

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS EN
Cecropia telenitida

Laura Isabel Triana Salcedo

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
QUÍMICA FARMACÉUTICA
Santiago de Cali
2018

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS EN
Cecropia telenitida

Laura Isabel Triana Salcedo

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE
PREGRADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA

DIRECTOR: Guillermo León Montoya Peláez Ph. D

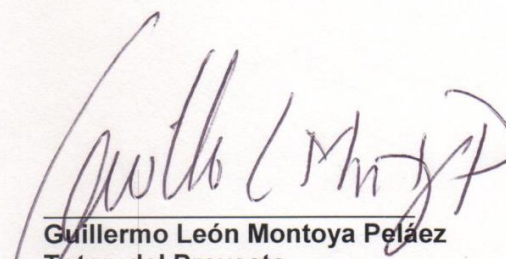
Santiago de Cali

2018



APROBADO POR:


Giovanni Rojas Jiménez
Evaluador


Guillermo León Montoya Peláez
Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A Dios principalmente le doy gracias por darme la oportunidad de cumplir mis sueños y lograr culminar una etapa más de mi vida realizando este proyecto de grado con el que finalizo mi etapa estudiantil.

A mi papá, a mi mamá, les doy infinitas gracias por apoyarme en cada momento de mi vida, hayan sido buenos o malos, siempre han sido una voz de aliento que me impulsaron a seguir adelante. Sin ellos no hubiese tenido la motivación diaria de terminar este proyecto.

A mi hermana que, sin su sonrisa, no podría vivir mí día a día

A mi tutor, por guiarme e instruirme en cada paso que debía seguir para desarrollar este proyecto y enseñarme un poco más de sus experiencias y conocimientos fitoquímicos que son fundamento de este documento.

A Gustavo, que siempre estuvo presente y atento en el desarrollo de mi proyecto además de haberme apoyado en etapas fundamentales y definitivas de esta investigación. Muchas gracias.

A Diana, por enseñarme a partir de sus experiencias, el desarrollo de ciertos procesos realizados en este proyecto.

A Daniela, por ser la amiga incondicional que Dios me permitió tener.

CONTENIDO

Lista de tablas.....	6
Lista de figuras.....	2
RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	6
2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia	6
2.2 Estado del arte.....	7
2.3 Marco teórico	9
2.3.1 Fitoesteroles y triterpenos pentacíclicos en la misma ruta metabólica.....	9
2.3.2 <i>Cecropia telenitida</i>	11
2.3.3 Actividad biológica de los triterpenos pentacíclicos.....	12
2.3.4 Actividad fisiológica de los fitoesteroles	13
2.3.5 Métodos instrumentales	14
OBJETIVOS	17
2.4.....	17
2.4.1 Objetivo general	17
2.4.2 Objetivos específicos	17
2.5 METODOLOGÍA UTILIZADA.....	18
2.5.1 Purificación.....	18
2.5.2 Caracterización	19
2.6 RESULTADOS	21
2.6.1 Purificación:.....	21
2.7 DISCUSIÓN.....	32
2.8 CONCLUSIONES	36
2.9 RECOMENDACIONES.....	37
2.10 BIBLIOGRAFÍA.....	38

Lista de tablas

Tabla 1	Especificaciones del equipo Isolera Flash One para muestra inicial	22
Tabla 2	Peso de las grandes fracciones resultantes de Cromatografía Flash para muestra inicial.	23
Tabla 3	Especificaciones del equipo Isolera Flash One para fracción 2.....	25
Tabla 4	Peso de las grandes fracciones resultantes de Cromatografía Flash para muestra 2.	27

Lista de gráficas

Gráfica 1 a. Resultados reportados por el Isolera en dos dimensiones para la muestra inicial. b. Resultados reportados con gráfica de superficie de respuesta para la muestra inicial.....	22
Gráfica 2 a. Resultados reportados por el Isolera en dos dimensiones para la fracción 2. b. Resultados reportados con gráfica de superficie de respuesta para la fracción 2.	25
Gráfica 3 Espectro de ^1H - RMN de la muestra $2f_6$	30
Gráfica 4 Espectro de masas de la muestra $2f_6$ en MS SQD2 de Waters.	31
Gráfica 5. Espectro de masas de Colesta-5,7-Dien-3-ol de la base de datos de NIST.	31

Lista de figuras

Figura 1 Triterpeno pentacíclico (Lupano) y Fitoesterol (β - sitoesterol).	10
Figura 2 Esquema general de la parte final de la ruta metabólica del Mevalonato para la formación de triterpenos y esteroides. Adaptado de (Thimmappa et al., 2014).....	10
Figura 3. Yarumo blanco (<i>Cecropia tenenitida</i>). Jardín, Antioquia.	11
Figura 4 a) Ubicación de <i>C.tenenitida</i> en América Latina en zonas resaltadas (GBIF.org). b) Trayectoria de la especie (Franco, 1997)	12
Figura 5. Esqueleto base de los triterpenos pentacíclicos	13
Figura 6. Estructura molecular de varios fitoesteroides (α - Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol)	14
Figura 7 Ilustración de todas separaciones llevadas a cabo en la muestra inicial.	19
Figura 8. Evaluación del extracto inicial en placas cromatograficas con diferentes polaridades usando como solventes diclorometano y acetato de etilo.	21
Figura 9 Cromatografía planar de las fracciones obtenidas en el Isolera Flash One. Fase móvil diclorometano / acetato de etilo 5:5	23
Figura 10. Cromatografía planar de las 6 fracciones recolectadas de la muestra inicial. Fase móvil: Diclorometano /acetato de etilo 5:5	24
Figura 11. TLC correspondientes a los tubos de ensayo obtenidos en Cromatografía flash para la muestra 2 tomados a partir del tubo 196. Fase móvil diclorometano/ acetato de etilo 8:2	26
Figura 12. Cromatografía planar de las 10 fracciones recolectadas de la muestra 2. Fase móvil: diclorometano /acetato de etilo 8:2	27
Figura 13. Cromatografía planar de fracciones recogidas en Cromatografía flash con sistema metanol 100%. Fase móvil: diclorometano /acetato de etilo 8:2	28
Figura 14 TLC correspondientes a los tubos de ensayo obtenidos en Cromatografía flash en fase reversa para la muestra 2f. Fase móvil diclorometano/ acetato de etilo 8:2	29
Figura 15 TLC correspondiente a la muestra final obtenida.....	29
Figura 16 a. Estructura molecular del compuesto definido en espectro de masas de la base de datos de NIST. b. Estructura molecular del compuesto definido como el pico base en el espectro de masas realizado por MS SQD2	35

RESUMEN

Colombia es el segundo país más biodiverso del mundo. Se caracteriza por tener por lo menos 56.000 especies de las cuales más de 9.000 son endémicas. Las plantas hacen parte de este conjunto, siendo ellas de gran variedad en apariencia, funcionalidad y propiedades terapéuticas. En contraste, el conocimiento a nivel fitoquímico y farmacognóstico continúa siendo incipiente.

El Yarumo blanco corresponde a una planta perteneciente a la familia *Urticaceae*, denominada *Cecropia telenitida*, nativa de Colombia y de zonas como Perú, Venezuela y Ecuador. Se ha utilizado en medicina tradicional por sus propiedades medicinales. En el 2007 fue aprobada por el Instituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y alimentos (INVIMA) como planta medicinal. Por ello, se reconoce la necesidad de indagar más a fondo acerca de las propiedades químicas de esta planta. De esta manera, fue pertinente entonces el aporte de este proyecto a la fitoquímica de *Cecropia telenitida*,

A través de este proyecto se logró aislar y caracterizar una molécula presente en un extracto de *Cecropia telenitida*, correspondiente a la estructura de un fitoesterol. Para ello, se realizaron varias cromatografías en columna automatizada (Cromatografía Flash), seguidas de una cromatografía en columna seca, siendo esta última, una separación parecida a la cromatografía planar, solo que en este caso se realiza en columna, se siembra la muestra en seco y las bandas pueden ser separadas fácilmente. Fue así como se obtuvo la fracción a caracterizar. Posteriormente para definir la estructura de la molécula, se llevó a cabo análisis de resonancia magnética nuclear protónica (^1H - RMN), espectrometría de masas en acople con cromatografía gaseosa y líquida. A partir de estos métodos analíticos se definió que había un conjunto de moléculas con similar estructura correspondiente a esteroides, dentro de los cuales se encontraba el fitoesterol Colesta-5,7 Dien-3-ol.

Con este proyecto se logró purificar y caracterizar moléculas activas que pueden tener ciertas propiedades fisiológicas, dándole mayor importancia al estudio. Durante el proceso de aislamiento, quedaron intactas ciertas fracciones que pueden ser fuente potencial de purificación de compuestos con atributos farmacológicos significativos los cuales pueden ser analizados a mayor profundidad.

Palabras clave: *Cecropia telenitida*, esteroides, espectrometría de masas

SUMMARY

Colombia is the second most biodiverse country in the world. It is characterized by having at least 56,000 species of which more than 9,000 are endemic. The plants are part of this set, being of great variety in appearance, functionality and therapeutic properties. In contrast, knowledge at the phytochemical and pharmacognostic level continues to be incipient.

The white Yarumo corresponds to a plant belonging to the family Urticaceae, called *Cecropia telenitida*, native to Colombia and areas such as Peru, Venezuela, and Ecuador. It has been used in traditional medicine for its medicinal properties. In 2007 it was approved by the National Institute of Surveillance of medicines and food (INVIMA) as a medicinal plant. Therefore, the need to investigate more thoroughly about the chemical properties of this plant is recognized. In this way, the contribution of this project to the phytochemistry of *Cecropia telenitida* was relevant,

Through this project it was possible to isolate and characterize a molecule present in an extract of *Cecropia telenitida*, corresponding to the structure of a phytosterol. To do this, several automated column chromatographies were performed (Flash Chromatography), followed by a dry column chromatography, the latter being a separation similar to planar chromatography, except that in this case it is done in a column, the sample is seeded in dry and the bands can be easily separated. This is how the fraction to be characterized was obtained. Later to define the structure of the molecule, proton nuclear magnetic resonance analysis ($^1\text{H-NMR}$), mass spectrometry in coupling with gas and liquid chromatography was carried out. From these analytical methods, it was defined that there was a set of molecules with a similar structure corresponding to sterols, within which was the phytosterol Colesta-5,7 Dien-3-ol.

With this project it was possible to purify and characterize active molecules that may have certain physiological properties, giving greater importance to the study. During the isolation process, certain fractions remained intact, which can be a potential source of purification of compounds with significant pharmacological attributes which can be analyzed in greater depth.

Key words: *Phytosterol, analytical methods, Cecropia, Chromatography*

1. INTRODUCCIÓN

Cecropia corresponde a un género que comprende aproximadamente 65 especies de árboles, los cuales están ubicados mayoritariamente en Suramérica. *Cecropia telenitida* es una de las especies que se encuentra principalmente en Colombia. Sin embargo, no se ha indagado profundamente en la química de esta planta, por lo que se hace pertinente realizar este proyecto que permita conocer más acerca de su composición.

Dentro de los procesos metabólicos de esta planta se conoce la ruta del mevalonato, que conlleva a la formación de triterpenos y esteroides, dos tipos de metabolitos con importantes propiedades terapéuticas que aún son fuente potencial de estudio. Estos metabolitos al ser abundantes se consideraron dentro de las probabilidades de aislamiento para este proyecto.

Los triterpenos pentacíclicos presentan ciertas propiedades bactericidas, fungicidas, antivirales, citotóxicos, analgésicos, anticancerígenos, entre otros, estudiadas principalmente en Lupeol y Betulina. Su mecanismo principalmente se relaciona con la afinidad a los receptores de glucocorticoides (Patočka, 2003). En el caso de los fitoesteroides, su efecto científicamente demostrado es el hipocolesterolémico. Estas moléculas son consideradas un buen material para el desarrollo de alimentos funcionales. Un ejemplo de estas moléculas corresponden al α -sitosterol, campesterol y stigmasterol. No se han reportado efectos tóxicos en su consumo (Muñoz, Alvarado-Ortíz, & Encina, 2011)

Para esta especie específicamente son pocos los estudios científicos realizados, de los cuales se destaca “Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* with immunomodulatory activity on dendritic cells” (Guillermo, Jever, Fernando, & Ulrike, 2013) en el que se estudia la composición química de una fracción triterpénica pentacíclica de las raíces de *C. telenitida* aislándose y caracterizándose una molécula nueva denominada ácido yarúmico. De esta manera se establece un precedente de los estudios previos llevados a cabo en esta planta relacionado con los compuestos de interés en este proyecto.

La información contenida en este documento se convierte en nuevo conocimiento adquirido de una planta abundante en nuestro territorio nacional. Se llevó a cabo entonces la purificación y caracterización de un compuesto activo presente en las raíces de *C. telenitida* a partir de cromatografía en columna automatizada, cromatografía en columna seca y técnicas espectroscópicas nos permitieron establecer la estructura del compuesto.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia

Colombia se considera uno de los cuatro países más ricos del mundo en diversidad biológica, ocupando el segundo lugar después de Brasil. Presenta aproximadamente 51220 especies de plantas vasculares lo que convierte este lugar en un blanco de interés para el estudio de su flora (Mongabay, 2016). Se encuentra en el puesto 47 de 214 países evaluados en el estudio de la ciencias de plantas, estando no muy lejos de los primeros lugares, sin embargo con una necesidad de profundizar en la biodiversidad que lo caracteriza (Scimago Journal & Country Rank, 2016). Es un país con gran cantidad de especies vegetales dispuestas a ser estudiadas, pero con la necesidad de una mayor investigación en ello. Por esta razón, el aporte a esta área de la ciencia, enfocado en la química de las plantas endémicas de Colombia, es fundamental y valioso, pues fortalecerá el conocimiento acerca de nuestros recursos naturales, los cuales pueden tener un potencial uso en el ámbito de la salud.

El área farmacéutica en la actualidad se ha fortalecido considerablemente, teniendo dentro de sus objetivos el descubrimiento de nuevos principios activos que aporten a la salud de la población mundial. Teniendo entonces las herramientas necesarias de conocimiento e instrumentación, las ciencias farmacéuticas consideran a las plantas como inmensas biofábricas en las que podemos encontrar una oportunidad para hallar bioactivos, siendo otra razón para ampliar el conocimiento de composición y propiedades de la flora colombiana, lo que podría llevar a un reconocimiento mundial del país no solo por su biodiversidad, sino por su estudio.

Cecropia telenitida (Yarumo blanco), es una planta propia de Colombia y de los andes del norte, utilizada para la modulación de diversas enfermedades cuya etilogía principal es la inflamación. Varias publicaciones nacionales y latinoamericanas reconocen los metabolitos secundarios del género *Cecropia* por su posibilidad de uso en terapéutica: “Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* leaves” (Müller et al., 2016), “Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan- induced diabetic rats”(Aragão et al., 2010), “Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetes” (Herrera-Arellano, Aguilar-Santamaría, García-Hernández, Nicasio-Torres, & Tortoriello, 2004), “Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients” (Revilla-Monsalve, Andrade-Cetto, Palomino-Garibay, Wiedenfeld, & Islas-Andrade, 2007) y “*Cecropia peltata* L (*Cecropiaceae*) has

wound-healing potential: A preclinical study in a Sprague Dawley rat model” (Nayak, 2006).

Sin embargo, existen pocas investigaciones sobre la especie *C. telenitida*, lo que obliga a la comunidad científica nacional a promover el conocimiento sobre una planta que no solamente no crece en otras partes del planeta, sino además que representa una innumerable fuente de metabolitos que podemos emplear para el tratamiento de patologías de alta incidencia en Colombia. Es importante destacar que existen más especies vegetales por explorar que se encuentran en la misma condición, por lo que hay un extenso trabajo que realizar en esta área.

Por estos motivos, se busca ampliar el conocimiento acerca de la composición de *C. telenitida*. Este proyecto realizará la purificación y caracterización de compuestos activos presentes en un extracto de diclorometano de *C. telenitida* a partir de técnicas analíticas como espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, con el fin de aportar conocimiento sobre la fitoquímica de esta planta nativa de los bosques montanos de los Andes del norte. De este modo, la información obtenida será útil para posteriores estudios ya sean farmacológicos o de alguna rama de la ciencia de plantas

2.2 Estado del arte

Este proyecto de investigación tiene un enfoque a la purificación y caracterización de un compuesto activo presente en las plantas de Yarumo blanco (*Cecropia telenitida*). Ciertas moléculas de esta planta han sido estudiadas en los últimos años para confirmar sus propiedades medicinales que habían sido determinadas de manera empírica en tiempos pasados. Un grupo de ellas se han utilizado como antiinflamatorios y antivirales, obteniéndose resultados científicos actuales que lo sustentan (Furtado et al., 2017). Este conjunto corresponde a los triterpenos pentacíclicos, metabolitos secundarios sintetizados en diversas especies de plantas que a su vez se encuentran distribuidas por múltiples zonas climáticas. De igual manera, otro grupo de moléculas presentes en esta especie, han demostrado tener propiedades hipocolesterolémicas, reducción de la hipertensión e incluso disminución de estreñimiento (Yang, Oyeyinka, & Ma, 2016). Estas propiedades corresponden a los fitoesteroles, metabolitos primarios sintetizados en todas las plantas. Por ello, el estudio de estos compuestos puede darse a partir de diversas materias primas que lo produzcan.

Al analizar estos metabolitos provenientes del Yarumo blanco, se propicia a un mayor conocimiento químico de esta planta nativa de los andes latinoamericanos. Además, *Cecropia* es un género aprobado por el Invima como planta medicinal (Invima, 2007). Se conocen pocas investigaciones enfocadas en *Cecropia telenitida*

por poseer la capacidad biosintética de ensamblar ambos tipos de moléculas de interés, lo que permitiría el aporte de nuevos conocimientos a partir de este proyecto.

De acuerdo a un trabajo realizado en Colombia por Montoya y colaboradores (Montoya, et al 2013), se establecen las propiedades farmacológicas y fitoquímicas de los triterpenos pentacíclicos en *C.telenitida*. “Some triterpenic compounds in extracts of *Cecropia* and *Bauhinia* species for different sampling years” (Schmidt et al., 2017), “Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*” (Rivera-Mondragón et al., 2017) corresponden a estudios relacionados con los fitoesteroles en especies como *Cecropia obtusifolia*, *Cecropia peltata* y *Cecropia glaziovii*, dando cierto aporte a lo que posiblemente podría encontrarse en *C. Telenitida*. Sin embargo no sería certero, por lo que se sustenta aún más la necesidad de analizar los fitoesteroles en dicha especie.

Se conocen también estudios recientes que se enfocan únicamente en los triterpenos pentacíclicos y su actividad biológica. Dentro de éstos se encuentra un estudio relacionado con la inhibición de dos enzimas (α -amilasa y α -glucosidasa) por nueve triterpenos pentacíclicos (Zhang et al., 2017). También, una investigación determinó una serie de derivados triterpenicos pentacíclicos como una nueva clase de inhibidores de la proteína de transferencia del éster de colesterilo (CETP) para el tratamiento de la dislipidemia (Chen et al., 2017); de igual manera, se han encontrado estudios que se enfocan en su cuantificación en otras especies. Por ejemplo, en uno de ellos se realiza la determinación simultánea de los principales triterpenos pentacíclicos de *Olea europaea L.* en plasma de rata (Giménez, et al. 2017) .

De igual manera, existen aportes científicos enfocados exclusivamente en fitoesteroles y sus efectos fisiológicos. En uno de ellos, se estudió la absorción de fitosteroles intestinales y colesterol en enterocitos absorbentes en el intestino, siendo este mecanismo poco definido en la actualidad (Davis et al., 2004); también se han cuantificado los fitoesteroles en otras especies, llevandose a cabo en cierta investigación, la determinación de los niveles de fitoesteroles y escualeno, así como los tocoferoles en granos seleccionados, semillas y legumbres (Ryan, Galvin, O'Connor, Maguire, & O'Brien, 2007). Se parte entonces de la necesidad de continuar estos estudios que complementen paulatinamente el conocimiento acerca de *C. telenitida* y sus metabolitos como compuestos candidatos para principios activos que mejoren o modulen la evolución de ciertas patologías.

2.3 Marco teórico

2.3.1 Fitoesteroles y triterpenos pentacíclicos en la misma ruta metabólica

El metabolismo es un proceso que consta de una secuencia de reacciones químicas que se llevan a cabo dentro de todas las células de los seres vivos y que concluye en la síntesis de nuevas sustancias ya sea por anabolismo o catabolismo. Para el caso de las plantas, sus rutas metabólicas son clasificadas como el metabolismo primario y el secundario. El metabolismo primario corresponde a la formación de compuestos químicos que intervienen en el crecimiento, supervivencia y desarrollo de la planta. A ellos se les denomina metabolitos primarios. Por el contrario, al metabolismo secundario le atañe la formación y acumulación de compuestos químicos que no están directamente involucrados en el crecimiento y desarrollo del organismo pero tienen funciones ecológicas, a los que se les denomina metabolitos secundarios (Anulika, et al 2016).

Los terpenos corresponden al grupo de metabolitos más grande conocido hasta hoy. Estas moléculas están conformadas por un elemento basal denominado isopreno. Se clasifican dependiendo el número de unidades isoprenoides que presenten. Un ejemplo de ello son los triterpenos, conformados por 30 átomos de carbono que pueden disponerse de manera lineal o formar ciclos. Dentro de la variedad de triterpenos ciclados, se encuentran los triterpenos pentacíclicos y esteroides. Los primeros corresponden a metabolitos secundarios que pueden contribuir a la resistencia de plagas, mientras que los segundos son componentes importantes de las membranas celulares, considerándose metabolitos primarios. La estructura común de los esteroides se basa en los esteroides, los cuales tienen en su estructura un grupo hidroxilo (Thimmappa, Geisler, Louveau, O'Maille, & Osbourn, 2014). En la figura 1 se aprecia la disposición molecular de un triterpeno pentacíclico y un fitoesterol.

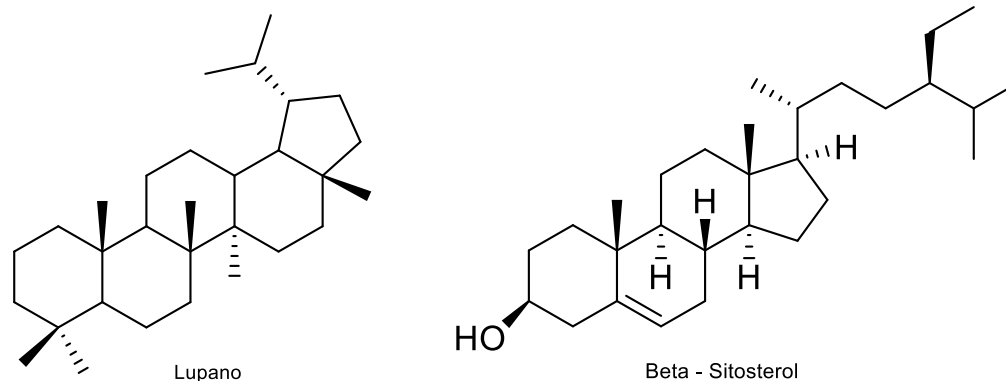


Figura 1 Triterpeno pentacíclico (Lupano) y Fitoesterol (β - sitoesterol).

Estos dos tipos de isoprenoides, pertenecen a una misma ruta metabólica: La ruta del mevalonato (Figura 2). El último intermediario común para sus dos vías es 2,3-oxidoescualeno. Para la biosíntesis de fitoesteros, el 2,3-oxidoescualeno se cicla en cicloartenol a través de la conformación silla-bote-silla. Por el contrario, en la síntesis del triterpeno este sustrato se pliega en una conformación silla-silla-silla, generando gran cantidad de triterpenos (en la figura 2 solo se muestra β amirina). La ciclación de triterpeno puede conducir a una amplia gama de diferentes estructuras triterpénicas, todas derivadas del sustrato isoprenoide lineal simple y ubicuo 2,3-oxidoescualeno.

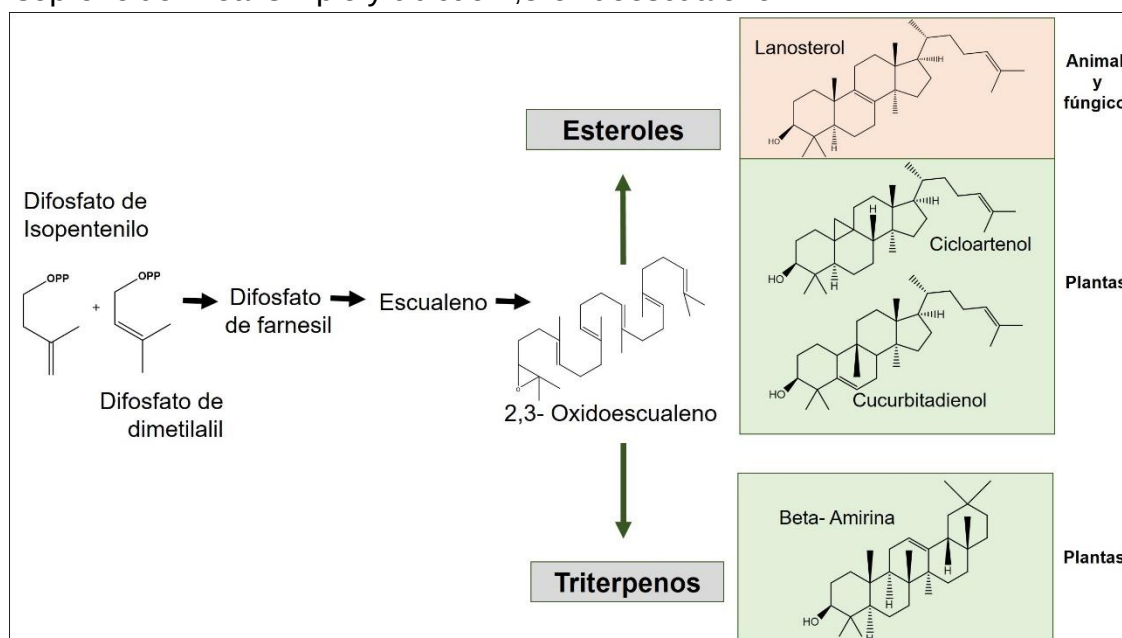


Figura 2 Esquema general de la parte final de la ruta metabólica del Mevalonato para la formación de triterpenos y esteroides. Adaptado de (Thimmappa et al., 2014)

2.3.2 *Cecropia telenitida*

Cecropia corresponde a un género de 65 especies de árboles tropicales que se ubican en América Central y del Sur, reconocidos por su delgado tronco de anillos blancos y su rápido crecimiento. Pueden colonizar lagunas viviendo hasta 30 años a una altura menor a 18 metros (Encyclopaedia Britannica, s.f.). *Cecropia telenitida* pertenece a este género, ubicada frecuentemente en áreas húmedas hasta 2600 metros sobre el nivel del mar (figura 3) (Montoya, et al 2013). Según la base de datos Tropicos, esta planta se distribuye en países como Venezuela, Ecuador, Perú y Colombia. Igualmente, en la infraestructura web de información mundial sobre biodiversidad GBIF (Global Biodiversity Information Facility) se establece la ubicación mayoritaria de esta especie en Colombia (Figura 4a), teniendo 276 de estas plantas documentadas en su plataforma de las cuales 205 se ubican en el país, posicionadas en lugares como Magdalena, Bogotá, Santander, Antioquia, Boyacá, y Quindío. En ninguna otra zona del mundo, es posible encontrar el árbol de Yarumo blanco (Figura 4b), teniendo colecciones botánicas nacionales en el herbario de la universidad de Antioquia, el herbario de la universidad de Caldas, la universidad Nacional de Colombia, el jardín botánico de la universidad tecnológica de Pereira, el herbario de la universidad industrial de Santander, el herbario amazónico Colombiano (Instituto amazónico de investigaciones científicas Sinchi), la universidad Católica de Oriente y en el herbario de Pontificia universidad Javeriana (GBIF, 2017)



Figura 3. Yarumo blanco (*Cecropia telenitida*). Jardín, Antioquia.

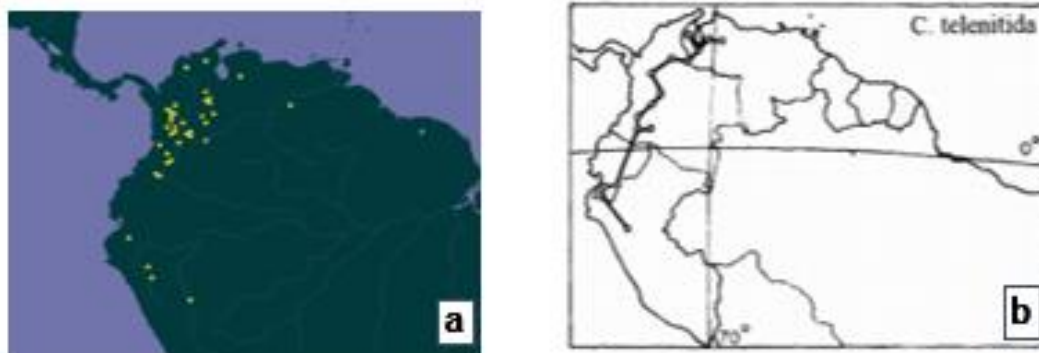


Figura 4 a) Ubicación de *C.telenitida* en América Latina en zonas resaltadas (GBIF.org).
b) Trayectoria de la especie (Franco, 1997)

Este árbol presenta en sus hojas, tallo y fruto gran cantidad de triterpenoides, tales como los fitoesteroles, que se encuentran en las membranas celulares vegetales (Muñoz et al., 2011), y los triterpenos pentacíclicos que se puede hallar principalmente en raíces y en sus hojas en menor medida (Andrade y Vásquez 2010).

2.3.3 Actividad biológica de los triterpenos pentacíclicos

Los triterpenos pentacíclicos tienen un abanico de actividades biológicas que han aportado a la medicina durante los últimos años. Se ha determinado que son bactericidas, fungicidas, antivirales, citotóxicos, analgésicos, anticancerígenos, antialérgicos, etc, a partir de estudios elaborados principalmente con Lupeol, betulina y ácido betulínico (Patočka, 2003).

El Lupeol administrado por vía oral ha demostrado tener acción inmunosupresora; el ácido betulínico ha demostrado su actividad anticancerígena sin ser citotóxico para las células normales (Patočka, 2003); la Betulina muestra un efecto antiviral y todas las anteriores han generado resultados positivos en cuanto a efectos antiinflamatorios en patologías como edemas oculares y edemas inducidos por carragenina, siendo su mecanismo de acción al parecer, la afinidad a los receptores de glucocorticoides. Algunos triterpenos pentacíclicos presentan actividad citotóxica, ejemplo de ello están el ácido ganodérico y el ácido ursólico (Patočka, 2003).

Se dice que el ácido betulínico es la molécula más biológicamente activa de la familia. A parte de las propiedades mencionadas anteriormente, ha demostrado

tener funciones de inhibidor selectivo del melanoma humano que funciona por inducción de apoptosis; también presenta actividad anti-VIH al inhibir la maduración del virus (Michaudel, 2013). En la figura 5 se aprecia el esqueleto base de los triterpenos pentacíclicos.

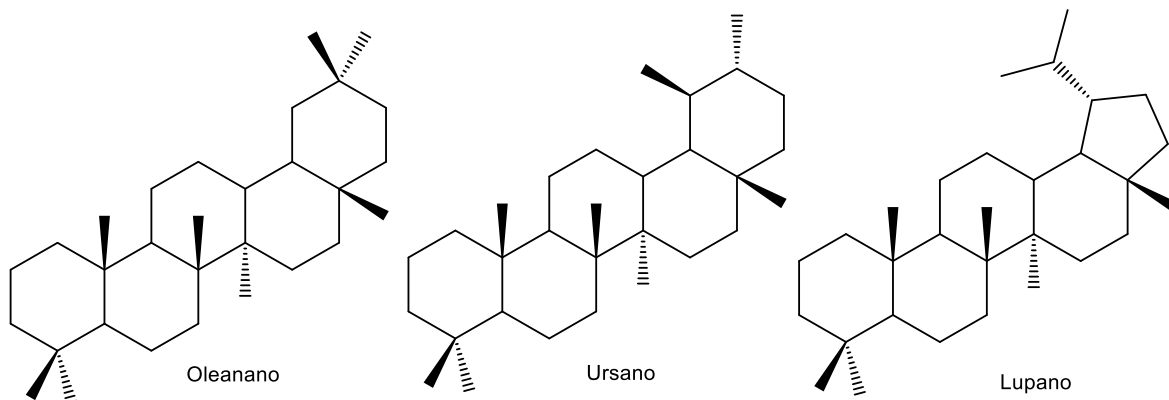


Figura 5. Esqueleto base de los triterpenos pentacíclicos

2.3.4 Actividad fisiológica de los fitoesteroles

Se han descrito variedades de efectos fisiológicos para los fitoesteroles y fitoestanoles tales como propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas, siendo propiedades que comparten con los triterpenos pentacíclicos. Sin embargo, su efecto científicamente demostrado es el hipocolesterolémico, tanto a nivel del colesterol total como del colesterol-LDL, sin modificar los niveles del HDL. Estas moléculas son consideradas un buen material para el desarrollo de alimentos funcionales. Un ejemplo de ello es el enriquecimiento de margarina con α -sitosterol, campesterol y stigmasterol (Figura 6), los cuales al ser administrados a personas moderadamente hipercolesterolémicas, produce reducciones del colesterol circulante de un 10% sin afectar el colesterol- HDL también, estos compuestos tienen efectos benéficos en el control de hiperplasia prostática benigna. (Valenzuela, Alfonso. Ronco, 2004). Hasta ahora, no se han reportado efectos tóxicos debido al consumo de fitoesteroles en animales y humanos. Es probable que su administración a altas dosis (sobre 20g/día) genere diarrea como máxima toxicidad. (Muñoz et al., 2011)

Actualmente, gracias a la actividad fisiológica de los fitoesteroles, las empresas hacen uso de ellos en la producción de sus nutraceuticos, de tal forma que le dan a sus productos un valor agregado. De igual manera se han implementado en los alimentos dichos compuestos, indicados para efectos hipercolesterolémicos e inflamación benigna de próstata (Valenzuela, Alfonso. Ronco, 2004).

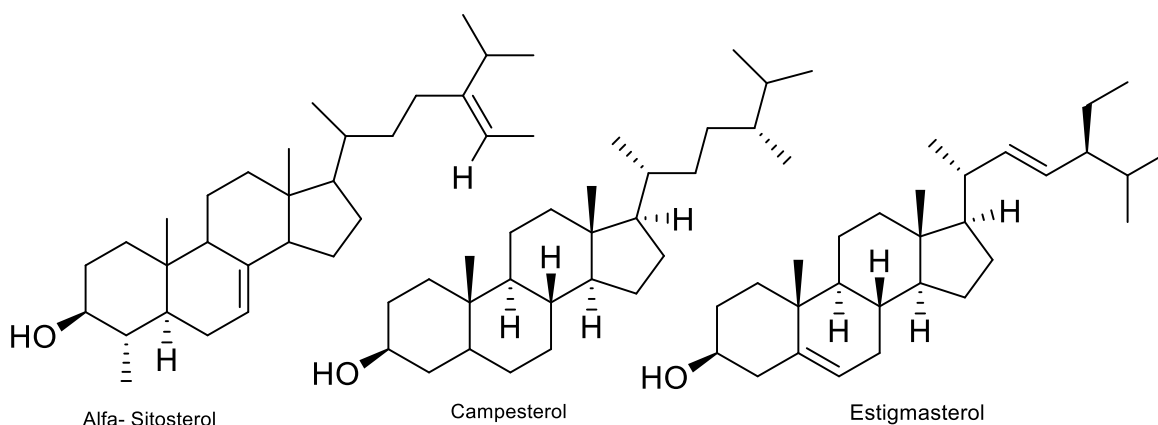


Figura 6 Estructura molecular de varios fitoesteroles (α - Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol)

Estas moléculas, específicamente la α -Sitosterol y Campesterol, son las más abundantes dentro de los esteroides vegetales. A pesar de que sus estructuras son similares a las del colesterol, su absorción en el intestino humano es distinta. No está elucidado totalmente el mecanismo en el que el fitoesterol ejerce efectos hipocolesterolémicos. Sin embargo, se ha postulado que debido a tener los fitoesteroides una mayor lipofiliidad que el colesterol (por su mayor extensión y complejidad de la cadena lateral), los esteroides vegetales desplazan competitivamente el colesterol desde la micela formada por la acción de fosfolípidos y de las sales biliares en el lumen intestinal. Así, cuando la micela tiene contacto con las microvelocidades de las células intestinales, los fitoesteroides ocuparían el lugar del colesterol y éste último terminaría siendo eliminado en las deposiciones (Valenzuela, Alfonso. Ronco, 2004).

2.3.5 Métodos instrumentales

2.3.5.1 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas corresponde a una técnica de análisis que tiene como objetivo caracterizar o determinar la estructura de las sustancias que se estén evaluando. Sin embargo, para lograr mejores resultados, se debe complementar con otras técnicas de caracterización. Este método es utilizado también para cuantificar compuestos conocidos y elucidar las propiedades químicas de las moléculas. La muestra es ionizada utilizando la técnica de impacto electrónico el cual consiste en el bombardeo de la muestra con una corriente de electrones de alta velocidad. El espectrómetro de masas genera múltiples iones de la muestra, luego la separa de acuerdo a su relación específica de masa carga (m/z) y finalmente

registra la abundancia relativa de cada tipo de ion, obteniéndose el ión molecular y el pico base (Premier Biosoft, 2016)

Esta espectrometría tiene muy poco en común con las técnicas clásicas de espectrofotometría, ya que, aquí no se utiliza ningún tipo de radiación y corresponde a un método destructivo, sin embargo la cantidad necesaria para obtener un espectro es muy pequeña (del orden de μg) (Premier Biosoft, 2016)

2.3.5.2 Cromatografía de gases- Espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica que logra separar ciertas mezclas que son muy complejas. Cuando ya se separan, detectan e incluso cuantifican los componentes de la muestra, solo se dispone como información el tiempo de retención de los picos cromatográficos. Al no ser suficiente dichos valores para identificar la molécula, se acopla la espectrometría de masas que identifica la sustancia una vez está pura. Por ello la asociación de ambas técnicas permite un resultado óptimo de la caracterización de una molécula (Gallego, 2011).

2.3.5.3 Cromatografía en columna automatizada

Isolera Flash-One corresponde al equipo utilizado para llevar a cabo cromatografía automatizada utilizando columnas compactas que permiten la purificación de los compuestos de manera rápida. Es un sistema de aislamiento cromatográfico acelerado de alto rendimiento con funciones de purificación, eficacia y ahorro de tiempo y costos (Biotage, s.f.)

2.3.5.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear (RMN) se puede aplicar a una amplia gama de matrices líquidas y sólidas sin alterar la muestra o producir desechos peligrosos (Almoselhy, Allam, El-Kalyoubi, & El-Sharkawy, 2014). RMN es utilizada para la determinación de la estructura de compuestos orgánicos, con la limitación de que solo se aplica para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones. Dentro de ellos se encuentran átomos como ^1H y ^{13}C , denominados núcleos magnéticamente activos (Sierra, et al 2010). Esta técnica es una de las más utilizadas por su gran capacidad para elucidación de estructuras moleculares.

Esta técnica se basa en estudiar los núcleos atómicos, alineándolos en un campo magnético constante para luego perturbar dicho alineamiento con otro campo magnético. La resonancia utiliza entonces los núcleos atómicos ya que resuenan a

una frecuencia directamente proporcional a la fuerza de un campo magnético ejercido (Sierra, et al 2010).

2.3.5.5 Cromatografía en columna seca

La cromatografía en columna seca es una técnica semejante a la cromatografía de capa fina, la diferencia radica en el uso de una columna para llevar a cabo la separación, siendo entonces su ventaja, la facilidad de cortar las bandas en que se separa la muestra dentro del sistema. Generalmente esta columna puede ser de plástico, de vidrio o nailon. En ella está contenida la silica como fase estacionaria hasta cierta altura, sembrándose en seco la muestra empacada. Se añade la fase móvil que avanzará por capilaridad hasta llegar al final de la columna. Las moléculas separadas se pueden apreciar en bandas que luego serán cortadas de la columna para obtener un compuesto altamente puro. Esta técnica permite una mejor resolución y reproducibilidad comparado a la cromatografía planar (Luján, 2010)

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo general

Realizar la separación y caracterización de compuestos activos presentes en un extracto de diclorometano de *Cecropia telenitida*.

2.4.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones cromatográficas para la purificación de al menos una molécula activa de un extracto de diclorometano de *Cecropia Telenitida*
- Identificar la molécula activa aislada del extracto de diclorometano de *Cecropia telenitida*

2.5 METODOLOGÍA UTILIZADA

2.5.1 Purificación

Para llevar a cabo la purificación de al menos una molécula activa presente en *C. telenitida*, se partió de un extracto de diclorometano de las raíces de esta planta. Dicho extracto se obtuvo en un proyecto de grado de maestría en la Universidad Icesi denominado “Biblioteca química derivada de *Cecropia telenitida* y su evaluación como fuente de moléculas inhibidoras de la enzima 11- β HSD1”. En primer lugar, se determinó el perfil de compuestos desconocidos a través de cromatografía en capa fina utilizando diversas fases móviles que iban desde una alta polaridad (Acetato de etilo 100%) hasta una baja polaridad (Diclorometano 100%), teniendo intermedios de diclorometano / acetato de etilo 2:8, 5:5 y 8:2. Con ello se determinó el gradiente óptimo para su aplicación en cromatografía automatizada y así llevar a cabo la primera separación de moléculas.

El proceso en el Isolera se realizaría teniendo la muestra líquida. Sin embargo, no se disolvió lo suficiente en los solventes usados (diclorometano y acetato de etilo), por lo que se rotaevaporó para eliminar dichos solventes y se trabajó con la muestra totalmente seca.

La muestra sólida se empacó con silica mediana (0,040-0,063mm) en una columna de 340g. Se preparó entonces todo el sistema para realizar la cromatografía Flash. Su fase móvil inicial fue diclorometano / acetato de Etilo 25:75, terminando con la proporción inversa (75:25). Al finalizar, se corrió únicamente metanol en la columna para extraer las moléculas que quedaron en ella.

Se obtuvieron 331 fracciones las cuales fueron verificadas de cinco en cinco utilizando cromatografía planar con fase móvil diclorometano / acetato de etilo 5:5. A partir de estos resultados se unieron las fracciones que al parecer contenían las mismas moléculas (R_f similar), quedando únicamente seis grandes fracciones y una séptima correspondiente a la extraída en metanol. Todas fueron secadas y posteriormente pesadas.

Se definió continuar la purificación con la fracción 2, realizando con ella el mismo procedimiento de cromatografía Flash en el Isolera pero comenzando con fase móvil diclorometano / acetato de etilo 90:10 y terminando con la proporción 50:50; se obtuvieron fracciones en 212 tubos de ensayo los cuales se verificaron de cinco en cinco y posterior de dos en dos en cromatografía planar (Diclorometano/ acetato de etilo 8:2); se unieron las fracciones que al parecer contenían las mismas moléculas obteniéndose diez grandes fracciones que se denominaron con letras para evitar confusiones (2a hasta 2j). Se testearon cada una de las diez fracciones en un sistema diclorometano / acetato de etilo 8:2 definiéndose a partir de allí continuar la separación con la fracción 2f.

Para este caso, se realizó otra corrida de la fracción 2f en cromatografía Flash usando una columna de 120g C18 y teniendo como fase móvil metanol 100%. Sin embargo, al verificar los tubos de ensayo en una cromatografía planar, no se aprecia una buena separación, por lo que se recupera nuevamente 2f en su totalidad. Durante una nueva corrida, en lugar de metanol 100%, se decidió usar un sistema inicial de metanol/ agua 50:50 terminando con metanol 100% como fase móvil.

Se testearon los tubos de ensayo con el sistema diclorometano /acetato de etilo 8:2 Con base en ello, se reunieron las fracciones en seis (2f₁, 2f₂,... 2f₆) decidiéndose tomar la fracción 2f₆, para posteriormente llevar a cromatografía en columna seca. Para la realización de ésta se utilizó una columna de vidrio de 9,5cm de diámetro con una altura de llenado de 10 centímetros de sílica mediana. Se utilizó diclorometano 100% como fase móvil. Se observó una banda definida con alto R_f, ésta se aisló y se secó, realizándose finalmente cromatografía planar para confirmar la presencia de una sola banda. En la figura 7 se muestra de manera resumida el procedimiento llevado a cabo.

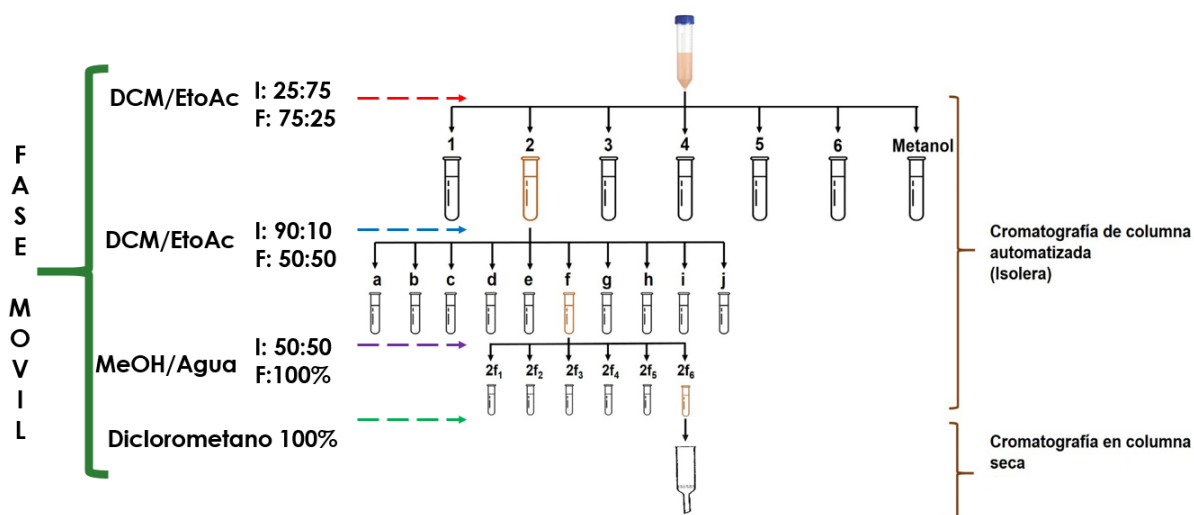


Figura 7 Ilustración de todas separaciones llevadas a cabo en la muestra inicial.

2.5.2 Caracterización

Con la muestra final extraída, se llevó a cabo cromatografía líquida con espectrómetro de masas (LC-MS) usando el espectrómetro SQD2 de Waters y resonancia magnética nuclear protónica (1H- RMN) en un equipo Bruker Ultrashield de 400MHz. También se realizó cromatografía de gases con detector de masas, teniendo un método con temperatura programada en columna de 80-290°C, la temperatura del inyector correspondiente a 250 °C y la columna utilizada fue una HP-5MS de 30 metros. Ésta técnica comparó cada señal con las bases de datos de

NIST, cotejándose únicamente aquellos compuestos que hicieron *match* con porcentaje de coincidencia por encima del 80%.

Con esta información extraída de la base de datos se destacó el compuesto de interés. Se realizó una comparación entre su espectro de masas proporcionado por la librería y los resultados que se obtuvieron en LC-MS. De igual manera se contrastó el espectro RMN-H para lograr una mayor robustez y evidencia en la identificación del compuesto presente.

2.6 RESULTADOS

2.6.1 Purificación:

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos al evaluar por primera vez el extracto de diclorometano de las raíces de *C. telenitida* en cromatografía planar con diferentes fases móviles para poder conocer la naturaleza de estas moléculas.

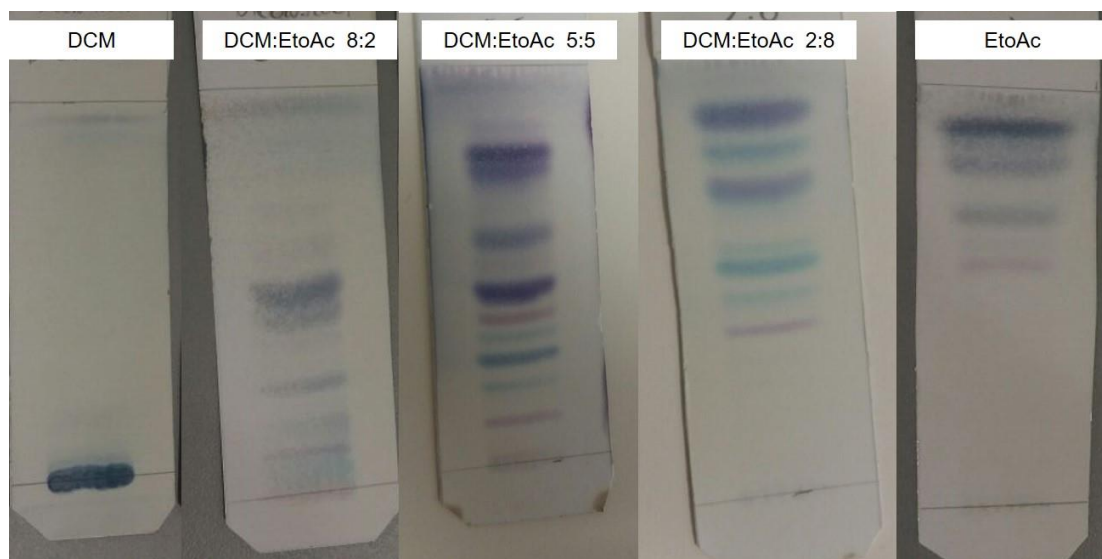


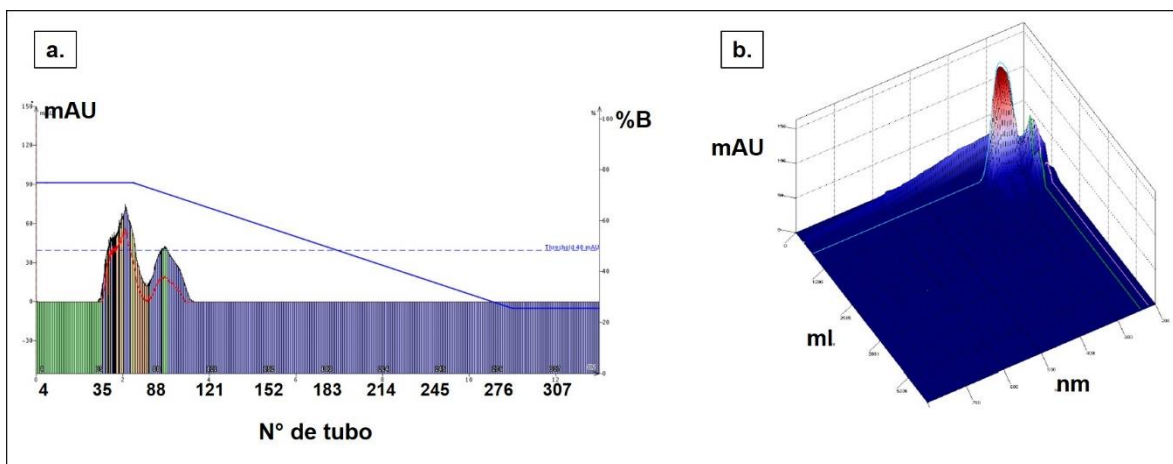
Figura 8 Evaluación del extracto inicial en placas cromatograficas con diferentes polaridades usando como solventes diclorometano y acetato de etilo.

Como se aprecia en la figura anterior, entre los sistemas 8:2 hasta 2:8 mostraron una clara separación en la que se ven gran cantidad de bandas, por lo que se convierten en una referencia para determinar posteriormente la proporción de los solventes en el Isolera Flash One.

El peso del extracto inicial correspondía a 5,3698g. Inicialmente, la corrida se llevaría a cabo con la muestra líquida. Sin embargo, no se solubilizó en los solventes utilizados, por ende se empaquetó en sílica mediana con el fin de realizar la cromatografía Flash teniendo la muestra sólida. Ésta se ubicó en una columna de 340g. En la tabla 1 se muestran las especificaciones del Isolera para realizar la corrida y en la gráfica 1 están los resultados proporcionados por la misma.

Tabla 1 Especificaciones del equipo Isolera Flash One para muestra inicial

Cartucho	SNAP HP- Sil 340g
Volumen de cada fracción	20 mL
Longitudes de onda	220nm-240nm
Solvente A/B respectivamente	Diclorometano / acetato de Etilo
Tasa de flujo	30 mL/min
Gradiente de inicio A/B	25:75
Gradiente final A/B	75:25



Gráfica 1 a. Resultados reportados por el Isolera en dos dimensiones para la muestra inicial. **b.** Resultados reportados con gráfica de superficie de respuesta para la muestra inicial

A las fracciones obtenidas se les evaluó en cromatografía planar de cinco en cinco en un sistema de diclorometano /acetato de etilo 5:5 para observar con mayor detalle la naturaleza de las moléculas (Figura 9)

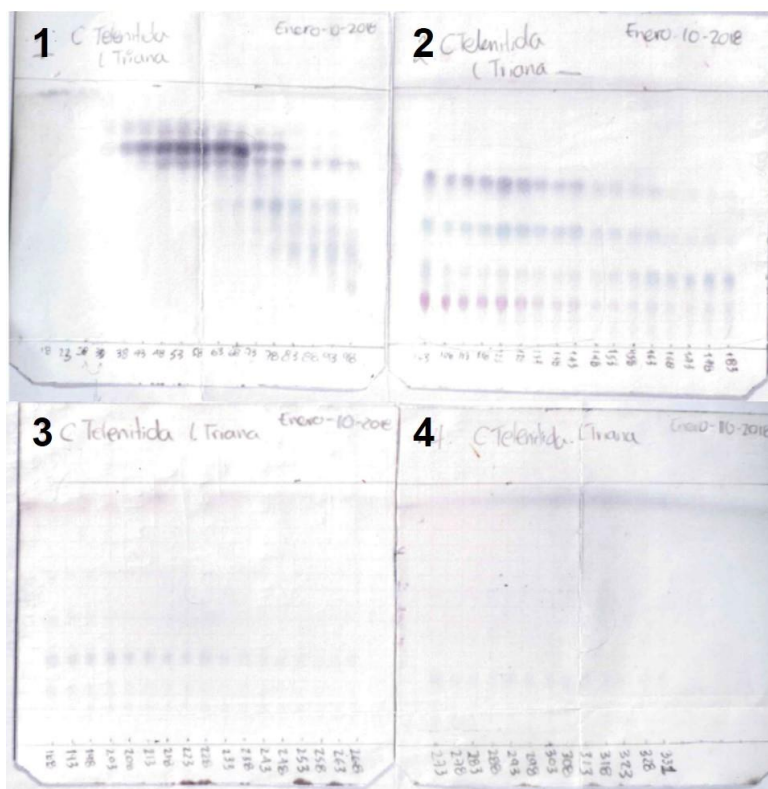


Figura 9. Cromatografía planar de las fracciones obtenidas en el Isolera Flash One. Fase móvil diclorometano / acetato de etilo 5:5

Para establecer cuales fracciones debían unirse, se tuvo en cuenta los Rf similares que presentaban las bandas y el color que se apreciaba en cada una de ellas. De esta manera, resultaron seis grandes fracciones y una séptima que correspondió a una corrida únicamente en metanol. Esta última igualmente fue secada. En la tabla 2 se muestran los pesos de cada una de las grandes fracciones.

Tabla 2 Peso de las grandes fracciones resultantes de Cromatografía Flash para muestra inicial.

Fracción	Peso (mg)
1	43,0
2	1605,4
3	332,0
4	477,0
5	119,0
6	292,0
7 (Metanol)	517,8

Se tuvo una pérdida de 2,0464g, correspondiente al 38,11% de la muestra inicial, durante el proceso de purificación.

Se realizaron varias cromatografías planares con las seis fracciones teniendo como fin evidenciar el comportamiento que tenía cada una de ellas en distintas polaridades. En la figura 10 se muestra la placa cromatográfica general realizada con todas las fracciones, en una proporción diclorometano / acetato de etilo 5:5

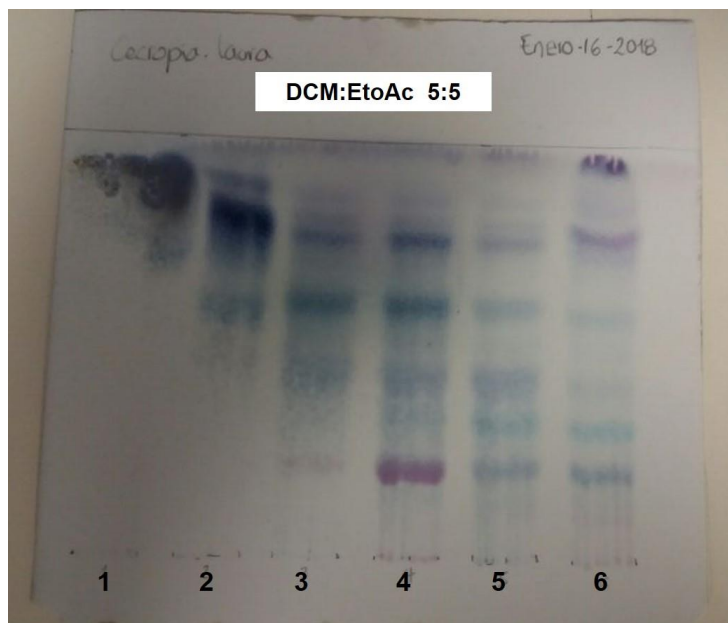


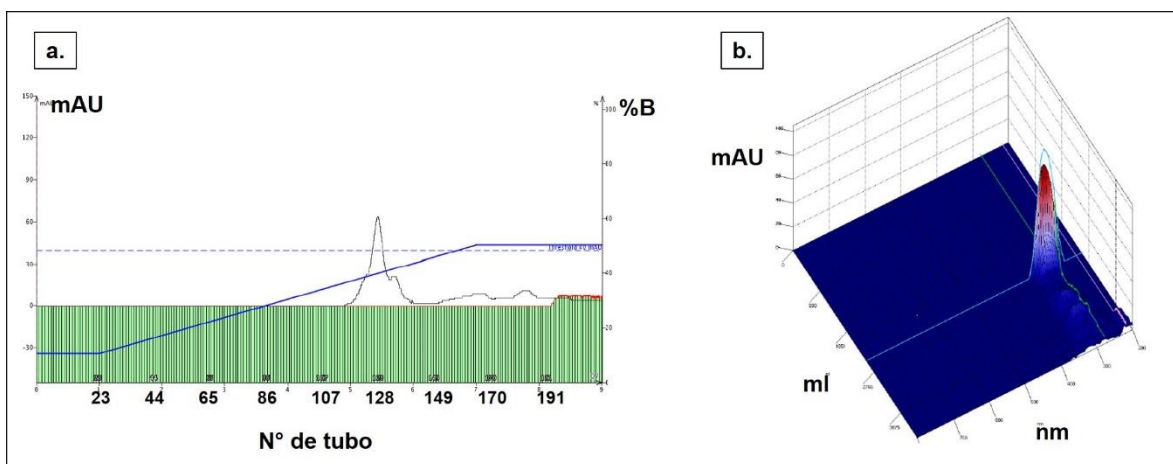
Figura 10. Cromatografía planar de las 6 fracciones recolectadas de la muestra inicial.
Fase móvil: diclorometano / acetato de etilo 5:5

Se analizó la fracción número 2 que, además de observarse una banda bastante oscura (alta concentración de moléculas), es la fracción que se encuentra en más alta cantidad. Por tales motivos se decidió continuar el proceso de aislamiento a partir de ella.

La fracción dos se preparó del mismo modo que la muestra inicial para realizar la cromatografía en el Isolera Flash One: Se empacó en silica mediana, y se montó en una columna de 340g. En la tabla 3 se muestran las especificaciones del Isolera para realizar la corrida y en la gráfica 2 están los resultados proporcionados por la misma.

Tabla 3 Especificaciones del equipo Isolera Flash One para fracción 2

Cartucho	SNAP KP- Sil 340g
Volumen de cada fracción	20 mL
Longitudes de onda	220nm-280nm
Solvente A/B respectivamente	diclorometano / acetato de etilo
Tasa de flujo	25 mL/min
Gradiente de inicio A/B	90:10
Gradiente final A/B	50:50



Gráfica 2 a. Resultados reportados por el Isolera en dos dimensiones para la fracción 2.
b. Resultados reportados con gráfica de superficie de respuesta para la fracción 2.

Se realizó cromatografía planar a los tubos de ensayo recogidos de cinco en cinco y posterior de dos en dos (DCM: EtoAc 8:2) y de esta manera se logró definir las fracciones que debían unirse. Se determinó que las primeras fracciones (1 a 95) contenían muy poca cantidad de moléculas debido a la baja intensidad de las bandas, por lo que se decidió testear de nuevo cada 2 tubos de ensayo a partir del tubo 96 hasta el 211 (Figura 11)

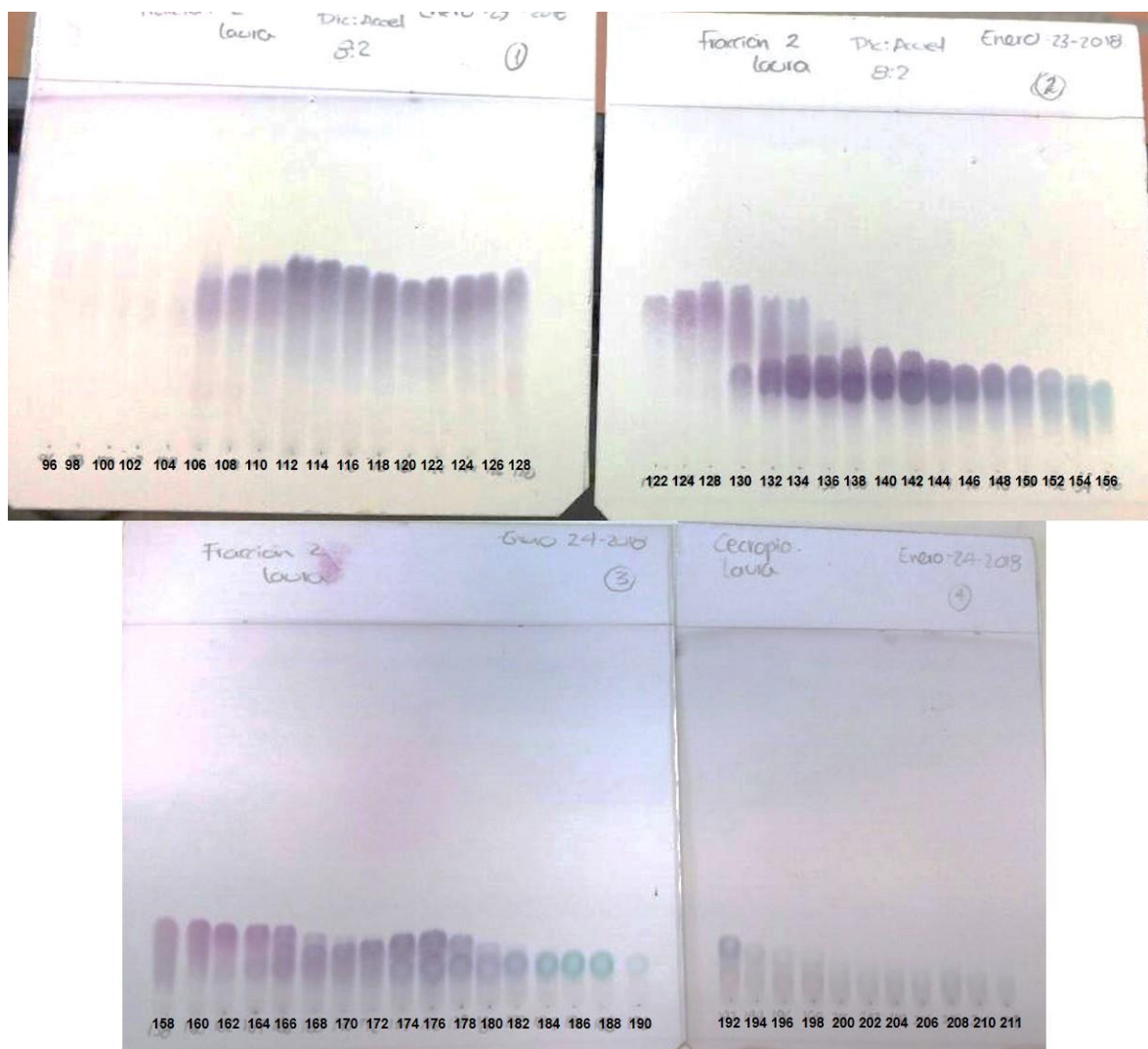


Figura 11. TLC correspondientes a los tubos de ensayo obtenidos en Cromatografía flash para la muestra 2 tomados a partir del tubo 196. Fase móvil diclorometano/ acetato de etilo 8:2

A partir de allí se unieron las fracciones que presentaban bandas con los mismos R_f y un color similar y a partir de allí se obtuvieron 10 grandes fracciones, denominadas con letras para diferenciarlas de las fracciones numéricas anteriormente nombradas. En la tabla 4 se muestra el peso de cada fracción (desde 2a hasta 2j) obtenido después de secar cada una de ellas.

Tabla 4 Peso de las grandes fracciones resultantes de Cromatografía Flash para muestra 2.

Fracción	Peso (mg)
2a	9,7
2b	20,9
2c	15,8
2d	13,8
2e	88,2
2f	667,9
2g	220,7
2h	63,0
2i	175,5
2j	56,1

Se tuvo una pérdida de 273,8 mg correspondiente al 17,05% de la muestra 2. En la figura 12 se aprecia la cromatografía planar realizada en fase móvil diclorometano/acetato de etilo 8:2 para las 10 fracciones resultantes.

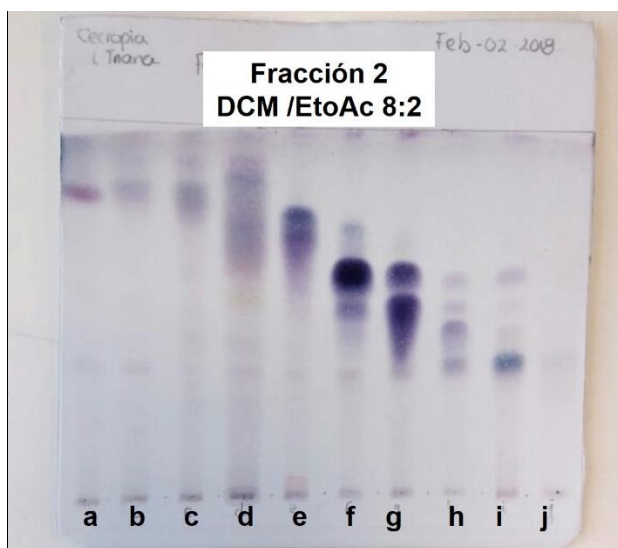


Figura 12. Cromatografía planar de las 10 fracciones recolectadas de la muestra 2. Fase móvil: diclorometano /acetato de etilo 8:2

Las muestras 2f y 2g tienen una señal bastante marcada. Sin embargo, la muestra 2g tiene otra señal que también se destaca, por lo que se prefirió continuar con 2f pues las demás señales de ésta muestran que no están en muy alta proporción. Las demás muestras (2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g, 2h, 2i, 2j) no continúan haciendo parte de este proyecto.

A partir de la muestra 2f se realizó la cromatografía flash en fase reversa utilizando la columna de 120g con silica C18 siendo la fase móvil metanol 100%. Cuando se realizó cromatografía planar a las fracciones obtenidas (DCM /EtoAc 8:2) se encontró que no hay una buena separación la cual se evidencia en la figura 13, donde fueron testeadas únicamente los tubos de ensayo del 8 al 13 puesto que la información dada por el Isolera indicaba una señal marcada en ellos. Se secó la muestra y se realizó nuevamente la corrida bajo las mismas condiciones exceptuando la fase móvil, correspondiente a metanol/ agua 50:50 terminando con metanol 100%.



Figura 13. Cromatografía planar de fracciones recogidas en Cromatografía flash con sistema metanol 100%. Fase móvil: diclorometano /acetato de etilo 8:2

Después de realizar por segunda vez la cromatografía de columna automatizada en fase reversa, se realizó cromatografía planar a las fracciones con fase móvil diclorometano / acetato de etilo 8:2. A partir de allí, se reunieron en seis grandes fracciones después de ver los resultados de la cromatografía planar (Figura 14). Se tomó la muestra 2f₆ que corresponde a la fracción que se encuentra entre las líneas punteadas de la figura 14. Ésta se pasó a cromatografía de columna seca. En ella se separó la banda que tenía un R_f de 0,81 (Figura 15)

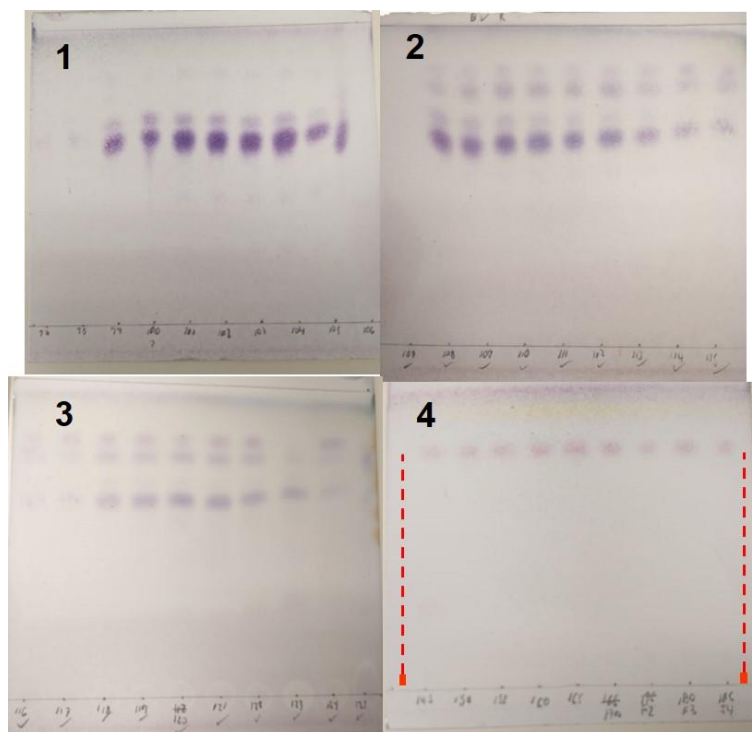


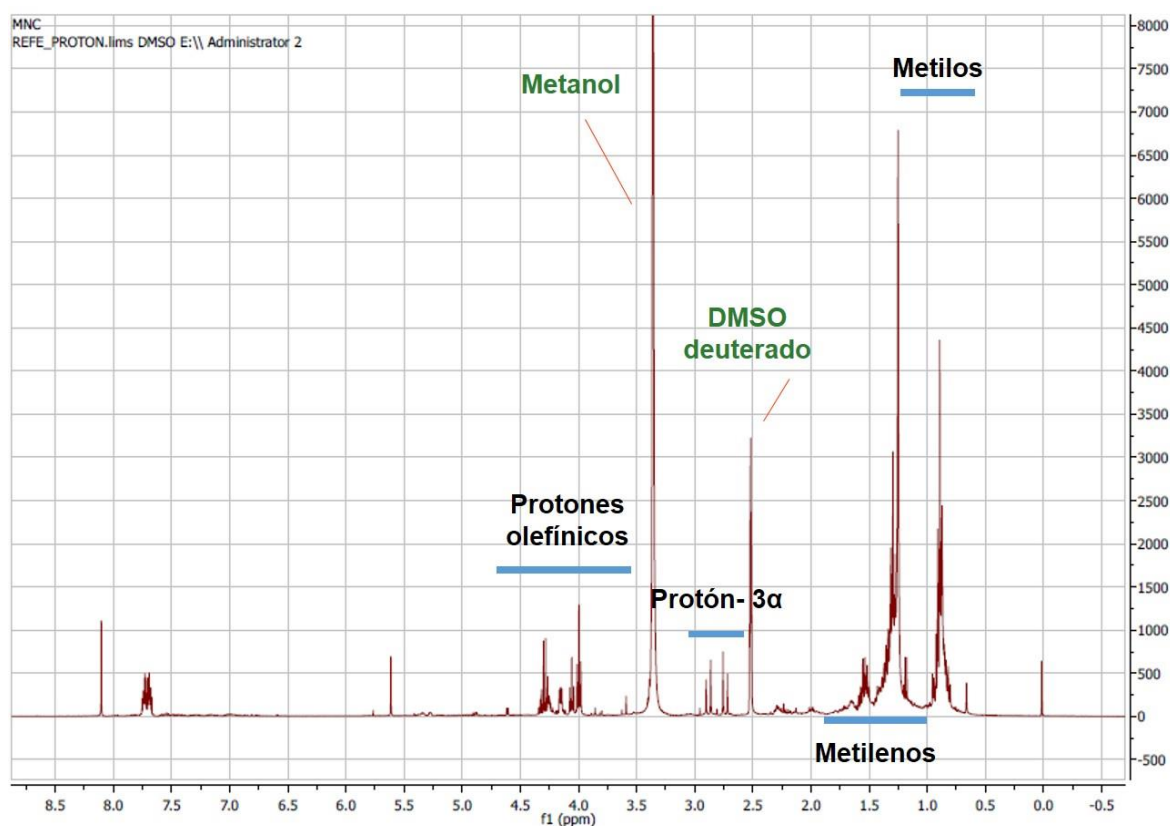
Figura 14 TLC correspondientes a los tubos de ensayo obtenidos en Cromatografía flash en fase reversa para la muestra 2f. Fase móvil diclorometano/ acetato de etilo 8:2



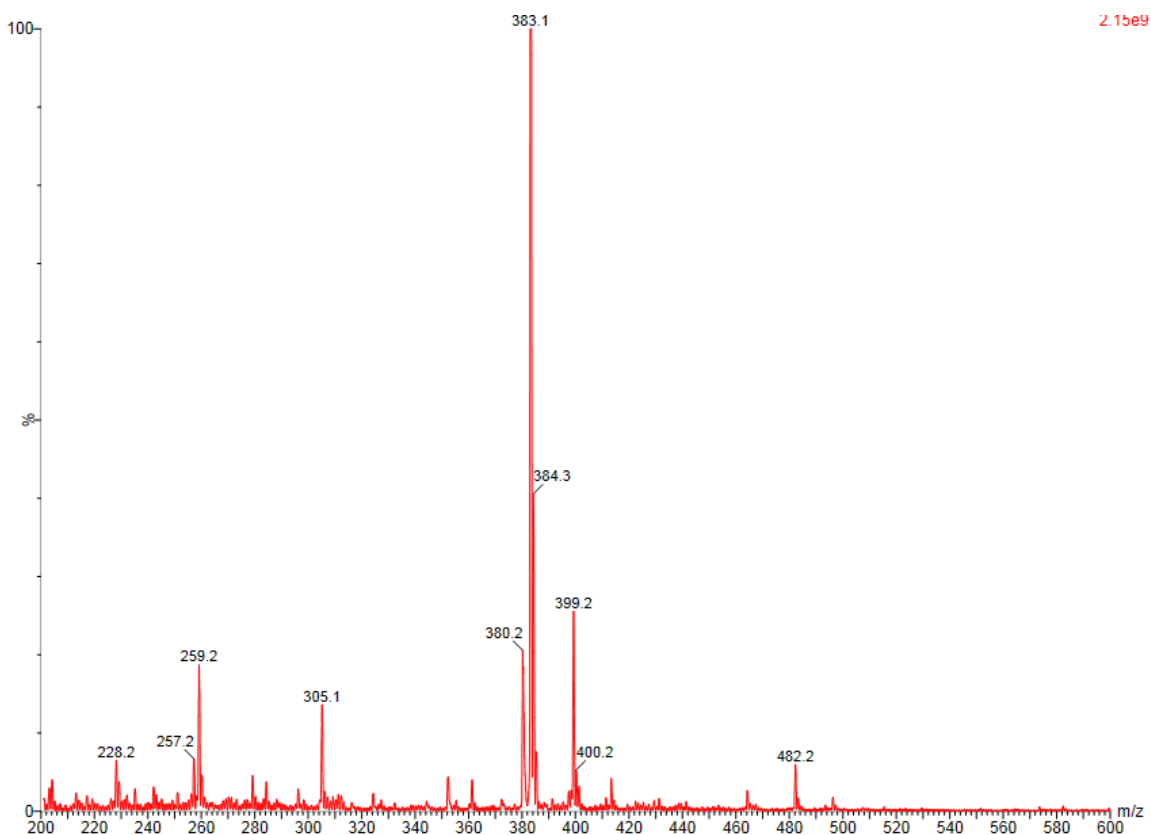
Figura 15. TLC correspondiente a la muestra final obtenida

2.6.2 Caracterización:

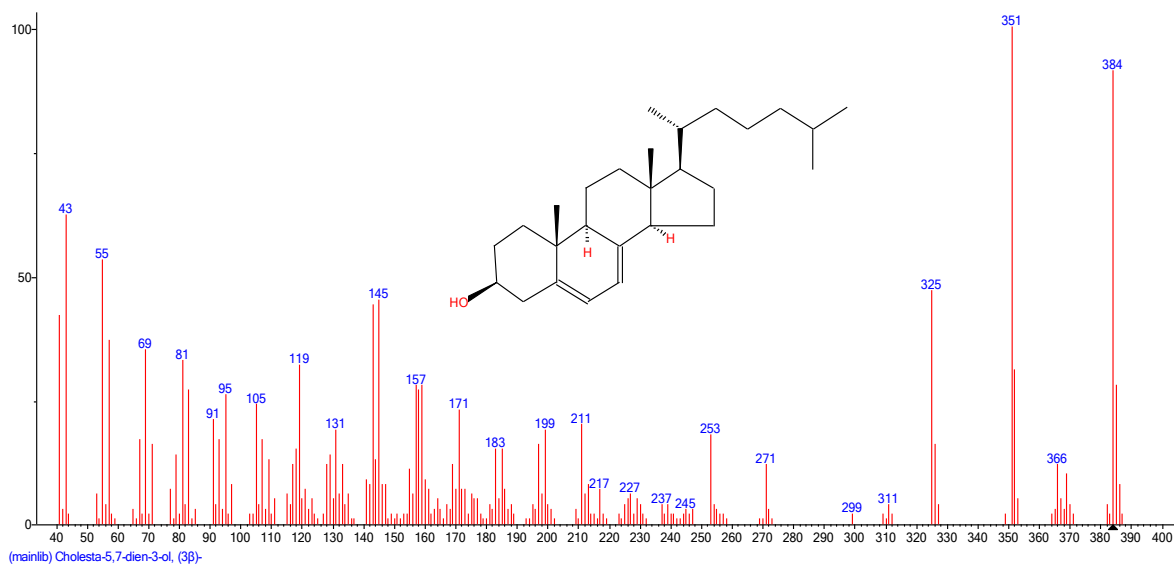
A continuación se muestra el espectro de RMN protónico. De igual manera, en la parte espectrométrica, se muestran los espectros de masas obtenidos en el espectrómetro SQD2 de Waters y detector de ionización de llama HP 6890.



Gráfica 3 Espectro de ^1H - RMN de la muestra $2f_6$



Gráfica 4 Espectro de masas de la muestra 2f₆ en MS SQD2 de Waters.



Gráfica 5. Espectro de masas de Colesta-5,7-Dien-3-ol de la base de datos de NIST.

2.7 DISCUSIÓN

Cecropia es un género conocido pero poco estudiado por la ciencia en cuanto a su composición y propiedades fitoquímicas. En vista de la necesidad de profundizar en estos conocimientos, se hace pertinente indagar la naturaleza química de *Cecropia telenitida*. Siendo este árbol objeto de este estudio, se logró identificar la presencia de un conjunto de compuestos característicos en esta planta.

Con el uso de la cromatografía de columna automatizada en repetidas ocasiones, se fue separando poco a poco la muestra inicial hasta llegar a un punto de alta pureza con el que se prosiguió a la etapa de caracterización. Al realizarse la primera corrida en el Isolera, se aprecia en la gráfica 1 que casi todas las moléculas fueron recolectadas en los primeros tubos de ensayo donde la fase móvil presentaba una mayor proporción polar. En términos generales, se podría decir que las moléculas allí presentes en su mayoría tenían una naturaleza polar y podrían arrastrar a aquellas que no lo eran. Al realizarse cromatografía planar, se reconfirma la alta concentración de moléculas en los primeros tubos de ensayo (figura 9), razón por la cual, después de reunir seis fracciones se decide tomar la fracción 2 (compuesta por los tubos de ensayo 33 hasta 83) obteniéndose una cantidad abundante de ésta (1605,4 mg).

Durante el segundo proceso de separación con la muestra 2 en el Isolera, se puede ver en la gráfica 2 que la mayoría de las moléculas están concentradas casi al final del trayecto que realiza el equipo, zona en la que la fase móvil correspondía a diclorometano/ acetato de etilo en proporción 60:40 aproximadamente. Teniendo en cuenta que se comienza con una proporción de 90:10, a pesar de que en este sistema existe una mayor proporción apolar, continúa la tendencia de que las moléculas eluyan cuando hay mayor cantidad de acetato de etilo. Después de realizar cromatografía planar a las fracciones resultantes (figura 11), puede notarse que entre los tubos 130 y 150 hay una banda bastante marcada. Al reunirse las fracciones con R_f similar, la muestra 2f corresponde al contenido de dichos tubos, por lo que se prosiguió con ella. De igual manera, fue la muestra en mayor cantidad (667,9 mg), lo cual es posible notar en la intensidad de las señales en la placa cromatográfica de la figura 12.

Al realizarse la cromatografía fase reversa en el isolera con la muestra 2f, se utilizó como fase móvil metanol 100%. Sin embargo, se observó que todas las moléculas se concentraron en los primeros tubos de ensayo, por lo que al evaluarse en cromatografía planar (figura 13), se evidencian varias bandas marcadas, por lo que no hubo una buena separación. Por ello se secó la muestra y al volverse a realizar el procedimiento, se tuvo en cuenta aumentar la polaridad de la fase móvil, utilizando agua y metanol para garantizar una separación más efectiva.

Después de evaluar en cromatografía planar (figura 14), se separan los tubos de ensayo en seis fracciones, escogiéndose la fracción 2f₆ puesto que solo se apreciaba una señal en la placa. Sin embargo, para garantizar una mejor resolución, se le realizó a esta muestra cromatografía por columna seca donde se extrajo la banda con mayor R_f (0,81) debido a que fue la que mejor aislamiento presentó en la columna. De esta manera, se establece que la cromatografía en columna seca permite separar mejor aquello que en una placa cromatografica no es posible diferenciar. Esto se debe a que, además de poder separar con mayor facilidad las partes de la columna que contienen la banda de interés, es posible variar la fase móvil durante el proceso de separación y mejorar de esta manera los resultados obtenidos (Luján, 2010).

Con respecto a la caracterización, se tiene entonces sustentos analíticos tales como la espectroscopia RMN protónica y la espectrometría de masas, en los cuales se logra determinar la composición de la muestra obtenida del proceso de purificación. Se comenzó analizando el espectro de ¹H- RMN (gráfica 5). En el espectro se pueden observar que las señales no están traslapadas y pueden ser interpretadas teniendo en cuenta sus desplazamientos. Entre 0,5 y 1,0 ppm se pueden ver señales que representan los hidrógenos presentes en grupos metilos; entre 1,0 y 1,8 ppm están las señales correspondientes a hidrógenos de grupos metilenos; entre 3,8 y 4,5 ppm se pueden ver ciertas señales correspondientes a protones olefínicos; entre 2,7 y 3,0 ppm se observan pequeños singletes correspondientes a protones 3 α . Cada una de estas señales es atribuida a partes estructurales características de una molécula de tipo esterol. Se puede notar que hay desplazamiento de los protones olefinicos a campo bajo, representando en gran manera un campo magnético efectivo mayor, lo que llevaría a la conclusión de que se encuentran poco apantallados debido a la estructura cíclica de la molécula y a sus dobles enlaces. Al apreciarse varios singletes que representan protones 3 α , se pudo determinar que la muestra evaluada no estaba completamente pura. Al parecer había un conjunto de moléculas similares que estaban mostrando estas señales. Por esta razón, se decidió continuar analizando el espectro de masas obtenido por infusión directa utilizado metanol y ácido fórmico.

En el espectrómetro de masas SQD2 se lleva a cabo la fragmentación con muy baja energía, usando una fuente ESI (electrospray). La muestra líquida se introduce a través de un capilar al que se aplica un elevado potencial ($\pm$ 3-5 kV), lo que permite producir un spray de microgotas cargadas, que provocan evaporación de los iones. Se genera lo denominado “ionización suave”, de tal forma que los iones producidos son principalmente derivados de la incorporación de uno o varios protones a las moléculas (Toribio, 2003) De esta manera, para la detección de la estructura, ésta se protona, de tal forma que su peso molecular aumenta, debido a la adición de protones con sus respectivos neutrones.

En el espectro se puede apreciar que su pico base tiene una relación m/z de 383,1, teniendo otras señales cercanas a él (380,2, 384,3, 399,2 m/z). Estos pesos moleculares son similares al peso de un esteroide, por lo que se define que cada una de ellas puede estar representando una molécula con dicha estructura teniendo en cuenta que, por la manera en que opera el equipo, su relación m/z aumenta su peso en una unidad debido a la adición de un protón.

Con los resultados de este espectro de masas y su respectivo análisis, se decidió continuar realizando cromatografía de gases acoplado a masas, ya que éste al comparar los resultados con la base de datos de NIST, indica las moléculas que tienen un alto *match* o porcentaje de similitud con las que están registradas en la librería. De esta manera se pueden contrastar los resultados de ambas técnicas espectrométricas.

En cromatografía de gases con detector de masas se da la ionización de electrones, es decir, se da un bombardeo de electrones libres a la muestra, causando la fragmentación de la molécula. A esta técnica se le denomina “ionización dura” la cual genera mayor cantidad de fragmentos de baja relación m/z . En pocas palabras, esta técnica se diferencia de la ionización suave puesto que no presenta colisión molecular con un gas introducido sino un bombardeo molecular de electrones (Abian, 1999).

Al realizarse entonces la cromatografía de gases, se vieron varias señales que demuestran efectivamente que la fracción 2f₆ presenta varios compuestos. Se realizó una comparación de los tiempos de retención de estas señales con la base de datos de NIST encontrándose que para la señal con un tiempo de retención de 22,654 y un *match* del 90%, correspondía el compuesto Colesta - 5,7- Dien-3-ol. De esta molécula se revisó el espectro de masas (Gráfica 5) y se encontraron relaciones significativas con el espectro de masas obtenido en el SQD2.

El ion molecular de Colesta - 5,7- Dien-3-ol es de 384 m/z , un valor cercano al que se obtuvo en el pico base del espectro de masas por infusión directa. Teniendo en cuenta el tipo de ionización de ambas técnicas espectrométricas, se corrobora entonces que, el pico base de 383,1 m/z está indicando la presencia de un esteroide en alta proporción que se encuentra protonado, muy parecido al que indica la librería de NIST en la cromatografía de gases. La estructura reflejada en el pico base tendría entonces un peso de 382,1 g/mol. Debido a su cercano peso molecular con Colesta - 5,7- Dien-3-ol, se puede decir que la molécula que se evidencia en el SQD2 es similar, teniendo un pequeño cambio en su estructura. Se concluye que hay un doble enlace adicional que disminuye la cantidad de hidrógenos en la molécula por lo que su peso disminuye en dos unidades.

En este orden ideas, se determina que la molécula que tiene un peso de 382,1 g/mol es 7-Dehidrocolesterina, la cual se refleja en el pico base del espectro pero en un estado protonado. Como se aprecia en la figura 16, las dos estructuras corresponden a esteroides con alta homología. Cabe resaltar que la muestra obtenida en la purificación no solo consta de estas dos moléculas, sino que corresponde a una fracción de varias emparentadas, es decir, con un esqueleto base y pequeños cambios en su estructura que hacen variar su peso molecular.

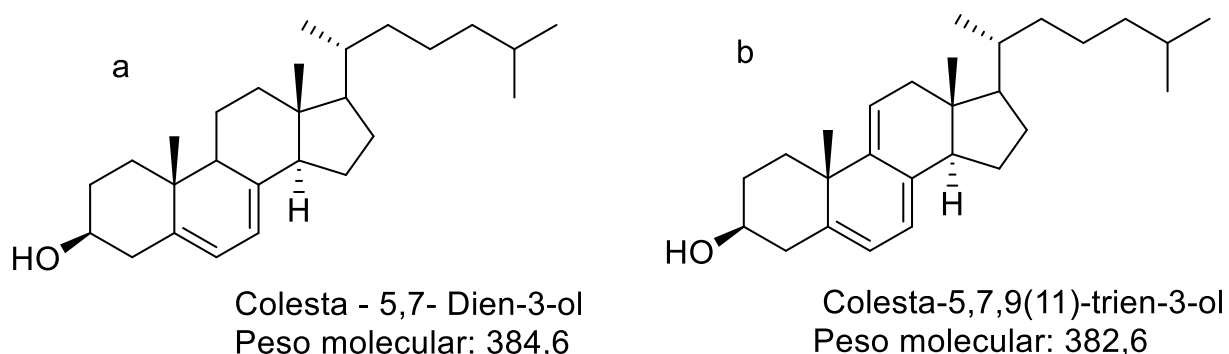


Figura 16 a. Estructura molecular del compuesto definido en espectro de masas de la base de datos de NIST. **b.** Estructura molecular del compuesto definido como el pico base en el espectro de masas realizado por MS SQD2

Es así como se establece que se tiene un grupo de moléculas esteroidales muy parecidas donde los métodos espectrométricos y espectroscopico así lo demuestran. Retomando el espectro de RMN protónico, se hace evidente que no habría forma de llegar a la molécula únicamente analizando sus señales puesto que no hay una única especie molecular, lo que haría difícil su integración y apreciación de señales definidas. Sin embargo, se tuvieron indicios de aquello que conformaba esta fracción en mayor cantidad.

Cuando se concluyó el proceso de purificación, se realizó una cromatografía planar (figura 15) donde solo se apreciaba una banda no por el hecho de contener un compuesto totalmente puro, sino porque su composición era de varias moléculas con polaridad similar. Además la baja resolución y aspecto mayoritariamente cualitativo de la cromatografía en capa fina hacía imposible diferenciar cada una de ellas.

2.8 CONCLUSIONES

- Mediante la cromatografía en columna automatizada y cromatografía en columna seca se logró purificar un conjunto de moléculas correspondientes a esteroides utilizando como fase móvil diclorometano y acetato de etilo principalmente, identificándose claramente una banda en la placa cromatográfica final que determinó el grado de pureza de la muestra final (muestra 2f₆).
- A partir de RMN protónico se logró tener un fundamento que permitió corroborar la presencia de esteroides en la muestra obtenida.
- Gracias a las técnicas espectrométricas se logró identificar dos moléculas con alta homología correspondiente a esteroides presentes en la muestra 2f₆: Colesta-5,7- Dien-3-ol con la cromatografía de gases acoplada a masas y 7 Dehidrocolesterina con la espectrometría de masas en el SQD2.
- Se determinó que la muestra 2f₆ correspondía, no solo a las dos moléculas caracterizadas sino a una fracción de diversas moléculas con una alta homología de tipo esteroide.

2.9 RECOMENDACIONES

- En vista de las propiedades terapéuticas que reconoce el Invima al género *Cecropia*, se recomienda continuar en la línea de investigación fitoquímica que permita identificar precisamente las moléculas responsables de estas propiedades, conociéndose que los fitoesteroides poseen efectos farmacológicos en el organismo.
- De igual manera, se podrían aislar otros componentes activos que quedaron en las fracciones no utilizadas en la conclusión de este proyecto y de esta manera crear un banco de moléculas exclusivas del género *Cecropia*.
- Se recomienda llevar a cabo ¹H-RMN después de conocer si el compuesto a evaluar está o no completamente puro.

2.10 BIBLIOGRAFÍA

- Abian, J. (1999). The Coupling of Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY J. Mass Spectrom*, 34(February), 157–168. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199903\)34:3<157::AID-JMS804>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199903)34:3<157::AID-JMS804>3.0.CO;2-4)
- Almoselhy, R. I. M., Allam, M. H., El-Kalyoubi, M. H., & El-Sharkawy, A. A. (2014). ¹H NMR spectral analysis as a new aspect to evaluate the stability of some edible oils. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2014.11.006>
- Andrade Andrés, V. R. (2010). Inhibición de la gluconeogénesis y composición fitoquímica de dos especies de Cecropia. *J Ethnopharmacol*, 93–97.
- Anulika, N. P., Ignatius, E. O., Raymond, E. S., Osasere, O., & Hilda, A. (2016). The Chemistry Of Natural Product : Plant Secondary Metabolites The Chemistry Of Natural Product : Plant Secondary Metabolites, 4(August), 0–8.
- Aragão, D. M. O., Guarize, L., Lanini, J., da Costa, J. C., Garcia, R. M. G., & Scio, E. (2010). Hypoglycemic effects of Cecropia pachystachya in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(3), 629–633. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.008>
- Biotage. (n.d.). Isolera Spektra Systems with ACI and Assist.
- Chen, D., Huang, X., Zhou, H., Luo, H., Wang, P., Chang, Y., ... Liu, J. (2017). Discovery of pentacyclic triterpene 3 β -ester derivatives as a new class of cholesterol ester transfer protein inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.012>
- Davis, H. R., Zhu, L. J., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., ... Altmann, S. W. (2004). Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33586–33592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405817200>
- Encyclopaedia Britannica. (n.d.). Cecropia Tropical Tree. In *Encyclopaedia Britannica*.
- Furtado, N. A. J. C., Pirson, L., Edelberg, H., Miranda, L. M., Loira-Pastoriza, C., Preat, V., ... André, C. M. (2017). Pentacyclic triterpene bioavailability: An overview of in vitro and in vivo studies. *Molecules*, 22(3), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules22030400>
- Gallego, L. (2011). *Técnicas: Espectrometría, espectroscopía. Unidad de espectrometría de Masas*.
- GBIF. (2017). Global Biodiversity Information Facility. Retrieved from https://www.gbif.org/occurrence/datasets?taxon_key=4013242

- Giménez, E., Juan, M. E., Calvo-Melià, S., & Planas, J. M. (2017). A sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination in plasma of pentacyclic triterpenes of *Olea europaea* L. *Food Chemistry*, 229, 534–541. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.116>
- Guillermo, M., Jelter, S., Fernando, A., & Ulrike, H. (2013). Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* with immunomodulatory activity on dendritic cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 7.
- Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaría, L., García-Hernández, B., Nicasio-Torres, P., & Tortoriello, J. (2004). Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*, 11(7–8), 561–566. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.01.006>
- Invima. (2007). Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA Ministerio de la Protección Social.
- Luján, M. (2010). Cromatografías especiales. *Complemento Teórico*, 1–5. Retrieved from <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads/2010/03/COMPL-TEOR-CROMATOG-ESPECIALES-2010.pdf>
- Michaudel, Q. (2013). Pentacyclic Triterpenes Pentacyclic Triterpenes, 1–12.
- Mongabay. (2016). The top 10 most biodiverse countries. Retrieved from <https://news.mongabay.com/2016/05/top-10-biodiverse-countries/>
- Müller, S. D., Florentino, D., Ortmann, C. F., Martins, F. A., Danielski, L. G., Michels, M., ... Reginatto, F. H. (2016). Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.007>
- Muñoz, A. M., Alvarado-Ortíz, C., & Encina, C. (2011). Fitoesteroides y fitoestanoles : Propiedades saludables. *Horizonte Medico*, 11(2), 93–100. Retrieved from http://www.medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2011_2/Art6_Vol11_N2.pdf
- Nayak, B. S. (2006). *Cecropia peltata* L.(Cecropiaceae) has wound-healing potential: A preclinical study in a Sprague Dawley rat model. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 5(1), 20–26. <https://doi.org/10.1177/1534734606286472>
- Patočka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J Appl Biomed*, 1(1), 7–12.
- Premier Biosoft. (2016). Mass spectrometry. Retrieved from http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html
- Revilla-Monsalve, M. C., Andrade-Cetto, A., Palomino-Garibay, M. A., Wiedenfeld, H., & Islas-Andrade, S. (2007). Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia*

- Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 636–640.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.014>
- Rivera-Mondragón, A., Ortiz, O. O., Bijttebier, S., Vlietinck, A., Apers, S., Pieters, L., & Caballero-George, C. (2017). Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1500–1512. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1307421>
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T. P., Maguire, A. R., & O'Brien, N. M. (2007). Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(3), 85–91.
<https://doi.org/10.1007/s11130-007-0046-8>
- Schmidt, M. E. P., Pires, F. B., Bressan, L. P., Silva, F. V. da, Lameira, O., & Rosa, M. B. da. (2017). Some triterpenic compounds in extracts of *Cecropia* and *Bauhinia* species for different sampling years. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.11.005>
- Scimago Journal & Country Rank. (2016). Rancking of Plant science.
- Sierra Isabel, Gómez Santiago, Pérez Damián, M. S. (2010). *Fundamento de la Resonancia Magnética Nuclear*. (B. Lorena, Ed.) (Hesbilbo).
- Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., & Osbourn, A. (2014). Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 225–257. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>
- Toribio, F. (2003). Cromatografía de líquidos - espectrometría de masas. *Desarrollo de Metodología Analítica Basada En El Uso de Técnicas Combinadas Para La Determinación de Aminas Heterocíclicas*, 167–169.
 Retrieved from <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42822>
- Valenzuela, Alfonso. Ronco, A. (2004). FITOESTEROLES Y FITOESTANOLES: ALIADOS NATURALES PARA LA PROTECCION DE LA SALUD CARDIOVASCULAR. *Revista de Chilena Nutrición*, 31, 161–169. Retrieved from https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182004031100003#top
- Yang, F., Oyeyinka, S. A., & Ma, Y. (2016). Novel Synthesis of Phytosterol Ester from Soybean Sterol and Acetic Anhydride. *Journal of Food Science*, 81(7), C1629–C1635. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13354>
- Zhang, B. wei, Xing, Y., Wen, C., Yu, X. xia, Sun, W. long, Xiu, Z. long, & Dong, Y. sheng. (2017). Pentacyclic triterpenes as α -glucosidase and α -amylase inhibitors: Structure-activity relationships and the synergism with acarbose. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(22), 5065–5070.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.027>