



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

**Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de
Erythrina ulei con posible actividad antiparasitaria**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Galarza Urgilés, Karla Ivannova.

DIRECTOR: Romero Benavides, Juan Carlos, Dr.

LOJA – ECUADOR

2016



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

2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Juan Carlos Romero Benavides

DOCENTE DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de *Erythrina ulei* con posible actividad antiparasitaria” realizado por Karla Ivannova Galarza Urgilés, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre del 2016

Ph.D. Juan Carlos Romero Benavides

C.I: 1103018477

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.

Yo, Karla Ivannova Galarza Urgilés, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de *Erythrina ulei* con posible actividad antiparasitaria.”, de la titulación de Ingeniería Química, siendo el Ph.D. Juan Carlos Romero Benavides, director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

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

Karla Ivannova Galarza Urgilés

C.I. 1104272479

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico de manera especial a mis padres Marco y Elsa, quienes con su sacrificio y amor lograron apoyarme en el transcurso de todos estos años, a quienes les debo la fortuna y la dicha de cumplir una meta más en mi vida. Dedicarles este trabajo significa retribuir cada uno de sus esfuerzos, demostrarles que toda la confianza que depositaron en mí ha sido felizmente recompensada. Ustedes más que nadie merecen la felicidad de compartir este logro.

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente a Dios quien ha permitido que pueda culminar esta etapa, quien cada día me ha brindado la fortaleza necesaria para persistir día a día y poder cumplir este sueño, el ser que me ha brindado las herramientas, las oportunidades y ante todo la sabiduría, sin su presencia en mi vida esto no habría sido posible.

A mis padres quienes son las personas más especiales e importantes de mi vida, gracias por todo su esfuerzo, gracias por cada consejo, gracias por cada uno de los sacrificios que han realizado para que yo puedo cumplir uno de mis tantos sueños, sin su apoyo incondicional, sin su paciencia, sin su ánimo y ante todo sin su amor este logro no representaría lo mismo. Hoy puedo decirles que juntos hemos cumplido este sueño. Desde el fondo de mi corazón les agradezco ser el más grande apoyo que he tenido.

Al Dr. Juan Carlos Romero Benavides por su orientación para el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación.

A Ronald, quien con su conocimiento, y su paciencia supo apoyarme y guiarme en mis días de laboratorio. Gracias porque sin tu ayuda y sin tu dirección no lo habría logrado, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme en lo que fuera necesario.

A Geanela por haberme ayudado tanto dentro como fuera del laboratorio. Por ser un gran apoyo para mí.

Este trabajo de fin de titulación se desarrolló gracias al financiamiento otorgado por la SENECYT (Código PIC-13-INSPI-005); y por la UTPL Código (PROY_FIN_QUI_0008).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y FÓRMULAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1	5
1. Fin, propósito y componentes del proyecto	6
CAPÍTULO 2	7
2. Aspectos generales	8
2.1. Biodiversidad en el Ecuador	8
2.2. Medicina tradicional y uso de plantas medicinales	8
2.3. Metabolitos secundarios	9
2.4. Descripción del género <i>Erythrina</i>	10
2.5. Descripción de la especie <i>Erythrina ulei</i>	13
2.6. Algunas técnicas de aislamiento, identificación y caracterización de metabolitos secundarios	14
2.6.1. Cromatografía	14
2.6.2. Cromatografía en columna	14
2.6.3. Cromatografía en capa fina	14
2.6.4. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas	14
2.6.5. Resonancia nuclear magnética	15
2.6.6. Cristalización	15
2.6.7. Punto de fusión	15

CAPÍTULO 3	16
3. Materiales y métodos	17
3.1. Selección y recolección de la materia vegetal	17
3.2. Obtención de extractos	18
3.3. Fraccionamiento de extractos	19
3.3.1. Montaje de columna	19
3.3.2. Cromatografía en capa fina	19
3.3.3. Unión y purificación	19
3.3.4. Microcolumna	19
3.4. Extracción de alcaloides	19
3.5. Caracterización de metabolitos secundarios	20
3.5.1. Punto de fusión	20
3.5.2. Factor de retención	20
3.5.3. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas	20
3.5.4. Espectroscopía de Resonancia Nuclear Magnética	21
CAPÍTULO 4	22
4. Resultados y análisis	23
4.1. Rendimiento de los extractos obtenidos	23
4.2. Aislamiento de metabolitos secundarios	24
4.2.1. Extracto de acetato de etilo – flores	24
4.2.2. Extracto de acetato de etilo – hojas	24
4.2.3. Extracto metanol – hojas	26
4.2.3.1. Extracción de alcaloides	26
4.2.3.2. Fracción alcaloidea pH 7	27
4.2.3.2.1. Columna de la fracción alcaloidea pH 7	27
4.2.3.3. Fracción alcaloidea pH 11	28
4.2.3.3.1. Columna de la fracción alcaloidea pH 11	28
4.3. Caracterización e identificación de metabolitos secundarios	30
4.3.1. Extracto de acetato de etilo - flores	30
4.3.1.1. Fracción AcOEtFF4	30
4.3.1.2. Fracción AcOEtFF13	32

4.3.2. Extracto de acetato de etilo - hojas	33
4.3.2.1. Fracción AcOEtHFM18-11	33
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de *Erythrina ulei*

Tabla 2. Condiciones de operación del equipo CG/EM

Tabla 3. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de *E. ulei*

Tabla 4. Unión de las fracciones de acetato de etilo de flores

Tabla 5. Unión de las fracciones del extracto de acetato de etilo de hojas

Tabla 6. Unión y peso de las fracciones de la microcolumna de la fracción AcOEtHF18

Tabla 7. Unión de las fracciones de la columna de la fracción alcaloidea pH 7

Tabla 8. Unión de las fracciones de la columna de la fracción alcaloides pH 11

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C (CDCl_3) del compuesto fitol acetato (12)

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (CDCl_3) del compuesto fitol acetato (12)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metodología experimental.

Figura 2. Mapa de recolección de la especie *Erythrina ulei*.

Figura 3. Placas cromatográficas de extractos de *Erythrina ulei* (a) Extracto de hexano (b) Extracto de acetato de etilo (c) Extracto de metanol.

Figura 4. Fracciones alcaloideas pH 7 y pH 11.

Figura 5. CCF de las fracciones alcaloideas en pH 7

Figura 6. CCF de las fracciones alcaloideas 1, 5, 12 y 18 en pH 11.

Figura 7. CCF de las fracciones alcaloideas 5, 12 y 18 en pH 11.

Figura 8. Estructuras de los compuestos pertenecientes a la mezcla 1: Tricosano (1), Tetracosano (2), Pentacosano (3), Hexacosano (4), Heptacosano (5), Octacosano (6), Nonacosano (7), Eicosano (8)

Figura 9. Estructuras de los compuestos pertenecientes a la mezcla 2. Bikaverin (9), Estigmastan 3,5,22 trien (10), Estigmastan 3,5 dien (11).

Figura 10. Estructura del compuesto identificado como fitol acetato (12).

LISTA DE FÓRMULAS

Fórmula 1. Cálculo del rendimiento de los extractos

Fórmula 2. Cálculo del factor de retención

ABREVIATURAS

Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CCF	Cromatografía en capa fina
RMN	Resonancia nuclear magnética
RMN ¹ H	Resonancia nuclear magnética de protón
RMN ¹³ C	Resonancia nuclear magnética de carbono
CG/EM	Cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas
IR	Índice de retención
t _R	Tiempo de retención
R _f	Factor de retención
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La especie *Erythrina ulei* fue recolectada en la parroquia rural Cumbaratza, cantón Zamora, provincia de Zamora Chinchipe, Ecuador. Se obtuvieron extractos (hojas, tallos y flores por separado), utilizando como disolventes hexano, acetato de etilo y metanol. El extracto que presentó mayor rendimiento fue el de metanol flores con 10.94%. Los extractos en acetato de etilo de flores y hojas se analizaron mediante cromatografía en columna abierta mientras que del extracto en metanol hojas se realizó el procedimiento de extracción de alcaloides. Del extracto en acetato de etilo flores se obtuvieron dos mezclas; mezcla 1:tricosano, tetracosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano, nonacosano, eicosano; y la mezcla dos probablemente podrían ser: bikaverin, estigmastan 3,5 dien, estigmastan 3,5, 22 trien. Del extracto en acetato de etilo de hojas se identificó el compuesto fitol acetato. Del extracto en metanol de hojas se obtuvo 236 y 226 mg de la mezcla de alcaloides en pH-7 y pH-11 respectivamente. Para la identificación de los compuestos se utilizó cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas, RMN de ^1H y ^{13}C , índice de retención, punto de fusión, factor de retención.

Palabras clave: *Erythrina ulei*, Fabaceae, hidrocarburos, fitol acetato.

ABSTRACT

Erythrina ulei species were collected from the rural parish of Cumbaratza, Zamora Chinchipe province, Ecuador. Nine extracts were obtained using various solvents as hexane, ethyl acetate and methanol. For the flowers, methanol extract had the highest extract efficiency with 10.94%. The flower and leaf ethyl acetate extracts were analyzed by open column chromatography. A further alkaloid extraction procedure was performed on the leaf methanol extract. From the ethyl acetate flower extract we obtained two distinct mixtures; mixture 1: tricosane, tetracosane, pentacosane, hexacosane, heptacosane, octacosane, nonacosane, eicosane; mixture 2 could probably be: bikaverin, stigmastan 3,5,22 trien and stigmastan 3, 5 dien. The phytol acetate compound of the leaf ethyl acetate extract was identified. From the leaf methanol extract we obtained 236 and 226 mg of alkaloids extract at pH7 and pH 11 respectively. For compound identification we used gas chromatography coupled to mass spectroscopy (GC/MS), ^1H and ^{13}C RMN, retention index, melting point and retention factor.

Key words: *Erythrina ulei*, Fabaceae, hydrocarbons, phytol acetate.

INTRODUCCIÓN

Se considera al Ecuador como uno de los países más ricos en diversidad de ecosistemas y especies en todo el mundo, presenta una amplia gama de plantas medicinales tanto nativas como introducidas. (Barrera, 2002).

Debido a la posición geográfica en la que se encuentra y a que cuenta con la cordillera de los Andes existe una gran cantidad de bosques y microclimas que varían desde los húmedos de la Amazonia y noroccidente hasta los ecosistemas secos del sur (Vallejo et al., 2007).

Desde hace miles de años se han utilizado las plantas medicinales con fines curativos. Durante un largo tiempo estas fueron el único medio terapéutico disponible. Lo cual hizo que el conocimiento de especies vegetales se profundizara así como también se ampliara la experiencia en el uso de los productos que se extraen a partir de ellas. (Pino-Rodríguez, et al., 2003)

Reportan más de 850 compuestos con actividad contra al menos una ETD (Enfermedad tropical desatendida) que han sido aislados de productos naturales como antiprotozoarios. Así como también la actividad de algunos alcaloides, que representan alrededor del 20% del total de compuestos con efecto antiparasitario. (Yaluff, et al., 2015)

En relación a la cantidad de especies e información etnomedicinal existente en Ecuador, existen pocos estudios acerca de la actividad antiparasitaria de especies nativas (Cerón, 2006). En base a esta información y reportes del uso tradicional de especies vegetales para el presente proyecto de investigación se decidió utilizar: *Erythrina ulei*.

El género *Erythrina* pertenece a la familia *Fabaceae* (*Leguminosae*) y presenta una gran diversidad ecológica así como también una amplia variación morfológica. Han sido descritas alrededor de 115 especies en el planeta distribuidas en Sudamérica, Centroamérica, Las Antillas y África Occidental (Pino-Rodríguez, et al., 2003).

La medicina tradicional, a las plantas pertenecientes a la Familia *Fabaceae*, le atribuye propiedades antisépticas para el tratamiento de heridas, como astringente y cicatrizante. Son usadas en combinación con otras plantas para el tratamiento de leishmaniasis y llagas. Algunos de sus componentes químicos, encontrados en las hojas, son de tipo triterpeno, flavonoide y alcaloide. (Yaluff, et al., 2015)

Hasta la fecha no existen reportes de metabolitos secundarios con actividad antiparasitaria aislados a partir de *Erythrina ulei*, pero debido a la actividad que presentan otras especies como *Erythrina crista-galli*, *E. dominguezzy* y *E. falcata*, pertenecientes al mismo género, se la consideró para el presente estudio.

Este proyecto de fin de carrera es parte del Programa Nacional para el Abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendidas en el Ecuador (PROPAD) perteneciente al Instituto Nacional de investigación en Salud Pública (INSPI), que cuenta con el financiamiento de la SENESCYT, y se está desarrollando en colaboración entre el INSPI, la Universidad Central del Ecuador (UCE) y la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), dentro del proyecto 5: Resistencia antiparasitaria y perspectiva del uso de extractos de plantas nativas en ensayos preclínicos, pretendemos la obtención, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios con posible actividad antiparasitaria de la especie vegetal *Erythrina ulei* y posteriormente en una segunda fase se realizará en el INSPI la evaluación de la actividad antiparasitaria tanto de extractos como de los metabolitos secundarios aislados en mayor proporción.

CAPÍTULO I

1. Fin, propósito y componentes del proyecto.

1.1. Fin del proyecto.

Contribuir con el estudio de metabolitos secundarios en la especie *Erythrina ulei*.

1.2. Propósito del proyecto.

Aislar e identificar metabolitos secundarios a partir de la especie vegetal *Erythrina ulei*.

1.3. Componentes del proyecto.

- Recolectar las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de la especie vegetal *Erythrina ulei*.
- Obtener extractos con disolventes de polaridad ascendente: hexano, acetato de etilo y metanol.
- Aislar, caracterizar e identificar los compuestos obtenidos.

CAPÍTULO II ASPECTOS GENERALES

2. Aspectos generales.

2.1. Biodiversidad en el Ecuador.

Se considera al Ecuador como uno de los 17 países en donde está concentrada la mayor biodiversidad del planeta. Debido a la variedad de climas que presenta, se ha producido el nacimiento de miles de especies de flora y fauna (Quiroz, 2008).

Se encuentra ubicado en una zona tórrida y está atravesado por la línea ecuatorial, debido a esto Ecuador debería tener un clima cálido, pero, dada su topografía y diversidad de zonas climáticas, posee varias especies vegetales y animales. Como representación de su alta biodiversidad también se encuentran múltiples culturas y etnias humanas (Vallejo M. , 2010).

La riqueza biológica de nuestro país se ve reflejada en toda una gama de organismos. En un área que representa el 2% del total de la superficie terrestre contiene el 10% de todas las especies vasculares presentes en el mundo (Vallejo M. , 2010). Al ser inmensamente rica en plantas útiles, se ha reconocido constantemente la flora de este país (Balslev, et al., 2008).

2.2. Medicina tradicional y uso de plantas medicinales.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Medicina Tradicional, también conocida como medicina alternativa o complementaria, comprende una gran variedad de terapias y prácticas que varían de acuerdo a los países y regiones. Se la considera como la suma de conocimientos, habilidades y prácticas que se basan en teorías, creencias y experiencias. Es utilizada para la prevención, diagnóstico, mejoramiento y tratamiento de enfermedades físicas y mentales (OMS, 2002).

En las últimas décadas el reconocimiento del uso y valor de las plantas medicinales, a nivel mundial, ha ido incrementando. De acuerdo a la OMS las dos terceras partes de la población, acuden al uso de las mismas para cubrir sus necesidades primarias como también las que requieren asistencia médica. Debido a la persistencia y aumento de cierto tipo de enfermedades, así como el impedimento de la mayoría de la población para acceder a servicios de salud institucionalizados, ha crecido el interés de varios organismos por incentivar al uso de las plantas medicinales (Cruz, et al., 2010).

Aproximadamente el 80% de la población Ecuatoriana utiliza plantas o productos naturales para su salud y bienestar (Ansaloni et al., 2010).

En nuestro país, las plantas, para las comunidades campesinas e indígenas, son consideradas como un recurso fundamental. En el campo, la mayoría de las personas dependen de las mismas para resguardar sus necesidades de alimento, medicina y vivienda. Por otro lado en la ciudad su uso directo es mucho menor, las usan con mayor frecuencia personas que viven en zonas urbano-marginales y son de clase social baja. En los mercados de las ciudades de Ecuador el comercio de las plantas aún se mantiene, se venden alrededor de 273 especies de plantas medicinales, las cuales son utilizadas para tratar más de 70 dolencias (Ansaloni, et al., 2010).

Tomando en cuenta la enorme cantidad de conocimiento sobre el uso de plantas medicinales que las culturas andinas poseen, las especies que se utilizan y las prácticas medicinales podrían ser mayores y muchos más diversas de las que hasta ahora se han reportado (Ansaloni, et al., 2010).

2.3. Metabolitos secundarios.

Se considera al metabolismo como el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples. Además de poseer un metabolismo primario, las plantas, poseen un metabolismo secundario el cual es utilizado para la producción y acumulación de compuestos químicos naturalmente diversos. Estos metabolitos secundarios se distribuyen entre grupos taxonómicos, se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como: medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Los metabolitos secundarios no presentan una función específica y no todos se encuentran en todos los grupos de plantas, algunos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal. Se sintetizan en cantidades pequeñas y algunos se encuentran solo en un determinado grupo de plantas, o una familia o incluso a alguna especie (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Prácticamente todas las sustancias provenientes de las plantas que no han sido utilizadas para fines alimenticios son productos provenientes del metabolismo secundario. La mayoría de estos metabolitos tienen algún tipo de actividad que puede ser antibacteriana, antioxidante, anticancerígena, entre otras. Debido a esto existe una amplia cantidad de programas de búsqueda de compuestos naturales que tengan una particular actividad biológica (Almaraz, et al., 2001).

2.4. Descripción del género *Erythrina*.

El origen del nombre *Erythrina* proviene de la palabra griega “erythros”, que significa rojo, debido a las flores rojas brillantes de los árboles de este género. Los árboles se conocen como “árbol de coral” (Araujo-Junior, et al., 2012). Se han dado varios usos a este género como: postes para cercos, sombras para cultivos de café y cacao, cultivo intercalado, forraje para el ganado y semillas comestibles. Presenta algunas características comunes como: rápido crecimiento, alta producción de biomasa, fácil propagación por medios vegetativos (Gómez, 2012).

Varias especies del género *Erythrina* son utilizadas para el tratamiento de alrededor de 60 trastornos. Las principales propiedades que se le asignan a estas especies vegetales son: alivio de dolores (7%); tratamiento de infecciones urinarias, respiratorias, infecciones de los ojos, piel y garganta (7%), para la fiebre (6%), cura de heridas (5%), para el tratamiento de trastornos menstruales (5%), procesos inflamatorios (4%), entre otras. Existe un reporte acerca de la utilización de algunas de estas especies como alimento y veneno para animales (3% del total de reportes). De 393 reportes de alcaloides, 358 son del tipo isoquinolínico, lo que revela que este tipo de alcaloide es predominante y característico del género *Erythrina* (Pino-Rodríguez et al., 2003).

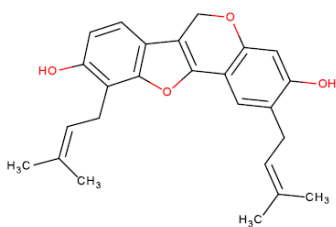
A partir de extractos de corteza y hojas de *Erythrina crista-galli*, *Erythrina dominguezzy* y *Erythrina falcata* se ha evaluado la actividad antiparasitaria in vitro sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* y promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. infantum* y *L. braziliensis* (Yaluff, et al., 2015).

Los alcaloides de la especie *Erythrina* poseen muchas actividades fisiológicas como: antifúngico, ansiolítico, sedante y bloqueadores neuromusculares (Trujillo-Trujillo, et al., 2007). Posee también características citotóxicas, antioxidantes, antibacteriales, antisépticas, fungicidas (Quattrochi, 2010), molusquicidas (pesticidas utilizados para controlar los moluscos) (Dawidar, et al., 2015), y es utilizado el jugo del interior de la corteza para tratar heridas (Quattrochi, 2010).

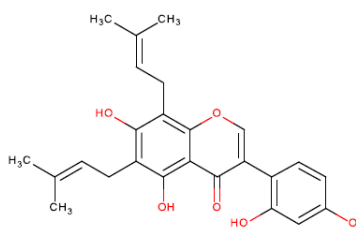
Para el tratamiento de enfermedades tropicales desatendidas como tripanosomiasis americana y leishmaniosis se reporta la actividad de los alcaloides, los cuales comprenden el 20% del total de compuestos con efecto antiparasitario, y los principales compuestos representativos son las quinolinas, isoquinolinas, índoles, esteroides y diterpenos (Yaluff, et al., 2015).

A partir de especies de este género se han logrado aislar varios compuestos como: erycristagallin (**E1**), que es un pterocarpano aislado a partir de *Erythrina mildbraedii* (Njamena, D. et al., 2003). Eritrochin B (**E2**); un isoflavonoide, aislado a partir de *Erythrina eriotricha* como también cinco pterocarpanos conocidos, isoneorautenol (**E3**), erybraedin A (**E4**), erybraedin C (**E5**), D (**E6**) y erybraedin E (**E7**) (Nkengfacka, A. et al., 2003). Un derivado de cinamato se obtuvo a partir de *Erythrina excelsa* y se identificó como nonadecilo para-hydroperoxycinnamato. Este compuesto se aisló junto con tres compuestos conocidos, lupeol (**E8**) (triterpeno), mezcla de sitosterol (**E9**) (fitoesterol) y estigmasterol (**E10**) (esterol), e isoneorautenol (Kwamou, GMN, et al., 2015). De *Erythrina suberosa* se han logrado aislar cuatro metabolitos distintos designados como 4'-metoxilicoflavanona (flavonoide), alpinumisoflavona (**E11**) (flavonoide), wighteone (**E12**) (isoflavonoide) y α -Hydroxyerysotrine (**E13**) (Kumara, S. et al., 2013).

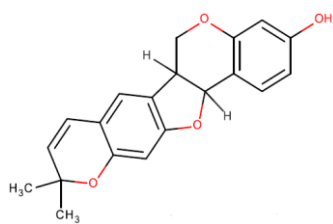
A continuación se muestran las estructuras moleculares de los compuestos aislados a partir de las diferentes especies del género.



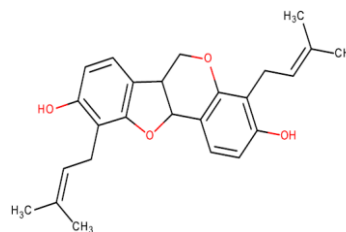
Erycristagallin (**E1**)



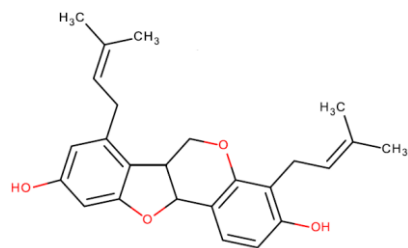
Eriotrichin B (**E2**)



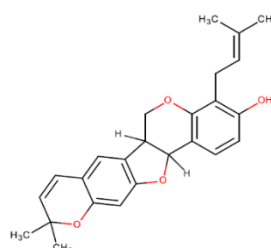
Isonorautenol (**E3**)



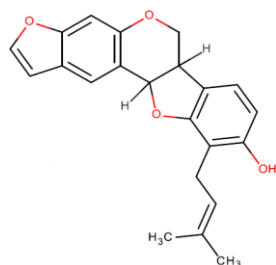
Erybraedin A (**E4**)



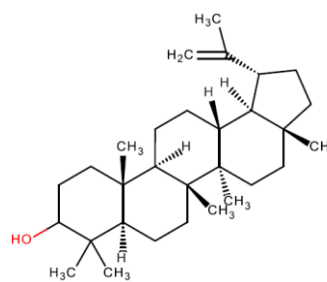
Erybraedin C (E5)



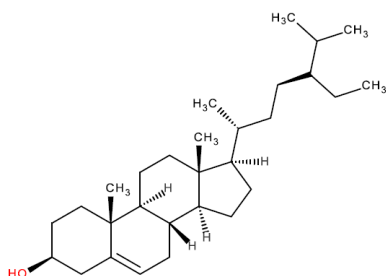
Erybraedin D (E6)



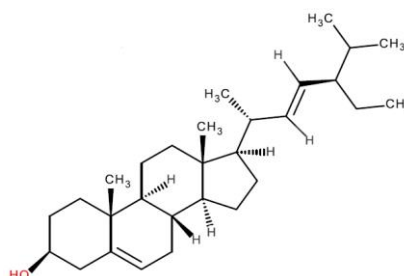
Erybraedin (E7)



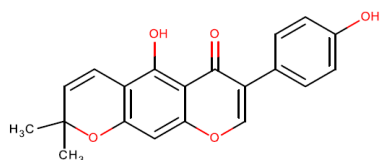
Lupeol (E8)



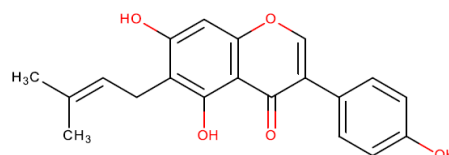
Sitosterol (E9)



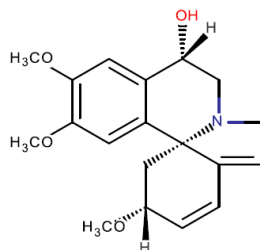
Stigmasterol (E10)



Alpinumisoflavona (E11)



Wighteone (E12)



α -hydroxyerysotrine (E13)

2.4.1. Descripción de la especie *Erythrina ulei*.

Erythrina ulei, también denominada *Erythrina xinguensis* Ducke, es un árbol que tiene entre 15 y 20 m de altura, su tallo es lenticelado y con tendencia a formar escamas por la corteza exfoliante, sus hojas tienen aproximadamente de 10 a 15 cm de longitud y entre 8 y 13 cm de ancho. Se distribuye en la amazonia de Perú, Ecuador, Brasil, Bolivia y Colombia. Esta especie tiende a perder sus hojas antes de florecer, y florece en los meses de Septiembre y Octubre.

Tabla 1. Taxonomía de *Erythrina ulei*

Reino:	Plantae	
División:	Angiospermae	
Clase:	Dicotyledoneae	
Sub-clase:	Archichlamydeae	
Orden:	Rosales	
Familia:	Fabaceae	
Sub-familia:	Papilionoideae	
Tribu:	Phaseoleae	
Género:	<i>Erythrina</i>	
Especie:	<i>Erythrina ulei</i>	

Fuente: (Araujo, 2005)

Hasta el momento no se han encontrado reportes sobre metabolitos secundarios con actividad antiparasitaria aislados a partir de la especie *Erythrina ulei*, existe un reporte con alcaloides que presentan actividad molusquicida (Dawidar, et al., 2015), pero se la ha considerado para el presente estudio por los metabolitos secundarios aislados a partir de

otras especies del mismo género, de los cuales si hay reportes de actividad antiparasitaria.

2.5. Algunas técnicas de aislamiento, identificación y caracterización de metabolitos secundarios.

2.5.1. Cromatografía.

En cromatografía se encuentran dos fases: la fase móvil que es el disolvente que pasa a través de la columna y la fase estacionaria que se encuentra fija en el interior. La separación se da debido al reparto de solutos entre las fases móvil y estacionaria (Harris, 2012).

2.5.2. Cromatografía en columna.

Se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias. Generalmente se utiliza, como fase estacionaria, sílice o alúmina. Y un disolvente o mezcla de disolventes, que pasan a través de la columna, como fase móvil. Dicho disolvente puede pasar por efecto de la gravedad o por la aplicación de presión. La fase móvil arrastra los compuestos que forman la mezcla, algunos de estos se encuentran fuertemente retenidos por la fase estacionaria por lo que hará que avanzarán más despacio, mientras que los que son apenas retenidos avanzarán más rápido (Rocha, 2000).

2.5.3. Cromatografía en capa fina.

Como fase estacionaria se utilizan partículas adsorbentes propagadas sobre una hoja inerte de vidrio, plástico, o metal. La fase móvil puede ser un disolvente o mezcla de varios disolventes. Algunas de las ventajas de cromatografía de capa fina (CCF) es que las muestras no tienen que someterse a extensas medidas de limpieza, y se tiene la capacidad para detectar una amplia gama de compuestos (Tesso, 2005).

2.5.4. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas.

Debido a la información cuantitativa y cualitativa que suministra, la espectrometría de masas es muy utilizada como detector en cromatografía. La selectividad del mismo facilita los requisitos de la preparación de muestra o completa la separación de los componentes que hay en la mezcla, y aumenta la relación señal/ruido (Harris, 2012).

El espectro de masas es extremadamente sensible por lo que se puede medir fácilmente un componente en un cromatograma complejo de compuestos poco separados. La detección de un ion seleccionado disminuye el límite de detección de un factor de aproximadamente 100, comparado con un barrido de m/z porque en la detección de iones escogidos se invierte más tiempo recogiendo solo iones de interés (Harris, 2012).

2.5.5. Resonancia nuclear magnética.

Es uno de los métodos más utilizados para la determinación de la estructura molecular en disolución en líquidos puros y en gases. La resonancia nuclear magnética se utiliza para caracterizar estructuralmente compuestos que contengan elementos con núcleos magnéticos, es decir todos los núcleos que poseen un número impar de protones o neutrones. Su sensibilidad depende de la abundancia y la magnitud de su momento magnético nuclear, entre otros. (Shriver et al, 2004).

2.5.6. Cristalización.

Para la cristalización es necesario disolver el sólido con una mínima cantidad del disolvente apropiado, obteniendo una disolución saturada. Al enfriarse se empiezan a formar pequeños cristales. Mediante filtración se separan los cristales de las aguas madres, el proceso de lavado se repite varias veces para eliminar impurezas. La cristalización idónea es aquella que tiene lugar lentamente, ya que conduce a cristales muy puros (Olivas & Barraza, 2011).

2.5.7. Punto de fusión.

Es la temperatura a la que un sólido se convierte en líquido. A medida que la masa molecular incrementa también los puntos de fusión. El empaquetamiento es la propiedad que determina lo bien que se acomodan las moléculas individuales dentro de la estructura cristalina de un sólido. Cuanto más compacto es el empaquetamiento, mayor energía se requerirá para romper la estructura y lograr la fusión del compuesto (Yurkanis, 2007).

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos.

En la figura 1 se presenta un esquema de la metodología que se empleó para el siguiente trabajo de investigación.

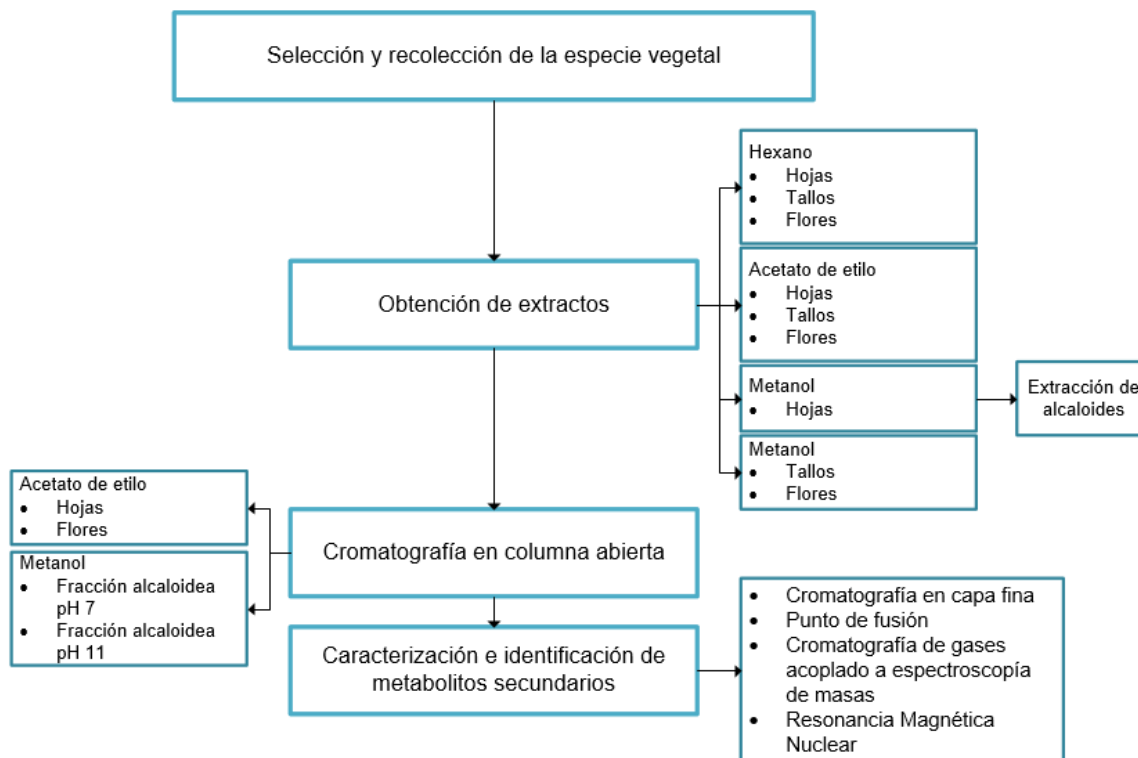


Figura 1: Metodología experimental

Fuente: Autora

3.1. Selección y recolección de la materia vegetal.

En base a información bibliográfica se realizó la selección de la especie vegetal. La materia prima se recolectó en la parroquia rural Cumbaratza en el cantón Zamora, en la provincia de Zamora Chinchipe, en Ecuador, con coordenadas 17735727E, 9557628N. Una vez identificada la especie por la Dr. Fani Tinitana, se depositó una muestra en el herbario de la UTPL con el número de voucher HUTPL7677.



Figura 2: Mapa de recolección de la especie *Erythrina ulei*.

Fuente: Mapas del Ecuador

3.2. Obtención de extractos.

Fueron secados 8 kg de la especie, se separaron hojas, tallos y flores. Se limpió la materia prima para eliminar cualquier rastro de impurezas que contenga y que puedan intervenir con la investigación.

Se colocó la materia vegetal en un cuarto de secado con flujo de aire a 37 °C por aproximadamente 7 días con el fin de eliminar la humedad presente.

Se llevó a maceración estática utilizando disolventes de polaridad ascendente: Hex, AcOEt, MeOH. La especie fue colocada en 7 recipientes, de los cuales 4 pertenecían a hojas, 2 a tallos y 1 a flores. Se colocó 10 litros del disolvente correspondiente y se lo dejó reposar durante 3 días, se realizaron cuatro extracciones con cada disolvente. Seguidamente se procedió al filtrado y concentrado al vacío en un rotaevaporador. Finalmente se pesó y etiquetó cada extracto.

El rendimiento de los extractos se calculó con la fórmula que se presenta a continuación:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso de extracto}}{\text{Peso de materia seca}} * 100$$

(Fórmula 1)

Cada estructura morfológica se trabajó por separado debido a la diferencia que presentaron los diferentes extractos en el perfil cromatográfico.

3.3. Fraccionamiento de extractos.

3.3.1. Montaje de columna.

Se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta de 42 mm de diámetro y 50 cm de altura de cuerpo, utilizando sílica gel 60 (0.015-0.040mm), para la elución se utilizó Hex, AcOEt, MeOH, así como también mezclas de los mismos. Se recolectaron fracciones de 10 mL y se realizó cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones.

3.3.2. Cromatografía en capa fina.

Se utilizaron placas de aluminio cubiertas de sílica gel 60 F₂₅₄ y fase inversa C18, la visualización se la realizó en luz UV 254 y 365 nm, cada placa fue revelada con ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

3.3.3. Unión y purificación.

Para realizar la unión se tomó en cuenta la similitud en el perfil cromatográfico de cada fracción, la altura de las manchas en la placa de cromatografía en capa fina de cada compuesto que se observaban en la luz UV a 254 y 365 nm y la similitud visual del revelador utilizando ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

La purificación de cada compuesto se hizo en base al grado de solubilidad que presentaba frente a cada disolvente utilizando el que fuera más adecuado para realizar el lavado, y en otros casos se utilizaron microcolumnas.

3.3.4. Microcolumna.

Para el fraccionamiento en microcolumna se utilizó sílica gel 60 (0.015-0.040mm) y una columna de 15 mm de diámetro y 40 cm de altura de cuerpo, utilizando una relación de empaquetamiento 1:15. Para la elución se utilizaron mezclas de disolventes de: hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol. Se obtuvieron fracciones de 2 mL y se realizó cromatografía en capa fina de cada uno de éstas, se unieron las fracciones que presentaban similitud en el perfil cromatográfico.

3.4. Extracción de alcaloides.

Para confirmar la presencia de alcaloides en el extracto metanólico de hojas se realizó una prueba de Dragendorff, al pintarse las manchas de un color naranja oscuro da un resultado positivo para la prueba por lo que se siguió el procedimiento de separación líquido-líquido.

Se acidificó el extracto con H₂SO₄ al 2%, se filtró y se realizó pruebas de Dragendorff hasta obtener un resultado negativo.

A la fase ácida que contiene los alcaloides se la extrajo mediante el siguiente proceso:

- Extracción con Hexano, pH ácido.
- Extracción con CHCl₃, pH ácido.
- Extracción con CHCl₃, pH 7.
- Extracción con CHCl₃, pH 11.

La extracción con Hexano y CHCl₃ a pH ácido se realizó cuatro veces, mientras que las extracciones con CHCl₃ a pH 7 y 11 se realizaron hasta que las pruebas de Dragendorff dieron un resultado negativo (Herrera, 2013).

3.5. Caracterización de metabolitos secundarios.

3.5.1. Punto de fusión.

Para determinar el punto de fusión de los compuestos aislados se utilizó el equipo Fisher Johns, las temperaturas no fueron corregidas.

3.5.2. Factor de retención.

Se determinó el factor de retención de cada uno de los compuestos aislados. Este expresa la relación entre la distancia recorrida de la muestra (desde el punto de la siembra) con respecto a la distancia recorrida por el solvente.

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

(Fórmula 2)

3.5.3. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas (CG/EM).

Para determinar los espectros de masas se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert) y columnas cromatográficas como BSNS y HP INNOWax. Para la identificación de los compuestos se emplearon las bases de datos Wiley 7n.l y spectral database for

organic compounds SDBS. Las condiciones de operación del equipo se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 2. Condiciones de operación del equipo CG/EM

COLUMNA	Columna capilar: Agilent 122-5562 DB-5ms, 0.25mm* 60mm*0.25µm
	Temperatura máxima: 350 °C
	Flujo constante. Flujo inicial 1.5 ml/min
	Presión inicial: 26.99 psi
	Velocidad promedio: 32 cm/s
	Presión de salida: vacío
INYECTOR en modo splitless	Temperatura inicial de 50 °C
	Gas: Helio
DETECTOR	Temperatura de 250 °C
	Gas: Nitrógeno
HORNO	Temperatura inicial: 80 °C
	Temperatura final: 300 °C
	Gradiente de temperatura de 5 °C/min

Fuente: Laboratorio de análisis químico e instrumental de la UTPL

3.5.4. Espectroscopía de Resonancia Nuclear Magnética (RMN).

Para obtener los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , 400 MHz y 100 MHz respectivamente, se utilizó un equipo de resonancia magnética nuclear Varian 400 MHz-Premium Schelded.

Para la lectura de las muestras se realiza una disolución de la misma empleando disolventes deuterados como CDCl_3 y MeOH.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y ANÁLISIS

4. Resultados y análisis.

4.1. Rendimiento de los extractos obtenidos.

Los resultados correspondientes al peso obtenido y al rendimiento de los extractos a partir de 8 kg de material vegetal seca, de los cuales 4.4 kg corresponden a hojas, 2.4 kg a tallos y 1.2 kg a flores, se detallan en la tabla 2.

Tabla 3. Peso y rendimiento de los extractos obtenidos de *E. ulei*

Disolvente	Parte aérea	Peso (g)	Rendimiento %
Hexano	Hojas	74.14	1.68
	Tallos	6.16	0.26
	Flores	11.28	0.94
Acetato de Etilo	Hojas	40.16	0.91
	Tallos	95.01	3.95
	Flores	21.34	1.78
Metanol	Hojas	149.51	3.40
	Tallos	140.80	5.87
	Flores	131.36	10.94

Fuente: Autora

Debido a la diferencia en el perfil cromatográfico se trabajaron los extractos por separado. En la Figura 3 se puede observar el perfil de los extractos en CCF. Se utilizó una letra en cada uno siendo H el correspondiente al extracto de hojas, T al de tallos y F al de flores.

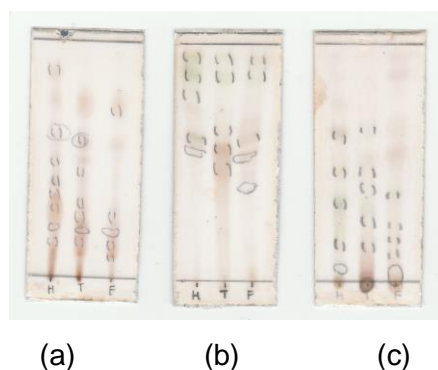


Figura 3. Placas cromatográficas de extractos de *Erythrina ulei* (a) Extracto de hexano (b) Extracto de acetato de etilo (c) Extracto de metanol.

Fuente: Autora

4.2. Aislamiento de metabolitos secundarios.

4.2.1. Extracto de acetato de etilo - flores.

Del extracto de acetato de etilo – flores (AcOEt F) se recolectaron 142 muestras con un volumen de 10 ml cada una, las cuales se unieron de acuerdo a la similitud que presentaron en el perfil cromatográfico, obteniéndose 18 fracciones en total (AcOEt FF1-AcOEt FF18). En la tabla 3 se muestran las fracciones con sus características.

Tabla 4. Unión de las fracciones de extracto de acetato de etilo de flores

Fracción	Muestra	Polaridad	Proporción (%)	Apariencia
AcOEt FF1	1-2;4-8	Hex: CH ₂ Cl ₂	70:30	Sólido amarillo
AcOEt FF2	3	Hex: CH ₂ Cl ₂	70:30	Sólido amarillo
AcOEt FF3	9-16	Hex: CH ₂ Cl ₂	70:30	Sólido amarillo
AcOEt FF4	17-22	Hex: CH ₂ Cl ₂	60:40	Polvo blanquecino
AcOEt FF5	23-24	Hex: CH ₂ Cl ₂	60:40	Sólido blanquecino
AcOEt FF6	25-29	Hex: CH ₂ Cl ₂	60:40	Sólido amarillo
AcOEt FF7	30-42	Hex: CH ₂ Cl ₂	50:50	Sólido amarillo
AcOEt FF8	43-46	Hex: CH ₂ Cl ₂	40:60	Sólido amarillo
AcOEt FF9	47-54	Hex: CH ₂ Cl ₂	40:60	Cristales amarillos
AcOEt FF10	55-62	Hex: CH ₂ Cl ₂	30:70	Cristales amarillos
AcOEt FF11	63-70	Hex: CH ₂ Cl ₂	20:80	Cristales amarillos
AcOEt FF12	71-86	Hex: CH ₂ Cl ₂	10:90	Cristales amarillos
AcOEt FF13	87-94	CH ₂ Cl ₂	100	Cristales amarillos
AcOEt FF14	95-102	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	95:05	Cristales amarillos
AcOEt FF15	103-110	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	90:10	Cristales amarillos
AcOEt FF16	111-118	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:50	Cristales amarillos
AcOEt FF17	119-126	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:50	Cristales amarillos
AcOEt FF18	127-142	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:50	Cristales amarillos

Fuente: Autora

4.2.2. Extracto de acetato de etilo – hojas.

Se recolectaron 120 fracciones con un volumen de 15 ml, en la tabla 4 se muestran las fracciones después de evaluar su perfil cromatográfico obteniendo 22 de las mismas (AcOEt HF1-AcOEt HF22). En la tabla 4 se especifican las características de las mismas.

Tabla 5. Unión de las fracciones del extracto de acetato de etilo de hojas

Fracción	Muestra	Polaridad	Proporción (%)	Apariencia
AcOEt HF1	1-8	Hex: CH ₂ Cl ₂	80:20	Sólido amarillo claro
AcOEt HF2	9-16	Hex: CH ₂ Cl ₂	80:20	Sólido amarillo claro

AcOEt HF3	17-24	Hex: CH ₂ Cl ₂	80:20	Sólido amarillo claro
AcOEt HF4	25-32	Hex: CH ₂ Cl ₂	70:30	Sólido amarillo claro
AcOEt HF5	33-36	Hex: CH ₂ Cl ₂	70:30	Sólido amarillo claro
AcOEt HF6	37	Hex: CH ₂ Cl ₂	60:40	Sólido amarillo claro
AcOEt HF7	38-40	Hex: CH ₂ Cl ₂	60:40	Sólido amarillo claro
AcOEt HF8	41-48	Hex: CH ₂ Cl ₂	50:50	Sólido amarillo claro
AcOEt HF9	49-51	Hex: CH ₂ Cl ₂	50:50	Sólido amarillo claro
AcOEt HF10	52-53	Hex: CH ₂ Cl ₂	50:50	Sólido amarillo claro
AcOEt HF11	54-56	Hex: CH ₂ Cl ₂	40:60	Sólido amarillo claro
AcOEt HF12	57-68	Hex: CH ₂ Cl ₂	40:60	Sólido amarillo claro
AcOEt HF13	69-70	Hex: CH ₂ Cl ₂	40:60	Sólido amarillo claro
AcOEt HF14	71	Hex: CH ₂ Cl ₂	40:60	Sólido amarillo claro
AcOEt HF15	72-80	Hex: CH ₂ Cl ₂	30:70	Sólido amarillo claro
AcOEt HF16	81-88	Hex: CH ₂ Cl ₂	30:70	Sólido amarillo oscuro
AcOEt HF17	89-99	Hex: CH ₂ Cl ₂	20:80	Sólido amarillo oscuro
AcOEt HF18	100-104	Hex: CH ₂ Cl ₂	20:80	Sólido amarillo oscuro
AcOEt HF19	105-112	Hex: CH ₂ Cl ₂	20:80	Sólido amarillo oscuro
AcOEt HF20	113-117	CH ₂ Cl ₂	100	Sólido amarillo oscuro
AcOEt HF21	118-119	CH ₂ Cl ₂	100	Sólido amarillo oscuro
AcOEt HF22	120	CH ₂ Cl ₂	100	Sólido amarillo oscuro

Fuente: Autora

De la fracción AcOEt HF18 se realizó una microcolumna isocrática con polaridad Hex:CH₂Cl₂ 8:2 para separar el compuesto mayoritario. En la tabla 5 se especifica el peso y unión de cada una de las fracciones recolectadas.

Tabla 6. Unión y peso de las fracciones de la microcolumna de la fracción AcOEt HF18

Fracción	Muestra	Peso (mg)
AcOEt HF18 – M1	1-71	1.8
AcOEt HF18 – M2	72-75	0.9
AcOEt HF18 – M3	77	1.1
AcOEt HF18 – M4	78	1.8
AcOEt HF18 – M5	79-80;82-83	6.2
AcOEt HF18 – M6	81 y 84	2.7
AcOEt HF18 – M7	76 y 85	1.4
AcOEt HF18 – M8	86-93;95	1.3
AcOEt HF18 – M9	94	1.1
AcOEt HF18 – M10	96-104	15.3
AcOEt HF18 – M11	105-136	30.1
AcOEt HF18 – M12	137-192	14.6
AcOEt HF18 – M13	193	1.8

AcOEt HF18 – M14	194	52.4
AcOEt HF18 – M15	195	8.7
AcOEt HF18 – M16	196	2.7
AcOEt HF18 – M17	197	8.9

Fuente: Autora

4.2.3. Extracto de metanol – hojas.

4.2.3.1. Extracción de alcaloides.

La presencia de alcaloides en el extracto metanólico de hojas se realizó utilizando la prueba de Dragendorff, al pintarse las manchas de un color naranja oscuro da un resultado positivo para la misma, por lo que se siguió el procedimiento de separación líquido-líquido.

A la fase ácida que contiene los alcaloides se la extrajo a pH 7 y 11. Las extracciones se realizaron hasta que las pruebas de Dragendorff dieron un resultado negativo.

Como puede verse en la figura 4 las fracciones alcaloideas son mezclas bastante complejas.

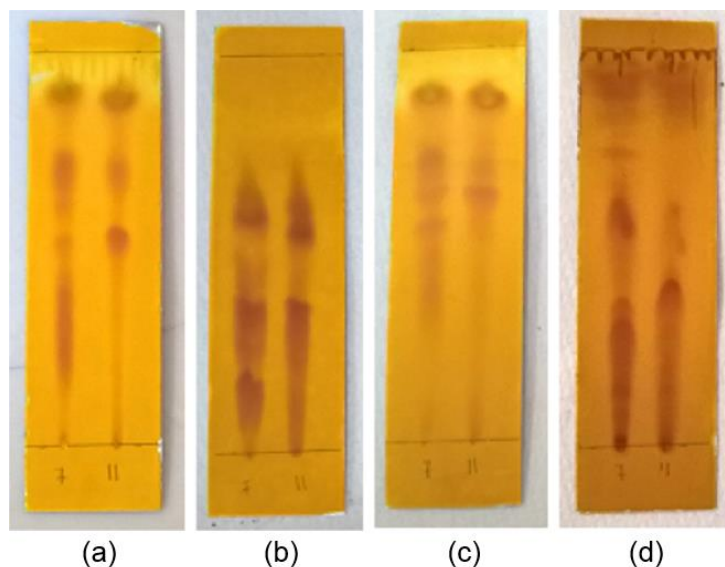


Figura 4. Fracciones alcaloideas pH 7 y pH 11

Fuente: Autora

En la Figura 4 se muestra la CCF de los extractos de alcaloideos en pH 7 (izquierda) y 11 (derecha), las polaridades en las que se trabajó fueron AcOEt: MeOH 1:1 corrida tres veces (a), MeOH 100% (b), MeOH 100% corrida tres veces (c) y AcOEt: MeOH 7:3 corrida tres veces (d).

Se montó microcolumnas isocráticas para tratar de separar los alcaloides

4.2.3.2. Fracción alcaloidea pH 7.

Se aislaron 236.8 mg de extracto soluble en metanol. La fracción fue analizada mediante RMN ¹H (Anexo, espectro 2) y CG/EM, con la base de datos Wiley 7n.l, y se obtuvo una mezcla de 10 compuestos con un tiempo de retención de t_R = 6.93, 17.20, 17.57, 18.46, 25.09, 25.74, 25.85, 26.04, 26.25, 27.71. Presentan un porcentaje de similitud que varía desde 38 a 89. (Anexo, espectro 1).

4.2.3.2.1. Columna de la fracción alcaloidea pH 7.

Se realizó una microcolumna isocrática con 115 mg del extracto alcaloideo con polaridad MeOH 100%, se recolectaron 354 muestras, de acuerdo a su perfil cromatográfico se unieron, resultando 23 fracciones en total. En la tabla 6 se especifica la unión de las mismas con su respectivo peso en mg.

Tabla 7. Unión de las fracciones de la columna de la fracción alcaloidea pH 7

Fracción	Muestra	Apariencia	Peso (mg)
MeOH A7F-1	1-5	Sólido amarillo claro	1.5
MeOH A7F-2	6-10	Sólido amarillo oscuro	2
MeOH A7F-3	11-16	Sólido amarillo oscuro	14.5
MeOH A7F-4	17-21	Sólido amarillo oscuro	30.4
MeOH A7F-5	22-32	Sólido amarillo oscuro	26.2
MeOH A7F-6	33-36	Sólido amarillo claro	2.3
MeOH A7F-7	37-45	Sólido amarillo claro	3.3
MeOH A7F-8	46-48	Sólido amarillo claro	1.9
MeOH A7F-9	49-56	Sólido amarillo claro	4.3
MeOH A7F-10	57-64	Sólido amarillo claro	4
MeOH A7F-11	65-80	Sólido amarillo claro	4.8
MeOH A7F-12	81-96	Polvo blanquecino	2.2
MeOH A7F-13	97-144	Polvo blanquecino	2.3
MeOH A7F-14	145-183	Polvo blanquecino	2.1
MeOH A7F-15	184	Polvo blanquecino	0.9
MeOH A7F-16	185-192	Polvo blanquecino	1
MeOH A7F-17	193	Polvo blanquecino	0.7
MeOH A7F-18	194-204	Polvo blanquecino	1
MeOH A7F-19	205	Polvo blanquecino	0.8
MeOH A7F-20	206-216	Polvo blanquecino	0.7
MeOH A7F-21	217-235;237-296	Polvo blanquecino	1.8

MeOH A7F-22	236	Polvo blanquecino	0.6
MeOH A7F-23	297-354	Polvo blanquecino	2.4

Fuente: Autora

En la Figura 5 se puede observar la CCF en luz UV de 365 nm de las fracciones de la microcolumna en pH 7, corrida en Hex: AcOEt 1:1.

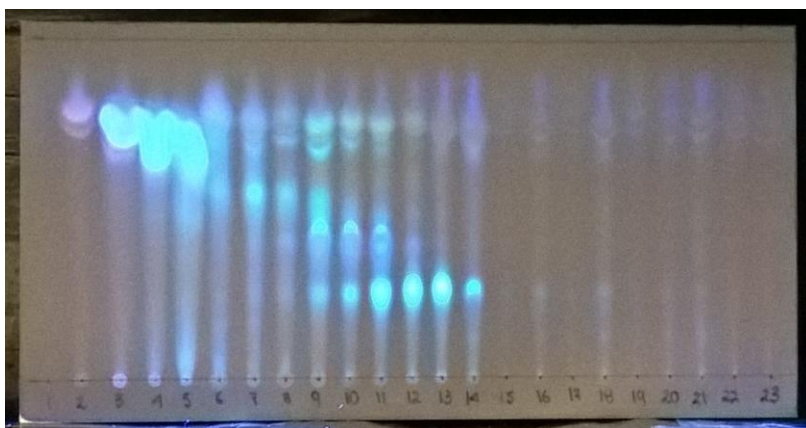


Figura 5. CCF de las fracciones alcaloides en pH 7

Fuente: Autora

4.2.3.3. Fracción alcaloidea pH 11.

Del extracto se aislaron 226.1 mg solubles en metanol. Se analizó la fracción mediante RMN ¹H (Anexo, espectro 4) y CG/EM y se obtuvo una mezcla de 9 compuestos con un tiempo de retención de $t_R = 15.60, 17.19, 19.07, 19.81, 20.76, 20.84, 21.53, 26.25, 27.70$, que presentan un porcentaje de similitud que varía desde 6 a 68 según la base de datos Wiley 7n.l. (Anexo, espectro 3).

4.2.3.3.1. Columna de la fracción alcaloidea pH 11.

Se realizó una microcolumna isocrática con 113.4 mg del extracto alcaloideo con polaridad MeOH 100%, se recolectaron 146 muestras, de acuerdo a su perfil cromatográfico se unieron, resultando 19 fracciones en total. En la tabla 7 se muestra el peso, en mg, de cada fracción obtenida.

Tabla 8. Unión de las fracciones de la columna de la fracción alcaloidea pH 11

Fracción	Muestra	Apariencia	Peso (mg)
MeOHA11F-1	1-2	Sólido amarillo claro	1.1
MeOHA11F-2	3	Sólido amarillo claro	0.5

MeOH A11F-3	4	Sólido amarillo oscuro	0
MeOH A11F-4	5-10	Sólido amarillo oscuro	1.2
MeOH A11F-5	11-30	Sólido amarillo oscuro	61.3
MeOH A11F-6	31-32	Sólido amarillo oscuro	2.5
MeOH A11F-7	33-40	Sólido amarillo oscuro	4.5
MeOH A11F-8	41-59	Sólido amarillo claro	3
MeOH A11F-9	60-64	Sólido amarillo claro	1
MeOH A11F-10	65-72	Sólido amarillo claro	2.8
MeOH A11F-11	73-80	Sólido amarillo claro	1.6
MeOH A11F-12	81-96	Polvo blanquecino	5.2
MeOH A11F-13	97-112	Polvo blanquecino	3
MeOH A11F-14	113-120	Polvo blanquecino	1.3
MeOH A11F-15	121-128	Polvo blanquecino	0.9
MeOH A11F-16	129-136	Polvo blanquecino	0.7
MeOH A11F-17	137-144	Polvo blanquecino	0.4
MeOH A11F-18	145	Sólido amarillo oscuro	12.3
MeOH A11F-19	146	Sólido amarillo oscuro	8.3

Fuente: Autora

Al estar muy mezcladas no fue posible separar los compuestos, sin embargo se sigue trabajando en las mismas. En la Figura 6 se observan las CCF de las fracciones MeOH A11F 1 (a), 5 (b), 12 (c) y 18 (d), corridas en Hex:AcOEt 1:1.

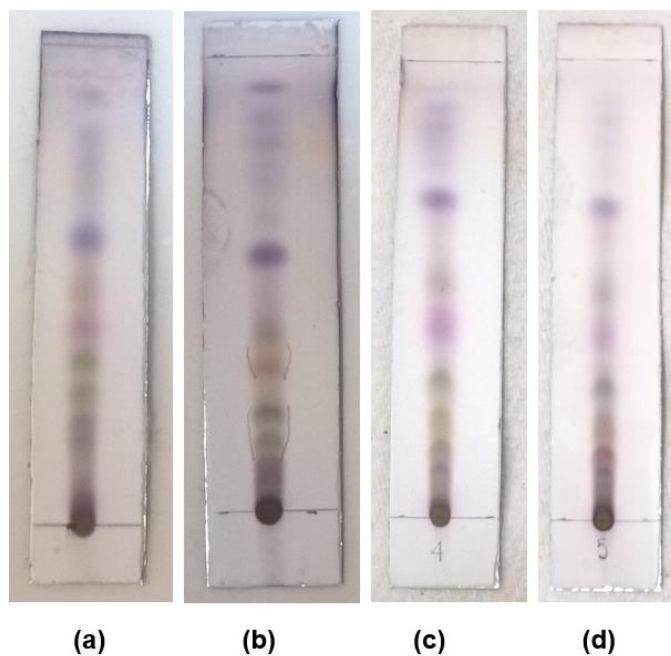


Figura 6. CCF de las fracciones alcaloides 1, 5, 12 y 18 en pH 11

Fuente: Autora

En la Figura 7 se observa las CCF de las fracciones MeOH A11F 5 (a) y 12 (b) en luz UV de 365 nm, así como la fracción 18 (c) revelada con Dragendorff, corridas en Hex:AcOEt 1:1.

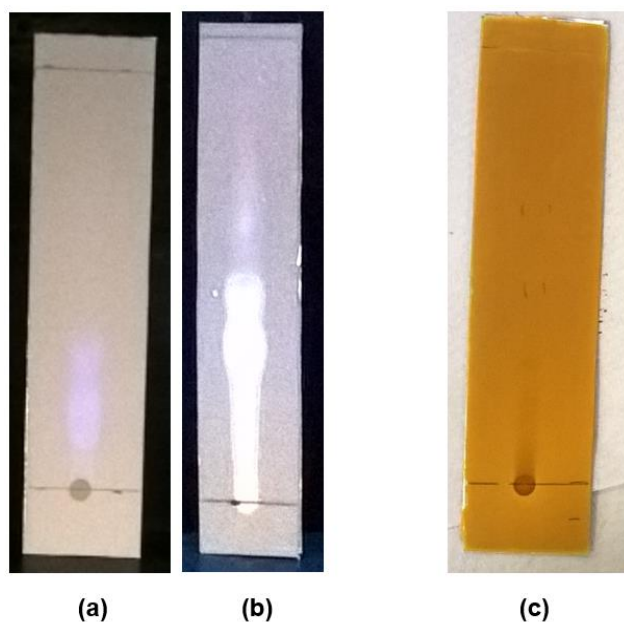


Figura 7. CCF de las fracciones alcaloides 5, 12 y 18 en pH 11

Fuente: Autora

4.3. Caracterización e identificación de metabolitos secundarios.

4.3.1. Extracto de acetato de etilo – flores.

4.3.1.1. Fracción AcOEtFF4.

De la fracción 17-22, identificada como AcOEt FF4, eluída en cromatografía en columna en una polaridad Hex: CH₂Cl₂ 6:4, se obtuvo 6.5 mg de un polvo blanquecino, con punto de fusión 39-42 °C, soluble en diclorometano y cloroformo, con un R_f de 0.58 en una polaridad Hex: CH₂Cl₂ 8:2. La fracción fue analizada en CG/EM y se obtuvo una mezcla de 8 hidrocarburos: Tricosano (**1**) (t_R= 21.12) cuyo peso molecular es 324.63 g/mol; Tetracosano (**2**) (t_R=21.95) cuyo peso molecular es 338.65 g/mol; Pentacosano (**3**) (t_R= 22.75) cuyo peso molecular es 352.68 g/mol; Hexacosano (**4**) (t_R= 23.52) cuyo peso molecular es 366.71 g/mol; Heptacosano (**5**) (t_R= 24.28) cuyo peso molecular es 380.73 g/mol; Octacosano (**6**) (t_R= 25.11) cuyo peso molecular es 394.76 g/mol; Nonacosano (**7**) (t_R= 26.12) cuyo peso molecular es 408.79 g/mol; Eicosano (**8**) (t_R= 28.89) cuyo peso molecular es 282.55 g/mol. Según la base de datos Wiley 7n.I en CG/EM (Anexo,

espectros 5 a 13) el porcentaje de similitud de los espectros de masa fueron 99, 99, 99, 98, 99, 99, 99 y 97% respectivamente para cada uno de los hidrocarburos. Se compararon los patrones de fraccionamiento de masa con los reportes previos en literatura que apoyan las estructuras propuestas (Ariza, O. et al., 2007) (Delange, D. et al., 2014) (Adams, 2007).

En las Figura 8 se muestran las estructuras de los compuestos que conforman la mezcla. Cuatro de estos hidrocarburos han sido reportados en otra especie del mismo género, *Erythrina smithiana* (Aguilar, L. 2015). El metabolito Heneicosano ha sido aislado en la especie *Posoqueria latifolia* del extracto etanólico, (Ariza, O. et al., 2007), para el mismo se ha reportado actividad analgésica. Los metabolitos pentacosano, heptacosano y eicosano han sido aislados a partir del extracto de éter de petróleo de *Petiveria alliacea*, reportando para los mismos propiedades antibacterianas (Delange, D. et al., 2014).

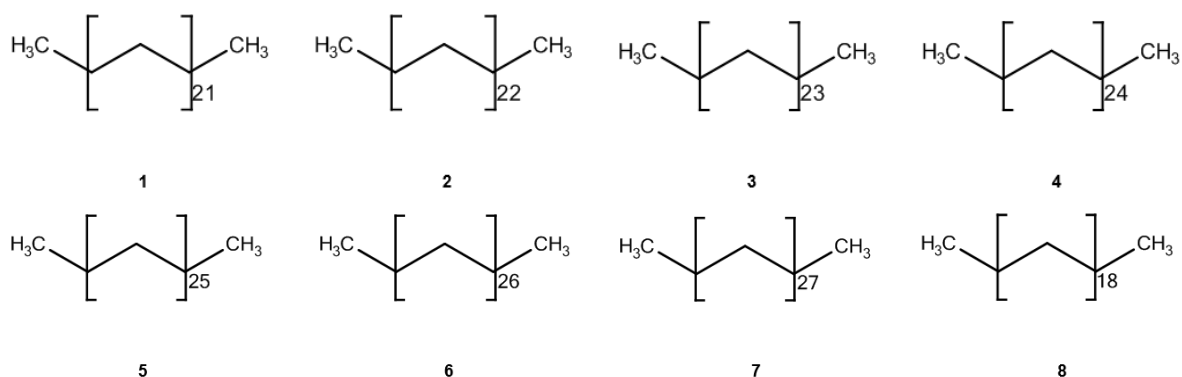


Figura 8. Estructuras de los compuestos pertenecientes a la mezcla 1: Tricosano (1), Tetracosano (2), Pentacosano (3), Hexacosano (4), Heptacosano (5), Octacosano (6), Nonacosano (7), Eicosano (8).

Fuente: Autora

4.3.1.2. Fracción AcOEt FF13.

De la fracción del extracto de acetato de etilo – flores, identificada como AcOEt FF13, correspondiente a la unión de las fracciones 87-94, eluída en cromatografía en columna con polaridad CH₂Cl₂ 100%, se obtuvieron cristales amarillos. Al realizar CCF se detectó la presencia de impurezas por lo que fue necesaria una re-cristalización con metanol, obteniendo 21.8 mg de un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión 115-119 °C, soluble en diclorometano y cloroformo, con un R_f de 0.45 en una polaridad Hex: CH₂Cl₂

6:4. Se analizó la fracción mediante CG/EM (Anexo, espectros 14 a 17), se pueden observar tres tiempos de retención distintos. Según la base de datos Wiley 7n.I los compuestos probablemente serían: bikaverin (**9**) ($t_R=33.71$), cuyo peso molecular es 382.32 g/mol, con un porcentaje de similitud de 90; estigmastan 3,5,22 trien (**10**) ($t_R=34.42$), cuyo peso molecular es 394.68 g/mol, con un porcentaje de similitud de 94 y estigmastan 3,5 dien (**11**) ($t_R= 36.25$), cuyo peso molecular es 396.69, con un porcentaje de similitud de 99. Reportes en literatura apoyan la estructura propuesta (Kwamou, GMN, et al., 2015) (Son, et al., 2008) (Bawankar, et al., 2013).

En la Figura 9 se muestran las posibles estructuras de la mezcla 2. A partir de *Erythrina excelsa* se logró aislar el compuesto estigmasterol (Kwamou, GMN, et al., 2015) mientras que los compuestos **10** y **11** se han aislado de *E. ulei*. El bikaverin (**9**) ha sido aislado a partir de *Fusarium oxysporum* al que le reportan actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de plantas diferentes, oomicetos y hongos verdaderos. (Son, et al., 2008)

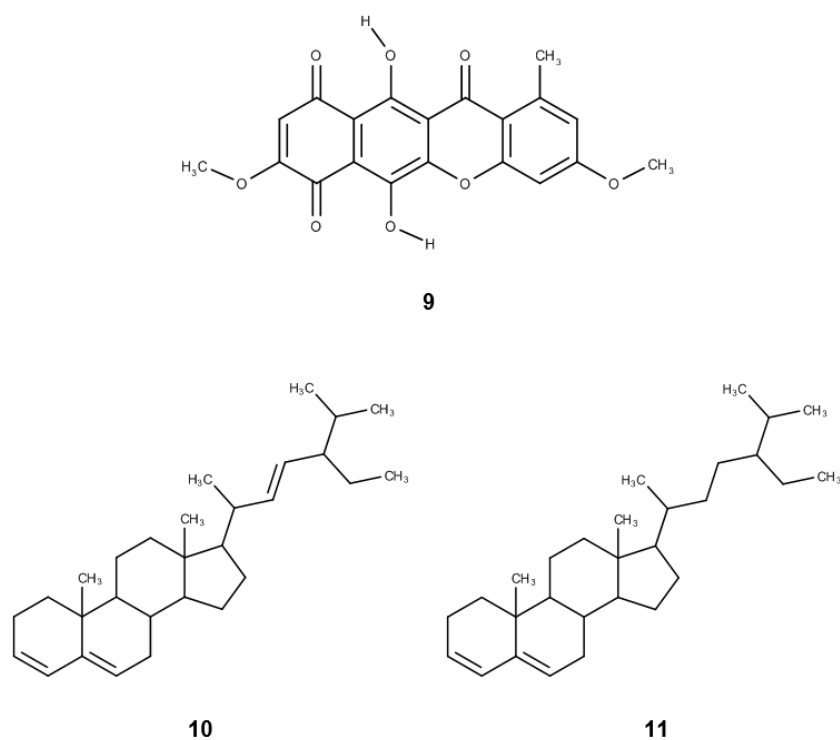


Figura 9. Estructuras de los compuestos pertenecientes a la mezcla 2. Bikaverin (**9**), Estigmastan 3,5 ,22 trien (**10**), Estigmastan 3,5 dien (**11**)

Fuente: Autora

4.3.2. Extracto de acetato de etilo – hojas.

4.3.2.1. Fracción AcOEt HF18-M11.

De la fracción 100-104, identificada como AcOEt HF18, eluída en cromatografía en columna abierta en una polaridad Hex: CH₂Cl₂ 2:8 se obtuvo 193.8 mg de un sólido amarillo oscuro soluble en diclorometano. Se realizó una microcolumna para separar los compuestos. Se aisló 30.1 mg de la fracción denominada AcOEt HF18-M11. Después de purificar la fracción para separar el compuesto, se obtuvo 8.6 mg de un líquido transparente soluble en diclorometano y cloroformo, con un R_f de 0.37 en Hex:CH₂Cl₂ 1:1. Al analizarlo en CG/EM (Anexo, espectro 18 y 19) se observan 5 tiempos de retención. Siendo t_R = 20.25 para el compuesto mayoritario con una proporción de 60.48 de acuerdo con la base de datos Wiley 7n.I. Para su identificación se comparó el espectro con el de la base de datos spectral database for organic compounds SDBS (Anexo, espectro 19-1).

El compuesto se identificó mediante RMN (Anexo, espectros 20 y 21) como: fitol acetato (**12**), cuyo peso molecular es 338.57 g/mol con fórmula química C₂₂H₄₂O₂. Fue caracterizado mediante comparación de espectros reportados en literatura (Bhattacharya & Rana, 2013)(Burdí & Hasan, 1991). En la tabla 9 y 10 se muestran los datos espectroscópicos correspondientes a ¹³C y ¹H del metabolito, en donde los desplazamientos químicos se hallan expresados en ppm.

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN ¹³C (CDCl₃) del compuesto fitol acetato (**12**)

Asignación	Tipo de carbono	Desplazamiento químico	
		Compuesto 12 (CDCl ₃)	Referencia bibliográfica (Bhattacharya & Rana, 2013)
C1	CH ₂	61.5	61.4
C2	CH	118.1	118
C3	C	142.9	142.8
C4	CH ₂	40.0	39.9
C5	CH ₂	25.2	25
C6	CH ₂	36.8	36.6
C7	CH	32.8	32.7
C8	CH ₂	37.6	37.4
C9	CH ₂	24.6	24.5
C10	CH ₂	37.4	37.3

C11	CH	32.9	32.8
C12	CH ₂	37.5	37.4
C13	CH ₂	24.9	24.8
C14	CH ₂	39.5	39.4
C15	CH	28.1	28
C16	CH ₃	22.7	22.6
C17	CH ₃	22.8	22.7
C18	CH ₃	19.8	19.7
C19	CH ₃	19.9	19.7
C20	CH ₃	16.5	16.4
C21	CO	171.3	171.1
C22	CH ₃	21.2	21

Fuente: Autora

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN ¹H (CDCl₃) del compuesto fitol acetato (12)

Asignación	Compuesto 12		Referencia bibliográfica (Bhattacharya & Rana, 2013)	
	Desplazamiento químico	Multiplicidad	Desplazamiento químico	Multiplicidad
C – H ₃	0.83 – 0.88	M	0.83 – 0.88	m
C – H ₂	1.02 – 1.40	M	1.02 – 1.40	m
C – H ₃	1.69	S	1.69	s
C – H ₂	2	T	2	t
C – H ₃	2.05	S	2.05	s
C – H ₂ – OAc	4.59	D	4.58	d
C – H	5.32	M	5.34	m

Fuente: Autora

El metabolito ha sido aislado a partir del extracto de diclorometano de las partes aéreas de la especie *Lagascea mollis*, se reporta actividad antimicrobiana para el mismo (Bhattacharya & Rana, 2013). También ha sido aislado del extracto etanólico de la especie *Leucosidea sericea* con actividad antibacteriana (Sharma, et al., 2014).

En la figura 10 se muestra la estructura del metabolito aislado, identificado como fitol acetato.

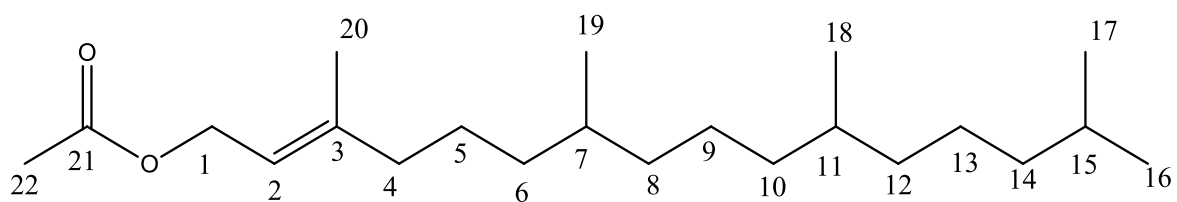


Figura 10. Estructura del compuesto identificado como fitol acetato (**12**)

Fuente: Autora

CONCLUSIONES

De los extractos obtenidos a partir de *Erythrina ulei* el que mostró mayor rendimiento fue el extracto metanólico - flores con 10.94% en comparación con los extractos de hexano y acetato de etilo de las diferentes partes aéreas, cuyos rendimientos son de 0.26 a 5.87.

Del extracto en acetato de etilo - flores de *Erythrina ulei* se identificó mediante el índice de retención la fracción AcOEt FF4, la cual fue una mezcla de ocho hidrocarburos que son: Tricosano (1); Tetracosano (2); Pentacosano (3); Hexacosano (4); Heptacosano (5); Octacosano (6); Nonacosano (7); Eicosano (8).

También se obtuvo la fracción AcOEtFF13 la cual fue una mezcla de tres compuestos de los cuales probablemente podrían ser: Bikaverin (9); estigmastan-3,5,22 trien (10); estigmastan-3,5 dien (11) ($t_R= 36.25$), según la base de datos Wiley 7n.l en CG/EM.

Del extracto en acetato de etilo - hojas se obtuvo el compuesto identificado como fitol acetato (12) de la fracción AcOEt HF18-M11, el cual ha sido aislado en las especies *Lagascea mollis* y *Leucosidea serícea*, este sería el primer reporte del compuesto para *Erythrina ulei*.

A partir del extracto de metanol hojas se obtuvieron 236.8 y 226.1 mg de dos fracciones alcaloideas en pH 7 y pH 11 respectivamente, los alcaloides aún no se han podido separar e identificar.

RECOMENDACIONES

Buscar otras técnicas que sean de mayor selectividad, como TLC preparativas, que permitan separar con mayor eficiencia los elementos presentes en las mezclas obtenidas.

Con el propósito de determinar todas las propiedades de un compuesto deberían realizarse pruebas de actividad biológica.

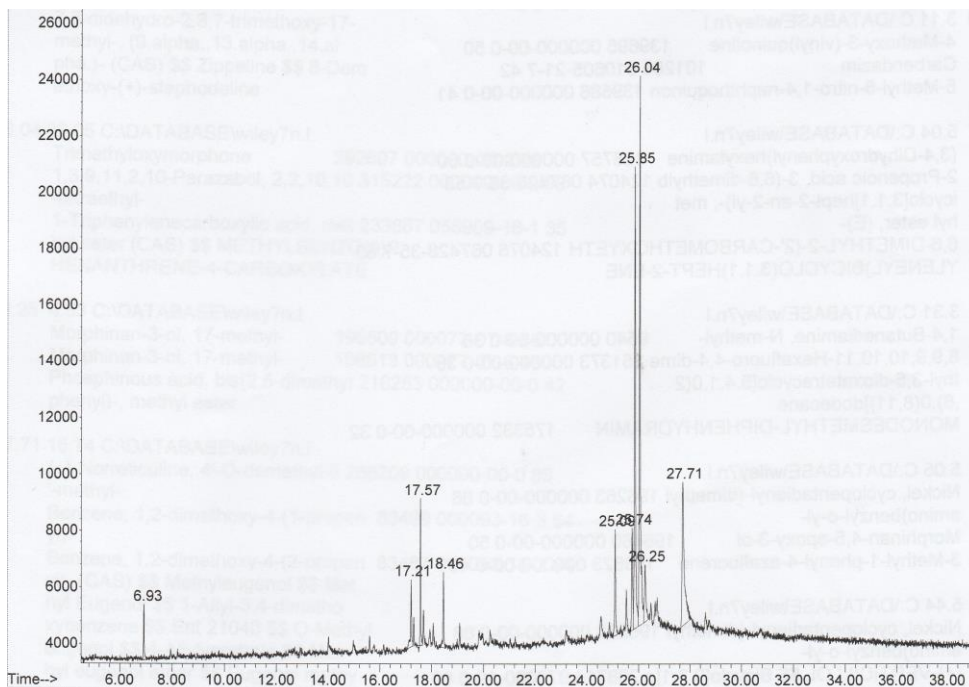
BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (4ta ed.). Allured Publishing Corporation.
- Aguilar, L. (2015). Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de la especie *Erythrina smithiana*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Almaraz, N., Ávila, J. A., Delgado, E., Naranjo, N., & Herrera, J. (2006). *El Metabolismo Secundario de las Plantas, un Nuevo Concepto*. *Vidsupra*, 1, 39-50.
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Peñaherrera, E., Tobar, V., & de Witte, P. (2010). *Estudio Preliminar Sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal*. Ecuador: Revista Tecnológica ESPOL 23(1), 89-97.
- Araujo, V. (2005). *Estudio Taxonómico e Histológico de Seis Especies del Género Erythrina L. (Fabaceae)*. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Araujo-Junior, J., Alexandre-Moreira, M., Aquino, P., Oliveira, M., & Sant'Ana, A. (2012). *A Phytochemical and Ethnopharmacological Review of the Genus Erythrina*. Brasil: Universidad Federal de Alagoas.
- Ariza, O., Rueda, E., Archila, A., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007). Determinación mediante hs-spme/gc-ms, de la composición química de la fragancia y el absoluto de las flores de *Posoqueria latifolia*, (33), 59–61.
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). *Matabolismo Secundario de Plantas*, 119-145. Madrid: Universidad Complutense. Facultad de Biología. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal 2(3), 119-145.
- Barrera, J. (2002). *Fundación Aliñambi, Curso de exportación de productos no tradicionales, Plantas medicinales*.
- Balslev, H., Navarrete, H., De la Torre, L., & Macía, M. (2008). Enciclopedia De Plantas Útiles Del Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU*, 1, 1–3.
- Bawankar, R., Deepti, V., Subashkumar, R., Vivekanandhan, G., Babu, S. (2013) Evaluation of Bioactive Potencial of an Aloe vera Sterol Extract. *Phytotherapy research*, 27, 864-868.
- Bhattacharya, A. K., & Rana, K. C. (2013). Antimycobacterial agent , (E) -phytol and lauric amide from the plant *LAGASCEA mollis*. *Indian Journal of Chemistry*, 52, 901–903.
- Burdi, D. K., & Hasan, M. (1991). Diterpene fatty acid ester from *leucas nutans*. *Journal of Natural Products*, 54(5), 1444–1446.
- Carretero, M., López, J., Abad, M., Bermejo, P., Tillet, S., Israel, A., & Noguera, B. (2008). Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 11-15.

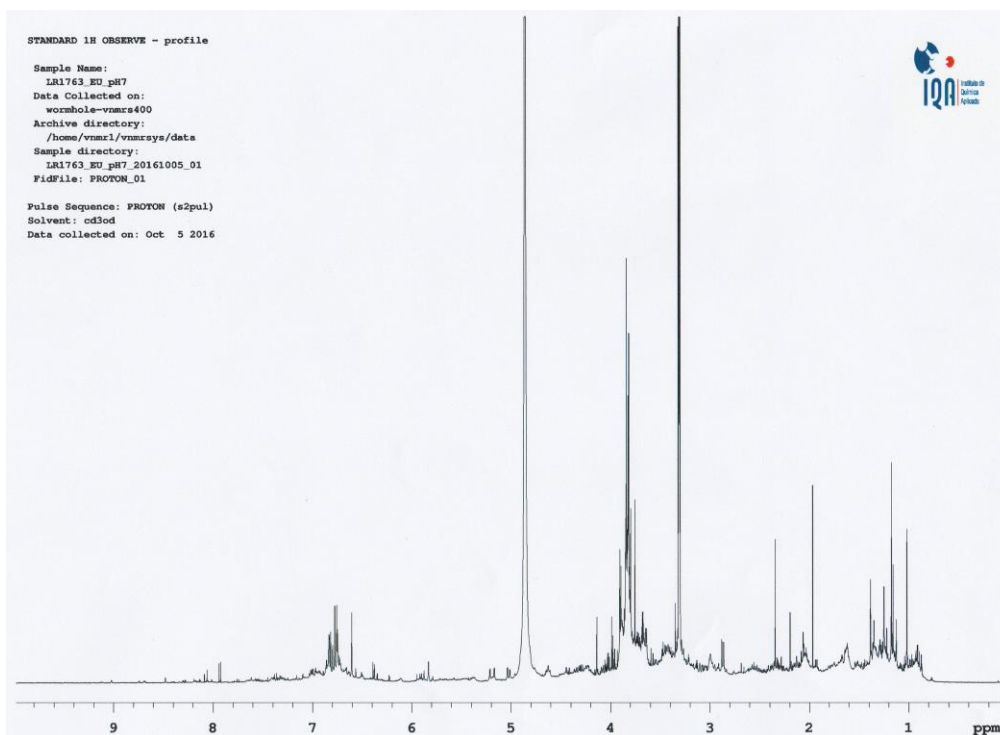
- Cerón, C. (2006). *Plantas Medicinales de Los Andes Ecuatorianos*. Botánica Económica de los Andes Centrales, 285-293.
- Cruz, C., González, M., & Morocho, L. (2010). *Plantas Medicinales, Plaguicidas, y Tóxicas de la Región Sur del Ecuador: Estudio Fitoquímico y de Toxicidad en Zamora Chinchipe*. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador. Revista del centro de estudios y desarrollo de la Amazonía, 1(1).
- Dawidar, A., Ayyad, S., Moratda, M., & Raghieb, H. (2015). Molluscicidal activity and chemical constituents *Erythrina ulei* AGAINST *Monacha cartusiana*, (June), 60–64.
- Delange, D., Bode, T., Cuéllar, A., Lizama, R., & Salas, E. (2014). Estudio por CG-EM de los componentes volátiles de las hojas de *Petiveria alliacea* L. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 45, 48–51.
- Gómez, A. (2012). *Caracterización con Marcadores RAM's de Algunas Especies del Género Erythrina Presente*. Universidad Nacional de Colombia, 15-29.
- Gupta, M. (2001). *Natural Products Research in Latin America*. Pharmaceutical Biology, 39, 80-91.
- Harris, D. (2012). *Análisis químico cuantitativo, Tercera Edición*. Editorial: Reverté, 517, 532, 579, 593-594.
- Herrera, C. (2013). *Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie Lycopodium complanatum*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Kumara, S. Pathaniab, A. Saxenab, A. Vishwakarmac, R. Alia, A. Bhushanb, S. (2013). The anticancer potential of flavonoids isolated from the stem bark of *Erythrina suberosa* through induction of apoptosis and inhibition of STAT signaling pathway in human leukemia HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 205(2), 128-137.
- Kwamou, GMN; Sandjo, LP; Kuete, V; Wandja, AAK; Tankeo, SB; Efferth, T; Nkengfack, AE. (2015). Unprecedented new nonadecyl para-hydroperoxycinnamate isolated from *Erythrina excelsa* and its cytotoxic activity.
- Lock, O. (1994). *Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios*. Pontificia Universidad Católica del Perú, 1, 41-64.
- McMurry, J. (2012). *Química Orgánica*. Cengage Learning.
- Njamena, D. Tallab, E. Tanyi Mbaforb, J. Tane Fomumb, Z. Kamanyic, A. Mbanyad, J. Cerdá-Nicoláse, M. (2003). Anti-inflammatory activity of erycristagallin, a pterocarpene from *Erythrina mildbraedii*. *European Journal of Pharmacology*, 468(1), 67-74.
- Nkengfack, A. Vardamidesa, J. Tane Fomum, Z. Meyer, M. (1995). Prenylated isoflavanone from *Erythrina eriotricha*. *Phytochemistry*, 40(6), 1803-1808.
- Olivas, M., & Barraza, G. (2011). *Manual de Prácticas, Química Orgánica*. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. Instituto de Ciencias Biomédicas.
- OMS. (2002-2005). *Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional*.

- Pino-Rodríguez, S., Prieto-González, S., Pérez-Rodríguez, M., & Molina-Torres, J. (2003). *Género Erythrina: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica*. Acta Farmacéutica Bonaerense, 23(2), 252-258.
- Quattrochi, U. (2010). *World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants*.
- Quiroz, N. (Marzo de 2008). *Estudio Para La Creación de Una Hostería Ecoturística Ubicada al Noroccidente de la Ciudad de Quito, Parroquia Nanegalito*. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolqui.
- Rocha, L. (2000). *Control de Calidad de Productos Fitoterapéuticos. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*, 78, 157.
- Sharma, R., Kishore, N., Hussein, A., & Lall, N. (2014). The potential of Leucosidea sericea against Propionibacterium acnes. *Phytochemistry Letters*, 7(1), 124–129. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.11.005>
- Shriver, D., Atkins, P., & Langford, C. (2004). *Química Orgánica, Segunda Edición*. Murcia: Reverté S.A.
- Son, S., Kim, H., Choi, G., Lim, H., Jang, K., Lee, S., . . . Kim, J. (2008). Bikaverin and fusaric acid from Fusarium oxysporum show antioomycete activity against Phytophthora infestans. *Applied Microbiology*, 104(3), 692-698.
- Tesso, H. (2005). *Isolation and Structure Elucidation of Natural Products from Plants*. Hamburg: Institute of Organic Chemistry. University of Hamburg, 126-131.
- Trujillo-Trujillo, E., Frausin, G., Correa, M., & Trujillo-C, W. (2007). *Sobre la Presencia de Erythrina ulei Harms (Fabaceae) en Colombia*. Universidad de la Amazonía: Momentos de ciencia, 4, 1-2.
- Vallejo, M. (2010). *Diversidad Biológica del Ecuador*. Quito, Ecuador: Universidad Equatorialis.
- Vallejo, S., Quingaísa, E., Ortiz, P., & Vinuesa, L. (2007). *El Agro y Vida Rural en Ecuador*. Quito, Ecuador: Comportamiento 2000-2007 y Perspectivas 2008, IICA.
- Van Den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11(3), 463–471. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
- Yaluff, G., Maldonado, M., Ferreira, M., Benitez, B., López, T., & Vera, N. (2015). *Actividad Antiparasitaria In Vitro de Extractos Etanólicos de Erythrina crista-galli L., Erythrina falcata Benth y Erythrina dominguezii Hassl*. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. 13(2), 60-66.
- Yurkanis, P. (2007). *Fundamentos de Química Orgánica*. Pearson Education. Primera Edición.

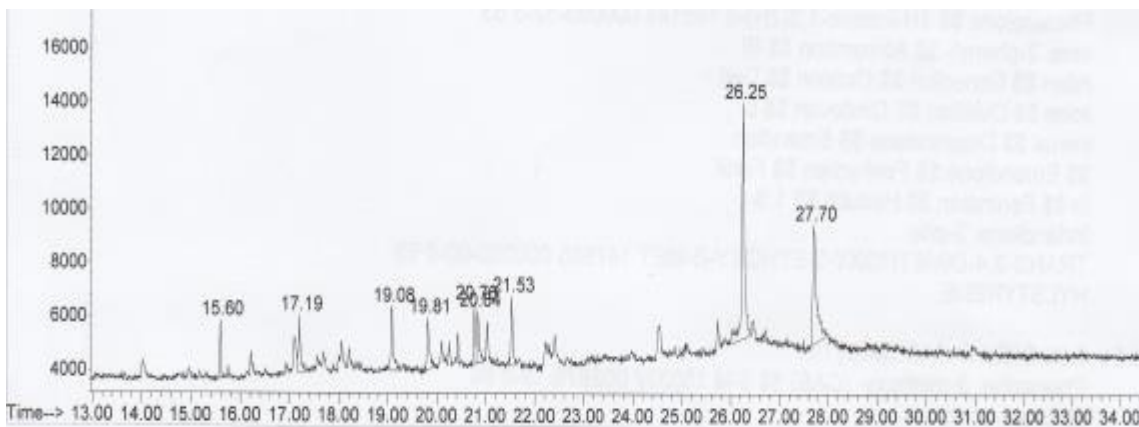
ANEXOS



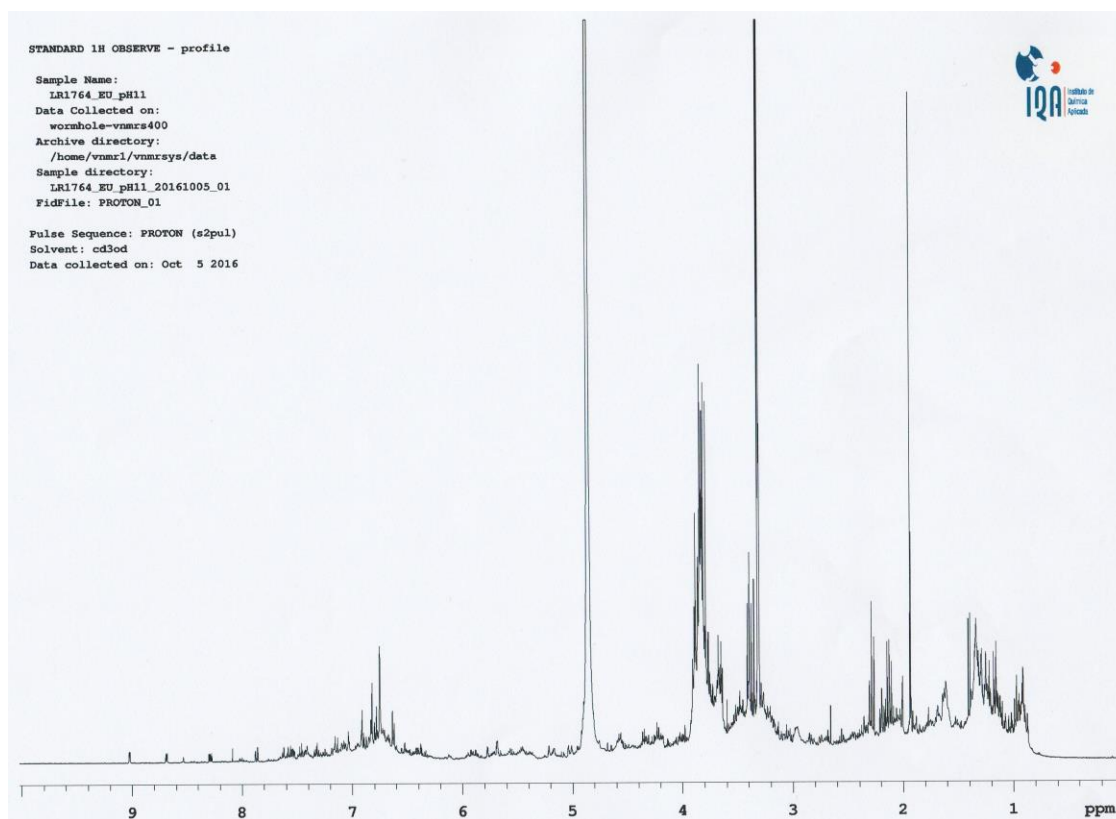
Espectro Nro 1. Espectro de CG de la fracción alcaloidea en pH 7, se muestran los 10 tiempos de retención detectados, $t_R = 6.93, 17.21, 17.57, 18.46, 25.09, 25.74, 25.85, 26.04, 26.25, 27.71$ min.



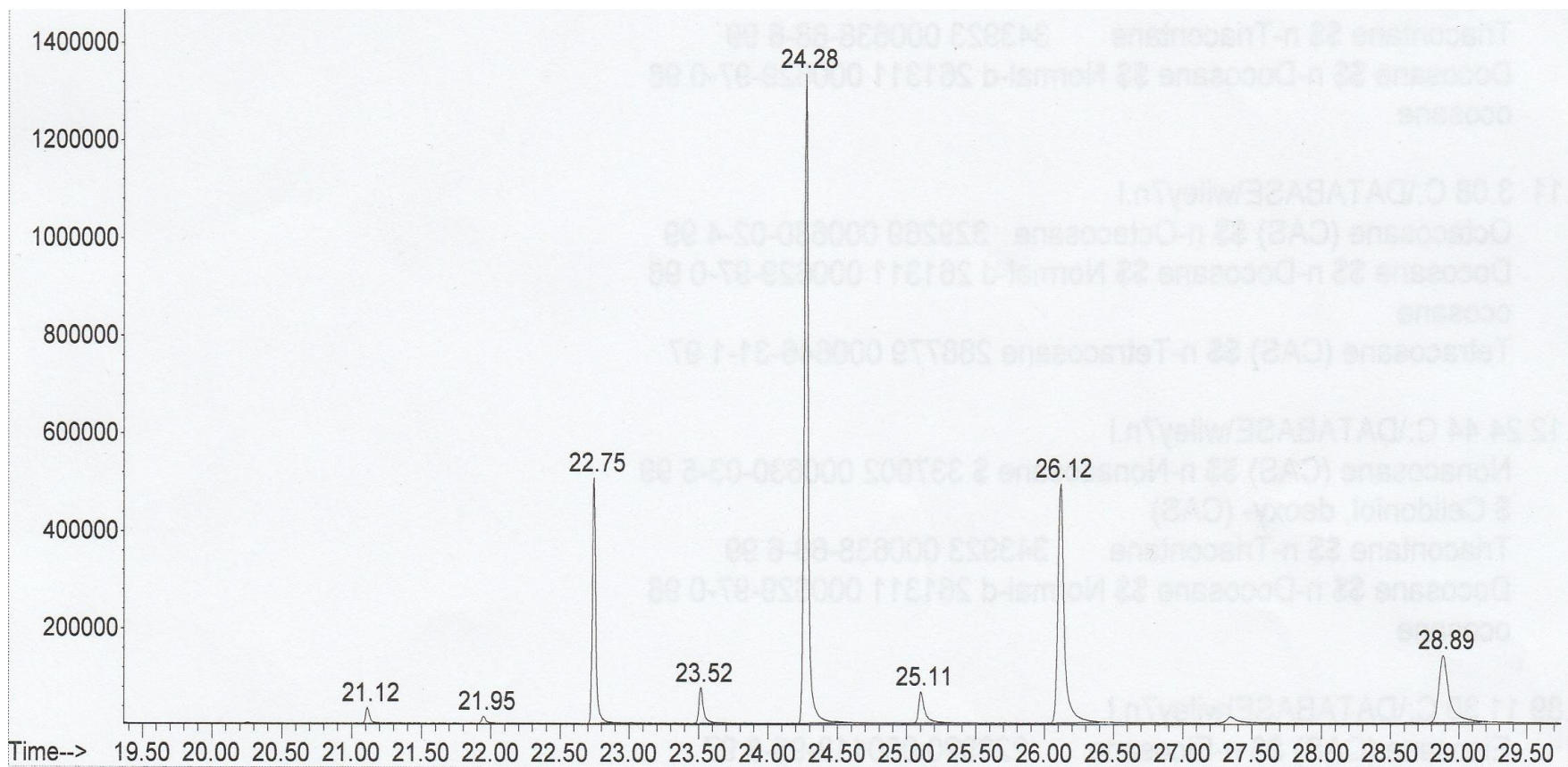
Espectro Nro 2. Espectro de RMN ¹H de la fracción alcaloidea en pH 7 del extracto metanólico de hojas.



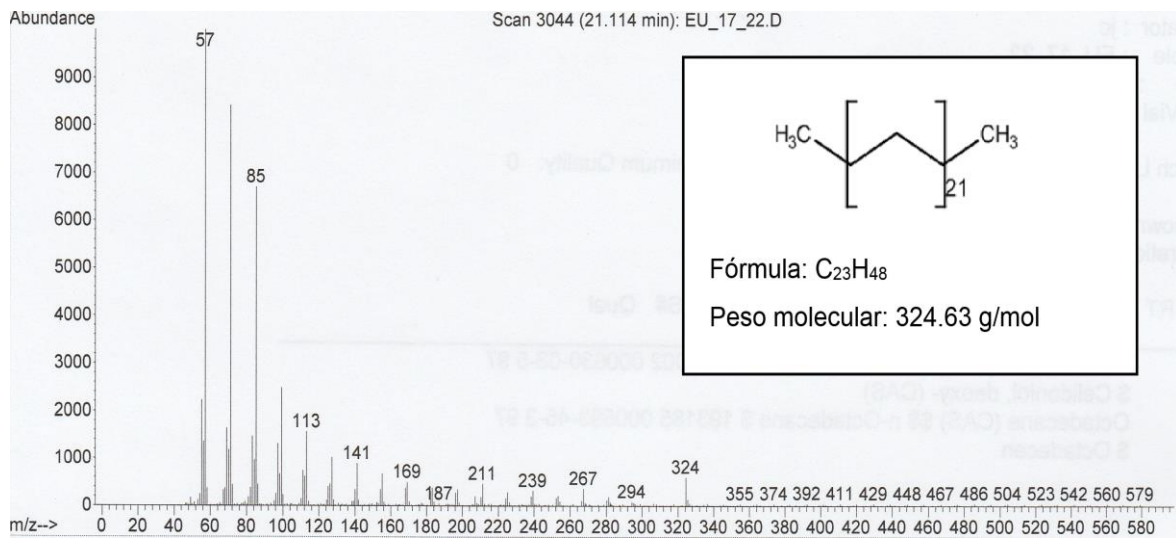
Espectro Nro 3. Espectro de CG de la fracción alcaloidea en pH 11, se muestran los 9 tiempos de retención detectados, $t_R = 15.60, 17.19, 19.07, 19.81, 20.76, 20.84, 21.53, 26.25, 27.70$ min.



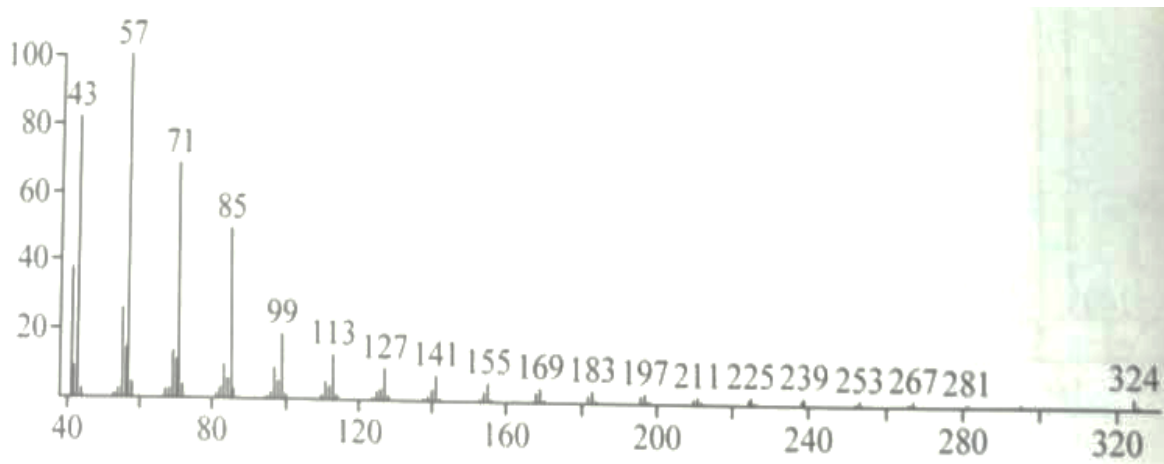
Espectro Nro 4. Espectro de RMN ^1H de la fracción alcaloidea en pH 11 del extracto metanólico de hojas.



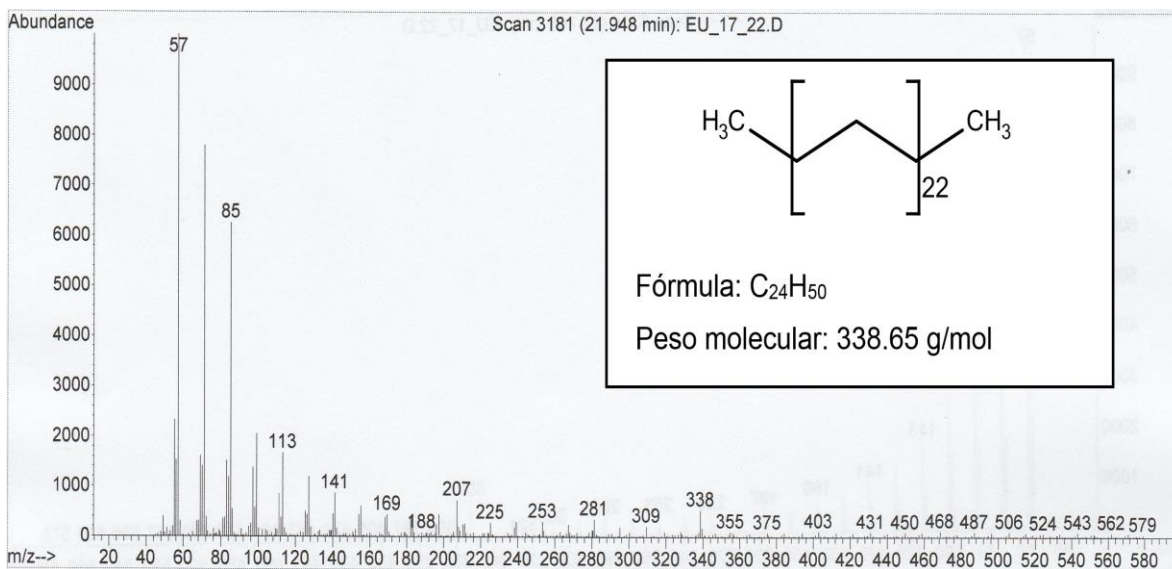
Espectro Nro 5. Espectro de CG de la fracción AcOEtFF4, del extracto de acetato de etilo de flores, se muestran los 8 tiempos de retención detectados, $t_R = 21.11, 21.95, 22.75, 23.52, 24.27, 25.11, 26.12, 28.89$ min.



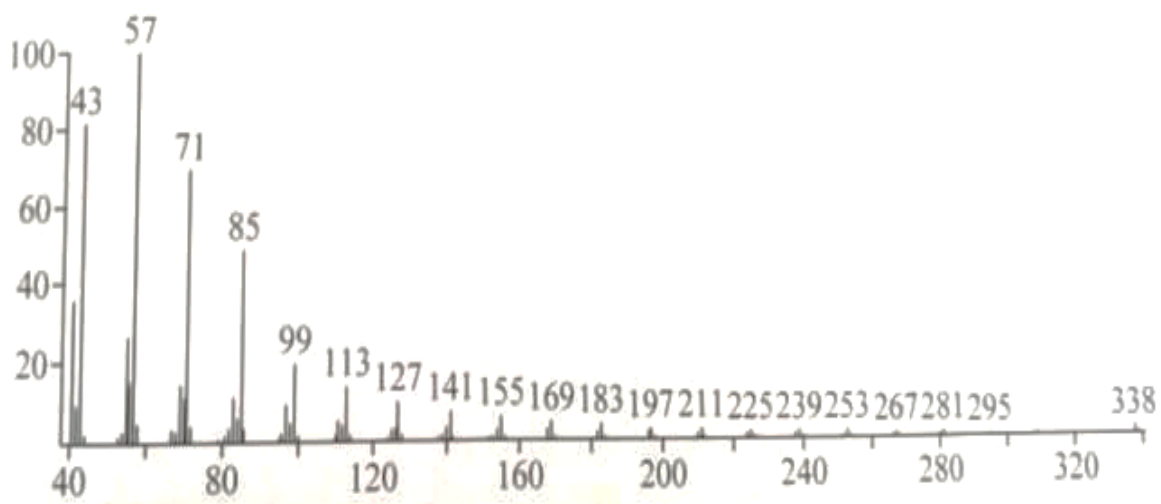
Espectro Nro 6A. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Tricosano con un $t_R = 21.12$ min, de la fracción AcOEtFF4



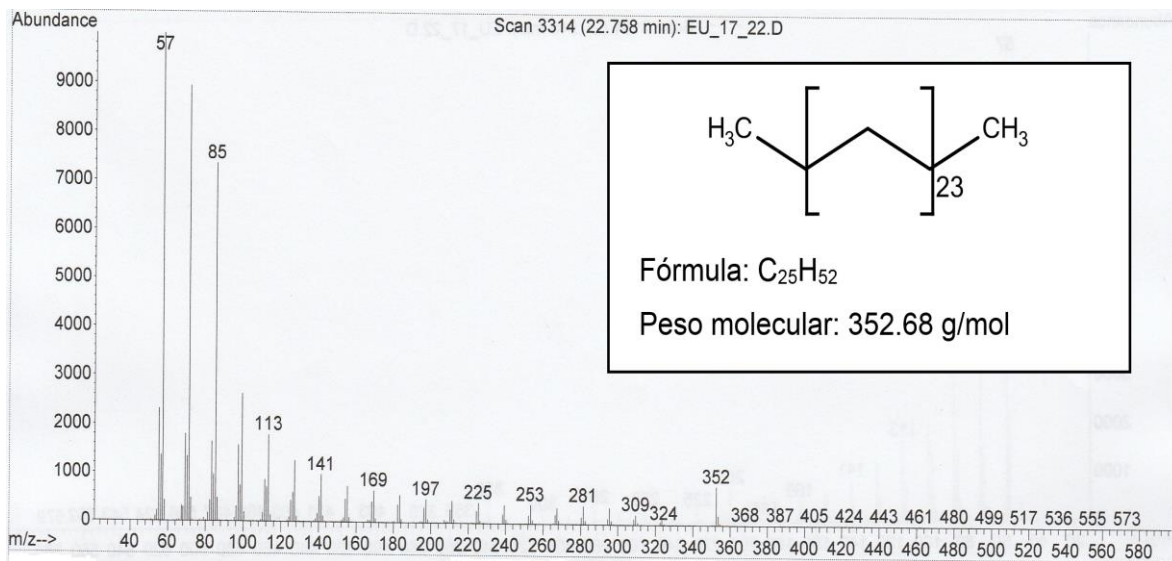
Espectro Nro 6B. Espectro de masas del compuesto identificado como Tricosano con el índice de retención de 2300 obtenido de (Adams, 2007).



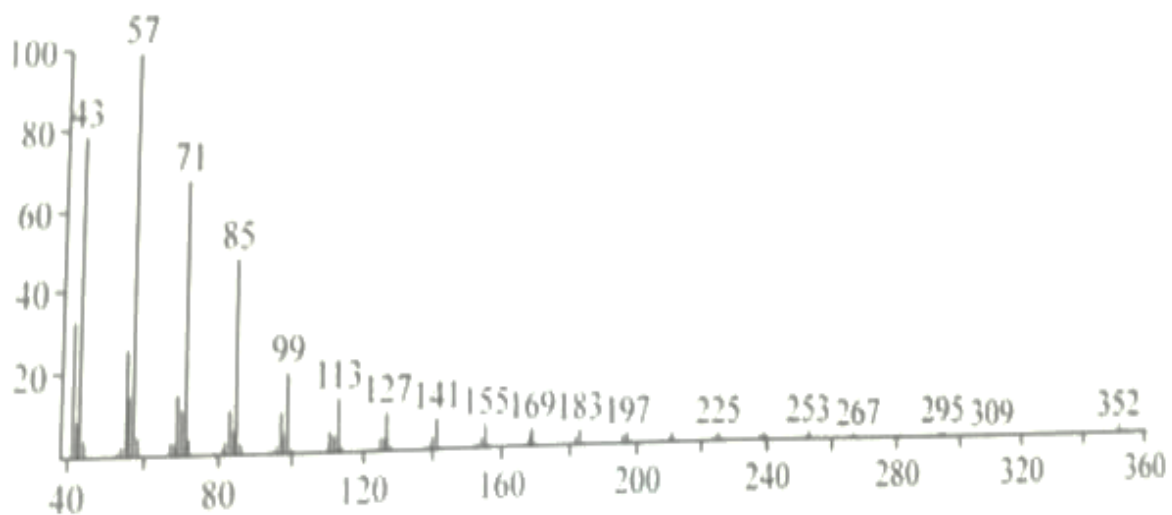
Espectro Nro 7A. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Tetracosano con un $t_R = 21.95$ min, de la fracción AcOEtFF4



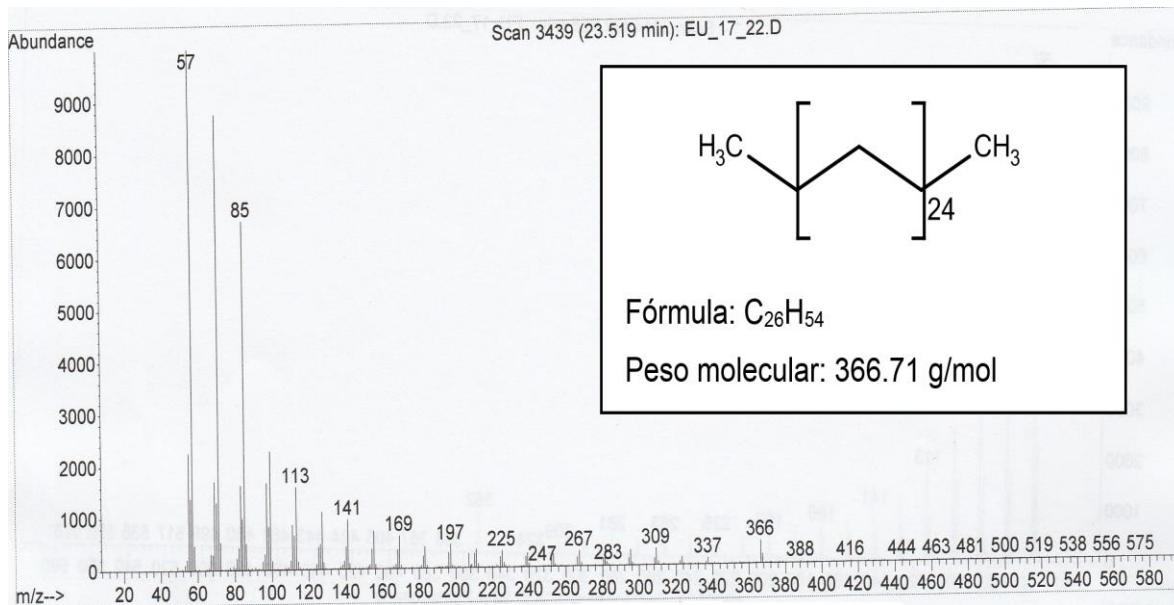
Espectro Nro 7B. Espectro de masas del compuesto identificado como Tetracosano con el índice de retención de 2400, obtenido de (Adams, 2007).



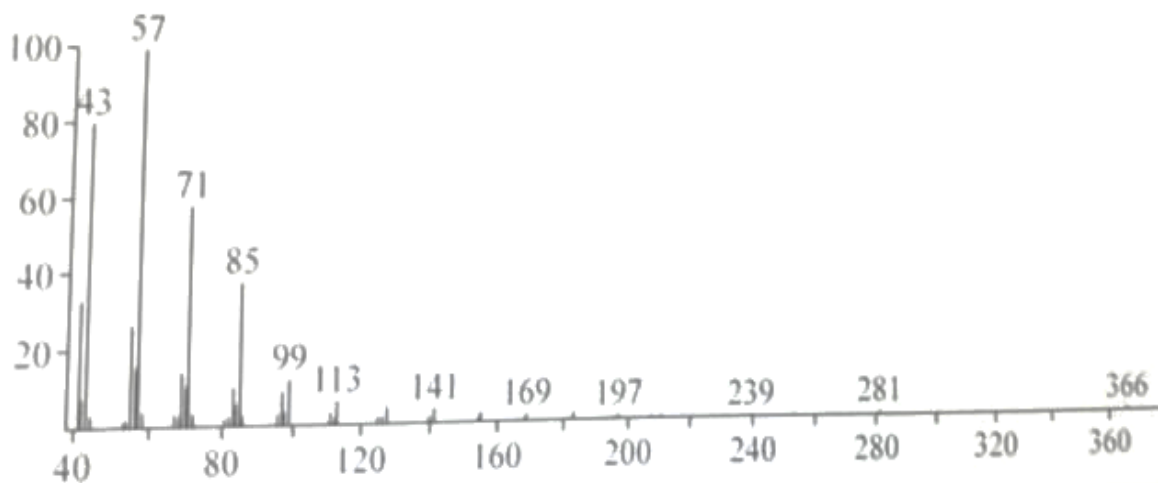
Espectro Nro 8A. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Pentacosano con un $t_R = 22.75$ min, de la fracción AcOEtFF4



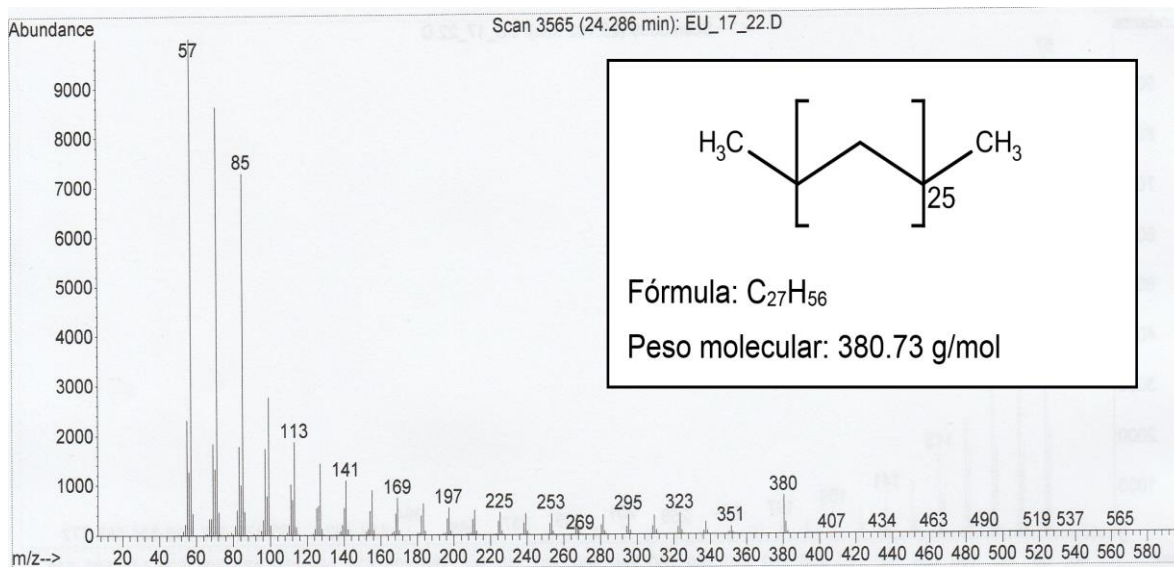
Espectro Nro 8B. Espectro de masas del compuesto identificado como Pentacosano con el índice de retención de 2500, obtenido de (Adams, 2007).



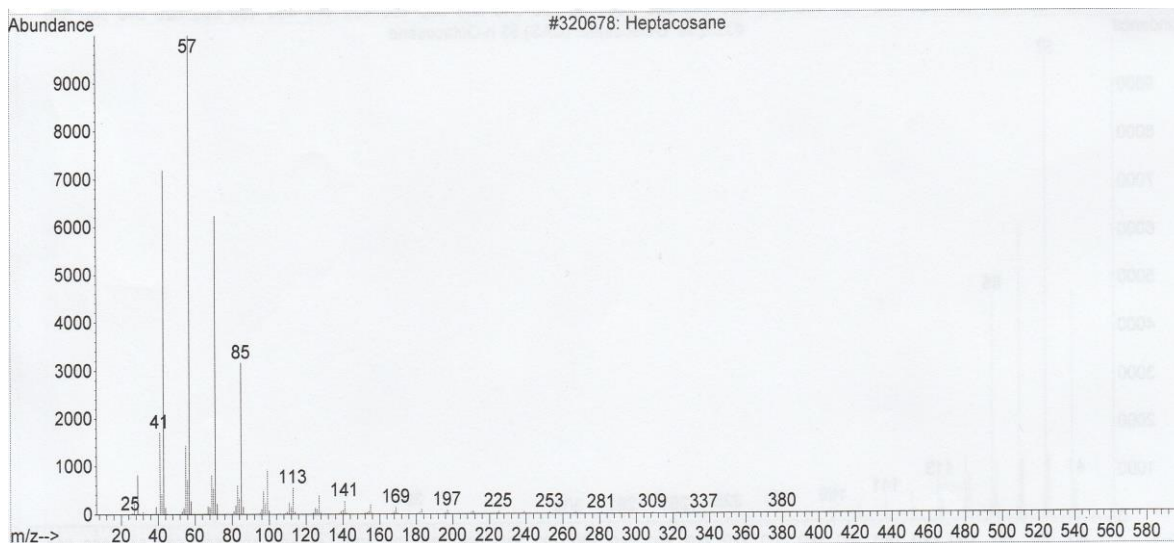
Espectro Nro 9A. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Hexacosano con un $t_R = 23.52$ min, de la fracción AcOEtFF4



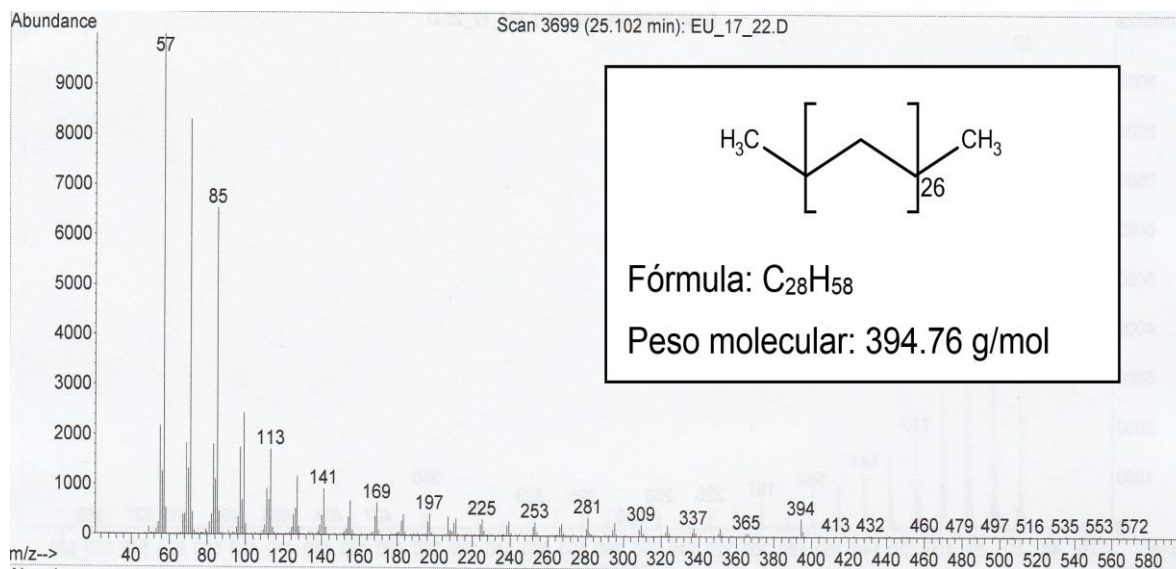
Espectro Nro 9B. Espectro de masas del compuesto identificado como Hexacosano con el índice de retención de 2600, obtenido de (Adams, 2007).



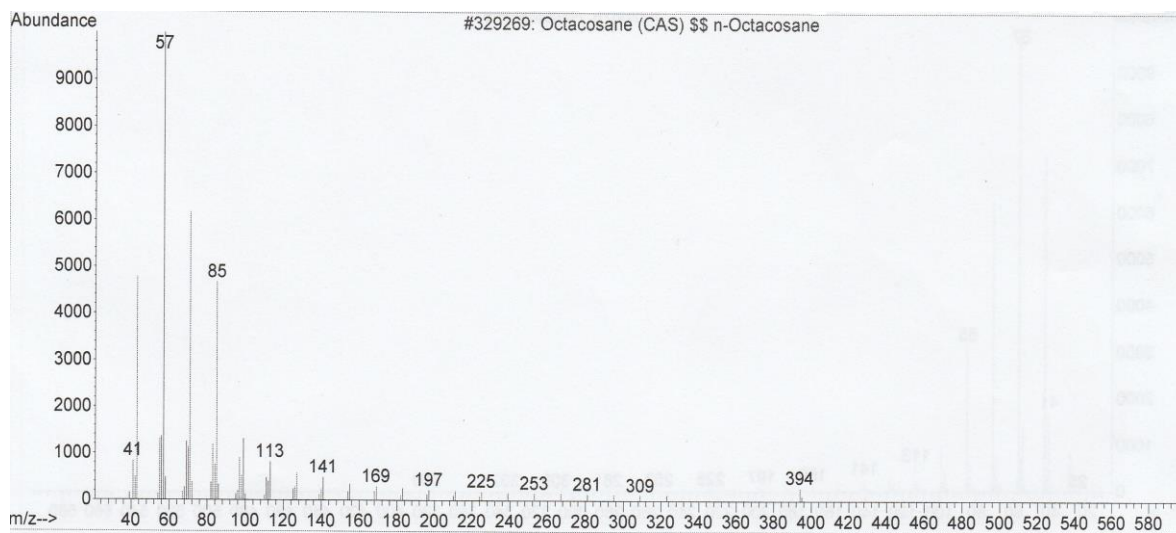
Espectro Nro 10A. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Heptacosano con un $t_R = 24.27$ min, de la fracción AcOEtFF4



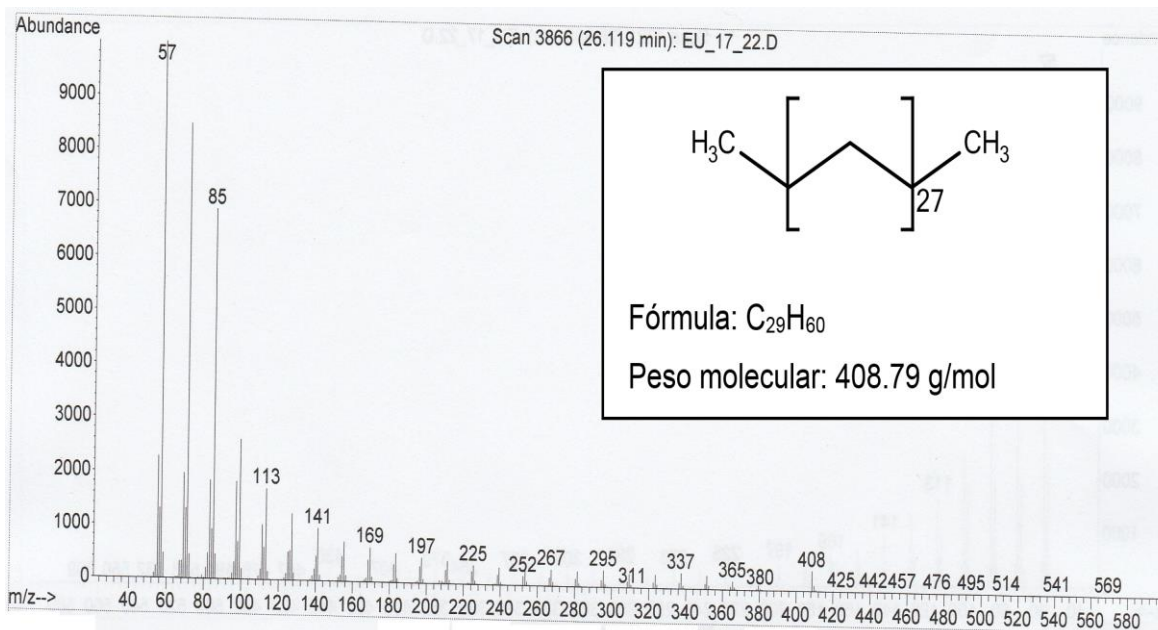
Espectro Nro 10B. Espectro de masas de la base de datos Wiley 7n.l del compuesto identificado como Heptacosano.



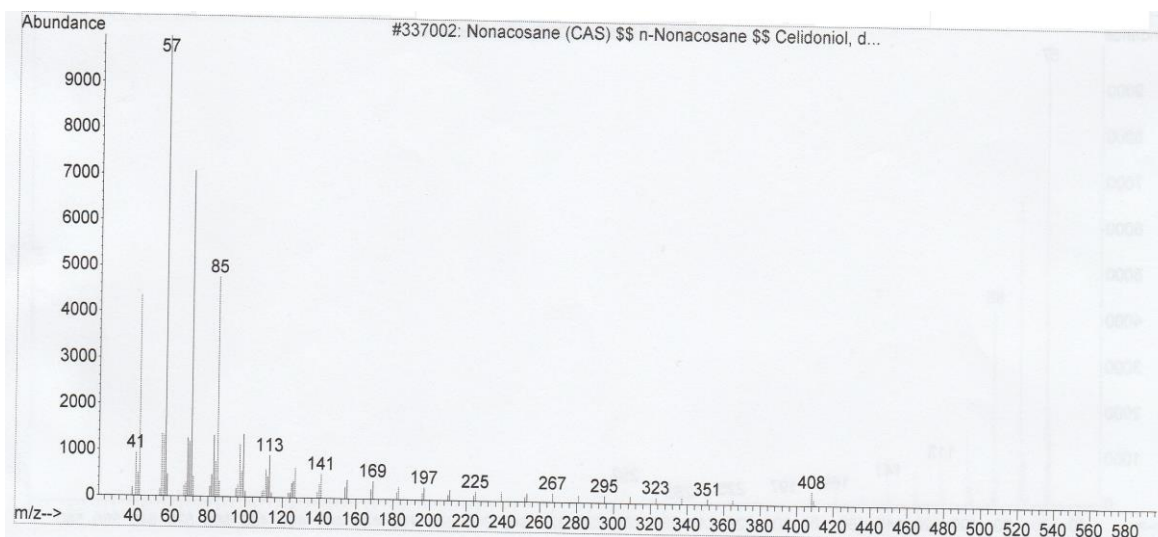
Espectro Nro 11A. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Octacosano con un $t_R = 25.11$ min, de la fracción AcOEtFF4.



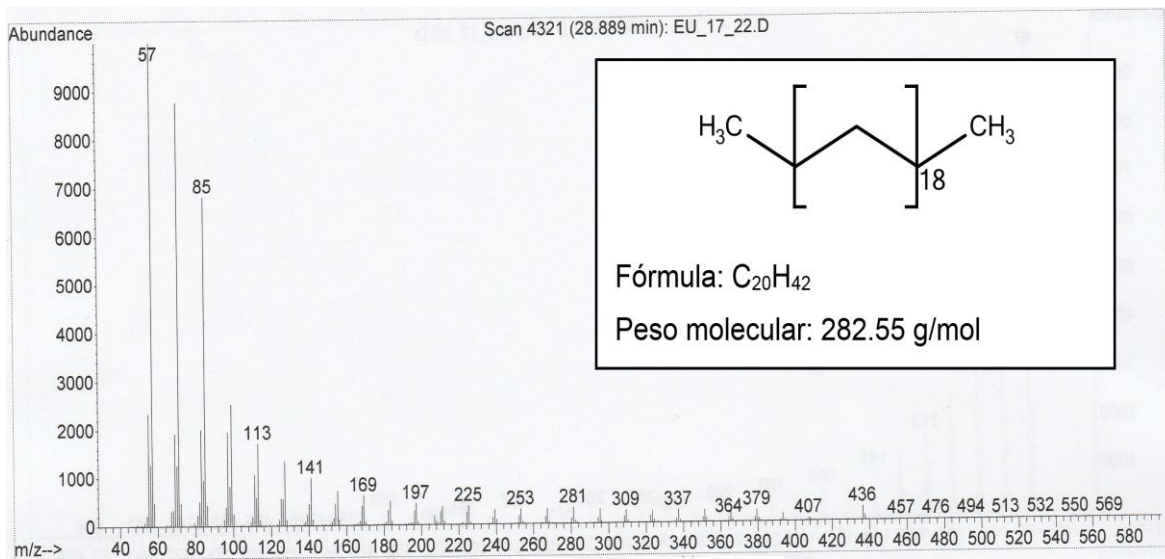
Espectro Nro 11B. Espectro de masas de la base de datos Wiley 7n.I del compuesto identificado como Octacosano.



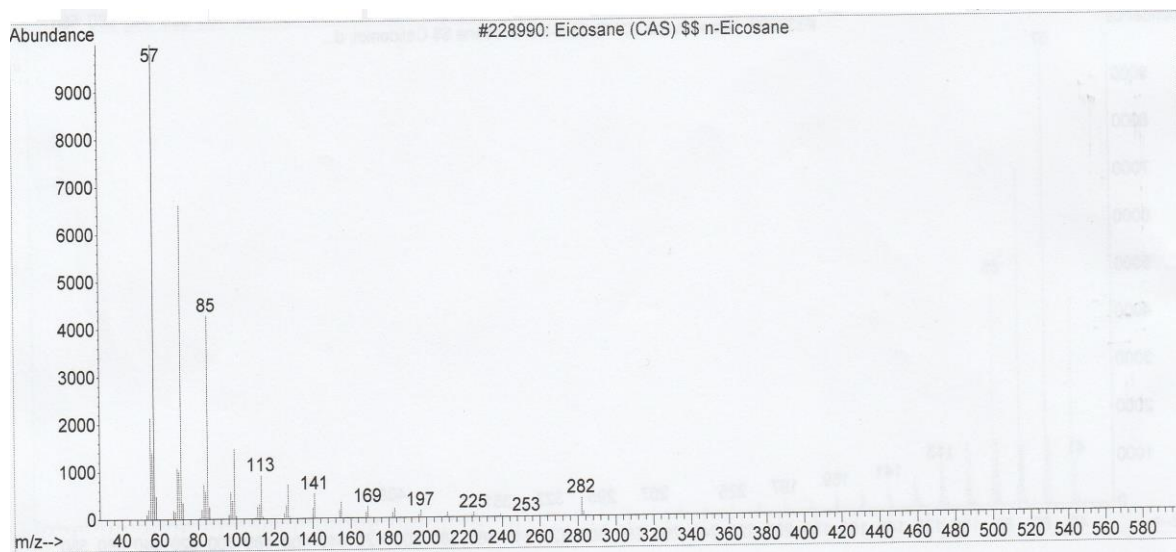
Espectro Nro 12A. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Nonacosano con un $t_R = 26.12$ min, de la fracción AcOEtFF4.



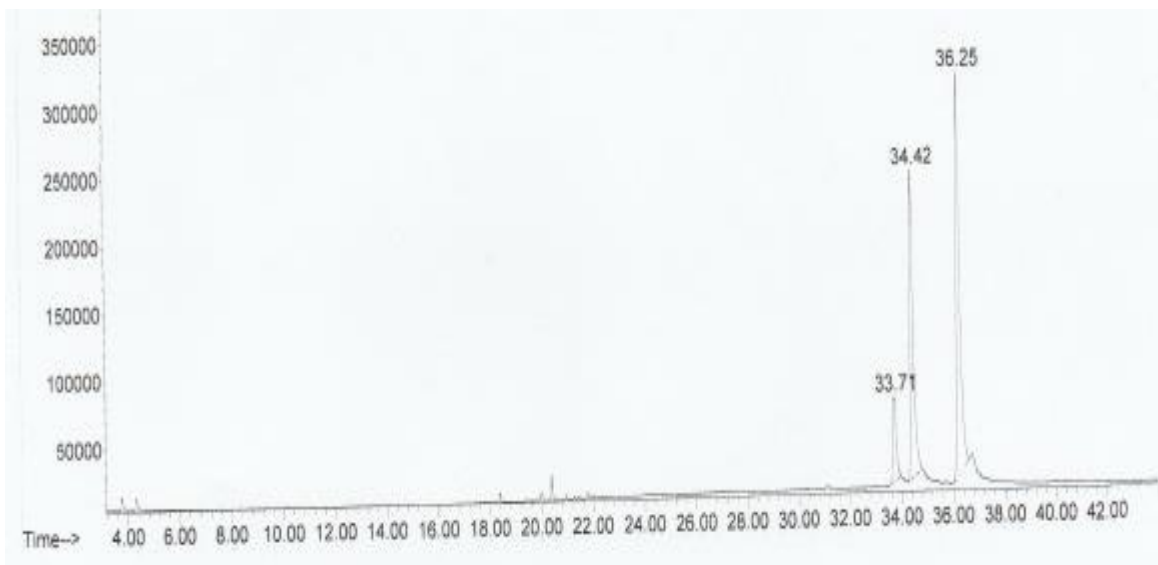
Espectro Nro 12B. Espectro de masas de la base de datos Wiley 7n.l del compuesto identificado como Nonacosano.



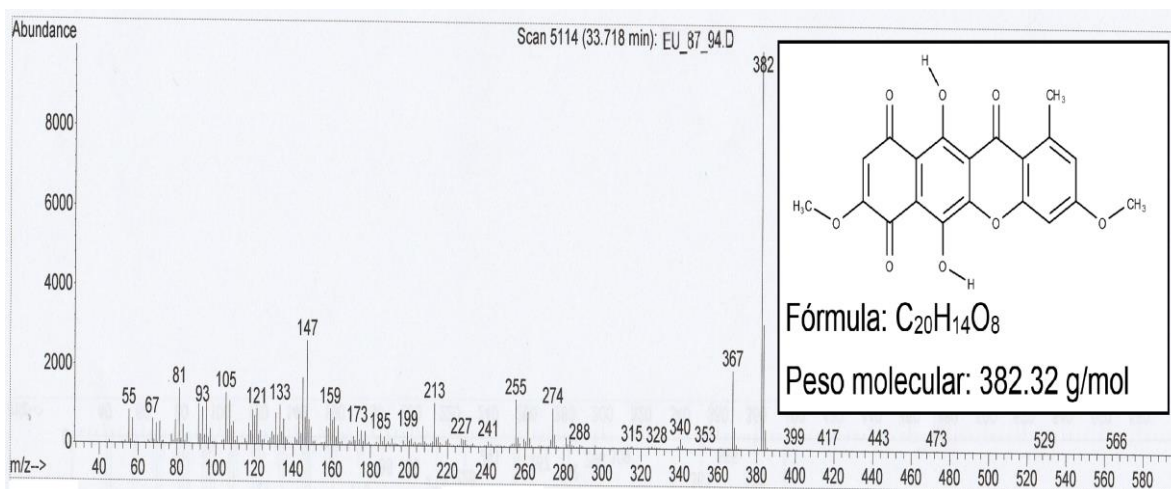
Espectro Nro 13A. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Eicosano con un $t_R = 28.89$ min, de la fracción AcOEtFF4.



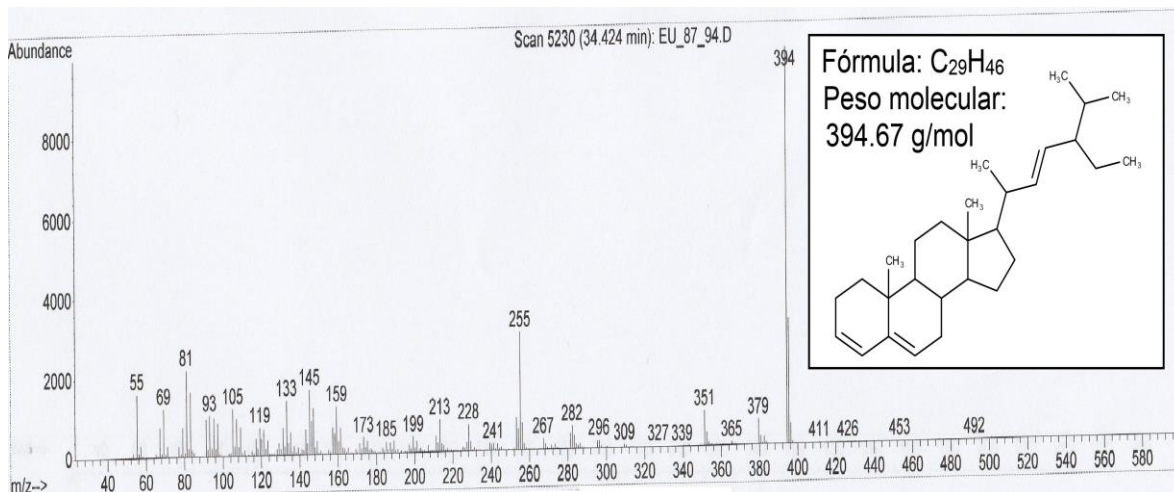
Espectro Nro 13B. Espectro de masas de la base de datos Wiley 7n.I del compuesto identificado como Eicosano.



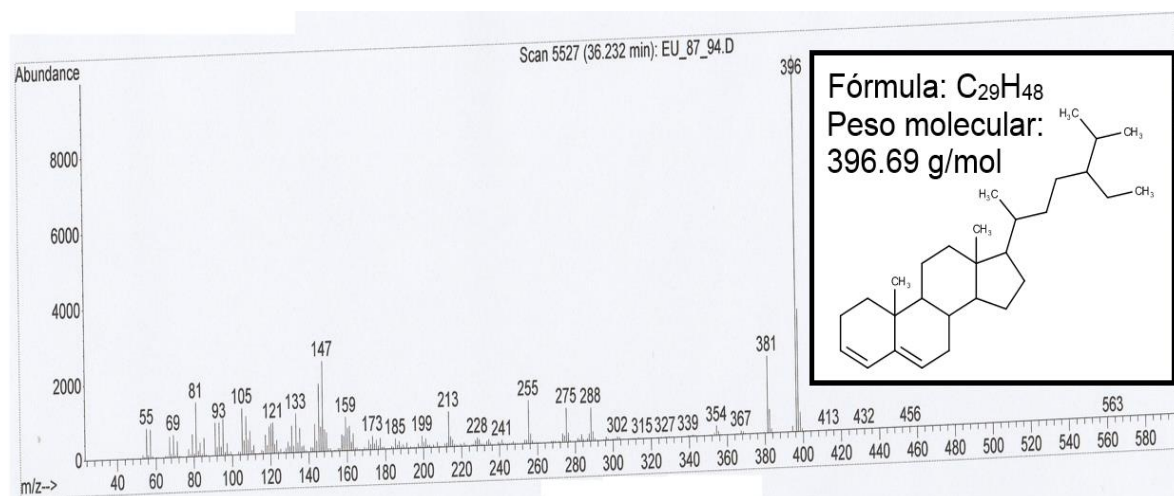
Espectro Nro 14. Espectro de GC de la fracción AcOEtFF13, del extracto de acetato de etilo de flores, se muestran los 3 tiempos de retención detectados: 33.71, 34.42 y 36.25 min.



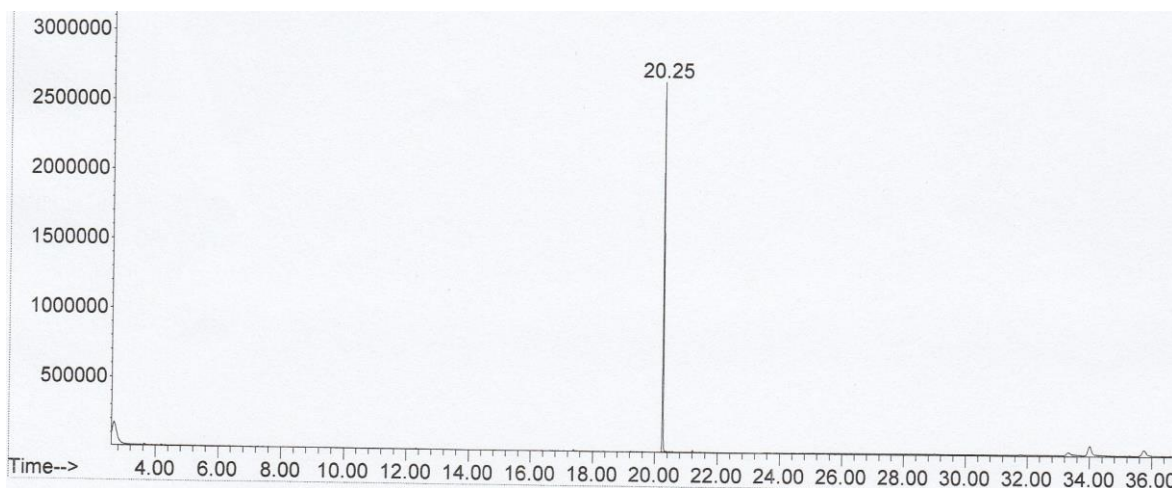
Espectro Nro 15. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Bikaverin con un $t_R = 33.71$ min, de la fracción AcOEtFF13



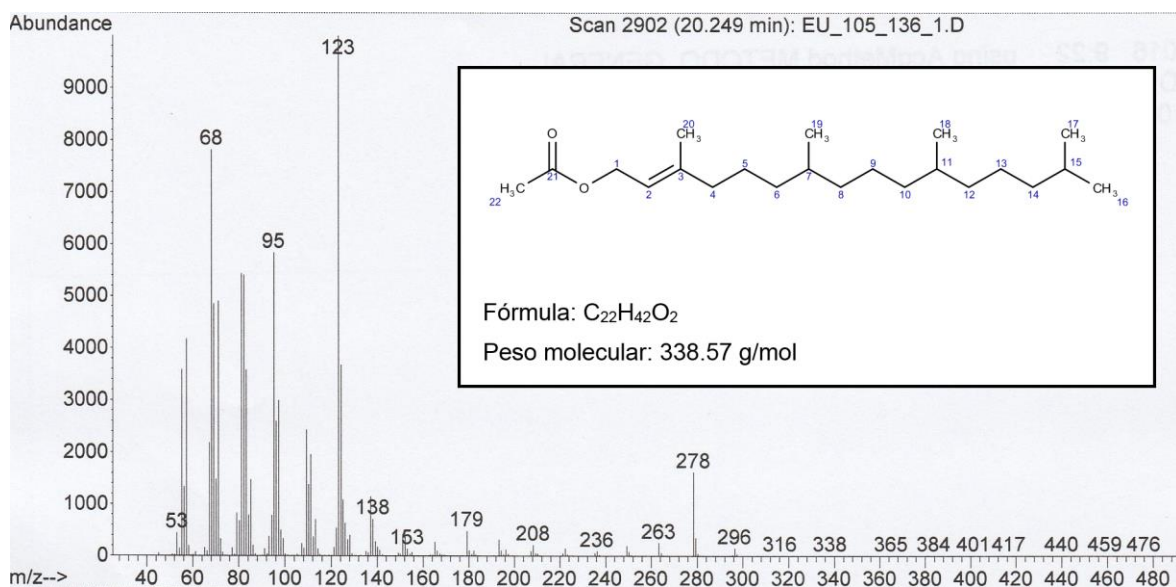
Espectro Nro 16. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como estigmastan – 3,5,22, trien con un $t_R = 34.42$ min, de la fracción AcOEtFF13



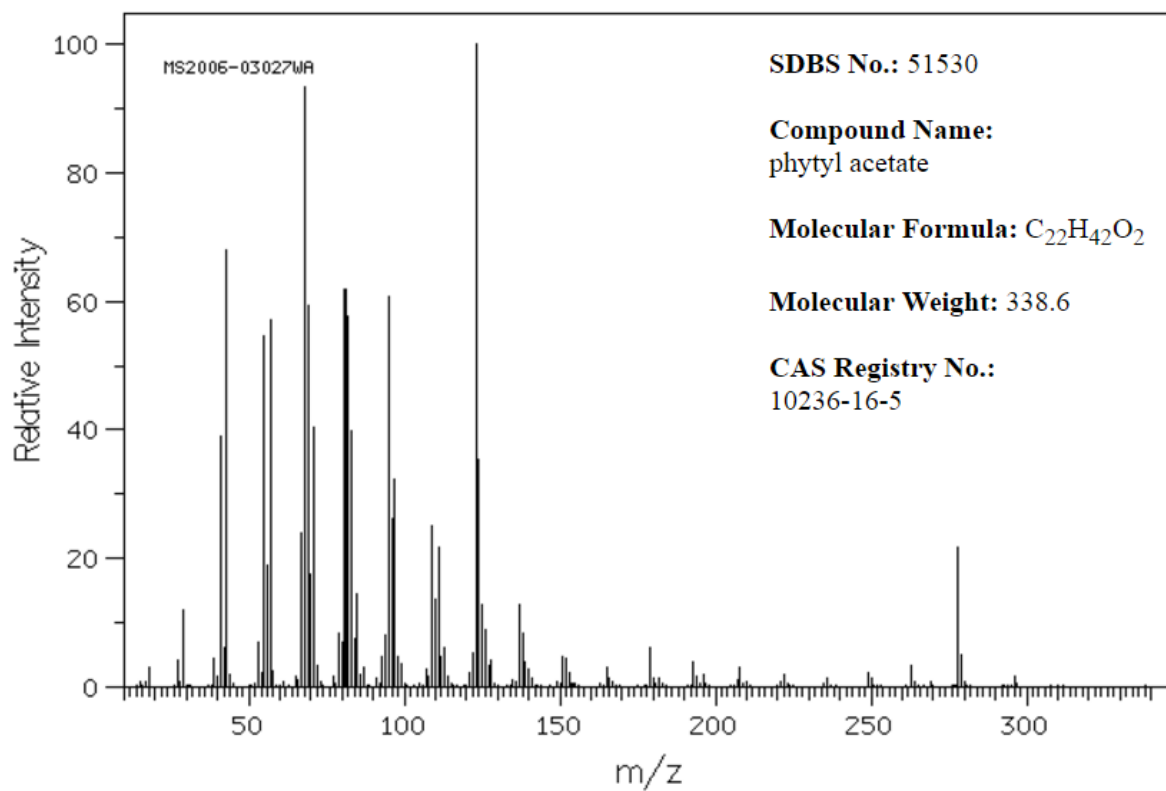
Espectro Nro 17. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como estigmastan – 3,5, dien con un $t_R = 36.25$ min, de la fracción AcOEtFF13



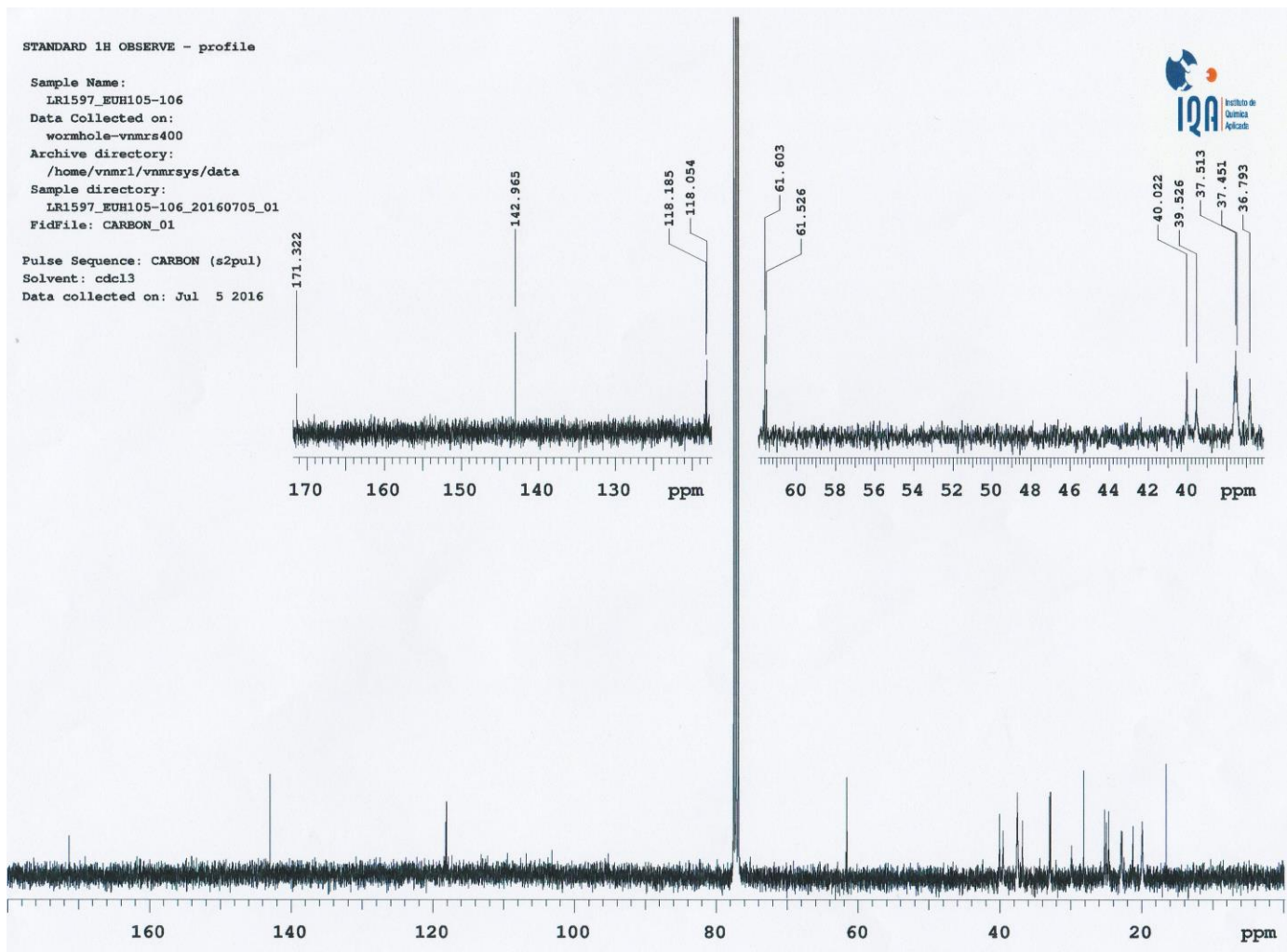
Espectro Nro 18. Espectro de CG de la fracción AcOEtHFM18-11, del extracto de acetato de etilo de hojas, se muestran los 5 tiempos de retención detectados, $t_R = 20.25, 21.21, 33.32, 34.01, 35.75$ min.



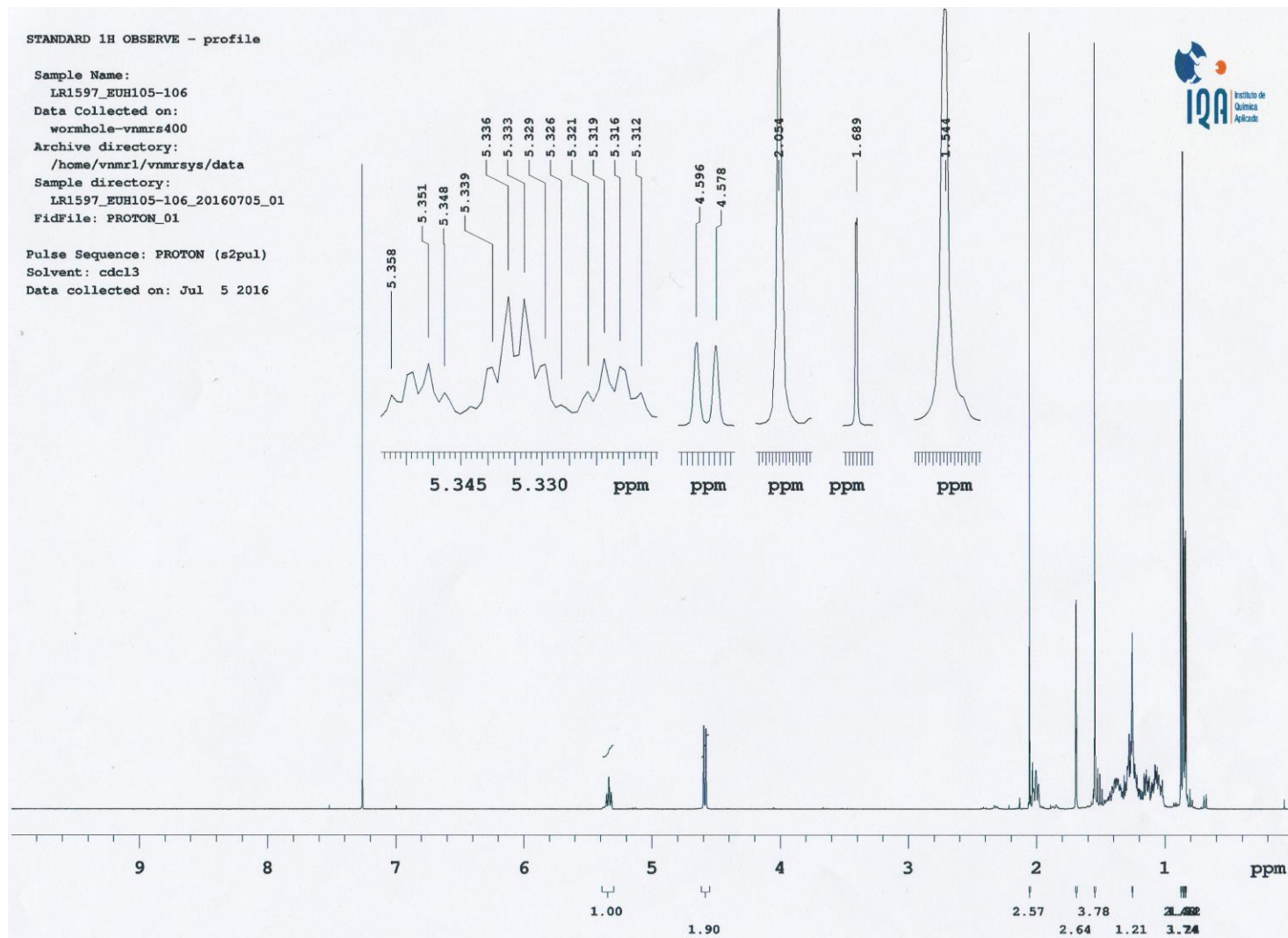
Espectro Nro 19. Espectro de masas del compuesto identificado como fitol acetato de la fracción AcOEtHFM18-11.



Espectro Nro 19-1. Espectro de masas del compuesto identificado como fitol acetato de la base de datos spectral database for organic compounds SDBS.



Espectro Nro 20. Espectros de RMN ^{13}C del compuesto fitol acetato (12) del extracto de acetato de etilo – hojas.



Espectro Nro 21. Espectros de RMN ^1H del compuesto fitol acetato (**12**) del extracto de acetato de etilo – hojas.