

**VARIABILIDAD QUÍMICA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES OBTENIDAS DE  
TRES ESPECIES DELA TRIBU *Senecioneae*: *Gynoxys hirsuta*, *Pentacalia  
ledifolia*, *Senecio pampae***

**ELVIA JOHANNA RAMIREZ MURILLO**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE POSGRADOS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA "GIFUJ"  
BOGOTÁ  
2011**

**VARIABILIDAD QUÍMICA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES OBTENIDAS DE  
TRES ESPECIES DELA TRIBU *Senecioneae*: *Gynoxys hirsuta*, *Pentacalia  
ledifolia*, *Senecio pampae***

**ELVIA JOHANNA RAMÍREZ MURILLO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Magister en Ciencias Biológicas**

**Dra. ALBA NOHEMI TELLEZ A**

**Directora**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE POSGRADOS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA “GIFUJ”  
BOGOTA  
2011**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

**Bogotá 2011**

**VARIABILIDAD QUÍMICA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE TRES  
ESPECIES DE LA TRIBU *Senecioneae*: *Gynoxys hirsuta*, *Pentacalia ledifolia*  
y *Senecio pampae***

**ELVIA JOHANNA RAMÍREZ MURILLO**

**APROBADO**

---

**Dr. Manuel A. Franco**  
**Director de Posgrados**  
**Facultad de Ciencias**

---

**Dra. Ingrid Shuler**  
**Decana Académica**  
**Facultad de Ciencias**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE POSGRADOS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA “GIFUJ”  
BOGOTÁ  
2011**

*Dedico este trabajo a mis padres:*

*Benjamin Ramirez Moreno y Argelia Maria Muzillo, por su apoyo incondicional en todo momento, por sus palabras de aliento en los momentos más difíciles y por enseñarme a ser mejor persona día a día.*

*A mi hermana Yvonne Maritza Ramirez por motivarme a alcanzar mis sueños y a mi sobrino Juan Camilo Otero Ramirez por llenarme de felicidad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Dios por darme la fuerza y la sabiduría para seguir adelante con este proyecto

A la Doctora Nohemí Tellez por su asesoría, por enseñarme y contribuir en este trabajo y compartir sus experiencias y conocimientos.

Al Doctor Julio Armando Pedrozo por sus aportes de tipo conceptual, por compartir generosamente sus amplios conocimientos y experiencia.

Al Doctor Jorge Robles, por su gran colaboración y aportes en lo académico y experimental.

A Jaime por su acompañamiento y colaboración en el laboratorio.

A Manuel Fredy Molina por su amistad y aportes en lo académico y experimental

A la profesora Elizabeth Cardenas, por su colaboración en la parte conceptual.

A Diana Tovar, por su colaboración en este trabajo de grado

A Jhon Edwar por su amistad y colaboración

A Juliana, Jennifer, Juanita, Fabian y a todos los demás compañeros y estudiantes del laboratorio de fitoquímica de la Universidad Javeriana por su constante colaboración, apoyo y amistad.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Aps	Alcaloides pirrolizidínicos
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDB	Cromatografía en capa delgada bidimensional
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases- espectrometría de masas
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
EtOH	Etanol
EM	Espectrometría de masas
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
MeOH	Metanol
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Sodio
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amonio
R <sub>f</sub>	Factor de retención
KOH	Hidróxido de potasio
GIFUJ	Grupo de Investigación Fitoquímica Universidad Javeriana
TR	Tiempo de retención
Zn	Zinc

## TABLA DE CONTENIDO

	INTRODUCCIÓN.....	1
	OBJETIVOS.....	3
1.	MARCO TEÓRICO.....	4
1.1	ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y TAXONÓMICOS.....	4
1.1.1	Tribu <i>Senecioneae</i> .....	4
1.1.2	Subtribus de la tribu <i>Senecioneae</i> .....	4
1.1.2.1	Subtribu Tussilaginatae: Género <i>Gynoxys</i> ; <i>Gynoxys hirsuta</i> ...	5
1.1.2.2	Subtribu Senecioninae: Género <i>Senecio</i> ; <i>Senecio pampae</i> ...	8
1.1.2.3	Subtribu Senecioninae: Género <i>Pentacalia</i> ; <i>Pentacalia ledifolia</i> .....	10
1.2	ANTECEDENTES QUÍMICOS DEL GÉNERO DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.....	13
1.2.1	Química del género <i>Gynoxys</i> .....	14
1.2.2	Química del género <i>Pentacalia</i> .....	14
1.2.3	Química del género <i>Senecio</i> .....	16
1.3	ANTECEDENTES QUIMIOTAXONÓMICOS.....	16
1.4	METABOLITOS SECUNDARIOS PRINCIPALES DE LA TRIBU <i>Senecioneae</i> .....	16
1.4.1	Alcaloides pirrolizidínicos.....	16
1.4.2	Derivados de eremofilano.....	18
1.4.3	Cumarinas.....	19

1.4.4	Quinoles.....	20
1.5	PÁRAMO DE SUMAPAZ.....	21
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	23
2.1	RECOLECCION DEL MATERIAL VEGETAL.....	23
2.2	OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRINCIPALES DE LA TRIBU <i>Senecioneae</i> .....	24
2.2.1	Obtención de las fracciones Aps 1 y Aps 2.....	24
2.2.2	Obtención de los extractos y fracciones No alcaloidales de las tres especies.....	25
2.2.3	Pruebas cualitativas.....	26
2.3	IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRINCIPALES DE LA TRIBU: <i>Senecioneae</i> EN EXTRACTOS Y FRACCIONES ALCALOIDALES Y NO ALCALOIDALES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA Y CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA BIDIMENSIONAL.....	29
2.3.1	Monitoreo cromatográfico.....	29
2.3.1.1	Pruebas Cromatográficas en capa delgada para fracciones Aps 1 y Aps 2.....	29
2.3.1.2	Pruebas Cromatograficas en capa delgada de extractos y fracciones no alcaloidales.....	30
2.3.1.3	Pruebas cromatográficas en capa delgada bidimensional para la identificación de los metabolitos secundarios en extractos y fracciones.....	30
2.3.2	Separación e identificación de las fracciones alcaloidales y No alcaloidales por CG-EM.....	31
2.3.2.1	Separación e Identificación de fracciones alcaloidales Aps 1 y Aps 2 mediante CG-EM.....	31

2.3.2.2	Separación e identificación de fracciones no alcaloidales mediante CG - EM.....	31
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
3.1	RENDIMIENTO DE FRACCIONES ALCALOIDALES (hojas) Aps 1 y Aps 2.....	32
3.1.1	Pruebas cualitativas del extracto EtOH (hojas) total.....	32
3.2	RENDIMIENTO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES NO ALCALOIDALES DE LAS ESPECIES.....	33
3.2.1	Rendimiento de las fracciones no alcaloidales.....	33
3.2.2	Rendimiento del extracto clorofórmico.....	34
3.2.3	Resultado pruebas químicas cualitativas.....	35
3.3	RESULTADOS DEL MONITOREO CROMATOGRÁFICO.....	36
3.3.1	Monitoreo en cromatografía en capa delgada unidimensional para fracciones Aps 1 y Aps 2.....	36
3.3.2	Monitoreo cromatográfico en capa delgada unidimensional y bidimensional de extractos y fracciones no alcaloidales.....	40
3.4	Separación e identificación de fracciones alcaloidales y no alcaloidales por CG-EM.....	51
3.4.1	Separación e Identificación de fracciones Aps 1 y Aps 2 por CG-EM.....	51
3.4.2	Separación e identificación de los metabolitos presentes en los extractos y fracciones no alcaloidales por CG-EM.....	69
3.4.3	Cumarinas.....	69
3.4.4	Terpenos.....	72
3.4.5	Fenoles.....	75
3.4.6	Esteroles.....	77
3.4.7	Hidrocarburos.....	80

3.4.8	Ácidos grasos.....	80
4.	CONCLUSIONES.....	82
5.	RECOMENDACIONES.....	84
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	85

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Algunos metabolitos identificados en el género <i>Pentacalia</i> .....	15
Tabla 2.	Sitios de recolección y características de las especies.....	23
Tabla 3.	Porcentaje en peso seco de fracciones Aps 1 y Aps 2 en relación con peso seco de extractos de las tres especies.....	32
Tabla 4.	Resultados pruebas cualitativas a las fracciones Aps 1 y Aps 2 a las tres especies.....	33
Tabla 5.	Porcentaje en peso seco de extractos y fracciones de las tres especies.....	34
Tabla 6.	Porcentaje de rendimiento y peso seco del extracto clorofórmico obtenido de las especies <i>Senecio pampae</i> y <i>Gynoxys hirsuta</i> .....	34
Tabla 7.	Resultados de pruebas cualitativas realizadas del extracto etanólico de las especies <i>Pentacalia ledifolia</i> , <i>Senecio pampae</i> y <i>Gynoxys hirsuta</i> .....	35
Tabla 8.	Resultados del CG-EM de la fracción Aps 2 de la especie <i>Gynoxys hirsuta</i> .....	60
Tabla 9.	Resultados del CG-EM de la fracción Aps 1 de la especie <i>P. ledifolia</i> .....	62
Tabla10.	Resultados del GC-MS de la fracción Aps 2 de la especie <i>P. ledifolia</i> .....	62
Tabla11.	Resultados del GC-MS de la fracción Aps 2 de la especie <i>S. pampae</i> .....	64
Tabla12.	Composición química de hidrocarburos saturados e insaturados de las tres especies.....	80

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Gynoxys hirsuta</i> Wedd. Páramo de Sumpaz, Laguna Chisacá.....	7
Figura 2.	<i>Gynoxys hirsuta</i> Wedd. Páramo de Sumpaz, Laguna Chisacá.....	8
Figura 3.	Especie <i>Senecio pampae</i> , vía Ubate.....	10
Figura 4.	Especie <i>Pentacalia ledifolia</i> (Kunth) Cuatrec. Páramo de Sumapaz.....	13
Figura 5.	Estructura básica de una necina.....	17
Figura 6.	Estructuras de los acidos monocarboxilos y dicarboxilos.	17
Figura 7.	Alcaloides pirrolizidínicos básicos según su estructura química.....	18
Figura 8.	Estructuras básicas de furanoeremofilanos y eremofinanólidos respectivamente.....	18
Figura 9.	Cumarinas complejas.....	19
Figura 10.	Quinoles aislados por el grupo (GIFUJ) en 2006.....	20
Figura 11.	Ubicación del páramo de Sumapaz.....	21
Figura 12.	Páramo de Sumapaz. Laguna Chisacá, 3700 m.s.n.m...	22
Figura 13.	Esquema general de la obtención de extractos y fracciones de las tres especies.....	25
Figura 14.	Cromatografía capa delgada de la fracción Aps 1 y Aps 2 de <i>G. hirsuta</i> .....	37
Figura 15.	Cromatografía capa delgada de la fracción Aps 1 y Aps 2 de <i>P. ledifolia</i> .....	38

Figura 16.	Cromatografía en capa delgada de la fracción Aps 1 Aps 2 de <i>S. pampae</i> .....	39
Figura 17.	Cromatografía CCD del extracto etanólico total de: M1 <i>Senecio pampae</i> . M2 <i>Gynoxys hirsuta</i> . M3. <i>Pentacalia ledifolia</i> .....	41
Figura 18.	Cromatografía CCD y CCDB de la fracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de la especie <i>P. ledifolia</i> .....	42
Figura 19.	CCD y CCDB de la fracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de la especie <i>P. ledifolia</i> .....	43
Figura 20.	CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>G. hirsuta</i> .....	44
Figura 21.	CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>S. pampae</i> .....	45
Figura 22.	CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>S. pampae</i> .....	47
Figura 23.	CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>G. hirsuta</i> .....	48
Figura 24.	CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>G. hirsuta</i> .....	50
Figura 25.	Cromatograma de gases de la fracción Aps 1 de la especie <i>Gynoxys hirsuta</i> .....	52
Figura 26.	Ruta de fragmentos de alcaloides pirrolizidínicos tipo otonecina.....	54
Figura 27.	Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención (5.234 min) de la fracción Aps 1 <i>Gynoxys hirsuta</i> .....	55
Figura 28.	Ruta de fragmentación de alcaloides pirrolizidínicos saturados diésteres.....	57
Figura 29.	Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención (4.496 min) de la fracción Aps 1 <i>Gynoxys hirsuta</i> .....	58

Figura 30.	... Cromatograma de gases de la fracción Aps 2 de la especie <i>Gynoxys hirsuta</i> .....	59
Figura 31.	Cromatograma de gases de la fracción Aps 2 de la especie <i>P. ledifolia</i> .....	61
Figura 32.	Cromatograma de gases de la fracción Aps 2 de la especie <i>S. pampae</i> .....	63
Figura 33.	Espectro de masas del compuesto, con tiempo de retención (18.019 min) identificado por CG-EM de la fracción Aps 2 de <i>S. pampae</i> . A. EM de la fracción Aps 2 B. EM de la biblioteca NIST 05 C. Estructura propuesta: Seneciofilina.....	66
Figura 34.	Espectro de masas del compuesto, de la fracción Aps 2 de la especie <i>S. pampae</i> con un tiempo de retención (18.019 min).....	67
Figura 35.	Ruta de fragmentación característica para Aps macrocíclicos tipo retronecina.....	68
Figura 36.	Espectrometría de masas de cumarinas.....	70
Figura 37.	Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención (15.349 min) identificado por GC-MS de la fracción Aps 2 de <i>S. pampae</i> . A. EM con tiempo de retención 15.349 B. EM de la biblioteca NIST 05 C. 7 hidroxi-6-metoxi-2H-benzopirena-2-ona.....	71
Figura 38.	Fragmentos de masas propuestos para el compuesto espatulenol.....	73
Figura 39.	Espectro de masas del compuesto espatulenol de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>G. hirsuta</i> . A. EM con tiempo de retención 11.289 B. EM de la biblioteca NIST 05 C. compuesto espatulenol.....	74
Figura 40.	Espectro de masas de 6,6 metilenbis (2-ter-butil-4 metilfenol) con tiempo de retención (20.577 min)	

	identificado por CG-EM en las tres especies. A. EM con tiempo de retención 20.577. B. EM de la biblioteca NIST 05 C. compuesto 6,6 metilenbis (2-ter-butil-4 metilfenol).....	76
Figura 41.	Ruta de fragmentación del compuesto gamma sitoesterol.....	78
Figura 42.	Espectro de masas del compuesto Gamma–sitoesterol con tiempo de retención (25.772 min) identificado por CG-EM en la especie <i>S.pampae</i> . A. EM con tiempo de retención25.772 B. EM de la biblioteca NIST 05. C. compuestogamma sitoesterol.....	79

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Cromatograma CG-EM del extracto $\text{CHCl}_3$ de la especie <i>Gynoxys hirsuta</i> Wedd.....	92
Anexo 2.	Compuestos químicos identificados por el CG-EM de la fracción $\text{CHCl}_3$ de la especie <i>Gynoxys hirsuta</i> Wedd.....	93
Anexo 3.	Cromatograma de gases de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>Gynoxys hirsuta</i> Wedd.....	95
Anexo 4.	Compuestos químicos identificados por el CG-EM de la fracción Éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>Gynoxys hirsuta</i> Wedd.....	98
Anexo 5.	Cromatograma de gases de la fracción Diclorometano del extracto etanólico de la especie <i>Gynoxys hirsuta</i> Wedd....	99
Anexo 6.	Compuestos químicos identificados por el CG-EM de la fracción Diclorometano del extracto etanólico de la especie <i>G. hirsuta</i> .....	100
Anexo 7.	Cromatograma de gases de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie <i>Gynoxys hirsuta</i> Wedd....	101
Anexo 8.	Compuestos químicos identificados por el CG-EM de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie <i>G. hirsuta</i> .....	102
Anexo 9.	Cromatograma de gases de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>Pentacalia ledifolia</i> ....	103
Anexo 10.	Compuestos químicos identificados por CG-EM de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie <i>P. ledifolia</i> .....	104
Anexo 11.	Cromatograma de gases de la fracción diclorometano del extracto etanólico de la especie <i>Pentacalia ledifolia</i> .....	105
Anexo 12.	Compuestos químicos identificados por el GC-MS de la fracción $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ del extracto etanólico de la especie <i>P. ledifolia</i> .....	106

Anexo 13.	Cromatograma de gases de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie <i>Pentacalia ledifolia</i> .....	107
Anexo 14.	Compuestos químicos identificados por el CG-EM de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie <i>P. ledifolia</i> .....	108
Anexo 15.	Cromatograma de gases de la fracción CHCl <sub>3</sub> del extracto etanólico de la especie <i>Senecio pampae</i> .....	109
Anexo 16.	Compuestos químicos identificados por el CG-EM de la fracción CHCl <sub>3</sub> del extracto etanólico de la especie <i>P. ledifolia</i> .....	110
Anexo 17.	Cromatograma CG de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie <i>Senecio pampae</i> .....	111
Anexo 18.	Compuestos químicos identificados por el GC-MS de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie <i>Senecio pampae</i> .....	112

“Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y conclusiones anotadas son responsabilidad sólo del autor y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana”

Artículo 9.18 del reglamento de los trabajos de grado y de investigación agosto 1989

## RESUMEN

El estudio de la variabilidad química de extractos y fracciones de tres especies de la tribu *Senecioneae* de la familia Asteraceae se realizó con la intención de determinar los metabolitos secundarios principales de la tribu: alcaloides pirrolizidínicos, derivados de eremofilano, cumarinas y quinoles, en las plantas *Gynoxys hirsuta*, *Pentacalia ledifolia* y *Senecio pampae* con el fin de considerar a estos como marcadores quimiotaxonómicos de la tribu.

Para la obtención de los extractos y fracciones se realizaron extracciones sucesivas con solventes de distinta polaridad (CHCl<sub>3</sub>, EtOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt) y en el tamizaje fitoquímico se emplearon técnicas sencillas de análisis cualitativo: pruebas químicas, análisis cromatográfico: cromatografía en capa delgada, cromatografía en capa delgada bidimensional y CG-EM.

Los resultados obtenidos permitieron comprobar la variabilidad de compuestos que están presentes en las hojas de las tres especies. Mediante la técnica CG-EM se identificaron alcaloides pirrolizidínicos, cumarinas, terpenos, fenoles, esteroides, hidrocarburos saturados e insaturados y ácidos grasos y por cromatografía CCD y CCDB se detectaron cumarinas en las especies *G. hirsuta*, *S. pampae* y *P. ledifolia* por presentar fluorescencias celestes con luz u.v en onda larga, quinoles en las especies *G. hirsuta* y *P. ledifolia* observándose coloraciones amarillo ocre al ser reveladas con KOH al 10% y furanoeremofilanos en las especies *S. pampae* y *G. hirsuta* por presentar fluorescencias verdes bajo luz u.v en onda larga.

Para la detección de alcaloides pirrolizidínicos se tuvo en cuenta la metodología propuesta por (Bicchi, C *et al* .1989), donde se presentaron posiblemente alcaloides pirrolizidínicos en las especies *G. hirsuta* y *S. pampae*, teniendo en cuenta que la cromatografía de gases en combinación con la espectrometría de

masas, es la técnica más usada para la identificación de alcaloides pirrolizidínicos (Witte *et al.* 1993).

## INTRODUCCION

La tribu *Senecioneae* contiene cerca de 3000 especies siendo la más grande de las 13 tribus de la familia de las Asteraceas (Romo de Vivar *et al.* 2007). La tribu en Colombia está representada en 19 géneros y alrededor de 300 especies incluyendo el más grande género *Senecio*. En el presente estudio se tuvo en cuenta la clasificación propuesta por Bremmer y Jansen (Bremmer.1994 y Jansen. 1990) y desde el punto de vista químico por Harborne y Mabry (Harborne y Mabry. 1982). La tribu *Senecioneae* está dividida en dos subtribus: *Senecioninae* y *Tussilagininae*, el género *Senecio* y *Pentacalia* (subtribu *Senecioninae*) y *Gynoxys* (subtribu *Tussilagininae*) (Romo de Vivar *et al.* 2007), la mayoría de estas especies contienen alcaloides pirrolizidínicos (Aps) y derivados de eremofilano como metabolitos secundarios principales. Los alcaloides pirrolizidínicos (Aps) son considerados metabolitos secundarios importantes por su actividad biológica y propiedades toxicológicas (Witte *et al.* 1993), sin embargo su uso medicinal es atribuido a otro tipo de metabolitos entre ellos a los terpenos conocidos con actividad antimicrobial (Bolzan, A. 2007).

La importancia de los metabolitos secundarios como marcadores quimiotaxonómicos en especies vegetales es ampliamente reconocido, ya que permite resolver problemas de clasificación botánica, como lo es también la importancia del papel que juegan durante la relación planta-herbívoro o planta-patógeno. Esto ha dado un intenso desarrollo a las técnicas de aislamiento y en el campo de bioensayos para la detección de la actividad biológica producidos por plantas.

Por otra parte, el grupo de investigación fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ), ha venido ampliando sus investigaciones en el estudio de nuevas y diversas plantas Colombianas, con el fin de identificar nuevos

metabolitos secundarios de interés biológico o contribuyendo a la quimiotaxonomía.

De la especie *Gynoxys hirsuta* hasta el momento no se conocían estudios publicados, con este trabajo se contribuyó al estudio quimiotaxonómico de la especie. Se ha propuesto caracterizar los metabolitos secundarios principales mediante diferentes técnicas y hacer una comparación con las especies ya antes estudiadas *Pentacalia ledifolia* y *Senecio pampae* por el grupo (GIFUJ) de la Pontificia Universidad Javeriana para mostrar sus posibles diferencias y similitudes con el fin de contribuir a la quimiotaxonomía a nivel de género y especie.

## OBJETIVOS:

- Determinar la presencia de los principales metabolitos secundarios : alcaloides pirrolizidínicos, derivados de eremofilano, cumarinas y quinoles de la tribu *Senecioneae* ,en extractos y fracciones de las especies *Gynoxys hirsuta* , *Pentacalia ledifolia* y *Senecio pampae*
- Contribuir al estudio quimiotaxonómico de la especie *Gynoxys hirsuta* (subtribu *Tussilagininae*, Tribu *Senecioneae*), estableciendo sus posibles diferencias y similitudes con dos especies de la subtribu relacionada *Senecioninae*: *Pentacalia ledifolia* y *Senecio pampae*.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y TAXONÓMICOS

#### 1.1.1 Tribu *Senecioneae*

La tribu *Senecioneae* contiene cerca de 3000 especies siendo la más grande de las 13 tribus de la familia de las Asteraceas (Romo de Vivar *et al.* 2007). El género tipo *Senecio* es el más rico de la familia debido al número de especies que agrupa. Dentro de la tribu el mayor problema sistemático corresponde a la clasificación de *Senecio*, género gigante y polifilético, entidad que se ha reducido progresivamente al ser separado como nuevos géneros en varios grupos monofiléticos, quedando integrado para un grupo parafilético y más homogéneo, basados en los caracteres plesiomórficos (Bremer.1994).

#### 1.1.2 Subtribus de la tribu *Senecioneae*

Las especies de este estudio pertenecen a las subtribus *Senecioneae*: *Senecio pampae* y *Pentacalia ledifolia* y Subtribu *Tussilagininae*: *Gynoxys hirsuta*.

La tribu *Senecioneae* fue propuesta por Cassini en 1819, pero el concepto de tribu vino a consolidarse gracias a los trabajos de Bentham y Hooker en 1873, alcanzando desde entonces una amplia aceptación y conservándose como tal por más de un siglo.

Bentham llegó a reconocer cuatro subtribus, que en la nomenclatura actual corresponde a los conceptos de *Senecioninae*, *Liabinae*, *Tussilagininae* y *Othoninae*. Hoffman en 1892 propuso un concepto tribal bastante similar, pero en la que tal solo se reconocían tres subtribus, por haber fusionado, las *Tussilagininae* con las *Senecioninae*.

Aunque existen diferencias notables, la mayoría de los autores reconocen como subtribus dos grupos, así: *Senecioninae* (como subtribu más grande y natural), en

la que se incluyen las antiguas *Tussilagininae*, así como las *Othoninae*, *Adenostylinae*, *Luininae* y *Blennospermatinae*, en tanto que otros autores reconocen tres subtribus: *Blennospermatinae*, *Senecioninae* y *Tussilagininae* (En Correa. 2002). En la actualidad se reconocen tres grupos: la subtribu *Blennospermatinae*, pequeña y más bien aislado, y las dos subtribus más grandes, subtribu *Senecioninae* y *Tussilagininae*. Las dos últimas constituyen un grupo monofilético bien circunscrito, pero la inclusión de *Blennospermatinae* en las *Senecioneae* debe ser considerada como tentativa (Bremer. 1994).

#### **1.1.2.1 Subtribu *Tussilagininae*: Género *Gynoxys*; *Gynoxys hirsuta* Wedd**

La subtribu *Tussilagininae*, con 48 géneros y alrededor de 730 especies, es el segundo grupo más grande dentro de la tribu *Senecioneae*. Los miembros de este taxón son abundantes en Eurasia, Australia y en Norte y Suramérica, mientras que en África están casi ausentes, excepto por el género *Tussilago* y algunas especies de *Doronicum*.

Según Bremer (1994) dentro de este grupo los géneros Andinos *Aquatorium*, *Paracalia* y *Paragynoxys* están mutuamente relacionados entre sí y con *Gynoxys* se presume que está estrechamente relacionada con otros tres géneros de arbustos y árboles de hojas opuestas: *Cabrieriella* y *Scrobicarea* de los Andes y *Heterodotia* de la Isla Española (Bremer. 1994).

#### **Descripción Botánica del género *Gynoxys***

Arbusto de 1-2 m, de corteza marrón levemente tomentosa, ramas canaliculadas. Hojas opuestas, carnosas o gruesocoríceas; peciolo de 1.0-2.5 cm de longitud, lámina ovada, de 1.5 – 6.1 cm de longitud x 0.8-2.8 cm lat, base truncada, ápice agudo, haz foliar bullada, completamente glabra y nítida, envés cubierto de un denso indumento lanoso, deciduo al tacto, nerviación reticulada, nervios secundarios pábulos de 8-15 por lado, provenientes en el envés, margen entera, revoluta. Inflorescencias piramidales, con ramas y pedúnculos gruesos

ydensamente lanosos; pedúnculos y pedicelos cubiertos por abundantes bractéolas triangulares de menos de 2 mm de longitud. Capítulos heterógamos, radiados cálculo nulo; involucre formado por 8 filarias, gruesas –caricáceas, ligeramente biseriadas, las externas 3, elípticas, de 7.5 mm de longitud x 3 mm lat, dorsalmente lanosas y con ápice agudo, las internas 5, oblongoovadas, de 7- 8 mm long x 3-3.5 mm lat, medialmente lanosas en el dorso, con el ápice obtuso y las márgenes escariosas. Flores radiadas, femeninas, liguladas, 4 por capitulo, corola glabra, de 8.5 – 9 mm de longitud. tubo de 3.5 -4.0 mm longitud, limbo 5 mm de longitud 2-3 dentado, ramas estigmáticas 1.8 x 0.3 mm, lisas, glabras, flósculos hermafroditas, 17-18, corola infundibuliforme, glabra, de 8.0 -9.5 mm long, tubo de 3-4 mm long, limbo de 4-5.5 mm de long, 5 lobulado, lobulos 2 mm longitud, triangulares; anteras ca 3mm longitud, base caudada, apéndice apical lanceolado, agudo, ramas del estilo lineares, contortas (Diaz,P *et al.* 2002).

### ***Gynoxys hirsuta* Wedd**

Sinónimo: *Gynoxys hirsutissima* Cuatrec.

Arbolito. Peciolos 3-5 m de largo; lámina 3-6.2 x 1.5 -3 cm, ovada a elíptica, envés velloso-tormentoso, base simétrica y cordada, margen revoluta, ápice obtuso, nervadura por el envés oculta por el indumento, excepto por la vena media. **Involucro** 0.6-1.1cm de largo; filarias 6-10X2-2.4 mm. **Lígulas** 0.9-1 cm de largo; limbo 2-2.4 mm de ancho; estaminodios incluidos dentro del tubo. **Flósculos** 6.8 – 9.1mm de largo. **Aquenio** 2.4 – 2.8 mm de largo. Se encuentra distribuida en los páramos Colombianos, estado de floración enero y diciembre (Diaz, Pet *al.* 2002).

## **Categorías taxonómicas**

**Nombre científico:** *Gynoxys hirsuta* Wedd

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Astereceae

Tribu: Senecioneae

Genero: *Gynoxys*

Especie: *hirsuta*

Autor Epíteto Especifico: Wedd

COL: 8114 HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO

**Figura 1.** *Gynoxys hirsuta* Wedd. Páramo de Sumpaz, Laguna Chisacá. Fuente: Autor



Figura 2. *Gynoxys hirsuta* Wedd. Páramo de Sumpaz, Laguna Chisacá



Fuente: Autor

#### 1.1.2.1 Subtribu *Senecioninae*, Género *Senecio*; *Senecio pampae*

*Senecio pampae* es un arbusto de 50 a 100 cm de altura, ramoso, con ramas redondeadas, glabras, hojosas, hasta la inflorescencia. Entrenudos de 5-10 mm de longitud, hojas alternas, sésiles, lineal lanceoladas, atenuadas y agudos en el ápice, atenuadas en la base, más o menos profundamente aserradas en el margen hasta sublobadas, con dientes agudos de 0.5 -5 mm de largo, glabras en ambas caras, de 40 a 70 mm de longitud por 2.5 a 10 mm de anchura, capítulos numerosos, radiados, dispuestos en cimas curimbiformes, densas en los ápices de las ramas, pedicelos de 3 a 10 mm de largo bracteolados. Involucro acompañado,

caliculado, de 6 a 8 mm de altura por 5-6 mm de diámetro, algo más corto que las flores del disco. Bractéolas del cálculo pocas, cortas, lineales, filarias 12-14 oblongo, laceoladas, agudas, glabras. Flores amarillas, dimorfas, las marginales cerca de 8, femeninas, liguladas, con tubos de unos 4 mm y lígula elíptica de 7-8 mm de largo por 2.5 mm de ancho. Flores del disco numerosas, hermafroditas, con corola tubulosa de 7 mm de largo. Aquenios cilindráceo, costados glabros, de 4 mm. Pappus blancos (Fedde, P.1910).

### **Categorías taxonómicas**

**Nombre científico:** *Senecio pampae*

Reino Plantae

Phylum: Magnoliophita

Clase: magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Tribu: Senecioneae

Subtribu: Senecioninae

Genero: Senecio

Especie: *pampae*

COL: 361473 HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO

**Figura 3. Especie *Senecio pampae*, vía Ubate**



**Fuente: Autor**

### **1.1.2.3 Subtribu *Senecioninae*: Género *Pentacalia*; *Pentacalia ledifolia***

El género *Pentacalia* fue propuesto por Cassini en 1827, ligando tal concepto con una característica poco común en la tribu Senecioneae, donde los aquenios son gruesos y pentagonales, este concepto permaneció olvidado hasta que en 1978, H. Robinson y Cuatrecasas los retomaron. La forma más típica del género está caracterizada por el hábito, por la posesión de las inflorescencias mas tirsoideas, capítulos discoideos, receptáculos no escrobiculados, aunque ninguna de estas características es exclusiva del género.

El género *Pentacalia* se divide en dos subgéneros: *Pentacalia* y *Mocrochaeta*, los cuales fueron establecidos en 1981, por José Cuatrecasas, estos subgéneros se pueden diferenciar fácilmente por el hábito: los primeros son fruticosos con tallo

aéreo y ramas semiapoyantes y escandentes, los tallos a veces en partes subterráneas, generalmente con hojas más grandes, y los segundos son fructices o fructículos erectos, aveces postrados, generalmente con hojas más pequeñas.

El género incluye aproximadamente unas 217 especies, para Colombia han resultado un total de 94 especies de las cuales 50 pertenecen al subgénero *Pentacalia* y 44 al subgénero *Microchaeta*. Este hecho pone de manifiesto que la zona norte de los Andes Colombianos es el epicentro de este género y, desde donde ha irradiado hacia el norte y el este del continente Americano: son 13 las especies que prosperan en Centroamérica, 32 en Venezuela, 42 en Ecuador, 60 en Perú y 15 en Bolivia (Diaz, S *et al.* 1999).

### **Categorías taxonómicas**

**Nombre científico:** *Pentacalia ledifolia* (Kunth) Cuatrec.

Sinónimo: *Cacalia ledifolia*

*Cacalia lanata*

*Senecio lanatus*

Nombre Vulgar: “Huasquin” (Cundinamarca)

Arbusto de 2 m de alto, bien ramificado, tallos amarillentos, escamosos y con cicatrices por la base persistente de las hojas, hojas alternas, cortamente pecioladas, elíptico-lanceoladas, ápice agudo, base atenuada 1.0-1.5 cm de largo, 3 mm de ancho, crece en altura de 3.000-3200 m.s.n.m (Cardenas, L.1998).

## **Categorías taxonómicas**

**Nombre Científico:** *Pentacalia ledifolia*

Reino Plantae

Phylum: Magnoliophita

Clase: magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Tribu: Senecioneae

Subtribu: Senecioninae

Género: *Pentacalia*

Especie: *ledifolia*

COL: 012549 HERBARIO PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Figura 4. Especie *Pentacalia ledifolia* (Kunth) Cuatrec. Páramo de Sumapaz



Fuente: Autor

## 1.2 ANTECEDENTES QUÍMICOS DEL GÉNERO DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

Los constituyentes químicos característicos de la tribu *Senecioneae* son los alcaloides pirrolizidínicos como la Senecionina y los terpenoides con esqueleto furano-eremofilano (6-cetofuranoeremofilano), la presencia o ausencia de estos caracteres químicos apoyan la segregación de los diferentes especies en los géneros y los géneros en las subtribus.

En una revisión de las especies mexicanas de la tribu *Senecioneae* muestra, que los géneros *Senecio* y *Packera* (subtribu *Senecioninae*) y los géneros *Barkleyanthus*, *Pittocaulium*, *Psacarium* y *Telanthophora* (subtribu *Tussilagininae*) contienen alcaloides pirrolizidínicos y derivados de eremofilano como metabolitos secundarios principales. Sin embargo de *Roldana* y *Robinsonecio* (subtribu *Tussilagininae*) no se han aislado alcaloides pirrolizidínicos (Aps). Un caso especial es el género *Pseudogynoxys* para el cual no se han reportado ni eremofilanos ni alcaloides pirrolizidínicos (Romo de Vivar *et al.* 2007).

### **1.2.1 Química del género *Gynoxys***

Aunque a nivel de género ha sido poco estudiada, existen reportes bibliográficos describiendo que, químicamente tienen como metabolitos secundarios principales furanoeremofilanos, en otras especies de *Gynoxys* se ha encontrado sorpresivamente diterpenos de tipo kaurano, siendo los furanoeremofilanos los compuestos mas comunes en el género (Jakupovic, J *et al.* 1995)

### **1.2.2 Química del género *Pentacalia***

El grupo de investigación en Fitoquímica (GIFUJ) de la Pontificia Universidad Javeriana, dentro de sus proyectos de investigación ha aislado e identificado como metabolitos secundarios característicos de esta tribu los quinoles, cumarinas, derivados de eremofilano, considerándose como metabolitos secundarios principales de esta tribu.

Sin embargo, existen pocos estudios fitoquímicos reportados del género *Pentacalia*; se han aislado friedelina, cicloartenos y una aceite esencial constituido principalmente por alfa-humuleno, Beta-farneseno, santanelo, isocumeno y otros sesquiterpenos altamente oxigenados de las especies *P. andicola*, *P. archeri* y *P. epiphytica* (Bohlmann, F *et al.* 1984)

Diversos estudios realizados por el grupo (GIFUJ) de la Pontificia Universidad Javeriana en el género *Pentacalia*, han podido establecer que este género se

caracteriza por presentar un alto contenido de cumarinas y quinoles (Granados. 2000) y algunos otros compuestos como flavonoides, esteroides y cicloartenol en *Pentacalia nítida* (Trillos, C. 1992), eicosanol y estigmasterol en *Pentacalia pulchella* (Forero, C. 1994). Algunos metabolitos secundarios encontrados en el género *Pentacalia* son mostrados en la siguiente tabla.

**Tabla 1. Algunos metabolitos identificados en el género pentacalia.**

Fuente: Autor

<i>Pentacalia</i>	Sustancias aisladas	Fuente
<i>Pentacalia andicola</i> <i>Pentacalia archeri</i>	Triterpenos: Oleano, Friedelano, Germacranos, nerolidol	BOLMHAN, F y ZIESCHE J. En:Phytochemistry.1979.Vol 18.p 1489
<i>P.corymbosa</i> <i>P.ledifolia</i>	Cumarinas: 7-geranil escopoletina, escopoletina, Quinoles: Jacaranona y metil jacaranona	GRANADOS, A.2000 Estudio Químico comparativo de tres especies de <i>Pentacalia</i>
<i>P.nitida</i>	Flavonoides tipo flavona, mezclas de ácidos grasos, esteroides	TRILLOS, Celia. 1992. Aislamiento de compuestos mayoritarios de <i>Pentacalia</i> <i>nítida</i> .

### **1.2.3. Química del género *Senecio***

Más de 180 especies relacionadas con el género *Senecio* han sido estudiadas, siendo los sesquiterpenos de tipo derivados de eremofilano y los alcaloides pirrolizidínicos (Romo de Vivar et al. 2007) los compuestos más comúnmente encontrados.

## **1.3 ANTECEDENTES QUIMIOTAXONÓMICOS**

Por ejemplo en el género *Senecio* (Asteraceae) se encuentran como constituyentes químicos característicos de la tribu Senecioneae como: los alcaloides pirrolizidínicos y terpenoides con esqueleto furanoeremofilano como el angelato de 10 $\beta$ -H europsonol<sup>2</sup>, (Bohlmann et al. 1984).

El género *Pentacalia* (Asteraceae) fue incluido dentro de un amplio género *Senecio* (Nordestam et al. 1977), pero posteriormente fue separado nuevamente (Robinson y Cuatrecasas. 1978). Así, especies del género *Senecio* como *Senecio andicola* y *Senecio firmipes* fueron segregadas y colocadas dentro del nuevo género *Pentacalia*.

El estudio fitoquímico efectuado posteriormente a esas dos plantas (Bohlmann et al. 1984) reveló la inexistencia de alcaloides pirrolizidínicos y de furanoeremofilanos que son metabolitos característicos de las especies del género *Senecio*. La ausencia de esos caracteres químicos apoya la segregación de las especies en los géneros y los géneros en las subtribus.

## **1.4 METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA TRIBU *Senecioneae***

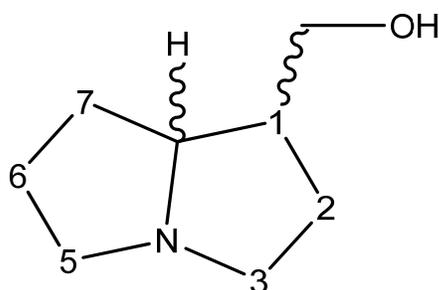
### **1.4.1 Alcaloides pirrolizidínicos**

Los alcaloides pirrolizidínicos (Aps) se encuentran en plantas cada vez con mayor frecuencia en todo el mundo. Son encontrados frecuentemente en la familias: *Boraginaceae*, (*Heliotropium*, *Trichodesma*, *Symphytum* y otros géneros),

*Compositae* (*Senecio*, *Eupatorium* y otros géneros de la tribu *Senecioneae* y *Eupatoriae*), *Leguminosae* (género *Crotalaria*).

Los alcaloides pirrolizidínicos son tóxicos en animales y humanos (Cheeke, P. 1989). Son productos naturales que contienen cualquiera de los cuatro isómeros de la 1 hidroximetilpirrolizidina, en esta molécula, llamada necina (Ver figura 5). Ellos pueden tener un doble enlace en el carbono 1, un grupo OH en el carbono C-7, y en la posición 2 y 6 pueden ser oxidados (Romo de Vivar *et al.* 2007).

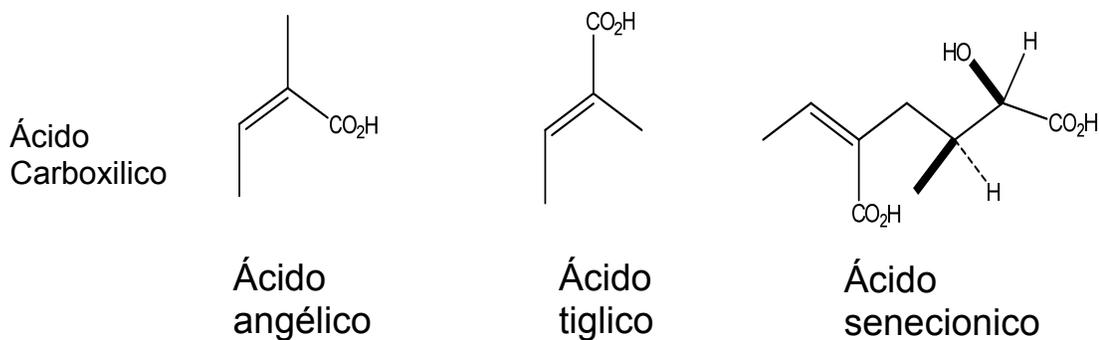
**Figura 5. Estructura básica de una necina**



Necina

Los grupos hidroxilos pueden ser esterificados por ácidos monocarboxilo como el angélico, el tíglico, o ácidos dicarboxilos como el ácido senecionico, como muestra la siguiente figura (figura 6):

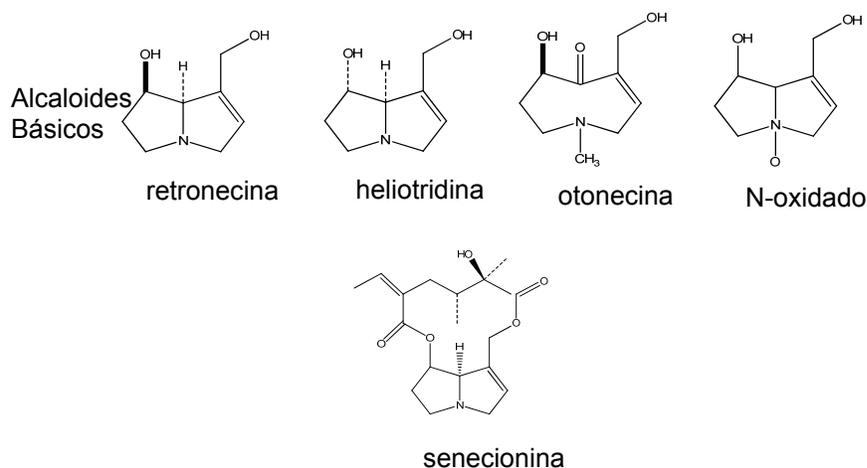
**Figura 6. Estructuras de los ácidos monocarboxilos y dicarboxilos**



Fuente: Romo de Vivar *et al.* 2007

Los alcaloides pirrolizidínicos en sus esqueletos básicos pueden presentarse como retronecina, otonecina o heliotridina, siendo altamente tóxicos. La toxicidad incrementa cuando el ester cíclico es presentado como en senecionina (ver figura 7). La base necínica puede ser 1, 2 –insaturada o saturada (Romo de Vivar *et al.* 2007).

**Figura 7. Alcaloides pirrolizidínicos básicos según su estructura química**

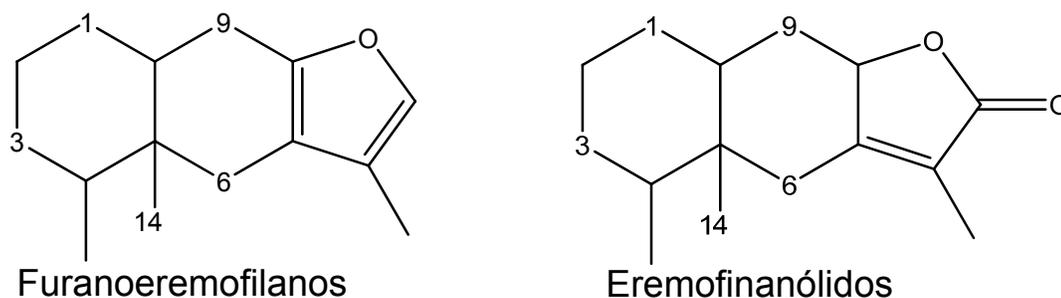


Fuente: Romo de Vivar *et al* 2007

#### 1.4.2. Derivados de eremofilano

Los sesquiterpenos conocidos como eremofilanos contienen, en su esqueleto básico, un sistema llamado decalin encontrados como furanos o eremofinanólidos (ver figura 8).

**Figura 8. Estructuras básicas de furanoeremofilanos y eremofinanólidos respectivamente**



Fuente: Romo de Vivar *et al* 2007

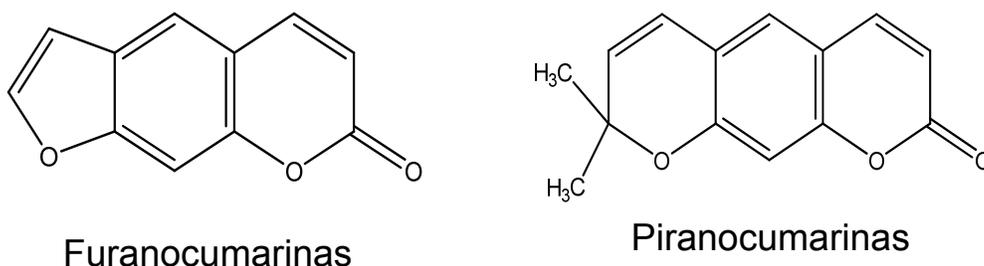
### 1.4.3 Cumarinas

Las cumarinas se constituyen un grupo importante de compuestos naturales; se les considera derivados de la lactona del ácido *o*-hidroxicinámico, usualmente llamado cumarina.

Su núcleo es La propiedad física más importante de estos compuestos produciendo fluorescencia generada con luz ultravioleta (365 nm), propiedad ampliamente usada para su detección (Arango, A. 2010).

Las cumarinas se encuentran con frecuencia en los extractos de *Leguminosas*, *Orchidaceae*, *Rutaceae* y *Umbeliferae*, y en cualquiera de los órganos vegetales, desde raíces hasta flores y frutos. Hay muchas cumarinas (ver figura 9) con una o varias cadenas de isopreno, como la suberosina y colombianetina, o con un anillo furano (furanocumarinas) ó con un pirano (piranocumarinas) (Ver figura 9).

**Figura 9. Cumarinas complejas**



**Fuente: Romo et al. 2007**

Estos compuestos presentan una amplio rango de actividad biológica, podemos citar: la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, la acción estrogénica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de ciertas furanocumarinas, etc., se destaca además, el uso de cumarinas como saborizantes y en perfumería (Arango, A. 2010).

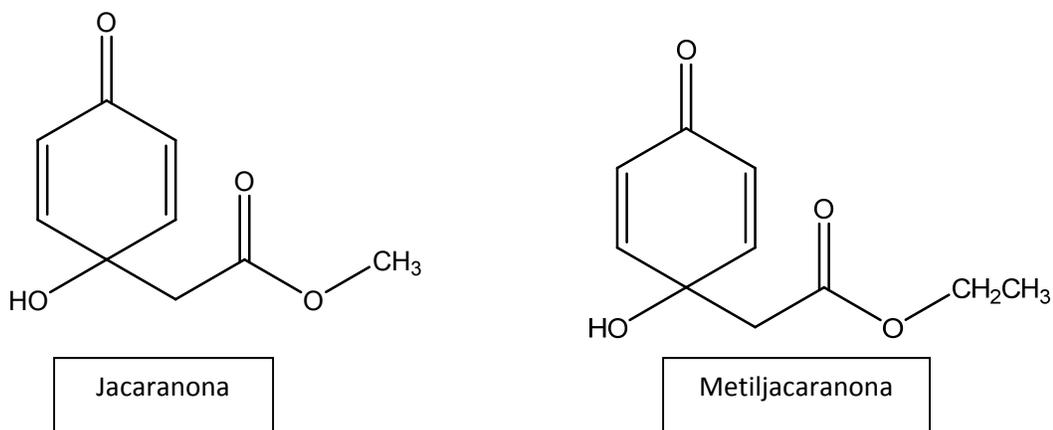
#### 1.4.4 Quinoles

Derivados quinólicos han sido obtenidos de diversas familias vegetales: Caricaceae, Salicaceae, Scrophulariaceae, Bignoniaceae entre otras, el (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexdienil) acetato de metilo llamado también jacaranona fue aislado de *Jacaranda caucana* y de *Senecio cannabinifolius*, en esta última especie también se identificó el (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienil) acetato de etilo o metiljacaranona reportándoseles una acción inhibitoria del crecimiento de la larva *Spodoptera litura*, un díptero que ataca plantas de tabaco (Pedrozo, J *et al.* 2006). Aislados del género *Pentacalia* por el grupo (GIFUJ) de la pontificia Universidad Javeriana.

Son compuestos muy escasos en la naturaleza, comúnmente son reconocidos como feniletanoides que, en cromatografía en capa delgada con silica gel 60G, revelan amarillo ocre cuando se usa agente revelador vainillina /H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% (Granados, A.2000).

En la figura se observa las estructuras de quinoles aislado del género *pentacalia*.

Figura 10. Quinoles aislados por el grupo (GIFUJ) en 2006.



Fuente: Pedrozo, J *et al.* 2006

## 1.5 PÁRAMO DE SUMAPAZ

Figura 11. Ubicación del páramo de Sumapaz



fuelle:<http://www.parquesnacionales.gov.co/PNN/portel/libreria/php/decide.php?patron=01.02022006>

El páramo Colombia se encuentra en nuestras cordilleras entre las altas montañas andinas y las cimas cubiertas de nieve perpetua. Solamente en Colombia, Ecuador y Venezuela existen, pero es Colombia la que más páramos poseen llegando al 98% de la totalidad y sobre todo tiene el páramo más grande del planeta, el Sumapaz (Cuatrecasas. 1958).

Del norte hacia el sur se extiende otro cordón cordillero con altura ligeramente superior a los 4.000 m.s.n.m, que separa la parte occidental del páramo de la región oriental caracterizada por su fuerte accidentalidad.

El suelo del páramo está cubierto en casi todas partes por una vegetación tupida, donde predominan la paja y el frailejón, acompañados de musgos cuya capacidad de absorción es muy grande. Aquí todo es tierra negra muy permeable, que hace del suelo una verdadera esponja, convirtiéndola en un inmenso depósito de agua cuya importancia ecológica es invaluable. Estos suelos son bastantes ácidos y tienen un alto contenido de sodio y potasio.

Esta radiación solar, hace que la luminosidad en el páramo sea altísima, ha generado importantes adaptaciones en las plantas para protegerse de ella, reflejándola por ejemplo, con las hojas plateadas o casi blancas, vidriosas y brillantes, o coloradas de tonos parduscos o rojizos, tan frecuentes en la vegetación del páramo.

El clima del páramo es básicamente frío y húmedo, sobre todo por la noche. La temperatura va variando con la altitud, estimándose en medio grado centígrado la baja térmica por cada 100 m de ascenso. Las oscilaciones diarias de temperatura son muy marcadas, varios autores concuerdan en que dichas variaciones pueden alcanzar 25°C grados, es decir entre  $-8^{\circ}\text{C}$  en la madrugada, hasta  $+17^{\circ}\text{C}$  en días soleados.

Estas alteraciones bruscas de temperatura determinan cambios muy fuertes en la humedad relativa, que puede variar de 50% a más de 90% en algunas horas. Este hecho contribuye considerablemente a la presencia de una vegetación de aspectos xerofítico, que caracteriza el paisaje paramuno (Guhl, N. 1982).

**Figura 12. Páramo de Sumapaz. Laguna Chisacá, 3700 m.s.n.m Fuente: Autor**



## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 RECOLECCION DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal de las tres especies de este estudio (hojas) se recolectó en estado de floración y se empaco en bolsas plásticas, se transportó debidamente hasta el laboratorio de fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana, en donde se colocaron y se organizaron para su secado a una temperatura adecuada, de tal manera que no le llegara tampoco demasiada luz, por un periodo de 3 semanas. En la tabla 2 se muestra las características del sitio de recolección, el número de recolección, el herbario y la cantidad recolectada de las tres especies y el número de colección:

Tabla 2. Sitios de recolección y características de las especies

<b>Especie</b>	<b>s. recolección</b>	<b>No. Col.</b>	<b>Herbario</b>	<b>Cantidad</b>
<b><i>Gynoxys hirsuta</i></b>	En el páramo de Sumapaz, vía Usme, cerca de la Laguna Chisacá a 3700 m.s.n.m.	8114	Nacional Colombiano (COL)	359 g
<b><i>Pentacalia Ledifolia</i></b>	En el páramo de Sumapaz, vía Usme, cerca de la Laguna Chisacá a 3700 m.s.n.m.	012549	Pontificia Universidad Javeriana (HPUJ)	473 g
<b><i>Senecio pampae</i></b>	En la vía Chía -Zipaquirá	361473	Nacional Colombiano (COL)	20 g

## 2.2 OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA TRIBU *Senecioneae*

### 2.2.1 Obtención de fracciones Aps 1 y Aps 2

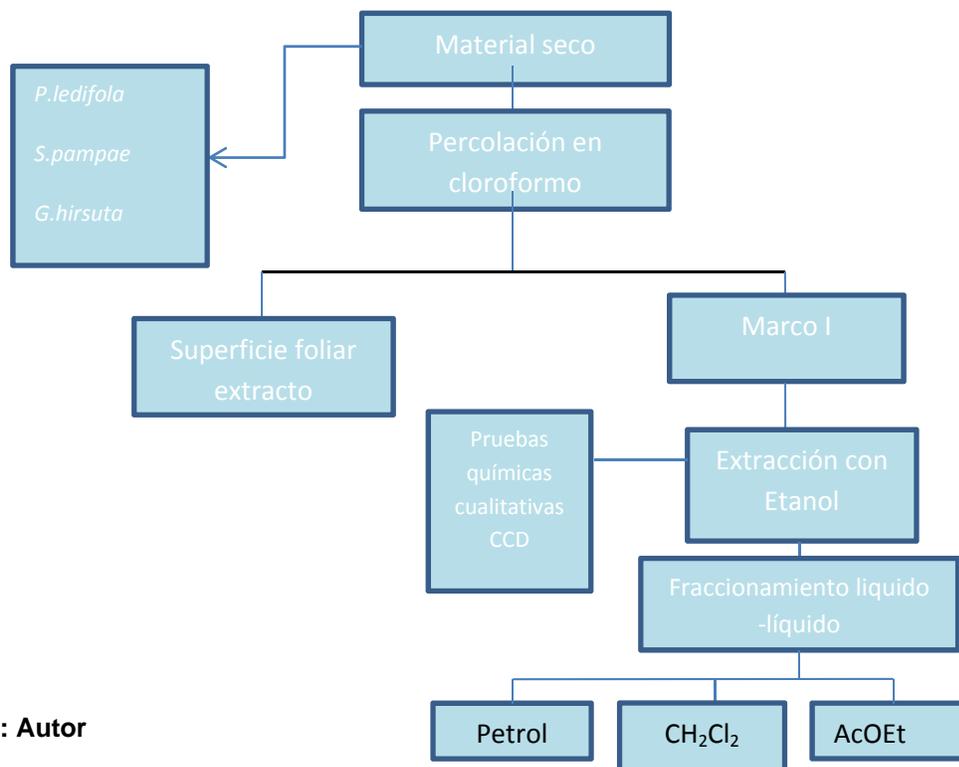
Para la obtención de las fracciones alcaloidales se tuvo en cuenta la metodología propuesta por Bicchi (Bicchi, C *et al.* 1989).

Se peso del material vegetal seco y molido (hojas), *Pentacalia ledifolia* (50 gramos), *Senecio pampae* (20 g) y *Gynoxys hirsuta* Wedd (500 g) y se sometieron a extracción con etanol en un aparato continuo tipo sohxlet durante 72 horas. El extracto se concentró en un rotaevaporador Buchi E 111, se evaporó hasta sequedad. Seguidamente se acidulo con HCl 0.5 N, se filtró, el extracto acuoso se desengraso con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la fase orgánica fue separada. La fase acuosa fue dividida en dos. La mitad de la fase acuosa fue basificada con NH<sub>4</sub>OH al 25% y llevada hasta pH 10, seguidamente se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en un embudo de decantación y se separó la fase orgánica, se adiciona 2 gramos de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para eliminar residuo acuoso y se filtra, el filtrado es evaporado hasta sequedad, se obtuvo un sólido color marrón llamado Aps 1. La otra mitad fue acidificada nuevamente con HCl 2 N y reducida con Zn durante toda la noche, se filtró, el filtrado se basificó con NH<sub>4</sub>OH al 25% hasta llevar a pH 10, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en un embudo de decantación y se separa la fase orgánica, se adicionaron 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para eliminar el residuo acuoso y se filtra, el filtrado es evaporado hasta sequedad en un rotaevaporador Buchi E 111, se obtuvo un sólido marrón llamado Aps 2 (Bicchi, C *et al.* 1989). Tanto las fracciones Aps 1 y Aps 2 fueron monitoreadas por CCD usando silica gel G60 y reveladas con Dragendorff para confirmar la presencia de alcaloides, estas fracciones fueron llevadas a la identificación por métodos espectroscópicos cromatografía de gases acoplado a masas. El siguiente esquema describe la obtención de las fracciones Aps 1 y Aps 2

## 2.2.2 Obtención de los extractos y fracciones No alcaloidales de las tres especies

Se pesaron 473 g (hojas) de *Gynoxys hirsuta* Wedd, *Pentacalia ledifolia* 359 g (hojas) y *Senecio pampae* 20g (hojas), cada especie fue tratada por percolación en un periodo de 5 minutos con cloroformo, el extracto obtenido, se evaporó hasta obtener un residuo viscoso llamado extracto clorofórmico de la superficie foliar. Al material vegetal resultante (marco I) se sometió a una extracción por maceración en frío con etanol al (90%) durante 72 horas de las especies individualmente. El extracto EtOH se floculó con 200 mL de agua destilada y se dejó reposando durante 24 horas. Seguidamente fue fraccionado mediante el método de extracción líquido-líquido utilizando solventes con polaridad creciente (Éter de petróleo, diclorometano, Acetato de etilo). La figura 13 muestra el esquema general.

Figura 13. Esquema general de la obtención de extractos y fracciones de las tres especies



Fuente: Autor

### **2.2.3 Pruebas cualitativas**

Las pruebas fitoquímicas cualitativas son pruebas químicas de caracterización consistentes en una reacción química que produce la alteración rápida en la estructura molecular de un compuesto, por ejemplo, la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un complejo de coordinación, lo cual da como resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas (Bilbao, M, R.1997).

A continuación se describen las pruebas fitoquímicas más usadas para la determinación cualitativa de los extractos y fracciones.

#### **PRUEBA DE SHINODA PARA FLAVONOIDES**

Tomar 1 mL de solución en un tubo de ensayo limpio. Añadir algunas limaduras de Mg. Sujetar el tubo con una pinza. Añadir cuidadosamente por la pared del tubo, unas gotas de HCl concentrado (37%).

La aparición de coloraciones naranja a violeta es prueba positiva para la presencia de flavonoides. Para fines de comparación realizar la prueba con 0.5 mL de una solución patrón. (Bilbao, M, R.1997).

#### **ENSAYO DE ROSENHEIM (PARA LEUCOANTOCIANIDINAS)**

Tomar 1 mL de solución acuosa en un tubo de ensayo limpio. Añadir 0.5 mL de HCl concentrado. Mezclar. Calentar durante 10 minutos a 100°C y enfriar. Pasar a un tubo de ensayo de 10 X 75 mm. Añadir 0.4 mL de alcohol amílico y agitar. Dejar separar las fases. La prueba se considera positiva si aparece coloración en la fase amílica que vaya desde el carmesí oscuro al rosado débil. (Bilbao, M, R.1997).

### ENSAYO DEL FeCl<sub>3</sub> (PARA COMPUESTOS CON HIDROXILOS FENOLICOS)

Tomar 1.0 mL de solución acuosa o alcohólica en un tubo de ensayo limpio. Añadir 1 gota de FeCl<sub>3</sub> al 1% acuoso o alcohólico. Mezclar. La aparición de colores violeta, verde, azul u oscura se considera prueba positiva.

Para fines de comparación realizar la prueba con 0.5 mL de solución patrón de ácido tánico (Bilbao, M, R.1997).

### ENSAYO DE LA GELATINA-SAL (PARA TANINOS)

Tomar 1.0 mL de solución acuosa neutra en un tubo de ensayo limpio. Añadir un 1.0 mL de solución de gelatina-sal. La formación de un precipitado se considera prueba positiva. Centrifugar si es necesario para observar el precipitado. (Bilbao, M, R.1997).

### ENSAYO DE LIEBERMANN-BURCHARD (PARA TRITERPENOIDES Y/O ESTEROIDES CON GRUPOS DIENO CONJUGADOS).

Tomar 0.5 mL de solución clorofórmica anhídrida en un tubo de ensayo limpio y seco. Añadir 0.5 mL de Anhídrido acético. Añadir cuidadosamente por la pared del tubo, una gota de ácido sulfúrico concentrado. Observar y anotar los cambios de coloración.

Se considera prueba positiva cuando aparecen coloraciones violeta, verde o azul (Bilbao, M, R.1997).

### ENSAYO DE BORNTRANGER (PARA NAFTO-Y ANTRAQUINONAS)

Tomar 3 mL de solución clorofórmica y llevarlos a sequedad. Redissolver en 5 mL de alcohol. Añadir 1 mL de agua oxigenada de 20 mL, 1 mL de ácido sulfúrico al 50% y calentar la mezcla en un baño de agua hirviendo durante 10 a 15 minutos. Dejar enfriar y extraer en un embudo de separación con 5 mL de benceno y tolueno. (Bilbao, M, R.1997).

Retirar 2 mL de la fase orgánica y agitarla en otro tubo con 1.0 mL de solución de NaOH al 5% en NH<sub>4</sub>OH al 2%. La prueba se considera positiva cuando aparecen coloraciones que van del rosado al rojo intenso en la capa alcalina. (Bilbao, M, R.1997).

#### ENSAYO DE KEDDE (PARA CARDIOTONICOS)

Tomar 1 mL de la fase orgánica. Llevar a sequedad. Redisolver en 1 mL de alcohol. Añadir 0.5 ml del reactivo de kedde recién preparado (mezclas de partes iguales de las soluciones A y B). Se considera prueba positiva si aparece una coloración púrpura o violácea. Como referencia se puede comparar con el color producido con 1 mL de KOH al 5 % en alcohol (Bilbao, M, R.1997).

#### ENSAYO PARA ALCALOIDES

Tomar 0.5 mL de solución acuosa ácida en 4 tubos de ensayo limpios. Añadir a cada tubo 1 gota de los reactivos de Dragendorff, Mayer y Valser, específicos para la identificación de alcaloides.

Reactivo de Dragendorff: Disolver en la menor cantidad de agua y por separado 8 g. de nitrato de bismuto y 27, 2 g. de yoduro de potasio; mezclar las dos soluciones y agregar 12 mL de ácido nítrico al 30 % p/v, finalmente ajustar a un volumen de 100 mL. Filtrar, si es necesario. (Sanabria, A. 1983).

Reactivo de Mayer: Disolver por separado 1.5 g. de cloruro mercúrico y 5.0 g. de yoduro de potasio en la mínima cantidad de agua, mezclar las dos soluciones y completar con agua destilada a un volumen de 100 mL. (Sanabria, A. 1983)

Reactivo de Valser: Disolver 10 g. de yoduro de potasio en agua destilada de manera que resulte un volumen final de 100 mL, agregar agitando a la anterior solución yoduro de mercurio sólido hasta que no se disuelva (aproximadamente 14 g.). Filtrar el exceso si es necesario. (Sanabria, A.1983)

Reactivo de Reinekato de amonio: Preparar una solución saturada de Reinekato de amonio en agua. Filtrar si es necesario. (Sanabria, A. 1983)

Se considera prueba positiva cuando aparecen precipitados en por lo menos 3 tubos. Para fines de comparación realizar el ensayo con 0.5 mL de una solución patrón de sulfato de quinina. (Sanabria, A. 1983).

### ENSAYO DE NINHIDRINA (PARA AMINOACIDOS)

Colocar 1 gota de solución, en una tirilla de papel de filtro. Secar. Añadir una gota de reactivo de ninhidrina (solución 0.002% en alcohol). Calentar sobre una plancha de calentamiento a 105°C. El desarrollo de coloraciones violeta, azul o rosada se considera prueba positiva (Bilbao, M, R.1997).

## **2.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA TRIBU *Senecioneae* EN EXTRACTOS Y FRACCIONES ALCALOIDALES Y NO ALCALOIDALES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA Y CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA BIDIMENSIONAL.**

### **2.3.1 Monitoreo cromatográfico**

#### **2.3.1.1 Pruebas Cromatográficas en capa delgada para fracciones Aps 1 y Aps 2**

Para confirmar la presencia de alcaloides, primero se realizó una CCD en sílica gel G60 con fase móvil  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10:1:0,1) revelada con el reactivo de Dragendorff para las dos fracciones Aps 1 y Aps 2 de las tres especies como lo indica el protocolo. Una coloración naranja con el reactivo de Dragendorff indica prueba positiva.

### **2.3.1.2 Pruebas Cromatográficas en capa delgada de extractos y fracciones no alcaloidales**

Teniendo en cuenta el objetivo de este proyecto de grado, contribuir con el estudio taxonómico de *Gynoxys hirsuta* Wedd y sus posibles diferencias y similitudes con *Pentacalia ledifolia* y *Senecio pampae* se realizaron pruebas cromatográficas en las 3 especies, a partir del extracto total etanólico, el cual fue monitoreado mediante CCD en sílica gel 60 usando diferentes mezclas de solventes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , éter de petróleo: AcOEt 8:2,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH 8:2), presentándose como mejor fase fase móvil  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (9,5:0,5).

Para la identificación de los metabolitos secundarios del tipo quinol, cumarinas y derivados de eremofilano de estas especies, se realizaron CCD unidimensionales a partir de las fracciones  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y éter de petróleo con fase estacionaria sílica gel G60 y fase móvil tolueno:acetona (8:2) al ser revelada con KOH al 10% .

### **2.3.1.3 Pruebas cromatográficas en capa delgada bidimensional para la identificación de los metabolitos secundarios principales en extractos y fracciones.**

Utilizando la cromatografía en capa delgada bidimensional se analizaron las similitudes y diferencias de las tres especies, teniendo en cuenta la fracción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y éter de petróleo en las tres especies.

A los extractos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y éter de petróleo de las tres especies se les realizó monitoreo por CCDB para observar la diferencia de los distintos metabolitos presentes en ellas. Después de varias mezclas, en la que mejor se observaron la presencia de estos metabolitos fue en la fase móvil (tolueno: acetona 8:2) en el primer frente (F1) y en el segundo frente (F2)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – MeOH (9:1).

De la fracción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y éter de petróleo de las diferentes especies se pesaron 20 mg disolviéndose en 0.5 ml de acetona, aplicándose con un capilar en la parte inferior izquierda de la placa de 10X10 cm.

## **2.3.2 Separación e identificación de las fracciones alcaloidales y No alcaloidales por CG-EM**

### **2.3.2.1 Separación e identificación de fracciones Aps 1 y Aps 2 mediante CG-EM**

La separación de las fracciones alcaloidales en las tres especies se realizó mediante la técnica en cromatografía de gases y la identificación mediante espectrometría de masas: en un cromatógrafo de gases Agilent 6850 serie II, acoplado a masas Agilent 5975B VL MSD con una columna Agilent 19091S-433E HP-5MS, con las siguientes especificaciones, empleando un método con temperatura inicial de 100°C por un minuto, con una rampa de calentamiento de 15°C por minuto hasta 180°C, nuevamente se aumenta la temperatura en 5°C hasta 300°C por 3 minutos. Cuyos espectros de masas fueron analizados y comparados con la base de datos NIST 05 y Wiley y con los resultados obtenidos para el mismo tipo de sustancias en otras investigaciones.

### **2.3.2.2 Separación e identificación de fracciones no alcaloidales mediante CG-EM**

La separación de las fracciones alcaloidales en las tres especies se realizó mediante la técnica en cromatografía de gases y la identificación mediante espectrometría de masas: en un cromatógrafo Agilent 6850 serie II, acoplado a masas Agilent 5975B VL MSD con una columna Agilent 19091S-433E HP-5MS, empleando un método con temperatura inicial de 80° C durante 1 minuto, seguido de una rampa de calentamiento, de 325°C por minuto hasta 350°C y se mantuvo en 280°C por 28 minutos. Modo de inyección Split, relación Split 15:1 Cuyos espectros de masas fueron analizados y comparados con la base de datos NIST 05 y Wiley y con los resultados obtenidos para el mismo tipo de sustancias en otras investigaciones.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 RENDIMIENTO DE FRACCIONES (hojas) ALCALOIDALES Aps 1 y Aps 2

A las fracciones obtenidas de cada una de las especies se les tomó el peso seco a partir del material vegetal y se evaluó el porcentaje obtenido con respecto a la cantidad de extracto etanólico, la tabla 3 muestra el porcentaje obtenido en peso seco de las fracciones Aps 1 y Aps 2 de todas las especies de este estudio.

**Tabla 3. Porcentaje en peso seco de fracciones Aps 1 y Aps 2 en relación con peso seco de extractos de las tres especies.**

Fuente: Autor

Especie	Material seco	Extracto etanólico	Aps 1	%rendimiento	Aps 2	%rendimiento
<b><i>Gynoxys hirsuta</i></b>	500 g	50 g	0,27 g	0,54	0,17g	0,34
<b><i>Pentacalia ledifolia</i></b>	50 g	10,76 g	0,36 g	3,34	0,01g	0,09
<b><i>Senecio pampae</i></b>	20 g	1,23 g	0,03 g	2,4	0,03 g	2,4

##### 3.1.1. Pruebas cualitativas para alcaloides del extracto etanólico total

A partir de extracto etanólico de cada una de las tres especies se realizaron pruebas cualitativas utilizando los reactivos de Dragendorff, Mayer, Wagner y Valser (Sanabria.1983), se transfirieron exactamente 0.5 ml de HCl en 4 tubos de ensayo y 0.2 mg de cada una de las fracciones, se le adicionaron 2 gotas del reactivo de Dragendorff (I), al segundo 2 gotas del reactivo de Mayer (II), al tercero 2 gotas del reactivo de Wagner (III) y al cuarto 2 gotas del reactivo de Valser (IV), de acuerdo a los resultados se tabularon en la tabla 4.

La tabla 4 muestra prueba positiva para la especie *G. hirsuta* por presentarse una turbidez en los reactivos de Wagner y Valser, mientras que con el reactivo de Dragendorff se formó un precipitado color naranja. Para el extracto etanólico de la especie *S. pampae* dio prueba positiva con Dragendorff formando un alto

contenido de precipitado, y dando turbidez con los reactivos de Mayer y Wagner. En el extracto de la especie *P. ledifolia* se observó una turbidez con el reactivo de Mayer, lo cual presentó duda y por esta razón se aplicó la metodología para extracción de alcaloides a las tres especies.

**Tabla 4. Resultados pruebas cualitativas a las fracciones Aps 1 y Aps 2 a las tres especies**

Especie	Dragendorff	Mayer	Wagner	Valsér
<i>Gynoxys hirsuta</i>	+	-	+	+
<i>Pentacalia ledifolia</i>	.	+	-	-
<i>Senecio pampae</i>	+	+	+	-

### **3.2 RENDIMIENTO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES (hojas) NO ALCALOIDALES DE LAS ESPECIES**

#### **3.2.1 Rendimiento de las fracciones no alcaloidales**

Una vez obtenidos los extractos se hicieron los respectivos fraccionamientos por los métodos ya explicados. En la tabla 5 se muestra el resultado del % de rendimiento calculado a partir de los g del extracto EtOH / 100 g del material vegetal, y para las fracciones: g de la fracción / 100 g de el extracto EtOH de cada una de las fracciones no alcaloidales.

**Tabla 5. Porcentaje en peso seco de extractos y fracciones de las tres especies**

<b>Especie</b>	<b>Cantidad g</b>	<b>% E. EtOH</b>	<b>fracción</b>	<b>% fracciones</b>
<i>Gynoxys hirsuta</i>	473 g	15	Éter de petróleo	0,19
<i>Pentacalia ledifolia</i>	359 g	7.6		0.13
<i>Senecio pampae</i>	20 g	10		1.5
<i>Gynoxys hirsuta</i>	473 g	15	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.36
<i>Pentacalia ledifolia</i>	359 g	7.6		0.86
<i>Senecio pampae</i>	20 g	10		1.75
<i>Gynoxys hirsuta</i>	473 g	15	AcOEt	0.85
<i>Pentacalia ledifolia</i>	359 g	7.6		1.06
<i>Senecio pampae</i>	20 g	10		1.85

Fuente: Autor

### 3.2.2 Rendimiento del extracto clorofórmico

El porcentaje de rendimiento se calculo a partir de g del extracto / 100 g del material vegetal seco, el volumen del extracto fúe evaporado en un rotaevaporador Bucchi E111, en la tabla 6 se muestra el porcentaje de rendimiento de las dos especies *G. hirsuta* y *S. pampae*, ya que para la especie *P. ledifolia* ya había sido extraído con CHCl<sub>3</sub> por un estudiante.

**Tabla 6. Porcentaje de rendimiento y peso seco del extracto clorofórmico obtenido de las especies *Senecio pampae* y *Gynoxys hirsuta***

<b>Plantas</b>	<b>Material vegetal</b>	<b>Extracto Superficie foliar</b>	<b>%Rendimiento</b>
<i>Gynoxys hirsuta</i>	473 g	4,79 g	1.01
<i>Pentacalia ledifolia</i>	359 g	-	-
<i>Senecio pampae</i>	20 g	1g	5

Fuente: autor

### 3.2.3 Pruebas químicas cualitativas

Las pruebas cualitativas se realizaron con el fin de determinar y comparar los metabolitos secundarios presentes en las especies *Pentacalia ledifolia*, *Senecio pampae* y *Gynoxys hirsuta*. A partir del extracto etanólico de las especies se realizaron las pruebas cualitativas. Cuyos resultados se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 7. Resultados de pruebas cualitativas realizadas del extracto etanólico de las especies *Pentacalia ledifolia*, *Senecio pampae* y *Gynoxys hirsuta***

Prueba	<i>P. ledifolia</i>	<i>G. hirsuta</i>	<i>S. pampae</i>
<i>Prueba de Lieberman-Burchard – Esteroides</i>	+	+	+
<i>Prueba de Salkowski Esteroides y Esteroles</i>	+	+	+
<i>Prueba de Baljet Terpenos y Esteroles</i>	+	+	+
<i>Prueba de l cloruro Férrico Fenoles</i>	+	+	+
<i>Prueba de Shinoda Flavonoides</i>	+/-	+/-	+/-
<i>Prueba de Rosenheim Leucoantocianidinas</i>	-	-	-
<i>Prueba de Kedde cardiotonicos</i>	+/-	+/-	-
<i>Prueba de Dragendorff Alcaloides</i>	-	+	+
<i>Prueba saponinas</i>	-	-	-

Fuente: El Autor

### 3.3 RESULTADOS DEL MONITOREO CROMATOGRÁFICO

#### 3.3.1 Monitoreo en cromatografía en capa delgada unidimensional para fracciones Aps 1 y Aps 2

A las tres especies de este estudio se les realizó extracción de alcaloides pirrolizidínicos según la metodología propuesta por (Bicchi, C *et al.* 1989). Para la comprobación cualitativa de alcaloides pirrolizidínicos se realizaron pruebas cromatográficas en capa delgada, en la figura 14 se observa el resultado de esta cromatografía: de la fracción Aps 1 (0,27 g) y Aps 2 (0,17 g) de la especie *Gynoxys hirsuta* que se obtuvo de la extracción específica para alcaloides pirrolizidínicos según metodología propuesta, en las dos fracciones mostro un sólido viscoso color café, se realizó la prueba cromatográfica de alcaloides a través de CCD usando una placa sílica gel G60 Merck con fase móvil  $\text{CHCl}_3$  – MeOH-  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10:1:0,1) revelada con el reactivo de Dragendorff, el cual dio positiva al ser revelada, mostrando una franja de color naranja delimitada con un óvalo (ver figura 14) . Mientras que en la figura A fue revelada bajo luz u.v en onda larga, donde se observan unas fluorescencias azul celeste característica de las cumarinas.

Figura 14. Cromatografía capa delgada de la fracción Aps 1 y Aps 2 de *G.hirsuta*



CCD de las fracciones Aps 1 y Aps 2, en sí gel G60, ( $\text{CHCl}_3$  - $\text{MeOH-NH}_4\text{OH}$  9,5:0,5:0,1) revelada con A. Bajo luz u.v en onda larga B. Revelada con el reactivo de Dragendorff

De las fracciones Aps 1(0,36 g) y Aps2(0,01g) obtenidas de la especie *Pentacalia ledifolia* según la extracción específica para alcaloides pirrolizidínicos, en la fracción Aps 1 mostro un sólido viscoso color café y en la fracción Aps 2 no hubo coloración, se realizó prueba cualitativa para la detección de alcaloides pirrolizidínicos mediante CCD en placa sílica gel G 60 con fase móvil  $\text{CHCl}_3$  - $\text{MeOH- NH}_4\text{OH}$  (10:1:0,1) al ser reveladas con el reactivo de Dragendorff no dio prueba positiva para alcaloides como lo muestra la figura 15, sin embargo antes de ser revelada con el reactivo de Dragendorff se observó la aparición de una fluorescencia azul bajo luz u.v de onda larga seleccionada con un ovalo como se observa en la figura 15 A, característica de las cumarinas, lo que indica que en

esta fracción Aps 1 también se encuentran compuestos de tipo cumarina, esto se confirmó al analizar los resultados obtenidos por CG-EM para esta fracción alcaloidal Aps 1.

**Figura 15. Cromatografía capa delgada de la fracción Aps 1 y Aps 2 de *P. ledifolia***



CCD de las fracciones Aps 1 y Aps 2, en sí gel G60, ( $\text{CHCl}_3$  -  $\text{MeOH}$  -  $\text{NH}_4\text{OH}$  9,5:0,5:0,1) revelada con A. Bajo luz u.v en onda larga B. Revelada con el reactivo de Dragendorff

En las fracciones Aps 1 y Aps 2 obtenidas de la especie *Senecio pampae* que se obtuvo de la extracción específica para alcaloides pirrolizidínicos según metodología propuesta por Bicchi (Bicchi, C *et al.* 1989), en la fracción Aps 1 y Aps 2 mostro un sólido viscoso color café, se realizó prueba cromatográfica través de CCD para alcaloides pirrolizidínicos, en placa sílica gel G60 Merck con

fase móvil  $\text{CHCl}_3$  -MeOH-  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10:1:0,1) al ser reveladas con el reactivo de Dragendorff dio una coloración roja en la fracción Aps 2, indicando la presencia de alcaloides como lo indica en la figura 16, delimitado con un óvalo. Esto se confirmó con los resultados obtenidos mediante la técnica CG-EM. En la misma fracción se observó bajo luz u.v en onda larga (ver figura 16) una coloración naranja, que pertenece a otra sustancia no identificada.

**Figura 16. Cromatografía en capa delgada de la fracción Aps 1 Aps 2 de *S. pampae***



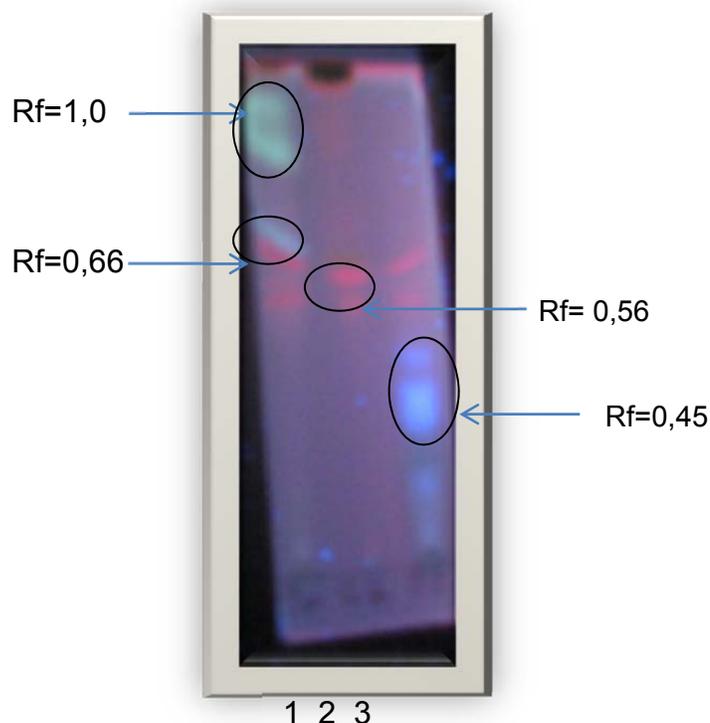
CCD de las fracciones Aps 1 y Aps 2, en sí gel G60, ( $\text{CHCl}_3$  -MeOH- $\text{NH}_4\text{OH}$  9,5:0,5:0,1) revelada con A. Bajo luz u.v en onda larga B. Revelada con el reactivo de Dragendorff

### 3.3.2 Monitoreo en cromatografía en capa delgada unidimensional y bidimensional de extractos y fracciones no alcaloidales

Para la identificación de los metabolitos secundarios principales no alcaloidales se empezó con una CCD del extracto etanólico total de cada uno de las tres especies con el fin de observar que metabolitos se presentaban y confirmar si existía variabilidad en el extracto total, según el resultado de esta cromatografía, ver figura 17, se buscó en que fracciones (éter de petróleo,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt) se identificaban los metabolitos mayoritarios secundarios de cada una de las especies. A continuación (ver figura 17) se presenta la cromatografía en capa delgada del extracto total de las tres especies.

Los extractos etanólicos obtenidos de las tres especies se monitorearon mediante cromatografía en capa delgada sílica gel G60 Merck, con fase móvil  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – MeOH (9,5:0,5) observada bajo luz u.v y revelada con vainillina / $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1%. En la muestra 1 de *S. pampae* delimitada con un ovalo bajo luz u.v indica la presencia de fluorescencias amarillas verdosas característica de furanoeremofilanos, mas debajo de la placa se presenta otra fluorescencia azul celeste, aparentemente de cumarinas. En la muestra 2 de *G. hirsuta* no se identifican coloraciones de metabolitos mayoritarios, sin embargo el óvalo delimitado pertenece a las clorofilas, en la muestra 3 de *P. ledifolia* se observa en el óvalo señalado fluorescencias azul celeste características de las cumarinas como lo indican algunos autores (ver figura 17). Con esta prueba cualitativa se inició el estudio fitoquímico en busca de los metabolitos secundarios mayoritarios no alcaloidales que se observaron en la CCD del extracto etanólico, según la literatura se tratan compuestos de tipo cumarinas y derivados de eremofilano por presentar estas coloraciones características (Granados, A. 2000).

**Figura 17. Cromatografía CCD del extracto etanólico total de: M1 *Senecio pampae*. M2 *Gynoxys hirsuta*. M3. *Pentacalia ledifolia*.**



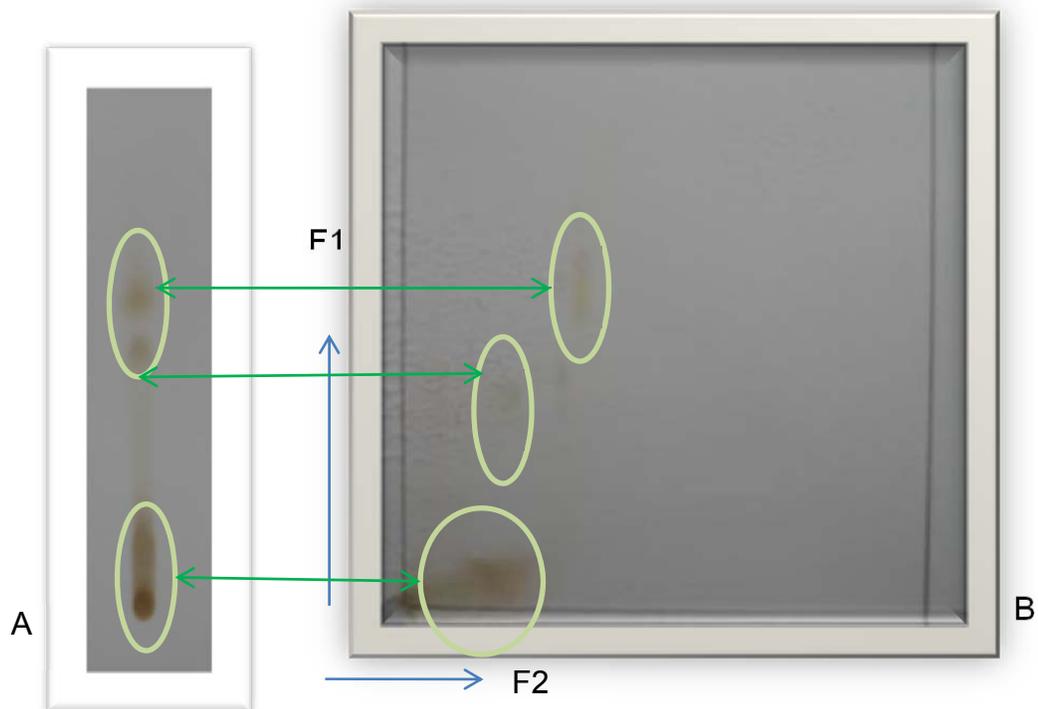
**Fuente: El Autor**

CCD del extracto etanólico de: 1 *Senecio pampae*. 2 *Gynoxys hirsuta*. 3 *Pentacalia ledifolia*. Fase estacionaria: sí gel, G 60, (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9,5:0,5) reveladas bajo luz u.v en onda larga.

De la fracción diclorometano del extracto etanólico de la especie *Pentacalia ledifolia* se realizó prueba cromatográfica en CCD unidimensional en sílica gel con fase móvil (tolueno: acetona 8:2) y en la CCDB con fase móvil Frente 1 (tolueno: acetona 8:2) y Frente 2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH 9,5:0,5) revelado KOH 10%. La figura 18 muestra las placas uni y bidimensionales al ser reveladas, se observa una coloración amarilla característica de los quinoles (Granados, A. 2000). En estudios reportados por el grupo (GIFUJ) se han identificado quinoles en el género *Pentacalia*, esto confirma que se puede considerar a los quinoles como

marcadores quimiotaxonómicos en el género *Pentacalia*, como lo indican algunos autores.

**Figura 18. Cromatografía CCD y CCDB de la fracción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de la especie *P. ledifolia***  
Fuente : El Autor



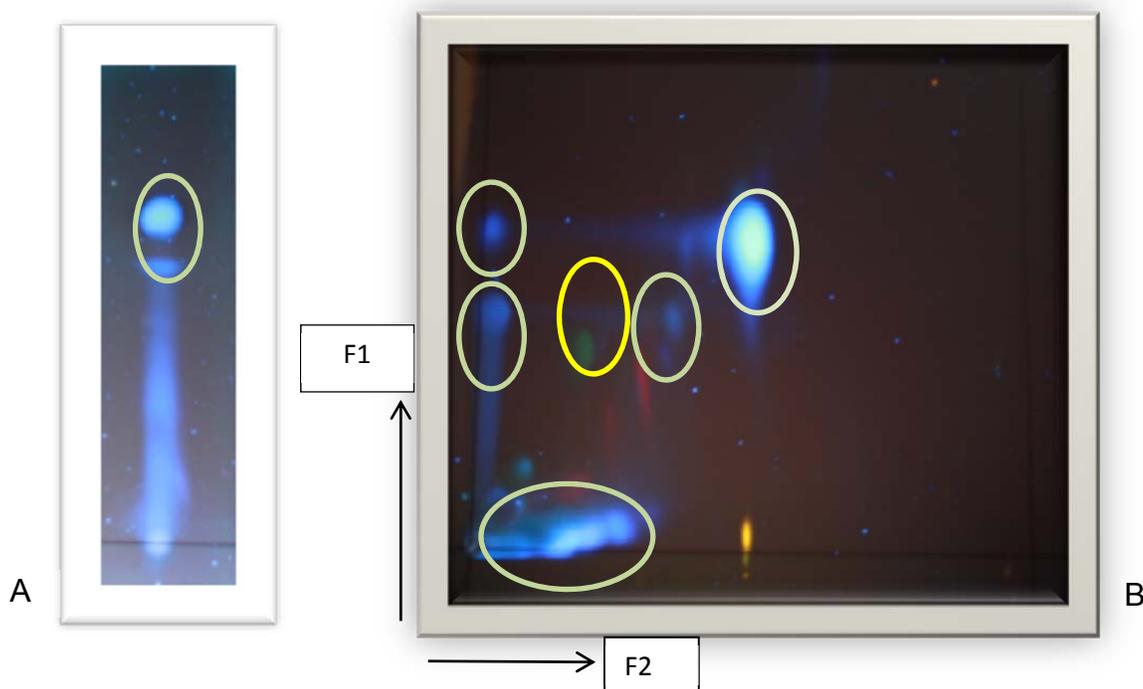
CCD y CCDB de la fracción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del extracto etanólico de la especie *P. ledifolia* A. En si gel, (tolueno: acetona 8:2) y B. Si gel, frente 1. (Tolueno: acetona 8:2), Frente 2 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH 9,5:0,5) revelado con KOH 10%.

En la figura 19 se muestra la CCD unidimensional y bidimensional de la fracción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del extracto etanólico de la especie *Pentacalia ledifolia* con fase estacionaria silica gel G60 y fase móvil (tolueno: acetona 8:2) en la unidimensional y en la bidimensional (tolueno: acetona 8:2) en el frente 1 y ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH 9,5:0,5) en el frente 2. Bajo luz u.v en onda larga se observa una fluorescencia azul celeste característica de las cumarinas, según los estudios realizados anteriormente al género *pentacalia* se ha encontrado que las cumarinas se identifican en la fracción éter de petróleo y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del extracto ertanólico, esto

indica que son compuestos de baja y mediana polaridad. Considerándose un marcador quimiotaxonómico para este género ya que han sido aisladas de las especies del mismo género.

En la CCDB de la fracción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del extracto etanólico de la especie *P. ledifolia* se observa coloraciones fluorescentes azul celestes intensas, indicando que es una fracción rica en cumarinas, en las partes de alta, mediana y baja polaridad, característica importante encontrada en *P. ledifolia*. El óvalo diferenciado con otro color, muestra una coloración verde, que posiblemente sea de anillos característicos de los furanoeremofilanos, pero no se confirma (ver figura 19).

**Figura 19. CCD y CCDB de la fracción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de la especie *P.ledifolia***

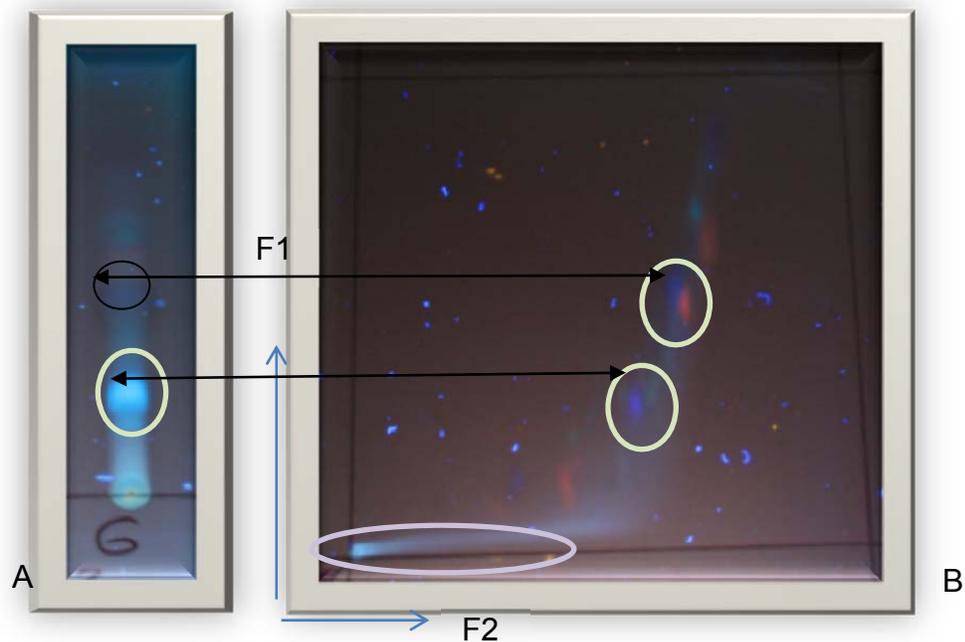


CCD y CCDB de la fracción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del extracto etanólico de la especie *Pentacalia ledifolia* A. con si gel G60 (tolueno: acetona 8:2) y B.si gel, Frente 1. (Tolueno: acetona 8:2) y ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH 9,5:0,5) en el frente 2. Revelada con luz u.v en onda larga

En la figura 20 se presenta la CCD unidimensional y bidimensional de la especie *Gynoxys hirsuta*, con fase estacionaria silica gel G60 Merck, y fase móvil (tolueno:

acetona 8:2) y en la bidimensional fase móvil (tolueno: acetona 8:2) frente 1 y (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH 9,5:0,5) en el frente 2 de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico, se observa fluorescencia azul celeste; cualitativamente y según la literatura estas fluorescencias azules celestes son características de las cumarinas.

**Figura 20. CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *G. hirsuta***

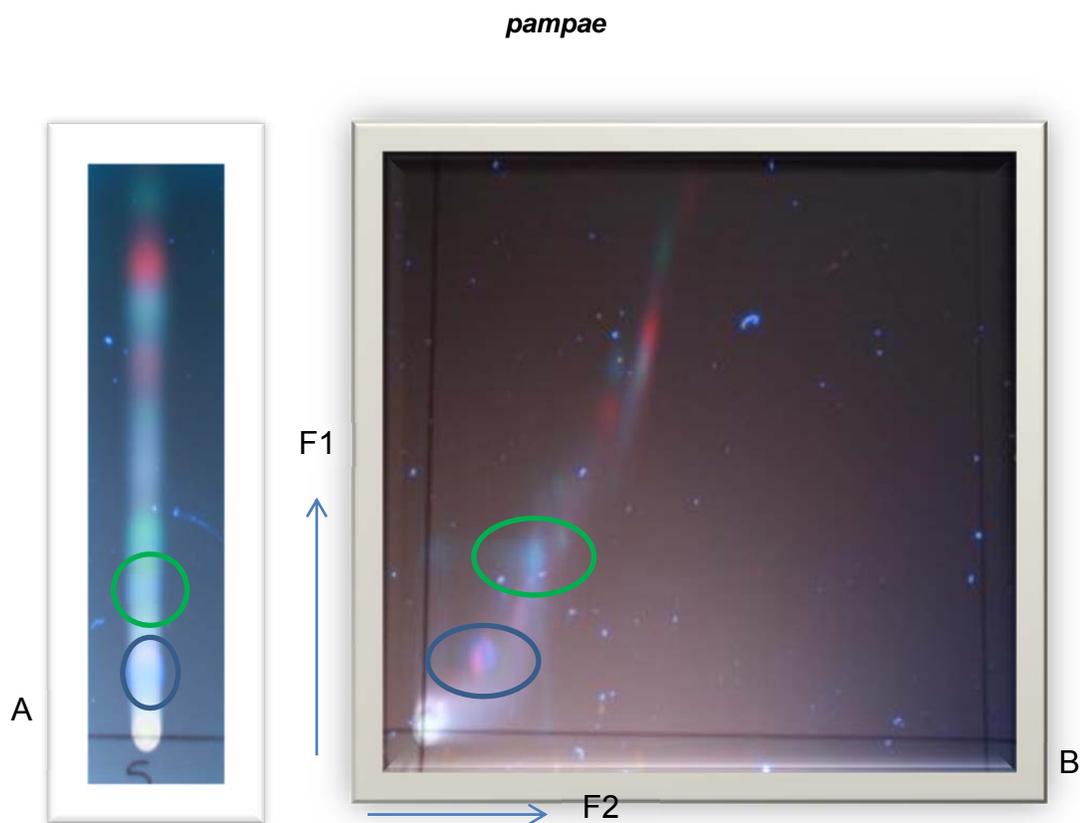


CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *Gynoxys hirsuta* A. con sí gel G60 (tolueno: acetona 8:2) y B. sí gel, Frente 1. (Tolueno: acetona 8:2) y (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH 9,5:0,5) en el frente 2. Revelada bajo luz u.v en onda larga

En la especie *S. pampae* también se observaron fluorescencias azul celeste, (ver figura 21), coincidiendo con la placa unidimensional las coloraciones con la placa bidimensional, se utilizó la CCD unidimensional y bidimensional, con fase estacionaria sílica gel G60 Merck, y fase móvil (Tolueno:acetona 8:2) y en la bidimensional fase móvil (tolueno:acetona 8:2) frente 1 y (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9,5:0,5)

en el frente 2 de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico, se observa fluorescencia azul celeste. (Ver figura 21).

**Figura 21. CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie S.**



CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *S.pampae*, con sí gel G60 Merck, y A. (tolueno: acetona 8:2) y B. sí gel, frente 1 (tolueno: acetona 8:2) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (9,5:0,5) en el frente 2. Revelada con luz u.v en onda larga.

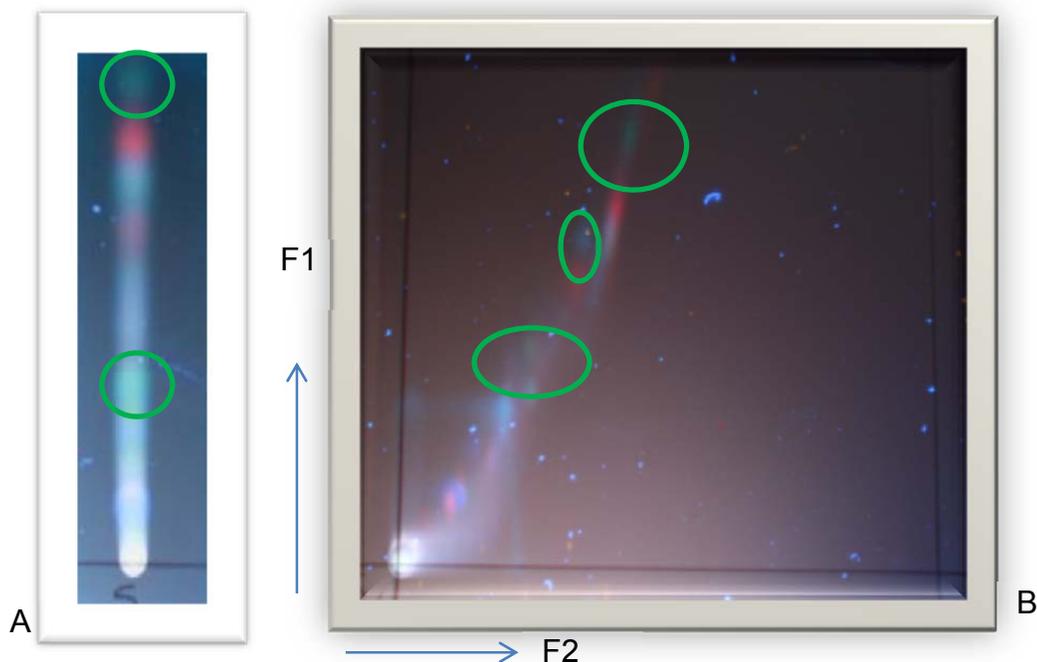
Cualitativamente las cumarinas se presentaron en las especies *P. ledifolia*, *G. hirsuta* y *S. pampae*, observándose en mayor cantidad y variedad en la especie *P. ledifolia*, considerándose una fuente importante de cumarinas, la presencia de estos no es de extrañar, ya que las especies del género *Pentacalia* son conocidas por su alto contenido en cumarinas. En CCDB y CG-EM se reportaron cumarinas para la especie *P. ledifolia*, estudios previos usando las mismas técnicas, realizados a la especie *P. ledifolia* por el grupo (GIFUJ) mostraron la presencia de

cumarinas (Granados, A.2000) mientras que para la especie *G. hirsuta* que hasta el momento no había tenido reportes bibliográficos, las cumarinas son identificadas por primera vez, siendo esto un aporte de gran importancia para el género y la especie. Para la especie *S. pampae* también se presentaron fluorescencias celestes características de las cumarinas, se puede considerar a las cumarinas como marcadores quimiotaxonómicos de la tribu.

En la figura 22 se observa CCD unidimensional y bidimensional de la fracción éter de petróleo de la especie *Senecio pampae* con fase estacionaria sílica gel G60 Merck, y fase móvil (tolueno: acetona 8:2) y en la bidimensional fase móvil (tolueno:acetona 8:2) frente 1 y (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH 9,5:0,5) en el frente 2, se observa bajo luz u.v en onda larga fluorescencias de color verde claro, en estudios anteriores por el grupo (GIFUJ) de la Pontificia Universidad Javeriana se han encontrado para esta misma especie compuestos de tipo furanoeremofilanos, presentando las mismas características bajo luz u.v en onda larga. Esto confirma que los derivados de eremofilano se consideran metabolitos secundarios principales de la subtribu *Senecioninae* (Romo de vivar *et al.* 2007).

A nivel de subtribu (Tussilaginatae) para esta especie se consideran marcadores quimiotaxonómicos (Romo de vivar *et al.* 2007), con esto se estaría comprobando que los derivados de eremofilano son marcadores quimiotaxonómicos para esta subtribu.

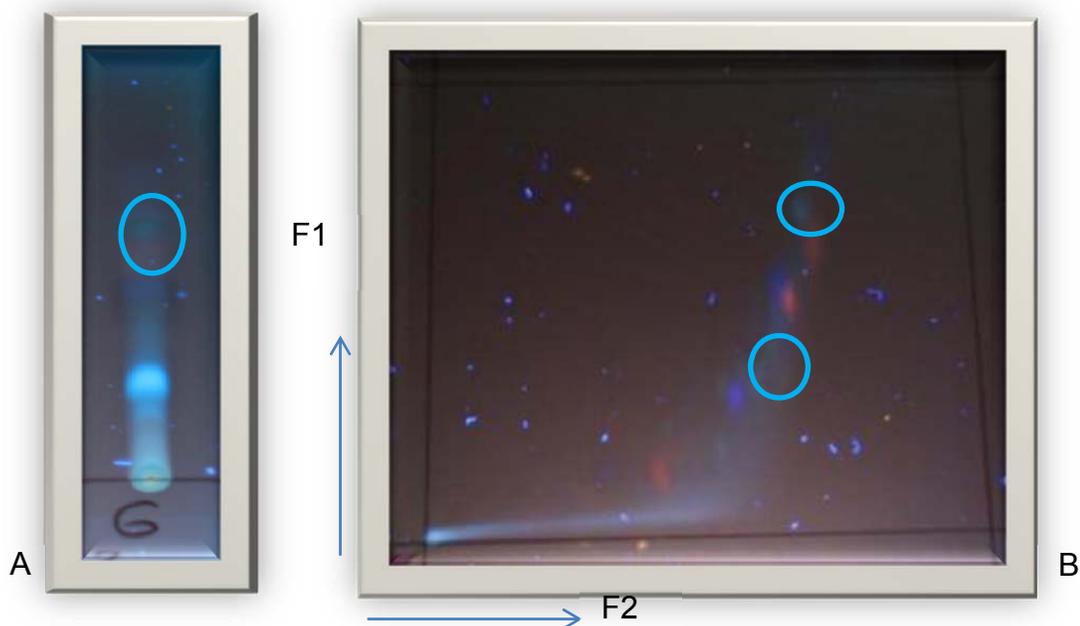
Figura 22. CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *S. pampae*



CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *S.pampae*, con sí gel G60, y A. (tolueno: acetona 8:2) y B. sí gel, frente 1 (tolueno: acetona 8:2) y ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH 9,5:0,5) en el frente 2. Revelado con luz u.v en onda larga.

En la especie *G. hirsuta* se identificaron furanoeremofilanos en la fracción éter de petróleo por presentar coloraciones amarillas verdosas reveladas con luz u.v en onda larga, se utilizó fase estacionaria sílica gel G60 Merck, y fase móvil (tolueno: acetona 8:2) y en la bidimensional fase móvil (tolueno:acetona 8:2) frente 1 y ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 9,5:0,5) en el frente 2. A continuación se muestra en la figura 23 el resultado de estas cromatografías, considerándose un aporte al género y especie por encontrarse por primera vez, estos metabolitos secundarios, además característicos a nivel de tribu y subtribu.

**Figura 23. CCD y CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *G. hirsuta***



CCD y CCDB de la de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *Gynoxys hirsuta*, con A. si gel G60 Merck, (tolueno: acetona 8:2) y B. si gel, frente 1 (tolueno: acetona 8:2) y ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH 9,5:0,5) frente 2. Revelado con luz u.v onda larga

Cualitativamente se identificaron derivados de eremofilanos en las especies *Gynoxys hirsuta* y *Senecio pampae* por la coloración característica mediante CCD y CCDB bajo la luz u.v., tanto en las CCD y CCDB presentaron color verde fluorescente en la fracción del extracto etanólico éter de petróleo, aunque en mayor proporción en la especie *S. pampae* por dar una coloración mas intensa que en la especie *G. hirsuta*. Estudios de estos compuestos por el grupo (GIFUJ) de la Pontificia Universidad Javeriana indican que los derivados de furanoeremofilanos presentan color verde fluorescente bajo luz u.v en onda larga, esto se debe a el anillo furanico.

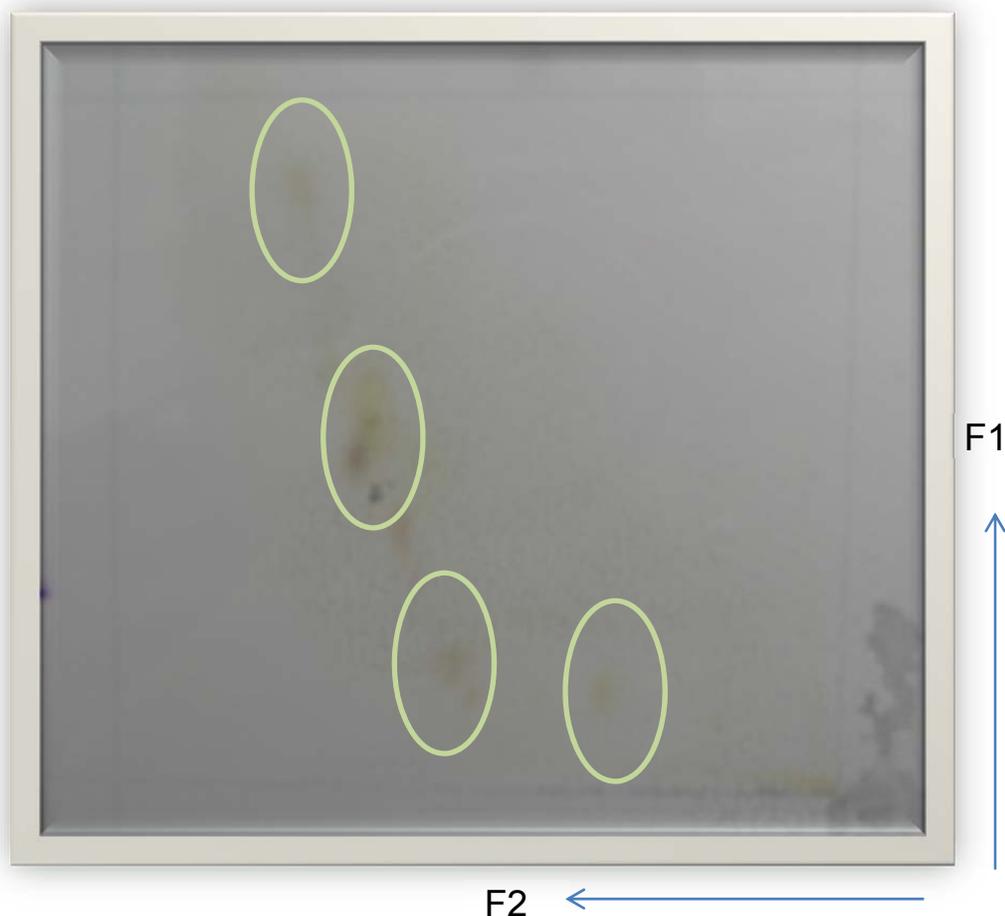
Esto confirma que los derivados de eremofilanos se pueden considerar como marcadores quimiotaxonómicos de varias especies de la tribu *Senecioneae*, ya

que han sido encontrados con mayor número de derivados de eremofilanos (Smith, P.1976). Siendo la primera vez encontrados para la especie *G. hirsuta* considerandose un aporte a la quimiotaxonómia del género.

Mediante CCDB se confirmó la presencia de derivados de eremofilanos en las especies *G. hirsuta* y *S. pampae*, mientras que para la especie *P. ledifolia* presentó una coloración verde, pero no se confirma la presencia de furanoeremofilanos para esta especie. Estos compuestos son de gran importancia a nivel taxonómico han sido usados (Smith, P. 1976).

En la figura 24 se presenta la CCDB fase móvil (tolueno: acetona 8:2) frente 1 y ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH 9,5:0,5) en el frente 2 revelado con KOH al 10% de la especie *G. hirsuta*, como muestra la figura se observa unas manchas amarillo ocre, características de los quinóles (Granados, A. 2000), en la especie *G. hirsuta* que hasta el momento no tenía reportes bibliográficos, el presentar quinóles es considerado como un aporte importante para la quimiotaxonómia del género y la especie.

**Figura 24. CCDB de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *G. hirsuta***



CCDB de la fracción  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del extracto etanólico de la especie *G. hirsuta*. Si gel, Frente 1, (tolueno: acetona 8:2) y frente 2, ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH 9,5:0,5) revelado con KOH 10%

Mediante las pruebas cromatográficas CCD y CCDB se identificaron los quinoles, presentes en las especies *P. ledifolia* y *G. hirsuta*. En las figuras 18 y 24 respectivamente muestran que al ser reveladas con KOH al 10% dando una coloración amarilla, según estudios realizados, este tipo de compuestos apagan la fluorescencia en las placas de sílica gel  $\text{F}_{254}$  y revelan amarillo ocre cuando se usa agente revelador KOH al 10% como lo indican algunos autores.

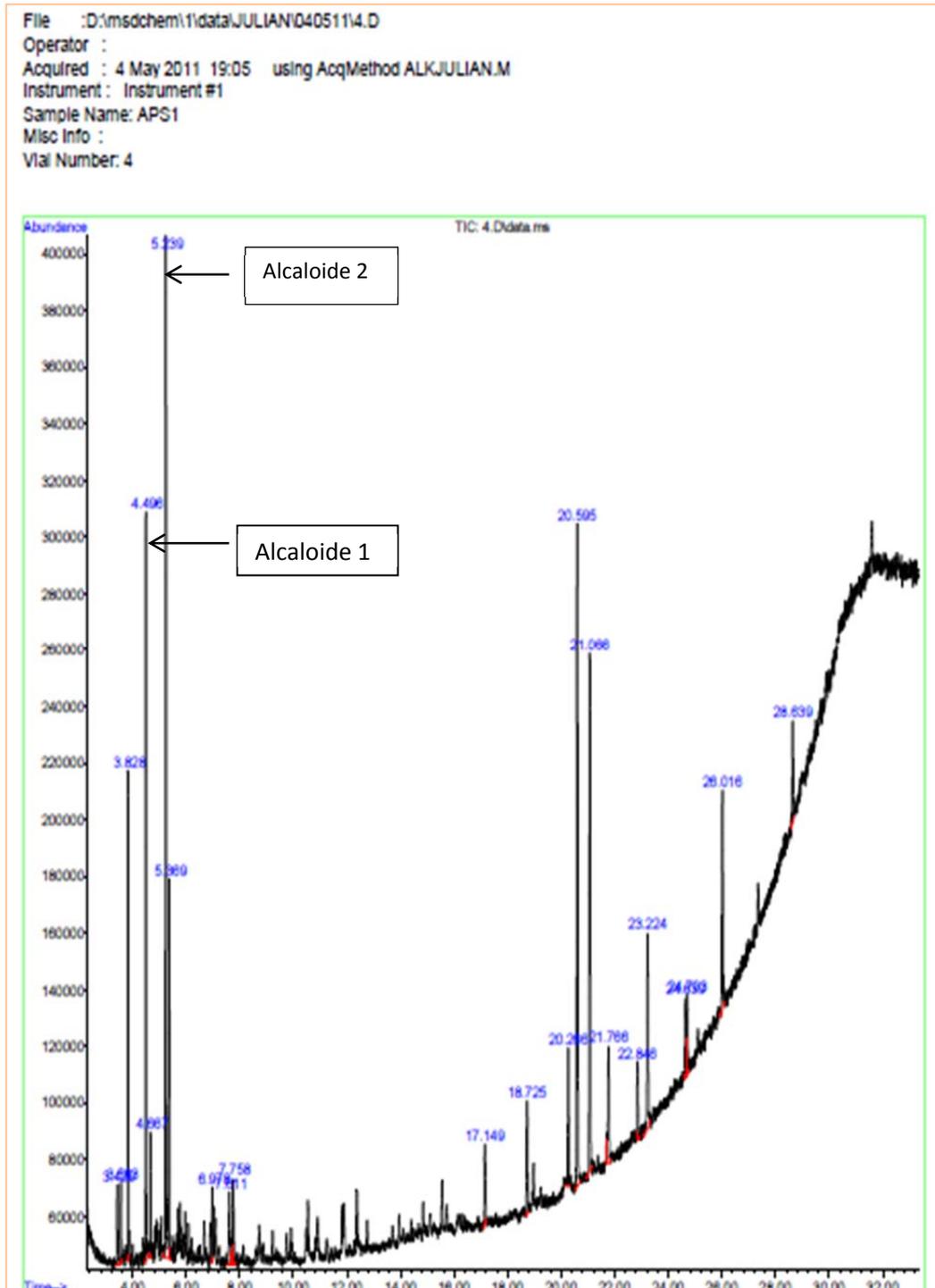
### **3.4 Separación e identificación de fracciones alcaloidales por CG-EM**

Según reportes bibliográficos la cromatografía de gases en combinación con la espectrometría de masas es un método poderoso de alta resolución y el más usado para el análisis de mezclas complejas de alcaloides pirrolizidínicos en fuentes biológicas. Esto es posible si se cuenta con los diferentes patrones de fragmentación y los índices de retención en combinación con los iones moleculares conocidos (Witte *et al.* 1993).

#### **3.4.1 Separación e Identificación de fracciones Aps 1 y Aps 2 por CG-EM**

En la figura 25, se muestra el cromatograma de gases obtenido de la fracción Aps 1 de la especie *G. hirsuta*. Debido a que en plantas los alcaloides pirrolizidínicos se encuentran en mezclas complejas de mas de 10 componentes individuales relativamente bajas concentraciones (0.1 – 1 % en materia seca). Se utilizó la técnica de separación e identificación por cromatografía de gases en combinación con la espectrometría de masas ya que esta es la técnica más usada para el análisis de mezclas complejas en Aps. (Witte *et al.* 1993). El cromatograma (ver figura 25) muestra varios picos, en comparación con el resultado de la CCD para fracciones alcaloidales es una fracción rica en alcaloides, y esto se confirma con el cromatograma al evidenciar varios picos. Para el análisis se tomaron como referencia dos de ellos, el pico con tiempo de retención (4.406 min) y (5.239 min).

Figura 25. Cromatograma de gases de la fracción Aps 1 de la especie *Gynoxys hirsuta*



A continuación se presenta los espectros de masas de los compuestos que se tomaron como referencia para el análisis, esto en combinación con los reportes bibliográficos sobre alcaloides pirrolizidínicos se puede concluir que posiblemente sean compuestos de este tipo.

En el espectro de masas de la figura 27 se presenta un ión molecular  $M^+$  405 con un pico base en  $m/z$  151, con fragmentaciones en  $m/z$  122,  $m/z$  109,  $m/z$  96,  $m/z$  81. El fragmento  $m/z$  151 como pico base es característico de los alcaloides pirrolizidínicos tipo otonecina, otros fragmentos  $m/z$  81,  $m/z$  96,  $m/z$  110 son muy cercanos a los fragmentos característicos que presentan estos compuestos, según la literatura, Los patrones de fragmentación de los compuestos tipo otonecina tienen fragmentaciones características en  $m/z$  94, 96, 110, 122-123 y 149-151, con pico base en  $m/z$  151 (Mattocks.1986 y Witte *et al.*1993). Se comparo el espectro de masas experimental con un compuesto del mismo tipo, llamado otosenina, con los siguientes fragmentos en  $m/z$  381, 353, 308, 294, 282, 267, 266, 250, 168, 152, 151(pico base) 150, 125, 124, 123, 122, 110, 108, 96, 94 (Gadner,D *et al.* 2006) haciendo una comparación con este alcaloide tipo otonecina los fragmentos son muy cercanos, lo que indica que posiblemente sea un Aps de este tipo. En otra referencia indican que los alcaloides pirrolizidínicos tipo otonecina tienen los siguientes rompimientos característicos  $m/z$  158,151 (base pico) ,110 y 96 (Trigo *et al.* 2003) nuevamente confirma la presencia de estos por la aproximación en los fragmentos. A continuación se muestran los diferentes fragmentos característicos que pueden presentar alcaloides pirrolizidínicos del tipo otonecina. Ver figura 26.

Figura 26. Ruta de fragmentos de alcaloides pirrolizidínicos tipo otonecina

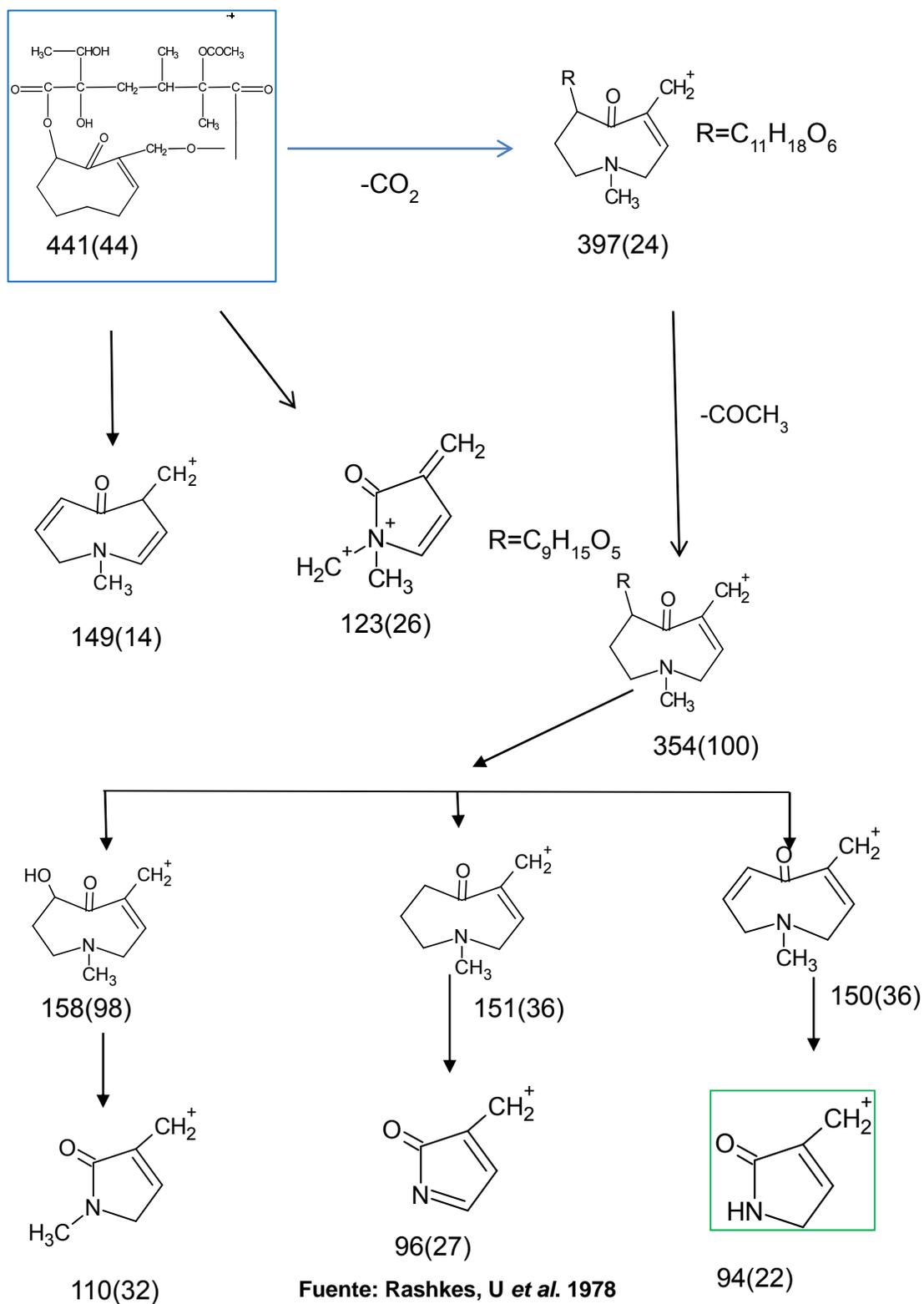
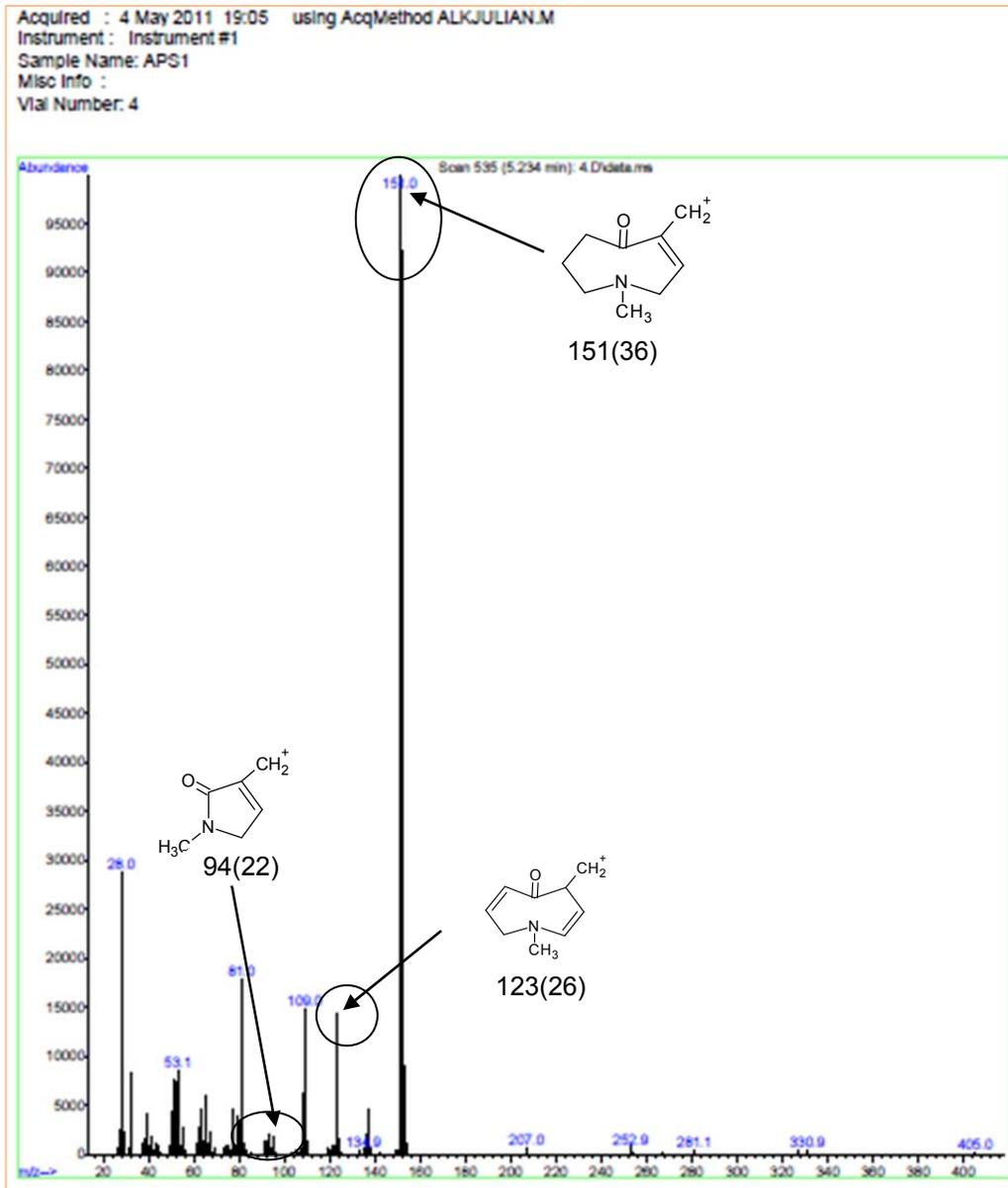
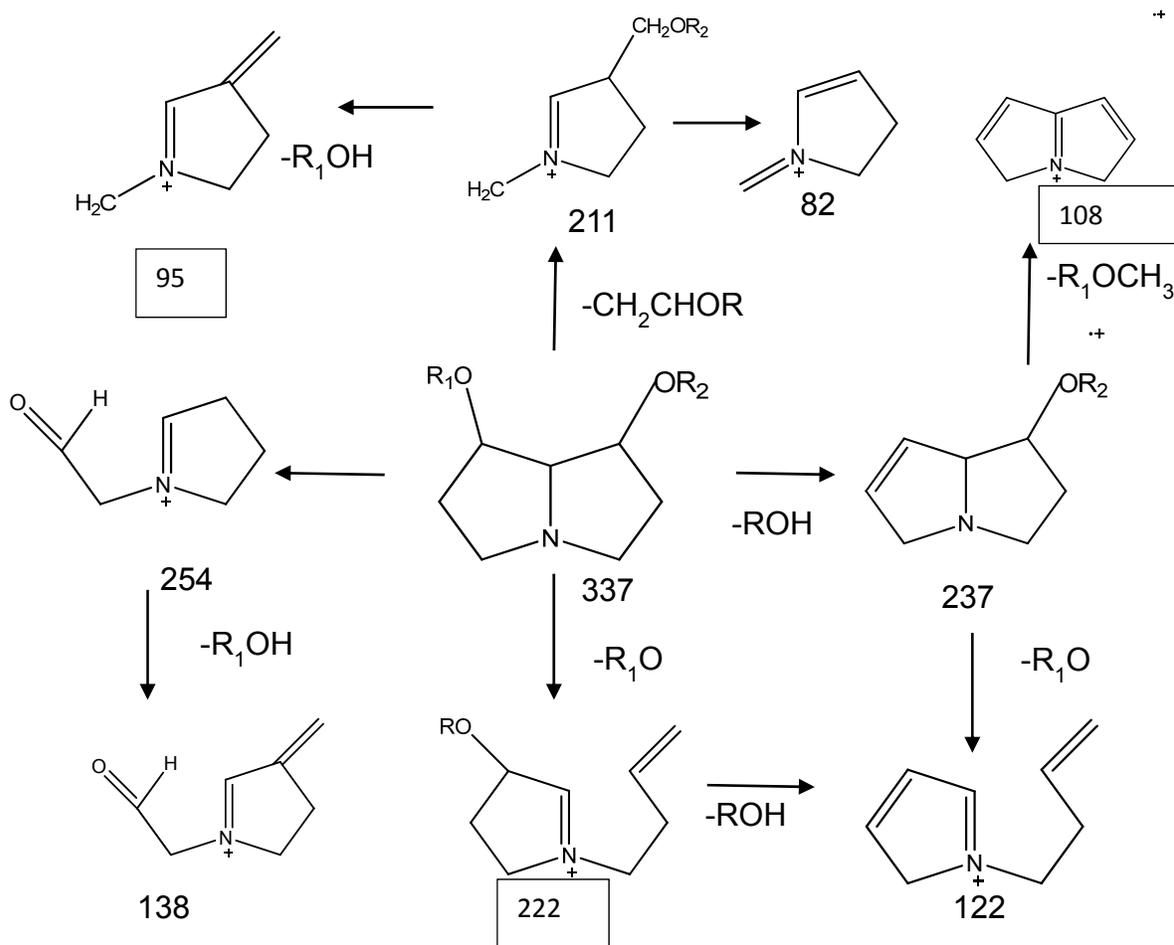


Figura 27. Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención (5.234 min) de la fracción Aps 1 *Gynoxys hirsuta*



El espectro de masas del compuesto que muestra la figura 29 se obtiene del CG-EM con tiempo de retención (4.496 min). Muestra un ión molecular  $M^+$  405 y los fragmentos  $m/z$  156, 139, 108, 95, 81 (pico base), 67, 55, estos fragmentos indican que posiblemente sea un alcaloide pirrolizidínico diéster saturado, teniendo en cuenta que los Aps diésteres con cadenas abiertas se caracterizan por los fragmentos en los iones  $m/z$  82, 83, 95, 96, 122, 123, 138, 139, 140, 222, 237 (Rashkes, Ya *et al.* 1978) por la semejanza en los fraccionamientos se puede comparar con este tipo de compuestos. Aunque los rompimientos no sean exactos debido a los diferentes ácidos que pueden reaccionar con los aminoalcoholes tales como los ácidos angeloil, tigloil, senecioil, que pueden aumentar o disminuir la masa molecular, se puede relacionar ya que los rompimientos son muy cercanos a los reportados en la literatura. Se comparó este espectro de masas con los rompimientos del compuesto de tipo diésteres abiertos, se observan similitud en los fraccionamientos (ver figura 28).

Figura 28. Ruta de fragmentación de alcaloides pirrolizidínicos saturados diésteres



Fuente: Rashkes, U *et al.* 1978

Figura 29. Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención (4.496 min) de la fracción Aps 1 *Gynoxys hirsuta*

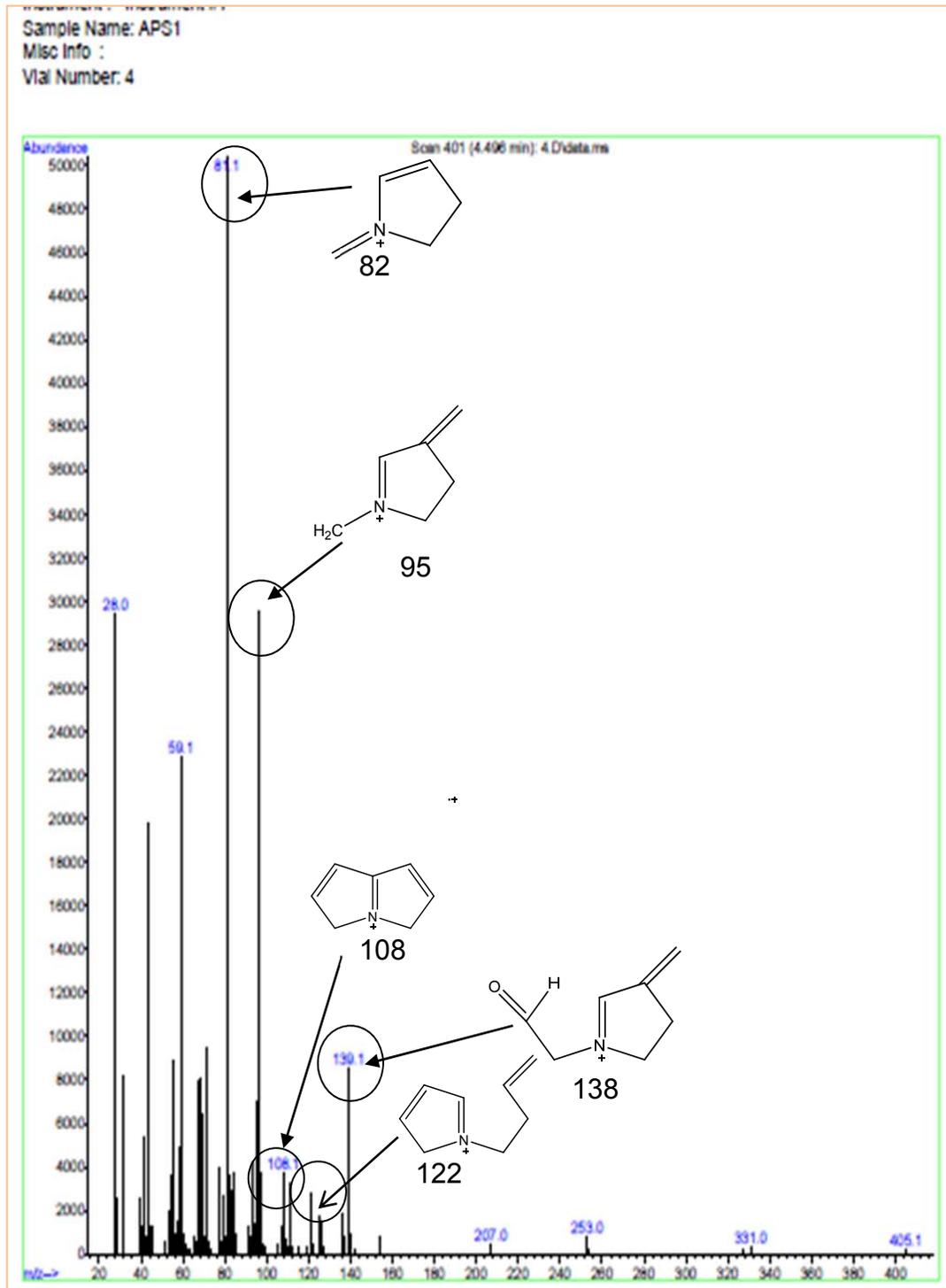
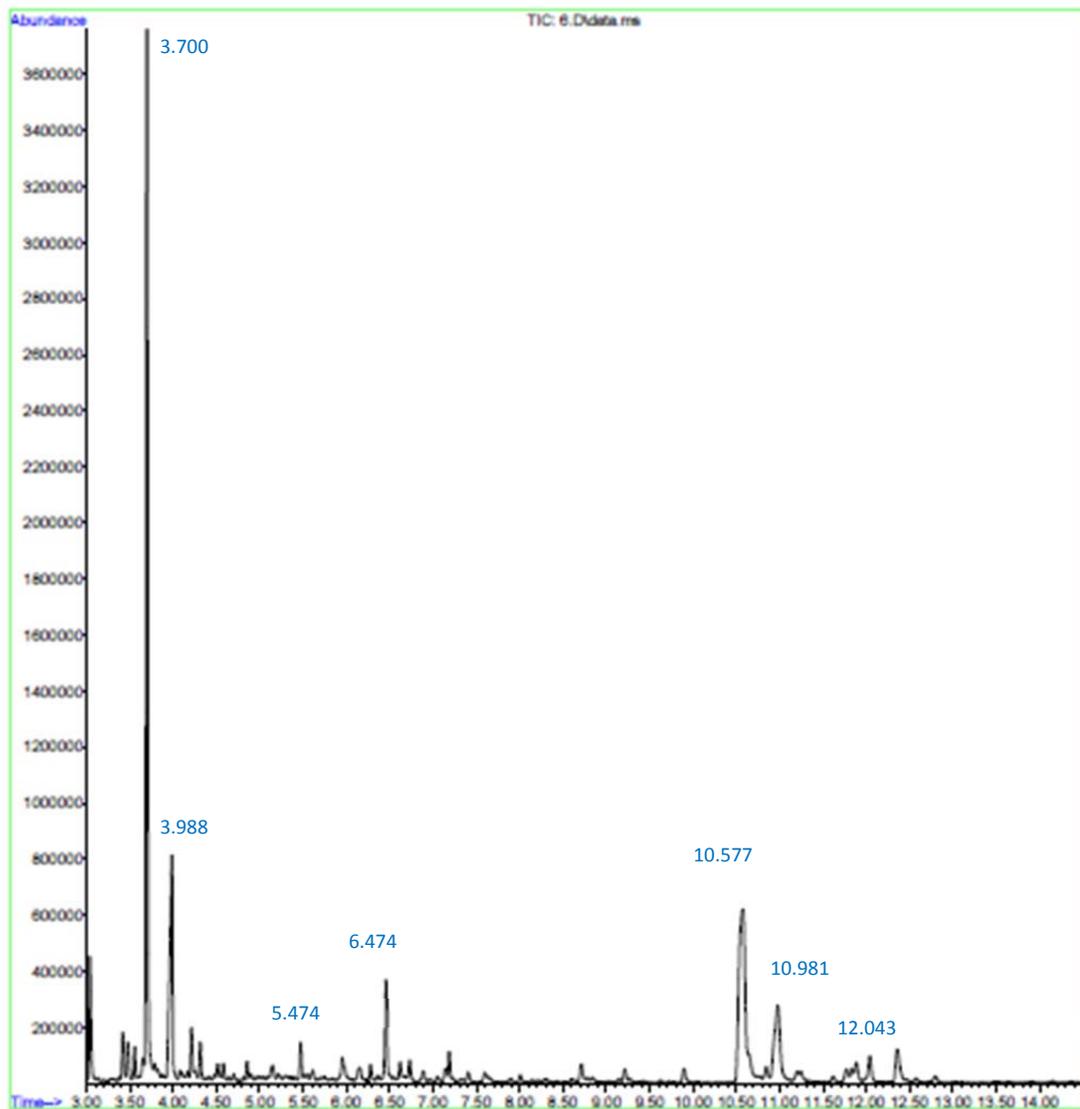


Figura 30. Cromatograma de gases de la fracción Aps 2 de la especie *Gynoxys hirsuta* Wedd

Operator :  
Acquired : 7 Jun 2011 19:25 using AcqMethod ALKJULIAN.M  
Instrument : Instrument #1  
Sample Name: G2  
Misc Info :  
Vial Number: 6



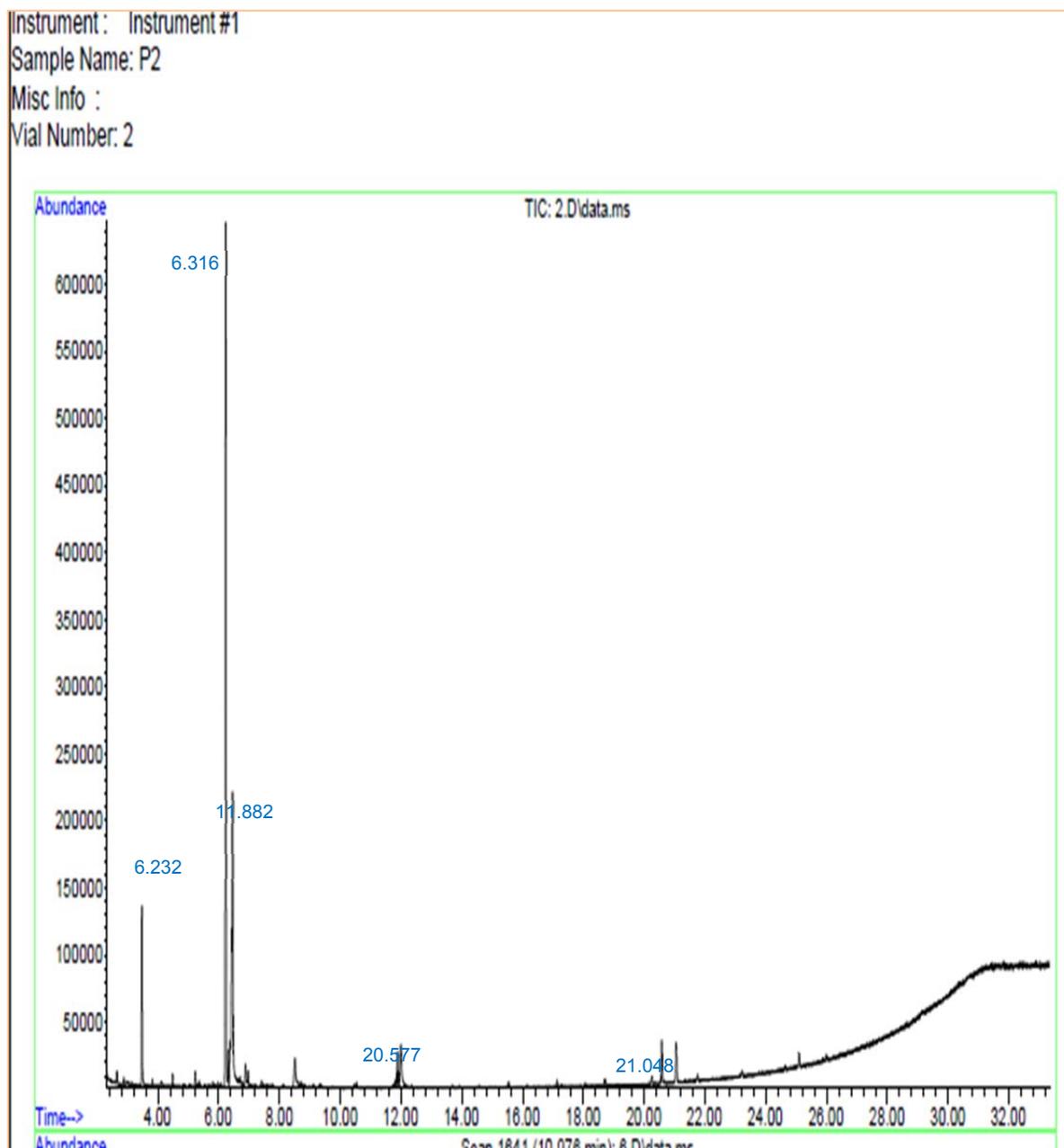
En la tabla 8 se muestra los resultados de algunos de los picos obtenidos del CG-EM de la fracción Aps 2 de la especie *G. hirsuta*, en esta fracción Aps 2 al ser analizados y comparados con los espectros de masas obtenidos por el CG-EM con los reportados en la literatura no presentaron fragmentaciones características de alcaloides pirrolizidínicos. Sin embargo, se identificó el compuesto 6,6 metilenbis (2-ter-butil-4 metilfenol) con un 99% de coincidencia con la biblioteca NIST 05.

**Tabla 8. Resultados del CG-EM de la fracción Aps 2 de la especie *Gynoxys hirsuta***

#	TR	Compuesto	% coincidencia	% Área
1	2.832	2-pirrolidinona	87	1.97
2	2.959	No identificado	-	1.11
3	3.044	No identificado	-	3.33
4	3.420	No identificado	-	3.33
5	3.478	No identificado	-	1.06
6	5.474	Ácido carboxílico -5-oxo-etil-ester- 2-pirrolidina	80	1.04
7	5.612	No identificado	-	-
8	5.956	No identificado	-	1.12
9	6.459	Ácido acético benceno, 4- hidroxí- etil-ester	91	3.31
10	20.571	6,6 metilenbis( 2-ter-butil-4 metilfenol)	99	-

A continuación se presenta el cromatograma de gases de la fracción Aps 2 de la especie *P. ledifolia* no se presenta el cromatogramas de la fracción Aps 1 porque presenta las mismas características, confirmándose la no detección de alcaloides pirrolizidínicos.

Figura 31. Cromatograma de gases de la fracción Aps 2 de la especie *P. ledifolia*



La tabla 9 muestra los resultados obtenidos de la fracción Aps 1 de la especie *P. ledifolia*, los espectros de masas de esta fracción no mostraron relación con las fragmentaciones características de los alcaloides pirrolizidínicos, sin embargo se

identificó la 7-hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzipiren-2-ona una cumarina y el compuesto 6,6 metilenbis (2-ter-butil-4 metilfenol).

**Tabla 9. Resultados del CG-EM de la fracción Aps 1 de la especie *P. ledifolia***

#	TR	Compuesto	% coincidencia	Área
1	3.478	No identificado	-	12.55
2	4.098	Hidroquinona	91	0.66
3	9.367	No identificado	-	1.04
4	9.875	No identificado	-	-
5	11.993	7-hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzipiran-2-ona	94	4.69
6	20.587	6,6 metilenbis( 2-ter-butil-4 metilfenol)	99	0.51

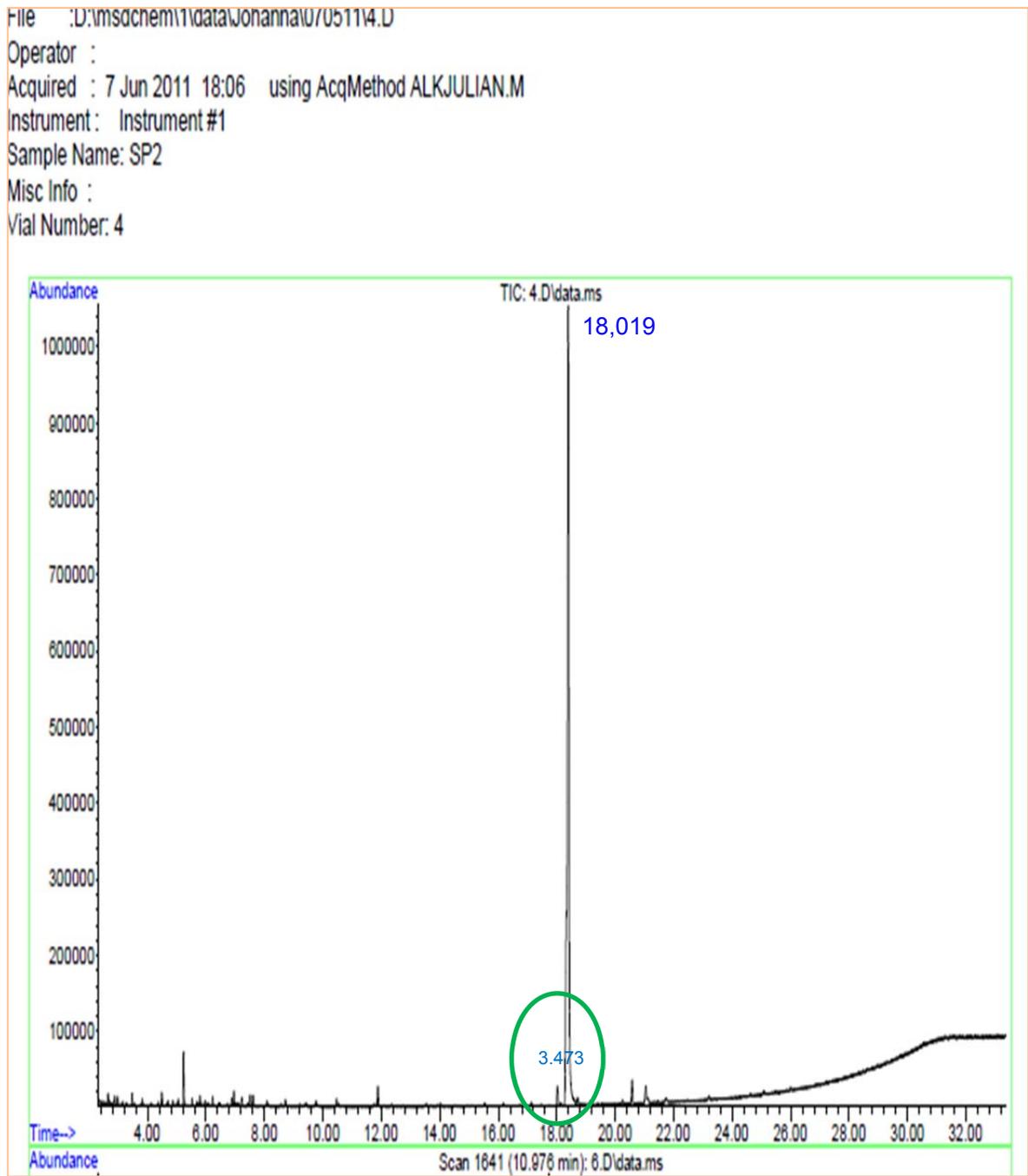
La tabla 10, presenta los resultados obtenidos de la fracción Aps 2 de la especie *P. ledifolia*, el CG-EM no identificó compuestos de tipo alcaloidal, pero si el compuesto 6,6 metilenbis (2-ter-butil-4 metilfenol).

**Tabla 10. Resultados del GC-MS de la fracción Aps 2 de la especie *P. ledifolia***

#	TR	Compuesto	% coincidencia	% Área
1	3.473	No identificado	-	9.10
2	6.232	No identificado	-	44.69
3	6.316	No identificado	-	-
4	6.375	Ácido bencenacético, 4-hidroxi	90	2.68
5	6.422	No identificado	-	8.12
6	20.577	6,6 metilenbis( 2-ter-butil-4 metilfenol)	-	3.13

En la figura 32 se muestra el cromatograma de gases de la fracción Aps 2 de la especie *S. pampae*. El pico analizado tiene un tiempo de retención de (18.019 min)

**Figura 32. Cromatograma de gases de la fracción Aps 2 de la especie *S. pampae***



La tabla 11 muestra los resultados obtenidos por el CG-EM de la especie *S. pampae*, presento un compuesto de tipo alcaloidal llamado seneciofilina con características de alcaloides y el compuesto 6,6 metilenbis (2-ter-butil-4 metilfenol).

**Tabla 11. Resultados del GC-MS de la fracción Aps 2 de la especie *S.pampae***

#	TR	Compuesto	% coincidencia	% Área
1	5.236	No identificado	-	2.51
2	11.882	No identificado	-	1.27
3	18.024	Senecifilina	43	1.50
4	18.395	No identificado	-	93.07
5	20.57	6,6 metilenbis( 2-ter-butil-4 metilfenol)	99	1.65

La prueba realizada mediante CCD para la identificación de alcaloides dio positiva. En la figura 34 se muestra el espectro de masas del compuesto de la fracción Aps 2 de la especie *S. pampae*. El espectro de masas muestra un ión molecular de  $M^+$  281, seguido con fragmentos  $m/z$  220, 206, 136, 120 (pico base), 108, 95 y otros fragmentos de menor intensidad. Los alcaloides pirrolizidínicos con una insaturación en los carbonos 1 y 2 del grupo macrocíclicos, con base necina tipo retronecina puede ser identificada por los fragmentos  $m/z$  138,137 y 136; 121, 120y 119; 95, 94 y 93 (Atal *et al.* 1966). El espectro de masas (ver figura 34) presenta fraccionamientos característicos de alcaloides pirrolizidínicos tipo macrocíclicos. Los patrones de fraccionamiento para este tipo de compuestos alcaloidales presentan los siguientes iones  $m/z$  220, 136, 120, 94 (Bredenkamp. 1991), se comparó estos fragmentos con el espectro de masas teniendo relación en los rompimientos  $m/z$  220, 120 (pico base) ,136 y 94 lo cual indica que es un compuesto de este tipo. Además. Este grupo de compuestos se caracteriza por

tener un primer rompimiento en el carbono 9, dando como resultado la migración del hidrógeno macrocíclico dentro de la núcleo de la necina (Rashkes, Ya *et al.* 1978), la presencia de los picos  $m/z$  136, 120, 119 son característicos para identificar el núcleo básico de la retronecina con 12 miembros macrocíclicos (Crout, J.1969., Bhacca *et al.* 1968 y Coucorakis *et al.* 1970). A continuación (ver figura 33) se muestra el espectro de masas del compuesto con tiempo de retención (18.019 min) que mostro fragmentaciones características de alcaloides pirrolizidínicos tipo retronecina macrocíclicos, comparado con el espectro de masas del compuesto seneciofilina con un 43 % de coincidencia de la biblioteca NIST 05 del EM.

Figura 33. Espectro de masas del compuesto, con tiempo de retención (18.019 min) identificado por CG-EM de la fracción Aps 2 de *S. pampae*. A. EM de la fracción Aps 2 B. EM de la biblioteca NIST 05 C. Estructura propuesta por la biblioteca NIST 05: Seneciofilina

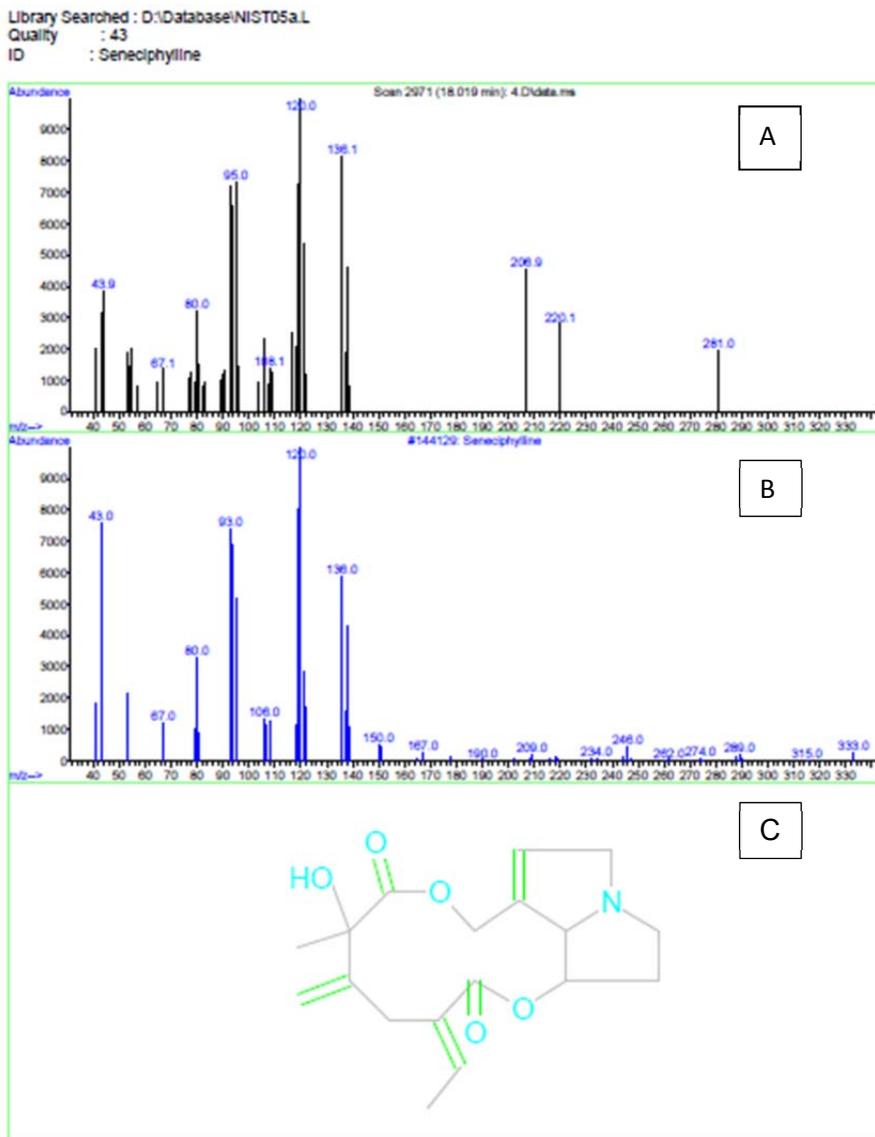
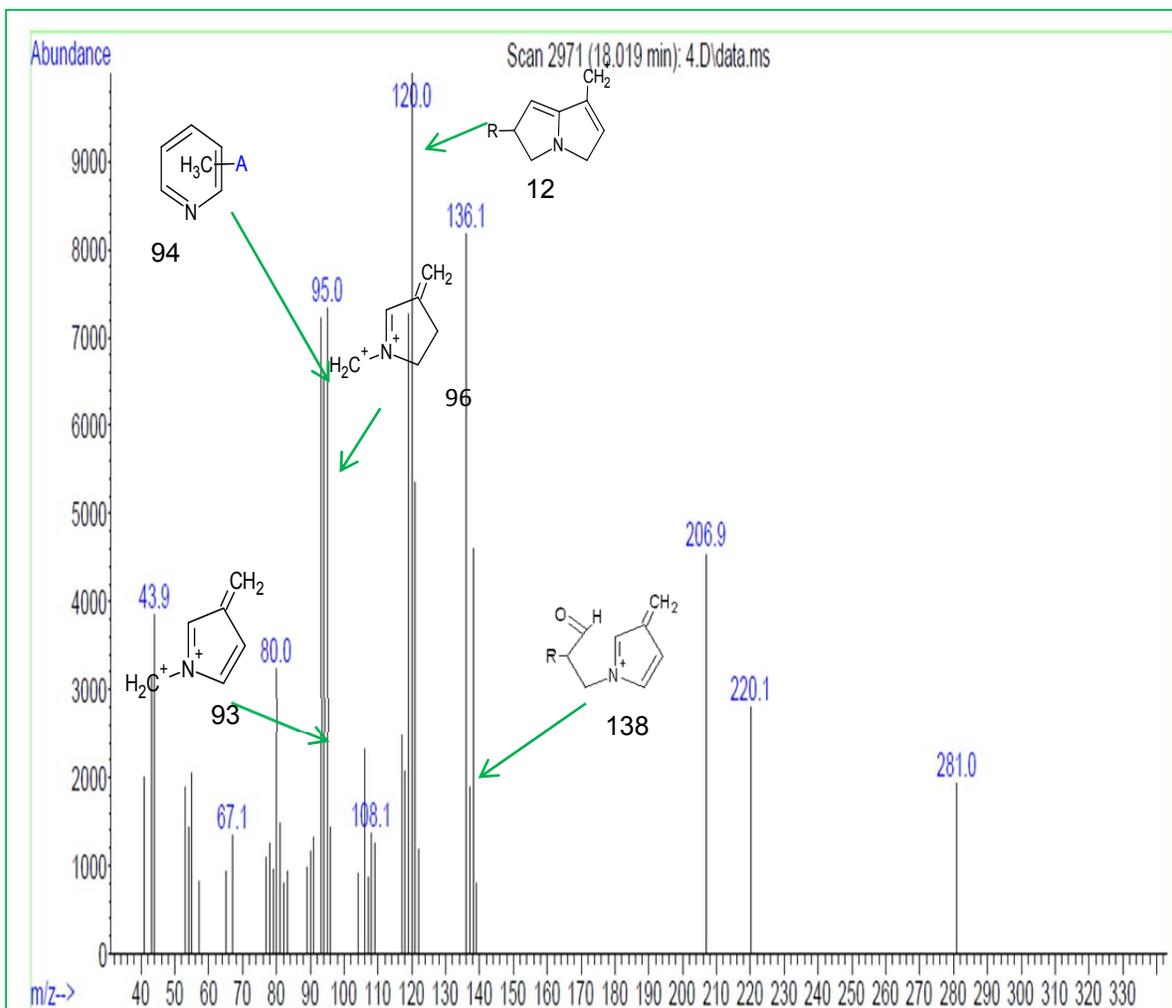


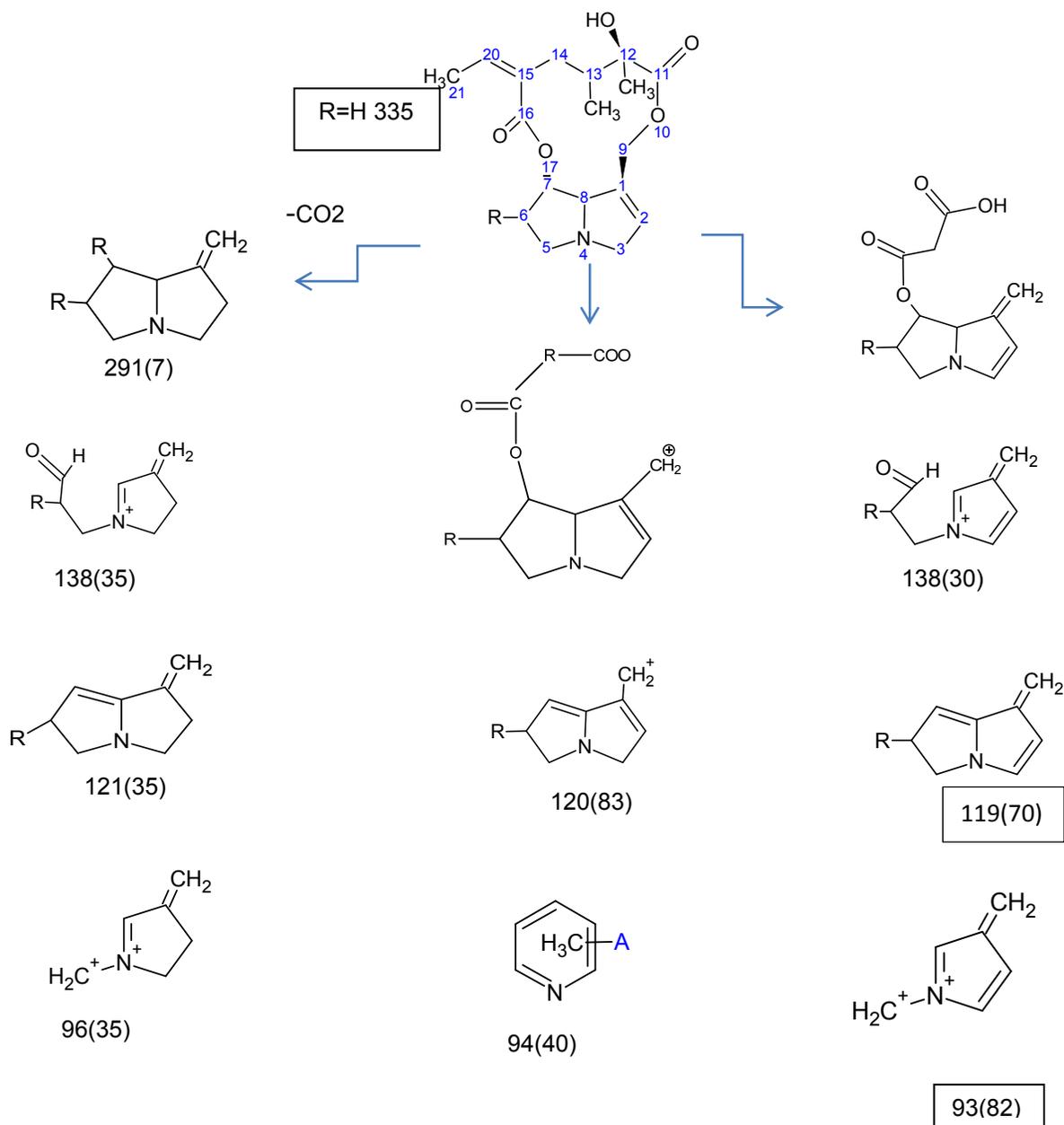
Figura 34. Espectro de masas del compuesto, con tiempo de retención (18.019 min) de la fracción Aps 2 de la especie *S. pampae*.



Para este tipo de compuestos se presentan las siguientes rutas de fragmentación, como lo indica la figura 35:

Figura 35. Ruta de fragmentación característica para Aps macrocíclicos tipo retronecina

Fuente: Rashkes, U.1978



### 3.4.2 Separación e identificación de los metabolitos presentes en los extractos y fracciones no alcaloidales por CG-EM

Los extractos y fracciones fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectro de masas. Se puntualiza la presencia o ausencia de los grupos de metabolitos secundarios considerados de valor quimiotaxonómico como cumarinas, terpenos, fenoles, esteroides, hidrocarburos saturados e insaturados y ácidos grasos.

### 3.4.3 Cumarinas

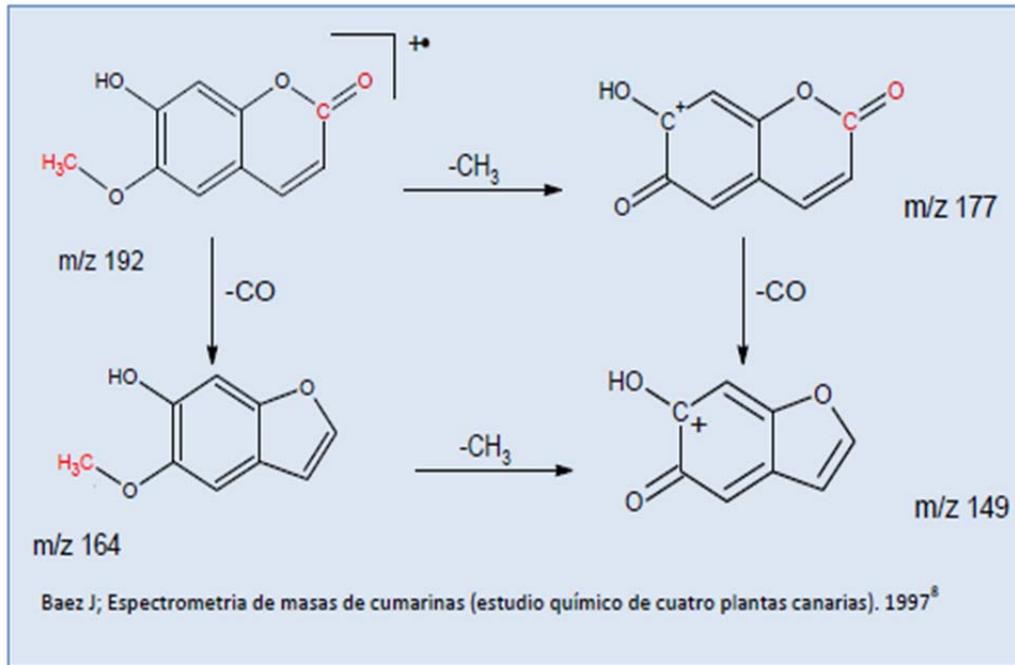
A continuación se presenta, en la figura 35 el espectro de masas del compuesto 7 hidroxí-6-metoxi-2H-benzopíren-2-ona, con tiempo de retención (15.349 min) identificado por CG-EM.

El espectro de masas obtenido de la fracción diclorometano del extracto etanólico indica la presencia de la cumarina 7 hidroxí-6-metoxi-2H-benzopíren-2-ona (Escopoletina), con tiempo de retención 15.349 min en la especie *Pentacalia ledifolia*, con un 94% de coincidencia con la biblioteca Wiley – NIST 05. Se observa un espectro de masas con  $M^+$  192 (100%),  $m/z$  177 (60%), 164 (20%), 149 (40%), 135 (1%) y el resto de picos de baja intensidad.

En el espectro de masas para el compuesto 7 hidroxí-6-metoxi-2H-benzopíren-2-ona con  $M^+$  192 que pertenece a la fórmula  $C_{10}H_8O_4$ . Del pico de ión molecular  $m/z$  192 al fragmento  $m/z$  177 indica la pérdida de un grupo metilo, el siguiente fragmento con  $m/z$  164 ocurre por la pérdida de un grupo carbonilo, el fragmento con  $m/z$  149 indica la pérdida de un grupo metilo ( $-CH_3$ ) (Baez, J. 1997) característicos de las cumarinas.

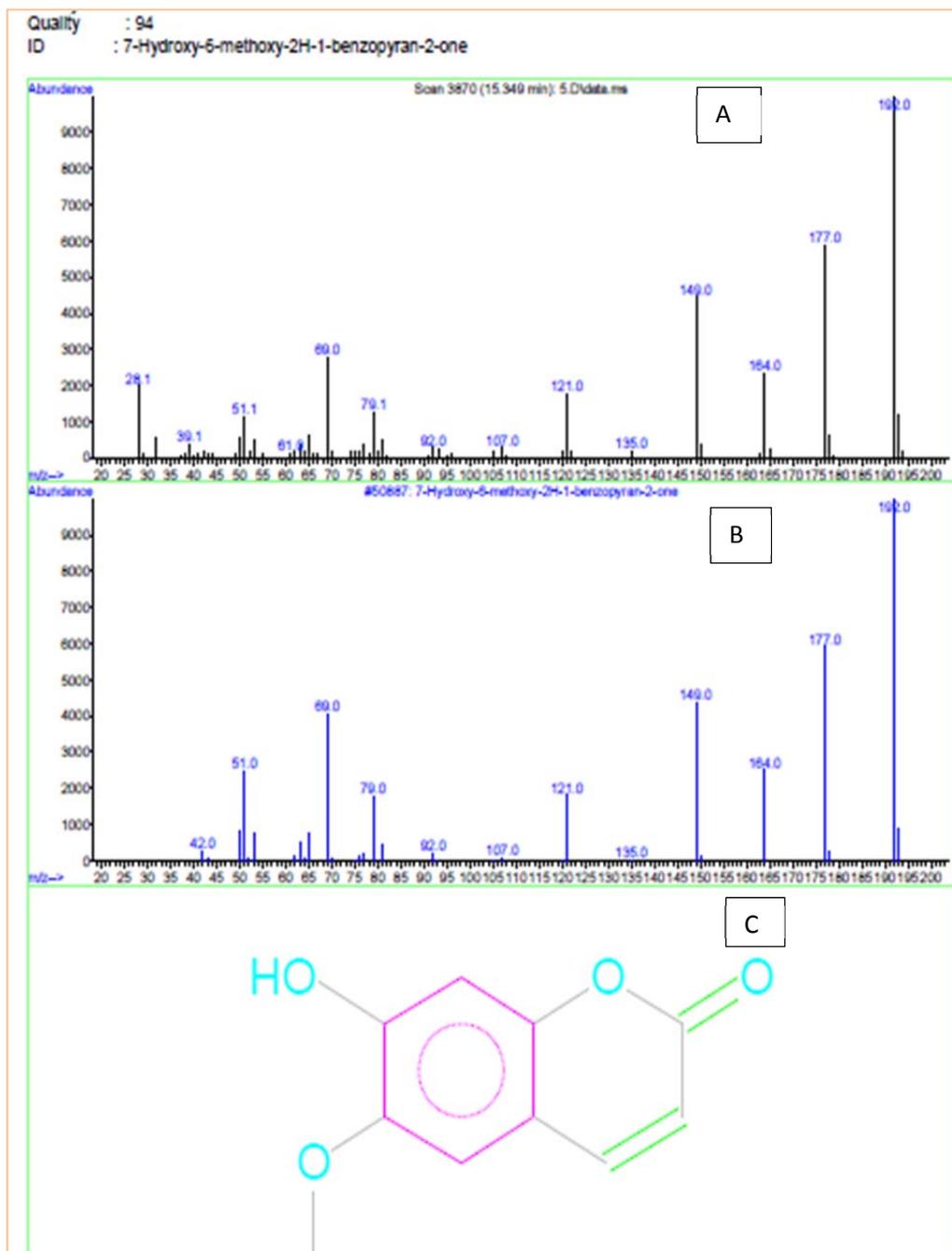
La figura 34 muestra los rompimientos característicos reportados en la literatura para este tipo de compuestos:

Figura 36. Espectrometría de masas de cumarinas



Fuente: Baez, J.1997

Figura 37. Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención (15.349 min) identificado por GC-MS de la fracción Aps 2 de *S. pampae*. A. EM con tiempo de retención 15.349 B. EM de la biblioteca NIST 05 C. 7 hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiren-2-ona



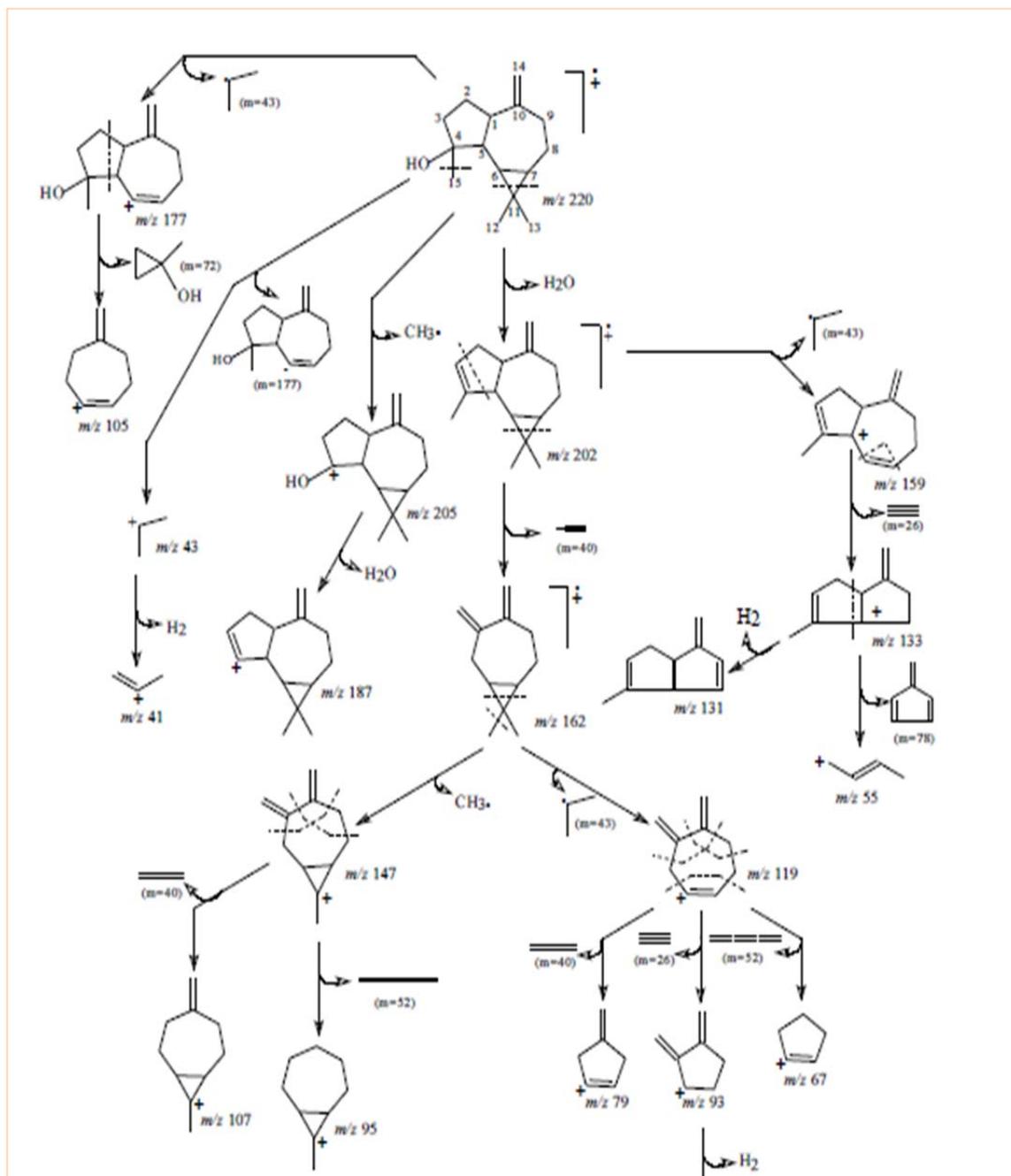
### 3.4.4 Terpenos

En la figura 38 se muestra el espectro de masas del compuesto espatulenol de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *G. hirsuta* se identificó por CG-EM un sesquiterpeno de importancia biológica con tiempo de retención (11.289 min). En el espectro de masas se presenta el pico del ión molecular  $M^+$  220 lo cual corresponde a la fórmula  $C_{15}H_{24}O$ . El ión molecular  $m/z$  220 sufre una eliminación de un radical metilo (M-15), originando un fragmento intenso en  $m/z$  205 (pico base). Posteriormente sufre la pérdida de una molécula de agua (M-18) dando el fragmento  $m/z$  187. Seguidamente un rompimiento entre los carbonos 6 -11 y 7-11 dando un fragmento en  $m/z$  177, debido a la pérdida de un grupo isopropil en forma de radical (43 u.m.a). A partir de este fragmento, se elimina una molécula neutra (72 u.m.a), originando una señal en  $m/z$  105 y a partir de la eliminación de moléculas neutras da los fragmentos característicos de este compuesto (Bolzan. 2007).

De acuerdo con la coincidencia del 92%, con la base Wiley-NIST 05 del CG-EM y la ruta de rompimientos reportada para este compuesto en otras investigaciones, coincidente con los rompimientos presentados en la figura se identificó el compuesto llamado espatulenol. Se han demostrado estudios anteriores que este compuesto presenta actividad antibacteriana contra cepas *Bacillus cereus* y *Speudomonas aeruginosa*. Este compuesto ha sido aislado de las partes aéreas del género *Senecio* (Bolzan. 2007). En otro estudio realizado se ha caracterizado sobre su actividad repelente contra mosquitos, demostrando que el espatulenol es altamente efectivo, previniendo picadas de *Aedes egypti* y *anopheles stephensi*.

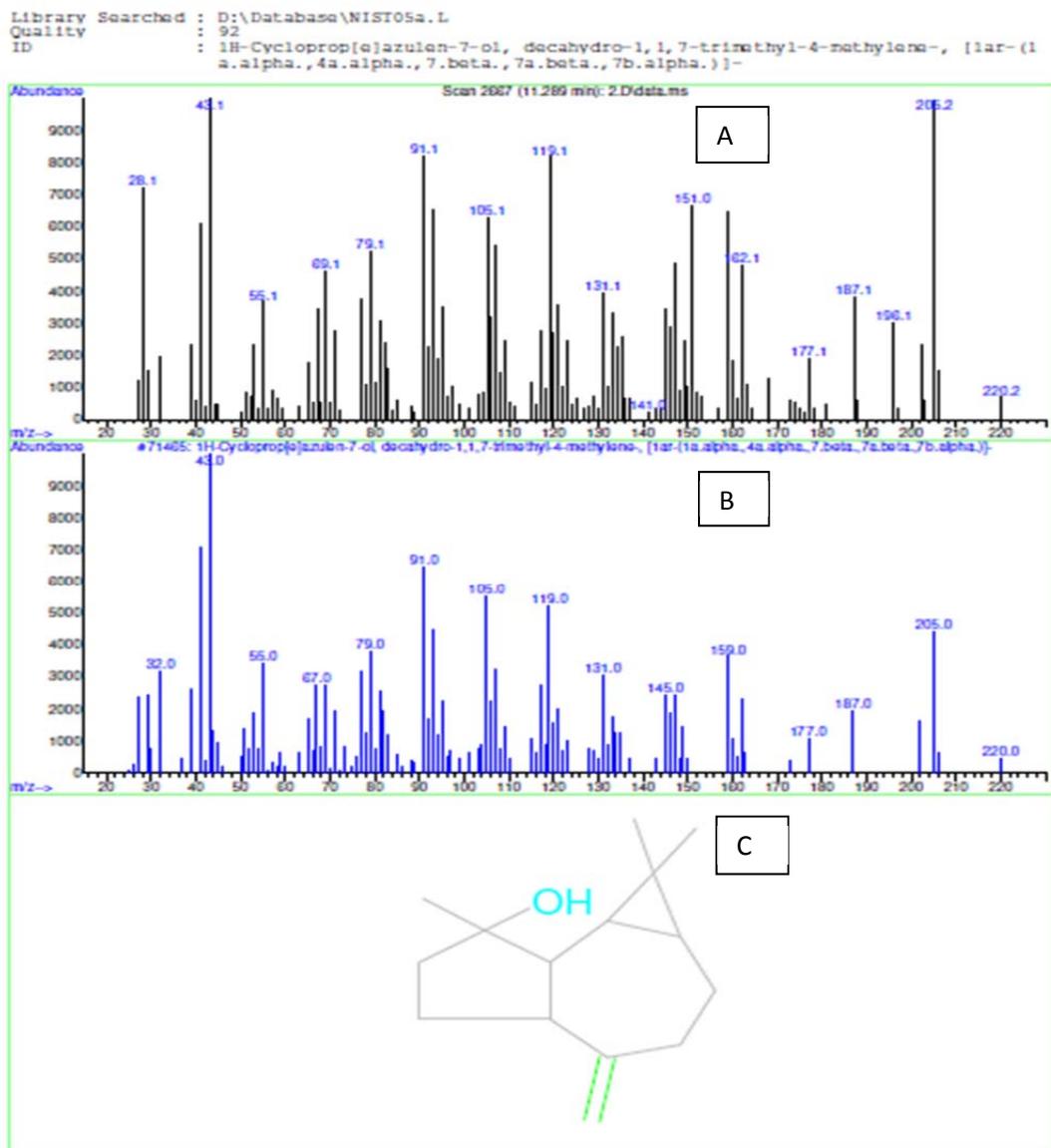
A continuación se muestra en la figura los rompimientos característicos planteados para este tipo de compuesto:

Figura 38. Fragmentos de masas propuestos para el compuesto espatulenol



Fuente: Bolzan, A. 2007.

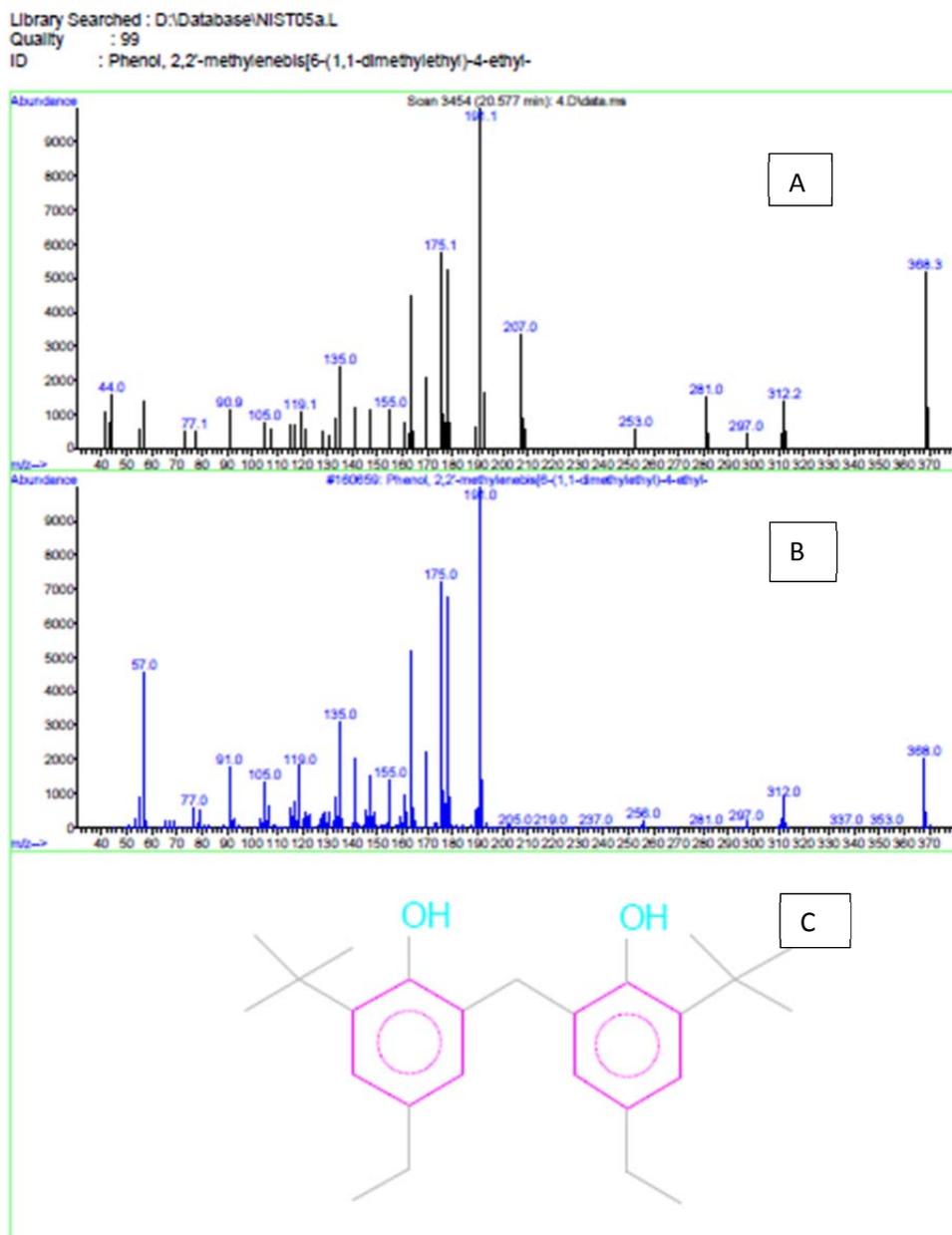
Figura 39. Espectro de masas del compuesto espatulenol de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *G. hirsuta*. A. EM con tiempo de retención 11.289 B. EM de la biblioteca NIST 05 C. compuesto espatulenol



### 3.4.5 Fenoles

En la figura 40 se muestra el espectro de masas para el compuesto, que se presentó de manera similar en las tres especies, en la fracción Aps 1 de todas las fracciones se identificó por CG-EM un nuevo compuesto llamado 6,6 metilenebis (2 ter-butil-4-metilfenol) con tiempo de retención (20.577 min) y con un porcentaje de coincidencia del 99% con la biblioteca Wiley-NIST 05. En reportes bibliográficos se le atribuye su potencial tóxico a la presencia de este tipo de fenoles. También se encontró en la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie *Pentacalia ledifolia* y en la fracción alcaloidal Aps 2 de *Senecio pampae*.

Figura 40. Espectro de masas de 6,6 metileno bis (2-ter-butil-4 metilfenol) con tiempo de retención (20.577 min) identificado por CG-EM en las tres especies. A. EM con tiempo de retención 20.577. B. EM de la biblioteca NIST 05 C. compuesto 6,6 metileno bis (2-ter-butil-4 metilfenol)



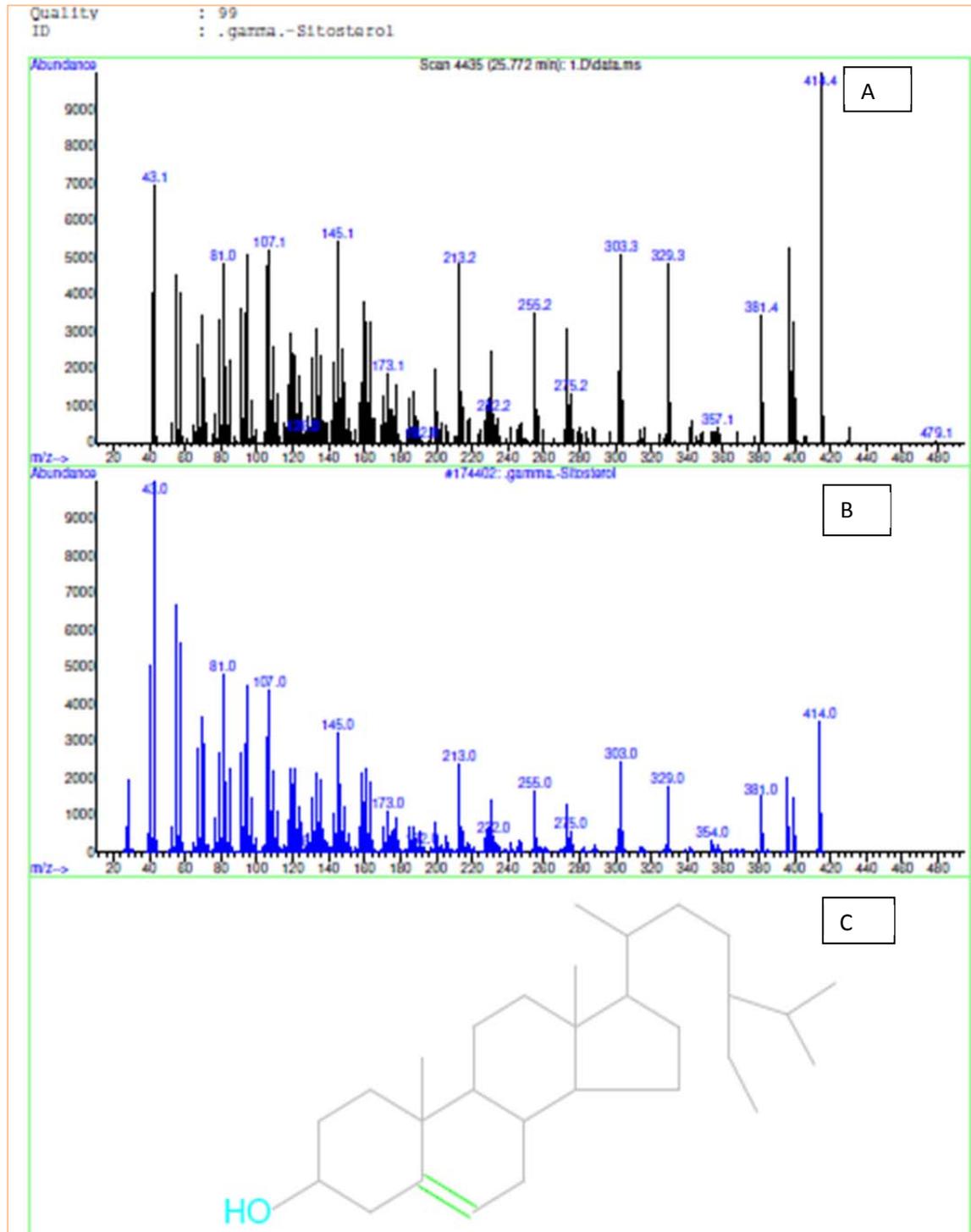
### 3.4.6 Esteroles

En el extracto clorofórmico de la especie *S. pampae* se identificó por CG-EM el compuesto gamma sitoesterol con tiempo de retención (25.772 min), como lo muestra la figura 42. En la prueba cualitativa de Lieberman-Buchard para identificar esteroides dio positiva. Este tipo de metabolitos ya han sido reportados para el género *Pentacalia* (Granados. 2000), lo que se puede afirmar que son recurrentes dentro de la subtribu *Senecioninae*. También por CG-EM se identificó en la especie *S. pampae*. El espectro de masas como lo muestra la figura 42 indica un % de coincidencia del 99%, por su estructura es un compuesto de tipo esteroide. Las fragmentaciones características para los esteroides son m/z 396 por la pérdida de agua (proveniente del grupo OH en la posición 3), este fragmento sufre una nueva fragmentación dando origen al fragmento de m/z 255, el cual se forma por la pérdida de la cadena lateral unida al ciclo pentano perhidrofenantreno.

Por otra parte se ven claramente los fragmentos del esteroide obtenidos a partir de la pérdida de la cadena lateral por parte del esteroide original, sin pérdida aún de agua, 273 m/z y la posterior pérdida de 18 unidades debido a la molécula de agua (proveniente del grupo OH de la posición 3) (Martinez. 2002), a continuación se muestra la ruta de fragmentación del gamma sitoesterol.



Figura 42. Espectro de masas del compuesto Gamma-sitosterol con tiempo de retención (25.772 min) identificado por CG-EM en la especie *S.pampae*. A. EM con tiempo de retención (25.772 min) B. EM de la biblioteca NIST 05. C. Compuesto gamma sitoesterol



### 3.4.7 Hidrocarburos

En la fracción clorofórmica de las partes aéreas de las especies *G. hirsuta*, *S. pampae* y *P. ledifolia* por GC-MS presentaron principalmente cadenas hidrocarbonadas entre C<sub>13</sub>-C<sub>20</sub>, los alcanos y algunos alquenos se presentaron en todas las fracciones de la fracción clorofórmica de *G. hirsuta* y *S. pampae* especialmente, se identificó el hidrocarburo eicosano como mayor componente en la mezcla, probablemente la presencia de estos hidrocarburos es producto de las condiciones de hábitat extremas, como las altas temperaturas y un alto estrés lo que provoca un almacenamiento constante de hidrocarburos para su gasto de energía, también los derivados de azúcares actúan como repelentes en animales herbívoros (Smith, P.1976). En la tabla 12 se muestra los hidrocarburos obtenidos del análisis por CG-MS.

**Tabla 12. Composición química de hidrocarburos saturados e insaturados de las tres especies**

	Composición química	<i>G.hirsuta</i>	<i>P. ledifolia</i>	<i>S.pampae</i>
#		abundancia	abundancia	abundancia
1	Octadecano	1,85	-	
2	17-pentatriacontano	0,4	-	
3	7-hexadeceno		-	4,24
4	Docosano		-	1,42
5	Eicosano	10,47	-	1,75
6	Heneicosano	9,14	-	
7	Octadecano	10,47	-	

### 3.4.8 Ácidos grasos

La composición química de ácidos grasos en las partes aéreas de las tres especies fue principalmente para las especies *G. hirsuta* y *P. ledifolia*. Se encontró como mayor componente el ácido hexadecanoico. Se lograron identificar los principales ácidos grasos de las tres especies, observándose grandes diferencias en su composición. Aun cuando dos de las especies contienen ácidos grasos. La tabla 13 muestra los compuestos obtenidos de las fracciones no alcaloidales.

**Tabla 13. Composición química de ácidos grasos y abundancia en las tres especies**

Composición química	<i>G.hirsuta</i>	<i>P.ledifolia</i>	<i>S.pampae</i>
#	abundancia	abundancia	abundancia
1	Ácido-2- metil- 2 butanoico	2,06	
2	Ácido hexanoico	0,21	
3	Ácido nonanoico	0,23	
4	Ácido decanoico	0,2	
5	Ácido hexadecanoico	1,03	3,19
6	9,12 Ácido octadecadienoico		1,95
7	Ácido octadecanoico		1,38

Nota: a la especie *P. ledifolia* no se le hizo extracción clorofórmica porque ya había sido tratada por otro estudiante.

#### 4. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos permitieron comprobar la variabilidad química de los extractos y fracciones obtenidos de las tres especies: *G. hirsuta*, *P. ledifolia* y *S. pampae* teniendo en cuenta la presencia o ausencia (no detección) de los marcadores quimiotaxonómicos: alcaloides pirrolizidínicos, eremofilanos, cumarinas y quinoles, identificados mediante las técnicas de análisis cualitativo: pruebas químicas y análisis cromatográfico (CCD, CCDB y CG-EM).
- Se comprobó la presencia de alcaloides pirrolizidínicos para las especies *G. hirsuta* y *S. pampae*, y la no detección de estos alcaloides en la especie *P. ledifolia*.
- Se identificaron derivados de eremofilanos en la fracción éter de petróleo de las especies *S. pampae* y *G. hirsuta*, mientras que en la especie *P. ledifolia* no se detectaron.
- Se observaron cumarinas en la fracción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la especie *P. ledifolia*, en la fracción éter de petróleo de la especie *G. hirsuta* y posiblemente en la especie *S. pampae*.
- Los quinoles fueron detectados en la fracción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en la especie *P. ledifolia* y la fracción éter de petróleo de la especie *G. hirsuta*.
- Comparando el género *Senecio* y género *Gynoxys* se pudo apreciar similitud en la detección de alcaloides pirrolizidínicos y derivados de eremofilano.
- Comparando el género *Pentacalia* y género *Gynoxys* analizadas en este estudio, se pudo apreciar similitud en la detección de cumarinas y quinoles.

- Se hallaron diferencias importantes: en la especie *P. ledifolia* por la no detección de alcaloides pirrolizidínicos y en *S. pampae* por la no detección de los quinoles.
- Se lograron identificar los cuatro marcadores quimiotaxonómicos: alcaloides pirrolizidínicos, furanoeremofilanos, cumarinas y quinoles en la especie *G. hirsuta*, identificados por primera vez.
- Este es el primer reporte en relación a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos mediante la técnica CG-EM en la especie *G. hirsuta* y *S. pampae*, lo que se considera un aporte al estudio fitoquímico de ambas especies.
- Se confirma que el género *Pentacalia* no contiene ni eremofilanos ni alcaloides pirrolizidínicos que son metabolitos secundarios característicos del género *Senecio*, con este estudio se apoya la segregación de esta especie en el género *Pentacalia*, por presentar la ausencia de estos caracteres químicos como lo menciona (Bohlmann *et al.* 1984).

## 5. RECOMENDACIONES

1. Extraer y purificar en *G. hirsuta* los marcadores quimiotaxonómicos como cumarinas, quinoles y derivados de eremofilano ya que fueron identificados pero no aislados.
2. Evaluar y comprobar actividad biológica de los extractos y fracciones de las especies *G. hirsuta* y *S. pampae* debido a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos, derivados de eremofilanos, quinoles y cumarinas de interés biológico.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

ARANGO A. 2010. Curso de farmacognosia. Compuestos derivados del ácido shikímico.<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/>. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

ATAL, C,K., KAPUR, K,K ., CULVENOR,C,C .,SMITH, L, W. 1966. A new pyrrolizidine aminoalcohol in alkaloids from *Crotalaria* species. *Tetrahedron let.* Vol 6. p 537

BAEZ, J.1977.Espectrometria de masas de Cumarinas (Estudio químico de cuatro plantas canarias).Tesis de grado para optar por el Título de Químico. Universidad la Laguna. Escuela Universitaria de Ingeniería técnica industrial de las Palmas.

BHACCA. SHARMA R,K. 1986. Mucronatine, a new alkaloid from *Crotalaria mucronata* desv. Vol 24. p 6319

BICCHI, C., CANIATO, R., TABACCHI, R.1989.Capillary gas-chromatography positive and negative-ion chemical ionization mass-spectrometry on pyrrolizidine alkaloids of *Senecio-inaequidens* using ammonia and hydroxyl ions as the reagent species.*J.Nat.Prod.*Vol 52. p32

BILBAO, M. 1997. Análisis fitoquímico preliminar. Química de los productos naturales. Universidad del Quindío. Editorial Norma Armenia. p 185

BOHLMANN, F., ZIESCH, E, J.1979. Neue Germacrene- derivate aus- *Senecio* arten- Phytchemistry. Vol 18. p 1489

BOHLMANN F., CASTRO V., ZIESCHE. 1984. New sesquiterpenes from *Pentacalia* species. Rev latinoamericana.Quim. Vol14. p 103

BOLZAN. 2007. A constituyentes de *Senecio platensis* Arech. Isolamiento elucidacao da actividade antibacteriana.Tesis de Maestria. Universidad Federal de Santa Maria.Brasil.p125

BREMER, K. 1994. Asteraceae. Cladistics and Clasification.Timber Press, Portland, Oregon, USA.p 752

BRENDENKAMP, M. W.1991. The mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids.In: Rizk, A. M (Ed.), Naturraly Ocurring Pyrrolizidine alkaloids.CRC Press, Florida. p 147

CARDENAS, L. 1998. Evaluación in vitro del extracto de Hojas de *Pentacalia ledifolia* (H.B.K) Cuatr. Y *Pentacalia corymbosa* (Benth) Cuatr. Contra *Fusarium oxisporum* f. sp. Dianthi. Productor del Marchitamiento Vascular del Clavel (*Dianthus cariuphillus*). Trabajo de grado de

Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas, D.C. p 51

CHEEKE, P, R. 1989. In toxicants of plant Origin. Alkaloids, Press, Florida. Vol 2. p.288

CORREA, A. 2002. Revisión taxonómica de las especies Colombianas de la subtribu Tussilaginatae (Senecioneae, Asteraceae). Tesis de posgrado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. UN, Bogotá D.C Colombia. p 166

COUCOURAKIS, E, D., GORDON-GRAY, C, G. 1970. The *Senecio* alkaloids. Suggested structures for isoline and bisline two new alkaloids from *Senecio othonniformes* Fourcade. Chem, Soc. p 231

CROUT, D, H, G. 1969. Structures of axillarine and axillaridine, novel pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria axillaris*. Chem. Soc. Vol 10. p1379

CUATRECASAS, J. 1958. Aspecto de la vegetación natural de Colombia. Rev. Acad. Col. Cienc. Exact. Fis. Nat, Química y actividad antimicrobiana de plantas autóctonas Colombianas. Vol 10 p. 221

DIAZ, S., CUATRECASAS, J. 1958. Aspecto de la vegetación natural de Colombia. Revista Académica. Col. Cien. Exact. Fis. Nat. Vol 10. p 221

DIAZ, S., CUATRECASAS, J. 1999. Asteraceas de la flora de Colombia. Santafé de Bogotá D.C. Colombia. p 387

DIAZ, P., CORREA, A. 2002. Nuevas especies de *scrobicaria*, *gynoxys* y *aquatorium*. Rev, Acad. Colomb. Cienc. Vol 26. p 341

FEDDE, P. 1910. *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis, fasciculus*. p 1033

FORERO, C. 1994. Fitoquímica y actividad antimicrobiana de *Pentacalia pulchella*. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá, Colombia. p186.

GADNER, D. R., THOME, M. S., MOLYNEUX, R. J., PFISTER, J. A. 2006 & SEAWRIGHT, A. A. Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. Vol 34. p 736

GRANADOS, A. 2000. Estudio químico comparativo de tres especies de *Pentacalia* originarias de páramo y evaluación de su actividad antifúngica. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. Colombia. p78

GUHL NIMTZ, E. 1982. Los páramos circundantes de la sabana de Bogotá (Publicado por el Jardín Botánico José Celestino Mutis y la financiera

eléctrica Nacional ed.) Bogotá.p 37

HARBORNE, J, B., MABRY T, J.1982.The Flavonoids: Advances in Research, Chapman & Hall, London. Vol 1 y 2 .p 744

IBRAHIM. 2007. Isolation and Characterization of pyrrolizidine Alkaloids from *Echium glomeratum* poir (Boraginaceae). Tesis de Maestría.Jordan University of Science and Technology.p 3

JAKUPOVIC, J., ZDERO, KIING M. 1995. Furanoeremophilanes from *Gynoxys* species.Phitochemistry. Vol 40. p1677

JANSEN R, K., HOLSINGER,K, E., MICHAEL,H, J., PALMER, J, D . 1990. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation data at higher taxonomic levels: an example from the Asteraceae. Evolution. Vol 44. P 2005

MATTOCKS, A, R. 1986. Chemistry and Toxicology of pyrrolizidine Alkaloids. Academic Press, London. p 32

MARTINEZ, A. 2002. Curso de farmacognosia. Esteroles<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/>. Facultad de Química

Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

NORDENSTAM, B., HEYWOOD, J. B., HARBORNE. TURNER .1977  
Senecioneae and Liabeae. The biology and chemistry of the Compositae,  
.Academic Press, London, UK. Vol 2, p799

PEDROZO, J., TORRENEGRA, R, TELLEZ, A. 2006 y otros. Nueva fuente  
de quinoles, la superficie foliar de *Pentacalia ledifolia* y *Pentacalia  
corymbosa* y sus propiedades antifúngicas. Revista Brasileira de  
Farmacognosia. Vol 16, p 591.

RASHKES, Ya, U.1978. Mass spectra of pyrrolizidine alkaloids. Chemistry of  
Natural Compounds. Vol 14.p 121.

ROBINSON, H y CUATRECASAS.1978. A review of the central American  
species of *Pentacalia* (Asteraceae-Senecioneae). Phytologia. Vol 4.p 37

ROMO DE VIVAR, A., PEREZ, A., ARCINIEGAS, A., VILLASEÑOR, J, L.  
2007. Secondary Metabolites from Mexican Species of Tribe *Senecioneae*  
(Asteraceae). J.Mex.Chem.Soc. Vol 51.p 160

SANABRIA, A. 1983. Análisis fitoquímico. Preliminar. Universidad Nacional  
de Colombia. Bogotá.p 95

SMITH, P. 1976. The Chemotaxonomy of Plants. Ed Edward Arnold. London. Bristol, England. p 123

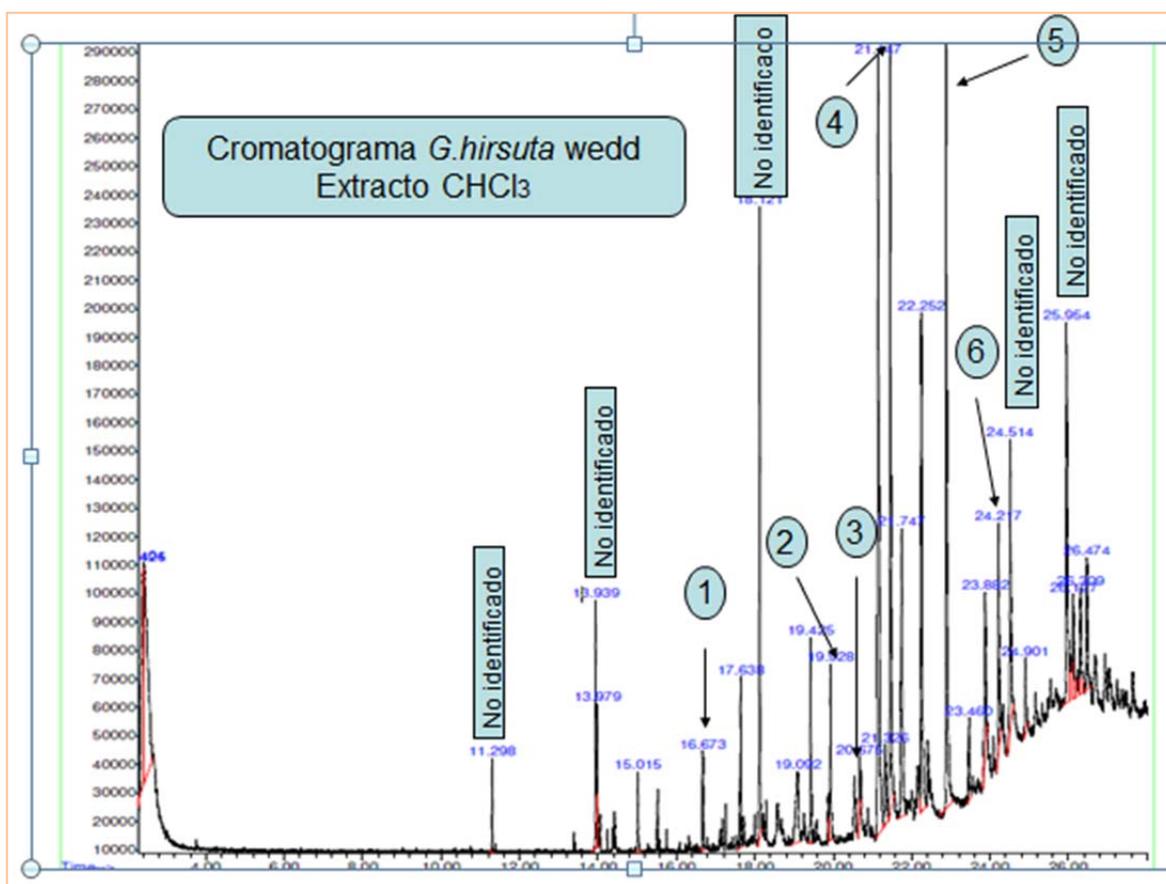
TRIGO, J. R., LEAL, I. R., MATZENBACHER, N. I., & LEWINSOHN T. M. 2003 Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (senecioneae: Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol 31. p1011

TRILLOS, C. 1992. Aislamiento de compuestos de *Pentacalia nítida*. Tesis de grado para optar por el título de Magister en Biología con énfasis en Fitoquímica. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. p 273

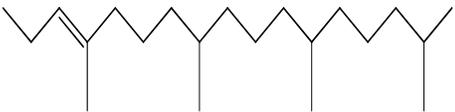
WITTE, L., RUBIOLO, P., BICCHI, C., HARTMANNT, T. 1993. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography –mass spectrometry. *Phytochemistry*. Vol 32. p. 187

## 7. ANEXOS

A continuación se presentan los cromatogramas de las fracciones no alcaloidales identificadas mediante la técnica CG-EM y las tablas de los compuestos identificados con más del 80 % de coincidencia con la biblioteca Wiley -NIST 05.

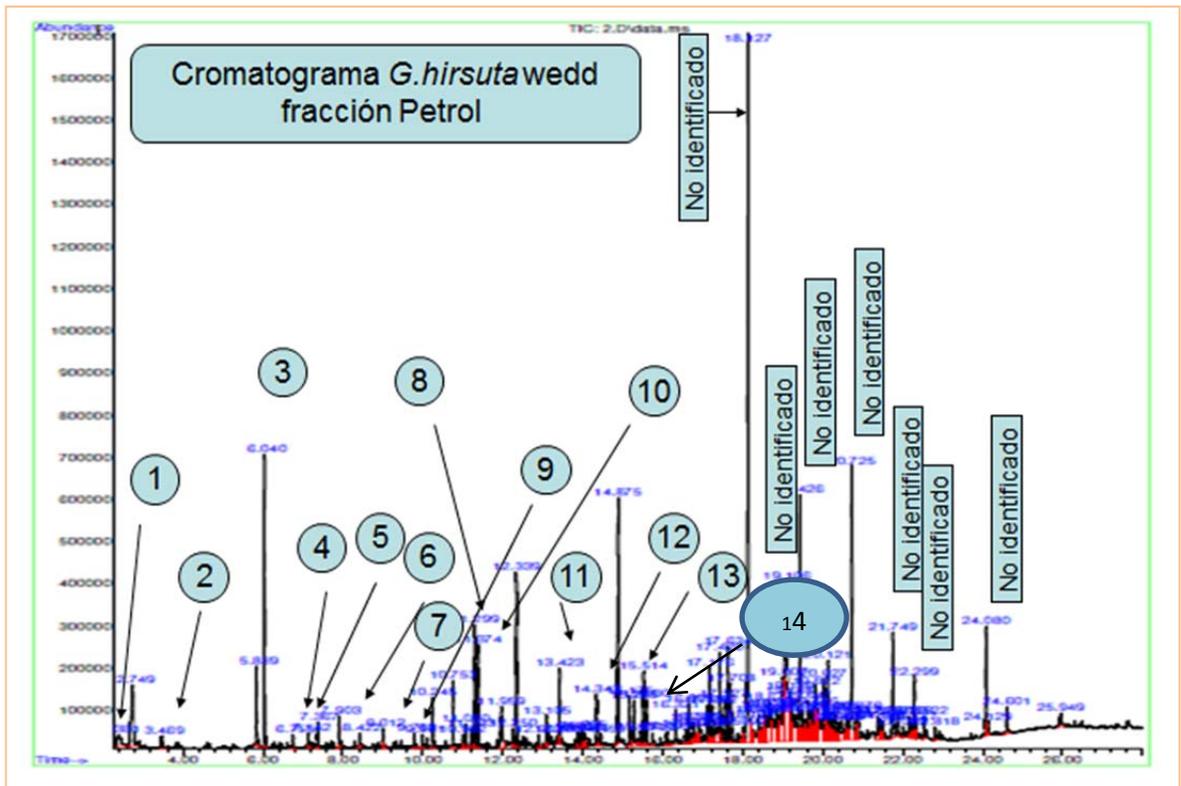


Anexo 1 .Cromatograma GC-MS del extracto CHCl<sub>3</sub> de la especie *Gynoxys hirsuta* Wedd

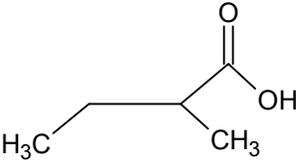
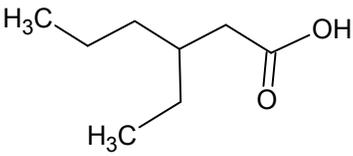
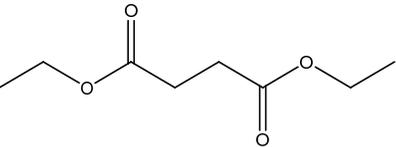
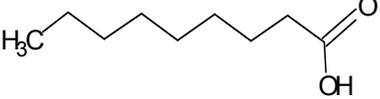
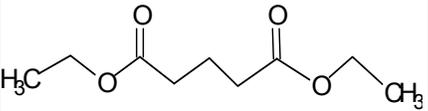
ESTRUCTURA	TR	NOMBRE	TIPO	%
<p>1</p> 	16.672	Fitol	alcohol	91
<p>2</p> 	19.929	octadecano	Hidrocarburo	91
<p>3</p> 	20.675	17- pentatriaconteno	Hidrocarburo	90
<p>4</p> 	21.459	Heneicosano	Hidrocarburo	95
<p>5</p> 	22.883	octadecano	Hidrocarburo	96

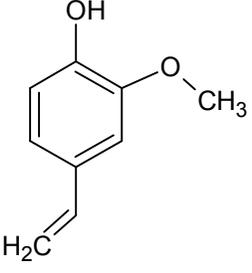
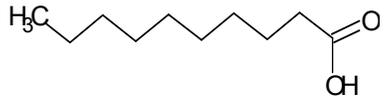
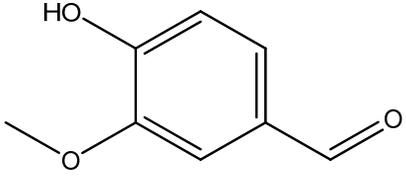
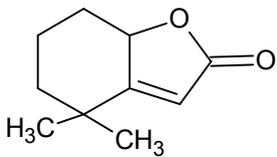
6		24.216	octadecano	Hidrocarburo	96
---	---	--------	------------	--------------	----

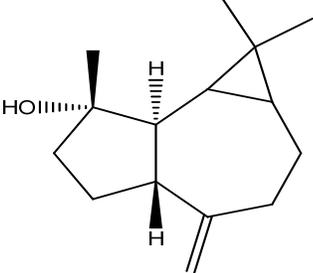
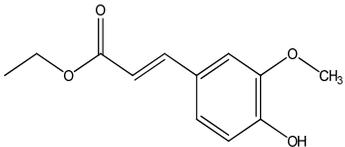
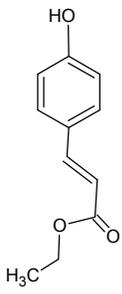
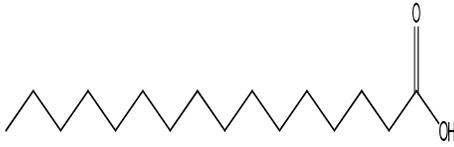
**Anexo 2. Compuestos químicos identificados por el CG-EMde la fracción CHCl<sub>3</sub> de la especie *Gynoxys hirsuta* Wedd**



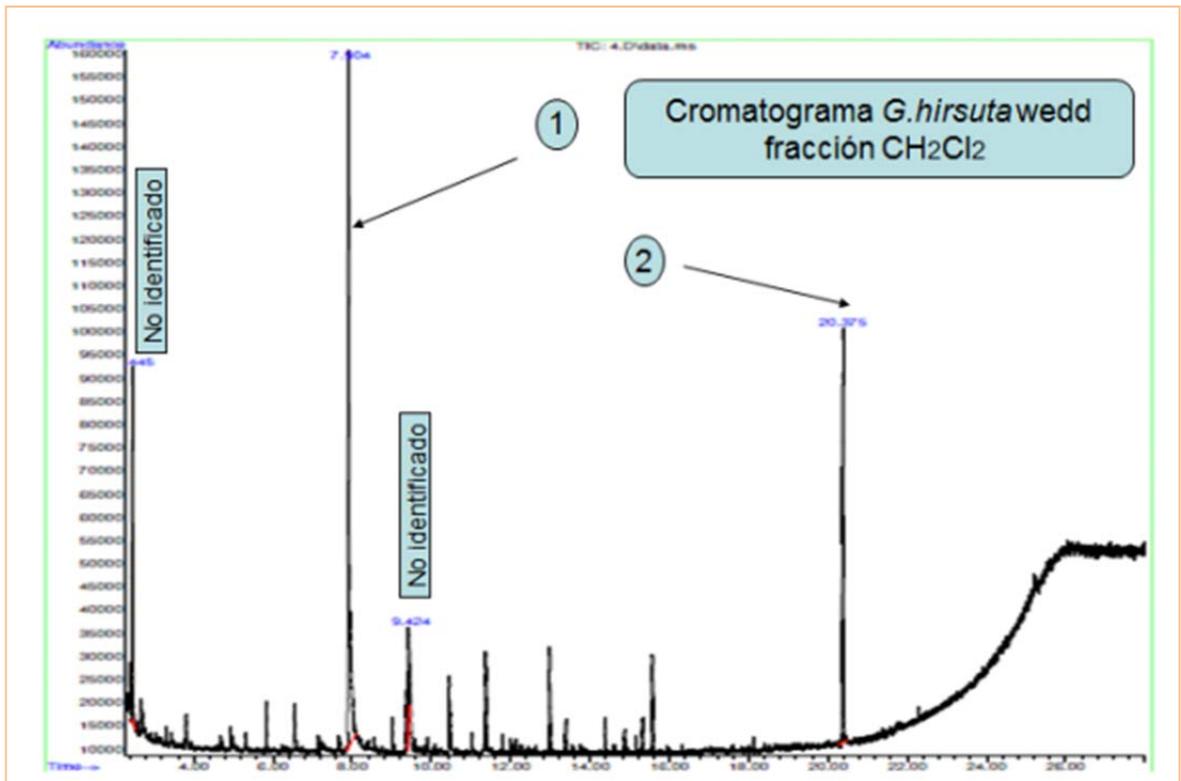
Anexo 3. Cromatograma de gases de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *Gynoxys hirsuta* Wedd

ESTRUCTURA	TR	NOMBRE	TIPO	%
1 	2.381	Ácido 2 metil butanoico	Derivados del ácido carboxílico	83
2 	3.468	Ácido hexanoico	Derivados del ácido carboxílico	83
3. 	6.04	Dietil éster butanodioico	Talato	83
4 	7.144	Ácido nonanóico	Ácido graso	83
5 	7.367	Dietil éster pentanodioico	Derivados de ésteres de ácidos carboxílicos	87

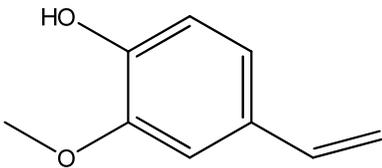
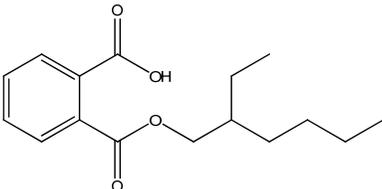
<p>6</p> 	7.903	2 metoxi -4- etenil fenol	Derivado fenólico	87
<p>7</p> 	8.423	Acido n- decanoico	Ácido graso	93
<p>8</p> 	9.014	4-hidroxi-3- metoxi- benzaldehido (vanillina )	Derivado fenólico	94
<p>9</p> 	10.246	9 -oxo nonanoato de etilo	Éster de ácidos grasos	87
<p>10</p> 	10.752	5,6,7,7a- tetrahidro-4,4,7 <sup>a</sup> trimetil Benzofuranona	Benzofurano	92

<p>11</p> 	11.299	Espatulanol	Sesquiterpeno	93
<p>12</p> 	13.422	hidroxi-3 metoxi -fenil- (2E)propenoato de etilo	Derivado del ácido cinámico	98
<p>13</p> 	13.861	Acido p- hidroxicinámico etil éster	Derivado del ácido cinámico	94
<p>14</p> 	15.174	Ácido hexadecanoico	Ácido graso	99

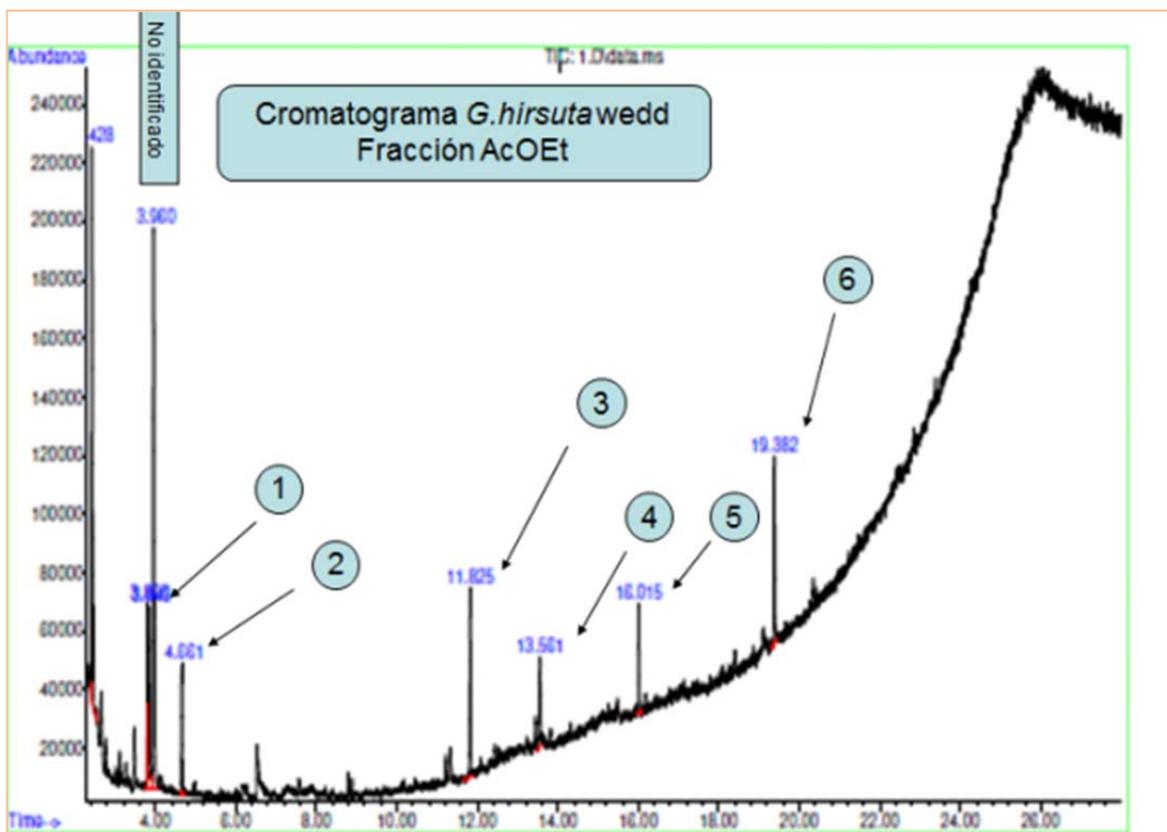
**Anexo 4. Compuestos químicos identificados por el GC-MS de la fracción Éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *Gynoxys hirsuta* Wedd.**



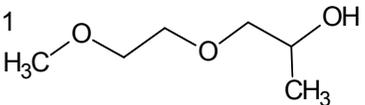
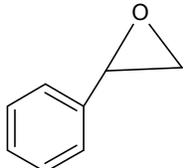
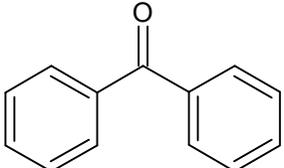
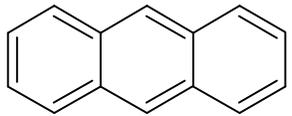
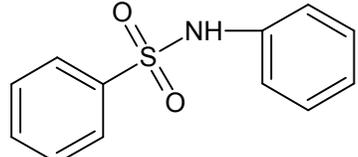
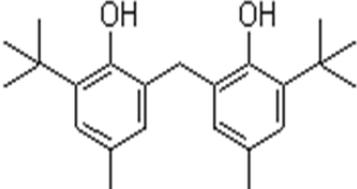
Anexo 5. Cromatograma de gases de la fracción Diclorometano del extracto etanólico de la especie *Gynoxys hirsuta* Wedd

ESTRUCTURA	TR	NOMBRE	TIPO	%
<p>1</p> 	7.903	2-metoxi 4-etilen fenol	Derivado fenólico	90
<p>2</p> 	20.375	Ácido 1,2 bencendicarboxílico mono(2 hetilhexil) ester	talato	91

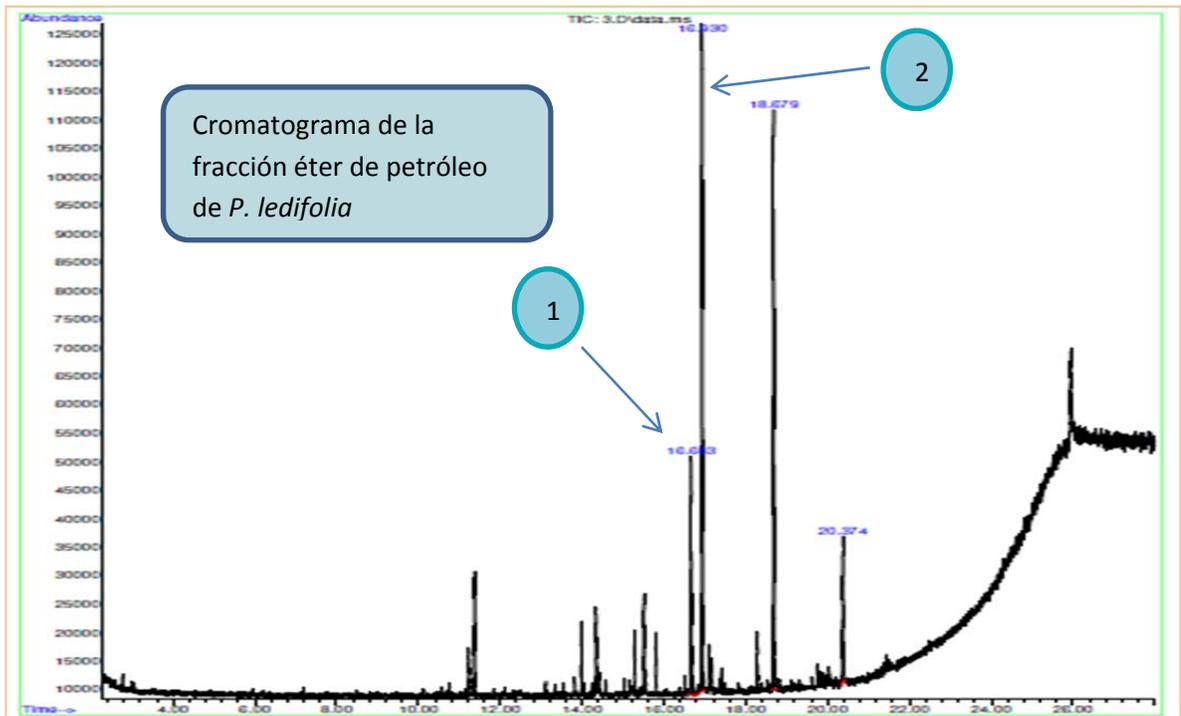
**Anexo 6. Compuestos químicos identificados por el GC-MS de la fracción Diclorometano del extracto etanólico de la especie *G. hirsuta***



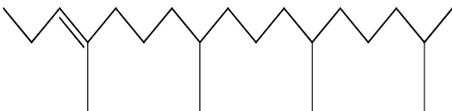
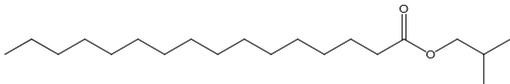
Anexo 7. Cromatograma de gases de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie *Gynoxys hirsuta* Wedd

ESTRUCTURA	TR	NOMBRE	TIPO	%
1 	3.801	1-(2-metoxi-1-metiletoxi) 2-Propanol	Alcohol	90
2 	4.659	(epoxietil)-, (R)- Benzeno,	Benceno	95
3 	11.824	Benzofenona	Benzofenona	93
4 	13.561	Antraceno	Poliaromaticos	95
5 	16.012	Benzenosulfonanilida		98
6 	19.380	metilenebis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol, 2,2'-	Polifenoles	94

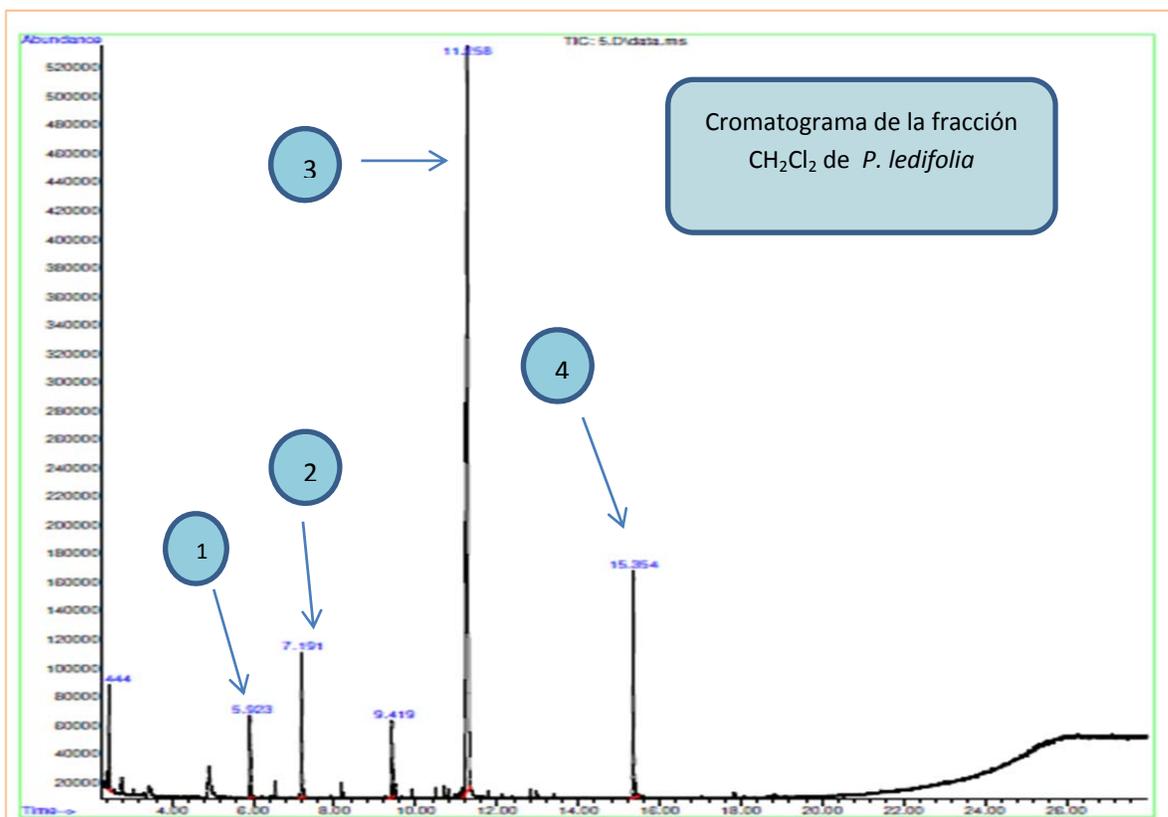
**Anexo 8. Compuestos químicos identificados por el GC-MS de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie *G.hirsuta*.**



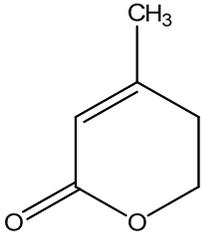
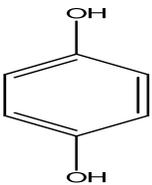
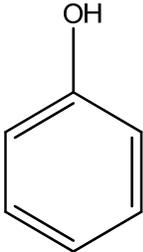
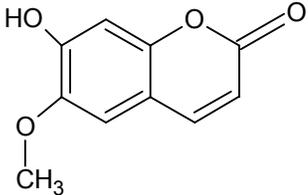
Anexo 9. Cromatograma CG de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *Pentacalia ledifolia*

ESTRUCTURA	TR	NOMBRE	TIPO	%
<p>1</p> 	16.662	Fitol	triterpeno	90
<p>2</p> 	16.929	Ácido hexadecanoico, 2-metil propil éster	Ácido graso	81

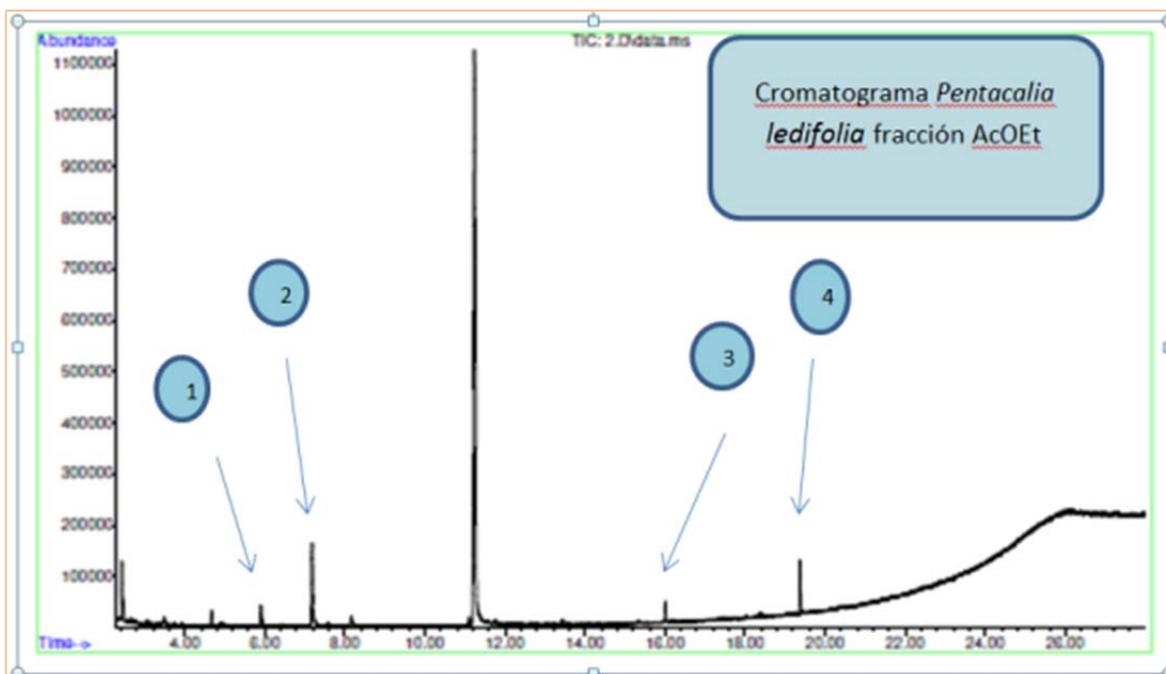
**Anexo 10. Compuestos químicos identificados por GC-MS de la fracción éter de petróleo del extracto etanólico de la especie *P.ledifolia***



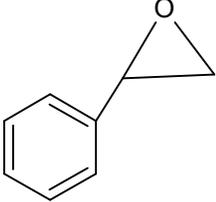
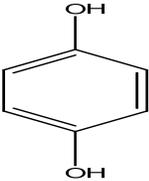
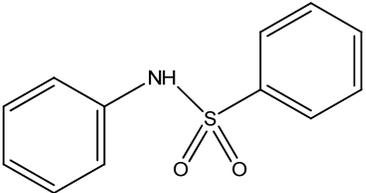
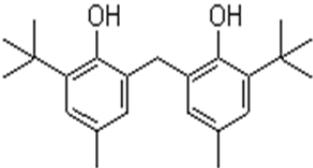
Anexo 11. Cromatograma de gases de la fracción diclorometano del extracto etanólico de la especie *Pentacalia ledifolia*.

ESTRUCTURA	TR	NOMBRE	TIPO	%
1 	5.922	Dehidromeval ónico Lactona	Lactona	90
2 	7.191	Hidroquinona	Fenol	91
3 	11.258	Fenol	Fenol	86
4 	15.356	7 hidroxí-6- metoxi-2H- benzopirén-2- ona.	Cumarina	91

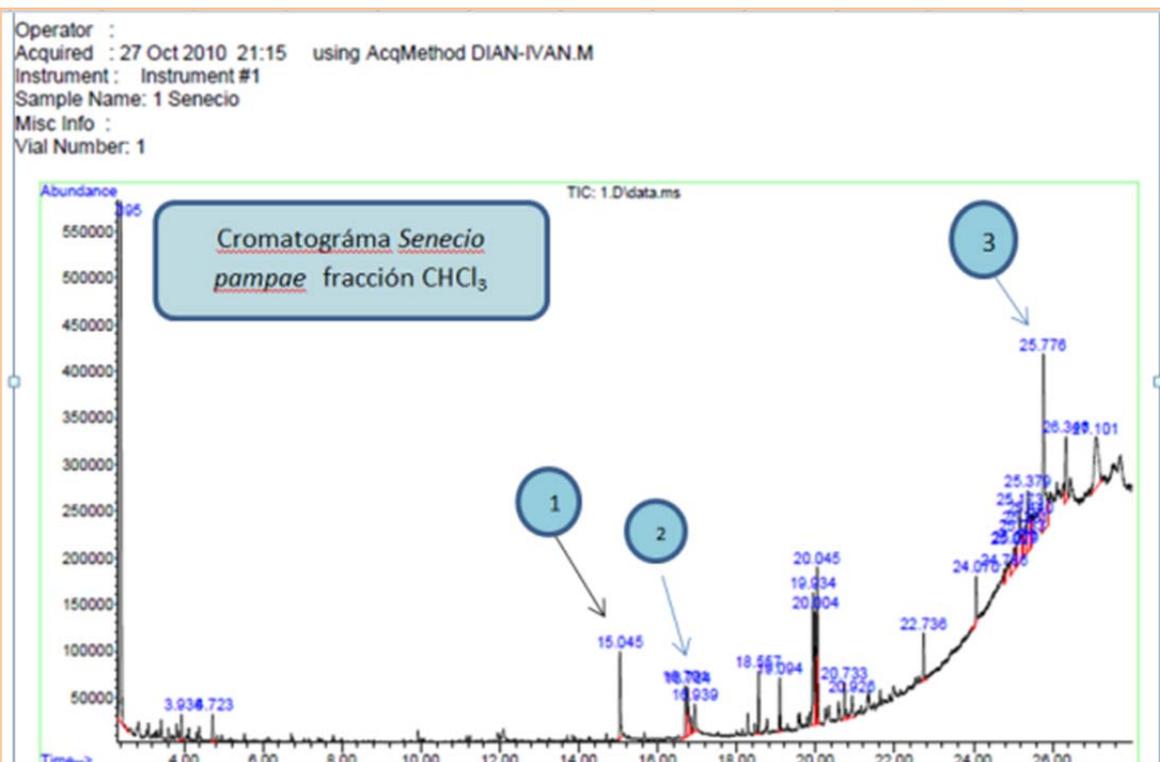
Anexo 12. Compuestos químicos identificados por el GC-MS de la fracción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> del extracto etanólico de la especie *P. ledifolia*.



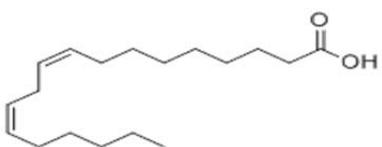
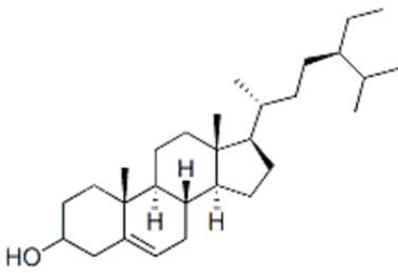
Anexo 13. Cromatograma CG de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie *Pentacalia ledifolia*.

Estructura	TR	Nombre	Tipo	%
1 	4.670	Benceno( epoxietil)	No identificado	90
2 	7.185	Hidroquinona	fenoles	91
3 	16.012	Bencensulfonamida	No identificado	95
4 	19.375	6,6 metilenebis (2 ter-butil-4-metilfenol)	Fenoles	99

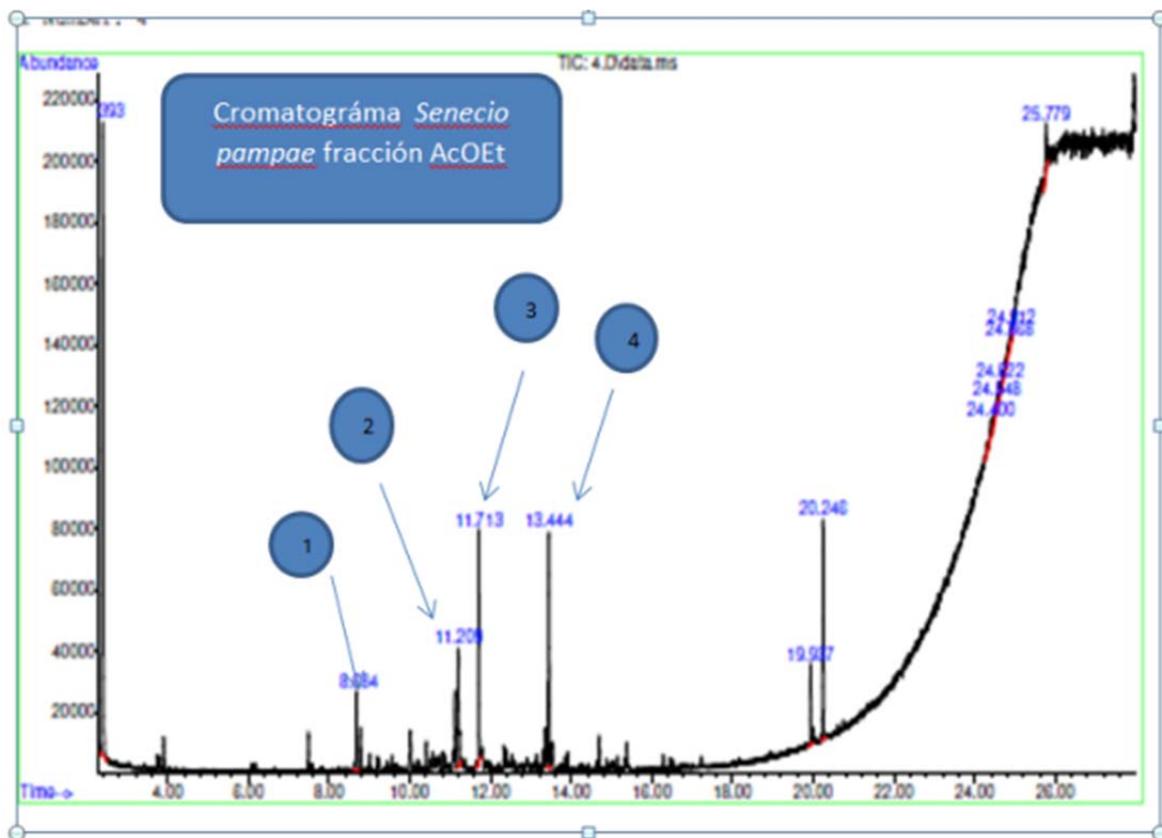
Anexo 14. Compuestos químicos identificados por el GC-MS de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie *P. ledifolia*.



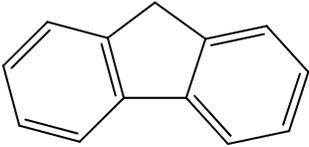
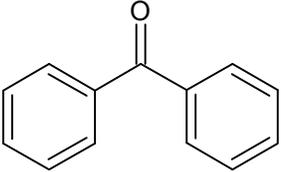
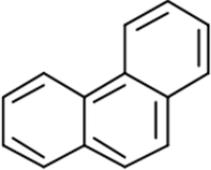
Anexo 15. Cromatograma de gases de la fracción CHCl<sub>3</sub> del extracto etanólico de la especie *Senecio pampae*.

Estructura	TR	Nombre	Tipo	%
1 	15.043	Ácido hexadecanoico	Ácido graso	96
2 	16.939	Ácido octadecanoico	Ácido graso	96
3 	25.77	Gama estigmasterol	Esteroles	99

**Anexo 16. Compuestos químicos identificados por el CG-EM de la fracción CHCl<sub>3</sub> del extracto etanólico de la especie *P. ledifolia*.**



Anexo 17. Cromatograma CG de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie *Senecio pampae*.

Estructura	TR	Nombre	Tipo	%
<p>1</p> 	8.664	7-hexadecano	Hidrocarburo	91
<p>2</p> 	11.209	Fluoreno	poliaromaticos	90
<p>3</p> 	11.712	Benzofenona	Derivados de la acetofenona y benzaldehido	95
<p>4</p> 	13.444	Fenantreno	poliaromaticos	93

Anexo 18. Compuestos químicos identificados por el GC-MS de la fracción AcOEt del extracto etanólico de la especie *S. pampae*.