

AISLAMIENTO, MODIFICACIÓN SINTÉTICA Y EVALUACIÓN *In vitro* DE LA
 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ALCALOIDES PROVENIENTES DE LAS HOJAS
 DE LA ESPECIE *Siparuna sessiliflora*



ADIEL JULIÁN GUEVARA VENEGAS

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
 FACULTAD DE CIENCIAS
 DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
 BOGOTÁ
 2012

AISLAMIENTO, MODIFICACIÓN SINTÉTICA Y EVALUACIÓN *In vitro* DE LA
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ALCALOIDES PROVENIENTES DE LAS HOJAS
DE LA ESPECIE *Siparuna sessiliflora*

ADIEL JULIÁN GUEVARA VENEGAS

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar el título de
Magister en ciencias biológicas.

Directora:
Alix Elena Loaiza Salazar
Química, Ph.D.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BOGOTÁ
2012

NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución N°13 de Julio de 1946

AISLAMIENTO, MODIFICACIÓN SINTÉTICA Y EVALUACIÓN *In vitro* DE LA
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ALCALOIDES PROVENIENTES DE LAS HOJAS
DE LA ESPECIE *Siparuna sessiliflora*

ADIEL JULIÁN GUEVARA VENEGAS

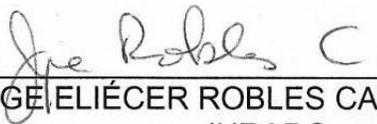
APROBADO



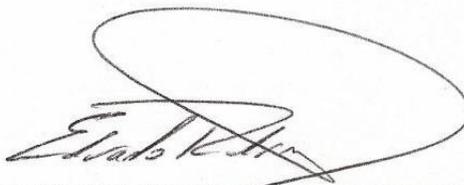
ALIX ELENA LOAIZA SALAZAR Ph.D.
DIRECTORA



JAIME MARTÍN FRANCO Ph. D.
JURADO



JORGE ELIÉCER ROBLES CAMARGO Ph. D.
JURADO



OSCAR EDUARDO RODRÍGUEZ AGUIRRE Ph. D.
JURADO

AISLAMIENTO, MODIFICACIÓN SINTÉTICA Y EVALUACIÓN *In vitro* DE
LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ALCALOIDES PROVENIENTES DE
LAS HOJAS DE LA ESPECIE *Siparuna sessiliflora*

Adiel Julián Guevara Venegas

Concepción Judith Puerta Ph.D
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Manuel Antonio Franco Ph.D
Director Posgrado
Facultad de Ciencias

AGRADECIMIENTOS

A la profe Alix y a John quienes siempre me orientaron durante todo el proceso.

A Isabel Pardo por colaborarnos en la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos y las fracciones

Al sendero ambiental Mogambo por suministrar el material vegetal para realizar esta investigación.

A toda mi familia que fue mi constante apoyo y motivación para seguir adelante.

A Dios que siempre me dio fortaleza y sabiduría para enfrentar la difícil tarea de la investigación.

Tabla de Contenidos

Índice de Gráficas	10
Índice de Figuras.....	11
RESUMEN.....	12
1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	15
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	16
2.1. Género <i>Siparuna</i>	16
2.1.1. Actividad biológica de plantas pertenecientes al género <i>Siparuna</i>	16
2.2. Alcaloides.....	17
2.2.1. Alcaloides presentes en plantas del género <i>Siparuna</i>	19
2.2.1.1. Alcaloides isoquinolínicos.....	19
2.2.1.2. Alcaloides aporfínicos	19
2.2.1.3. Biogénesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos y aporfínicos.....	20
2.3. Especie <i>Siparuna sessiliflora</i>	21
2.4. Hongos Fitopatógenos	22
2.4.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	23
2.4.2. <i>Alternaria sp</i>	23
2.4.3. <i>Aspergillus niger</i>	23
2.4.4. <i>Rhizoctonia solani</i>	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. General.....	24
3.2. Específicos	24
4. METODOLOGÍA	25
4.3. Extracción, separación y purificación de los alcaloides mayoritarios.....	25
4.4. Identificación de los alcaloides presentes en las fracciones F-AcOEt-1, F-AcOEt-2 y F-AcOEt-3.....	25
4.5. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto total ET-DCM, las fracciones F-AcOEt, F-MeOH y la 12-O-metil-N-metilcoclaurina.....	25
4.1. Estudio preliminar: marcha fitoquímica y elección del método de extracción	26
4.3. Extracción, separación y purificación de los alcaloides mayoritarios.....	28
4.4. Identificación de los alcaloides presentes en las fracciones F-AcOEt-1, F-AcOEt-2 y F-AcOEt-3.....	29

4.5. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto total ET-DCM, las fracciones F-AcOEt, F-MeOH y la 12-O-metil-N-metilcoclaurina.....	29
4.6. Modificación química de los alcaloides mayoritarios	30
4.6.1. Oxidación de la oliverolina (síntesis de 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona):.....	30
4.6.2. Síntesis del éter de oxima 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona O-bencil-oxima	30
4.6.3. O-Alquilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2-bromobencilo (síntesis de 7-(2-bromobenciloxi)-6-metoxi-1-(4-metoxibencil)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina)	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5.1. Estudio preliminar: marcha fitoquímica	31
5.3. Extracción, identificación, separación y purificación de los alcaloides mayoritarios	35
5.4. Identificación de los alcaloides presentes en las fracciones F-AcOEt-1, F-AcOEt-2 y F-AcOEt-3.....	38
5.4.1. Análisis por CG-EM.....	38
5.4.2. Análisis por RMN	39
5.5. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto total ET-DCM, las fracciones F-AcOEt, F-MeOH y la 12-O-metil-N-metilcoclaurina.....	46
5.6. Modificación química de los alcaloides mayoritarios	51
5.6.1. Oxidación de la oliverolina:	51
5.6.2. Síntesis de la oxima 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona O-bencil-oxima	57
5.6.3. O-Alquilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2-bromobencilo (síntesis de 7-(2-bromobenciloxi)-6-metoxi-1-(4-metoxibencil)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina)	60
6. CONCLUSIONES.....	66
7. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

Índice de tablas

Tabla 1. Actividades biológicas encontradas en plantas pertenecientes al género <i>Siparuna</i>	16
Tabla 2. Resultados marcha fitoquímica con el extracto etanólico	31
Tabla 3. Alcaloides identificados en los extractos ET-DCM y ET-EtOH mediante CG-EM, por comparación con la base de datos NIST05a.L., con porcentajes de coincidencia superiores al 80%	35
Tabla 4. Alcaloides mayoritarios presentes en el extracto total ET-DCM identificados por CG-EM.....	36
Tabla 5. Resultados análisis mediante CG-EM y masa de las fracciones obtenidas a partir del extracto ET-DCM.....	37
Tabla 6. Comparación de algunos δ H de la oliverolina reportados por (Brastianos, 2007) con los δ H de F-AcOEt-1	39
Tabla 7. Comparación de algunos δ H de la 12-O-metil-N-metilcoclorina reportados por Iturriaga V. en 2001 y F-AcOEt-2.....	44
Tabla 8. Comparación de algunos δ H de la liriodenina reportados por Wang et al. En 2010 y Pang et al. en 2007, con F-AcOEt-3.....	45
Tabla 9. Comparación de los iones principales de la oliverolina y el producto de reacción.	56
Tabla 10. Comparación de los iones principales y tiempos de retención de la 12-O-metil-N-metilcoclorina y el producto de O-alquilación esperado.....	64

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de <i>Aspergillus niger</i> a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.....	46
Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.....	47
Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de <i>Alternaria sp</i> a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.....	48
Gráfica 4. Porcentaje de inhibición de <i>Alternaria sp</i> a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.....	49
Gráfica 5. Porcentaje de inhibición de <i>Rhizoctonia solani</i> a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.....	50

Índice de Figuras

Figura 1. Ruta biosintética de los alcaloides bencilisoquinolinicos y aporfínicos.....	21
Figura 2. Metodología empleada para el estudio de los alcaloides y su actividad antifúngica	26
Figura 3. Metodología empleada en la marcha fitoquímica.....	27
Figura 4. Espectro RMN- ¹ H de la de la fracción F-AcOEt-2 (300 MHz, CD ₃ OD).....	41
Figura 5. Ampliación de la zona alifática del espectro HSQC de la fracción F- AcOEt-2.....	42
Figura 6. Ampliación de la zona aromática del espectro HSQC de la fracción F- AcOEt-2.....	43
Figura 7. Oxidación de la oliverolina	51
Figura 8. Mecanismo de oxidación de la oliverolina	52
Figura 9. Cromatograma de la mezcla de reacción de la oxidación de la oliverolina con PCC a los 2 días:.....	52
Figura 10. Cromatograma de la mezcla de reacción de la oxidación de la oliverolina con PCC a los 5 días:.....	53
Figura 11. Cromatograma de la mezcla de reacción de la oxidación de la oliverolina con PCC a los 8 días:.....	53
Figura 12. Espectro de masas del producto de oxidación de la oliverolina (tiempo de retención de 24.191 minutos)	54
Figura 13. Ruta de fragmentación propuesta del producto de oxidación de la oliverolina..	55
Figura 14. Espectro de masas de la oliverolina obtenido por impacto electrónico	56
Figura 15. Obtención del éter de oxima 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H- benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona O-bencil-oxima	57
Figura 16. Mecanismo de reacción de la formación del éter de oxima.....	57
Figura 17. Espectro de masas del éter de oxima (tiempo de retención de 25.009 minutos).	59
Figura 18. Ruta de fragmentación propuesta para el éter de oxima obtenido.....	60
Figura 19. O-Alquilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2- bromobencilo.....	61
Figura 20. Mecanismo de reacción de la O-Alquilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2-bromobencilo	62
Figura 21. Espectro de masas del producto bromado (tiempo de retención de 24.575 minutos).	63
Figura 22. Espectro de masas de 12-O-metil-N-metilcoclaurina (tiempo de retención de 23.118 minutos).	63
Figura 23. Ruta de fragmentación propuesta para el producto de la O-alquilación.	65

RESUMEN

La especie *Siparuna sessiliflora* pertenece a la familia Siparunaceae, género *Siparuna*, su nombre común es limoncillo y aunque es empleada por varias comunidades indígenas para tratar diversos problemas de salud y es considerada una especie promisorio, sorprende los pocos estudios fitoquímicos y reportes relacionados con la evaluación de su actividad biológica.

Con el propósito de contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en ésta especie y su actividad biológica, se emprendió un estudio enfocado hacia la identificación y evaluación de la actividad antifúngica de los alcaloides presentes en sus hojas.

Para lograr lo anterior, se realizó una extracción por Soxhlet de las hojas de la planta con diclorometano, el extracto obtenido se trató con ácido para obtener un extracto total de alcaloides que se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (CG-EM), y se identificaron los compuestos oliverolina y 12-O-metil-N-metilcoclaurina como compuestos mayoritarios (25% y 15% respectivamente), además de coridina, N-metillauretina, boldina, liriodenina, N-metilcoridaldina, nornuciferina, stefolidina, nantenina, ajmalina y 1-[(2-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-6-metoxi-Isoquinolina con porcentajes de coincidencia superiores al 90% comparados con la base de datos NIST05a.L.

Posteriormente, mediante cromatografías de columna y de capa delgada preparativa, se aislaron los alcaloides oliverolina, 12-O-metil-N-metilcoclaurina y liriodenina, cuya identidad fue confirmada por resonancia magnética nuclear (RMN). Los alcaloides mayoritarios se modificaron mediante reacciones conocidas de la química orgánica, lográndose la oxidación del alcohol secundario presente en la oliverolina con clorocromato de piridinio (PCC), obteniéndose la respectiva cetona, la cual fue tratada con O-bencilhidroxilamina para obtener el respectivo éter de oxima. También se realizó la O-alkilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2-bromobencilo. La identidad de estos compuestos se confirmó por EM.

Por último se evaluó la actividad antifúngica del extracto total alcaloidal proveniente de la extracción por Soxhlet, algunas fracciones provenientes de separaciones cromatográficas y un alcaloide con 85% de pureza, contra los hongos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp*, *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani*, para lo cual se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial.

Los resultados mostraron que la mejor actividad del extracto total alcaloidal se dio a una cantidad de 2.025 mg, presentando inhibiciones de 100% contra *Fusarium oxysporum*, 81% contra *Alternaria sp* y 25 % contra *Aspergillus niger* a un tiempo de 96 h.

Así mismo, una de las fracciones, que contenía oliverolina y 12-O-metil-N-metilcoclaurina como compuestos mayoritarios, inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en un 90%, *Aspergillus niger* en un 85% y *Alternaria sp* en un 40 % a un tiempo de 96 h a una cantidad de 2.025 mg. Ninguna de las muestras analizadas mostró actividad inhibitoria relevante contra *Rhizoctonia solani*.

Éste estudio muestra la marcada presencia de alcaloides isoquinolínicos y aporfínicos en la especie *S. sessiliflora*, contribuyendo así al conocimiento de nuestra biodiversidad, y permite además visualizar una aplicación potencial, a largo plazo, de los alcaloides presentes en sus hojas, como agentes para el tratamiento de hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

The *Siparuna sessiliflora* species belongs to the family Siparunaceae, genus *Siparuna*, its common name is "limoncillo" and although it is used by several indigenous to treat various health problems and is considered a promising species, surprised the absence of phytochemical studies and reports related to the evaluation of its biological activity.

In order to contribute to the knowledge of the secondary metabolites present in this species and its biological activity, we undertook a study focused on the identification and evaluation of the antifungal activity of the alkaloids present in their leaves.

To achieve this goals, we performed a Soxhlet extraction of the leaves of the plant with dichloromethane, the extract obtained was treated with acid to obtain a total alkaloids extract that was analyzed by gas chromatography coupled to a mass detector (GC-MS), and were identified oliverolina and 12-O-methyl-N-methylcoclaurine as major compounds (25% and 15% respectively), besides coridine, N-methyl-laurotetanine, boldine, liriodenine, N-methylcoridaldine, nornuciferine, stepholidine , nantenine, Ajmaline and 1 - [(2-hydroxy-3-methoxyphenyl) methyl]-6-methoxy-isoquinoline with matching percentages above 90% compared with the NIST05a.L database.

Subsequently, by column and preparative thin layer chromatography alkaloids oliverolina, 12-O-methyl-N-methylcoclaurine and liriodenine were isolated, whose identity was confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR). The mayor alkaloids were modified by known reactions of organic chemistry, achieving oxidation of the secondary alcohol present in the oliverolina with pyridinium chlorochromate (PCC) to give the corresponding ketone, whose identity was confirmed by MS and NMR. We also performed the O-alkylation of the 12-O-methyl-N-methylcoclaurina with 2-bromobenzylbromide, the only product was characterized by GC-MS.

Finally, antifungal activity of alkaloid total extract from the Soxhlet extraction, some fractions derived from chromatographic separations and one alkaloid with 85% purity was evaluated, against fungus *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp*, *Aspergillus niger* and *Rhizoctonia solani*, for technique was used which inhibition of radial growth.

The results showed that the best activity of total alkaloid extract was achieved to an amount of 2,025 mg, showing 100% inhibition against *Fusarium oxysporum*, 81% against *Alternaria sp* and 25% against *Aspergillus niger* at a time of 96 h. Likewise, one of the fractions containing oliverolina and 12-O-methyl-N-methylcoclaurine as main compounds inhibited the growth of *Fusarium oxysporum* in 90%, *Aspergillus niger* in 85% and *Alternaria sp* in 40% at a time of 96 h in a quantity of 2,025 mg. None of the samples tested showed significant inhibitory activity against *Rhizoctonia solani*.

This study shows the strong presence of isoquinoline and aporphine alkaloids in the species *S. sessiliflora*, contributing in this way to the knowledge of our biodiversity, and allows knowing a potential application in the long term, of the alkaloids present in the leaves, as agents for the treatment of fungal pathogens.

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las plantas han sido usadas a lo largo de la historia para tratar diversas enfermedades y esto se debe principalmente a que ellas producen todo un arsenal de compuestos entre los que se encuentran terpenoides, taninos, flavonoides, cardiotónicos, quinonas y alcaloides entre otros, con una amplia gama de actividades que van desde antimicrobianos (Lutta, Christine, Teresa, & Wanjala, 2008) hasta antimutagénicas (Miyazawa, Shimamura, Nakamura, & Kameoka, 1996). Estos metabolitos son preferidos por las personas sobre medicamentos usuales ya que tienen menos efectos secundarios sobre la salud humana.

Numerosos reportes de muestran que desde 1982 hasta 2007 más de la mitad de los medicamentos aprobados son productos naturales o al menos están basados en estos, siendo las plantas las que más sustancias aportan a la medicina (Harvey, 2008), lo que nos da un indicio de nuestra dependencia por esta clase de metabolitos.

Por otra parte, se ha encontrado que un 8% de los hongos conocidos son fitopatógenos y causan alrededor de 80.000 enfermedades en las plantas, en un rango amplio de huéspedes. Esto representa un problema económico ocasionado por el alto costo del tratamiento de las enfermedades causadas por ellos y las pérdidas de los cultivos (Centro agronómico tropical de la investigación y enseñanza, 1991). Una posibilidad de resolver parte del problema sería partiendo de estudios reportados en la literatura sobre la actividad antifúngica de extractos de hojas de la especie *Siparuna sessiliflora*, siendo ampliamente significativo identificar los metabolitos secundarios tipo alcaloides que están presentes en las hojas de la planta y en cuanto sea posible aislarlos para evaluar su actividad fungicida y determinar su uso potencial como antifúngico natural.

Todo esto constituye un primer paso hacia el logro de dichos objetivos si se tiene en cuenta que los estudios reportados de esta planta son escasos, lo cual sorprende dada la amplia variedad de actividades biológicas reportadas para las plantas de éste género (Céline et al., 2009), (Lomonte, León, Angulo, Rucavado, & Núñez, 2009), (Lopez, Hudson, & Towers, 2001), (Tempone et al., 2005).

Con el desarrollo del presente proyecto se pretende realizar un aporte en el conocimiento de nuestra biodiversidad y establecer potenciales aplicaciones de especies vegetales consideradas promisorias (Bernal & Correa, 1990), que eventualmente conlleven al desarrollo de nuevos productos con actividad farmacológica entre otras.

2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

La especie *Siparuna sessiliflora* pertenece a la familia *Siparunaceae*, género *Siparuna*, por lo cual se decidió hacer una revisión bibliográfica acerca de éste género, caracterizado por presentar una amplia variedad de actividades biológicas y por poseer entre sus metabolitos secundarios alcaloides isoquinolínicos y aporfínicos, como se mostrará a continuación.

2.1. Género *Siparuna*

El género *Siparuna* pertenece al orden Laurales, al cual pertenecen 150 especies. Se ubica principalmente en el hemisferio sur y se presenta en forma de árboles o arbustos que producen aceites esenciales, con hojas perennes y en algunos casos poseen un olor cítrico muy agradable, por lo que pueden clasificarse como plantas aromáticas, poseen alcaloides y flavonoides entre sus metabolitos secundarios, y una amplia variedad de actividades biológicas (Leitão et al., 1999).

2.1.1. Actividad biológica de plantas pertenecientes al género *Siparuna*

En la literatura se encuentran numerosos reportes de los resultados obtenidos durante la evaluación de los extractos de estas plantas en diversos tipos de ensayos biológicos entre los que se destacan antimicrobianos, antimaláricos y antiprotozoicos como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Actividades biológicas encontradas en plantas pertenecientes al género *Siparuna*

Especie estudiada	Tipo de actividad	Comentarios
<i>Siparuna guianensis</i>	Antiprotozoica (<i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania chagasi</i>)	Se evaluó el extracto etanólico y el extracto total alcaloidal de las hojas a una concentración de 100 µg/mL obteniendo 100% de eficacia a las 48 horas (Tempone et al., 2005).
	Antimicrobiana (<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Mycobacterium Phlei</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>)	Se evaluó el extracto metanólico a una concentración de 20 µg/mL obteniendo un amplio espectro de actividad (Lopez et al., 2001).
<i>Siparuna aspera</i>	Antimalarica	Se evaluó el extracto etanólico obteniendo actividades con IC _{50a} concentraciones menores de

		10mg/mL(Céline et al., 2009)
<i>Siparuna thecaphora</i>	Neutralización del veneno de <i>Bothrops asper</i>	Se evaluó el extracto total, pre incubándolo con el veneno. Luego fueron inyectados en ratones, logrando un efecto antihemorrágico (Lomonte et al., 2009).
	Antimalárica (causada por <i>Plasmodium berghei</i>)	Se evaluaron extractos etanólicos de hojas, flores, frutos, corteza y raíz <i>in vivo</i> , obteniendo actividad inhibitoria a una concentración IC ₅₀ de 16 mg/kg. (Chinchilla Carmona et al., 2011).
<i>Siparuna pauciflora</i>	Antiplasmodial (<i>Plasmodium falciparum</i>)	El alcaloide <i>nor-boldina</i> presente en sus hojas, mostró actividad inhibitoria moderada a una concentración IC ₅₀ de 3.1 mg/mL y 5.4 mg/mL(Jenett-Siems et al., 2003).

Como se dijo anteriormente, este género se caracteriza por poseer una amplia variedad de alcaloides del tipo aporfínicos e isoquinolínicos, por lo tanto, a continuación se presenta una breve revisión acerca de los alcaloides en general y de aquellos presentes en las plantas de éste género.

2.2. Alcaloides

La palabra alcaloide fue utilizada por primera vez por W. Meissner en el primer cuarto del siglo XIX para designar algunos compuestos con actividad que se encontraban en los vegetales y que poseían carácter básico (Sujata, Nagasampagi, & Meenakshi, 2009). En este importante grupo de metabolitos se incluyen compuestos dotados de actividades marcadas.

Más tarde los alcaloides se definieron en un sentido amplio, como compuestos básicos, nitrogenados, de origen vegetal o animal.

A lo largo de la primera mitad del siglo XIX se aislaron numerosos alcaloides como la morfina, la estricnina, la narcotina y la codeína entre otros.

En la actualidad se conocen más de 5.000 alcaloides, la mayor parte de origen vegetal, restringidos a un número corto de familias botánicas y se continúa investigando en la búsqueda de nuevos compuestos pertenecientes a este grupo.

Desde el punto de vista químico, todos los alcaloides son compuestos nitrogenados, estando en la mayoría de los casos el nitrógeno formando parte de un heterociclo y en algunas ocasiones formando parte de una cadena abierta (Sujata et al., 2009).

Están constituidos además por carbono e hidrógeno, muchos llevan oxígeno, lo que les confiere una serie de propiedades físicas (sólidos cristalizables de diferentes colores, aromas y polaridades), y raramente suelen contener azufre. Algunos autores hacen una diferenciación entre alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides.

Los primeros serían compuestos de origen vegetal, con nitrógeno heterocíclico, con carácter básico y siempre procedentes de aminoácidos. Los protoalcaloides son aminas simples, con nitrógeno no heterocíclico, también con carácter básico y formados biogénicamente a partir de aminoácidos, y los pseudoalcaloides tendrían las propiedades de los alcaloides pero su biosíntesis no sería a partir de aminoácidos. Esta diferencia entre los alcaloides no es compartida por muchos autores ya que excluye auténticos alcaloides como son la efedrina, colchicina o cafeína, por citar algunos de interés.

La mayor parte de los alcaloides conocidos son de origen vegetal, si bien se ha aislado alguno de animales, como la samandarina de las glándulas de la piel de *Salamandra maculosa* o diversos alcaloides de artrópodos. Generalmente en las plantas no se encuentran como bases libres sino en forma de sales unidos a ácidos orgánicos como el ácido cítrico, málico, succínico, etc. En algunas ocasiones se unen a ácidos orgánicos específicos como al ácido mecónico en el opio o al ácido trópico en las Solanáceas tropánicas.

Los alcaloides poseen estructuras químicas muy diversas, lo que además de dificultar su definición, explica el abanico de actividades farmacológicas que pueden presentar. Entre las diferentes actividades podemos destacar: actividad sobre el sistema nervioso central como, por ejemplo, la morfina aislada de las cápsulas de adormidera y del opio, que deprime el SNC y produce una marcada analgesia (Cowan, 1999), o la cafeína, que por el contrario, excita el SNC.

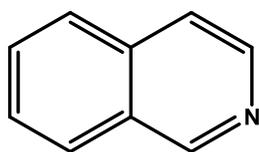
Otros alcaloides presentan actividad sobre el sistema nervioso autónomo como, por ejemplo, la pilocarpina de las hojas de jaborandi, con propiedades parasimpaticolíticas, la atropina aislada de las hojas de belladona con actividad anticolinérgica, o la efedrina de las sumida desde efedra, útil como vasoconstrictor en casos de asma por sus propiedades simpaticomiméticas; en algún caso como, por ejemplo, la cocaína aislada de las hojas de coca, la actividad es anestésica

local (hoy prácticamente este alcaloide no tiene utilidad terapéutica); actividad sobre el corazón, como la quinidina aislada de las cortezas de quina, con propiedades antiarrítmicas (Meissner & Bernard, 2001).

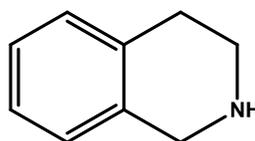
2.2.1. Alcaloides presentes en plantas del género *Siparuna*

2.2.1.1. Alcaloides isoquinolínicos

Los alcaloides isoquinolínicos constituyen uno de los grupos de alcaloides más importantes en el cual están englobados todos los productos naturales que contienen en su estructura un sistema heterocíclico de tipo isoquinolina.

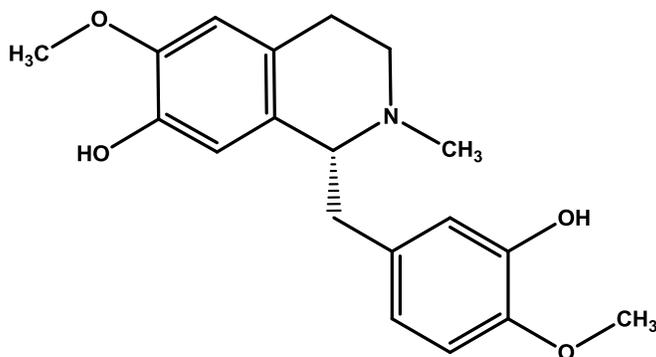


Isoquinolina



1, 2, 3, 4-Tetrahydroisoquinolina

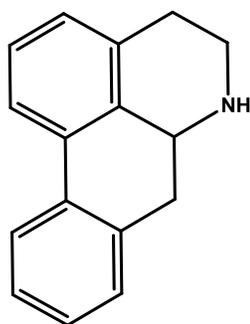
Las estructuras que presentan estos alcaloides son muy variadas y por este motivo tienen un amplio espectro de actividades biológicas que incluyen antiprotozoaria (Tempone et al., 2005), antimicrobiana, antimalárica, citotóxica y anti-VIH (Iwasa et al., 2001). El género *Siparuna* es rico en alcaloides de tipo benciltetrahydroisoquinolínicos. La reticulina por ejemplo, es un alcaloide de tipo bencilisoquinolínico y fue aislada de las hojas de la *Siparuna apiocyse* (Leitão et al., 1999).



Reticulina

2.2.1.2. Alcaloides aporfínicos

Son alcaloides de tipo dibenzoquinolínicos que poseen la siguiente estructura básica:

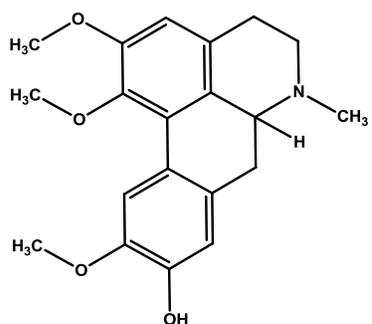


Aporfina

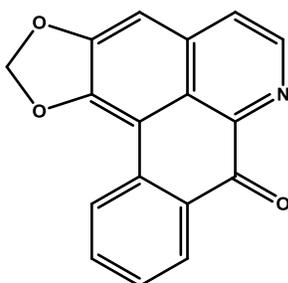
Al igual que los alcaloides isoquinolínicos presentan una gran diversidad de estructuras y de actividades reportadas, especialmente contra el virus del herpes simple (As'ari et al., 1999), antiprotozoaria (Fournet et al., 2007) y antimicrobiana (Nissanka et al., 2001).

En el género *Siparuna* se han aislado muchos de ellos como por ejemplo la liriodenina, obtenida de la *Siparuna gilgiana*, *Siparuna guianensis* y *Siparuna nicaraguensis*. Se le atribuye una actividad de tipo sedante del sistema nervioso central (Leitão et al., 1999).

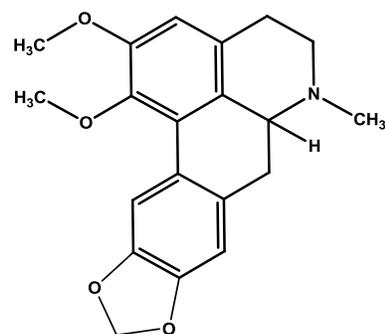
También se han aislado la nantenina a partir de la *Siparuna arianae* y la N-metillaurotetanina a partir de la *Siparuna apiosyce*.



N-metillaurotetanina



Liriodenina



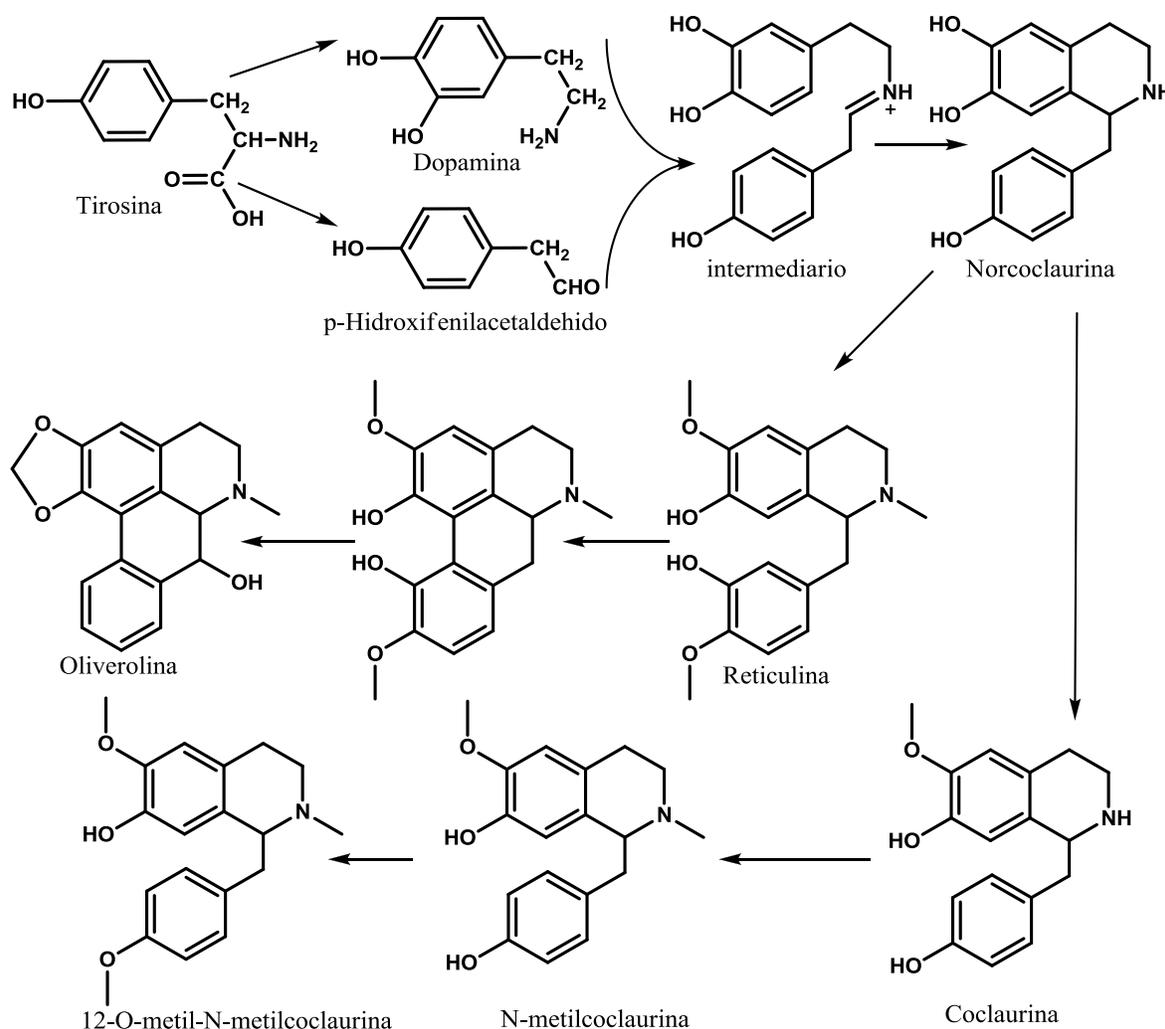
Nantenina

2.2.1.3. Biogénesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos y aporfínicos

Ambos alcaloides provienen del aminoácido tirosina que tras una descarboxilación e hidroxilación del anillo fenólico se convierte en dopamina, y que luego de una transaminación seguida por una descarboxilación genera el *p*-hidroxifenilacetaldehído. Estos dos compuestos se condensan formando un ion iminio intermediario, que cicla sobre el anillo aromático formando la norcoclaurina

y posteriormente las sustancias ya mencionadas (Cordell, 1998), como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Ruta biosintética de los alcaloides bencilisoquinolinicos y aporfínicos



2.3. Especie *Siparuna sessiliflora*

Esta planta pertenece a la familia Siparunaceae, género *Siparuna* (Leitão et al., 1999), su nombre común es limoncillo (Red Nacional de Jardines Botánicos., 2008). Estos son algunos sinónimos de la planta ("Tropicos.org," n.d.):

- *Citriosma mollicoma* Mart. ex Tul.
- *Citriosma radiata* Poepp. ex Endl.
- *Citriosma dubia* Kunth
- *Citriosma molle* Kunth
- *Citriosma sessiliflora* Kunth

- *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A. DC.
- *Siparuna magnifica* Perkins
- *Siparuna mollicoma* (Mart. ex Tul.) A. DC.
- *Siparuna mollis* A. DC.
- *Siparuna pittieri* R. Knuth ex Steyerm.
- *Siparuna radiata* (Poepp. & Endl.) A. DC.
- *Siparuna steleandra* Perkins

Esta especie se encuentra a una altitud de 0 a 3051 m (Missouri Botanical Garden, n.d.), se localiza en Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Crece en forma de arbusto terrestre con una altura de 3-4 metros, su flor tiene forma de sombrilla de color amarillo y naranja, las jóvenes son verde claro. Sus hojas tienen un tamaño cercano a los 7 cm x 14 cm, su forma es elíptica y tienen el ápice obtuso. Aunque es empleada por varias comunidades indígenas para tratar diversos problemas de salud y es considerada una especie promisorio (Valadeau, Castillo, Sauvain, Lores, & Bourdy, 2010), sorprende la ausencia de estudios fitoquímicos y la escasez de reportes relacionados con la evaluación de su actividad biológica.

El único estudio fitoquímico encontrado de la planta reporta la evaluación del extracto total alcaloidal obtenido de una maceración en frío con etanol de las hojas a una concentración de 20 mg/mL contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, obteniendo un porcentaje de inhibición de hasta el 73%. Los autores establecen que esta actividad se debe probablemente a los siguientes alcaloides: Asimilobina, Corlumina y 1-bencil-6-metoxi-3,4-dihidroisoquinolin-7-ol (Padilla G. & Gil A., 2012).

Como se comentó en la formulación del problema y la justificación, uno de los propósitos de este trabajo era evaluar la actividad sobre hongos fitopatógenos, de los extractos alcaloidales de las hojas de esta especie, por lo cual a continuación se hace una descripción de algunas características de los hongos evaluados y las enfermedades causadas por estos.

2.4. Hongos Fitopatógenos

Los hongos constituyen el grupo más importante de agentes de tipo infeccioso que provocan enfermedades en las plantas. Así mismo, han mostrado ser específicos para el órgano al que se unen, mientras que algunos colonizan partes aéreas, otros pueden invadir tejidos por mecanismos de adhesión, penetración e invasión, dejando consigo el deterioro de la planta.

Un problema para la agricultura es el costo por enfermedades producidas por hongos en algunos cultivos que corresponde a 45% de los costos de producción,

sumado a esto algunos hongos han generado resistencia a fungicidas tradicionales entre los que se destacan el benzimidazole, las dicarboximidias y el Benomil. (Garcés, Orozco, Bautista, & Valencia, 2001)

Los hongos evaluados durante esta investigación fueron los siguientes:

2.4.1. *Fusarium oxysporum*

Es un hongo que se presenta principalmente como saprófito en el suelo o también como patógeno especializado y es causante del marchitamiento vascular en tomate. Sin embargo no solo ataca a esta planta ya que se ha encontrado parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene para vencer las defensas de muchas plantas (Garcés et al., 2001)

2.4.2. *Alternaria sp*

El género *Alternaria* contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos tales como micotoxinas. Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados (Carrillo, 2002).

2.4.3. *Aspergillus niger*

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Sin embargo, vale la pena anotar que *A. niger* es de interés industrial ya que se emplea en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Carrillo, 2002).

2.4.4. *Rhizoctonia solani*

Causa la costra negra de la papa. A menudo se observan plantaciones con abundantes plantas de baja altura, amarillentas, con tubérculos aéreos y aspecto blanquecino entre el cuello de la raíz e inicio del tallo. Estas plantas al ser cosechadas producen tubérculos con evidentes deformaciones, altamente manchados por presencia de esclerocios del hongo y con rajaduras siendo muy bajos los rendimientos (García, García, & Garnica, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar la actividad antifúngica de los alcaloides aislados e identificados, de las hojas de la especie *Siparuna sessiliflora*

3.2. Específicos

- Identificar los alcaloides presentes en los extractos de las hojas de la especie *Siparuna sessiliflora*.
- Evaluar la actividad antifúngica de los alcaloides contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp*, *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani*.
- Obtener derivados sintéticos de los alcaloides mayoritarios aislados.

4. METODOLOGÍA

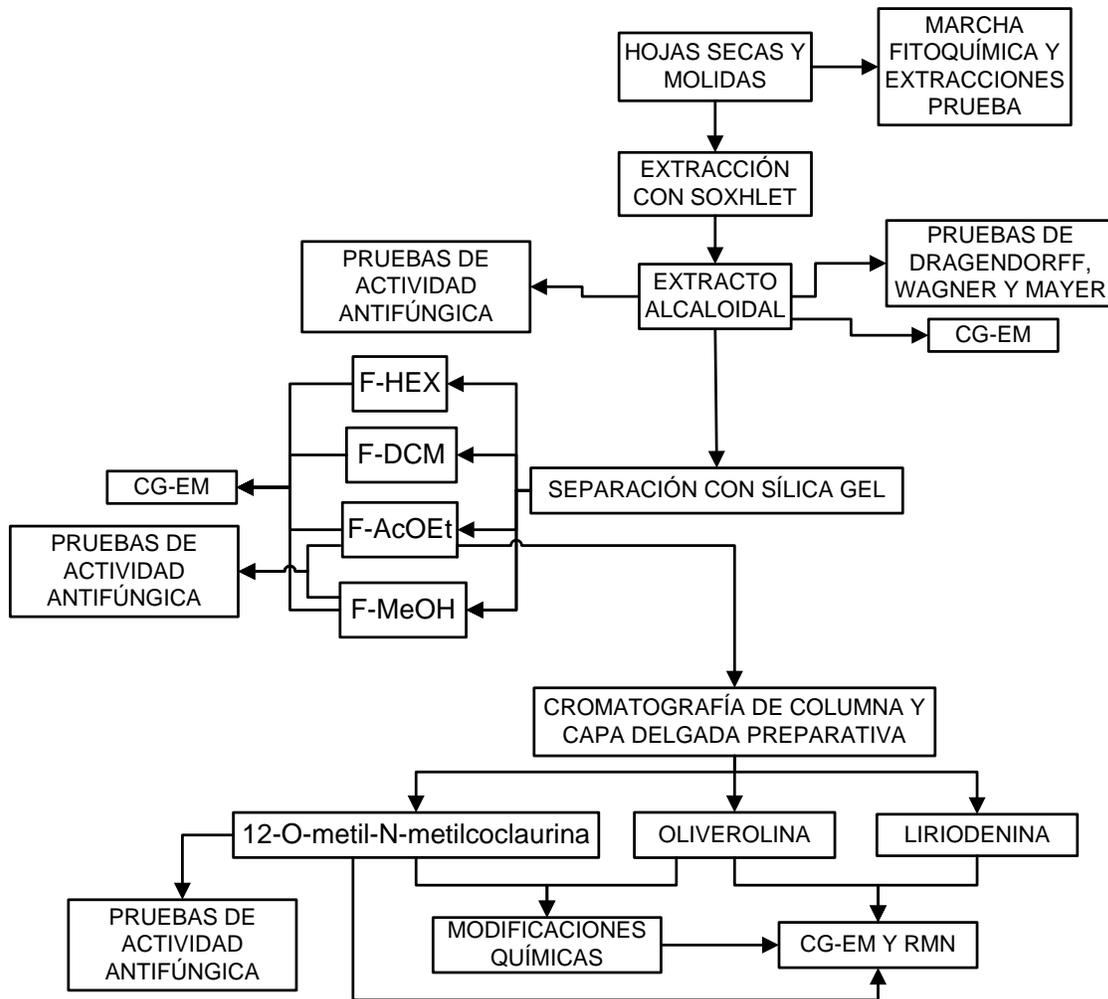
Para comenzar con este estudio, se recolectaron hojas de la especie *Siparuna sessiliflora* en el sendero ambiental Mogambo, en la vereda Brasil del municipio de Viotá (Cundinamarca) y un ejemplar de la especie proveniente del mismo sitio ya había sido incluido en la colección del herbario de la Pontificia Universidad Javeriana con número de identificación 013690 (Padilla G. & Gil A., 2012), se secaron durante 3 días bajo sombra y a continuación se colocaron en un molino para obtener el material vegetal en trozos pequeños.

La metodología usada en el presente trabajo se divide en seis fases:

- 4.1. Marcha fitoquímica preliminar
- 4.2. Elección del método de extracción mediante comparación de dos metodologías
- 4.3. Extracción, separación y purificación de los alcaloides mayoritarios
- 4.4. Identificación de los alcaloides presentes en las fracciones F-AcOEt-1, F-AcOEt-2 y F-AcOEt-3.
- 4.5. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto total ET-DCM, las fracciones F-AcOEt, F-MeOH y la 12-O-metil-N-metilcoclorina.
- 4.6. Modificación química de los alcaloides mayoritarios

En la siguiente figura se muestra las etapas de la metodología empleada:

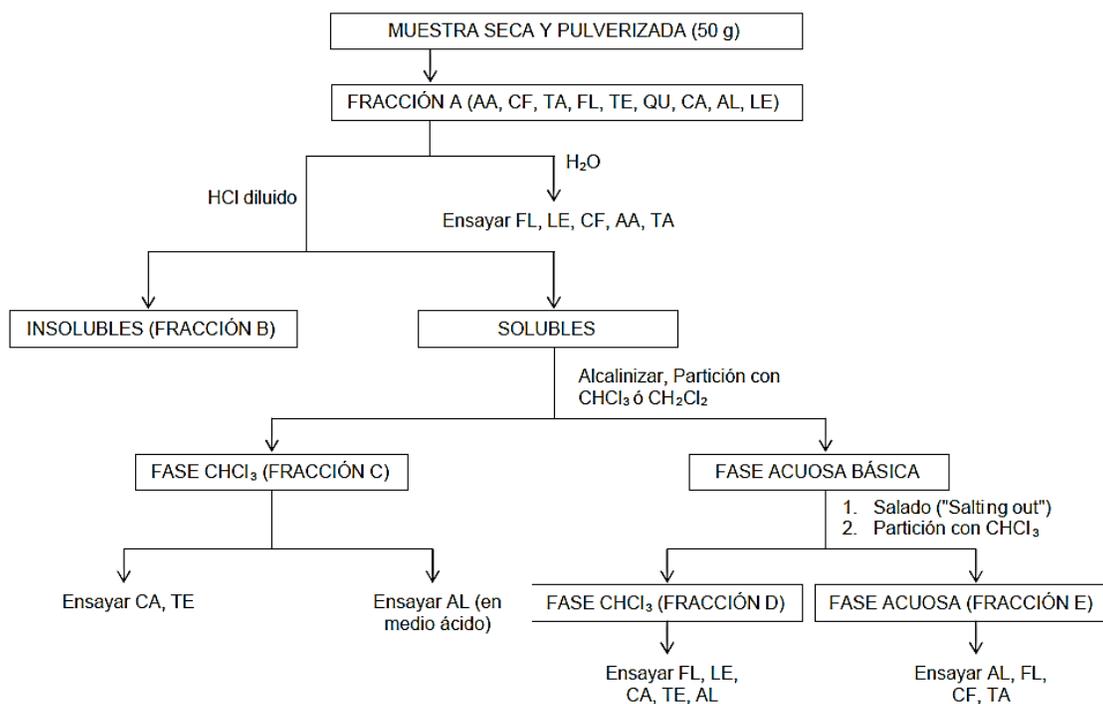
Figura 2. Metodología empleada para el estudio de los alcaloides y su actividad antifúngica



4.1. Estudio preliminar: marcha fitoquímica y elección del método de extracción

Para iniciar con el estudio de la planta, se decidió realizar una marcha fitoquímica con el fin de saber qué tipo de metabolitos secundarios tenía, para esto se tomaron las hojas molidas y se pusieron en un balón de reacción de 250 mL, luego se dejaron en reflujo por 2 horas, utilizando como solvente etanol. El procedimiento usado se muestra en la figura 3 (Martinez M., Valencia P., Jimenez U., Mesa, & Galeano J., 2008).

Figura 3. Metodología empleada en la marcha fitoquímica



Abreviaturas: AA = aminoácidos; CF = compuestos fenólicos; TA = taninos; FL = flavonoides; TE = triterpenoides y/o esteroides; QU = quinonas; CA = cardiotónicos; AL = alcaloides; LE = leucoantocianinas

4.2. Elección del método de extracción mediante comparación de dos metodologías

Una vez realizada la marcha y confirmada la presencia de alcaloides, se hizo un desengrasado del material vegetal con éter de petróleo por siete días a temperatura ambiente. La mezcla heterogénea se filtró, el solvente orgánico se evaporó a presión reducida produciendo 5.41 g (1.35%) etiquetado como ET-EP, el cual se le hizo prueba de Dragendorff y fue analizado por CG-EM.

El material vegetal desengrasado se secó y se procedió a hacer la extracción de los alcaloides siguiendo dos métodos: extracción con Soxhlet y maceración en frío.

Extracción con Soxhlet:

En un equipo Soxhlet se colocaron 132 g de material vegetal desengrasado y se usó como solvente diclorometano (Djilani, Legseir, Soulimani, & Dicko, 2006). El solvente se dejó en reflujo durante 7 días, se rotaevaporó y se hizo una extracción líquido-líquido con diclorometano y HCl al 5%. La fase acuosa se basificó con NH_4OH hasta obtener un $\text{pH} \geq 8$ y nuevamente se hizo una extracción líquido-

líquido usando diclorometano. La fase orgánica se secó, filtró y rotaevaporó, produciendo 0.1158 g del extracto ET-DCM. Porcentaje de rendimiento: 0.129%

Maceración en frío:

En un frasco de boca ancha se colocaron 132 g del material vegetal desengrasado en contacto con etanol durante 7 días y después de rotaevaporar el solvente, se obtuvo el extracto etanólico al que se le realizó el tratamiento ácido-base descrito anteriormente. Finalmente se consiguieron 0.3891 g (0.294% de rendimiento) del extracto total de alcaloides ET-EtOH.

Los dos extractos obtenidos, ET-DCM y ET-EtOH, fueron analizados por CG-EM y en el extracto ET-EtOH además de alcaloides se encontraron otros metabolitos secundarios no alcaloidales, lo que dificultó la purificación. Por este motivo se decidió escoger como metodología de extracción el Soxhlet con diclorometano como solvente, que resultó ser más selectivo.

4.3. Extracción, separación y purificación de los alcaloides mayoritarios

Una vez seleccionado el método de extracción más conveniente (Soxhlet con diclorometano), se obtuvo nuevamente un extracto total alcaloidal (ET-DCM) a partir de 844 g de material vegetal, el cual fue analizado en un CG-EM con las siguientes especificaciones:

Agilent Technologies 6850 series II, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD5975B, con puerto de inyección split/splitless (260 °C, relación de split 15:1), y un inyector automático Agilent 6850 series. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida, HP-5MS 5% fenilmetilsiloxano de 30 m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 µm (df). La programación de temperatura del horno fue de 80 °C (1 min), luego se incrementó hasta 320°C (2min) a 10°C/min. Gas de arrastre helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1 mL/min.

El reconocimiento de los compuestos presentes se realizó con base en la comparación de espectros de masas adquiridos, con los reportados en las bases de datos NIST05a.L y Willey7.

El extracto ET-DCM se fraccionó en una columna con 10 g de sílica gel (130 – 210 mesh) desactivada con 1 mL de agua, empleando 200 mL de cada uno de los siguientes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol.

Después de rotaevaporar el solvente, se obtuvieron cuatro fracciones (F-HEX, F-DCM, F-AcOEt y F-MeOH). Las fracciones F-AcOEt (642.7 mg) y F-MeOH (232.5 mg) contenían en su mayoría alcaloides.

Tanto la fracción F-AcOEt como F-MeOH fueron evaluadas contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp*, *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani*.

La fracción F-AcOEt se separó mediante cromatografía de columna utilizando 30 g de sílica gel (130 – 210 mesh) y como fase móvil hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Se obtuvieron 3 fracciones etiquetadas como F-AcOEt-1 (173.4 mg), F-AcOEt-2 (207.8 mg) y F-AcOEt-3 (5 mg).

4.4. Identificación de los alcaloides presentes en las fracciones F-AcOEt-1, F-AcOEt-2 y F-AcOEt-3.

Las fracciones F-AcOEt-1, F-AcOEt-2 y F-AcOEt-3 se analizaron mediante las técnicas: espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear en un equipo Bruker Avance III, de 300 MHz empleando CDCl₃ como solvente. Mediante estas técnicas se estableció su identidad (oliverolina, 12-O-metil-N-metilcoclaurina y liriodenina respectivamente).

4.5. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto total ET-DCM, las fracciones F-AcOEt, F-MeOH y la 12-O-metil-N-metilcoclaurina.

La actividad antifúngica se evaluó mediante la técnica de inhibición de crecimiento radial. Para esto los hongos se sembraron en agar PDA y se incubaron a 25°C durante 5 días, después de este tiempo se tomó una muestra de aproximadamente 4 mm de diámetro; de forma paralela se preparó una solución stock de 27 mg/mL de cada mezcla a evaluar (ET-DCM, F-MeOH, F-AcOEt y 12-O-metil-N-metilcoclaurina) y a partir de ésta se hicieron diluciones de 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL y 15 mg/mL en dimetilsulfóxido. Luego se colocaron 75 µL de cada una de las soluciones incluida la de 27 mg/mL en agar PDA, por lo tanto las cantidades de las sustancias evaluadas fueron: 0.075, 0.375, 0.75, 1.125 y 2.025 mg.

Posteriormente las cajas de Petri se llevaron a refrigeración a 4°C por 24 horas para permitir la difusión del compuesto sobre el agar, luego se inocularon las cajas con discos de agar con los hongos previamente crecidos y se incubaron a 25°C evaluando cada 24 horas el crecimiento del hongo; el tratamiento se evaluó hasta que el crecimiento radial en el control negativo igualó el diámetro de la caja de Petri; el porcentaje de inhibición micelial se determinó comparando el tamaño de la colonia con el extracto y la del control negativo (éste último se realizó colocando el disco de agar en PDA), y el porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición micelial} = \frac{\text{crecimiento del micelio (control)} - \text{crecimiento del micelio (tratamiento)}}{\text{crecimiento del micelio (control)}} \times 100$$

Se realizó un control positivo usando terbinafina con un stock de 2 mg/mL en agua y colocando 75 µL en cada caja, quedando la cantidad final en 0.15 mg para los hongos *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria sp.* y para *Rhizoctonia solanise* utilizaron 0.15 mg de nistatina, ya que este hongo es resistente a la terbinafina.

4.6. Modificación química de los alcaloides mayoritarios

4.6.1. Oxidación de la oliverolina (síntesis de 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona):

En un balón de fondo redondo de 10 mL flameado con boca esmerilada, se pusieron 57.6 mg de oliverolina. Luego se adicionaron 84.6 mg de PCC con 60 mg de alúmina ácida pulverizados (Tojo & Fernández, 2006) y se inyectó 1 mL de acetonitrilo. La mezcla se agitó durante 8 días a temperatura ambiente y el avance de la reacción se monitoreo por CG-EM.

4.6.2. Síntesis del éter de oxima 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona O-bencil-oxima

Se pusieron 20.4 mg de la cetona proveniente de la oxidación de la oliverolina con 1 gota de piridina y 0.5 mL de metanol en un balón de reacción de 10 mL con boca esmerilada, flameado previamente, y por último se adicionaron 16 mg de clorhidrato de O-bencilhidroxilamina. La mezcla se dejó en reflujo por 1 día. El avance de la reacción se monitoreo por CG-EM.

4.6.3. O-Alquilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2-bromobencilo (síntesis de 7-(2-bromobenciloxi)-6-metoxi-1-(4-metoxibencil)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina)

En un balón de reacción de 10 mL flameado y bajo argón, se agregaron 17 mg de ter-butóxido de potasio con 0.5 mL de THF seco, luego se disolvieron 40 mg de 12-O-metil-N-metilcoclaurina en 0.3 mL de THF seco y se dejaron en contacto con el ter-butóxido de potasio por 5 minutos. Para finalizar se disolvieron 38.1 mg de bromuro de 2-bromobencilo en 0.2 mL de THF y se inyectaron en el balón. La mezcla se agitó por 1 día a temperatura ambiente y bajo atmosfera de argón. El avance de la reacción se monitoreo por CG-EM

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estudio preliminar: marcha fitoquímica

Se hizo la marcha fitoquímica con el extracto etanólico que resultó del reflujo por 2 horas, con el fin de establecer la presencia de los metabolitos presentes en dicho extracto y confirmar la presencia de alcaloides en la planta. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 2. Resultados marcha fitoquímica con el extracto etanólico

Ensayo	Fracción	Resultado	Descripción	Foto
Ninhidrina para aminoácidos	A	+	Se formó un anillo de color púrpura en el papel filtro.	
Flavonoides	Filtrado acuoso caliente A	+	La solución se tornó naranja.	
Leucoantocianinas	Filtrado acuoso caliente A	+	Se obtuvo una coloración carmesí oscura en la fase amilica.	
Compuestos fenólicos	Filtrado acuoso frío A	+	La solución se tornó de color verde oscuro.	
Taninos	Filtrado acuoso frío A	-	No hubo formación de colores o precipitados verdes, azules o	

			negros.	
Triterpenoides	Filtrado, fracción B	+	La solución se tornó verde esmeralda.	
Cardiotónicos	Filtrado, fracción B	-	No aparecieron coloraciones violetas o púrpuras.	
Quinonas	Filtrado, fracción B	-	No se formó coloración rosada o roja intensa en la capa acuosa.	
Flavonoides	Filtrado, fracción B	-	No hubo formación de colores naranja, rosado, rojo o violeta.	
Cardiotónicos	Filtrado, fracción C	-	No hubo aparición de coloraciones violetas o púrpuras.	
Triterpenoides	Filtrado, fracción C	-	No se formaron colores azules, violetas, rojos o verdes.	
Alcaloides	Filtrado, fracción C (acidificada)	+	Dragendorff: La prueba dio un precipitado color naranja.	
		+	Mayer: La prueba generó un precipitado de color blanco-crema.	

		+	Wagner: La prueba produjo una coloración café oscura.	
Flavonoides	Fracción D1	+	La solución tomó una coloración rosada, según la guía la coloración debe ser violeta, sin embargo se debe tener en cuenta que la concentración de los compuestos puede ser baja por lo que varía el color.	
Cardiotónicos	Fracción D1	-	No hubo formación de colores azules, violetas, rojos o verdes.	
Leucoantocianinas	Fracción D1	+	Se obtuvo una coloración carmesí oscura en la fase amilica.	
Triterpenoides	Fracción D2	-	No se formaron colores azules, violetas, rojos o verdes.	
Alcaloides	Fracción D2	-	Dragendorff: No hubo formación de un precipitado naranja.	
		-	Mayer: No hubo formación de un precipitado blanco-crema.	
		-	Wagner: No hubo formación de un precipitado café oscuro.	
Flavonoides	Fracción	-	No hubo formación de	

	E		colores naranja, rosado, rojo o violeta.	
Leucoantocianinas	Fracción E	–	No hubo aparición de coloraciones rojas	
Compuestos fenólicos	Fracción E	–	No hubo aparición de coloraciones violeta, verdes, azules u oscuras	
Taninos	Fracción E	–	No hubo formación de colores o precipitados verdes, azules o negros.	

A partir de la marcha fitoquímica se estableció que las hojas de la *S. sessiliflora* tienen los siguientes metabolitos secundarios:

Flavonoides, leucoantocianinas, compuestos fenólicos, alcaloides, triterpenoides y/o esteroides. Además se puede afirmar que no contiene taninos, cardiotónicos y quinonas.

5.2. Elección del método de extracción mediante comparación de dos metodologías:

Una vez realizada la marcha fitoquímica y confirmada la presencia de alcaloides, se procedió a hacer un desengrasado que tenía como fin eliminar los metabolitos de baja polaridad y de esta manera facilitar la purificación de alcaloides. Se obtuvieron 5.41 g (1.35%) del extracto total ET-EP al cual se le hizo prueba de Dragendorff, la cual fue negativa. Además se analizó por CG-EM mostrando que contenía 47 compuestos en total, entre los que se encontraron mayoritariamente:

- γ -tocoferol
- vitamina E
- estigmasterol
- 22,23-dihidroestigmasterol

Posterior al desengrase se hizo la extracción usando dos metodologías con el fin de escoger la mejor:

Extracción por Soxhlet con diclorometano: A partir de 132 g de las hojas secas se obtuvo 0.1158 g (0.129%) del extracto ET-DCM.

Extracción por maceración en frío con etanol: A partir de 132 g de las hojas secas se obtuvo 0.3891 g (0.294%) del extracto etanólico ET-EtOH.

Tanto al extracto ET-DCM como a ET-EtOH se les hizo las pruebas químicas de Dragendorff, Mayer y Wagner, las cuales dieron positivas. Así mismo se

analizaron mediante CG-EM y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Alcaloides identificados en los extractos ET-DCM y ET-EtOH mediante CG-EM, por comparación con la base de datos NIST05a.L., con porcentajes de coincidencia superiores al 80%

Nombre	ET-DCM	ET-EtOH
1-Bencil-6-metoxi-3,4-dihidroisoquinolin-7-ol	X	
Corlumina	X	X
Oliverolina	X	X
Coridina	X	X
Isoboldina	X	X
Boldina	X	
Liriodenina	X	X
N-metilcoridaldina		X
Norisoboldina		X

A partir de los compuestos presentados en la tabla se puede decir que ambos procedimientos extraen los mismos alcaloides a diferencia de dos o tres. A pesar de que el mejor rendimiento de extracción lo da la maceración en frío, no se alcanzan el rendimiento del 3.9 % reportado por algunos autores (Huallpara, 2005).

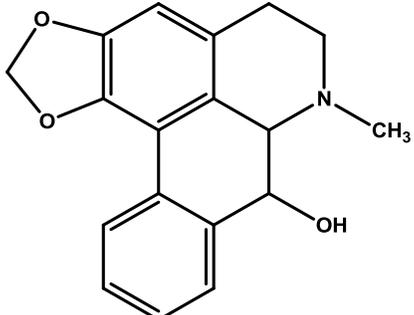
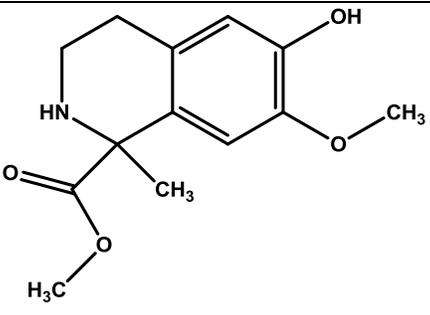
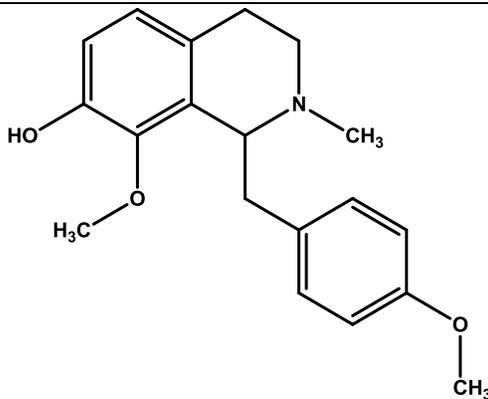
Es importante aclarar que en el extracto ET-EtOH, además de los alcaloides citados en la tabla 3, se detectó un total de 220 compuestos, lo cual hizo imposible la separación de los alcaloides mediante cromatografía de columna. Por otra parte, en el extracto ET-DCM se detectaron 57 compuestos en total. Este factor fue determinante a la hora de seleccionar el método de extracción más conveniente ya que la extracción con diclorometano fue más selectiva.

5.3. Extracción, identificación, separación y purificación de los alcaloides mayoritarios

Debido a los resultados anteriormente discutidos, se decidió realizar una extracción por Soxhlet y como solvente diclorometano a partir de 844 g de hoja seca y molida, para lo cual se hizo previamente un desengrasado del material vegetal. De esta manera se obtuvo un extracto total alcaloidal (ET-DCM) de 1.047 g con un rendimiento de extracción del 0.124%.

Una muestra de dicho extracto total se analizó por CG-EM y se pudo establecer que los alcaloides mayoritarios son los mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Alcaloides mayoritarios presentes en el extracto total ET-DCM identificados por CG-EM

Nombre	Área (%)	Coincidencia (%)	Estructura
Oliverolina	25	98	
6-hidroxi-7-metoxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-metilcarboxilato	18	74	
7-Hidroxi-8-metoxi-2-metil-1-(4'-metoxibencil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina	15	80	

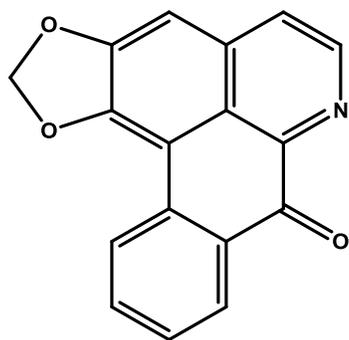
Compuestos identificados por comparación con la base de datos NIST05a.L.

También se identificaron los siguientes alcaloides con un área menor al 1% y coincidencia mayor de 90% comparados con la base de datos NIST05a.L.:

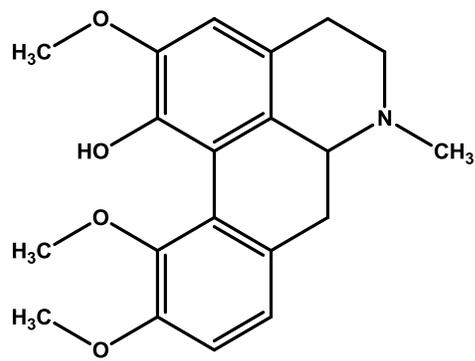
Nornuciferina, liriodenina, coridina, nantenina, boldina, Isoboldina, 1-Bencil-6-metoxi-3,4-dihidroisoquinolin-7-ol, 3,4-dihidro-7-hidroxi-6-metoxi-2-metil-1(2H)-

Isoquinolinona, corlumina, N-metillaurotetanina, 1-[(2-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-6-metoxi-Isoquinolina, 6-O-metilpapaverolina, 5,8,13,13a-tetrahidro-3,9-dimetoxi-6H-Dibenzo[a,g]quinolizina-2,10-diol, estefolidina, ajmalina y 3,4-dihidro-4-metil-3-(fenilmetileno) 1H-1,4-Benzodiazepin-2,5-diona.

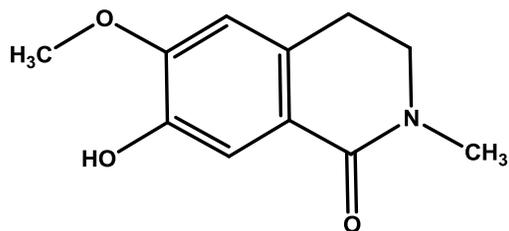
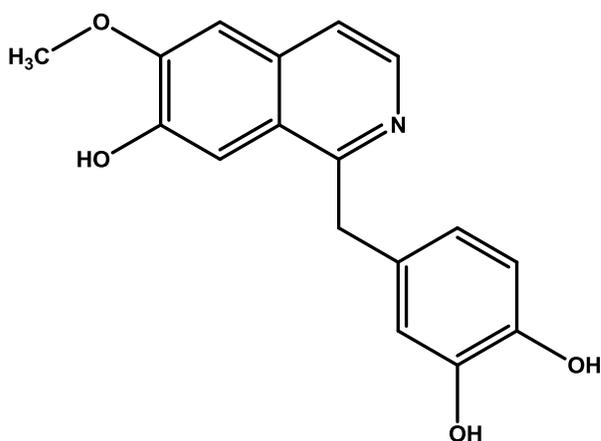
A continuación se muestra la estructura de algunos de los alcaloides minoritarios encontrados:



Liriodenina



Coridina



3,4-dihidro-7-hidroxi-6-metoxi-2-metil-1(2H)-Isoquinolinona

6-O-metilpapaverolina

Luego de esto, el extracto total alcaloidal fue fraccionado con sílica gel, obteniendo 4 fracciones, cuya masa y resultados del análisis por CG-EM se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Resultados análisis mediante CG-EM y masa de las fracciones obtenidas a partir del extracto ET-DCM

Fracción	Masa (mg)	Compuestos identificados*
F-HEX (hexano)	13.5	Un alcaloide no reconocido (Pico base m/z 192 que probablemente corresponde a un

		alcaloide con núcleo isoquinolínico). Además el equipo reconoció 17 compuestos más entre los que se encuentra el nonadecano, eicosano y octadecano.
F-DCM (diclorometano)	25.5	Oliverolina, un alcaloide no reconocido (Pico base m/z 192 que probablemente corresponde a un alcaloide con núcleo isoquinolínico) y 3,4-dihidro-4-metil-3-(fenilmetileno) 1H-1,4-Benzodiazepin-2,5-diona.
F-AcOEt (acetato de etilo)	642.7	7-Hidroxi-8-metoxi-2-metil-1-(4'metoxibencil)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina, oliverolina, liriodenina, 6-metilreticulina.
F-MeOH (metanol)	232.5	Oliverolina, un alcaloide no reconocido (Pico base m/z 192 que probablemente corresponde a un alcaloide con núcleo isoquinolínico), apomorfina, 6-metilreticulina y 6-hidroxi-7-metoxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-metilcarboxilato.

*Compuestos identificados por comparación con la base de datos NIST05a.L.

La fracción F-AcOEt se separó por cromatografía de columna con sílica gel, empleando como fases móviles diclorometano, acetato de etilo y metanol. Como resultado se obtuvieron 173.4 mg de una fracción etiquetada como F-AcOEt-1, 207.8 mg de F-AcOEt-2 y 5 mg de F-AcOEt-3. Estas tres fracciones fueron analizadas por CG-EM, y fueron reconocidos por la base de datos como oliverolina, 7-Hidroxi-8-metoxi-2-metil-1-(4'metoxibencil)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina y liriodenina respectivamente con porcentajes de coincidencia superiores al 80 %. Así mismo, estas tres fracciones fueron analizadas por RMN. Los resultados se discuten a continuación.

5.4. Identificación de los alcaloides presentes en las fracciones F-AcOEt-1, F-AcOEt-2 y F-AcOEt-3

5.4.1. Análisis por CG-EM

- **F-AcOEt-1:** t_R : 25.179 minutos. IE-EM m/z 295 $[M]^+$, pico base m/z 295, reconocido como Oliverolina con un porcentaje de coincidencia de 95 %
- **F-AcOEt-2:** t_R : 23.118 minutos. IE-EM m/z 312 $[M]^+$, pico base m/z 192, reconocido como 7-Hidroxi-8-metoxi-2-metil-1-(4'metoxibencil)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina con un porcentaje de coincidencia de 80 %.

- **F-AcOEt-3**:t_R: 30.971 minutos. IE-EM m/z 275 [M]⁺, pico base m/z 275 reconocido como Liriodenina con un porcentaje de coincidencia de 99 %.

5.4.2. Análisis por RMN

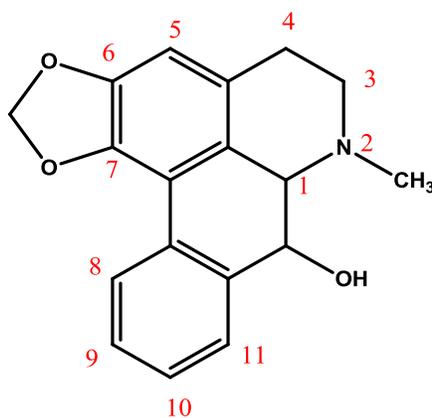
Las fracciones F-AcOEt-1, F-AcOEt-2 y F-AcOEt-3 fueron analizadas por RMN, los resultados se muestran a continuación:

IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE OLIVEROLINA

- **F-AcOEt-1** (Oliverolina): ¹HRMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 2.66 (3H, s, N-CH₃), 2.71-2.81(1H, m, H-4a), 2.71-2.81(1H, m, H-3a), 3.11-3.2 (1H, m, H-4b), 3.11-3.2 (1H, m, H-3b), 3.37 (1H, s, H-1), 4.95 (1H, dd, H-1a), 5.98 (1H, dd, OCH₂O), 6.13 (1H, dd, OCH₂O), 6.58 (1H, s, H-5), 7.3-7.35 (1H, m, H-10), 7.43-7.48 (2H, m, H-9 y H-11), 8.15-8.18 (1H, m, H-8). ¹³CRMN (300 MHz, CDCl₃):28.9 (C-4), 53.3 (C-3), 62.2 (C-1a), 67.0 (C-1),101.2 (OCH₂O),107.76 (C-5), 127.4 (C-8).

Para confirmar que el compuesto etiquetado como F-AcOEt-1 correspondía a la oliverolina, se comparó con los datos reportados por Brastianos en 2007 (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de algunos δ H de la oliverolina reportados por (Brastianos, 2007) con los δ H de F-AcOEt-1



Señal	δ H F-AcOEt-1 (300 MHz, CDCl ₃)	δ H oliverolina (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)
H-1a	4.94	4.92
OCH ₂ O	5.96 y 6.11	6.06 y 6.24
H-9	7.45	7.43
H-10	7.45	7.43
H-8	8.15	8.00

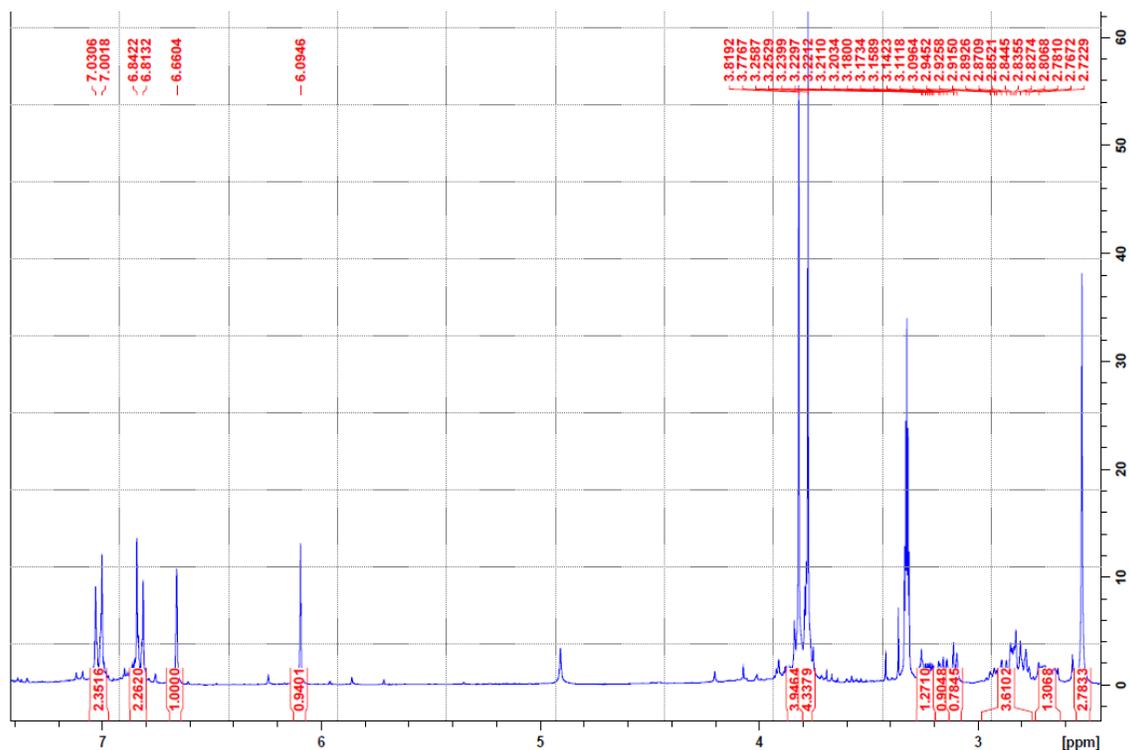
El grupo metilendioxi (OCH₂O) genera dos señales debido a que sus hidrógenos tienen ambientes químicos diferentes. Esto también pasa en los hidrógenos 3 y 4. El H-5 genera como señal un singlete ya que no tiene hidrógenos vecinos con quien acoplar. Así mismo el espectro HSQC muestra correlaciones entre el H-3 y el C-3, el H-4 con el C-4, el H-5 con el C-5 y el H-8 con el C-8. Además, comparando las señales del compuesto F-AcOEt-1 aislado de las hojas de *Siparuna sessiliflora* con los desplazamientos reportados en la literatura para la oliverolina, se puede confirmar que concuerdan satisfactoriamente.

IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE 7-Hidroxi-8-metoxi-2-metil-1-(4'metoxibencil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina

- **F-AcOEt-2:** ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ): 2.50 (3H, s, N-CH₃), 2.76-2.78 (1H, m, H-4a), 2.78-2.8 (1H, m, H-3a), 2.80-2.84 (1H, m, H-1a-a), 2.90-2.92 (1H, m, H-4b), 3.08-3.12 (1H, m, H-1a-b), 3.2-3.24 (1H, m, H-3b), 3.75-3.77 (1H, m, H-1), 3.78 (3H, s, O-CH₃), 3.82 (3H, s, O-CH₃), 6.09 (1H, s, H-8), 6.66 (1H, s, H-5), 6.81-6.84 (2H, m, H-3' y H-5'), 7.0-7.03 (2H, m, H-2' y H-6'). ¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃, δ, J/Hz): 24.34 (C-4), 39.0 (C-1a), 40.9 (N-CH₃), 46.05 (C-3), 54.19 (O-CH₃), 54.87 (O-CH₃), 64.5 (C-1), 111.11 (C-5), 113.31 (C-3'), 114.29 (C-8), 128.30 (C-1'), 128.32 (C-8a), 130.23 (C-2'), 130.80 (C-4a), 143.7 (C-6), 146.6 (C-7), 158.28 (C-4').

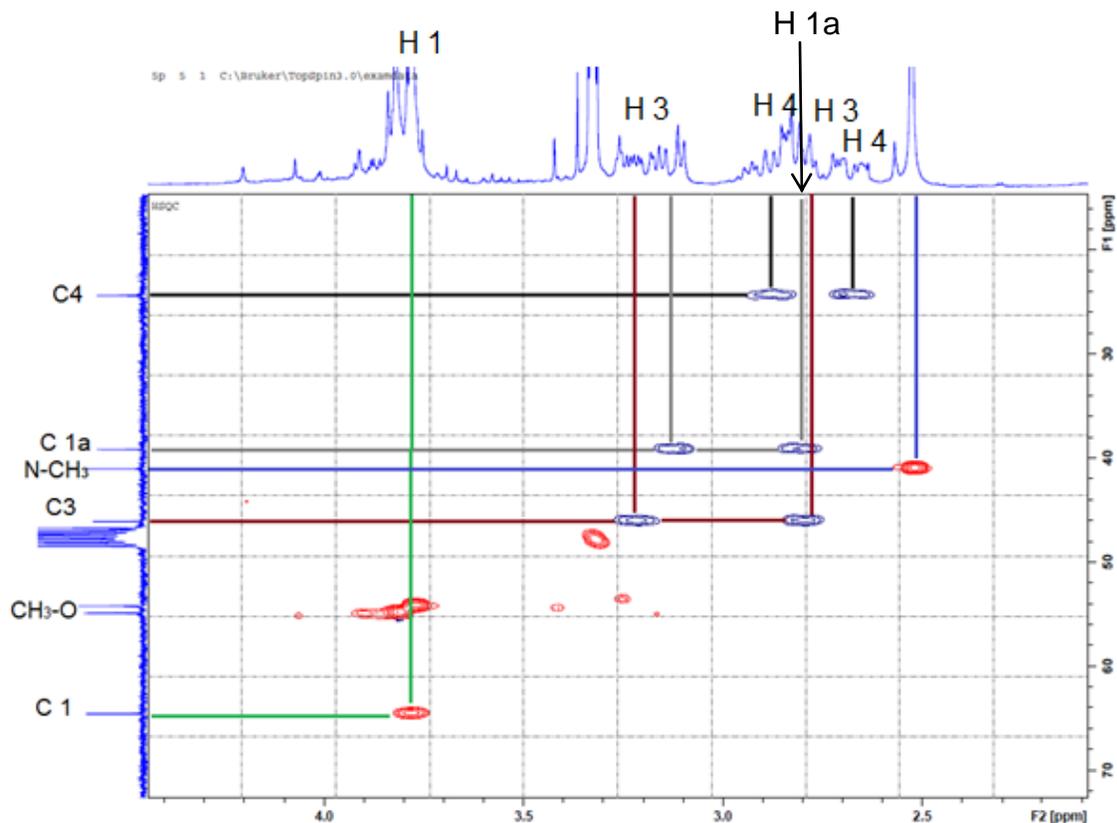
En este punto es importante aclarar que la estructura propuesta por la base de datos del espectrómetro de masas (7-Hidroxi-8-metoxi-2-metil-1-(4'metoxibencil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina), no coincide con la estructura elucidada mediante RMN. En la figura 4 se muestra el espectro de RMN de dicha fracción y a continuación se hace una discusión del mismo.

Figura 4. Espectro RMN-¹H de la de la fracción F-AcOEt-2 (300 MHz, CD₃OD)



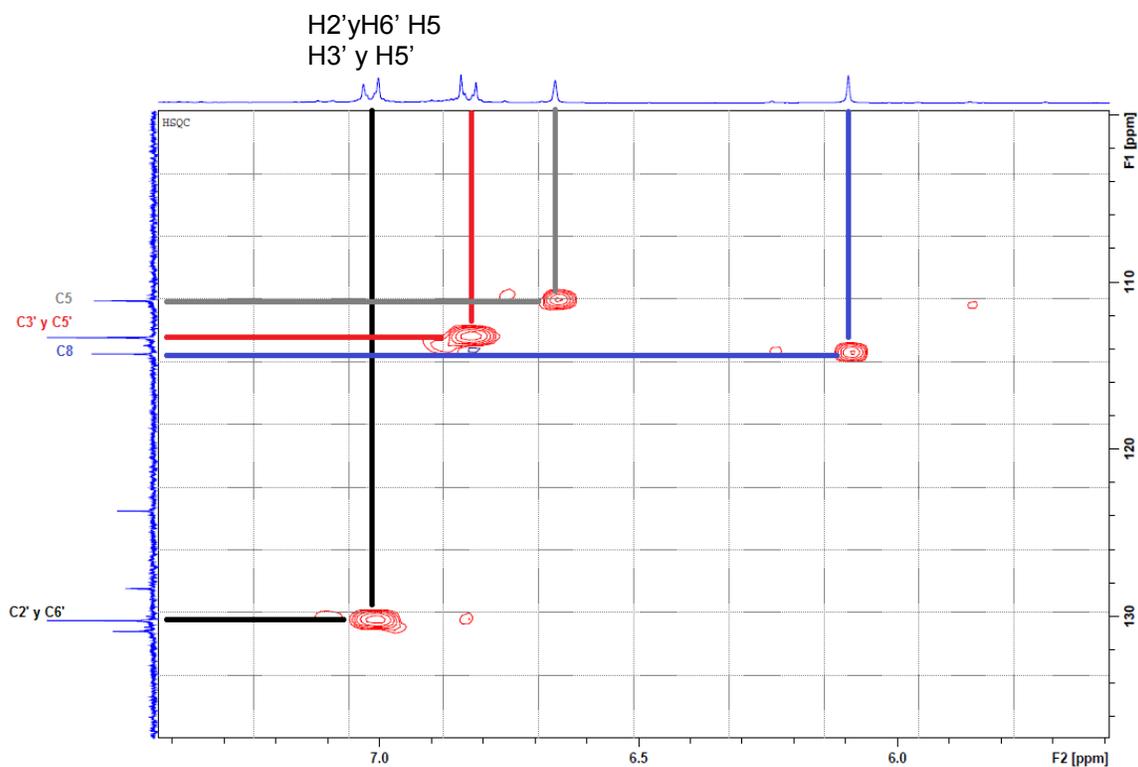
A partir del espectro, se puede ver que en la zona aromática se presentan dos señales singletes, uno con δ de 6.09 (H-8) y el otro con δ de 6.66 (H-5) y que deberían de dar acoplamiento para los dos hidrógenos si estuvieran juntos según la estructura reportada por la base de datos del equipo CG-EM (7-Hidroxi-8-metoxi-2-metil-1-(4'-metoxibencil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina tabla 4). Para confirmar lo anterior se tomaron espectros bidimensionales. A continuación se muestran ampliaciones del espectro HSQC (Figuras 5 y 6).

Figura 5. Ampliación de la zona alifática del espectro HSQC de la fracción F-AcOEt-2

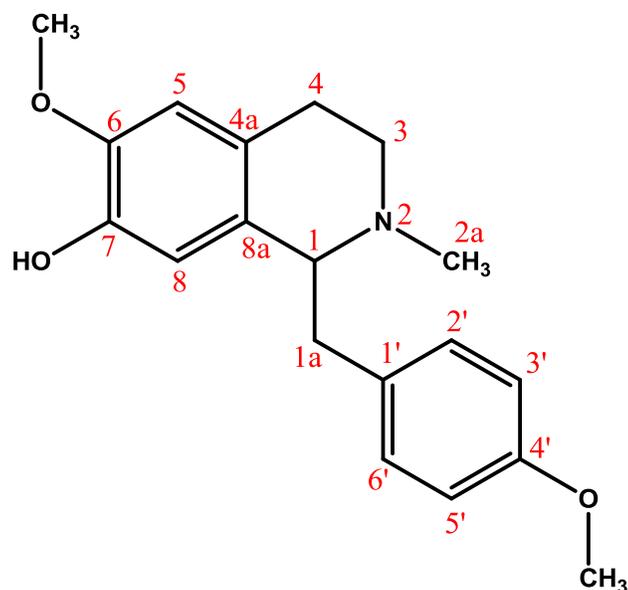


A partir de la correlaciones se pudo establecer los desplazamientos para los hidrógenos de la zona alifática. La pareja de hidrógenos H-1a, es diastereotópica por encontrarse alfa a un centro quiral. Así mismo, cada pareja de hidrógenos H-3 y H-4 muestran desplazamientos químicos distintos y cada pareja acopla con un solo átomo de carbono, tal como se puede ver en el espectro.

Figura 6. Ampliación de la zona aromática del espectro HSQC de la fracción F-AcOEt-2



En el anterior espectro se puede observar la correlación entre el C-5 con un singlete y el C-8 con otro singlete. A partir de esto se logró determinar que la posición del O-CH₃ de la isoquinolina no se encontraba en ninguno de estos dos carbonos sino en el carbono 6. Es así como se consiguió proponer la estructura para el compuesto obtenido que corresponde a la 12-O-metil-N-metilcoclaurina, cuya estructura se muestra a continuación.



12-O-metil-N-metilcoclaurina

Para confirmar la estructura del compuesto se comparó con los datos reportados en un artículo (Iturriaga V., 2001). La siguiente tabla muestra la comparación de señales de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina:

Tabla 7. Comparación de algunos δ H de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina reportados por Iturriaga V. en 2001 y F-AcOEt-2.

Señal	δ H F-AcOEt-2 (300 MHz, CD ₃ OD)	δ H 12-O-metil-N-metilcoclaurina (500 MHz, CDCl ₃)
N-CH ₃	2.50	2.58
O-CH ₃	3.78 y 3.82	3.81 y 3.82
H-4	2.76 y 2.92	2.60 y 2.86
H-1a	2.80 y 3.10	2.80 y 3.10
H-3	2.79 y 3.22	2.76 y 3.23
H-1	3.77	3.58
H-8	6.09	6.07
H-5	6.66	6.50
H-3' y 5'	6.81	6.82
H-2' y 6'	7.03	7.11

Al confrontar las señales del compuesto F-AcOEt-2 aislado de las hojas de *Siparuna sessiliflora* con las señales reportadas en la literatura se puede confirmar que concuerda satisfactoriamente con la 12-O-metil-N-metilcoclaurina y no la 7-

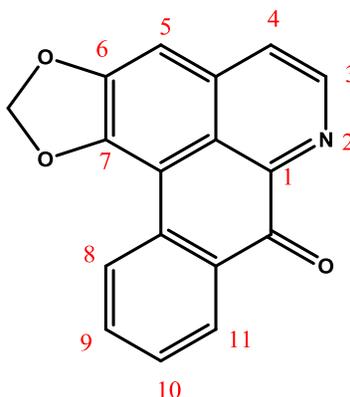
Hidroxi-8-metoxi-2-metil-1-(4'-metoxibencil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina como lo reportaba la base de datos del EM.

IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA DELIRIODENINA:

- **F-AcOEt-3** (Liriodenina): $^1\text{HRMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ): 6.39 (2H, s, OCH_2O), 7.20 (1H, s, H-5), 7.59 (1H, td, H-10), 7.74 (1H, td, H-9), 7.77 (1H, d, H-4), 8.60 (1H, dd, H-11), 8.64 (1H, dd, H-8), 8.89 (1H, d, H-3). $^{13}\text{CRMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 102.1 (OCH_2O), 103.1 (C-3), 124.1 (C-4), 127.18 (C-11), 128.4 (C-9), 128.7 (C-8), 133.7 (C-10), 144.7 (C-5).

Para confirmar la estructura del compuesto se comparó con los datos reportados en dos artículos para la liriodenina, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Comparación de algunos δ H de la liriodenina reportados por Wang et al. En 2010 y Pang et al. en 2007, con F-AcOEt-3



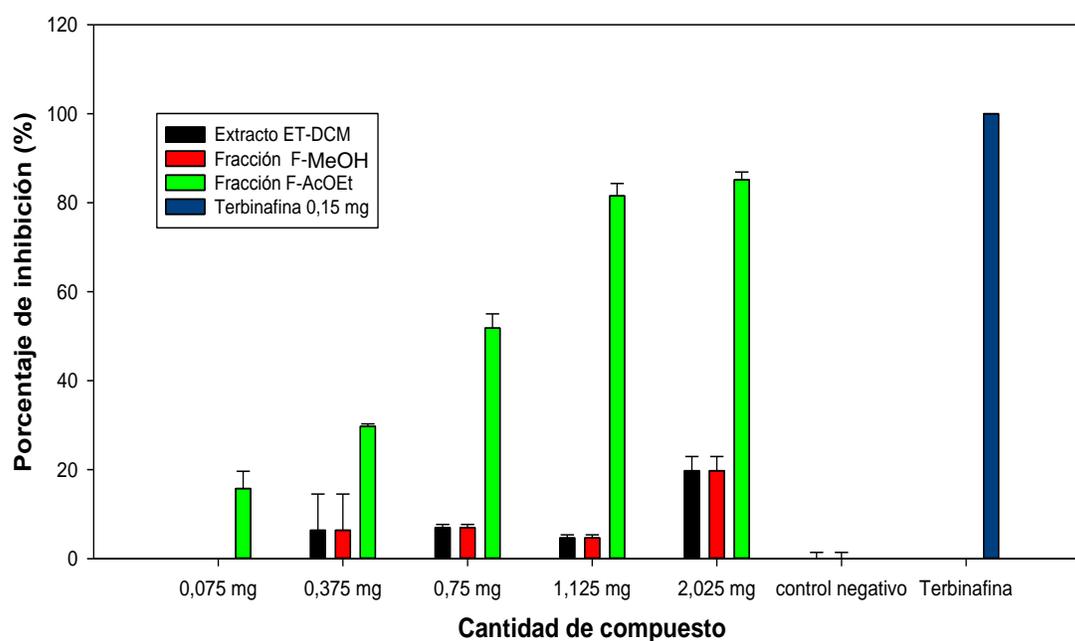
Señal	δ H F-AcOEt-3 (300 MHz, CDCl_3)	δ H liriodenina (400 MHz, CDCl_3) (Wang, Lo, Huang, Wang, & Chen, 2010)	δ H liriodenina (500 MHz, CD_3OD) (Pang, Wang, Huang, Zhang, & Qin, 2007)
OCH_2O	6.39	6.37	6.36
H-5	7.20	7.16	7.16
H-10	7.59	7.55	7.57
H-9	7.74	7.74	7.72
H-4	7.77	7.76	7.74
H-11	8.60	8.61	8.57
H-8	8.64	8.64	8.65
H-3	8.89	8.89	8.90

Así mismo en el espectro HSQC se observan correlaciones entre el H-3 con el C-3, H-5 y el C-5, los H del metilendioxi con su carbono y el H-8 con el C-8. Además, comparando las señales del compuesto F-AcOEt-3 aislado de las hojas de *Siparuna sessiliflora* con las señales reportadas en la literatura se puede confirmar que concuerda satisfactoriamente con la liriodenina.

5.5. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto total ET-DCM, las fracciones F-AcOEt, F-MeOH y la 12-O-metil-N-metilcoclaurina.

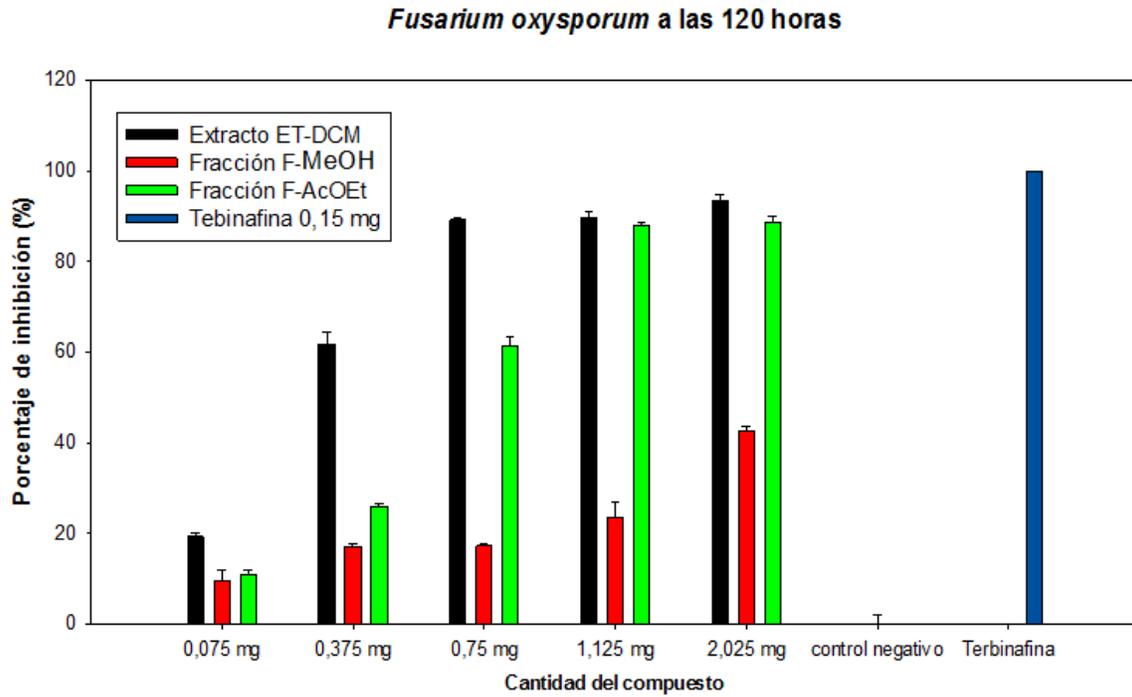
Las siguiente graficas muestran los resultados más relevantes obtenidos en la evaluación de la actividad antifúngica del extracto total alcaloidal ET-DCM, la fracción F-AcOEt y la fracción F-MeOH a diferentes cantidades de sustancia: 0.075, 0.375, 0.75, 1.125 y 2.025 mg. Como control positivo se usó Terbinafina y como control negativo dimetilsulfoxido (DMSO).

Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de *Aspergillus niger* a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.
***Aspergillus niger* a las 96 horas**



Como se puede observar en la gráfica, los porcentajes de inhibición más altos se dieron en la fracción F-AcOEt, cuyos compuestos principales eran la oliverolina y la 12-O-metil-N-metilcoclaurina. Así mismo la fracción F-MeOH no presentó inhibición relevante.

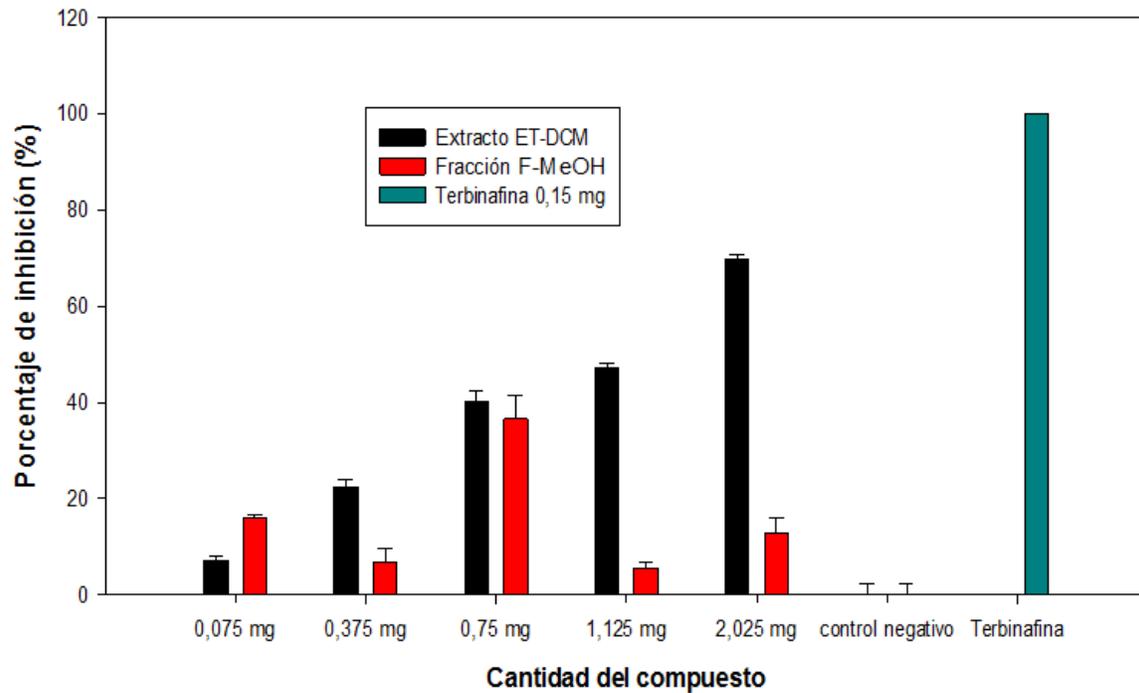
Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.



En la grafica se puede observar que tanto el extracto ET-DCM, como la fraccion F-AcOEt presentaron porcentajes de inhibicion parecidos. Esto probablemente se debe a que son los alcaloides mayoritarios los responsables de la actividad antifungica.

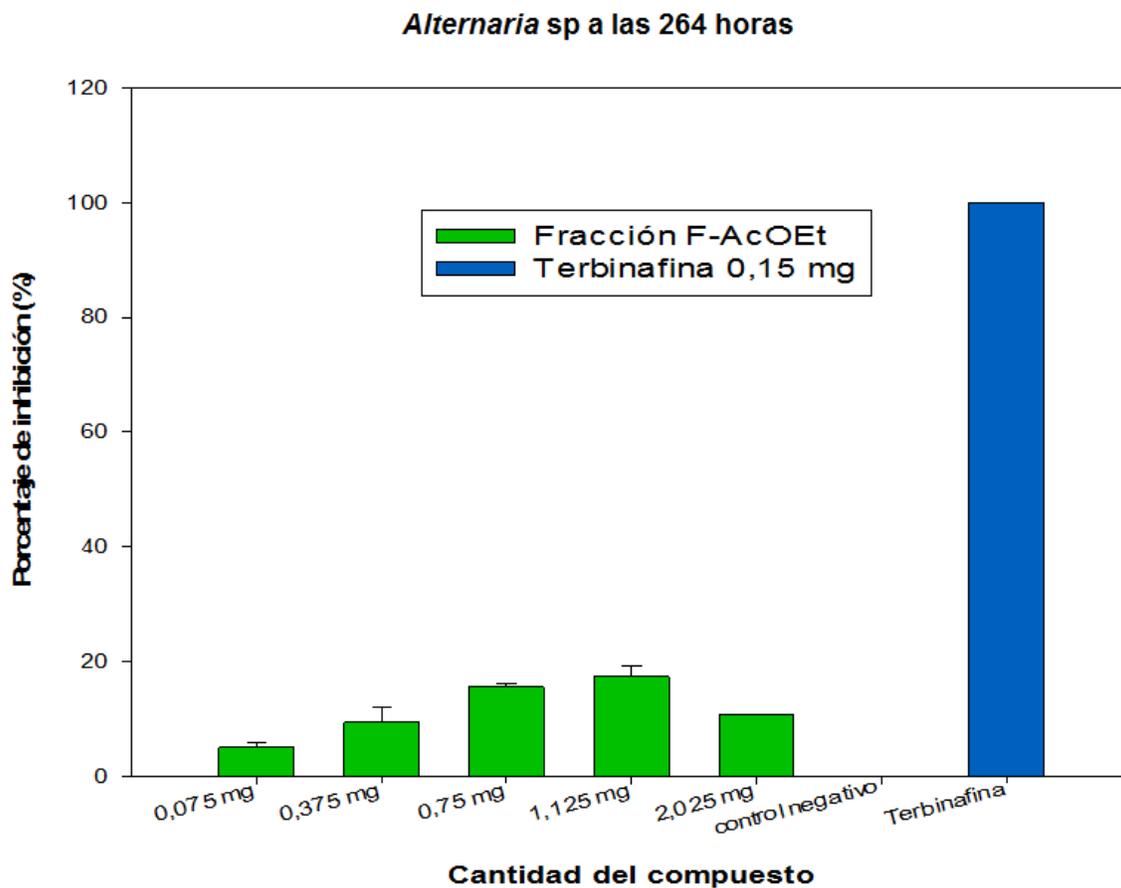
Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de *Alternaria sp* a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.

***Alternaria sp* 216 horas**



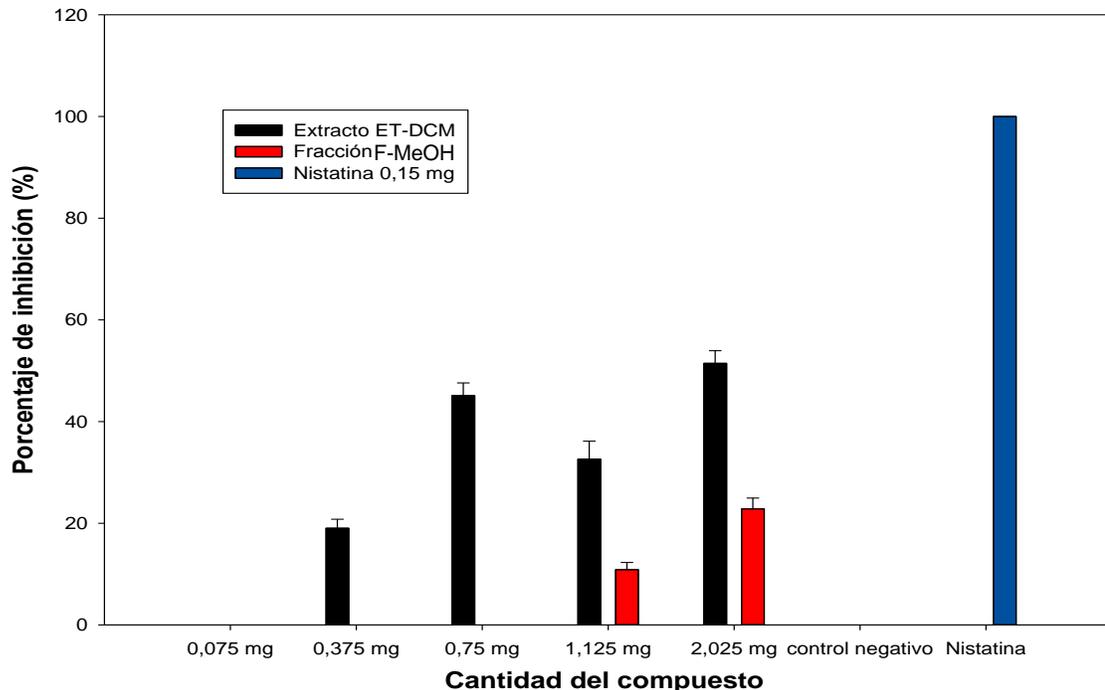
En la gráfica se puede observar como el extracto ET-DCM presenta inhibiciones más altas que la fracción F-MeOH. Comportamiento que se vio en las últimas gráficas.

Gráfica 4. Porcentaje de inhibición de *Alternaria sp* a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.



Gráfica 5. Porcentaje de inhibición de *Rhizoctonia solani* a diferentes cantidades de las sustancias analizadas.

***Rhizoctonia solani* a las 72 horas**



En las dos últimas graficas se puede observar que el porcentaje de inhibición es muy bajo, lo que indica la resistencia por parte del hongo hacia las sustancias evaluadas.

La fracción F-AcOEt mostró ser más activa contra *A. niger*, mientras que contra los otros tres hongos fue más activo el extracto ET-DCM. La otra fracción evaluada (F-MeOH) no presentó actividad relevante contra los cuatro hongos lo que confirma que probablemente son los alcaloides los responsables de la actividad antifúngica ya que esta fracción contiene menos alcaloides que la otra.

A pesar de que el mecanismo de acción que explica el efecto antimicrobiano de los alcaloides no está muy elucidado, algunos autores han descrito diferentes vías de acción, entre las que se encuentran que este tipo de metabolitos secundarios causan la lisis celular, en otros casos son considerados intercaladores del ADN y por último pueden llegar a inhibir la síntesis de ADN (Karou et al., 2005).

Para finalizar, se evaluaron 1.5 mg de 12-O-metil- N-metilcoclaurina contra *Alternaria* sp sin que se observara actividad inhibitoria relevante.

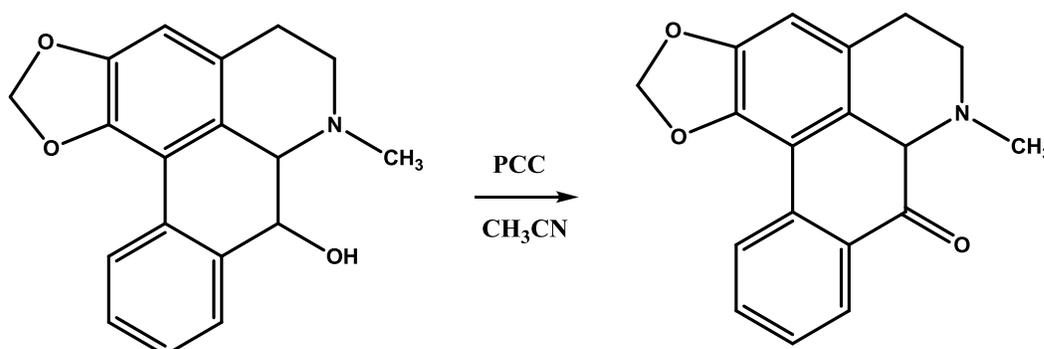
5.6. Modificación química de los alcaloides mayoritarios

Con el fin de confirmar la estructura de los alcaloides aislados, obtener nuevas sustancias y en un futuro (fuera de los alcances de este proyecto), evaluar su actividad antifúngica, se procedió a modificar la oliverolina y la 12-O-metil-N-metilcoclaurina.

5.6.1. Oxidación de la oliverolina:

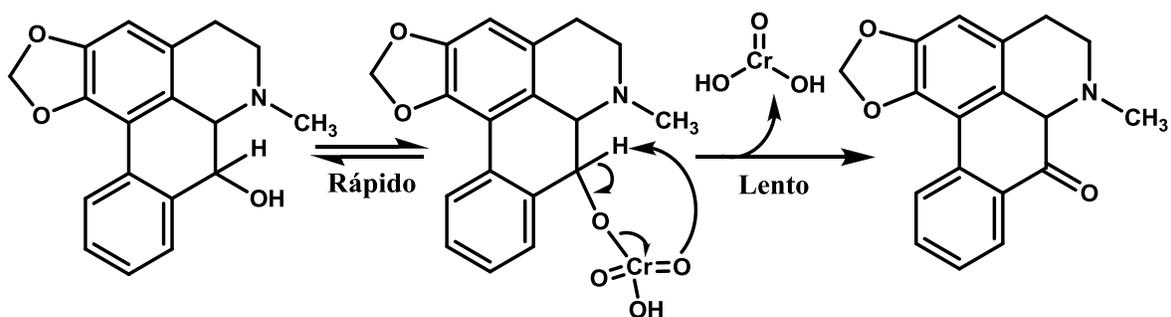
La primera modificación química fue la oxidación del alcohol secundario de la oliverolina, hasta la cetona 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona, empleando PCC como agente oxidante. Esta reacción se intentó con diclorometano pero la solubilidad del alcaloide no era buena por lo que se cambió el solvente por acetonitrilo (CH_3CN) el cual demostró ser el más apropiado. La figura 7 muestra la transformación efectuada:

Figura 7. Oxidación de la oliverolina



La velocidad está determinada por dos pasos, el primero es rápido y se da la formación de un intermediario éster cromato; en el segundo se genera la cetona, siendo este paso el determinante de la velocidad (figura 8) (Tojo & Fernández, 2006).

Figura 8. Mecanismo de oxidación de la oliverolina



Una muestra de la mezcla de reacción se analizó en el CG-EM en donde se obtuvieron los siguientes cromatogramas (Figuras 9-11):

Figura 9. Cromatograma de la mezcla de reacción de la oxidación de la oliverolina con PCC a los 2 días:

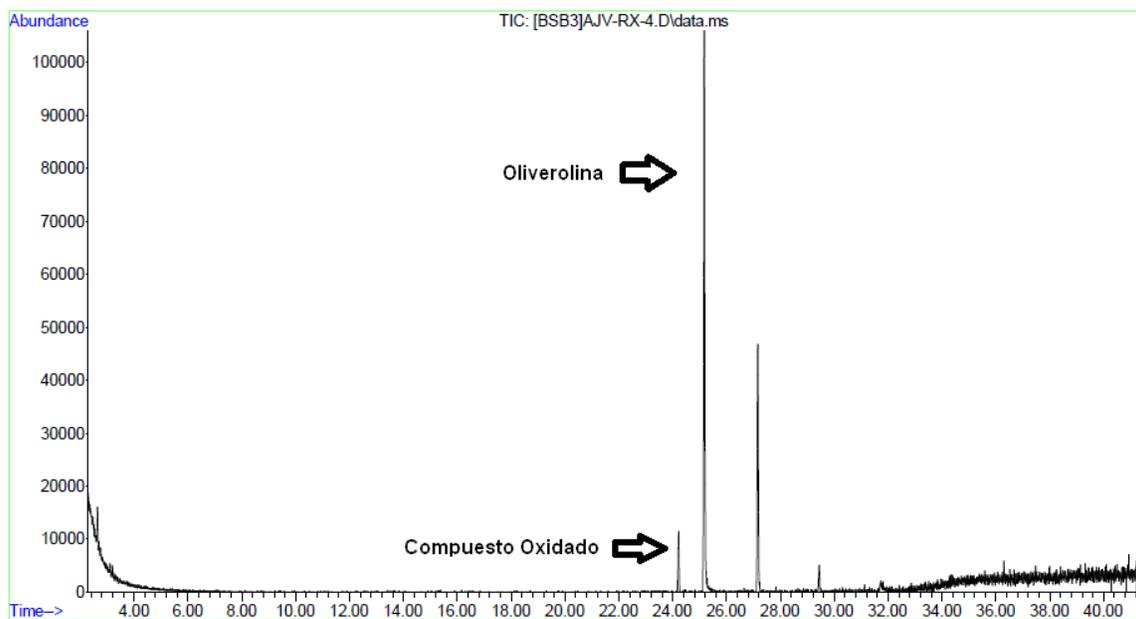


Figura 10. Cromatograma de la mezcla de reacción de la oxidación de la oliverolina con PCC a los 5 días:

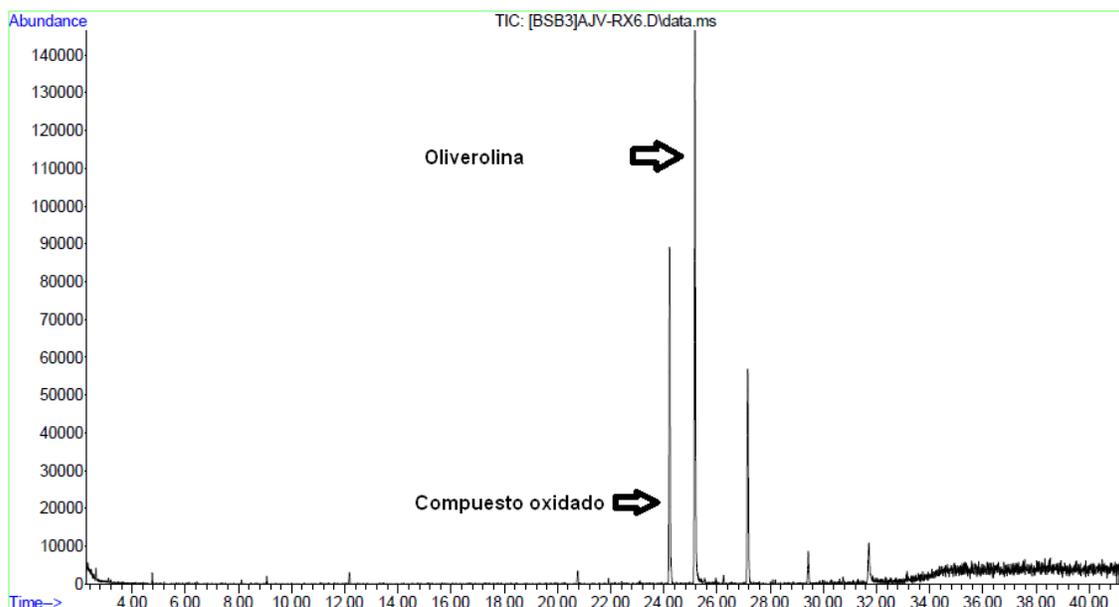
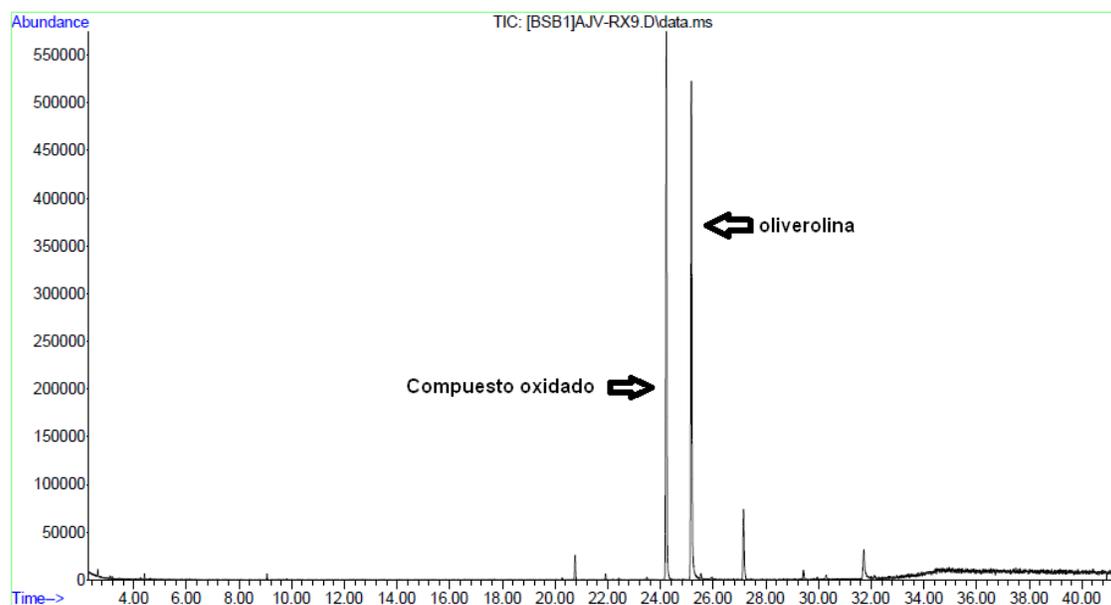


Figura 11. Cromatograma de la mezcla de reacción de la oxidación de la oliverolina con PCC a los 8 días:



A partir de los cromatogramas se puede afirmar que la reacción se estaba llevando a cabo, aunque muy lentamente, ya que con el paso del tiempo aumentaba la proporción de compuesto oxidado (tiempo de retención de 24.191 minutos) respecto a la oliverolina (tiempo de retención de 25.179 minutos).

El espectro de masas del producto oxidado de la reacción es el siguiente:

Figura 12. Espectro de masas del producto de oxidación de la oliverolina (tiempo de retención de 24.191 minutos)

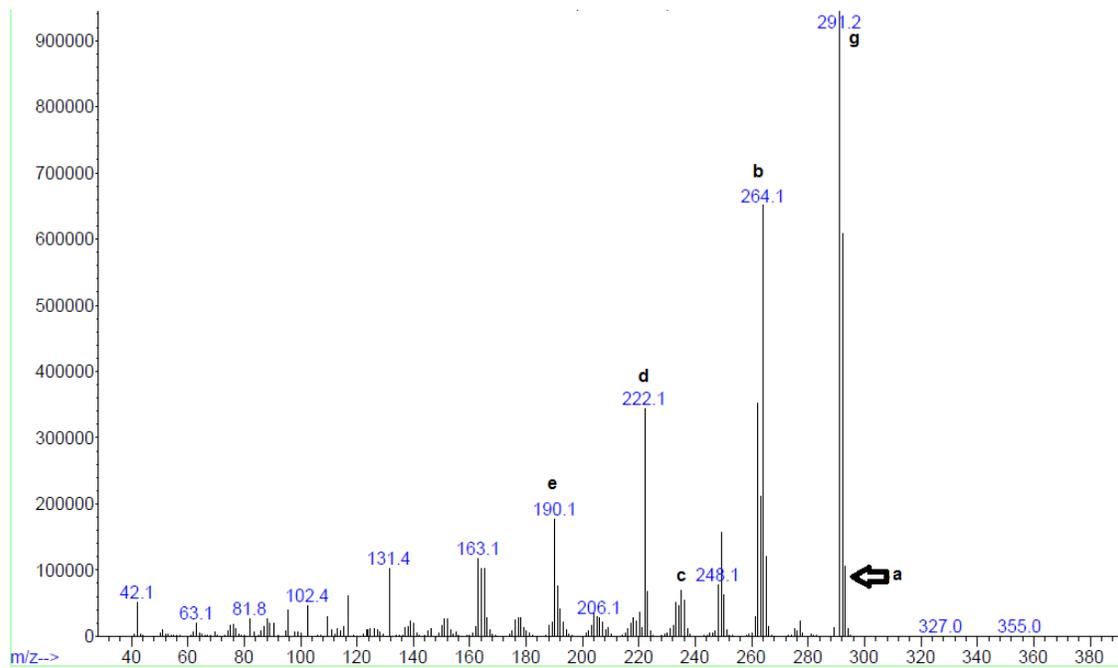
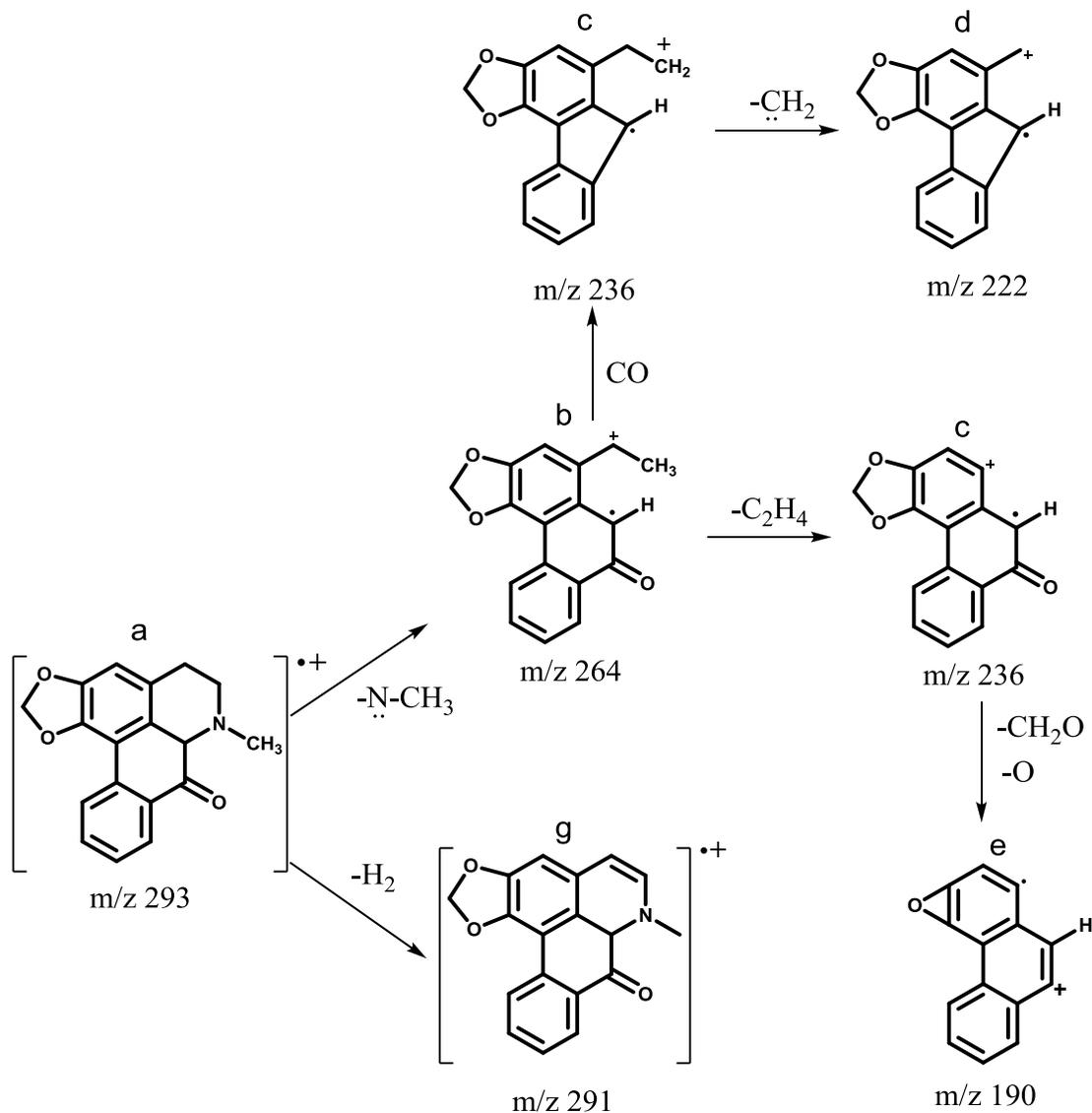


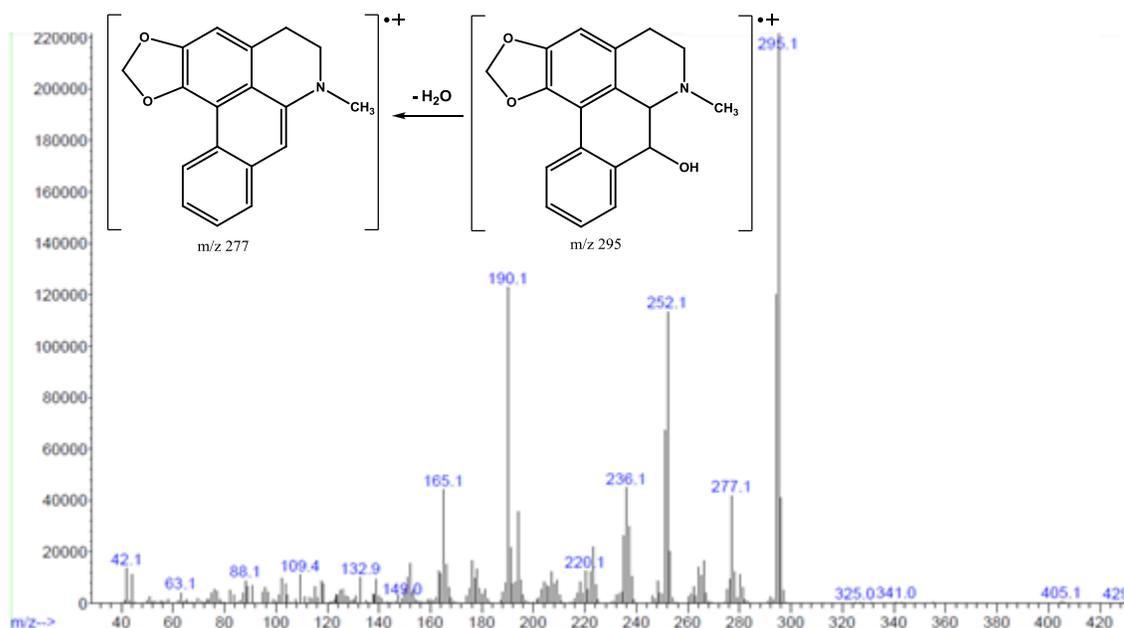
Figura 13. Ruta de fragmentación propuesta del producto de oxidación de la oliverolina



En el espectro de masas se puede ver como la pérdida del grupo N-CH₃ a partir del compuesto original, da un fragmento con m/z de 264, siendo característico para compuestos con nitrógeno terciario (Nikolić et al., 2012). Además la pérdida de una molécula de metanal seguido de un oxígeno genera un fragmento con m/z 190 que es consistente con la ruta de fragmentación propuesta.

A continuación se muestra el espectro de masas de la oliverolina para hacer una comparación entre ésta y el producto de oxidación.

Figura 14. Espectro de masas de la oliverolina obtenido por impacto electrónico



Al comparar los espectros de masas del producto de reacción (figura 12) y el de la oliverolina (figura 14) se ven muchas diferencias, entre las que se encuentran el ion molecular, el pico base y las más importante es la perdida de agua que es característica de los alcoholes; perdida que solo se da en el espectro de masas de la oliverolina.

Tabla 9. Comparación de los iones principales de la oliverolina y el producto de reacción.

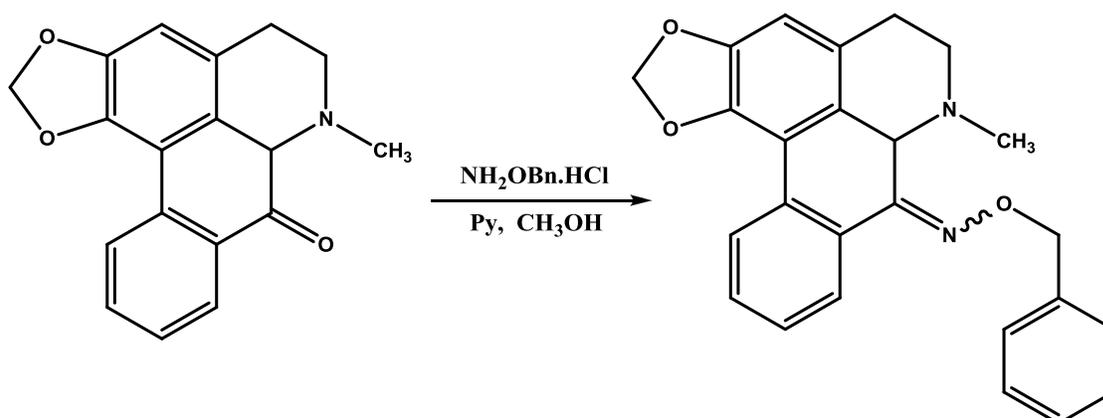
Ion	Oliverolina	Compuesto oxidado
[M] ⁺ m/z	295	293
Pico base m/z	295	291

Po último, se analizó el compuesto por RMN en donde el espectro de ¹H reveló la desaparición de la señal del H 1a con δ 4.94 (ver tabla 6 y anexo). El espectro de ¹³C muestra la aparición de una señal con δ 182.3 que corresponde al carbono carbonilo, característico de este tipo de cetonas y que aparece también en estructuras similares como la liriodenina (δ 182.4) (Guo et al., 2011) y la lisicamina (δ 182.5) (Ismail, Alias, Osman, & Mara, 2003) lo que confirma la estructura del compuesto.

5.6.2. Síntesis de la oxima 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona O-bencil-oxima

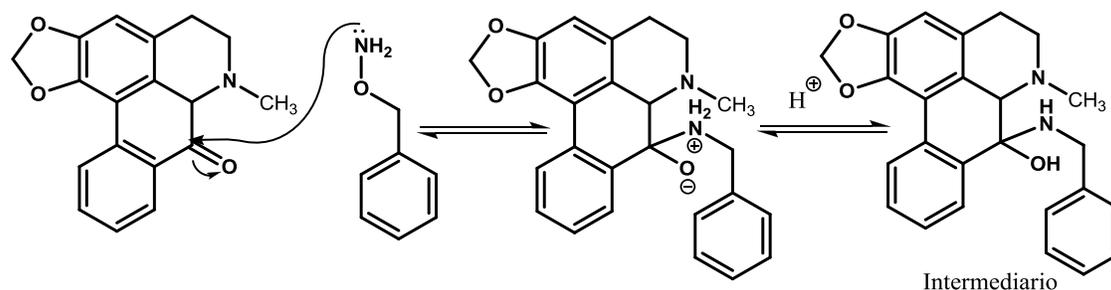
A partir del producto de oxidación de la oliverolina por reacción con O-bencilhidroxilamina se intentó obtener el éter de oxima 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona O-bencil-oxima, ya que estos compuestos se caracterizan por tener una muy buena actividad antifúngica (Díaz-Velandia, Durán-Díaz, Robles-Camargo, & Loaiza, 2011), antibacteriana (Bhandari, Srinivas, Shiva, & Shukla, 2009), (Oshida, Ado, Kezaki, & Ato, 2001) y citotóxica contra células tumorales (Abele et al., 2003); En la figura 15 se muestra la ecuación de la reacción llevada a cabo.

Figura 15. Obtención del éter de oxima 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona O-bencil-oxima

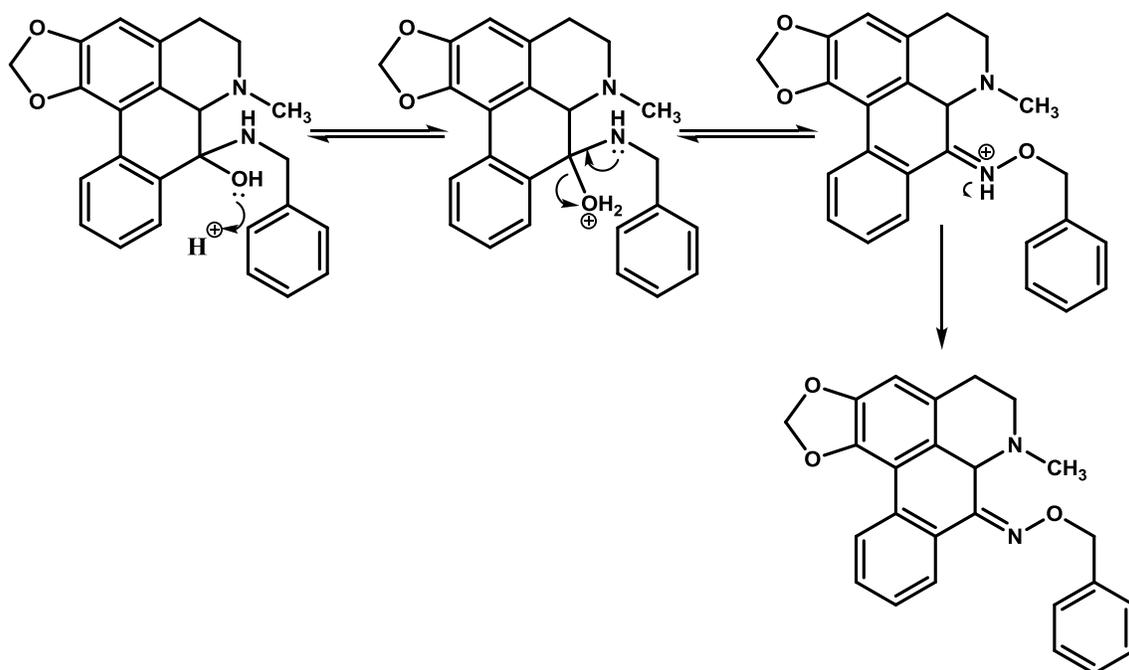


El mecanismo de la reacción inicia con el ataque nucleofílico del NH_2 de la O-bencilhidroxilamina sobre el carbonilo de la cetona para formar un intermediario inestable tal como un hemiacetal (figura 16).

Figura 16. Mecanismo de reacción de la formación del éter de oxima

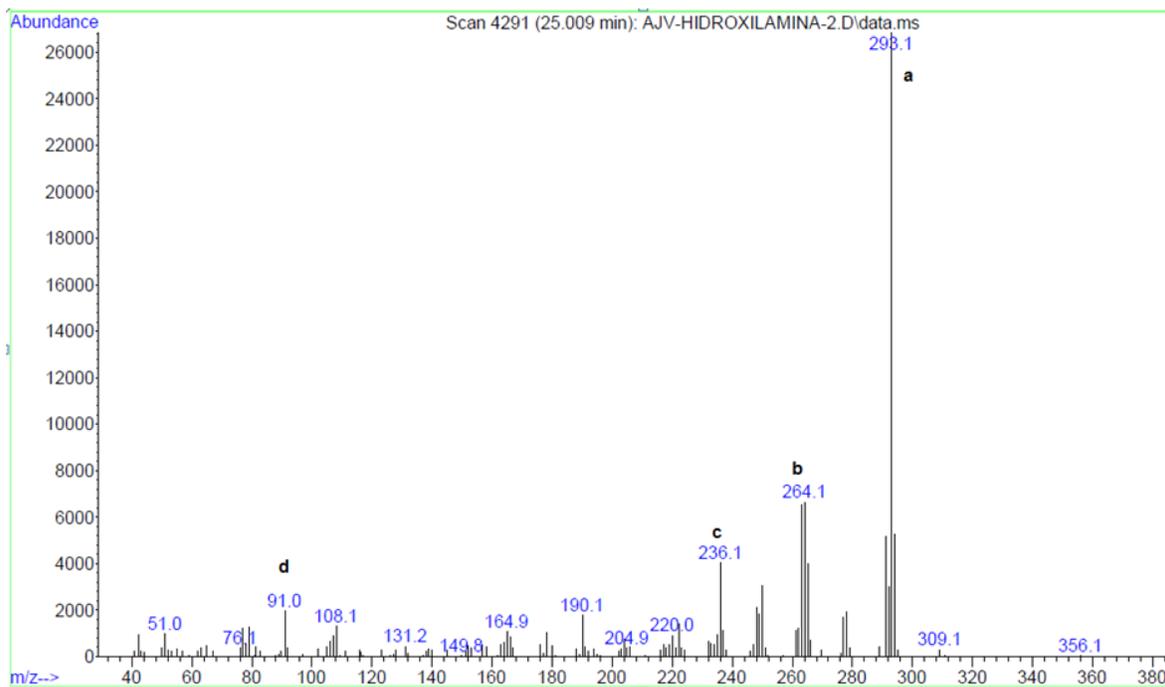


Estos intermediarios se descomponen perdiendo agua, formado el éter de oxima. Esta pérdida se da ya que es más nucleofílico el átomo de nitrógeno que el átomo de oxígeno (Clayden, Greeves, & Warren, 2012):



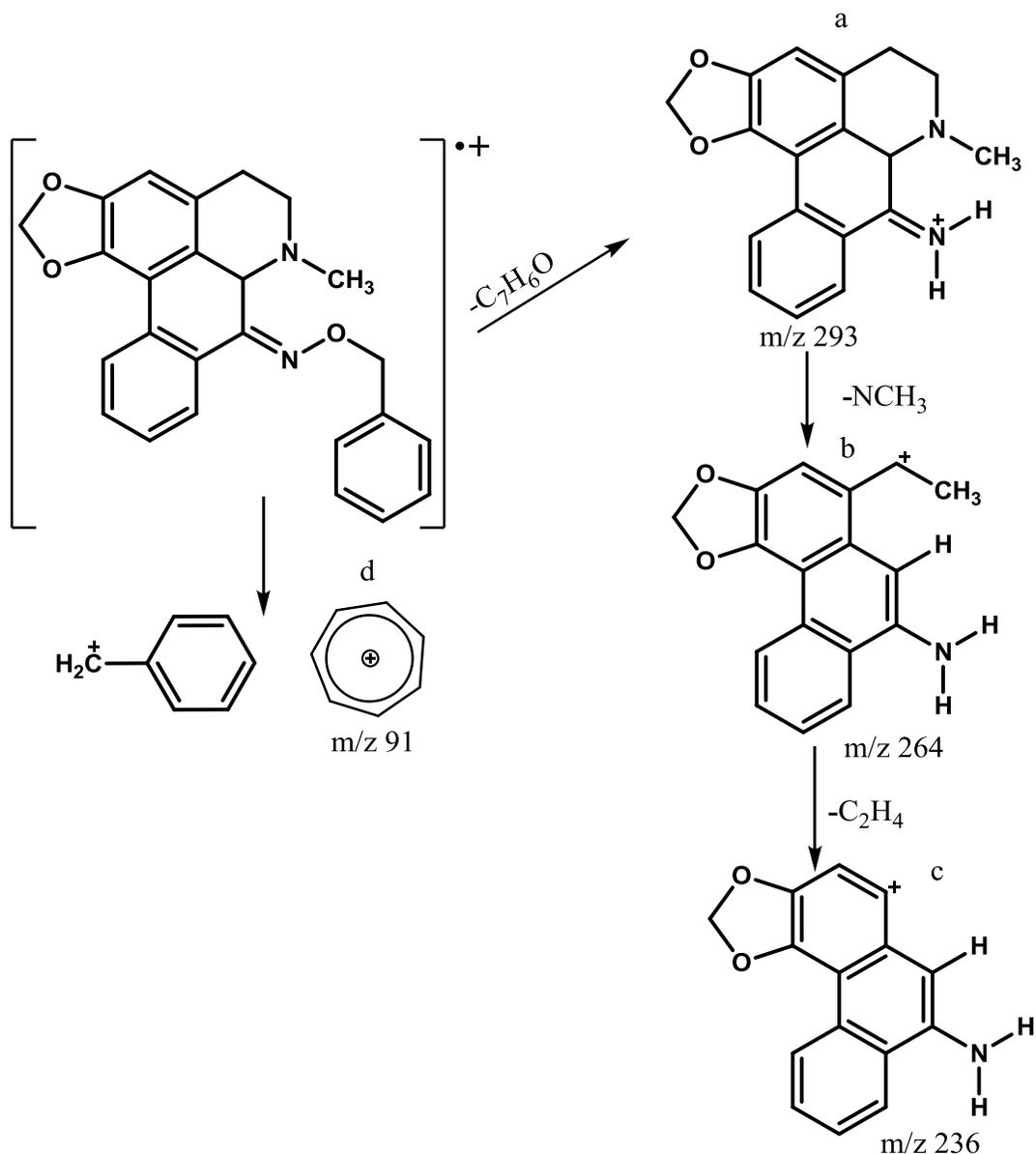
Para la reacción, se partió de 20 mg de la mezcla que contenía la cetona, piridina y O-bencilhidroxilamina en metanol, la reacción tuvo una duración de 1 día y fue monitoreada por CG-EM. Se obtuvieron 30 mg de una mezcla de compuestos entre los que se identificó un producto con un tiempo de retención de 25.009 minutos (área del pico 8 %) que de acuerdo con las fragmentaciones mostradas por su espectro de masas (Figura 17), correspondían al éter de oxima. Por la cantidad tan baja, no se intentó su aislamiento.

Figura 17. Espectro de masas del éter de oxima (tiempo de retención de 25.009 minutos).



El espectro de masas muestra un rompimiento característico de este tipo de compuestos en el enlace nitrógeno-oxígeno, dando dos iones de m/z 91 y m/z 293. Al igual que en la cetona precursora, se pierde un grupo $N-CH_3$ que es particular de los alcaloides con nitrógeno terciario. En la figura 18 se muestra la ruta de fragmentación propuesta para el éter de oxima obtenido

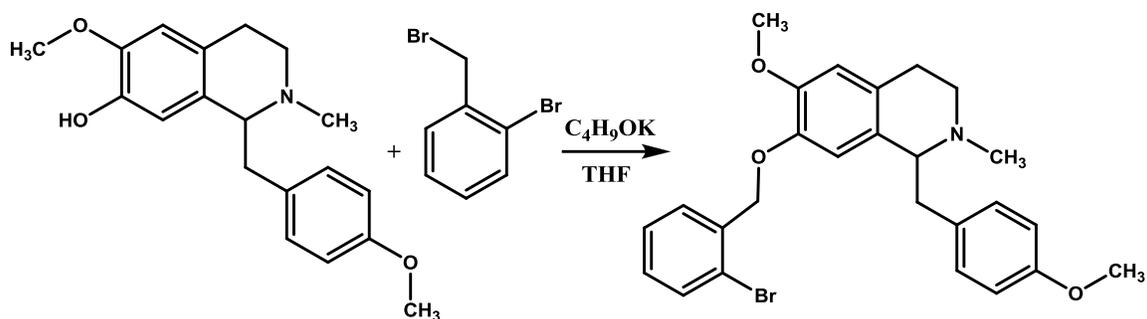
Figura 18. Ruta de fragmentación propuesta para el éter de oxima obtenido



5.6.3. O-Alquilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2-bromobencilo (síntesis de 7-(2-bromobenciloxi)-6-metoxi-1-(4-metoxibencil)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina)

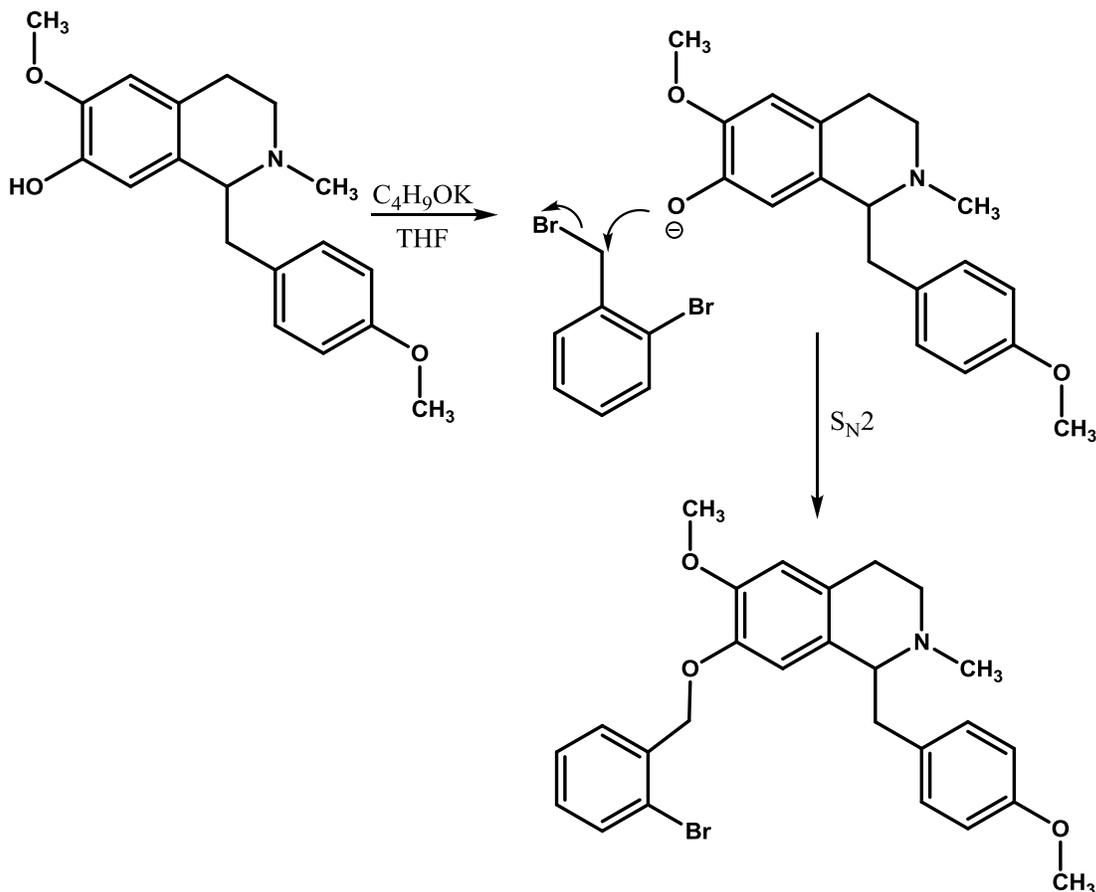
La última reacción efectuada fue la O-alquilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2-bromobencilo para obtener el producto bromado 7-(2-bromobenciloxi)-6-metoxi-1-(4-metoxibencil)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, como se muestra en la siguiente figura.

Figura 19. O-Alquilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2-bromobencilo



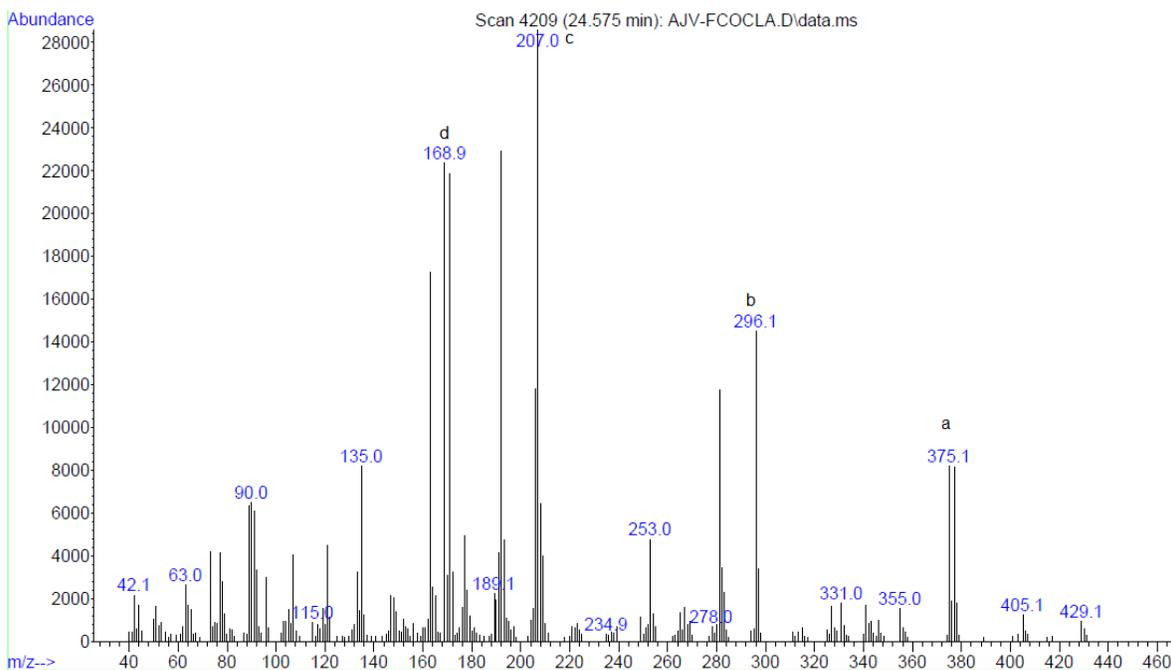
El primer paso del mecanismo de la reacción es la generación del ion fenóxido del alcaloide para lo cual se agrega el ter-butóxido. El siguiente paso es el ataque nucleofílico del ion fenóxido al carbono sp^3 unido al átomo de bromo en el bromuro de 2-bromobencilo, tal como se muestra en la figura 20.

Figura 20. Mecanismo de reacción de la O-Alquilación de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con bromuro de 2-bromobencilo



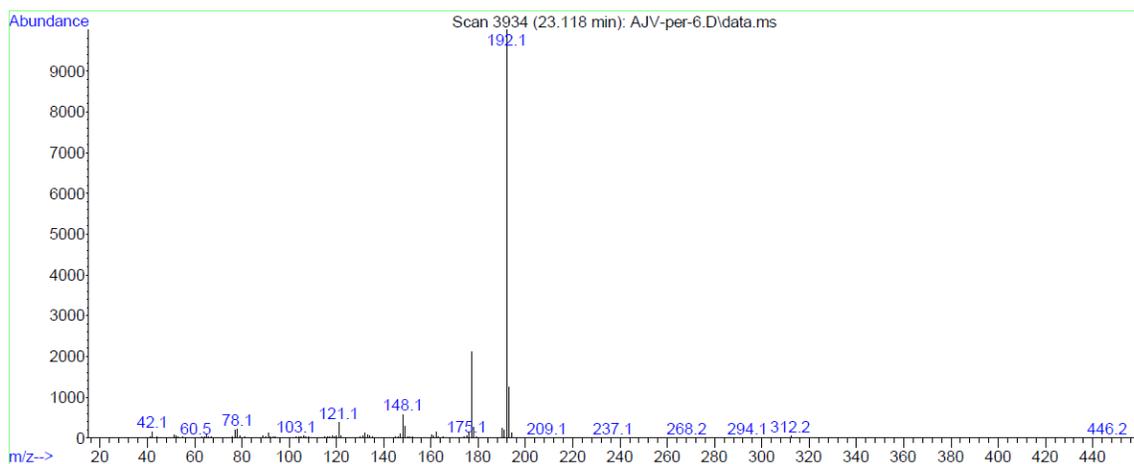
El avance de la reacción se monitoreó por CG-EM, y se observó que el material de partida no se consumió en su totalidad, así como la aparición de un nuevo producto con un t_R de 24.575 minutos (área del pico 11%), cuyo espectro de masas se muestra en la figura 21.

Figura 21. Espectro de masas del producto bromado (tiempo de retención de 24.575 minutos).



Al comparar el espectro de masas de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina (Figura 22) con el producto bromado se puede observar que tienen diferencias notables como en el pico base, que en el caso de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina es de m/z 192 y el del producto alquilado es de m/z 207 (Figura 22), lo que probaría parcialmente que probablemente se llevó a cabo la reacción esperada.

Figura 22. Espectro de masas de 12-O-metil-N-metilcoclaurina (tiempo de retención de 23.118 minutos).



Así mismo los tiempos de retención de los dos compuestos son diferentes lo que también confirmaría que la reacción tuvo lugar (ver tabla 10).

Tabla 10. Comparación de los iones principales y tiempos de retención de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina y el producto de O-alkilación esperado.

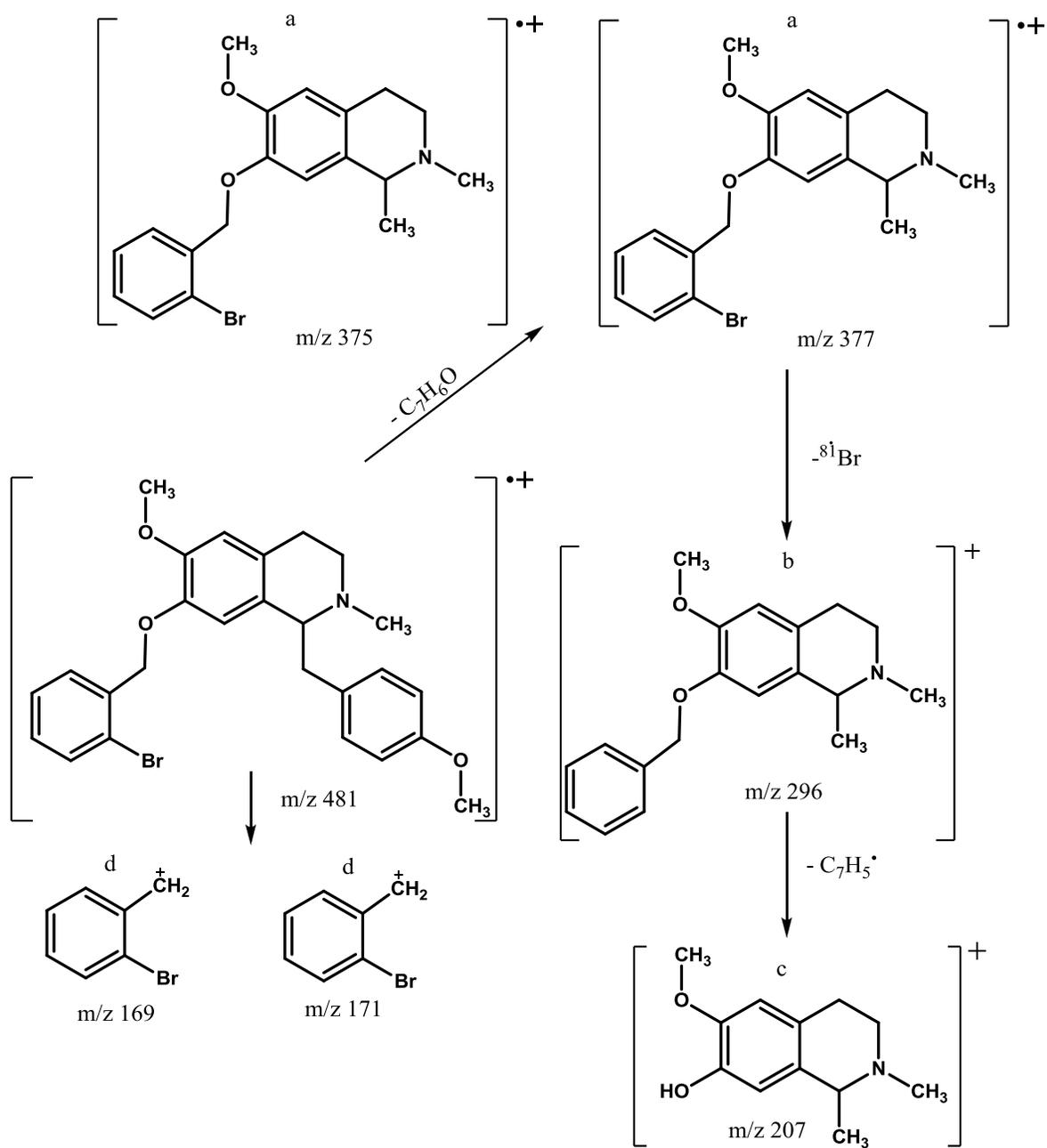
Ion	12-O-metil-N-metilcoclaurina	Compuesto Bromado
[M] ⁺ m/z	312	----
Pico base m/z	192	207
t _R	23.118	24.575

En la figura 23 se muestra la ruta de fragmentación propuesta para el producto de la O-alkilación.

Se puede ver como la pérdida del C₇H₆O genera un fragmento de m/z 375 y otro de m/z 377, debido a iones que presentan en su estructura un átomo de bromo. Esto se debe a que este elemento tiene dos isótopos (⁷⁹Br y ⁸¹Br) con abundancia similar lo que generan fragmentos con dos unidades de diferencia.

Este ion de m/z 375 al perder el bromo genera otro fragmento con m/z 296, dando una sola señal, lo que es consistente tanto en el EM como en la ruta de fragmentación propuesta.

Figura 23. Ruta de fragmentación propuesta para el producto de la O-alkilación.



6. CONCLUSIONES

- Como resultado de la marcha fitoquímica realizada a las hojas de la especie *Siparuna sessiliflora* se pudo determinar que contienen los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, leucoantocianinas, compuestos fenólicos, alcaloides, triterpenoides y/o esteroides.
- Las dos metodologías de extracción de alcaloides ensayadas permitieron concluir que el método más conveniente fue la extracción con Soxhlet y diclorometano (0.12 % de rendimiento) por ser más selectivo, pues aunque en la maceración en frío con etanol se obtuvo un 0.29 % de rendimiento, dicho método extrae una amplia variedad de metabolitos polares que dificultan la purificación de los alcaloides. En ambos extractos se identificaron la nornuciferina, liriodenina, coridina, nantenina, boldina, Isoboldina, corlumina, N-metilaurotetanina, 6-O-metilpapaverolina, stefolidina y ajmalina entre otros.
- Los alcaloides mayoritarios que se aislaron de las hojas de la especie *Siparuna sessiliflora* fueron la oliverolina y la 12-O-metil-N-metilcoclaurina.
- Algunos alcaloides minoritarios reconocidos por el CG-EM con porcentajes de coincidencia mayores a 90 % comparados con la base de datos NIST05a.L. son nornuciferina, liriodenina, coridina, nantenina, boldina, corlumina y ajmalina.
- Éste estudio muestra la marcada presencia de alcaloides isoquinolínicos y aporfínicos en la especie *S. sessiliflora*, cuya identificación se logró gracias a dos técnicas: cromatografía de gases acoplada a masas y resonancia magnética nuclear.
- La fracción F-AcOEt mostró ser más activa contra *A. niger* con una cantidad de 1.125 mg, en un tiempo de 96 h y con porcentajes de inhibición superiores al 80%, mientras que contra los otros tres hongos fue más activo el extracto total alcaloidal ET-DCM a 0.75 mg, en un tiempo aproximado de 120 h y con porcentajes de inhibición superiores al 80 %. Esto se debe probablemente a un efecto sinérgico de varios alcaloides que al ser aislados, pierden dicha actividad.
- La fracción F-MeOH no presentó inhibiciones tan altas como el extracto ET-DCM y la fracción F-AcOEt contra los cuatro hongos evaluados, sin embargo mostró una inhibición cercana al 40 % contra *Alternaria* sp con una cantidad de 0.75 mg y un tiempo de 216 h.

- La 12-O-metil-N-metilcoclaurina fue evaluada contra *Alternaria* sp con una cantidad de 1.5 mg, pero no presentó actividad inhibitoria importante.
- Se obtuvieron 3 derivados de los dos alcaloides mayoritarios aislados: la oxidación de la oliverolina con PCC produjo el primer derivado que fue la cetona 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona, que por reacción con clorhidrato de O-bencilhidroxilamina produjo el éter de oxima 7-Metil-6,7,7a,8-tetrahidro-5H-benzo[g][1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]quinolin-8-ona O-bencil-oxima, que fue el segundo derivado y la reacción de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina con el bromuro de 2-bromobencilo 7-(2-bromobenciloxi)-6-metoxi-1-(4-metoxibencil)-2-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, arrojó el tercer derivado. Los tres productos fueron identificados por CG-EM.

7. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

En el extracto crudo alcaloidal el CG-EM reportó tres alcaloides mayoritarios, de los que dos se pudieron separar e identificar, por eso sería importante seguir con la investigación con el fin de aislar y caracterizar el alcaloide que en esta investigación no se pudo identificar.

Así mismo la metodología usada para aislar y purificar esta clase de metabolitos secundarios (cromatografía en columna y en capa preparativa) funcionó bien sin embargo se deben hacer pruebas con otras fases estacionarias como Sefadex y RP-18 para evaluar si hay una mejor separación.

Se debe hacer una evaluación antifúngica de los alcaloides puros y de los derivados sintéticos ya que la idea de modificarlos era saber si al someterlos a una reacción se incrementa o se disminuye su actividad biológica.

Sería interesante evaluar otro tipo de actividad a estos metabolitos secundarios ya que en la bibliografía se reportan muchas actividades como lo son antiprotozoaria, citotóxica contra algunas células tumorales y antivirales.

Por último, dado que se encontraron dos tipos de alcaloides (isoquinolínicos y aporfínicos) es necesario refinar la parte de evaluación antifúngica para así establecer cuál de los dos grupos es el responsable de dicha actividad o si más bien se debe a un efecto sinérgico de varios alcaloides.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abele, E., Abele, R., Arsenyan, P., Shestakova, I., Kanepe, I., Antonenko, I., Popelis, J., et al. (2003). Synthesis and Cytotoxicity of Silicon and Germanium Containing Pyridine Oxime O-Ethers. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1(371), 299–308.
- As'ari, N., Chao-mei, M., Norio, N., Masao, H., Masahiko, K., Kimiyasua, S., NORIAKI, K., et al. (1999). Anti-Herpes Simplex Virus Activity of alkaloids Isolated from *Stephania cepharantha*. *Biol. Pharm. Bull.*, 22(3), 268–274.
- Bernal, H. Y., & Correa, J. E. (1990). *Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello*. (Guadalupe Ltda, Ed.). Bogotá, D. C.
- Bhandari, K., Srinivas, N., Shiva, G. B., & Shukla, P. K. (2009). Tetrahydronaphthyl azole oxime ethers : the conformationally rigid analogues of oxiconazole as antibacterials †. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(7309), 437–447.
- Brastianos, H. C. (2007). *Bioactive Natural Products From Nature*. The University of British Columbia.
- Carrillo, L. (2002). *Los Hongos de los Alimentos y Forrajes*. (U. N. Salta, Ed.) (pp. 81–86).
- Centro agronómico tropical de la investigación y enseñanza. (1991). *Plagas y enfermedades forestales en América central* (Primera ed.). Costa Rica.
- Chinchilla Carmona, M., Valerio Campos, I., Sánchez Porras, R., Mora chaves, V., Bagnarello madrigal, V., Martínez esquivel, L., González Paniagua, A., et al. (2011). Evaluación in vivo de la actividad antimalárica de 25 plantas provenientes de una Reserva de Conservación Biológica de Costa Rica. *Revista chilena de Historia Natural*, 115–123.
- Clayden, J., Greeves, N., & Warren, S. (2012). *Organic Chemistry* (Second Edi., p. 1264). Oxford.
- Cordell, G. A. (1998). *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. (E. S. Serials, Ed.) (p. 304). USA.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4).
- Céline, V., Adriana, P., Eric, D., Joaquina, A., Yannick, E., Augusto, L. F., Rosario, R., et al. (2009). Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 413–422. doi:10.1016/j.jep.2009.03.041
- Diaz-Velandia, J., Durán-Díaz, N., Robles-Camargo, J., & Loaiza, A. E. (2011). Síntesis y evaluación “in vitro” de la actividad antifúngica de oximas, éteres de oxima e isoxazoles. *Universitas Scientiarum*, 16, 294–302.
- Djilani, A., Legseir, B., Soulimani, R., & Dicko, A. (2006). New Extraction Technique for Alkaloids. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol., 17(3), 518–520.
- Fournet, A., Ferreira, M. E., Rojas de Arias, A., Guy, I., Guinaudeau, H., & Heinzen, H. (2007). Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*, 78(5), 382–384. doi:10.1016/j.fitote.2007.03.003

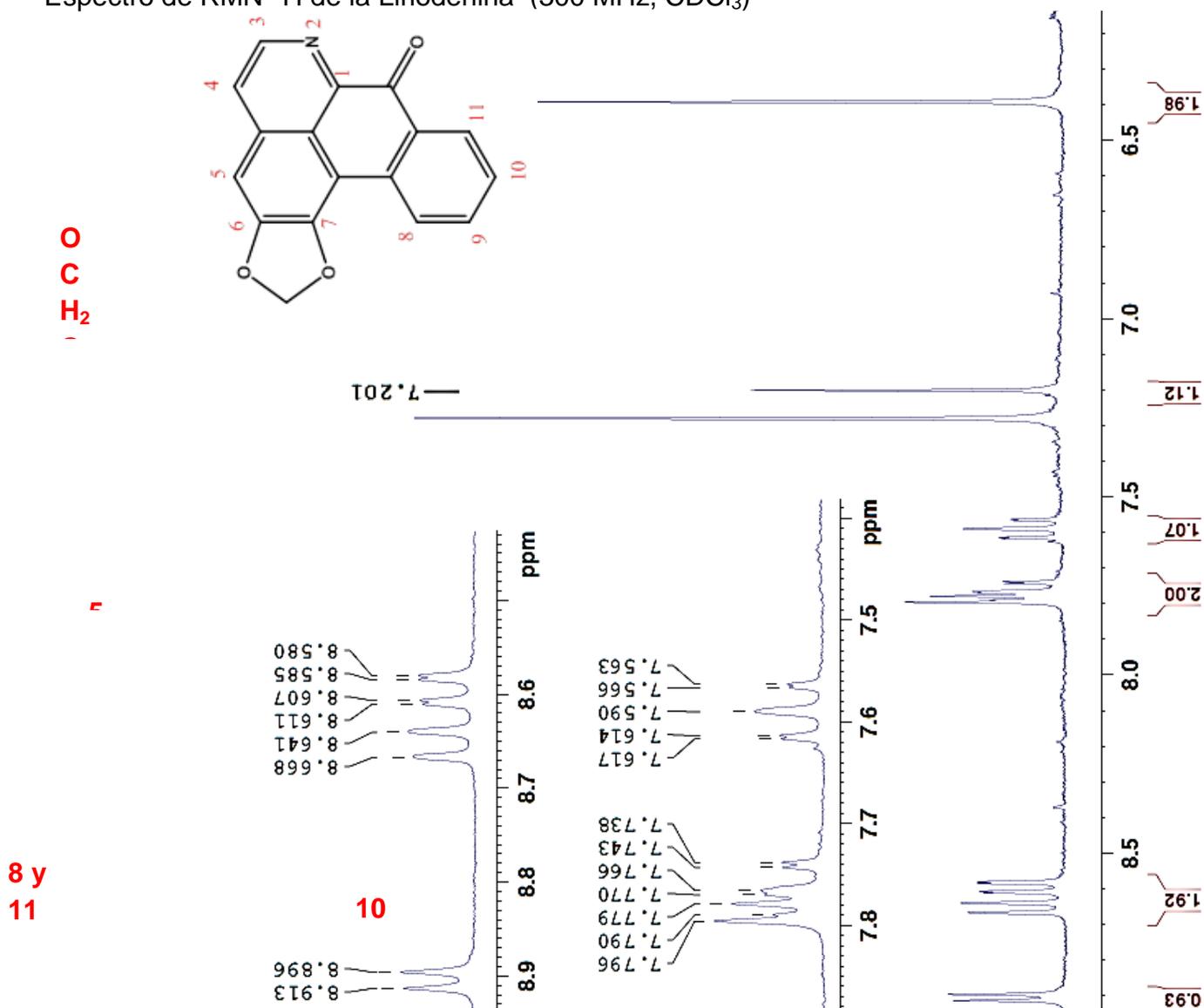
- Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G., & Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum*. El Hongo Que Nos Falta Conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7–26.
- García, R., García, A., & Garnica, C. (2002). Distribución , Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo Papa en el Estado Mérida , Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa.*, 13, 24–40.
- Guo, Z., Wang, X., Luo, J., Luo, J., Wang, J., & Kong, L. (2011). Fitoterapia A novel aporphine alkaloid from *Magnolia officinalis*. *Fitoterapia*, 82(4), 637–641. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.021
- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*, 13(19-20), 894–901. doi:10.1016/j.drudis.2008.07.004
- Huallpara, C. (2005). *Estudio Comparativo de Métodos de Extracción de Alcaloides Kallunki (Evanta) con Actividad Leishmanicida*. Universidad Mayor de San Andrés.
- Ismail, N. H., Alias, A., Osman, C. P., & Mara, U. T. (2003). Alkaloids and Anthraquinones from Malaysian Flora.
- Iturriaga V., P. (2001). *Análogos Simplificados de Alcaloides Bencilisoquinolinicos Como Posibles Relajante Musculares*. Universidad de Chile.
- Iwasa, K., Moriyasu, M., Tachibana, Y., Kim, H., Wataya, Y., Wiegrebe, W., Bastow, K. F., et al. (2001). Simple Isoquinoline and Benzylisoquinoline Alkaloids as Potential Antimicrobial, Antimalarial, Cytotoxic, and Anti-HIV Agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9, 2871–2884.
- Jenett-Siems, K., Kraft, C., Siems, K., Jakupovic, J., Solis, P. N., Gupta, M. P., & Bienzle, U. (2003). Sipaucins A–C, sesquiterpenoids from *Siparuna pauciflora*☆☆Part 9 in the series “Herbal remedies traditionally used against malaria”, for part 8 see Köhler et al., 2002 [Zeitschrift für Naturforschung, 57 (2002) 1022]. *Phytochemistry*, 63(4), 377–381. doi:10.1016/S0031-9422(03)00098-0
- Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Yameogo, S., Montesano, C., Simpore, J., Colizzi, V., et al. (2005). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*, 4(December), 1452–1457.
- Leitão, G. G., Simas, N. K., Soares, S. S., De Brito, a P., Claros, B. M., Brito, T. B., & Delle Monache, F. (1999). Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on Siparuna and Mollinedia. *Journal of ethnopharmacology*, 65(2), 87–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10465659>
- Lomonte, B., León, G., Angulo, Y., Rucavado, A., & Núñez, V. (2009). Neutralization of Bothrops asper venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 54(7), 1012–28. doi:10.1016/j.toxicon.2009.03.015
- Lopez, A., Hudson, J., & Towers, G. (2001). Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2-3), 189–196. doi:10.1016/S0378-8741(01)00292-6

- Lutta, K. P., Christine, B., Teresa, A. A., & Wanjala, W. (2008). Antimicrobial Marine Natural Products from the Sponge , *Axinella infundibuliformis*. *Rec. Nat. Prod.*, 4, 116–127.
- Martinez M., A., Valencia P., G. A., Jimenez U., N., Mesa, M., & Galeano J., E. (2008). Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica (pp. 1–96). Universidad de Antioquia.
- Meissner, W., & Bernard, C. (2001). Alcaloides: aspectos generales (I). *Panorama Actual Med*, 25(241), 222–227.
- Missouri Botanical Garden. (n.d.). zipcodezoo.com. Retrieved from http://zipcodezoo.com/Plants/S/Siparuna_sessiliflora/
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S., & Kameoka, H. (1996). Antimutagenic Activity of (+) - Eudesmol and Paeonol from *Dioscorea japonica*. *J. Agric. Food Chem.*, (1985), 1647–1650.
- Nikolić, D., Gödecke, T., Chen, S., White, J., Lankin, D. C., Pauli, G. F., & Breemen, R. B. Van. (2012). Fitoterapia Mass spectrometric dereplication of nitrogen-containing constituents of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.). *Fitoterapia*, 83(3), 441–460. doi:10.1016/j.fitote.2011.12.006
- Nissanka, A., Karunaratne, V., Bandara, B. M., Kumar, V., Nakanishi, T., Nishi, M., Inada, A., et al. (2001). Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Phytochemistry*, 56(8), 857–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11324918>
- Oshida, T. Y., Ado, N. K., Kezaki, E. O., & Ato, H. K. (2001). Studies on Macrolide Antibiotics I . Synthesis and Antibacterial Activity of Erythromycin A 9-O-Substituted Oxime Ether Derivatives against *Mycobacterium avium* Complex. *Chem. Pharm. Bull.*, 49(9), 1120–1127.
- Padilla G., G. F., & Gil A., E. (2012). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones de hojas de *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC. (limoncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 65–72.
- Pang, S.-Q., Wang, G.-Q., Huang, B.-K., Zhang, Q.-Y., & Qin, L.-P. (2007). Isoquinoline alkaloids from *Broussonetia papyrifera* fruits. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(1), 83–84.
- Red Nacional de Jardines Botánicos. (2008). Catálogo de la biodiversidad de Colombia. Retrieved from <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=1984&method=displayAAT>
- Sujata, B., Nagasampagi, B., & Meenakshi, S. (2009). *Natural Products* (pp. 1–8). Oxford.
- Tempone, A. G., Treiger Borborema, S. E., De Andrade, H. F., De Amorim Gualda, N. C., Yogi, Á., Salerno Carvalho, C., Bachiega, D., et al. (2005). Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*, 12(5), 382–390. doi:10.1016/j.phymed.2003.10.007
- Tojo, G., & Fernández, M. (2006). *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones* (p. 375). España.
- Tropicos.org. (n.d.). Retrieved from www.tropicos.org

- Valadeau, C., Castillo, J. A., Sauvain, M., Lores, A. F., & Bourdy, G. (2010). The rainbow hurts my skin: medicinal concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *Journal of ethnopharmacology*, 127(1), 175–92. doi:10.1016/j.jep.2009.09.024
- Wang, H.-M., Lo, W.-L., Huang, L.-Y., Wang, Y.-D., & Chen, C.-Y. (2010). Chemical constituents from the leaves of *Michelia alba*. *Natural product research*, 24(5), 398–406. doi:10.1080/14786410802394132

ANEXO

Espectro de RMN-¹H de la Liriodenina (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de RMN-¹H de la Oliverolina (300 MHz, CDCl₃)

4 y
9

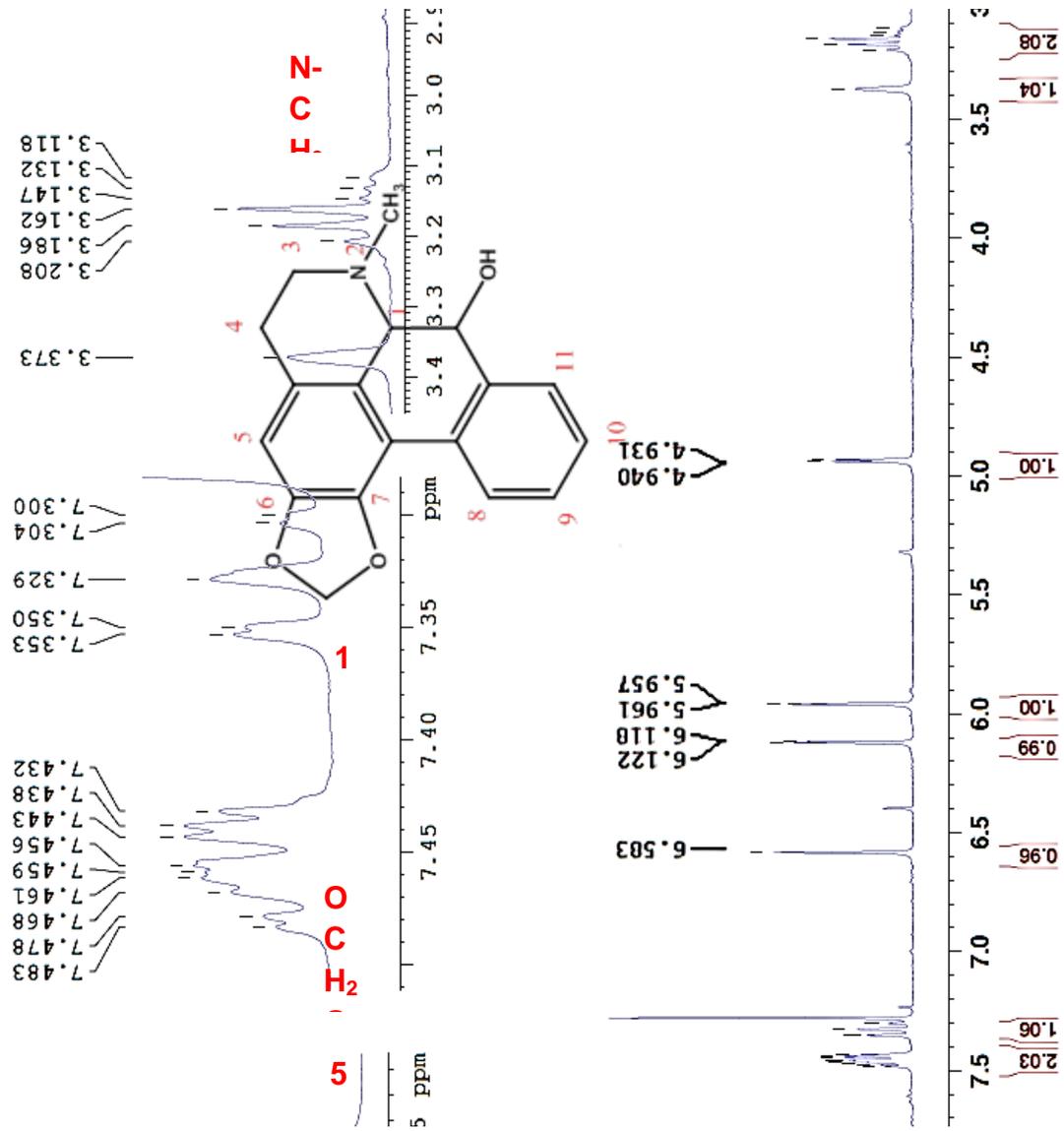
3 y
4

3 y
4

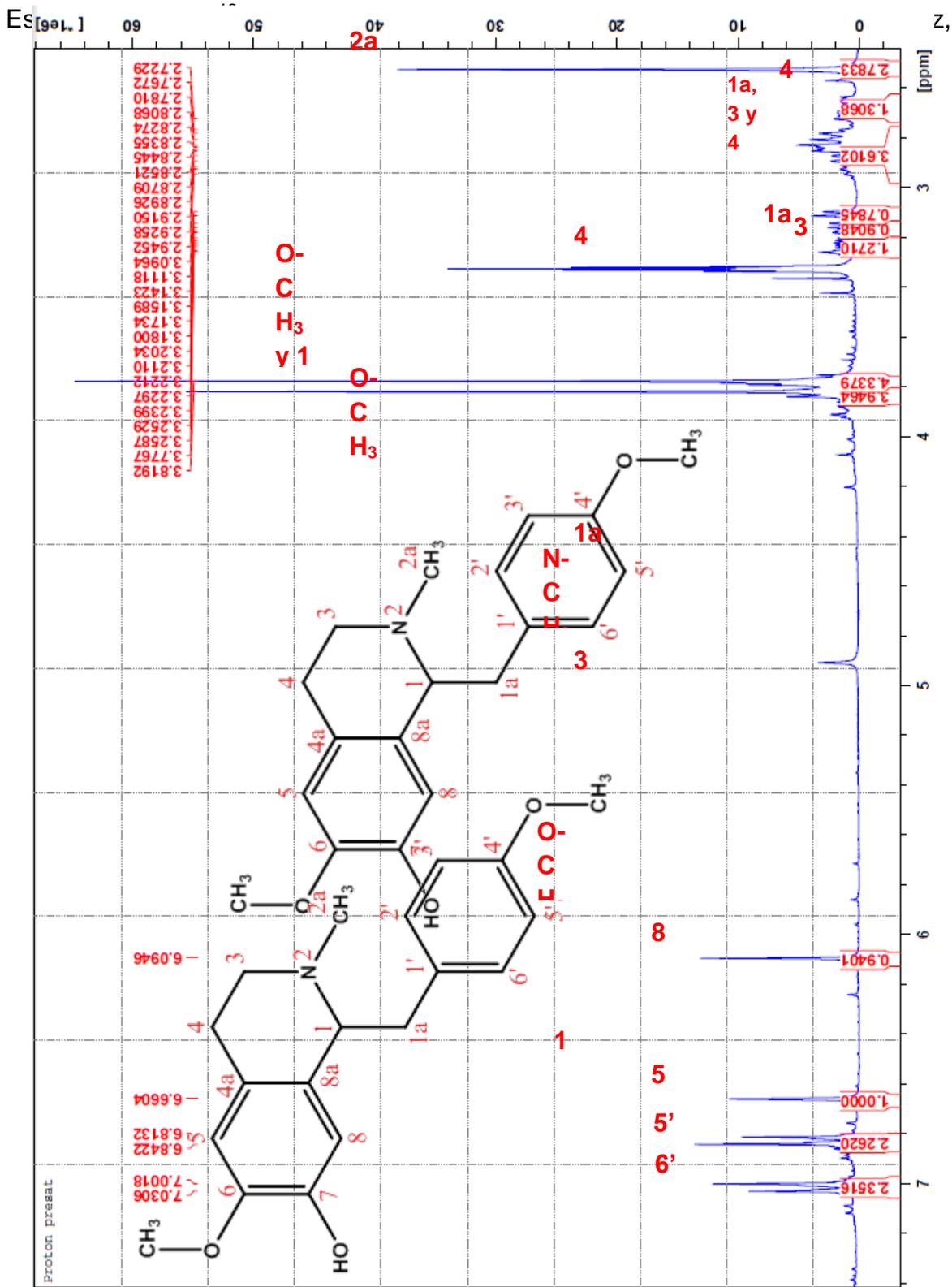
1 a

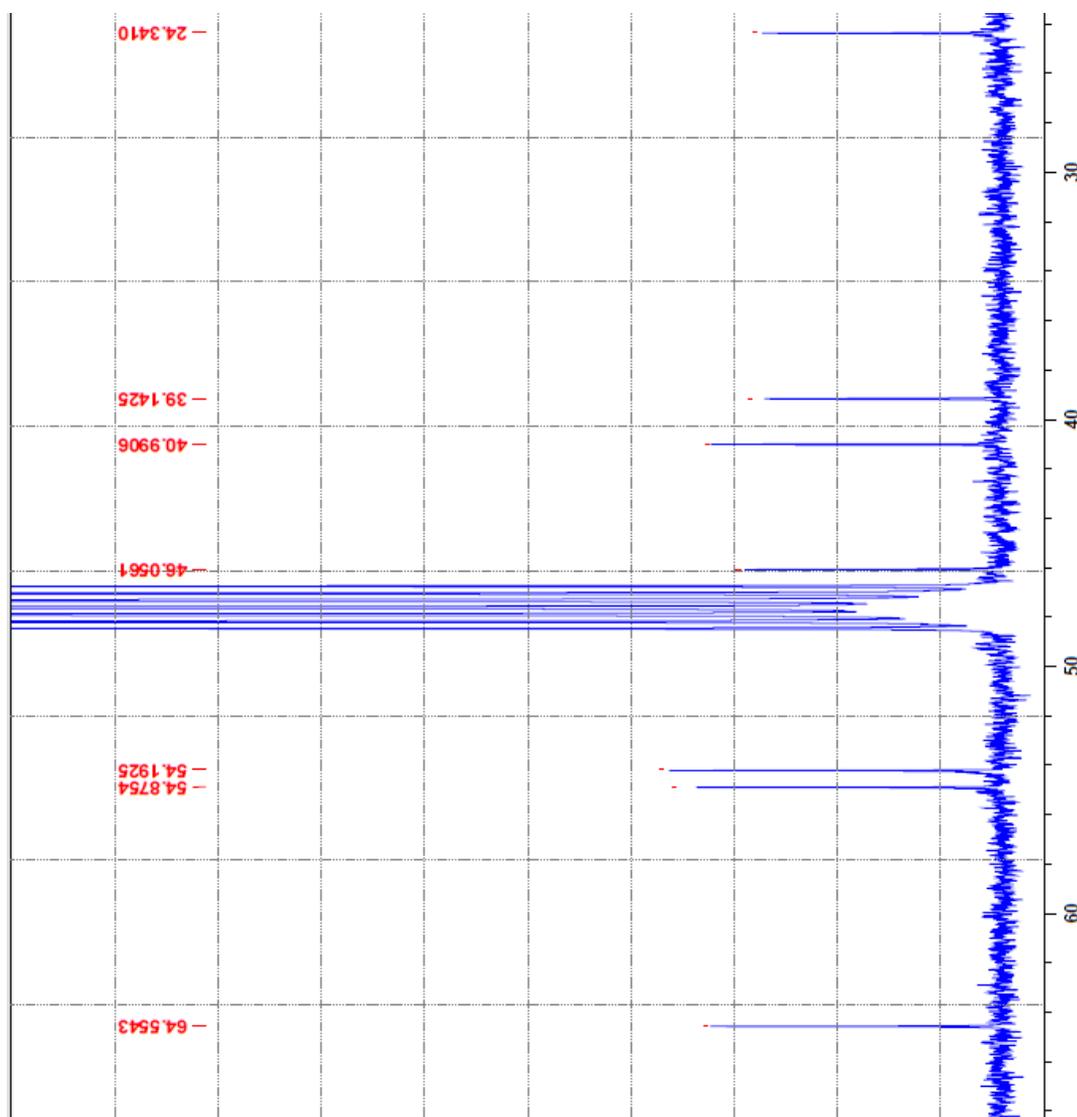
10

9 y
11

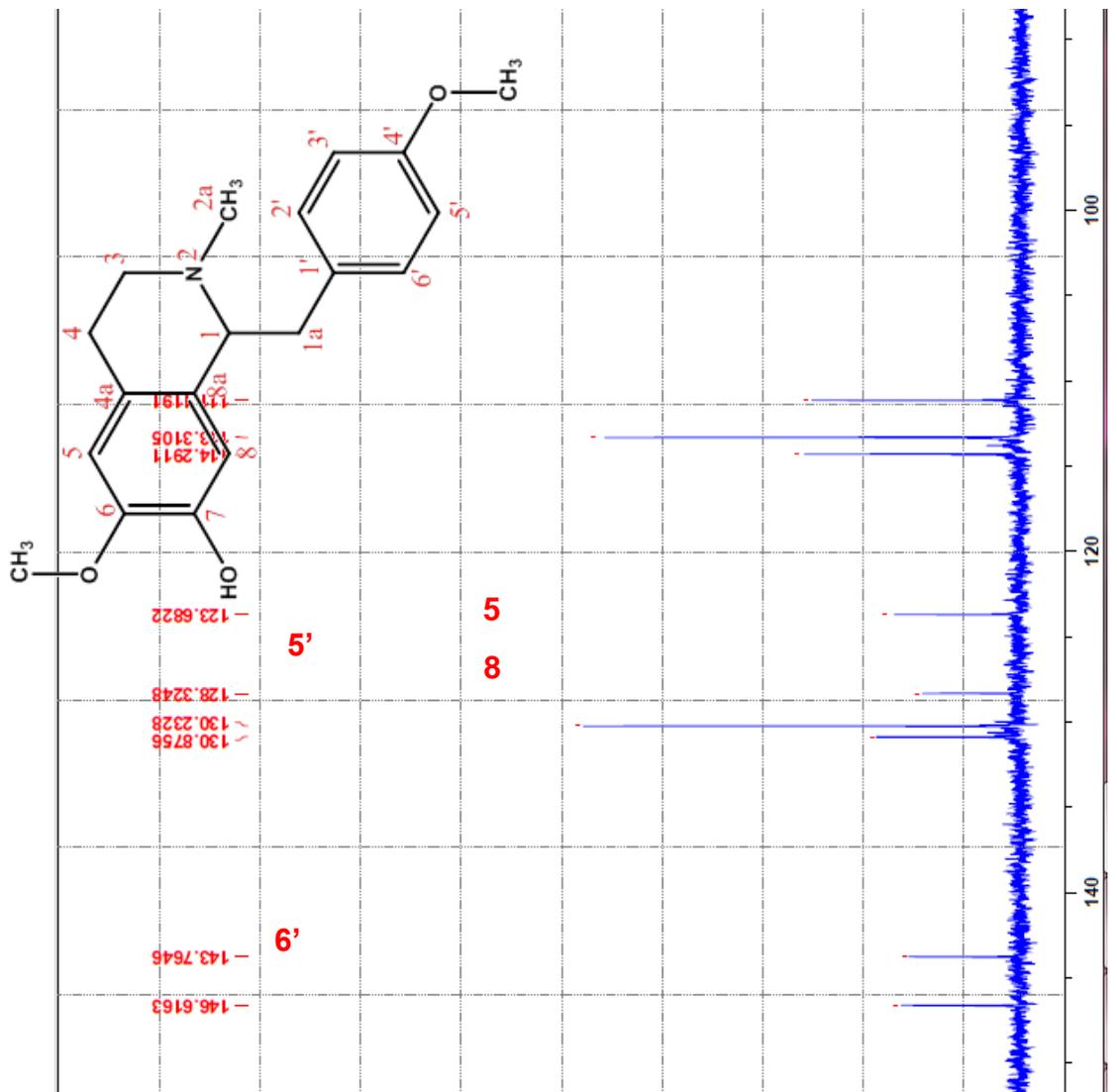


Espectro de RMN-¹H de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina (300 MHz, CD₃OD)

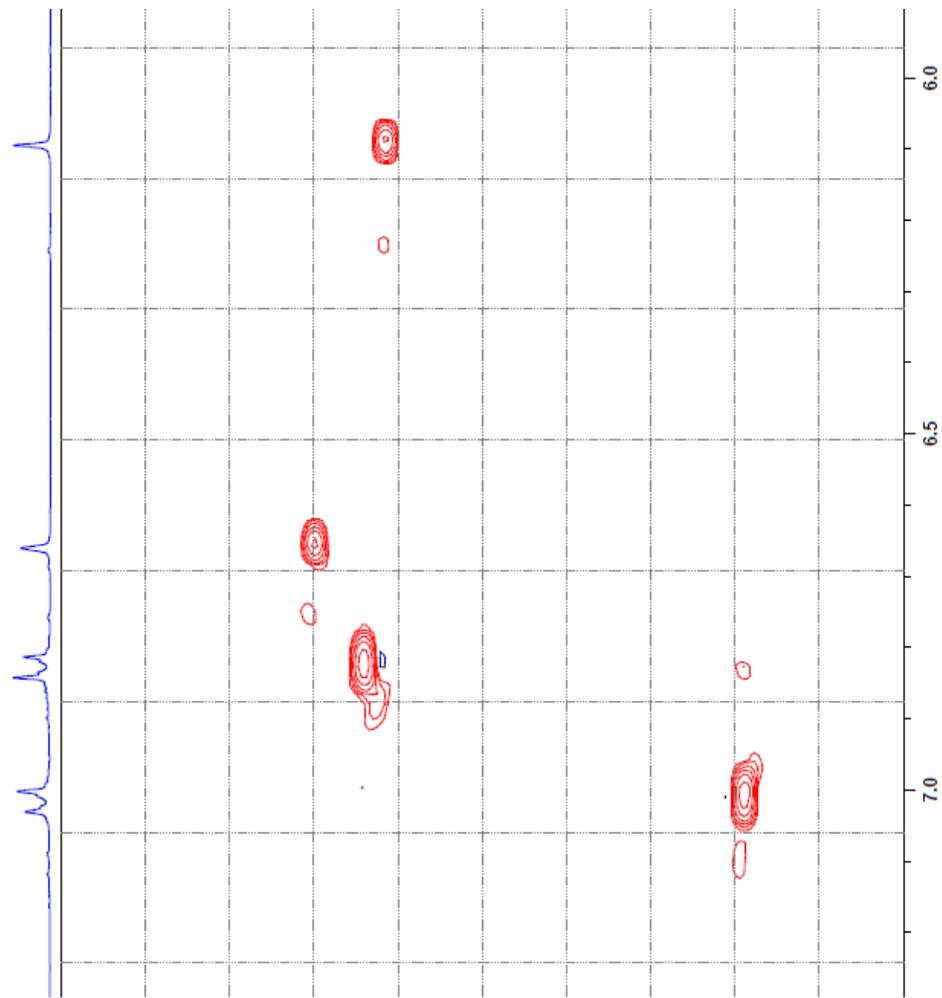




Espectro de RMN- ^{13}C de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina zona aromática (300 MHz, CD_3OD)



Espectro de HSQC de la 12-O-metil-N-metilcoclaurina zona aromática (300 MHz, CD₃OD)



Comparación de
(300 MHz, CDCl₃)

