



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO Y FARMACÉUTICO

“Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Lycopodium complanatum* L.”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR:

Herrera Sarango Claudia del Rosario

DIRECTOR:

PhD. Armijos Riofrío Chabaco Patricio

LOJA- ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

PhD. Chabaco Armijos Riofrío

DIRECTOR DE TESIS

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Lycopodium complanatum* L., realizado por Claudia del Rosario Herrera Sarango, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre de 2013

.....

PhD. Chabaco Armijos Riofrío

CI: 1102430509

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Claudia del Rosario Herrera Sarango declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Lycopodium complanatum* L.”, de la Titulación de Bioquímica Farmacia, siendo PhD. Chabaco Patricio Armijos Riofrío, Director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 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 o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....
Claudia Herrera Sarango

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, razón de mi vida motivo de mi inspiración y fortaleza, quienes con su ternura y cariño determinaron mis constantes sacrificios

A mis hermanos por su apoyo y amistad invaluable en los momentos de alegría y tristeza.

A mis amigos y demás familiares por todo y cada uno de sus consejos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios quien me dio la vida y me ha llenado de bendiciones en todo este tiempo, a mis padres por todo el esfuerzo que hicieron para darme una profesión y hacer de mí una persona de bien, gracias por los sacrificios y la paciencia que demostraron todos estos años, juntos logramos este éxito.

Al PhD. Chabaco Armijos, por sus sabios consejos, por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias por su paciencia y enseñanzas.

A todas aquellas personas que contribuyeron no solo en la realización de este proyecto, si no en el transcurso de mi vida universitaria y a todos los que han influenciado positivamente en mi vida...no quiero olvidar a nadie...por eso cuando lean esto se sentirán identificados, gracias por haber creído en mí en los momentos en que yo había perdido la fe en mí misma.

Claudia Herrera Sarango.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1. Antecedentes	6
1.2. Familia Lycopodiaceae	7
1.2.1. Descripción del género <i>Lycopodium</i>	7
1.2.2. Descripción botánica de la especie <i>L. complanatum</i> L.....	8
1.3. Medicina tradicional y empleo de especies alucinógenas.	9
1.4. Alcaloides	10
1.4.1. Generalidades.	10
1.4.2. Definición.....	10
1.4.3. Detección y caracterización.	10
1.4.4. Extracción de alcaloides.	11
1.4.5. Alcaloides de la familia Lycopodiaceae.....	12
1.5. Flavonoides	12
1.6. Terpenos	14
1.7. Cromatografía.....	15
1.7.1. Cromatografía de capa fina.....	15
1.7.2. Cromatografía en columna.....	16

1.7.3. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.	16
1.8. Resonancia Magnética Nuclear.	17

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de recolección.....	20
2.2. Obtención del extracto hidro-etanólico de <i>L. complanatum</i> L.....	20
2.3. Desclorofilación del extracto.....	21
2.4. Obtención de la fracción total de alcaloides.....	21
2.5. Cromatografía de capa fina.....	23
2.6. Cromatografía en columna.....	23
2.7. Unión y purificación de fracciones.....	23
2.8. Caracterización química de las fracciones.....	24
2.8.1. Punto de Fusión.....	24
2.8.2. Solubilidad.....	24
2.8.3. Factor de retención.....	24
2.9. Identificación de los compuestos aislados.....	24
2.9.1. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.....	24
2.9.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	25

CAPITULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Identificación de los compuestos aislados.....	27
3.1.1. Identificación preliminar de alcaloides.....	27
3.2. Alcaloides obtenidos de <i>L. complanatum</i> L.....	27
3.3. Compuestos aislados de la fracción sin alcaloides de <i>L. complanatum</i> L.	29
3.3.1. Aislamiento de la flavona TRICIN de la fracción sin alcaloides de <i>L. complanatum</i> L.	30
3.3.2. Identificación de la flavona TRICIN de la fracción sin alcaloides de <i>L. complanatum</i> L.	31
3.3.3. Aislamiento del posible triterpeno de la fracción sin alcaloides de <i>L. complanatum</i> L.	32

3.3.4. Identificación del posible triterpeno de la fracción sin alcaloides de <i>L. complanatum</i> L.	32
3.3.5. Características generales de los compuestos aislados en <i>L. complanatum</i> L.	33
CAPITULO IV	
1. CONCLUSIONES	36
2. RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de <i>Lycopodium complanatum</i> L.	8
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides	13
Figura 3. Clasificación de los flavonoides.....	13
Figura 4. Esquema del desarrollo de la investigación.	20
Figura 5. Obtención del extracto hidro-etanólico de <i>L. complanatum</i> L.	21
Figura 6. Esquema de la extracción de la fracción total de alcaloides.....	23
Figura 7. Cromatografía en columna.....	24
Figura 8. Equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus, serial 40-22	25
Figura 9. Esquema de la obtención del alcaloide Licopodina	29
Figura 10. CCF de la flavona TRICIN aislada de <i>L. complanatum</i> L.....	31
Figura 11. Estructura química de la flavona TRICIN	32
Figura 12. CCF del posible triterpeno aislado de <i>L. complanatum</i> L.....	33
Figura 13. Estructura química de los triterpenos tipo serratano.....	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica de la especie <i>Lycopodium complanatum</i> L.	8
Tabla 2. Características de la columna.....	26
Tabla 3. Identificación fitoquímica de alcaloides.....	28
Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción sin alcaloides.....	30
Tabla 5. Características físico-químicas de los compuestos aislados.....	35

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
DCM	Diclorometano
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía de capa fina
UV	Ultravioleta
Pf	Punto de fusión
Rf	Factor de Retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹H RMN	Resonancia Magnética Nuclear Protón
¹³C RMN	Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13
CDCl₃	Cloroformo deuterado
Acetona-d₆	Acetona deuterada
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de Masas

RESUMEN

La Región Sur del Ecuador cuenta con una gran riqueza vegetal y constituye una de las zonas menos estudiadas, que sin embargo ofrece grandes posibilidades para la obtención de nuevos metabolitos que pueden llevar al desarrollo de productos farmacéuticos.

Con el presente trabajo de investigación se pretendió extraer (mediante maceración y extracciones líquido-líquido con diferentes solventes), purificar (empleando técnicas cromatográficas: TLC, CC) e identificar (analizando por técnicas espectroscópicas CG-EM, RMN) metabolitos secundarios de la especie *Lycopodium complanatum* L.

Luego de la maceración se procedió a eliminar las clorofilas, se continuó con una extracción líquido-líquido para obtener la fracción de alcaloides que fue fraccionada por cromatografía en columna aislándose el alcaloide Licopodina.

El extracto sin alcaloides se fraccionó en cromatografía en columna usando solventes de polaridad creciente y de la cual se logró aislar el compuesto 5,7,4'-trihidroxi -3', 5'-dimetoxiflavona conocido como TRICIN y un compuesto de posible naturaleza triterpénica cuya identidad aún no ha sido establecida completamente.

PALABRAS CLAVES: Ecuador, *Lycopodium complanatum* L., Licopodina, flavona TRICIN, triterpenoides.

ABSTRACT

The South Region of Ecuador has vast plant richness and is one of the least surveyed zones. However, it offers a great possibility to obtain new metabolites that may lead to the development of pharmaceuticals.

In this work, we attempted to extract (through maceration and liquid – liquid extractions with different solvents), purify (using chromatographic techniques: TLC, CC) and identify (analyzed by spectroscopic techniques: GC-MS, NMR) secondary metabolites of the specie *Lycopodium complanatum* L.

After maceration, chlorophylls were removed and the process by a liquid-liquid extraction for the total fraction of alkaloids. Alkaloid fraction was fractionated by column chromatography and isolated alkaloid Lycopodine.

The no alkaloidal extract was fractionated on column chromatography using increasingly polar solvent and led to the isolation of compound 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone, known as TRICIN. It was also possible to isolate a compound of triterpenic nature, but it has not been identified yet.

KEY WORDS: Ecuador, *Lycopodium complanatum* L., Lycopodine, TRICIN flavone, triterpenoids.

INTRODUCCIÓN

El reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen sustancias de valor medicinal, en la actualidad un gran número de plantas son estudiadas constantemente respecto a su posible valor farmacológico (Noriega, Venegas, Chávez, & Eustaquio, 2010). A nivel mundial la utilización de plantas con principios activos, constituye la aplicación primaria en el tratamiento de diversas enfermedades (Cos, Maes, Vlietinck, & Pieters, 2008).

Las plantas medicinales se han empleado desde la antigüedad como un recurso para la alimentación y medicina (Lock, 1994), las primeras culturas en su afán de bienestar y prosperidad empezaron a adquirir conocimientos empíricos sobre la utilización de plantas para curar enfermedades (Muñoz, 2008).

En Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes debido, principalmente, a que el conocimiento médico ancestral es inmenso. Se reportan 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales en nuestro país, el 75% de estas especies son nativas y el 5% endémicas, mientras que el 11% son introducidas. Las partes de las plantas más utilizadas son las hojas (30%), la planta entera (10%) y las flores o inflorescencia (6%) (De la Torre, Alarcón, Lars, & Salazar, 2011).

El estudio de los metabolitos secundarios de las plantas nos brinda valiosa información, tanto para la estandarización del uso de plantas en medicina tradicional, como para el descubrimiento de nuevas moléculas con posible actividad terapéutica, para lo cual, la fitoquímica a través de herramientas como: cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía en columna (CC), nos permiten aislar compuestos activos de las plantas.

Hoy en día, Ecuador es considerado uno de los países poseedores de la más alta biodiversidad en el mundo y donde la población mantiene sus costumbres ancestrales en el uso de remedios ancestrales. Loja y Zamora Chinchipe son dos provincias del sur del Ecuador con una biodiversidad abundante y una tradición etnobotánica rica (Tene, Malagón, Vita-Finzi, Vidari, Armijos, & Zaragoza, 2007).

Basados en este contexto el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja está desarrollando un estudio fitoquímico de algunas especies de la familia Lycopodiaceae distribuidas en la región Sur del Ecuador.

Así, la finalidad de proyecto: “Aislamiento e Identificación de Metabolitos Secundarios de la especie *Lycopodium complanatum* L.”, consiste en extraer e identificar compuestos con posible actividad terapéutica que permitan el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

Con el presente estudio se pretende, comprobar la presencia de alcaloides de tipo *Lycopodium*, así como de compuestos triterpenoides del tipo serratano que son comunes en especies de la familia Lycopodiaceae.

Además verificar si la flavona TRICIN aislada de otras especies de Lycopodiaceae de la Región Sur del Ecuador se encuentra en la especie *Lycopodium complanatum* L.

CAPÍTULO I
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Antecedentes

Las culturas Asiáticas han empleado especies de la familia 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 (Wu & Gu, 2006).

Lycopodium serratum Thunb. (syn. *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev., ha sido utilizada en la medicina tradicional China desde hace siglos para el tratamiento de la amnesia, contusión, cefa, hematuria, la esquizofrenia y la hinchazón. Está demostrado que *L. varium* posee actividad insecticida hacia la moscas, y se ha informado que *L. clavatum*, tienen un efecto curativo en las heridas y enfermedades dermatológicas incluyendo fiebre en los bebés y, por tanto, llamado "polvo vientre" (Orhan et al., 2007).

Por otro lado, en Argentina, *Huperzia saururus* (Lycopodiaceae) 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 sauroxina, 6-hidroxicopodina y Licopodina, exhiben una importante actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa (Ortega, Agnese, Barboza, & Cabrera, 2007).

En Perú, especies de la familia Lycopodiaceae se emplean como talismán asociada a la fertilidad de animales domésticos y en especial de cuyes, en el mismo especies de *Huperzia* como *H. brevifolia*, *H. kuesteri* y *H. sellifolia* son comercializadas como parte de objetos y plantas de valor mágico (Navarrete et al., 2006).

Estudios realizados en el Departamento de Química de la UTPL han demostrado la presencia de alcaloides en especies de la familia Lycopodiaceae (Guamán, 2010), además estudios realizados en Italia, Universidad de Pavía se demostró la presencia de alcaloides: Lycodine y Licopodina y el flavonoide 5,7,4'-trihidroxi -3', 5'-dimetoxiflavona en otras especies de la misma familia (Armijos C. , 2012).

Finalmente los sanadores de la Etnia Saraguro, Rikuyhampiyachak (visionarios) han empleado especies de la familia Lycopodiaceae por sus propiedades alucinógenas en rituales y ceremonias de sanación (Andrade, Lucero, Armijos, & Malagón, 2009).

1.2. Familia Lycopodiaceae

Las licopodiáceas son un grupo de plantas vasculares con una larga historia evolutiva, ya que fueron parte de los principales elementos de la flora terrestre primitiva y son el producto de un evento cladogénico temprano en la evolución de las plantas vasculares (Arana & Øllgaard, 2012).

Lycopodiaceae es una familia cosmopolita de 4 géneros (Murillo-Pulido & Murillo-Aldana, 1999). *Lycopodiella* con 40 especies. *Lycopodium* con 40 especies. *Huperzia* con 400 especies de amplia distribución, principalmente en zonas tropicales y subtropicales y *Phylloglossum* con 1 sola especie proveniente de Tasmania, Australia y Nueva Zelanda (Riba & Lira, 1996).

En Ecuador la familia está representada por tres géneros: *Huperzia* con 67 especies, *Lycopodiella* con 8 especies y *Lycopodium* con 5 especies (Jorgensen & León-Yáñez, 1999).

La familia Lycopodiaceae destaca la presencia de alcaloides, diterpenos y triterpenos, flavonas y ácidos fenólicos, algunos de los cuales poseen actividades farmacológicas (Hongmei et al., 2010).

1.2.1. Descripción del género *Lycopodium*

Comúnmente conocido como "licopodios, musgos, pino suelo, la garra del diablo" son plantas que se encuentra en bosques tropicales y subtropicales de todo el mundo. Muchos son utilizadas por tribus para mejorar el efecto memoria, también como analgésico para aliviar dolores reumáticos en las articulaciones y la espalda (Das, Ghosh, Dutta, Nath, & Choudhury, 2011).

Son plantas con tallos principales subterráneos o epígeos, largamente rastreros o erectos, raíces emergiendo directamente de la cara ventral de los tallos principales. Ramas laterales erectas, dorsiventrales, aplanadas en sección transversal, con tres tipos de licofilos dispuestos en cuatro hileras, una dorsal y otra ventral de licofilos angostos hasta casi filiformes, y dos hileras laterales con licofilos más anchos. Esporofilos subpeltados, agrupados en estróbilos pedunculados o sésiles, más cortos que los licofilos del pedúnculo. Esporangios reniformes. Esporas reticuladas en todas las caras (Arana & Øllgaard, 2012).

1.2.2. Descripción botánica de la especie *L. complanatum* L.

Figura 1. Fotografía de *L. complanatum* L.



Elaboración: La autora

Tabla 1. Clasificación botánica de la especie *L. complanatum* L.

Reino	Plantae
Phylum	Lycopodiophyta
Clase	Lycopodiopsida
Orden	Lycopodiales
Familia	Lycopodiaceae
Género	<i>Lycopodium</i>
Especie	<i>Lycopodium complanatum</i> L.

Fuente: (Instituto de Botánica Darwinion, 2013)

1.3. Medicina tradicional y empleo de especies alucinógenas.

La Organización Mundial de la Salud, (2004) define la Medicina Tradicional en los siguientes términos: “prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados en forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar de diagnosticar y prevenir enfermedades”.

Este sistema de medicina se basa en las tradiciones culturales de curación, las cuales han ido pasando de generación en generación, de curador en curador, de familia en familia y a veces de tribu en tribu, influenciados por factores tales como la historia, las actitudes personales y la filosofía. Su práctica varía en gran medida de un país a otro y una región a otra y es compartida con la gente autóctona, colonizadora y migratoria del sector (Gualavisí, 2008).

A diferencia de la biomedicina 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 prácticas distintivas como la herbolaria (Nigenda, Mora, Aldama, & Orozco, 2001).

El uso de plantas alucinógenas ha formado parte de la experiencia humana, influyendo en la formación de los pueblos primitivos como parte importante de los ritos religiosos. La diversidad cultural asociada con el diverso ecosistema andino, expone en la actualidad cantidad y calidad de conocimientos etnobotánicos, entre los cuales se encuentran los conocimientos sobre el empleo de especies estimulantes capaces de alternar la conciencia para explorar el mundo metafísico y comunicarse con los espíritus y dioses que forman parte de la cosmovisión de los pueblos primitivos (Guamán, 2010).

Las plantas psicoactivas han servido para contactar a los dioses, diagnosticar o curar enfermedades, evaluar o resolver problemas, incorporar fuerza física o simplemente para relajar y hasta divertirse. 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 sanguínea*) fueron usadas desde la época pre y post coloniales debido a sus propiedades alucinógenas y narcóticas (Kvist & Morales, 2006).

1.4. Alcaloides

1.4.1. Generalidades.

Uno de los grupos de metabolitos secundarios más diversos 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 sustancias naturales de interés terapéutico (Loyola, Sánchez, Canto, Gutiérrez, Galaz, & Moreno, 2004), estos se han aislado principalmente en plantas superiores, encontrándose en más de 100 familias 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, también en microorganismos (ergot); muchos de ellos empleados en medicina siendo prominentes fármacos hoy en día (Arango, 2008).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

1.4.2. Definición.

No existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como: “Un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación” (Arango, 2008; Bruneton, 2001).

1.4.3. Detección y caracterización.

Las técnicas de reconocimiento son 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 o en el campo (Arango, 2008).

En la práctica, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como: la solución de yodo-yoduro de potasio, reactivo de Wagner; mercurio tetrayoduro de potasio, reactivo de Mayer; tetrayodo bismuto de potasio, reactivo de Dragendorff

(Bruneton, 2001); solución de ácido pícrico, reactivo de Hager; ácido sílico túngtico, reactivo de Bertrand; p-dimetilamino benzaldehído, reactivo de Ehrlich; nitración de alcaloides, reacción de Vitali-Morin (Arango, 2008).

Las reacciones colorimétricas planteadas caracterizan la presencias de alcaloides, pero no verifican la identidad de una droga, no proporcionan tampoco conocimientos sobre la composición de una mezcla, para este fin, se lleva a cabo la cromatografía de capa fina (CCF), usando para el revelado el reactivo de Dragendorff (Bruneton, 2001).

1.4.4. Extracción de alcaloides.

La extracción se basa en el carácter básico de los alcaloides y en el hecho de su existencia en las plantas como sales de ácidos orgánicos o como combinaciones solubles de otras sustancias (Arango, 2008).

En escala de laboratorio la extracción de alcaloides de cualquier planta que los contenga, 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 cromatoplasmas preparativas. Los alcaloides aislados son purificados por recristalización en solventes.

Aunque este proceso es de gran utilidad y eficiencia en un laboratorio de fitoquímica, no es adecuado a escalas industriales por ser demorado, por emplear grandes cantidades de solventes y por necesitar cromatografía en columnas de sílica gel, que es un material de alto costo.

Los procesos industriales para la obtención de alcaloides comprenden la extracción de la droga vegetal se realiza con solventes orgánicos o con soluciones acuosas de ácidos o de sales de reacción ácida. En el primer caso, los alcaloides son extraídos en forma de bases libres. En el segundo caso, en forma de sales (Sharapin, Machado, & Pinzón, 2000).

Es posible extraer los alcaloides a escala industrial por medio de cuatro procesos:

- Extracción con solventes no miscibles con agua.
- Extracción con solventes miscibles con agua.
- Extracción con agua acidulada.
- Extracción con soluciones de sales de reacción ácida.

1.4.5. Alcaloides de la familia Lycopodiaceae.

A nivel científico especies de la familia Lycopodiaceae son motivo de estudio en diferentes países por ser fuentes de alcaloides del tipo Lycopodium, cuya actividad en la cura de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer ha sido comprobada, tal es el caso de la Huperzina A (Armijos, Gilardoni, Malagón, Vita-Finzi, & Vidari, 2012).

Los denominados alcaloides *Lycopodium* representan un gran número de metabolitos secundarios obtenidos a partir de especies pertenecientes a la familia Lycopodiaceae. Desde los impresionantes esqueletos y diversas actividades biológicas interesantes, estos alcaloides siguen siendo motivo de interés y algunos de ellos han sido un desafío para los objetivos de síntesis total biogenética y biológica (Zhang, *et al.* 2013).

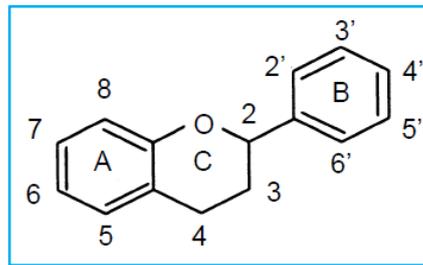
1.5. Flavonoides

Son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Martínez, González, Culebras, & Tuñón, 2002).

Biológicamente, los flavonoides desempeñan un papel importante en la polinización y alimentación de los insectos en las plantas; algunos tienen un sabor amargo que repele a ciertas orugas e impide que se coman las hojas de las especies que los contienen. Por otra parte, el hombre consume cantidades considerables de flavonoides en la dieta vegetal, lo cual se considera beneficioso para la salud humana, dada sus propiedades antioxidantes, protegiendo contra enfermedades vasculares y algunos tipos de cáncer (Formica & Regelson, 1995).

Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 2) (Escamilla, Cuevas, & Guevara, 2009).

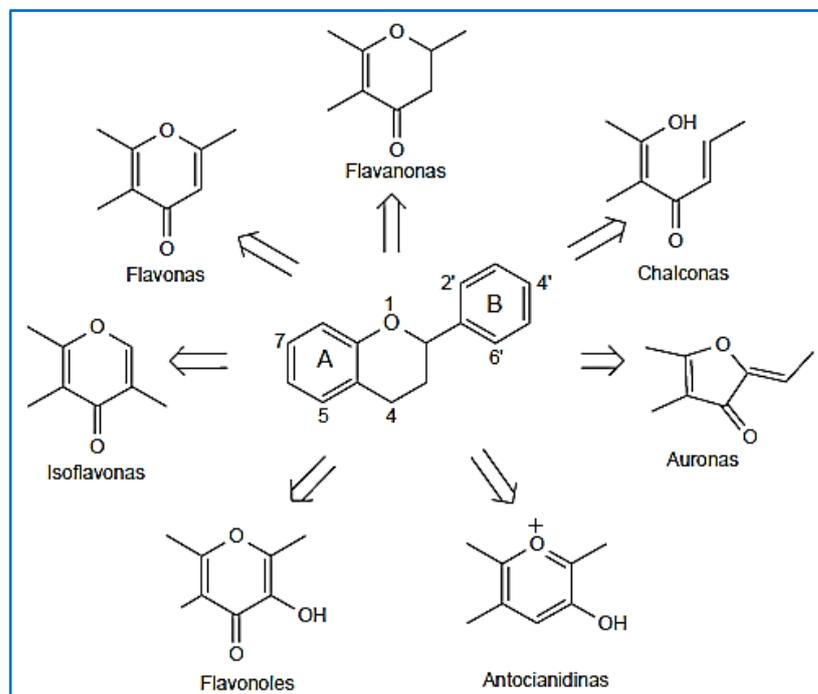
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides



Fuente: (Escamilla, Cuevas, & Guevara, 2009)

Los flavonoides se pueden clasificar en diferentes subgrupos según el nivel de oxidación del anillo central (unidad C3) en: flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, antocianidinas, chalconas y auronas. Los dos últimos subgrupos se separan algo de la estructura general: las chalconas tienen una forma isomérica de cadena abierta y las auronas poseen un heterociclo de cinco miembros, en lugar del de seis como en el resto de los flavonoides. Los diferentes flavonoides se forman por adición, en distintas posiciones de los anillos A y B, de grupos hidroxilo, metoxilo, metilo e isoprenilo (Ruiz, 2002).

Figura 3. Clasificación de los flavonoides.



Fuente: (Ruiz, 2002).

Estudios de laboratorio, investigaciones epidemiológicas y estudios clínicos indican que los flavonoides tienen efectos importantes en la quimio-prevención y quimioterapia

del cáncer. Algunos mecanismos de acción celular se han identificado gracias al estudio de flavonoides, como son por ejemplo la interrupción del ciclo celular, la inducción a la apoptosis y diferenciación, la inhibición de la angiogénesis, el efecto antiproliferativo o la inactivación de la carcinogénesis (Ren, Qiao, Wang, Zhu, & Zhang, 2003).

1.6. Terpenos

Los terpenos, también denominados terpenoides o isoprenoides, son probablemente el grupo más numeroso de productos naturales presentes en las plantas, habiéndose descrito alrededor de veinte mil estructuras. Los terpenos pueden encontrarse en todas las partes de las plantas superiores: semillas, flores, frutos, hojas y raíces. También se encuentran en algas, musgos, líquenes, insectos y microorganismos (Ruiz, 2002).

Los terpenos son compuestos que se biosintetizan a partir de unidades de isopreno de cinco átomos de carbono. Su sistema de clasificación es muy sencillo y se agrupan según el número de átomos de carbono del esqueleto carbonado, siempre múltiplo de cinco. Los más sencillos son los monoterpenos (C₁₀) que se caracterizan por tener dos unidades de isopreno, le siguen los sesquiterpenos (C₁₅) con tres unidades de isopreno, los diterpenos (C₂₀) constituidos por dos unidades de geranilo, los triterpenos (C₃₀) con dos unidades de farnesilo, los carotenoides (C₄₀) con dos unidades de geranilgeranilo y los poliisoprenoides con más de cuarenta átomos de carbono (Ruiz, 2002).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. Muchas plantas (limón, menta, eucalipto o tomillo) producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales, responsables de los olores y sabores característicos de estas plantas, algunos de los cuales actúan como repelentes de insectos o insecticidas (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Triterpenos serratano se han encontrado en diversas plantas como las coníferas (especialmente especies de *Pinus* y *Picea*), licopodios (especies de *Lycopodium*), y más recientemente *Homogyne alpina* y *Nardia scalaris* (Conner, Nagasampagi, & Rowe, 1984).

Las investigaciones de los constituyentes de tipo triterpeno de ciertas especies de *Lycopodium* que crecen en Japón ha dado como resultado el aislamiento de serratanodiol y tohogenol (triterpenos del tipo serratano) (Inubushi, Sano, & Price, 1967).

Estudios fitoquímicos de *Lycopodium clavatum* han demostrado la presencia de triterpenoides de tipo serratano o derivados de la biogenética precursor α -onocerin. (Deng, Ai, Chen, & Yang, 2009).

1.7. Cromatografía

Es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos.

- Retención. Efecto producido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- Desplazamiento. Efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil, recibe el nombre de elución. La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria, mientras que la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. Las dos fases se eligen de forma que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Jhonson & Pasto, 1977).

1.7.1. Cromatografía de capa fina.

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares (Guamán, 2010).

La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil, que asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa esta se saca y se visualiza.

La relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen se conoce como R_f (Jhonson & Pasto, 1977).

1.7.2. Cromatografía en columna.

Es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánicos a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina con una placa porosa que impide su paso y en un estrechamiento con una llave. La mezcla se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria mientras que la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones, los más polares quedan más retenidos y para que salgan generalmente hace falta aumentar la polaridad del disolvente. El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna se llama tiempo de retención.

1.7.3. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.

Técnica combinada que permite la separación e identificación de mezclas complejas, la utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.

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

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma. En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado (Jhonson & Pasto, 1977).

1.8. Resonancia Magnética Nuclear.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear es un fenómeno que se produce cuando los núcleos de ciertos átomos se encuentran inmersos en un campo magnético estático y se expande a un segundo campo magnético oscilante.

Para obtener un espectro de RMN, se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en medio mililitro de disolvente deuterado en un tubo de vidrio largo que se sitúa dentro del campo magnético del aparato. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical, el ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, generando finalmente las respectivas gráficas (James, 1998).

Por lo tanto es una técnica instrumental no destructiva que permite el análisis de compuestos orgánicos y algunos inorgánicos. Por medio de ella se puede deducir la identidad de la gran mayoría de compuestos orgánicos conocidos y desconocidos. Tan sólo se necesitan unos cuantos miligramos de sustancia para realizar un análisis.

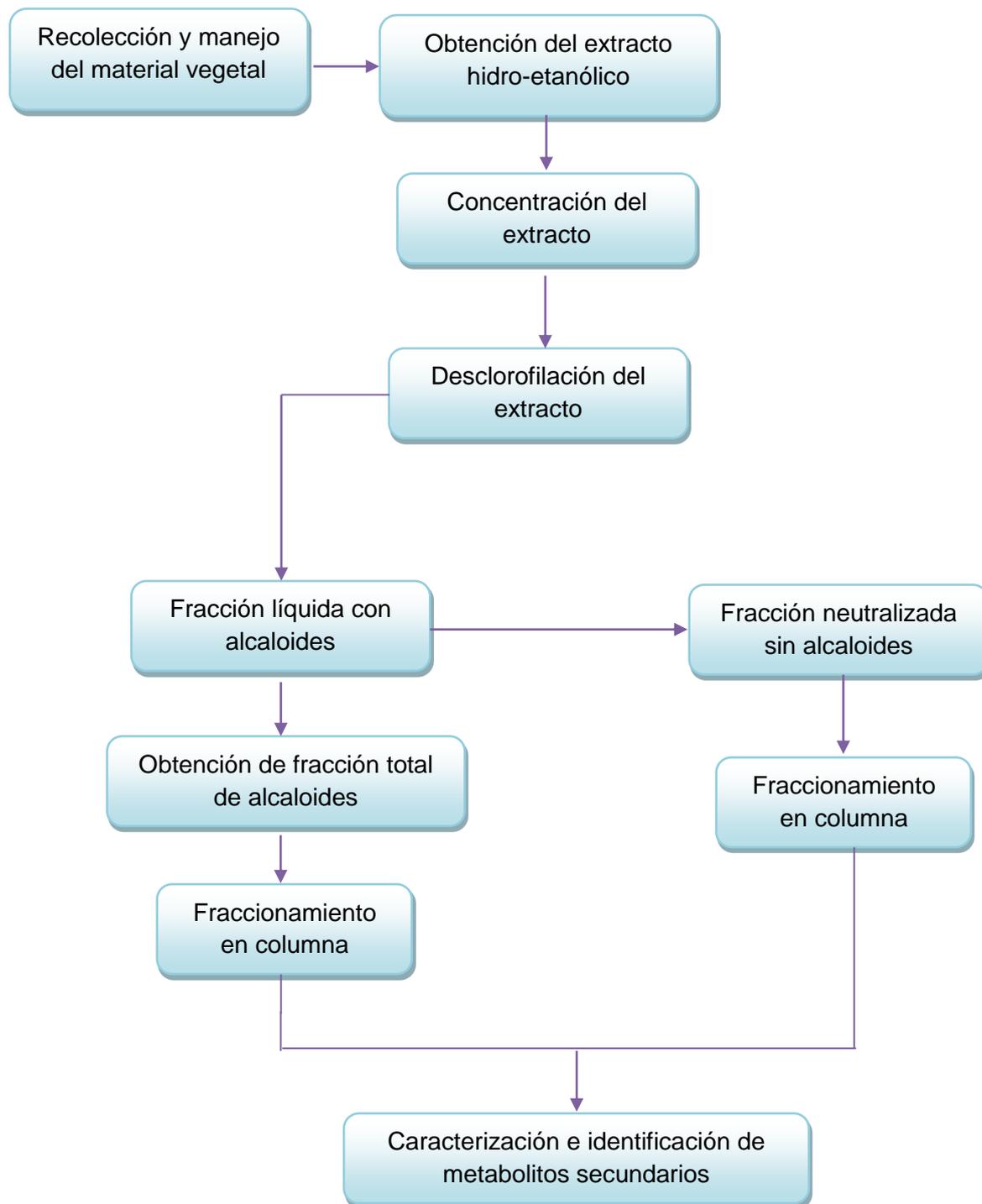
Por su versatilidad y la riqueza de la información que produce, es la técnica más usada en la identificación de nuevos compuestos orgánicos. El rango de posibles aplicaciones de la resonancia magnética nuclear es demasiado amplio para incluir una lista completa, pero algunas son:

- Verificación del grado de pureza de materias primas.
- Análisis de drogas y fármacos.
- Desarrollo de productos químicos.
- Control de calidad de productos químicos.
- Investigación de reacciones químicas.
- Identificación de sustancias desconocidas.
- Análisis de polímeros

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo la presente investigación se procedió a realizar la siguiente metodología:

Figura 4: Esquema del desarrollo de la investigación.



Elaboración: La autora.

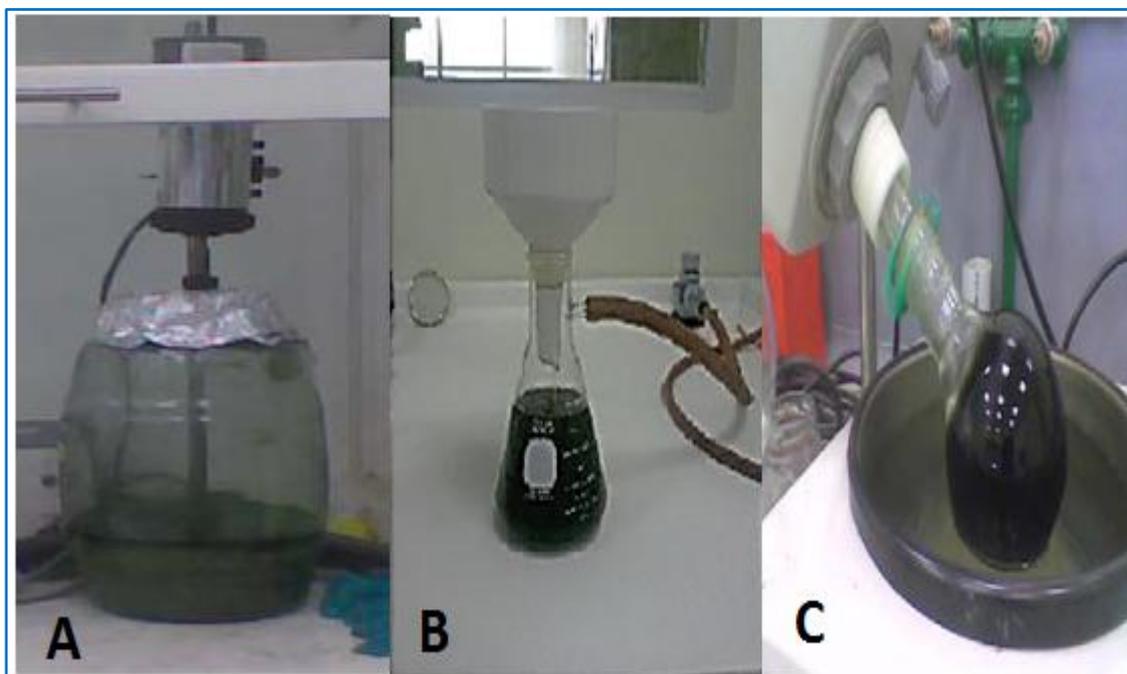
2.1. Área de recolección

La recolección de la muestra de la especie vegetal *Lycopodium complanatum* L., se realizó en la Provincia de Loja, en la comunidad de Saraguro con coordenadas geográficas 17697649E - 9590439N y una altitud de 3219 m s.n.m. La identificación taxonómica fue realizada por Bolívar Merino curador oficial del Herbario-Loja de la Universidad Nacional de Loja (UNL). Un ejemplar de la muestra fue depositado en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con el código voucher Ly-001-08.

2.2. Obtención del extracto hidro-etanólico de *L. complanatum* L.

El material vegetal se secó por 3 días a 34°C, se pesó 200 g y se procedió a triturar. La obtención del extracto se realizó por maceración dinámica a temperatura ambiente por 5 horas, utilizando como solvente de extracción etanol: agua (9:1 v/v), luego se separó el residuo vegetal y el líquido extractivo empleando filtración al vacío. Se procedió a la concentración del extracto empleando un equipo rota- evaporador a temperatura moderada de 30-35°C, hasta obtener un extracto seco.

Figura 5. Obtención del extracto **A)** Maceración **B)** Filtración **C)** Rota evaporación



Elaboración: La autora.

2.3. Desclorofilación del extracto

El extracto libre de solvente pesó 23,6 gramos y fue sometido a una eliminación de clorofilas mediante una columna SPE Discovery-18 60 ml de 10 gramos, utilizando como eluyente una mezcla de MeOH:H₂O en proporción 7:3 (v/v), de este modo se obtuvo el extracto desclorofilado, mientras que el extracto con clorofilas fue recogido con acetona al 100%.

2.4. Obtención de la fracción total de alcaloides

Durante la maceración dinámica y al extracto libre de clorofilas con el objetivo de detectar la presencia de alcaloides se les realizó las pruebas generales de Dragendorff, Mayer y Warner (Anexo 1).

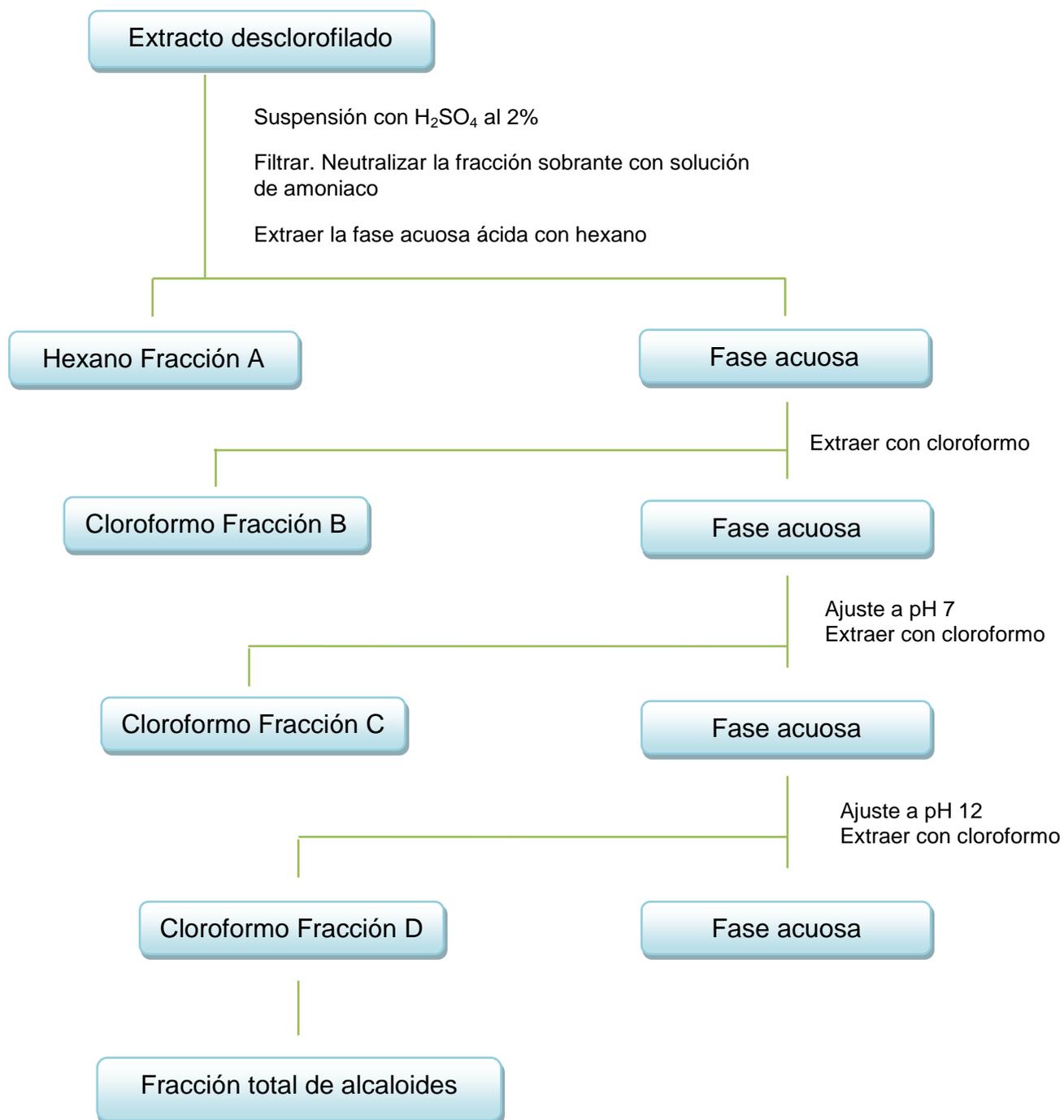
Confirmada la presencia de alcaloides y para obtener la fracción total se siguió el procedimiento de separación líquido-líquido, en el cual se acidificó el extracto desclorofilado con H₂SO₄ al 2%, se realizó una filtración para separar la fracción que fue lavada repetidamente hasta que las pruebas de Dragendorff, Mayer y Warner fueron negativas, al final la fracción fue neutralizada con solución de amoníaco y secada.

La fase acuosa ácida que contiene la fracción alcaloidea fue extraída de la siguiente manera:

- Extracción con Hexano (triplicado) a pH ácido, Fracción A.
- Extracción con CHCl₃ (triplicado) a pH ácido, Fracción B.
- Extracción con CHCl₃ (triplicado), Fracción C.
- Extracción con CHCl₃ (triplicado), Fracción D.

El proceso general de la obtención de la fracción total de alcaloides se resume en el esquema a continuación.

Figura 6: Esquema de la extracción de la fracción total de alcaloides



Elaboración: La autora.

Las fracciones se evaporaron y en el caso de la fracción D que resultó positiva a Dragendorff, Mayer y Warner se procedió a fraccionar.

2.5. Cromatografía de capa fina

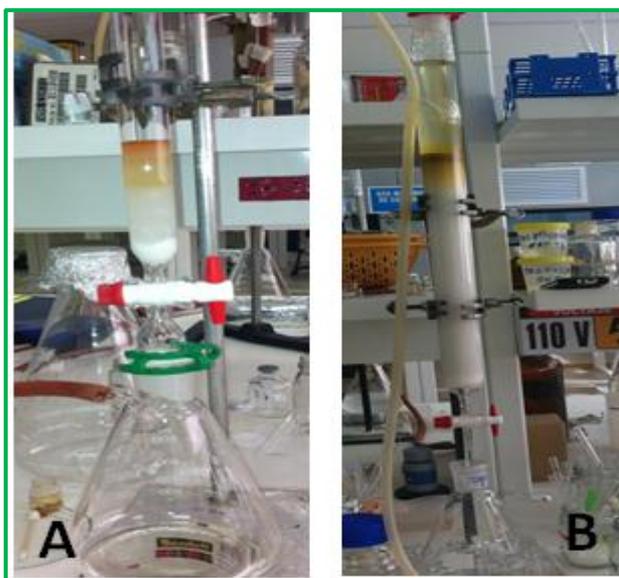
La fracción total de alcaloides y la fracción sin alcaloides fueron sometidas a cromatografía de capa fina. Esto se llevó a cabo en placas de aluminio cubiertas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck y la visualización se realizó con luz UV 254 y 360 nm.

2.6. Cromatografía en columna

Para el montaje de la columna de la fracción total de alcaloides (fracción D) se usó una relación muestra-sílica gel 1:100 (Figura 7a), para el fraccionamiento se utilizaron las siguientes polaridades: DCM:AcOEt:MeOH, en proporciones 8:1.5:0.5, 8:1:1, 8:1:1+5 gotas de ácido fórmico, tomando un volumen de 50 ml por cada fracción.

Para la preparación de la columna de la fracción sin alcaloides se usó una relación muestra-sílica gel 1:100 (Figura 7b), para el fraccionamiento se utilizaron los disolventes hexano, acetato de etilo y metanol en polaridad creciente; tomando un volumen de 100 ml por cada fracción.

Figura 7. Cromatografía en columna **A)** Fracción de alcaloides **B)** Fracción sin alcaloides



Elaboración: La autora.

2.7. Unión y purificación de fracciones

Para la unión de fracciones se relacionó la altura de las manchas características de cada fracción y la similitud visual que estas reflejaron ante la luz ultravioleta a una longitud de 254 y 365 nm; además esto se corroboró con el agente revelador ácido sulfúrico al 5% y vainillina (Anexo 2).

2.8. Caracterización química de las fracciones

Esta caracterización se realizó en las fracciones que cristalizaron. Se determinó el punto de fusión (Pf), factor de retención (Rf) y solubilidad.

2.8.1. Punto de Fusión.

La determinación del punto de fusión de los compuestos se realizó tomando una muestra sólida de la fracción y utilizando el equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus, serial 40-22 de 50-60 Hz (Figura 8).

Figura 8. Equipo Fisher-Johns-Melting Point Apparatus, serial 40-22



Elaboración: La autora

2.8.2. Solubilidad.

Los disolventes empleados para determinar la solubilidad de los compuestos fueron: hexano, acetato de etilo, metanol, diclorometano, acetona, DMSO.

2.8.3. Factor de retención.

El Rf del compuesto químico se calculó de acuerdo a la fórmula y considerando la gráfica del anexo 3.

2.9. Identificación de los compuestos aislados

2.9.1. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.

La identificación de los compuestos aislados de la especie *L. complanatum* L., por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM) se hizo mediante un cromatógrafo de gases Agilent, las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil –metilpolisiloxano).

En la tabla 2 se detallan las características de las columnas capilares que se usaron para las inyecciones cromatográficas.

Tabla 2. Características de la columna

Características de la columna capilar					
Fracción	Columna	Temperatura °C	Película (μm)	Diámetro (mm)	Longitud (m)
LC 3	DB-5MS	350	0,25	0,25	30

Fuente: Fielquimec

2.9.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los espectros de NMR fueron obtenidos en un equipo Varian N° de serie 21953 operando a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , usando acetona- d_6 y CDCl_3 a 25°C.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Identificación de los compuestos aislados

3.1.1. Identificación preliminar de alcaloides.

Los resultados obtenidos en la identificación preliminar de alcaloides del extracto hidro-etanólico con clorofilas y sin clorofilas usando reactivos de precipitación se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Identificación fitoquímica de alcaloides.

Extracto	Ensayo	Metabolitos	<i>L. complanatum</i> L.
Hidro-etanólico con clorofila	Dragendorff		-
	Mayer	Alcaloides	+
	Warner		+
Hidro-etanólico sin clorofila	Dragendorff		+
	Mayer	Alcaloides	+
	Warner		+

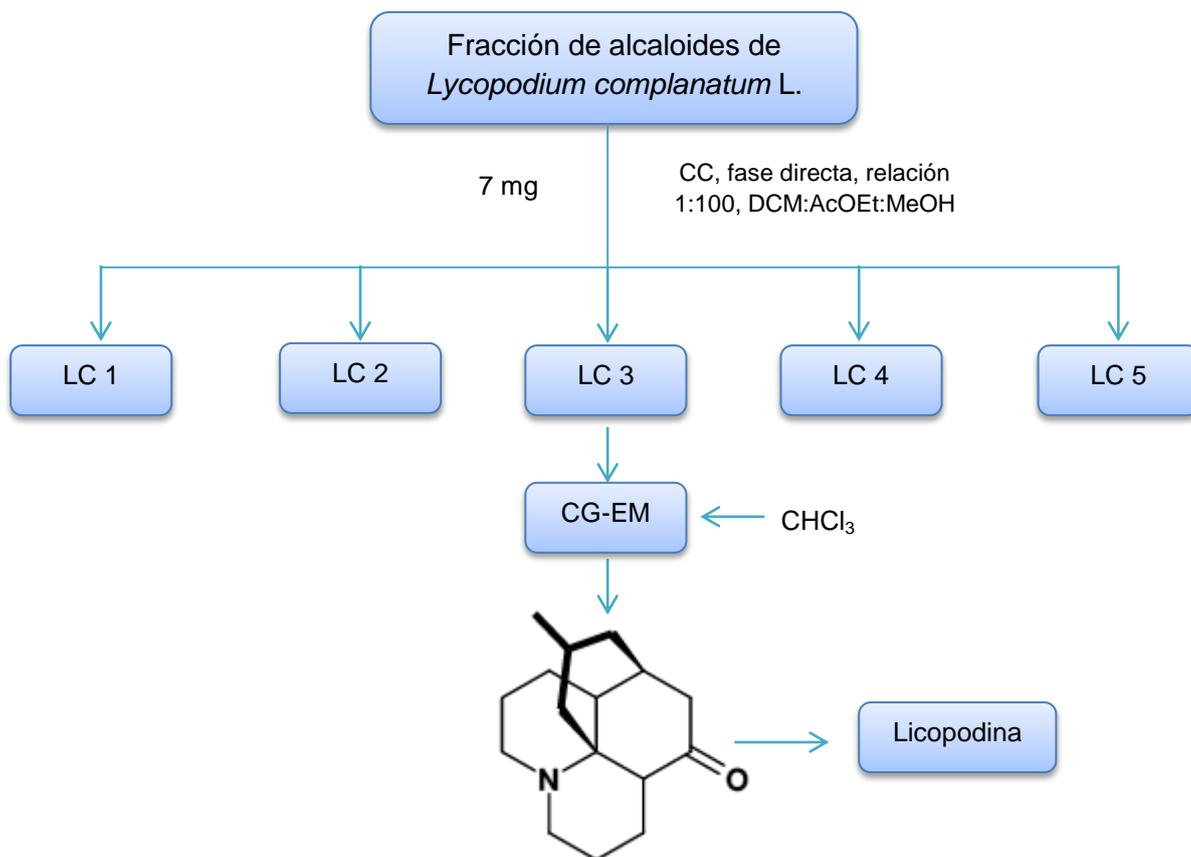
(+) Presencia; (-) Ausencia

Elaboración: La autora

3.2. Alcaloides obtenidos de *L. complanatum* L.

A partir de la cromatografía en columna se obtuvieron 11 fracciones denominadas LC 1 hasta LC 11 (Figura 9). Todas las fracciones eluidas fueron analizadas por cromatografía de capa fina, usando placas de sílica gel 60F₂₅₄ (fase directa) y reveladas con solución de Dragendorff.

Figura 9. Esquema de la obtención del alcaloide Licopodina



Elaboración: La autora

La fracción LC3 fue disuelta en cloroformo y analizada mediante cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.

El espectro de masas presentó un pico de ion molecular a 247 m/z, compatible con la fórmula molecular C₁₆H₂₅NO que corresponde al nombre de Licopodina. Los datos espectrales se compararon con los de Gerard R., (1985) (Anexo 4).

La primera investigación sobre alcaloides *Lycopodium* se remonta a 1881, siendo Licopodina el primer alcaloide *Lycopodium* identificado (Hiroshi & Choo, 2006). Orhan et al. (2007) analizó el contenido de la fracción de alcaloides de *Lycopodium clavatum*, por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) e identificó a Licopodina como el principal alcaloide. Ayer et al. (1968) estudió la fracción total de alcaloides de *Lycopodium alopecuroides* L. encontrando siete alcaloides. Estos incluyen: Licopodina, Licodolina, clavolonina alopecurina, debenzoylalopecurina, alopecuridina y anhydrolicodolina. Bödeker, separó Licopodina, a partir de *Lycopodium complanatum* en 1938 (Hiroshi & Choo, 2006). Orhan et al. (2009) identifica el alcaloide Licopodina mediante CG-MS en la especie *L. complanatum* colectada en

Turquía, lo cual corrobora los resultados obtenidos en la presente investigación, pues dicho alcaloide es común encontrarlo en especies de la familia Lycopodiaceae.

Con respecto a la actividad biológica, Mandal et al. (2010) señalan que Licopodina inhibe considerablemente el crecimiento de las células HeLa lo que indica su potencial uso en la quimioterapia. Bishayee et al. (2013), sugiere que Licopodina, es un prometedor candidato para el uso terapéutico como un fármaco anticáncer.

Así mismo, Ortega et al. (2007) han demostrado que los alcaloides sauroxina, 6-hidroxicopodina y Licopodina, exhiben una importante actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa.

3.3. Compuestos aislados de la fracción sin alcaloides de *L. complanatum* L.

De la cromatografía en columna se obtuvieron 146 fracciones. Todas las fracciones eluidas fueron analizadas por cromatografía de capa fina, usando placas de sílica gel 60F254 (fase directa).

En la Tabla 4 se exponen los disolventes empleados y las proporciones a las cuales las fracciones fueron eluidas así como también la apariencia que presentaron.

Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción sin alcaloides

Fracciones	Proporción	Mezclas de disolventes	Apariencia
1 – 2	100	Hex	Aceitosa
3-5	90:10	Hex- AcOEt	Aceitosa
6 -8	80:20	Hex- AcOEt	Sólida
9 -12	70:30	Hex- AcOEt	Sólida
13 -16	60:40	Hex- AcOEt	Sólida
17 – 20	50:50	Hex- AcOEt	Sólida
21 – 24	40:60	Hex- AcOEt	Sólida
25 – 28	30:70	Hex- AcOEt	Sólida
29 – 32	20:80	Hex- AcOEt	Sólida
33- 37	10:90	Hex- AcOEt	Sólida
38 – 41	100	AcOEt	Cristales
42-51	100	AcOEt	Sólida
52-61	100	AcOEt	Sólida
62-69	90-10	AcOEt – MeOH	Sólida
70-73	80-20	AcOEt – MeOH	Cristales
74-77	80-20	AcOEt – MeOH	Sólida
78-85	70-30	AcOEt – MeOH	Sólida
86-93	60-40	AcOEt – MeOH	Sólida

94-101	50-50	AcOEt – MeOH	Sólida
102-109	40-60	AcOEt – MeOH	Sólida
110-117	30-70	AcOEt – MeOH	Sólida
118-125	20-80	AcOEt – MeOH	Sólida
126-133	10-90	AcOEt – MeOH	Sólida
134- 146	100	MeOH	Sólida

Elaboración: La autora

Como se puede observar en la Tabla 3 las fracciones de la 38-41 y 70-73 presentaron la formación de cristales luego de evaporarse el disolvente, por ello se decidió realizar en los mismos las pruebas respectivas para facilitar la identificación molecular del compuesto. El análisis de estas fracciones se indica a continuación:

3.3.1. Aislamiento de la flavona TRICIN de la fracción sin alcaloides de *L. complanatum* L.

Este compuesto se obtuvo en las fracciones 38-41 eluidas con acetato de etilo (100%). El precipitado tuvo la apariencia de cristales amarillo, luego de ser lavado sucesivamente con metanol y agregar unas gotas de acetona, se obtuvieron 11 mg, su punto de fusión fue de 287-289 °C, el compuesto fue soluble en DMSO y acetona e insoluble en hexano, acetato, diclorometano y metanol. Su cromatografía de capa fina corrida con Hex: AcOEt en proporción 1:1, dio una mancha amarilla al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina, con un Rf de 0,30 (Figura 10).

Figura 10. CCF de la flavona TRICIN aislada de *L. complanatum* L.



Elaboración: La autora

3.3.2. Identificación de la flavona TRICIN de la fracción sin alcaloides de *L. complanatum* L.

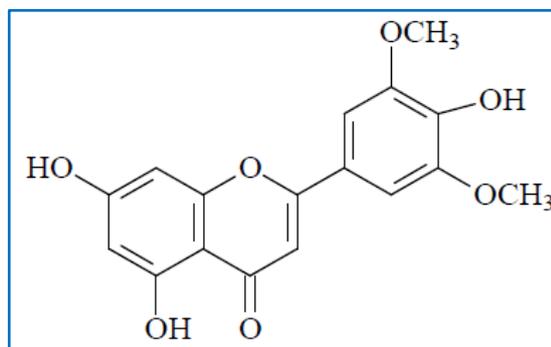
Mediante el análisis de RMN de ^1H y ^{13}C (Anexo 5). Los datos espectrales se muestran a continuación:

^1H - RMN: (400 MHz, acetona- d_6): δ ppm 12.99 (s, 1H), 7.37 (s, 2H), 6.73 (s, 1H), 6.55 (d, 1H), 6.25 (d, 1H), 3.96 (s, 6H).

^{13}C - NMR: (100 MHz, acetona- d_6): δ ppm 183.1 (C-4), 165.0 (C-2 y C-7), 163.3 (C-9), 158.7 (C-5), 149.1 (C-3' y C-5'), 140.9 (C-4'), 122.3 (C-1'), 105.2 (C-2' y C-6'), 104.6 (C-3 y C-10), 99.7 (C-6), 94.8 (C-8), 56.9 (OCH $_3$ x2).

En comparación con los datos espectrales de publicaciones anteriores (Jiao, Zhang, Liu, Liu, Wu, & Zhang, 2007) (Kuwabara, Mouri, Otsuka, Kasai, & Yamasaki, 2006) y la muestra analizada en el presente estudio, el producto final se identificó como 5,7,4'-trihidroxi -3', 5'-dimetoxiflavona (figura 11) más conocido como TRICIN.

Figura 11. Estructura química de la flavona TRICIN



Fuente: (Jiao et al., 2007)

TRICIN es un compuesto de origen natural que pertenece a la clase de flavonas. Este compuesto se ha detectado principalmente en hojas y tallos, y raíces rara vez (Zhou & Ibrahim, 2010).

Estudios anteriores señalan a TRICIN como agente farmacológicamente activo en la prevención del cáncer. Hudson et al. (2000) demostraron que el flavonoide TRICIN interfirió de forma potente en el crecimiento in vitro de células malignas humanas MDA-MB-468 cáncer de mama. Otro estudio informa de que los altos niveles de TRICIN encontrados en el tracto gastrointestinal después de la ingesta alimentaria, evita la carcinogénesis colorrectal (Cai, Al-Fayez, Tunstall, Platton, Steward, & Gescher, 2005). Además, la literatura describe entre otras actividades atribuidas a

TRICIN, antiviral (Yazawa et al., 2010) y antioxidante (Duarte-Almeida, Negri, Salatino, de Carvalho, & Lajolo, 2007)

3.3.3. Aislamiento del posible triterpeno de la fracción sin alcaloides de *L. complanatum* L.

El compuesto se obtuvo en las fracciones 70-73 eluidas con AcOEt:MeOH (80:20 v/v). El precipitado tuvo la apariencia de cristales blanquecinos, luego de ser lavado sucesivamente con hexano y agregar unas gotas de acetato, se obtuvieron 7 mg, soluble en cloroformo y acetato e insoluble con hexano y metanol. Su cromatografía de capa fina corrida con AcOEt: MeOH en proporción 1:1, dio una mancha color violeta al ser revelada con ácido sulfúrico y vainillina y un Rf de 0,81 (Figura 12).

Figura 12. CCF del posible triterpeno aislado de *L. complanatum* L.



Elaboración: La autora

3.3.4. Identificación del posible triterpeno de la fracción sin alcaloides de *L. complanatum* L.

Los datos espectrales de compuesto aislado comparados con los de la literatura se muestran a continuación:

Triterpenoide del tipo serratano reportado por Fang et al. (1991):

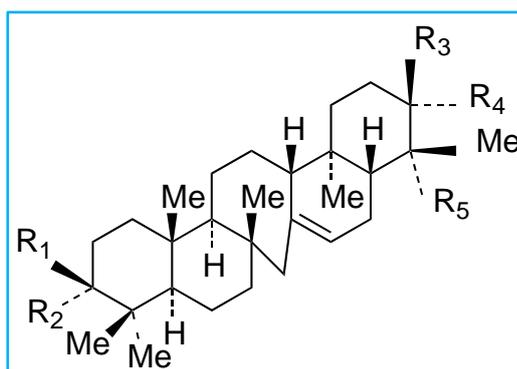
¹³C- NMR: (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 38.5, 22.3, 88.5, 38.2, 56.3, 18.8, 45.2, 38.9, 57.0, 36.0, 25.3, 27.2, 62.9, 138.3, 121.9, 24.1, 49.6, 37.1, 36.7, 23.8, 81.1, 37.7, 15.7, 19.8, 28.1, 16.2, 56.0, 13.4, 27.5, 15.7, 57.5, 21.3, 17.0

Compuesto aislado de *L. complanatum* L.

¹³C- NMR: (100 MHz, CDCl₃): δ ppm 13.571, 14.268, 14.779, 15.948, 16.715, 18.921, 19.959, 21.485, 22.840, 23.978, 24.202, 24.876, 25.387, 27.377, 27.703, 27.803, 28.237, 29.220, 29.391, 29.514, 29.592, 29.739, 29.793, 29.809, 29.847, 32.078, 33.657, 36.267, 37.258, 38.040, 38.412, 39.016, 45.133, 49.624, 55.943, 56.113, 57.298, 62.819, 79.336, 80.985, 122.336, 138.287, 171.204.

Las señales resaltadas con azul coinciden con las de la literatura consultada. Se debe indicar que a pesar de los intentos realizados no se pudo elucidar completamente la molécula, sin embargo las señales características encontradas nos permiten inferir que posiblemente se trata de un compuesto de naturaleza triterpenoide con una estructura química que corresponde a los triterpenoides del tipo serratano (Figura 13) que han sido aislados e identificados en varias especies de la familia Lycopodiaceae.

Figura 13. Estructura química de los triterpenos tipo serratano



Fuente: (Fang, Tsai, & Cheng, 1991)

En la especie *Lycopodium complanatum* L., colectada en Nueva Guinea se ha identificado los triterpenoides serratanodiol y tohogenol, aislados como sus diacetatos mediante cromatografía en columna (Inubushi, Sano, & Price, 1967), lo cual corrobora de manera indirecta la presencia de triterpenos en la especie en estudio.

Los estudios farmacológicos han demostrado que los triterpenoides de tipo serratano tienen acción farmacológica, incluyendo la actividad quimiopreventivo del cáncer y efectos inhibitorios contra *Candida albicans* (Deng, Ai, Chen, & Yang, 2009).

3.3.5. Características generales de los compuestos aislados en *L. complanatum* L.

A continuación se resume las características y valores obtenidos de los compuestos:

Tabla 5. Características físico-químicas de los compuestos aislados.

<i>Lycopodium complanatum</i> L.			
	LC3	Fracción 38-41	Fracción 70-73
Peso	1.1 mg	11 mg	7 mg
Porción de solventes	8:1:1 DCM:AcOEt:MeOH	100 % acetato	80:20 AcOEt:MeOH
Apariencia física	Sólido	Cristales amarillos	Cristales blanquecinos
Factor de retención	-	0,30	0,81
Punto de fusión	112-114 °C	287-289 °C	230-232 °C
RMN	-	Flavona	Posible terpeno
Nombre	Licopodina	5,7,4'-trihidroxi -3', 5'- dimetoxiflavona	Por confirmar

Elaboración: La autora

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. CONCLUSIONES

- La separación cromatográfica del extracto desclorofilado de *L. complanatum* L., condujo al aislamiento e identificación del alcaloide Licopodina mediante cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM).
- Por resonancia magnética nuclear se identificó 5,7,4'trihidroxi-3',5'dimethoxiflavona (TRICIN), compuesto aislado e identificado en otras especies de la familia Lycopodiaceae de la región Sur del Ecuador y a la cual se le atribuyen algunas propiedades farmacológicas.
- La estructura química probable del compuesto de la fracción 70-73 es comparable con la estructura de triterpenos del tipo serratano comunes en la familia Lycopodiaceae.

2. RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de *Lycopodium complanatum* L., realizando el aislamiento e identificación de las demás fracciones que no cristalizaron con el fin de contribuir al estudio de la planta.
- Elucidar la estructura del compuesto de la fracción 70-73 en base a los datos espectrales obtenidos.
- Realizar otras pruebas a los compuestos identificados, con el fin de determinar sus propiedades.
- Realizar trabajos de investigación similares con otras especies del género en la búsqueda de nuevos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, J., Lucero, H., Armijos, C., & Malagón, O. (2009). *Plantas medicinales silvestres, empleadas por la etnia Saraguro en la Parroquia San Lucas*. Loja: Editorial Universitaria UTPL.
- Arana, M., & Øllgaard, B. (2012). Revisión de las Lycopodiaceae (Embryopsida, Lycopodiidae) de Argentina y Uruguay. *Darwiniana.*, 50(2), 266-295.
- Arango, G. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Obtenido de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf>
- Armijos, C. (2012). "Ethnobotany, Ecology and Identification of Secondary Metabolites of Species Psicoactive Family Lycopodiaceae use from Saraguros in the South Region of Ecuador". *Tesis Doctoral*.
- Armijos, C., Gilardoni, G., Malagón, O., Vita-Finzi, P., & Vidari, G. (2012). Estudio químico de las especies del género *Huperzia* usadas por los Saraguros, Ecuador. *Recuperado de <http://www.silae.it/docs>*.
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo Secundario de plantas. *Reduca*, 2(3), 119-145.
- Ayer, B., Valverde-López, S., Douglas, R., & Weisbach, J. (1968). The Alkaloids of *Lycopodium alopecuroides* L. . *Canadian Journal of Chemistry.*, 128-132.
- Bishayee, K., Chakraborty, D., Ghosh, S., Boujedaini, N., & Khuda-Bukhsh, A. (2013). Lycopodine triggers apoptosis by modulating 5-lipoxygenase, and depolarizing mitochondrial membrane potential in androgen sensitive and refractory prostate cancer cells without modulating p53 activity: Signaling cascade and drug–DNA interaction. *European Journal of Pharmacology*, 110-121.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales*. Editorial ACRIBIA.
- Cai, H., Al-Fayez, M., Tunstall, R., Platton, S., Steward, W., & Gescher, A. (2005). The rice bran constituent triclinicin potently inhibits cyclooxygenase enzymes and interferes with intestinal carcinogenesis in Apc Min mice. *Mol Cancer Ther.*, (4), 1287–1292.
- Conner, A., Nagasampagi, B., & Rowe, J. (1984). New serratane triterpenes from western white pine bark. *Tetrahedron.*, (21), 4217-4226.
- Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A., & Pieters, L. (2008). Plant-Derived Leading Compounds for Chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection – An Update (1998 – 2007). *Plant Med*, 64(2), 97-109.
- Das, A., Ghosh, R., Dutta, M., Nath, D., & Choudhury, S. (2011). A Review on Pteridophyte Antioxidants and their Potential Role in Discovery of New Drugs. *Assam University Journal of Science & Technology :Biological and Environmental Sciences.* (7), 151-155.

- De la Torre, L., Alarcón, D., Lars, P., & Salazar, J. (2011). *Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas*. Obtenido de Herbario QCA & Herbario AAU. Quito: <http://www.biologia.puce.edu.ec/natura.php?c=350>
- Deng, T.-Z., Ai, Y., Chen, Y., & Yang, G.-Z. (2009). Triterpenoid from *Lycopodium obscurum* L. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44 (8), 891-894.
- Duarte-Almeida, J., Negri, G., Salatino, A., de Carvalho, J., & Lajolo, F. (2007). Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. *Phytochemistry*, (68), 1165–1171.
- Escamilla, C., Cuevas, E., & Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med*, 2(52), 73-76.
- Fang, J., Tsai, W., & Cheng, Y. (1991). Serratene triterpenes from *Pinus armandii* bark. *Phytochemistry*, 4(30), 1333-1336.
- Formica, J., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 1061-1080.
- Gerald, R. (1985). GC/MS examination of *Lycopodium* extracts for alkaloid content. *Tesis doctoral*.
- Gualavisí, L. (2008). Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el concentrado mensual de la Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del Ministerio de Salud Pública. *Tesis de grado*.
- Guamán, A. (2010). "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*.
- Hertog, M., Hollman, P., & Putte, B. (1996). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem*, 1242-1246.
- Hiroshi, M., & Choo, C. (2006). Potential anticholinesterase agent for the treatment of Alzheimer's disease - lycopodium alkaloids. *Universiti Teknologi MARA.*, <http://eprints.uitm.edu.my/7827/>.
- Hongmei, L., Ying, L., Chao, S., Qiong, W., Jingyuan, S., Yongzhen, S., et al. (2010). Comparison of 454-ESTs from *Huperzia serratane* reveals putative genes involved in *lycopodium* alkaloid biosynt. *BMC Plant Biol.*, 10, 209.
- Hudson, E., Dinh, P., Kokubun, T., Simmonds, M., & Gescher, A. (2000). Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, (9), 1163–11.
- Inubushi, Y., Sano, T., & Price, J. (1967). Triterpene constituents of *Lycopodium complanatum* L from New Guinea. *Aust. J. Chem.*, (20), 387-388.

- James, T. (1998). *Fundamentals of NMR*. Obtenido de Department of Pharmaceutical Chemistry University of California San Francisco, CA: http://qudev.ethz.ch/content/courses/phys4/studentpresentations/nmr/James_Fundamentals_of_NMR.pdf
- Jhonson, C., & Pasto, D. (1977). *Determinación de estructuras orgánicas*. España: Editorial Reverté, s.a.
- Jiao, J., Zhang, Y., Liu, C., Liu, J., Wu, X., & Zhang, Y. (2007). Separation and Purification of Tricin from an Antioxidant Product Derived from Bamboo Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 10086-10092.
- Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. USA: Missouri Botanical Garden Press.*
- Kuwabara, H., Mouri, K., Otsuka, H., Kasai, R., & Yamasaki, K. (2006). Tricin from a Malagasy Connaraceous plant with potent antihistaminic activity. *J. Nat. Prod.*, 66, 1273–1275.
- Kvist, L., & Morales, M. (2006). *Plantas psicoactivas*. Obtenido de Publicaciones Beisa: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2019.pdf>
- Lock, O. (1994). *Investigación Fitoquímica: Métodos en el Estudio de Productos Naturales*. Lima, Perú: Fondo Editorial PUCP.
- Loyola, V., Sánchez, P., Canto, B., Gutiérrez, L., Galaz, R., & Moreno, O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Redalyc*, 1(48), 67.
- Mandal, S., Biswas, R., Bhattacharyya, S., Dutta, S., Pathak, S., & Khuda-Bukhsh, A. (2010). Lycopodine From *Lycopodium clavatum* Extract Inhibits Proliferation Of HeLa Cells Through Induction Of Apoptosis Via Caspase-3 Activation. *Eur J Pharmacol.*, 626(2-3), 115-122.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 17(6), 271-278.
- Muñoz, D. (2008). Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Actividad fungicida e insecticida de la especie *Piper eridopon* (Piperaceae). (*Tesis inédita de maestría*). Universidad Nacional de Colombia: Bogota.
- Murillo-Pulido, M., & Murillo-Aldana, J. (1999). Pteridofitos de Colombia I. Composición y distribución de las Lycopodiaceae. *Rev Acad. Colomb. Cienc.*, 23(86), 19-83.
- Navarrete, H., León, B., Gonzales, J., Áviles, D., Salazar, J., Mellado, F., et al. (2006). *Helechos*. Obtenido de Publicaciones Beisa: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2024.pdf>
- Nigenda, G., Mora, G., Aldama, S., & Orozco, E. (2001). La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. *Redalyc*, 1(43), 41-51.

- Noriega, S., Venegas, E., Chávez, M., & Eustaquio, C. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV - Scientia*, 2(2), 11-22.
- OMS. (2004). *Estrategias del nuevo milenio para la Medicina Tradicional y Medicina Complementaria y Alternativa*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/index.html>
- Orhan, I., Oezcelik, B., Aslan, S., Kartal, M., Karaoglu, T., Sener, B., *et al.* (2007). Antioxidant and antimicrobial actions of the clubmoss *Lycopodium clavatum* L. *Phytochem Rev.*, (6), 189-196.
- Orhan, I., Ozcelik, B., Aslan, S., Kartal, M., Karaoglu, T., Sener, B., *et al.* (2009). In vitro biological activity screening of *Lycopodium complanatum* L. ssp. *chamaecyparissus* (A. Br.) Doll. *Nat Prod Res.*, 23(6), 514-526.
- Ortega, M., Agnese, A., Barboza, G., & Cabrera, J. (2007). Seasonal study of the alkaloid pattern of *Huperzia saururus* with habitat in Córdoba Province (Argentina). *J. Argent. Chem. Soc.*, 95(1-2), 1-9.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev.*, 23(4), 519-534.
- Riba, R., & Lira, R. (1996). *Flora del Valle de Tehucán - Cuicatlán*. Obtenido de <http://www.ibiologia.unam.mx/BIBLIO68/fulltext/fasiculosfloras/fas10.pdf>
- Ruiz, G. (2002). *Productos Naturales*. Pamplona: 76-78.
- Sharapin, N., Machado, L., & Pinzón, R. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: CAB.
- Tene, V., Malagón, O., Vita-Finzi, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. 63-81.
- Wu, Q., & Gu, Y. (2006). Quantification of huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS. *J Pharm Biomed Anal*, 40(4), 993-998.
- Yazawa, K., Kurokawa, M., Obuchi, M., Li, Y., Yamada, R., Sadanari, H., *et al.* (2010). Antiinfluenza Virus Activity by Tricin, Isolated from *Sasa Albomarginata* in Japan. *Antiviral Resear ch*, (86), 49.
- Zhang, X.-Y., Dong, L.-B., Liu, F., Wu, X., He, J., Peng, L.-Y., *et al.* (2013). New Lycopodium alkaloids from *Lycopodium obscurum*. *Nat. Prod. Bioprospect.*, (3), 52-55.
- Zhou, J., & Ibrahim, R. (2010). Tricin a potential multifunctional nutraceutical. *Rev Phytochem.*, (9), 413-424.

ANEXOS

ANEXO 1.

Preparación de Reactivos Generales para la detección de alcaloides: Dragendorff, Mayer y Wagner.

Se usaron reactivos generales para detectar alcaloides como: la solución de yoduro de potasio (Reactivo de **Wagner**), mercurio tetrayoduro de potasio (reactivo de **Mayer**), tetrayodo bismuto de potasio (reactivo de **Dragendorff**).

Preparación de reactivos:

El reactivo de **Dragendorff**: Comprende dos soluciones: Solución **a**: 0.85 g de subnitrito de bismuto disueltos en una mezcla de 10 ml de ácido acético y 40 ml de agua. Solución **b**: 8 g de yoduro de potasio disueltos en 20 ml de agua. Se mezclan 5 ml de solución **a** con 5 ml de solución **b** y 20 ml de ácido acético para luego completar a 100 ml con agua. La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona esta reactivo a una solución de alcaloides.

Reactivo de **Mayer**: se prepara disolviendo 1.3 g de bicloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio y se afora a 100 ml. Los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema.

Reactivo de **Wagner**: disolver 1,27 g de yodo y 2 gotas de yoduro de potasio en 20 ml de agua, aforar la solución en un matraz de 100 ml. Los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema.

ANEXO 2.

Preparación del revelador

Ácido Sulfúrico y Vainillina: Se emplea como revelador en los cromatogramas de aceites esenciales y la mayor parte de compuestos orgánicos.

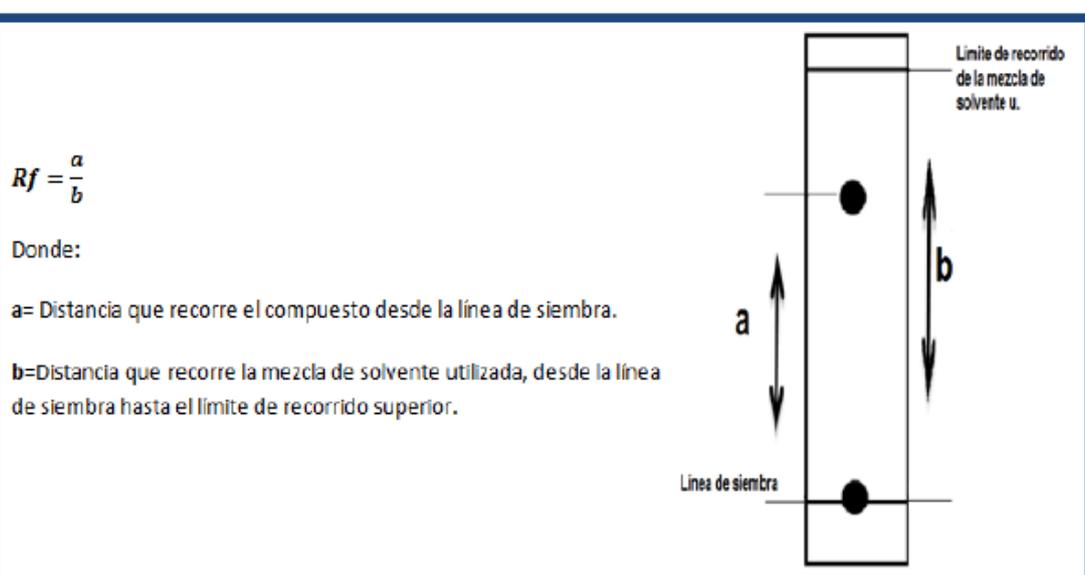
Reactivo	Composición
Ácido sulfúrico	250ml Etanol
	12,5ml ácido sulfúrico
Procedimiento:	
• Se aforan los 12,5 ml de ácido sulfúrico con los 250ml de etanol	

Reactivo	Composición
Vainillina	250ml Etanol
	2,5g de vainillina
Procedimiento:	
• Se aforan los 2,5g de vainillina con los 250ml de etanol	

ANEXO 3.

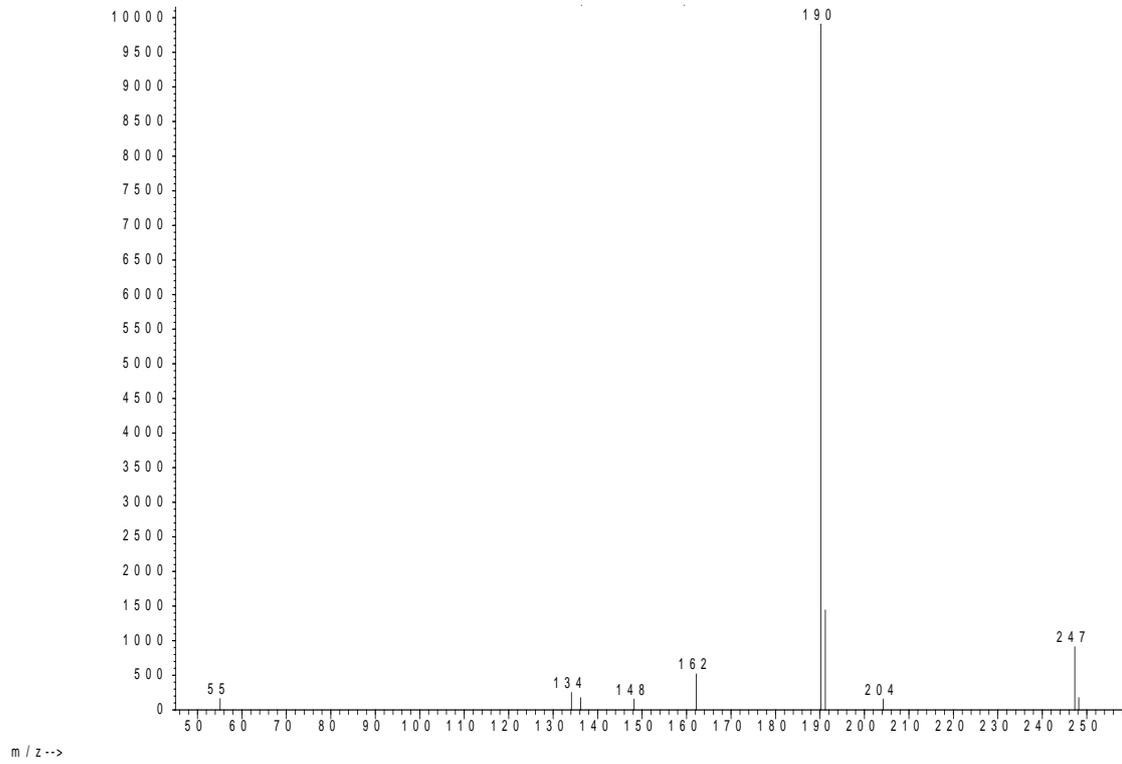
Cálculo del factor de retención en la placa sílica gel marca Merck 60 F₂₅₄

$$R_f = \frac{\text{Distancia desde el origen hasta el compuesto}}{\text{Distancia desde el origen frente del solvente}}$$

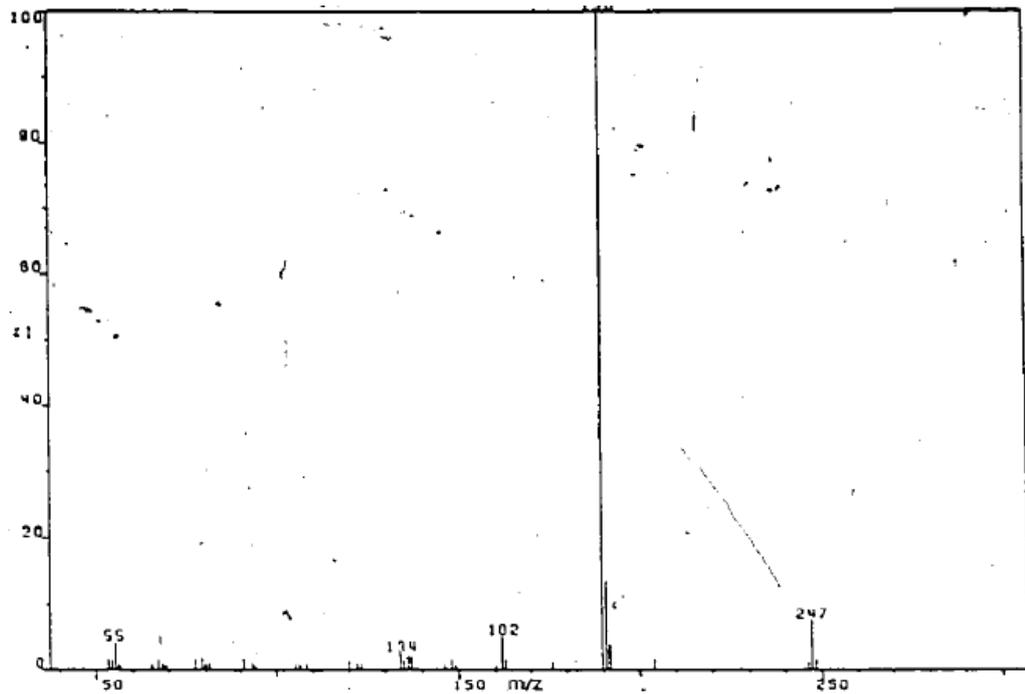


ANEXO 4

Espectro de masas de Licopodina en la fracción analizada (Anex. 4a) comparado con el de la literatura (Anex. 4b)



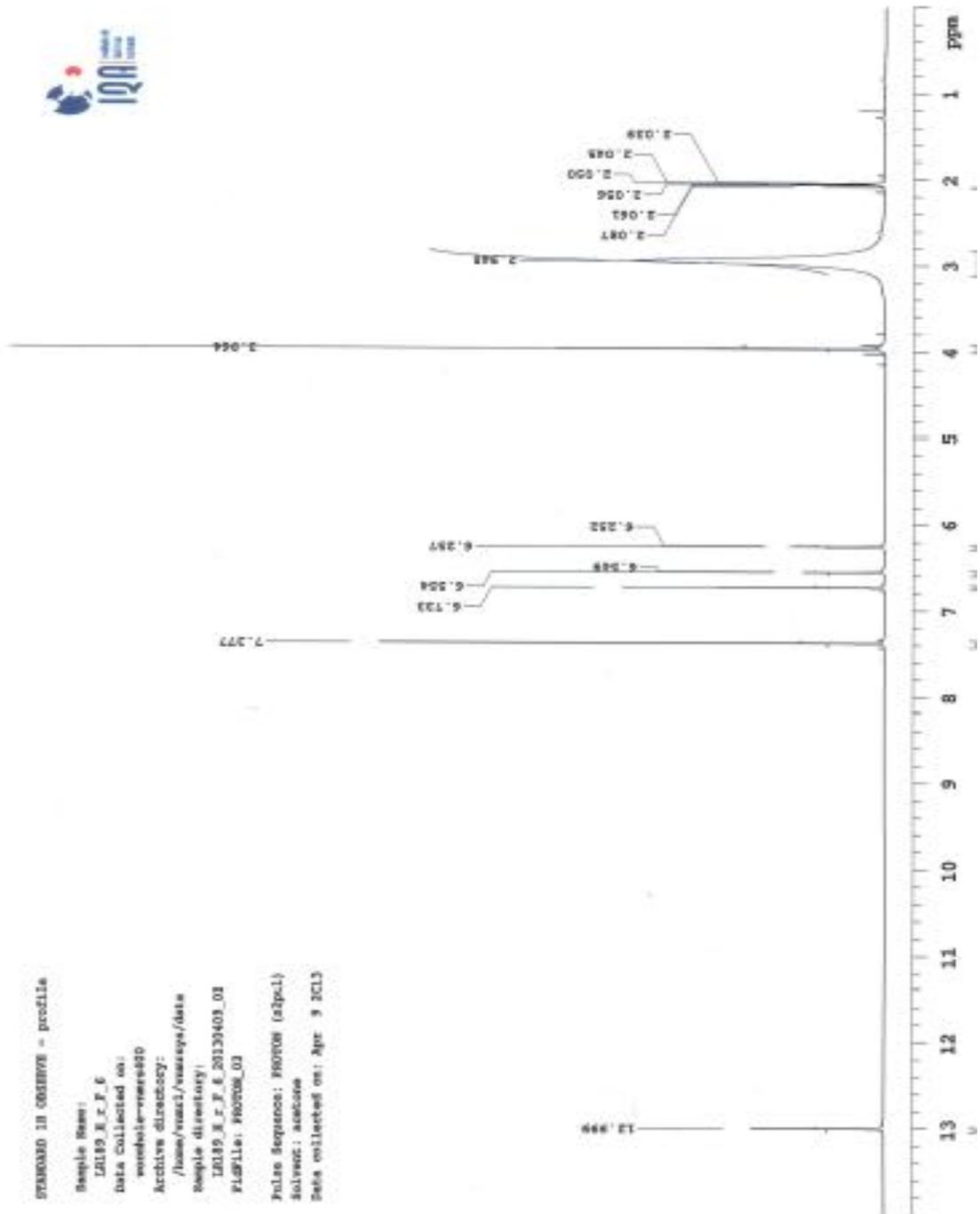
A



B

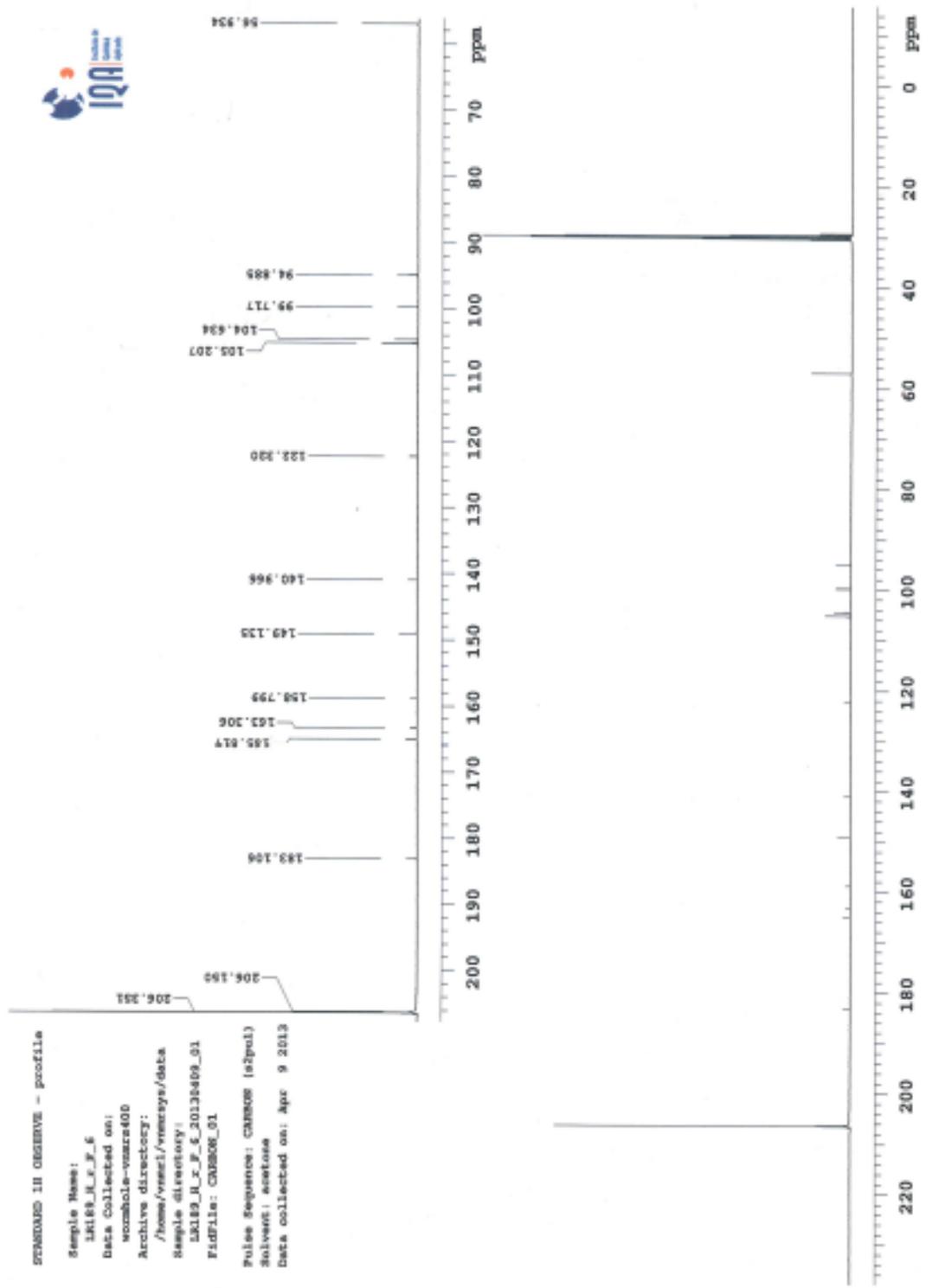
ANEXO 5

Espectros de ^1H y ^{13}C MNR de la flavona TRICIN



STANDARD IN OBSERVE - profile

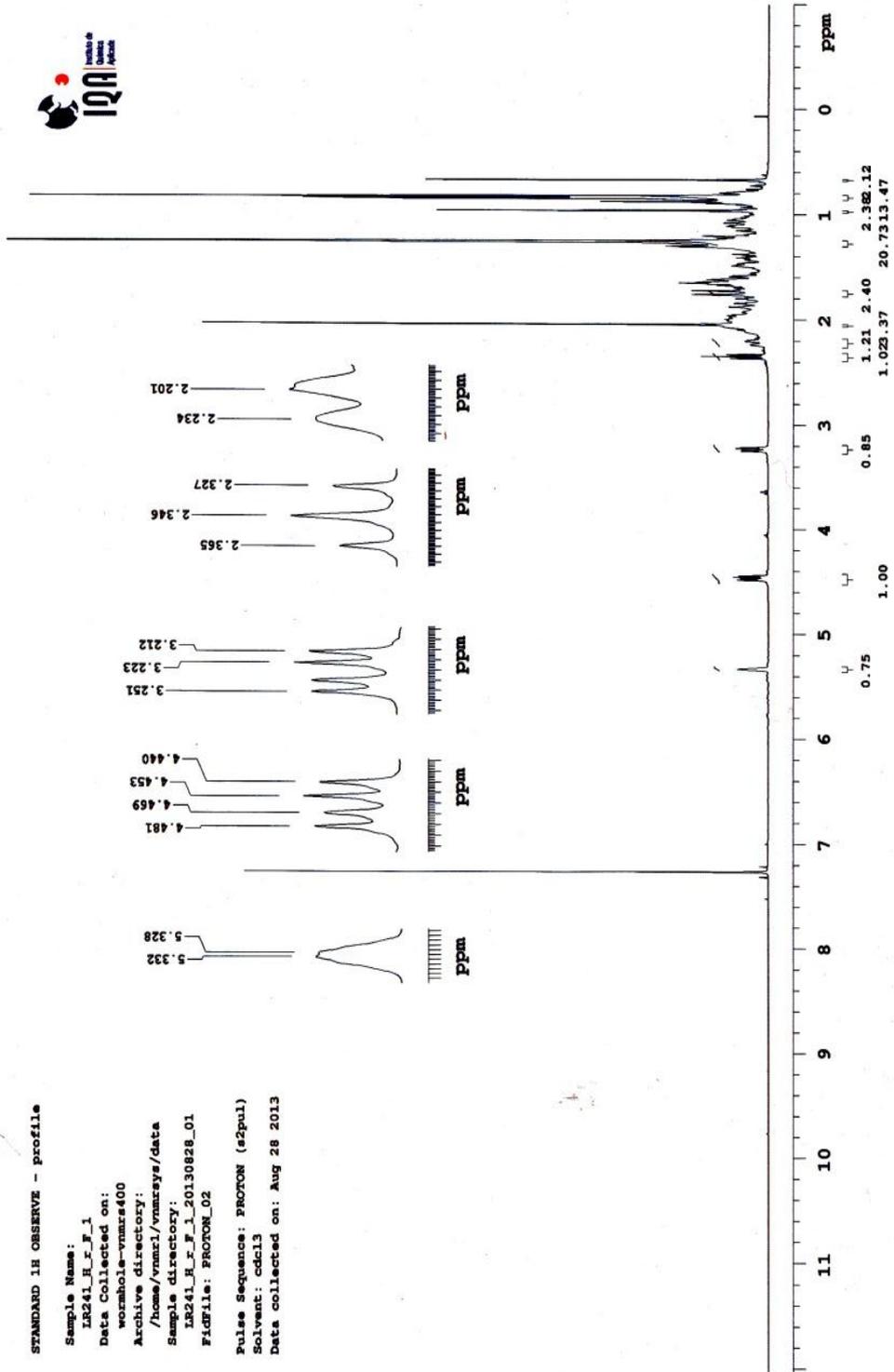
Sample Name:
LX189_R_X_F_5
Data Collected on:
wormhole-vmsra400
Archive directory:
/home/vmsra1/vmsra400/data
Sample directory:
LX189_R_X_F_5_20130409_01
FidFile: CARRBOR_01
Pulse Sequence: CARRBOR (s2pol)
Solvent: acetone
Data collected on: Apr 9 2013



ANEXO 6

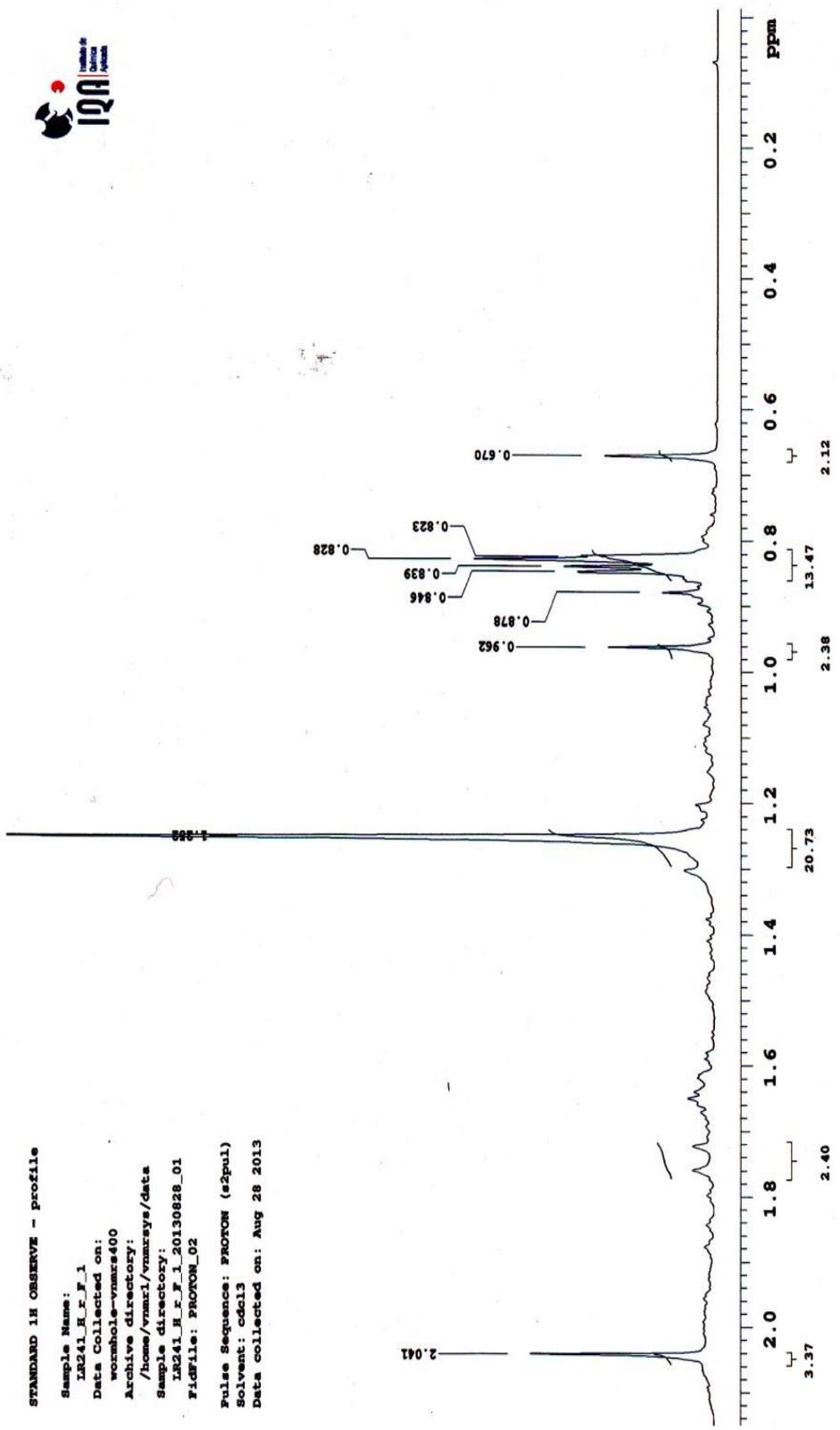
Espectros de ^1H y ^{13}C MNR del posible triterpenoide

STANDARD 1H OBSERVE - profile
 Sample Name:
 LR241_R_F_1
 Data Collected on:
 wczmhols-vmrz400
 Archive directory:
 /home/vmrz1/vmrzsys/data
 Sample directory:
 LR241_R_F_1_20130828_01
 F16File: PROTON_02
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: cdc13
 Data collected on: Aug 28 2013

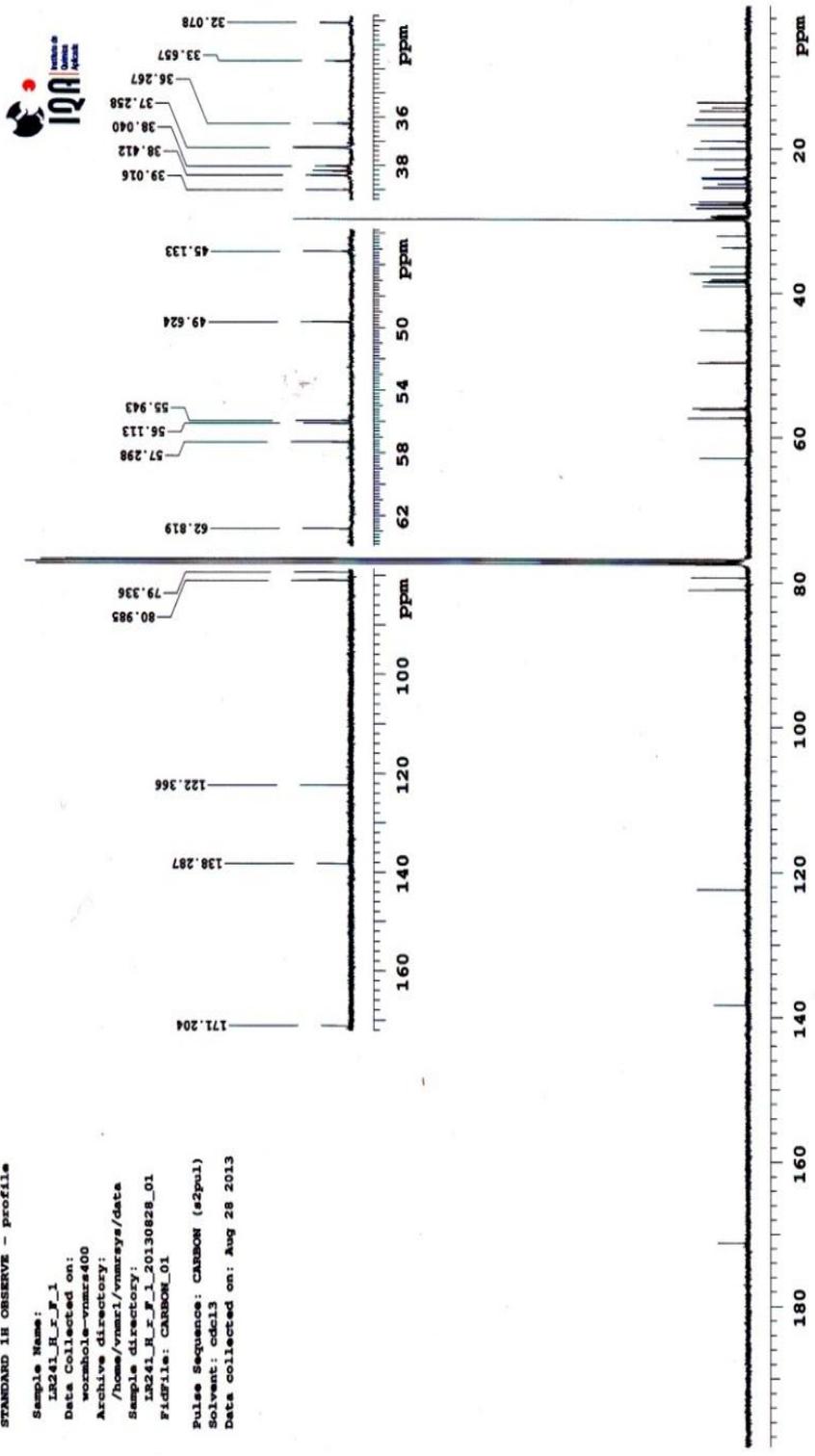




STANDARD 1H OBSERVE - profile
Sample Name: LR241_R_F_1
Data Collected on: workhole-vmars400
Archive directory: /home/vmari/vmarsys/data
Sample directory: LR241_R_F_1_20130828_01
Ficfile: PROTON_02
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Aug 28 2013



STANDARD 1H OBSERVE - profile
 Sample Name: LR241_R_F_1
 Data Collected on: wczmhle-vnmr400
 Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data
 Sample directory: LR241_R_F_1_20130828_01
 FIDFile: CARBOM_01
 Pulse Sequence: CARBOM (s2pul)
 Solvent: cdc13
 Data collected on: Aug 28 2013





STANDARD IR OBSERVE - profile

Sample Name:
IR241_R.F.F.1
Data Collected on:
scorchole-vmax400
Archive directory:
/home/vmax1/vmaxrays/data
Sample directory:
IR241_R.F.F.1_20130828_01
File: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Aug 28 2013

