

**EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE GLICÓSIDOS PRESENTES EN
Nerium oleander Y *Thevetia peruviana* POR UPLC ACOPLADO A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS A PARTIR DEL MATERIAL VEGETAL**

LIESETH MANRIQUE CABRERA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

**EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE GLICÓSIDOS PRESENTES EN
Nerium oleander Y *Thevetia peruviana* POR UPLC ACOPLADO A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS A PARTIR DEL MATERIAL VEGETAL**

LIESETH MANRIQUE CABRERA

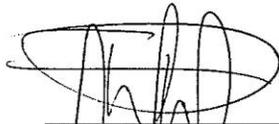
**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE PREGRADO EN:
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**TUTOR DE INVESTIGACIÓN
GUILLERMO LEÓN MONTOYA PELÁEZ
DIRECTOR PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA**

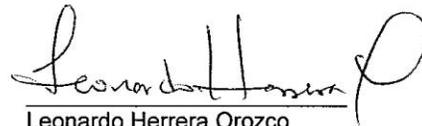
**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**



APROBADO POR:



Andrés Felipe Dávalos Vélez
Evaluador



Leonardo Herrera Orozco
Evaluador



Guillermo León Montoya Peláez
Director del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Guillermo León Montoya Pelaez por su apoyo durante el desarrollo de la parte experimental del proyecto y también su asesoría en la escritura del mismo.

A la Universidad Icesi por los espacios físicos que permitieron el desarrollo del proyecto y por las especies vegetales que fueron objeto de estudio del proyecto.

Al almacén de reactivos y materiales de la Facultad de Ciencias Naturales por el apoyo brindado con los materiales y reactivos usados durante el proyecto.

A las profesoras: Nora Elena Valderruten Posso y Clara Beatriz Ocampo por sus correcciones durante proyecto de grado I.

Tabla de contenido

1. Lista de Figuras.....	6
2. Resumen del proyecto.....	7
3. Abstract	8
4. Introducción.....	9
5. Descripción del proyecto.	11
Planteamiento del problema.....	11
Marco teórico y estado del arte.	13
Aspectos relevantes y reportes farmacológicos:.....	13
Correlación entre fisiología vegetal y la expresión metabólica	14
Glicósidos cardiotónicos.	14
Aspectos toxicológicos de <i>Thevetia peruviana</i>	15
Aspectos toxicológicos de <i>Nerium oleander</i>	16
Herramientas analíticas en el análisis de glicósidos tóxicos.....	16
Espectrometría de masas y su aplicación en el análisis fitoquímico.....	18
6. Objetivos.....	19
7. Metodología propuesta	20
Matriz de marco lógico.	23
8. Resultados.....	25
9. Discusión de Resultados.	29
<i>Nerium oleander</i>	29
<i>Thevetia peruviana</i>	31
10. Conclusiones.	32
11. Bibliografía.....	33
12. Anexos	36

Lista de Figuras.

Figura 1. Estructura general de los glicósidos cardiotónicos. (Prassas et al 2008)..	13
Figura 2. Estructura química de la Oleandrina. (ChemDraw software)	15
Figura 3. Estructura química del peruvósido (ChemDraw software)	15
Figura 4. Material vegetal para sonicar. <i>T. peruviana</i> a la izquierda y <i>N. oleander</i> a la derecha.	21
Figura 5. Separación de fases de los extractos obtenidos.	21
Figura 6. Muestras líquidas y purificadas de <i>Nerium oleander</i> y <i>Thevetia peruviana</i> .	22
Figura 7. Proceso de liofilización con <i>T. peruviana</i> a la izquierda y <i>N. oleander</i> a la derecha.	22
Figura 8. Cromatograma y espectro de masas de <i>Nerium oleander</i> .	25
Figura 9. Espectro de masas de <i>Nerium oleander</i> con voltaje de cono de 10.	26
Figura 10. Relación del cromatograma de <i>Thevetia peruviana</i> con PDA.	26
Figura 11. Espectros de <i>Thevetia peruviana</i> .	27
Figura 12. Espectro de masas de <i>Thevetia peruviana</i> para compuesto desconocido.	28
Figura 13. Estructura química de la oleandrina gentobiósido	30
Figura 14. Estructura química del odorósido	30
Figura 15. Estructura química de la adinerina.	30
Figura 16. Estructura química del oleásido A.	30
Figura 17. Información sobre el thevetin A presente en <i>Thevetia peruviana</i> .	31

Resumen del proyecto

Palabras clave: *Nerium oleander*, *Thevetia peruviana*, glicósidos cardiotónicos, caracterización.

Las especies vegetales *Nerium oleander* y *Thevetia peruviana* se caracterizan por ser especies ornamentales en Cali (Colombia) presentes en jardines, centros comerciales, instituciones educativas y parques de la ciudad. Su toxicidad está asociada a la ingesta de infusiones o tés preparados a partir de sus hojas, frutos y semillas; ya que en estos órganos es donde principalmente se encuentran altas proporciones de los metabolitos secundarios tóxicos como los glicósidos cardiotónicos. (Bandara, Weinstein, White, & Eddlestone, 2010)

Debido a la falta de documentación sobre su toxicidad en el ámbito nacional, éste proyecto pretende verificar la presencia de glicósidos cardiotónicos en éstas especies de la ciudad de Cali, para lo cual se realizó un procedimiento de extracción de los glicósidos a partir del material vegetal recolectado. Adicionalmente se realizó una concentración de las muestras por liofilización y finalmente se realizó la caracterización química del extracto mediante espectrometría de masas.

Se encontró que en las hojas de *Nerium oleander* hay presencia de oleandrina gentobiósido y odorósido como metabolitos secundarios que ya han sido descritos para esta planta; mientras que para los frutos de *Thevetia peruviana* sólo se identificó el thevetin A como metabolito mayoritario. Con lo anterior, y al contrastar los metabolitos obtenidos experimentalmente con las referencias bibliográficas, se confirma que las especies vegetales contienen glicósidos cardiotónicos.

Abstract

Keywords: *Nerium oleander*, *Thevetia peruviana*, cardiac glycosides, characterization.

The species *Nerium oleander* and *Thevetia peruviana* are characterized as ornamental species in Cali (Colombia), which are present in gardens, shopping centers, educational institutions and city parks. Its toxicity is associated to the intake of tea infusions or prepared infusions from the leaves, fruits and seeds; since in these specie's parts is where secondary metabolites are found mainly in higher proportions, such as cardiac glycosides. (Bandara, Weinstein, White, & Eddlestone, 2010)

Due to the lack of documentation on the toxicity of the plant species *Nerium oleander* and *Thevetia peruviana* in Colombia, this project aims to verify the presence of cardiotoxic glycosides in these species of Cali, for which a process was performed for the glycosides extraction from plant material collected of *Nerium oleander* and *Thevetia peruviana*, additionally, a concentration of samples was made by freeze-drying procedure and finally, the chemical characterization of the extract was performed by mass spectrometry.

As a result of the investigation project, it was found that the leaves from *Nerium oleander* has olenadin gentobioside and odoroside that has been already described for this plant as secondary metabolites, while for the fruits of *Thevetia peruviana* Thevetin A was identified as major metabolite. With this information and contrasting the results obtained experimentally with bibliographic references it is confirmed that the species contains cardiac glycosides.

Introducción

Las medicinas populares, principalmente basadas en plantas, tienen alta aceptación por la sociedad en general al concebirlas menos peligrosas y porque pueden causar menos efectos secundarios en comparación con los medicamentos tradicionales, ésta idealización se observa especialmente en aquellos países en desarrollo en donde los servicios de salud modernos son muy limitados. (Zibbu & Batra, 2011) Dichas alternativas terapéuticas suelen tomar ventaja de las especies vegetales y de su composición química para intentar prevenir problemas de salud como lo son la obesidad, la ansiedad y dolores generales.

Nerium oleander y *Thevetia peruviana* son dos especies vegetales ampliamente distribuidas que suelen encontrarse como especies ornamentales, decorando hogares, centros comerciales, parques públicos e instituciones educativas. Dichas especies vegetales se caracterizan por tener en sus órganos (frutos, hojas y/o raíces) glicósidos cardiotónicos, moléculas que presentan un muy estrecho margen terapéutico y por lo tanto su uso requiere especiales restricciones y un adecuado manejo. Paralelamente, ha sido posible establecer que el mecanismo de acción de estos compuestos se logra mediante la inhibición de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa lo cual conlleva a que se eleven las concentraciones de iones de sodio en los miocitos, conduciendo a un aumento en el nivel de iones de calcio y así una mayor fuerza contráctil cardíaca. Se ha reportado que el glicósido cardiotónico en mayor proporción en *N. oleander* es la oleandrina (Arvind, Tanmoy, Amrita, & Arun, 2013) mientras que en *T. peruviana* es el peruvósido (Zibbu & Batra, 2011). No obstante, existen más glicósidos tóxicos reportados para ambas plantas (Sheriff, 1999) y por consiguiente en muchos países existen informes en diferentes medios de comunicación sobre las intoxicaciones que se presentan frecuentemente con estas especies vegetales. (Aguilar García & Maycotte, 2013) (Colegio de Farmacéuticos de la provincia de Buenos Aires) (Y. Aular de González, 2003) (Khan, Kant, Sanwaria, & Meena, 2010), (Sheriff, 1999)

En Colombia el único documento que reporta a *N. oleander* y *T. peruviana* como especies vegetales tóxicas es el código número 23, específicamente en las secciones escritas por el Doctor Ramiro Fonnegra (Fonnegra Gómez, y otros, 2010). Esta información descrita anteriormente es contrastada con los documentos técnicos de los entes regulatorios del país, en donde se observa que ni en el vademécum colombiano de plantas medicinales, ni en el listado de plantas tóxicas del INVIMA describen éstas plantas como potencialmente tóxicas, a pesar de los múltiples artículos científicos, libros, noticias y reportes de casos clínicos en los que se narran sus riesgos.

Así, este proyecto de investigación pretende verificar la presencia de glicósidos cardiotónicos en las dos especies ornamentales mencionadas, *N. oleander* y *T. peruviana* mediante caracterización química por espectrometría de masas de las muestras obtenidas.

Con los resultados se espera que el presente proyecto sirva de información y apoyo científico contundente para que nuevos investigadores realicen estudios *in vitro* que permitan desarrollar una guía toxicológica en Colombia, para el uso adecuado de los fitoterapéuticos desarrollados a partir de las especies vegetales *N. oleander* y *T. peruviana*. Además, surge la necesidad de desarrollar noticias y alarmas sobre la toxicidad de éstas especies debido al contenido de metabolitos tóxicos en sus órganos.

Se sugiere realizar el mismo estudio en otras ciudades de Colombia que difieran de Cali en el clima y flora, tales como Bogotá, Medellín, Manizales y la costa caribe para verificar así que las variaciones climáticas no afectan la composición química.

Descripción del proyecto.

Planteamiento del problema.

La acción farmacoterapéutica atribuida a los glicósidos como metabolitos secundarios es variada, incluyendo su uso como antiviral, abortivo, diurético y antibacterial. Así mismo, dichos glicósidos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y la principal acción que se les atribuye es como cardiotónicos razón por la cual su uso para el tratamiento de desórdenes cardíacos fue descrito inicialmente en 1785, pero su mecanismo de acción se elucidó aproximadamente hace 50 años. (Prassas & P. Diamandis, 2008)

N. oleander y *T. peruviana* son arbustos perennes que pertenecen a la familia Apocynaceae crecen con facilidad por distintos países en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. *N. oleander* suele distinguirse por ser el laurel rosado o blanco mientras que *T. peruviana* es amarillo o naranja. Ambas especies se cultivan extensamente como arbustos ornamentales (Langford & Boor, 1996)

N. oleander contiene metabolitos secundarios que poseen una estructura química parecida a la de la digoxina, un reconocido glicósido digitálico. El hecho de tener alta homología estructural le confiere efectos cardíacos de tipo digitálico y es rápidamente absorbida para luego ser excretada lentamente. Sus propiedades tóxicas se conocen desde la época de los hebreos y de los egipcios. Todas las partes de la planta, principalmente las flores, son altamente venenosas para el hombre. (Fonnegra Gómez, y otros, 2010) *T. peruviana* contiene Thevetin A y peruvósido como metabolitos mayoritarios y también posee otras moléculas como el Thevetin B, thevetoxin, peruvósido, ruvósido y neriifolin (Zibbu & Batra, 2011). Al igual que pasa con *N. oleander*, todos sus órganos generan intoxicaciones, por lo que la ingesta de grandes porciones de las partes aéreas produce alteraciones cardíacas, como bloqueos atrioventriculares. Algunas veces puede producir bloqueos totales que ocasionan inconsciencia, convulsiones y paro cardíaco. (Fonnegra Gómez, y otros, 2010)

Los glicósidos cardiotónicos presentes en estas especies vegetales, se consideran importantes indicadores para investigaciones forenses y farmacológicas. Además, su ingesta deliberada está representando un método de autolesión en el norte de Sri Lanka (un país isleño ubicado al sur de la india). Miles de casos son reportados anualmente con una tasa entre el 5% y 10% de pacientes sin tratamiento; estas tasas de intoxicación pueden ser más altas en los países o comunidades que dependen en gran medida de medicamentos a base de las plantas. (Kohls, Scholz-Böttcher, Teske, Zark, & Rullkötter, 2011)

En Colombia, actualmente el INVIMA no incluye a *T. peruviana* y *N. oleander* en el listado de plantas tóxicas que fue publicado en Octubre de 2013 (Instituto Nacional

de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, 2013) tampoco se les encuentra en las plantas medicinales y entonces, el único documento existente en el cual se les considera como potencialmente tóxicas es el código número 23 en las secciones relatadas por el Doctor Ramiro Fonnegra. (Fonnegra Gómez, y otros, 2010)

Por consiguiente y conforme a lo que se mencionó anteriormente la ingesta inadecuada de extractos, infusiones y tés de las hojas y/o frutos de las especies vegetales ornamentales se hace necesario crear documentos que reporten en forma clara y precisa el problema de salud que se está generando con su inadecuado manejo. Basados en las consideraciones anteriores se puede determinar que es de mucha trascendencia reconocer cuales de los metabolitos secundarios sintetizados por estas dos especies vegetales, pueden ser reconocidos y usados para investigaciones toxicológicas y forenses.

Marco teórico y estado del arte.

Aspectos relevantes y reportes farmacológicos:

El uso de extractos obtenidos a partir de la especie vegetal *Digitalis purpurea*, que contenían glicósidos cardiotónicos, para el tratamiento de desórdenes cardíacos fue descrito por primera vez en 1785 por William Withering. Sin embargo, el mecanismo de acción de los glicósidos cardiotónicos fue descrito hace 50 años aproximadamente, cuando Schatzmann y sus colegas los identificaron como inhibidores específicos de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. (Prassas & P. Diamandis, 2008)

Los glicósidos cardiotónicos comprenden una gran familia de compuestos derivados de la naturaleza que muestran una diversidad química-estructural considerable, que comparten la característica de tener un núcleo esteroidal con un anillo de lactona insaturada en la posición 17 y una porción de azúcar para la posición 3. Se ha demostrado que la lactona con el esteroide son las partes que generan un efecto biológico y por lo tanto reciben el nombre de farmacóforo. La naturaleza del resto de lactonas se encarga de caracterizar el subgrupo de glicósidos en cardenólidos o bufadienólidos (o bufanólidos) como se observa en la **Figura 1**. (Prassas & P. Diamandis, 2008)

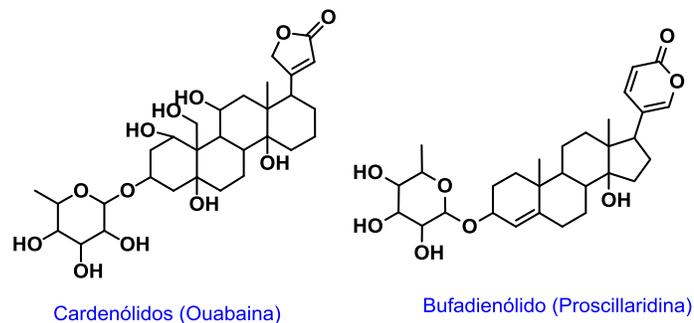


Figura 1. Estructura general de los glicósidos cardiotónicos. (Prassas et al 2008). La principal diferencia existente entre los glicósidos, es que los cardenólidos poseen un anillo furánico en la posición de la lactona en comparación con los bufadienólidos que tienen un anillo piránico.

Gracias a la capacidad que tienen dichas sustancias para ejercer importantes efectos biológicos y terapéuticos, es necesario definir la distribución natural de los compuestos de interés. Los glicósidos categorizados como cardenólidos se encuentran principalmente en las hojas de plantas de las familias *Scrophulariaceae*, *Apocynaceae*, *Liliaceae*, *Ranunculaceae* y *Moraceae* (Alejandro, 2002). Cuando el glicósido cardíaco es de tipo bufadienólido, es porque principalmente se encuentra en ranas del género *Bufus* y en las alas de mariposa monarca, los cuales han comenzado a ser de interés terapéutico dado su potencial anti proliferativo. (Alejandro, 2002)

Correlación entre fisiología vegetal y la expresión metabólica

El envenenamiento por las especies vegetales *N. oleander* y *T. peruviana* es una emergencia toxicológica común en zonas tropicales y subtropicales y a su vez, se consideran un método intencional de autolesión que es prevalente en países sur asiáticos. (Bandara, Weinstein, White, & Eddlestone, 2010) De acuerdo con el Doctor Ramiro Fonnegra, *T. peruviana* ha enfermado a por lo menos cien personas en el período de tiempo transcurrido entre los años 2000 y 2002 y a su vez produjo la muerte de cuatro mujeres. Incluso los síntomas de las intoxicaciones suelen requerir cuidados intensivos por varios días y generar alarmas sobre el uso inadecuado de los productos naturales por parte de los colombianos (López, 2002) (Redacción Nacional, 2003). Pese a lo anterior, *T. peruviana* se comercializa en las calles como producto natural para disminuir de peso, bajo el nombre comercial de *Catapisa*. (López, 2002)

Al investigar sobre *N. oleander* se encuentran diversos casos de intoxicación a nivel nacional e internacional, sin embargo, en el ámbito nacional no existen reportes adecuados sobre su toxicidad y por lo tanto la información relevante que fue posible encontrar radica en el hecho de que el contenido total de los glicósidos cardiotónicos es mayor en aquellas plantas de *N. oleander* que producen flores rojas en comparación de aquellas que producen flores blancas, en cualquier etapa del crecimiento, pero cabe resaltar que se obtiene la mayor concentración en la etapa de florecimiento. En paralelo, las mayores concentraciones de aquellos metabolitos en *T. peruviana* están en las semillas, seguido por las hojas, frutas y savia. (Bandara, Weinstein, White, & Eddlestone, 2010)

Glicósidos cardiotónicos.

Existe una gran variedad de especies vegetales que contienen glicósidos cardiotónicos: *Digitalis purpurea*, *Digitalis lanata*, plantas del género *Strophantus*, *N. oleander* con la oleandrina (ver estructura en la **Figura 2.**) como cardiotónico en mayor proporción y *T. peruviana* con el peruvósido como metabolito predominante (ver estructura en la **Figura 3.**) seguido de thevetin A y thevetin B. (Alejandro, 2002)

La información necesaria para el posterior análisis de los metabolitos cardiotónicos esperados, se encuentra en la **Tabla 1.** con los datos sobre los pesos de cada metabolito completo y su respectiva estructura química, además, también se ven los pesos de las agliconas.

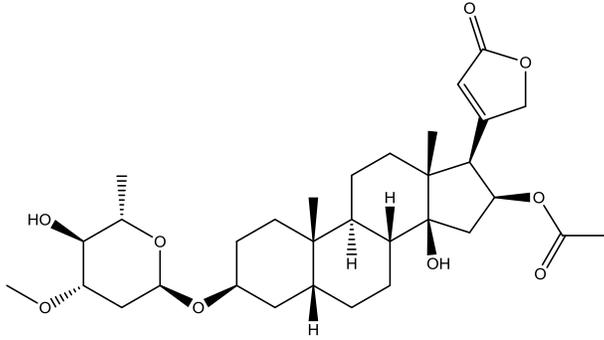


Figura 2. Estructura química de la Oleandrina. (ChemDraw software)

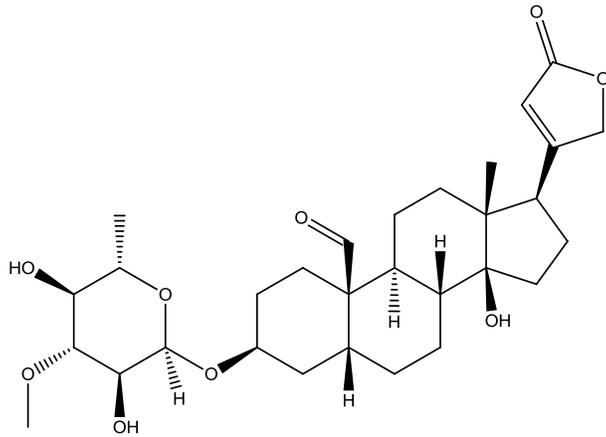


Figura 3. Estructura química del peruvósido (ChemDraw software)

Aspectos toxicológicos de *Thevetia peruviana*

Muchos de los pacientes en busca de un tratamiento natural y radical para el sobrepeso, han decidido tomar infusiones de las semillas u hojas de *T. peruviana* y tabletas de la misma, conocidas en el mercado como “catapis”, con las cuales se presentan intoxicaciones (Kumar , Khatri, Gopi, Shukla, & Patel, 2012). La inhalación, ingestión o contacto con las mucosas de la savia o extractos de la planta puede causar muchas reacciones adversas.

Siendo así, diversos autores han referido irritación de mucosas, eritema bucal, náuseas, vómitos, salivación profusa, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, alteraciones mentales, disturbios visuales, midriasis, neuritis periférica y síntomas cardiovasculares (bloqueo sinusal y aurículo-ventricular) como resultado de la ingestión de *T. peruviana*. (Y. Aular de González, 2003) La intoxicación por la ingesta de ésta especie vegetal puede presentarse de inmediato o, en algunos casos por su ingesta continua, puede exhibirse de manera crónica. Si llegase a suceder el último caso, es decir por ingesta crónica, los médicos podrían confundir los síntomas con el síndrome de Guillain Barre ocasionando que el tratamiento sea más extenso de lo necesario. (Aguilar García & Maycotte, 2013)

Aspectos toxicológicos de *Nerium oleander*.

La segunda especie vegetal, *N. oleander*, se ha empleado en la medicina popular como abortivo y en el tratamiento de la hidropesía, la malaria y las enfermedades venéreas. Los activos contenidos en *N. oleander* son glicósidos cardiotónicos similares a la digitoxina, molécula digitálica usada en el ámbito hospitalario y clínico. Las intoxicaciones por *N. oleander* son relativamente frecuentes, tanto en humanos como en animales. Sin embargo, la mortalidad en éste caso es baja incluso en los casos de ingesta con fines autolíticos, posiblemente por su gran capacidad emetógena. (Monero Aparicio, Arriola Martínez, Martínez Odriozola, & De la Villa, 2006)

El diagnóstico de intoxicación por *N. oleander* debe sospecharse ante un cuadro clínico similar a una intoxicación digitálica, descrita con anterioridad para *T. peruviana*. (Monero Aparicio, Arriola Martínez, Martínez Odriozola, & De la Villa, 2006)

Herramientas analíticas en el análisis de glicósidos tóxicos

La espectrometría de masas tiene un alto grado de sensibilidad y fiabilidad cuya principal ventaja en comparación de otras técnicas de detección, es su capacidad para suministrar información desde el punto de vista cualitativo; mientras que por otro lado, es un detector universal basado en la separación de especies cargadas de acuerdo con su relación masa/carga. (De Castro Ríos, 2007) La espectrometría de masas se fundamenta entonces en la separación de iones de moléculas u átomos por su diferente masa. El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas: (México, s.f.)

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Separación de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal. (México, s.f.)

Dentro de esta perspectiva, cabe resaltar que existen grandes diferencias entre las técnicas de introducción y análisis de muestras líquidas al equipo, sin embargo, suelen distinguirse dos grandes grupos: el primero se caracteriza por introducir la muestra en la fuente de iones de manera directa, mientras que el segundo realiza una ionización blanda determinada a bajas energías. (Montoya P., 2011)

Experimentalmente se usó la fuente de iones por electrospray (ESI) para lograr la caracterización química. Al tomar provecho de ésta metodología es posible generar los iones a presión atmosférica, el flujo de solvente pasa a través de un capilar y al mantener un voltaje de cono predeterminado, la muestra líquida se dispersa formando una niebla de gotas diminutas que al estar cargadas

experimentan el proceso de desolvatación por el uso de un gas de secado (usualmente nitrógeno). (Montoya P., 2011)

Otro componente importante del equipo es el analizador cuadrupolar, el cual consiste en cuatro barras opuestas, que mediante un valor específico de voltaje permiten que los iones con una relación específica de masa/carga lleguen al detector. Los analizadores de cuadrupolo son detectores ideales para la cromatografía puesto que tienen la habilidad de realizar un escaneo rápido (Montoya P., 2011) Sin embargo, el analizador que se utilizó experimentalmente corresponde a un cuadrupolo simple el cual suele ser clasificado como un equipo de baja resolución.

Por otro lado, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación que ha sido utilizada por décadas, y mediante el acoplamiento a la espectrometría de masas se ha convertido en un método analítico que permite no solo rapidez en la separación, sino además alta sensibilidad en la detección. (De Castro Ríos, 2007)

El acople LC-MS es una técnica adecuada para el análisis de sustancias polares como los glicósidos de interés, que poseen peso molecular elevado y al mismo tiempo tienen enlaces químicos que pueden romperse por la temperatura. Con ello se evita el proceso de derivatización que es obligatorio en la cromatografía gaseosa. (Quintela O., Cruz A., Concheiro M., De Castro A. y López-Rivadulla M., 2004)

Ésta metodología de análisis tiene diversas aplicaciones tanto cualitativas como cuantitativas entre las cuales se destacan: (Skoog, Hiller, & Nieman, 2001)

- **Determinación del peso molecular** de todas aquellas sustancias que pueden volatilizarse por la posición del pico correspondiente a la masa patrón.
- **Determinación de la fórmula molecular.** Si el instrumento es de gran resolución bastará la determinación precisa de su masa molecular para poder atribuirle una fórmula empírica. Otras veces, se puede determinar la fórmula por la relación entre las alturas del pico correspondiente a la masa patrón y la de los picos de los isótopos.
- **Identificación de compuestos por su fragmentación patrón:** la fragmentación de la mayor parte de las moléculas produce un gran número de picos que permiten la identificación de numerosos compuestos y el reconocimiento de ciertos grupos funcionales de ellos y así, es que éste proyecto de investigación analizará los resultados obtenidos
- **Identificación de productos de reacción o de productos metabólicos:** se usa en cinética química y en farmacología pudiéndose

llegar a identificar impurezas y metabolitos a concentraciones de pocas partes por millón.

Espectrometría de masas y su aplicación en el análisis fitoquímico.

El descubrimiento de nuevas entidades químicas ha sido durante los últimos años la actividad científica de mayor demanda, dado que a grandes rasgos, pretende desarrollar alternativas terapéuticas para las enfermedades de mayor impacto para la humanidad. (Montoya P., 2011) En la actualidad, los productos naturales son fuente de casi la mitad de los fármacos usados en el ámbito clínico y por consiguiente los estudios que se centran en sus propiedades químico-estructurales y su bioactividad se han visto incrementados. (Xing, Xie, & Lou, 2007)

Es evidente entonces, que aquellos países con amplia biodiversidad han comenzado a descubrir alternativas terapéuticas potenciales en sus recursos naturales, gracias a la alta sensibilidad que tiene la metodología previamente mencionada. Así mismo, se ha logrado la identificación y cuantificación de digitálicos en muestras biológicas y por lo tanto puede ser útil para la identificación absoluta y la cuantificación de la oleandrina en posibles envenenamientos por *N. oleander* usando como estándares la digoxina o la digitoxina. (A. Tracqui , P. Kintz, B. Ludes, P. Mangin, 1997)

Existen actualmente varias aplicaciones que vislumbran la importancia y versatilidad del acople de espectrometría de masas y del impacto que seguirá tendiendo esta técnica en el desarrollo de la fitoquímica moderna. (Montoya P., 2011)

Objetivos

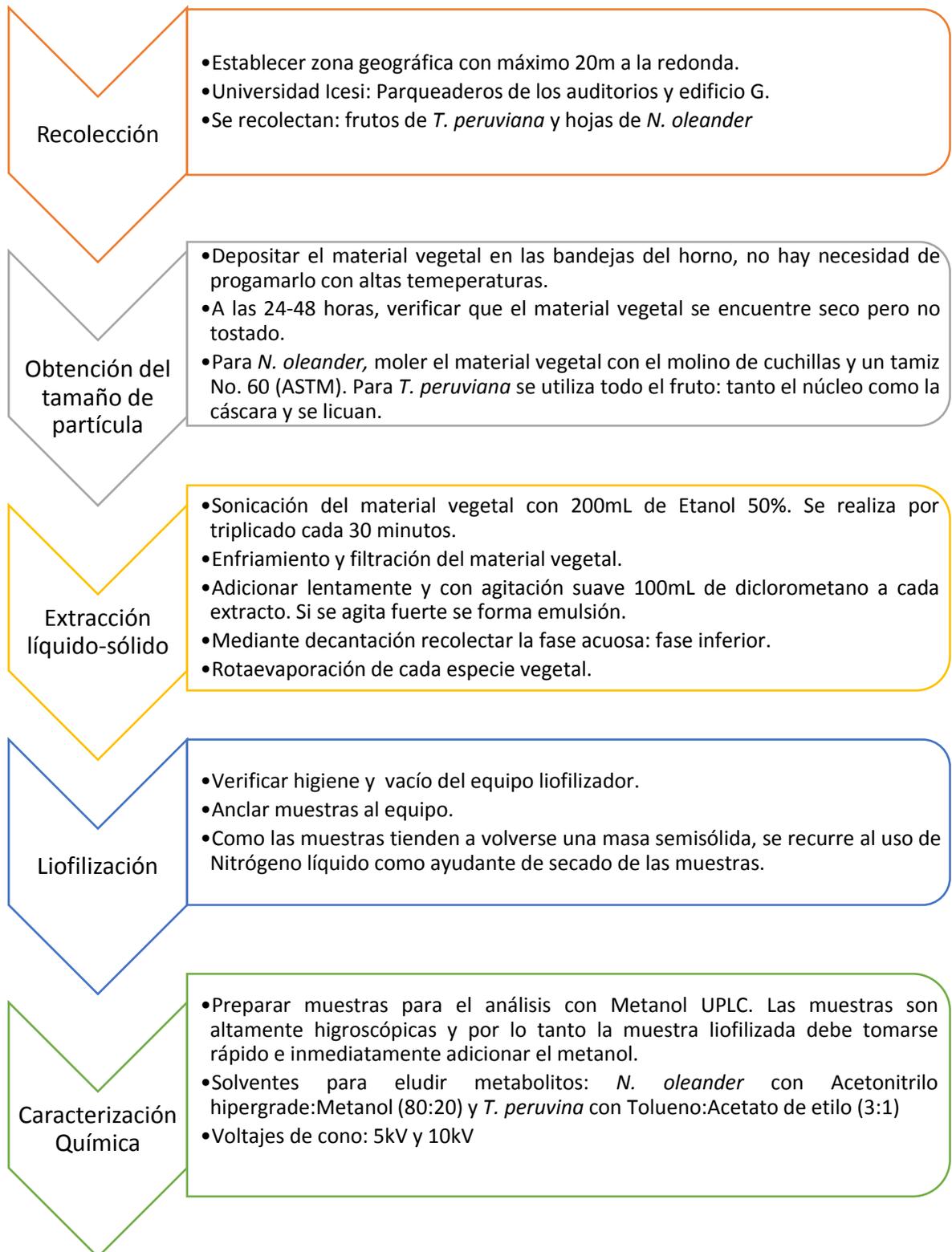
Objetivo General

Extraer, identificar y caracterizar los glicósidos cardiotónicos presentes en *Nerium oleander* y *Thevetia peruviana*.

Objetivos específicos:

- ✓ Extraer los glicósidos cardiotónicos de *Nerium Oleander* y *Thevetia peruviana* partir de hojas y frutos de cada especie, respectivamente.
- ✓ Obtener un producto liofilizado a partir del material vegetal recolectado en el sur de la ciudad de Cali.
- ✓ Realizar caracterización mediante UPLC acoplado a espectrometría de masas de los glicósidos extraídos.

Metodología propuesta



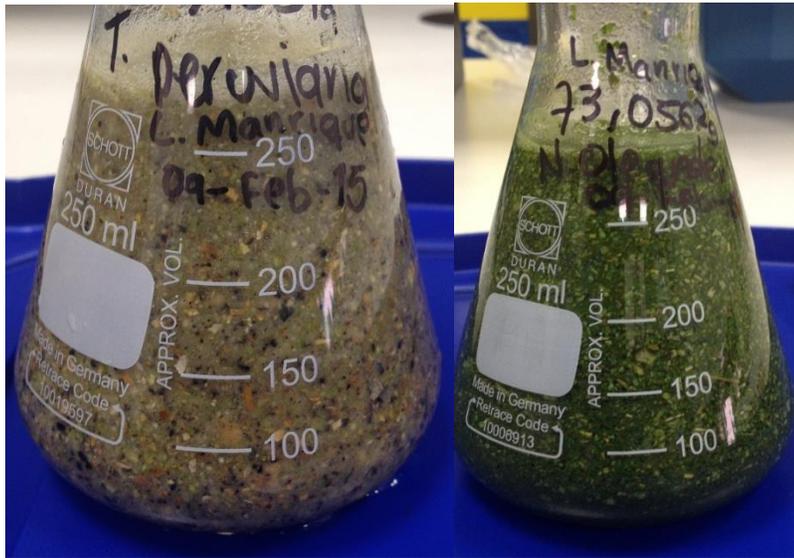


Figura 4. Material vegetal para sonicar. *T. peruviana* a la izquierda y *N. oleander* a la derecha.



Figura 5. Separación de fases de los extractos obtenidos. A la izquierda *T. peruviana* cuyas fases tienen a tener coloración café pálido mientras que a la derecha con *N. oleander* se observan dos fases: una verde y otra café oscura. Las fases superiores corresponden a las fases acuosas mientras que las inferiores a la mezcla orgánica que se lleva a rotaevaporación

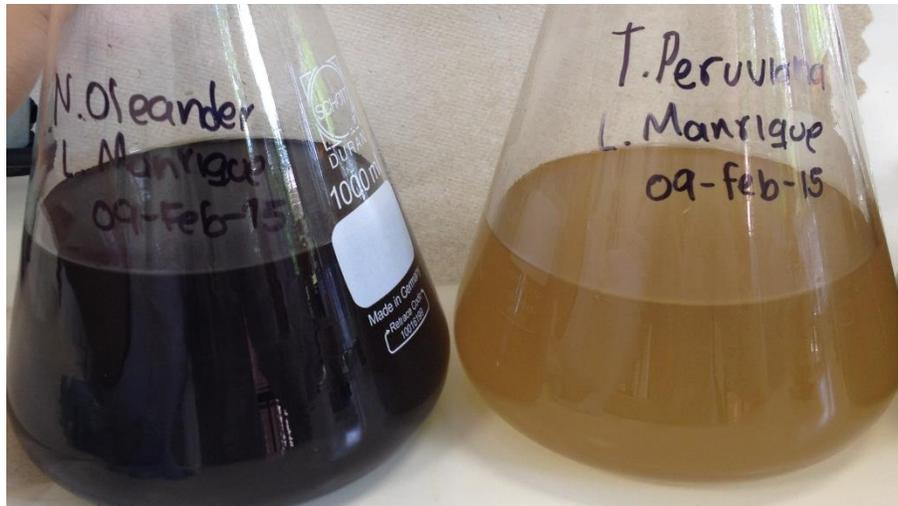


Figura 6. Muestras líquidas y purificadas de *Nerium oleander* y *Thevetia peruviana*.

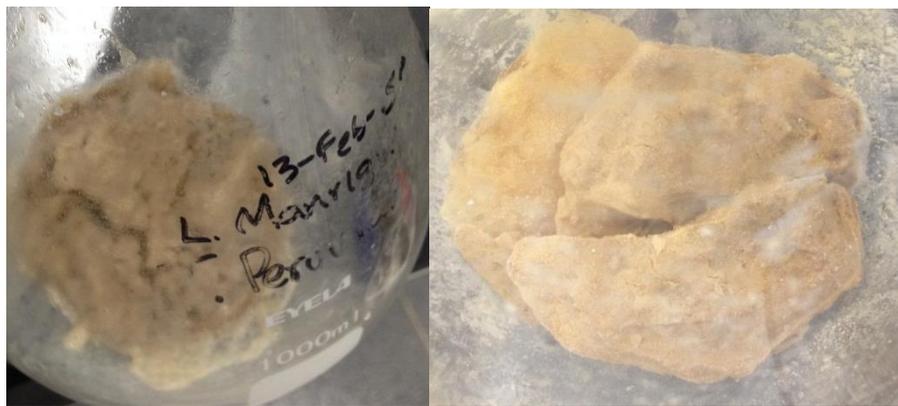


Figura 7. Proceso de liofilización con *T. peruviana* a la izquierda y *N. oleander* a la derecha.

Matriz de marco lógico.

Objetivo General: Extraer, identificar y caracterizar los glicósidos cardíacos presentes en <i>Nerium oleander</i> y <i>Thevetia peruviana</i> .			
Objetivo específico	Actividades	Supuestos	Indicador
1. Extraer los glicósidos cardíacos de <i>Nerium oleander</i> y <i>Thevetia peruviana</i> a partir de hojas y frutos de cada especie, respectivamente.	<ul style="list-style-type: none"> • Recolección del material vegetal. • Secado del material vegetal recolectado. • Tritura del material vegetal seco. • Realizar extracción líquido-sólido del material vegetal. • Elección de los solventes a utilizar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los glicósidos cardíacos se encuentran presentes en las hojas de <i>Nerium oleander</i> y los frutos de <i>Thevetia peruviana</i>. • Los glicósidos cardíacos no son volátiles y son solubles en los solventes a utilizar. • Los materiales y reactivos están disponibles en la universidad. 	Seleccionar las condiciones apropiadas para extraer los glicósidos cardíacos de cada especie sin generar degradación química.
2. Obtener un producto liofilizado a partir del material vegetal extraído.	<ul style="list-style-type: none"> • Verificar la presencia de glicósidos cardiotónicos mediante espectrometría de masas, analizando los fragmentos obtenidos. • Liofilizar el extracto de cada material vegetal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los glicósidos cardíacos son marcadores quimiotaxonómicos de ambas especies y deberán estar en los extractos polares. • La universidad cuenta con los equipos que se utilizarán. 	Conseguir un polvo sólido a partir del extracto, obtenido del material vegetal recolectado.

<p>3. Realizar caracterización mediante UPLC acoplado a espectrometría de masas de los glicósidos extraídos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Establecer los mejores parámetros cromatográficos para que el análisis por UPLC de los resultados esperados. • Identificar los glicósidos cardíacos. 	<ul style="list-style-type: none"> • La universidad cuenta con el factor económico asociado al uso de los equipos. • Los materiales y reactivos están disponibles en la universidad. 	<p>Identificar los glicósidos en mayor proporción de cada especie vegetal y caracterizarlos</p>
--	---	--	---

Resultados

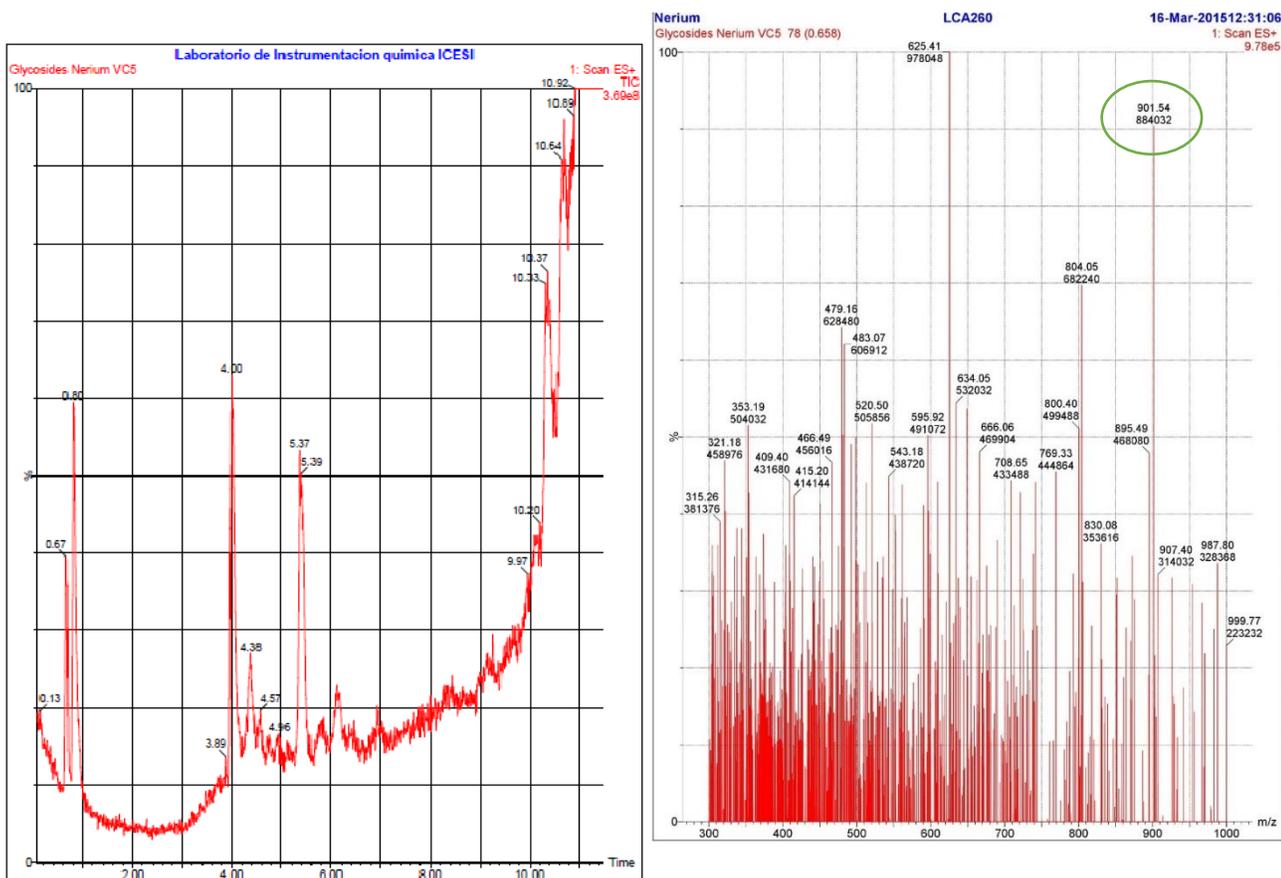


Figura 8. Cromatograma y espectro de masas de *Nerium oleander*. El espectro de masas que se observa a la derecha, fue obtenido con un voltaje de cono de 5kV y presenta el pico 901,54 el cual será descrito en la discusión de resultados y corresponde al metabolito Oleandrina gentobiosida.

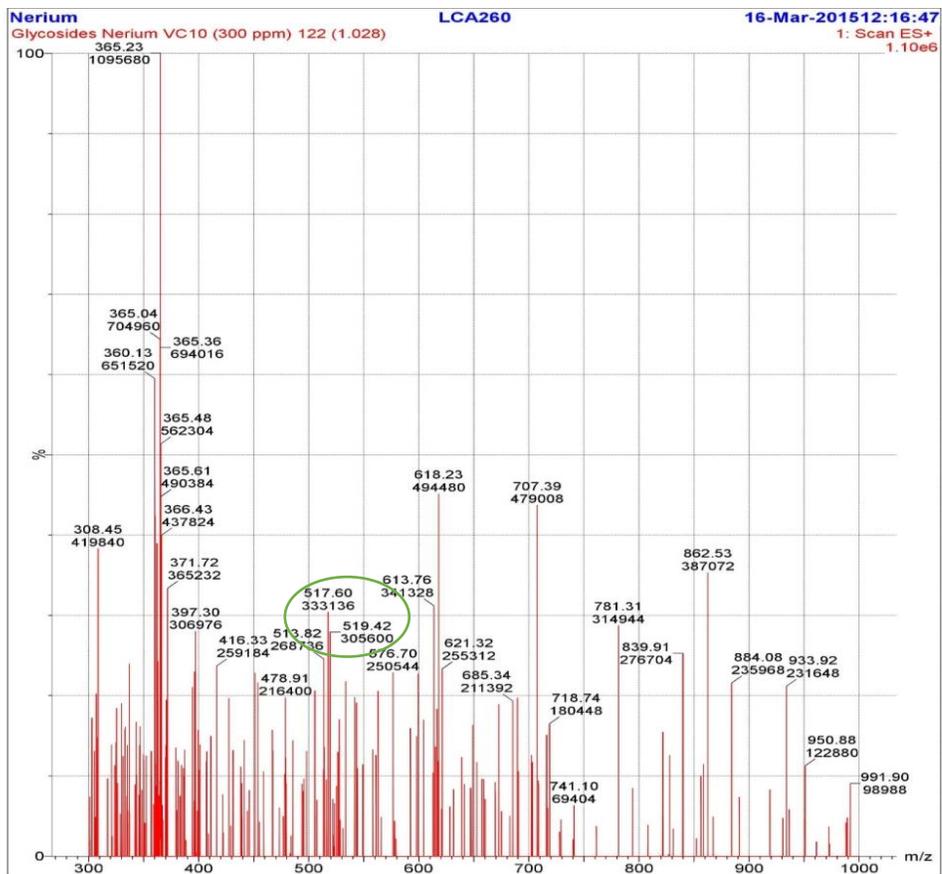


Figura 9. Espectro de masas de *Nerium oleander* con voltaje de cono de 10.

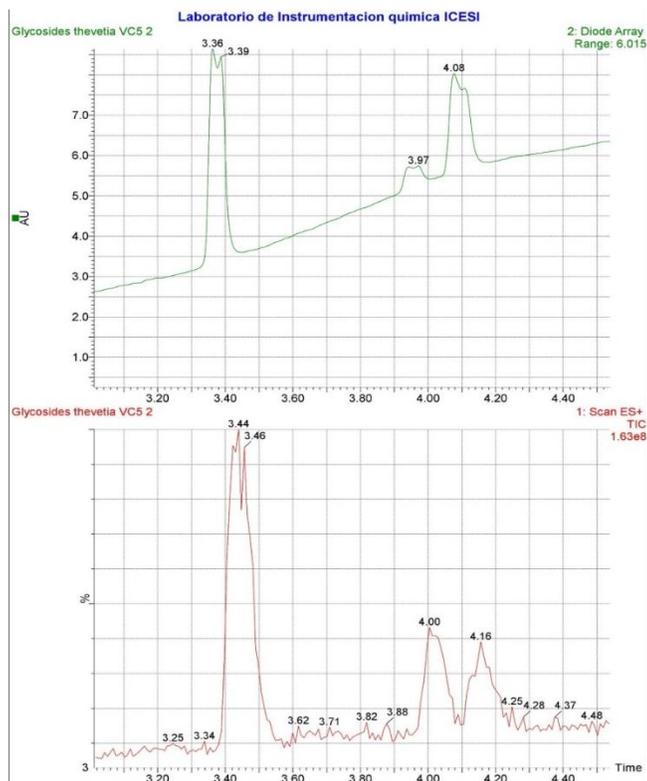


Figura 10. Relación del cromatograma de *Thevetia peruviana* con PDA.

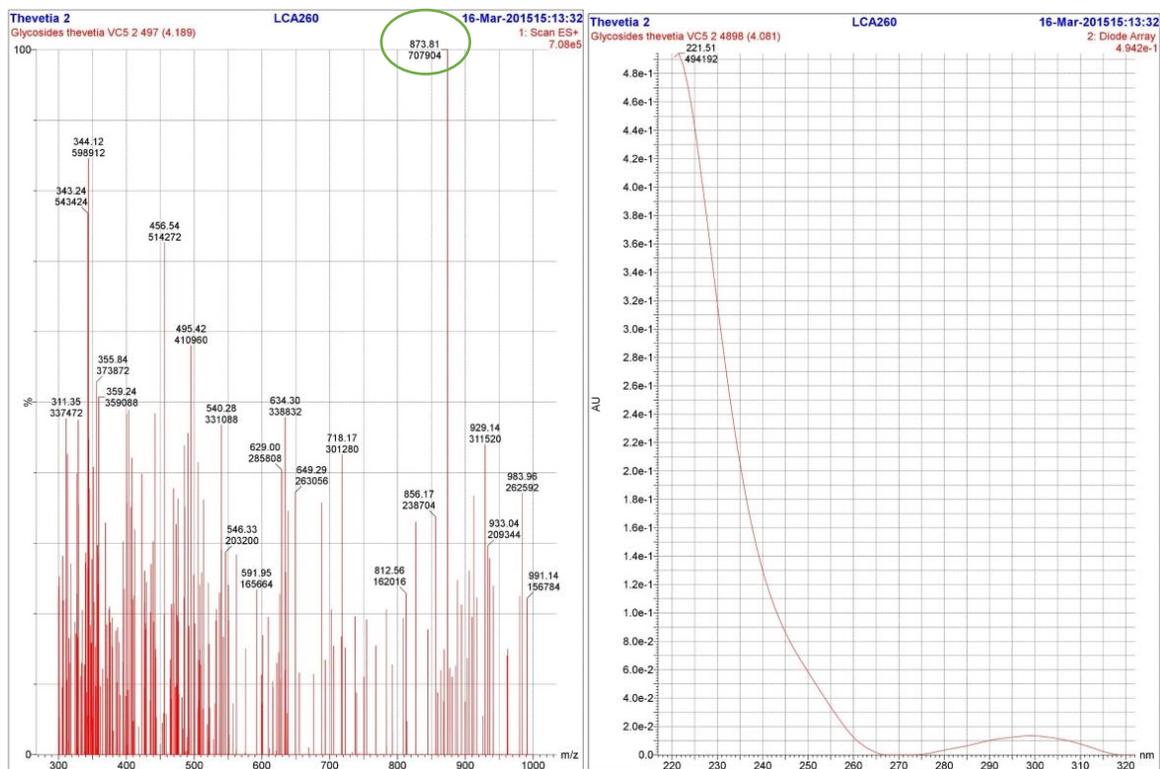


Figura 11. Espectros de *Thevetia peruviana*. A la izquierda se encuentra el espectro de masas obtenido para *T. peruviana* y a la derecha la absorción UV que presentó el Thevetin A, metabolito presente *T. peruviana*, el máximo de absorción se encuentra en el rango reportado en la literatura: 215-220 nm (Alejandro, 2002)

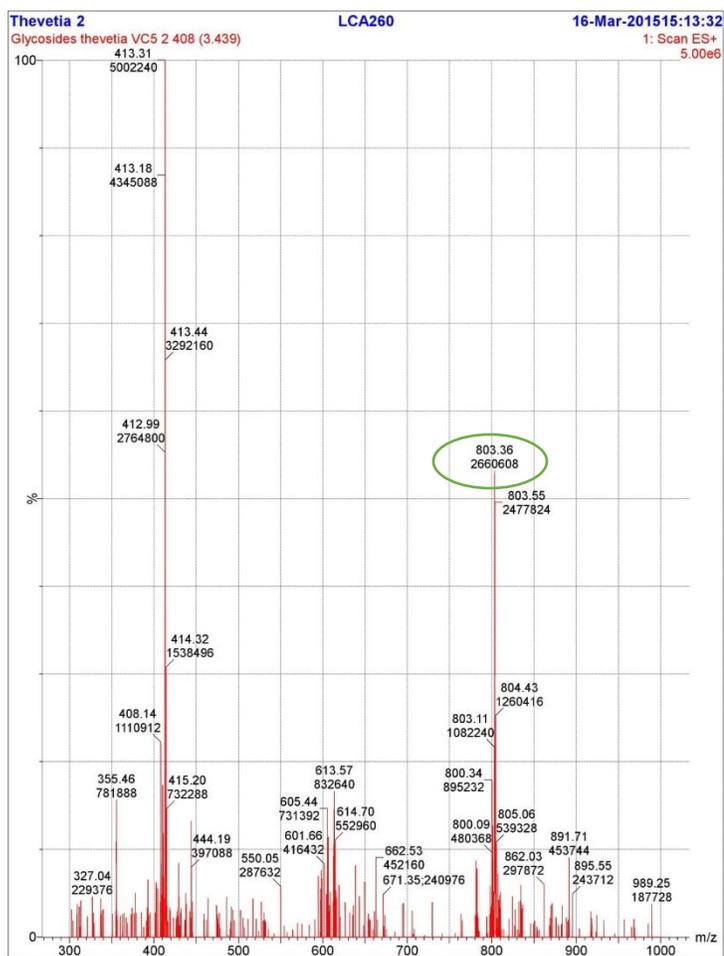


Figura 12. Espectro de masas de *Thevetia peruviana* para compuesto desconocido.

Discusión de Resultados.

Nerium oleander

La recolección del material vegetal en la Universidad Icesi, permitió observar que las flores de la especie *N. oleander*, utilizada como objeto de estudio para el proyecto, eran de color blanco, razón por la cual según lo mencionado en el marco teórico puede haber una menor concentración de los glicósidos como metabolitos secundarios. Además, al utilizar un analizador de cuadrupolo sencillo la resolución suele ser baja y por ello los resultados pueden resultar distintos a los objetivos que se habían idealizado.

Adicionalmente cabe resaltar, que los metabolitos esperados se caracterizan por tener una fracción glicosídica unida al núcleo esteroidal, la cual, confiere polaridad a la estructura química y por ello pueden ser tanto termolábiles como susceptibles a hidrólisis. Teniendo en cuenta esto, experimentalmente se utilizaron voltajes de cono de 10kV y 5kV con la finalidad de proteger la integridad estructural de las moléculas y por ende no se viesen afectadas por altas energías de ionización. Complementariamente, en la cromatografía líquida de alta eficiencia se usó una columna cromatográfica de fase reversa la cual mediante el mecanismo de reparto entre dos fases líquidas logra que los compuestos de interés sean separados. Además, dicha técnica utiliza una fase móvil que contiene grandes proporciones de agua como eluyente principal en conjunto con un modificador orgánico que completa la composición del eluyente. (Abascal)

Así pues, ya que los metabolitos se caracterizaban por ser polares, se esperaba que a medida que el agua comenzara a fluir a través de la columna cromatográfica en los primeros tiempos de retención dichos compuestos eluyeran y por ende se idealizaban tiempos de retención cortos, en comparación con los compuestos químicos con naturaleza hidrófoba que tienen afinidad por solventes orgánicos. Por consiguiente eluyeran cuando el solvente polar se acabara y sólo quedase el solvente orgánico (apolar). Al contrastar lo anterior con el cromatograma observado en la **Figura 8**, es posible evidenciar que los compuestos de interés tienen alta probabilidad de estar apareciendo en los primeros seis minutos.

Teóricamente, las matrices biológicas utilizadas permitirían realizar los análisis espectrométricos mediante el patrón de fragmentación, sin embargo, al realizar el screening en los espectros de masas obtenidos -para ambas especies vegetales- no fue posible evidenciar las fragmentaciones que ya habían sido reportadas y por consiguiente, se realizó el análisis de los datos comparando los pesos moleculares de los metabolitos con los picos del espectro de masas. Como el equipo se empleó en modo positivo, los picos del espectro corresponderían al peso molecular del metabolito protonado.

Por lo tanto, al evaluar el espectro de masas de la **Figura 8**, para los primeros dos minutos, se observa que el pico de masa correspondiente a 901,54 es la oleandrina gentobiósida protonada, glicósido reportado en 1983 (ver **Figura 13**) (Yamauchi, y otros, 1983); el cual conservó su estructura gracias a que se utilizó un voltaje de cono de 5kV. Por otro lado, se observó que a un voltaje de cono de 10kV se observan glicósidos cuya fracción glicosídica no era tan grande, caracteriza que le otorga mayor resistencia a la hidrólisis y fragmentación, de tal manera que, a comparación del anterior metabolito, se puede ver su pico molecular fácilmente a un mayor voltaje de cono. Los datos que conllevan a inferir esto se encuentran en la **Figura 9**, la cual contiene un pico en 519 el cual corresponde al glicósido denominado como odorósido (ver **Figura 14**) y se encontraría protonado y otro pico en 517 que pudiese ser la adinerina (ver **Figura 15**) o el oleásido A (ver **Figura 16**) pero debido a su alto grado de similaridad estructural no es posible afirmar con seguridad cuál de los dos es.

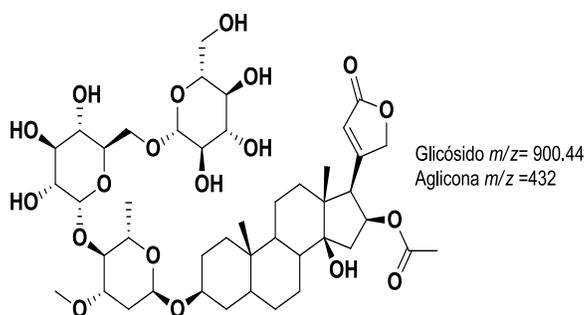


Figura 13. Estructura química de la oleandrina gentobiósido

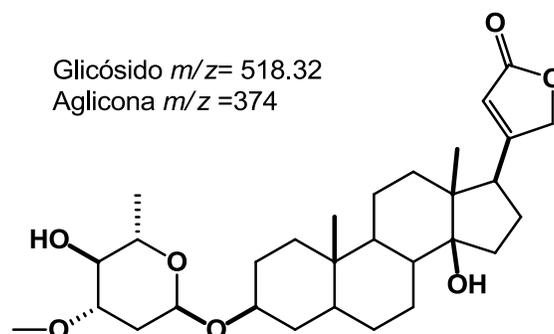


Figura 14. Estructura química del odorósido

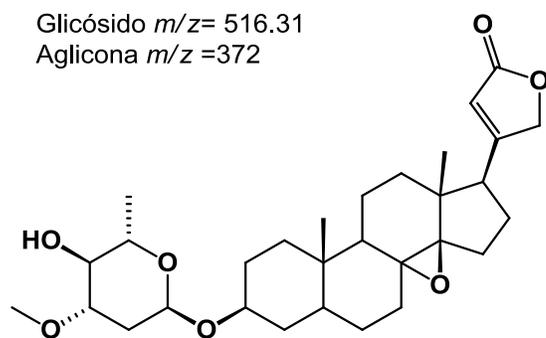


Figura 15. Estructura química de la adinerina.

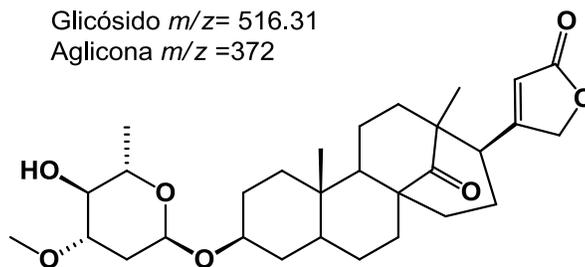


Figura 16. Estructura química del oleásido A.

El objetivo principal de este proyecto consistía en confirmar la presencia de los metabolitos mayoritarios en *N. oleander* y *T. peruviana*, sin embargo, al observar los datos de *N. oleander* es evidente que no fue posible ver otros compuestos químicos del grupo de los glicósidos esperados. Por ello, surgió la probabilidad de que algunos metabolitos hubiesen sufrido fragmentaciones de su estructura pese

a la baja energía de ionización. Ambas partes (glicósido y aglicona) tendrían unos pesos esperados, sin embargo, al buscarlos en los espectros no fue posible encontrarlos y por lo tanto se infiere que no estaban presentes en la muestra o de pronto durante el proceso de purificación de la muestra se perdieron.

Thevetia peruviana.

Al analizar el comportamiento cromatográfico de los metabolitos esperados para esta especie vegetal, es posible observar en la **Figura 10.** que hay ciertas moléculas que están absorbiendo luz ultravioleta, con ello es necesario analizar qué tipo de metabolitos presentan dicho comportamiento. Por consiguiente, dichos metabolitos pueden ser de tipo flavonoles según reportes bibliográficos (Abe, Yamauchi, Iwase, Yahara, & Nohara, 1995) (Tewtrakul, Nakamura, Hattori, Fujiwara, & Supavita, 2002), su presencia se logra confirmar porque dichos metabolitos suelen tener pesos moleculares alrededor de 700-800 y por lo tanto, el pico de 803 observado en el espectro de masas de la **Figura 11.** Tiene gran probabilidad de ser el esperado.

Adicionalmente, al continuar con el análisis de la especie vegetal y teniendo en cuenta que el peso del Thevetin A es de 872,40g, y que la capacidad de absorber energía ultravioleta también ha sido reportada para los glicósidos esperados debido al cromóforo presente en la γ -lactona α,β -insaturada, el cual muestra un máximo de absorción alrededor de 215-220 nm (Alejandro, 2002) es válido afirmar que conforme a la **Figura 11.** el metabolito que se encontró como glicósido cardiotónico es el Thevetin A cuya estructura se encuentra a continuación.

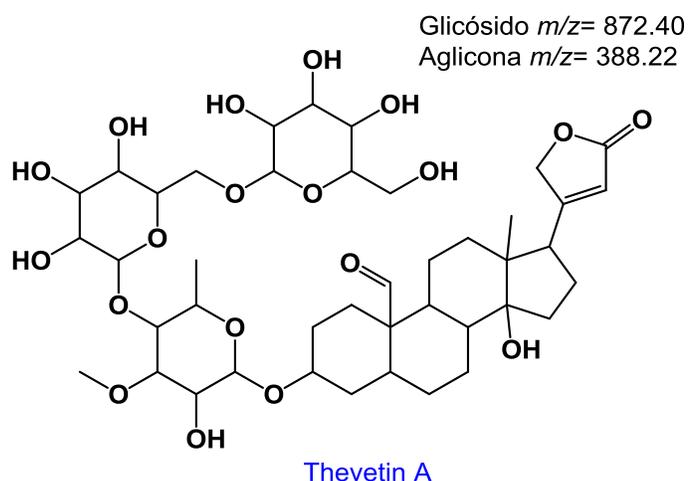


Figura 17. Información sobre el thevetin A presente en *Thevetia peruviana.*

Conclusiones.

- Se encontró que las hojas de *N. oleander* contienen a la oleandrina gentobiósido y el odorósido como glicósidos cardiotónicos, además, existe un tercer glicósido presente en la especie vegetal que no pudo ser distinguido entre adinerina y oleásido A.
- No se evidenció la presencia de oleandrina como glicósido cardiotónico en mayor proporción de *N. oleander*, por lo que se deben realizar estudios posteriores para elucidar mejor los metabolitos tóxicos de la especie vegetal.
- Se encontró que las semillas del fruto de *T. peruviana* contienen Thevetin A como metabolito secundario principal al cual se le asocian los efectos observados en pacientes intoxicados por la ingesta de dicha especie vegetal. Además, ésta especie vegetal también contiene flavonoles como metabolitos secundarios que no lograron ser identificados, razón por la cual se sugieren estudios químicos posteriores para lograr una mayor recolección de datos y un mejor argumento en la elucidación de estructuras.
- Se verificó que las especies ornamentales *N. oleander* y *T. peruviana*, del sur de la ciudad de Cali, contienen marcadores quimiotaxonómicos que les atribuyen los efectos tóxicos reportados en distintos artículos de distintas ciudades, por lo anterior se hace necesario el desarrollo de una guía toxicológica de las especies vegetales y además la inclusión de las mismas en el INVIMA y el vademécum como plantas tóxicas que requieren restricciones en su uso.

Bibliografía

- Montero Aparicio, E., Arriola Martínez, P., Martínez Odriozola, P., & De la Villa, F. M. (2006). Intoxicación por ingesta de adelfa (*Nerium oleander*). Cartas al editor. *Medicina clínica*.
- A. Tracqui, P. Kintz, B. Ludes, P. Mangin. (1997). High-performance liquid chromatography–ionspray mass spectrometry for the specific determination of digoxin and some related cardiac glycosides in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 101-109.
- Abascal, J. G. (s.f.). *Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, España*. Recuperado el 28 de Abril de 2015, de CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf
- Abe, F., Yamauchi, T., Iwase, Y., Yahara, S., & Nohara, T. (1995). FLAVONOL SINAPOYL GLYCOSIDES FROM LEAVES OF THEVETIA PERUVIANA. *Phytochemistry*, Vol 40., 577-581.
- Aguilar García, C. R., & Maycotte, Z. L. (2013). Intoxicación por *Thevetia peruviana*. *Revista de la asociación mexicana de medicina crítica y terapia invasiva*, 245-248.
- Alejandro, M. M. (2002). *Esteroides cardiotónicos*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Amaringo Villa, F., Hormaza, A., & Arias Z, M. (2011). Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante. *Scientia et Technica*, 298-301.
- Arvind, K., Tanmoy, D., Amrita, M., & Arun, K. M. (2013). Oleandrin: A cardiac glycosides with potent cytotoxicity. *Pharmacognosy Reviews*, 131-137.
- Bandara, V., Weinstein, S., White, J., & Eddlestone, M. (2010). A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon*, 273-281.
- Colegio de Farmacéuticos de la provincia de Buenos Aires. (s.f.). Plantas Medicinales de procedencia dudosa y tratamiento para bajar de peso. *Atención Farmacéutica*, 16-18.
- De Castro Ríos, A. (2007). Aplicación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en TANDEM a la determinación de antidepresivos en plasma y fluido oral. En *Tesis de doctorado* (págs. 99-104). España:

Universidade de Santiago de Compostela. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico.

Fonnegra Gómez, R., Botero Restrepo, H., Estrada Gómez, C. A., Orrego Arismendi, J. C., Delgado Salazar, R., Marian Nathalia, T., & Catalina, M. (Noviembre de 2010). *CÓDICE. Boletín Científico y Cultural del Museo Universitario de la Universidad de Antioquia*. Recuperado el 25 de Noviembre de 2014, de Plantas medicinales y tóxicas. Ramiro Fonnegra: <http://ilam.org/ILAMDOC/Codice/codice23.pdf>

H. Wagner, S. Bladt. (1996). *Plant drug analysis. A thin layer chromatography*. Berlín.: Springer. 2da edición.

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. (14 de Agosto de 2013). *Sala especializada de productos naturales 2014*. Recuperado el 26 de Noviembre de 2014, de Listado de plantas tóxicas: <https://www.invima.gov.co/images/pdf/salas-especializadas/productos-naturales/2014/Listado%20plantas%20tóxicas%20v%20publicación%20web.pdf>

Khan, I., Kant, C., Sanwaria, A., & Meena, L. (2010). Acute Cardiac Toxicity of Nerium Oleander/Indicum Poisoning (Kaner) Poisoning. *Heart views*, 115-116.

Kohls, S., Scholz-Böttcher, B., Teske, J., Zark, P., & Rullkötter, J. (2011). Cardiac glycosides from Yellow Oleander (*Thevetia peruviana*) seeds. *Phytochemistry*, 114-127.

Kumar, P., Khatri, P., Gopi, J., Shukla, P., & Patel, R. (2012). Pharmacognostic and Preliminary Physicochemical Investigations of. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, 100-108.

Langford, S., & Boor, P. (1996). Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. *Toxicology 109*, 1-13.

López, N. A. (19 de Septiembre de 2002). INTOXICADOS POR PASTILLA DE ADELGAZAR. *El Tiempo*.

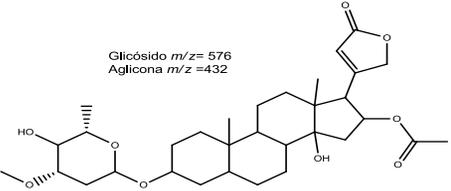
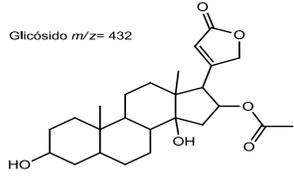
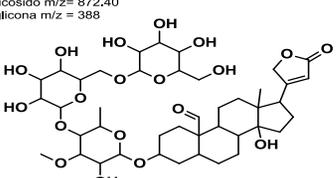
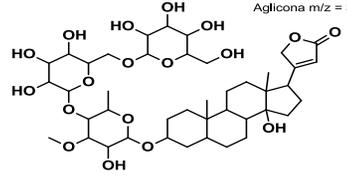
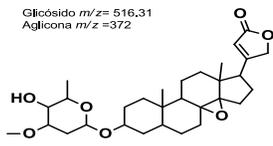
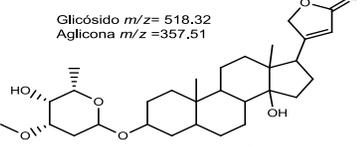
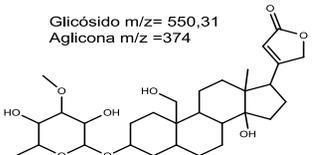
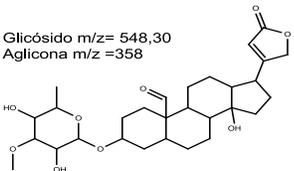
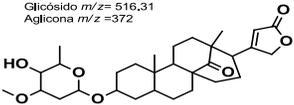
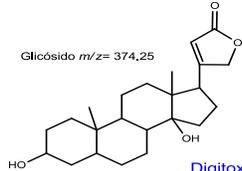
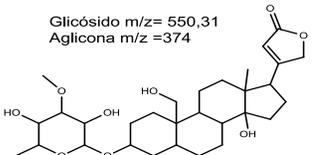
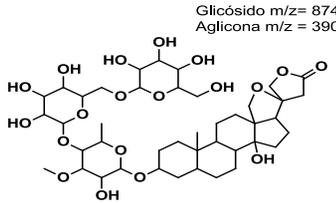
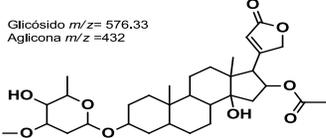
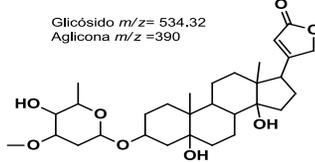
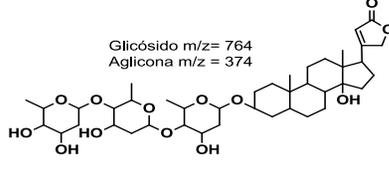
México, F. d. (s.f.). *FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS*. Recuperado el 17 de Marzo de 2015, de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/masas_10832.pdf

Montoya P., G. L. (10 de Agosto de 2011). Consideraciones sobre la espectrometría de masas debido a su moderno acople con cromatografía líquida y su modo de aplicación en la química de productos naturales. *Universidad Icesi, Facultad de Ciencias Naturales.*, 1-28.

- Prassas, I., & P. Diamandis, E. (2008). Novel therapeutic applications. *Nature reviews drug discovery*, 926-935.
- Quintela O., Cruz A., Concheiro M., De Castro A. y López-Rivadulla M. (2004). Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Revista Toxicológica 2005*, 7-14.
- Redacción Nacional. (09 de Abril de 2003). LAS OTRAS DROGAS ILEGALES. *El tiempo*.
- Sheriff, R. (1999). YELLOW OLEANDER POISONING - IN SEARCH OF AN ANTIDOTE. *Sri Lanka Medical Association Oration* , 855-867.
- Skoog, D., Hiller, F., & Nieman , T. (2001). *Principios de Análisis instrumental*. Madrid: Mc Graw Hill, 5a edición, 490 pgs.
- Tewtrakul, S., Nakamura, N., Hattori, M., Fujiwara, T., & Supavita, T. (2002). Flavanone and Flavonol Glycosides from the Leaves of *Thevetia peruviana* and Their HIV-1 Reverse Transcriptase and HIV-1 Integrase Inhibitory Activities. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, Vol. 50 No 5, 630-635.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer.
- Xing, J., Xie, C., & Lou, H. (2007). Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44, 368-378.
- Y. Aular de González, M. P. (2003). Intoxicación por la administración de tabletas de *Thevetia peruviana* como tratamiento para bajar de peso: presentación de un caso. *Revista de toxicología*, 221-223.
- Yamauchi, T., Abe, F., Tachibana, Y., Atal, C., Sharma, B., & Imre, Z. (1983). Quantitative variations in the cardiac glycosides of oleander. *Phytochemistry*, Vol. 22, No. 10., 2211-2214.
- Zibbu, G., & Batra, A. (2011). *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum . : A plant with enormous therapeutic potential. *Journal of Pharmacy Research*, 4461-4464.

Anexos

Tabla 1. Cardiotónicos esperados en *Nerium oleander* y *Thevetia peruviana*

<i>Nerium oleander</i>	<i>Thevetia peruviana</i>
<p>Glicósido $m/z = 576$ Aglicona $m/z = 432$</p>  <p>Oleandrina</p> <p>Glicósido $m/z = 432$</p>  <p>Oleandrigenina</p>	<p>Glicósido $m/z = 872,40$ Aglicona $m/z = 388$</p>  <p>Thevetina A</p> <p>Glicósido $m/z = 858$ Aglicona $m/z = 374$</p>  <p>Thevetina B</p>
<p>Glicósido $m/z = 516,31$ Aglicona $m/z = 372$</p>  <p>Adinerina</p> <p>Glicósido $m/z = 518,32$ Aglicona $m/z = 357,51$</p>  <p>Odorósido A</p>	<p>Glicósido $m/z = 550,31$ Aglicona $m/z = 374$</p>  <p>Ruvósido</p> <p>Glicósido $m/z = 548,30$ Aglicona $m/z = 358$</p>  <p>Peruvósido. Peso exacto: 548,30</p>
<p>Glicósido $m/z = 516,31$ Aglicona $m/z = 372$</p>  <p>Oleásido A</p> <p>Glicósido $m/z = 374,25$</p>  <p>Digitoxigenina</p>	<p>Glicósido $m/z = 550,31$ Aglicona $m/z = 374$</p>  <p>Ruvósido</p> <p>Glicósido $m/z = 874$ Aglicona $m/z = 390$</p>  <p>Thevetina C</p>
<p>Glicósido $m/z = 576,33$ Aglicona $m/z = 432$</p>  <p>Nerigosido</p> <p>Glicósido $m/z = 534,32$ Aglicona $m/z = 390$</p>  <p>Neridiginosido</p> <p>Glicósido $m/z = 764$ Aglicona $m/z = 374$</p>  <p>Digitoxina</p>	<p>Glicósido $m/z = 874$ Aglicona $m/z = 390$</p>  <p>Thevetina C</p>

