

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

“IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS
PRESENTES EN LAS HOJAS DE YAWAR PANGA (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule.*)”

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA

ELABORADA POR:

LUIS ROJAS RODRIGUEZ

ASESORA:

MAG. ELENA ALICIA CÓNDOR CUYUBAMBA

LIMA – PERÚ

2022

*A mis padres, por su
apoyo y motivación
incondicional.*

*A mis abuelos maternos,
por sus consejos y
amabilidad.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a mi asesora, M Sc. Elena A. Córdor C., por formarme con principios y valores en el trabajo de investigación fitoquímica; así, como por brindarme consejos y apoyo durante el tiempo en el que desarrollamos el presente trabajo. Además, por incentivarne a mejorar continuamente asumiendo nuevos retos.

Asimismo, al Dr. Victor M. Reyna P., jefe del Grupo de Investigación de Química de Productos Naturales, por el apoyo brindado en diversas etapas del desarrollo de la Tesis. Además, de compartir conmigo experiencias que enriquecieron mi formación.

También es pertinente agradecer, a la PhD. Valérie Jullian de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Toulouse-Francia, por las facilidades brindadas para la realización del espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C , espectros indispensables para la culminación del presente trabajo.

Finalmente, a la Oficina de Gestión de la Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería, por la subvención otorgada para el desarrollo experimental de la Tesis como parte del concurso: Proyectos de Investigación Formativa Multidisciplinaria 2019.

RESUMEN

El Perú es considerado uno de los países mega diversos del mundo, debido a la gran variedad de plantas que crecen en el territorio nacional; calculándose un aproximado de 25000 plantas distintas, muchas de las cuales son utilizadas en medicina tradicional desde los tiempos del Incanato.

Una de las plantas utilizadas en la Amazonía peruana por la capacidad de sus hojas en inducir al vómito es el Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule.* o *Aristolochia didyma*). Esta propiedad se emplea en el Centro Takiwasi en la ciudad de Tarapoto, con el fin de eliminar toxinas presentes en el estómago, así como los excesos de comida o bebida.

El presente trabajo responde a la necesidad de contar con información relativa a los compuestos orgánicos, principalmente metabolitos secundarios, de las hojas de Yawar Panga, debido a que en la bibliografía no se reporta estudios químicos de esta planta.

El trabajo de investigación dio inicio con la recolecta de las hojas de Yawar Panga realizada en el Jardín Botánico del Centro Takiwasi así como su identificación botánica. Luego se realizó el secado y molienda del material vegetal para realizar el análisis cualitativo de metabolitos secundarios, marcha fitoquímica, en donde se identificó la presencia de aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos, triperenos, esteroides, catequinas, flavonoides del tipo isoflavonas, quinonas, antranas y antranoles.

Posteriormente, se llevó a cabo la obtención de tres extractos brutos orgánicos:

- i. EBO/éter (4,54 g): fue separado por columnas cromatográficas de sílica gel (CC) obteniéndose 168 mg de cristales de color blanco con impurezas de color amarillo, que por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se identificó la presencia de campesterol, estigmasterol y γ -sitosterol.
- ii. EBO/diclorometano (10,82 g): se separó por medio de columna flash de sílica gel (CF), columna cromatográfica de sílica gel (CC) y placa preparativa de sílica gel (PP), donde se obtuvo 120 mg de cristales blancos, que por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se identificó la presencia de campesterol, estigmasterol y γ -sitosterol.
- iii. EBO/etanol (4,37 g): se separó por partición líquido-líquido (PLL), columna cromatográfica de sephadex (CS) y columna cromatográfica de sílica gel (CC), obteniéndose 152,9 mg de un polvo crema identificado como rotenona por los espectros de CG-EM, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C (RMN ^1H y RMN ^{13}C).

ABSTRAC

Peru is considered one of the mega diverse countries in the world, due to the great variety of plants that grow in the national territory; calculating an approximate of 25,000 different plants, many of which are used in traditional medicine since the time of the Incan.

One of the plants used in the Peruvian Amazon due to the ability of its leaves to induce vomiting is Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule.* or *Aristolochia didyma*). This property is used in the Takiwasi Center in the city of Tarapoto, in order to eliminate toxins present in the stomach, as well as excess food or drink.

The present work responds to the need to have information related to organic compounds, mainly secondary metabolites, of Yawar Panga leaves, due to the fact that chemical studies of this plant are not reported in the bibliography.

The research work began with the collection of the Yawar Panga leaves carried out in the Botanical Garden of the Takiwasi Center as well as their botanical identification. Then, the drying and grinding of the plant material was carried out to carry out the qualitative analysis of secondary metabolites, phytochemical progress, where the presence of primary and / or secondary aminogroups, phenolic groups, triperthenes, steroids, catechins, flavonoids of the isoflavone type, was identified. quinones, anthrones and anthranols.

Subsequently, three organic raw extracts were obtained:

- i. EBO/ether (4,54 g): it was separated by chromatographic column of silica gel (CC) obtaining 168 mg of white crystals with yellow impurities, which by gas chromatography coupled to mass spectrometry identified the presence of campesterol, stigmasterol and γ -sitosterol.
- ii. EBO/dichloromethane (10,82 g): separated by means of a flash column of silica gel (CF), chromatographic column of silica gel (CC) and preparative plate of silica gel (PP), where 120 mg of white crystals were obtained, which by gas chromatography coupled to mass spectrometry identified the presence of campesterol, stigmasterol and γ -sitosterol.
- iii. EBO/ethanol (4,37 g): separated by liquid-liquid partition (PLL), sephadex chromatographic column (CS) and silica gel chromatographic column (CC), obtaining 152,9 mg of a cream powder identified as rotenone by the GC-MS spectra, Fourier transform infrared (FTIR) and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR and ^{13}C NMR).

INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
I. Objetivo general	6
II. Objetivos específicos	6
ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	7
I. Aspectos generales de las hojas de Yawar Panga	8
A. Familia <i>Aristolochiaceae</i>	8
B. Hojas de Yawar Panga	12
II. Estudios químicos generales	13
A. Metabolitos secundarios	13
B. Análisis cualitativo	15
C. Pruebas específicas	16
1. <i>Prueba de cloruro férrico</i>	16
2. <i>Prueba de gelatina</i>	17
3. <i>Prueba de Liebermann Burchard</i>	17
4. <i>Prueba de Borntrager</i>	17
5. <i>Prueba de Dragendorff</i>	18
6. <i>Prueba de Mayer</i>	18
7. <i>Prueba de Wagner</i>	19
8. <i>Prueba de Rosembeim</i>	19
9. <i>Reacción de Shinoda</i>	19
10. <i>Prueba de la espuma</i>	20
D. Flavonoides, isoflavonas y rotenona	21
E. Esteroides y esteroles	29
1. <i>Campesterol</i>	30
2. <i>Stigmasterol</i>	31
3. <i>γ-sitosterol</i>	32
F. Identificación espectroscópica	33

1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	34
2. Espectrometría de masas (EM)	36
3. Resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H)	37
4. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C)	39
PARTE EXPERIMENTAL	41
I. Selección y recolección de la planta	42
II. Identificación botánica	43
III. Secado y molienda	43
IV. Análisis cualitativo	44
A. Según Rondina & Coussio	44
1. Primer análisis	46
2. Segundo análisis	46
B. Pruebas específicas de Villacrez	47
1. Flavonoides	47
2. Alcaloides	47
V. Aislamiento de rotenona	48
A. Extracción sólido-líquido	48
1. Maceración con éter de petróleo	48
2. Maceración con diclorometano	49
3. Maceración con etanol	50
B. Separación de rotenona	51
1. Partición líquido-líquido (PLL)	51
2. Columna cromatográfica de sephadex (CS)	52
C. Purificación por columna cromatográfica de sílica gel (CC)	53
D. Identificación de la rotenona	55
1. Pruebas específicas	55
2. Determinación de punto de fusión	56
3. Prueba de solubilidad	56
4. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)	56

5. <i>Análisis por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)</i>	60
6. <i>Análisis por resonancia magnética nuclear de ¹H (RMN ¹H)</i>	62
7. <i>Análisis por resonancia magnética nuclear de ¹³C (RMN ¹³C)</i>	65
VI. Identificación de esteroides en el EBO/éter	68
A. Extracción sólido-líquido	68
B. Separación de esteroides	68
1. <i>Primera columna cromatográfica de sílica gel (CC)</i>	68
2. <i>Segunda columna cromatográfica de sílica gel (CC)</i>	70
C. Identificación de esteroides por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)	72
1. <i>Campesterol</i>	74
2. <i>Stigmasterol</i>	75
3. <i>γ-sitosterol</i>	76
VII. Identificación de esteroides en el EBO/diclorometano	77
A. Extracción sólido-líquido	77
B. Separación de esteroides	78
1. <i>Columna cromatográfica de sephadex (CF)</i>	78
2. <i>Columna cromatográfica de sílica gel (CC)</i>	79
3. <i>Placa preparativa (PP)</i>	80
C. Identificación de esteroides por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)	82
1. <i>Campesterol</i>	85
2. <i>Stigmasterol</i>	85
3. <i>γ-sitosterol</i>	85
CONCLUSIONES	86
RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	95

INDICE DE FIGURAS

	Página
<i>Figura 1.</i> Rizoma.	8
<i>Figura 2.</i> Flor de la <i>Aristolochia grandiflora</i> .	9
<i>Figura 3.</i> Distribución de la familia <i>Aristolochiaceae</i> en el mundo.	9
<i>Figura 4.</i> Estructura del ácido aristolóquico.	11
<i>Figura 5.</i> Hoja de Yawar Panga.	12
<i>Figura 6.</i> Foto de una hoja de Yawar Panga cortada.	12
<i>Figura 7.</i> Rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios.	15
<i>Figura 8.</i> Reacción del ácido gálico con el cloruro férrico.	17
<i>Figura 9.</i> Reacción de Dragendorff en la mescalina.	18
<i>Figura 10.</i> Reacción de Mayer en la mescalina.	19
<i>Figura 11.</i> Reacción de Shinoda de una flavona.	20
<i>Figura 12.</i> Estructura base de los flavonoides.	21
<i>Figura 13.</i> Relación entre tipos de flavonoides.	22
<i>Figura 14.</i> Principales rotenoides usados como insecticidas.	23
<i>Figura 15.</i> Estructura de la rotenona.	23
<i>Figura 16.</i> EM de la rotenona aislada de las raíces de <i>Darris urucur</i> .	25
<i>Figura 17.</i> FTIR de un patrón de rotenona al 95%.	26
<i>Figura 18.</i> RMN ¹ H de rotenona aislada de las raíces de <i>Darris urucur</i> a 300 MHz en CDCl ₃ .	27
<i>Figura 19.</i> RMN ¹³ C de rotenona aislada de las raíces de <i>Darris urucur</i> a 100 MHz en CDCl ₃ .	28
<i>Figura 20.</i> Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno.	29
<i>Figura 21.</i> Estructura base de los esteroides.	29
<i>Figura 22.</i> Estructura del campesterol.	30
<i>Figura 23.</i> Estructura del estigmasterol.	31
<i>Figura 24.</i> EM del estigmasterol obtenido de las raíces de <i>Mansoa alliacea</i> .	31
<i>Figura 25.</i> Estructura del γ -sitosterol.	32
<i>Figura 26.</i> EM del γ -sitosterol obtenido de las hojas de <i>Phyllanthus</i> <i>orbicularis</i> RBK.	32
<i>Figura 27.</i> Tipos de vibraciones de los enlaces.	35

Figura 28. Formación del ion molecular.	36
Figura 29. Efecto de un campo magnético sobre los núcleos.	38
Figura 30. Ubicación del centro Takiwasi.	42
Figura 31. Plantación de Yawar Panga en el Centro Takiwasi.	43
Figura 32. Hoja seca de Yawar Panga.	44
Figura 33. Muestra seca y molida.	44
Figura 34. Diagrama de proceso químico de la marcha fitoquímica según Rondina & Coussio- 1969.	45
Figura 35. Diagrama de proceso químico de la marcha fitoquímica según Villacrez-1995.	47
Figura 36. EBO/etanol.	50
Figura 37. PLL del EBO/etanol.	51
Figura 38. CS de G _{CLOROFORMO} .	53
Figura 39. CC de sílica gel de G _{DICLOROMETANO} .	54
Figura 40. G7c.	55
Figura 41. TIC de G7c.	58
Figura 42. EM de la rotenona presente en G7c obtenido de las hojas de Yawar Panga.	59
Figura 43. FTIR de rotenona aislada de las hojas de Yawar Panga.	61
Figura 44. Espectro RMN ¹ H de la rotenona aislada de las hojas de Yawar Panga a 300 MHz en CDCl ₃ .	63
Figura 45. Distribución de los átomos de hidrógeno en la molécula de rotenona.	65
Figura 46. Espectro RMN ¹³ C de la rotenona aislada de las hojas de Yawar Panga a 75 MHz en CDCl ₃ .	66
Figura 47. Distribución de los átomos de carbono en la molécula de rotenona.	68
Figura 48. CC de EBO/éter.	69
Figura 49. CC de E4c.	71
Figura 50. Cristales con impureza amarilla en E4cc.	71
Figura 51. TIC de E4cc.	73
Figura 52. EM obtenida del campesterol presente en la muestra E4cc.	74
Figura 53. EM obtenida del estigmasterol presente en la muestra E4cc.	75

Figura 54. EM obtenida del γ -sitosterol presente en la muestra E4cc.	76
Figura 55. CF de EBO/diclorometano.	79
Figura 57. PP de D7fc.	81
Figura 58. Cristales en D3fcp.	82
Figura 59. TIC de D3fcp.	84
Figura 60. EM obtenida del campesterol presente en la muestra D7fcp.	85
Figura 61. EM obtenida del estigmasterol presente en la muestra D7fcp.	85
Figura 62. EM obtenida del γ -sitosterol presente en la muestra D7fcp.	85

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. <i>Subfamilias y géneros de la familia Aristolochiaceae.</i>	10
Tabla 2. <i>Especies del género Aristolochia con propiedades medicinales.</i>	11
Tabla 3. <i>Estructura base, reacciones características y ejemplos de algunos productos naturales.</i>	14
Tabla 4. <i>Pruebas para la identificación de metabolitos secundarios.</i>	16
Tabla 5. <i>Coloración de la fase amílica según el tipo de flavonoides en la reacción de Shinoda.</i>	20
Tabla 6. <i>Propiedades de algunos esteroides.</i>	30
Tabla 7. <i>Regiones de un espectro FTIR..</i>	36
Tabla 8. <i>Clasificación taxonómica del Yawar Panga.</i>	43
Tabla 9. <i>Bandas de vibración características del espectro FTIR de la rotenona.</i>	62
Tabla 10. <i>Datos de RMN ¹H a 300 MHz de rotenona en CDCl₃, comparación de desplazamientos (δ_H en ppm) con los reportados en bibliografía.</i>	64
Tabla 11. <i>Datos de RMN ¹³C a 75 MHz de rotenona en CDCl₃, comparación de desplazamientos (δ_C en ppm) con los reportados en bibliografía.</i>	67
Tabla 12. <i>Composición de esteroides de E4cc.</i>	74
Tabla 13. <i>Composición de esteroides de D7fcp.</i>	85

ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Certificado por ponencia en el XXVIII	96
ANEXO 2. Reactivos para pruebas específicas	97
ANEXO 3. Acta de recolecta de Yawar Panga	98
ANEXO 4. Constancia de identificación botánica de Yawar Panga	99
ANEXO 5. Procedimiento marcha fitoquímica de Reyna-2012 basado en Rondina & Coussio-1969	100
ANEXO 6. Acta de Marcha fitoquímica N°1	106
ANEXO 7. Acta de Marcha fitoquímica N°2	107
ANEXO 8. Procedimiento de pruebas específicas según Villacrez-1995	108

ABREVIATURAS

Dr.	Doctor.
Blgo.	Biólogo.
PhD.	Doctora.
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
μL	Microlitros.
mL	Mililitros.
μm	Microlitros.
mm	Mililitros.
cm	Centímetros.
cm^{-1}	Centímetros inversos.
Km^2	Kilómetros cuadrados.
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar.
g	Gramos.
Kg	Kilogramos.
ppm	Partes por millón.
g/mol	Gramos por mol.
m/z	Relación masa con carga.
min.	Minutos.
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados.
Å	Armstrong.
%	Porcentaje.
V	Voltaje.
C5	Cadena de 5 carbonos.
C15	Cadena de 15 carbonos.
C20	Cadena de 20 carbonos.
UV-vis	Espectroscopía ultravioleta-visible
EM	Espectrometría de masas.
CG-EM	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.
TIC	Cromatograma de iones totales.
FTIR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier.
IR	Espectro infrarrojo.

NIR	Espectro infrarrojo cercano.
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹ H	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear del ¹ H.
COSY	Espectroscopía de correlación.
RMN ¹³ C	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear del ¹³ C.
HMQC	Espectroscopía de correlación cuántica múltiple hetero nuclear
MHz	Megahercio.
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.
B ₀	Campo magnético.
B _L	Campo magnético local.
B _E	Campo magnético efectivo.
ú	Número de onda.
ν ⁻¹	Modos vibracionales.
λ	Longitud de onda.
δ	Desplazamiento químico.
δ _H	Desplazamiento químico de hidrógeno.
δ _C	Desplazamiento químico de carbono.
M ^{+o}	Ion molecular.
EBO	Extracto bruto orgánico.
EBO/éter	Extracto bruto orgánico de éter de petróleo.
EBO/diclorometano	Extracto bruto orgánico de diclorometano.
EBO/etanol	Extracto bruto orgánico de etanol.
CC	Columna cromatográfica de sílica gel.
CF	Columna flash de sílica gel.
CCF	Cromatografía de capa fina.
PP	Placa preparativa.
CS	Columna de sephadex.
PLL	Partición líquido-líquido.

INTRODUCCIÓN

Nuestro país es considerado mega diverso por la gran cantidad de ecosistemas que posee, calculándose alrededor de 60. Los ecosistemas tienen las condiciones ambientales necesarias para distintos tipos de plantas crezcan en ellas (Brack, 1999). En la actualidad se estima que en el Perú hay aproximadamente veinticinco mil plantas distintas, las cuales son usadas con fines terapéuticos (plantas medicinales), decorativos y alimentarios (frutas, verduras, tubérculos, etc.)

Las plantas medicinales, como lo es el Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule.* o *Aristolochia didyma*), son utilizadas en diversas zonas del Perú, así como en países como China, India y Brasil. Sin embargo, en la gran mayoría de casos los usos medicinales de las plantas son producto de las experiencias de nuestros antepasados, que al consumir un extracto acuoso o hacer pomadas con algunas hierbas podían aliviar sus malestares. Estos conocimientos fueron pasados entre generaciones hasta la actualidad en donde aún hay muchas plantas con propiedades medicinales que no han sido estudiadas para identificar el o los compuestos responsables de su propiedad.

El Yawar Panga, planta utilizada en la selva peruana por la propiedad emética de las hojas, pertenece a la familia Aristolochiaceae (Politi et al. 2018). Su nombre común, Yawar Panga, tiene origen quechua: Yawar que significa sangre y Panga que significa hoja ancha, siendo la traducción de Yawar Panga como “hoja ancha de sangre”, pues esta planta libera un líquido color rojo semejante a la sangre cuando se cortan los tallos .

La familia a la cual pertenece el Yawar Panga, Aristolochiaceae, suelen ser enredaderas y están ampliamente distribuidas en el mundo con más de 625 especies diferentes (Mulder, 2003). En esta familia de plantas se presenta comúnmente el alcaloide denominado ácido aristolóquico, que posee una actividad antitumoral y antimicrobiana (Agrawal et al. 2017) pero, además, genera problemas renales al ser consumido (Heinrich et al. 2009)

El Yawar Panga es utilizado por sus propiedades vomitivas en terapia asistida (Politi et al. 2018). Además, se utiliza tradicionalmente para calmar la tos (Odonne et al., 2013). En la bibliografía no se reportan estudios químicos en los cuales se identifique los compuestos presentes en esta planta.

El presente trabajo de investigación pertenece a la rama de Química Orgánica de Productos Naturales (Fitoquímica); siendo la continuación de trabajos previos realizados en los cursos de Proyecto de Tesis I CQ-561: “Análisis Fitoquímico Preliminar de las hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule*)” y en Proyecto de Tesis II CQ-022: “Identificación de los Esteroles Presentes en el Extracto Apolar de las Hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule*).”. Además, se emplearon los conocimientos adquiridos en los cursos de Química orgánica III CQ-441, Química Orgánica IV CQ-444 y Química de productos Naturales CQ-046.

Debido a que no se contaba con estudios previos de las hojas de Yawar Panga, el trabajo realizado en Proyecto de Tesis I fue fundamental. En este curso se logró identificar que las hojas de Yawar Panga poseen: aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos, triptenos, esteroides, catequinas, flavonoides, quinonas, antronas y antranoles.

En Proyecto de Tesis II, a partir del extracto bruto orgánico de éter de petróleo se logró identificar, por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, tres esteroides: campesterol, estigmasterol y, principalmente, γ -sitosterol. Estos resultados fueron presentados en el XXVIII Congreso de la Sociedad Italo-Latinomericana de Etnomedicina (SILAE), realizado en setiembre de 2019 en la ciudad de La Habana, Cuba (Anexo 1).

A continuación, se procede a mencionar los procesos desarrollados en este trabajo de investigación:

- i. Recolección de la muestra vegetal, hojas de Yawar Panga, del Jardín Botánico del Centro de Rehabilitación de Toxicómanos y de Investigación de Medicinas Tradicionales Takiwasi, ubicado en Tarapoto.
- ii. Identificación botánica del material vegetal en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de San Marcos.
- iii. Secado y molienda del material vegetal.

- iv. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de Yawar Panga mediante el análisis fitoquímico preliminar (marchar fitoquímica).
- v. Obtención de extractos brutos orgánicos por maceración en frío con éter de petróleo, diclorometano y etanol, a partir de las hojas secas y pulverizadas de las hojas de Yawar Panga.
- vi. Separación y purificación de los extractos brutos mediante distintas técnicas de columna cromatográfica: sílica gel, columna flash y columna de sephadex; así como cromatografía en placa preparativa y partición líquido-líquido.
- vii. Identificación de los esteroides presentes mediante su análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
- viii. Identificación de la rotenona aislada mediante sus espectros de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

Cabe señalar que, como todo proyecto, se presentan riesgos propios del trabajo fitoquímico, tales como:

- i. Degradación de metabolitos secundarios, por lo que se realiza el secado a máximo 40°C .
- ii. Presencia de hongos en la muestra vegetal, para evitarlo los extractos donde haya presencia de agua serán congelados y posteriormente liofilizados.
- iii. Falta de material vegetal, de ocurrir esto se solicitaría más hojas de Yawar Panga al Centro Takiwasi.
- iv. Contaminación por los solventes utilizados, con la finalidad mitigar esta contaminación, se trabaja bajo campanas extractoras y se concentra los extractos en rotavapor, cuyos desechos se ponen a disposición del personal competente.

OBJETIVOS

I. Objetivo general

Aislamiento e identificación de los principales metabolitos secundarios presentes en las hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule.* o *Aristolochia didyma*): rotenona, campesterol, estigmasterol y γ -sitosterol.

II. Objetivos específicos

- i. Análisis fitoquímico preliminar (marcha fitoquímica) de las hojas de Yawar Panga.
- ii. Obtención de los extractos brutos orgánicos de éter de petróleo, diclorometano y etanol por medio de maceración convencional.
- iii. Separación de los esteroides presentes en los extractos de éter de petróleo y diclorometano por columna cromatográfica de sílica gel (CC), columna flash de sílica gel (CF) y cromatografía en placa preparativa (PP).
- iv. Identificación de los esteroides (campesterol, sitosterol y γ -sitosterol) presentes en los extractos de éter de petróleo y diclorometano, mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).
- v. Separación de la rotenona presente en el extracto de etanol mediante partición líquido-líquido (PLL) y columna cromatográfica de sephadex (CS).
- vi. Purificación de rotenona mediante CC.
- vii. Caracterización de la rotenona mediante sus espectros de: espectrometría de masas (EM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear del ^1H (RMN ^1H) y del ^{13}C (RMN ^{13}C).

ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

I. Aspectos generales de las hojas de Yawar Panga

En la bibliografía solo se han reportado pocos estudios de las propiedades medicinales de las hojas de Yawar Panga; caso contrario, no se tiene estudios químicos precedentes relativos a los compuestos presentes en dichas hojas, ni en ninguna parte de la planta.

A. Familia *Aristolochiaceae*

Las plantas que pertenecen a la familia de Yawar Panga, familia *Aristolochiaceae*, son perennes, en su gran mayoría viven más de 2 años. Presentan un tallo leñoso, del cual se puede extraer madera, o herbáceo, los cuales son finos semejantes una enredadera (Wanke et al., 2017). En algunos casos, presentan rizoma (múltiples yemas bajo tierra de las cuales pueden crecer diversos tallos que llegan a entrelazarse), **Figura 1**.

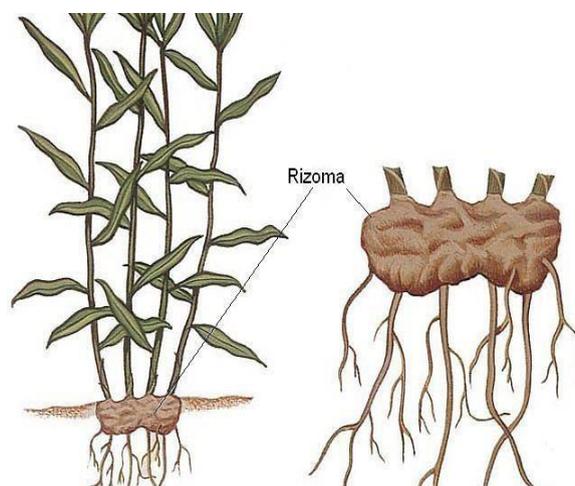


Figura 1. Rizoma¹.

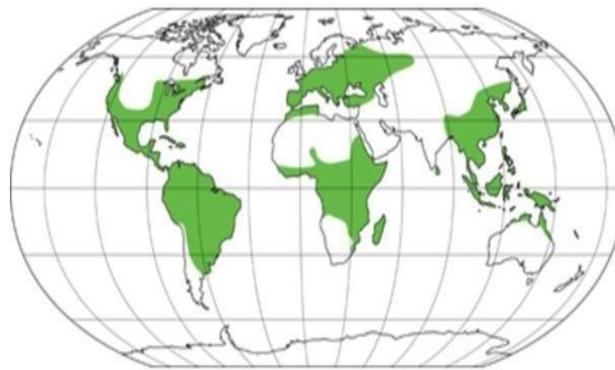
Las hojas, en su mayoría, crecen de forma escalonada y opuesta una de la otra con respecto al tallo. Muchas de las plantas de esta familia presentan flores, comúnmente con un olor fétido, con forma zigomorfa (simétricas respecto a un eje vertical) (Wanke et al., 2017), **Figura 2**.

¹Fuente: Unidad de Informática del Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México.
URL: <https://uniquim.iquimica.unam.mx/glossary/rizoma/>



Figura 2. Flor de la *Aristolochia grandiflora*¹.

La distribución de la familia *Aristolochiaceae* es amplia, **Figura 3**, debido a que pueden crecer en una gran variedad de hábitats, como selvas tropicales, bosques secos e incluso en la sabana.



■ Distribución de la familia *Aristolochiaceae*.

Figura 3. Distribución de la familia *Aristolochiaceae* en el mundo².

Esta familia pertenece al reino *Plantae* y está conformada por 2 subfamilias, las cuales son *Asaroideae* y *Aristolochioideae*. Entre ambas subfamilias se tiene un total de 7 géneros con poco más de 625 especies a nivel mundial (Mulder, 2003). **Tabla 1**, siendo el género *Aristolochia* el que posee un mayor número de especies, cerca de 370.

¹Fuente: Plants of the Word online.

URL:<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:92978-1>

²Fuente: Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares.

URL:http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/aristolochiaceae.html

Tabla 1.*Subfamilias y géneros de la familia Aristolochiaceae.*

Familia	Subfamilia	Géneros	Habitad
<i>Aristolochiaceae</i>	<i>Asaroideae</i>	<i>Saruma</i>	Se encuentra en bosques densos, valles, a las orillas de arroyos principalmente en China.
		<i>Asarum</i>	Crece en zonas templadas del hemisferio norte.
	<i>Aristolochioideae</i>	<i>Thottea</i>	Se identificó especies en Malasia e India.
	<i>Isotrema</i>	Tiene prevalencia al noreste de China. En zonas tropicales con poca humedad.	
	<i>Endodeca</i>	Algunas especies se han encontrado al este de América del Norte.	
	<i>Pararistolochia</i>	Se han encontrado especies en Australia, África y Papúa de Nueva Guinea.	
		<i>Aristolochia</i>	Las especies de este género crece en la selva tropical principalmente en el bosque del Amazonas.

En un gran número de las especies de plantas de esta familia, se encontró el alcaloide denominado ácido aristolóquico, cuya estructura se evidencia en la **Figura 4**. El nombre de este compuesto deriva del nombre de la familia *Aristolochiaceae*. Está comprobado que el ácido aristolóquico produce problemas renales e incluso se le atribuye la formación de algunos tipos de cáncer a la vejiga cuando es consumido de manera prolongada (Heinrich et al. 2009)

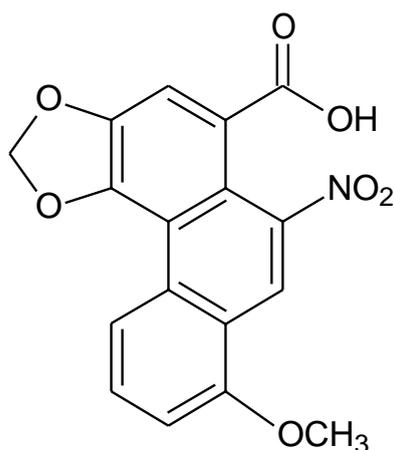


Figura 4. Estructura del ácido aristolóquico.

Así como el Yawar Panga, otras especies del género *Aristolochia* son usadas en medicina tradicional, como se muestra en la **Tabla 2**, en las respectivas regiones donde crecen.

Tabla 2.

Especies del género Aristolochia con propiedades medicinales.

Especie	Propiedad	Preparación	Referencia
<i>Aristolochia angustifolia</i>	Controla el asma.	Se bebe la decocción de las hojas y flores.	(Ahumada, 1970)
<i>Aristolochia elegans</i>	Calma los dolores del reumatismo	Se deja hervir las ramas y al enfriarse el líquido se bebe.	(Wu et al., 2002)
<i>Aristolochia fimbriata</i>	Alivia los dolores de muela.	Con la decocción de las hojas de hace “buches”.	(Bliss et al., 2013)
<i>Aristolochia triangularis</i>	Combate la gota.	Se debe beber la decocción de los rizomas.	(Priestap et al., 1990)
<i>Aristolochia chilensis</i>	Cura úlceras en la boca y alivia la artritis.	Se debe ingerir la decocción de hojas y ramas.	(Urzúa et al., 1983)

B. Hojas de Yawar Panga

El Yawar Panga, **Figura 5**, (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule.* o *Aristolochia didyma*) es una especie que pertenece al género *Aristolochia* de la familia *Aristolochiaceae*.



Figura 5. Hoja de Yawar Panga.

(Foto tomada por el Dr. Reyna en el Centro Takiwasi en 2014)

Su nombre proviene de dos palabras en quechua: Yawar que significa sangre y Panga que significa hoja ancha, por lo que la traducción de quechua a español sería: hoja ancha de sangre; esto debido a que sus hojas tienen, en promedio, 15cm de alto y 10 cm de ancho y al ser cortado la rama que las une al tallo desprende un líquido rojizo similar a la sangre, como se aprecia en la **Figura 6**.



Figura 6. Foto de una hoja de Yawar Panga cortada.

(Foto tomada por el Dr. Reyna en el Centro Takiwasi en 2014)

El Yawar Panga se utiliza tradicionalmente para calmar la tos (Odonne et al., 2013), y, principalmente, por sus propiedades vomitivas en terapia asistida con la finalidad de expulsar las toxinas del estómago (Politi et al. 2018). Por esta importante propiedad purgante se utiliza en el Centro de Rehabilitación de Toxicómanos y de Investigación de Medicinas Tradicionales Takiwasi en la ciudad de Tarapoto, departamento de San Martín, Perú.

El tratamiento de sus pacientes inicia con la toma de la decocción de entre 10 a 15 hojas de Yawar Panga, pues al ser una planta vomitiva permite limpiar el organismo de drogas presentes en el sistema digestivo (Politi et al. 2008).

Antes de la ingesta del extracto de Yawar Panga se realiza un prepurgado mediante la toma de un digestivo leve: jugo de naranja, jugo de coco y bicarbonato de sodio. Al día siguiente, el paciente consume, en pequeñas cantidades, el extracto de Yawar Panga. El prepurgado se realiza con la finalidad de preparar al organismo de tal manera que el Yawar panga no genere daños por su potente propiedad vomitiva.

II. Estudios químicos generales

A. Metabolitos secundarios

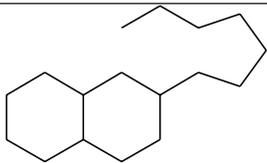
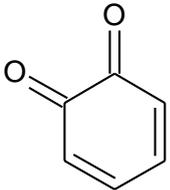
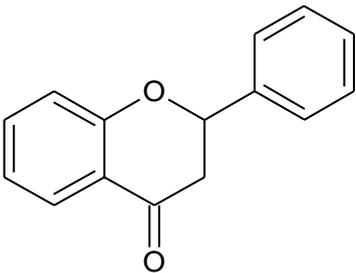
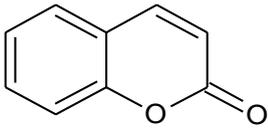
También llamados productos secundarios, productos naturales o principios activos, no intervienen en los procesos de fotosíntesis, respiración o síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos que tienen lugar en la planta; caso contrario de los metabolitos primarios (Ravelo et al. 2009).

Los productos naturales se dividen dependiendo de su origen biosintético y en base a su estructura química, **Tabla 3**.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios se origina en un metabolito primario, los principales productos naturales se biosintetizan por tres rutas características: ruta del ácido shikímico, ruta del acetato y ruta del ácido mevalónico (Ravelo et al. 2009).

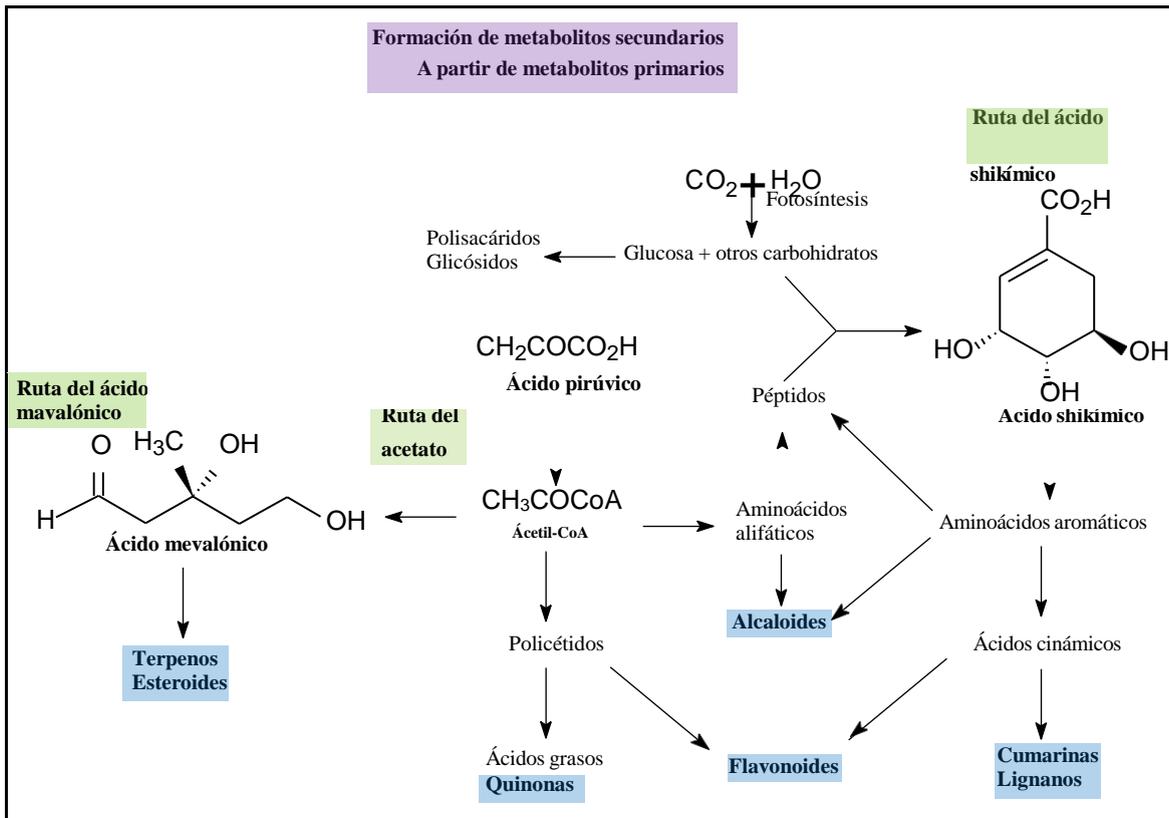
Tabla 3.

Estructura base, reacciones características y ejemplos de algunos productos naturales.

Producto natural	Estructura base	Reacciones características	Ejemplos
Esteroides		Liebermann Burchard	Colesterol, campesterol, estrofantidina y diosgenina.
Quinona		Borntrager	Furanonaftoquinona, antroquinona y filoquinona (vitamina K).
Flavonoide		Shinoda, Rosembeim	Apigenina, rotenona, buteína y hesperetina
Cumarina		Perkin	Esculosido, dicumarol y ácido rosmarínico.
Alcaloide	Depende del aminoácido de núcleo.	Wagner, Mayer y Dragendorff.	Ornitina, cocaína y triptófano.

Cada ruta proporciona como resultado una familia de metabolitos secundarios, **Figura 7**. Sin embargo, cabe señalar que en el caso de los flavonoides su estructura básica se biosintetiza por dos rutas distintas: la del ácido shikímico y la del acetato.

En la actualidad se llega al concepto de planta biodinámica, que hace referencia a aquellas plantas que producen, por sí solas, compuestos biológicamente activos, como los metabolitos secundarios (Montes, 1992). De esta manera las plantas pueden considerarse como un laboratorio de biosíntesis apto para proveer y suplir sus necesidades propias y las de los seres vivos.



B. Análisis cualitativo

EL análisis cualitativo, también conocido como marcha fitoquímica, es un procedimiento conformado por múltiples reacciones de coloración o precipitación que tienen como finalidad identificar, de manera cualitativa, compuestos presentes en una determinada parte de la planta, compuestos como los metabolitos secundarios (Lock, 2016).

Algunas de las pruebas para la determinación cualitativa de metabolitos secundarios se muestran en la **Tabla 4**, con estas pruebas se arman procedimientos de análisis los cuales permiten realizar un reconocimiento de la clase de compuestos que la parte de la planta a estudiar posee.

La preparación de reactivos específicos para realizar estas pruebas se muestra en el Anexo 2.

Tabla 4.*Pruebas para la identificación de metabolitos secundarios.*

Nº	Prueba	Metabolito secundario
1	Prueba del cloruro férrico	Taninos
2	Prueba de gelatina	Taninos
3	Reacción de Liebermann Burchard	Triptenos y esteroides
4	Reacción de Borntrager	Quinonas, antronas y antranoles
5	Reacción de Dragendorff	Alcaloides
6	Reacción de Mayer	Alcaloides
7	Reacción de Wagner	Alcaloides
8	Reacción de Rosembeim	Leutoantocianidinas y catequinas
9	Reacción de Shinoda	Flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavononas
10	Prueba de la espuma	Saponinas

A continuación, describiremos brevemente como se realizan estas pruebas y en la secciones D. y E. presentaremos dos clases de productos naturales, los flavonoides y esteroides, los cuales identificamos en las hojas de Yawar Panga.

C. Pruebas específicas para identificación de metabolitos secundarios

1. Prueba de cloruro férrico

Por medio de esta prueba se puede determinar la presencia de taninos, así como de grupos fenólicos libres, esto es posible pues el grupo hidroxilo reacciona con el cloruro férrico formando un complejo de hierro el cual precipita (Lock, 2016), **Figura 8**.

Para llevar a cabo esta prueba se añade una solución acuosa de cloruro férrico al 1% sobre un extracto acuoso, metanólico o etanólico de la muestra a analizar.

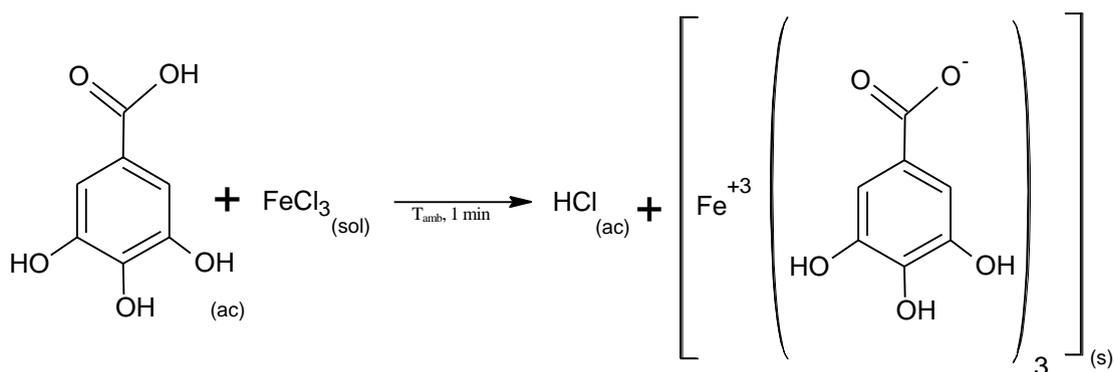


Figura 8. Reacción del ácido gálico con el cloruro férrico.

La presencia del precipitado color verde o rojo producto de la reacción, evidencia la formación del complejo lo cual nos indica que la prueba es positiva, es decir, hay taninos y/o grupos fenólicos libres en la muestra analizada.

2. *Prueba de gelatina*

Otra prueba usual para determinar la presencia de taninos es la prueba de la gelatina. Esta prueba consiste en añadir gotas de solución acuosa de NaCl al 10% en flashatina al 1% sobre una muestra líquida. La prueba es positiva si se observa un precipitado blanco o turbidez, lo que depende de la concentración de taninos en la muestra (Lock, 2016).

3. *Prueba de Liebermann Burchard*

Debido a que tanto los triptenos como los esteroides poseen estructuras similares, pues ambos poseen 3 ciclohexanos en la misma posición, esta prueba es positiva si hay al menos uno de estos constituyentes. Esta prueba consiste en añadir anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado sobre la muestra (Bruneton, 1991).

Inmediatamente después de añadir ambos reactivos se debe observar un cambio de color a rojo, rosado, púrpura, naranja, azul o verde. Este cambio de color indica la presencia de triptenos y/o esteroides.

4. *Prueba de Borntrager*

La reacción de Borntrager es utilizada frecuentemente para identificar si en una muestra vegetal hay compuestos antraquinónicos.

Esta reacción consiste en agregar un reactivo alcalino como amoníaco, solución de hidróxido de sodio o de potasio directamente a un extracto, en donde de ser positiva se observará una coloración roja en el extracto analizado.

5. Prueba de Dragendorff

Para esta reacción se utiliza el reactivo de Dragendorff que está preparado a base de nitrato de bismuto (III) y yoduro de potasio.

Sobre un extracto ácido, el cual permite la extracción de los alcaloides, se adiciona gotas del reactivo mencionado formándose así el tetrayodo bismutado de potasio el cual precipita. La presencia del precipitado, de color rojo, nos indica que la prueba es positiva (Reyna, 2012).

En la **Figura 9** se puede observar un ejemplo de la reacción del reactivo de Dragendorff con el alcaloide mescalina.

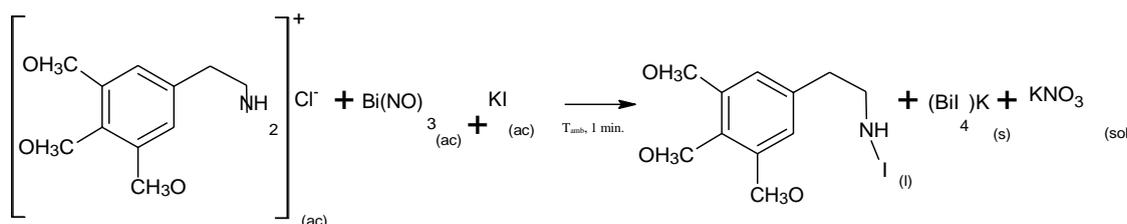


Figura 9. Reacción de Dragendorff en la mescalina.

6. Prueba de Mayer

El reactivo empleado para esta prueba consta de una solución acuosa de cloruro de mercurio (II) y yoduro de potasio (Bruneton, 1991).

Se considera una prueba no selectiva, debido a que la reacción se produce el con átomo de nitrógeno que todo alcaloide posee procedente del aminoácido del cual se biozintetizó; por este motivo es posible que la prueba de un falso positivo si en el extracto donde se adiciona el reactivo hay aminoácidos (Lock, 2016).

La prueba es positiva cuando luego de añadir el reactivo a la solución a ser analizada precipita tetrayodo mercurato de potasio, el cual es un sólido blanco. Un ejemplo de la reacción de Mayer se muestra en la **Figura 10**.

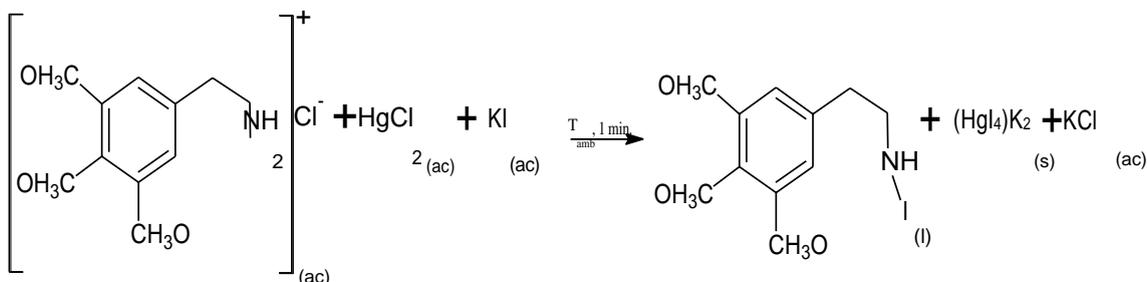


Figura 10. Reacción de Mayer en la mescalina.

7. Prueba de Wagner

La reacción de Wagner consiste en añadir una solución de yodo/yoduro de potasio sobre un extracto ácido de la muestra. Estos reactivos reaccionan con el alcaloide formando un precipitado pardo, la presencia de este precipitado indica que la prueba es positiva (Reyna, 2012).

8. Prueba de Rosembeim

Para realizar esta prueba se debe añadir 1 mL de HCl concentrado sobre el extracto acuoso de la planta a estudiar, luego se somete a baño María durante 20 min. Al concluir el tiempo de calentamiento se añade alcohol amílico sobre la muestra caliente.

De haber una coloración parda en la fase amílica se concluye que la prueba es positiva por ente hay catequinas y/o leucoantocianidinas en la muestra (Reyna, 2012).

9. Reacción de Shinoda

Esta es la prueba más común para identificar la presencia de flavonoides en un extracto alcohólico (Lock, 2016). Consiste en añadir limaduras de magnesio y HCl concentrado al extracto, posteriormente se añade alcohol amílico. Los cambios de color de la fase amílica dependen del tipo de flavonoide presente en la muestra como se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5.

Coloración de la fase amilica según el tipo de flavonoides en la reacción de Shinoda (Lock, 2016).

Tipos de flavonoides	Coloración luego de la prueba
Flavona y flavonoles	Rojo
Flavanonoles	Magenta
Flavonas	Rojo, magenta violeta o azul
Isoflavonas	amarillo

No todos los flavonoides dan coloración con esta prueba, tal es el caso de las isoflavononas, chalconas y auronas. En la **Figura 11** se muestra la reacción de Shinoda sobre una flavona donde se obtiene una sal de color rojo, color característico de este tipo de flavonoides.

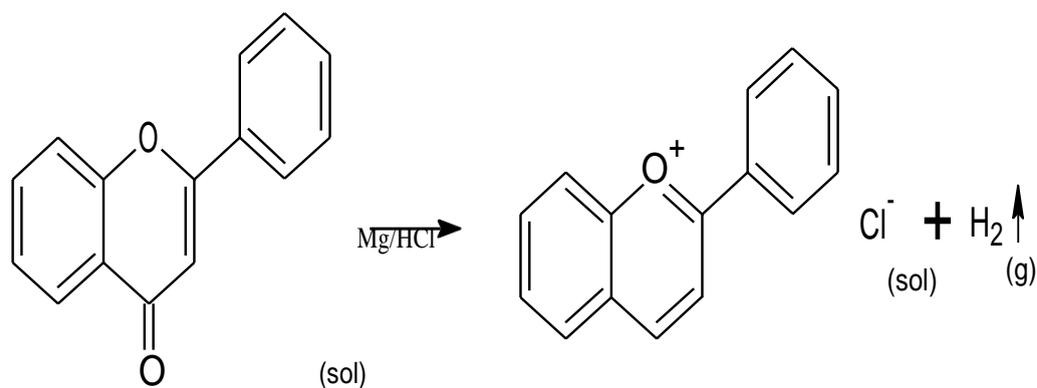


Figura 11. Reacción de Shinoda de una flavona.

10. Prueba de la espuma

Por medio de esta prueba se puede identificar si en la muestra hay saponinas, es viable tanto para saponinas del tipo esterooidal como triterpénicas.

La prueba consiste en calentar a baño María 10 mL de agua destilada con una muestra de 1g el material vegetal seco y pulverizado que se va a analizar, el calentamiento se lleva a cabo durante 15 min. luego del transcurrir el este tiempo se filtra la solución acuosa y se agita vigorosamente. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido la cual persiste por más de 15 min (Reyna, 2012).

D. Flavonoides, isoflavonas y rotenona

Los flavonoides son un tipo de metabolito secundario que se biosintetiza por la ruta del ácido shikímico y la del acetato (Ravelo et al. 2009), siendo los flavonoides del tipo chalcona los primeros en ser formados. Los flavonoides constituyen el grupo más numeroso de compuestos que se encuentran distribuidos en plantas, habiéndose reportado, hasta el 2008, más de 8000 flavonoides distintos (Lock, 2016).

Los flavonoides tienen un núcleo básico de 15 carbonos, **Figura 12**, de los cuales se originan alrededor de 10 clases de flavonoides, como las isoflavonas, flavonoles, auronas, antiocianidinas, etc, **Figura 13** (Lock, 2016). La rotenona, compuesto que hemos aislado de las hojas de Yawar Panga es una isoflavona.

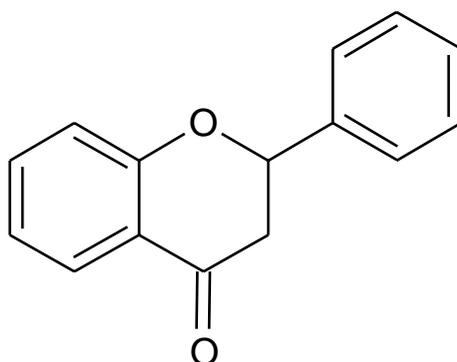


Figura 12. Estructura base de los flavonoides.

Los flavonoides se encuentran generalmente como agliconas¹ o más comúnmente como glicósidos². Una característica de muchos flavonoides es que son solubles en agua y en etanol, y poseen una intensa absorción de la luz ultravioleta y visible, debido a la presencia de los anillos aromáticos (Lock, 2016).

Este tipo de compuestos fueron empleados en la antigüedad como colorantes, y actualmente se usan como conservantes de grasas, también son analgésicos y antioxidantes por lo que se encuentran en la cascara de muchas frutas como la naranja. Además, algunos flavonoides son usados como otro uso es como insecticidas, principalmente las isoflavonas (Lock, 2016), también poseen una acción farmacológica como dilatadores de redes coronarias, tienen propiedades antihepatóxicas y antimicrobianas.

¹Las agliconas son compuestos orgánicos obtenidos al reemplazar por un hidrógeno el glúcido de un glucósido.

²Los glucósidos son moléculas en donde un compuesto se enlaza por un carbono anomérico a glúcidos.

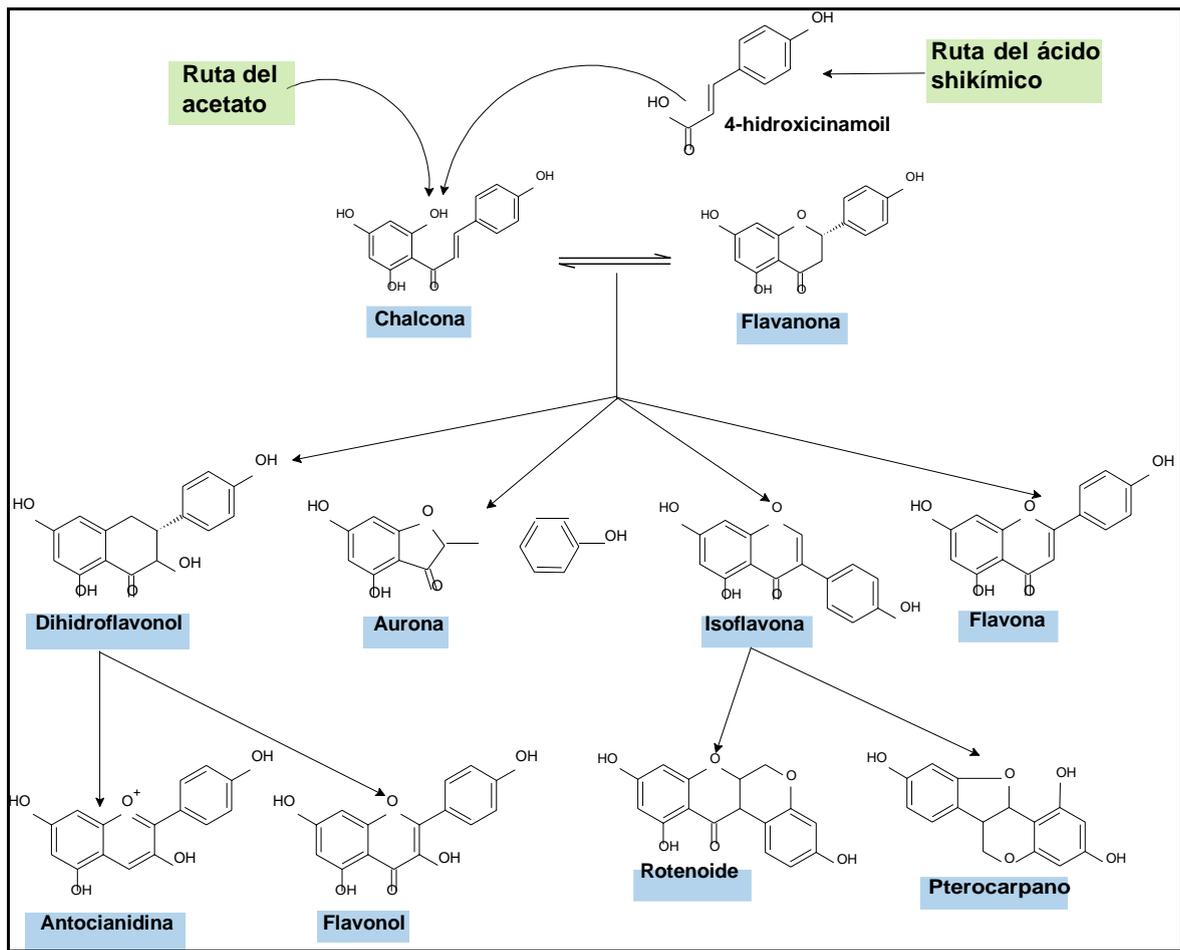


Figura 13. Relación entre tipos de flavonoides (Lock, 2016).

Las isoflavonas son un tipo de flavonoide que deriva de la chalcona. Algunas isoflavonas tienen propiedad insecticida, por lo que se usaron con este fin.

Las isoflavonas se dividen en dos sub grupos: pterocarpanos y rotenoides, como se observa en la **Figura 13**. Siendo los rotenoides buenos insecticidas, **Figura 14** (De Souza, 2007).

La rotenona, **Figura 15**, es un rotenoide, proviene de las isoflavonas. Fue aislado por primera vez en 1892 en forma de cristales de la especie *Lonchocarpus nicou* (De Souza, 2007); inicialmente recibió el nombre de nicoulina, en referencia a la especie donde fue aislada, Hasta que en 1902 fue aislado en forma de cristal color blanco de las raíces de la *Derris Chinensis*, la cual es una variedad de *Derris elliptica*, que tiene por nombre de la planta en japonés: roh-ten (Roark, 1929) de donde proviene el nombre rotenona.

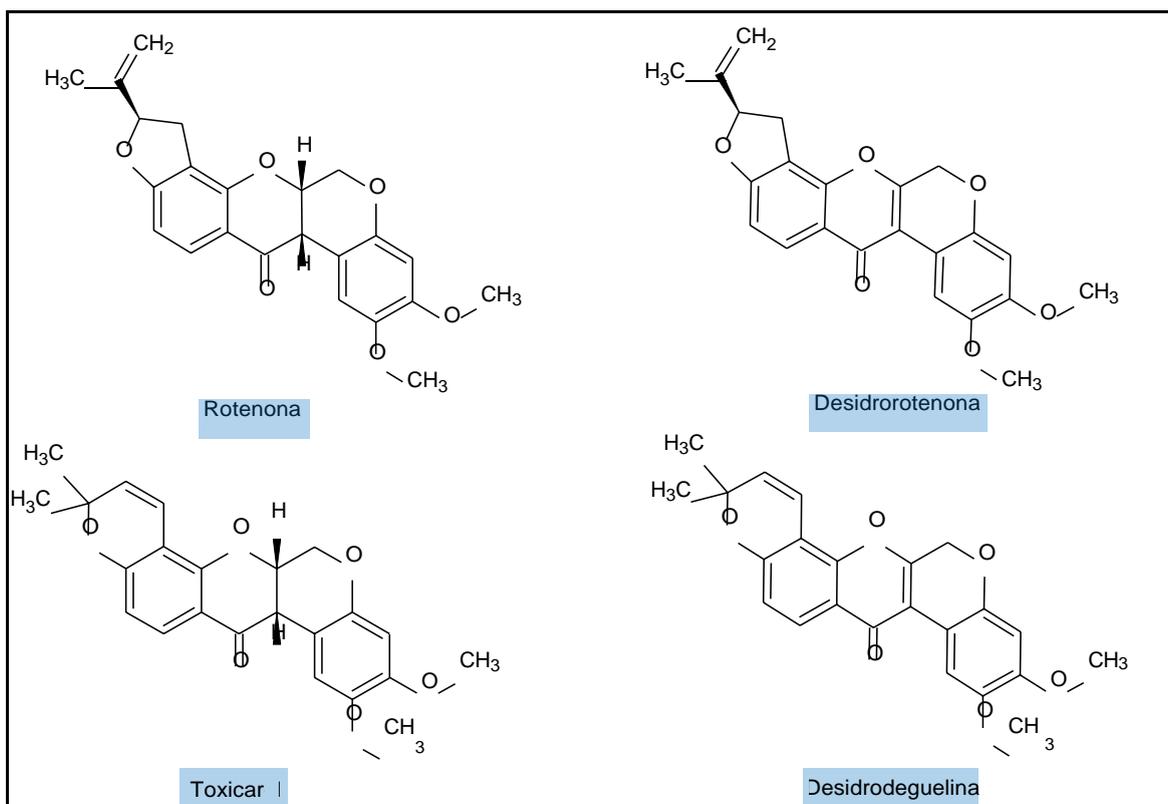


Figura 14. Principales rotenoides usados como insecticidas.

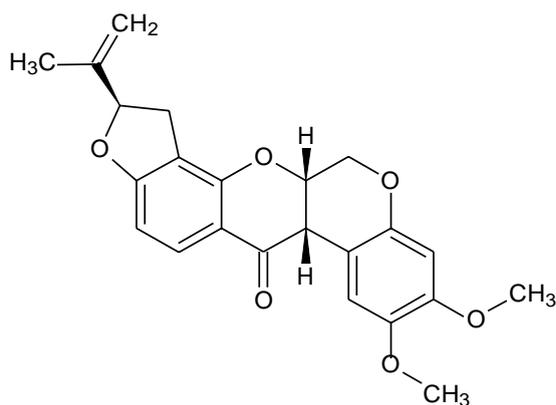


Figura 15. Estructura de la rotenona.

En 1929 el científico Roark publicó un conglomerado de las propiedades de la rotenona obtenidas por el científico japonés Nagai (Roark, 1929):

- i. Punto de fusión: 163 °C.
- ii. Es soluble en éter y acetona e insoluble en agua.
- iii. Estable en las raíces de la planta y se descompone con facilidad en agua y soluciones alcalinas.

- iv. Se demostró la presencia de dos grupos metoxilo y un grupo cetona.
- v. Se calculó que las raíces secas de plantas del género *Derris* poseen entre 0,5 a 6% de rotenona.

Posteriormente se verificó que la rotenona es un insecticida eficaz, superior a la nicotina. Afortunadamente, se encontró que se descompone totalmente a 48 horas de su aplicación, por lo que no hay riesgo de consumir rotenona en frutas o verduras que hayan sido tratadas con este compuesto (Roark, 1929).

Sin embargo, en el 2007 la rotenona fue catalogada como moderadamente peligrosa y toxina ambiental según la Organización Mundial de la Salud (OMS). (De Souza, 2007).

Debido a su amplio uso la rotenona ha sido identificada por métodos como EM, FTIR, RMN ^1H y RMN ^{13}C .

- i. Del EM se obtuvo la masa molecular de la rotenona igual a 394 g/mol, el ion molecular es correspondiente a este número. Además, se observó fragmentos como el de $m/z = 177$ y $m/z = 192$ siendo los más sobresalientes del espectro, **Figura 16**, (De Souza, 2007).
- ii. Del FTIR se identificó modos vibraciones correspondientes: al grupo carbonilo CO (1670 cm^{-1}), al enlace CH de un aromático (3081 cm^{-1}), al doble enlace entre carbonos (1595 cm^{-1}) y al enlace simple entre carbono y oxígeno (1194 cm^{-1}), entre otros, **Figura 17** (Othman et al., 2018).
- iii. Con los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se confirma la fórmula molecular de la rotenona, siendo $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$, **Figura 18 y 19**. Fueron realizados disolviendo rotenona en cloroformo deuterado (CDCl_3).

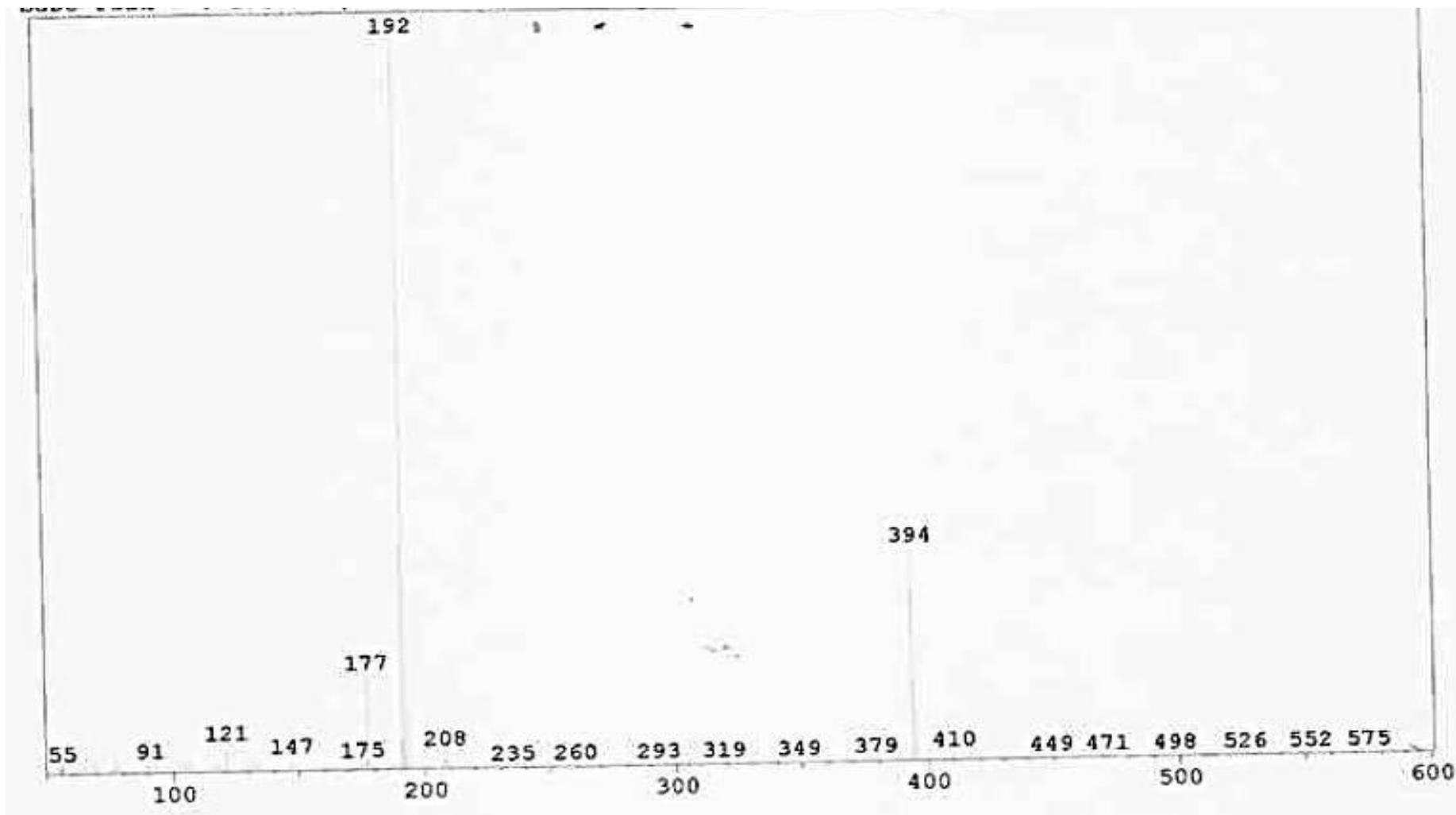


Figura 16. EM de la rotenona aislada de las raíces de *Darris urucur* (De Souza, 2007).

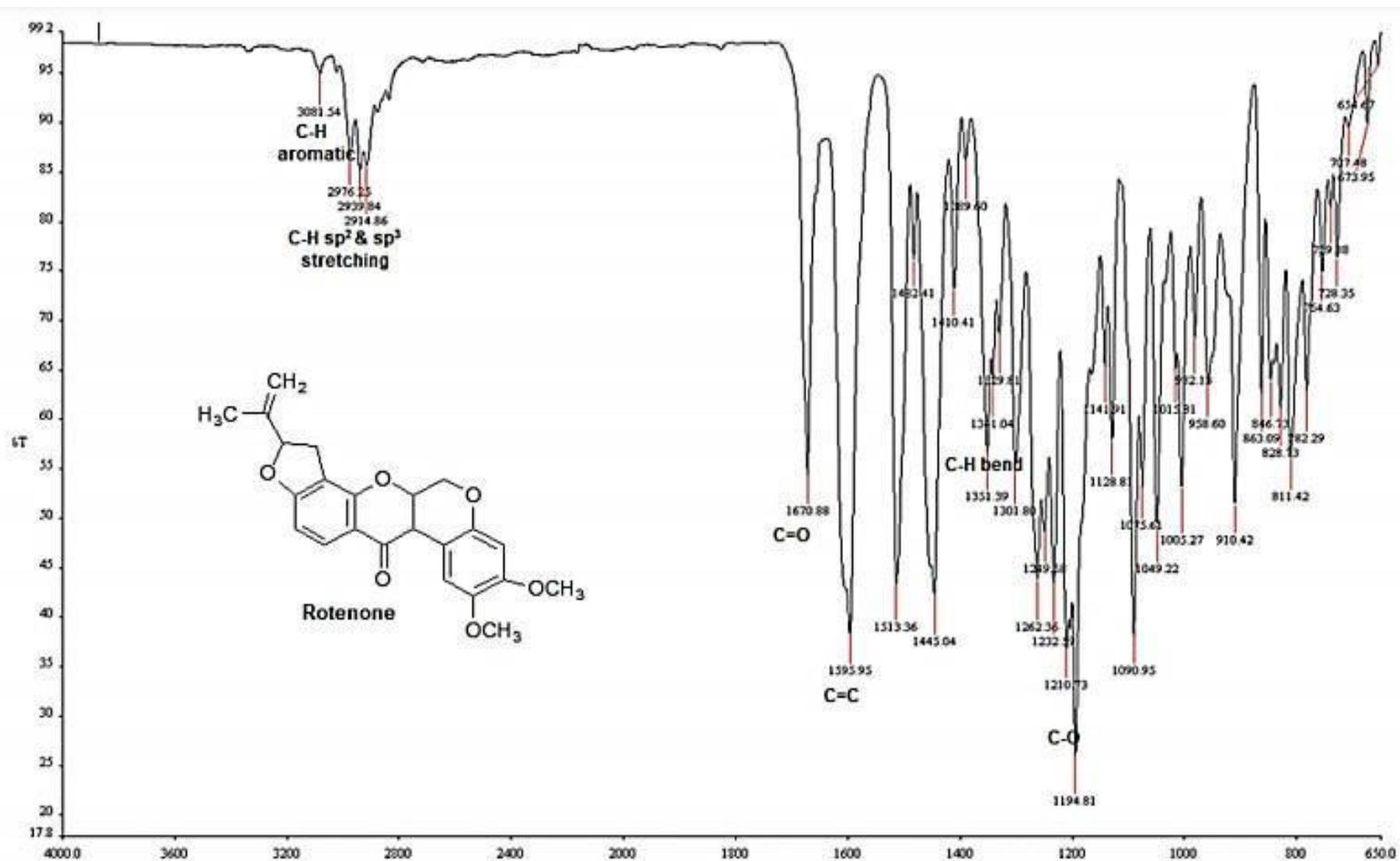


Figura 17. FTIR de un patrón de rotenona al 95% (Othman et al., 2018).

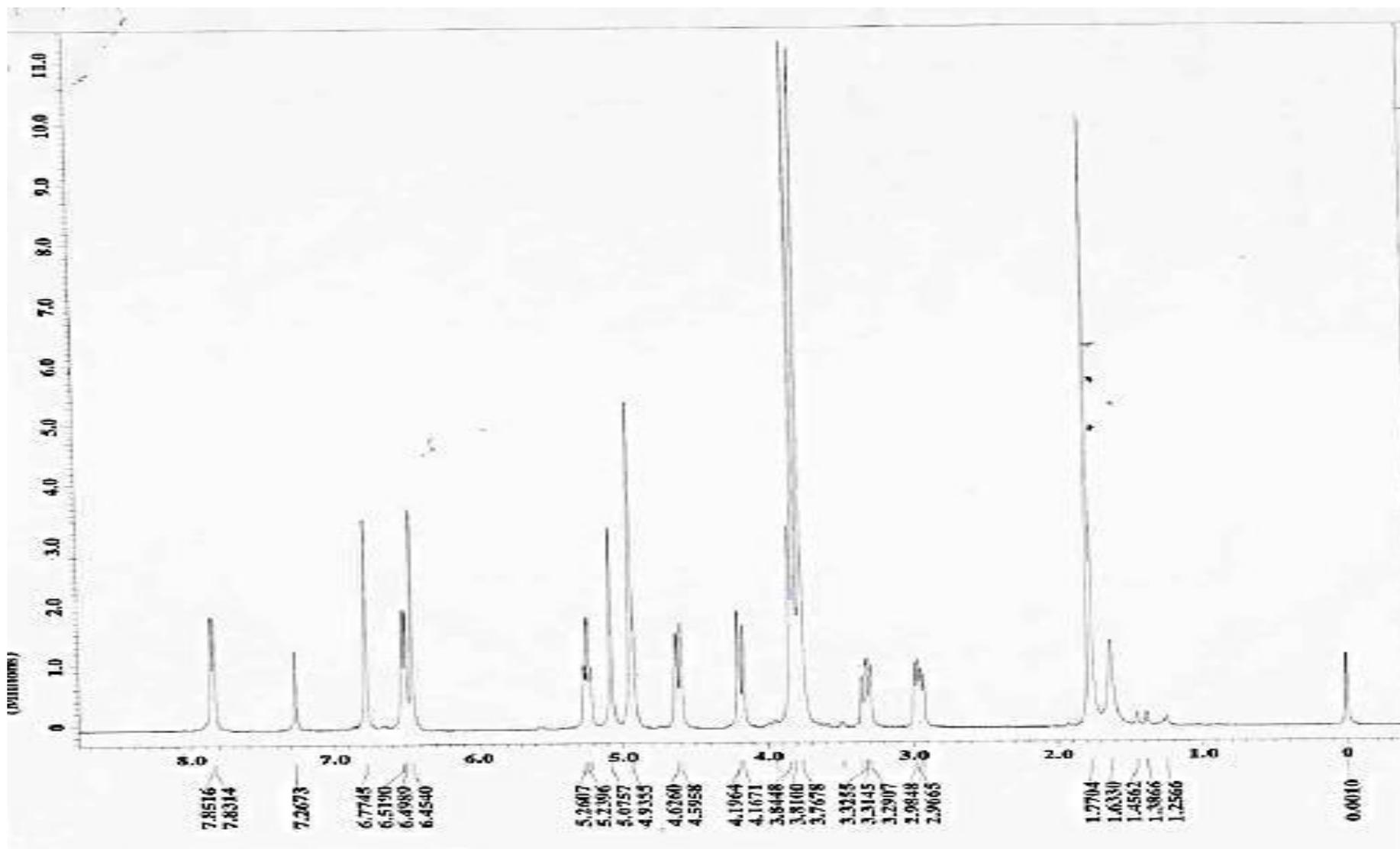


Figura 18. RMN ^1H de rotenona aislada de las raíces de *Darris urucur* a 300 MHz en CDCl_3 (De Souza, 2007).

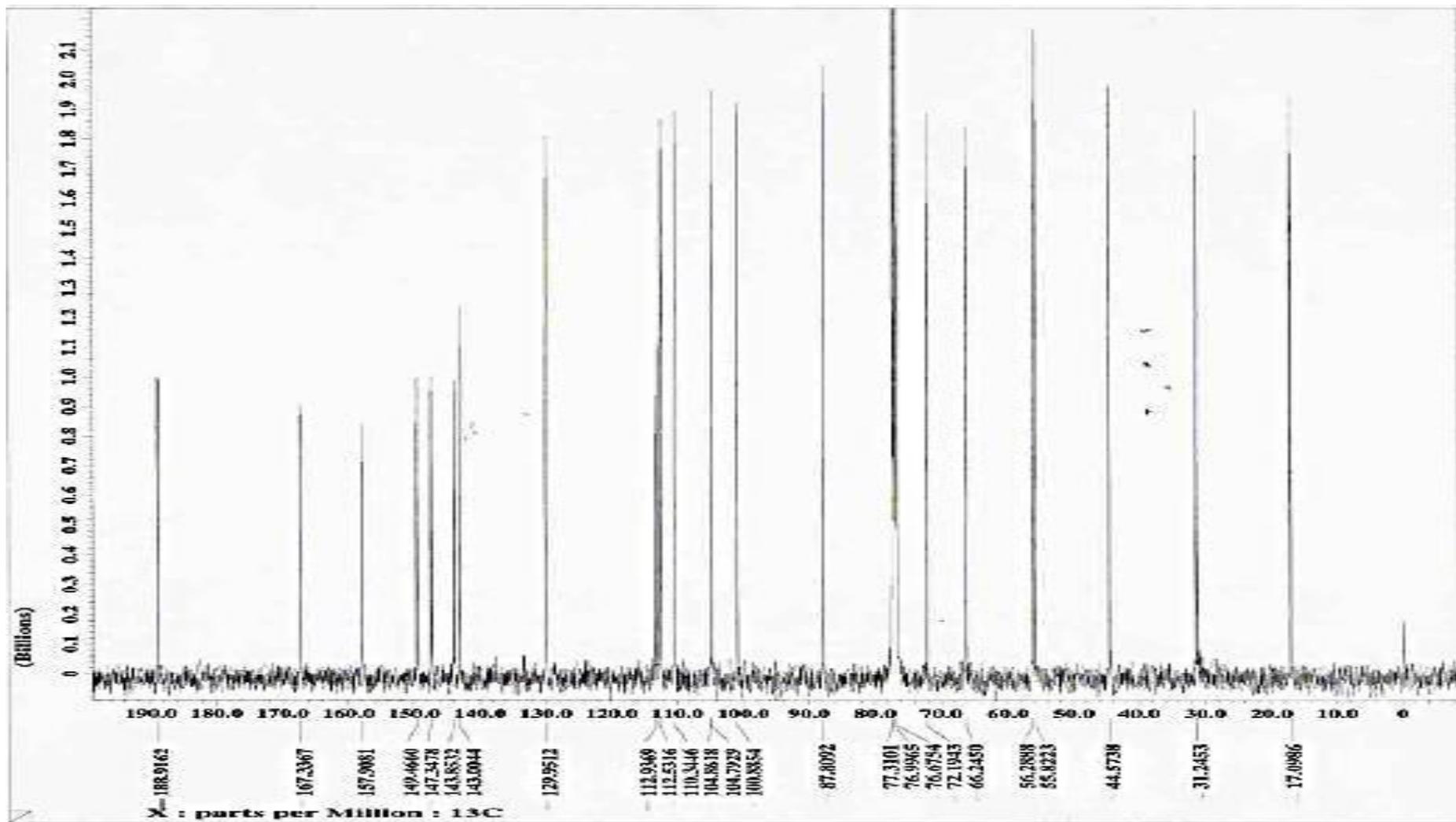


Figura 19. RMN ^{13}C de rotenona aislada de las raíces de *Darris urucur* a 100 MHz en CDCl_3 (De Souza, 2007).

E. Esteroides y esteroides

Los esteroides son una clase de metabolitos secundarios que se dividen en: esteroides, sapogeninas, glicósidos cardíacos, esteroalcaloides y hormonas esteroideas, las cuales se consideraban únicamente de origen animal hasta que en 1966 se aislaron de tejidos de plantas (Lock, 2016).

Los esteroides se forman por la ruta del ácido mevalónico. Son sólidos cristalinos de color blanco y tienen un esqueleto común que se basa en el ciclopentanoperhidrofenantreno, **Figura 20**.

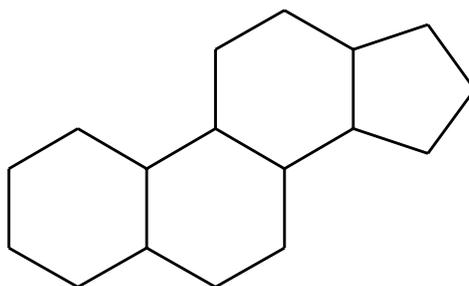


Figura 20. Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno.

Los esteroides, cuya estructura base se muestra en la **Figura 21**, son una clase de esteroide, se encuentran distribuidos tanto en animales como plantas, siendo el más conocido el colesterol el cual es propio de animales.

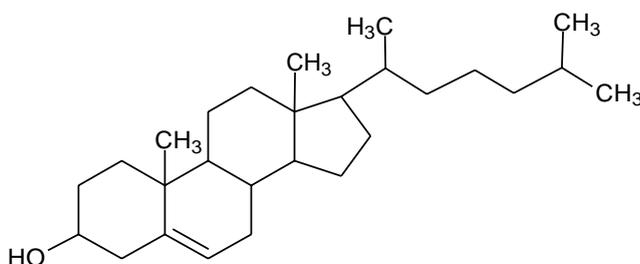


Figura 21. Estructura base de los esteroides.

Como se puede observar en la **Figura 21** la principal diferencia entre la estructura base de los esteroides y la de los esteroides es una cadena alifática en el ciclopentano.

Los esteroides propios de plantas también son denominados fitoesteroides, éstos tienen puntos de fusión, generalmente, menores a 200 °C. Los fitoesteroides cumplen la función del

colesterol en el cuerpo humano motivo, debido a que poseen estructuras similares al colesterol, por el los fitoesteroles reducen la cantidad de colesterol en el cuerpo humano (Plat & Mensink, 2001). Además, de tener otras propiedades, **Tabla 6**.

Tabla 6.
Propiedades de algunos esteroles.

N°	Esterol	Propiedad	Referencia
1	γ -sitosterol	Aumenta la citotoxicidad de extractos frente a líneas celulares cancerígenas.	(Luo et al., 2014)
2	Estigmasterol	Evita la osteoporosis y artritis. Captador de radicales libres.	(Gabay et al., 2010) (Emre et al. 2011)
3	Campesterol	Reduce la formación de vasos sanguíneos a partir de los preexistentes.	(Choi et al., 2007)

Como parte de la Tesis presentada se identificó 3 esteroles: campesterol, estigmasterol y γ -sitosterol, los cuales se describen a continuación:

1. *Campesterol*

El campesterol, **Figura 22**, es uno de los esteroles más comunes en plantas, abunda principalmente en nueces, semillas, cereales y aceites vegetales (Ikeda et al., 2006; Ling & Jones, 1995; Phillips et al., 2005).

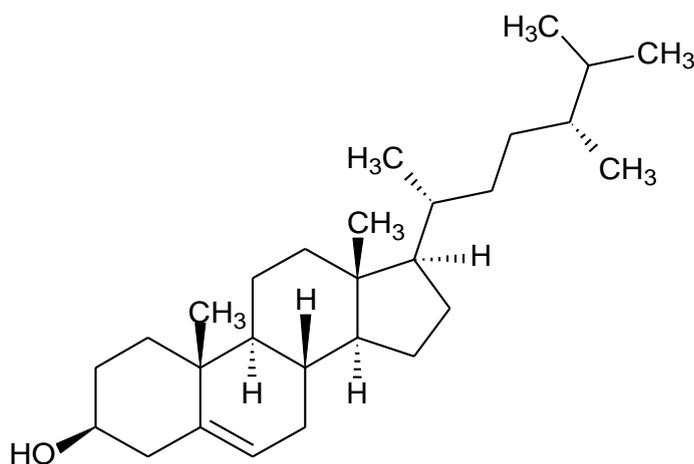


Figura 22. Estructura del campesterol.

El campesterol es uno de los esteroides quimiopreventivo, en el caso particular del campesterol demostró tener efectividad contra cáncer de mama, próstata y pulmón (Awad et al., 2000; McCann et al., 2005; Schabath et al., 2005)

2. *Estigmasterol*

El estigmasterol, **Figura 23**, el segundo esteroide en cuanto a abundancia en plantas se refiere, solo superado por el sitosterol.

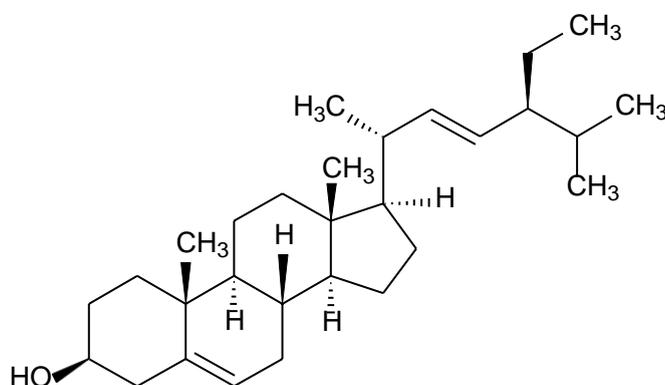


Figura 23. Estructura del estigmasterol.

Este esteroide que ha logrado inhibir tumores cancerígenos en ratas además de estar comprobada su propiedad antiosteoartríticas así como actividad antiinflamatoria (Atuesta, G.C.P., 2017; Gabay et al., 2010). Además, es considerado un potente antioxidante al ser captador de radicales libres dentro del organismo (Emre et al. 2011)

El estigmasterol es identificado principalmente por su EM, **Figura 24**, en donde se aprecia que el ion molecular es 412 igual que la masa molar de la molécula. Además, se tiene fragmentos como: $m/z = 41$, $m/z = 69$, $m/z = 135$ y $m/z = 394$, entre otros (Grovas Llamocca et al., 2018).

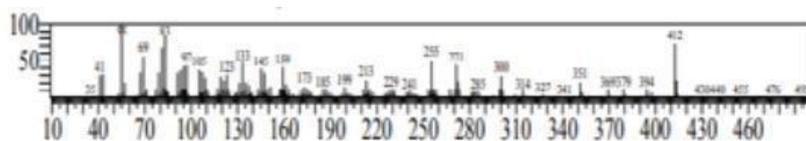


Figura 24. EM del estigmasterol obtenido de las raíces de *Mansoa alliacea* (Grovas Llamocca et al., 2018).

3. γ -sitosterol

El γ -sitosterol, **Figura 25**, es, junto al β -sitosterol, el esteroide de mayor abundancia en plantas.

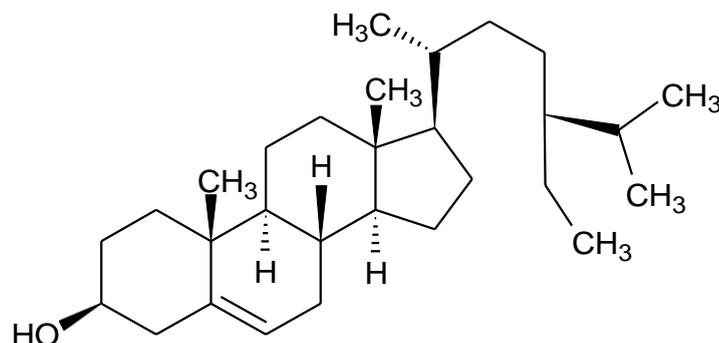


Figura 25. Estructura del γ -sitosterol.

Extractos en cuya composición se encuentra de 10 a 20% de γ -sitosterol exhiben un amplio rango de actividad citotóxica frente a líneas celulares cancerosas en ensayos de reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Luo et al., 2014).

La identificación del γ -sitosterol se realiza por la fragmentación del EM. Como se observa en la **Figura 26**, se tiene un ion molecular correspondiente a la masa molar del γ -sitosterol (414), y otros fragmentos como: $m/z = 43$, $m/z = 145$, $m/z = 163$ y $m/z = 396$ (Gaitén et al., 2011).

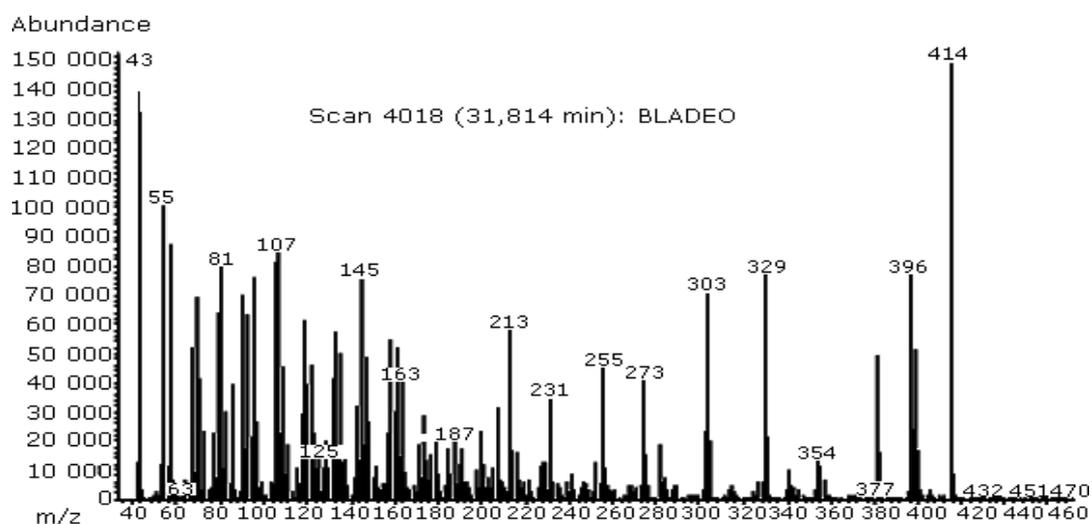


Figura 26. EM del γ -sitosterol obtenido de las hojas de *Phyllanthus orbicularis* RBK (Gaitén et al., 2011)

F. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos (McMurry, 2012)

La espectroscopía, el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia de estudio, es el fundamento para el desarrollo de múltiples tipos de técnicas espectroscópicas como: espectroscopía ultravioleta, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, polarimetría y espectroscopía infrarroja entre otros. Todas estas técnicas tienen como finalidad la elucidación estructural de los compuestos presentes en una mezcla o aquellos que se encuentran puros.

Al emplear una técnica espectroscópica se debe tener en cuenta las desventajas de la misma así como la información que se puede obtener, por ejemplo, la espectrometría infrarroja mide las longitudes de onda en la cual un enlace vibra lo que permite identificar los grupos funcionales presentes en la molécula, mas no nos permite saber si hay una mezcla de compuestos, motivo por el cual se debe utilizar en compuestos de alta pureza, o cuantos de estos grupos funcionales están presentes en la molécula.

Debido a la utilidad de las técnicas espectroscópicas los químicos orgánicos las emplean como su principal herramienta en la elucidación de moléculas. Dentro de la química orgánica se emplean las siguientes técnicas:

- i. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis): Permite la identificación de grupos cromóforos. Su principal desventaja es que al sólo identificar grupos cromóforos no da información de otras partes de la molécula. También, se utiliza para la cuantificación de compuestos por medio de la ley de Lambert-Beer.
- ii. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR): Con esta técnica se identifica los grupos funcionales presentes en las moléculas, pero no la cantidad de cada grupo funcional ni la ubicación que tienen en la estructura de estudio.
- iii. Espectrometría de masas (EM): Nos permite conocer la masa molecular del compuesto a estudiar por medio de la formación de un ion molecular. Además, es útil pues cada compuesto tiene una EM único, motivo por el cual una molécula

puede ser identificada mediante una comparación con espectros entre el obtenido y los que hayan sido reportados.

- iv. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H): Es la técnica de mayor uso al momento de la elucidación de una estructura, esto debido a que nos brinda información de la composición de átomos de hidrógeno y la vecindad en la cual se encuentran. Además, es la base de técnicas como la espectroscopía de correlación (COSY), la cual permite conocer la relación que hay entre un átomo de hidrógeno y aquellos que se encuentran a 2 o 3 enlaces.
- v. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C): Caso similar al RMN ^1H es una técnica muy útil al momento de elucidar una estructura, con la desventaja que los análisis con más tardados por la poca abundancia del ^{13}C en comparación con el ^1H . Esta técnica nos permite conocer la conformación de átomos de carbono y la vecindad d ellos mismos. Además, junto al RMN ^1H , son base de la espectroscopía de correlación cuántica múltiple hetero nuclear (HMQC) la cual permite conocer la relación entre átomos de hidrógenos y de carbono para distinguir cuales se encuentran enlazados.

A continuación, procederemos a detallar las técnicas espectroscopias utilizadas para la identificación de metabolitos secundarios en las hojas de Yawar Panga.

1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para la medición con esta técnica se hace uso de la región infrarroja del espectro electromagnético, la cual se divide en infrarrojo cercano, infrarrojo e infrarrojo lejano, siendo utilizada por los químicos la región del infrarrojo que abarca las longitudes de onda (λ) que van desde $2,5 \times 10^{-4}$ cm hasta $2,5 \times 10^{-3}$ cm. Al tener mayores longitudes de onda que el espectro visible no hay la energía suficiente para romper enlaces, pero si para hacer vibrar los enlaces.

Para fines de análisis se emplea el número de onda (ν) el cual es la inversa de λ , por lo que un espectro FTIR tiene como eje horizontal el número de onda que va desde 400 a

4000 cm^{-1} , y en el eje vertical se observa el porcentaje de transmitancia medida que va de 0 a 100%.

La FTIR se basa en la absorción de energía por parte de la molécula analizada, esto es debido a que los enlaces se encuentran en constante movimiento, **Figura 27**, y al ser irradiados por energía electromagnética absorben energía si la frecuencia irradiada coincide con alguna de las frecuencias de vibración natural de la molécula, lo cual se ve reflejado en picos que poseen un porcentaje de transmitancia a un determinado número de onda. De esta forma se identifica que modos vibracionales tiene una molécula y con ello los grupos funcionales que están presentes.

Una desventaja del uso del FTIR es que las muestras analizadas tienen que tener una alta pureza, debido a que también se generarían picos por los grupos funcionales de las impurezas que puede o no coincidir con los de la molécula de interés.

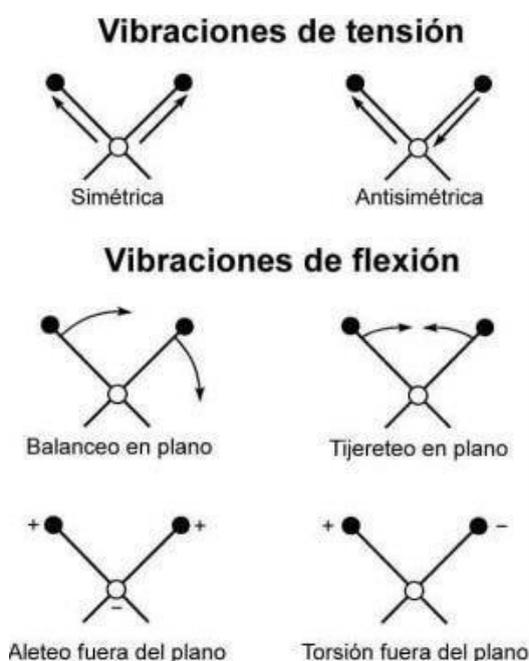


Figura 27. Tipos de vibraciones de los enlaces¹.

También, la interpretación del espectro se dificulta debido a que las moléculas orgánicas tienen decenas de enlaces que tienen un movimiento particular y por ende absorben en un número de onda diferente, lo cual ocasiona que el espectro

¹Fuente: Universidad del País Vasco
URL: <http://www.ehu.eus/imacris/PIE06/web/IR.htm>

resultante tenga muchas señales. No obstante, esto es productivo debido a que la región entre 400 y 1500 cm^{-1} del espectro FTIR es conocida como la huella digital de las moléculas, **Tabla 7**, debido a que son únicas, al punto que si dos muestras tienen el mismo espectro en la región mencionada es casi seguro que se trate del mismo compuesto.

Tabla 7.

Regiones de un espectro FTIR..

Región (cm^{-1})	Enlaces característicos
400 - 1500	Región de la huella digital; se encuentran vibraciones de enlaces simples entre: CO, CN y CO.
1500 - 2000	Se encuentran vibraciones procedentes de dobles enlaces entre: CO, CN y CO.
2000 - 2850	En esta región se ubican las vibraciones de los triples enlaces entre CC y CN.
2850 - 4000	Se identifican los modos vibracionales de enlaces: CH, NH y OH, los últimos generan una banda de absorción en lugar de un pico.

2. *Espectrometría de masas (EM)*

La espectrometría de masa, como su nombre lo indica, es la medida de la masa; por lo que el principal dato que se obtiene es la masa molecular del compuesto analizado.

El método consiste en cargar la molécula por medio de una ionización, siendo la ionización por impacto de electrones la más utilizada para fines de investigación de fragmentos y la ionización química empleada cuando haya dudas respecto a la masa molecular. Para poder ionizar la molécula, **Figura 28**, ésta debe ser vaporizada y es bombardeada por un flujo de electrones, el choque entre el electrón y la molécula desprende un electrón de valencia del compuesto analizado obteniéndose un radical catión de la molécula el cual se denomina ion molecular.



Figura 28. Formación del ion molecular.

El resultado de un análisis por EM proporciona en el eje x la relación masa carga (m/z) y siendo la carga igual a 1 el valor m/z es igual a la masa, motivo por el cual se logra obtener la masa molecular del compuesto. también en este eje se encontrarán picos en otros valores de m/z correspondiente a partes o fragmentos de la molécula original que por la cantidad de energía irradiada son formados, alguno de ellos tendrá carga neutra por lo que no aparecen en el espectro y la gran mayoría tendrá la carga positiva que se genera por la pérdida de un electrón y serán vistos como picos en el espectro y con los cuales se construye la estructura de la molécula analizada.

Por otro lado, en el eje y se grafica una abundancia relativa, asignándole al pico m/z con mayor abundancia, el pico más alto, se le asigna el valor de 100 % y es conocido como pico base.

Cabe señalar que a menos que se realice una ionización química el pico base y el ion molecular no suelen ser el mismo.

Una desventaja del EM es que es una técnica destructiva y no se puede analizar correctamente moléculas con masas molares superiores a 2500 g/mol.

3. *Resonancia magnética nuclear del ^1H (RMN ^1H)*

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear se basa en el concepto de que los núcleos atómicos giran alrededor de un eje, para que ello sea posible los núcleos deben tener espines desapareados tal es el caso de los átomos como ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P ; siendo los primeros dos los más usados porque son la base de las estructuras orgánicas.

De manera normal los espines están orientados de manera aleatoria, lo que cambia al aplicar un campo magnético (B_0), el cual orienta los espines en direcciones específicas, ya sea en la misma o diferente dirección al campo aplicado. Ahora bien, si a los espines dentro del campo se les añade radiación electromagnética a una frecuencia apropiada que pueda ser absorbida y generar que los espines se invierten ocasionando una resonancia, **Figura 29**.

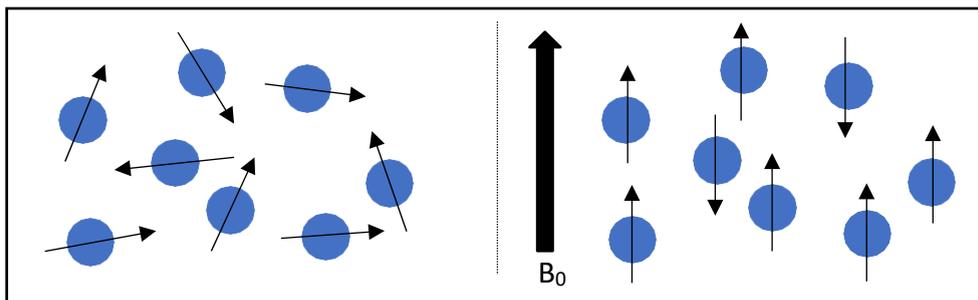


Figura 29. Efecto de un campo magnético sobre los núcleos.

Si los núcleos sólo estarían expuestos a un campo B_0 los espectros de RMN sólo tendrían una banda de absorbancia algo que resulta inútil para la elucidación de una estructura. Pues bien, los núcleos aplican campos magnéticos locales (B_L), los cuales son opuestos a B_0 , sobre aquellos que están a su alrededor lo cual genera que el campo efectivo (B_E) sobre el espín disminuya y sea variado para cada tipo de átomo, es por este motivo que los espectros RMN están conformados por múltiples picos donde cada uno representa a uno o más protones que producen resonancia al absorber una determinada frecuencia del espectro electromagnético lo cual es medido como desplazamiento químico (δ).

La información proporcionada por un espectro RMN ^1H es amplia, lo primera fuente de información es el desplazamiento químico (δ) de los protones, esto depende de la frecuencia del espectro al cual se genera la resonancia del espín y se comprende principalmente entre valores de 10 a 0 ppm. Cabe señalar que al ser B_E mayor se necesita más frecuencia para que puedan generar resonancia, por ende, tendrán un mayor desplazamiento.

Aquellos protones que no tiene otros cerca (no tiene apantallamiento) absorben en el denominado campo bajo, debido a que B_E es mayor, pues no hay campos locales generados por otros protones. Caso contrario los protones apantallados tienen un B_E menor por lo que su desplazamiento menor.

Otro dato importante del espectro es la integración de las señales, que no es más que el área sobre cada pico, el cual al ser calculada por medio de una integración y comparada con el resto de los picos, nos indica la proporción de átomos de hidrógeno que representa cada uno de ellos.

Una característica que brinda información al momento de elucidar una estructura usando el RMN ^1H es el desdoblamiento del espín, esto se produce debido a los pequeños campos producidos por otros spins cercanos lo que ocasiona que en lugar de obtener un solo pico se tengan multipletes denominados multipletes. Cuando solo se trata de un pico se denomina singulete lo cual indica que alrededor de ese espín no hay otros protones que generen campos, de haber dos picos es un doblete que indica que hay un espín generando un pequeño campo por lo que en la estructura el hidrógeno de la señal doblete estará cerca a otro. De igual forma se tiene triplete, cuatriplete, quintuplete y multipletes, este último cuando no hay un conteo adecuado de picos.

4. Resonancia magnética nuclear del ^{13}C (RMN ^{13}C)

Similar a lo explicado en la sección anterior, el espectro RMN del ^{13}C depende de la frecuencia a la cual un espín, sometido a un campo efectivo, genera resonancia. La diferencia más importante entre ambos espectros es la abundancia de los protones necesarios para el análisis, en el caso del ^{13}C tiene una abundancia de apenas 1%, esto genera que los espectros sean muy ruidosos y no se puedan interpretar con una sola medición; por ese motivo se deben realizar múltiples análisis de la misma muestra para poder obtener un espectro que nos permita realizar la construcción de la molécula.

Además, mientras que el espectro de RMN ^1H tiene desplazamiento entre 10 y 0 ppm, el de ^{13}C va desde 220 hasta 0 ppm, esto debido a la baja abundancia del ^{13}C , por lo que en la práctica se requiere mucha más masa de la muestra para que el análisis de RMN ^{13}C que para el de ^1H en donde se puede usar apenas unos cuantos miligramos y obtener un espectro adecuado para la interpretación.

Dada la poca abundancia del ^{13}C no se espera que los átomos cercanos generen campos considerables sobre aquel que se encuentra siendo analizado, por lo que la diferencia de las señales depende de la electronegatividad de los átomos cercanos. Tal es el caso que aquellos carbonos enlazados a oxígeno, nitrógeno y otro halógeno absorben en campo bajo, y los carbonos de alcanos en campo alto.

Esta técnica es un complemento del RMN ^1H pues permite conocer el entorno de los átomos de carbono a los cuales están enlazados los de hidrógeno, identificando el número de hidrógenos enlazados a cada carbono, además de identificar a aquellos carbonos que no están enlazados a ningún hidrógeno.

PARTE EXPERIMENTAL

I. Selección y recolección de la planta

Se optó por estudiar las hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule* o *Aristolochia didyma*) por tres motivos:

- i. Las hojas no cuentan con estudios químicos previos referidos a su composición química.
- ii. Se cuenta con material vegetal suficiente para realizar el estudio.
- iii. Las hojas de Yawar Panga son utilizadas en la Amazonía peruana por sus propiedades eméticas.

La recolecta de las hojas y tallos de Yawar Panga, fue realizada por el Dr. Victor Reyna, el 11 de febrero de 2014, con lluvia, en el Jardín Botánico del Centro de Rehabilitación de Toxicómanos y de Investigación de Medicinas Tradicionales Takiwasi (Anexo 3), ubicado en la ciudad de Tarapoto (aproximadamente 15 km² a 350 m.s.n.m.) en la provincia de San Martín-Perú, **Figura 30**, centro terapéutico donde las hojas de la planta son utilizadas por inducir al vómito.



Figura 30. Ubicación del centro Takiwasi¹.

La recolecta de Yawar Panga se realizó en conjunto con la de Yagé y ajo Sacha como parte del proyecto titulado: Estudio Químico del Yagé (*Diploteria cabrenara*).

¹Mapa obtenido de Google Maps.

II. Identificación botánica

La Identificación botánica, **Tabla 8**, de la muestra recolectada, **Figura 31**, se realizó por el especialista botánico, Blgo. Severo Baldeon, del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), el 6 de mayo de 2014 (Anexo 4).

Tabla 8.

Clasificación taxonómica del Yawar Panga.

Clasificación Taxonómica



Figura 31. Plantación de Yawar Panga en el Centro Takiwasi.

(Foto tomada por el Dr. Reyna en el Centro Takiwasi en 2014).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Aristolochiales
Familia	<i>Aristolochiaceae</i>
Género	<i>Aristolochia</i>
Especie	<i>Aristolochia cf. Cauliflora Ule.*</i>

*Presenta sinonímica con *Aristolochia didyma*.

III. Secado y molienda

Se recolectó 3 Kg de muestra (húmeda) entre hojas y tallos, la cual al llegar a Lima se secaron para evitar la formación de hongos, obteniéndose 737,3 g de muestra seca. La

muestra seca se dejó en cajas de cartón desde el 4 de marzo de 2014 hasta el 12 de noviembre de 2018 fecha en donde se dio inicio del trabajo de investigación.



Figura 32. Hoja seca de Yawar Panga.
(Foto tomada por L. Rojas en 2018)

Como la muestra había estado guardada por largo tiempo, antes de iniciar el trabajo, se volvió a realizar el secado de las hojas en una estufa Binder (modelo E028-230V-T). Obteniéndose una masa total de 542,59 g de muestra seca. Luego toda la muestra fue molida en un molino doméstico marca Moulinex, y de esta forma se obtuvo una masa de 532,65 g de muestra seca y molida, **Figura 33.**



Figura 33. Muestra seca y molida.
(Foto tomada por L. Rojas en 2018)

IV. Análisis cualitativo

A. Según Rondina & Coussio

El procedimiento realizado (Anexo 5) es el descrito por Reyna-2012, en base a lo propuesto por Rondina & Coussio-1969, **Figura 34.**

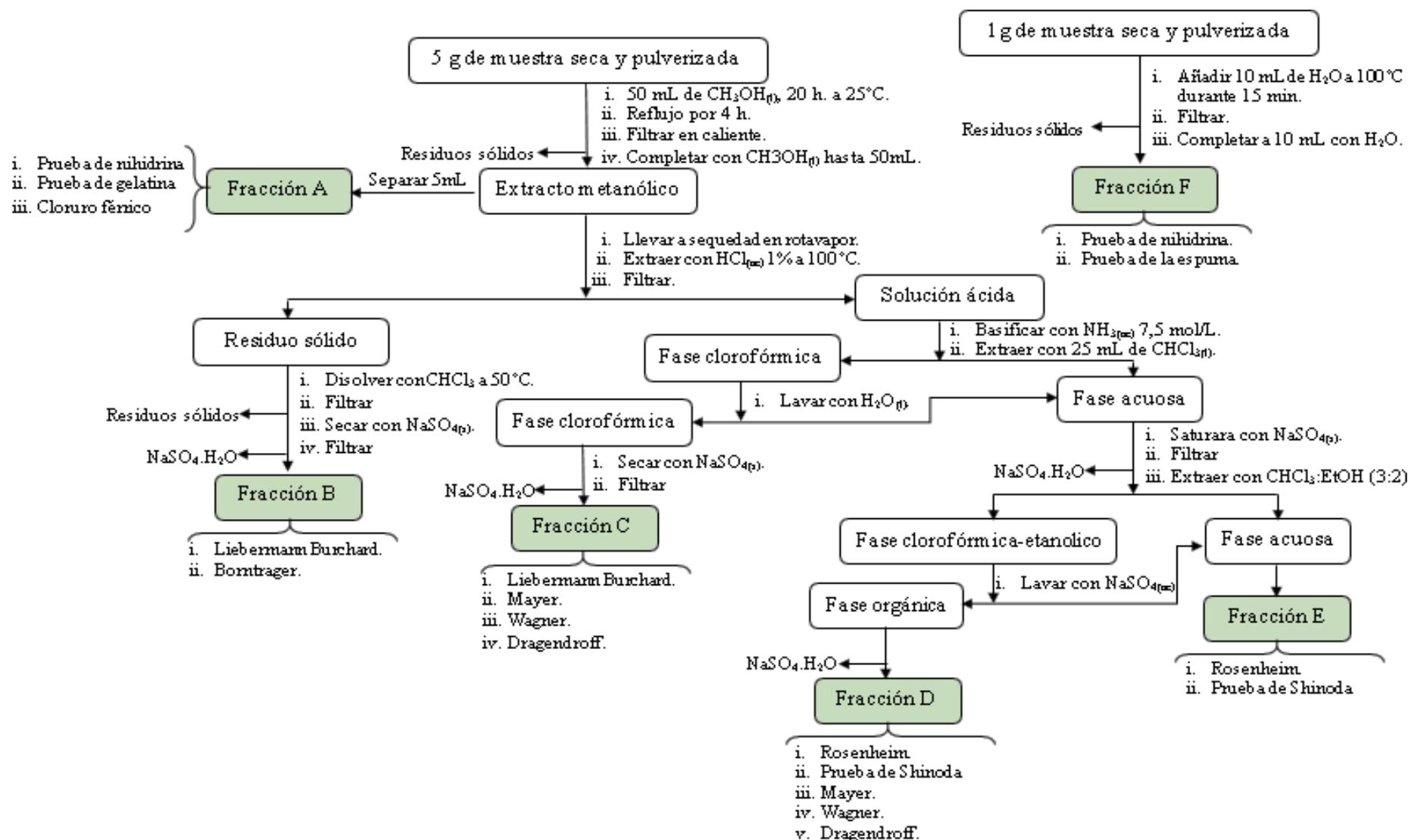


Figura 34. Diagrama de proceso químico de la marcha fitoquímica según Rondina & Coussio- 1969.

1. Primer análisis

- i. Muestra: 6 g de hojas secas y molidas de Yawar Panga.
- ii. Fechas: 14, 15 y 19 de noviembre de 2018.
- iii. Resultados (Anexo 6):
Contiene: Aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos, tripertenos y esteroides, catequinas, flavonoides, quinonas, antranas y antranoles.
No contiene: Taninos, alcaloides, leucoantocianidinas ni saponinas.
- iv. Observaciones: Hubo un precipitado color crema en la prueba de Dragendorff. Además, la reacción de Shinoda fue positiva con coloración naranja.

2. Segundo análisis

- i. Muestra: 6 g de hojas secas y molidas de Yawar Panga.
- ii. Fechas: del 20 al 22 de noviembre de 2018.
- iii. Resultados (Anexo 7):
Contiene: Aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos, tripertenos y esteroides, catequinas, flavonoides, quinonas, antranas y antranoles.
No contiene: Taninos, alcaloides, leucoantocianidinas ni saponinas.
- iv. Observaciones: Hubo dos precipitados, uno color blanco y la otra crema, en la prueba de Dragendorff. Además, la reacción de Shinoda fue positiva con coloración amarilla.

Al existir discrepancias en los resultados de ambos análisis se procedió a realizar las pruebas específicas de Villacrez para alcaloides y para flavonoides.

B. Pruebas específicas de Villacrez

El procedimiento realizado (Anexo 8) es el descrito por Villacrez-1995, **Figura 35**.

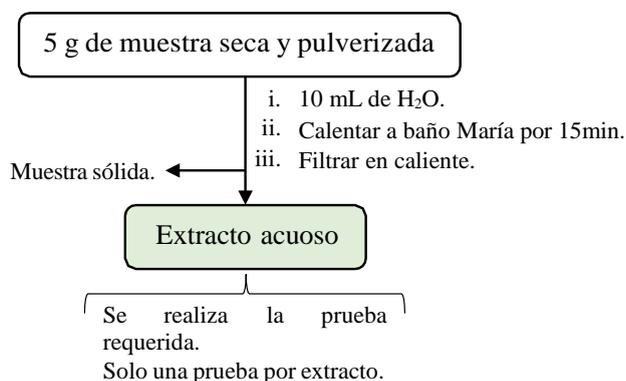


Figura 35. Diagrama de proceso químico de la marcha fitoquímica según Villacrez-1995.

1. Flavonoides

- i. Muestra: 5 g de hojas secas y molidas de Yawar Panga.
- ii. Fecha: 28 de noviembre de 2018.
- iii. Prueba: Reacción de Shinoda.
- iv. Resultado: Se confirmó la presencia de flavonoides, la coloración de la prueba fue amarillo indicando que se trata de isoflavonas.
- v. Discusiones: La diferencia de colores en las pruebas de Rondina & Coussio, puede deberse a la intensidad y la luminosidad del ambiente al momento de realizar la prueba por o que el color anaranjado tenue se puede confundir con amarillo

2. Alcaloides

- i. Muestra: 15 g de hojas secas y molidas de Yawar Panga.

- ii. Fecha: 28 de noviembre de 2018
- iii. Pruebas: Reacción de Dragendorff, reacción de Mayer y reacción de Wagner.
- iv. Resultado: Se descartó la presencia de alcaloides al no haber precipitado en ninguna de las tres pruebas.
- v. Discusiones: Los resultados obtenidos en la sección IV.A.2. se debieron a que las hojas de Yawar Panga contienen aminogrupos, los cuales pueden llegar a reaccionar con los reactivos de las pruebas de alcaloides generando falsos positivos.

Finalizados los análisis cualitativos (marchas fitoquímicas) sobre las hojas de Yawar Panga queda evidenciado lo siguiente:

- i. Las hojas de Yawar Panga contienen: Aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos, triptenos y esteroides, catequinas, flavonoides del tipo isoflavonas, quinonas, antronas y antranoles.
- ii. Las hojas de Yawar Panga no contienen: Taninos, alcaloides, leucoantocianidinas ni saponinas.

Según lo planteado por Agrawal en 2016, el ácido aristolóquico es un alcaloide, y teniendo un resultado negativo para alcaloides en las pruebas realizadas, se infiere que las hojas de Yawar Panga no poseen ácido aristolóquico.

V. Aislamiento de rotenona

A. Extracción sólido-líquido

Las hojas secas y molidas de Yawar Panga (500,65 g), fueron maceradas en distintos solventes, iniciando con éter de petróleo, luego diclorometano y finalmente, etanol.

1. Maceración con éter de petróleo

- i. Muestra: 500,65 g de hojas secas y molidas de Yawar Panga.
- ii. Solvente: Éter de petróleo.
- iii. Características: Maceración convencional a temperatura ambiente (4 maceraciones continuas de 1, 2, 3 y 4 días por separado).
- iv. Fechas: Del 17 de diciembre de 2018 al 3 de enero del 2019.
- v. Resultado: El extracto se concentró en rotavapor obteniéndose 4,54 g del extracto bruto orgánico de éter de petróleo (EBO/éter).
- vi. Observación: El trabajo realizado con el EBO/éter se detalla en la sección VI.

La muestra que fue extraída con éter de petróleo, se colocó en una campana extractora para que se evapore el solvente y utilizar la muestra posteriormente para la maceración con diclorometano.

2. Maceración con diclorometano

- i. Muestra: 496,11 g de hojas secas y molidas de Yawar Panga previamente extraídas con éter de petróleo.
- ii. Solvente: Diclorometano (CH_2Cl_2).
- iii. Características: Maceración convencional a temperatura ambiente (3 maceraciones continuas de 1, 2 y 3 días).
- iv. Fechas: Del 8 al 16 de enero de 2019.
- v. Resultado: Se concentró en un rotavapor el extracto obteniéndose 10,82 g del extracto bruto orgánico de éter de diclorometano (EBO/diclorometano).

- vii. Observación: El trabajo realizado con el EBO/diclorometano se detalla en la sección VII.

La muestra que fue extraída con diclorometano, se colocó en una campana extractora para que se evapore el solvente y utilizar la muestra posteriormente para la maceración con etanol.

3. Maceración con etanol

- i. Muestra: 485,29 g de hojas secas y molidas de Yawar Panga previamente extraídas con éter de petróleo y diclorometano.
- ii. Solvente: Etanol (C_2H_5OH).
- iii. Características: Maceración convencional a temperatura ambiente (3 maceraciones continuas de 1, 2 y 3 días).
- iv. Fechas: Del 7 al 14 de mayo de 2019.
- v. Resultado: Se concentró en un rotavapor el extracto obteniéndose 4,37 g del extracto bruto orgánico de etanol (EBO/etanol), **Figura 36**.
- vi. Observaciones: La muestra que fue extraída con etanol, se colocó en una campana extractora para que se evapore el solvente y utilizarla para estudios posteriores.



Figura 36. EBO/etanol.

(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

B. Separación de rotenona

1. *Partición líquido-líquido (PLL)*

- i. Muestra: 4,37 g de EBO/etanol disuelta, previamente, en una mezcla de metanol (5mL), cloroformo (3 mL) y agua (2 mL).
- ii. Fecha: 5 de junio de 2019
- iii. Solventes: Cloroformo 170 mL, butanol 100 mL y agua 50 mL.
- iv. Características de la columna: 72 cm de altura y 2 cm de diámetro.
- v. Procedimiento: En la columna se trasvasó la muestra, más 10 mL de agua. Seguidamente se adicionó 170 mL de cloroformo, **Figura 37**. Se recolectó la fase clorofórmica en dos frascos de 100 mL (F1 y F2). Los cuales luego de ser concentrados se juntaron en un único grupo ($G_{\text{CLOROFORMO}}$).



Figura 37. PLL del EBO/etanol.
(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

Luego se retiró la fase acuosa, guardándola para un posterior tratamiento con butanol. La columna fue lavada con metanol, para luego añadir 100 mL de butanol y por la parte superior de la columna se añadió la fase acuosa, la cual al llegar a la parte inferior de la

columna fue recolectada en un frasco de 100 mL (F3) que luego se liofilizó formando G_{AGUA}. Finalmente se retiró el extracto butanólico por la parte superior de la columna colocándose en tres frascos de 100 mL (F4, F5 y F6) que fueron concentrados en rotavapor y luego juntados formando el tercer grupo (G_{BUTANOL}).

vi. Resultado: Las masas de los tres grupos obtenidos son:

G_{CLOROFORMO} (2,4230 g), en cromatografía de capa fina (CCF) se identificó un compuesto predominante por lo que se volvió a realizar una separación, pero ahora por CS.

G_{BUTANOL} (0,9108 g), se realizó una separación por columna cromatográfica de C18, obteniéndose tres nuevos grupos los cuales fueron liofilizados y almacenados para estudios posteriores.

G_{AGUA} (0,9637 g), una vez liofilizada se almacenó para estudios posteriores.

2. *Columna cromatográfica de sephadex (CS)*

- i. Muestra: 2,4230 g de G_{CLOROFORMO}.
- ii. Fecha: 4 de julio de 2019
- iii. Solventes: Éter de petróleo 20 mL, diclorometano 120 mL y metano 200 mL.
- iv. Características de la columna: 72 cm de altura y 2 cm de diámetro.
- v. Fase estacionaria: sephadex LH-20 de la marca GE Healthcare.
- vi. Procedimiento: En la columna se empacó con sephadex hasta una altura de 10 cm en éter de petróleo. La muestra se disolvió en éter de petróleo con diclorometano y se añadió a la columna. Se efluyó con 20 mL de éter de petróleo, posteriormente con 120 mL de diclorometano y finalmente con 200 mL de metanol, **Figura 38**.

Los extractos se recolectaron en balones y fueron concentrados en rotavapor y colocados en viales de 10 mL.

- vii. Resultado: Se obtuvo tres grupos correspondiente a los solventes que se utilizaron en la columna los cuales fueron concentrados en rotavapor, obteniendo los siguientes grupos:

G_{ÉTER} (1,1575 g), por medio de la separación por CC y comparando las fracciones obtenidas con un patrón de esteroides en CCF, se identificó la presencia de esteroides. Todos los grupos obtenidos se almacenaron.

G_{DICLOROMETANO} (0,5414 g), en este grupo se identifica en CCF un compuesto mayoritario con impurezas de color marrón, motivo por el cual se realizó una purificación por CC.

G_{METANOL} (0,2939 g), se almacenó para estudios posteriores



Figura 38. CS de G_{DICLOROMETANO}.
(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

C. Purificación por columna cromatográfica de sílica gel (CC)

- i. Muestra: 0,5414 g de G_{DICLOROMETANO}, se preparó una papilla con diclorometano (10,90 g de sílica gel).

- ii. Fecha: 15 de julio de 2019

- vi. Eluyentes: Éter de petróleo 100 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (9,5:0,5) 200 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (9:1) 300 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (8:2) 600 mL, acetato de etilo y cloroformo (1:1) 250 mL y metanol 100 mL.

- vii. Características de la columna: 72 cm de altura y 2 cm de diámetro.

- viii. Fase estacionaria: Sílica gel de porosidad 60 Å y un tamaño de partícula de 40-63 µm de la marca Sigma Aldrich.

- ix. Masa de sílica gel: 46,00 g.

- x. Altura de sílica gel en la columna: 42 cm.

- xi. Altura de la muestra en columna: 5 cm.

- xii. Procedimiento: En la columna se colocó la sílica gel en éter de petróleo y en la parte superior la papilla preparada. La elución inició con éter de petróleo y se fue cambiando los eluyentes hasta finalizar con metanol, **Figura 39**. Se recolectó en tubos de precipitado de 13x150 mm.



Figura 39. CC de sílica gel de CH_2Cl_2 .
(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

- xiii. Resultado: Se obtuvo 130 fracciones de aproximadamente 10 mL cada una. Éstas fueron analizadas en CCF y se juntaron aquellas que tenían un comportamiento similar, de esta forma se tiene 19 grupos nuevos (G1c-G19c), siendo G7c (152,9 mg), **Figura 40**, el que presenta un sólido crema con una sola mancha en CCF, por lo que se decide realizar ensayos de identificación.

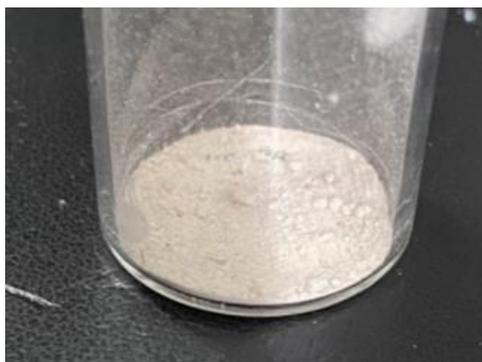


Figura 40. G7c.
(Foto tomada por el L. Rojas en 2019)

D. Identificación de la rotenona

1. Pruebas específicas

- i. Muestra: 5 mg de G7c para cada prueba.
- ii. Fecha: 11 de noviembre de 2020.
- iii. Procedimiento: Se realizaron las pruebas de Shinoda, Bortrager, Rosembeim y Liebermann Burchard, según el procedimiento de análisis descrito por Reyna, 2012.
- iv. Resultado: Se obtuvo sólo una prueba positiva, la cual fue la reacción de Shinoda para determinar flavonoides, siendo de color amarillo, lo cual es característico de isoflavonas. Al no haber otra prueba positiva nos indica que G7c está conformada únicamente por alguna isoflavona.

2. *Determinación de punto de fusión*

- i. Muestra: muestra 5 mg de G7c.
- ii. Fecha: 11 de noviembre de 2020.
- iii. Equipo: Medidor electrotérmico de punto de fusión modelo 9100 de la marca Thermo Scientific.
- iv. Operador: L. Rojas.
- v. Procedimiento: Se selló un capilar al cual se le añadió la muestra y se colocó en el medidor, se tomó la temperatura cuando toda la muestra se encontraba en fase líquida.
- vi. Resultado: El punto de fusión medido fue de 166,4 °C. Comparando los puntos de fusión de isoflavonas con el obtenido, se encontró similitud con la rotenona con una diferencia de 3,4 °C según lo descrito por Roark-1929.

3. *Prueba de solubilidad*

Se probó la solubilidad en diversos solventes, obteniéndose como resultado:

- i. Soluble en acetona, diclorometano y acetato de etilo.
- ii. Poco soluble en etanol.
- iii. Insoluble en agua y metanol.

Estos resultados son similares a los descritos por Roark-1929 para la rotenona.

4. *Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)*

- i. Muestra: 1mg de G7c/mL CH₂Cl₂.

- ii. Fecha: 19 de noviembre del 2020.
- iii. Operador: J. Utano (Labicer) con la presencia de L. Rojas.
- iv. Equipo: SHIMADZU, GC-2010 Plus, con automuestreador: AOC-6000, y detector de EM SHIMADZU, GCMS-QP210 Ultra.
- v. Características del equipo:
 - Columna: RESTEK. RTX-5MS, 30m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m df.
 - Fase móvil: He 99,99% de pureza, rapidez de flujo: 1 mL/min, split: 20:1.
 - Temperatura de la muestra: 250°C.
 - Temperatura de la columna: inició en 190 °C e incrementó hasta 250 °C a una velocidad de 10 °C/min., permaneciendo en 250 °C durante 5 min. Luego aumentó hasta 280 °C a una velocidad de 15 °C/min. permaneciendo en 280 °C durante 47 min.
 - Modo de ionización: IE+.
 - Energía de electrón: 70eV.
 - Temperatura de interface: 220°C.
 - Temperatura de la fuente de Ion: 200°C.
 - Voltaje de detección: 350V.
 - Carga de muestra: 3.0 μ L.
- vi. Resultado: El cromatograma de iones totales (TIC) se muestra en la **Figura 41**.

La concentración de rotenona, con un tiempo de retención de 45,015 min., en la muestra G7c es 93,42% siendo el compuesto predominante en la muestra. La identificación se realizó por medio de la comparación de los espectros de masas obtenidos en el análisis, **Figura 42**, con aquellos que se encontraban en la biblioteca del equipo. Cabe señalar que la bibliografía indica que la rotenona es de color blanco pero la muestra G7c es ligeramente crema, esto debido a las impurezas que se encuentran en la muestra junto con la rotenona.

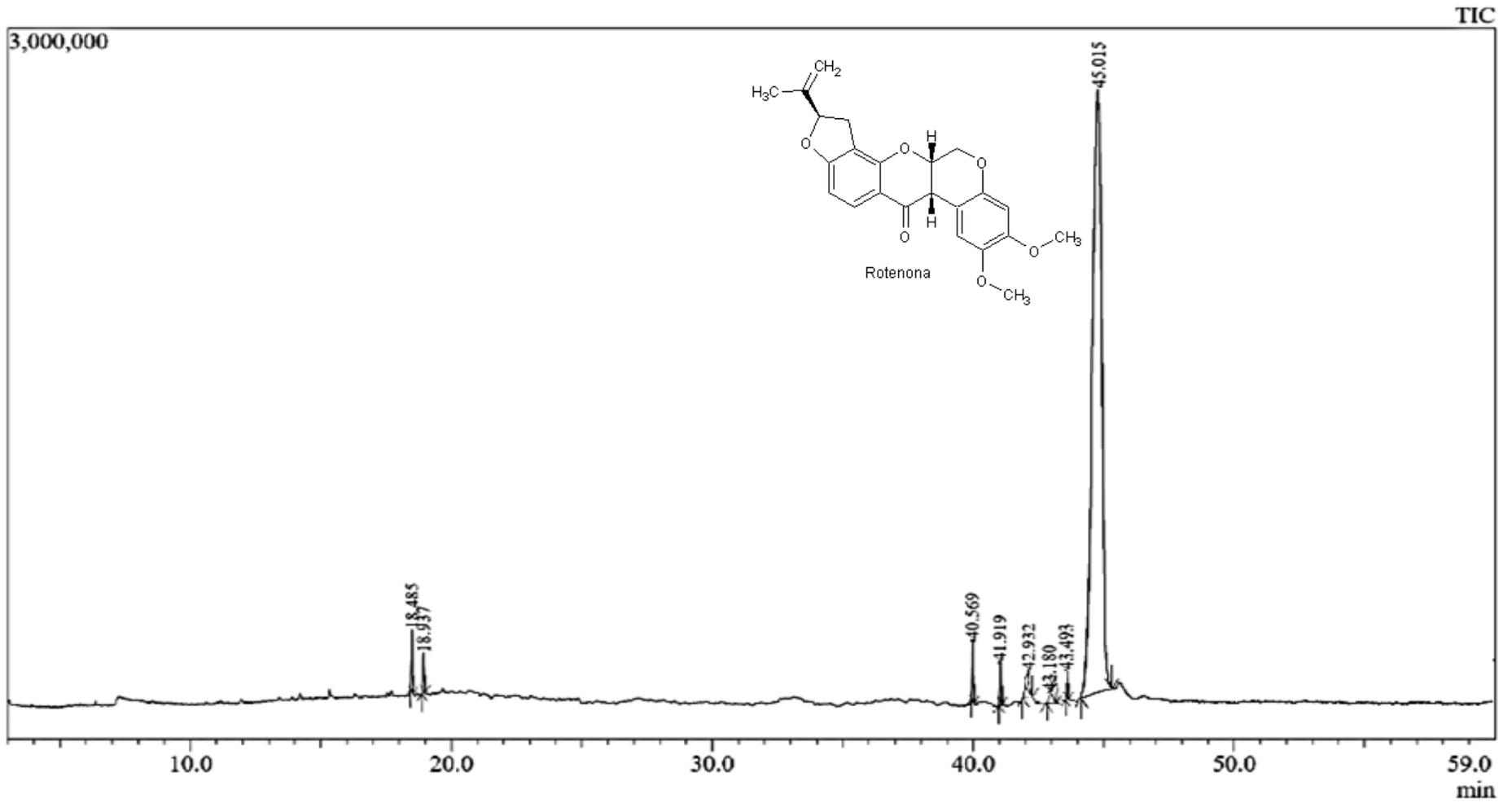


Figura 41. TIC de G7c.

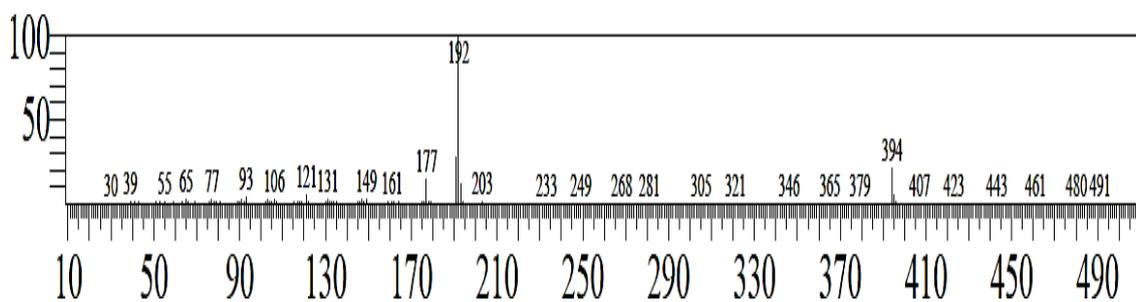
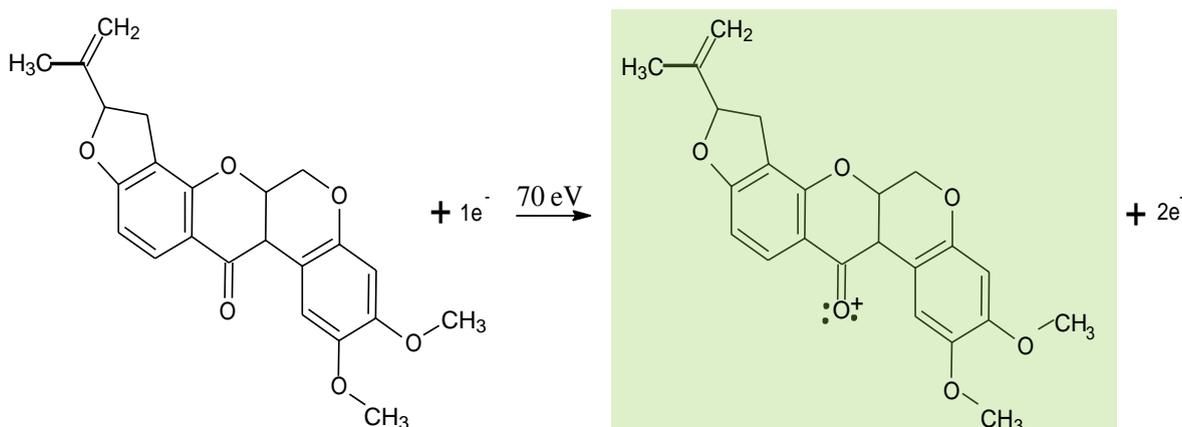


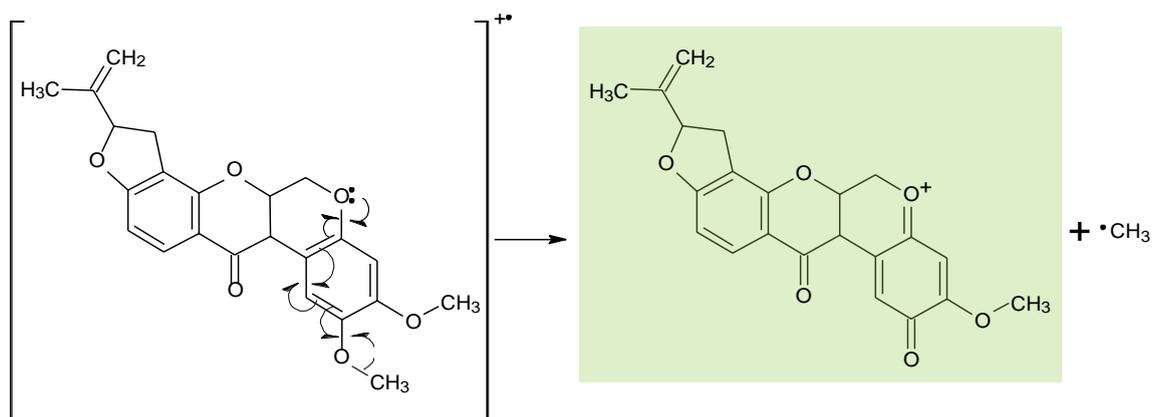
Figura 42. EM de la rotenona presente en G7c obtenido de las hojas de Yawar Panga.

Con el espectro obtenido de la rotenona, **Figura 42**, se procedió a realizar la fragmentación de masas:

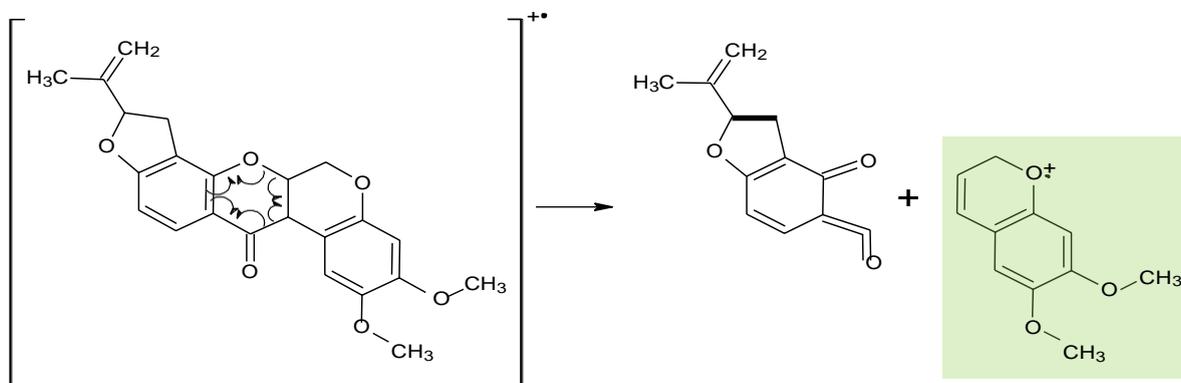
i. Ion molecular $M^{+\circ} = 394$.



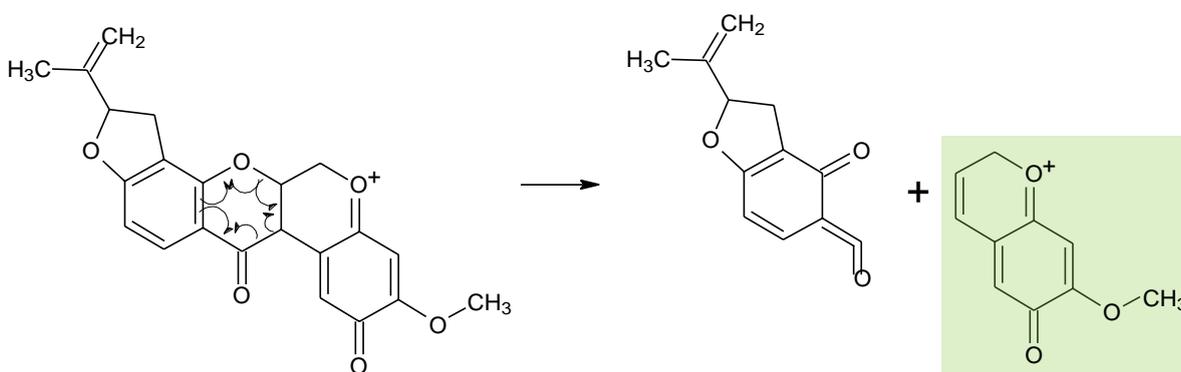
ii. $m/z = 379$; $M^{+\circ} - 15$.



iii. $m/z = 192$.



iv. $m/z = 177$, $m/z = 379 - 202$.



5. *Análisis por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)*

- i. Muestra: 2 mg de rotenona.
- ii. Fecha: 23 de diciembre de 2020.
- iii. Equipo: Espectrómetro IR marca Perkin Elmer modelo Spectrum 400IR/NIR.
- iv. Operador: J Utano (Labicer) con la presencia de L. Rojas.
- v. Resultado: Se obtuvo el espectro FTIR de la muestra G7c (rotenona), **Figura 43**.

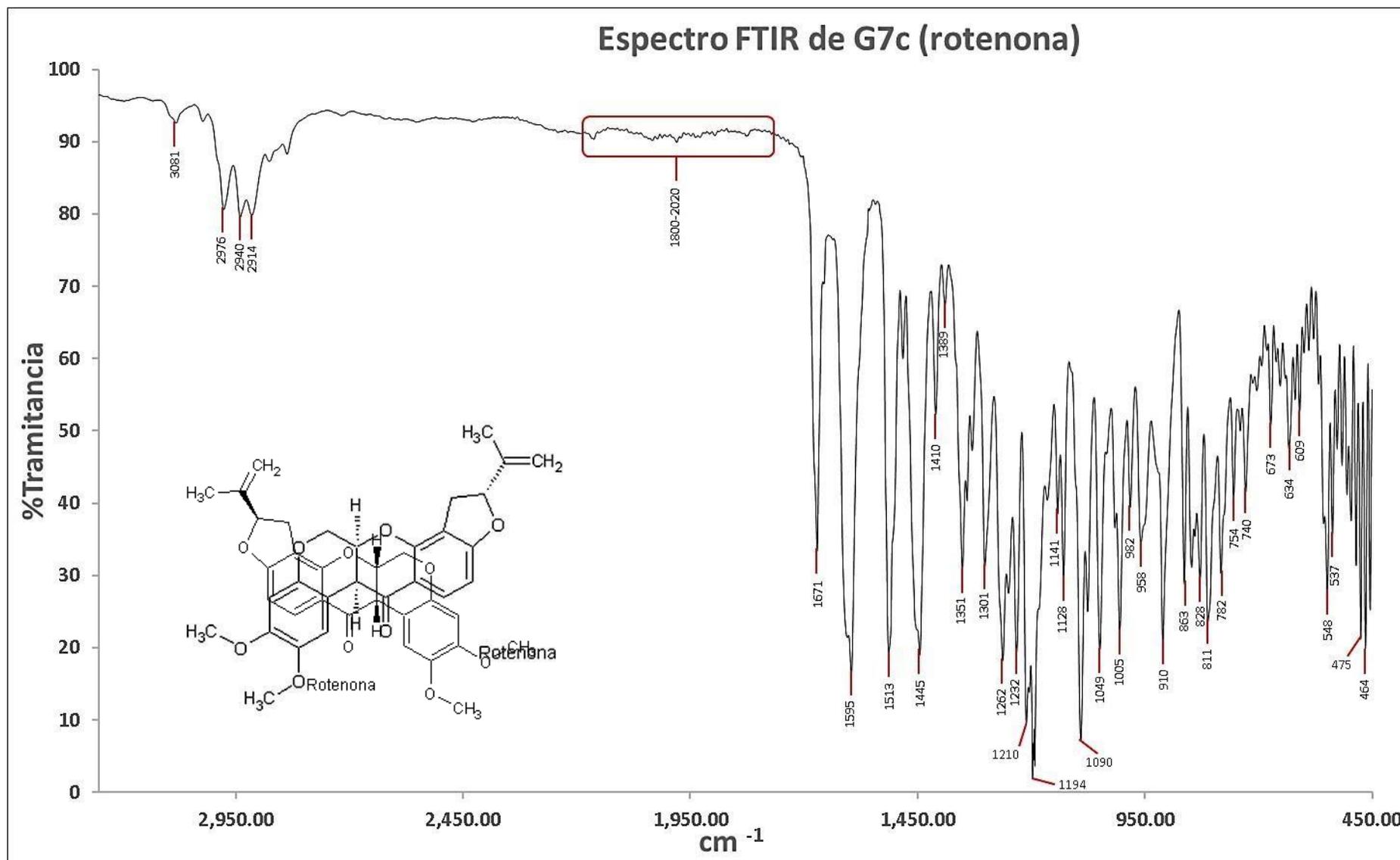


Figura 43. FTIR de rotenona aislada de las hojas de Yawar Panga.

El espectro obtenido fue comparado con el reportado en la bibliografía (Othman et al., 2018) para un patrón de rotenona, en donde se observó la similitud de ambos espectros. Además, se comprobó que las bandas de vibración, **Tabla 9**.

Tabla 9.

Bandas de vibración características del espectro FTIR de la rotenona.

N°	ν^{-1} (cm ⁻¹)	Modo vibracional
1	3081	Estiramiento C-H de un anillo aromático.
2	2976	Estiramiento simétrico C-H de un alqueno.
3	2940	Estiramiento C-H (OCH ₃).
4	1800-2200	Sobrenoto del C-H de un aromático
5	1671	Estiramiento (CO).
6	1595	Estiramiento entre carbonos de un doble enlace.
7	1445	Torsión asimétrica C-H (CH ₃)
8	1389	Torsión simétrica C-H (CH ₃)
9	1194	Torción simétrica de cetona.
10	1128	Estiramiento simétrico R-O-R.
11	1090	Aleteo C-H (CH ₂).
12	1005	Aleteo y torsión C-H anular.

6. *Análisis por resonancia magnética nuclear del pontón ¹H (RMN ¹H)*

- i. Muestra: 10 mg de rotenona.
- ii. Solvente: Cloroformo deuterado (CDCl₃).
- iii. Fecha: 2 de febrero de 2021.
- iv. Modelo: Espectrómetro Bruker Avance de 300 MHz.
- v. Operador: PhD. Valérie Jullian de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Toulouse 3, Francia
- vi. Resultado: Se obtuvo los espectros de RMN ¹H, **Figura 44**.

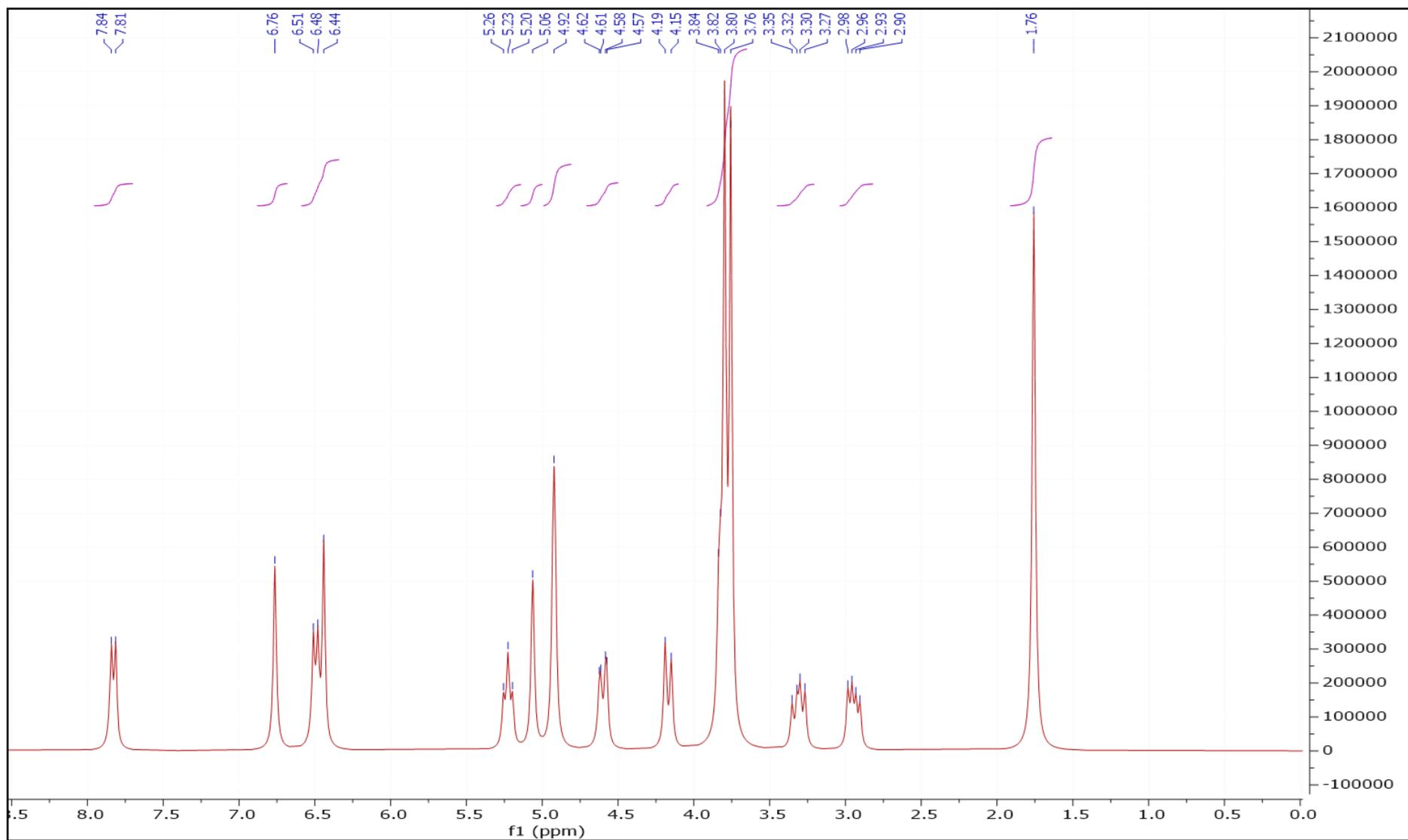


Figura 44. Espectro RMN ^1H de la rotenona aislada de las hojas de Yawar Panga a 300 MHz en CDCl_3 .

Tabla 10.

Datos de RMN ^1H a 300 MHz de rotenona en CDCl_3 , comparación de desplazamientos (δ_{H} en ppm) con los reportados en bibliografía.

Número de H	Integración	Acoplamiento ¹	δ_{H} obtenido	δ_{H} (de Souza, 2007)	δ_{H} (Fang & Casida, 1998)
1	3H	s	1,76	1,77	1,77
2	1H	m	2,96	2,97	2,95
3	1H	m	3,30	3,31	3,32
4a	3H	m	3,76	3,76	3,77
4b	3H	m	3,80	3,81	3,81
4c	1H	m	4,84	3,84	3,84
5	1H	d	4,19	4,18	4,18
6	1H	m	4,61	4,61	4,62
7a	1H	s	4,92	4,93	4,94
7b	1H	s	4,92	4,93	4,94
8	1H	s	5,06	5,07	5,07
9	1H	t	5,23	5,24	5,24
10a	1H	d	6,48	6,45	6,45
10b	1H	d	6,51	6,50	6,51
11	1H	s	6,76	6,77	6,77
12	1H	d	7,84	7,84	7,84

Como se observa en la **Tabla 10**, todas la señales pertenecen a la rotenona pese a que la muestra presenta impurezas a las que se les atribuye la coloración crema, lo que nos indica que estas impurezas son despreciables en el análisis de RMN ^1H .

Con los datos obtenidos se procedió a identificar cada hidrógeno en la molécula de rotenona, **Figura 45**.

¹s: singulete; d: doblete; t: triplete y m: multiplete.

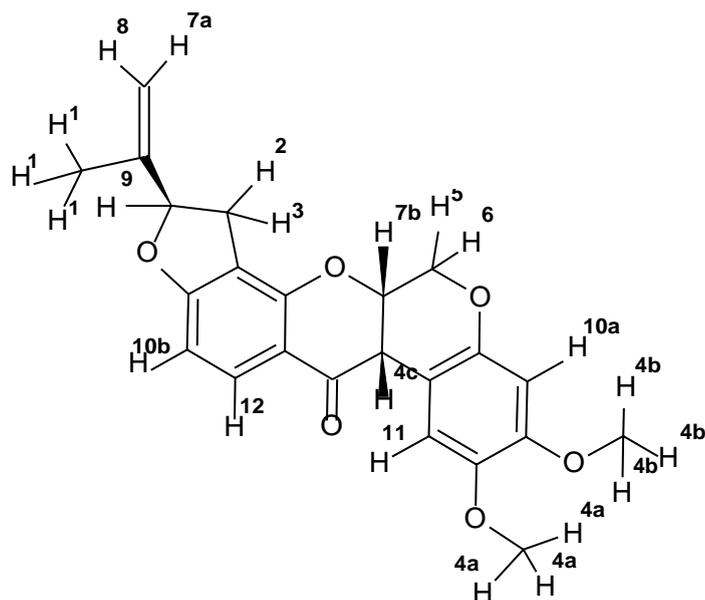


Figura 45. Distribución de los átomos de hidrógeno en la molécula de rotenona.

7. *Análisis por resonancia magnética nuclear del ^{13}C (RMN ^{13}C)*

- i. Muestra: 20 mg de rotenona.
- ii. Solvente: Cloroformo deuterado (CDCl_3).
- iii. Fecha: 2 de febrero de 2021.
- vii. Modelo: Espectrómetro Bruker Avance de 300 MHz.
- viii. Operador: PhD. Valérie Jullian de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Toulouse 3, Francia
- iv. Resultado: Se obtuvo los espectros de RMN ^{13}C , **Figura 46**

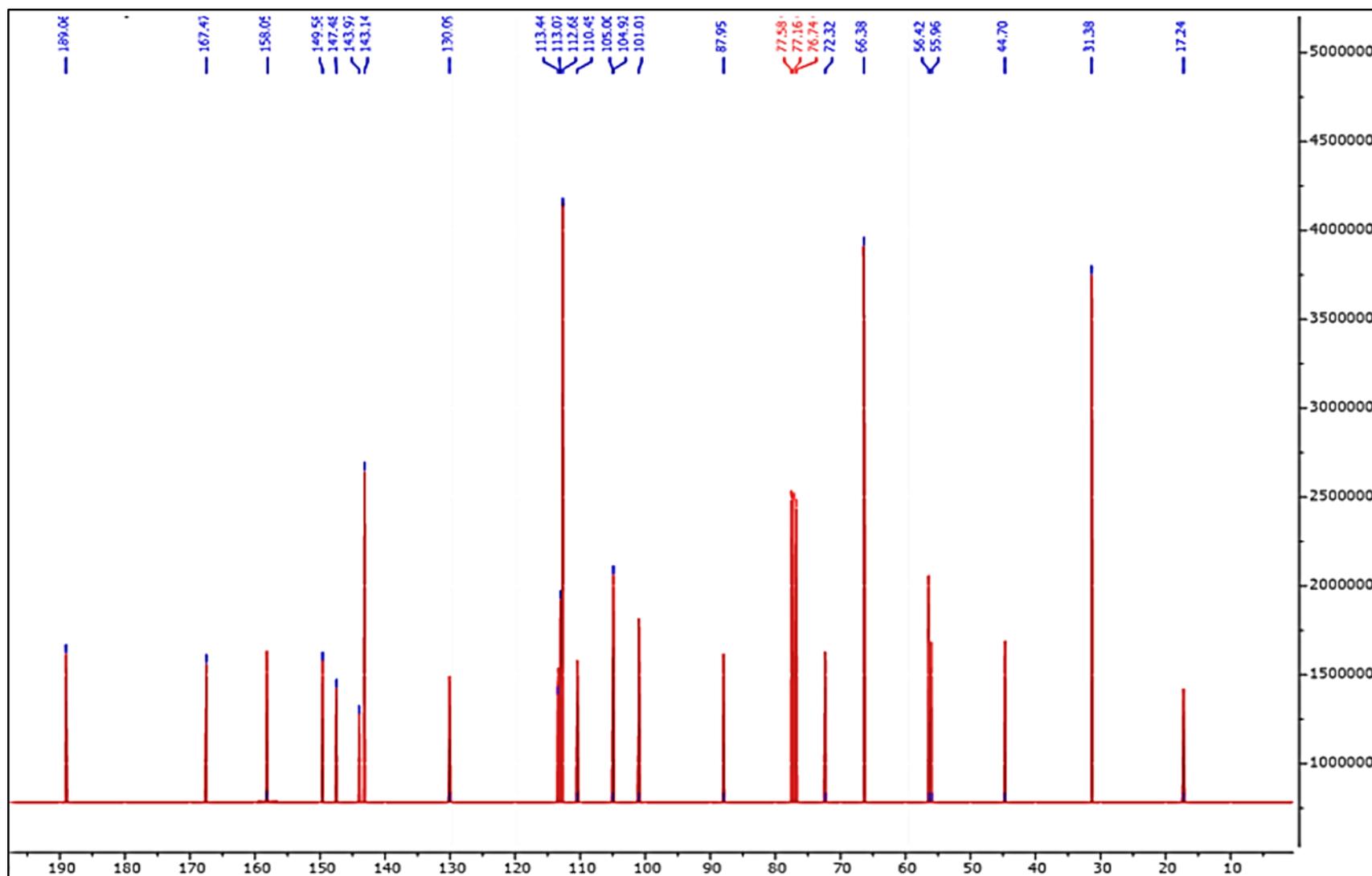


Figura 46. Espectro RMN ¹³C de la rotenona aislada de las hojas de Yawar Panga a 75 MHz en CDCl₃.

Tabla 11.

Datos de RMN ^{13}C a 75 MHz de rotenona en CDCl_3 , comparación de desplazamientos (δ_{C} en ppm) con los reportados en bibliografía.

Número de C	Tipo de C	δ_{C} obtenido	δ_{C} (de Souza, 2007)	δ_{C} (Fang & Casida, 1998)
1	CH_3	17,24	17,09	17,0
2	CH_2	31,38	31,24	31,2
3	CH	44,70	44,57	44,5
4	OCH_3	55,96	55,82	55,7
5	OCH_3	56,42	56,28	56,2
6	CH_2	66,38	66,24	66,1
7	CH	72,32	72,19	72,2
8	CH	87,95	87,80	87,7
9	CH	101,01	100,88	100,9
10	C	104,92	104,79	104,8
11	CH	105,00	104,86	104,7
12	CH	110,45	110,34	110,5
13	CH_2	112,68	112,53	112,3
14	C	113,07	112,93	112,8
15	C	113,44	113,30	113,2
16	CH	130,09	129,95	129,8
17	C	143,14	143,00	142,9
18	C	143,97	143,85	143,8
19	C	147,48	147,34	147,3
20	C	149,58	149,46	149,4
21	C	158,05	157,90	157,8
22	C	167,47	167,33	167,2
23	C	189,06	188,91	188,7

Como se observa en la **Tabla 11**, todas la señales pertenecen a la rotenona pese a que la muestra presenta impurezas, lo que nos indica que estas impurezas son despreciables en el análisis de RMN ^{13}C .

Con los datos obtenidos se procedió a identificar cada carbono en la molécula de rotenona, **Figura 47**.

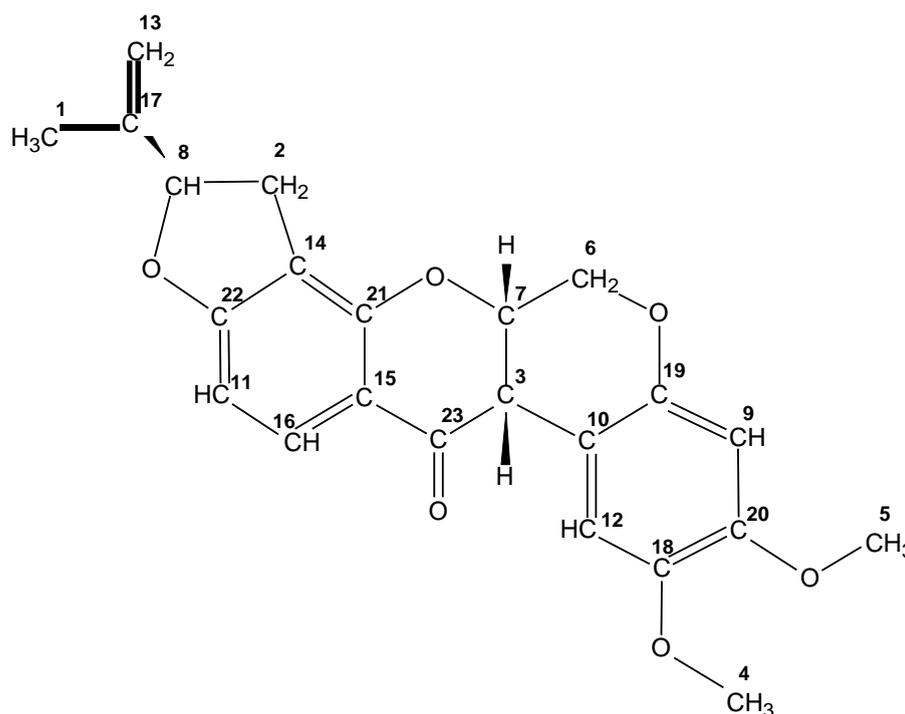


Figura 47. Distribución de los átomos de carbono en la molécula de rotenona.

VI. Identificación de esteroides en el EBO/éter

A. Extracción sólido-líquido

La obtención del EBO/éter se describe en la sección V.A.1.

B. Separación de esteroides

1. Primera separación por columna cromatográfica de sílica gel (CC)

- i. Muestra: 4,54 g de EBO/éter, su obtención se describe en la sección V.A.1

- ii. Fecha: 08 de febrero de 2019
- iii. Eluyentes: Éter de petróleo 250 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (9,9:0,1) 150 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (9:1) 600 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (8:2) 200 mL, acetato de etilo y cloroformo (1:1) 400 mL y metanol 250 mL.
- iv. Características de la columna: 40 cm de altura y 4 cm de diámetro.
- v. Fase estacionaria: sílica gel de porosidad 60 Å y un tamaño de partícula de 40-63 µm de la marca Sigma Aldrich.
- vi. Masa de sílica gel: 45.17 g.
- vii. Altura de sílica gel en la columna: 21 cm.
- viii. Altura de la muestra en columna: 0.3 cm.
- ix. Procedimiento: En la columna se colocó la sílica gel en éter de petróleo y encima de esta la muestra disuelta en éter de petróleo. La elución inició con éter de petróleo hasta que se observara que no haya desplazamiento en la columna, en ese momento se dejaba que el eluyente este al ras de la sílica y se añadía el siguiente eluyente, **Figura 48**. Se recolectó en Erlenmeyer de 150 mL.



Figura 48. CC de EBO/éter.
(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

- x. Resultado: Se obtuvo 25 fracciones de aproximadamente 125 mL cada una. Éstas fueron analizadas en CCF y se juntaron aquellas que tenían un comportamiento similar, de esta forma se tiene 6 nuevos grupos (E1c, E2c, E3c, E4c, E5c y E6c), siendo E4c (1.2624 g), que presenta cristales con abundante impureza motivo por el cual se procedió a realizar una segunda separación por CC.

2. *Segunda separación por columna cromatográfica de sílica gel (CC)*

- i. Muestra: 1.2624 g de E4c.
- ii. Fecha: 12 de marzo de 2019
- iii. Eluyentes: Éter de petróleo 200 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (9,5:0,5) 300 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (9:1) 450 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (8:2) 300 mL, acetato de etilo y cloroformo (1:1) 200 mL y metanol 100 mL.
- iv. Características de la columna: 72 cm de altura y 2 cm de diámetro.
- v. Fase estacionaria: sílica gel de porosidad 60 Å y un tamaño de partícula de 40-63 µm de la marca Sigma Aldrich.
- vi. Masa de sílica gel: 45,17 g.
- vii. Altura de sílica gel en la columna: 42 cm.
- viii. Altura de la muestra en columna: 0,2 cm.
- ix. Procedimiento: En la columna se colocó la sílica gel en éter de petróleo y encima de esta la muestra disuelta en éter de petróleo. La elución inició con éter de petróleo hasta que se observara que no haya desplazamiento en la columna, en ese momento se dejaba que el eluyente este al ras de la sílica y se añadía el siguiente eluyente, **Figura 49**. Se recolectó en tubos de ensayo de 13x150 mm.



Figura 49. CC de E4c.

(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

- x. Resultado: Se obtuvo 79 fracciones de aproximadamente 10 mL cada una. Éstas fueron analizadas en CCF y se juntaron aquellas que tenían un comportamiento similar, de esta forma se tiene 9 nuevos grupos (E1cc, E2cc, E3cc, E4cc, E5cc, E6cc, E7cc, E8cc y E9cc), siendo E4cc (168 mg), que presenta cristales con mínima impureza de color amarillo, **Figura 50**, motivo por el cual se procedió a realizar un análisis por CG-EM.

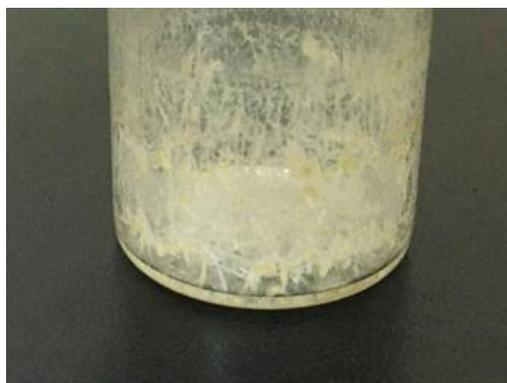


Figura 50. Cristales con impureza amarilla en E4cc.

(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

C. Identificación de esteroides por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)

- i. Muestra: 1 mg de E4cc/mL CH₂Cl₂.
- ii. Fecha: 04 de abril del 2019.
- iii. Operador: J. Utano (Labicer) con la presencia de L. Rojas.
- iv. Equipo: SHIMADZU, GC-2010 Plus, con automuestreador: AOC-6000, y detector de EM SHIMADZU, GCMS-QP210 Ultra.
- v. Características del equipo:
 - Columna: RESTEK. RTX-5MS, 30m x 0.25 mm ID x 0.25 µm df.
 - Fase móvil: He 99,99% de pureza, rapidez de flujo: 1 mL/min, split: 10:1.
 - Temperatura de la muestra: 250°C.
 - Temperatura de la columna: la temperatura de la columna varió de 240 °C hasta 265 °C a una velocidad de 10 °C/min., permaneciendo en 265 °C durante 40 min.
 - Modo de ionización: IE+.
 - Energía de electrón: 70eV.
 - Temperatura de interface: 220°C.
 - Temperatura de la fuente de Ion: 200°C.
 - Voltaje de detección: 350V.
 - Carga de muestra: 1.0µL.
- i. Resultado: El TIC se muestra en la **Figura 51**.

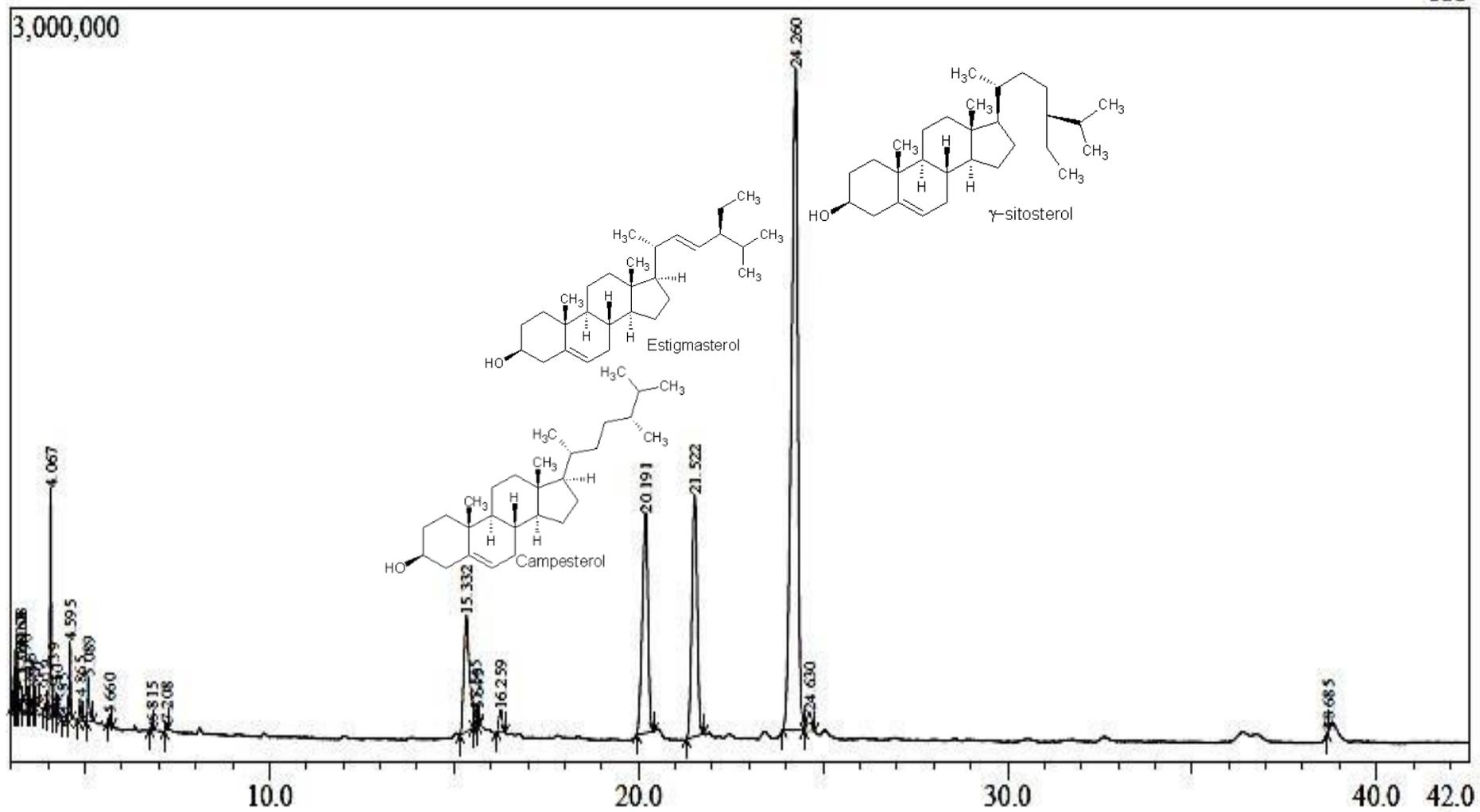


Figura 51. TIC de E4cc.

Tabla 12.*Composición de esteroides de E4cc.*

Esterol	Tiempo de retención (min)	Porcentaje en E4cc (%)
Campesterol	20,191	14,63
Estigmasterol	21,522	14,83
γ -sitosterol	24,260	48,96

La identificación se realizó por medio de la comparación de los espectros de masas obtenidos, **Figuras 52, 53 y 54**, en el análisis con aquellos que se encontraban en la biblioteca del equipo utilizado. Además, se realizó la fragmentación con los espectros de masas obtenidos.

1. Campesterol

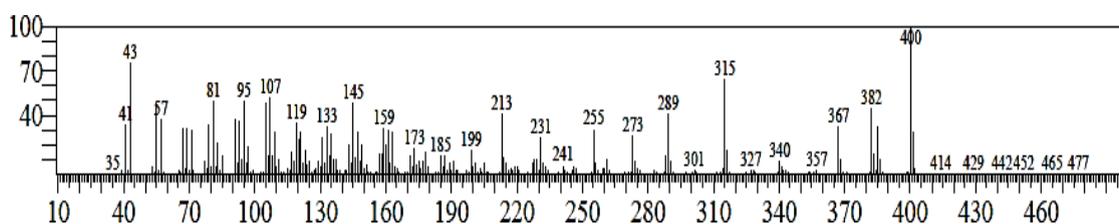
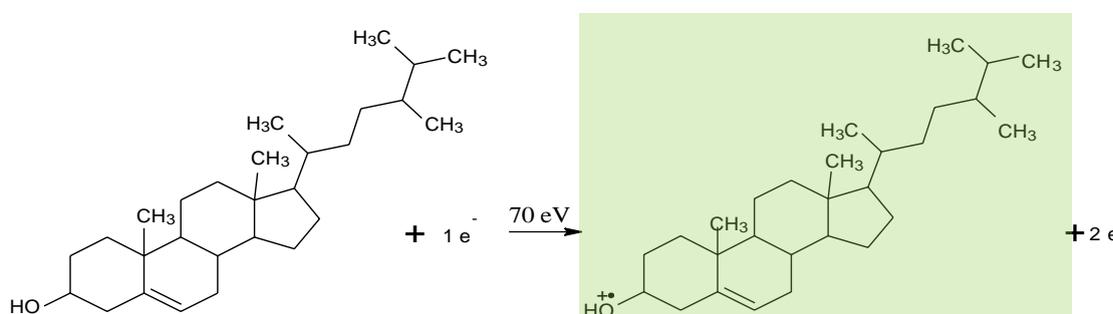
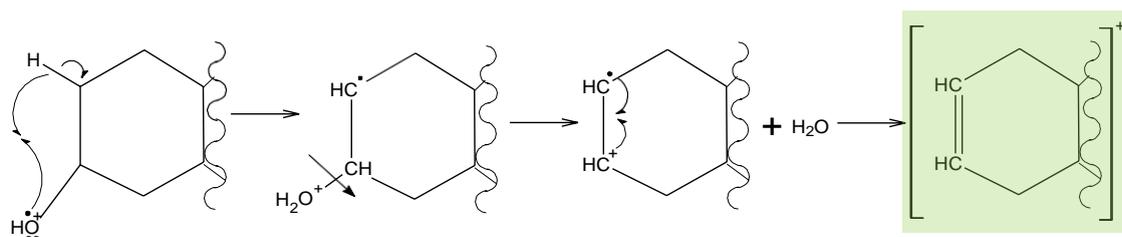


Figura 52. EM obtenida del campesterol presente en la muestra E4cc.

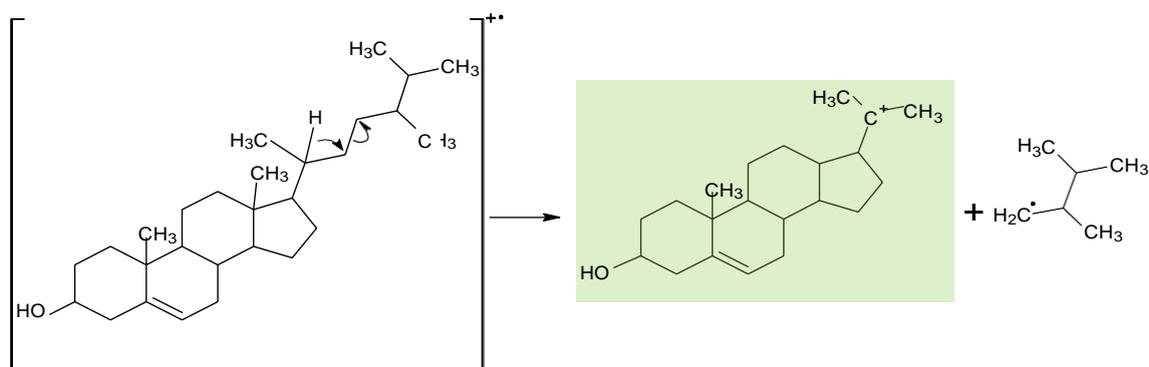
i. Ion molecular $M^{+\circ} = 400$.



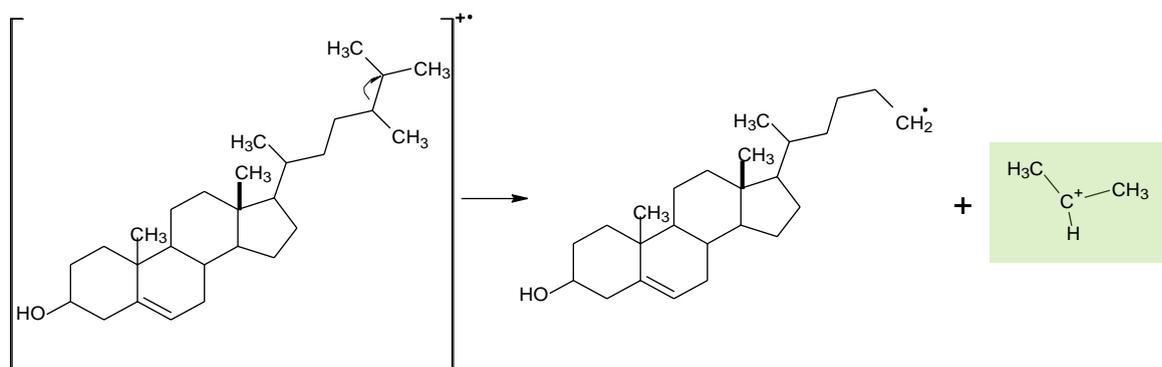
ii. $m/z = 382$; $M^{+\circ} - 18$.



iii. $m/z = 315; M^{+\circ} - 85.$



iv. $m/z = 43.$



2. *Estigmasterol*:

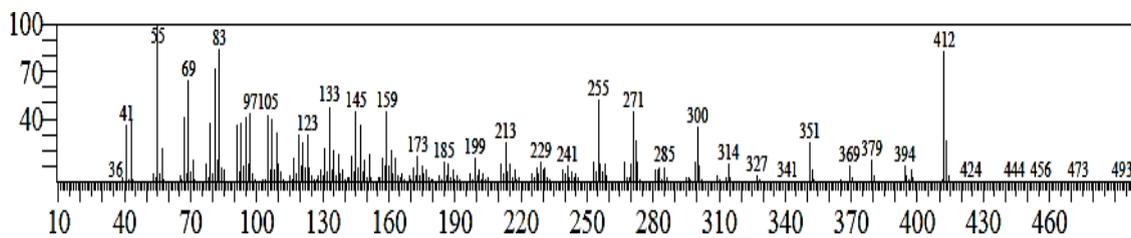
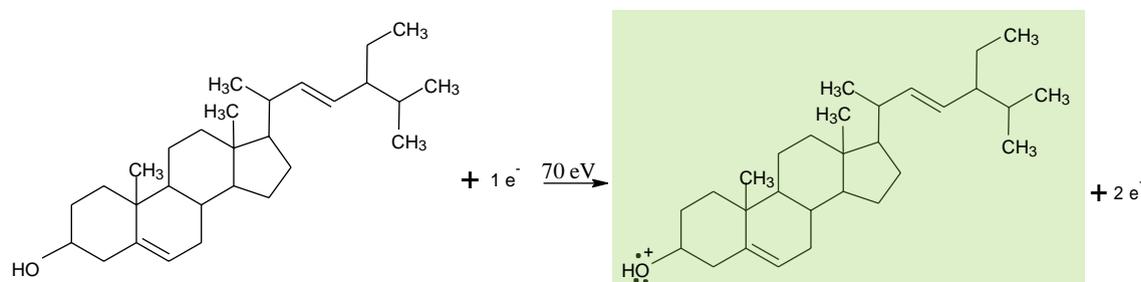
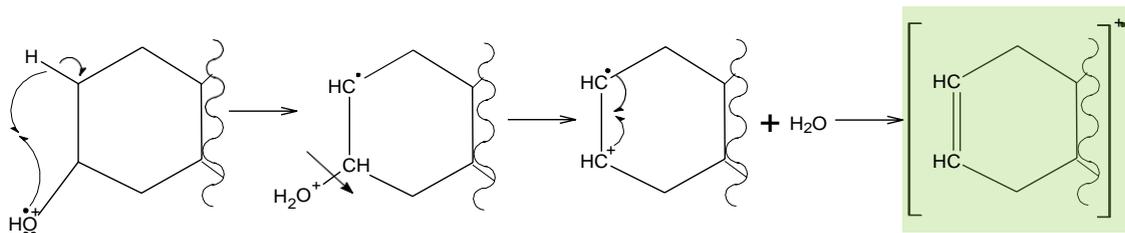


Figura 53. EM obtenida del estigmasterol presente en la muestra E4cc.

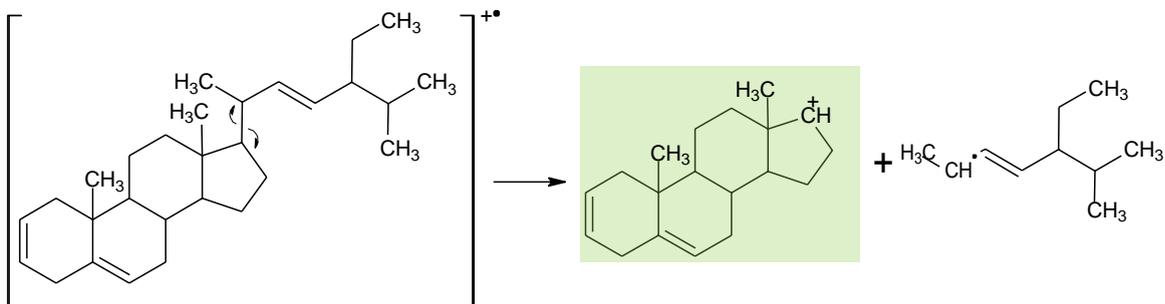
a) Ion molecular $M^{+\circ} = 412.$



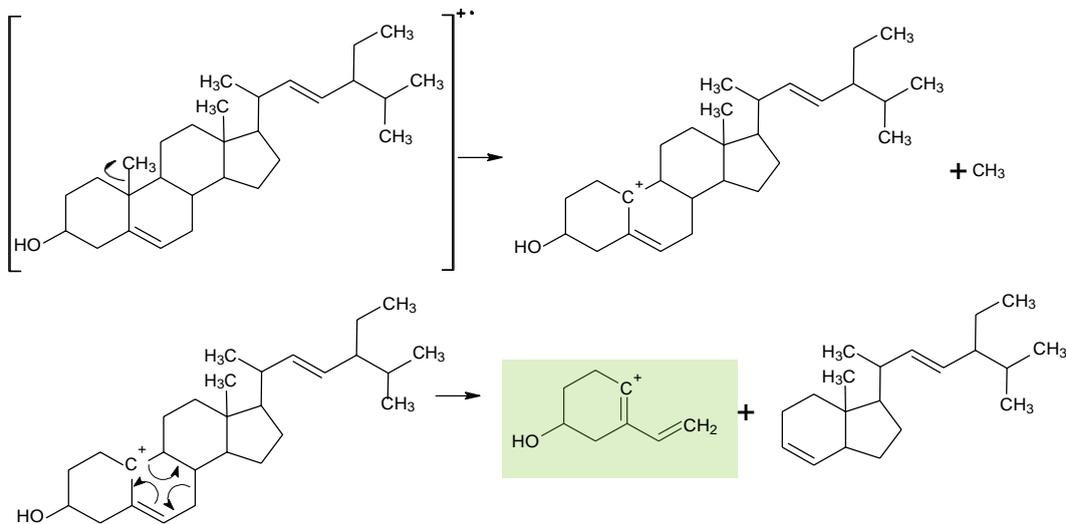
b) $m/z = 394; M^{+o} - 18$.



c) $m/z = 255; m/z = 394 - 139$.



d) $m/z = 123$.



3. γ -sitosterol

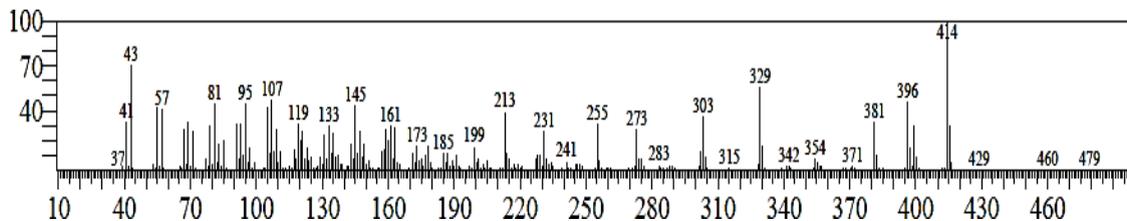
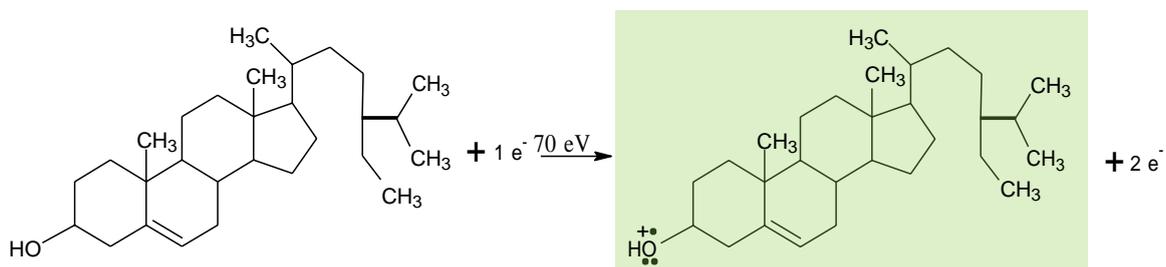
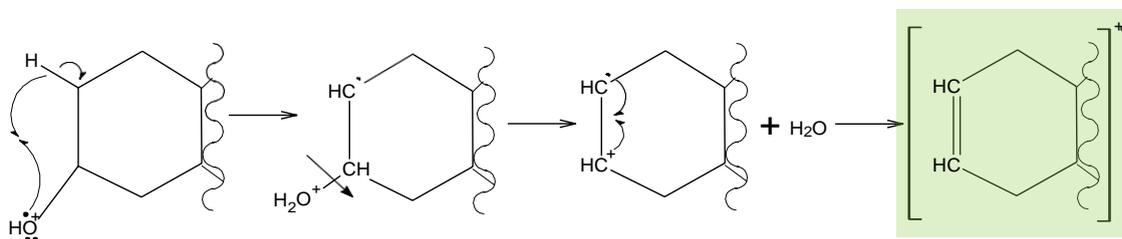


Figura 54. EM obtenida del γ -sitosterol presente en la muestra E4cc.

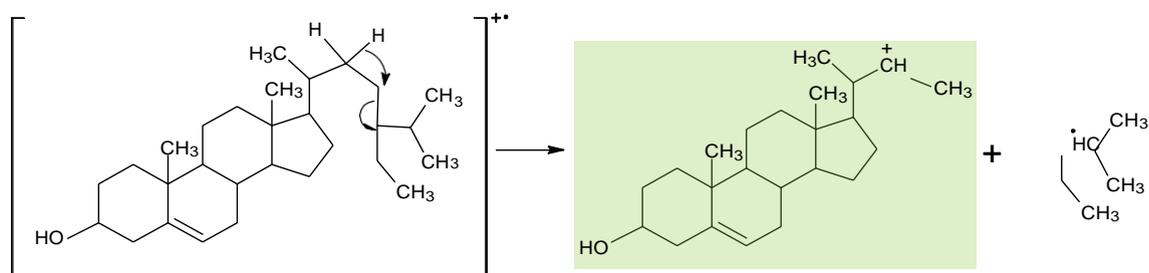
a) Ion molecular $M^{+\circ} = 414$.



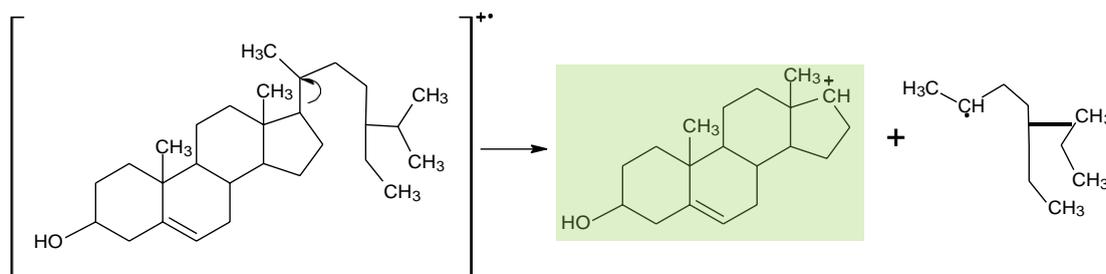
b) $m/z = 396, M^{+\circ} - 18$.



c) $m/z = 329, M^{+\circ} - 85$.



d) $m/z = 273, M^{+\circ} - 141$.



VII. Identificación de esteroides en el EBO/diclorometano

A. Extracción sólido-líquido

La obtención del EBO/éter se describe en la sección V.A.2.

B. Separación de esteroides

1. Columna cromatográfica de sephadex (CF)

- ii. Muestra: 10,8246 g de EBO/diclorometano, su obtención se describe en la sección V.A.1. La muestra sólida se diluyó en diclorometano y se combinó con 35,70 g de sílica gel. Luego, en campana, se evaporó el solvente.
- iii. Fecha: 18 de febrero de 2019.
- iv. Eluyentes: Éter de petróleo 500 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (9:1) 900 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (8:2) 900 mL, acetato de etilo y cloroformo (1:1) 800 mL y metanol 400 mL.
- v. Características de la columna: 35 cm de altura y 4 cm de diámetro.
- vi. Fase estacionaria: sílica gel de porosidad 60 Å y un tamaño de partícula de 40-63 µm de la marca Sigma Aldrich.
- vii. Masa de sílica gel: 156,03 g.
- viii. Altura de sílica gel en la columna: 20 cm.
- ix. Altura de la muestra en columna: 5,00 cm.
- x. Procedimiento: En la columna se colocó la sílica gel en éter de petróleo y encima de esta la muestra mezclada con sílica gel. La elución inició con éter de petróleo, con ayuda de vacío, hasta que se observara que no haya desplazamiento en la columna, en ese momento se dejaba que el eluyente este al ras de la sílica y se añadía el siguiente eluyente, **Figura 55**. Se recolectó en balos de 500 mL.



Figura 55. CF de EBO/diclorometano.
(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

- x. Resultado: Se obtuvo 17 fracciones de aproximadamente 250 mL cada una. Éstas fueron analizadas en CCF y se juntaron aquellas que tenían un comportamiento similar, de esta forma se tiene 7 nuevos grupos (D1f, D2f, D3f, D4f, D5f, D6f y D7f), siendo D3f (794,2 mg), que presenta cristales con impureza de color verde, motivo por el cual se procedió a realizar una separación por CC.

2. *Columna cromatográfica de sílica gel (CC)*

- i. Muestra: 794,2 mg de D3f. La muestra sólida se diluyó en diclorometano y se combinó con 4,84 g de sílica gel. Luego, en campana, se evaporó el solvente.
- ii. Fecha: 28 de mayo de 2019.
- iii. Eluyentes: Éter de petróleo 100 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (9,5:0,5) 100 mL, éter de petróleo y acetato de etilo (9:1) 500 mL, acetato de etilo y cloroformo (1:1) 100 mL y metanol 50 mL.
- iv. Características de la columna: 72 cm de altura y 2 cm de diámetro.
- v. Fase estacionaria: sílica gel de porosidad 60 Å y un tamaño de partícula de 40-63 µm de la marca Sigma Aldrich.
- vi. Masa de sílica gel: 40,86 g.

- vii. Altura de sílica gel en la columna: 38,00 cm.
- viii. Altura de la muestra en columna: 4,50 cm.
- ix. Procedimiento: En la columna se colocó la sílica gel en éter de petróleo y encima de esta la muestra mezclada con sílica gel. La elución inició con éter de petróleo hasta que se observara que no haya desplazamiento en la columna, en ese momento se dejaba que el eluyente este al ras de la sílica y se añadía el siguiente eluyente, **Figura 56**. Se recolectó en tubos de ensayo de 13x150 mm.



Figura 56. CC de D3f.
(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

- xi. Resultado: Se obtuvo 70 fracciones de aproximadamente 10 mL cada una. Éstas fueron analizadas en CCF y se juntaron aquellas que tenían un comportamiento similar, de esta forma se tiene 11 nuevos grupos (D1fc, D2fc, D3fc, D4fc, D5fc, D6fc, D7fc, D8fc, D9fc, D10fc y D11fc), siendo D7fc (320 mg), que presenta cristales con impureza de color verde, motivo por el cual se procedió a realizar una separación por PP.

3. *Placa preparativa (PP)*

- i. Muestra: 320 mg de D7fc. La muestra sólida se diluyó en diclorometano para ser sembrada en la placa.

- ii. Fecha: 27 de agosto de 2019.
- iii. Eluyente: Éter de petróleo y acetato de etilo (9:1).
- iv. Características de la placa: PLC Sílica Gel 60 F25 de base de vidrio de 20 x20 cm con 2 mm de espesor de sílica
- v. Procedimiento: La placa fue calentada a 100 °C durante 30 min. Luego se la colocó dentro de un desecador hasta que se encuentre a temperatura ambiente. La muestra fue sembrada, formando una línea con un tubo capilar a 2 cm de la base inferior de la placa, teniendo 1 cm de márgenes derecho e izquierdo, con una secadora doméstica se evaporó el solvente y se colocó la placa dentro de un recipiente rectangular con el eluyente, **Figura 57**.

Se dejó eluir hasta que el eluyente se encontrara a 2 cm de la parte superior de la placa, posteriormente se secó el solvente con una secadora doméstica y se reveló a 254 nm. Se observaron 6 bandas las cuales fueron raspadas para retirar la sílica de la placa, una por una, y se lavaron con diclorometano y metanol para extraer todos los compuestos. El solvente fue concentrado en rotavapor y se guardó los extractos en viales de 10 mL.

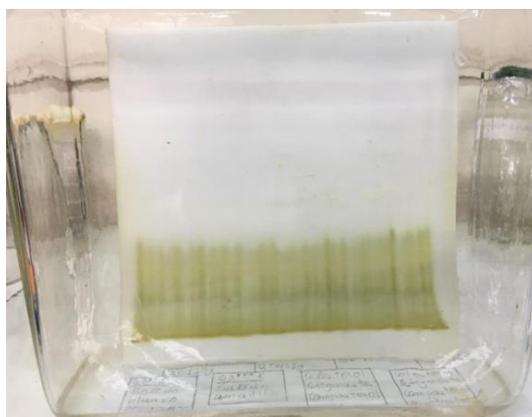


Figura 57. PP de D7fc.
(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

- vi. Resultado: Se obtuvo 6 nuevos grupos (D1fcp, D2fcp, D3fcp, D4fcp, D5fcp y D6fcp), siendo D3fcp (120 mg), **Figura 58**, el que presenta cristales blancos por lo que se analizó por CG-EM.

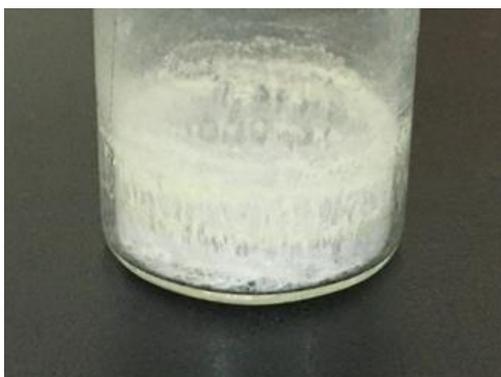


Figura 58. Cristales en D3fcp.
(Foto tomada por L. Rojas en 2019)

C. Identificación de esteroides por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)

- i. Muestra: 1 mg de D3fcp/mL CH₂Cl₂.
- ii. Fecha: 27 de setiembre del 2019.
- iii. Operador: J. Utano (Labicer) con la presencia de L. Rojas.
- iv. Equipo: SHIMADZU, GC-2010 Plus, con automuestreador: AOC-6000, y detector de EM SHIMADZU, GCMS-QP210 Ultra.
- v. Características del equipo:
 - Columna: RESTEK. RTX-5MS, 30m x 0.25 mm ID x 0.25 µm df.
 - Fase móvil: He 99,99% de pureza, rapidez de flujo: 1 mL/min, split: 10:1.
 - Temperatura de la muestra: 250°C.
 - Temperatura de la columna: la temperatura de la columna varió de 240 °C hasta 265 °C a una velocidad de 10 °C/min., permaneciendo en 265 °C durante 40 min.
 - Modo de ionización: IE+.
 - Energía de electrón: 70eV.
 - Temperatura de interface: 220°C.
 - Temperatura de la fuente de Ion: 200°C.

- Voltaje de detección: 350V.
- Carga de muestra: 1.0 μ L.

iv. Resultados: el TIC de D3fcp se muestra en la ***Figura 59***.

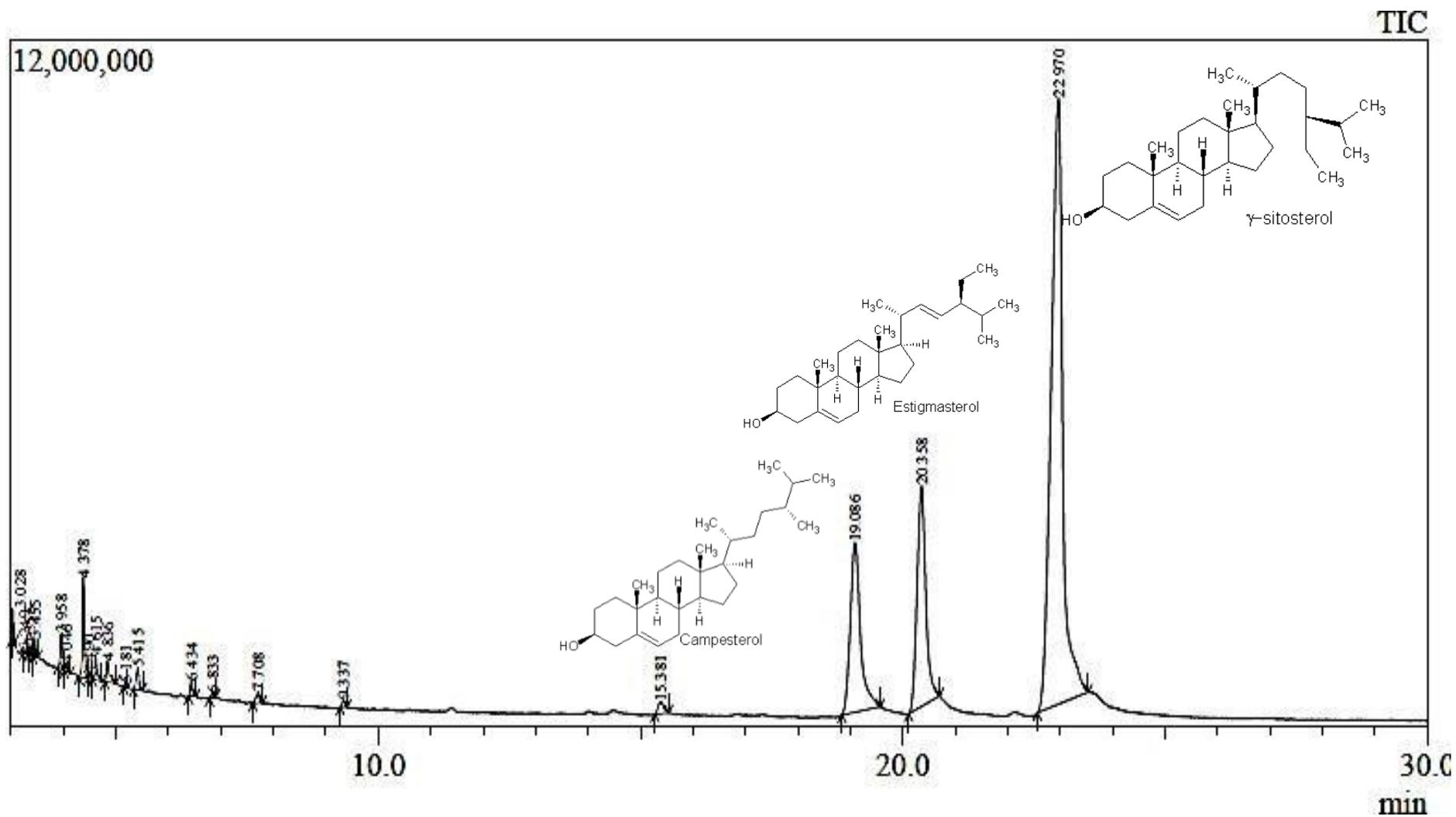


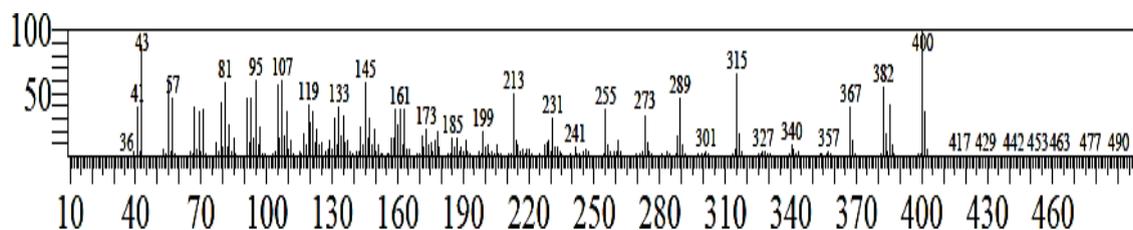
Figura 59. TIC de D3fcp.

Tabla 13.*Composición de esteroides de D7fcp.*

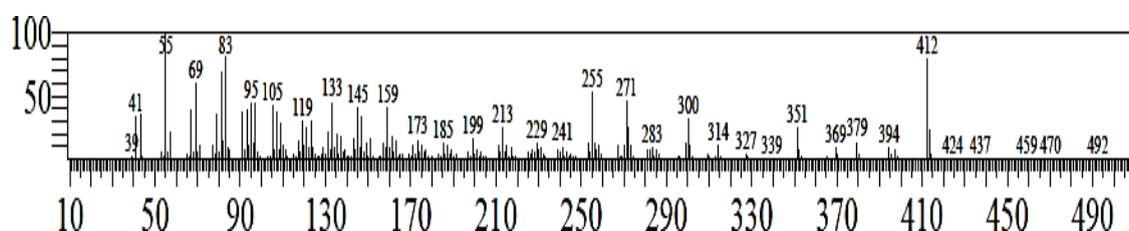
Esterol	Tiempo de retención (min)	Porcentaje en D7fcp (%)
Campesterol	19.086	12,69
Estigmasterol	20.358	16,51
γ -sitosterol	22.970	65,30

La identificación se realizó por medio de la comparación de los espectros de masas obtenidos, **Figuras 60, 62 y 62**, en el análisis con aquellos que se encontraban en la biblioteca del equipo utilizado. Además, se realizó la fragmentación con los espectros de masas obtenidos, del mismo modo que se muestra en la sección VI.C.

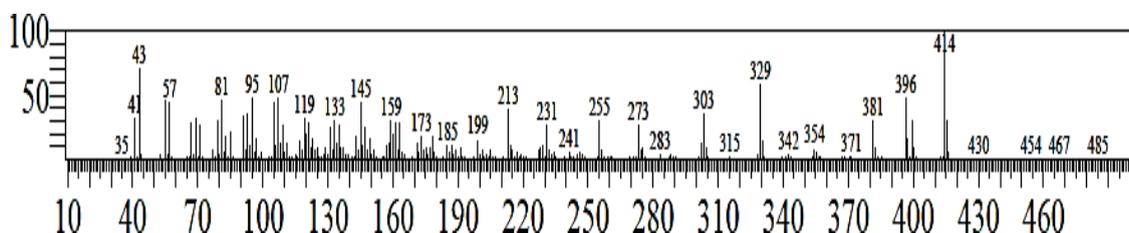
1. *Campesterol*

**Figura 60.** EM obtenida del campesterol presente en la muestra D7fcp.

2. *Estigmasterol*

**Figura 61.** EM obtenida del estigmasterol presente en la muestra D7fcp.

3. *γ -sitosterol*

**Figura 62.** EM obtenida del γ -sitosterol presente en la muestra D7fcp.

CONCLUSIONES

El análisis fitoquímico preliminar, marcha fitoquímica, de las hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule.* o *Aristolochia didyma*) se identificó que poseen: aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos, triperenos, esteroides, catequinas, flavonoides del tipo isoflavonas, quinonas, antronas y antranoles.

De los extractos brutos orgánicos de éter de petróleo (EBO/éter) y de diclorometano (EBO/diclorometano) de las hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule.* o *Aristolochia didyma*) se identificó, que en ambos se encontraban los esteroides campesterol, estigmasterol y γ -sitosterol, los cuales fueron separados por cromatografía de gases e identificados por sus respectivos espectros de masas.

A partir del extracto bruto orgánico de etanol (EBO/etanol) de las hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. Cauliflora Ule.* o *Aristolochia didyma*) se aisló 152,9 mg de rotenona, flavonoide del tipo isoflavona, el cual fue identificado por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, espectrometría de masas y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

RECOMENDACIONES

Con la finalidad de continuar con el presente trabajo, para conocer los compuestos que contienen las hojas de Yawar Panga, se recomiendan las siguientes acciones:

- i. Realizar la identificación de compuestos presentes en las muestras obtenidas a lo largo de la Tesis, que no se trabajaron debido a falta de instrumentación.
- ii. Obtener el extracto acuoso de las hojas de Yawar Panga, con la finalidad de identificar los compuestos de mayor polaridad presentes.
- iii. Analizar la decocción preparada en el Centro Takiwasi para el consumo de sus pacientes, para identificar si en el procedimiento que realizan extraen rotenona. Además, en caso sea necesario, cuantificar la concentración de rotenona que consumen los pacientes.
- iv. Realizar análisis biológicos que permitan identificar cual o cuales de los compuestos presentes en las hojas de Yawar Panga son responsables de su actividad vomitiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, P., & Laddha, K. (2017). Development of validated high-performance thin layer chromatography for quantification of aristolochic acid in different species of the Aristolochiaceae family. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 425–429.
- Ahumada, L. Z. (1970). Morfología y sistemática de *Aristolochia angustifolia* y *A. viperina* (Aristolochiaceae). *Soc Argent Bot Bol*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302343437>
- Atuesta, G.C.P., J. C. A. P. (2017). Aislamiento del estigmasterol de las semillas de *Crotalaria juncea* L. (cascabelito) y su bioactividad sobre *Drosophila melanogaster* | Penaloza Atuesta | *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(3).
- Awad, A. B., Downie, A. C., & Fink, C. S. (2000). Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by beta-sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. *International Journal of Molecular Medicine*, 5(5), 541–545.
- Bliss, B. J., Wanke, S., Barakat, A., Ayyampalayam, S., Wickett, N., Wall, P. K., Jiao, Y., Landherr, L., Ralph, P. E., Hu, Y., Neinhuis, C., Leebens-Mack, J., Arumuganathan, K., Clifton, S. W., Maximova, S. N., Ma, H., & dePamphilis, C. W. (2013). Characterization of the basal angiosperm *Aristolochia fimbriata*: A potential experimental system for genetic studies. *BMC Plant Biology*, 13(1).
- Brack A., *Diccionario enciclopédico de plantas útiles de Perú*. Cusco: centro de Estudios regionales Andinos “Bartolomé de las Casas”; 1999.
- Bruneton, J. (1991), *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Editorial SCRIBIA S.A.; Royo 23, Zaragoza, España.
- Choi, J. M., Lee, E. O., Lee, H. J., Kim, K. H., Ahn, K. S., Shim, B. S., Kim, N. Il, Song, M. C., Baek, N. I., & Kim, S. H. (2007). Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities. *Phytotherapy Research*, 21(10), 954–959.
- de la Fuente, G. de A., Sevillano, B. H., del Valle, K. M. P., & Gili, B. Q. (2019). Tubulointerstitial kidney diseases. Chronic patterns. *Medicine (Spain)*, 12(83), 4872–4877.
- de Souza, M. (2007). Modificaciones estructurales y validación de ditotoxicidad de rotenoides aislados y modificados de la especie *Derris urucu*. Centro de ciencia y tecnología de la Universidad Estatal del Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

- Emre, I., Kursat, M., Yilmaz, Ö., & Erecevit, P. (2011). Compuestos biológicos, capacidad atrapadora de radicales libres y actividad antimicrobiana de las semillas de " *Nepeta italica* L" y " *Sideritis Montana* L" susp. montana de Turquía. *Grasas y aceites*, 62(1), 68-75.
- Fang, N & Casida, J E. (1998). Acción anticancerígena del insecticida cubé: correlación para los componentes rotenoides entre la inhibición de NADH: ubiquinona oxidoreductasa y las actividades inducidas por ornitina descarboxilasa. *Prod. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 95; 3380-3384
- Gabay, O., Sanchez, C., Salvat, C., Chevy, F., Breton, M., Nourissat, G., Wolf, C., Jacques, C., & Berenbaum, F. (2010). Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(1), 106–116.
- Gaitén, Y. I. G., Martínez, M. M., Alarcón, A. B., Hernández, S. V., & Porto, R. M. de O. (2011). Caracterización química por cromatografía de gases/espectrometría de masas de dos extractos obtenidos de *phyllanthus orbicularis* HBK. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(3), 405–413.
- Grovas Llamocca, J. E., Córdor Cuyubamba, E. A., Reyna Pinedo, V. M., & Collantes Díaz, I. E. (2018). ESTEROLES PRESENTES EN EL EXTRACTO APOLAR DE LAS RAÍCES DE AJO SACHA *Mansoa alliacea*. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 84(4), 513–521.
- Heinrich M, Chan J, Wanke S, Neinhuis C, Simmonds MS. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2--a global assessment based on bibliographic sources. *J Ethnopharmacol*. 2009 Aug 17;125(1):108-44.
- Ikeda, I., Konno, R., Shimizu, T., Ide, T., Takahashi, N., Kawada, T., Nagao, K., Inoue, N., Yanagita, T., Hamada, T., Morinaga, Y., Tomoyori, H., Imaizumi, K., & Suzuki, K. (2006). Campesterol-5-en-3-one, an oxidized derivative of campesterol, activates PPAR α , promotes energy consumption and reduces visceral fat deposition in rats. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(5), 800–807.
- Jauregui, X., Clavo, Z. M., Jovel, E. M., & Pardo-De-Santayana, M. (2011). “Plantas con madre”: Plants that teach and guide in the shamanic initiation process in the East-Central Peruvian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(3), 739–752.
- Ledeá Rodríguez, J. L., Benítez Giménez, D. G., Arias Pérez, R. C., & Guerra Manso, A. (2017). Comportamiento agronómico de cultivares de *Cenchrus purpureus* tolerantes a la salinidad. *Revista de Producción Animal*, 29(3), 18–28.

- Ling, W. H., & Jones, P. J. H. (1995). Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. In *Life Sciences* (Vol. 57, Issue 3, pp. 195–206). Life Sci.
- Olga Lock, 2016, *Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales*, Departamento de Ciencias-Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Luo, H., Cai, Y., Peng, Z., Liu, T., & Yang, S. (2014). Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1.
- Luo, H., Cai, Y., Peng, Z., Liu, T., & Yang, S. (2014). Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1.
- McCann, S. E., Ambrosone, C. B., Moysich, K. B., Brasure, J., Marshall, J. R., Freudenheim, J. L., Wilkinson, G. S., & Graham, S. (2005). Intakes of selected nutrients, foods, and phytochemicals and prostate cancer risk in Western New York. *Nutrition and Cancer*, 53(1), 33–41.
- McMurry, J., (2012), *Química orgánica*. Editorial Cengage Learning, Col. Granjas México, Ciudad de México-México. pags: 456-484.
- Montes, Marca, Tatiana Wilkomirsky, 1992, *Plantas medicinales*, Ediciones Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Pag. 207-210.
- Mulder, CH "Aristolochiaceae". *Revisión de Paleobotánica y Palinología* 123. Pag. 47-55, 2003.
- Odonne, G., Valadeau, C., Alban-Castillo, J., Stien, D., Sauvain, M., & Bourdy, G. (2013). Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Paranaपुरa basin (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 127–153.
- Othman, Z. S., Koketsu, M., Abd Karim, N. H., Zubairi, S. I., & Hassan, N. H. (2018). Interaction study of binary solvent systems ionic liquid and deep eutectic solvent with rotenone. *Sains Malaysiana*, 47(7), 1473–1482.
- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., & Ashraf-Khorassani, M. (2005). Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9436–9445.
- Plat, J., & Mensink, R. P. (2001). Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. In *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* (Vol. 11, Issue 1, pp. 31–40).

- Politi, M., Friso, F., & Mabit, J. (2018). Plant based assisted therapy for the treatment of substance use disorders - part 1. The case of Takiwasi Center and other similar experiences. *Revista Cultura y Droga*, 23(26), 99–126.
- Priestap, H. A., Bandoni, A. L., Neugebauer, M., & Rücker, G. (1990). Investigation of the essential oils from *Aristolochia triangularis*. *Journal of Essential Oil Research*, 2(3), 95–98.
- Reyna, V. *Compendio de Química Orgánica Experimental 1*, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, agosto de 2012.
- Ravelo, A. G., & Braun, A. E. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI. *Rev. Real Acad. Cienc. Exactas Físicas Nat*, 103, 409-420.
- Roark, R. C. (1929). Recent Progress in the Chemistry of Derris. *Journal of Economic Entomology*, 22(2), 378–381.
- Rondina R, Coussio J. Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales. *Rev Investig. Agropecu.* 1969; 6 (33): 351-366.
- Schabath, M. B., Hernandez, L. M., Wu, X., Pillow, P. C., & Spitz, M. R. (2005). Dietary phytoestrogens and lung cancer risk. *Journal of the American Medical Association*, 294(12), 1493–1504.
- Urzúa, A., Salgado, G., Cassels, B. K., & Eckhardt, G. (1983). Aristolochic acids in *Aristolochia chilensis* and the *Aristolochia*-FEEDER *Battus Archidamas* (Lepidoptera). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 48(5), 1513–1519.
- Wanke, S., Granados Mendoza, C., Müller, S., Paizanni Guillén, A., Neinhuis, C., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., & Samain, M. S. (2017). Recalcitrant deep and shallow nodes in *Aristolochia* (Aristolochiaceae) illuminated using anchored hybrid enrichment. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 117, 111–123.
- Wu, T. S., Tsai, Y. L., Damu, A. G., Kuo, P. C., & Wu, P. L. (2002). Constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. *Journal of Natural Products*, 65(11), 1522–1525.

ANEXOS

ANEXO 1

Certificado por ponencia en el XXVIII SILAE



16 al 20 de septiembre de 2019, Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba

XXVIII Congreso Internacional de la Sociedad Italo-Latinoamericana de ETNOMEDICINA

El Comité Organizador otorga el presente certificado

A: **ROJAS, L., CÓNDROR, E., REYNA, V.**

Título: Estudio fitoquímico preliminar de las hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. cauliflora* Ule.)

Por su participación en la modalidad de:

<input type="checkbox"/> Delegado	<input type="checkbox"/> Comité Organizador
<input type="checkbox"/> Conferencista	<input type="checkbox"/> Comité Científico
<input type="checkbox"/> Tema Libre	<input type="checkbox"/> Presidente de sala
<input type="checkbox"/> Póster	<input type="checkbox"/> Invitado
<input type="checkbox"/> Expositor	

Presidente Comité Organizador
Msc. Dr. Rodolfo Arencibia Figueroa

Secretario General SILAE
Dr. Cs. Luca Mastrelli

Presidente Comité Científico
Dr. Cs. Daisy Novarra Cordero

Dictamen No: 022/19 Créditos académicos: 5/10 otorgados. Firma autorizada: 

ANEXO 2

Reactivos para pruebas específicas

- Reactivo Nihidrina:
Solución de nihidrina al 0,2% en etanol.
- Cloruro Férrico:
Solución de cloruro férrico al 1 % en agua.
- Solución de Gelatina:
Se disuelve 10 mg de cloruro de sodio en una Solución de Gelatina al 1%.
- Reactivo de Dragendorff:
Sol. A: 8 g de nitrato de bismuto (III) en 20 mL de ácido nítrico
Sol. B: 27,2 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua.
Las soluciones A y B se mezclan y se deja decantar por 24 horas. Luego de afora con agua hasta 100mL.
- Reactivo de Mayer:
Sol. A: Se disuelve 1,36 g de cloruro de mercurio (II) en 60 mL de agua.
Sol. B: 5 g de yoduro de potasio en 10 mL.
Se juntan ambas soluciones y se afora a 100mL.
- Reactivo de Wagner:
Se disuelve 1,27 g de yodo resublimado y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. La solución se afora a 100 mL.

ANEXO 3

Acta de recolección de Yawar Panga

Universidad Nacional de Ingeniería
Facultad de Ciencias
Laboratorio de Investigación de Química de Productos Naturales

ACTA DE RECOLECCIÓN & RECEPCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL (Feb'14) ^{N1,N2}

Referencia: Viaje de recolección de material vegetal en el Jardín Botánico del Centro Takiwasi (Tarapoto, Dpto. San Martín).

Proyecto de Investigación: "Estudio Químico del Yagé (Diplopteris cabrerana)"
(Jefe del Proyecto: Dr. Víctor M. Reyna Pinedo).

Lugar de recolección: Jardín Botánico del Centro Takiwasi

Recolector: Dr. Víctor Reyna P., Profesor Principal FC-UNI).

Fecha de recolección: del lunes 10 al jueves 13 de febrero de 2014.

Recepción de plantas en Lima: Vie. 14. Feb. 2014 (09h30), por José Flores G. ^{N3}

PLANTAS MEDICINALES RECOLECTADAS:

- | | |
|--|---|
| 1. MUESTRA N° 1 (Nombre Común): | YAGÉ |
| a) Nombre científico (a verificar) ^{N4} : | Diplopteris cabrerana |
| b) Fecha de recolección: | Lunes 10. Feb (15h40-18h30) ^{N2} , con lluvia. |
| c) Características de la muestra: | Hojas |
| d) Peso de la muestra recolectada: | 2.5 Kg ^{N4} (hojas húmedas) |
| Peso de la muestra casi seca ^{N6} : | 1.5 Kg (Jue. 13. Feb, 16h30). |
| e) Muestras botánicas (2): | Hojas y tallos. |
| f) Peso de la muestra seca: | 946.2 g (Lima, 24. Feb) |
| 2. MUESTRA N° 2 (Nombre Común): | AJO SACHA |
| a) Nombre científico (a verificar): | Mansoa allicea ^(*) |
| b) Fecha de adquisición: | Jueves 13. Feb (16h15) ^{N7} |
| c) Características de la muestra: | Raíces cortadas y secas. |
| d) Peso de la muestra: | 0.5 Kg |
| e) Muestras botánicas (2): | Muestras en plántulas (raíz, tallo y hojas) ^{N8} |
| Fecha de entrega (del Vivero): | Jue. 13. Feb (11h15) |
| 3. MUESTRA N° 3 (Nombre Común): | YAWAR PANGA |
| a) Nombre científico (a verificar) ^{N4} : | Aristolochia didyma <i>A. sp. conli floro</i> |
| b) Fecha de recolección: | Martes 11. Feb (10h30-13h) ^{N2} , con lluvia. |
| c) Características de la muestra: | Hojas |
| d) Peso de la muestra recolectada: | 3 Kg (hojas húmedas) |
| Peso de la muestra casi seca: | 2.25 Kg (Jue. 13. Feb, 16h40) |
| e) Muestras botánicas (2): | Hojas y tallos |
| f) Peso de la muestra seca: | 737.3 g (Lima, 03. Mar) |

ANEXO 4

Constancia de identificación botánica de Yawar Panga



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 87 -USM-2014

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Tallo, hojas y frutos), recibida de **Víctor REYNA PINEDO**; ha sido estudiada y clasificada como: ***Aristolochia* cf. *cauliflora* Ule**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: MAGNOLIIDAE

ORDEN: ARISTOLOCHIALES

FAMILIA: ARISTOLOCHIACEAE

GENERO: *Aristolochia*

ESPECIE: *Aristolochia* cf. *cauliflora* Ule.

Nombre vulgar: "Yawar Panga"

Determinado por: Blgo. Severo Baldeon.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 06 de Mayo 2014



[Firma]
DR. JAYDE MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ANEXO 5

Procedimiento marcha fitoquímica de Reyna-2012 basado en Rondina & Coussio-1969

Obtención de fracciones

1. Fracción (a)

- i. Se coloca 5,0 gramos de muestra seca en un balón de 100 mL, luego se adiciona 50 mL de metanol, y se deja macerar durante 20 horas a temperatura ambiente.
- ii. Se somete la muestra, ya macerada, a reflujo durante 4 horas. Al cabo de ese tiempo se filtra en caliente, lavando el residuo con metanol, hasta completar 50mL.
- iii. Se separa 5 mL del extracto que se obtiene, lo que constituye la fracción (a). Descartando el residuo sólido.

2. Fracción (b)

- i. Se lleva a sequedad los 45 mL restantes del extracto metanólico, en un rotavapor.
- ii. El residuo obtenido se extrae con 10 mL de HCl_(ac) al 1%, calentando ligeramente (50⁰C), y se filtra utilizando un papel filtro lento. Se repite una vez más esta operación, pero con 5 mL de HCl_(ac) al 1%. Las soluciones ácidas obtenidas se reciben en un Erlenmeyer de 50 mL y se guardan para ser utilizadas posteriormente (Sec. 3.i).
- iii. El residuo sólido se disuelve con 5mL de cloroformo, con ayuda de calor (50⁰C) y agitación vigorosa, luego se filtra a través de un embudo pequeño utilizando papel de filtro lento. El líquido filtrado se seca con sulfato de sodio anhidro, para obtener la fracción (b). El residuo sólido se descarta.

3. Fracción (c)

- i. La solución ácida obtenida en la sección 2.ii, se basifica con NH_{3(ac)} 7,5N hasta pH 9-10.
- ii. Se extrae con cloroformo (2x25 mL) en una pera de decantación. La fase acuosa se guarda para su posterior utilización (Sec. 4.i).
- iii. La fase clorofórmica se lava con 10 mL de agua destilada. Se reúne el agua de lavado con la fase acuosa obtenida en la etapa anterior (ii).

- iv. La fase clorofórmica obtenida se seca con sulfato de sodio anhidro, filtrando luego la solución. El filtrado constituye la Fracción (c).

4. Fracción (d)

- i. La solución acuosa básica obtenida en la sección 3.ii y 3.iii se semisatura con sulfato de sodio, agregando 0.1 g de sal por mL de solución, y se filtra con papel de filtro rápido. Luego se realizan dos extracciones con 25 mL de una mezcla de cloroformo:etanol (3:2) en un embudo de separación de 125 mL. Se guardan las fases acuosas para su posterior uso (Sec. 5).
- ii. La fase orgánica se lava con una solución semisaturada de sulfato de sodio, 0,1 g en 10 mL de agua destilada. Se junta el lavado acuoso con la obtenida en la etapa anterior.
- iii. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se filtra, obteniéndose la fracción (d).

5. Fracción (e)

- i. Las fases acuosas obtenidas en la sección 4.i y 4.ii constituyen la fracción (e).

6. Fracción (f)

- i. En un tubo de ensayo de 18x160 se coloca 1 g de muestra seca y pulverizada, y se adiciona 10 mL de agua destilada. Se calienta la mezcla durante 15 minutos en "baño maría".
- ii. La solución obtenida se filtra en caliente utilizando un papel de filtro lento, completando el filtrado a 10 mL con agua destilada, y se deja enfriar a temperatura ambiente. Constituyendo esta solución la fracción (f).

Pruebas de identificación de los principios activos

1. Aminogrupos primarios o secundarios (Prueba de Ninhidrina)

Se realiza sobre las fracciones (a) y (f)

- i. Tomando cuidado de no tocar la parte central con los dedos, se prepara tres trozos de papel filtro "lento" de 2x3 cm, colocando cada uno sobre una luna de reloj. Luego con la ayuda de una pipeta pasteur se coloca, en el centro de cada uno, 1 gota de las siguientes muestras: fracción (a), fracción (f) y agua destilada. Los papeles se dejan secar a temperatura ambiente.

- ii. Luego se agrega 1 gota de la solución de ninhidrina al 0,2% en etanol sobre la parte central de cada uno de los tres papeles anteriores.
- iii. Finalmente, los papeles se colocan durante 30 minutos dentro de una estufa a una temperatura de 120°C.

Observación: un color azul o violáceo nos indica prueba positiva.

2. Grupos fenólicos libres y/o taninos (Prueba con el reactivo férrico)

Se realiza sobre la fracción(a)

- i. El resto de la fracción (a) se lleva a sequedad en un rotavapor en un balón de 100mL.
- ii. El residuo se disuelve en 0,5 mL de agua destilada y se filtra a través de un papel de filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo (13x100mm), siendo esta la solución (a).
- iii. Se colocan 2 gotas de la solución (a) en una placa de toque, y a continuación se agrega 1 gota de solución acuosa de cloruro férrico al 1% y se mezcla con una bagueta.

Observaciones: un precipitado de color rojo-vino o verde nos indica prueba positiva.

3. Taninos (Prueba de la Gelatina)

Se realiza sobre “ la solución a”

- i. Se colocan 4 gotas de la “solución a” en una luna de reloj y a continuación se adicionan 2 gotas de solución de gelatina al 0,5%. Esta operación se realiza con 2 gotas de agua destilada como referencia.

Observaciones: un precipitado de color blanco o turbidez nos indica prueba positiva.

4. Flavonoides (Reacción de Shinoda) (exceptuando dihidrochalconas, chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas)

Se realiza sobre la fracción (d) y (e)

- i. Se coloca la fracción (d) en un balón de 100 mL y se lleva a sequedad en un rotavapor.

- ii. Sobre el residuo se agrega 2,5 mL de etanol, dentro de un “baño maría” a 50°C. Luego se filtra a través de un papel de filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo (13x100). Constituyendo esta la “solución d”.
- iii. En un tubo de ensayo se colocan 3 gotas de la “solución d” con 2 mL de agua destilada, y en otro tubo 2 mL de la fracción (e). Luego se adiciona 1 mL de HCl 12N y unas limaduras de magnesio, a cada tubo. Se agitan ambos tubos y luego se dejan en reposo durante 5 minutos.
- iv. Se adicionan 10 gotas de alcohol amílico a cada tubo, agitando estos. Luego se dejan en reposo para la separación de las 2 fases.

Observaciones y resultados: una coloración amarilla, naranja, rojo de la fase amílica nos indica prueba positiva.

5. Triterpenoides y esteroides (Reacción de Lieberman-Burchard)

Se realiza sobre las fracciones (b) y (c) y la “solución d”

- i. Se separa 4 mL de la fracción (c) en un tubo de 13x100 mm y se lleva a sequedad. Luego se disuelve el residuo con 0,2 mL de cloroformo. Constituyendo ésta la “solución (c)”.
- ii. Se colocan 5 gotas de la “solución (d)” en un tubo de 13x100 mm y se lleva a sequedad en un rotavapor, disolviendo el residuo con 2 gotas de cloroformo.
- iii. En tres tubos de 6x50 mm por separado, se colocan 2 gotas de la fracción (b), la “solución (c)” y la “solución (d)”, respectivamente. Luego se agrega 2 gotas de anhídrido acético sobre ellas y se mezcla bien.
- iv. Finalmente, se agrega, a través de las paredes del tubo, sobre cada una de ellas 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Observaciones: una coloración rojo, rosado, púrpura, naranja, azul o verde del anillo, nos indica prueba positiva.

6. Naftaquinonas y antraquinonas, antronas o antranoles (Reacción de Borrrtrager)

Se realiza sobre la fracción (b)

- i. El resto de la fracción (b) se coloca en un tubo de ensayo de 16x180 mm, y se agrega 5 mL de hidróxido de sodio al 5%. Luego se agita el tubo.

Observaciones: Fase acuosa rosada o roja nos indica prueba positiva.

7. Alcaloides (Test de Dragendorff, Mayer y Wagner)

Se realiza sobre la Fracción (c) y la "solución d"

- i. El resto de la fracción (c) se lleva a sequedad y el residuo se disuelve con 2,5 mL de HCl al 1%, luego se filtra a través de un papel filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo de 13x100 mm.
- ii. Se disponen de 5 gotas de la solución (d) en un tubo de ensayo de 13x100 mm y se lleva a sequedad, luego se filtra a través de un papel de filtro lento, recibiendo el filtrado en un tubo de ensayo de 6x50 mm..
- iii. A tres tubos de ensayo de 6x50 mm, se adicionan 5 gotas de la solución final obtenida en la secc.7.i, por separado. Asimismo, a otros 3 tubos de ensayo de 6x50 mm, se adicionan 5 gotas de la solución final obtenida en la secc.7.ii, por separado. Luego se adiciona a cada tubo 2 gotas de los reactivo de Dragendorff, Mayer y Wagner, respectivamente.

Observaciones: la formación de precipitado rojo, crema y pardo, respectivamente nos indica prueba positiva.

8. Leucoantocianidinas y catequinas (Reacción de Rosenbein)

Se realiza sobre la fracción (e) y la" solución d"

- i. En un tubo de ensayo de 13x100mm se colocan 3 gotas de la "solución (d)" junto con 2 mL de agua destilada, y en otro tubo de ensayo de 13x100 mm 2 mL de la fracción (e).
- ii. Luego a ambos tubos se agrega 1 mL de HCl 12N, se agitan y se colocan en baño maría durante 10 minutos.
- iii. Se dejan enfriar las mezclas, luego se agregan 10 gotas de alcohol amílico, a cada una, se agitan, y se dejan reposar por 5 minutos.

Observaciones: una coloración parda de la fase amílica nos indiac prueba positiva.

9. Saponinas (Prueba de la espuma)

Se realiza sobre la fracción (f).

- i. Se coloca 1 mL de la fracción (f) en un tubo de ensayo de 13x100mm y se agita durante 15 segundos. Luego se deja en reposo durante 15 minutos, al cabo de lo cual se debe medir la altura de la espuma.

Observaciones: si la espuma tiene una altura mayor o igual de 5mm y persiste por más de 5 minutos nos indica prueba positiva.

ANEXO 6

Acta de Marcha fitoquímica N°1

RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR 1

(De acuerdo al procedimiento de Rondina & Coussio-1969)

Muestra (Nombre común y científico): hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. cauliflora* Ule)

Procedencia: Tarapoto, San Martín, Perú

Cantidad de la muestra: 6 g.

Fecha de Análisis: 14, 15 y 19 de noviembre del 2018

Prueba N°	Principio Activo	Pruebas de coloración	Fracción	Resultados (*)	Observaciones (color de soluciones y/o precipitados)
01	Aminogrupos primarios y/o secundarios	Ninhidrina	a	-	
			f	++	Color violeta
02	Grupos fenólicos libres y/o Taninos	Cloruro férrico	a	+	Color verde oscuro
03	Taninos	Gelatina	a	-	
04	Triptenos y esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	b	++	Color verde
			c	-	Color pardo
			d	-	Incoloro
05	Quinonas, antronas o antranoles	Reacción de Borntrager	b	+	Color amarillo
06	Alcaloides	Reacción de Dragendorff	c	-	
			d	+	Precipitado crema
		Reactivo de Mayer	c	-	Turbidez de color rosado
			d	-	
		Reactivo de Wagner	c	-	Turbidez
			d	-	
07	Leucoantocianidinas (rojo), catequinas (marrón)	Reacción de Rosembeim	d	-	Color amarillo
			e	+	Color pardo tenue
08	Flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas	Reacción de Shinoda	d	-	Incoloro
			e	++	Color naranja
09	Saponinas	Prueba de la espuma	f	-	

(*) Convención: Abundante (+++), regular (++) , poco (+), negativo (-)

Para aminogrupos y triterpenos-esteroides, la observación macroscópica del color de la prueba no guarda relación con la cantidad de sustancia presente.

RESUMEN DE RESULTADOS:

CONTIENE.- Aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos, triptenos, esteroides, catequinas, flavonoides, quinonas, antronas y antranoles.

NO CONTIENE.- Taninos, alcaloides, leucoantocianidinas ni saponinas.

Obs: Se descartó la presencia de alcaloides y se confirmó la presencia de flavonoides con las pruebas según Villacrez (se realizó el día 28.Nov.18)

V°: Elena Córdor C.

30 de Noviembre del 2018
Luis Rojas Rodriguez

ANEXO 7

Acta de Marcha fitoquímica N°2

RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR 2 (De acuerdo al procedimiento de Rondina & Coussio-1969)

Muestra (Nombre común y científico): hojas de Yawar Panga (*Aristolochia cf. cauliflora* Ule)
Procedencia : Tarapoto, San pMartin, Perú
Cantidad de la muestra : 6 g.
Fecha de Análisis : 20, 21 y 22 de noviembre del 2018

Prueba N°	Principio Activo	Pruebas de coloración	Fracción	Resultados (*)	Observaciones (color de soluciones y/o precipitados)
01	Aminogrupos primarios y/o secundarios	Ninhidrina	a	-	
			f	++	Color violeta
02	Grupos fenólicos libres y/o Taninos	Cloruro férrico	a	+	Color verde oscuro
03	Taninos	Gelatina	a	-	
04	Triptenos y esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	b	++	Color verde
			c	-	Color pardo
			d	-	Incoloro
05	Quinonas, antronas o antranoles	Reacción de Borntrager	b	+	Color amarillo
06	Alcaloides	Reacción de Dragendorff	c	+	Precipitado color blanco
			d	+	Precipitado crema
		Reactivo de Mayer	c	-	Turbidez de color rosado
			d	-	
		Reactivo de Wagner	c	-	Turbidez
			d	-	
07	Leucoantocianidinas (rojo), catequinas (marrón)	Reacción de Rosembeim	d	-	Color amarillo
			e	+	Color pardo tenue
08	Flavonoides excepto chalconas, auronas, catequinas e isoflavonas	Reacción de Shinoda	d	-	
			e	++	Color naranja
09	Saponinas	Prueba de la espuma	f	-	

(*) Convención: Abundante (+++), regular (++) , poco (+), negativo (-)
 Para aminogrupos y triterpenos-esteroides, la observación macroscópica del color de la prueba no guarda relación con la cantidad de sustancia presente.

RESUMEN DE RESULTADOS:

CONTIENE.- Aminogrupos primarios y/o secundarios, grupos fenólicos, triptenos, esteroides, catequinas, flavonoides, quininas, antronas y antranoles.

NO CONTIENE.- Taninos, alcaloides, leucoantocianidinas ni saponinas.

Obs: Se descartó la presencia de alcaloides y se confirmó la presencia de flavonoides con las pruebas según Villacrez (se realizó el día 28.Nov.18)

V°: Elena Cóndor C.

30 de Noviembre del 2018
Luis Rojas Rodríguez

ANEXO 8

Procedimiento de pruebas específicas según Villacrez-1995

- i. Se dispuso de 5 g de muestra seca y molida, la cual se introdujo en un tubo de ensayo con 15 mL de agua destilada.
- ii. Se calentó la muestra a baño María durante diez minutos.
- iii. Luego del tiempo transcurrido se filtró sobre papel de filtro lento recibiendo la solución en un tubo de ensayo.
- iv. Sobre la solución filtrada se realiza la prueba deseada.

A. Flavonoides

- a. Reacción de Shinoda

Sobre la solución filtrada se añade una tira de magnesio y $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 12 N. Se deje reaccionar y se añade alcohol amílico.

B. Alcaloides

- a. Reacción de Dragendorff

A la solución filtrada se añade el reactivo de Dragendorff.

- b. Reacción de Mayer

A la solución filtrada se añade el reactivo de Mayer.

- c. Reacción de Wagner

A la solución filtrada se añade el reactivo de Wagner.