



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO.

Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Erythrina edulis*.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Loyola Reascos, María Cristina.

DIRECTOR: Romero Benavides, Juan Carlos, Ph.D.

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 DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph. D.

Juan Carlos Romero Benavides.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: "Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Erythrina edulis*" realizado por Loyola Reascos María Cristina; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2016

f) _____

Juan Carlos Romero Benavides, Ph.D.

C.I : 1103018477

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo María Cristina Loyola Reascos declaro ser autor (a) del presente trabajo de titulación: “Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Erythrina edulis*”, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo 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 y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f) _____

Autora: María Cristina Loyola Reascos.

C.I: 1105004442

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación, va dedicado, primeramente a Dios, él es la persona que me acompañado a los largo de mi carrera universitaria dándome tranquilidad, sabiduría y salud para alcanzar mi meta propuesta. A mis padres: Fernando y Mónica quienes día a día luchan y se esfuerzan por darme lo mejor; por enseñarme a ser una persona de bien, inculcándome valores para mi diario vivir. A mi hermano Cristian, por su inmenso amor y cariño. Y finalmente a dos persona muy importantes en mi vida, mis abuelitos Oswaldo y Olguita, dos personas que me acompañaron en toda mi carrera universitaria, brindándome cariño incondicional y apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Le doy gracias a mis padres Fernando y Mónica por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. A mi hermano Cristian Fernando sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Ph.D. Juan Carlos Romero Benavides, director del presente trabajo de fin de titulación, por compartir su amplio conocimiento científico y de esta manera contribuir al desarrollo de la investigación.

Al Departamento de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja, por el servicio brindado para el desarrollo de la investigación.

Mi agradecimiento al Bioquímico Farmacéutico Ronald Silva, por sus enseñanzas en las técnicas empleadas para el aislamiento de metabolito secundarios y por su amistad brindada.

Este proyecto se desarrolló gracias al financiamiento otorgado por la SENECYT (Código PIC-13-INSPI-005) Y por la UTPL Código (PROY_FIN_QUI_0008).

Cristina L.

INDICE DE CONTENIDOS.

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ABREVIATURAS	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.	5
1.1. Fin del proyecto.....	6
1.2. Propósito del proyecto.	6
1.3. Componentes del Proyecto.	6
CAPÍTULO II FUNDAMENTO TEÓRICO.	7
2.1. Biodiversidad del 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>	11
2.5. Descripción de la especie <i>Erythrina edulis</i>	14
2.6. Técnicas utilizadas en la elucidación de metabolitos secundarios y su importancia.....	15
2.6.1. Cromatografía.	15
2.6.2. Cromatografía en capa fina (CCF).	16
2.6.3. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM).	16
2.6.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	16
2.6.5. Cristalización.....	17
2.6.6. Punto de Fusión.....	17
CAPÍTULO III MÉTODOS.....	18
3.1. Recolección de la especie.	20
3.1. Materia Vegetal.	21

3.2. Obtención de extractos.....	21
3.3. Fraccionamiento de los extractos.....	22
3.3.1. Cromatografía en Columna.....	22
3.3.2. Cromatografía en Capa Fina.....	22
3.4. Microcolumna.....	22
3.5. Unión y Purificación.....	23
3.6. Caracterización de metabolitos secundarios.....	23
3.6.1. Punto de Fusión.....	23
3.6.2. Factor de Retención.....	24
3.6.3. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas.....	24
3.6.3. Espectroscopia de Resonancia Nuclear Magnética (RMN).....	25
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	26
4.1. Extractos obtenidos de la especie <i>Erythrina edulis</i>	27
4.2. Extracto de Acetato de Etilo (tallos).....	28
4.2.1. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto de Acetato de Etilo (tallos).....	28
4.2.2. Fracción AcOEt-T20.....	30
4.3. Extracto de Metanol (tallos).....	33
4.3.1. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto de Metanol (tallos).....	33
4.3.2. Fracción MeOH-T7.....	35
4.3.3. Fracción MeOH-T14.....	35
CONCLUSIONES.....	37
REFERENCIAS.....	38
ANEXOS.....	42

ABREVIATURAS

CCRF-CEM	Leucemia linfoblástica.
CEM/ADR5000	Leucemia linfoblástica aguda.
MDA-MB231	Adenocarcinoma de mama.
HCT116	Cáncer de colon.
U87MG	Cáncer de cerebro.
HepG2	Cáncer de hígado.
Hex	Hexano.
AcOEt	Acetato de etilo.
MeOH	Metanol.
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano.
CDCl ₃	Cloroformo adulterado.
CCF	Cromatografía en Capa Fina.
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
RMN	Resonancia Nuclear Magnética.
RMN ¹³ C	Resonancia Nuclear Magnética de carbono 13.
RMN ¹ H	Resonancia Nuclear Magnética de protón.
UV	Ultravioleta.
R _F	Factor de retención.
t _R	Tiempo de retención.
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50.
ED ₅₀	Dosis eficaz, para eliminar el 50% de las células/parásitos.

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructuras moleculares de los compuestos aislados a partir de las diferentes especies del género erythrina.	13
Figura 2. Metodología a desarrollar en la presente investigación.	19
Figura 3. Mapa del lugar de recolección de la especie vegetal <i>Erythrina edulis</i>	20
Figura 4. Equipo de Rotaevaporador.	21
Figura 5. Equipo Fisher Johns, serial 40-22 de 50-60 Hz.....	23
Figura 6. Cálculo del Factor de Retención.	24
Figura 7. Ferulato de tridecilo (1)	31
Figura 8. Estructuras de los compuestos presentes en el extracto de metanol (tallos) de la especie <i>Erythrina edulis</i>	36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la especie <i>Erythrina edulis</i>	15
Tabla 2. Condiciones de operación del equipo CG/EM.....	25
Tabla 3. Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de la especie <i>Erythrina edulis</i>	27
Tabla 4. Fracciones obtenidas a partir del Extracto de AcOEt (tallos).	28
Tabla 5. Unión de fracciones según su perfil cromatográfico.	29
Tabla 6. Datos espectroscópicos RMN ¹³ C del compuesto (1)	31
Tabla 7. Datos espectroscópicos RMN ¹ H del compuesto (1)	32
Tabla 8. Fracciones obtenidas a partir del Extracto de MeOH (tallos).....	33
Tabla 9. Unión de fracciones según su perfil cromatográfico.	34

RESUMEN.

Se realizó el estudio fitoquímico de la especie *Erythrina Edulis*, recolectada en el Barrio la Argelia, perteneciente a la Provincia de Loja, de las partes aéreas se obtuvieron extractos en polaridad ascendente hexano, acetato de etilo y metanol. El extracto con mayor rendimiento fue el de Acetato de Etilo (hojas) con 2.63%. Se obtuvo del extracto de Acetato de Etilo (tallos) un sólido blanquecino identificado como ferulato de tridecilo **(1)**, el mismo que presenta un tiempo de retención de 25.93 min, punto de fusión 55-58°C, para su identificación del compuesto se utilizó (CG/EM) y RMN (¹H-¹³C). Del extracto de Metanol (tallos), se obtuvo un sólido blanquecino con punto de fusión de 65-68°C, fue analizado por CG/EM, con un tiempo de retención de 28.38 min el compuesto probablemente es etil ciclocosano **(2)**. También se obtuvo un sólido blanquecino cuyo punto de fusión es de 75-79°C, esta fracción se analizó mediante CG/EM mostrando cuatro tiempos de retención distintos. De acuerdo a la base de datos Wiley 7n.I, probablemente estos compuestos podrían ser: 2-acetil-6-metoxinaftaleno **(3)**, etil ciclocosano **(4)**, ciclotetracosano **(5)**, y 1-docosano **(6)**.

Palabras claves: *Erythrina Edulis*, (CCA), (CG/EM), ferulato de tridecilo, etil ciclocosano, 2-acetil-6-metoxinaftaleno, etil ciclocosano, ciclotetracosano, 1-docosano.

ABSTRACT

Were obtained extracts of *Erythrina edulis specie* (in hexane, ethyl acetate, and methanol) were collected in the district of Argelia, Loja province, for phytochemical study. The ethyl acetate extract (from the leaves) had better performance (2.63%) than the other extracts and contained a whitish solid identified as tridecyl-ferulate (**1**), which had a retention time of 25.93 minutes and a melting point of 55 - 58° C; compound identification was performed via GC/MS and ¹H/¹³C NMR. The methanol extract (from the stems) contained a white solid that had a retention time of 28.38 minutes and a melting point 65 - 68° C; compound identification via GC/MS suggests that the compound was ethyl ciclocosane (**2**). The methanol extract also contained another whitish solid with a melting point of 75 - 79° C and four different retention times in GC/MS. According to the Wiley database 7n.l, these compounds might be: 2-acetyl-6-methoxynaphthalene (**3**), 13-teradecen-1-ol acetate (**4**), ciclotetracosane (**5**), and 1-docosene (**6**).

Key words: *Erythrina Edulis*, CCA, GC/MS, tridecyl-ferulate, ethyl ciclocosane, 2-acetyl-6-methoxynaphthalene, 13-teradecen-1-ol acetate, ciclotetracosane, 1-docosene.

INTRODUCCIÓN.

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad a nivel mundial, concentrada en tan solo 275.000 km^2 , incluyendo los distintos tipos de ambientes naturales, a esto se debe que el Ecuador es un país “megadiverso”, ello significa que el país cuenta con las más variadas formas de vida expresadas en su flora, fauna y microorganismos, en su diversidad genética y en una variedad de ecosistemas, que se forman gracias a las particulares condiciones geográficas de ubicación relieve y clima (Eguiguren, P. 2012).

El uso de plantas medicinales es el resultado del contacto del hombre hacia la naturaleza acumulado por muchas generaciones , así como también la relación entre diferentes culturas (Gómez, R. 2012).

La Organización Mundial de la Salud, reconoce y estimula el gran valor de las plantas medicinales en la atención primaria de millones de personas, estima que el 80% de la población mundial utiliza estos recursos como principal fuente de atención de sus problemas de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos, constituyendo un recurso para encontrar nuevos fármacos (Vivot, E. 2012).

El género *Erythrina* pertenece a la familia Fabaceae, se encuentra constituido por 120 especies a nivel mundial, caracterizado por tener un tallo armado, presencia de estipelas glandulares y caracteres variables en frutos. Varias especies pertenecientes a este género han sido ampliamente estudiadas (*Erythrina crista-galli* L., *E. dominguezii* Hassl y *E. falcata* Benth), presentando actividad biológica.

Erythrina edulis Triana ex Micheli, es un árbol, con una altura promedio de 8 metros y un diámetro de tronco de 24 centímetros; es propio de los valles interandinos del norte de Suramérica (Bedoya, O. 2012).

En base a la información bibliográfica de las diferentes especies del género *Erythrina*; se ha considerado para la presente investigación el estudio la especie *Erythrina edulis* debido a que no existen reportes de metabolitos secundarios aislados anteriormente.

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

CAPÍTULO I.

1.1. Fin del proyecto.

Contribuir al conocimiento de la existencia de metabolitos secundarios presentes en extractos obtenidos de plantas nativas con posible actividad antiparasitaria.

1.2. Propósito del proyecto.

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

1.3. Componentes del Proyecto.

- Selección y recolección de especie vegetal.
- Obtención de extractos en hexano, acetato de etilo y metanol.
- Fraccionamiento de extractos mediante cromatografía en columna abierta.
- Purificación y caracterización de metabolitos secundarios.

CAPÍTULO II FUNDAMENTO TEÓRICO.

2.1. Biodiversidad del Ecuador.

Ecuador posee actualmente 1700 especies de plantas vasculares, convirtiéndose en uno de los países con mayor biodiversidad a nivel mundial, por eso se dice que es un país “megadiverso”, ello significa, que el país cuenta con las más variadas formas de vida expresadas en su flora, fauna y microorganismos, en su diversidad genética y en una variedad de ecosistemas, las razones para que esto sea así son varias, pero las más importantes son: encontrarse bajo la línea ecuatorial, estar atravesando por la Cordillera de los Andes y tener sus Costas hacia el Océano Pacífico (Bravo,E. 2013).

La megadiversidad del Ecuador es impresionante, si se toma en cuenta que se encuentra concentrada en tan solo 275.000 km^2 . La Región Sur del Ecuador, se localiza en tres regiones diferentes: Costa, Sierra y Oriente. En el Parque Nacional Podocarpus, ubicado en la provincia de Loja y Zamora – Chinchipe, conserva 99 especies exclusivas de esta área, representando el número más alto de endemismo de todas las áreas protegidas del Ecuador (Lozano,P. 2002).

La flora del Ecuador ha sido reconocida por ser rica en plantas útiles, debido a la riqueza cultural que conforman los diferentes grupos étnicos, cada uno de ellos aporta sus conocimientos ancestrales del uso de especies de plantas silvestres y cultivadas principalmente en el ámbito medicinal (Balslev,H. et al . 2008).

2.2. Medicina Tradicional y uso de Plantas Medicinales.

Según la Organización Mundial de la Salud, la medicina tradicional o también conocida como medicinal alternativa, es el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, usados para el mantenimiento de la salud, así como la prevención, el diagnóstico, o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales.

Una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Burton, A. 2013).

El consumo y manejo de plantas silvestres como medicina forma parte de un conocimiento tradicional de distintas poblaciones humanas, en la actualidad existen diversos sistemas de

salud, estos sistemas ofrecen una amplia gama de enfoques, recursos, costos y beneficios para la salud individual y colectiva (Arias,B. 2009).

Alrededor del 80% de los habitantes del planeta cubren principalmente con medicamentos tradicionales sus necesidades de atención primaria de salud y gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos. Dichas plantas tienen diversos usos en la medicina moderna: se emplean como materias primas para el aislamiento de metabolitos secundarios y para la fabricación de compuestos semisintéticos más complejos, las estructuras químicas derivadas de las sustancias vegetales pueden servir de modelos para nuevos productos sintéticos y se pueden utilizar como marcadores taxonómicos o para la búsqueda de nuevos compuestos (Akerlele, O 1993).

A principios de la medicina occidental, las plantas medicinales han ocupado, un lugar privilegiado como agentes terapéuticos. Las plantas medicinales, son una fuente de nuevos recursos terapéuticos frente a la diversidad de nuevas enfermedades (Salaverry,O. 2012).

En los últimos años, la prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares se ha asociado con una mayor ingesta de frutas frescas y vegetales ricos en antioxidantes naturales (Avello,M. et al. 2013).

Durante siglos, las plantas medicinales, se han utilizado en la medicina tradicional, para el tratamiento de muchas dolencias, desde dolores de cabeza hasta enfermedades parasitarias. El uso de plantas medicinales con actividad antiparasitaria es reconocido y documentado desde tiempos antiguos. El descubrimiento de la quinina en *Cinchona officinalis* y su posterior desarrollo como medicamento antimalárico, representa un hito en la historia de las drogas antiparasitarias de origen natural. Muchas especies vegetales biosintetizan principios activos antiparasitarios, debido a que actúan directamente sobre los parásitos, provocando su inhibición (Sánz, C. 2010).

2.3. Metabolitos secundarios.

En las plantas se biosintetizan sustancias químicas, de hecho se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Un gran porcentaje de los principios activos está comprendido dentro de los llamados productos naturales o

metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución restringida. Entre estos metabolitos son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, bacterias, parásitos, hongos, como son los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides (Martínez, Y et al. 2012) .

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (Ávalos , A et al. 2009).

La mezcla de metabolitos secundarios son únicos para cada especie, puesto que su biosíntesis se rige principalmente por la genética vegetal, pero también influyen la fisiología, el estrés, la procedencia geográfica y condiciones de recolección del vegetal, entre otros factores (Avello, M et al. 2013).

Las plantas originan una gran variedad de metabolitos secundarios, con actividad biológica, como: citotóxica, antiparasitaria y antimicrobiana. Dentro de la actividad antiparasitaria, los metabolitos secundarios aislados, inhiben al parásito, mediante alquilación, microtúbulos, destrucción de biomembranas y alteración en el sistema nervioso a través de la inhibición de neuroreceptores (Wink, M. 2014).

Dentro de las plantas utilizadas con mayor actividad antihelmíntica, se destaca como la más frecuente la *Chenopodium ambrosioides* L. (paico), sobre el cual existe varios trabajos de investigación; uno de ellos, es la obtención de aceite esencial a través de hidrodestilación y analizado por cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas, identificando los principales compuesto: ascaridol (27,27%), ρ cimeno (19,05%) y isoascaridol (14,75%). Según el ensayo de actividad biológica, el compuesto ascaridol posee mayor actividad antihelmíntica contra *Ascaris lumbricoide* y *Ancylostoma duodenale* (Chuan, Q. 2011).

La quinina y chinchonidina de *Chinchona officinalis*, dio origen a la cloroquina y primaquina, que sirve para tratar el paludismo originado por el *Plasmodium falciparum* (Wink, M. 2014).

Los filamentos de actina y los microtúbulos son las principales proteínas del citoesqueleto de las células eucariotas, cuya función es intervenir en el ensamblaje del huso mitótico, se conoce un sinnúmero de productos naturales que tienen afinidad a los microtúbulos tales

como: colchicina (*Gloriosa superba*), vinblastina (*Catharanthus roseus*), chalcona (*Combretum caffrum*) y paclitaxel (*Taxus baccata*), algunos de estos metabolitos secundarios son utilizados actualmente en el tratamiento del cáncer (quimioterapia) y también poseen actividad antiparasitarias (Wink, M. 2014).

2.4. Descripción del Género *Erythrina*.

El género *Erythrina* pertenece a la familia Fabaceae (Leguminosae) y comprende un amplio rango de variación morfológica y una gran diversidad ecológica, se han descrito alrededor de 120 especies en el planeta y se distribuyen en Sudamérica, Centroamérica, Las Antillas y África occidental. Un gran número de metabolitos secundarios aislados a partir del género *Erythrina*, tales como los alcaloides, flavonoides, lectinas y pterocarpanos; presentan actividad antibacteriana, antiparasitaria, antiinflamatoria, analgésica, antifúngica y efecto citotóxico (Pino, S et al.2004).

Se han realizados estudios de la especie *Erythrina americana* Miller observando un alto contenido de alcaloides, siendo los principales α y β eritroidina, presentando efectos farmacológicos importantes sobre el sistema nervioso periférico como relajante muscular, empleados clínicamente como coadyuvantes en anestesia y acción sobre el sistema nervioso central como tranquilizante (Herrera, S.2001).

Investigadores, han aislado de la especie *Erythrina excelsa*, un compuesto denominado Acrilato de (E) nonadecil 3-4 hidroxifenilo (**1**), con una citotoxicidad moderada contra seis líneas celulares de cáncer CCRF-CEM (Leucemia linfoblástica), CEM/ADR5000 (Leucemia linfoblástica aguda), MDA-MB231 (Adenocarcinoma de mama), HCT116 (Carcinoma de colon), U87MG (Cáncer de cerebro) y HepG2 (Cáncer de hígado) (Kwamou et al., 2015).

Se reportan estudios fitoquímicos del extracto de acetona (tallos) de la especie *erythrina caffra*, aislando e identificando el compuesto denominado ferulato de octacosilo (**2**), mostrando actividad moderada antiplasmódica ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$) para la cepa de *plasmodium falciparum* (Chukwujekwu, J. et al, 2016).

De la especie *Erythrina livingstoniana*, existe estudios fitoquímicos y también se ha evaluado su actividad antibacteriana, identificando 6 compuestos de tipo flavonas, de las cuales los compuestos 5,7,3'-trihidroxi-5'-(3-hidroxi-3metil-trans-butyl-1-enyl)-4'-

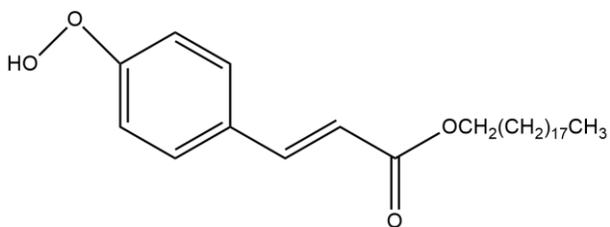
metoxiflavona **(3)**, 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-5'-(3-metil-butil- 2-enil) **(4)** y 7,3'-dihidroxi-4'-metoxi-5'-(3- metil- butil-2-enil) **(5)** mostraron eficacia contra tres cepas de patógenos *E.coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Bedane et al., 2015).

También se ha evaluado la actividad antiparasitaria in vitro de extractos de cortezas y hojas de *Erythrina crista-galli* L., *E. dominguezii* Hassl y *E. falcata* Benth sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* y promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*. En las tres especies se evidencia que el extracto etanólico de la corteza, es el que presentó mayor actividad antiparasitaria para *Trypanosoma cruzi* y las cepas de *Leishmania* (Yaluff, G. 2015).

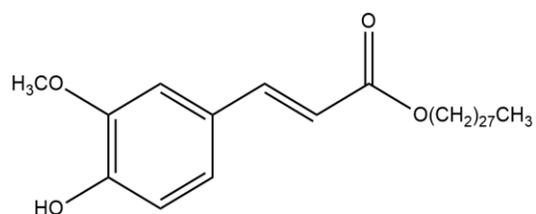
Recientes estudios, publican actividad antimicrobiana y antioxidante de la corteza de *Erythrina stricta* utilizando hexano, diclorometano y acetato de etilo, los resultados obtenidos indican que el extracto de hexano, diclorometano y acetato de etilo mostraron la mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus* y el extracto de acetato de etilo y diclorometano tienen actividad significativa frente a *Candida albicans* (Akter et al., 2016).

El extracto de acetona de la corteza de la raíz de *Erythrina burttii* mostró actividad in vitro antiplasmódica. Fueron identificados como los compuestos con mayor actividad antiplasmódica: Isoflavona-3-enes **(6)** y el 2-arilbenzofuran **(7)** (Yenesew et al., 2012).

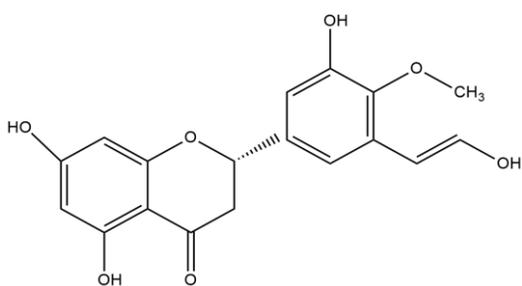
A continuación se muestran las estructuras moleculares de los compuestos aislados a partir de las diferentes especies del género erythrina.



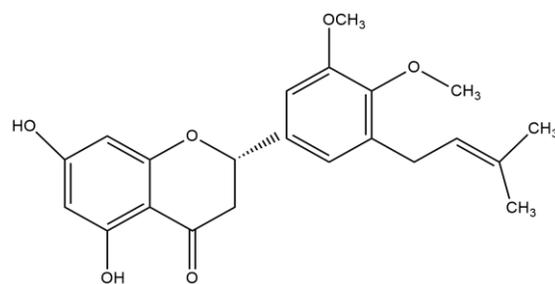
Acrilato de (E) nonadecil 3-4 hidroxifenilo (**1**)



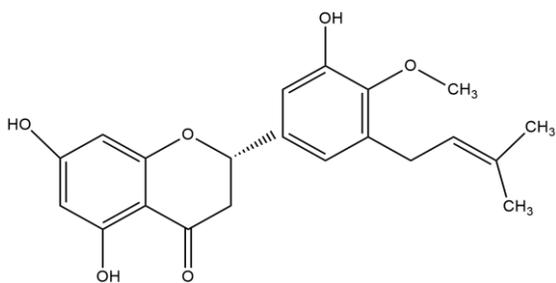
Ferulato de octacosilo (**2**)



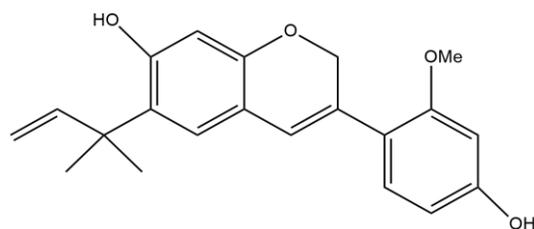
5, 7, 3'-trihidroxi-5'-(3-hidroxi-3metil-trans-butyl-1-enil)-4'-metoxiflavona (**3**)



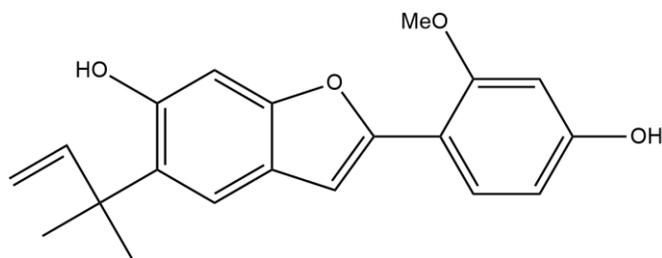
5, 7, 3'-trihidroxi-4'-metoxi-5'-(3-metil-butyl-2-enil) (**4**)



7,3'-dihidroxi-4'-metoxi-5'-(3-metil-butyl-2-enil) (**5**)



Isoflavona-3-enes (**6**)



2-aril-benzofuran (**7**)

Figura 1. Estructuras moleculares de los compuestos aislados a partir de las diferentes especies del género erythrina.

2.5. Descripción de la especie *Erythrina edulis*.

Erythrina edulis Triana ex Micheli, es un árbol, con una altura promedio de 8 metros y un diámetro de tronco de 24 centímetros; es propio de los valles interandinos del norte de Suramérica, recibe nombres variados en cada país, en Ecuador se la conoce como: guato, sachaporoto, zapote de cerro, frijol de monte, pashullo, poroto y porotón. Es una planta multipropósito de la cual se obtienen varios beneficios, las partes útiles de la planta son: las hojas, la cascara del fruto y sus semillas. Las hojas tienen un alto contenido proteico, es un excelente complemento en la alimentación animal (Bedoya, O. 2012).

De las semillas de *Erythrina edulis*, se ha realizado aislamiento y caracterización de lectinas, las lectinas son proteínas que se encuentran distribuidas ampliamente en microorganismos, tejido vegetal y tejido animal. Su importancia principal radica en sus propiedades biológicas, en la aglutinación de eritrocitos y otras células como linfocitos y plaquetas (Perez, G. 1984).

Cabe destacar, que no se han encontrado estudios sobre el aislamiento de metabolitos secundarios de la especie *Erythrina edulis* con actividad antihelmíntica; pero si existen estudios realizados de otra especie que pertenece al mismo género; para el presente proyecto se tomó en cuenta que la especie *Erythrina variegata* (corteza) tiene actividad antiparasitaria para: *Paramphistomum cervi* (Trematoda) y *Haemonchus contortus* (Nemátodo) (Islam et al., 2015).

Tabla 1. Taxonomía de la especie *Erythrina edulis*.

Reino	Plantae
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Orden	Fabales Bromhead
Familia	Fabaceae Lindl.
Género	<i>Erythrina</i> L.
Especie	 <p><i>Erythrina edulis</i> Triana ex Micheli</p>

Fuente: Trópicos.

2.6. Técnicas utilizadas en la elucidación de metabolitos secundarios y su importancia.

2.6.1. Cromatografía.

Un rasgo característico de la cromatografía es la presencia de dos fases; dispuestas de tal manera que mientras una permanece estacionaria dentro del sistema (fase estacionaria), la otra se desplaza a lo largo de él (fase móvil). La clave de la separación en cromatografía es que la velocidad con la que se mueve cada sustancia depende de su afinidad relativa por ambas fases (equilibrio de distribución). En general, los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan lentamente (más retenidos) mientras que los más afines a la fase móvil (menos retenidos) se mueven con mayor rapidez. Por consecuencia, el medio cromatográfico (columna, placa o papel) funciona como un controlador de la velocidad de cada sustancia que constituye la mezcla, logrando así su separación y mediante el uso de un detector, su caracterización química (Braithwaite, A .2007).

2.6.2. Cromatografía en capa fina (CCF).

En la cromatografía de capa fina, un absorbente está depositado formando una delgada capa sobre una placa de vidrio, por la que ascienden, arrastradas por un disolvente, una o más sustancias que se desean identificar. Con la ayuda de un capilar de vidrio, una pequeña cantidad de muestra se deposita sobre la placa de sílice, muy cerca al extremo inferior de la placa, luego se deposita la placa en una cubeta de cromatografía, que contiene en el interior el disolvente; el disolvente asciende por capilaridad a lo largo de la placa, arrastrando los compuestos a diferentes velocidades, según el grado de absorción de estos, produciéndose así su separación. Luego de unos minutos la placa se seca y se examina por medio de luz UV observando diferentes coloraciones o utilizando el revelador adecuado como Sulfato cérico, vainillina, etc. (Tswett, M. 2004).

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

La cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas, es una técnica que constituye una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400°C una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas (Gutierrez & Droguet, 2002).

2.6.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN), es la herramienta más útil para la elucidación estructural de moléculas orgánicas, permitiéndonos dar la posición relativa de átomos dentro de una molécula, basándose en la absorción de energía electromagnética (ondas de radio) por moléculas inmersas en un fuerte campo magnético. Se puede obtener espectros de una gran variedad de núcleos como ^{13}C , ^1H , ^{15}N , ^{19}F Y ^{31}P . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes (Rojas, R. 2014).

2.6.5. Cristalización.

La cristalización es un proceso de purificación bastante selectivo, ya que en el crecimiento de cristal, el empaquetamiento regular de moléculas de un mismo tipo, forma y tamaño, tiende a excluir la presencia de impurezas. La cristalización es el método más adecuado para purificar compuestos sólidos, siempre que contenga una cantidad moderada de impurezas, se basa en el hecho de que los sólidos orgánicos son más solubles en un disolvente caliente que en frío, formando una solución sobresaturada, el exceso de soluto sobresaturado es el que se cristaliza (Hernández, E et al. 2010).

2.6.6. Punto de Fusión.

El punto de fusión es la temperatura de cambio del estado sólido al estado líquido. Para que esto ocurra es necesario que se rompan las fuerzas intermoleculares que mantienen cohesionados en una estructura cristalina las moléculas de un compuesto y por tanto su valor dependerá del balance de las diferentes fuerzas intermoleculares. La presencia de impurezas, incluso en pequeñas cantidades, produce una disminución del punto de fusión, acompañado generalmente de un incremento del intervalo en que funde, por ello otra de las utilidades de la medida del punto de fusión es como criterio de pureza de un determinado compuesto (Jaramillo, A. 2008).

CAPÍTULO III MÉTODOS.

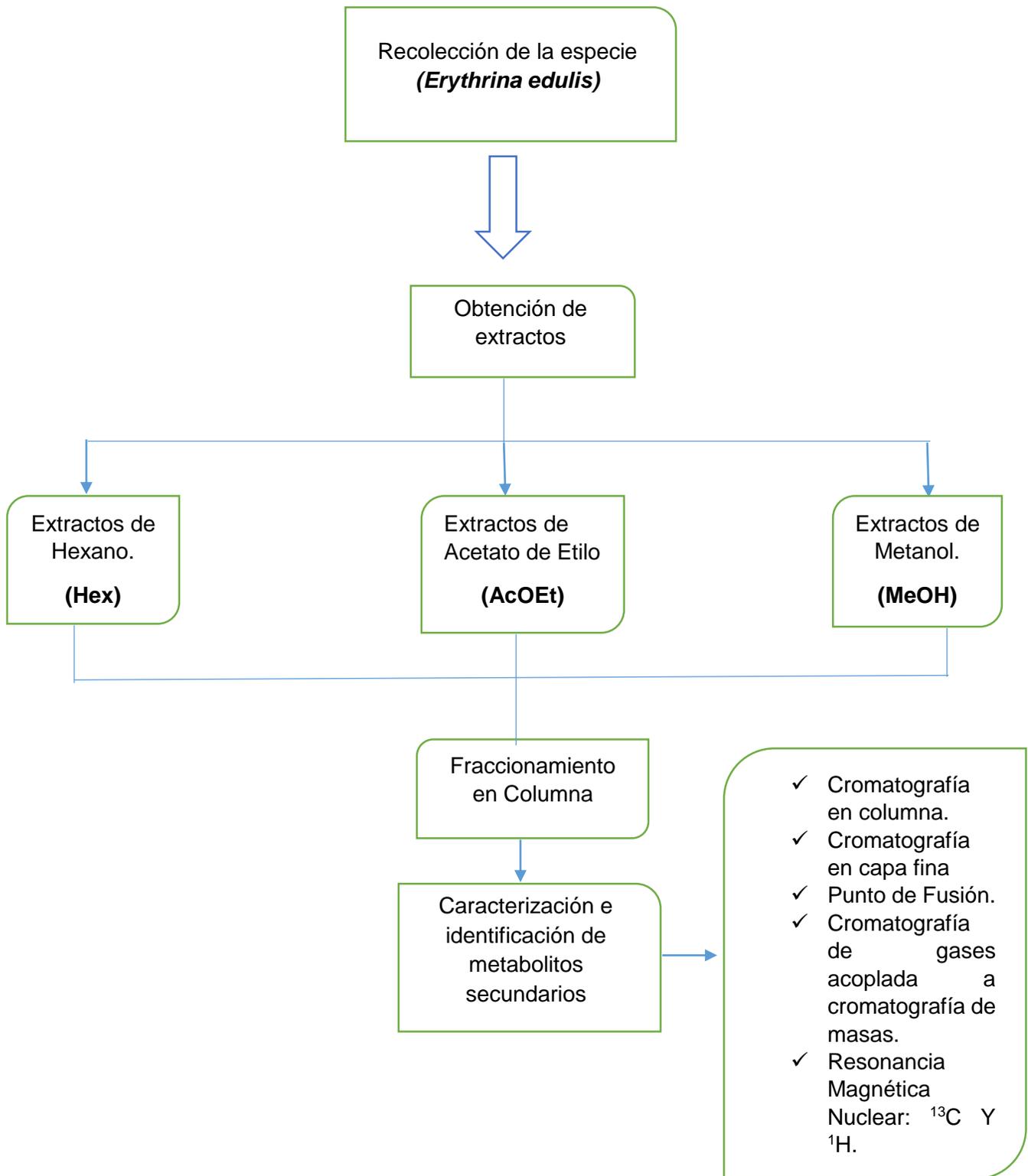


Figura 2. Metodología a desarrollar en la presente investigación.

3.1. Recolección de la especie.

La recolección de la especie *Erythrina edulis* se la realizó, en el Barrio “La Argelia” ubicado en la Parroquia Loja del cantón Loja perteneciente a la Provincia de Loja, con coordenadas 03° 59'32.5"; 079° 12'09.4" y altitud 2142 msnm. La identificación de la especie la realizó la Dra. Fanni Tinitana Imaicela.

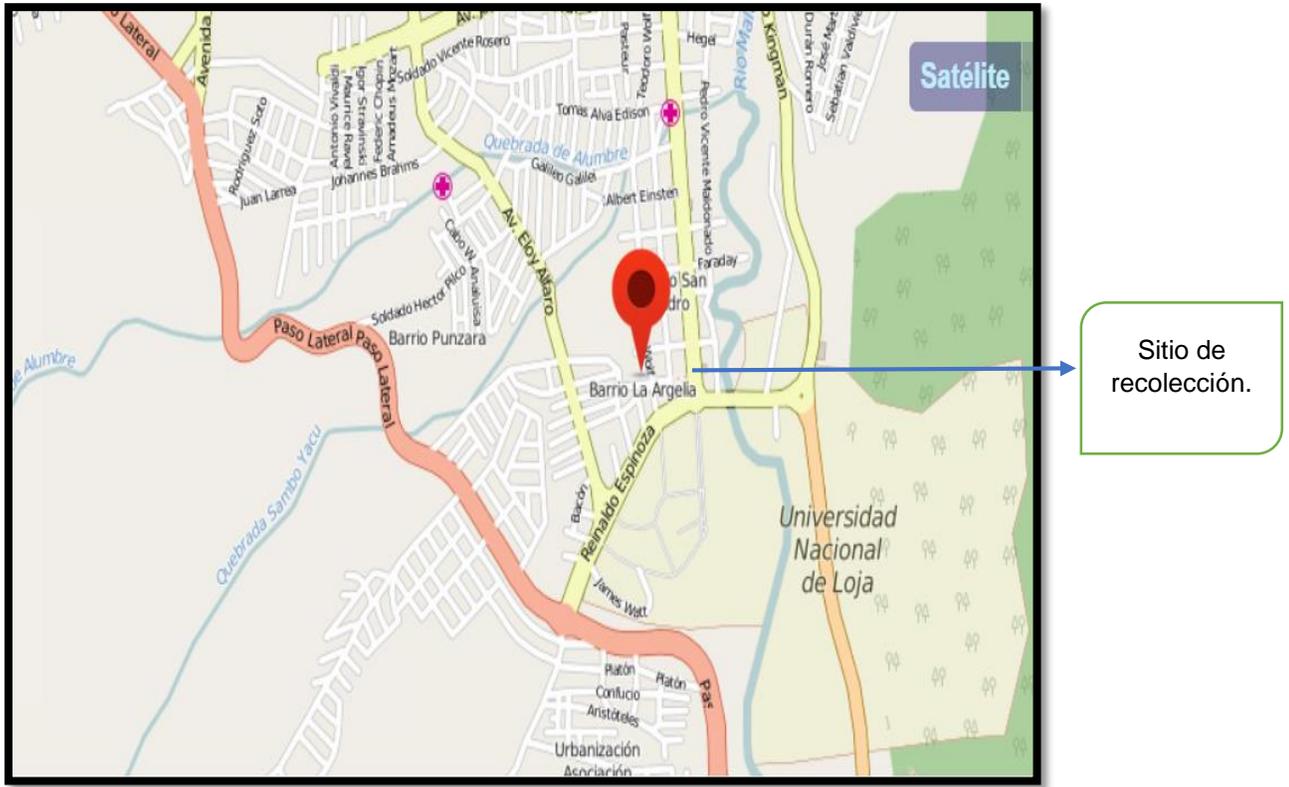


Figura 3. Mapa del lugar de recolección de la especie vegetal *Erythrina edulis*.

Fuente: <https://maps.google.com.ec/>.

3.1. Materia Vegetal.

Se recolectó 8 kg de las partes aéreas de la especie *Erythrina edulis*, seguidamente se realizó una limpieza para la eliminación de impurezas.

Una vez lista la especie vegetal, se colocó en el cuarto de secado de la UTPL a una temperatura de 37°C y con flujo de aire, con el fin de lograr la deshidratación de la planta durante aproximadamente 7 días, hasta que el peso de una muestra fue constante.

3.2. Obtención de extractos.

Se trabajó a partir de 7 kg de material vegetal seco, clasificando en 3,4 kg en hojas y 3,2 kg en tallos. Se realizó maceración estática empleando tres tipos de disolventes: Hex, AcOEt, y MeOH, en polaridad ascendentes.

La materia vegetal clasificada en hojas y tallos se colocó en seis recipientes cubriendo en su totalidad con el disolvente respectivo aproximadamente 20 litros, cada uno de ellos se procedió a dejar en reposo por cinco días, luego de ello se llevó a cabo su filtración y concentración al vacío, empleando un rotaevaporador, este procedimiento se lo repitió hasta obtener cantidad suficiente de extracto que nos permita continuar con el procedimiento, realizando un promedio de cuatro extracciones tanto en hojas y tallos con cada disolvente.

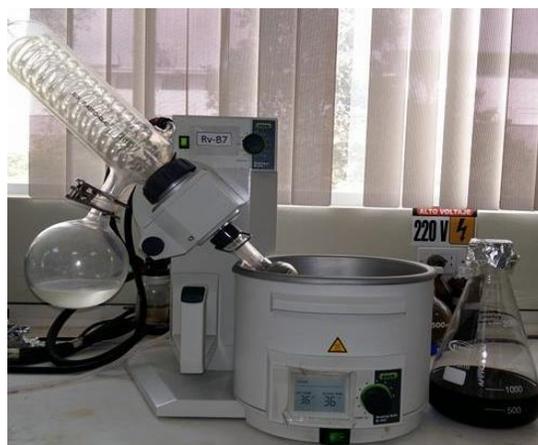


Figura 4.Equipo de Rotaevaporador.
Fuente: Autora.

El rendimiento de extracto, se lo calculó en base a la cantidad de extracto obtenido y el peso del material vegetal seco, como se indica en la fórmula:

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

3.3. Fraccionamiento de los extractos.

Para proceder al fraccionamiento por cromatografía en columna abierta, primero se analizó mediante cromatografía de capa fina (CCF) en fase directa, los extractos de Acetato de etilo y Metanol de hojas y tallos.

3.3.1. Cromatografía en Columna.

Se efectuó el fraccionamiento de los extractos por cromatografía en columna abierta utilizando columnas de 50 cm de alto y 42 mm de diámetro en relación 1:100 extracto: sílice, realizando el empaquetamiento en húmedo utilizando sílice gel 60F₂₅₄, para su elución se empleó: Hexano, Acetato de etilo, Metanol y mezclas de los mismos, se recolecto fracciones con un volumen de 15 ml aproximadamente. Posterior a ello, cada fracción se rotaevaporó para la eliminación del disolvente y finalmente se procedió a realizar cromatografía en capa fina.

3.3.2. Cromatografía en Capa Fina.

Se realizó fraccionamiento cromatográfico en capa fina (CCF), a cada fracción adquirida en cromatografía en columna, haciendo uso de placas de aluminio cubiertas de sílice gel 60F₂₅₄, corridas en diferentes polaridades de (Hex, AcOEt, MeOH, CH₂Cl₂ y mezclas respectivas). Se observó el perfil cromatográfico de cada fracción por medio de luz UV en 254 y 365 nm, revelando cada placa con ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

3.4. Microcolumna.

Se visualizó y se analizó el perfil cromatográfico de cada placa, seleccionando la fracción donde se encuentra el compuesto mayoritario y de interés. Para el montaje de la microcolumna se utilizó sílice gel 60F₂₅₄ en una proporción 1:100 extracto: sílice. Para su

elución se manejó disolventes como: Hexano, Acetato de etilo, Metanol y mezclas de los mismos, se recolectó fracciones de 10 ml aproximadamente, cada fracción se rotaevaporó para la eliminación del disolvente y finalmente se procedió a realizar cromatografía en capa fina.

3.5. Unión y Purificación.

Para la unión de fracciones se visualizó: el fraccionamiento en cromatografía de capa fina observadas en luz UV tanto de 254 y 365 nm , la apariencia física de los viales obtenidos en cromatografía en columna y la comparación visual utilizando ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

3.6. Caracterización de metabolitos secundarios.

3.6.1. Punto de Fusión.

Es la temperatura a la cual un sólido pasa a líquido, durante el proceso de cambio de estado de una sustancia pura, la temperatura se mantiene constante puesto que todo el calor se emplea en el proceso de fusión. Por lo tanto el punto de fusión de sustancias puras es definido para su identificación.

Una vez aislado el compuesto de interés a través de cromatografía en columna y cromatografía de capa fina, se procedió a la identificación, para ello el punto de partida, fue determinar el punto de fusión del compuesto aislado en la presente investigación.



Figura 5.Equipo Fisher Johns, serial 40-22 de 50-60 Hz.

Fuente: Autora.

3.6.2. Factor de Retención.

El factor de retención de un determinado analito, se define como la relación entre la distancia que recorre el compuesto desde la línea de siembra y la distancia que recorre desde la línea de siembra hasta el límite del recorrido superior (Tuñez, I. 2004).

El factor de retención se lo adquirido con la siguiente fórmula:

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

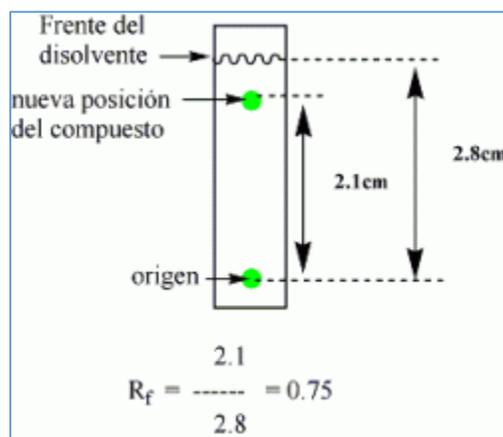


Figura 6. Cálculo del Factor de Retención.

Fuente: Tuñez, I. 2004.

3.6.3. Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas.

La identificación de los metabolitos secundarios de la especie *Erythrina Edulis*, se lo realizó a través de cromatografía de gases "Agilent Technologies 6890N" acoplado a espectroscopia de masas "Agilent 5973 inert" con una columna cromatográfica BSNS. Las inyecciones se realizaron en columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil – metilpolisiloxano). Las condiciones de operación del equipo CG/EM se detallan en la tabla N°2.

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	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

3.6.3. Espectroscopia de Resonancia Nuclear Magnética (RMN).

Mediante el equipo “Varian Unity RMN” de 400 y 100 MHz – Premium Schelded, se obtuvieron los espectros de RMN DE ^1H y ^{13}C . Los desplazamientos químicos son expresados en δ ppm en relación al tetrametil- silano (TMS) como referencia interna y las constantes de acoplamiento J ($^1\text{H}/^1\text{H}$) son expresadas en Hz.

Para la lectura de las muestras se realizó una disolución empleando disolventes deuterados: cloroformo y metanol.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y ANÁLISIS.

4.1. Extractos obtenidos de la especie *Erythrina edulis*.

Se trabajó a partir de 7 kg de material vegetal seco: 3,4 kg de hojas y 3,2 kg de tallos. El rendimiento de extracto (ver tabla N°2), fue determinado en relación a la cantidad de extracto obtenido y el peso del material vegetal seco.

Tabla 3. Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de la especie *Erythrina edulis*.

Disolvente.	Parte Aérea.	Peso (g).	Rendimiento %
Hexano	Hojas	73,07	2,15
	Tallos	7,20	0,22
Acetato de Etilo	Hojas	89,56	2,63
	Tallos	15,28	0,45
Metanol	Hojas	88,78	2,61
	Tallos	12,31	0,38

Fuente: Autora.

4.2. Extracto de Acetato de Etilo (tallos).

4.2.1. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto de Acetato de Etilo (tallos).

Se realizó cromatografía en columna abierta en proporción 1:20, utilizando 11 g de extracto de Acetato de etilo (tallos) y 220 g de sílice gel. En la tabla N° 3 se describe las fracciones obtenidas con su polaridad.

Tabla 4. Fracciones obtenidas a partir del Extracto de AcOEt (tallos).

Número de Fracciones.	Proporción de disolventes	Mezcla de Disolventes.
1-16	50:50	Hex/CH ₂ Cl ₂
17	40:60	Hex/CH ₂ Cl ₂
18-33	30:70	Hex/CH ₂ Cl ₂
34-55	20:80	Hex/CH ₂ Cl ₂
56-65	10:90	Hex/CH ₂ Cl ₂
66-77	100	CH ₂ Cl ₂
78-89	90:10	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt
90-138	80:20	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt
139-161	10:10	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt
162-190	100	MeOH

Fuente: Autora.

Del análisis cromatográfico realizado en capa fina, las fracciones que presentaron el mismo perfil cromatográfico fueron unidas obteniéndose un total de 33 fracciones que se detallan a continuación en la tabla N° 4.

Tabla 5.Unión de fracciones según su perfil cromatográfico.

Identificación de fracciones con el mismo perfil cromatográfico.	Unión de Fracciones	Apariencia
AcOEt-T1	1	Sólido amarillo
AcOEt-T2	2-3	Sólido amarillo
AcOEt-T3	4-7	Sólido amarillo
AcOEt-T4	8-12	Sólido amarillo
AcOEt-T5	13-14	Sólido amarillo
AcOEt-T6	15-17	Sólido amarillo
AcOEt-T7	17-21	Sólido amarillo
AcOEt-T8	22-28	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T9	29-35	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T10	36-38	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T11	39-42	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T12	43-45	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T13	46-49	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T14	50-51	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T15	52-56	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T16	58-63	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T17	64-75	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T18	76	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T19	77	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T20	78-98	sólido amarillo oscuro
AcOEt-T21	99-100	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T22	101-105	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T23	106-109	Sólido amarillo oscuro
AcOEt-T24	110-112	Polvo blanquecino
AcOEt-T25	113-116	Polvo blanquecino
AcOEt-T26	117-119	Polvo blanquecino
AcOEt-T27	120-126	Polvo blanquecino

AcOEt-T28	127-133	Polvo blanquecino
AcOEt-T29	134-140	Polvo blanquecino
AcOEt-T30	141-147	Polvo blanquecino
AcOEt-T31	148-154	Polvo blanquecino
AcOEt-T32	155-161	Polvo blanquecino
AcOEt-T33	162-190	Polvo blanquecino

Fuente: Autora

4.2.2. Fracción AcOEt-T20.

De la fracción AcOEt-T20 (78-98), eluída en cromatografía en columna en una polaridad de 90:10 (CH₂Cl₂/AcOEt), se obtuvieron 70 mg de un sólido amarillo oscuro, soluble en diclorometano. A partir de esa fracción, se realizó una microcolumna para separar el compuesto de interés, la columna fue eluída en polaridad 90:10 (Hex/AcOEt), obteniendo 49 fracciones y por medio de cromatografía en capa fina se procedió a realizar la unión de fracciones con el mismo perfil cromatográfico, consiguiendo un total de 21 fracciones de las cuales, de la fracción 11 AcOEt-MT11 se obtuvo 10 mg de un sólido blanquecino, cuyo punto de fusión es 55-58°C, soluble en diclorometano y cloroformo, con un R_f de 0.5 eluído en una mezcla 9:1 (Hex/AcOEt).

Para su identificación, se analizó mediante CG/EM (**Anexo 1 y 2**) el mismo que muestra un t_R=25.93 min y además se sometió a espectroscopia de RMN de ¹H y ¹³C (**Anexo 3 y 4**). La identificación se realizó comparando con espectros reportados en literatura.

Este compuesto se identificó como ferulato de tridecilo (**1**) (**Figura 7**), con fórmula molecular C₂₃H₃₆O₄ y peso molecular 376.26 g/mol, este es el primer reporte del compuesto en la especie *Erythrina edulis*.

Sin embargo, en base a la literatura se ha identificado un compuesto que posee una estructura similar a partir de la especie *erythrina caffra*, denominado ferulato de octacosilo (**Figura 1**), con fórmula molecular C₃₈H₆₅O₄ y peso molecular 585.48 g/mol reportando actividad moderada antiplasmódica (CI₅₀ <10 µg/ml) para la cepa de *plasmodium falciparum* (Chukwujekwu et al., 2016).

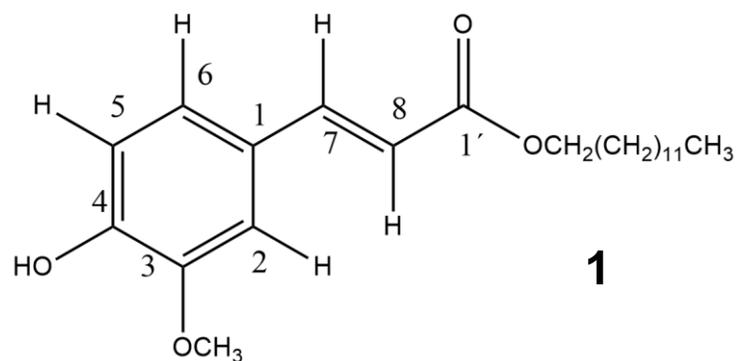


Figura 7. Ferulato de tridecilo (**1**).

Fuente: Autora.

Los datos espectroscópicos de RMN ^{13}C Y ^1H en CDCl_3 que se obtuvieron del ferulato de tridecilo, se detallan en las tablas N°5 y 6.

Tabla 6. Datos espectroscópicos RMN ^{13}C del compuesto (1).

Asignación de C	Espectro ^{13}C RMN del compuesto (1)	Referencia Bibliográfica. (Lancefield, C 2011).
C1	127.2	126.6
C2	109.4	109.3
C3	146.9	147.8
C4	148.0	146.6
C5	114.8	114.6
C6	123.2	122.8
C7	144.7	144.8
C8	115.8	114.8
C1'	167.5	167.6

* CDCl_3

Fuente: Autora

Tabla 7. Datos espectroscópicos RMN ¹H del compuesto (1).

Referencia Bibliográfica. (Chukwujekwu et al., 2016)			Datos Experimentales.		
Desplazamiento químico	Multiplicidad	Asignación	Desplazamiento químico	Multiplicidad	Asignación
7.61	d	H-7'	7.60	d	H-7'
7.07	dd	H-6'	7.05 – 7.08	dd	H-6'
7.03	d	H-2'	7.03	d	H-2'
6.91	d	H-5'	6.92	d	H-5'
6.29	d	H-8'	6.29	d	H-8'
5.83	s	H-4'(OH)	5.83	s	H-4'(OH)
4.17	t	OCH ₂	4.17	t	OCH ₂
3.95	s	H-3'(OCH ₃)	3.92	s	H-3'(OCH ₃)
0.90	t	H-28	0.90	t	H-28

*CDCl₃

Fuente: Autora

4.3. Extracto de Metanol (tallos).

4.3.1. Elución mediante cromatografía en columna abierta del extracto de Metanol (tallos).

Se realizó cromatografía en columna abierta en proporción 1:20, utilizando 11 g de extracto de Metanol (tallos) y 220 g de sílice gel. En la tabla N° 7 describimos las fracciones obtenidas con su polaridad.

Tabla 8. Fracciones obtenidas a partir del Extracto de MeOH (tallos).

Número de Fracciones.	Proporción de disolventes	Mezcla de Disolventes.
1-23	100	CH ₂ Cl ₂
23-44	99:1	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
45-70	98:2	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
71-90	97:3	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
91-109	96:4	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
110-126	95:5	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
127-146	94:6	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
147-166	93:7	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
167-178	92:8	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
179-190	91:9	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
191-214	90:10	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
215-229	80:20	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
230-249	60:40	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
250-268	40:60	CH ₂ Cl ₂ /MeOH
267-280	100	MeOH

Fuente: Autora.

Del análisis cromatográfico realizado en capa fina, las fracciones que presentaron el mismo perfil cromatográfico, fueron unidas obteniéndose un total de 18 fracciones que se detallan a continuación en la tabla N° 8.

Tabla 9.Unión de fracciones según su perfil cromatográfico.

Identificación de fracciones con el mismo perfil cromatográfico.	Unión de Fracciones	Apariencia
MeOH-T1	1-3	Sólido amarillo
MeOH-T2	4-10	Sólido amarillo
MeOH-T3	11-15	Sólido amarillo
MeOH-T4	16-21	Sólido amarillo
MeOH-T5	22-25	Sólido amarillo
MeOH-T6	26-39	Sólido amarillo
MeOH-T7	40-71	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T8	72-74	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T9	75-87	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T10	88-99	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T11	100-117	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T12	118-125	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T13	126-153	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T14	154-192	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T15	193-241	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T16	242-249	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T17	250-268	Sólido amarillo oscuro
MeOH-T18	269-280	Sólido amarillo oscuro

Fuente: Autora.

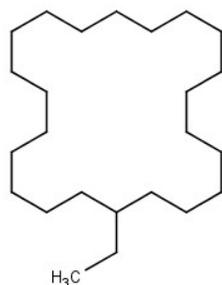
4.3.2. Fracción MeOH-T7.

De la fracción MeOH-T7 eluída en una polaridad 98:2 CH₂Cl₂/MeOH, se obtuvo un sólido amarillo oscuro que al ser evaluada por cromatografía en capa fina se observó impurezas por lo que fue llevado a recristalización con AcOEt, obteniendo 1.8 mg de un sólido blanquecino con punto de fusión de 65-68°C, soluble en dicloro-metano y cloroformo. Esta fracción fue analizada por CG/EM (**Anexo 4 y 6**), la que muestra un tiempo de retención $t_{R}=28.38$, un ion M⁺ de 336 m/z que corresponde con fórmula molecular C₂₄H₄₈ y peso molecular 336.65 g/mol, el compuesto probablemente es etil ciclocosano (**2**) (**Figura 8**), la identificación se la realizó por comparación con la base de datos Wiley 7n.I, este es el primer reporte del compuesto para la especie *Erythrina edulis*, sin embargo este mismo compuesto ya se ha reportado en la especie *Tabebuia serratifolia* a partir de extracto etanólico de la parte aérea de la planta (corteza) dando como resultado el aislamiento de tres hidrocarburos: etil ciclocosano, eicosano y octacosano, identificados por gases-masa, mostrando importante actividad frente a *T. cruzi*, con una ED₅₀ de 1.57 µg/ml (Sánchez, C. 2010).

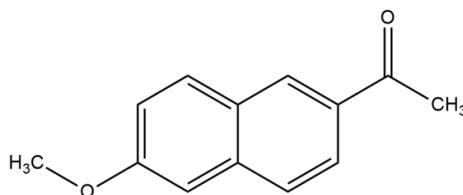
4.3.3. Fracción MeOH-T14.

A partir de la fracción MeOH-T14 eluída en una polaridad 92:8 CH₂Cl₂/MeOH se obtuvo un sólido amarillo oscuro que al ser evaluada por cromatografía en capa fina se observó impurezas por lo que fue llevado a recristalización con AcOEt, obteniendo 2.9 mg de un sólido blanquecino cuyo punto de fusión es de 75-79°C, soluble en dicloro-metano y cloroformo, presentando un R_f de 0.64 eluído en una polaridad dicloro-metano al 100%. Esta fracción se analizó mediante CG/EM (**Anexo N°7 – N°11**) mostrando cuatro tiempos de retención distintos, que corresponden a cuatro compuestos. De acuerdo a la base de datos Wiley 7n.I, probablemente estos compuestos podrían ser: 2-acetil-6-metoxinaftaleno (**3**) con un $t_{R}=19.11$ min y M_± de 200 m/z que pertenece al peso molecular del compuesto 200.2 g/mol, 13-tetradecen-1-ol-acetate (**4**) con un $t_{R}=26.19$ min y M_± de 254 m/z que pertenece al peso molecular del compuesto 254.4 g/mol, ciclotetracosano (**5**) con un $t_{R}=28.39$ min y M_± de 336 m/z que pertenece al peso molecular del compuesto 336.6 g/mol y 1-docosano (**6**) con un $t_{R}=31.53$ y M_± de 308 m/z que pertenece al peso molecular del compuesto 308.5 g/mol.

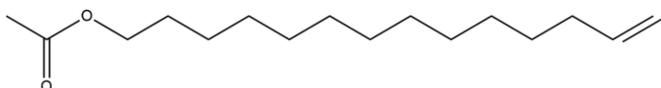
En la figura 8 se indican las estructuras de los metabolitos secundarios identificados a partir del extracto de metanol (tallos) MeOH-T7, cabe destacar que dichos metabolitos no se han reportado anteriormente en otras especies del género *Erythrina*. El metabolito secundario 13-tetradecen-1-ol-acetate aislado a partir de la especie *Ficus religiosa* del extracto metanólico, reporta actividad antioxidante y antimicrobiana para el microorganismo *Escherichia coli* (Verma & Gupta, 2015). Los metabolitos secundarios ciclotetracosano y 1-docosano, se han identificado en la especie del hongo *Penicillium citreovirens* a partir del extracto de éter de petróleo, presentando actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (Hernández, E. 2012).



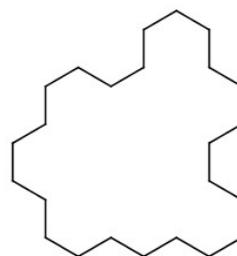
Etil ciclocosano (2)



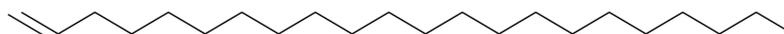
2-acetil-6-metoxinaftaleno (3)



13-tetradecen-1-ol-acetate (4)



Ciclotetracosano (5)



1-Docosano (6)

Figura 8. Estructuras de los compuestos presentes en el extracto de metanol (tallos) de la especie *Erythrina edulis*.

CONCLUSIONES.

- El extracto con un mayor rendimiento fue el de Acetato de Etilo (hojas) con 2,63%, seguido el extracto de metanol (hojas) con 2,1%, mientras que los demás extractos tuvieron rendimiento entre 0,2 y 2,15%.
- Del extracto de Acetato de Etilo (tallos), se identificó el compuesto ferulato de tridecilo **(1)** con fórmula molecular $C_{23}H_{36}O_4$ y peso molecular 376.26 g/mol, este es el primer reporte del compuesto en la especie *Erythrina edulis*. Sin embargo, en base a la literatura se ha identificado un compuesto que posee una estructura similar a partir de la especie *erythrina caffra*, denominado ferulato de octacosilo, reportando actividad moderada antiplasmódica.
- Del extracto metanólico (tallos), la fracción MeOH-T7, fue analizada por CG/EM mostrando un $t_R=28.38$ min, el compuesto probablemente es etil cicocosano **(2)**, con formula molecular $C_{24}H_{48}$ y peso molecular es 336.65 g/mol, dicha identificación se la realizo por comparación con la base de datos Wiley 7n.I.
- Del extracto metanólico (tallos), la fracción MeOH-T14, se la analizó mediante CG/EM mostrando cuatro tiempos de retención distintos, que corresponden a cuatro compuestos. De acuerdo a la base de datos Wiley 7n.I, probablemente estos compuestos podrían ser: 2-acetil-6-metoxinaftaleno **(3)** ,13-tetradecen-1-ol-acetate **(4)**, ciclotetracosano **(5)** y 1-docosano **(6)**.

REFERENCIAS.

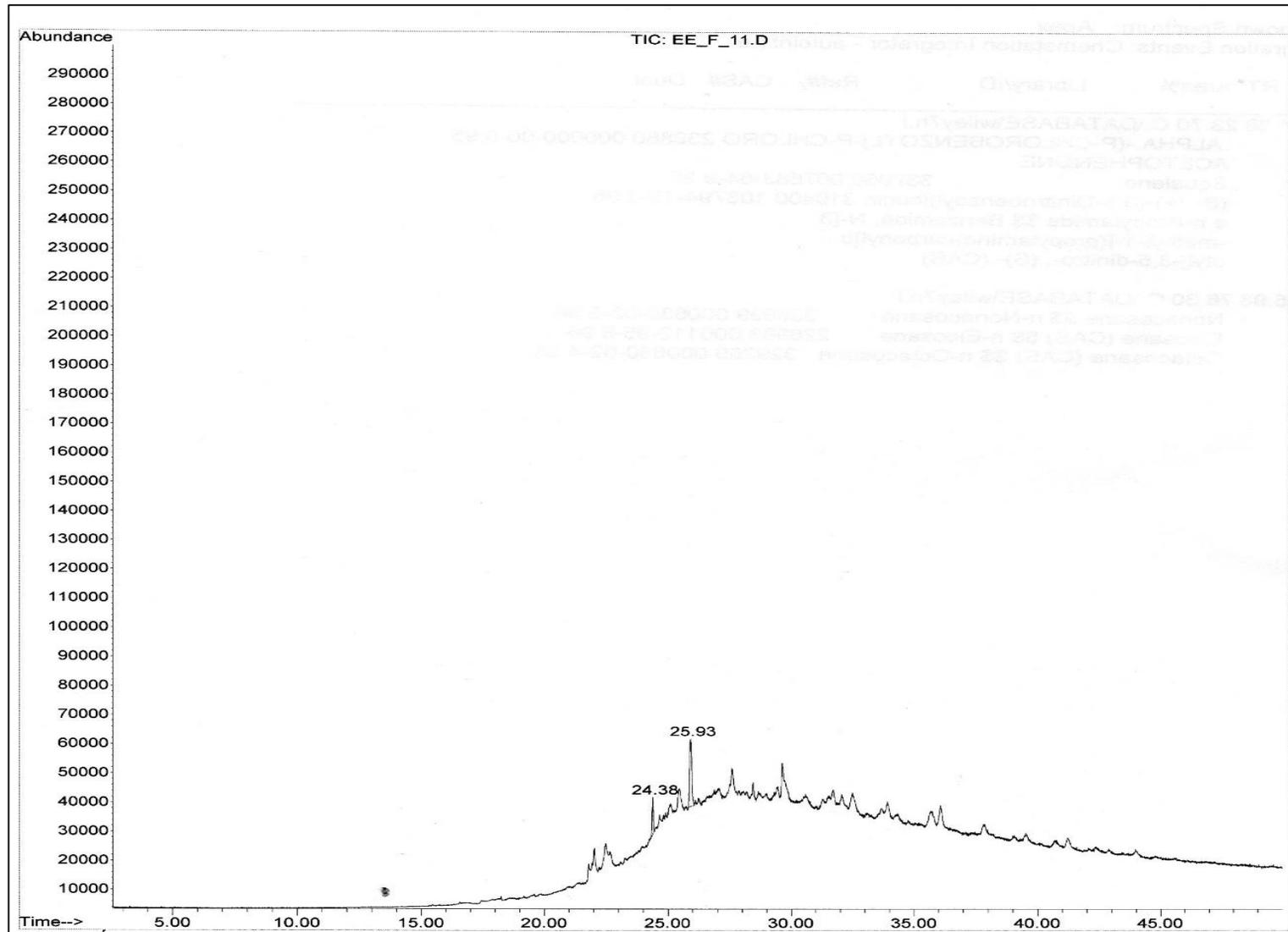
- Akerele, O. (1993). Medicina tradicional Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de La Salud*, 14, 390–395. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/47707/1/WHF_1993_14_4_p390-395_spa.pdf
- Akter, K., Barnes, E. C., Loa-Kum-Cheung, W. L., Yin, P., Kichu, M., Brophy, J. J., ... Jamie, J. F. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity and chemical characterisation of *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 171–181. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.011>
- Arias, B. (2009). Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 8(5), 389–401.
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Revista Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>
- Avello, M., & Cisternas, I. (2013). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile Origins and situation of phytotherapy in Chile. *Artículo de Revisión Rev Med Chile*, 138, 1288–1293. <http://doi.org/10.4067/S0034-98872010001100014>
- Balslev, H., Navarrete, H., Torre, L. De, & Macía, M. J. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. (pp. 1–3). Herbario QCA & Herbario AAU. Quito. Retrieved from <http://www.puce.edu.ec/portal/wr-resource/blobs/1/PUB-QCA-PUCE-2008-Enciclopedia.pdf>
- Bedane, K. G., Kusari, S., Eckelmann, D., Masesane, I. B., Spiteller, M., & Majinda, R. R. T. (2015). Erylivingstone A-C with antioxidant and antibacterial activities from *Erythrina livingstoniana*. *Fitoterapia*, 105, 113–118. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.06.016>
- Bedoya, O. (2012). Obtención de un extracto proteico a partir de harina de chachafruto. *Rev Univ. Salud.*, 14(2), 161–167. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v14n2/v14n2a06>
- Braithwaite, A. (2007). Técnicas Cromatográficas. *Química Analítica Instrumental II*, 1–123. Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf

- Bravo, E. (2013). Biodiversidad del Ecuador. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, pp. 1689–1699). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Burton, A . Falkenberg, T. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. *Organización Mundial de La Salud.*, 1–72. Retrieved from <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- Chuan, Q. (2011). Nematicidal Constituents from the Essential Oil of *Chenopodium Ambrosioides* Aerial Parts. *E-Journal of Chemistry*, 8, 143–149. <http://doi.org/10.1155/2011/470862>
- Chukwujekwu, J. C., Kock, C. A. De, Smith, P. J., Heerden, F. R. Van, & Staden, J. Van. (2016). South African Journal of Botany Antiplasmodial activity of compounds isolated from *Erythrina caffra*. *South African Journal of Botany*, 106(1), 101–103. <http://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.05.019>
- Eguiguren, P. (2012). Conservación de la Biodiversidad en Ecuador. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013\(02\)60-066](http://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013(02)60-066)
- Gómez, R. (2012). MEDICINAL PLANTS IN A SMALL VILLAGE IN THE STATE OF TABASCO , MÉXICO, 35(1), 43–49. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v35n1/v35n1a7.pdf>
- Gutierrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigacion Textil Y de Cooperacion Industrial*, (122), 35–41. Retrieved from <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>
- Hernández, E. (2012). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DETECTADOS EN LA FERMENTACIÓN LÍQUIDA DE UNA CEPA NATIVA DE *Penicillium* sp. *Pontificia Universidad Javeriana-Colombia.*, 1–54. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11796/HernandezTorresEliana2012.pdf?sequence=1>
- Hernández, L., Esparza, M., & Reyes, J. (2010). Facultad de Farmacia - Cristalización, 1–7. Retrieved from <http://asignatura.us.es/aaef/Cristalizacion .pdf>
- Herrera, S. (2001). Identificación de los alcaloides en las inflorescencia de *Erythrina*

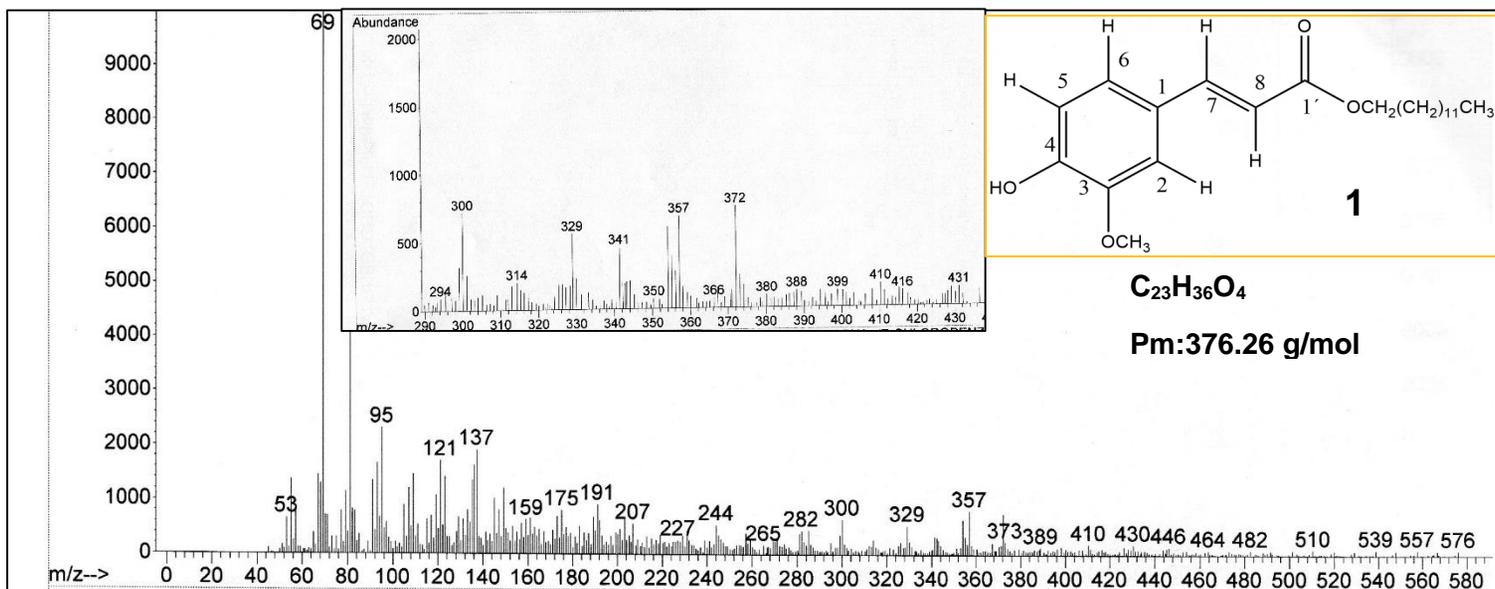
- americana Miller., 7(1), 37–42. Retrieved from www.chapingo.mx/revistas/phpscript/download.php?file=completo&id=MzM5
- Islam, M. K., Siraj, M. A., Sarker, A. B., Saha, S., Mahmud, I., & Rahman, M. M. (2015). In-vitro anthelmintic activity of three Bangladeshi plants against *Paramphistomum cervi* and *Haemonchus contortus*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 12(2), 171–174. <http://doi.org/10.1515/jcim-2014-0059>
- Jaramillo, O. A. (2008). Notas de Físico-Química. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 2(6), 1–35. Retrieved from <http://www.cie.unam.mx/~ojs/pub/Liquid3/liquid3pdf.pdf>
- Kwamou, G. M. N., Sandjo, L. P., Kuete, V., Wandja, A. a K., Tankeo, S. B., Efferth, T., & Nkengfack, A. E. (2015). Unprecedented new nonadecyl para-hydroperoxycinnamate isolated from *Erythrina excelsa* and its cytotoxic activity. *Natural Product Research*, 29(10), 921–5. <http://doi.org/10.1080/14786419.2014.959519>
- Lancefield, S. (2011). Fig. S1. ¹H NMR spectra for (A) methyl ferulate and (B) ethyl ferulate. *Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 20(June), 10–13. <http://doi.org/10.4014/jmb.1104.04014>
- Lozano, P. E. (2002). Los tipos de bosque en el sur del Ecuador. *Universidad Estatal Amazónica*, (JANUARY 2002), 29–50. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/233936622_Los_tipos_de_bosque_en_el_sur_del_Ecuador
- Perez, G. (1984). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina Edulis*. *Phytochemistry*, 23(6), 1229–1232. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80431-8](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80431-8)
- Pino-Rodriguez, S., Prieto-González, S., Pérez-Rodriguez, M. E., & Molina-Torres, J. (2004). Género *Erythrina*: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. In *Acta Farmaceutica Bonaerense* (Vol. 23, pp. 252–258).
- Rojas, R. (2014). Introducción a la Resonancia Magnética ., 58. Retrieved from <http://smri.org.mx/memorias/rad2010/platicas/3.pdf>
- Salaverry, O. (2012). Plantas medicinales y medicina moderna. *Instituto Nacional de Salud.*, 1, 155–158. Retrieved from <http://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/INS/374/1/BOLETIN-2012-set-oct-155-157.pdf>

- Sáenz, C. (2010). Agentes antiparasitarios de plantas de la Amazonia Peruana empleadas en medicina tradicional. Retrieved from https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/4759/31368_saenz_bocanegra_claudia_olga.pdf?sequence=1
- Tuñez, I. (2004). Cromatografía en Capa Fina., 6, 10–20. Retrieved from <http://biblioteca.uns.edu.pe/saladocentes/archivoz/curzoz/cromatograf?a.pdf>
- Verma, I., & Gupta, R. K. (2015). Estimation of phytochemical , nutritional , antioxidant and antibacterial activity of dried fruit of sacred figs (*Ficus religiosa*) and formulation of value added product (Hard Candy), 4(3), 257–267. Retrieved from <http://www.phytojournal.com/archives/2015/vol4issue3/PartD/4-3-57.pdf>
- Vivot, E. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos. *Universidad Nacional de Entre Ríos – Uner–, Oro Verde (Entre Ríos, Argentina)*, 165–185. Retrieved from <http://www.sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/7097/7098/7110/7114/82960.pdf>
- Wink, M. (2014). Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites, 12771–12791. <http://doi.org/10.3390/molecules171112771>
- Yaluff, G. (2015). Actividad antiparasitaria in vitro de extractos etanolicos de *Erythrina crista-galli* L., *Erythrina falcata* Benth y *Erythrina dominguezii* Hassl. *Mem.Inst.Investig.Cienc.Salud*, 13(2), 60–66. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013\(02\)60-066](http://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013(02)60-066)
- Yenesew, A., Akala, H. M., Twinomuhwezi, H., Chepkirui, C., Irungu, B. N., Eyase, F. L., ... Waters, N. C. (2012). The antiplasmodial and radical scavenging activities of flavonoids of *Erythrina burtii*. *Acta Tropica*, 123(2), 123–127. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.011>
- Yordan Martínez Aguilar, C., Rodríguez, F. S., Manuel Almeida Saavedra, C., Espinosa, R. H., & Yero, O. M. (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.

ANEXOS.



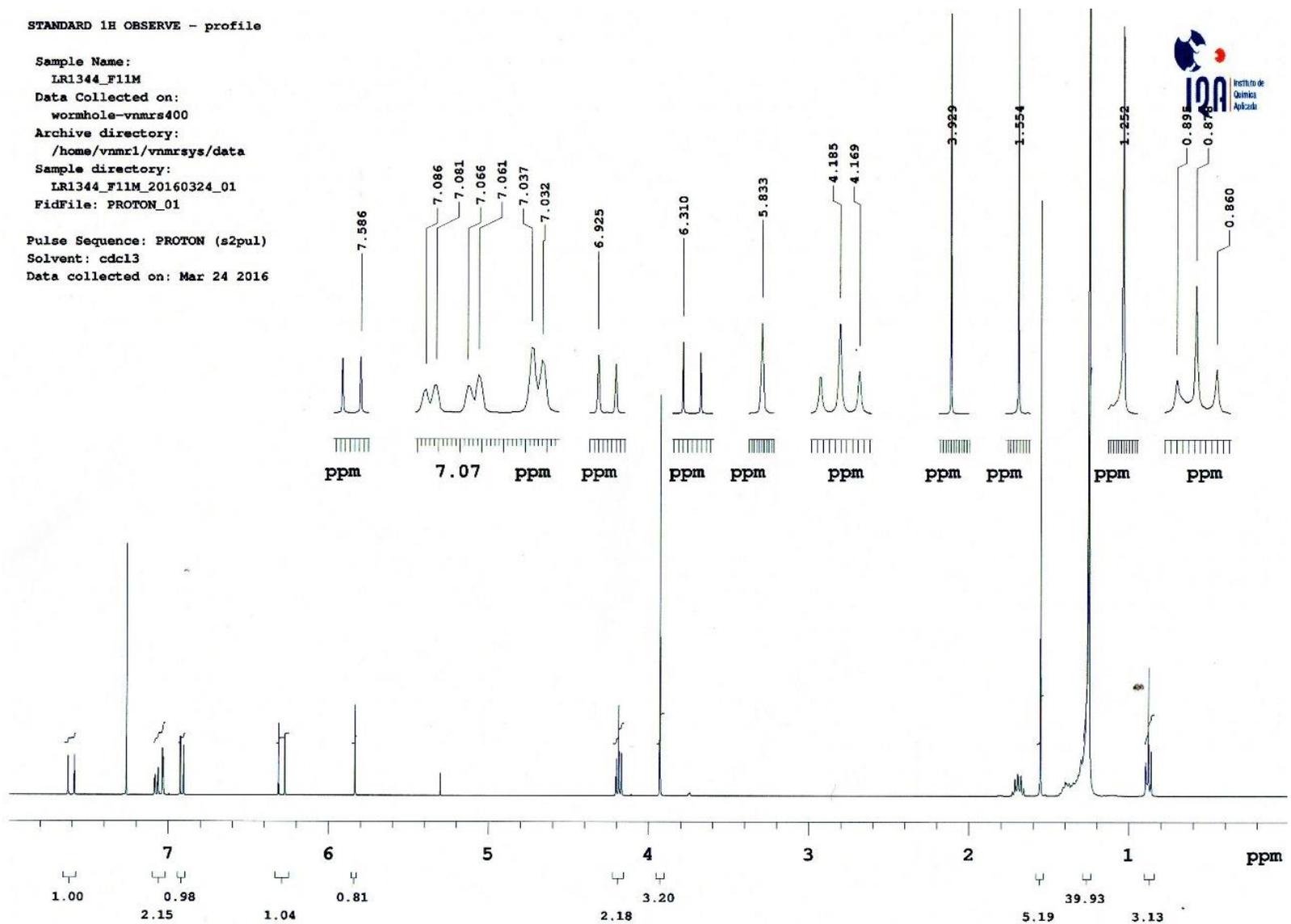
ANEXO 1: Cromatograma de CG de la fracción AcOEt-MT11 de la especie *Erythrina edulis*, observando un $t_R=25.93$ min.



ANEXO 2. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como Ferulato de tridecilo (**1**) aislado de la fracción AcOEt-MT11 de la especie *Erythrina edulis*.

STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR1344_F11M
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LR1344_F11M_20160324_01
FidFile: PROTON_01
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 24 2016

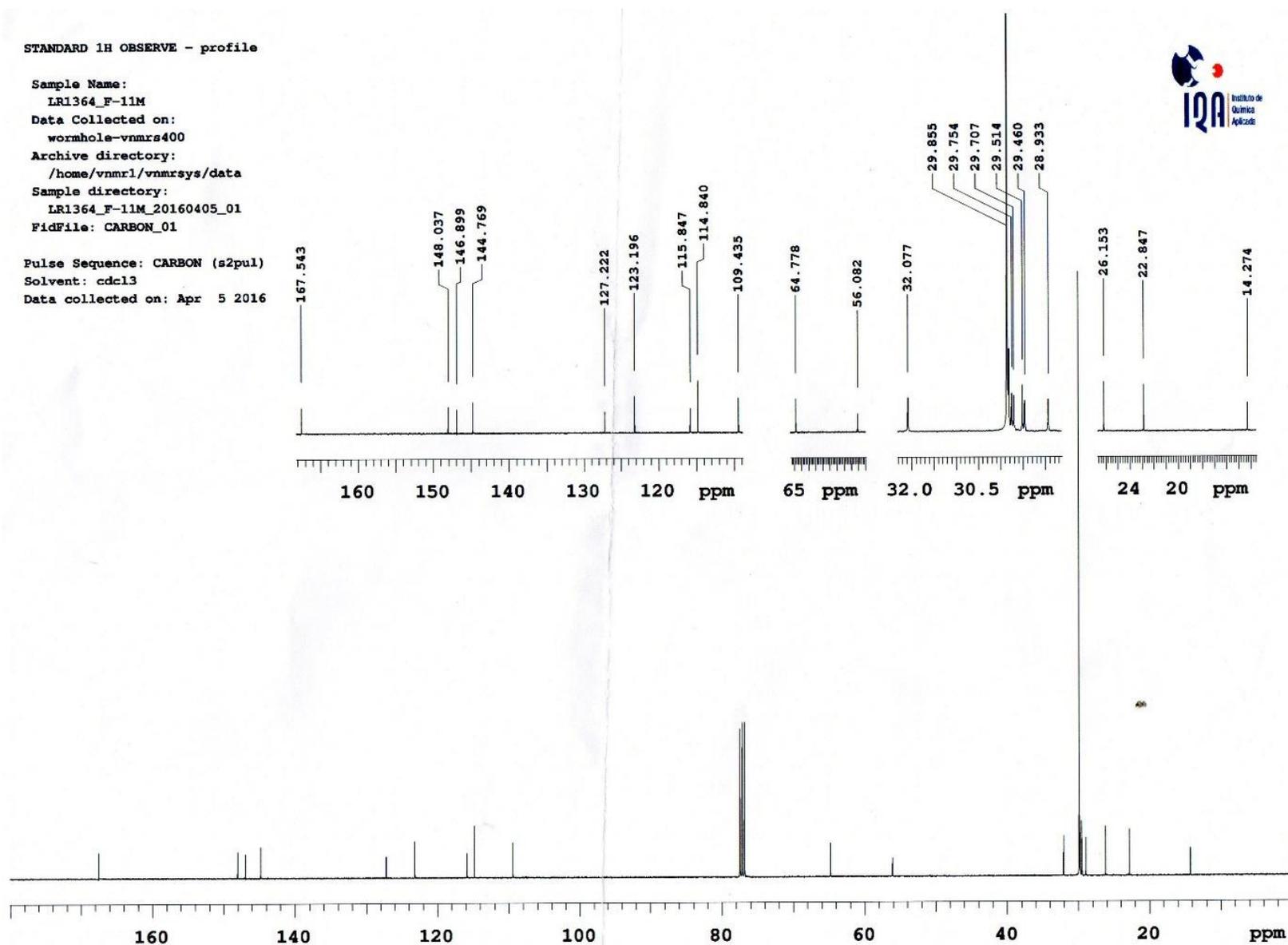


ANEXO 3: Espectro de RMN ^1H correspondiente al compuesto ferulato de tridecilo (**1**) aislado a partir de la fracción AcOEt-MT11 de la especie *Erythrina edulis*.

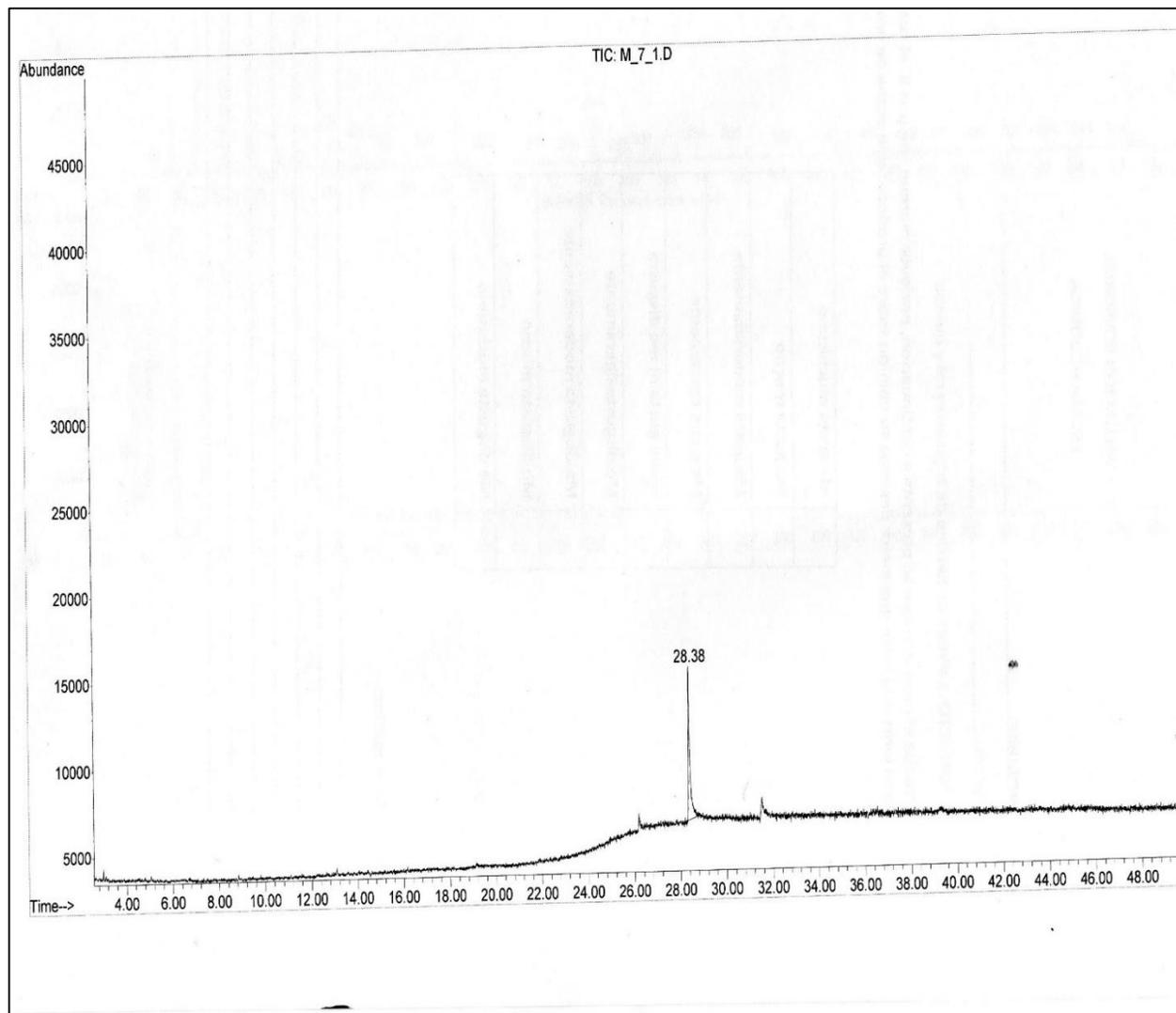
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LRI364_F-11M
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LRI364_F-11M_20160405_01
FidFile: CARBON_01

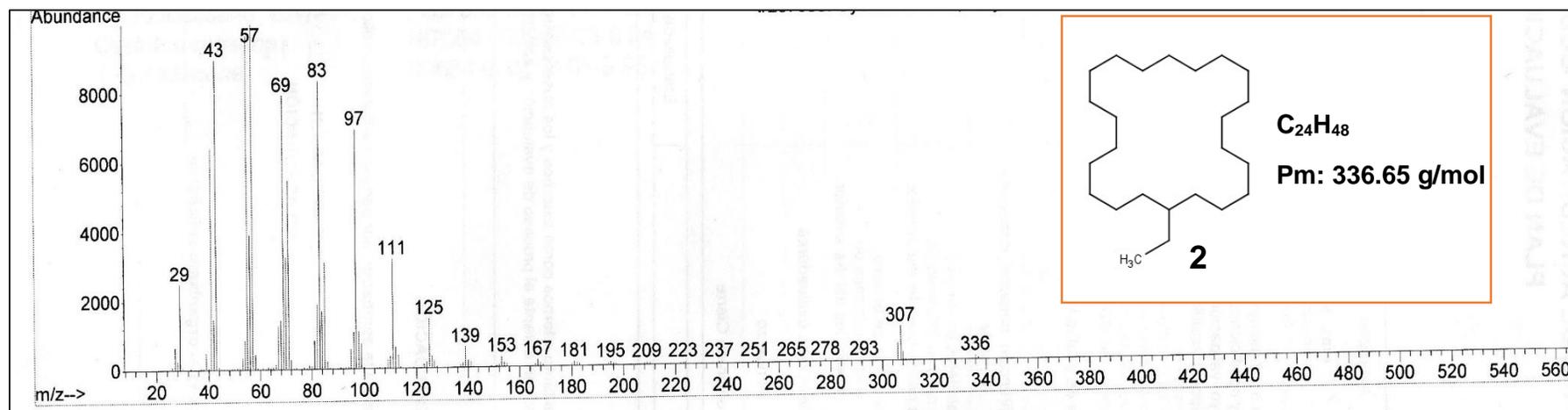
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 5 2016



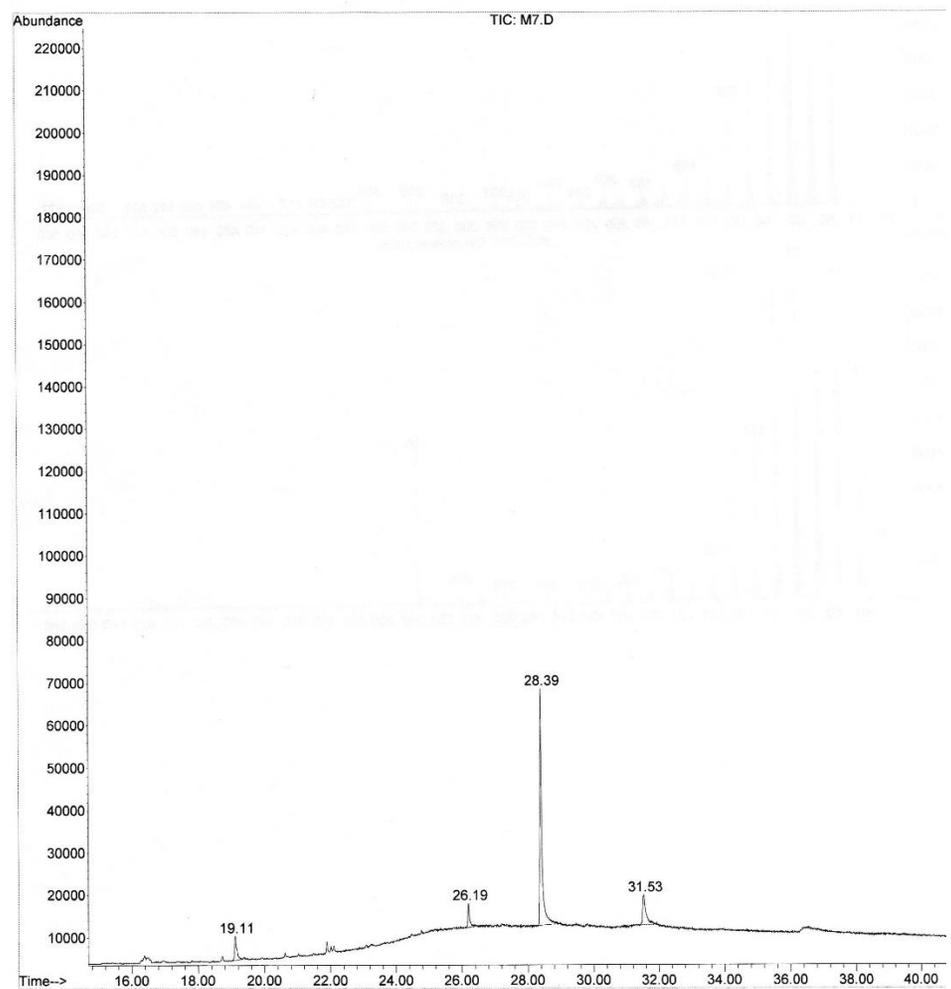
ANEXO 4: Espectro de RMN ¹³C correspondiente al compuesto ferulato de tridecilo (**1**) aislado a partir de la fracción AcOEt-MT11 de la especie *Erythrina edulis*.



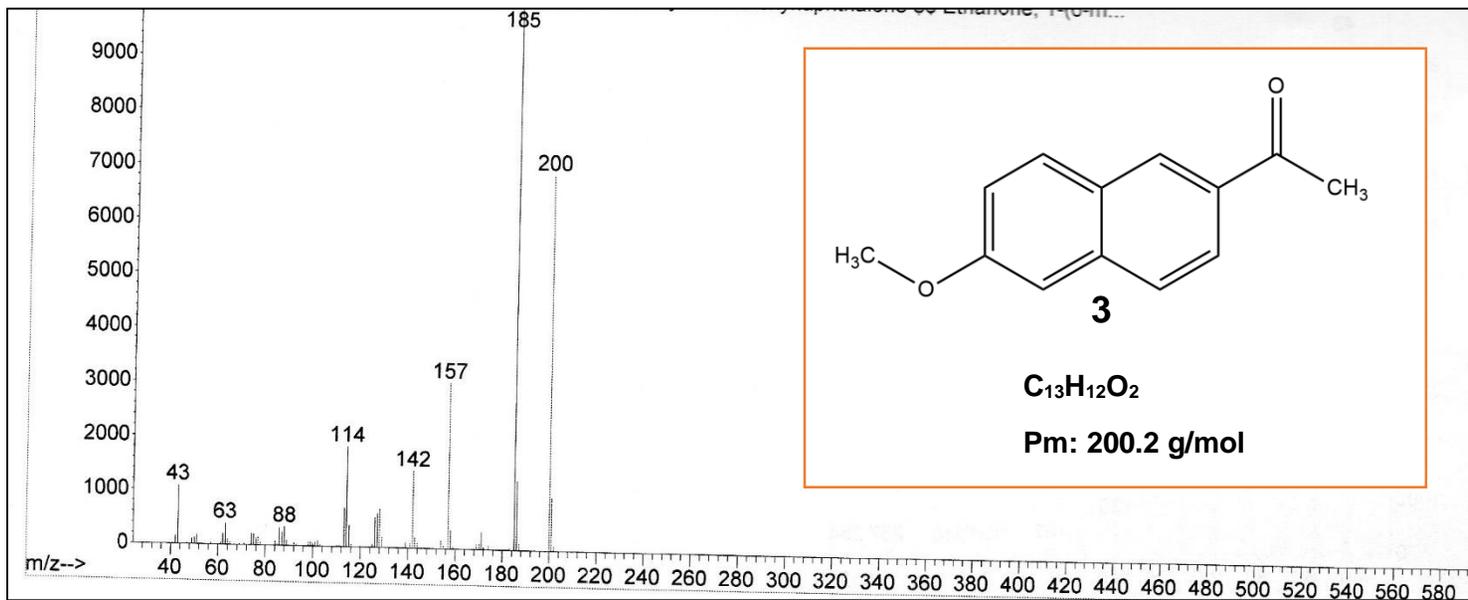
ANEXO 5: Cromatograma de CG aislado de la fracción MeOH-T7, con un $t_R=28.38$ min.



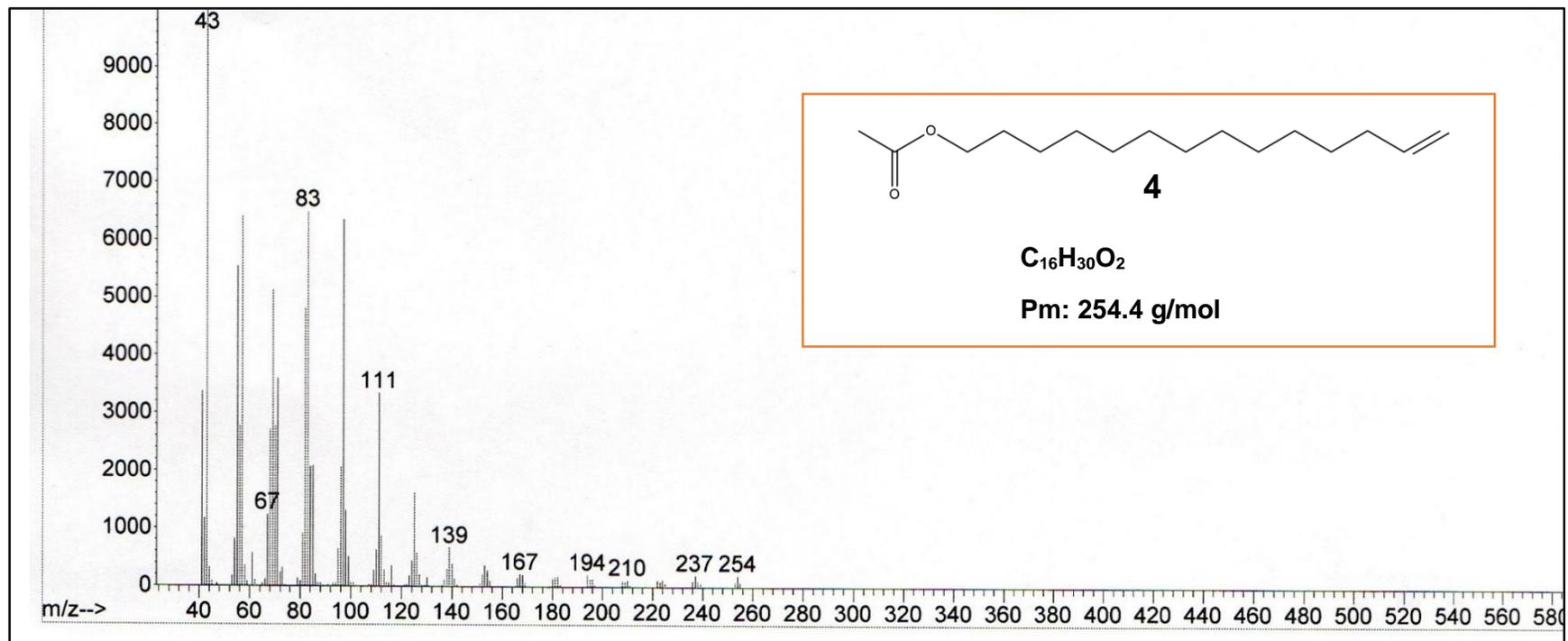
ANEXO 6. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como etil ciclocosano (**2**) aislado de la fracción de la MeOH-T7 especie *Erythrina edulis*.



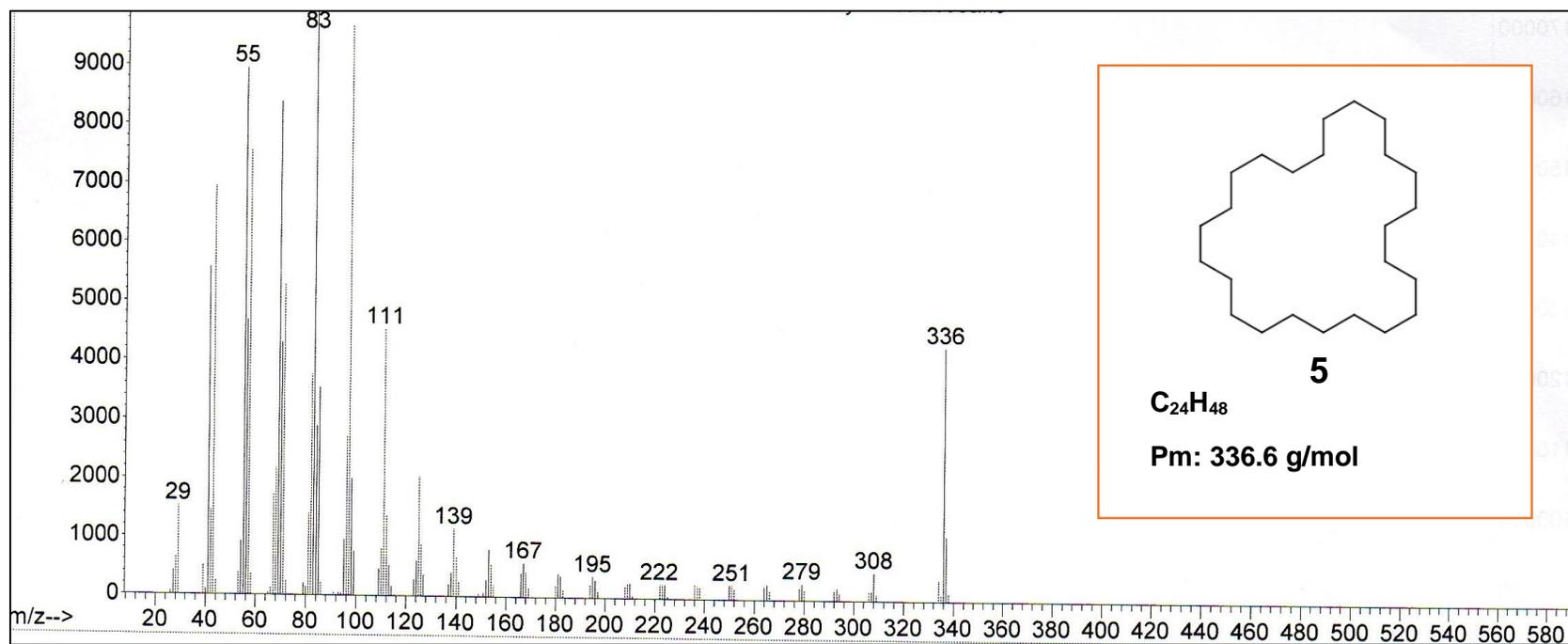
ANEXO 7: Cromatograma de CG correspondiente a la fracción MeOH-T14 de la especie *Erythrina edulis*. Se muestran los cuatros tiempos de retención detectados: $t_R=19.11$ min, $t_R=25.19$, $t_R=28.39$ y $t_R=31.53$.



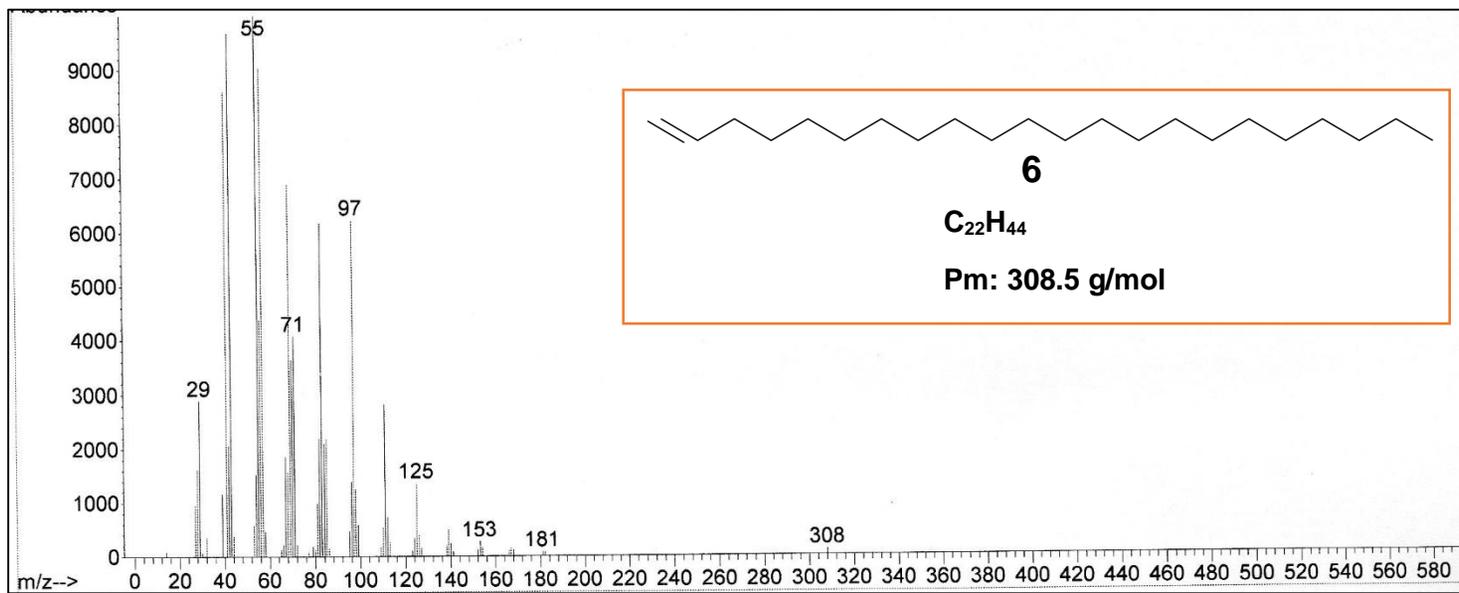
ANEXO 8. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como 2-acetil-6-metoxinaftaleno (**3**) con un $t_{R=19.11}$ min.



ANEXO 9. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como 13-tetradecen-1-ol-acetate (**4**) con un $t_{R}=26.19$ min.



ANEXO 10. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como cicloteicosano (**5**) con un $t_R=28.39$ min.



ANEXO 11. Espectro de masas correspondiente al compuesto identificado como 1-docosano (**6**) con un $t_R=31.53$.