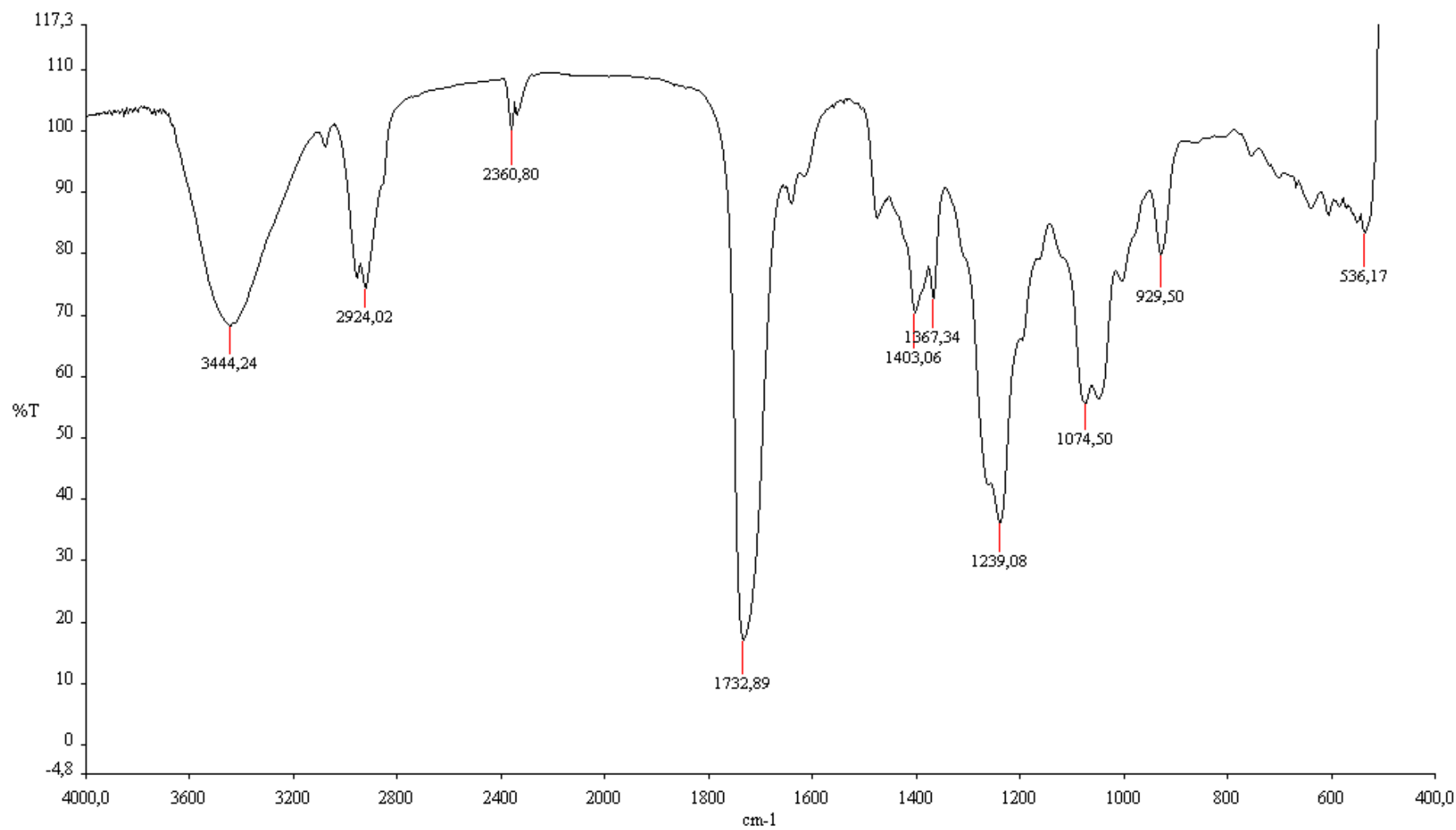
Anexo 19. Espectro de HSQC en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 4 (MH-3 (P))



Anexo 20. Espectro de HMBC en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 4 (MH-3 (P))



**Anexo 21. IR del compuesto 4 (MH-3 (P))**



**Anexo 22.** Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas del compuesto 4 (MH-3 (P))

