



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

**“Aislamiento de Alcaloides de 5 Especies Alucinógenas de
la Familia Lycopodiaceae Usadas en Medicina Ancestral
por los Rikuyhampiyachak (visionarios) de la Etnia
Saraguro – Ecuador”**

**Tesis de Grado Previa a la
Obtención del Título en
Ingeniería Química**

AUTORA

Ana Lucia Guamán Guamán

DIRECTOR

Ing. Chabaco Patricio Armijos Riofrío

**Loja - Ecuador
2010**

CESIÓN DE DERECHOS

Yo Ana Lucia Guamán Guamán, declaro ser la autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus Representantes Legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Loja, junio de 2010

Ana Lucía Guamán Guamán

C.I. 1104101751

CERTIFICACIÓN DE REVISIÓN DEL TUTOR

Ing.

Chabaco Patricio Armijos Riofrío

CERTIFICA

Que el presente trabajo realizado por la estudiante Ana Lucía Guamán Guamán, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por lo tanto autorizo su presentación.

Chabaco Patricio Armijos
DIRECTOR DE TESIS

Loja, Junio del 2010.

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación y todo su contenido son de responsabilidad absoluta de la autora.

Ana Lucía Guamán Guamán

C.I. 1104101751

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, quienes con su incondicional apoyo, económico y moral contribuyeron a la culminación de mi carrera profesional, a mis hermanos y hermanas quienes me brindaron su apoyo y amistad invaluable en los momentos de alegría y tristeza, dedico también este trabajo a mi hija Clara Yanina, razón de mi vida, motivo de inspiración y fortaleza, quien con su ternura y cariño determinó mis constantes sacrificios.

Ana Lucia

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

A Dios por darme la vida y la sabiduría para enfrentar con serenidad los continuos retos.

A mis padres, quienes con sacrificio y confianza supieron guiarme para enfrentar la vida con estabilidad y valentía.

Al personal del instituto de Química Aplicada, Ingenieros, Tesistas, quienes desinteresadamente aportaron con sus conocimientos durante la realización de este trabajo. De manera especial extendo mis más sinceros agradecimientos a los ingenieros José Miguel, Vladimir y Jorge por su apoyo constante e incondicional.

Al Ing. Chabaco Armijos, en calidad de director de Tesis, quien con sus sabios conocimientos y experiencias supo guiarme durante el proceso de realización de la presente investigación.

INDICE DE CONTENIDOS

CESIÓN DE DERECHOS	I
CERTIFICACIÓN DE REVISIÓN DEL TUTOR	II
AUTORÍA	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
CONTENIDO	VI
ARTÍCULO: EN ESTE NUMERAL SE INCLUYE EL ARTÍCULO EN INGLÉS.	VII
1. PRESENTACIÓN DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	
	1
1.1. Fin del proyecto.....	2
1.2. Propósito del proyecto.....	2
1.3. Componentes del proyecto.....	2
1.4. Hipótesis.....	3
1.5. Justificación y antecedentes.....	4
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Medicina tradicional.....	8
2.1.1. Medicina tradicional y el empleo de especies alucinógenas.....	9
2.2. Alcaloides.....	9
2.2.1. Generalidades.....	9
2.2.2. Historia.....	10
2.2.3. Definición.....	11
2.2.4. Estado Natural y Distribución.....	12
2.2.5. Localización en especies vegetales.....	13
2.2.6. Función en las especies.....	13
2.2.7. Propiedades fisicoquímicas.....	14
2.2.8. Detección y caracterización.....	15
2.2.9. Extracción de los alcaloides.....	16
2.2.9.1. Extracción con un disolvente en medio alcalino...	16
2.2.9.2. Extracción en medio ácido.....	18
2.2.9.3. Aislamiento de alcaloides a escala del laboratorio.....	19
2.2.10. Actividad biológica.....	21
2.3. Técnicas de Identificación de Metabolitos Secundarios.....	22
2.3.1. Tamizaje fitoquímico para la determinación de alcaloides.....	22
2.3.1.1. Ensayo de Dragendoff.....	22
2.3.1.2. Ensayo de Mayer.....	22
2.3.1.3. Ensayo de Wagner.....	23

2.3.2. Tamizaje Fitoquímico para la determinación de Metabolitos secundarios	23
2.3.2.1. Ensayo de Baljet.....	23
2.3.2.2. Ensayo de Borntrager.....	23
2.3.2.3. Ensayo Liebermann-Burchard.....	24
2.3.2.4. Ensayo de espuma.....	25
2.3.2.5. Ensayo del cloruro férrico.....	25
2.3.2.6. Ensayo de Shinoda.....	26
2.4. Cromatografía.....	26
2.4.1. Cromatografía de partición.....	27
2.4.2. Aislamiento por Cromatografía de Capa fina (TLC).....	28
2.4.3. Principios básicos de la Cromatografía de Capa fina (TLC).....	28
2.4.4. Aplicación de la Cromatografía de Capa Fina.....	29
2.5. Descripción de las Especies.....	30
2.5.1. Clasificación taxonómica de <i>Huperzia crassa</i>	31
2.5.2. Clasificación taxonómica de <i>Huperzia hystrix</i>	31
2.5.3. Clasificación taxonómica de <i>Huperzia compacta</i>	32
2.5.4. Clasificación taxonómica de <i>Huperzia columnaris</i>	32
2.5.5. Clasificación taxonómica de <i>Huperzia espinosana</i>	32
2.6. Usos etnomedicinales del género.....	33
2.6.1. Bioactividad de la Huperzina A.....	34
3. MATEERIALES Y MÉTODOS	36
3.1. Obtención de extractos totales.....	37
3.2. Diagrama de flujo para la obtención de extractos totales.....	37
3.3. Descripción del diagrama de flujo para la obtención de extractos totales.....	38
3.3.1. Recolección de especies.....	38
3.3.2. Selección de especies.....	39
3.3.3. Secado y trituración.....	39
3.3.4. Extracción por Maceración.....	40
3.3.5. Filtración y concentración.....	41
3.4. Marchas fitoquímicas.....	44
3.5. Determinación cualitativa de alcaloides.....	45
3.6. Aislamiento de alcaloides.....	45
3.6.1. Acidificación.....	47
3.6.2. Extracción Líquido – Líquido.....	48
3.6.3. Alcalinización del la fase acuosa.....	49
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	51
4.1. Obtención de extractos totales.....	52

4.1.1. Análisis de extractos totales obtenidos mediante el empleo de distintos solventes.....	52
4.2. Rastreo cualitativo para la determinación de alcaloides.....	53
4.3. Tamizaje Fitoquímico.....	54
4.3.1. Tamizaje fitoquímico para la determinación de metabolitos secundarios.....	54
4.3.2. Tamizaje fitoquímico para la determinación de alcaloides.....	55
4.4. Aislamiento de Alcaloides.....	56
5. CONCLUSIONES.....	61
5.1. Conclusiones.....	62
5.2. Recomendaciones.....	63

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1 Alcaloides en el comercio y su acción fisiológica.....	21
Tabla N°2 Lugar de recolección de las especies <i>Lycopodiaceae</i>	39
Tabla N°3 Porcentaje de extractos totales.....	52
Tabla N°4 Porcentaje de extractos totales según el solvente.....	52
Tabla N°5 Resultado de las marchas fitoquímicas el extracto etanólico.....	54
Tabla N°6 Pruebas colorimétricas utilizadas para la identificación cualitativa de los alcaloides.....	55
Tabla N°7 Rendimiento de las fracciones totales de alcaloides.....	56
Tabla N°8 Fracciones de alcaloides totales a diferente pH de extracción.....	57
Tabla N°9 Análisis en TLC de las fracciones totales de alcaloides.....	58

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema N°1 Aislamiento de alcaloides en medio básico.....	17
Esquema N°2 Extracción de alcaloides en medio débilmente ácido.....	18
Esquema N°3 Extracción de alcaloides a escala de laboratorio.....	20
Esquema N°4 Obtención de extractos totales.....	37
Esquema N°5 Proceso de extracción.....	40
Esquema N°6 Aislamiento de alcaloides.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura N°1 Pseudoalcaloide; β -esquita.....	12
Figura N°2. Protoalcaloide serotonina.....	12
Figura N°3 Extracción liquido-liquido.....	27
Figura N°4 <i>Huperzia crassa</i> (Humb & Bonpl. Ex. Willd) Rothm.....	31
Figura N°5 <i>Huperzia hystrix</i> (Herter) Holub.....	31
Figura N°6. <i>Huperzia compacta</i> (Hook) Trevis.....	32
Figura N°7 <i>Huperzia columnaris</i> B. Φ llg.....	32
Figura N°8 <i>Huperzia espinosana</i> B. Φ llg.....	32
Figura N°9 Ubicación geográfica de recolección de las especies.....	38
Figura N°10 Pesado de muestra seca.....	41
Figura N°11 Precipitado de extracto etanólico redissuelto.....	43
Figura N°12 Separación de precipitados del extracto etanólico.....	43
Figura N°13 Extracto etanólico sin precipitados.....	43
Figura N°14 Extracto etanólico con menor cantidad de precipitados.....	44
Figura N°15 Extracto etanólico, de acetato de etilo y hexánico.....	44
Figura N°16 Ensayos para la determinación alcaloides.....	45
Figura N°17 Precipitado Acuoso ácido	47
Figura N°18 Precipitado en reposo.....	48
Figura N°19 Separación del precipitado con una pipeta Pasteur.....	48
Figura N°20 Extracción líquido-líquido.....	49
Figura N°21 Alcalinización de la fase acuosa con Bicarbonato de Sodio.....	50
Figura N°22 Alcaloides Libres totales.....	50
Figura N°23 <i>H. crassa</i> , TLC Eluída con Metanol -HCl 7:3.....	55
Figura N°4 <i>H. crassa</i> , TLC revelada con vainillina.....	55

ANEXOS

Anexo N°I Obtención de extractos para el Tamizaje fitoquímico.....	65
Anexo N°II Tamizaje fitoquímico para la determinación de metabolitos secundarios en hexano.....	66
Anexo N°III Reacciones para determinación de metabolitos secundarios en extracto etanólico.....	66
Anexo N°IV Fraccionamiento Líquido – Líquido.....	67
Anexo N°V Fraccionamiento Líquido-Líquido.....	67
Anexo N°VI Cromatografía de capa fina en extractos de <i>Huperzia</i> antes del proceso de aislamiento de metabolitos secundarios.....	68
Anexo VII Tamizaje fitoquímico en extracto etanólico.....	69
Anexo VIII Tamizaje fitoquímico para alcaloides en extracto etanólico.....	69
Anexo IX Tamizaje fitoquímico para la determinación de alcaloides en el extracto hexánico.....	70

Isolation of Alkaloids From five Hallucinogenic Species the uses of the Lycopodiaceae Family in Ancestral Medicine by Rikuyhampiyachak (visionaries) in the Saraguro Culture- Ecuador

Ana Guamán¹, Chabaco Armijos², Omar Malagon², Miguel Andrade²
e-mail: alguaman@utpl.edu.ec

Chemical Engineering School - Technical University of Loja
San Cayetano Alto s/n, Postal Code 11-01-608, Loja Ecuador

Institute of Applied Chemistry (IQA) -Natural Products Plant (NPP)-Technical University of Loja (UTPL), San Cayetano
Alto s / n, Zip Code 11-01-608, Loja-Ecuador

Summary

Recent studies have shown that the plant species from the family LYCOPODIACEA, whose compositions has been found to contain alkaloids like Huperzine A and Sauroine, has been used in traditional medicine. These same alkaloids which inhibit acetylcholinesterase have been used in the treatment of Alzheimer's in occidental medicine. This paper addresses the isolation of alkaloids present in five species in the Lycopodiaceae family, *crassa*, *H. compacta*, *H. hystrix*, *H. columnaris* and *H. espinosana*, found in Loja province. The Phytochemical screening for determination of alkaloids (Wagner, Mayer, and Dragendorff) were performed using hexane, ethyl acetate and ethanol extracts. Only in the case of the ethanol extracts gave positive results in alkaloid determination. Baljet, Borntrager, Liebermann-Burchard, foam, iron-chloride, and Shinoda tests were performed to find other secondary compounds were tested only using the ethanol extract. The thin layer chromatography technique confirms the presence of other secondary compounds in addition to the alkaloids present in each species that are revealed in the chromatographic plaques reveals the positive reaction of Dragendorff and vanillin.

Key Words: Rikuyhampiyachak, Lycopodiaceae, Phytochemical screening, Alkaloids.

Many species of plants have been used in medicine and food. [1] *Huperzia serrata* was used across Asia as a diuretic and anesthetic. Modern medicine has isolated the bioactive compound Huperzina A, which is being studied for its potential in the treatment of dementia, including Alzheimer's disease. [2, 12] On the other side of the world, in Argentina, *Huperzia saururus* has been studied for its uses as an aphrodisiac, and these studies have found the alkaloid Sauroina which inhibits Acetylcholinesterase activity. [3]

In Peru *Huperzia crassa* is used as a talisman associated with the fertility of domestic animals, especially guinea pigs. [4] Other species of *Huperzia* including

brevifolia, *H. kuesteri* y *H. sellifolia* are sold for their magical value. [4]

Huperzia tetragona was used to treat evil spirits in both humans and cows in the Andes Mountains of Ecuador. [5, 4] In 1838 Hooker [4] reported the possibility of using the plants in a systematic cleanse because of the high alkaloid content. The indigenous of the Azuay region recognized the power of the *Huperzia tetragona* and used it to treat Elephantiasis and leprosy. [4]

The traditional healers of the Saraguro culture, including Rikuyhampiyachak or visionaries have used species of the Lycopodiaceae family [5] in healing rituals and ceremonies. Unfortunately there have been few ethno-botanical studies, except

Species	Collection area	Location	Height (m s n m)
<i>Huperzia crassa</i>	Inguera o Aguarango	17700781E; 9586086N	3478
<i>Huperzia compacta</i>	Inguera o Aguarango	17700781E; 9586086N	3478
	Loma de Torre o Peña Blanca	17696489E; 959404N	3316
<i>Huperzia hystrix</i>	Loma de Torre o Peña Blanca	17696489E; 959404N	3316
<i>Huperzia columnaris</i>	Fierro Urku	17685761E; 959095N	3900
<i>Huperzia espinosana</i>	Loma de Torre o Peña blanca	17696489E; 959404N	3316

for that of Morocho, (2006) in Saraguro and by Andrade, (2007) in the Parish of San Lucas in Loja.

This paper conducts a quantitative study, with the goal of isolating the alkaloids and other secondary compounds of interest, which are responsible for the pharmacological and hallucinogenic affects that have been continuously used in indigenous communities for traditional medical practice.

Within this context, the study was conducted in the Institute of Applied Chemistry at the Technical University of Loja (UTPL) with the goal of discovering, valuing and conserving the therapeutic resources used within the Saraguro culture. In addition, with the goal of creating relationships and modes of direct communication between the Hampiyachak (healers) and those dedicated to scientific research, helping to establish important sources of scientific inquiry.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of species

The samples of species were collected in the mountains of Saraguro and San Lucas (Table N°1), (Figure N°1) and brought the plants to Natural Products laboratory for separation into roots, grasses and mosses and dried at 45 °C in a PPN drier for three days then stored. At the same time they were brought to the National University in Loja for classification.

Table 1 Areas of collection of *Lycopodiaceae* species

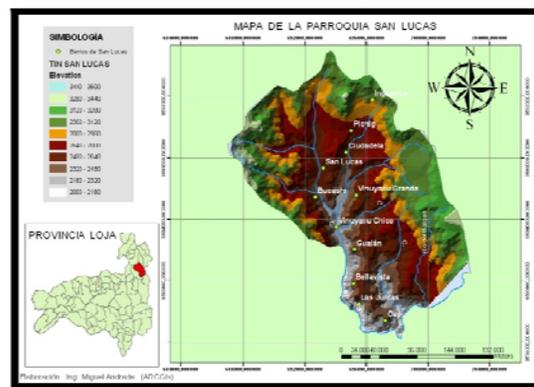


Figure 1 Geographic location of the areas of collection of the species

Source: Andrade, et al. 2009.

2.2. Extraction for soaking and chemical screening

200g of the dried plant was used and pulverized for the extraction process; the samples were then soaked and agitated at room temperature for five hours, with ratio of 10:1 solvent: plant and a speed of agitation of 1500-2000 rotations per minute.

The plant was soaked on three successive occasions, using three types of solvents of increasing polarity. The first solvent was Hexane, the second Ethyl Acetate and the third Ethanol. Each solvent contained extracts of each species from the extraction process and was screened for the presence of alkaloids using the Wagner, Mayer and Dragendorff tests. Additionally in the samples containing the ethanol extract the following tests were performed: Baljet (Coumarines of Lactones kind), Borntrager (Quinones), Liebermann-Burchard (triterpens), Foam (saponins), iron-chloride (Tanins and/o phenolic compounds) and Shinoda (flavonoids).

2.3. Isolation of Alkaloids

Hexane, ethyl acetate, and ethanol extracts were concentrated with vacuum evaporation and stored, with the exception of the ethanol extract from which the alkaloids were isolated.

The process of isolation of the alkaloids became with the acidification of the ethanol extract using a 2% solution of sulfuric acid, which was placed in a decanter to be washed four times with dichloromethane as a method of extraction. Then the solution was alkalizing with sodium bicarbonate until it reached a pH of 7. Then the sample was washed ten times with dichloromethane and process to increase the pH with ammonium hydroxide until it reached a pH of 11, understanding that each extraction has different pH.

In each phase of the liquid-liquid extraction, a colorimetric stain was applied of Dragendorff (organic phase) and Mayer (acid phase) to determine the presence of lack of alkaloids in each of the phases. In this manner, the extraction continues if the stain test were positive in both phases. If the reaction was positive in only the acid phase than the sample was alkalized each phase and continued with the extractions. The tests continued until none of the phases had a positive reaction for either the Mayer or the Dragendorff tests.

3. Results and Analysis

3.1. Acquisition of total extracts

During the process of exhaustive extraction from 200g of plant material, it was determined (Table N°2) that in total the extract obtained independently of a given solvent, observing that the *Huperzia columnaris* had the largest yield of all the samples (29.60%) while the *H. crassa* and *H. hystrix* with a lower yields of de 21.40% and 21.72% respectively.

Table N°2 Resulting yield of total extracts

Species	Initial Sample (g).	Total extracts (g)	Yield (%)
<i>Huperzia crassa</i>	200	42,800	21,40
<i>Huperzia compacta</i>	200	49,091	24,54
<i>Huperzia hystrix</i>	200	43,450	21,72
<i>Huperzia columnaris</i>	200	59,340	29,67
<i>Huperzia espinosana</i>	200	45,160	22,58

3.1.1. Analysis of total extracts obtained with the use of various solvents

Table three demonstrated the percentage of total extracts obtained using a given solvent for the five species, where, in the extraction the plant material with ethanol of the five species *Huperzia crassa*, *H. compacta*, *H. hystrix*, *H. columnaris* and *H. espinosana*, was measured that the *H. columnaris* had the highest yield (23.83%) and the *Huperzia compacta* the lowest yield (15,61%). Generally we can say that the ethanol extract presented the largest yield of extraction with respect to the other two solvents, Hexane and ethyl acetate. [6, 7, 2, 8, 9]

Table N°3 Yield of total extracts obtained using different solvents

Species	Initial Sample (g)	Solvents	Weigh of extract (g)	Yield %
<i>Huperzia crassa</i>	200	Hexano	1,66	0,83
		Acetato de etilo	4,98	2,49
		Etanol	36,16	18,08
<i>Huperzia compacta</i>	200	Hexano	4,49	2,24
		Acetato de etilo	13,37	6,68
		Etanol	31,23	15,61
<i>Huperzia hystrix</i>	200	Hexano	2,04	1,02
		Acetato de etilo	9,63	4,81
		Etanol	31,78	15,89
<i>Huperzia columnaris</i>	200	Hexano	1,79	0,89
		Acetato de etilo	9,88	4,94
		Etanol	47,67	23,83
<i>Huperzia espinosana</i>	200	Hexano	3,09	1,54
		Acetato de etilo	9,73	4,86
		Etanol	32,24	16,17

3.2. Stain cultivation for the identification of alkaloids

According to the following qualitative determinations using the Dragendorff and Meyer tests to determine the presence of alkaloids, it can be said that the hexane extract does not contain alkaloids. The same can be said of the samples tested with the ethyl acetate. The opposite is true of the sample tested with ethanol which resulted in positive results on the Dragendorff and Mayer tests for which the study focused on the isolation of alkaloids in the *Huperzia crassa*, *H. compacta*, *H. Hystrix*, *H. columnaris* y *H. espinosana* species. The etanólico extract was in accordance with the forms of extraction used for the isolation of the alkaloids. [7, 9, 2] The alkaloids were in polar solvents, acidic solutions and hydro alcohols. [10]

3.3 Phytochemical screening for the presence of secondary compounds.

Using the Baljet test, the lack of de Coumarines of the Lactones in all the species, though in the iron chlorine (Tanins and/o compounds fenólicos) developed a greed coloration that corresponded with the presence of Tanins. The Shinoda (flavonoids),

Liebermann-Burchard (triterpens) y foam test (saponins) also had positive results (Table N°4). From this, we can day that during the chemical screening and the fine point chromatography the presence of other secondary compounds that contained alkaloids was determined (Figure N°2 y 3).

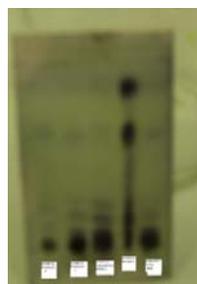


Figure N°2 TLC N°3 TLC Methanol- ethyl acetate 7:3

Figure Revealed with vainillina

Table N°4 Results of Phytochemical screening on ethanol extracts

Species	Flavonoids	Tanins	Triterpens and/o esterooids	Lactones / Coumarinas	Saponins
<i>Huperzia crassa v</i>	+	+	+	-	+
<i>Huperzia compacta</i>	+	+	+	-	+
<i>Huperzia hystrix</i>	+	+	+	-	+
<i>Huperzia columnaris</i>	+	+	+	-	+
<i>Huperzia espinosana</i>	+	+	+	-	+

3.3.2 Chemical screening for the determination of presence of alkaloids

The qualitative determination of alkaloids, from the ethanol extract was positive in the three cases, reacting in the Mayer, Dragendorff and Wagner tests (table N°5), which was unsuccessful with the hexane extract and the ethyl acetone that were negative. This test where the alkaloid species that were being studied were found in polar solvents such as ethanol, which is confirmed with the bibliography for the extraction of alkaloids from the ethanol [2, 11],

Table N°5 Results of the colorimetric test for the identification of alkaloids

Tests for determining the presence of alkaloids			
Species	Mayer	Wagner	Dragendorff
<i>Huperzia crassa</i>	++	+++	+++
<i>Huperzia compacta</i>	++	++	+++
<i>Huperzia hystrix</i>	++	+++	++
<i>Huperzia columnaris</i>	+	+++	++
<i>Huperzia espinosana</i>	+	+++	+++

Reactions of Wagner and Dragendorff, + = Opalencia; ++ = Turbidity; +++ = precipitate
Resultados de prueba de Mayer. + = Opalencia; ++ = Turbidity; +++ = Bushy precipitate

3.4. Isolation of alkaloids

With respect to the total alkaloids isolated from each species from 200 grams of the initial sample (table N°6), it can be said that , *Huperzia crassa* had the highest concentration of alkaloids (0.4%), followed by *H. espinosana* and *H. compacta* from which (0, 28 y 0,22 %)

were isolated respectively, followed by *H. hystrix* and *columnaris* from which only 0.17% and 0.55% of alkaloids

were isolated. With these results we can confirm that the amount of total ethanol extract obtained from the process of soaking and agitation did not influence the total quantity of alkaloids obtained.

Table N°6 Yield of total alkaloids for each species

Species	Weight g.	Yield %	% Total
<i>Huperzia crassa</i>	0,80	0,40	100
<i>Huperzia compacta</i>	0,45	0,22	100
<i>Huperzia hystrix</i>	0,34	0,17	100
<i>Huperzia columnaris</i>	0,31	0,15	100
<i>Huperzia espinosana</i>	0,57	0,28	100

3.5 Alkaloids at different pH extractions

From the fraction of alkaloids from the Ethanol extract, it can be determined that the compounds that are extracted at alkaline pH (7-9 and 11), and that the quantities obtained through the Dragendorff test presented a positive reaction. Additionally, in only one case alkaloids were obtained at a pH of 2, which was in the case of *Huperzia columnaris*.

We also have the case of the *Huperzia crassa* with the highest yield (0.39%) of alkaloids at an alkaline pH of 7-9 in relation with others species. Species with highest yield of alkaloids at pH of 11 was fined for *H. espinosana* and *H. compacta* with a yield of 0.12% and 0.11%

respectively in comparison with other species had yields of less than 0.1%. In the case of *H. columnaris* alkaloids at acid pH were obtained, with a very low yield of 0.02%. From these tests, it can be said that

the majority of the alkaloids in the *Huperzias* studies can be found at an interval of pH 7-9 and at a pH lower than 11.

Table N°7 indicates the yield of the parts of total alkaloids at different pH of extraction

Species	Inicial sample (g)	pH	Total Alkaloids (g)	Yield %	% Total
<i>Huperzia crassa</i>	200	2	0	0	0
		7	0,78	0,39	97,5
		11	0,02	0,01	2,5
<i>Huperzia compacta</i>	200	2	0	0	0
		7	0,24	0,12	53,33
		11	0,21	0,11	46,67
<i>Huperzia hystrix</i>	200	2	0	0	0
		7	0,32	0,16	94,12
		11	0,02	0,01	5,88
<i>Huperzia columnaris</i>	200	2	0,04	0,02	12,9
		7	0,25	0,13	80,65
		11	0,02	0,01	6,45
<i>Huperzia espinosana</i>	200	2	0	0	0
		7	0,34	0,17	59,65
		11	0,23	0,12	40,35

Front TLC analysis of the total parts of the alkaloids, has been used Rp-18 plaque and used eluents methanol-hydrochloric acid in proportion (7:3). Elution of the compounds and the R_f of each of the sample is in the (table N°8)

From relation of the eluent used, we can conclude that after the preliminary tests with other eluents, it can be determined that the most successful for these species was the Methanol-hydrochloric acid 2% in proportions of 7:3 and that with other eluents the compounds remain in the base.

Table N°8 Thin Layer chromatography

Species	pH	Rf	TLC/ reverse UV- 365	Revealed Dragendorff
<i>Huperzia crassa</i>	7a9	0,63		
	11	0,68		
<i>Huperzia compacta</i>	7a9	0,68		
	11	0,59		
<i>Huperzia hystrix</i>	7a9	0,65		
	11	0,73		

4. Conclusions

Especies	pH	Rf	TLC/ reverse UV- 365	Revealed Dragendorff
<i>Huperzia columnaris</i>	2	0,46		
	7a9	0,67		
	11	0,71		
<i>Huperzia espinosana</i>	7a9	0,49		
	11	0,56		

After completing the process for acquiring the alkaloids of the Lycopodiaceae species, we can conclude the following:

Based on the colorimetric stain tests of the alkaloids, Dragendorff and Mayer, it was determined that the isolated compounds were alkaloids, which was confirmed by the orange color that presented in the Dragendorff reaction.

Huperzia crassa, has the highest yield of the alkaloids as a result of the ethanol extract (0.40%).

In all of the species studied, the fraction of the total alkaloid obtained at a pH of 7-9 presented the highest level of the extracted substance in grams.

The extracts of hexane and ethyl acetate, were not a source of alkaloids, the opposite was discovered with the ethanol fraction which was positive in the colorimetric test of Dragendorff, Mayer and Wagner. In the use of these species in traditional medicine, they are first soaked in alcohol, which would indicate that in these

traditional uses. With this result we can to approve initial hypothesis.

4.2 Recommendations

To do more detailed studies with the extracts of the species from this plant family in which the identification of alkaloids to contextualize the clarity of structure.

At the base of this work, the recommendation would be to perfect the technique of alkaloid extraction in order to increase yield.

With respect to the parts of the whole alkaloids which can be found first using screening which allows for the evaluation of the anti-microbial of the studied species.

BLIIOGRAFIA

1. Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos de estudio de productos naturales. Pontificia Universidad del Perú. Fondo. Segunda Edición. 300 págs.
2. Wu, Q & Gu, Y. 2005. Quantification of *huperzine A* in *Huperzia serrata* by HPCL-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40(2006):993-998.
3. Ortega, M. et al. 2007. Seasonal Study of the Alkaloid Pattern of *Huperzia saururus* with Habitat in Cordoba Province (Argentina). The Journal of the Argentine Chemical Society 95 (1-2): 1-9
4. Navarrete, et al. 2006. Helechos. Botánica Económica de los Andes Centrales, (1): 385-411.
5. Andrade, J. et al. 2009. Plantas medicinales silvestres, empleadas por la etnias Saraguro en la Parroquia san Lucas. Primera edición, Editorial Universitaria UTPL, Loja, 63 págs.
6. Bruneton, J. 2001. Alcaloides. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915 págs.
7. Sharapin, N. et al. .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.
8. Miranda M. 2000. Farmacognosia y productos Naturales. La Habana, Cuba, 126 págs.
9. Hill, et al 2001. Alcaloides en la especie cubana *croton micradenus urb.* Rev. Cubana Farm 35(1):61-5.
10. Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía.
11. García, et al. 2004. Toxicidad de Alcaloides de *Erythrina Americana* en Larvas de Mosquito *Culex Quinquefasciatus* Revista fitotecnia Mexicana 27(04): 297-303.
12. Ma, X., et al. 2007. Huperzine A-an ethnopharmacological review. ScienceDirect Journal of ethnopharmacology 113(2007):15-34.

CAPÍTULO 1

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROYECTO

1. PRESENTACIÓN DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. FIN DEL PROYECTO

EL Presente proyecto tiene como finalidad aislar los alcaloides presentes en 5 especies de la familia Lycopodiaceae utilizadas en medicina ancestral por los Rikuyhampiyachak (visionarios) de la etnia Saraguro.

1.2. PROPÓSITO DEL PROYECTO

Aislar los alcaloides de cinco especies alucinógenas de la familia Lycopodiaceae empleadas en medicina ancestral por la etnia Saraguro en el Sur del Ecuador, mediante la separación de bases débiles, medianas y fuertes, debido a la acción de solventes de creciente polaridad y variaciones de pH.

1.1. COMPONENTES DEL PROYECTO

- ✓ Aislar los metabolitos secundarios nitrogenados presentes en 5 especies de la familia Lycopodiaceae.
- ✓ Investigar y desarrollar una metodología de separación que permita el aislamiento de los alcaloides de otros compuestos de interés.
- ✓ Fraccionar el extracto total etanólico con el fin de separar los principios activos (alcaloides) de interés.

1.4. HIPÓTESIS

Ho: El empleo de etanol en el proceso de maceración tradicional de las especies Lycopodiaceae usadas por los Rikuyhampiyachak (visionarios), influyen en la extracción de alcaloides totales.

H1: El empleo de etanol en el proceso de maceración tradicional de las especies Lycopodiaceae usadas por los Rikuyhampiyachak (visionarios), no influyen en la extracción de alcaloides totales.

1. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES

Las adaptaciones de las plantas para la vida en la tierra conformaron la base para el desarrollo del ser humano, puesto que estas han provisto al hombre del sustento necesario para su sobrevivencia,^[1] por sus importantes aplicaciones en medicina moderna, se emplean como materia prima para la elaboración de medicamentos semisintéticos más complejos^[2] y la estructura química de sus principios activos sirven de modelo para la realización de modificaciones estructurales.^[3] Las plantas medicinales representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados mientras que en los países en desarrollo el uso de plantas medicinales representa el 80% del arsenal terapéutico. El interés por las plantas medicinales en los países industrializados es cada vez mayor debido a la falta de nuevos descubrimientos de moléculas farmacológicamente activas y de su posible uso terapéutico.^[4]

La investigación etnobotánica ha adquirido especial relevancia, debido a la creciente pérdida del conocimiento tradicional y la degradación de los hábitats naturales,^[1] ya que los usos ancestrales de plantas medicinales utilizadas en Etnomedicina tienen mayor probabilidad de presentar actividad farmacológica que aquellas seleccionadas al azar o por criterios quimiotaxonómicos,^[2] no obstante, el análisis de los datos etnobotánicos es una tarea complicada, pues una alta proporción de los estudios etnobotánicos es de carácter cualitativo y en la mayoría de los casos carece de detalles metodológicos suficientes que permitan determinar cómo se recogieron los datos y de criterios para evaluar la calidad de los mismos. Algunos investigadores han tratado de desarrollar

-
- (1) De la Torre, L & Macía, M. 2008. La etnobotánica del Ecuador. Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador. 13-27.
 - (2) Bermúdez, A. Miranda, M. & Velázquez, D. 2008. La investigación Etnobotánica sobre Plantas Medicinales: una Revisión de sus Objetivos y Enfoques Actuales. *Interciencia* 30 (8):453 - 459.
 - (3) Vega, E. Velasco R & Jiménez, M. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Revisión.* (31):97-111.
 - (4) Sharapin, N. *et al.* .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.
 - (1) De la Torre, L & Macía, M. 2008. La etnobotánica del Ecuador. Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador. 13-27.

metodologías que permitan cuantificar la información, pero el análisis cuantitativo siempre se sustenta en criterios cualitativos. [5]

Las plantas medicinales se han empleado desde la antigüedad como un recurso tanto como para la alimentación como en medicina incluso en la actualidad cientos de ellas son utilizadas en medicina. [6] Las culturas Asiáticas han empleado la especie *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae) como analgésico y diurético, del cual se ha aislado un compuesto bioactivo denominado Huperzina A, estudiado a la vez por su potencial para el tratamiento de demencias como el Alzheimer. [7] Por otro lado, en Argentina, la *Huperzia saururus* tiene un extenso uso en etnomedicina debido a sus propiedades afrodisíacas, razón por la cual se han llevado a cabo estudios químicos demostrando que los alcaloides aislados, sauroina, sauroxina, 6-hidroxicopodina y licopodina, exhiben una importante actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa. [8]

En Perú, la *Huperzia crassa*, se emplea como talismán asociada a la fertilidad de animales domésticos y en especial de cuyes; en el mismo país, otras especies de *Huperzia* de ambientes paramunos, como *H. brevifolia*, *H. kuesteri* y *H. sellifolia* son comercializadas como parte de objetos y plantas de valor mágico. [9]

Así mismo, la *Huperzia tetragona* (Lycopodiaceae) en la Sierra Ecuatoriana fue empleada para tratar el mal de aire en personas [10] y ganado vacuno, [9] conceptualizándose al mal de aire, como una enfermedad causada por cambios bruscos de temperatura o al atravesar lugares pesados, como cementerios,

(5) Andrade, J. 2007. Estudio Etnobotánico de las plantas medicinales empleadas por la Etnia Saraguro en la parroquia San Lucas. Cantón Loja. Provincia de Loja. Tesis de grado previa a la obtención de ingeniero agropecuario. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Ingeniería Agropecuaria. 93 págs.

(6) Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos de estudio de productos naturales. Pontificia Universidad del - Perú. Fondo. Segunda Edición. 300 págs.

(7) Wu, Q & Gu, Y. 2005. Quantification of *huperzine A* in *Huperzia serrata* by HPCL-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40(2006):993-998.

(8) Ortega, M. et al. 2007. SEASONAL STUDY OF THE ALKALOID PATTERN OF *HUPERZIA SAURURUS* WITH HABITAT IN CORDOBA PROVINCE (ARGENTINA). The Journal of the Argentine Chemical Society 95 (1, 2):1-9.

(9) Navarrete, et al. 2006. Helechos. Botánica Económica de los Andes Centrales, (1): 385-411.

(10) Andrade, J. et al. 2009. Plantas medicinales silvestres, empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas. Primera edición, Editorial Universitaria UTPL, Loja, 63 págs.

piedras grandes, quebradas etc., que ocasiona parálisis facial o corporal. Hooker, (1838) reportó, para la misma especie, la capacidad de un violento purgativo supuestamente por el contenido de alcaloides a la vez utilizado por los indígenas del Azuay para tratar la Elefantiasis (crecimiento desproporcionado de extremidades inferiores y órganos genitales externos, producido por parásitos del grupo de la filaria) y Lepra.^[9]

Finalmente los sanadores de la Etnia Saraguro, Rikuyhampiyachak (visionarios), han empleado especies de familia Lycopodiaceae^[10] por sus propiedades alucinógenas, en rituales y ceremonias de sanación; lamentablemente en la actualidad solo contamos con la investigaciones etnobotánicas cualitativas realizadas por Morocho (2006) en el Cantón Saraguro y Andrade (2007) en la Parroquia San Lucas del Cantón Loja.

Por tal motivo, el presente trabajo tiene como finalidad realizar un estudio cuantitativo, con la finalidad de aislar los alcaloides de otros metabolitos secundarios de interés, las cuales son las responsables del efecto alucinógeno y farmacológico que hasta ahora le han atribuido las comunidades indígenas por el constante y tradicional uso.

Dentro de este contexto la investigación se lleva a cabo en el Instituto de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con la finalidad de recuperar, valorar y conservar los recursos fitoterapéuticos utilizados ancestralmente por la Etnia Saraguro, permitiendo crear relaciones de comunicación directas entre los Hampiyachak (Sanadores) y el personal dedicado a la investigación, haciendo de estos trabajos fuentes importantes para la investigación científica.

(9) Navarrete, et al. 2006. Helechos. Botánica Económica de los Andes Centrales, (1): 385-411.

(10) Andrade, J. et al. 2009. Plantas medicinales silvestres, empleadas por la etnias Saraguro en la Parroquia san Lucas. Primera edición, Editorial Universitaria UTPL, Loja, 63 págs.

CAPÍTULO 2

REVISION BIBLIOGRÁFICA

1. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. Medicina tradicional

Medicina tradicional o etnomedicina es un conjunto de prácticas empíricas basadas en el conocimiento de un grupo social, transmitidos de forma oral de generación en generación con la finalidad de resolver problemas de salud, además constituye una alternativa de la medicina occidental y se encuentra estrechamente ligado a la cosmovisión, creencias y costumbres indígenas.^[11]

Al hacer referencia a medicina tradicional se incluye la medicación, materiales elaborados, preparados y productos acabados a base de especies vegetales^[12] usados para curar y mitigar dolores e infecciones como única alternativa de tratamiento.^[31] La OMS ha estimado que más del 80% de la población mundial emplea medicina tradicional para tratar enfermedades mediante el uso empírico de extractos de las plantas.^[12]

A diferencia de la medicina oficial, la medicina tradicional ha sido caracterizada a partir de elementos culturales orientados a la sanación, que varían en su combinación, como uno de sus rasgos preponderantes se ha destacado su dimensión místico religiosa así como el uso de la herbolaria.^[13] El sector tradicional tiene una trascendencia importante en la mayoría de los países latinoamericano con diferentes formas de expresión que varían de acuerdo a la localidad, siendo en mayor proporción en comunidades indígenas y poblaciones rurales.

(11) Béjar, E. et al. 2001. Herb of Southern Ecuador. Primera edición 76 págs.

(12) Silva, I & Tene, M. 2008. Adaptación tecnológica para la elaboración de un fitopreparado semisólido para aliviar la tos causado por resfrío a partir de *Lepidium chichira.*, *Menta pipéríta L.*, *Solanum americanun Mill.*, *Clinopodium sp. L.*, en base a los conocimientos ancestrales de los Humpy yachakkuna de San Lucas – Loja – Ecuador. Tesis de grado previa a la obtención de Título Bioquímico Farmacéutico e Ingeniero en Industrias Agropecuarias. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia e Ingeniería en Industrias Agropecuarias.

(31) Madaleno, I. 2007. Etno-farmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. Etno-Desarrollo en América Latina, África, Asia y Pacífico. 41 (2): 61-95.

(2) Bermúdez, A. Miranda, M. & Velázquez, D. 2008. La investigación Etnobotánica sobre Plantas Medicinales: una Revisión de sus Objetivos y Enfoques Actuales. Interciencia 30 (8):453 - 459.

(13) Nigenda *et al.* 2001. La Práctica de la Medicina Tradicional en América Latina: El dilema entre la Regulación y Tolerancia. Revista de Salud Pública de México. 1(43):41-51.

2.1.1. Medicina tradicional y el empleo de especies alucinógenas

El uso de las plantas alucinógenas ha formado parte de la experiencia humana, influyendo en la formación de pueblos primitivos como parte importante de ritos religiosos. La diversidad cultural asociada con el diverso ecosistema andino, expone en la actualidad cantidad y calidad de conocimientos etnobotánicos [14] entre los cuales se encuentran los conocimientos sobre el empleo de especies estimulantes capaces de alterar la conciencia para explorar el mundo metafísico y comunicarse con los espíritus y Dioses que forman parte de la cosmovisión de los pueblos primitivos. [1]

Las plantas psicoactivas han servido para contactar dioses, diagnosticar y curar enfermedades, evaluar o resolver problemas, incorporar fuerza física y para purificar el espíritu. [15, 16] La coca (*Erythroxylum coca*), San Pedro (*Echinopsis pachanoi*), el árbol de vilca (*Anadenanthera colubrina*), el yocó (*Paullinia yoco*), la guayusa (*Ilex guayusa*) y el wantuk (*Brugmasia sanguinea*) fueron usadas desde las épocas pre y post coloniales debido a sus propiedades alucinógenas y narcóticas. [16,1]

2.2. Alcaloides

2.2.1. Generalidades

Uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios encontrados en los organismos vivos son los alcaloides. La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica, hacen de los alcaloides los grupos más importantes entre las

-
- (14) De la Torre, P. Muriel & Balslev, H. 2006. Etnobotánica en los Andes del Ecuador. Botánica Económica de los Andes Centrales. 246-267.
- (1) De la Torre, L & Macía, M. 2008. La etnobotánica del Ecuador. Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador. 3-27.
- (15) Radice, M. 2006. Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* y la elaboración de un prototipo de fito-fármaco de interés comercial. Tesis previa a la obtención del Título de Magíster en Tecnología para el Aprovechamiento de los Recursos Naturales no Tradicionales. Università delgi studi di Pavia.
- (16) Kvist, L. & Morales, M. 2006. Plantas psicoactivas. Botánica Económica de los Andes Centrales. (1): 294-312.
- (1) De la Torre, L & Macía, M. 2008. La etnobotánica del Ecuador. Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador. 13- 27.

sustancias naturales de interés terapéutico;^[17] estos se han aislado principalmente en plantas superiores, encontrándose en más de 100 familias de Fanerógamas (aquellas plantas que se reproducen por semillas producidas en sus inflorescencias), en menor proporción en Criptógamas (Plantas que tienen sus órganos reproductores ocultos) del tipo licopodios, microorganismos (ergot),^[18, 19] más de 800 alcaloides lipofílicos en anfibios^[20] y en invertebrados e insectos; muchos de ellos han sido empleados en medicina y muchos son prominentes fármacos hoy en día.^[17]

2.2.2. Historia

El conocimiento sobre plantas y drogas que poseen alcaloides es muy antiguo entre estas están: la coca, el opio, la belladona, cólchico, quina, ipecacuana o curares que se utilizan desde años incluso algunas desde hace siglos.^[19]

Derosne. (1803), extrajo morfina del opio y una mezcla de narcotina; fue el primero en aislar el álcali de un vegetal. En 1806, Serturmer demostró la naturaleza alcalina del principio somnífero del opio, principio que después de decenios fue denominado morfina. Pelletier y Caventou entre 1817 y 1820 aislaron varios compuestos activos, la cafeína, emetina de la ipecacuana, estricnina de la nuez vómica, quinina y la cinchonina de la corteza la quina y la conina. Los mismos químicos llevaron a cabo la primera elucidación estructural de la conina en el año de 1970;^[19, 4] a partir de este resultado y mediante el empleo de equipos de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Difracción de Rayos X, en 1952 se aisló la morfina y empezaron a explorar el

(17) Loyola, et al. 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. Soc. Quím. Méx. 48(1): 67-94.

(18) Arango, G. &. 2002. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía.

(19) Bruneton, J. 2001. Alcaloides. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915 págs.

(20) Cipriani, I & Rivera, M. 2009. Detección de alcaloides en la piel de cuatro Especies de anfibios ecuatorianos (Anura: Dendrobatidae). Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas (3) 1 y 2: 42-49.

(4) Sharapin, N. et al. .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.

amplio campo de los alcaloides ^[19] describiendo un sinnúmero de estructuras biosintéticas y sintéticas de interés terapéutico. ^[17]

2.2.3. Definición

El término alcaloide (de álcali), fue propuesto por el farmacéutico W. Meissner en el siglo XIX del año 1819, se aplicó para designar a los compuestos las sustancias naturales que reaccionan como bases. ^[19]

Los alcaloides se definen como sustancias nitrogenadas, básicas de origen natural y de distribución restringida cuyo átomo de nitrógeno se encuentra formando parte del sistema heterocíclico, poseen actividad farmacológica, ^[19] porque tienen incidencia directa sobre los distintos sistemas que conforman el organismo además de estas características, provienen de la síntesis de un aminoácido. ^[4] Estos elementos caracterizan y diferencian a los alcaloides de los demás compuestos similares, siendo, *Pseudoalcaloides* (Figura N°1) aquellos que poseen similares propiedades, pero no provienen de aminoácidos; en los *Protoalcaloides* (Figura N°2) el nitrógeno no se encuentra incluido en el sistema heterocíclico mientras que conserva las propiedades de un alcaloide verdadero. ^[19, 16, 4, 18]

(19) Bruneton, J. 2001. Alcaloides. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915págs.

(17) Loyola, et al. 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. Soc. Quím. Méx. 48(1): 67-94.

(6) Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos de estudio de productos naturales. Pontificia Universidad del Perú. Fondo. Segunda Edición. 300 págs.

(4) Sharapin, N. et al. .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.

(18) Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía.

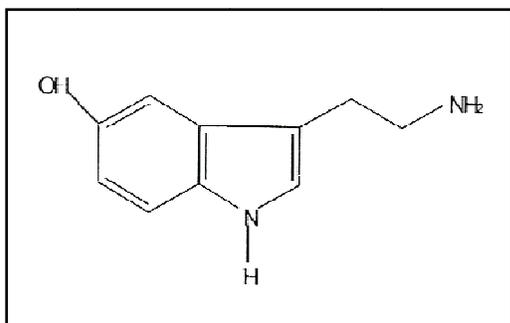


Figura N°1 Pseudoalcaloide; β -esquita
Fuente: Ordoñez & Vega, 2006

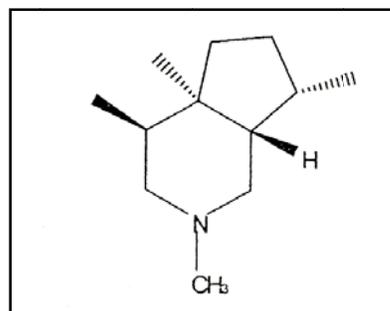


Figura N°2. Protoalcaloide serotonina
Fuente: Ordoñez & Vega, 2006

2.2.4. Estado Natural y Distribución

Los alcaloides se hallan presentes en importantes cantidades en las bacterias especialmente en (*Pseudomonas aeruginosa*), son muy raros en Hongos y en las Pteridofitas, a excepción de las Lycopodiaceae ^[19] Los alcaloides son compuestos que se encuentran esencialmente en las Angiospermas tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas, las cuales tienden a sintetizarlos en mayor cantidad. ^[19] algunas familias poseen una marcada tendencia a elaborar alcaloides: esto ocurre en las monocotiledóneas (Amaryllidaceae y Liliaceae) como en las Dicotiledóneas (Annonaceae Lauraceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae, Annonaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Fumariaceae, Rutaceae, Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae, y Solanaceae) ^[19,18] . La atropina, cocaína, codeína, emetina, escopolamina, morfina y quinina son los alcaloides más conocidos por su acción farmacológica. ^[4,6]

Las plantas casi nunca poseen un único alcaloide, sino una mezcla, también los alcaloides de una misma especie provienen de un mismo origen biosintético, incluso cuando sus estructuras son bastante diferentes. ^[19]

(19) Bruneton, J. 2001. Alcaloides. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915págs.

(18) Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía.

(6) Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos de estudio de productos naturales. Pontificia Universidad del Perú. Fondo. Segunda Edición. 300 págs.

(4) Sharapin, N. *et al.* .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.

2.2.5. Localización en especies vegetales

En el vegetal, los alcaloides se encuentran en forma soluble de sales (Citratos, malatos, tartratos, meconatos, isobutiratos, benzoatos) o en combinación con taninos. La microquímica permite comprobar que los alcaloides se encuentran en los tejidos periféricos (cortezas de tallo, raíz y tegumentos de semillas). La basicidad y las acciones antimetabólicas de la mayoría de estas moléculas imponen su compartimentación. Normalmente se encuentran almacenados en las vacuolas celulares mientras que la síntesis se realiza a nivel de determinados lugares, raíz en crecimiento, células especializadas de los laticíferos o cloroplastos para ser transportados a su lugar de almacenamiento.

[19]

2.2.6. Función en las especies

A continuación se citan algunas sugerencias sobre el “rol” que juegan los alcaloides vegetales.

- ✓ Sirven como productos de desecho o almacenamiento del nitrógeno sobrante, esta función es equivalente a la del ácido úrico o de la urea en los animales.
- ✓ En algunos casos los alcaloides pueden servir como productos de almacenamiento del nitrógeno no metabolizado o para transporte del mismo; en el caso de las Solanaceas midriáticas, los esteres del tropano se forman en las raíces y son transportados a las partes aéreas donde pueden ser hidrolizados.
- ✓ La microquímica ha permitido mostrar en forma general, que los alcaloides son localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de la planta, es decir en el recubrimiento de las semillas, corteza del tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja; esto nos permite pensar que los alcaloides cumplen una importante función como es la de proteger a la planta, por su sabor amargo, del ataque de insectos.

- ✓ Los alcaloides pueden servir de reguladores del crecimiento, se ha demostrado que los alcaloides derivados de la putrescina se incrementan notablemente en algunas plantas cuando se encuentran en suelos deficientes de potasio.
- ✓ Mediante técnicas biotecnológicas, las plantas que normalmente acumulan alcaloides en las partes aéreas, como es el caso de la *Nicotiana* y *Daturas*, se han producido sin alcaloides, la pérdida de alcaloides en el vástago, no impide el desarrollo de la planta, lo cual sugiere que los alcaloides no son esenciales para los vegetales. Si bien, la presencia de alcaloides no es vital para la planta, estos deben de participar en secuencias metabólicas y no son solamente productos de desecho del metabolismo.^[18]

2.2.7. Propiedades fisicoquímicas

Los alcaloides tienen masas moleculares que varían entre 100 y 900¹⁹ (coniína $C_8H_{17}N=127$, vincristina $C_{46}H_{56}N_4O_{10}=824$); son casi siempre incoloros a excepción de aquellos altamente conjugados como berberina (amarillo), sanguinarina (rojo), urabaina (verde) y oxoaporfina que van de amarillo a rojo,¹⁸ las bases no oxigenadas son normalmente líquidas a temperatura ambiente (coniína, la nicotina y la esparteína), las bases que contienen oxígeno en su fórmula, como sucede con la mayoría de las estructuras, son sólidos cristalizables, las bases dan puntos de fusión netos sin descomposición sobre todo por debajo de los 200 °C.^[19]

La basicidad de los alcaloides les permite formar sales con ácidos minerales (clorhidratos, sulfatos, nitratos) u orgánicos como tartratos, sulfamatos y maleatos. Las sales de los alcaloides son generalmente solubles en agua y en alcoholes diluidos, en raras ocasiones son insolubles en solventes orgánicos. Las sales cristalizadas se conservan bastante bien y constituyen habitualmente la forma comercial de estas moléculas.^[19]

(19) Bruneton, J. 2001. Alcaloides. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915 págs.

(18) Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía.

La basicidad de los alcaloides es un factor de inestabilidad en las moléculas, siendo especialmente sensibles al calor, la luz y al oxígeno. ^[19, 3]

2.2.8. Detección y caracterización

Las técnicas de reconocimiento están basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno formando precipitados; estos ensayos preliminares se pueden realizar en el laboratorio. ^[18]

En la práctica, se utilizan reactivos específicos para detectar alcaloides; la solución de yodo-yoduro de potasio conocido como reactivo de **Wagner**, mercurio tetrayoduro de potasio, reactivo de **Mayer**, tetrayodo bismuto de potasio reactivo de **Dragendoff**, ^[19] solución de ácido pícrico, reactivo de **Hager**, ácido sílico túngtico reactivo de **Bertrand** y *p*-dimetilamino benzaldehido reactivo de **Ehrlich**; nitración de alcaloides, reacción de **Vitali-Morin** se usa para alcaloides en estado base. ^[18]

Las reacciones colorimétricas planteadas permiten verificar la presencia de alcaloides, pero estas no permiten verificar la identidad de la droga, tampoco permiten verificar la constitución de la mezcla. Para este fin como para la mayoría de metabolitos secundarios se lleva a cabo la cromatografía de capa fina (CCF) en fase normal o reversa usando para el revelado el reactivo de Dragendoff; debido a que la mayoría de los alcaloides no son volátiles, no se emplea cromatografía de gases, CG. ^[19]

(3) Vega, E. Velasco R & Jiménez, M. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. (31):97-111.

(18) Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía.

(19) Bruneton, J. 2001. Alcaloides. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915págs.

(18) Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía

2.2.9. Extracción de los alcaloides

Inicialmente se utilizan los reactivos colorimétricos de precipitación y caracterización previa a la extracción de los alcaloides. ^[21]

La extracción de los alcaloides se basa en el hecho de que dichos compuestos se encuentran en las plantas en estado de sales y el de su basicidad. El material vegetal contiene a menudo cantidades de grasa como, ceras, terpenos, pigmentos etc., que interfieren en el proceso de extracción, por lo que en principio se procede al desengrasado del materia vegetal. ^[18]

2.2.9.1. Extracción con un disolvente en medio alcalino

A continuación se describe la extracción de los alcaloides en medio alcalino. ^[19]

Ver también (Esquema N°1).

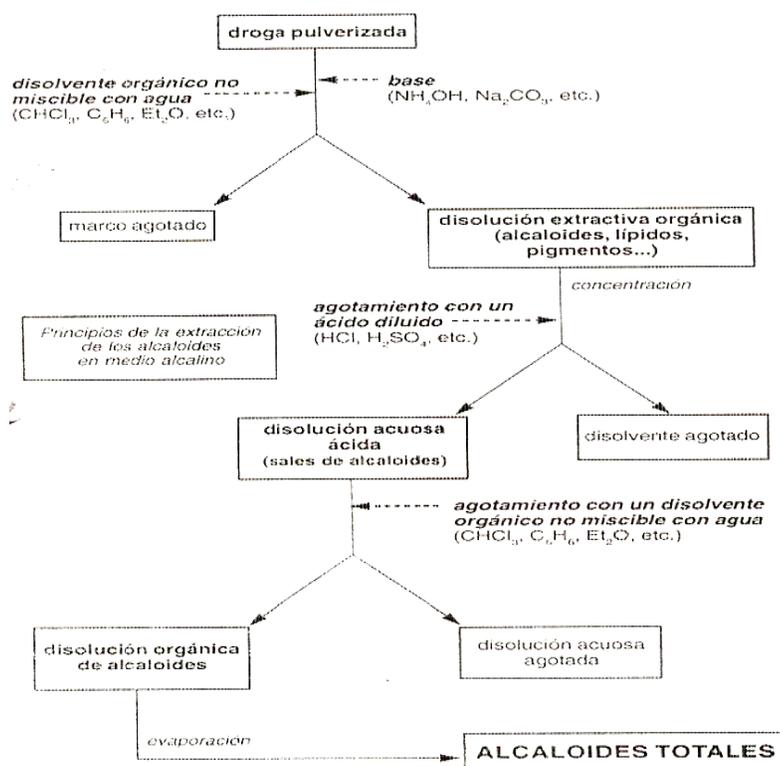
- ✓ La droga pulverizada y previamente desengrasada (hexano o éter) es mezclada con una solución acuosa alcalina (se usa de preferencia amoniac), lo que hace que los alcaloides presentes en forma de sal se desplacen formando las bases libres, las cuales, así liberadas se solubilizan en un solvente orgánico. El disolvente orgánico puede ser el diclorometano, cloroformo, benceno o dióxido de etilo.
- ✓ El disolvente orgánico que contiene los alcaloides se separa del marco concentrándolo a presión reducida. Posteriormente el disolvente se agita con una disolución acuosa ácida solubilizando a los alcaloides en esta bajo formas de sales mientras que las impurezas permanecen en la fase orgánica, la operación se repite hasta lograr que la fase orgánica no contenga alcaloides. Los ácidos pueden ser clorhídrico, sulfúrico, sulfámico, tartárico; siempre en disoluciones muy diluidas.

(21) Ordoñez, et al., 2006 Phytochemical study of native plant species used in tradicional medicine in Loja Province. *Lyonia*, 10(2):65-71.

(19) Bruneton, J. 2001. *Alcaloides*. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915págs.

- ✓ La disolución acuosa de las sales de alcaloides reunidas, se alcalinizan con una base en presencia de un disolvente orgánico no miscible en agua. Los alcaloides bases, precipitan y se disuelven en la fase orgánica, el agotamiento de la fase acuosa continua hasta que todos los alcaloides se encuentren en la fase orgánica, esto se puede comprobar al observar una reacción negativa a la prueba de Mayer, esta etapa de purificación se lleva a cabo en una ampolla de decantación.

Finalmente, el disolvente orgánico que contiene los alcaloides se separa por decantación, se eliminan las trazas de agua que pudiera contener mediante una deshidratación con sal anhidra y se evapora hasta obtener los alcaloides totales, (AT).

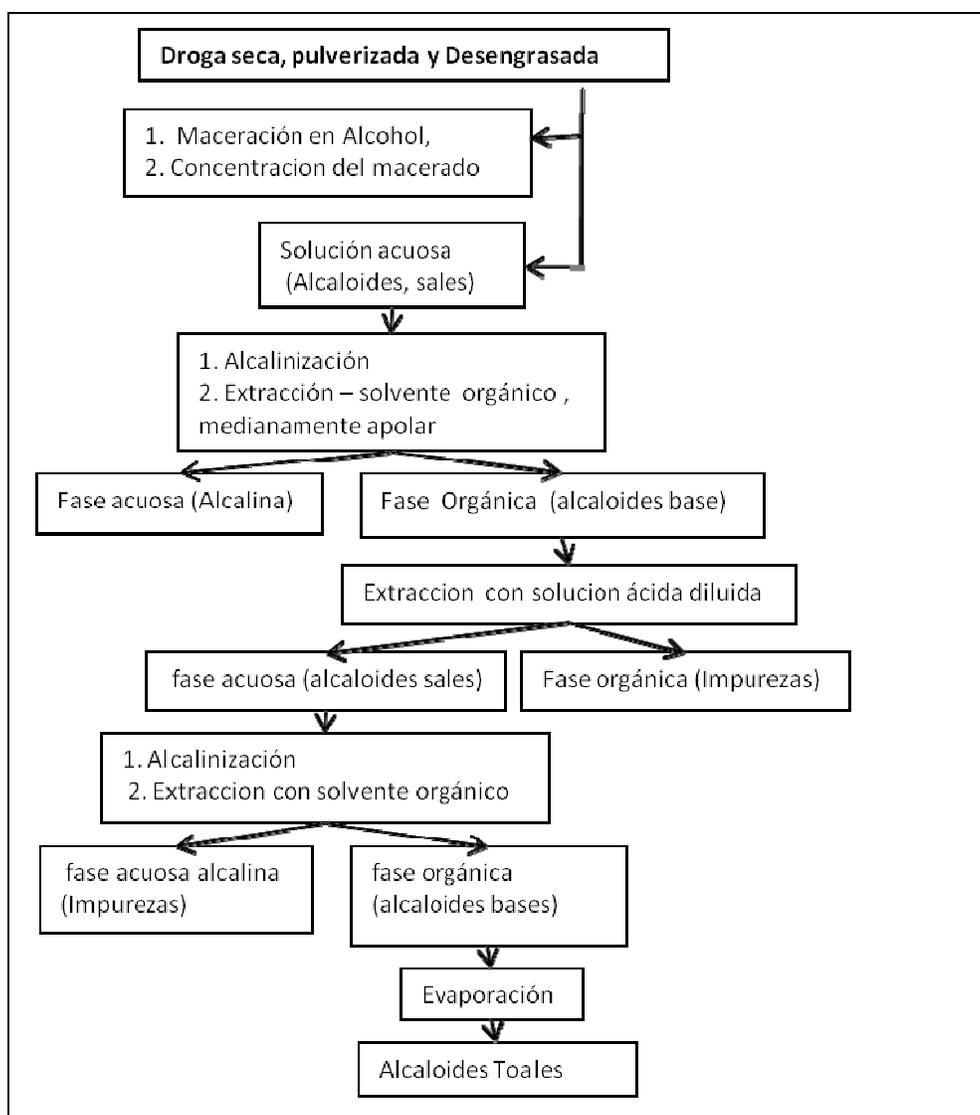


Esquema N°1 Aislamiento de alcaloides en medio básico
Fuente: Bruneton, 2001.

2.2.9.2. Extracción en medio ácido

La droga seca, pulverizada y desengrasada es extraída con agua acidulada, con alcohol o solución hidroalcohólica acidulada, tendremos extractos de alcaloides en forma de sales. En estos casos los extractos pueden ser tratados de diferentes formas: ^[18]

- ✓ Alcalinización y extracción de los alcaloides base con un solvente orgánico no miscible. Hay que recordar que en su estado natural, los alcaloides se encuentran en forma de sales solubles en soluciones acuosas o hidroalcohólicas, (Esquema N°2).



Esquema N°2 Extracción de Alcaloides en medio débilmente ácido
Fuente: Arango, 2002

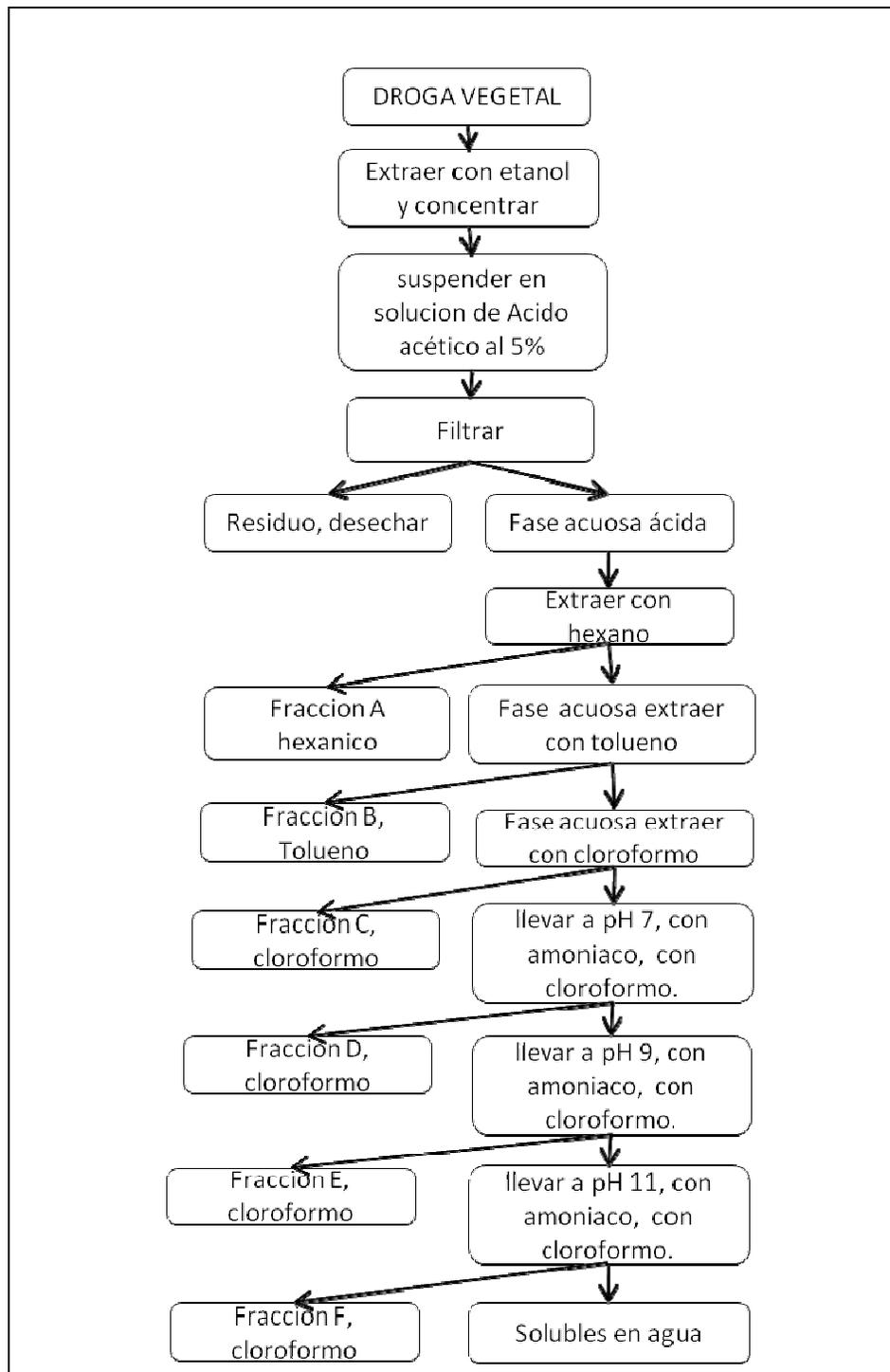
- ✓ Fijación de los alcaloides sobre resinas intercambiadoras de iones para luego separarlas por elución con ácidos fuertes
- ✓ Precipitación de los alcaloides en forma de yodomercuriados con el reactivo de Mayer concentrado; el complejo formado es recuperado por filtración o centrifugación, luego se redisuelve en una mezcla de agua-alcohol-acetona y se separan los alcaloides haciéndolos pasar sobre resinas intercambiadoras de iones. (técnica es particularmente útil para alcaloides amonios cuaternarios).^[7]

2.2.9.3. Aislamiento de alcaloides a escala del laboratorio

El aislamiento de los alcaloides, tiene como principio, la separación de bases débiles, medianas y fuertes, debido a la acción de solventes de creciente polaridad y variaciones de pH. Las fracciones obtenidas, son cromatografiadas en columnas de sílica gel o en cromatoplacas preparativas. Los alcaloides obtenidos son purificados por recristalización en solventes,^[4] (Esquema N°3).

(7) Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía

(4) Sharapin, N. *et al.* .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.



Esquema N°3 Extracción de alcaloides a escala de laboratorio
Fuente: Sharapin 2000

2.2.10. Actividad biológica

El rol que juegan los alcaloides en las plantas no es muy conocido pero se reporta que algunos sirven como reguladores del crecimiento, como repelentes o atractores de insectos ^[6] sin embargo su acción fisiológica (Tabla N°1) ha sido conocida durante muchos años.

Tabla N°1 Alcaloides en el comercio y su acción fisiológica (Lock, 1994)

Alcaloides	Acción fisiológica
Atropina	Antiespasmódico, estimulante, analgésico
Cocaína	Estimulante, anestésico local, sedante
Codeína	Analgésico, sedante, hipnótico
Emetina	Emético, expectorante, antipirético, amebicida
Escopolamina	Hipnótico, sedante
Esparteína	Estimulante cardíaco, diurético
Hiosciamina	Hipnótico, sedante cerebral, midriático
Morfina	Narcótico, sedante hipnótico, analgésico
Quinina	Tónico, antiséptico, antipirético
Efedrina	Vasoconstrictor, asma, insuficiencia circulatoria
Papaverina	Relajante muscular
Lobelina	Expectorante, emético, estimulante respiratorio
Reserpina	Control de la presión alta en la sangre
Tubocurarina	Relajante muscular

Los alcaloides son sustancias que poseen especial interés por sus actividades farmacológicas sobre los campos más variados: A nivel del sistema nervioso central, ya sea como depresores (morfina, escopolamina) o estimulantes (estriccina, cafeína); a nivel del sistema nervioso autónomo, anticolinérgicos

(16) Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos de estudio de productos naturales. Pontificia Universidad del Perú. Fondo. Segunda Edición. 300 págs.

(atropina), gangliopléjicos (nicotina); hay que señalar así mismo los anestésicos locales, cocaína, antifibrilantes (Quinidina) y antitumorales. ^[6]

2.3. Técnicas de Identificación de Metabolitos Secundarios

2.3.1. Tamizaje fitoquímico para la determinación de alcaloides

Para el tamizaje fitoquímico se empleó de forma general el esquema para la extracción sucesiva empleando solventes de polaridad creciente, el proceso aquí descrito fue tomado de la bibliografía de Miranda, 2000.

2.3.1.1. Ensayo de Dragendoff

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y luego se disuelve en 1ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, se añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendoff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++). ^[6, 19, 23, 18]

2.3.1.2. Ensayo de Mayer

Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++), ^[6,19, 23,18]

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia

(6) Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos de estudio de productos naturales. Pontificia Universidad del Perú. Fondo. Segunda Edición. 300 págs.

(19) Bruneton, J. 2001. Alcaloides. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915págs.

(23) Valencia, et al. 2007. Técnicas de Aislamiento de Metabolitos Secundarios. Relacyc 33(07): 251-252.

(18) Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquia.

la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

2.3.1.3. Ensayo de Wagner

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma. [6, 19, 23, 18]

2.3.2. Tamizaje Fitoquímico para la determinación de Metabolitos secundarios

2.3.2.1. Ensayo de Baljet

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1ml). En estas condiciones se adiciona 1ml del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.

2.3.2.2. Ensayo de Borntrager

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo se disuelve en 1ml de cloroformo. Se

-
- (6) Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos de estudio de productos naturales. Pontificia Universidad del Perú. Fondo. Segunda Edición. 300 págs.
(19) Bruneton, J. 2001. Alcaloides. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915págs
(23) Valencia, et al. 2007. Técnicas de Aislamiento de Metabolitos Secundarios. Relacyc 33(07): 251-252.
(18) Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía.

adiciona 1ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado u rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

2.3.2.3. Ensayo Liebermann-Burchard

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1ml de cloroformo. Se adiciona 1ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado *sin agitar*. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

Importante: *Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.*

La reacción de Liebermann-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen

coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

2.3.2.4. Ensayo de espuma

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

2.3.2.5. Ensayo del cloruro férrico

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Según el procedimiento planteado por, Miranda 2000., si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.

(22) Miranda M. 2000. Farmacognosia y productos Naturales. La Habana, Cuba, 126 págs.

- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

2.3.2.6. Ensayo de Shinoda

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.^[22]

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

2.4. Cromatografía

Las diversas técnicas de separación de metabolitos secundarios se logran mediante la exposición de las mismas en un sistema bifásico. Las fases que intervienen en la separación pueden ser: dos líquidos inmiscibles; gas-líquido, gas-sólido o líquido-sólido.^[34] La cromatografía se fundamenta en el empleo de la fase móvil (eluyente) y una estacionaria (adsorbente).

Las fases estacionarias (adsorbente) pueden ser polares y apolares. Las fases polares (hidrofílicas) o normales se combinan con eluyentes no polares; mientras que las fases apolares lipofílicas (fase reversa) se combinan con eluyentes con alto contenido de agua.

(22) Miranda M. 2000. Farmacognosia y productos Naturales. La Habana, Cuba, 126 págs.

(34) Ordoñez, P. & Vega, M. 2005. Estudio Fitoquímico de especies vegetales nativas utilizadas en medicina tradicional de la provincia de Loja. Tesis de grado previa a la obtención del título de ingenieros Químicos de La universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Ingeniería Química, Loja-Ecuador. 161 págs.

2.4.1. Cromatografía de partición

Cuando una disolución (soluto A en disolvente 1) se mezcla y agita con un segundo disolvente (disolvente 2) siendo ambos disolvente no miscibles el soluto se distribuye entre las dos fases líquidas. La relación de las concentraciones de soluto en cada fase es una constante denominada coeficiente de distribución (o coeficiente de partición) K definido por $K=C_2/C_1$ donde C_2 y C_1 son las concentraciones, en gramos por litro, del soluto A en los disolventes 2 y 1 respectivamente.

La transferencia de un soluto, de un disolvente a otro es lo que se denomina extracción. La extracción es una operación muy habitual en química orgánica.

De acuerdo con la expresión de coeficiente de distribución anteriormente comentada es evidente que no todo el soluto se transferirá al disolvente 2 en una única extracción (salvo que el valor de K sea muy grande). Normalmente son necesarias varias extracciones para eliminar todo el soluto del disolvente 1.

Para extraer un soluto de una disolución siempre es mejor usar varias pequeñas porciones del segundo disolvente que usar una única extracción con una gran cantidad. La extracción puede ser un método tanto de separación como de purificación (Figura N°3).

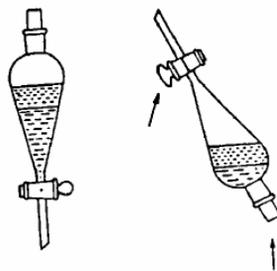


Figura N°3 Extracción líquido-líquido

Fuente: Manual de Pruebas, Planta de Productos Naturales (PPN)-UTPL.

2.4.2. Aislamiento por Cromatografía de Capa Fina (CCF)

La cromatografía líquida plana (PLC) trata sobre la separación de las mezclas sobre capas delgadas de adsorbentes que usualmente están soportados en vidrio, plástico u hojas de aluminio. La forma más común de cromatografía líquida plana, es la Cromatografía de Capa Fina (CCF).

La cromatografía de capa fina, consiste en la separación de componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre la capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. ^[21]

2.4.3. Principios básicos de la Cromatografía de Capa fina (CCF)

En esta técnica, la solución de una muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (Sílica, Alúmina, etc.) distribuido uniformemente sobre una placa de vidrio o de aluminio. Las placas se colocan verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal manera que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente migra por capilaridad a través de la placa cromatográfica, separado por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después de esta etapa se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz UV o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada ^[4]

El proceso de separación está basado en una serie de etapas o equilibrios de adsorción-desorción. Los tipos de adsorbentes que se encuentran disponibles en el mercado son muy variados, entre los cuales esta silicagel (SiO_2), la Celita (Tierra de diatomeas), la alúmina (Al_2O_3), la celulosa (para cromatografía de reparto) y la poliamida.

(21) Ordoñez, *et al.*, 2006. Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province. *Lyonia*, 10(2):65-71.

(4) Sharapin, N. *et al.* 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.

La sílica también puede ser modificada, dando como resultado la cromatografía en fase reversa; esto ocurre cuando, mediante procedimientos químicos se enlaza la sílica a grupos como C₁₈, C₈, C₂, CN y NH₂. Cuando utilizamos la cromatografía en fase reversa se usa un adsorbente de polaridad media o un apolar y una fase móvil polar; mientras que en la cromatografía en fase normal se utiliza un adsorbente polar y una fase móvil apolar. De esta forma el número de sustancias diferentes que pueden ser analizadas por cromatografía de capa fina aumenta considerablemente. [4]

La medida de la migración de una sustancia sobre una placa cromatográfica y en un solvente determinado, puede ser medido mediante el Factor de Retención (Rf) el cual se calcula usando la siguiente expresión:

$$Rf = \frac{\text{Dis tan cia desde el origen hasta el compuesto}}{\text{Dis tan cia desde el origen al frente del solvente}}$$

Los factores que causan variaciones en el valor del Rf son las variaciones de temperatura del medio ambiente, el grado de pureza de los solventes utilizados y las variaciones de homogeneidad de las diferentes placas de capa fina, por lo que es más aconsejable tomar en cuenta estos factores sobre todo cuando se trabajan con extractos de plantas. [4]

2.2.4. Aplicación de la Cromatografía de Capa Fina

La cromatografía de capa fina (CCF) se aplica para la detección y monitoreo de compuestos obtenidos a través de un proceso de separación en los casos de productos naturales conocidos u otros compuestos fitoterapéuticos, para obtener productos uniformes en los diferentes lotes de producción. [4]

(4) Sharapin, N. *et al.* .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.
(4) Sharapin, N. *et al.* .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.

Los compuestos de productos naturales provenientes de otro proceso de separación como Cromatografía en columna o HPLC son rastreados empleando las corridas en cromatografía de capa fina (CCF). [21]

2.5. Descripción de las Especies

Lycopodiaceae es una familia que está compuesta por 4 géneros, *Huperzia* Bernh, *Phylloglossum* Kunze, *Lycopodium* L., y *Lycopodiella* Holub, con una amplia distribución alrededor del mundo; *Huperzia* es una familia cosmopolita con alrededor de 300 especies en el mundo y cerca de 150 en el neotrópico. *Huperzia saururus* (Lam) Trevis, crece en sud América desde el norte del Perú hasta Argentina, África y Madagascar. [24, 8]

Las Lycopodiales son plantas pequeñas que tienen una distribución geográfica amplia y son cosmopolitas. Se conocen aproximadamente unas 500 especies agrupadas en diferentes géneros; *Huperzia* Bernh es un género mayor diversificado en el Neo-trópico con unas 300 especies, de las que unas 69 serían endémicas de los Andes de Colombia y Ecuador. [25] En Ecuador la familia Lycopodiaceae está representada por tres géneros y 67 especies, [32] de los cuales en Loja se han reportado 33 especies, siendo el género *Huperzia* el más diverso con 28 especies [5] la mayoría de ellos típicos de páramos “Tierras altas, que en los Andes se sitúan entre los 10° N y los 8° S, a altitudes comprendidas entre los 3000 y los 4500”. [26]

-
- (21) Ordoñez, P et al., 2006 Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province. *Lyonia*, 10(2):65-71.
- (24) Murillo, M & Murillo, J. 1990. PTERIDÓFITOS DE COLOMBIA I. COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS LYCOPODIACEAE. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 23 (86):19-38.
- (8) Ortega, M. et al. 2007. Seasonal Study of the Alkaloid Pattern of *Huperzia saururus* with Habitat in Cordoba Province (Argentina). *The Journal of the Argentine Chemical Society* 95 (1-2): 1-9
- (25) Rincón, E et al., 2009. Ontogenia del esporangio y esporogénesis del licopodio *Huperzia brevifolia* (Lycopodiaceae) de las altas montañas de Colombia. Laboratorio de Histotecnica, Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Departamento de Biología, Universidad del Valle, Valle del Cauca, Cali, Colombia.
- (32) Jorgensen, P & León, S (Eds). 1999. Catalogue of the Vascular plants of the Ecuador Missouri Botanical Garden. Press. St. Louis. U.S.A. Volumen 75. 900 págs.
- (5) Andrade, J. 2007. Estudio Etnobotánico de las plantas medicinales empleadas por la Etnia Saraguro en la parroquia San Lucas. Cantón Loja. Provincia de Loja. Tesis de grado previa a la obtención de ingeniero agropecuario. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Ingeniería Agropecuaria. 93 págs.
- (26) Izco, et al. 2007. Estudio florístico de los páramos de pajonal meridionales de Ecuador. *Rev. peru. biol.* 14(2): 237-246

De las 5 especies estudiadas, *Huperzia crassa*, *H. compacta*, *H. hystrix*, *H. espinosana* y *H. columnaris* no ha se encontrado información bibliográfica. Las especies fueron ajustadas al sistema de Cronquis para su clasificación. ^[18]

2.5.1. Clasificación taxonómica *Huperzia crassa*



Reino -Plantae
División - Lycopodiophyta
Familia - *Lycopodiaceae*
Género- *Huperzia*
Especie – *crassa*
Nombre común - Waminga amarilla

Figura N°4 *Huperzia crassa* (Humb & Bonpl. Ex. Willd) Rothm.
Fuente: La Autora

2.5.2. Clasificación taxonómica de *Huperzia hystrix*



Reino - Plantae
División - Lycopodiophyta
Familia - Lycopodiaceae
Genero - *Huperzia*
Especie - *hystrix*
Nombre común - waminga roja grande

Figura N°5 *Huperzia hystrix* (Herter) Holub
Fuente: La Autora

(27) (Ing. Bolívar Merino, com. Pers.)

2.5.3. Clasificación taxonómica de *Huperzia compacta*



Reino - Plantae
División - Lycopodiophyta
Familia - Lycopodiaceae
Genero - *Huperzia*
Especie - *compacta*
Nombre común - waminga roja pequeña

Figura N°6. *Huperzia compacta* (Hook) Trevis
Fuente: La Autora

2.5.4. Clasificación taxonómica de *Huperzia columnaris*



Reino - Plantae
División - Lycopodiophyta
Familia - Lycopodiaceae
Genero - *Huperzia*
Especie - *columnaris*
Nombre común - waminga verde grande

Figura N°7 *Huperzia columnaris* B. Øllg
Fuente: La Autora

2.5.5. Clasificación taxonómica de *Huperzia espinosana*



Reino - Plantae
División - Lycopodiophyta
Familia - Lycopodiaceae
Genero - *Huperzia*
Especie - *espinosana*
Nombre común - waminga verde

Figura N°8 *Huperzia espinosana* B. Øllg
Fuente: La Autora

2.6. Usos etnomedicinales del género

En Argentina, *Huperzia saururus* comúnmente conocida como “cola de quirincho” se ha usado en etnomedicina por sus propiedades afrodisiacas; mientras que en otros países han sido reportados sus efectos tóxicos por ingestión, tales razones han llevado a la ejecución de investigaciones, demostrando que los alcaloides en dicha especie como la sauroina, sauroxina, hidroxilycopodina, N-acetylycopodine, lycopodine, N-methyllycodine y clavolonina exhiben una importante actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa. ^[18]

Huperzia serrata, ha sido empleada China por cientos de años como agente diurético, antiespasmódico, analgésico ^[28] para tratar y curar dolencias contusiones, estiramientos bruscos, esquizofrenia y miastenia gravis. En los últimos años se ha aislado un alcaloide a partir de *Huperzia serrata* llamado Huperzia A, uno de los químicos extensamente estudiado por su potencial en el tratamiento de demencias como el Alzheimer. ^[28]

En el Perú, la *Huperzia crassa*, se emplea como talismán asociada a la fertilidad de animales domésticos y en especial a la de los cuyes; en el mismo país, otras especies de *Huperzia* de ambientes paramunos, como *H. brevifolia*, *H. kuesteri* y *H. sellifolia* son comercializadas como parte de objetos y plantas de valor mágico. ^[9]

Así mismo, la *Huperzia tetragona* (Lycopodiaceae) en la Sierra Ecuatoriana fue empleada para tratar el mal de aire en personas y ganado vacuno; ^[9] una enfermedad causada por cambios bruscos de temperatura o al atravesar lugares pesados, como cementerios, piedras grandes, quebradas ^[10] etc., que ocasiona parálisis facial o corporal. ^[33] Hooker, (1838) reportó, para la misma especie, la

(18) Ortega, M. *et al.* 2007. Seasonal Study of the Alkaloid Pattern of *Huperzia saururus* with Habitat in Cordoba Province (Argentina). The Journal of the Argentine Chemical Society 95 (1-2): 1-9

(28) Wu, Q & Gu, Y. 2005. Quantification of *huperzine A* in *Huperzia serrata* by HPCL-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40(2006):993-998.

capacidad de un violento purgativo supuestamente por el contenido de alcaloides, a la vez utilizado por los indígenas del Azuay para tratar la Elefantiasis y Lepra.^[9]

Huperzia austroecuadorica, *Huperzia sellifolia* y *Huperzia tetragona* son especies empleadas por los Rikuyhampiyachak (visionarios) de la etnia Saraguro, para sanar enfermedades de carácter mitológico;^[10, 5] en unión con otras especies de la misma familia.

2.6.1. Bioactividad de la Huperzina A

La actividad más importante de este compuesto es su efecto en la memoria y la capacidad de protección neuronal, ya que mejora significativamente los procesos cognitivos y la retención de la memoria, en especial en pacientes que padecen la enfermedad del Alzheimer.^[30]

Uno de los mayores déficits funcionales en pacientes con la enfermedad de Alzheimer es la hipofunción de las neuronas colinérgicas, por lo que una de las estrategias para su tratamiento es incrementar los niveles de acetilcolina, en pacientes con la enfermedad usando drogas como la tacrina y Donepezilo que inhiben la acetilcolinesterasa. En este caso la Huperzina A es un inhibidor acetilcolinesterasa de origen natural que incrementa los niveles de acetilcolina después de su administración; por otro lado se ha determinado que la Huperzina A natural, es tres veces más potente que las moléculas sintéticas usadas en el tratamiento de Alzheimer.^[28] Además se reportó que es más selectivo para la acetilcolinesterasa que la butyrylcolinesterasa (BuChE) y menos tóxico que el Donepezilo y la tacrina, ya que reduce las células muertas mejorando la

-
- (32) Ministerios de Salud Pública. Dirección Provincial de Salud de Loja. Subproceso de Salud Intercultural. 2009. Apuntes sobre medicina ancestral
 - (10) Andrade, J. *et al.* 2009. Plantas medicinales silvestres, empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas. Primera edición, Editorial Universitaria UTPL, Loja, 63 págs.
 - (5) Andrade, J. 2007. Estudio Etnobotánico de las plantas medicinales empleadas por la Etnia Saraguro en la parroquia San Lucas. Cantón Loja. Provincia de Loja. Tesis de grado previa a la obtención de ingeniero agropecuario. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Ingeniería Agropecuaria. 93 págs.
 - (28) Wu, Q & Gu, Y. 2005. Quantification of *huperzine A* in *Huperzia serrata* by HPCL-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40(2006):993-998.

capacidad de retención en la memoria, además, en comparación con la tacrina y Donepezilo, rivastigmina y galantamina, la Huperzina A tiene una mejor penetración a través del torrente sanguíneo y mayor duración en la acción inhibitoria del acetilcolinesterasa (AChE).^[30]

(30) Ma, *et al.*, 2007. Huperzine A-an ethnopharmacological review. ScienceDirect Journal of ethnopharmacology 113(2007):15-34.

CAPÍTULO 3

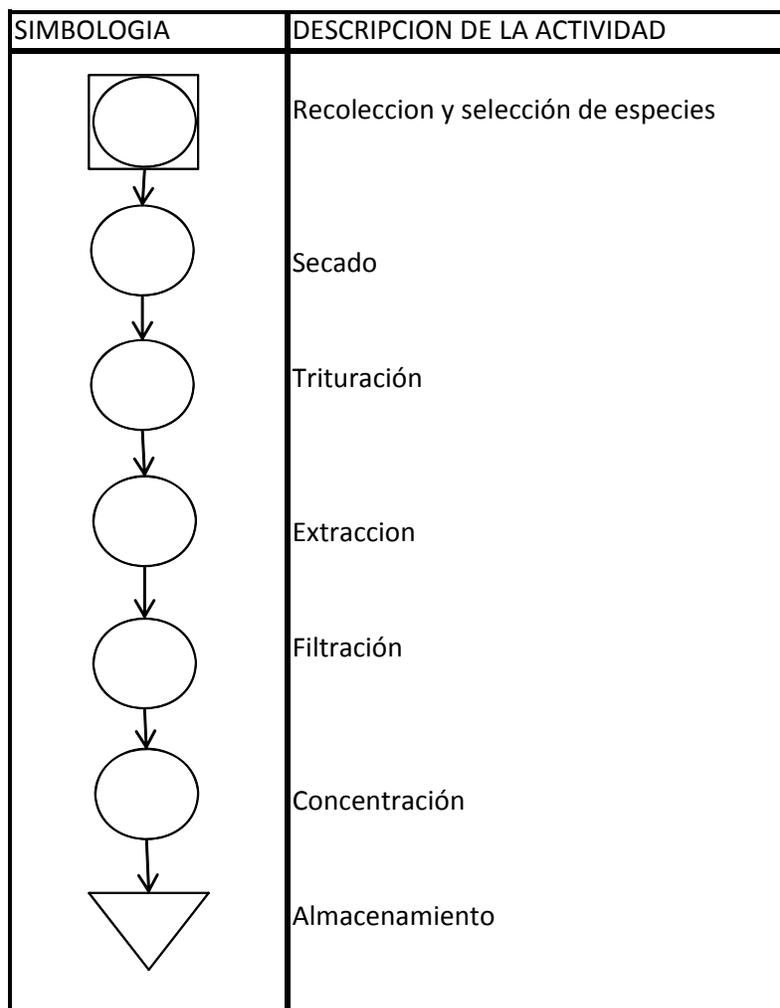
METODOLOGÍA

3. MATEERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de Extractos Totales

El esquema N° 4, muestra el proceso de obtención de extractos totales, el cual inicia con la recolección de las especies y termina en la etapa de almacenamiento de los extractos previo al proceso de aislamiento de alcaloides.

3.2 Diagrama de flujo para la obtención de extractos totales



Esquema N°4 Obtención de extractos totales
Fuente: La autora

3.3. Descripción del diagrama de flujo para la obtención de extractos totales

3.3.1. Recolección de especies

El área de recolección de las especies (Figura N°3), está ubicada al norte de la Provincia de Loja, parroquia San Lucas, ubicada a 45Km de la capital de provincia con un área superficial de 15 900 ha, habitado en un 90% por indígenas de la etnia Saraguro. Tiene una temperatura promedio a lo largo del año de 12.8°C y una altitud promedio de 2430 m s. n. m. (Andrade, 2007).

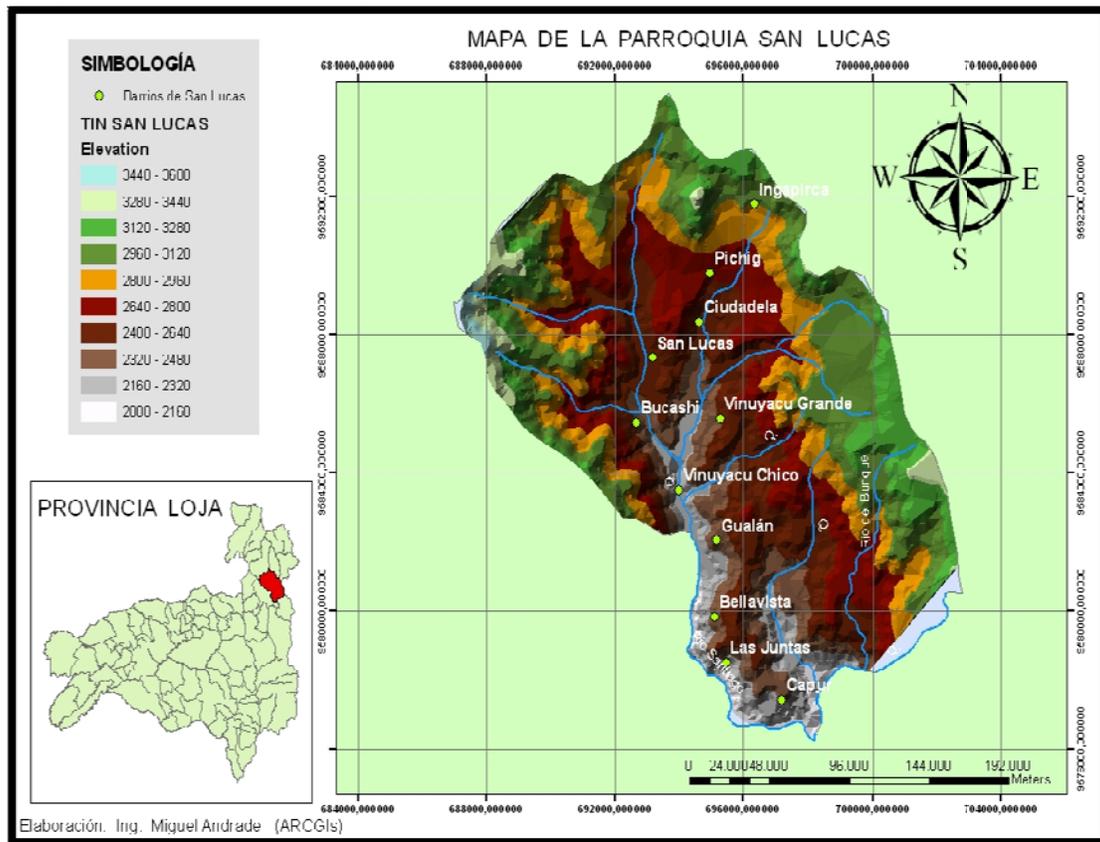


Figura N ° 9 Ubicación geográfica de los lugares de recolección de las especies
Fuente: Andrade *et al.*, 2009

Las especies de la familia Lycopodiaceae se recolectaron en los páramos de la parroquia San Lucas y el cantón Saraguro, a alturas entre 3100 y 3900 m. s. n. m. Los lugares de recolecta se indican en la Tabla N°2.

Tabla N°2 Lugar de recolección de las especies Lycopodiaceae

Especies	Lugar de recolección	Coordenadas	Altitud (m. s. n. m.)
<i>Huperzia crassa</i>	Inguera o Aguarango	17700781E; 9586086N	3478
<i>Huperzia compacta</i>	Inguera o Aguarango	17700781E; 9586086N	3478
	Loma de Torre o Peña Blanca	17696489E; 959404	3316
<i>Huperzia hystrix</i>	Loma de Torre o Peña Blanca	17696489E; 959404	3316
<i>Huperzia columnaris</i>	Fierro Urku	17685761E; 959095N	3900
<i>Huperzia espinosana</i>	Loma de Torre o	17696489E; 959404	3316
	Peña blanca		

Una vez recolectadas, las especies estas fueron llevadas al herbario de la Universidad Nacional de Loja para su clasificación.

3.3.2. Selección de especies

Las especies recolectadas fueron seleccionadas en función de las impurezas y contaminación que estas especies presentan.

3.3.3. Secado y trituración

El secado se realizó a 40°C por tres días; una vez cumplido este período las muestras son sacadas del secadero y llevadas a un molino mecánico de tipo sin fin para su trituración.

3.3.4. Extracción por Maceración

Proceso de extracción se llevó a cabo empleando solventes de polaridad creciente (Esquema N° 5).



Esquema N°5 Proceso de Extracción
Fuente: La Autora

Se utilizó 200 g de planta seca triturada para el proceso de extracción, la misma que se llevo a cabo por maceración dinámica a temperatura ambiente durante 5

horas, con una relación solvente/planta 10:1 a una velocidad de agitación 1500-2000 rpm (Figura N°10).



Figura N°10 Pesado de muestra seca
Fuente: La Autora (Investigación experimental)

La planta fue macerada, de manera consecutiva, usando tres diversos solventes de polaridad creciente.

3.3.5. Filtración y concentración

Se filtro en un embudo Buchner a presión reducida y luego se concentró.

Hexano: Primer solvente, se realizó dos filtraciones; La primera se llevo a cabo usando vacío debido a que el extracto posee fragmentos de materia vegetal grandes que obstruyen el paso del mismo. La segunda se filtro por gravedad, usando un embudo simple y 2 hojas de papel filtro para evitar el paso de partículas pequeñas, la parte líquida fue concentrada en el rotaevaporador a 35 °C, mientras que la torta (fragmentos de la planta) fue secada y pesada nuevamente para la extracción en Acetato de etilo.

Acetato de etilo: De igual forma se filtro dos veces la parte líquida obtenida fue concentrada y la parte sólida (Torta), fue secada para la siguiente extracción con etanol. Dado que durante la concentración del extracto se formó un precipitado de aspecto espeso, este se redisolvió en el mismo solvente, Acetato de Etilo, formándose dos fases: Un precipitado sólido que se queda en el fondo del balón

el cual es separado de la fase líquida, secado, rotulado y guardado como (P1 AcetOH) precipitado de acetato de etilo 1; y una parte líquida que se separó para su posterior concentración a vacío; en esta etapa se formó nuevamente un precipitado para el cual se repitió el proceso disolviendo y filtrando el precipitado hasta que al concentrar la fase líquida del extracto no se forme el precipitado.

Etanol: de igual forma se procedió a filtrar el extracto etanólico usando vacío, y luego usando un embudo simple con 3 hojas de papel filtro, inicialmente, se obtiene un líquido claro pero a medida que se va concentrando se va formando el precipitado, se procede a concentrar hasta una consistencia espesa y se re-dissuelve en etanol para separar el precipitado que se deposita en el fondo del recipiente. Durante el proceso se determinó que no es aconsejable el uso del papel filtro, debido a que las partículas que se precipitan son extremadamente pequeñas, tanto, que atraviesan las paredes del papel filtro a pesar de que se usen cuatro o más hojas a la vez.

La separación del precipitado presente en el extracto, consiste en re-dissolver el concentrado en etanol (50 ml) y dejar en reposo 4 horas (Figura N°11) aproximadamente hasta que las pequeñas partículas sedimenten completamente; se procede a retirar cuidadosamente la parte líquida, usando una pipeta Pasteur (Figura N°12), de modo que el precipitado quede con una mínima cantidad de solvente (etanol); el precipitado es lavado 8 veces con el mismo solvente hasta que la prueba de Dragendoff de reacción negativa. Los lavados respectivos se realizan con la finalidad de garantizar que los alcaloides pasen a la fase etanólica y que el precipitado quede libre de los mismos. Por otra parte se procede a concentrar la parte líquida producto del lavado, obteniéndose nuevamente el mismo precipitado. El proceso se repite hasta que la fase etanólica no forme precipitados durante la concentración (Figuras N°13 y 14). Cabe mencionar que no se obtiene un concentrado sin precipitado puesto que de alguna manera y pese al esfuerzo por eliminar el precipitado este persiste.



Figura N°11 Precipitado de extracto etanolico redissuelto
Fuente: La Autora (Investigacion Experimental)



Figura N°12 Separacion de precipitados del extracto etanolico
Fuente: La Autora (Investigacion Experimental)

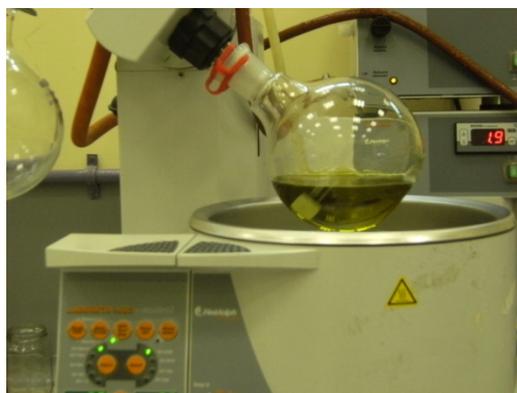


Figura N°13 Extracto etanolico sin precipitados
Fuente: La Autora (Investigacion Experimental)

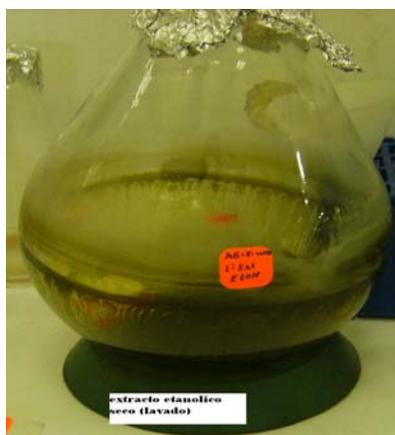


Figura N°14 Extracto etanolico con menor cantidad de precipitados
Fuente: La Autora (Investigacion Experimental)

El precipitado final libre de alcaloides se pesa, etiqueta y almacena como, (P1 EtOH), precipitado 1 del extracto etanólico.

3.4 Marchas fitoquímicas

Las marchas fitoquímicas se llevaron a cabo para la determinación de metabolitos secundarios presentes en las especies, siguiendo el procedimiento propuesto por Miranda, (2002) con ciertas modificaciones. Una vez obtenidos los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico (Figura N°15 y 16) se procedió a realizar las pruebas colorimétricas de Dragendoff, Mayer y Wagner empleados para la determinación cualitativa de alcaloides, mientras que en la fase etanólica se realizó las pruebas para la determinación de metabolitos secundarios.

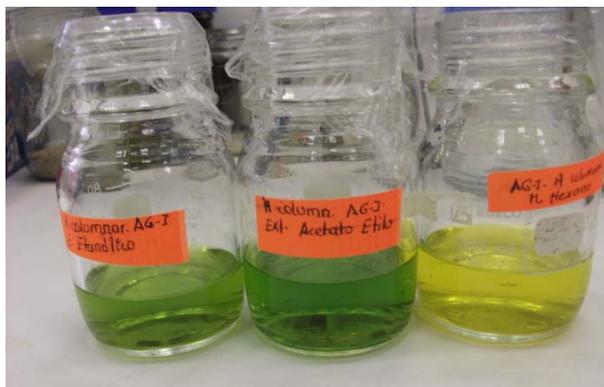


Figura N°15 Extracto etanolico, de acetato de etilo y hexánico
Fuente: La Autora (Investigacion Experimental)

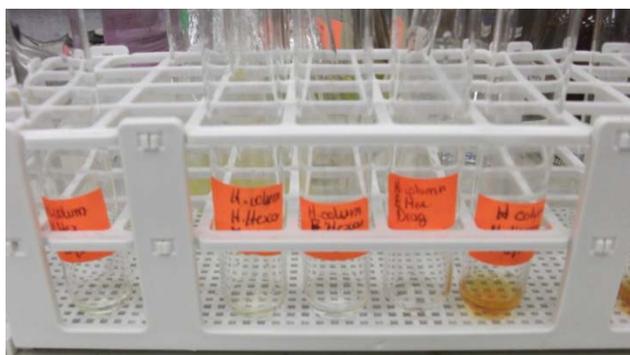


Figura N°16 Ensayos para la determinación alcaloides en los distintos extractos
Fuente: La Autora (Investigacion Experimental)

3.5. Determinación cualitativa de alcaloides

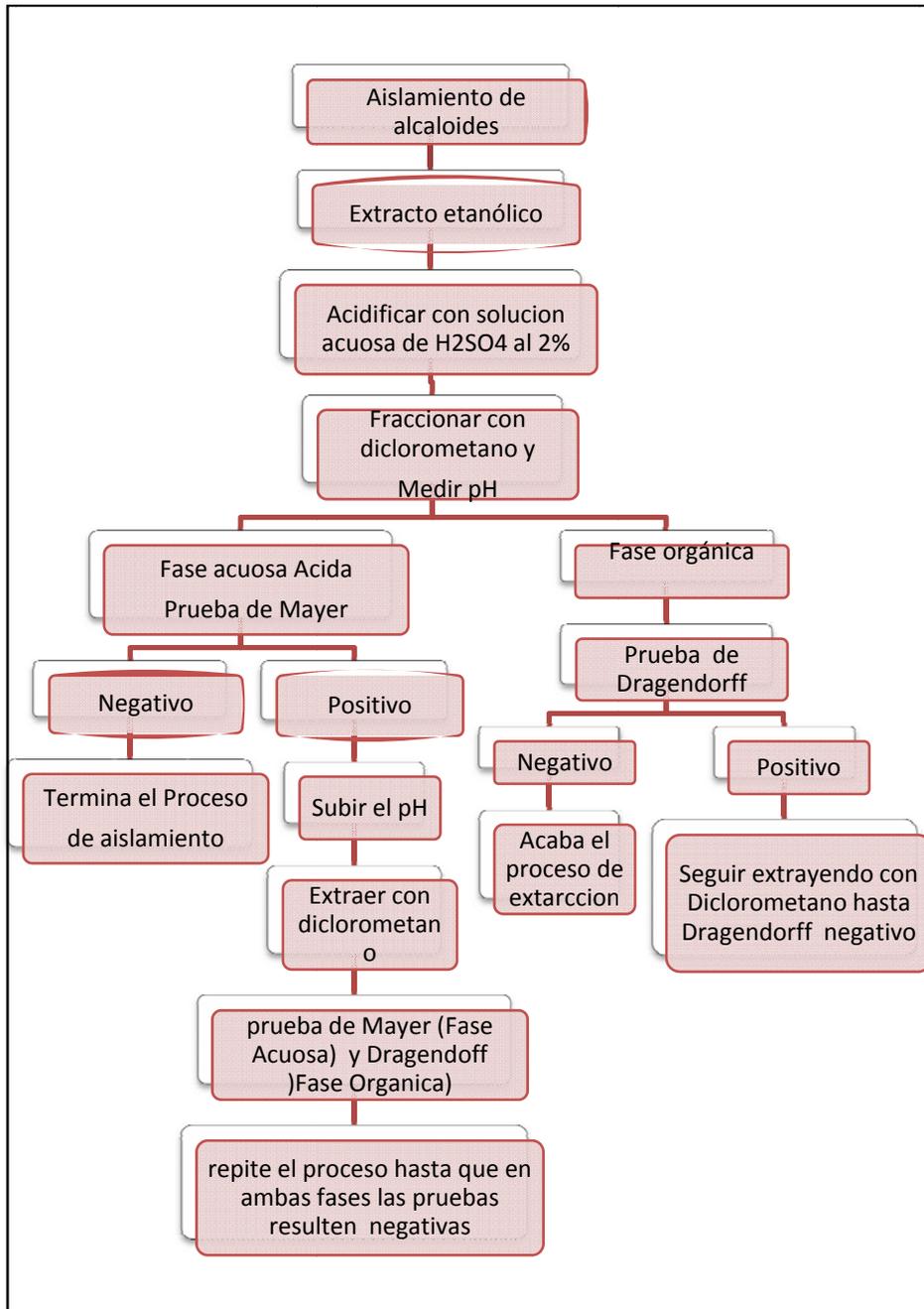
Para la determinación cualitativa de los alcaloides se empleo el Ensayo de Dragendoff; esta técnica, es una prueba colorimétrica que permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides. Una leve turbidez o precipitado (rojo a naranja, blanco a crema y marrón) evidencia la posible presencia de los mismos (Miranda, 2002). La prueba consiste en colocar una gota de extracto liquido, usando un tubo capilar muy fino, sobre una placa de silica gel 60F254, se deja evaporar el solvente y sobre esta se deja caer una suave capa del reactivo de Dragendoff, se seca al ambiente y se observa la reacción característica que éste presenta frente a los alcaloides.

3.6. Aislamiento de alcaloides

El aislamiento de alcaloides se basó en la bibliografía de Sharapin 2000, deonde se muestra el aislamiento de alcaloides a escala de laboratorio, y García, 2002. Con algunas modificaciones.

3.6.1. Esquema para el aislamiento de alcaloides

El esquema N° 6 muestra el proceso para el aislamiento de los alcaloides de las 5 especies.



Esquema N°6 Aislamiento de alcaloides
Fuente: La Autora

3.6.1. Acidificación

Se preparo 500 ml de una solución de ácido sulfúrico al 2%, la cual se encuentra a un pH 2 a 22.5 °C, con la cual se procedió a lavar nuestro extracto etanólico seco, este extracto volvió a formar un precipitado similar al anterior, el mismo que no se lo pudo separar por filtración aun usando 4 hojas de papel filtro a la vez, por lo que se procedió a seguir el siguiente procedimiento (Figura N°17):



Figura N°17 Precipitado Acuoso ácido
Fuente: La Autora (Investigacion Experimental)

Se disolvió el precipitado en agua acidificada (50ml) se agitó fuertemente y dejo en reposo 2 horas aproximadamente (Figura N°18 y 19), hasta que el precipitado se sedimente completamente, entonces se procedió a separar la parte líquida con una pipeta Pasteur, hasta que la parte del precipitado quede con la mínima cantidad de agua acidificada. Este proceso de lavado, agitado y separación de ambas fases se lleva a cabo 10 veces, hasta que el líquido con la cual se realiza el lavado de negativo a la prueba de Dragendoff. A la parte sólida (precipitado) se etiqueta, pesa y guarda como (T. A) torta acidificada.



Figura N°18 Precipitado en reposo
Fuente: La Autora (Investigación Experimental)



Figura N°19 Separación del precipitado con una pipeta Pasteur.
Fuente: La Autora (Investigación Experimental)

3.6.2. Extracción Líquido - Líquido

La parte líquida acidificada, sin precipitados, es sometida al proceso de extracción líquido – líquido (Figura N°20), usando diclorometano; la extracción consiste en colocar en un embudo de decantación todo el contenido del agua acidificada y diclorometano, agitar el embudo fuertemente con la finalidad que el solvente diclorometano extraiga los alcaloides que se encuentren en la fase acuosa ácida, en esta separación luego de una fuerte agitación dejar reposar hasta que las dos fases inmiscibles se separen; una vez separadas las dos

fases se recoge la parte de diclorometano y se repite la extracción con nuevo solvente (diclorometano) 2 veces más, hasta que en el fraccionamiento no se obtenga alcaloides.



Figura N°20 Extracción líquido-líquido (Fase acuosa parte superior y Fase Orgánica inferior).

Fuente: La Autora (Investigacion Experimental)

3.6.4. Alcalinización de la fase acuosa

Seguidamente se procedió a la alcalinización de la solución acuosa usando bicarbonato de sodio (NaHCO_3), hasta lograr que la fase acuosa llegue a un pH 7 (Figura N°21), una vez alcanzada dicha alcalinidad se procedió a realizar las extracciones líquido-líquido posteriores con diclorometano, hasta que la fracción a pH 7 de negativo a la prueba de Dragendoff. Cabe notar que a medida que se llevaban a cabo las extracciones el pH de la solución acuosa subía paulatinamente hasta llegar a pH 9. De esta manera se obtiene las fracciones que fueron unidas y concentradas, finalmente se pesa la fracción y etiqueta como (Alcaloides libres totales a pH 7-9); dicha fracción representa la fracción de alcaloides libres totales (Figura N°22).

Dado que la fase acuosa ácida, frente a la prueba de Mayer, dio reacción positiva y la fase orgánica dio negativo a la prueba de Dragendorff (el diclorometano dejó de extraer los alcaloides presentes entre pH 7 – 9), se subió el pH de la fase acuosa a 11 usando Hidróxido de amonio y se realizó el fraccionamiento con diclorometano obteniendo así varias fracciones a tal pH. Estas fueron reunidas, concentradas y etiquetadas como alcaloides libres.



Figura N°21 Alcalinización de la fase acuosa con Bicarbonato de Sodio
Fuente: La Autora (Investigación Experimental)



Figura N°22 Alcaloides libres totales
Fuente: La Autora (Investigación Experimental)

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y ANÁLISIS

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Obtención de extractos totales

Tabla N°3 Porcentaje de extractos totales, obtenidos partir de 200 gramos de muestra en las diferentes especies

Especies	Muestra inicial (g).	Total de extractos (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
<i>Huperzia crassa</i>	200	42,800	21,40
<i>Huperzia compacta</i>	200	49,091	24,54
<i>Huperzia hystrix</i>	200	43,450	21,72
<i>Huperzia columnaris</i>	200	59,340	29,67
<i>Huperzia espinosana</i>	200	45,160	22,58

Durante el proceso de extracción exhaustiva del material vegetal, se determino el total de extracto obtenido independientemente del solvente empleado, observando que la *Huperzia columnaris* presenta un mayor porcentaje de rendimiento total de extracciones (29,60%), siendo la *H. crassa* y *H. hystrix* las que presentaron el menor rendimiento de (21,40%) y (21,72%) respectivamente.

4.1.1. Análisis de extractos totales obtenidos mediante el empleo de distintos solventes

Tabla N°4 Porcentaje de extractos totales obtenidos de acuerdo al solvente empleado en las 5 especies

Especies	Muestra inicial (g)	Solvente	Cantidad de extracto (g)	Cantidad en %
<i>Huperzia crassa</i>	200	Hexano	1,66	0,83
		Acetato de etilo	4,98	2,49
		Etanol	36,16	18,08
<i>Huperzia compacta</i>	200	Hexano	4,49	2,24
		Acetato de etilo	13,37	6,68
		Etanol	31,23	15,61
<i>Huperzia hystrix</i>	200	Hexano	2,04	1,02
		Acetato de etilo	9,63	4,81
		Etanol	31,78	15,89

Especies	Muestra inicial (g)	Solvente	Cantidad de extracto (g)	Cantidad en %
<i>Huperzia columnaris</i>	200	Hexano	1,79	0,89
		Acetato de etilo	9,88	4,94
		Etanol	47,67	23,83
<i>Huperzia espinosana</i>	200	Hexano	3,09	1,54
		Acetato de etilo	9,73	4,86
		Etanol	32,24	16,17

En la extracción del material vegetal con etanol de las 5 especies *Huperzia crassa*, *H. compacta*, *H. hystrix*, *H. columnaris* y *H. espinosana*, se registró que la *H. columnaris* presenta un mayor porcentaje de rendimiento de extracción (23,83%) y la *Huperzia compacta* presentó el de menor rendimiento (15,61%); de manera general podemos decir que el extracto etanólico presentó el mayor porcentaje de rendimiento de extracción con respecto a los otros dos solventes, Hexano y Acetato de etilo [19, 4, 28, 19, 35, 34]

4.2. Rastreo cualitativo para la determinación de alcaloides

Mediante el seguimiento cualitativo usando la prueba de Dragendoff y Mayer para la determinación de alcaloides, se puede decir que el extracto de hexano no presenta alcaloides, lo mismo sucede con la fracción que se obtuvo con acetato de etilo. Lo contrario sucede con la fracción etanólica que resulto positiva a la prueba de Dragendoff y Mayer, por tanto en esta investigación el extracto de partida para el aislamiento de alcaloides de las especies *Huperzia crassa*, *H. compacta*, *H. Hystrix*, *H. columnaris* y *H. espinosana*, es el extracto

- (19) Bruneton, J. 2001. Alcaloides. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 915págs.
(4) Sharapin, N. *et al.* .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología. N°78) 248. págs.
(28) Wu, Q & Gu, Y. 2005. Quantification of *huperzine A* in *Huperzia serrata* by HPCL-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40(2006):993-998.
(22) Miranda M. 2000. Farmacognosia y productos Naturales. La Habana, Cuba, 126 págs.
(35) Hill, et al 2001. Alcaloides en la especie cubana *crotón micradenus* urb. Rev. Cubana Farm. 35(1):61-5.
(34) García, et al. 2004. Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de mosquito *Culex Quinquefasciatus*. Relacyc. 27(004):297-303.

etanólico esto concuerda con las practicas de extracción empleadas para el aislamiento de alcaloides realizadas por. [29, 12, 32, 34] Los alcaloides son solubles en solventes polares agua, soluciones ácidas e hidroalcohólicas. [3]

4.3. Tamizaje Fitoquímico

4.3.1. Tamizaje fitoquímico para la determinación de metabolitos secundarios

Tabla N°5 Resultado de las marchas fitoquímicas en el extracto etanólico

Especies	Flavonoides	Taninos	Triterpenos y/o esteroides	Cumarinas del tipo Lactonas	saponinas
<i>Huperzia crassa</i>	+	+	+	-	+
<i>Huperzia compacta</i>	+	+	+	-	+
<i>Huperzia hystrix</i>	+	+	+	-	+
<i>Huperzia columnaris</i>	+	+	+	-	+
<i>Huperzia espinosana</i>	+	+	+	-	+

Mediante el ensayo de Baljet se determino la ausencia de Cumarinas del tipo lactonas en todas las especies; mientras que los ensayos de cloruro férrico (taninos y/o compuestos fenólicos) desarrollaron una coloración verde que correspondieron a la presencia de taninos, por otra parte el ensayo de Shinoda (flavonoides), Liebermann-Burchard (triterpenos) y ensayo de espuma (saponinas) resultaron también positivas. Por tanto podemos decir que mediante el tamizaje fitoquímico y la cromatografía de capa fina, se determinó la presencia de otros metabolitos secundarios adicionales al contenido de alcaloides (Figura N°17 y 18).

- (4) Sharapin, N. *et al.* .2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. (Serie de ciencia y Tecnología N° 78) 248 págs.
- (35) Hill, et al 2001. Alcaloides en la especie cubana crotón micradenus urb. Rev. Cuban Farm. 35(1):61-5.
- (28) Wu, Q & Gu, Y. 2005. Quantification of *huperzine A* in *Huperzia serrata* by HPCL-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40(2006):993-998.
- (34) García, et al. 2004. Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de mosquito *Culex Quinquefasciatus*. Relacyc. 27(004):297-303.
- (17) Arango, G. &. 2002 Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquía.

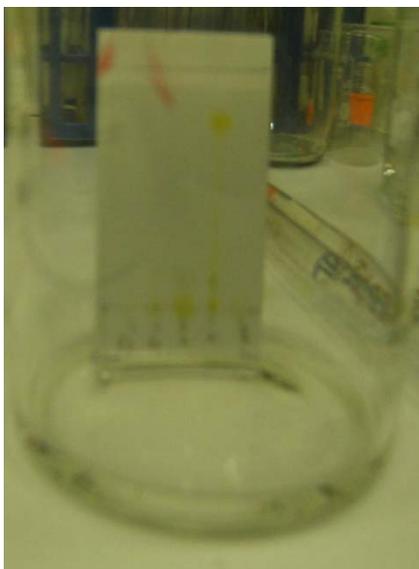


Figura N°23 *H. crassa*, TLC Eluida con con Metanol y Acetato de etilo 7:3
Fuente: La Autora



Figura N° 24 *H. crassa*, TLC revelada con vainillina
Fuente: La Autora

2.3.2. Tamizaje fitoquímico para la determinación de alcaloides

En la tabla N°6 se indican las pruebas colorimétricas utilizadas para la identificación cualitativa de los alcaloides presentes en el extracto etanólico

Pruebas para la determinación de alcaloides			
Especies	Mayer	Wagner	Dragendoff
<i>Huperzia crassa</i>	++	+++	+++
<i>Huperzia compacta</i>	++	++	+++
<i>Huperzia hystrix</i>	++	+++	++
<i>Huperzia columnaris</i>	+	+++	++
<i>Huperzia espinosana</i>	+	+++	+++

Resultados Miranda, 2000: Reacción de Wagner y Dragendoff, + = Opalencia; ++ = Turbidez; +++ = precipitado

Resultados de prueba de Mayer. + = Opalencia; ++ = Turbidez; +++ = precipitado coposo

La determinación cualitativa de alcaloides, a partir del extracto etanólico fueron positivas en los tres casos, reactivo de Mayer, Dragendoff y Wagner, lo que no sucedió con los extracto hexánico y acetato de etilo que fueron negativas. Esto prueba que los alcaloides de las especies estudiadas se encuentran en

solventes polares como el etanol, lo cual se corrobora con la bibliografía para la extracción de alcaloides a partir de etanol. [28, 34]

4.4. Aislamiento de Alcaloides

En la tabla N°7 se muestra el rendimiento de las fracciones totales de alcaloides para cada especie

Especie	Peso g.	Rendimiento %	% Total
<i>Huperzia crassa</i>	0,80	0,40	100
<i>Huperzia compacta</i>	0,45	0,22	100
<i>Huperzia hystrix</i>	0,34	0,17	100
<i>Huperzia columnaris</i>	0,31	0,15	100
<i>Huperzia espinosana</i>	0,57	0,28	100

Con respecto a los alcaloides totales aislados de cada especie a partir de 200 gramos de muestra inicial, se puede decir que, la *Huperzia crassa* resultó ser la portadora de la mayor cantidad de alcaloides (0,4%), seguida por la *H. espinosana* y *H. compacta* de las cuales se aislaron (0,28 y 0,22 %) de alcaloides respectivamente, mientras que de la *H. hystrix* y *columnaris* se aislaron solo el 0,17 y 0,55%, con estos resultados se puede afirmar que la cantidad de extracto total etanólico obtenido del proceso de maceración no influye en la cantidad de alcaloides totales a obtener; cada uno de los porcentajes de rendimiento obtenido corresponden al 100% de alcaloides presentes en cada especie. A manera general se puede decir que los alcaloides pueden obtenerse en cantidades muy pequeñas como en el caso de la vinca de Madagascar (3g a partir de 1 tonelada), hasta 15 veces más, como en el caso de los alcaloides aislados de la corteza del tronco de la quina. [19]

(28) Wu, Q & Gu, Y. 2005. Quantification of *huperzine A* in *Huperzia serrata* by HPCL-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40(2006):993-998.

(34) García, et al. 2004. Toxicidad de Alcaloides de *Erythrina Americana* en Larvas de Mosquito *Culex Quinquifasciatus* *Revista fitotecnia Mexicana* 27(04): 297-303.

(19) Bruneton, J. 2001. *Alcaloides*. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, S. A 95págs.

La tabla N°8 indica el rendimiento de las fracciones de alcaloides totales a diferente pH de extracción

Especies	Muestra inicial (g)	pH	Alcaloides totales (g)	% alcaloides totales	% total
<i>Huperzia crassa</i>	200	2	0	0	0
		7	0,78	0,39	97,5
		11	0,02	0,01	2,5
<i>Huperzia compacta</i>	200	2	0	0	0
		7	0,24	0,12	53,33
		11	0,21	0,11	46,67
<i>Huperzia hystrix</i>	200	2	0	0	0
		7	0,32	0,16	94,12
		11	0,02	0,01	5,88
<i>Huperzia columnaris</i>	200	2	0,04	0,02	12,9
		7	0,25	0,13	80,65
		11	0,02	0,01	6,45
<i>Huperzia espinosana</i>	200	2	0	0	0
		7	0,34	0,17	59,65
		11	0,23	0,12	40,35

De la fracción de alcaloides a partir del extracto etanólico se pudo determinar que dichos compuestos se extraen a pH alcalino (7-9 y a 11), ya que las fracciones obtenidas frente a la prueba de Dragendoff presentan reacción positiva; sin embargo en un solo caso se obtuvo alcaloides a pH 2, esto es en la *Huperzia columnaris*.

Así también tenemos que la *Huperzia crassa* arrojó el mayor rendimiento (0,39%) de alcaloides a pH alcalino entre 7 – 9 en relación a los de las otras especies; la mayor cantidad de los alcaloides liberados a pH 11 pertenecieron a *H. espinosana* y *H. compacta* con un rendimiento de 0,11% y 0,12% respectivamente esto en comparación con otras especies de las cuales se obtuvieron rendimientos inferiores al 0,1%; en el caso de la *H. columnaris* se obtuvo alcaloides a pH ácido, con un rendimiento muy bajo (0,02%). Del mismo modo se puede decir que la mayoría de los alcaloides en las *Huperzias*

estudiadas encuentran en un intervalo de pH 7 – 9 y en menor cantidad a pH 11.

Para el análisis en TLC de las fracciones totales de alcaloides se emplearon placas Rp-18 y como eluyentes metanol- ácido clorhídrico (7:3), la elución de los compuestos y los Rf de cada uno de ellos se muestran en la tabla N°9.

Especies	pH	Rf	TLC/inversa UV- 365	Revelado Dragendoff
<i>Huperzia crassa</i>	7a9	0,63		
	11	0,68		
<i>Huperzia compacta</i>	7a9	0,68		
	11	0,59		

Especies	pH	Rf	TLC/inversa UV- 365	Revelado Dragendoff
<i>Huperzia hystrix</i>	7a9	0,65		
	11	0,73		
<i>Huperzia columnaris</i>	2	0,46		
	7a9	0,67		
	11	0,71		

Especies	pH	Rf	TLC/inversa UV- 365	Revelado Dragendoff
<i>Huperzia espinosana</i>	7a9	0,49		
	11	0,56		

En relación al eluyente empleado se puede concluir que luego de la pruebas preliminares con otros eluyentes se determino que el más adecuado para estas especies resultó ser el Metanol - Acido clorhídrico 2% en proporciones 7:3, ya que con otros eluyentes los compuestos se quedan en la base.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones

Luego del proceso realizado para la obtención de alcaloides en especies de la familia Lycopodiaceae podemos concluir lo siguiente:

- ✓ En base a las pruebas colorimétricas de rastreo de alcaloides, Dragendoff y Mayer, se determinó que los compuestos aislados son alcaloides, esto se comprobó por la coloración anaranjada presentada luego de la aplicación del reactivo de Dragendoff.
- ✓ *Huperzia crassa*, presenta el mayor rendimiento en alcaloides totales a partir del extracto etanólico (0,40%)
- ✓ Para todas las especies estudiadas la fracción total de alcaloides obtenidos a pH 7-9 presenta la mayor cantidad de sustancia extraída en gramos frente a la extracción realizada a pH 2 y pH11.
- ✓ Los extractos de Hexano y Acetato de etilo, no resultaron ser una fuente de alcaloides, lo contrario sucede con la fracción etanólica que es positiva a las pruebas colorimétricas de Dragendorff, Mayer y Wagner. Lo que validaría el uso tradicional de estas especies, las cuales son maceradas en alcohol para su uso tradicional.

5.2. Recomendaciones

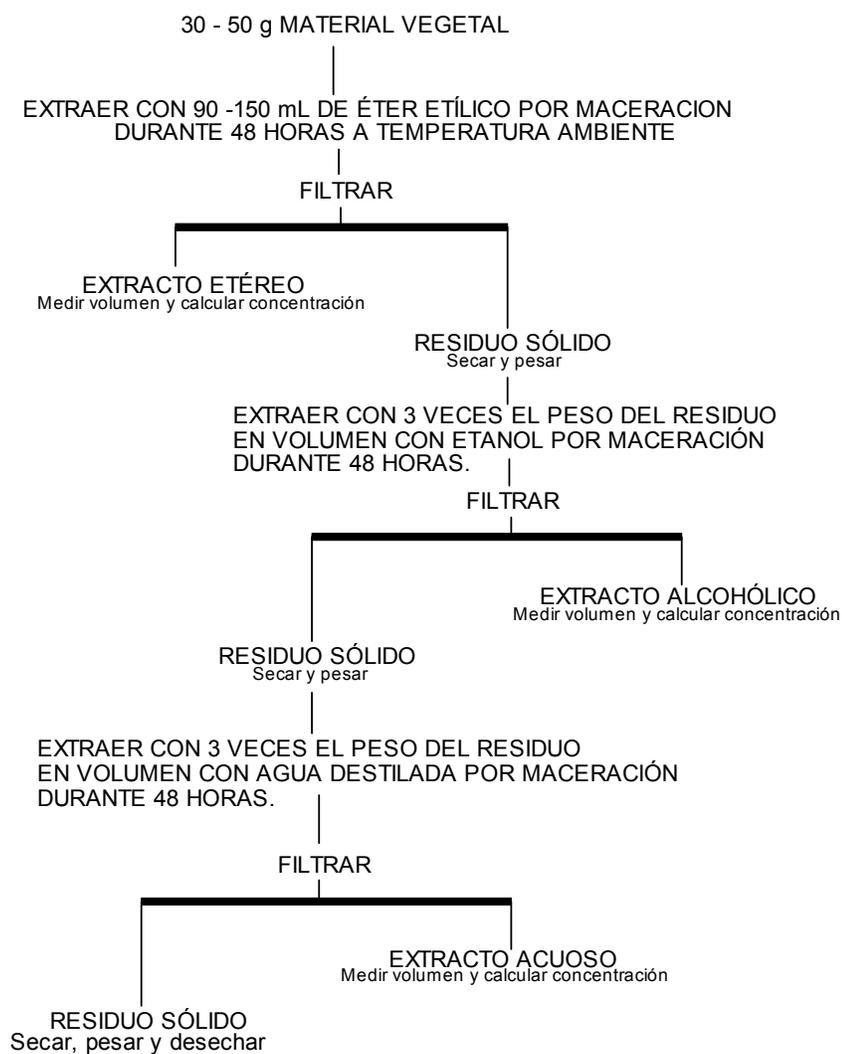
Realizar estudios más específicos con los extractos de las especies de esta familia en lo que a identificación de alcaloides se refiere para lograr su elucidación estructural.

En base a este trabajo, lo recomendable, sería perfeccionar la técnica para alcanzar el mayor rendimiento en cuanto a la extracción de alcaloides totales se refiere.

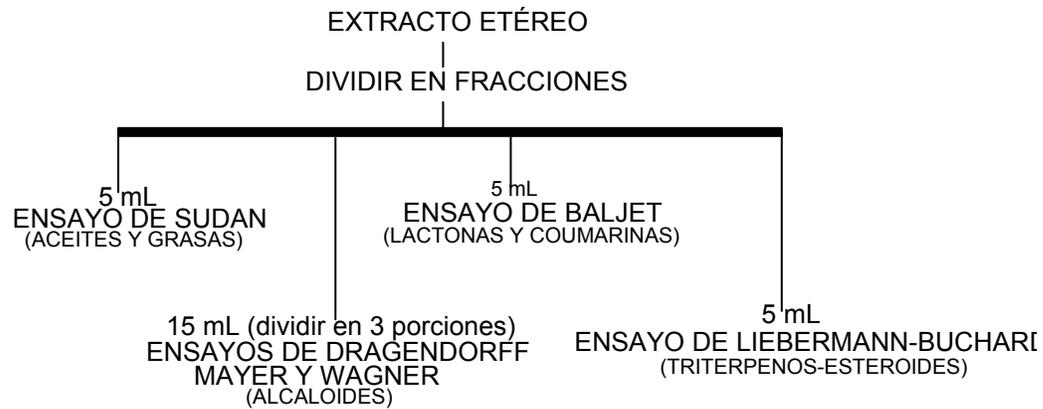
Con respecto a las fracciones totales de alcaloides se podría iniciar con un screening primario que permita evaluar la actividad antimicrobiana de las especies estudiadas.

ANEXOS

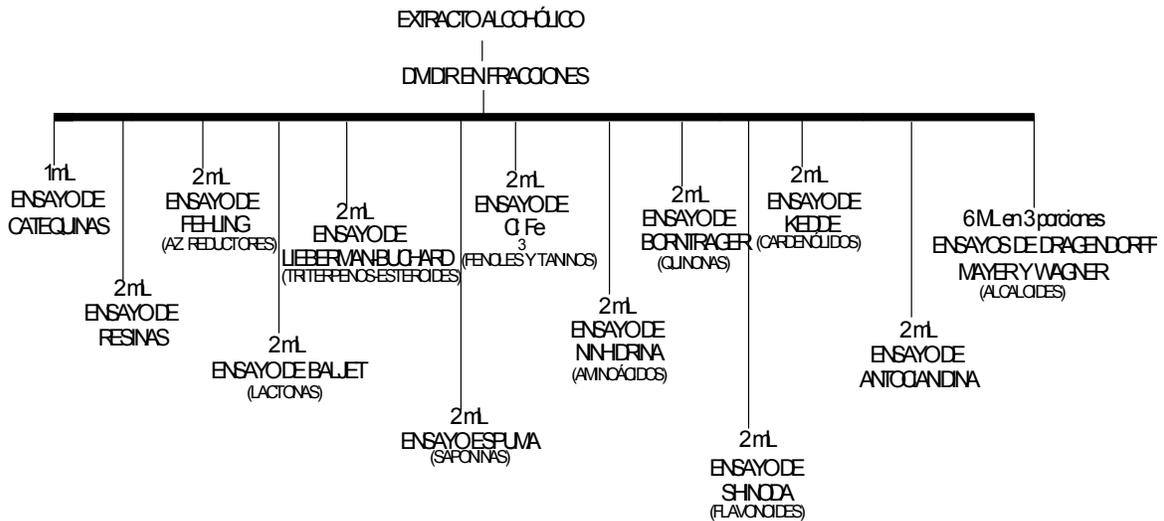
Anexo N°1 Obtención de extractos para el Tamizaje fitoquímico según Miranda, 2000.



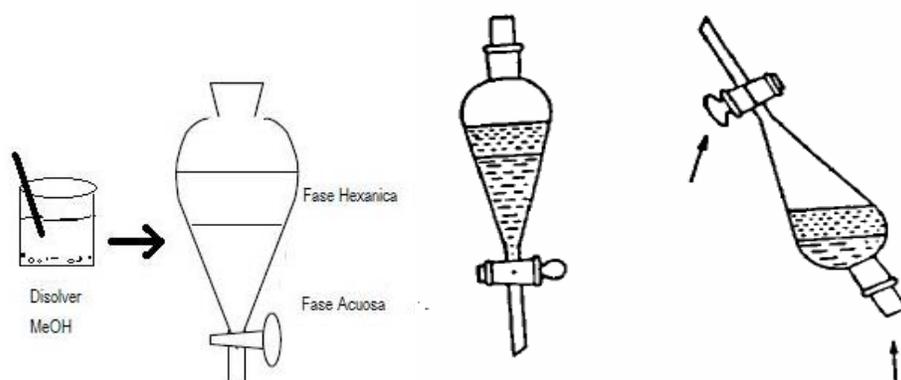
Anexo N°II Tamizaje fitoquímico para la determinación de metabolitos secundarios hexano, según Miranda, 2000.



Anexo N°III Reacciones para determinación de metabolitos secundarios en extracto etanólico, según Miranda, 2000.



Anexo N°IV Método de fraccionamiento Líquido – Líquido.



Anexo N°V Fraccionamiento Líquido-Líquido

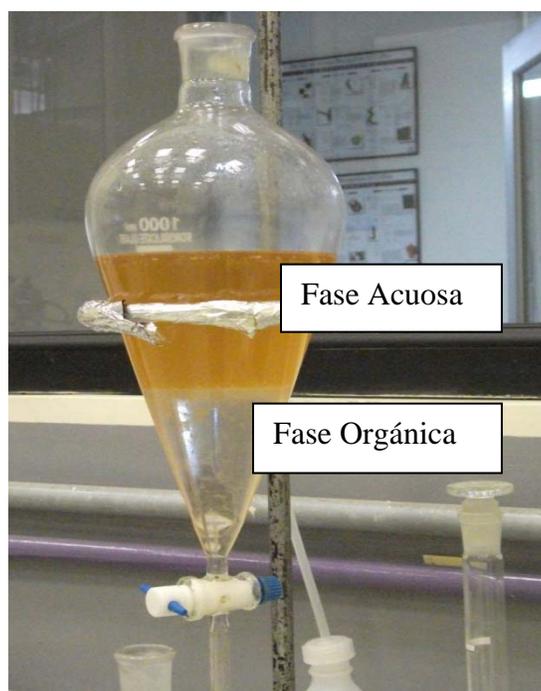
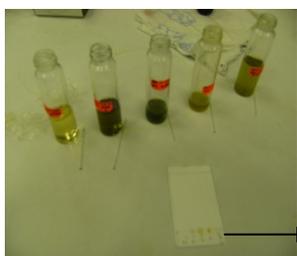


Figura: Fraccionamiento Líquido- Líquido
Fuente: La Autora (Investigación experimental)

Anexo N°VI Cromatografía de capa fina en extractos de *Huperzia*, antes del proceso de aislamiento de metabolitos secundarios.

Las figuras indican la elución de los extractos de *Huperzia crasa*, usando como eluyente metanol- HCL2% en proporción 7:3 en fase directa.



TLC

TLC1. Siembra de extractos
Fuente: La Autora



Elución en TLC
Fuente: La Autora



TLC revelada con vainillina
Fuente: La Autora

Anexo VII Tamizaje fitoquímico en extracto etanólico



Prueba de Baljet (Cumarinas)
Fuente: La Autora



Ensayo de Borntrager (Quinonas)
Fuente: La Autora



Ensayo de Liberman-Buchard
Fuente: La Autora



Ensayo de Shinoda
Fuente: La Autora

Anexo VIII Tamizaje fitoquímico para alcaloides en extracto etanólico



Prueba de Mayer
Fuente: La Autora



Prueba de Dragendoff
Fuente: La Autora



Prueba de Wagner
Fuente: La Autora

Anexo IX Tamizaje fitoquímico para la determinación de alcaloides en el extracto hexánico



Evaporación de extracto
Fuente: La Autora



Reacción de Mayer
Fuente: La Autora



Reacción de Dragendoff
Fuente: La Autora