

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ALCALOIDES DEL GÉNERO

Zephyranthes sp.

ANDREA ESCOBAR FUERTES

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ALCALOIDES DEL GÉNERO

Zephyranthes sp.

ANDREA ESCOBAR FUERTES

**PROYECTO DE TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO
DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**ASESOR: GUILLERMO MONTOYA Ph.D
CO-ASESOR: MARCELA SANTAELLA Ph.D**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO DE TABLAS	5
CONTENIDO DE FIGURAS.....	6
1. RESUMEN DEL PROYECTO.....	7
2. INTRODUCCIÓN	8
3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	10
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	<i>10</i>
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	11
➤ <i>IMPORTANCIA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LAS PLANTAS: REVISIÓN TEÓRICA SOBRE LOS ALCALOIDES</i>	<i>11</i>
➤ <i>DESCRIPCIÓN GENERAL SOBRE LA FAMILIA Amaryllidacea, LOS ALCALOIDES Y SU BIOSÍNTESIS.</i>	<i>13</i>
➤ <i>ASPECTOS FUNDAMENTALES SOBRE LA BIBLIOTECA ESPECTRAL Amaryllidaceae.</i>	<i>20</i>
5. OBJETIVOS.....	24
5.1 OBJETIVO GENERAL	24
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
6. METODOLOGÍA.....	25
6.1 MATERIALES.....	25
6.2 MÉTODOS.....	25
6.2.1 <i>Preparación del Material vegetal.....</i>	<i>25</i>
6.2.2 <i>Extracción de la fracción total de alcaloides.....</i>	<i>27</i>
6.2.3 <i>Preparación de la muestra para la creación de la biblioteca de espectros</i>	<i>28</i>
6.2.4 <i>Análisis de las muestras en el UPLC</i>	<i>28</i>
6.2.5 <i>Creación de la biblioteca espectral UV.....</i>	<i>30</i>
6.2.6 <i>Comparación entre los alcaloides de las diferentes procedencias.....</i>	<i>30</i>

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	31
7.1 Determinación del órgano de la planta a utilizar y evaluación del método de extracción.....	31
7.2 Creación de la biblioteca espectral UV.....	32
7.3 Análisis de los datos obtenidos en la biblioteca espectral de Amaryllidaceae.....	36
7.4. Mejoras realizadas al método de separación de los alcaloides.....	46
7.5 Comparación entre los alcaloides de las diferentes procedencias	48
8. CONCLUSIONES	57
9. RECOMENDACIONES	58
10. REFERENCIAS	59
11. ANEXOS	62
Anexo 1. Procedimiento la Extracción de la Fracción total de Alcaloides....	62
Anexo 2. Tabla de los datos de referencia	63
Anexo 3. Resultados de las muestras analizadas.	63

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de muestras de plantas por origen según su ubicación	26
Tabla 2. Condiciones cromatográficas empleadas para la separación de los alcaloides. (Deepali Katoch, 2012).....	29
Tabla 3. Datos de tiempos de retención y máximos de absorción UV de los alcaloides identificados en <i>Z. grandiflora</i> . (Deepali Katoch, 2012).....	29
Tabla 4. Resultados de la muestra Alk-1-27, con valores de pureza de pico y ajuste de la biblioteca que indican que el analito corresponde al Alcaloide identificado.....	34
Tabla 5. Datos de la biblioteca creada a partir de las fracciones purificadas, en orden de menor a mayor según el tiempo de retención.	36
Tabla 6. Datos de los máximos de absorción y tiempos de retención de los alcaloides incluidos en la biblioteca.....	37
Tabla 7. Datos de referencia para los máximos de absorción y tiempos de retención extraídos del artículo de referencia. (Deepali Katoch, 2012).....	37
Tabla 8. Comparación entre los tiempos de retención y máximos de absorción de la biblioteca con los datos reportados en el artículo “Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from <i>Zephyranthes grandiflora</i> by UPLC. <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i> , 1-6”.....	38
Tabla 9. Alcaloides identificados en la muestra IA-020, con los respectivos ángulos de pureza y similitud entre los Alcaloides de la biblioteca.	41
Tabla 10. Alcaloides identificados en la muestra IA-036, con los respectivos ángulos de pureza y similitud entre los Alcaloides de la biblioteca.	42
Tabla 11. Alcaloides identificados en la muestra IA-071, con los respectivos ángulos de pureza y similitud entre los Alcaloides de la biblioteca.	44
Tabla 12. Comparación entre los alcaloides encontrados en los 5 orígenes de las muestras.....	49
Tabla 13. Componentes principales encontrados en los 5 orígenes del género <i>Zephyranthes</i> en comparación con los compuestos de referencia encontrados en el artículo: “ <i>Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from Zephyranthes grandiflora</i> by UPLC. <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i> , 1-6”.....	50
Tabla 14. Resultados obtenidos de la muestra IA-035.	53
Tabla 15. Resultados obtenidos de la muestra IA-045.	54
Tabla 16. Resultados obtenidos de la muestra IA-113.	55

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de alcaloides encontrados en la familia <i>Amaryllidaceae</i> (Bastida Jaume, 2011)	14
Figura 2. Biosíntesis de norbeladina y 4'-O-metilnorbeladina a partir de los precursores tiramina y 3,4 dihidroxibenzaldehído (Cedrón, 2010).	15
Figura 3. Acoplamientos oxidativos sobre el precursor 4'-O-metilnorbeladina (Osorio, 2004-2006)	16
Figura 4. Representación de la formación de las estructuras como licorina, crinina y galantamina (Cedrón, 2010).	17
Figura 5. Biosíntesis de tazetina a partir de hemantamina (Cedrón, 2010).	18
Figura 6. Comparación de espectros de absorción UV/Vis de dos compuestos (Waters Corporation, 2005).	21
Figura 7. Vectores de espectros para Compuesto A y B (Waters Corporation, 2005).	21
Figura 8. Ángulo de umbral. (Antwerp, 2003)	22
Figura 9. Representación de las propiedades de alcaloides (Acosta, 2008)	27
Figura 10. Cromatografía planar del extracto de hojas IA-025. Sistema de revelado: Dragendorff. Fase móvil: Metanol: Acetato de etilo (90:10).	31
Figura 11. Cromatografía planar del extracto de hojas IA-027. Sistema de revelado: Dragendorff. Fase móvil: Metanol: Acetato de etilo (90:10).	32
Figura 12. Espectros de absorción (a) y cromatograma (b) obtenidos de la muestra Alk-1-27, del cual se identificaron los Alcaloides 1, 3, 4, 14, y 15.	33
Figura 13. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-020, en la cual se identificaron los Alcaloide 26, 2, 30, 12, 18, 9, 19, 14 y 15. .	40
Figura 14. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-036, en la cual se identificaron los Alcaloides 27, 11, 23, 24, 28.	42
Figura 15. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-071, del cual se identificaron los Alcaloides 5, 27, 11, 24, 25, 13, 14 y 15.	43
Figura 16. Cromatograma obtenido para la muestra IA-026. Se identificaron los alcaloides 26, 11, 3, 24, 28, 10, 20, 14 y 15, donde la mayoría se encuentran en la region de 2 a 3 min.	45
Figura 19. Comparación entre las muestras 23, 36, 37, 71 y 100 de los orígenes orígenes 1, 3, 4, 6 y 7 respectivamente. Se identificaron en común los Alcaloides 26, 27, 11, 24, 30 y 33 de a) desde 0.50 min a 4.00 min y los alcaloides 14 y 15 en b) desde 4.00 min a 9.00 min. (A 11: Alcaloide 11 y así mismo para los demas alcaloides)	52
Figura 20. Cromatograma y espectros de absorcion obtenidos en la muestra IA-035.	53
Figura 21. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-045.	54
Figura 22. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-113.	55

1. RESUMEN DEL PROYECTO

Con este proyecto de investigación se pretende contribuir al conocimiento químico en el género *Zephyranthes*, un grupo de plantas que pertenece a la familia *Amaryllidaceae* encontradas en algunas regiones de Colombia, al establecer un perfil de metabolitos secundarios conformado principalmente por un conjunto de alcaloides estructuralmente relacionados de los cuales no se tenía información reportada.

Para el desarrollo de este proyecto, se analizaron 28 muestras provenientes de Cali, Tuluá, Popayán, Ibagué y Barranquilla, a las cuales se les realizó una caracterización cualitativa mediante la técnica cromatográfica UPLC acoplada a un detector PDA, para la separación e identificación de estos marcadores quimiotaconómicos.

Por medio de este análisis químico se logró la creación de la primera biblioteca de espectros UV de la familia *Amaryllidaceae* mediante la cual se pudo establecer un perfil de alcaloides y los componentes principales encontrados entre los diferentes orígenes de los cuales proviene el material vegetal. La biblioteca se encuentra constituida por 34 alcaloides donde la mayoría de estas moléculas son comunes entre todas las muestras, permitiendo concluir que sin importar el lugar de donde se recolectaron estas plantas, comparten algunos de sus componentes químicos.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se confirmó la presencia de alcaloides típicos de la familia en el género *Zephyranthes* y se pudo realizar una comparación entre los parámetros de identificación obtenidos con respecto a valores teóricos reportados en el artículo que sirvió de base para este proyecto: "Simultaneous quantification of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*" el cual brinda información sobre el perfil de alcaloides de este género.

La información que se logra extraer de este proyecto constituye un primer acercamiento al conocimiento del valor químico que poseen las plantas de este género y sirve como base para otros estudios con los que se quiera obtener una identificación más precisa ó investigaciones que se quieran realizar sobre la gran variedad estructural entre estos metabolitos.

2. INTRODUCCIÓN

La diversidad biológica es un concepto importante ya que gracias a esta la naturaleza nos brinda un gran número de recursos que podemos usar para nuestro beneficio y el de todos los organismos vivos que componen los ecosistemas. Por tanto, los estudios que se realicen para contribuir al conocimiento de esta diversidad son de gran valor ya que de esa forma se va reconociendo la importancia que juegan cada uno de los elementos naturales que nos rodean.

Colombia se encuentra ubicada en la región trópica húmeda ecuatorial en una zona que le permite presentar una gran diversidad botánica. Durante muchos años la riqueza natural con la que cuenta nuestro país ha sido aprovechada por todas las culturas que han pasado a través de los tiempos, y se han valido de las innumerables propiedades farmacológicas que presentan las plantas para el tratamiento de enfermedades (Cabezas, 2007). Por esto, hoy en día son un recurso en el cual la ciencia invierte con el fin de encontrar y potencializar los beneficios que nos ofrecen.

Además de buscar la forma de obtener los máximos beneficios de estos recursos, la ciencia también se interesa por mantener y conservar aquellas familias de plantas que representan un valor importante a nivel medicinal y más aún cuando aquellas especies se encuentran en peligro de extinción.

Un ejemplo de todo lo anterior es la familia botánica Amaryllidaceae, que presenta una gran distribución en nuestro país, representada por los géneros: *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyrantes*, *Hippeastrum*, *Crinum*, *Eucharis*, *Caliphruria*, de los cuales los dos últimos están en vía de extinción (Calderón, 2003).

El interés por el estudio de esta familia surgió desde que en 1874 se aisló la licorina, alcaloide extraído a partir de *Narcissus pseudonarcissus* y desde esto, más de 200 especies de Amaryllidaceae han sido estudiadas por la presencia de un grupo de alcaloides que le confieren a todos sus géneros gran valor desde el punto de vista fitoquímico, debido al amplio rango de actividad biológica que presentan como analgésicos, estimulantes respiratorios, insecticidas, antimitóticos, entre otros (Cabezas F. C.).

A pesar de la reconocida importancia de esta familia, en Colombia son pocos los trabajos de investigación que van más allá de los estudios biológicos que brinden información sobre el componente químico que presentan estos

géneros endémicos generando un desconocimiento en cuanto a estos importantes marcadores quimiotaxonómicos.

Ante esta problemática el presente trabajo de investigación surge con la intención de dar a conocer la composición de alcaloides en plantas que pertenecen al género *Zephyranthes*, brindando un aporte al conocimiento de estas moléculas, por medio de una caracterización cualitativa en ejemplares de diferentes procedencias como Valle del Cauca, Atlántico, Cauca y Tolima.

Este proyecto de investigación tuvo como objetivo el establecimiento de un perfil metabólico o *Fingerprint* y la creación de la primera biblioteca espectral de Amaryllidacea a partir de los alcaloides identificados. La importancia de este trabajo radica en que la información encontrada servirá como una base para futuros estudios con los cuales se quieran establecer comparaciones entre otros géneros o que busquen una identificación más precisa de estas moléculas.

La metodología que se empleó para el logro de los objetivos fué la técnica cromatográfica UPLC para la separación de los metabolitos y un sistema de identificación por espectrofotometría UV-Vis para la detección de los mismos.

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia varios autores se han enfocado en el estudio de algunos de los géneros de la familia *Amaryllidaceae* como lo son *Crinum*, *Eucharis*, *Caliphruria*, entre otros, en busca de la aplicabilidad de las propiedades que presentan este grupo de alcaloides. Sin embargo, se ha identificado que existe un vacío en el conocimiento a nivel químico del género *Zephyranthes*.

Lo que se conoce de este género a nivel nacional, está relacionado con las caracterizaciones morfológicas desde el punto de vista biológico, que también enriquecen el conocimiento de la diversidad botánica y con el cual se han podido establecer diferencias entre otras especies de *Zephyranthes*. Aunque esto es importante, existe la necesidad de adquirir un conocimiento sobre el contenido de los marcadores quimiotaxonómicos que han inspirado la mayoría de los estudios que hasta ahora se tienen y se siguen realizando en esta familia.

El realizar análisis químico, caracterizaciones biológicas e identificación de principios activos en las plantas, es relevante ya que el adquirir este conocimiento permite corroborar las relaciones filogenéticas, morfológicas y fisiológicas que se comparten entre un mismo grupo de plantas, detectar nuevas aplicaciones de los componentes activos a nivel terapéutico y permite una selección más racional de las especies a estudiar en busca de nuevos productos naturales.

Por lo anterior, el presente trabajo se realiza con el fin de dar un primer paso sobre el conocimiento del componente químico que permita identificar los alcaloides que conforman estas plantas y establecer comparaciones entre los demás géneros o especies del mismo, aumentando el interés por el estudio sobre la conservación y el uso a nivel terapéutico de las mismas.

El realizar una caracterización cualitativa de estos metabolitos secundarios y el crear un perfil de los mismos encontrados en muestras procedentes de nuestro país, servirá como un aporte al reconocimiento del valor fitoquímico que poseen estas plantas.

4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

➤ IMPORTANCIA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LAS PLANTAS: REVISIÓN TEÓRICA SOBRE LOS ALCALOIDES

Las plantas no presentan un sistema inmune con el que puedan defenderse de los depredadores pero producen una serie de sustancias que varían de acuerdo a su especie, condiciones ambientales, factores de estrés y muchas otros elementos que condicionan también las cantidades de los mismos. Dichas sustancias son conocidas como metabolitos secundarios y entre esos se encuentran los alcaloides denominados de esta forma por su carácter alcalino (Acosta, 2008).

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados derivados principalmente de aminoácidos. En la naturaleza se pueden encontrar como sales con el ácido acético, láctico, málico, tartárico, cítrico y oxálico (Acosta, 2008). Estos sistemas son de vital importancia en la célula ya que cumplen un papel muy importante en el mimetismo hormonal de la planta y son necesarios para el metabolismo. Aunque sus estructuras difieran mucho entre unas y otras sus funciones farmacológicas son muy parecidas. Aproximadamente el 25% de las plantas presentan alcaloides y pueden llegar a una concentración del 10% en algunas ya sea en sus flores, raíces, hojas, semillas, frutos, cortezas, etc. (Acosta, 2008).

En las plantas dichos metabolitos cumplen un papel de almacenamiento de nitrógeno, sirven como sustancias protectoras de los frutos, semillas, corteza del tallo, raíz y epidermis de las hojas (Acosta, 2008). Son factores importantes que ayudan al desarrollo de la planta mas no son indispensables en algunas de ellas ya que aquellas que no producen estos metabolitos, tienen otros que ayudan a su desarrollo. Estos compuestos están en constante transformación y también son producto del metabolismo de las sustancias que se acumulan y son nocivas para la planta de tal forma que son agentes finales del proceso de desintoxicación (Acosta, 2008).

Los alcaloides se clasifican dependiendo de unas determinadas características que los hacen denominarse como tal, ya que no todos los compuestos heterocíclicos que encontramos en la naturaleza y que tienen un nitrógeno se pueden llamar alcaloides. Existen los alcaloides verdaderos, los cuales se derivan de los aminoácidos, presentan un nitrógeno intracíclico, son de carácter básico y se encuentran en la naturaleza en forma de sales. Los protoalcaloides a diferencia de los verdaderos, son aminas simples con el grupo nitrógeno extracíclico. Los

pseudoalcaloides no son derivados de aminoácidos pero presentan algunas características de la definición estricta de alcaloides. Y finalmente están los alcaloides imperfectos que se derivan de las bases púricas (Acosta, 2008).

Según los datos históricos que se conocen se dice que el descubrimiento y aislamiento de los primeros álcalis vegetales se dió aproximadamente en el año 1803 por Charles Derosne, quien logró extraer una mezcla de narcotina y morfina del opio, un látex proveniente de la planta *Papaver somniferum* conocida comúnmente como la *adormidera* debido a sus efectos analgésicos y calmantes. Dicho látex contiene entre el 10 al 20% de alcaloides diferentes donde los principales son la papaverina, tebaína, noscapina y la ya mencionada morfina (Bruneton, J, 1993). En el año 1805, el químico alemán Friedrich W. Sertürner logró un primer aislamiento de la morfina a partir de la misma planta (Science Museum).

Desde entonces este grupo de metabolitos fueron ampliamente estudiados y sobrevivieron los nuevos hallazgos de compuestos activos como la cafeína, emetina, estricnina y quinina, en los años 1817 y 1820, por los farmacéuticos franceses Pelletier y Caventou (Bruneton, 1993). Aunque no fué un trabajo fácil la elucidación de las estructuras químicas de estos compuestos es importante resaltar que desde tiempos remotos, los alcaloides han sido compuestos de gran interés y hasta ahora en los últimos años el hombre se ha interesado por crear nuevas metodologías analíticas como técnicas de resonancia magnética y espectrometría de difracción de Rayos X para el estudio de dichos metabolitos (Bruneton, 1993).

Principalmente ese interés por los alcaloides se debe a la aplicación terapéutica que estos presentan y las aplicaciones que se les han podido otorgar a estas sustancias activas. Estos compuestos tienen una variedad de campos de aplicación como lo son el sistema nervioso central, actuando como depresores del mismo (escopolamina, morfina) o actuando como estimulantes (estricnina, cafeína). A nivel del sistema nervioso central autónomo se pueden encontrar los simpaticomiméticos como la efedrina, simpaticolíticos como la yohimbina, parasimpacomiméticos como la pilocarpina, anticolinérgicos como la atropina y finalmente gangliopléjicos como la nicotina (Bruneton, 1993).

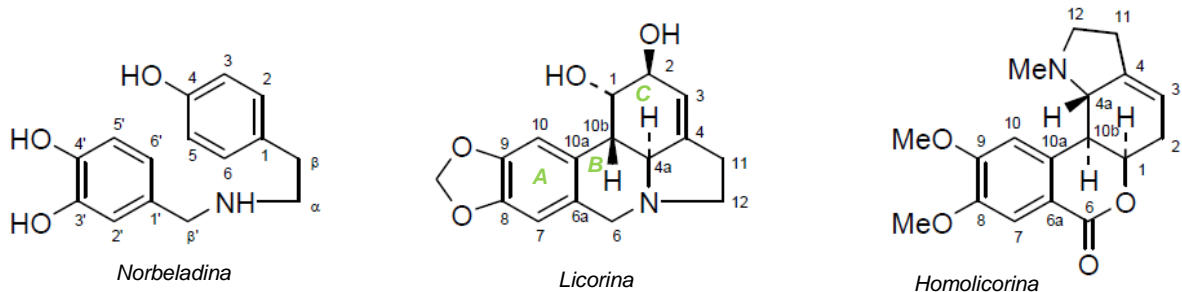
Sus efectos y empleo como anestésicos locales, antifibrilantes, antitumorales, antipalúdicos, entre otras aplicaciones, son otras de las actividades interesantes e importantes que presentan los alcaloides. Es por esto que sus usos e introducción en medicina han sido posibles y se ha hecho el intento por lograr incluir dichas sustancias en ayudas terapéuticas tanto para el ser humano como para los animales (Bruneton, 1993).

La industria farmacéutica ha sido la principal encargada del desarrollo e innovación de nuevos medicamentos que contengan estos principios activos. Algunos como la teofilina y papaverina, los cuales se emplean actualmente para el tratamiento de enfermedades respiratorias y mejoramiento del flujo sanguíneo en pacientes con problemas de circulación respectivamente, se han obtenido por síntesis ya que para las industrias esto les ha resultado más fácil, pues la complejidad de la producción de estas sustancias no es alta (Bruneton, 1993). Sin embargo, para la realización de otros productos y el empleo de otras sustancias que no se sintetizan debido a su alta complejidad, la extracción a partir de las plantas para la obtención es la única forma de obtener dichos compuestos como por ejemplo para el caso de morfina y escopolamina, entre otros.

➤ DESCRIPCIÓN GENERAL SOBRE LA FAMILIA *Amaryllidaceae*, LOS ALCALOIDES Y SU BIOSÍNTESIS.

La familia *Amaryllidaceae* es ampliamente conocida ya que presentan un alto contenido de alcaloides y se han logrado extraer alrededor de 300 compuestos de esta clase (Bastida, 2011). Se encuentra dividida en 59 géneros, con aproximadamente 850 especies y sus centros de distribución principales son el Sur y Norte de África, América del Sur, especialmente en la región andina y en Europa principalmente en el Mediterráneo (Bastida, 2011). Desde hace mucho se vienen utilizando en medicina y se ha demostrado en varios estudios realizados que poseen una actividad importante en el sistema nervioso central, para el manejo de la pérdida de la memoria, la ansiedad y trastornos depresivos (Bastida, 2011).

El amplio número de estos compuestos y las múltiples variaciones a nivel estructural que presentan los alcaloides de esta familia se deben a las rutas biosintéticas que los producen, por lo que se encuentran clasificados 9 esqueletos del tipo: *norbelladina*, *licorina*, *homolicorina*, *crinina*, *hemantamina*, *narciclasina*, *tazetina*, *montanina* y *galantamina* (Bastida, 2011).



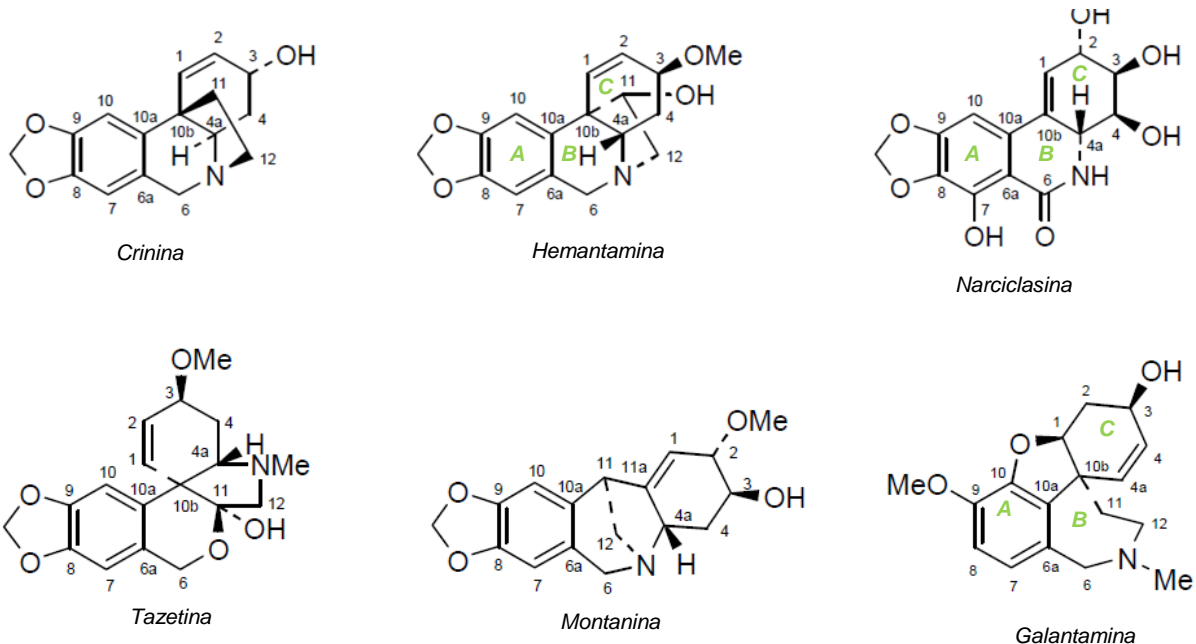


Figura 1. Tipos de alcaloides encontrados en la familia Amaryllidaceae (Bastida, 2011)

La numeración que de estos alcaloides no sigue estrictamente las reglas establecidas de la IUPAC, de hecho fue propuesta por Ghosal y colaboradores en 1985 y tienen en cuenta principalmente la ruta biosintética (Osorio, 2004-2006):

- La enumeración del anillo aromático A es siempre la misma sin importar el tipo de esqueleto.
- La posición bencílica α con respecto al heteroátomo siempre es 6.
- La posición vecinal del N en el anillo pirrolidínico no comprometida con los anillos B o C, siempre es 12.
- La enumeración del anillo C es siempre en el sentido de las agujas del reloj, excepto para los alcaloides del tipo homolicorina, debido a su proceso biosintético.
- En los alcaloides de tipo norbelladina, la notación [] hace referencia al anillo que tiene como precursor la L-Phe.

La biosíntesis de estas moléculas es compleja y se descubrió entre los años 1960 y 1970 (Cedrón, 2010). Los núcleos de estos alcaloides son el resultado de acoplamientos oxidativos intramoleculares que se generan en un precursor del tipo $C_6C_2-N-C_1C_6$, donde la unidad C_6C_2 proviene de una molécula de tirosina y la unidad C_1C_6 debe su origen a una molécula de fenilalanina.

La formación de la unidad C_1C_6 a partir de fenilalanina implica la pérdida de dos átomos de carbono de la cadena lateral, así como la introducción de dos sustituyentes oxigenados en el anillo aromático. Esto es posible por la enzima PAL (en inglés: “*Phenylalanine ammonia lyase*”) y de los ácidos cinámicos. La enzima produce una desaminación oxidativa de este precursor con lo que se da origen al ácido *trans*-cinámico. De otro lado, la tirosina se incorpora como tiramina, previo a una descarboxilación (Osorio, 2004-2006). La condensación del aldehído que se forma, el 3,4 dihidroxibenzaldehído se con- densa con la tiramina dando lugar a una base de Schiff (Bruneton, 1993). Esta última sufre una reducción y se obtienen los precursores más importantes que son la norbeladina y la 4'-O-metilnorbeladina.

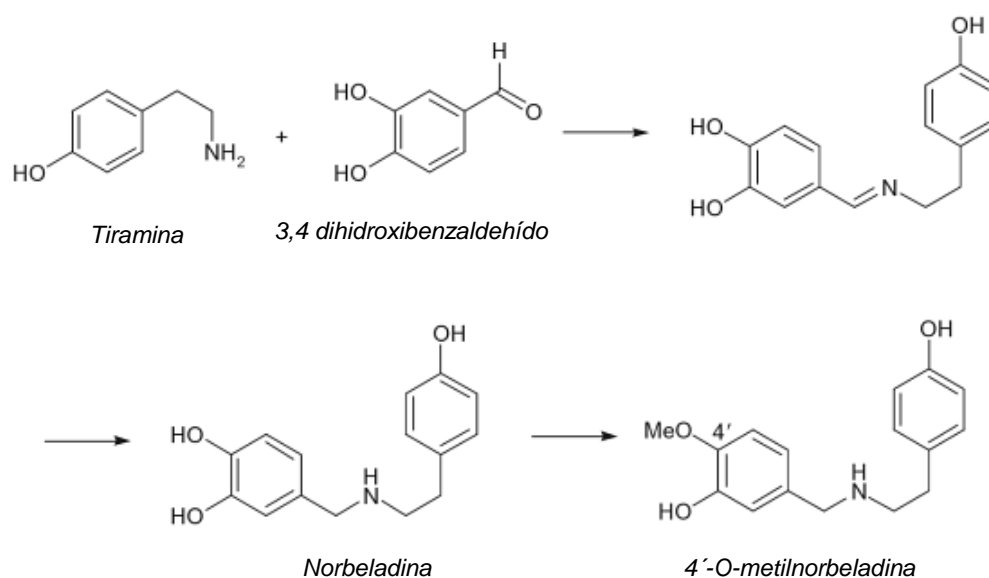


Figura 2. Biosíntesis de norbeladina y 4'-O-metilnorbeladina a partir de los precursores tiramina y 3,4 dihidroxibenzaldehído (Cedrón, 2010).

Sobre la 4'-O-metilnorbeladina se presentan tres tipos de acoplamientos oxidativos: *orto-para*, *para-para*, y *para-orto*, para conformar las estructuras correspondientes a licorina, galantamina y crinina (Cedrón, 2010).

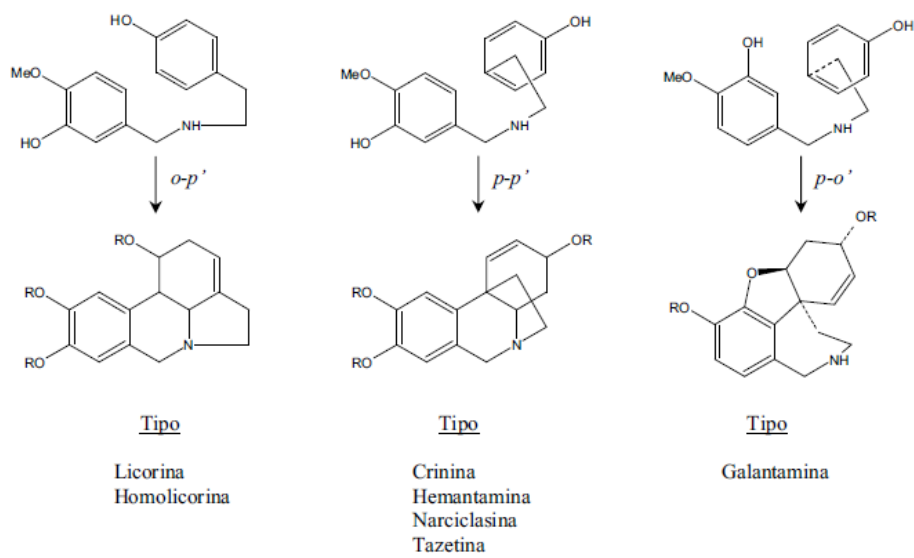
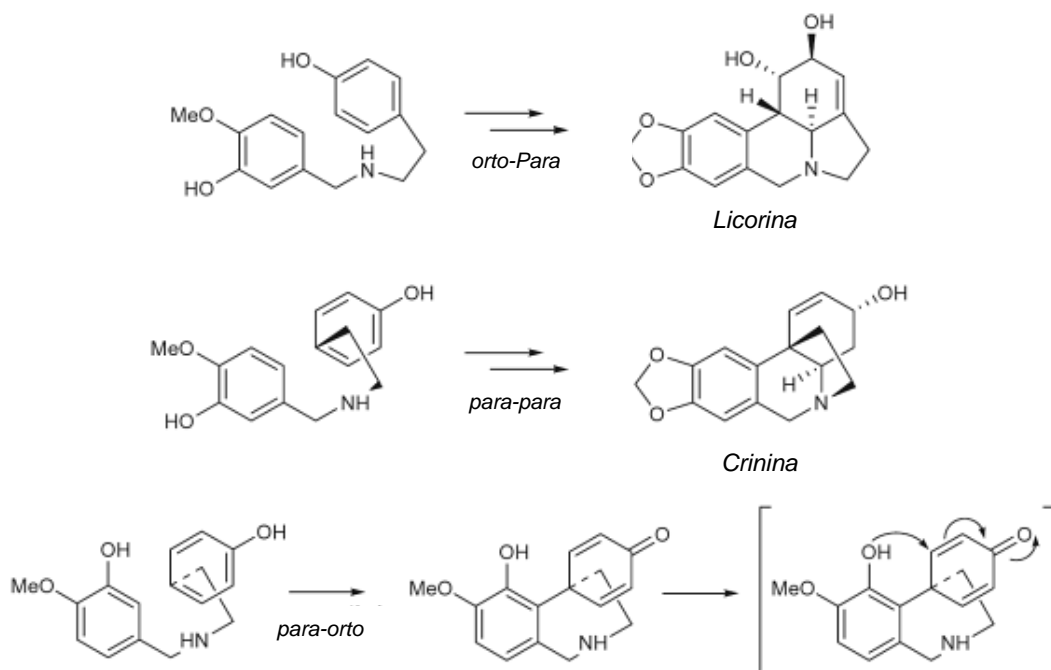


Figura 3. Acoplamiento oxidativo sobre el precursor 4'-O-metilnorbeladina (Osorio, 2004-2006)



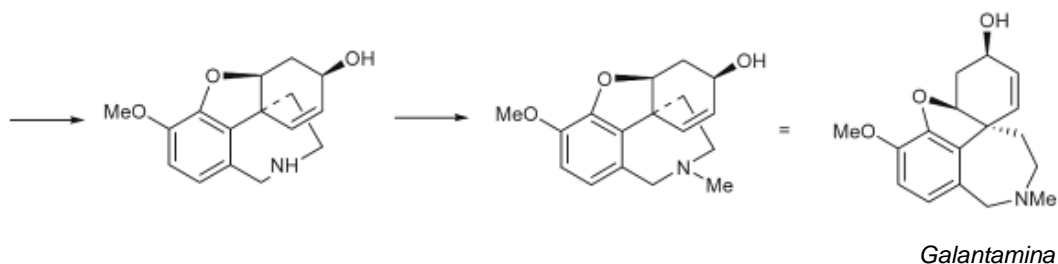
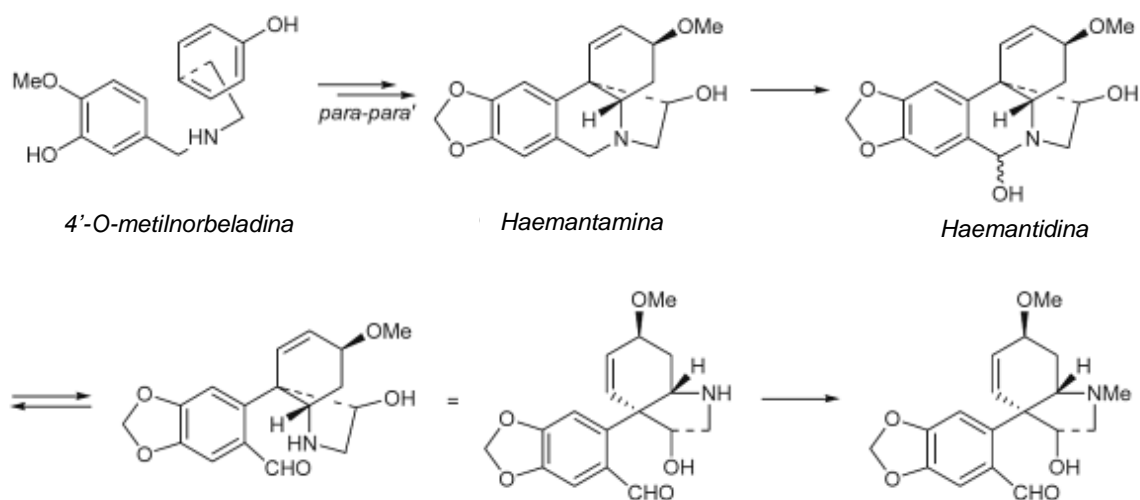


Figura 4. Representación de la formación de las estructuras como licorina, crinina y galantamina (Cedrón, 2010).

La hemantamina se forma de un acoplamiento para-para que ocurre en la estructura enantiomérica de la crinina y es el precursor de tazetina, montanina y narciclasina. Cuando la hemantamina sufre una oxidación y se transforma en hemantadina, esta sufre una apertura del anillo por el equilibrio del grupo aminoaldehído, permitiendo la formación de un hemiacetal seguido una metilación, dando paso a la conformación de la estructura pretazetina, que mantiene en equilibrio con tazetina debido a que es inestable tanto en medio básico como ácido (Cedrón, 2010).



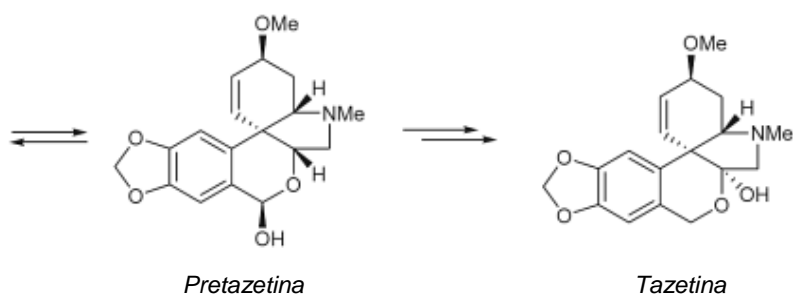


Figura 5. Biosíntesis de tazetina a partir de hemantamina (Cedrón, 2010).

Los alcaloides del tipo Amaryllidaceae son bases débiles con un pKa entre 6 y 9, correspondiente al único átomo de nitrógeno que presentan, el cual puede ser secundario, terciario o incluso cuaternario. El número de átomos de carbono que se encuentra entre 16 a 20 átomos, depende de los sustituyentes que tenga cada molécula (Osorio, 2004-2006).

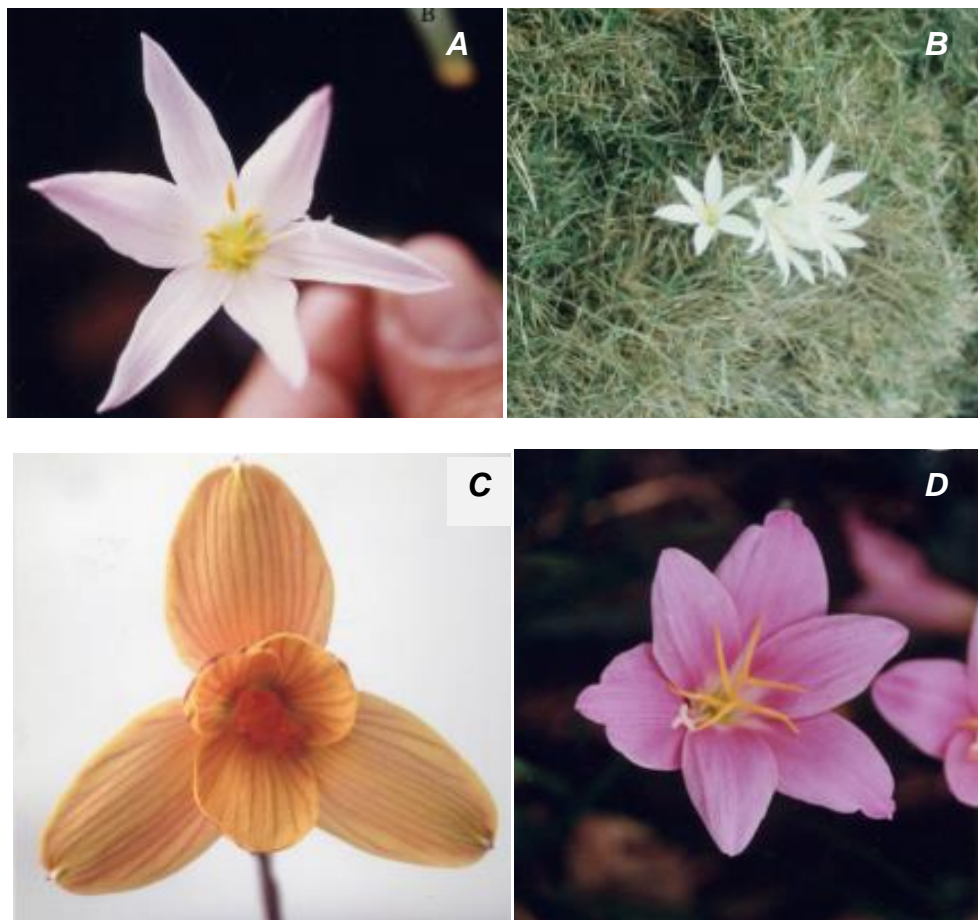
Se han descrito en muchos artículos científicos el amplio rango de actividades biológicas de los alcaloides de esta familia como analgésicos, antimaláricos, antimicrobianos, citotóxicos, anticonvulsivos, hipotensivos, antiinflamatorios, antivirales, antitumorales, protozoicidas, expectorantes, estimulantes respiratorios, entre otras propiedades (Cabezas F. C.) y se han realizado numerosos estudios *in-vitro* con el fin de demostrar dichas actividades fisiológicas. Sin embargo y hasta el momento, Galantamina es uno de los alcaloides más importantes y representativo de estas plantas, ya que se ha comprobado su aplicación en el tratamiento del Alzheimer (Bastida, 2011), donde cumple un papel como inhibidor selectivo competitivo de acción prolongada de la acetilcolinesterasa. Con esto ayuda al mejoramiento de los síntomas del paciente, en especial mejorando la capacidad de recordar y pensar (Alpizar, 2003).

➤ DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Zephyranthes*

Tradicionalmente las plantas pertenecientes al género *Zephyranthes* con alrededor de 60 especies, han sido ampliamente utilizadas ornamentalmente y se conocen como “lirios de lluvia” por la tendencia a florecer poco después del periodo de lluvia. Las pequeñas diferencias que se pueden observar entre el mismo género son la posición de la flor, la simetría de la corola, el número de semillas, número de diferentes longitudes de filamentos de anteras, entre otras. (Fernandez, 2004).

Según lo reportado en la literatura en Colombia se conocen 6 especies; *Z. susatana*, en Cundinamarca, Municipio de Suesca; *Z. albiella* Traub, también

encontrada en el alto plano de Cundinamarca; *Z. carinata* Herb (Nueva especie actualmente registrada) que se encuentra en Medellín, Boyacá, Cundinamarca y Santander; *Z. puertoricensis* Traub en San Bernardo (Bolívar), y Tolima; *Z. robusta* encontrada en Medellín conocida como cebollita, y *Z. rosea* encontrada en San Andrés y Providencia y en las Islas del Rosario (Bolívar) (Fernandez, 2004).



Fotografía 1. Imágenes fotográficas de *Z. rosea* (A), *Z. puertoricensis* (B), *Z. susatana* (C) y *Z. carinata* (D). (Fernandez, 2004)

Aunque se han realizado estudios sobre dichos alcaloides empleando otros géneros en diferentes regiones del país como el Amazonas y Cundinamarca, no son muchos los estudios realizados a nivel nacional que den a conocer la composición de sus núcleos alcaloidales (Fernandez, 2004).

Por lo tanto, el aporte que se pretende realizar es establecer un perfil de la composición de alcaloides mediante la caracterización cualitativa de estos, que permitan identificar los tipos de alcaloides que se producen a partir de esta fuente vegetal nativa.

➤ ASPECTOS FUNDAMENTALES SOBRE LA BIBLIOTECA ESPECTRAL
Amaryllidaceae.

Para la creación de la biblioteca espectral se empleó el software Empower PDA 3.0, una herramienta que permite procesar los datos espectrales y cromatográficos de una forma rápida aumentando la productividad y facilidad de manejo de los resultados por parte de los usuarios. El PDA permite la detección y cuantificación de muestras con concentraciones bajas de analitos y proporcionan información tridimensional para la identidad de pico y su pureza

El detector de matriz de fotodiodos mide la cantidad de luz que incide en la matriz, lo cual determina la absorbancia de la muestra. El conjunto contiene 512 fotodiodos los cuales son capaces de transformar la señal lumínica en voltaje y con la anchura del diodo de 50µm junto con la ranura de 100µm, determina la intensidad y el ancho de banda de la luz que incide en los fotodiodos (Waters Corporation, 2005). Luego de que se han identificado todos los picos, el detector PDA puede recoger espectros en cada pico y calcular los máximos de absorción (Dionex Corporation, 2003). Las variaciones que se generan en la intensidad y ancho de banda permiten la distinción entre espectros que son similares y pueden alcanzar resoluciones espectrales de 1.2 nm que es el intervalo de longitud de onda entre los puntos de los datos adquiridos en cada espectro (Waters Corporation, 2005).

Para conocer sobre el fundamento en el cual se basa la creación de la biblioteca se debe realizar una revisión a la Teoría del Contraste Espectral que emplea un algoritmo con el cual se comparan los espectros de absorción UV/Vis de las muestras analizadas. Esto lo hace ya que convierte los espectros en vectores y con estos determina si existen diferencias por la presencia de múltiples compuestos en el mismo pico.

La forma de los espectros de absorción caracteriza al compuesto y se producen en diferentes longitudes de onda generando una forma única para el analito. Los vectores generados por el contraste espectral, cuantifican las diferencias encontradas entre espectros y la conversión se hace mediante la línea base corregida y luego estos se comparan. Los vectores presentan dos propiedades (Waters Corporation, 2005):

- *Largo*: que es proporcional a la concentración del analito.
- *Dirección*: determinada por la absorbancia relativa del analito en longitudes de onda. Contribuye a la identificación del compuesto. (Waters Corporation, 2005)

En la siguiente figura, muestra los espectros de absorción para el Compuesto A y B, en forma de ilustración para determinar las diferencias que existen entre ellos:

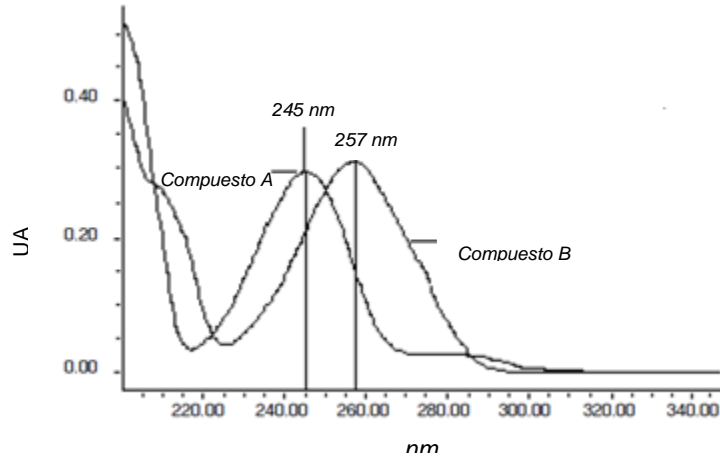


Figura 6. Comparación de espectros de absorción UV/Vis de dos compuestos (Waters Corporation, 2005).

Y se determinan los vectores para cada espectro a partir de la relación de absorbancia para cada uno.

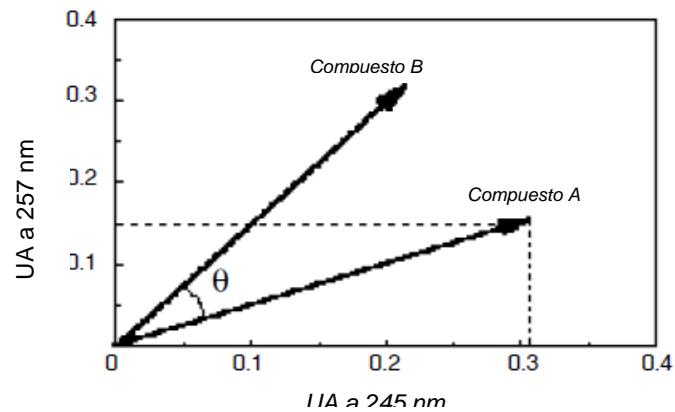


Figura 7. Vectores de espectros para Compuesto A y B (Waters Corporation, 2005).

La resolución espectral es un factor determinante para la diferenciación vectorial de los espectros, mientras la longitud de onda y la resolución aumenten la precisión espectral para los compuestos también aumenta.

Como se observa existe una diferencia entre el compuesto A y B y se representa mediante el ángulo de contraste espectral ((Match angle), (θ), que presentan máximos de absorción a longitudes de onda diferentes (Compuesto A, 245nm; Compuesto B, 257nm). Cuando este ángulo espectral tenga un valor mayor que cero indica que la forma de los espectros es diferente. El algoritmo utiliza absorbancias de múltiples longitudes de onda para obtener mejores resultados de la comparación entre espectros, generando un vector en el espacio n-dimensional. Por tanto cuando el ángulo obtiene un valor igual a cero indicará que las relaciones de absorbancias correspondientes a cada longitud de onda de los diferentes compuestos coinciden (Waters Corporation, 2005).

Además del ángulo de contraste también se genera un ángulo de umbral (threshold angle) que es el ángulo máximo de contraste entre espectros generado por diferentes factores no deseados, asociados al ruido del detector o al efecto del solvente. Con este ángulo se puede determinar si las diferencias entre los espectros corresponden a sus diferencias propias o si esa diferencia se debe a fenómenos no ideales. Cuando el ángulo de contraste (θ) es mayor al ángulo de umbral las diferencias son propias de cada espectro (Waters Corporation, 2005).

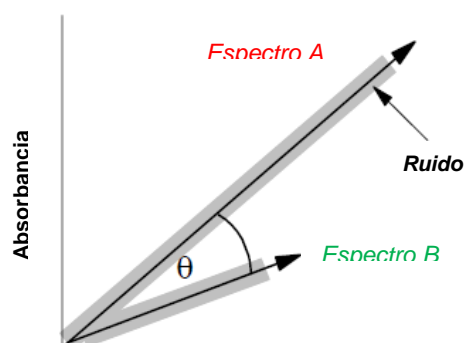


Figura 8. Ángulo de umbral. (Antwerp, 2003)

Cuando el ángulo de contraste (Match angle) sea menor que el ángulo de umbral (Match Threshold), indica que el espectro de absorción del compuesto en la biblioteca es igual o similar al espectro de absorción identificado en la muestra. (Waters. Revision A, 2002)

Otro concepto importante que se debe tener en cuenta para la creación de la biblioteca es la pureza de pico, el cual es un algoritmo que usa la teoría del contraste espectral para realizar la comparación de todos los espectros que se generan en un pico. Este ángulo es un promedio ponderado de todos los ángulos calculados. Cuando su valor es menor que el valor del ángulo de umbral, se dice que el pico es espectralmente homogéneo o que es ópticamente puro, es decir, que sólo se está reconociendo un analito y no está coeluyendo con otros compuestos y que el espectro de absorción generado corresponde únicamente a un compuesto y no a varios en el mismo pico (Antwerp, 2003). Cuando el ángulo de pureza es mayor que el umbral calculado, indicará entonces que dentro del pico hay algo que no puede ser explicado por el ruido y dicho pico es impuro (Waters, 2013).

De otro lado para que la biblioteca espectral realice la identificación de las moléculas, también se basa en el ajuste que se le haga a los parámetros conocidos como: "*Retention Time Presearch (RTP)*" y "*Wavelength Presearch (WP)*". Estos dos representan el porcentaje de diferencia que se quiere mantener entre el valor de un tiempo de retención y los valores de los máximos de absorción de la muestra con respecto a los de la biblioteca para que esta última clasifique los datos y reconozca los alcaloides.

El valor que se le asigne al rango de identificación entre los datos, depende de que tan cercanos sean estos para que la biblioteca haga una identificación más precisa.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar cualitativamente los alcaloides presentes en el género *Zephyranthes* según los tiempos de retención y máximos de absorción, para establecer un perfil de metabolitos o *Fingerprint*.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener la fracción de alcaloides totales a partir de las hojas de las muestras disponibles de *Zephyranthes*.
- Crear la primera biblioteca de espectros UV de los alcaloides encontrados en las plantas del género en estudio.
- Realizar una comparación entre los alcaloides encontrados en las diferentes procedencias de las muestras analizadas.

6. METODOLOGÍA

El desarrollo de este proyecto de investigación se llevó a cabo en la Universidad Icesi de la Ciudad de Cali, en los laboratorios de investigación de Fitoquímica y Biotecnología. La metodología que se describe a continuación se empleó con el fin de crear una biblioteca espectral con los alcaloides encontrados en plantas del género *Zephyranthes*, para brindar un nuevo conocimiento sobre el componente químico de esta importante familia de plantas endémicas.

6.1 MATERIALES

El material vegetal empleado fueron plantas del género *Zephyranthes* que se encuentran en la universidad, recolectadas con anterioridad en diferentes períodos de tiempo y en diversas regiones del país como Valle del Cauca, Cauca, Atlántico, entre otros.

Los materiales utilizados en la parte experimental fueron: placas de cromatografía en capa fina TLC silica gel 60 GF₂₅₄, columnas cromatográficas *BEH C₁₈* (2.1mm x 100mm, 1.7 μm) y *CSH* (2.1mm x 100mm, 1.7 μm), equipo de cromatografía UPLC, Rotaevaporador Heidolph, Rapidvap, Sonicador Elma 60KHz.

Solventes como Acetonitrilo HPLC, Metanol HPLC, Ácido Clorhídrico, Hidróxido de sodio, Acetato de etilo y Ácido Fórmico.

6.2 MÉTODOS

A continuación se describen las fases en las cuales fue dividida la metodología para el logro de los objetivos propuestos.

6.2.1 Preparación del Material vegetal

A partir de los ejemplares de plantas se realizaron nuevas siembras de las mismas con el fin de obtener mayor cantidad de muestras. Se dividieron los bulbos de cada origen y se plantaron en otras macetas empleando el abono que previamente pasó por un proceso de autoclavado para prevenir la contaminación de las plantas por algún microorganismo o insecto. Cada una de las macetas fue rotulada con su No. de código establecido internamente.

CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE *Zephyranthes spp.*

	Código Identificación	Fecha M/A	Procedencia
Origen 1	IA-020	Ago-12	Desconocido
	IA-021	Ago-12	Desconocido
	IA-022	Ago-12	Desconocido
	IA-023	Ago-12	Desconocido
	IA-024	Ago-12	Desconocido
	IA-025	Ago-12	Desconocido
	IA-026	Ago-12	Desconocido
Origen 2	IA-027	Ago-12	Desconocido
Origen 3	IA-035	Sep-12	Tuluá
Origen 3	IA-036	Sep-12	Cauca, Hda. Calibío (Popayán)
Origen 4	IA-037	Oct-12	Pichindé (La Yolanda), pbn natural
	IA-040	Oct-12	Pichindé (La Yolanda), pbn natural
	IA-041	Oct-12	Pichindé (La Yolanda), pbn natural
Origen 5	IA-042	Dic-12	Barranquilla
	IA-043	Dic-12	Barranquilla
	IA-044	Dic-12	Barranquilla
	IA-045	Dic-12	Barranquilla
	IA-046	Dic-12	Barranquilla
	IA-047	Dic-12	Barranquilla
	IA-048	Dic-12	Barranquilla
Origen 6	IA-071	Ago-12	Desconocido
Origen 7	IA-100	Mar-13	Cali, San Fernando (El bosquecito)
Origen 4	IA-101	Mar-13	Pichindé (La Yolanda), pbn natural
	IA-102	Mar-13	Pichindé (La Yolanda), pbn natural
	IA-103	Mar-13	Pichindé (La Yolanda), pbn natural
	IA-104	Mar-13	Pichindé (La Yolanda), pbn natural
	IA-105	Mar-13	Pichindé (La Yolanda), pbn natural
Origen 8	IA-113	Ago-13	Ibagué (Cra. 5 con 50)

Tabla 1. Clasificación de muestras de plantas por origen según su ubicación.

En la tabla anterior se da a conocer la identificación de las plantas, la fecha de su recolección y su procedencia, donde algunos orígenes son desconocidos. Las plantas se almacenaron en el laboratorio de biotecnología bajo las mismas condiciones, en un ambiente favorable para su crecimiento y desarrollo, con los requerimientos de agua y luz necesarios.

6.2.2 Extracción de la fracción total de alcaloides

Existen diferentes métodos para la extracción de alcaloides y la selección de uno de ellos depende del tipo de material vegetal y de las características químicas y físicas de las moléculas en particular que se desean obtener. Las diferencias a nivel estructural que se presentan en los alcaloides son muy variadas pero todas tienen un N (nitrógeno) en común que les otorga un carácter básico. Su solubilidad en los diferentes solventes depende entonces del pH al que se encuentren ya que tienen también la propiedad de presentarse en forma de sales (Acosta, 2008).

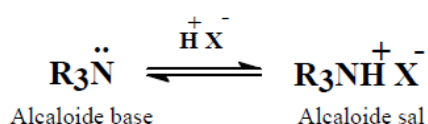


Figura 9. Representación de las propiedades de alcaloides (Acosta, 2008)

Cuando se presentan en forma de bases, los alcaloides se solubilizarán en solventes orgánicos apolares como: benceno, éter etílico, diclorometano, acetato de etilo y cloroformo. Si se presentan en forma de sales se deben emplear solventes polares como agua, soluciones hidroalcohólicas o soluciones ácidas (Acosta, 2008).

Según lo anterior entre los métodos generales de extracción se conocen:

- Extracción en medio básico
- Extracción en medio ácido
- Extracción con solventes orgánicos

Habitualmente los alcaloides en la naturaleza se encuentran en forma de sales por tanto, para la realización de la parte experimental de este proyecto se aplicó el siguiente método de extracción (Acosta, 2008):

Se tomó de cada muestra de 1 a 6 hojas (dependiendo de la disponibilidad de material) y se maceraron con nitrógeno líquido. El macerado se acidificó con HCl al 5% y se sonicó durante 15 minutos. Con el extracto obtenido se realizó una primera extracción en cloroformo y se descartó la fase orgánica. Luego la fase ácida se basificó con NH₄OH al 30% y nuevamente se realizó una extracción con cloroformo, pero esta vez se recuperó la fase orgánica. Finalmente el extracto

resultante se llevó a sequedad y se recuperó en metanol obteniéndose la fracción total de alcaloides.

6.2.3 Preparación de la muestra para la creación de la biblioteca de espectros

Para lograr una mejor separación de los alcaloides antes de proceder con el análisis en el UPLC, el extracto obtenido en el ítem 6.2.2 de la muestra previamente seleccionada con identificación IA-027, se empleó para realizar una cromatografía planar y se sembró la muestra en una placa de silica gel 60 GF 254 (10x10 cm), utilizando como fase móvil metanol: acetato de etilo (90:10).

Dentro de las técnicas de reconocimiento de alcaloides se tiene el reactivo de Dragendorff, que fue usado para revelar las placas de cromatografía realizadas a lo largo del desarrollo experimental del proyecto. Estas técnicas de reconocimiento se basan en la capacidad que tienen los alcaloides cuando se encuentran en forma de sales de combinarse con yodo y metales pesados formando precipitados (Acosta, 2008).

Luego de corroborar las bandas en las cuales se tenía una fracción de alcaloides, se recuperó la silica del plato y se disolvió en metanol; esto se pasó por un filtro de jeringa 0.22 μm para llevar al análisis en el UPLC.

6.2.4 Análisis de las muestras en el UPLC

Según la bibliografía consultada sobre el método cromatográfico, se ajustan las condiciones del UPLC para llevar a cabo la separación e identificación de las moléculas como se presenta a continuación:

Condiciones Cromatográficas:

Columna	CSH Charged Surface Hybrid (2.1 mm x 100mm, tamaño de partícula: 1.7 μm)
Temperatura	25°C
Fase Móvil	Solvente A: Agua (0.05% Ácido Fórmico) Solvente B: Acetonitrilo

Flujo	0.3 mL/min
Longitud de Onda (Detector)	210 nm-400 nm
Gradiente Método UPLC	0.0-2.0 min 95% A 0.7-2.2 min 87% A 2.5-3.6 min 84% A 4.2-4.8 min 77% A 5.0-6.0 min 70% A 7.0-7.8 min 95% A

Tabla 2. Condiciones cromatográficas empleadas para la separación de los alcaloides. (Deepali Katoch, 2012)

Los resultados obtenidos de tiempos de retención y máximos de absorción, se compararon con los datos reportados en la literatura de la siguiente tabla. Con base a esto se realizó la identificación de las moléculas en las muestras.

Tiempo Retención (min)	Máximos		Compuesto
0,84	269		Desconocido
1,02	260		Desconocido
1,76	252	285	Desconocido
1,91	232	288	Licorina
2,11	232	286	Licoramina
2,27	238	285	Dihidrovitatina
2,45	240	281	Licoramina N-oxido
2,61	239	288	Galantina
2,74	237	287	Hamaina
3,52	236	285	Zaidein
3,68	239	288	Tipo Hemantamina
3,74	243	289	Ambelina
3,80	244	288	Crinamidina
3,95	243	290	Hemantamina
4,12	245	292	Vitatina
4,50	239	277	Zefbetaina
4,93	260	275	Ungeremina
5,60	238	277	1-O-(3-hidroxitiril)-pancratistatina
6,14	263		Tipo Licorina
6,80	263		Tortuosina

Tabla 3. Datos de tiempos de retención y máximos de absorción UV de los alcaloides identificados en *Z. grandiflora*. (Deepali Katoch, 2012).

6.2.5 Creación de la biblioteca espectral UV

Mediante el software EMPOWER 3.0 que posee el UPLC se procesan los datos espectrales y cromatográficos, comparando los *Tiempos de Retención* y los *Espectros UV* de los metabolitos presentes en las muestras analizadas generándose una biblioteca de compuestos puros ópticamente.

Se compararon los parámetros de identificación de cada muestra con los reportados en el artículo (**Tabla 3.**) Y para determinar aquellos datos que serían guardados en la librería, se realizó una comparación entre los resultados de cada una de las muestras.

Para lo anterior se hizo una clasificación por tiempos de retención, seleccionando en el software un rango de identificación entre los datos del 5.0% y para los máximos de absorción similares o iguales un rango de longitud de onda del 0.1%. Cada uno de los espectros seleccionados para guardar en la biblioteca que cumpliera con el criterio de pureza, se identificaron como Alcaloide 1, Alcaloide 2... Alcaloide 34.

6.2.6 Comparación entre los alcaloides de las diferentes procedencias.

Uno de los objetivos finales para este proyecto, consiste en dar a conocer si existen variaciones en el componente químico de los ejemplares que se utilizaron para el análisis. Este conocimiento es de gran importancia, ya que se puede observar las diferencias entre sus perfiles de metabolitos, lo cual es de gran contribución para el conocimiento de la diversidad de estas especies.

Para el cumplimiento de este objetivo se emplearon los datos arrojados por el Empower y la biblioteca creada en el ítem anterior. El software realizó una comparación de los parámetros de interés, teniendo en cuenta los rangos de identificación que se configuraron, agrupando los datos obtenidos en cada una de las muestras otorgándole el nombre al alcaloide identificado. Al revisar la tabla de resultados de cada una de las muestras se indican los alcaloides que fueron reconocidos como iguales con el ajuste del Library Matching, el cual arroja los ángulos de comparación como lo son el Match Angle y el Match Threshold. Cuando existe una similitud entre un espectro de absorción UV con respecto a otro, el Match Angle es menor que el Match Threshold.

Después de observar estos valores que indican que la molécula es igual se realizó una clasificación por alcaloides y por orígenes para establecer las comparaciones

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 Determinación del órgano de la planta a utilizar y evaluación del método de extracción.

Se aplicó el método de extracción de la fracción total de alcaloides sobre la muestra IA-025 utilizando bulbos y hojas por separado con el fin de determinar cuál sería el órgano de la planta más apropiado para emplear. Al realizar los análisis, se observó que el mayor contenido de alcaloides se encontraba en las hojas y que este material vegetal sí podría ser empleado para continuar con los procesos experimentales.

Para la evaluación del método de extracción de los compuestos de interés con el extracto obtenido a partir de las hojas (muestra IA-025) se realizó una siembra en placas de sílica gel 60 GF254 (7x5 cm) y se derivatizó con el reactivo de Dragendorff. (**Figura 10**). Las bandas que se identifican en color naranja, corresponden a una determinada fracción de alcaloides que logró ser separada de los demás componentes de la muestra.

La fase móvil empleada fue previamente seleccionada (metanol: acetato de etilo (90:10)) como el mejor sistema de separación de los metabolitos, luego de realizar múltiples ensayos utilizando diferentes proporciones de estos mismos solventes.



Figura 10. Cromatografía planar del extracto de hojas IA-025. Sistema de revelado: Dragendorff. Fase móvil: Metanol: Acetato de etilo (90:10).

En base a estos resultados, se determinó que pueden emplearse las hojas y que el método de extracción es adecuado para la separación de las moléculas de interés.

7. 2 Creación de la biblioteca espectral UV

En el ítem 6.2.3 se menciona el procedimiento que se llevó a cabo para la purificación de la fracción total de alcaloides a partir de la muestra IA-027. La TLC preparativa que se obtuvo se presenta a continuación donde se pueden apreciar las 4 bandas características para alcaloides.

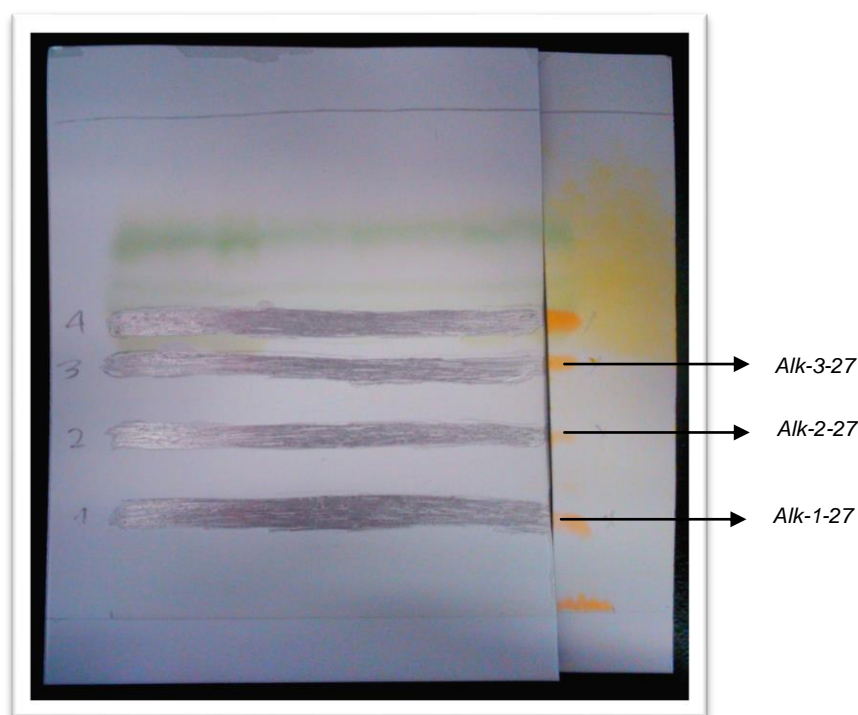


Figura 11. Cromatografía planar del extracto de hojas IA-027. Sistema de revelado: Dragendorff. Fase móvil: Metanol: Acetato de etilo (90:10).

Estas fracciones purificadas se llevaron al UPLC obteniéndose mejores resultados en las bandas 1, 2 y 3, las cuales se identificaron como Alk-1-27, Alk-2-27 y Alk-3-27. Con estas fracciones puras se construyó la biblioteca tomando los máximos de absorción y tiempos de retención como los datos de referencia que servirían para la identificación de los demás compuestos encontrados en todas las muestras.

➤ Muestra Alk-1-27

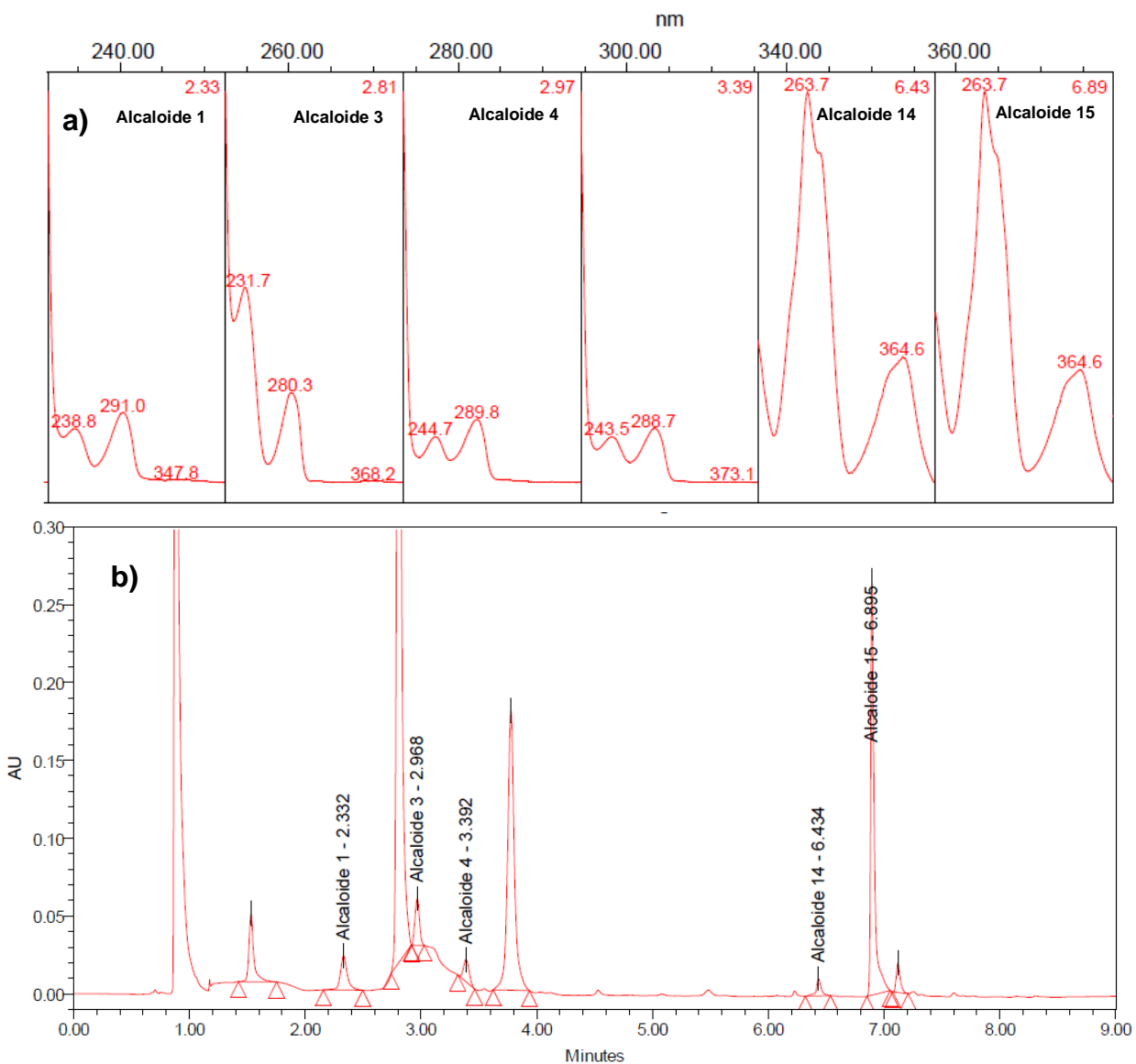


Figura 12. Espectros de absorción (a) y cromatograma (b) obtenidos de la muestra Alk-1-27, del cual se identificaron los Alcaloides 1, 3, 4, 14, y 15.

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
Alk-1-27	2,332	238,8-291,0	6,306	66,213	Alcaloide 1	1,14	90,000
	2,968	244,7-289,8	8,43	25,235	Alcaloide 3	0,064	90,000
	3,392	243,5-288,7	6,669	57,291	Alcaloide 4	0,662	90,000
	6.434	263.7	4.805	45.382	Alcaloide 14	2.136	17.413
	6.895	263.7	0.725	2.160	Alcaloide 15	0.888	1.740

Tabla 4. Resultados de la muestra Alk-1-27, con valores de pureza de pico y ajuste de la biblioteca que indican que el analito corresponde al Alcaloide identificado.

Los criterios de selección que se tuvieron en cuenta para incluir en la biblioteca los datos espectrales obtenidos de estas fracciones fueron:

1. Los máximos de absorción deberían ser iguales o similares a los valores reportados en la literatura. Se consideró para estos un rango de identificación del 0.1%, entre un los máximos de un espectro y otro.
2. Que los tiempos de retención fueran iguales o similares a los valores reportados, considerando un rango de identificación de 5% entre un los tiempos de retención de cromatograma y otro.
3. El pico debía cumplir con los parámetros de pureza, es decir, que el ángulo de umbral fuera mayor que el ángulo de pureza. Ver datos de pureza de pico y Library Match en el **Anexo 3**.

Se tomó como única referencia para los datos espectrales y cromatográficos el artículo de *Deepali Katoch y colaboradores 2012*, ya que fue el único donde se encontraron reportados estos datos, se empleaba una metodología cromatográfica fácil de implementar en el mismo equipo que se tiene disponible en la universidad (UPLC) y el material vegetal utilizado pertenecía al género *Zephyranthes*. Sus resultados en cuanto a la identificación de los metabolitos se hizo además, empleando la técnica de Espectrometría de Masas, lo cual le aporta un grado de confiabilidad significativo donde los máximos corresponden verdaderamente a los alcaloides identificados. Ver **Anexo 2**.

El orden en como se encuentran los alcaloides va en orden de tiempo (menor a mayor) para mejorar la comprensión de los datos. La biblioteca se construyó de la siguiente manera:

Biblioteca de espectros UV <i>Amaryllidaceae</i>			
COMPUESTO	TIEMPO RETENCIÓN	MÁXIMOS	
Alcaloide 5	1,775	240,0	288,7
Alcaloide 6	1,871	240,0	291,0
Alcaloide 27	1,942	238,8	291,0
Alcaloide 31	1,997	240,0	291,0
Alcaloide 26	2,032	238,8	291,0
Alcaloide 34	2,057	241,2	288,7
Alcaloide 32	2,258	231,7	281,5
Alcaloide 1	2,332	238,8	291,0
Alcaloide 22	2,562	242,4	289,8
Alcaloide 11	2,568	231,7	281,5
Alcaloide 2	2,615	231,7	280,3
Alcaloide 23	2,723	242,4	287,5
Alcaloide 30	2,816	243,5	287,5
Alcaloide 24	2,962	242,2	288,7
Alcaloide 3	2,968	244,7	289,8
Alcaloide 25	2,991	240,0	291,0
Alcaloide 33	3,012	241,2	288,7
Alcaloide 12	3,047	241,2	288,7
Alcaloide 29	3,135	242,4	289,8
Alcaloide 7	3,187	240,0	291,0

Alcaloide 28	3,214	240,0	291,0
Alcaloide 18	3,248	240,0	289,8
Alcaloide 13	3,256	242,4	291,0
Alcaloide 10	3,372	237,6	289,8
Alcaloide 4	3,392	243,5	288,7
Alcaloide 9	3,454	238,8	289,8
Alcaloide 16	4,216	240,0	291,0
Alcaloide 17	4,446	238,8	291,0
Alcaloide 8	4,684	241,2	291,0
Alcaloide 21	5,044	240,0	291,0
Alcaloide 20	5,287	240,0	288,7
Alcaloide 19	5,321	238,8	288,7
Alcaloide 14	6,141	263,0	
Alcaloide 15	6,849	263,0	

Tabla 5. Datos de la biblioteca creada a partir de las fracciones purificadas, en orden de menor a mayor según el tiempo de retención.

7.3 Análisis de los datos obtenidos en la biblioteca espectral de Amaryllidaceae

Según los datos obtenidos, se logró identificar la presencia de 34 alcaloides en las muestras analizadas para este proyecto de investigación.

Este número de alcaloides podría variar ya que existen valores muy cercanos que podrían ser los mismos compuestos, pero ahora es imposible determinar si se trata de moléculas diferentes o si son iguales. Un ejemplo de estos datos son los Alcaloides 7 y 28:

Compuesto	Tiempo Retención	Máximos	
Alcaloide 7	3,187	240,0	291,0
Alcaloide 28	3,214	240,0	291,0

Tabla 6. Datos de los máximos de absorción y tiempos de retención de los alcaloides incluidos en la biblioteca.

Estas dos moléculas presentan los mismos valores para absorbancia y tiempos de retención aproximados.

Sin embargo, si se comparan estos datos con los valores teóricos reportados se puede apreciar que también existe cercanía entre estos parámetros.

Compuesto	Tiempo Retención	Máximos	
Licorina	1.91	232	288
Licoramina	2.11	232	286

Tabla 7. Datos de referencia para los máximos de absorción y tiempos de retención extraídos del artículo de referencia. (Deepali Katoch, 2012).

Bajo esta observación y como se puede ver en la **Tabla 5**, se decidieron añadir como alcaloides diferentes, aquellos compuestos que presentaran valores parecidos entre estos parámetros de identificación, ya que el método de identificación empleado no aporta un criterio fuerte para decidir si incluir o rechazar algunos datos obtenidos.

Si se realiza un análisis más detenido y una comparación minuciosa entre los máximos de absorción incluidos en la biblioteca de aquellos compuestos que se presentan con mayor frecuencia en las muestras con respecto a los valores de referencia, se puede establecer la siguiente similitud y correspondencia de los compuestos encontrados:

Datos Experimentales				Datos del Artículo			
Compuesto	Tiempo R	Máximos		Compuesto	Tiempo R	Máximos	
Alcaloide 15	6,85	263,0		Tortuosina	6,80	263	
Alcaloide 14	6,14	263,0		Tipo Licorina	6,14	263	
Alcaloide 11	2,57	231,7	281,5	Licoramina	2,11	232	286
Alcaloide 26	2,03	238,8	291,0	Dihidrovitatina	2,27	238	285
Alcaloide 30	2,82	243,5	287,5	Hamaina	2,74	237	287
Alcaloide 25	2,99	240,0	291,0	Licoramina-N-oxido	2,45	240	281
Alcaloide 9	3,45	238,8	289,8	Tipo hemantamina	3,68	239	288
Alcaloide 29	3,14	242,4	289,8	Hemantamina	3,95	243	290
Alcaloide 33	3,01	241,2	288,7	Ambelina	3,74	243	289
Alcaloide 4	3,39	243,5	288,7	Crinamidina	3,80	244	288
Alcaloide 16	4,22	240,0	291,0	Vitatina	4,12	245	292
Alcaloide 17	4,45	238,8	291,0	Zefbetaina	4,50	239	277
Alcaloide 19	5,32	238,8	288,7	Pancratistatina	5,60	238	277

Tabla 8. Comparación entre los tiempos de retención y máximos de absorción de la biblioteca con los datos reportados en el artículo “Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1-6”.

Al presentar los datos como aparecen en la **Tabla 8** se puede evidenciar que existe alguna similitud entre ciertos valores y se podría pensar que aquellos alcaloides son los que están presentes en las muestras que se emplearon para este proyecto. Sin embargo es inadecuado afirmar que por ejemplo el Alcaloide 29 es Hemantamina ya que para esto necesitaríamos una identificación más precisa que nos permita llegar a esta conclusión (podría acompañarse de espectrometría de masas y su mecanismo de fragmentación a diferentes voltajes)

Los alcaloides 15 y 14, son los valores más cercanos a los reportados en comparación con los demás datos y fueron los más comunes entre todas las muestras analizadas ya que en la mayoría aparecen y se mantienen los mismos valores para los máximos y tiempos de retención.

Al haber creado la biblioteca y revisar los resultados obtenidos por cada muestra se observa que aquellas moléculas extraídas se identificaron con el Alcaloide seleccionado por el software teniendo en cuenta el ajuste de la librería.

Todos los picos identificados cumplen con los criterios de pureza indicando que son puros ópticamente y que el analito de interés no se encuentra con otro compuesto coeluyendo (Purity Angle menor que Purity Threshold). Así mismo, los alcaloides reconocidos por la biblioteca cumplen con el ángulo de ajuste que realiza el software (Match Angle menor que el Match Threshold), demostrando que el analito identificado a ese tiempo de retención y con los máximos de absorción que presenta es igual y corresponde al compuesto de la biblioteca.

Algunos analitos que presentaban tiempos de retención parecidos, máximos de absorción iguales a los alcaloides de la biblioteca y cumplían con el criterio de pureza, no se identificaron con el compuesto correspondiente al de la biblioteca. Lo anterior no significa que no se trate de la misma molécula ya que probablemente sí lo es. Este inconveniente no se logró resolver al hacer los ajustes necesarios y se desconoce el motivo por el cual se presentó (Ver resultados en el **Anexo 3**).

Una ilustración de los resultados obtenidos se presenta a continuación (ejemplo de muestras 20, 36, 71 de los orígenes 1, 3 y 6 respectivamente. Ver el **Anexo 3**

➤ Muestra IA-020

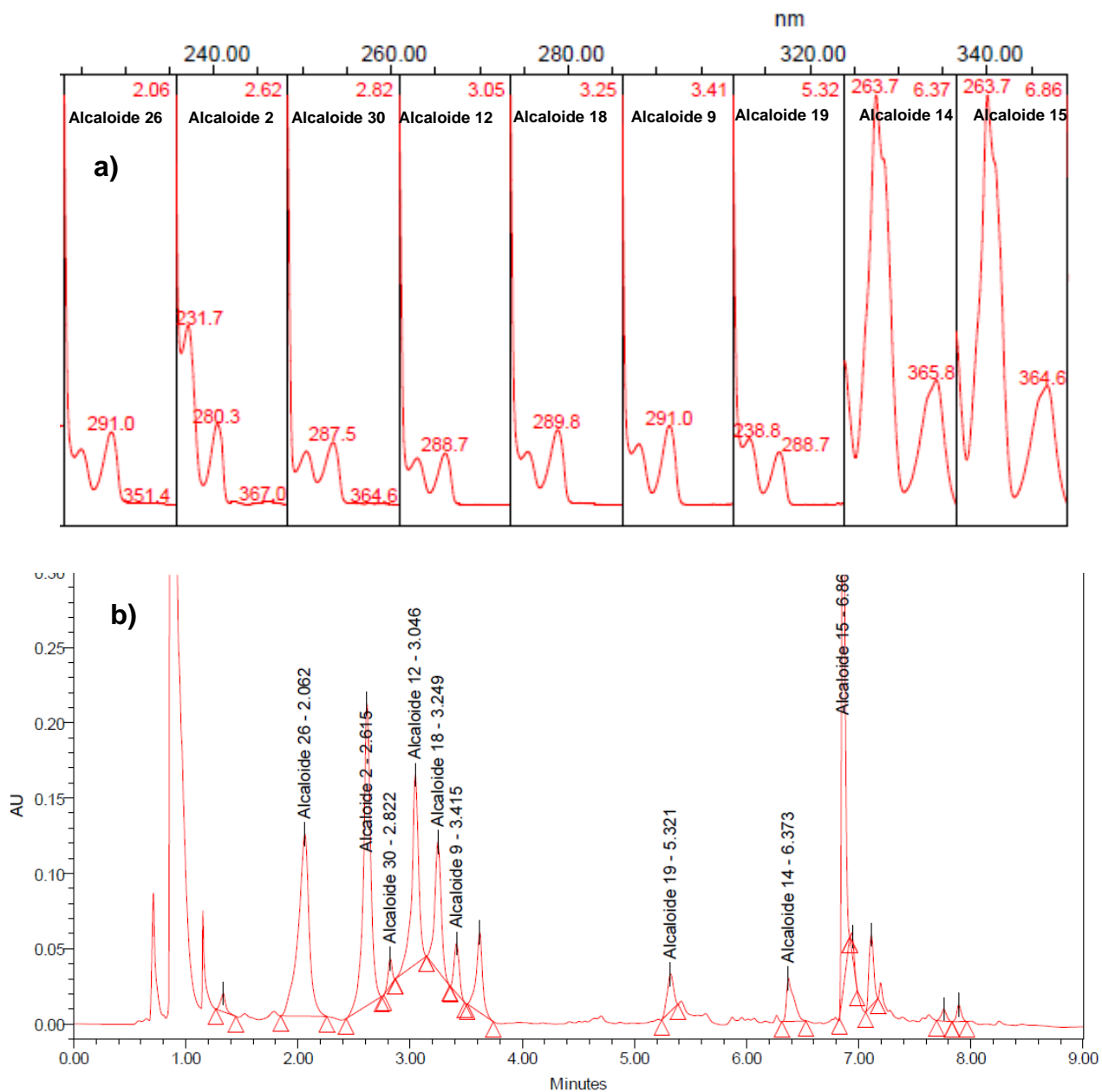
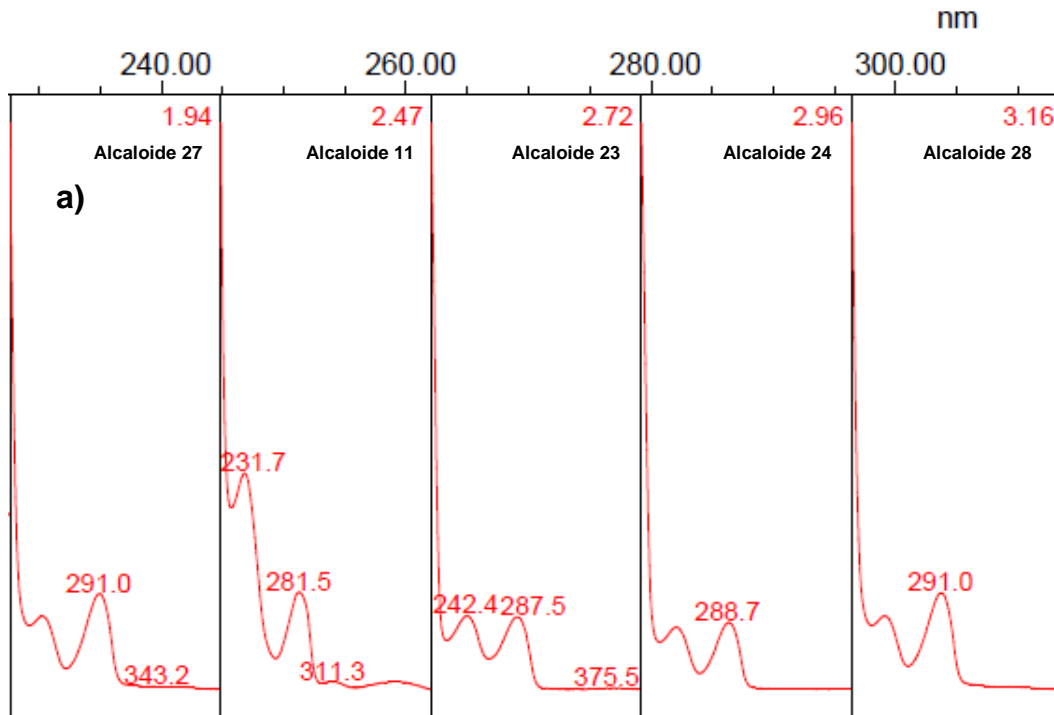


Figura 13. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-020, en la cual se identificaron los Alcaloide 26, 2, 30, 12, 18, 9, 19, 14 y 15.

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-020	2,062	238,8-291,0	5,664	59,616	Alcaloide 26	3,536	39,639
	2,615	231,7-280,3	9,33	30,155	Alcaloide 2	0,000	20,367
	2,822	243,5-287,5	6,026	90,000	Alcaloide 30	5,506	90,000
	3,046	241,2-288,7	22,94	90,000	Alcaloide 12	0,000	44,769
	3,249	240,0-289,8	19,342	90000	Alcaloide 18	0,000	90,000
	3,415	238,8-291,0	5,810	90,000	Alcaloide 9	5,448	90,000
	5,321	238,8-288,7	9,439	90,000	Alcaloide 19	0,313	90,000
	6,373	263,7	13,325	90,000	Alcaloide 14	4,580	32,428
	6,86	263,7	1,684	3,788	Alcaloide 15	0,433	2,990

Tabla 9. Alcaloides identificados en la muestra IA-020, con los respectivos ángulos de pureza y similitud entre los Alcaloides de la biblioteca.

➤ Muestra IA-036



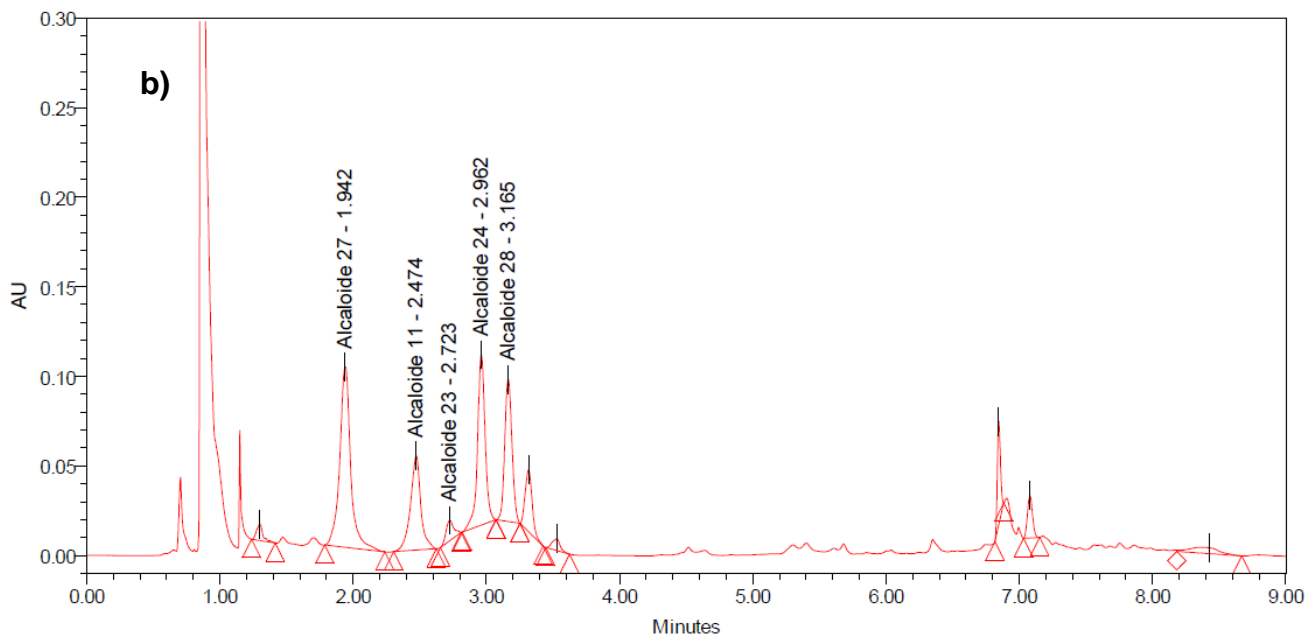


Figura 14. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-036, en la cual se identificaron los Alcaloides 27, 11, 23, 24, 28.

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Biblioteca	Match Angle	Match Threshold
IA-036	1,942	238,8-291,0	6,633	90,000	Alcaloide 27	0,000	41,085
	2,474	231,7-281,5	4,016	90,000	Alcaloide 11	7,644	50,458
	2,723	242,4-287,5	5,028	90,000	Alcaloide 23	0,126	90,000
	2,962	242,4-288,7	4,335	90,000	Alcaloide 24	0,000	34,826
	3,165	240,0-291,0	5,965	80,346	Alcaloide 28	6,601	90,000

Tabla 10. Alcaloides identificados en la muestra IA-036, con los respectivos ángulos de pureza y similitud entre los Alcaloides de la biblioteca.

➤ Muestra IA-071

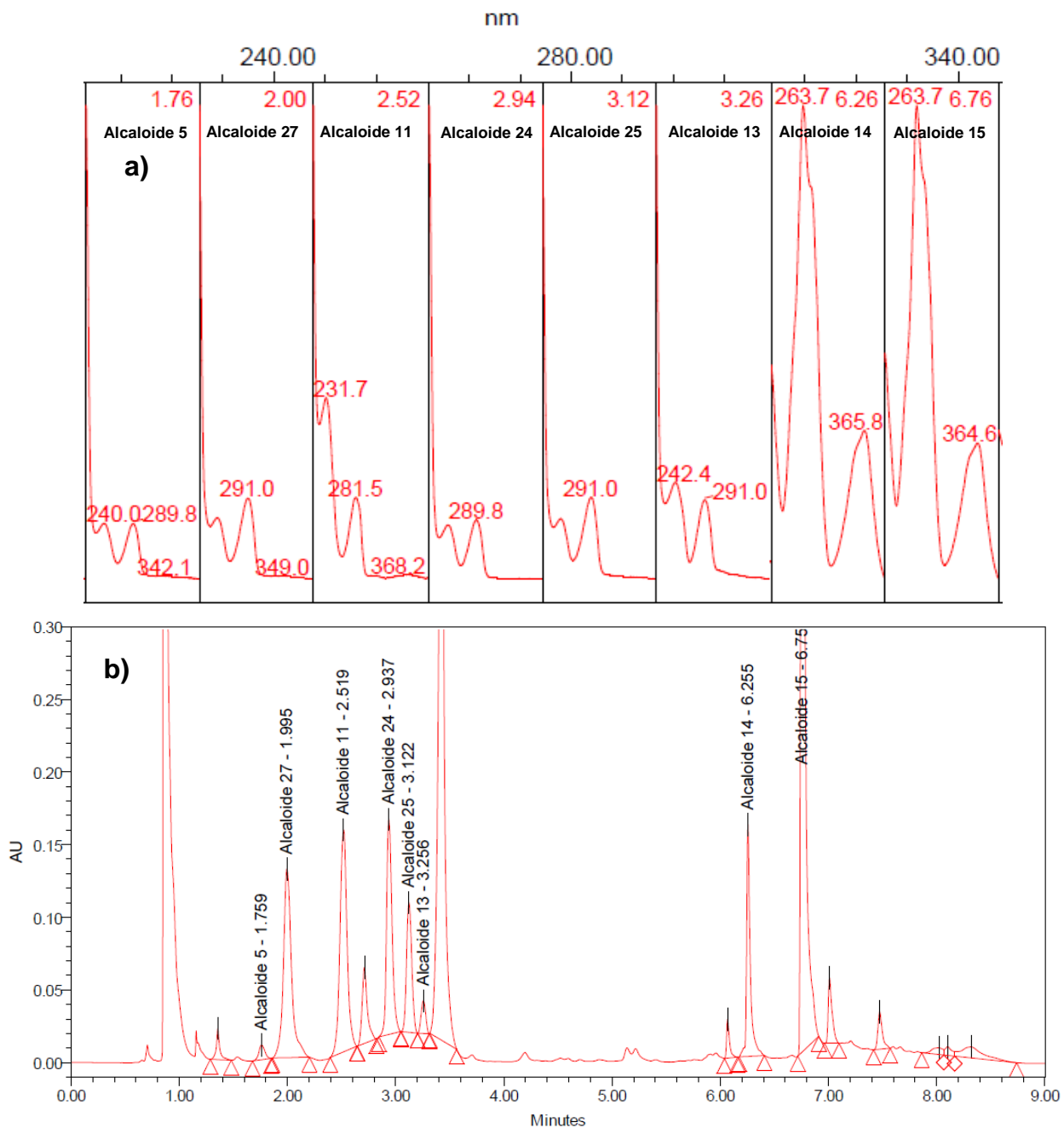


Figura 15. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-071, del cual se identificaron los Alcaloides 5, 27, 11, 24, 25, 13, 14 y 15.

Muestra	T Retención	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-071	1,759	240,0-288,7	6,766	90,000	Alcaloide 5	3,990	90,000
	1,995	240,0-291,0	6,872	90,000	Alcaloide 27	3,163	47,405
	2,519	231,7-2,81,5	7,370	61,461	Alcaloide 11	7,019	40,528
	3,122	240,0-291,0	5,846	90,000	Alcaloide 25	5,051	67,005
	3,256	242,4-291,0	10,195	90,000	Alcaloide 13	0,194	90,000
	6,255	263,3	1,253	25,397	Alcaloide 14	0,577	9,791
	6,757	263,3	0,615	4,493	Alcaloide 15	1,036	2,851

Tabla 11. Alcaloides identificados en la muestra IA-071, con los respectivos ángulos de pureza y similitud entre los Alcaloides de la biblioteca.

Se evidenció que existen diferencias en cuanto a los datos de la biblioteca de la **Tabla 5** con respecto a los presentados en el artículo de referencia en la **Tabla 3** que pueden describen a continuación:

En cuanto a los tiempos de retención, son un parámetro cromatográfico que no es exactamente reproducible, sin embargo son una característica diferenciadora de cada molécula y si se emplea el mismo método de separación y la misma fase móvil, debe observarse una similitud entre estos valores. Esto se aplica para los datos obtenidos en este trabajo, ya que los tiempos se aproximan a los reportados en la literatura y los analitos eluyen en la zona esperada como se señala en la **Figura 16** donde se aprecia que la mayoría de las moléculas de interés se encuentran concentradas entre los tiempos de retención de 2 a 4 minutos.

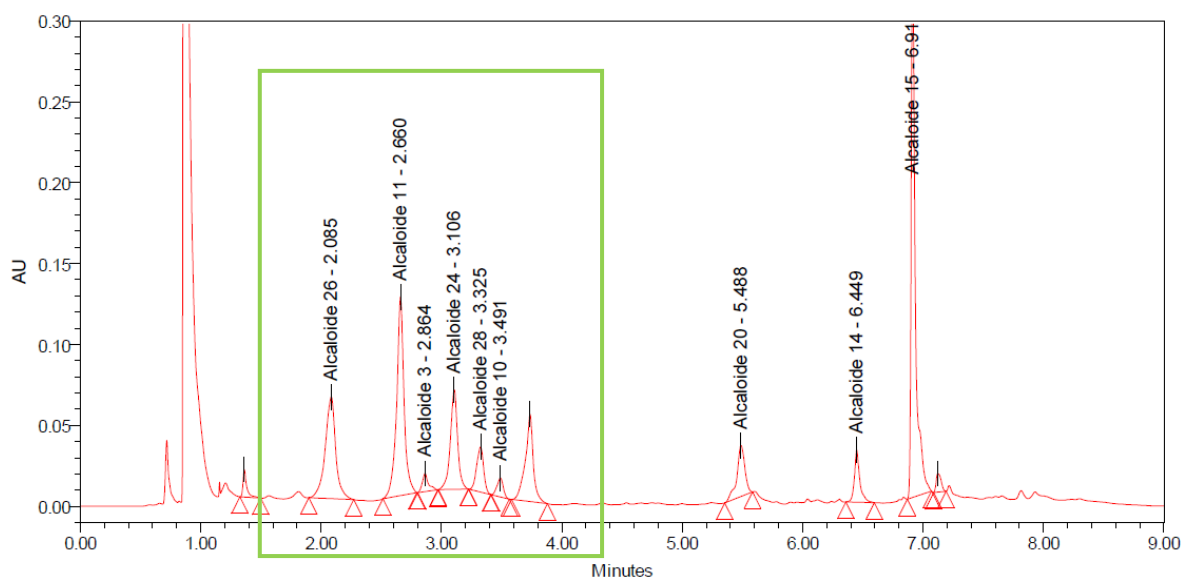


Figura 16. Cromatograma obtenido para la muestra IA-026. Se identificaron los alcaloides 26, 11, 3, 24, 28, 10, 20, 14 y 15, donde la mayoría se encuentran en la region de 2 a 3 min.

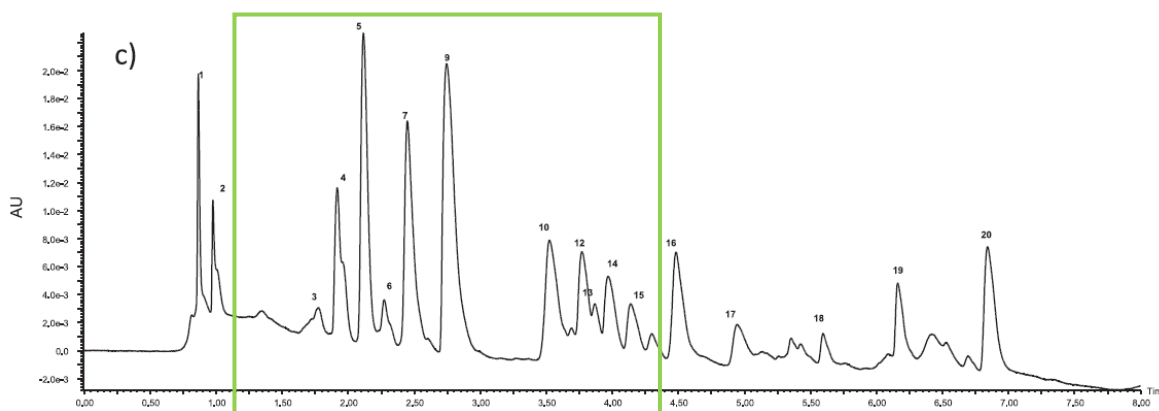


Figura 17. Cromatograma obtenido con muestras recolectadas en temporada lluviosa. Extraído de “Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 1-6”. (Deepali Katoch, 2012).

Con respecto a los máximos de absorción, se pueden presentar diferencias por varias razones. Primero, la absorbancia es un factor que depende proporcionalmente de la concentración y esta última depende de las condiciones ambientales y factores de estrés a los que se encuentra expuesta la planta. Con

un alto grado de probabilidad las concentraciones de alcaloides para las muestras de este trabajo, son diferentes a de las en las muestras tomadas como referencia. A pesar de que las plantas pertenecen al mismo género, las que proporcionaron el valor teórico han sido recolectadas en la India en diferentes estaciones del año a diferencia de las recolectadas en Colombia donde no se tienen las mismas condiciones ambientales.

Si los alcaloides de las muestras analizadas en comparación con los identificados en las muestras que fueron empleadas en el artículo son los mismos, las consideraciones que se presentaron anteriormente pueden explicar las diferencias entre los parámetros de identificación. Esto puede ser posible ya que son núcleos comunes a la familia Amaryllidacea y seguramente coinciden en gran parte en su composición química.

Sin embargo, en el caso de que estas incompatibilidades en los valores correspondan a que se están identificando otros compuestos diferentes en las muestras con las que se realizó este trabajo, lo cual también es muy posible, no se puede determinar con exactitud ahora ya que se necesitaría otro método de identificación como la espectrometría de masas con el cual estas dudas se despejarían.

7.4. Mejoras realizadas al método de separación de los alcaloides.

Para el mejoramiento de los cromatogramas, se realizó un cambio en la columna empleada. Inicialmente se había trabajado con una columna **C₁₈ BEH** (2.1mm x 100mm, 1.7 μ m), igual a la utilizada en el artículo, pero los picos obtenidos presentaban coleo, fenómeno característico de moléculas básicas en este tipo de columnas.

Al ser moléculas básicas cuando están en medio ácido (Fase móvil: Acido fórmico al 0.5%) se encuentran protonadas o con cargas y por tanto se recomienda el uso de una columna con superficie cargada (Charged Surface Hybrid) **CSH** (2.1mm x 100mm, 1.7 μ m), ya que se conforma de partículas híbridas con una carga superficial de bajo nivel, diseñadas especialmente para el mejoramiento de esta capacidad que presentan los analitos y para el mejoramiento de la asimetría de pico cuando se emplean fases móviles iónicas de baja resistencia. Esta configuración mantiene simultáneamente la estabilidad mecánica y química que presentan las columnas BEH (Ethylene Bridged Hybrid) (Waters CSH, 2013), que son empleadas para cromatografía de fase inversa, de interacción hidrofóbica y en rangos de pH de 1 a 12, proporcionando una mayor retención de compuestos

fenólicos en comparación con columnas alquilo de cadena lineal (Waters BEH, 2013).

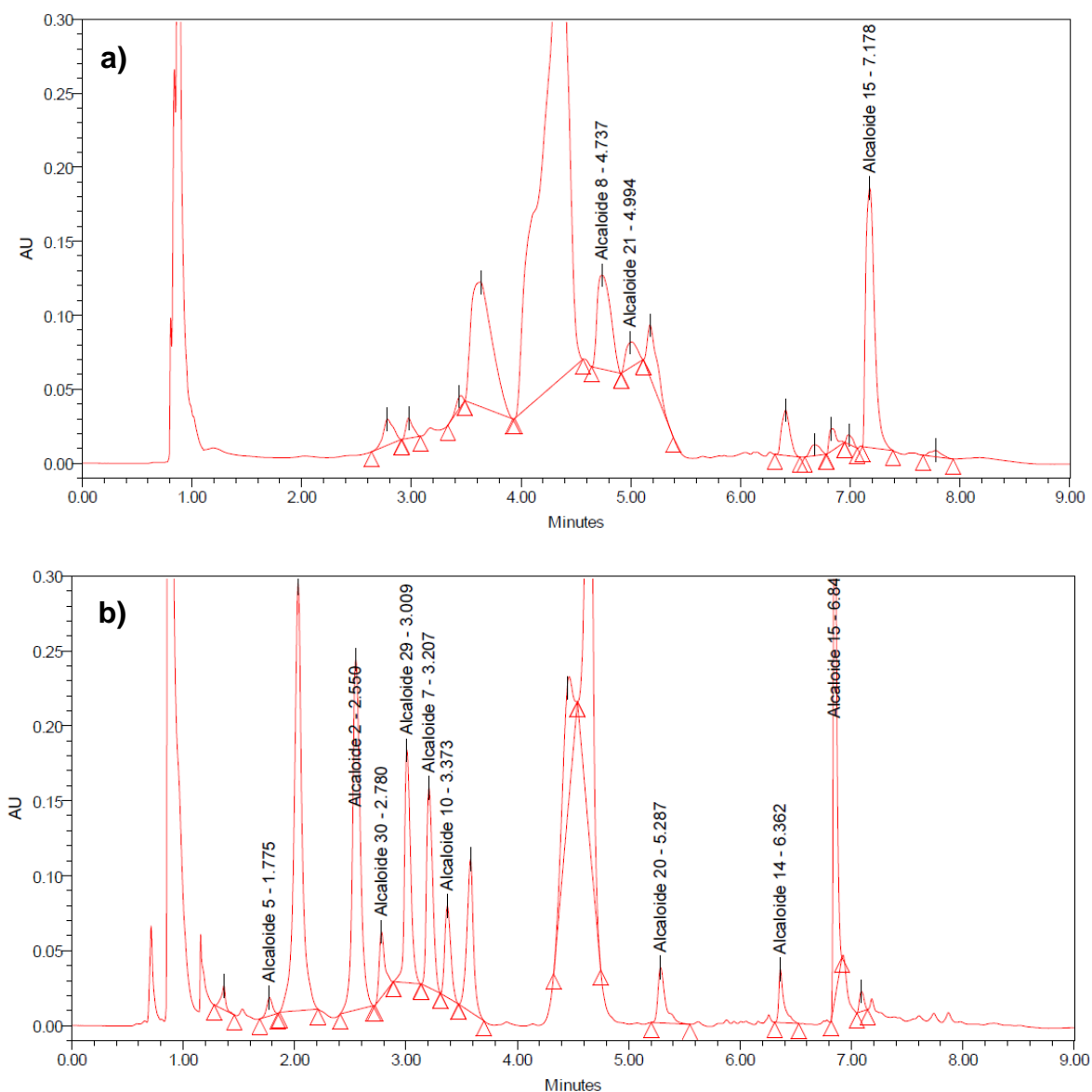


Figura 18. a) Cromatograma de la muestra IA-022 empleando una columna BEH. **b)** Cromatograma de la muestra IA-022 empleando una columna CSH.

Se puede evidenciar en esta imagen, un mejoramiento en la forma de los picos, cuando se realiza el cambio en la columna y un mejoramiento en la retención de los analitos, proporcionando mejores resultados en **b)** con la columna CSH. Las dos muestras se analizaron en el UPLC con la misma fase móvil y manteniendo las mismas condiciones cromatográficas.

Con los resultados presentados hasta el momento, se han cumplido dos objetivos de este trabajo de investigación. En la primera parte se demostró de forma cualitativa, que el método empleado era adecuado para lograr la extracción de los alcaloides y que el órgano de la planta para realizar los procesos experimentales también contenía estos metabolitos. En la segunda parte, se creó la biblioteca y se logró la identificación de los alcaloides en cada una de las muestras analizadas.

Este trabajo se realizó de forma cualitativa ya que en principio no se conocían los alcaloides que pueden tener las plantas del género en estudio y no se tenían disponibles los estándares de los mismos que permitieran realizar una caracterización cuantitativa. Además, aunque se utilizara un equipo de alta tecnología que aporta unos estándares de separación y resolución de pico elevados (UPLC), el sistema de detección no era lo suficientemente sensible para el reconocimiento de estos compuestos.

7.5 Comparación entre los alcaloides de las diferentes procedencias.

Con los datos obtenidos anteriormente se realizó la comparación entre los diferentes orígenes respecto al contenido de alcaloides y se pueden identificar las similitudes de la composición química en las muestras de *Zephyranthes*. En la tabla que se muestra a continuación se observa cuáles fueron los alcaloides identificados en cada uno de los orígenes y el porcentaje de aparición que indica la frecuencia con la que se presentaron en cada uno de estos.

Compuesto	Tiempos de Retención	Máximos		Ori 1	Ori 3	Ori 4	Ori 6	Ori 7	Porcentaje de Aparición
Alcaloide 5	1,775	240,0	288,7	x			x		40
Alcaloide 6	1,871	240,0	291,0			x			20
Alcaloide 27	1,994	238,8	291,0		x		x		40
Alcaloide 31	1,997	240,0	291,0			x			20
Alcaloide 26	2,032	238,8	291,0	x		x			40
Alcaloide 34	2,057	241,2	288,7	x					20
Alcaloide 32	2,258	231,7	281,5			x			20
Alcaloide 1	2,332	238,8	291,0	x					20
Alcaloide 22	2,562	242,4	289,8					x	20
Alcaloide 11	2,568	231,7	281,5	x	x	x	x		80

Alcaloide 2	2,615	231,7	280,3	x					20
Alcaloide 23	2,723	242,4	287,5		x				20
Alcaloide 30	2,816	243,5	287,5	x		x			40
Alcaloide 24	2,962	242,2	288,7	x	x	x	x	x	100
Alcaloide 3	2,968	244,7	289,8	x					20
Alcaloide 25	2,991	240,0	291,0			x	x	x	60
Alcaloide 33	3,012	241,2	288,7	x		x			40
Alcaloide 12	3,047	241,2	288,7	x		x			40
Alcaloide 29	3,135	242,4	289,8	x					20
Alcaloide 7	3,187	240,0	291,0	x					20
Alcaloide 28	3,214	240,0	291,0	x	x	x			60
Alcaloide 18	3,248	240,0	289,8	x					20
Alcaloide 13	3,256	242,4	291,0				x		20
Alcaloide 10	3,372	237,6	289,8	x					20
Alcaloide 4	3,392	243,5	288,7	x					20
Alcaloide 9	3,454	238,8	289,8	x		x			40
Alcaloide 16	4,216	240,0	291,0	x				x	40
Alcaloide 17	4,446	238,8	291,0	x					20
Alcaloide 8	4,684	241,2	291,0	x					20
Alcaloide 21	5,044	240,0	291,0	x					20
Alcaloide 20	5,287	240,0	288,7	x					20
Alcaloide 19	5,321	238,8	288,7	x					20
Alcaloide 14	6,141	263,0		x		x	x	x	80
Alcaloide 15	6,849	263,0		x		x	x	x	80

Tabla 12. Comparación entre los alcaloides encontrados en los 5 orígenes de las muestras.

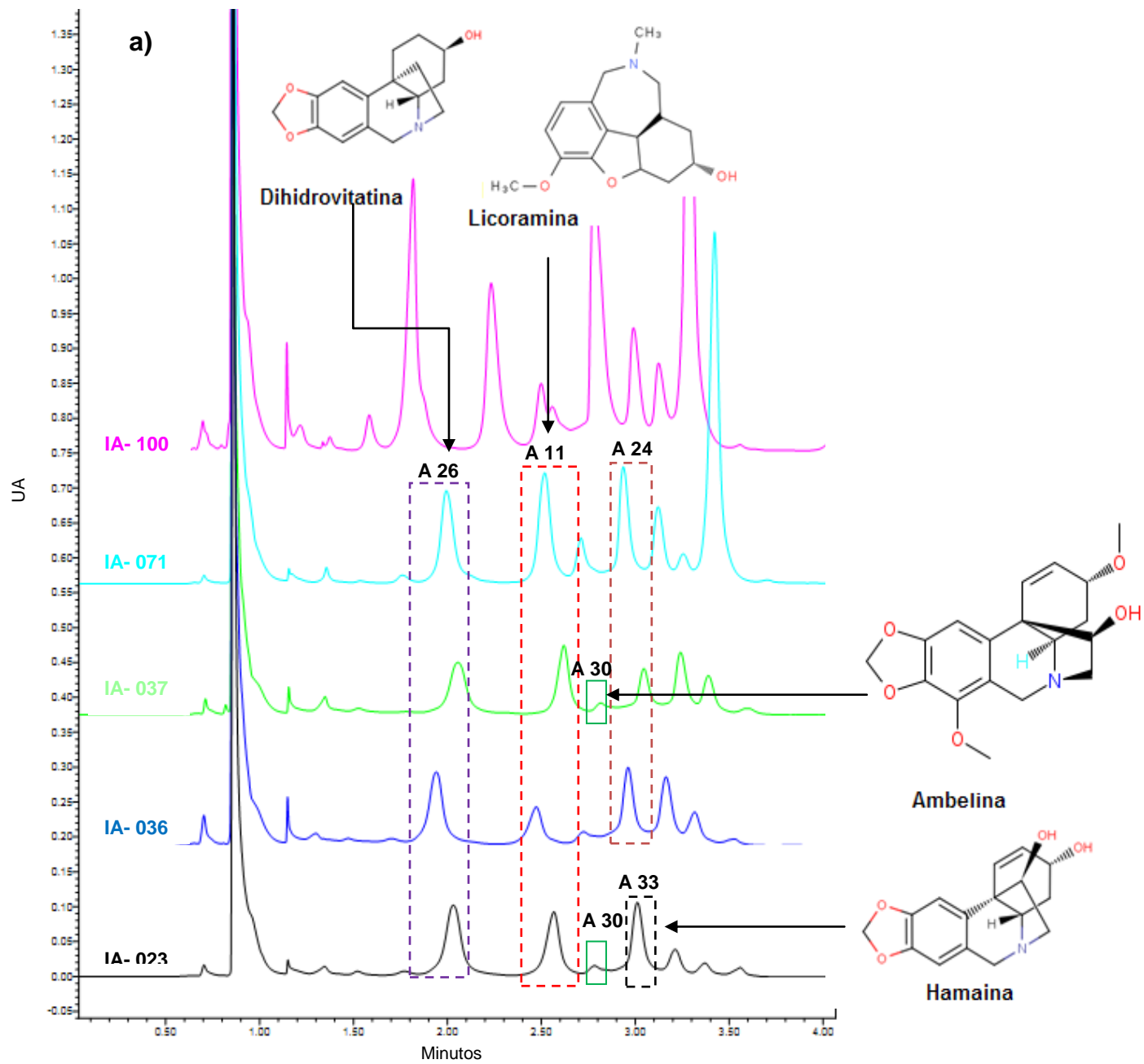
A partir de la información que brinda la tabla anterior se pueden establecer los componentes principales entre las procedencias y realizar nuevamente una comparación con los datos de referencia como se realizó en la **Tabla 8**.

Compuesto	Compuesto Referencia	Tiempo de Retención	Máximos		Ori 1	Ori 3	Ori 4	Ori 6	Ori 7	Porcentaje de Aparición
Alcaloide 24	Desconocido	2,962	242,2	288,7	x	x	x	x	x	100
Alcaloide 26-27	Dihidrovitatina	2,032	238,8	291,0	x	x	x	x		80
Alcaloide 11	Licoramina	2,568	231,7	281,5	x	x	x	x		80
Alcaloide 14	Tipo Licorina	6,141	263		x		x	x	x	80
Alcaloide 15	Tortuosina	6,849	263		x		x	x	x	80
Alcaloide 25	Licoramina N-Oxido	2,991	240	291			x	x	x	60
Alcaloide 28	Desconocido	3,21	240	291	x	x	x			60

Tabla 13. Componentes principales encontrados en los 5 orígenes del género *Zephyranthes* en comparación con los compuestos de referencia encontrados en el artículo: “Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1-6”.

Los alcaloides 26 y 27 se tomaron como un sólo compuesto ya que al analizar nuevamente los datos de la librería, se observa que estos presentan tiempos muy similares y los mismos valores de absorbancia. Un argumento que puede justificar lo anterior es que debido a que la identificación de estos compuestos se hizo sobre la fracción total de alcaloides, la presencia de un gran número de moléculas puede ocasionar el solapamiento entre ellas generando las variaciones entre estos parámetros.

Los cromatogramas que se muestran a continuación, correspondientes a las muestras IA-023, IA-036, IA-037, IA-071, IA-100 de los orígenes 1, 3, 4, 6 y 7 respectivamente, representan las similitudes y los componentes principales de la **Tabla 13**. Esta información resulta interesante, ya que se comprueba que a pesar de las diferentes procedencias, los metabolitos secundarios que se expresan en las plantas de este género, comparten algunos de sus marcadores quimiotaxonómicos característicos.



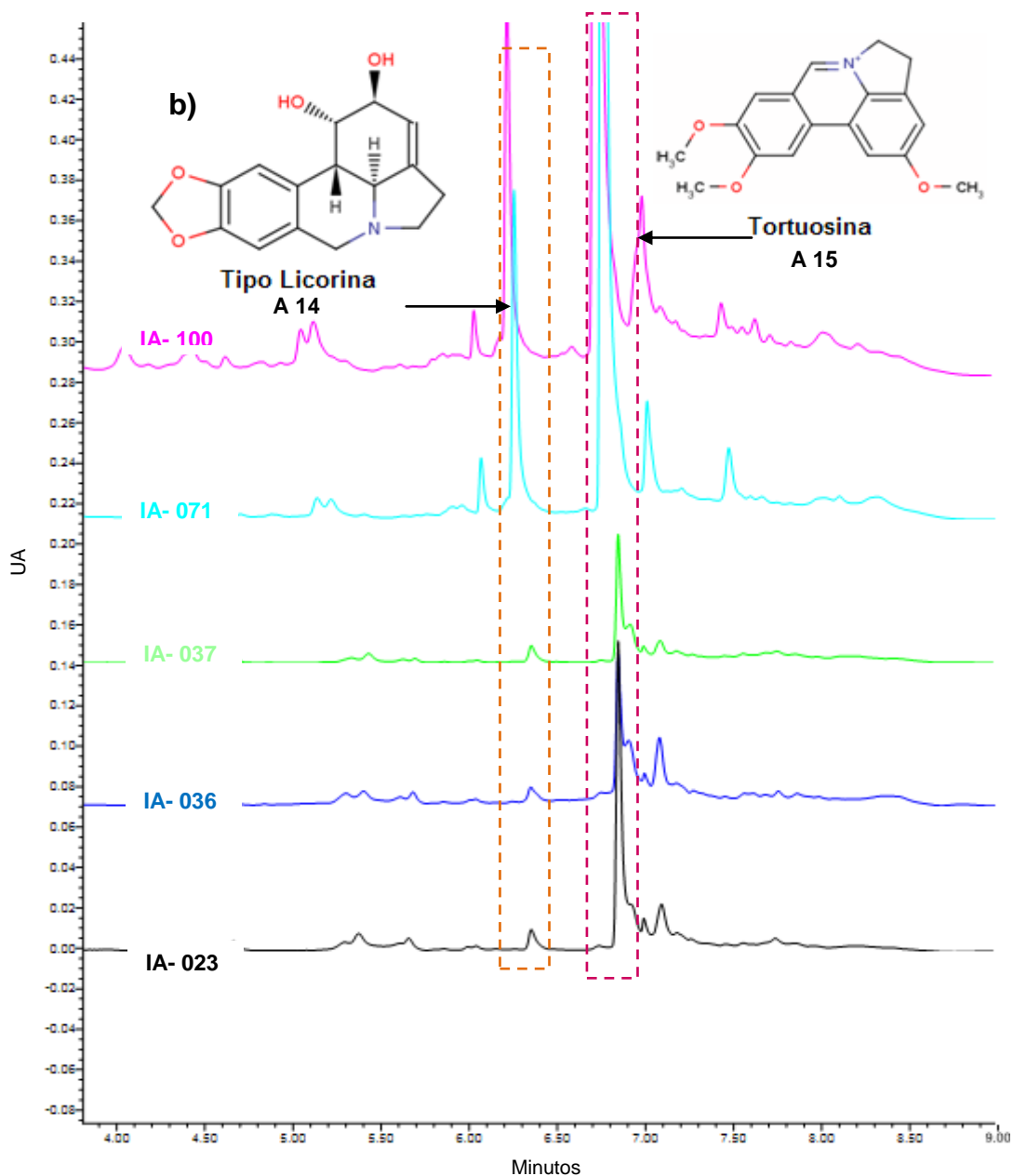


Figura 19. Comparación entre las muestras 23, 36, 37, 71 y 100 de los orígenes 1, 3, 4, 6 y 7 respectivamente. Se identificaron en común los Alcaloides 26, 27, 11, 24, 30 y 33 de a) desde 0.50 min a 4.00 min y los alcaloides 14 y 15 en b) desde 4.00 min a 9.00 min. (A 11: Alcaloide 11 y así mismo para los demás alcaloides).

Al revisar los resultados de cada una de las muestras, se observó que no fue posible comparar los máximos de absorción ni tiempos de retención de las moléculas obtenidas en las muestras de los orígenes 2, 5 y 8 de Tuluá,

Barranquilla e Ibagué respectivamente con respecto a los datos reportados en la literatura, ya que no presentaban ninguna similitud. A continuación se muestran algunos de los resultados observados:

Muestra: IA-035

Origen: 2

Procedencia: Tuluá

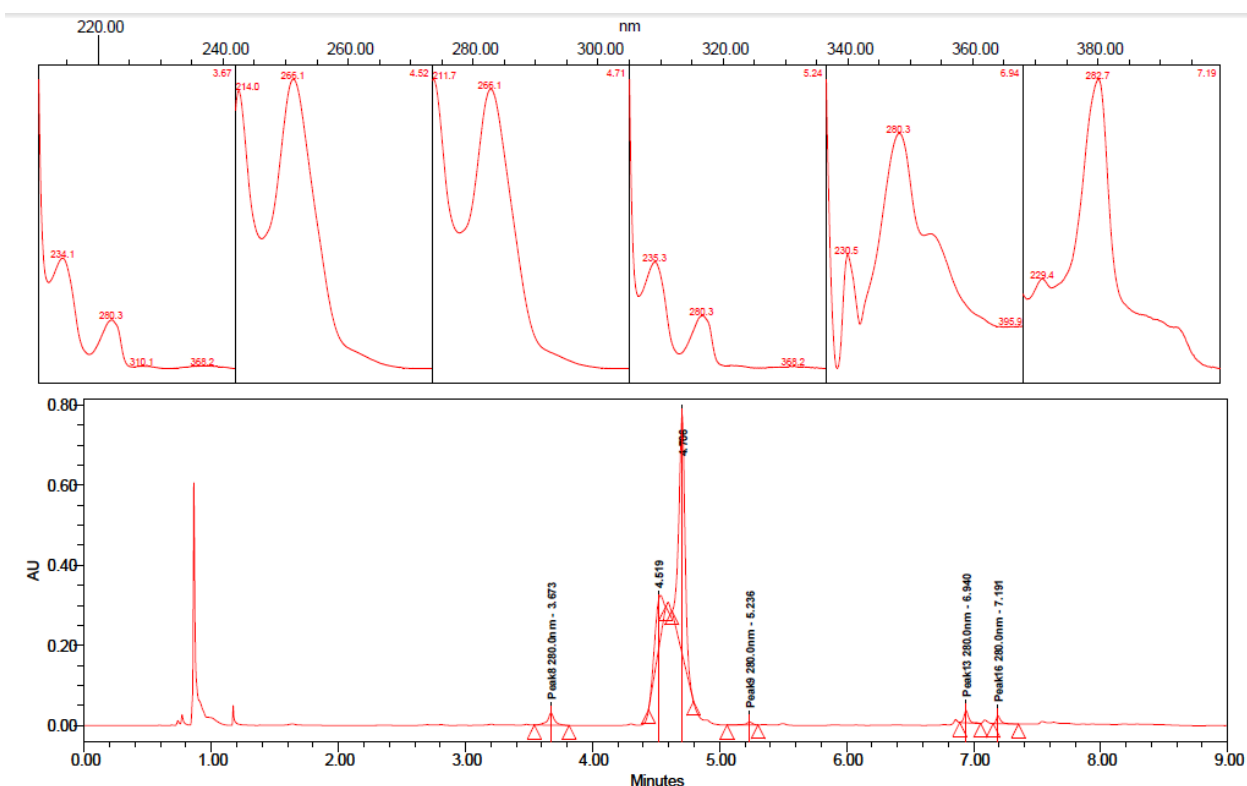


Figura 20. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-035

Muestra	t Ret	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-035	1,172	236,4-288,3	-	-	-	-	-
	3,673	234,1-280,3	-	-	-	-	-
	4,519	214,0-266,1	-	-	-	-	-
	4,706	211,7-266,1	-	-	-	-	-
	6,940	230,5-280,3	-	-	-	-	-
	7,191	228,2-282,7	-	-	-	-	-

Tabla 14. Resultados obtenidos de la muestra IA-035.

Muestra: IA-045
 Origen: 5
 Procedencia: Barranquilla

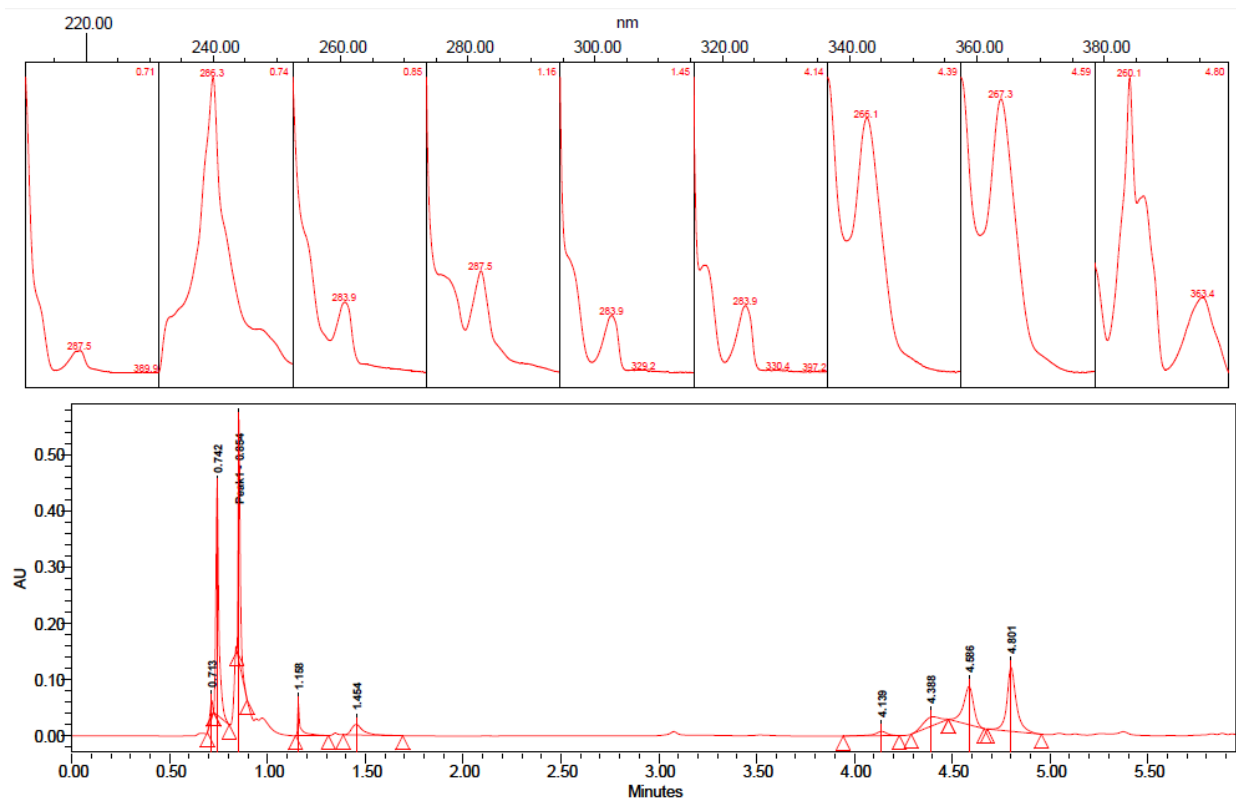


Figura 21. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-045.

Muestra	t Ret	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-045	0,742	286,3	-	-	-	-	-
	0,854	283,9	-	-	-	-	-
	1,158	287,5	-	-	-	-	-
	1,454	289,3	-	-	-	-	-
	4,139	283,9	-	-	-	-	-
	4,388	266,1	-	-	-	-	-
	4,586	267,3	-	-	-	-	-
	4,801	260,1	-	-	-	-	-

Tabla 15. Resultados obtenidos de la muestra IA-045.

Muestra: IA-113
 Origen: 8
 Procedencia: Ibagué

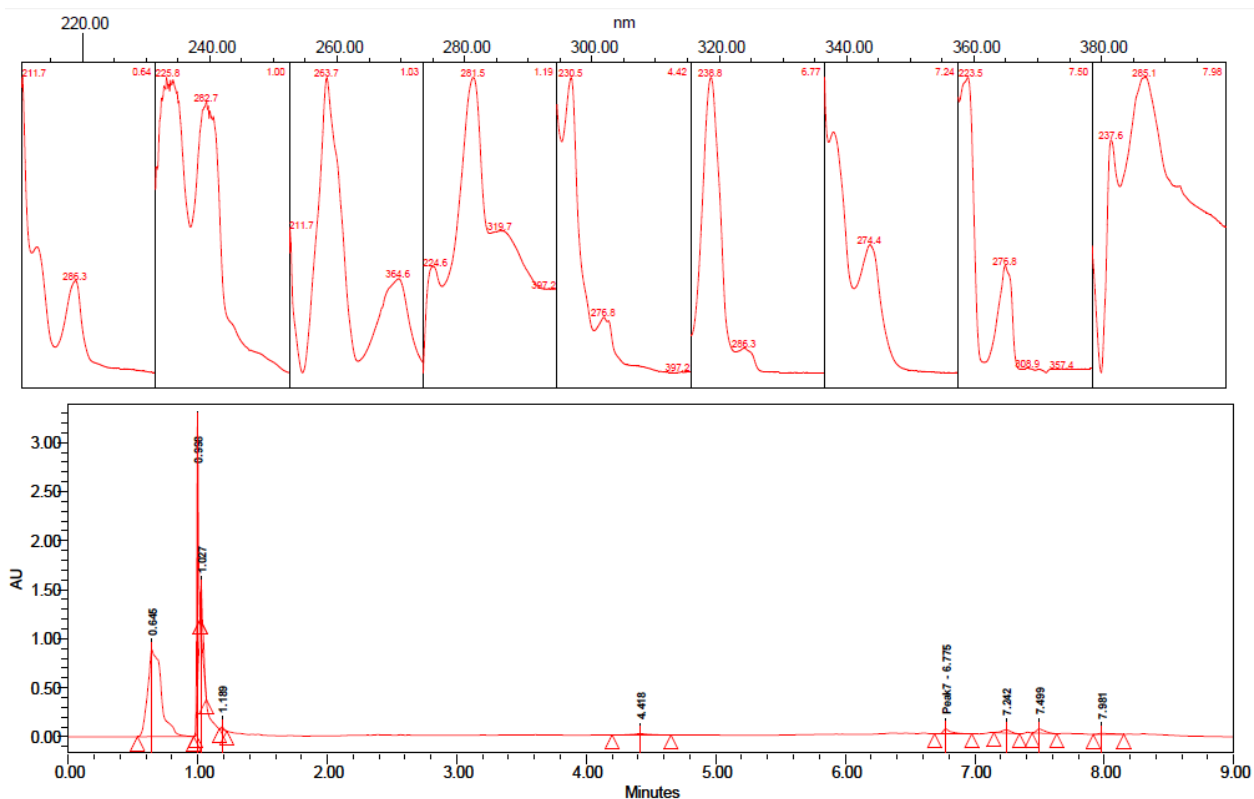


Figura 22. Cromatograma y espectros de absorción obtenidos en la muestra IA-113.

Muestra	t Ret	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Biblioteca	Match Angle	Match Threshold
IA-113	0,998	225,8-282,7	-	-	-	-	-
	1,027	263,7-364,6	-	-	-	-	-
	1,189	224,6-281,5	-	-	-	-	-
	4,418	230,5-276,8	-	-	-	-	-
	6,775	238,8-286,3	-	-	-	-	-

Tabla 16. Resultados obtenidos de la muestra IA-113.

Los datos obtenidos en estas muestras no se consideraron al momento de crear la biblioteca de espectros y ninguno de sus analitos fue identificado por los datos de la misma. Se decidieron descartar ya que como se puede apreciar los cromatogramas reflejan que no se logró una adecuada separación de las moléculas y los máximos de absorción no se encuentran dentro del rango característico para los alcaloides de la familia Amaryllidacea.

Todos los análisis que se llevaron a cabo en el UPLC se hicieron al mismo tiempo en un corrido aproximadamente de 8 horas, lo cual puede descartar la posibilidad de que haya ocurrido un problema en el momento que iban atravesando la columna cromatográfica. Además fueron muestras intermedias donde los cromatogramas de las siguientes muestras salieron correctamente y los analitos bien separados con los máximos de absorción característicos.

En cuanto al procesamiento de las muestras a nivel del laboratorio, las extracciones de la fracción total de alcaloides realizadas, se hicieron siempre de la misma forma empleando los mismos reactivos, siguiendo el mismo procedimiento del ítem 6.2.2. Las muestras llevaban un tiempo aproximado de 5 meses en el laboratorio de biotecnología, tiempo en el que se adaptaron al ambiente donde se encontraban y todas las plantas estaban bajo las mismas condiciones ambientales. Por lo anterior, se descartan posibles errores a nivel de experimentación y que estos resultados estén relacionados con la procedencia.

Se podría pensar entonces que los cromatogramas y espectros de absorción UV obtenidos se debieron a condiciones o características inherentes del material vegetal, sin embargo esto no se puede asegurar ya que por cuestiones de tiempo no fue posible realizar un reprocesamiento de estas muestras para determinar si los resultados corresponden ciertamente a las plantas o a otra causa externa.

Finalmente y con todo lo anterior, se pudieron realizar comparaciones entre orígenes y se encontraron similitudes en el componente químico de estas plantas, siendo esto hasta el momento una importante contribución al conocimiento que no se tenía anteriormente sobre este género encontrado en ciertas regiones del país.

La información alcanzada en este proyecto de investigación, es de gran importancia hasta el momento y contribuye al conocimiento sobre estos marcadores quimiotaxonómicos tan importantes, ya que se realizó una caracterización cualitativa de alcaloides presentes en el género *Zephyranthes*, y se logró el establecimiento de la primera biblioteca espectral de Amaryllidacea que servirá de base para futuros estudios que deseen desarrollar un conocimiento más amplio.

8. CONCLUSIONES

- Se logró obtener la fracción de alcaloides a partir de las muestras analizadas ya que esto se confirmó mediante la aplicación de cromatografía planar y se comprobó que el método fue el adecuado para lograr el primer objetivo específico planteado en este proyecto. La reproducibilidad de este método, dependerá de las características del material vegetal y los alcaloides que se presenten en las plantas.
- Se consiguió la separación de los alcaloides mediante la técnica cromatográfica UPLC y el método aplicado en el equipo, obteniendo cromatogramas con una resolución adecuada permitiendo observar los picos correspondientes a los compuestos encontrados en las muestras.
- Se construyó la primera biblioteca espectral de Alcaloides a partir de las plantas que pertenecen al género *Zephyranthes*, conformada por 34 alcaloides identificados cualitativamente mediante los máximos de absorción y tiempos de retención característicos.
- No fue posible definir con certeza a qué tipo de alcaloide correspondía cada una de las moléculas identificadas ya que no se empleó otro sistema de identificación más preciso pero se hizo una aproximación de estos empleando los datos reportados en el artículo de referencia.
- Se establecieron 7 componentes principales de alcaloides en las muestras los cuales se presentan con mayor frecuencia entre los 5 orígenes analizados que demuestran una relación entre sus componentes químicos, sin importar su procedencia.

9. RECOMENDACIONES

- Como la investigación desarrollada en este proyecto de tipo cualitativo, se recomienda que para aportar un mayor conocimiento sobre el contenido de alcaloides en este género de plantas, se realice de forma cuantitativa o empleando un sistema de identificación como Espectrometría de masas.
- Se recomienda que las plantas sean debidamente identificadas con un número de referencia, especie o género y su procedencia respectiva, ya que en este trabajo algunos de los orígenes eran desconocidos al igual que las especies de plantas, ocasionando incertidumbre en cuanto a los resultados obtenidos.

10.REFERENCIAS

- Acosta, G. J. (Junio de 2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados. Medellin, Colombia : Universidad de Antioquia .
- Alpizar, Q. C. (2003). La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa. *Acta Med. Costarrica* , 50-56.
- Antonio Evidente, A. S. (2009). Biological Evaluation of Structurally Diverse Amaryllidaceae. *Planta Med. Author manuscript* , 1-3.
- Antwerp, J. V. (2003). Advanced Detectors For Empower: ELSD, PDA, SQD and TQD.
- Aspe, R. G. (2006). Aislamiento de la morfina. 200 Años de descubrimiento fundamental para la química moderna. *An. Quim* , 1-2.
- Bastida Jaume, S. B. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Transworld Research Network* , 1-3.
- Bruneton, J. (1993). Alcaloides. En J. Bruneton, *Farmacognosia. Fitoquímica Plantas Medicinales* (págs. 775-1073). Zaragoza: Acribia.
- Cabezas Fabio, C. C. *Algunas Especies Colombianas de Amaryllidaceae como fuentes potenciales de Inhibidores de Enzimas*. Universidad de Barcelona, Universidad del Cauca.
- Cabezas, F. B. (2007). ALCALOIDES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, ESPECIES COLOMBIANAS DE AMARYLLIDACEAE. *Scientia et Technica* , 237.
- Calderón Sánchez, E. (2003). *Proyecto Flora Amenazada: Lista Roja de Plantas Fanerógamas de Colombia*. Instituto Alexander-Von-Humboldt.
- Cedrón, M. J.-A.-B. (2010). The Alkaloids . En *Chemistry and Biology of Pancratium Alkaloids* (págs. 2-6). London: Elsevier Inc. .
- CHUAN-LIANG DENG, J. Z.-J.-C.-Y.-D. (2006). Assessment of genetic diversity of *Lycoris longituba* (Amaryllidaceae). *Journal of Genetics* , 1-4.
- Deepali Katoch, S. K. (2012). Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 1-6.

Dionex Corporation. (Septiembre de 2003). PDA-100 PHOTODIODE ARRAY DETECTOR Operator's Manual . United States of America.

Fernandez, J. L. (2004). A new species of *Zephyranthes* Herb. (Amaryllidaceae, Hippeastreae), with notes on the genus in Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc* , 2-10.

Jean, B. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales* (2ª Edición ed.). Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A.

Lucie Cahliková, I. V. (2011). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* , 1-3.

Lucie Cahliková, S. Z. (2011). Isolation and Cholinesterase Activity of Amaryllidaceae Alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Natural Product Communications* , 35-36.

María R. Herrera, A. K. (2001). *Crinane and Lycorane Type Alkaloids*. Barcelona: Universidad de Barcelona. Copyrighted material.

Martín, C. B. (s.f.). *Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano*. Recuperado el 10 de 2013, de <http://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CDYQFjAA&url=http%3A%2F%2Fmaterias.fi.uba.ar%2F6305%2Fdownload%2Fespectrofotometria.pdf&ei=PffBUpxvKIWIkQfV71CoBA&usq=AFQjCNEkeLtXYG-k99bqDjqiKZvWIA0byg&bvm=bv.58187178,d.eW0>

Nina Ronsted, M. R. (2012). Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of amaryllidaceae. *BMC Evolutionary Biology* , 4-5.

Osorio, D. J. (2004-2006). *Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora Colombiana: Alcaloides de *Phaedranassa dubuia* (Amaryllidaceae) y Biflavonoides de *Garcinia madurno* (Clusiaceae)*. Barcelona : Javier Osorio Durango 2008.

Rosembaum, S. (2011). *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics : an integrated textbook and computer simulations*. Canadá: Wiley.

Salvador, F. (1994). *Aislamiento y Caracterización de Alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Producción de Galantamina por Cultivos Invitro de *Narcissus Confusus**. Barcelona: Universidad de Barcelona .

Science Museum . (s.f.). Recuperado el 9 de Mayo de 2013, de Brought to live: <http://www.sciencemuseum.org.uk/broughttolife/people/friedrichserturner.aspx>

Shimadzu Excellence un Science . (s.f.). *Shimadzu*. Recuperado el 4 de 11 de 2013, de <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=empower>

Waters . (2013). *Waters The Science of What's Possible*. Recuperado el 4 de 11 de 2013, de http://www.waters.com/waters/en_US/2998-Photodiode-Array-%28PDA%29-Detector-for-Alliance-HPLC-Systems/nav.htm?cid=1001362&locale=en_US

Waters BEH. (2013). *BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology*. Recuperado el 12 de 2013, de http://www.waters.com/waters/es_ES/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?locale=es_ES&cid=134618172

Waters Corporation. (2005). *Acquity UPLC Photodiode Array Detector, Getting Started Guide*. United States of America .

Waters CSH. (2013). *CSH (Charged Surface Hybrid) Technology*. Recuperado el 12 de 2013, de http://www.waters.com/waters/es_ES/CSH-%28Charged-Surface-Hybrid%29-Technology/nav.htm?locale=es_ES&cid=134618101

Waters. Revision A. (2002). *Empower PDA Software. Getting Started Guide*. United States of America: Waters Corporation.

Xi Zhang, H. H. (2009). *Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from Crinum by HPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Shanghai: RCM, RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY.

11. ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para la Extracción de la Fracción total de Alcaloides.

El procedimiento que se describe a continuación fue llevado a cabo para la extracción de alcaloides en todas las muestras.

1. Se recolectaron las hojas cada uno de los orígenes (entre 1 a 8 hojas) y se lavaron con Extran al 2% y agua para retirar los residuos de tierra y otros materiales extraños.
2. Se maceraron en un mortero, aplicando nitrógeno líquido. Al tener las hojas bien maceradas, se sumergieron en ácido clorhídrico al 5% empleando la cantidad suficiente para cubrir el material vegetal.
3. Se sonicó 5 minutos por triplicado y en cada pausa realizó un proceso de filtración a gravedad.
4. Al filtrado obtenido se le realizó una extracción con cloroformo, empleando una cantidad proporcional al volumen resultado del extracto ácido y se ajito con precaución por 10 minutos. La fase con cloroformo se descartó.
5. Al componente ácido, se le adicionaron unas gotas de Hidróxido de Amonio al 30% para basificar el medio hasta alcanzar un pH aproximadamente de 10.0. Esto se comprobó empleando papel indicador.
6. Al componente básico se le realizó otra extracción con cloroformo, empleado nuevamente una cantidad proporcional al volumen de la muestra. Se dejó en reposo por un tiempo prolongado (aproximadamente 5 horas) para lograr una mejor extracción los alcaloides.
7. La fracción total de alcaloides se concentró en el rotaevaporador a una temperatura no mayor a 50°C, llevando a sequedad.
8. Se aplicó metanol para redissolver el extracto concentrado anteriormente y se filtró para llevar al análisis en el UPLC.

Anexo 2. Tabla de los datos de referencia

Se presentan en esta tabla los tiempos de retención, datos espectrales, patrón de fragmentación de masas y compuestos identificados en *grandiflora Z.* por UPLC-DAD/ESI-MS/MS, encontrados en el artículo “*Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from Zephyranthes grandiflora by UPLC–DAD/ESI-MS/MS*”

192

D. Katoch et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 71 (2012) 187–192

Table 3

Retention time, UV spectral data, mass fragmentation pattern and compound identified in *Z. grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS.

Peak no.	t_R (min)	λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺	MS/MS	Compound identified
1	0.84	269	381	381, 336, 230, 219, 201, 156	Unknown
2	1.02	260	268	268, 253, 177, 136, 109	Unknown
3	1.76	252, 285	286	286, 268, 228	Unknown
4	1.91	232, 288	288	288, 270, 252, 147, 119	Lycorine ^a
5	2.11	232, 286	290	290, 233, 215, 189	Lycoramine ^a
6	2.27	238, 285	274	274, 256, 228, 196	Dihydrovittatine [7,16]
7	2.45	240, 281	306	306, 290, 233, 216, 189	Lycoramine N-oxide [17]
8	2.61	239, 288	318	318, 286, 268, 237, 193, 162, 147	Galanthine [9]
9	2.74	237, 287	288	288, 270, 226, 196, 181, 153	Hamayne ^a
10	3.52	236, 285	318	318, 287, 268, 258, 239, 199, 167	Zaidein [18]
11	3.68	239, 288	314	314, 300, 282, 266, 242, 213, 181	Haemanthamine type [7]
12	3.74	243, 289	332	332, 300, 282, 264, 225, 195, 167	Ambelline [7]
13	3.80	244, 288	318	318, 300, 286, 268, 250, 227, 212	Crinamidine [19]
14	3.95	243, 290	302	302, 270, 226, 211, 181, 153	Haemanthamine ^a
15	4.12	245, 292	272	272, 254, 226, 196, 149, 118	Vittatine ^a
16	4.50	239, 277	268	268, 254, 225, 209, 179	Zefbetaine [20]
17	4.93	260, 275	266	266, 236, 208, 179	Ungeremine [20]
18	5.60	238, 277	412	412, 326, 272, 244, 218, 186	1-O-(3-hydroxybutyryl)-pancratistatin ^a [13]
19	6.14	263	282	282, 267, 239, 210, 196, 168	Lycorine type [9,12]
20	6.80	263	296 [M] ⁺	296, 280, 237, 209, 180	Tortuosine ^a

Anexo 3. Resultados de las muestras analizadas.

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-021	2,011	291	8,264	59,770	Alcaloide 26	7,618	39,129
	2,545	231,7-280,3	5,163	90,000	Alcaloide 11	1,194	52,252
	2,770	287,5	4,835	90,000	Alcaloide 30	4,621	90,000
	3,003	288,7	6,123	90,000	Alcaloide 29	4,831	69,933
	3,187	240,0-291,0	8,517	44,069	Alcaloide 7	0,354	23,614
	3,360	238,8-291,0	7,325	90,000	Alcaloide 9	9,519	90,000
	3,569	286,3	4,555	90,000			
	5,295	240,0-288,7	27,353	90,000	Alcaloide 20	8,846	90,000
	6,362	263,7	7,307	90,000	Alcaloide 14	2,714	39,456
	6,848	263,7	1,506	6,436	Alcaloide 15	0,190	4,539

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-022	1,775	240,0-288,7	7,422	90,000	Alcaloide 5	0,327	90,000
	2,033		10,128	71,85			
	2,550	231,7-281,5	9,496	58,931	Alcaloide 2	1,111	31,927
	2,780	287,5	4,327	90,000	Alcaloide 30	8,631	90,000
	3,009	288,7	4,675	90,000	Alcaloide 29	3,749	90,000
	3,207	291,1	7,385	90,000	Alcaloide 7	4,431	59,663
	3,373	289,8	11,457	90,000	Alcaloide 10	0,322	90,000
	5,287	240,0-288,7	28,631	90,000	Alcaloide 20	0,000	90,000
	6,362	263,7	5,777	90,000	Alcaloide 14	2,814	51,105
6,849	263,7	1,246	6,775	Alcaloide 15	0,000	4,541	

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-023	2,032	291,0	5,179	77,894	Alcaloide 26	0,000	40,970
	2,568	231,7-281,5	5,908	54,357	Alcaloide 11	0,000	35,927
	2,783	287,5	7,852	90,000	Alcaloide 30	2,849	90,000
	3,012	288,7	5,033	90,000	Alcaloide 33	0,000	52,309
	3,214	291,0	5,867	90,000	Alcaloide 28	0,000	90,000
	3,372	238,8-291,0	10,837	90,000			
	6,353	263,7	5,889	90,000	Alcaloide 14	1,309	90,000
	6,846	263,7	2,539	12,091	Alcaloide 15	1,15	7,326

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-024	4,684	289,8	11,351	29,32	Alcaloide 8	2,083	15,262
	5,044	291	5,668	1,872	Alcaloide 21	0,112	1,808

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-025	3,298	231,7-281,5	6,869	1,431			
	3,518	288,7	5,178	8,034	Alcaloide 4	3,353	90,000
	4,216	291	4,949	2,828	Alcaloide 16	0,103	2,2727
	4,446	291	5,618	4,95	Alcaloide 17	0,000	4,357
	6,663	263,7	4,292	2,461	Alcaloide 15	3,651	2,451

6,938	263,7	1,73	1,654	Alcaloide 15	1,942	1,727
-------	-------	------	-------	--------------	-------	-------

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-026	2,085	291	3,971	62,054	Alcaloide 26	3,158	39,694
	2,660	231,7-281,5	7,997	22,572	Alcaloide 11	3,148	27,576
	2,864	244,7-288,7	8,610	90,000	Alcaloide 3	9,433	90,000
	3,106	288,7	4,643	90,000	Alcaloide 24	1,041	33,251
	3,325	291	6,716	90,000	Alcaloide 28	3,992	90,000
	3,491	291	9,566	90,000	Alcaloide 10	3,946	90,000
	5,488	241,2-289,8	8,233	90,000	Alcaloide 20	8,690	90,000
	6,449	263,7	6,603	47,689	Alcaloide 14	4,174	18,774
	6,913	263,7	2,831	4,658	Alcaloide 15	0,637	2,713

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-027	2,057	241,2-288,7	10,871	90,000	Alcaloide 34	0,000	90,000
	2,338	291	8,552	59,516	Alcaloide 1	6,423	90,000
	3,135	289,8	4,420	60,180	Alcaloide 29	0,000	34,909
	3,345	291	6,755	90,000	Alcaloide 7	9,974	90,000
	6,388	263,7	1,417	28,688	Alcaloide 14	0,629	10,981
	6,864	263,7	1,072	3,697	Alcaloide 15	0,765	2,378

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-037	2,057	240,0-291,0	3,925	60,618	Alcaloide 26	3,265	39,985
	2,621	231,7-281,5	6,350	30,647	Alcaloide 11	1,084	29,682
	2,816	243,5-287,5	6,463	90,000	Alcaloide 30	0,000	90,000
	3,047	241,2-288,7	3,950	90,000	Alcaloide 24	1,555	46,995
	3,242	240,0-291,0	6,353	52,534	Alcaloide 28	6,231	90,000
	3,391	238,8-291,0	5,347	90,000	Alcaloide 9	7,405	90,000
	6,845	263,7	3,620	20,348	Alcaloide 15	2,961	12,694

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Biblioteca	Match Angle	Match Threshold
IA-040	1,997	240,0-291,0	4,843	54,561	Alcaloide 31	0,000	31,051
	3,022	241,2-288,7	7,771	90,000	Alcaloide 33	3,677	56,577
	3,222	240,0-291,0	6,729	44,423	Alcaloide 28	3,349	90,000

	6,352	263,7	2,316	14,691	Alcaloide 14	1,120	6,640
	6,843	263,7	2,342	1,669	Alcaloide 15	2,380	1,564

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-041	1,996	240,0-291,0	4,978	56,143	Alcaloide 31	1,279	31,929
	3,007	241,2-288,7	12,697	90,000	Alcaloide 24	3,194	32,493
	3,205	238,8-291,0	11,019	90,000	Alcaloide 28	4,990	90,000
	6,344	263,7	3,313	31,873	Alcaloide 14	1,492	14,373
	6,840	263,7	7,097	7,356			

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-071	1,759	240,0-289,8	6,766	90,000	Alcaloide 5	3,990	90,000
	1,995	291	6,872	90,000	Alcaloide 27	3,163	47,405
	2,519	231,7-281,5	7,370	61,461	Alcaloide 11	7,019	40,528
	2,937	289,8	4,830	90,000	Alcaloide 24	5,910	38,384
	3,122	291	5,846	90,000	Alcaloide 25	5,051	67,005
	3,256	242,4-291,0	10,195	90,000	Alcaloide 13	0,194	90,000
	6,255	263,7	1,253	25,397	Alcaloide 14	0,577	9,791
	6,757	263,7	0,615	4,493	Alcaloide 15	1,036	2,851

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-100	2,234	231,7-281,5	10,092	63,516			
	2,562	242,4	11,580	90,000	Alcaloide 22	0,000	90,000
	2,992	291	5,046	75,437	Alcaloide 25	2,507	52,575
	4,426	289,8	15,512	90,000	Alcaloide 16	5,420	90,000
	6,215	263,7	1,298	29,391	Alcaloide 14	0,657	11,005

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-101	2,827	241,2-288,7	7,834	40,481	Alcaloide 24	2,575	19,081
	3,003	240,0-291,0	7,866	34,876			
	6,200	263,7	3,475	28,427	Alcaloide 14	0,844	10,730
	6,708	263,7	1,799	3,843	Alcaloide 15	1,763	2,865

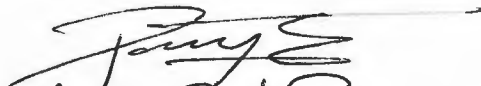
Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-102	1,870	291,0	5,815	47,772	Alcaloide 6	0,089	22,693
	2,356	231,7-281,5	4,168	90,000	Alcaloide 32	3,019	90,000
	2,991	291,0	6,083	42,823	Alcaloide 25	0,000	35,444
	6,189	263,7	1,667	17,546	Alcaloide 14	0,692	6,894
	6,691	263,7	3,423	4,726	Alcaloide 15	1,525	3,434

Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-103	1,804	291,0	4,151	24,450	Alcaloide 6	7,031	12,425
	2,258	231,7-281,5	5,320	90,000	Alcaloide 32	0,000	67,819
	2,958	291,0	4,887	12,043	Alcaloide 25	8,279	26,085
	6,170	263,7	1,410	10,381	Alcaloide 14	0,624	4,529
	6,673	263,7	1,194	2,731	Alcaloide 15	1,120	2,311

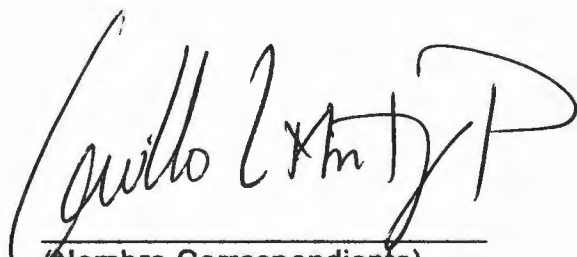
Muestra	Tiempo R	Máximos	Purity Angle	Purity Treshold	Alcaloide Librería	Match Angle	Match Threshold
IA-104	1,915	291,0	4,080	57,602	Alcaloide 31	2,519	33,125
	2,420	231,7-280,3	5,834	90,000			
	2,845	288,7	10,134	80,618	Alcaloide 24	3,590	30,507
	3,004	240,0-291,0	7,269	31,888	Alcaloide 25	6,079	30,427
	6,141	263,7	1,661	14,602	Alcaloide 14	0,703	6,008
	6,630	263,7	1,839	3,633	Alcaloide 15	1,771	2,688



APROBADO POR:


Aram Joel Panay
(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.


Giovanni Rojas
(Nombre Correspondiente)
Evaluador Externo.


Guillermo Quintana
(Nombre Correspondiente)
Director del Proyecto.


Marcela Santaella T.
(Nombre Correspondiente)
Director ó Co-Director del Proyecto.