

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES

CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



**TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
ALCALOIDES MAYORITARIOS DE LA ESPECIE
*STENOMESSON MINIATUM***

POSTULANTE: JOSÉ ANTONIO RUIZ MACHICAO

TUTORA: GIOVANNA ROCIO ALMANZA VEGA Ph.D.

LA PAZ – BOLIVIA

2019

Contenido

1 INTRODUCCIÓN.....	8
2 ANTECEDENTES	11
2.1 Familia Amarillidaceae.....	11
2.1.1 Genero <i>Stenomesson</i>	11
2.1.2 <i>Stenomesson miniatum</i>	12
2.2 Compuestos bioactivos	13
2.2.1 Alcaloides de Amarillidaceae	13
2.2.2 Alcaloides inhibidores de la Acetilcolinesterasa y su relación con el Alzheimer 15	
2.2.3 Galantamina	16
2.2.4 Hemantamina	17
2.2.4.2. Derivados de Hemantamina como inhibidores de Acetilcolinesterasa.	18
2.2.4.3 Hemantamina como anticancerígeno	19
2.2.4.4 Alcaloides con propiedades apoptóticas, citotóxica y citostáticas y su relación con células cancerígenas.	19
2.2.4.5 Apoptosis y compuestos con propiedades apoptóticas	20
2.2.5 Otros alcaloides de interés.....	21
3 MARCO TEÓRICO	23
3.1 Extracción de alcaloides	23
3.2 Separación de alcaloides.....	24
3.2.1 Cromatografía en capa fina (TLC).....	24
3.2.2 Cromatografía líquida flash (FLC).....	25
3.2.3 Cromatografía por exclusión (Sephadex® LH-20).....	25
3.2.4 Cristalización.....	26
3.3 Identificación de alcaloides.....	26
3.3.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)	26
3.3.2 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).....	29
3.3.3 Cromatografía de alta presión HPLC	30
4 PROBLEMÁTICA	31
4.1 Biodiversidad en Bolivia.....	31
4.2 Productos naturales como agentes terapéuticos.....	31

5 HIPÓTESIS	32
6 JUSTIFICACIÓN	32
7 OBJETIVOS	34
7.1 Objetivo general.....	34
7.2 Objetivos específicos	34
8 METODOLOGÍA.....	35
8.1 Muestreo	35
8.2 Preparación de la muestra	36
8.3 Obtención de extracto rico en alcaloides	36
8.4 Cromatografía flash	37
8.4.1 Sistema de solventes.....	37
8.4.2 Empaquetado de la columna	37
8.4.3 Siembra de la muestra y separación de compuestos	38
8.5 Cromatografía por exclusión con Sephadex® LH-20	39
8.6 Purificación por recristalización	39
8.7 Elucidación estructural por RMN	39
8.8 Cuantificación por HPLC	40
9 RESULTADOS	42
9.1 Obtención del extracto rico en alcaloides	42
9.2 SEPARACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS	44
9.2.1 Separación de alcaloides por cromatografía en columna	44
9.2.2 Separación por cromatografía en columna flash.....	46
9.2.3 Separación por cromatografía de exclusión	48
9.2.4 Purificación por recristalización.....	49
9.3 Determinación estructural por RMN	50
9.4 Cuantificación de Hemantamina por HPLC	55
10 CONCLUSIONES.....	61
11 RECOMENDACIONES	64
11 ANEXOS.....	66
Anexo 1	66
Anexo 2.....	67

Anexo 3.....71
12 BIBLIOGRAFÍA.....74



Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Lugares de muestreo</i>	35
Tabla 2. Volúmenes y proporciones de solventes utilizadas para la separación en la columna flash.....	38
Tabla 3. Rampa de concentración y flujo de solventes utilizada en HPLC.....	40
Tabla 4. Masa de muestra seca y extracto rico en alcaloides proveniente de las plantas colectadas en Charazani y en el campus de la FCPN.	41
Tabla 5. Masa obtenida de muestra seca.	42
Tabla 6. Masa y rendimiento de los extractos alcohólicos obtenidos.	42
Tabla 7. Sistemas de solventes utilizados para las placas referenciales de TLC.....	44
Tabla 8. Volúmenes y proporciones de solventes utilizadas para la separación en la columna flash.	46
Tabla 9. Fracciones obtenidas de la separación por cromatografía flash.	47
Tabla 10. Fracciones unidas provenientes de la separación por cromatografía flash.....	48
Tabla 11. Fracciones unidas luego de la cromatografía de exclusión. A corresponde a una muestra de referencia.....	49
Tabla 12 Desplazamientos de H^1 , C^{13} y datos obtenidos de los espectros COSY, HSQC y HMBC.	54
Tabla 13. Datos obtenidos por HPLC de las 5 soluciones patrón utilizadas para elaborar la curva de calibración y la muestra de extracto rico en alcaloides.....	57
Tabla 14. Masa de los bulbos secos, extracto rico en alcaloides y Hemantamina obtenida a partir de bulbos secos de las diferentes muestras.	58
Tabla 15. Cantidad de Hemantamina y de alcaloides totales presentes en las muestras colectadas.....	58
Tabla 16. Resultados reportados por la universidad de Barcelona del análisis por GC-MS. *La codeína se utilizó como patrón interno.....	59
Tabla 17. Resultados de las pruebas del extracto de alcaloides contra AChE y BuChE.....	60

Índice de figuras

Figura 1 Flores de <i>Stenomesson miniatum</i>	13
Figura 2. Esqueletos de los alcaloides representativos de la familia <i>Amaryllidaceae</i>	15
Figura 3. Estructuras de la Hemantamina (izquierda) y Hemantidina (derecha)	17
Figura 4 Estructura de la Hemantamina con el sustituyente R.	18
Figura 5 Estructura de la Lycorina	21
Figura 6 Esqueleto tipo Crinina.....	22
Figura 7 Dipolo magnético generado por un núcleo en movimiento.	27
Figura 8 a) Movimiento de precesión de μ en un campo magnético B_0 generando un ángulo Θ . b) Cambio del ángulo Θ por el efecto de la adición de un campo magnético B_1 al sistema inicial.	27
Figura 9 Alineamiento α y β de un núcleo producto del efecto de B_1	28
Figura 10 Placa de TLC revelada con Dragendorff. 1) Prueba positiva de alcaloides para el extracto en H_2SO_4 2%. 2) Prueba negativa para alcaloides en el remanente redisoluto en EtOH.....	43
Figura 11. Placa de TLC revelada con Dragendorff de las tres porciones de AcOEt de la extracción líquido-líquido. 1) Presencia de todos los alcaloides de la muestra. 2) presencia de al menos dos alcaloides. 3) no se detecta presencia de alcaloides.....	44
Figura 12. Placas realizadas para la selección de solventes a) AcOEt b) AcOEt-EtOH [95:5] c) AcOEt-EtOH [60:40] d) AcOEt-EtOH- NH_4^+ [90:9,9:0,1].....	45
Figura 13. Unión de fracciones provenientes de la separación por cromatografía Flash. A) Unión de fracciones 50-70 B) Unión de las fracciones 1-20A. C) Unión de las fracciones 4-20B. D) Unión de las fracciones 1-20C.	48
Figura 14 Placas de TLC de las uniones A, B, C, D, E Y F (de izquierda a derecha) de las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía de exclusión.....	49
Figura 15 Estructura determinada mediante Resonancia Magnética Nuclear. La estructura corresponde a la Hemantamina.....	50
Figura 16 Espectro de H^1 obtenido por RMN. Se muestran 13 señales correspondientes a los 19 hidrógenos de la Hemantamina.....	51
Figura 17 Ampliación de la sección entre 4.8 y 7.1 del espectro de H^1 obtenido por RMN.	52
Figura 18 Ampliación de la sección entre 0 y 4.7 del espectro de H^1 obtenido por RMN.	53
Figura 19 Espectro de C^{13} obtenido por RMN.	53
Figura 20 Estructura de la Hemantamina elucidada por RMN.	55
Figura 21. Cromatograma del extracto rico en alcaloides de bulbos de <i>Stenomesson miniatum</i> Se detalla el pico a 14.123min que corresponde a la Hemantamina. mAU= unidades arbitrarias de intensidad del detector DAD. Los compuesto no identificados se denominan como; A, B, C, D y E.	56

Figura 22. Cromatograma del patrón de Hemantamina. La hemantamina tiene un tiempo de retención de 14.107 con el sistema de solventes utilizado en el HPLC. mAU= unidades arbitrarias de intensidad del detector DAD.56



Índice de abreviaturas y unidades

AChE	Acetilcolinesterasa
AcOEt	Acetato de etilo
ADB	Muestra de bulbos de invernadero
AFB	Muestra de bulbos exterior
BuChE	Butirilcolinesterasa
cm	centímetros
COSY	Correlated Spectroscopy
EtOH	Etanol
FCPN	Facultad de Ciencias Puras y Naturales
g	gramos
GC	Gas Chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IC₅₀	Concentración inhibitoria maxima media
msnm	metros sobre el nivel del mar
MS	Mass Spectroscopy
mUA	mili unidades aleatorias de absorbancia
ppm	partes por millón
TLC	Thin layer cromatography
µg	microgramos de muestra

En este documento se utiliza la coma (,) como separador de decimales.

Las cifras se agrupan de 3 a partir de la coma decimal separadas por un espacio en blanco.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más profundos agradecimientos a todas las personas que me acompañaron durante el proceso de elaboración de este proyecto.

A mis padres Roxana y Antonio por darme todo su amor, confianza y apoyo incondicional durante toda mi vida y ser un ejemplo a seguir.

A mis hermanas Erika y Yara, por apoyarme en todo momento y aconsejarme en los momentos más difíciles.

A mi familia, por estar a mi lado en todo momento y apoyarme en las decisiones que tomo.

A Fabiola Valdivieso, por apoyarme incondicionalmente y alentarme a seguir adelante en todo momento.

A mi tutora Giovanna Almanza y a mi tribunal Yonny Flores, por guiarme en la elaboración de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y ayuda durante la elaboración de este proyecto.

Al laboratorio de Bioorgánica, por darme la posibilidad de elaborar este proyecto brindando materiales y reactivos.

A la carrera de Ciencias Químicas, por acogerme y brindarme la educación necesaria para mi formación como profesional.

A la Universidad Mayor de San Andrés, por ser la cuna de mi formación como profesional.

1 INTRODUCCIÓN

El trabajo tiene el interés de elaborar un perfil de los alcaloides mayoritarios producidos por la planta *Stenomesson miniatum* de modo que se pueda relacionar las propiedades de estos con los usos comunes que se le da a esta planta dentro de la medicina tradicional boliviana. Esta planta pertenece a la familia de las Amarillidaceae, familia conocida por producir metabolitos secundarios de gran interés. Esta planta, endémica de Bolivia y Perú, se encuentra distribuida en el norte de La Paz, encontrándose especímenes desde el municipio de Combaya hasta Charazani.

El interés de este trabajo por realizar una caracterización de los alcaloides que produce la especie *Stenomesson miniatum* nace de los reportes de las propiedades antifúngicas, antibacterianas, antivirales, antimaláricas y antitumorales de alcaloides producidos por plantas de la familia de las Amarillidaceas (Amina H. Abou-Donia, 2008). El metabolito más conocido de esta familia es la galantamina (alcaloide encontrado en plantas del género *Galanthus*) que se utiliza como tratamiento para el Alzheimer ya que funciona como un regulador de la Acetilcolinesterasa en el organismo. (A. Emir, 2013).

Por otro lado, el Alzheimer representa la enfermedad neurodegenerativa más importante de los últimos 30 años. La organización mundial de la salud estima que para el año 2030 habrá 4 mil millones de personas en el mundo que padecerán de esta enfermedad. Por este motivo, tanto la OMS como distintas organizaciones destinadas a la salud y la neurociencia están altamente enfocadas en encontrar tratamientos para esta enfermedad. En este ámbito, la medicina natural tiene cada vez una mayor importancia en la búsqueda de nuevos principios activos que ayuden a tratar y curar las enfermedades de este tipo.

2 ANTECEDENTES

2.1 Familia Amarillidaceae

Las amarillidaceas son una familia de plantas herbáceas, perennes y bulbosas, compuesta por 73 géneros y alrededor de 1600 especies. (Maark W. Chase, 2009). Esta familia se caracteriza por producir metabolitos de gran interés para la medicina. Estudios han confirmado que estos metabolitos tienen propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales. Algunos alcaloides, de especies de la familia de amarillidaceas, como la licorina, augustina y crinamina tienen actividad antimalárica y se ha reportado que algunos de ellos poseen actividad antitumoral. (K. Acosta, 2014)

Miembros de esta familia están ampliamente distribuidos en el trópico y las regiones cálidas alrededor del planeta. Así se presentan centros de alta concentración de especies en Sudáfrica y en menor medida en Sudamérica. Algunas especies de esta familia se encuentran distribuidas en el mediterráneo y otras, relacionadas filogenéticamente, se pueden encontrar distribuidas en puntos geográficos específicos. (Esameldin E. Elgorashi, 2009). El género *Narcisseae* se encuentra típicamente distribuido en el mediterráneo mientras que el género *Stenbergia* recorre desde el mediterráneo hasta Irán. Las tribus Heamantae y Amaryllideae se encuentran distribuidas en el sur de África. Por su parte, Géneros como *Hippeastrum* se han encontrado en Brasil y Chile mientras que el género *Stenomesson* se encuentra distribuido en las distintas regiones de Bolivia, Perú, Ecuador y Chile. (Silvia -arroyo Leuenberger, 1996) El género *Phaedranassa* está ampliamente distribuido en Centroamérica (José Esteban Jimenes, 2018) y el género *Crinum* está distribuido ampliamente en la región tropical de Sudamérica. (Tram, 2002)

2.1.1 Genero *Stenomesson*

Stenomesson es un género perteneciente a la familia Amarillidaceae que se encuentra distribuido en Bolivia, Perú, Ecuador y Chile. (Silvia -arroyo Leuenberger, 1996). Son plantas herbáceas, perennes y bulbosas. El género fue descrito por primera vez por William Herbert. Las especies pertenecientes a este género son:

- *Stenomesson aurantiacum*
- *Stenomesson breviflorum*
- *Stenomesson campanulatum*
- *Stenomesson chilense*
- *Stenomesson chloranthum*
- *Stenomesson flavum* .
- *Stenomesson gasteroides*
- *Stenomesson leucanthum*
- *Stenomesson miniatum*
- *Stenomesson mirabilis*
- *Stenomesson moldenkei*
- *Stenomesson parvulum*
- *Stenomesson pauciflorum*
- *Stenomesson pearcei*
- *Stenomesson rupense*
- *Stenomesson vitellinum*
- *Stenomesson weberbaueri*

2.1.2 *Stenomesson miniatum*

Esta especie, previamente conocida como *Urceolina peruviana*, es una planta característica por su flor en forma de urna. Es una especie de climas de humedad media que crece en el verano, permanece inactiva en el invierno y florece en la primavera junto con la aparición de sus hojas. En Bolivia se han encontrado especímenes en el norte de La Paz, desde el municipio de Combaya hasta el municipio de Charazani.



Figura 1 Flores de *Stenomesson miniatum*

Fuente: Pacificbulbsociety, Nhu Nguyen.

La planta es conocida como Pulu pulu, nombre en quechua que hace referencia a la forma de los bulbos característicos de esta planta. Estos son de gran interés para la medicina tradicional y ancestral de los Kallawayas. Ellos exprimen el “jugo” de los bulbos para utilizarlos como brebajes y ungüentos tópicos. El extracto se consume directamente en dosis reducidas para tratar la “enfermedad del olvido” nombre con el cuál los Kalawayas definen al Alzheimer y demencia senil. El mismo jugo, mezclado con extractos de otras plantas se usa para formar un ungüento que utilizan para tratar tumores superficiales. El consumo en dosis muy elevadas del jugo de los bulbos produce leves alucinaciones.

2.2 Compuestos bioactivos

El uso de plantas de la familia Amaryllidaceae en la medicina tradicional ha promovido la investigación sobre los compuestos bioactivos presentes en esta familia. Dados los objetivos de la investigación, se entrará en detalle solo sobre los alcaloides presentes en las plantas de esta familia.

2.2.1 Alcaloides de Amarrillidaceae

A mediados del siglo XX investigaciones con plantas del género *Narcissus* y *Galanthus* llevaron al aislamiento de la licorina y galantamina, respectivamente. A partir

de ese momento, hasta la actualidad, se han reportado alrededor de 300 alcaloides provenientes de plantas pertenecientes a la familia amaryllidaceae.

Los alcaloides de esta familia constan generalmente de un sistema de anillos de quince carbonos dividido en dos partes. La primera parte consta del anillo aromático (anillo A) donde el carbón bencílico está unido ya sea a nitrógeno u oxígeno. La segunda parte consta de 8 carbonos y está compuesta por un anillo de 6 miembros y una ramificación de dos carbonos los cuales están invariablemente unidos el uno al otro y al nitrógeno básico para dar las diferentes estructuras de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae.

Entre los esqueletos conocidos de alcaloides de esta familia se encuentran:

- Alcaloides tipo Lycorina, derivados del pirrol (1)
- Alcaloides tipo Lycorerina, derivados de 2-benzopirano 3,4-indol (2)
- Alcaloides tipo Galantamina, derivados del anillo dibenzofurano (5)
- Alcaloides tipo crinina, derivados de la 5,10 etanofenantridina (3)
- Alcaloides tipo Montanina, derivados de la metanomorfantidina (6).
- Alcaloides tipo cherilina, derivados de tetrahidroisoquinolina (4).
- Alcaloides tipo Narciclasina (7) y Tazetina (8), ambos derivados de 2.benzopirano-3,4 indol.

A continuación se muestran las estructuras representativas de cada tipo de alcaloide. Licorina (1), Licorenina (2), Crinina (3), Cherilina (4), Galantamina (5), Montanina (6), Narciclasina (7) y tazetina (8).

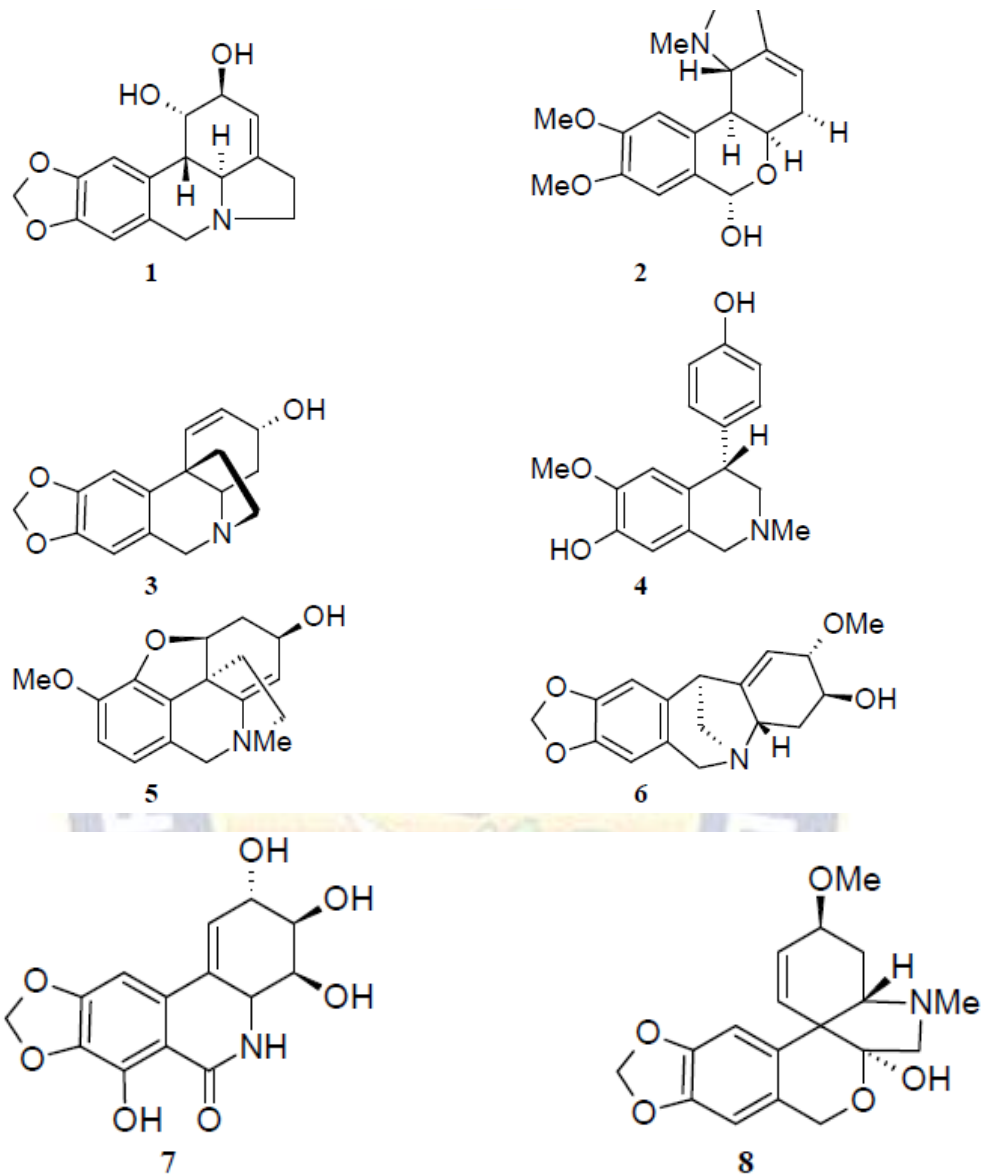


Figura 2. Esqueletos de los alcaloides representativos de la familia *Amaryllidaceae*.

Fuente: (Esameldin E. Elgorashi, 2009)

2.2.2 Alcaloides inhibidores de la Acetilcolinesterasa y su relación con el Alzheimer

Los inhibidores de colinesterasa son el único tratamiento aprobado para pacientes con diagnósticos moderados de Alzheimer, enfermedad asociada con la progresiva pérdida de la memoria y capacidades cognitivas. La hipótesis que se postula es que la

pérdida de la capacidad cognitiva y la memoria en los pacientes con Alzheimer, se debe a un déficit de la función colinérgica en el cerebro. (K. Geoffrey White, 2002) El cambio más importante observado es la disminución de los niveles de Acetilcolina y Acetilcolintransferasa en la región del hipocampo y la corteza cerebral. Mediante la inhibición de la enzima Acetilcolinesterasa, se pueden restaurar los niveles de Acetilcolina en estas regiones del cerebro. (susana López, 2002).

El alcaloide más conocido por su actividad como inhibidor de la Acetilcolinesterasa es la galantamina. Sin embargo, se ha demostrado que no solo alcaloides con esta estructura poseen esta propiedad, sino también alcaloides con esqueleto tipo licorina.

2.2.3 Galantamina

La galantamina es un alcaloide producido por varias especies de la familia Amarillidaceae. El interés por su estudio se basa en los usos que le da la medicina tradicional de ciertas regiones del este de Europa. Actualmente la galantamina se usa, bajo sus nombres comerciales Reminyl[®] y Nivalin[®], como tratamiento para la enfermedad del Alzheimer.

El inicio del interés por los alcaloides de esta familia se remonta al desarrollo de una cura para la poliomelitis en el este de Europa, para cuyo tratamiento se utilizaban extractos de la especie *Galanthus woronowii* y, posteriormente, de *Narcissus spp.* (Daffodil) Y *Leucojum spp.* (Snowflake). En 1952 se logra la Galantamina es aislada por primera vez a partir de la especie *Galanthus woronowii*. Para finales de la década se llevan a cabo numerosos estudios sobre las propiedades de la galantamina, de manera que:

- Se identifica que la galantamina tiene propiedades antagónicas contra agentes de bloqueo neuromuscular.
- Se inician experimentos en ratones para determinar los efectos de la galantamina en el cerebro.
- La galantamina es registrada como medicamento bajo el nombre de “Nivalin” y es comercializado en Bulgaria.

A partir de este momento hasta fines de los años 80 se realizan numerosos experimentos que prueban la actividad de la galantamina como supresor de la Acetilcolinesterasa y, en consecuencia, se inician estudios preclínicos y clínicos de este compuesto como un posible tratamiento para el Alzheimer. Desde los años 90 hasta la actualidad la galantamina ha sido aprobada para su uso en los Estados Unidos y varios países Europeos. (Heinrich, 2010).

2.2.4 Hemantamina

Los alcaloides tipo Crinina, entre los cuales se encuentra la Hemantamina, han sido uno de los primeros alcaloides provenientes de amarillidáceas en mostrar actividad citotóxica contra células cancerígenas. Pruebas pre clínicas han demostrado que la Hemantamina y la Hemantidina, reducen la actividad de la membrana mitocondrial lo cual conlleva a un decrecimiento en el porcentaje de células en la fase de síntesis del ciclo de reproducción celular. Es decir, la fase de duplicación de material genético. Se ha verificado la actividad apoptósica de la Hemantamina mediante ensayo con Annexina V y se ha verificado que la capacidad de generación de apoptosis de estos compuestos en células cancerígenas de leucemia es más pronunciada que la de la radiación gamma. (Radim Havalek, 2014).

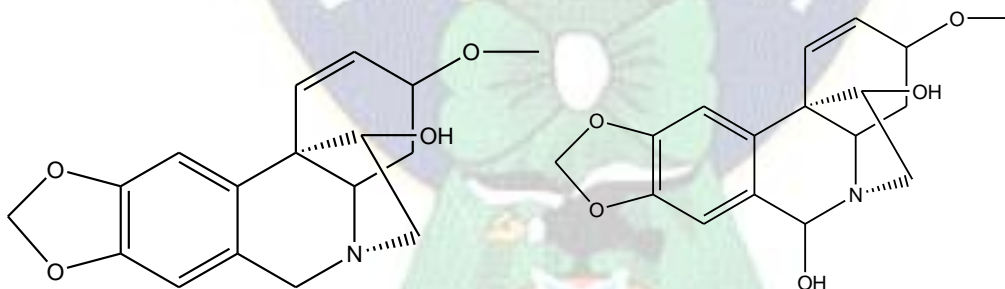


Figura 3. Estructuras de la Hemantamina (izquierda) y Hemantidina (derecha)

2.2.4.1. Derivados de Hemantamina con actividad antimalarica

La malaria en humanos es causada por el protozoo parásito *Plasmodium falsiparum* y es tratada principalmente con cloroquina (fármaco activo contra *Plasmodium falsiparum*). Sin embargo, existe una gran variedad de cepas de

Plasmodium falsiparum resistentes a la cloroquina. El tratamiento a personas que padecen de malaria producida por cepas resistentes es más complicado y presentan mayor riesgo de mortalidad.

Se ha demostrado que derivados de la Hemantamina y la Hemantidina tienen actividad en contra de cepas de *Plasmodium falsiparum* resistentes a la cloroquina. Tanto la Hemantamina como la hemantidina presentan la mayor actividad antiplasmódica con un índice IC_{50} de 1,3 y 1,2 μM , respectivamente, presentando mucha mayor actividad antiplasmódica que otros alcaloides característicos de las Amarillidaceas. Además, se ha encontrado que derivados de ambas moléculas, han mostrado valores de IC_{50} menores a 1 μM . (J.C. Cedrón, 2012)

2.2.4.2. Derivados de Hemantamina como inhibidores de Acetilcolinesterasa.

Si bien se ha demostrado que la Hemantamina como tal posee una baja actividad como inhibidor de la enzima hidrolasa de la Acetilcolina (Peter J. Houghton, 2004). Se ha visto que se pueden realizar derivatizaciones sobre la estructura de la Hemantamina para mejorar su actividad como inhibidor enzimático.

La acilación del hidroxilo de la Hemantamina para formar ésteres con cloruro de benzoilo sustituido (figura 4) ha demostrado mejorar significativamente la actividad de la Hemantamina como inhibidor de Acetilcolinesterasa y, además, distintos derivados han demostrado mayor actividad citotóxica. La figura # muestra la molécula de Hemantamina y los sustituyentes que presentaron mayor actividad como inhibidores enzimáticos. (Eliska Kohelva, 2019)

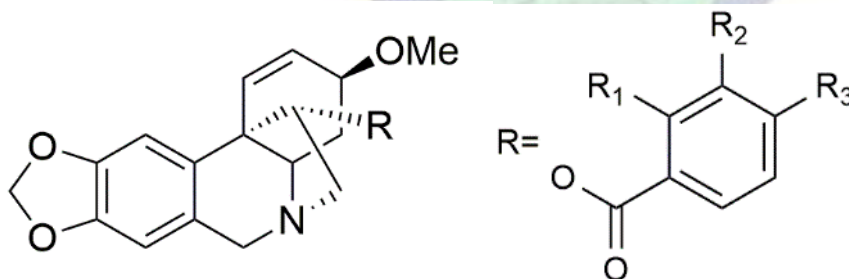


Figura 4 Estructura de la Hemantamina con el sustituyente R.

Los sustituyentes del benzoilo son:

A) $R_1=Me$, $R_2=H$, $R_3=H$

B) $R_1=H$, $R_2=H$, $R_3=NO_2$

2.2.4.3 Hemantamina como anticancerígeno

La determinación de propiedades citotóxicas y citostáticas de distintos alcaloides provenientes de plantas de la familia de las Amarillidaceas, ha mostrado que la Hemantamina puede ser un potencial fármaco contra el cáncer debido a que puede, tanto inducir la muerte de células cancerígenas, como retrasar el proceso de proliferación de estas. (Gwendoline Van Goietsenoven, 2009).

Se ha determinado la actividad de la Hemantamina contra células cancerígenas resistentes a la apoptosis y se ha demostrado que la Hemantamina tiene propiedades citostáticas (retraso de la proliferación de células cancerígenas) contra células cancerígenas humanas del tipo NSCLC A 549, U373GBM y OE21 de cáncer de esófago y SKMEL-28 de melanoma. Además, es activa contra células sensibles a la apoptosis de oligodendroglioma humano y melanoma en ratones. (Gwendoline Van Goietsenoven, 2009)

Encontrar moléculas con actividad citostática es de mucha importancia para la medicina moderna ya que al rededor del 90% de las muertes por cáncer se da debido a la metástasis de células resistentes a la apoptosis que no responden a la mayoría de los medicamentos disponibles hoy en día. (Craig D. Simpson, 2008)

La revista *Planta Médica* ha publicado estudios que muestran una alta actividad de la Hemantamina, junto a otros alcaloides de tipo crinina, contra líneas de cáncer tipo limfoblastoma humano Molt4 y actividad contra la proliferación y migración de líneas de cáncer de pecho, pulmón y colorectal. (B. Weniger, 1994).

2.2.4.4 Alcaloides con propiedades apoptóticas, citotóxica y citostáticas y su relación con células cancerígenas.

El cáncer es la segunda causa de mayor mortalidad a nivel mundial y, según la OMS, en 2018 se han registrado 18,1 millones de casos de cáncer y 9 millones de muertes a causa de esta enfermedad. (OMS, 2018). Cáncer es el nombre que reciben un

conjunto de enfermedades ligadas a un proceso descontrolado de división celular en el cuerpo formando tejidos cuyo crecimiento excede al de los tejidos normales y no está coordinado con estos. (NCI, 2015).

Los tratamientos actuales para el cáncer consisten en drogas que tienen la capacidad de inducir la muerte celular (apoptosis) de los tejidos que crecen de manera descontrolada. Sin embargo, existen células cancerígenas resistentes a la apoptosis y, por ende, inmunes a estos tratamientos. Al ser inmunes a la apoptosis, estos tejidos tienen libertad de continuar creciendo y proliferándose, a esta etapa se la conoce como metástasis la cual es la etapa final del cáncer y es la causa del 90% de las muertes por esta enfermedad. (Gwendoline Van Goietsenoven, 2009).

Revistas científicas como el *Journal of Natural Products* y *Planta Medica* han publicado estudios donde se dan a conocer productos naturales con actividad tanto apoptótica, inclusive en líneas de cáncer resistentes a este proceso, como citostática, es decir, de retardo de la proliferación de células cancerígenas y, por consiguiente, de prevención de que el cáncer alcance la etapa de metástasis. Muchos de estos alcaloides provienen de plantas de la familia de las amarillidaceas. Sobresalen entre ellos alcaloides con estructuras tipo crinina y licorina.

2.2.4.5 Apoptosis y compuestos con propiedades apoptóticas

La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica. (AMEisen, 1996). El proceso apoptótico se puede dividir en tres etapas: la primera es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte a través de un inductor extrínseco o intrínseco; en la segunda etapa, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, y por último, la tercera etapa en la que los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes. (Hengartner., 2000).

Los inductores de la muerte celular pueden ser de carácter intrínseco, cuando la célula libera citocromo C por acción de estrés biológico, iniciando la muerte de la célula, o de carácter extrínseco, cuando la muerte celular es inducida por agentes externos, los

cuales pueden ser de origen fisiológico (hormonas), biológico (bacterias, virus, parásitos), químico (fármacos) o físico (radiación) pudiendo un mismo estímulo generar respuestas diferentes y hasta opuestas en distintos tipos de células o, incluso, en células del mismo tipo pero que se encuentran en una etapa de desarrollo diferente. (Thompson, 1995)

Existe una gran variedad de fármacos con propiedades apoptóticas, todos ellos actúan como inductores del proceso de muerte celular. La Hemantamina es una molécula que ha ganado bastante interés en el campo de la medicina y bioquímica gracias a que se han demostrado su actividad como inductor apoptótico.

2.2.5 Otros alcaloides de interés

2.2.5.1 Lycorina

La Lycorina es un alcaloide de la familia de Amarillidáceas aislado del género *Lycoris* cuya estructura se muestra en la figura 5. Se ha reportado que este alcaloide es activo contra líneas de leucemia mieloide aguda, uno de los tipos más agresivos de leucemia. El mecanismo reporta que la Lycorina induce apoptosis a través de la liberación de Citocromo C y activación de Caspasa. (Xiao Shan Liu, 2009)

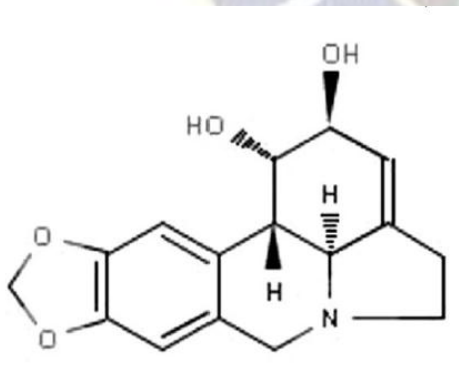


Figura 5 Estructura de la Lycorina
Fuente: (Xiao Shan Liu, 2009)

2.2.5.2 Crinina

La crinina es el esqueleto base de muchos alcaloides característicos de las Amarillidaceas. Algunas de las cuales presentan actividad apoptótica contra líneas de cáncer de tipo glioma resistentes a la apoptosis. El esqueeto tipo crinina se muestra en la figura 6. (Giovanni Luchetti, 2012)

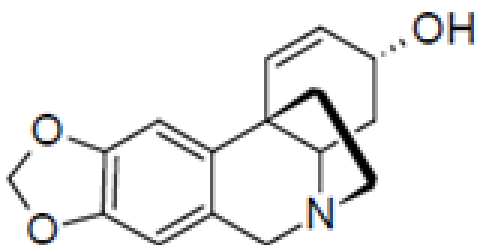


Figura 6 Esqueleto tipo Crinina
Fuente: (Giovanni Luchetti, 2012)

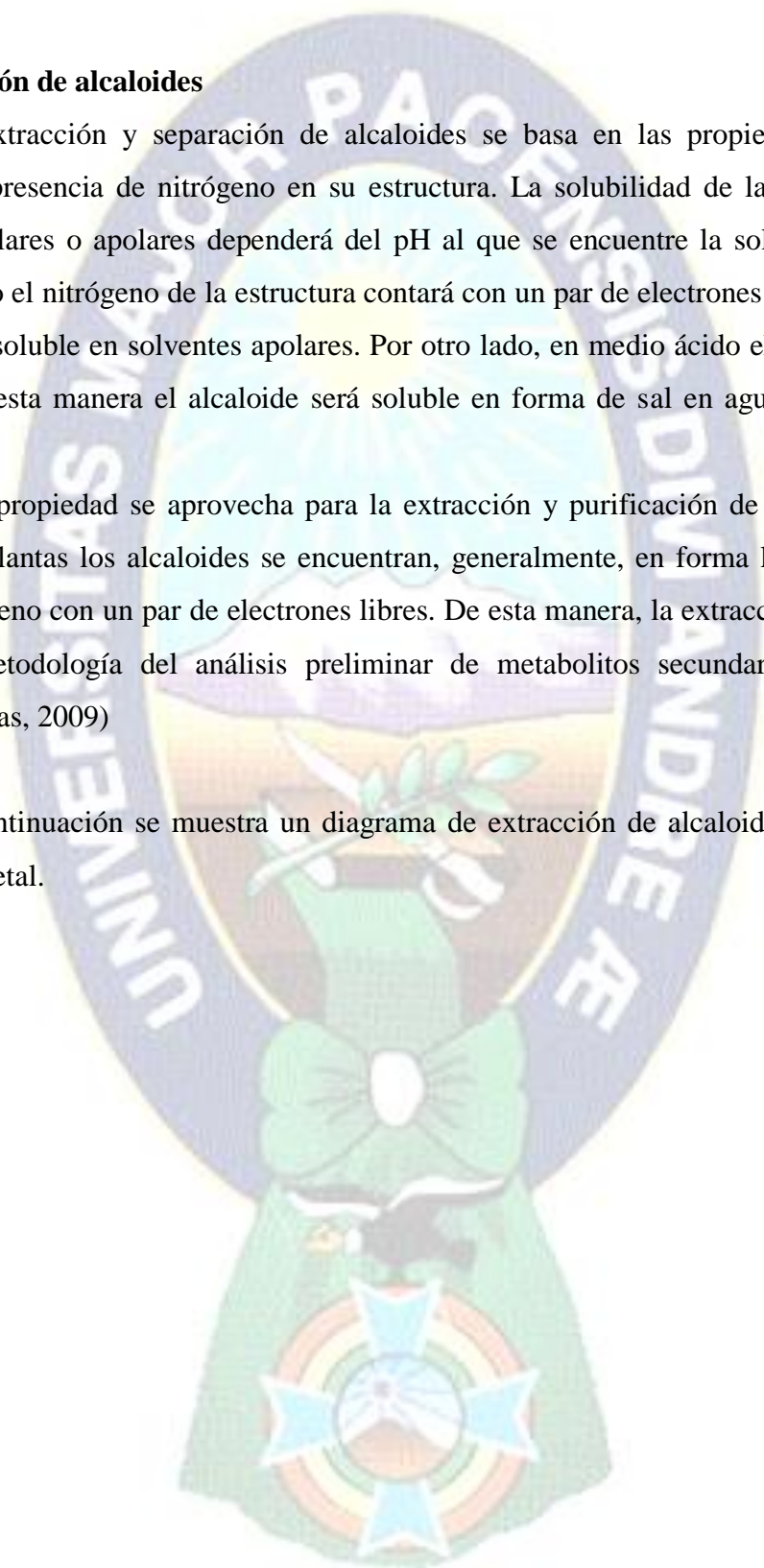
3 MARCO TEÓRICO

3.1 Extracción de alcaloides

La extracción y separación de alcaloides se basa en las propiedades que le confiere la presencia de nitrógeno en su estructura. La solubilidad de la molécula en solventes polares o apolares dependerá del pH al que se encuentre la solución. En un medio básico el nitrógeno de la estructura contará con un par de electrones libres, siendo el alcaloide soluble en solventes apolares. Por otro lado, en medio ácido el nitrógeno se protona, de esta manera el alcaloide será soluble en forma de sal en agua y solventes polares.

Esta propiedad se aprovecha para la extracción y purificación de alcaloides ya que en las plantas los alcaloides se encuentran, generalmente, en forma libre, es decir con el nitrógeno con un par de electrones libres. De esta manera, la extracción se realiza según la metodología del análisis preliminar de metabolitos secundarios. (Lyndon Carvajal Rojas, 2009)

A continuación se muestra un diagrama de extracción de alcaloides a partir de material vegetal.



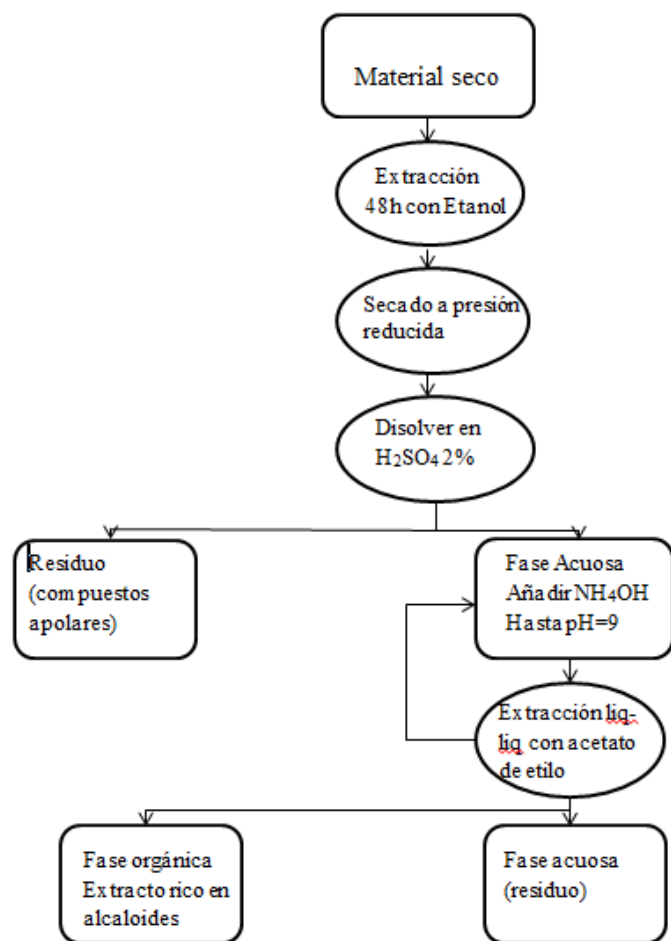


Diagrama 1. Esquema de la extracción y separación de alcaloides

3.2 Separación de alcaloides

Una vez obtenido el extracto rico en alcaloides, la separación de estos se realiza mediante técnicas de cromatografía líquida en columna, cromatografía en capa fina y técnicas de recristalización.

3.2.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés) es una técnica rápida, sensible y accesible para determinar el número de componentes de una mezcla, verificar la identidad y pureza de un compuesto, monitorear el progreso de una reacción, determinar el sistema de solventes para separaciones preparativas y analizar las fracciones obtenidas por cromatografía en columna. A diferencia de la cromatografía en

columna, la TLC necesita apenas microgramos de muestra para obtener resultados satisfactorios. (Cai, 2018)

3.2.2 Cromatografía líquida flash (FLC)

La cromatografía líquida FLASH es una técnica popularizada por Clark Still como alternativa a la cromatografía abierta. Técnica que en muchas ocasiones resulta lenta e ineficiente. La cromatografía FLASH varía de la cromatografía abierta en dos formas: primero, el tamaño de partícula de la sílica es ligeramente menor, entre 37 y 63 micrones. La segunda diferencia es que se aplica una presión a la columna (de entre 10 y 15psi) para elevar el flujo de la columna, restringido por el tamaño de partícula utilizado. Al igual que la TLC la capacidad de realizar una buena separación de los componentes de una mezcla, dependerá de la diferencia de polaridad que exista entre ellos y del solvente o sistema de solventes que se utilicen para la elución de las partículas. (Cram, 1978)

3.2.3 Cromatografía por exclusión (Sephadex® LH-20)

La cromatografía por exclusión, también conocida como filtración Gel, es la técnica más simple y dócil de la cromatografía en columna y separa partículas en función de su tamaño. Para la separación de moléculas como terpenos, esteroides, lípidos y otras partículas de bajo peso molecular se utiliza Sephadex® LH-20. Esta fase estacionaria consiste en perlas de dextrano hidroxipropilado que han sido entrecruzadas para formar una red de polisacáridos. (biosciences, 2018)

Este método requiere de un solo solvente ya que la capacidad de la separación de compuestos no depende de la afinidad que los componentes de la muestra tengan por la fase móvil, sino del tamaño de partícula y su capacidad de atravesar la red de polisacáridos que conforman la fase estacionaria.

3.2.4 Cristalización

La cristalización y recristalización son métodos de separación utilizados para obtener compuestos con altos grados de pureza. Estas técnicas aprovechan la diferente solubilidad de los compuestos en solventes diferentes o mezclas de estos, así como la mayor solubilidad de la mayoría de las moléculas en solventes calientes. (Armarego & Chai, 2003)

- **Diferencia de solubilidad por temperatura**

Este sistema se utiliza cuando el compuesto a separar es muy soluble en un solvente caliente y poco o nada soluble en el mismo solvente frío. Para el desarrollo de esta técnica se debe disolver la muestra en la mínima cantidad necesaria de solvente caliente, de modo que al enfriarse y por evaporación del solvente, la solubilidad del compuesto que se desea obtener puro disminuye y comienza a cristalizar. (Armarego & Chai, 2003)

- **Recristalización usando dos solventes**

Este sistema se utiliza cuando se tienen compuestos que son muy solubles en solventes de una polaridad definida y muy poco o nada solubles en solventes de polaridad distinta a la del solvente original. Para su aplicación se añade la mínima cantidad de solvente necesaria para que la muestra se disuelva. Una vez disuelta toda la muestra, se añade gota a gota el solvente en el que el compuesto no es poco o nada soluble hasta que se observe turbidez, una vez llegado a este punto, se debe dejar reposar la muestra por 24h para la formación de cristales. (Armarego & Chai, 2003)

3.3 Identificación de alcaloides

Para la determinación de estructuras de los alcaloides aislados se emplearán las técnicas de:

3.3.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear RMN es una técnica de elucidación estructural utilizada ampliamente en la química orgánica. Se basa en las propiedades magnéticas de algunos núcleos de elementos como el ^1H , ^{13}C , ^{15}N , y otros núcleos que posean un spin diferente de cero.

El movimiento de cualquier partícula cargada tiene un campo magnético asociado. Es decir, que genera un dipolo magnético, que en un campo magnético corresponde a un momento magnético μ (Figura 4). El μ de un núcleo está íntimamente relacionado a su momento angular. Es decir, que μ es directamente proporcional al spin nuclear. (Ioannis Gerothanassis, 2002)

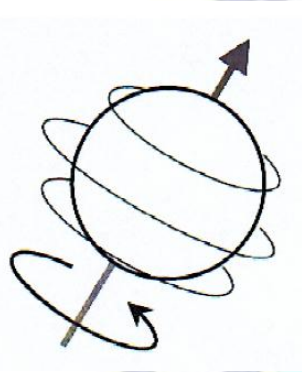


Figura 7 Dipolo magnético generado por un núcleo en movimiento.

Si se considera el movimiento de un momento magnético μ en un campo magnético constante aplicado externamente B_0 , este movimiento describirá un cono como se muestra en la figura #7. Si además, a este sistema se le aplica un campo magnético B_1 , más débil y perpendicular a B_0 . Este campo magnético aplicado generará un torque en μ que ocasionará un cambio en el ángulo Θ formado entre μ y B_0 . (Figura 8)



Figura 8 a) Movimiento de precesión de μ en un campo magnético B_0 generando un ángulo Θ . b) Cambio del ángulo Θ por el efecto de la adición de un campo magnético B_1 al sistema inicial.

Fuente: Ioannis P. Gerothanassis

Un núcleo con un movimiento de precesión dentro de un campo magnético B_0 , afectado por un campo magnético perpendicular B_1 puede alinearse a favor o en contra del campo magnético externo. Estas disposiciones energéticas serán denominadas como números de spin $+1/2$, para el estado de menor energía, y $-1/2$, para el estado de mayor energía (Figura 9). Ambos estados son también denominados como α y β , respetivamente. (Ioannis Gerothanassis, 2002)

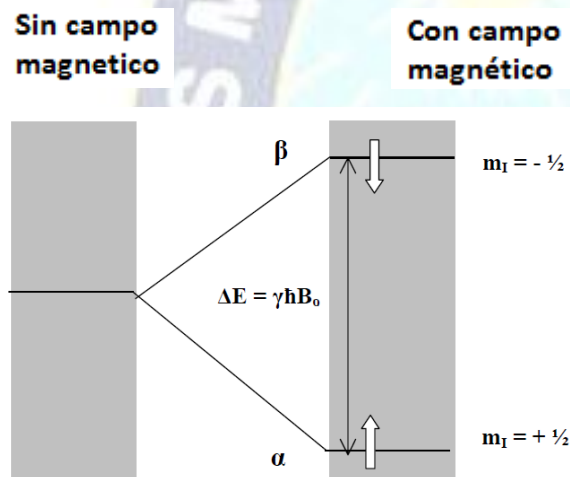


Figura 9 Alineamiento α y β de un núcleo producto del efecto de B_1 .

Fuente: Fuente: Ioannis P. Gerothanassis

La tendencia será que los núcleos se encuentren en el estado de menor energía y solo una pequeña proporción se encontrará en el estado de mayor energía. Esta diferencia hace posible que, al incidir energía, en este caso del orden de la radiofrecuencia, a las partículas, exista un salto de un estado a otro y un diferencial energético cuantificable en el campo magnético. Al mismo tiempo, al estar los átomos en una molécula rodeados de otras partículas de características diferentes, las variaciones de energía son diferentes entre núcleos del mismo elemento pero unidos a distintos núcleos y a través de distintos tipos de enlaces. De esta manera, este equipo permite la obtención de un espectro característico para cada molécula y se hace posible su elucidación estructural.

De esta manera, es posible la obtención de espectros de ^1H , ^{13}C y bidimensionales; COSY que muestra el acoplamiento entre hidrógenos vecinos, HSQC que muestra el acoplamiento entre el hidrógeno y el carbono al que se encuentra enlazado y HMBC que muestra el acoplamiento entre hidrógeno y carbono a tres enlaces de distancia.

3.3.2 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada en la separación de analitos entre dos fases inmiscibles: una fase gaseosa (Carrier gas) y una fase estacionaria sólida empacada en una columna. La muestra es vaporizada con un sistema de ingreso de calor y atraviesa la columna eluida por el gas carrier. Los analitos son adsorbidos en la fase estacionaria y se remueven mediante la aplicación de rampas de temperatura. A mayor adsorción de un analito, mayor el calor necesario para que sea eluido. De esta manera, el análisis por GC es una técnica viable para moléculas volátiles, semi-volátiles y térmicamente estables. (Taha, 2018).

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica muy sensible, rápida y con diversas aplicaciones en química analítica. El primer paso para el análisis por MS es la producción de iones gaseosos de los compuestos que se desean analizar, por ejemplo por ionización electrónica. El ion molecular se puede fragmentar ya que se trata de un radical con un número impar de electrones. La fragmentación puede producir un radical y un ion con un número par de electrones o una molécula y un nuevo radical.

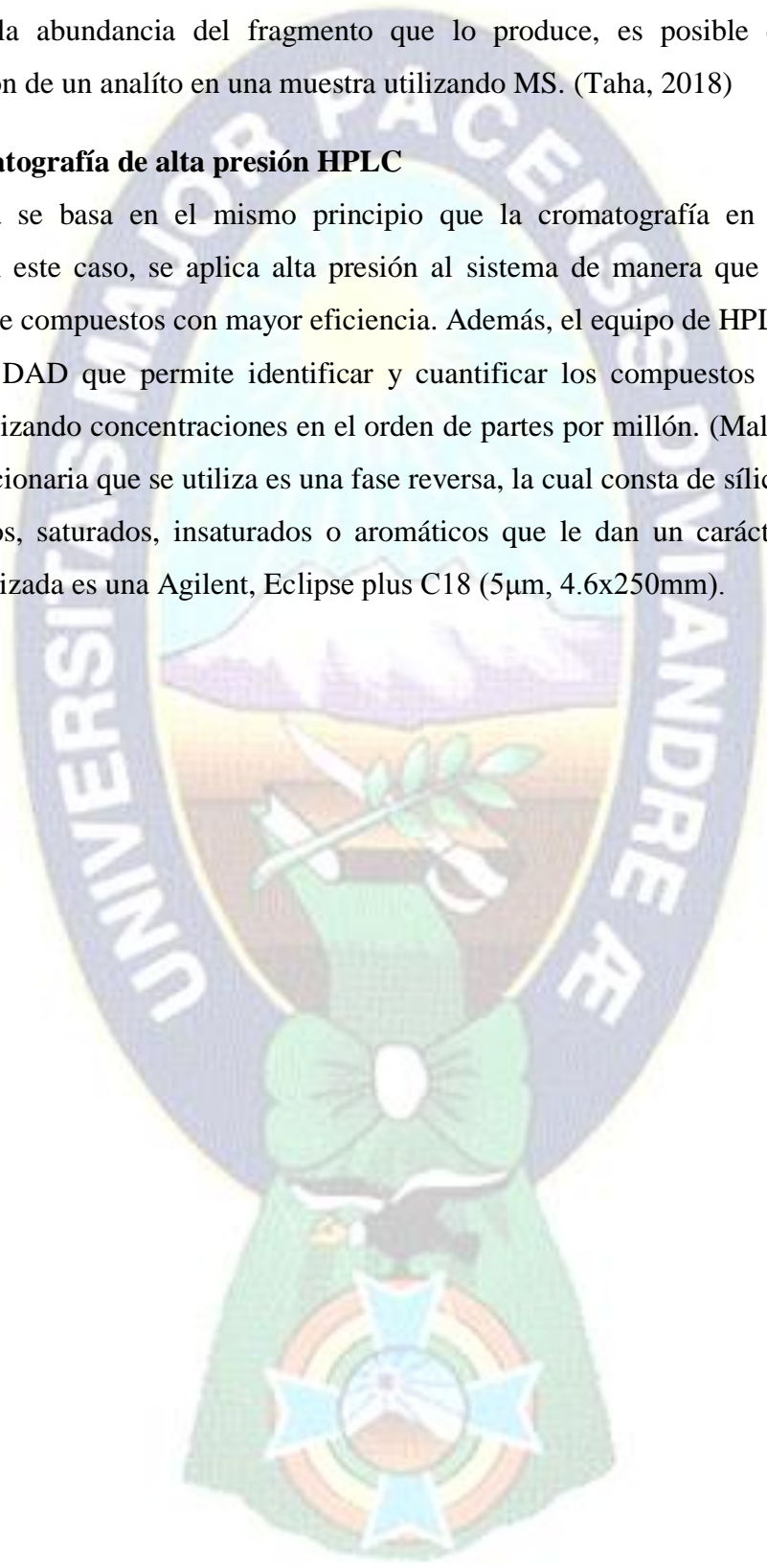
Cada una de las especies formadas tiene diferentes propiedades químicas. Cada una de las especies derivadas del ion molecular puede fragmentarse de nuevo. Todas estas especies se separan en función a su relación de masa-carga y detectadas en función a su abundancia. Como resultado de esta separación se obtiene un espectro de masas que relaciona la abundancia de una especie con su relación masa-carga.

Cada compuesto producirá fragmentos diferentes a partir de su ion molecular lo cual permite que se pueda determinar la estructura de una molécula gracias a su espectro de masas ya que cada compuesto dará como resultado un espectro diferente y

único. Además, al existir una relación directa entre la intensidad de un pico en el espectro y la abundancia del fragmento que lo produce, es posible determinar la concentración de un analito en una muestra utilizando MS. (Taha, 2018)

3.3.3 Cromatografía de alta presión HPLC

Esta técnica se basa en el mismo principio que la cromatografía en columna, sin embargo, en este caso, se aplica alta presión al sistema de manera que se permite la separación de compuestos con mayor eficiencia. Además, el equipo de HPLC cuenta con un detector DAD que permite identificar y cuantificar los compuestos eluidos en la columna utilizando concentraciones en el orden de partes por millón. (Malviya R, 2010) La fase estacionaria que se utiliza es una fase reversa, la cual consta de sílica dopada con hidrocarburos, saturados, insaturados o aromáticos que le dan un carácter apolar. La columna utilizada es una Agilent, Eclipse plus C18 (5 μ m, 4.6x250mm).



4 PROBLEMÁTICA

4.1 Biodiversidad en Bolivia

Bolivia es uno de los países más biodiversos del planeta y a causa de esto es que muchas culturas bolivianas han desarrollado un amplio conocimiento en usos medicinales y terapéuticos de la inmensa variedad de plantas que tienen a su disposición. (Ibisch, 2001) Uno de los ejemplos más conocidos de estas culturas son los Kallawayas. Médicos que, a través de la transmisión oral de conocimiento de generación en generación, han conseguido acumular gran cantidad de conocimiento sobre las plantas y el uso medicinal y terapéutico que se les puede dar.

Si bien este conocimiento es amplio y desarrollado, carece de dos factores. En primer lugar, de un fundamento científico que confirme que los compuestos encontrados en una planta tengan propiedades para curar o tratar enfermedades específicas y, en segundo lugar, carece de una forma de difusión controlada y sistemática que permita la distribución del conocimiento más allá de las fronteras bolivianas, garantizando que el conocimiento y la cultura de los kallawayas perdure en el tiempo y muestre su valor e importancia para el país y la humanidad.

4.2 Productos naturales como agentes terapéuticos

Históricamente los productos naturales y la medicina tradicional presentaron un papel preponderante en la preservación de la salud del ser humano. Sin embargo durante la última década del siglo pasado, los avances tecnológicos permitieron la inclusión de nuevas vías para el descubrimiento de drogas, entre las cuales se pueden mencionar: Screening de librerías de compuestos sintéticos, modificación racional de drogas existentes, diseño a partir del ligando natural o modulador, síntesis combinatoria, síntesis paralela y diseño asistido por computadoras (Patrick 2009). Estas técnicas, generaron grandes expectativas en la comunidad científica y en la empresa farmacéutica, ya que parecía que su utilización podía ser la solución para el descubrimiento de nuevos fármacos contra diversas enfermedades de manera más rápida y eficiente. Esto hizo que las inversiones disminuyeran en el campo de los productos naturales y se incrementaran

en estos nuevos campos. Sin embargo, luego de una década de su aplicación, no se vio un incremento real en la capacidad de generación de nuevos fármacos utilizando estas nuevas técnicas y aunque en la comunidad científica aún hay cautela en dar un veredicto al respecto (Drews 2000), investigaciones recientes muestran que el campo de los productos naturales sigue siendo de gran importancia. Este hecho se halla demostrado por que la mayoría de las nuevas moléculas identificadas y aprobadas como drogas, fueron aisladas de recursos naturales o fueron desarrolladas en base a estos compuestos naturales, ya sean compuestos naturales puros, compuestos análogos hemisintéticos o compuestos sintéticos basados en farmacóforos, propuestos en función a productos naturales (Newman & Cragg 2007). Por tanto, se puede ver que uniendo el conocimiento adquirido de la naturaleza con la tecnología y los métodos modernos de síntesis, se han obtenido excelentes resultados para la salud humana.

Existen diversas enfermedades, como el Alzheimer y el Cáncer, de alta incidencia a nivel mundial, cuya mejor respuesta se ha encontrado en el campo de productos naturales, por lo que la investigación de nuevos productos para estas enfermedades es motivo de interés de diversos grupos del área.

5 HIPÓTESIS

La especie *Stenomesson miniatum* produce alcaloides con actividad apoptótica, antitumoral, contra malaria, Alzheimer u otras infecciones de carácter viral, bacteriano o fúngico.

6 JUSTIFICACIÓN

Los Kallawayas de Charazani utilizan “jugo” de los bulbos de la especie *Stenomesson miniatum*, conocida como P’ulu P’ulu, para el tratamiento del Alzheimer y demencia senil. Además, se utiliza para realizar ungüentos tópicos para tratar tumores e inflamaciones. Debido a su parentesco con otras amarillidáceas y el uso que les dan los Kallawayas a estas plantas, se cree que pueden producir alcaloides de interés para la medicina como la galantamina.

Si bien el conocimiento del uso de estas plantas se ha transmitido por generaciones entre los Kallawayas y los tratamientos han dado resultados positivos, no se tiene ningún respaldo científico que corrobore estos resultados y demuestre que estas plantas son adecuadas para el tratamiento de este tipo de enfermedades. De esta manera, este trabajo pretende, además, aportar una base científica al conocimiento de los pueblos originarios de tal manera que se enriquezca su aporte a la cultura nacional y latinoamericana, promoviendo su difusión de manera verbal, como se ha hecho por generaciones entre los Kallawayas, y aportando documentación que respalde las propiedades de estas plantas.

La respuesta a la necesidad de difundir y conservar el conocimiento y la cultura ancestral de la medicina tradicional de Bolivia está en la investigación científica. Darle un soporte científico al conocimiento empírico de los kallawayas se ha convertido en una oportunidad de aportar al desarrollo de distintos pueblos bolivianos y a la conservación de su cultura. De esta manera, es que se ve una oportunidad en la investigación de la especie *Stenomesson miniatum* como una forma de aportar al conocimiento y cultura del municipio de Charazani. Esto solo traerá beneficios no solo sociales sino también económicos ya que, a largo plazo, se pueden desarrollar metodologías y políticas para aprovechar tanto el conocimiento de los médicos como el producto mismo de su trabajo traducido en un medicamento certificado para su uso como tratamiento contra distintas enfermedades.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

- Determinar los alcaloides mayoritarios de la especie *Stenomesson miniatum* y su potencial actividad en el tratamiento de distintas enfermedades, como aporte al conocimiento de la biodiversidad y cultura boliviana.

7.2 Objetivos específicos

- Obtener un extracto de alcaloides totales de la especie *Stenomesson miniatum*.
- Aislar e identificar alcaloides mayoritarios de la especie.
- Cuantificar los alcaloides aislados en diferentes muestras de la especie
- Realizar un análisis por GC/MS del extracto, en colaboración con la Universidad de Barcelona, para determinar la composición de alcaloides de la planta.
- Realizar una revisión bibliográfica profunda de los alcaloides identificados para justificar su potencial uso medicinal.

8 METODOLOGÍA

8.1 Muestreo

El muestreo se realizó en el municipio de Charazani al norte del departamento de La Paz. El municipio se encuentra a una altura promedio de 3250 msnm. La zona de muestreo se ha definido en función a muestreos anteriores y referencias obtenidas de Kallawayas de la comunidad. Además, se colectaron plantas del invernadero de Física de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales (FCPN). En la Tabla

1 se muestran las coordenadas y características de los lugares de muestreo.

Tabla 1. Lugares de muestreo.

Fuente: Elaboración propia.

	Muestreo 1	Muestreo 2	
País	Bolivia	Bolivia	
Departamento	La Paz	La Paz	
Provincia	Bautista Saavedra	Murillo	
Municipio	Charazani		
Sitio de muestreo	W 69°00'18,0'' S 15°10'29,4''	W 68°03'18,2'' S 16°32'48,7''	
Altura sobre el nivel del mas del sitio de muestreo [msnm]	3 457	3 593	
Cantidad colectada [g]	7 351	346	382

El lugar de muestreo (Tabla 1) se trata de la ladera de la montaña orientada hacia el noreste a orillas de una vertiente de montaña en el camino entre Charazani y Chari. La referencia de la presencia de la especie *Stenomesson miniatum* en este lugar fue obtenida del Kallawayaya Aurelio Ortiz. La planta se distribuye en pequeños conjuntos de entre 4 a 6 plantas generalmente al redor de cactus o en lugares rocosos y cercanos a desniveles del cerro.

Se colectaron 7,351kg de muestra fresca divididas entre partes aéreas (flores, hojas y tallos) y partes terrestres (bulbos y raíces). La colecta se realizó en el mes de septiembre ya que en esta época del año la planta se encuentra en flor, lo cual facilita su

identificación. Una vez identificada la planta, se escarba la tierra alrededor hasta encontrar el conjunto de bulbos que se extraen en conjunto con cuidado de no dañar ninguna parte de la planta en el proceso. Una vez extraída de la tierra, se separan las partes aéreas de las partes terrestres.

8.2 Preparación de la muestra

Las muestras transportadas a la ciudad de La Paz, se trasladaron al laboratorio de bioorgánica del Instituto de Investigaciones Químicas de la Universidad Mayor de San Andrés donde tanto partes aéreas como terrestres fueron congeladas a -18°C . Los bulbos congelados fueron trozados y liofilizados en un liofilizador *Alpha 1-2 LD Plus®* calibrado a 7mbar de presión y -68°C de temperatura durante 72h.

La muestra seca se coloca en un recipiente plástico de 20L de capacidad en la cual se realiza la extracción. Esta se realiza con Etanol 96°GL *Unagro* durante 48h a una relación de 10ml de solvente por gramo de muestra seca. Luego del tiempo requerido para la extracción se filtra la solución obtenida y los sólidos remanentes se transfieren de nuevo al recipiente plástico para una segunda extracción con Etanol 96°GL *Unagro* durante 24h a una relación de 10ml de solvente por gramo de muestra seca. La solución obtenida es llevada a sequedad a presión reducida con un rotaevaporador *Heidolph, laborota 4011 digital* con baño maría a una temperatura de 40°C a 50rpm.

El procedimiento de liofilización se realizó cuatro veces con masas de 1 100g de muestra debido a la capacidad de carga del liofilizador. Cada porción de muestra seca fue sometida a extracción de manera independiente inmediatamente después de salir del liofilizador. De igual manera, los extractos fueron secados independientemente, cada uno luego del tiempo respectivo de maceración. Los tres extractos secos fueron unidos antes de proceder a la obtención del extracto rico en alcaloides.

8.3 Obtención de extracto rico en alcaloides

Una vez que la muestra ha sido llevada a sequedad, se redisuelve con tres porciones de 20ml de una solución de H_2SO_4 al 2%. El sólido remanente se redisuelve

en etanol para realizar una prueba de presencia de alcaloides mediante reactivo de Dragendorff. En caso de dar positiva la prueba se debe secar nuevamente y repetir el proceso de disolución en medio ácido.

La solución ácida obtenida se lleva a pH=9 añadiéndole amoníaco concentrado, se transfiere a un embudo de separación y se realiza una extracción líquido-líquido con porciones de 10ml de AcOEt. Realizar la separación hasta que la fracción acuosa de prueba negativa al reactivo de Dragendorff.

La solución en AcOEt se concentra a la mitad de su volumen y se realiza una placa resumen (TLC) para determinar la cantidad de alcaloides presentes en la solución y para determinar el sistema de solventes a utilizar para la cromatografía flash.

8.4 Cromatografía flash

La cromatografía Flash es un tipo de cromatografía en columna en la que se aplica una determinada presión para acelerar el flujo de la fase estacionaria y favorecer la separación de compuestos. Este tipo de cromatografía requiere de la elección de un solvente o mezcla de solventes para separar los componentes de una muestra en función a la diferencia de polaridad entre estos.

8.4.1 Sistema de solventes

El sistema de solventes que se utiliza para la separación por cromatografía flash se determina realizando distintas placas de TLC en sílica utilizando diferentes solventes o mezcla de ellos como fase móvil. Aquel sistema que logre eluir toda la muestra y separar los compuestos presentes en ella con una diferencia notable en el Rf de cada compuesto en la placa, será el sistema que se deba utilizar en la separación por cromatografía flash.

8.4.2 Empaquetado de la columna

Se utiliza una columna de vidrio de 5cm de diámetro y 30cm de alto que se empaca con sílica con un tamaño de poro de 45-60mm hasta una altura de 16cm. El

solvente a utilizar para el empaquetamiento de la muestra debe ser el solvente menos polar que se vaya a utilizar en la separación.

8.4.3 Siembra de la muestra y separación de compuestos

La siembra de la muestra se realiza en seco. La muestra se concentra en un rotaevaporador, sin llegar a sequedad y se añade la misma sílica que se utilizó para empaquetar la columna hasta que la muestra se desprenda fácilmente de las paredes del balón. La muestra solida se deposita en la columna empacada y se empaqueta ligeramente sin aplicar demasiada presión.

La separación se realiza con el sistema de solventes seleccionado previamente. Se puede utilizar un solo solvente durante toda la separación o un gradiente de solventes y mezclas de solventes de manera que la polaridad de la fase móvil se incremente siendo la mezcla más polar utilizable AcOEt:EtOH [1:1]. El sistema utilizado consta de mezclas de AcOEt y EtOH en distintas proporciones a las cuales se les agrega, en todos los casos, 0.1ml de amoníaco concentrado. En la Tabla 2 se muestran las proporciones y volúmenes de solvente utilizados para la separación.

Tabla 2. Volúmenes y proporciones de solventes utilizadas para la separación en la columna flash. Tomar en cuenta que a cada solución debe añadirse 1% de amoníaco concentrado respecto al volumen total.

Sistema	Proporción [%]	Volumen [ml]
AcOEt:EtOH	97:3	200
AcOEt:EtOH	95:5	200
AcOEt:EtOH	93:7	200
AcOEt:EtOH	90:10	100
AcOEt:EtOH	85:15	100
AcOEt:EtOH	80:20	200
AcOEt:EtOH	75:25	200
AcOEt:EtOH	70:30	200
AcOEt:EtOH	65:35	200

8.5 Cromatografía por exclusión con Sephadex® LH-20

La cromatografía por exclusión se realiza en una columna de 2cm de diámetro y 110cm de alto empacada con Sephadex® LH-20 sigma-Aldrich a una altura de 60cm. En esta columna se siembra una de las fracciones obtenidas de la cromatografía flash o una mezcla de varias fracciones que contengan un mismo metabolito en gran cantidad. La elución se realiza con EtOH como fase móvil y se trata de una columna abierta en la que la fase móvil cae por acción de la gravedad. Se obtienen fracciones que se secan al 10% de su volumen inicial aproximadamente y se realizan placas de control de TLC para determinar las fracciones que contienen los compuestos de interés. Las fracciones que contengan un compuesto en común se unen y se realiza una nueva placa de control para determinar su pureza. Se seleccionan aquellas que serán secadas y recristalizadas para la purificación de los compuestos de interés.

8.6 Purificación por recristalización

Las fracciones unidas y secas deben ser re-disueltas en la mínima cantidad posible de un solvente en el que sean medianamente solubles. En este caso se utilizó AcOEt para re-disolver la muestra y se le añadieron gotas de éter de petróleo 40-60 para bajar la polaridad de la solución. Esta solución se dejó reposar durante toda la noche cubierta de parafilm® con perforaciones para una evaporación lenta del solvente. Los cristales obtenidos fueron filtrados y lavados con gotas de etanol. Los cristales se llevaron a sequedad con ayuda de una bomba de alto vacío durante 24 horas. Luego de ser pesada, la muestra fue llevada al equipo de resonancia magnética nuclear para su elucidación estructural.

8.7 Elucidación estructural por RMN

Se utilizó un equipo Shield® de 300MHz para la obtención de espectros H^1 , C^{13} (unidimensionales) y COSY, HSQC y HMBC (bidimensionales) de los compuestos aislados. La muestra fue disuelta en DMSO.

8.8 Cuantificación por HPLC

Para la cuantificación del alcaloide mayoritario aislado se utilizó un equipo de HPLC Agilent 1100 Series. Con una columna Agilent, Eclipse plus C18 (5 μ m, 4.6x250mm). El sistema de solventes utilizado para la elución es: Solvente A) Acetonitrilo y solvente B) Acetato de amonio 1% ajustado a pH=8 con amoniaco. El gradiente de solventes se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Rampa de concentración y flujo de solventes utilizada en HPLC

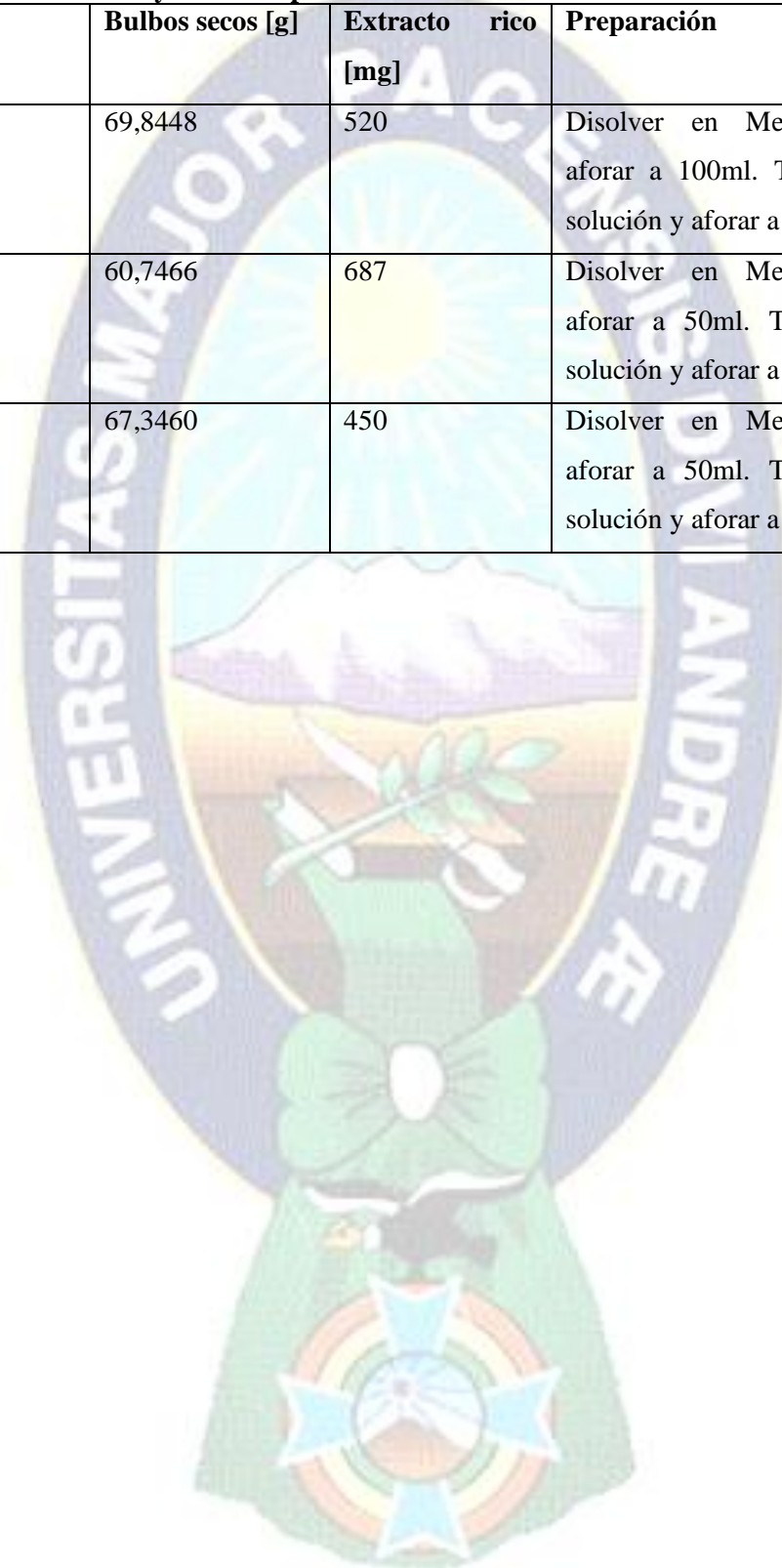
Sistema	Tiempo [min]	A [%]	B [%]	Flujo [ml/min]
1	0	20	80	0,6
2	11	40	60	0,5
3	25	40	60	0,5

Se prepararon soluciones patrón para elaborar una curva de calibración que permita la cuantificación de Hemantamina en los bulbos de *Stenomesson miniatum*. Para ello se prepararon soluciones de 192, 160, 128, 64 y 32ppm que se corrieron en el HPLC con el sistema de solventes mostrado en la Tabla 3.

El extracto rico en alcaloides se obtuvo a partir de bulbos secos de plantas colectadas en Charazani y de dos muestras colectadas en el campus de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales de la Univerisdad Mayor de San Andrés. El extracto se obtuvo mediante el procedimiento descrito en la sección 8.3. Los extractos ricos en alcaloides se disolvieron en MetOH (grado HPLC) y se realizaron las diluciones que se muestran en la Tabla 4 para realizar la cuantificación por HPLC.

Tabla 4. Masa de muestra seca y extracto rico en alcaloides proveniente de las plantas colectadas en Charazani y en el campus de la FCPN.

Muestra	Bulbos secos [g]	Extracto rico [mg]	Preparación
Charazani	69,8448	520	Disolver en MetOH (HPLC) aforar a 100ml. Tomar 1ml de solución y aforar a 10ml.
Campus AD	60,7466	687	Disolver en MetOH (HPLC) aforar a 50ml. Tomar 1ml de solución y aforar a 10ml.
Campus AF	67,3460	450	Disolver en MetOH (HPLC) aforar a 50ml. Tomar 1ml de solución y aforar a 10ml.



9 RESULTADOS

9.1 Obtención del extracto rico en alcaloides

La liofilización de las muestras de bulbos dio como resultado un total de 887.35 ± 0.25 g de muestra seca. En la Tabla 5 se muestran las masas obtenidas de cada procedimiento independiente de secado y el total de la masa seca obtenida.

Tabla 5. Masa obtenida de muestra seca. *Promedio de porcentaje de humedad en los bulbos.

Secado	Masa húmeda [g]	Masa seca [g]	Porcentaje de humedad [%]
1	1313,4425	221,8424	$83,10 \pm 0,20$
2	1350,4122	229,5736	$82,98 \pm 0,23$
3	1206,7189	215,7645	$82,11 \pm 0,15$
4	1206,1878	220,1819	$81,75 \pm 0,54$
Total	5076,7614	887,3624	$82,49 \pm 0,28$

A partir de la masa total de muestra seca se obtuvo un total de 109.90 extracto etanólico. En la Tabla 6 se muestran las masas de extracto obtenido de cada porción de muestra seca obtenida.

Tabla 6. Masa y rendimiento de los extractos alcohólicos obtenidos. *Promedio de porcentaje de rendimiento en base húmeda y seca.

Extracción	Masa húmeda [g]	Masa seca [g]	Masa extracto [g]	Rendimiento en base húmeda [%]	Rendimiento en base seca [%]
1	1313,44	221,84	27,40	$2,09 \pm 0,21$	$12,35 \pm 0,32$
2	1350,41	229,57	29,79	$2,21 \pm 0,12$	$12,13 \pm 0,12$
3	1206,71	215,76	25,84	$2,14 \pm 0,14$	$11,98 \pm 0,21$
4	1206,18	220,18	26,16	$2,17 \pm 0,24$	$11,88 \pm 0,22$
Total	5076,74	887,35	109,90	$2,15 \pm 0,17$	$12,08 \pm 0,23$

La unión de todas las porciones de extracto seco se disolvió con tres porciones de H_2SO_4 2% de 50, 30 y 20 ml, respectivamente. Las porciones se unieron y se filtraron para obtener un total de 100ml de solución acuosa. El sólido remanente se disolvió en etanol y se realizó una prueba en TLC para la presencia de alcaldes con reactivo de Dragendorff. La figura 10 muestra la placa de TLC que confirma la presencia de alcaloides en la solución acuosa y que no existen alcaloides en la fracción etanólica.



Figura 10 Placa de TLC revelada con Dragendorff. 1) Prueba positiva de alcaloides para el extracto en H_2SO_4 2%. 2) Prueba negativa para alcaloides en el remanente redisoluto en EtOH.

La solución acuosa se llevó a un pH=9 con amoníaco concentrado. El pH se determinó mediante papel tornasol. Una vez alcanzado el pH adecuado, se realizó una extracción líquido-líquido con porciones de 15ml de AcOEt hasta que la solución acuosa diera prueba negativa para presencia de alcaloides con el reactivo de Dragendorff. En la figura 11 se muestra la placa de prueba donde se observa que la siembra 3 no da prueba positiva para la presencia de alcaloides. La solución de AcOEt obtenida se llevó a sequedad a baño maría y se terminó de eliminar el solvente a presión reducida con una bomba de alto vacío para ser pesada. Se obtuvo una masa total de c de extracto rico en alcaloides.



Figura 11. Placa de TLC revelada con Dragendorff de las tres porciones de AcOEt de la extracción líquido-líquido. 1) Presencia de todos los alcaloides de la muestra. 2) presencia de al menos dos alcaloides. 3) no se detecta presencia de alcaloides.

9.2 SEPARACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS

9.2.1 Separación de alcaloides por cromatografía en columna

Selección de sistema de solventes para la separación por cromatografía flash.

La selección del sistema de solventes a usar para la separación en columna se realizó elaborando placas referenciales de TLC con diferentes sistemas de solventes. En la Tabla 7 se muestran los solventes y las proporciones de las mezclas utilizadas en las pruebas.

Tabla 7. Sistemas de solventes utilizados para las placas referenciales de TLC.

Sistema de solventes	Relación de solventes [%]	Placa
AcOEt	100	a
AcOEt-EtOH	95:5	b
AcOEt-EtOH	60:40	c
AcOEt-EtOH-NH ₄ ⁺	90:9.9:0.1	d

En la figura 12 se muestran los resultados de las pruebas de solventes en placas de TLC. En la placa a) se ve que los compuestos no han sido eluidos ya que el solvente utilizado es muy apolar y los metabolitos de la muestra son muy poco afines él. La placa b) muestra 2 compuestos eluidos y una mancha oscura que no ha sido totalmente eluida

desde el punto de siembra. Esta mancha corresponde a un grupo de compuestos que no han sido separados entre sí. La placa c) muestra que todos los metabolitos de la muestra han sido eluidos, sin embargo, no existe una separación notoria entre ellos. La placa d) muestra al menos 7 compuestos que han sido separados entre sí.

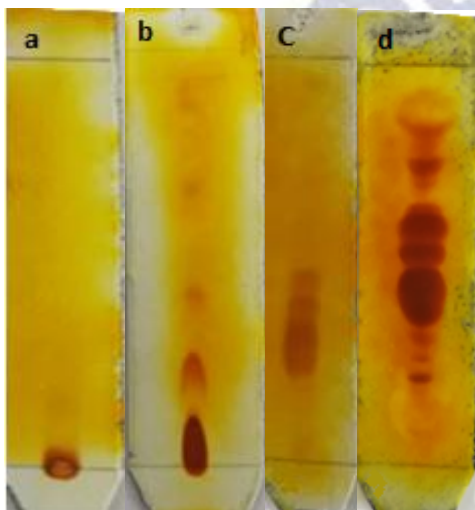


Figura 12. Placas realizadas para la selección de solventes a) AcOEt b) AcOEt-EtOH [95:5] c) AcOEt-EtOH [60:40] d) AcOEt-EtOH- NH₄⁺ [90:9,9:0,1]

Dado que la placa d muestra la mayor cantidad de compuestos eluidos y separados entre sí, se selecciona el sistema AcOEt-EtOH-NH₄⁺ [90:9.9:0.1] como el adecuado para la separación en columna. Si bien con los sistemas utilizados en las placas a, b y c no se obtuvieron resultados satisfactorios, en la placa b se puede observar que existen compuestos que han sido eluidos con facilidad. De esta manera, se determinó realizar la separación en columna flash con los solventes y volúmenes de solvente mostrados en la Tabla 8.

Tabla 8. Volúmenes y proporciones de solventes utilizadas para la separación en la columna flash. Tomar en cuenta que se debe añadir 1% de amoniaco concentrado a cada solución.

Sistema	Proporción [%]	Volumen [ml]	Fracciones	Total fracciones
AcOEt:EtOH	97:3	200±0,01	0	100
AcOEt:EtOH	95:5	200±0,01		
AcOEt:EtOH	93:7	200±0,01	A	40
AcOEt:EtOH	90:10	100±0,01		
AcOEt:EtOH	85:15	100±0,01	B	48
AcOEt:EtOH	80:20	200±0,01		
AcOEt:EtOH	75:25	200±0,01	C	100
AcOEt:EtOH	70:30	200±0,01		
AcOEt:EtOH	65:35	200±0,01		

9.2.2 Separación por cromatografía en columna flash.

La separación de alcaloides se realizó en una columna de vidrio de la marca GlassCobol de 30cm de alto y 5cm de diámetro empacada con Sílica-gel Sigma-Aldrich hasta alcanzar los 16cm de altura. Para la separación se utilizaron los sistemas de solventes descritos en la Tabla 7. Se obtuvieron un total de 284 fracciones divididas en secciones 0, A, B y C de acuerdo a la polaridad de los solventes siendo la fracción 0 la menos polar y la fracción C la más polar. La Tabla 9 muestra las secciones obtenidas y el número de fracciones por cada sección.

Tabla 9. Fracciones obtenidas de la separación por cromatografía flash. A todos los sistemas se les añadió 0.1% de NH_4^+ .

Fracciones	Total fracciones	Sistema	Proporción [%]
0	100	AcOEt:EtOH	97:3
		AcOEt:EtOH	95:5
A	40	AcOEt:EtOH	93:7
		AcOEt:EtOH	90:10
B	48	AcOEt:EtOH	85:15
		AcOEt:EtOH	80:20
C	76	AcOEt:EtOH	75:25
		AcOEt:EtOH	70:30
		AcOEt:EtOH	65:35

Una vez obtenidas las fracciones, se realizaron placas referenciales de TLC para verificar la presencia de alcaloides en las distintas fracciones. Los resultados de las placas se pueden observar en el Anexo 1. Las fracciones que contienen el mismo metabolito se unieron y concentraron para realizar una placa resumen de los compuestos separados. En la Tabla 10 se muestran las fracciones unidas. En la figura 13 se muestra la placa resumen realizada de las fracciones unidas. Además, se muestra la masa de muestra seca presente en cada unión. Cada unión se secó a baño maría a 40°C y se terminó de remover el solvente con ayuda de una bomba de alto vacío.

Como se observa en la Tabla 10 la unión de las fracciones 4-20B tiene una masa en seco de 214.17mg por lo que se eligió esta unión para realizar la separación por exclusión.

Tabla 10. Fracciones unidas provenientes de la separación por cromatografía flash.

Unión	Fracciones	Masa en seco [mg]
A	50-70	33,4
B	1-20A	37,1
C	4-20B	214,17
D	1-20C	27,2

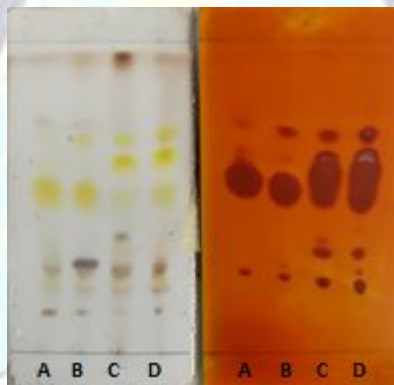


Figura 13. Unión de fracciones provenientes de la separación por cromatografía Flash. A) Unión de fracciones 50-70 B) Unión de las fracciones 1-20A. C) Unión de las fracciones 4-20B. D) Unión de las fracciones 1-20C.

9.2.3 Separación por cromatografía de exclusión

De las fracciones unidas provenientes de la separación en columna flash, se eligió la unión de las fracciones 4-20B para realizar una separación por exclusión. Se utilizó una columna de 110cm de altura y 2cm de diámetro rellena con Sephadex® LH-20 de Sigma-Aldrich (lote #SLBJ3546V) a una altura de 60cm. Se utilizó EtOH como fase móvil y se recolectaron fracciones cada 5 minutos a un flujo de 0.63ml/min.

Se obtuvo un total de 50 fracciones que fueron concentradas aproximadamente al 10% de su volumen original y con ellas se realizaron placas referenciales de TLC para verificar la separación de los alcaloides de la muestra. En la Tabla 11 se muestran las fracciones unidas y en la figura 14 la placa resumen de TLC de las uniones de fracciones vista bajo luz UV a 256nm y revelada con reactivo de Dragendorff.

Tabla 11. Fracciones unidas luego de la cromatografía de exclusión. A corresponde a una muestra de referencia.

Unión	Fracciones unidas	Masa en seco [mg]
A	1-10	13,4±0,1
B	11-18	17,1±0,1
C	19-25	12,2±0,1
D	26-35	23,1±0,1
E	36-43	20,3±0,1
F	44-50	18,2±0,1

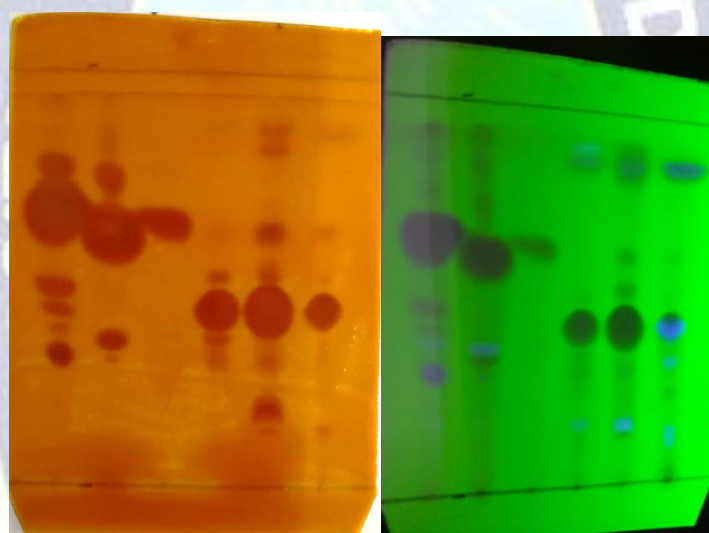


Figura 14 Placas de TLC de las uniones A, B, C, D, E Y F (de izquierda a derecha) de las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía de exclusión.

En la Figura 14 se puede observar que las uniones B, D, E y F presentan más de un compuesto. Sin embargo, se observa que la unión C muestra un solo alcaloide libre de la presencia de otros alcaloides u otros compuestos. Esta unión se selecciona para purificarla y pesarla.

9.2.4 Purificación por recristalización

La Unión C proveniente de la separación por cromatografía de exclusión fue sometida a un proceso de recristalización para su purificación. La muestra fue re-disuelta en la mínima cantidad necesaria de AcOEt para que toda la muestra se encuentre en solución. A esta solución se le agregaron gotas de éter de petróleo fracción 40-60 para

disminuir la polaridad de la solución. La solución se tapó con una lámina de Parafilm® a la que se le perforaron pequeños agujeros para permitir la evaporación de solvente y se dejó recristalizar durante una noche. Los cristales obtenidos fueron filtrados y lavados con gotas de etanol. Una vez lavados, se llevaron a secar en una bomba de alto vacío durante 2 horas. Una vez secos los cristales, se pesaron y se etiquetaron para su análisis por RMN. El peso total del compuesto obtenido fue de 7,2 mg.

9.3 Determinación estructural por RMN

La muestra pesada se llevó nuevamente a secar a presión reducida con una bomba de alto vacío durante 7 horas. Una vez seca, la muestra se analizó por RMN. Esta fue disuelta en cloroformo deuterado y se obtuvieron espectros H^1 , C^{13} , COSY, HSQC Y HMBC. En las figura 16 y 19 se pueden observar los espectros obtenidos de H^1 y C^{13} , respectivamente. En las figuras 17 y 18 se muestran ampliaciones de dos regiones del espectro de H^1 . Los espectros bidimensionales; COSY, HSQC Y HMBC se muestran en el anexo 2. La figura 15 muestra la estructura determinada por RMN.

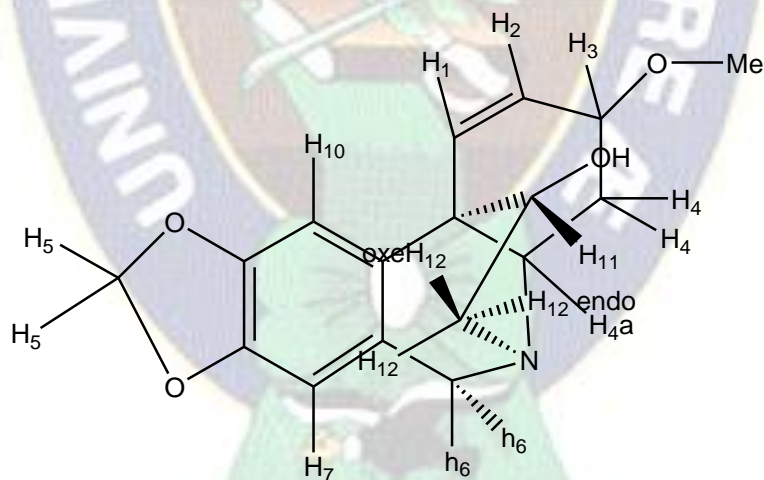


Figura 15 Estructura determinada mediante Resonancia Magnética Nuclear. La estructura corresponde a la Hemantamina.

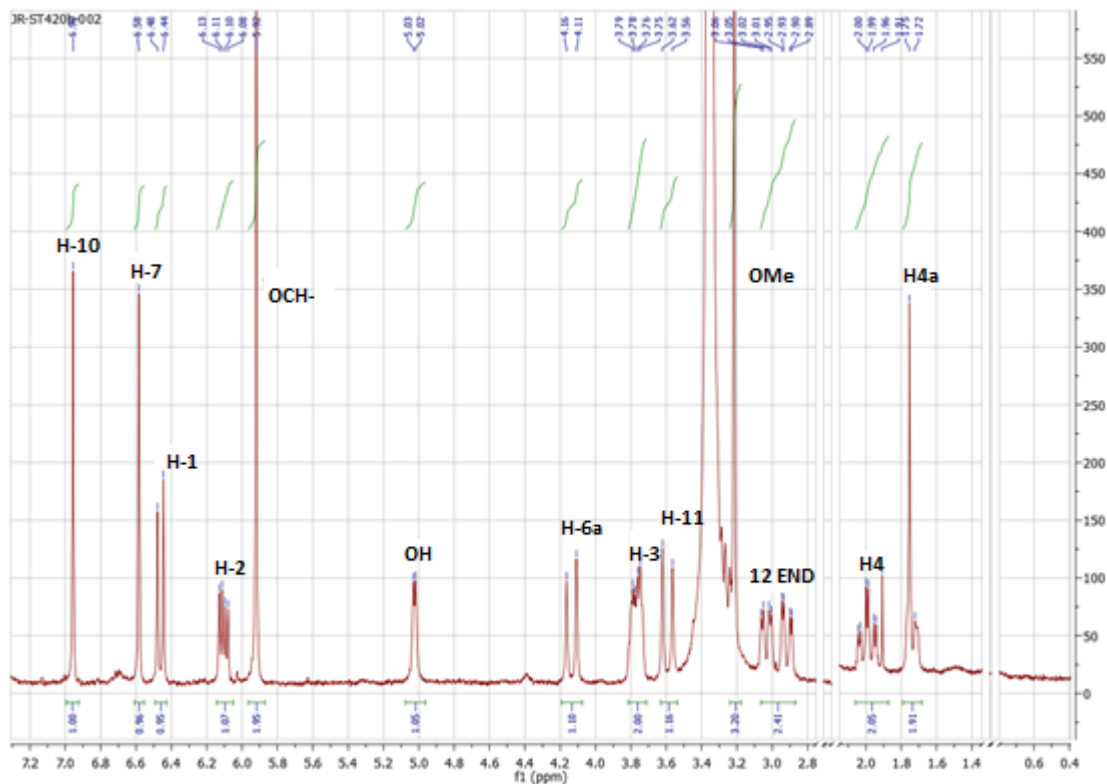


Figura 16 Espectro de H^1 obtenido por RMN. Se muestran 13 señales correspondientes a los 19 hidrógenos de la Hemantamina.



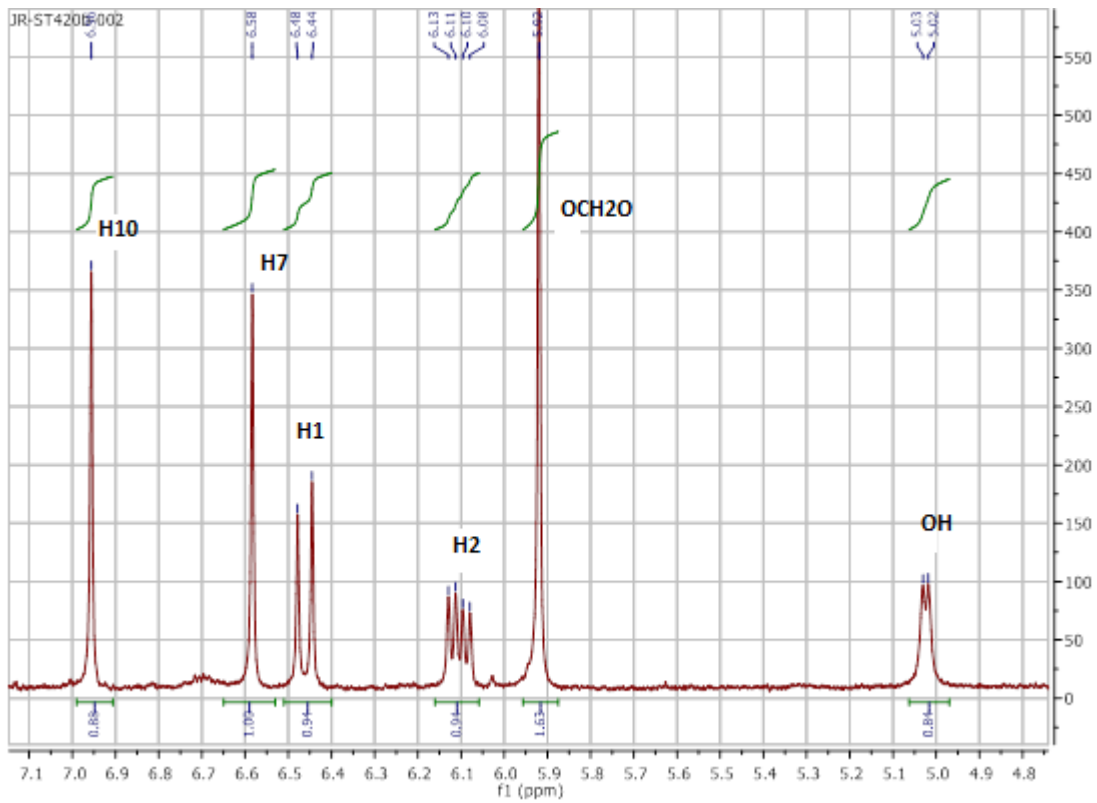


Figura 17. Ampliación de la sección entre 4.8 y 7.1 del espectro de H¹ obtenido por RMN.



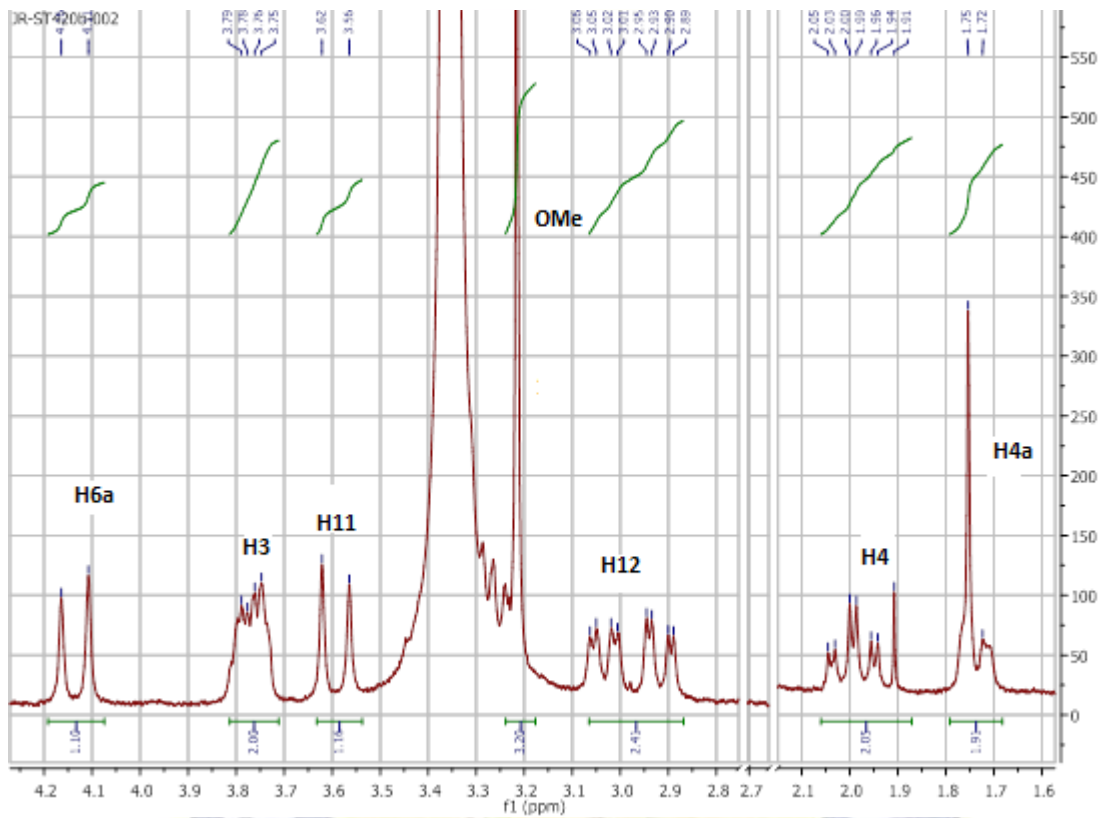


Figura 18. Ampliación de la sección entre 0 y 4.7 del espectro de H^1 obtenido por RMN.

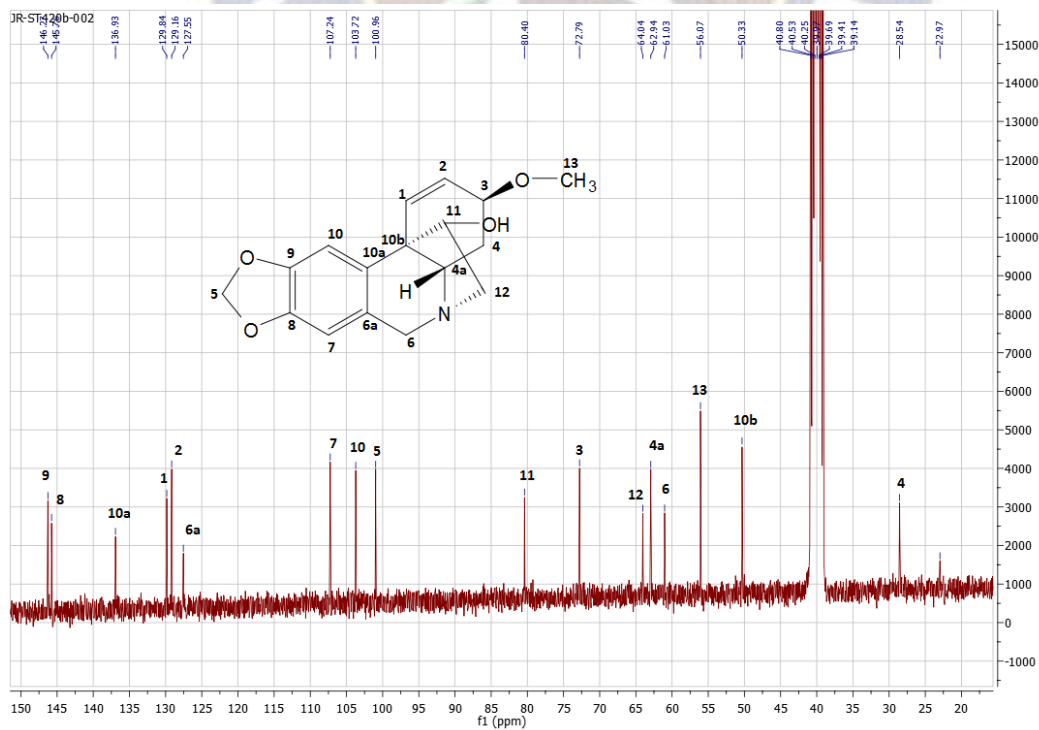


Figura 19. Espectro de C^{13} obtenido por RMN.

En la Tabla 12 se pueden observar los desplazamientos químicos para el H¹ y C¹³. Además, se observan los datos obtenidos de los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC para la elucidación estructural de la molécula.

Tabla 12. Desplazamientos de H¹, C¹³ y datos obtenidos de los espectros COSY, HSQC y HMBC.

H ¹	δH	C ¹³	δC	COSY	HSQC	HMBC
H-10	6.95	9	146,27		9-Cuat	9-H-7 (H-10,OCH-70)
H-7	6.58	8	145,76		8-Cuat	8-H-10 (H-7,OCH-70)
H-1	6.46	10 a	136,39	H-1-H-2	10a-Cuat	10a-H-7,H-1
H-2	6.1	1	129,94	H-2-H-1	1-H-1	1-H-3
OCH2O	5.92	2	129,16		2-H-2	2-H-3
OH	5.02	6 a	127,55	OH-H-11	6a-cuat	6a-H-10
H-3	3.77	7	107,24	H-6α-H-6β	7-H-7	7-(H-10)
H-11	3.76	10	103,72	H-3-OMe	10-H-10	10-(H-7)
H-6	3.59	5	100,96	H-11-OH	5-OCH-70	
H-12exo	3.35	11	80,43	H-6β-H-12endo,OMe	11-H-6α	
OMe	3.21	3	72,79	H-12endo-H-6β,H-4α	3-H-3	3-H-6β (H-1,H-2)
H-4	2.91	12	64,04	OMe-H-6β	12-OMe	12-(OH)
H-4α	1.99	4 a	62,24	H-4α-H-12endo	4a-H-12endo	4a-H-1 (H-11)
		6	61,03	H-12exo-H-6β	6-H-11	6-H-7 (H-6β)
		13	56,07		13-H-6β	13-OMe (H-12endo)
		10b	50,33		10b-cuat	10b-H-10 (H-1,H-2)
		4	28,94		4-H-4α	4-H-2

Con los datos obtenidos de los espectros tanto unidimensionales como bidimensionales, se logró determinar la estructura del alcaloide de la muestra. La figura 20 muestra la estructura de la molécula que corresponde a la Hemantamina.

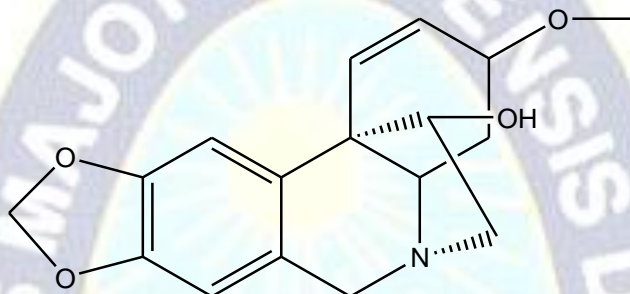


Figura 20 Estructura de la Hemantamina elucidada por RMN.

9.4 Cuantificación de Hemantamina por HPLC

Para la cuantificación se utilizó el equipo descrito en la sección 8.8 y el sistema de solventes descrito en la Tabla 3. En la figura 21 se muestra el cromatograma obtenido del extracto rico en alcaloides procedente de la muestra de bulbos de *Stenomesson miniatum* colectada en Charazani. En la figura 22 se muestra el cromatograma obtenido del patrón de Hemantamina aislado previamente de las muestras de bulbos de Charazani. En la Tabla 13 se muestran los resultados de las áreas de los picos tanto de la muestra como de las soluciones patrón y en la gráfica 1 se observa la curva de calibración obtenida. Los cromatogramas de las muestras ADB, AFD y Charazani se muestran en el anexo 3.

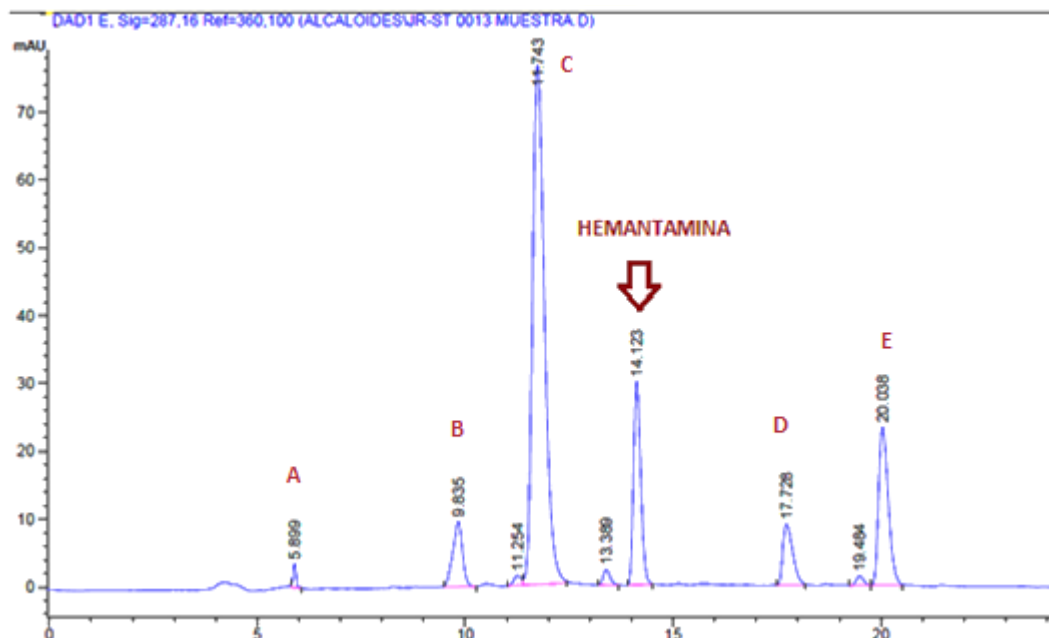


Figura 21. Cromatograma del extracto rico en alcaloides de bulbos de *Stenomesson miniatum*. Se detalla el pico a 14.123min que corresponde a la Hemantamina. mAU= unidades arbitrarias de intensidad del detector DAD. Los compuesto no identificados se denominan como; A, B, C, D y E.

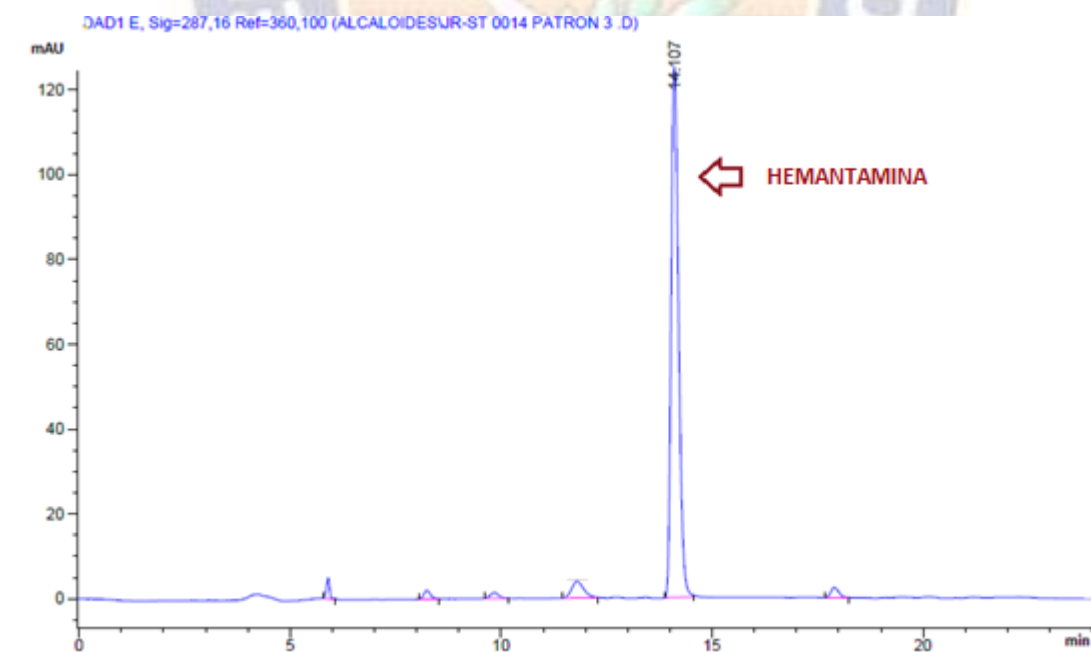


Figura 22. Cromatograma del patrón de Hemantamina. La hemantamina tiene un tiempo de retención de 14.107 con el sistema de solventes utilizado en el HPLC. mAU= unidades arbitrarias de intensidad del detector DAD.

Tabla 13. Datos obtenidos por HPLC de las 5 soluciones patrón utilizadas para elaborar la curva de calibración y la muestra de extracto rico en alcaloides.

Lectura	T. de retención [min]	Area [mAU*s]	Concentración [ppm]
Patrón 1	14,11	1517,37	192
Patrón 2	14,12	1271,27	160
Patrón 3	14,11	1031,09	128
Patrón 4	14,11	481,04	64
Patrón 5	14,12	269,63	32
Charazani	14,12	361,76	45,74
Campus AD	14,27	866,3	109,39
Campus AF	14,23	1211,61	152,95

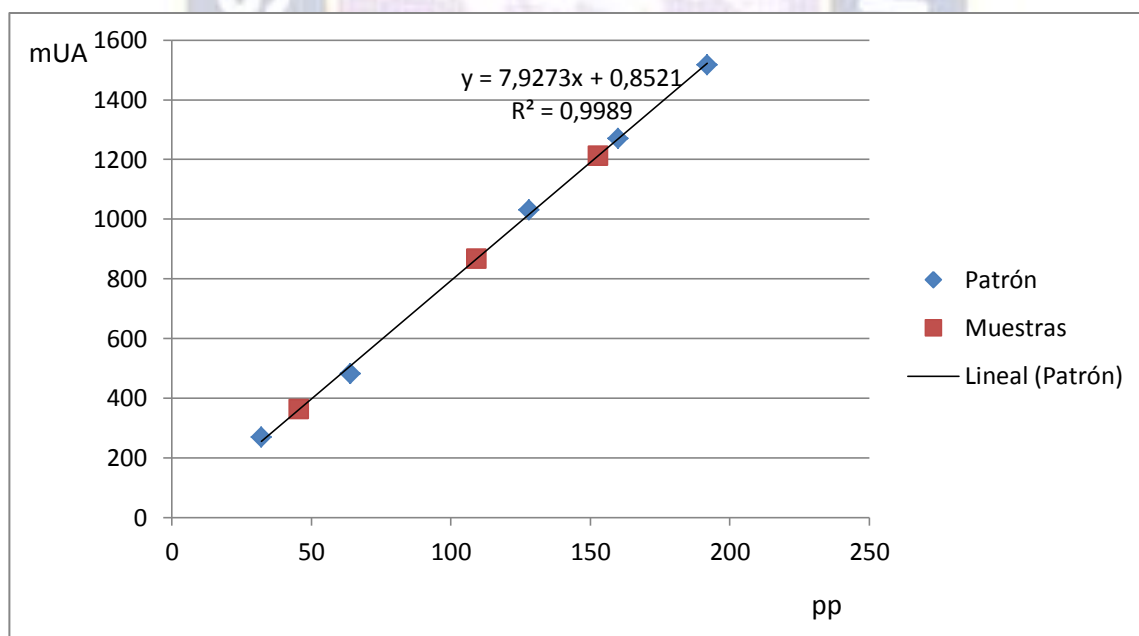


Gráfico 1. Curva de calibración obtenida con las soluciones patrón de Hemantamina (azul). Concentraciones calculadas para las muestras de plantas de Charazani y del campus de la FCPN (rojo). La recta muestra un coeficiente de correlación $R^2=0.9989$

Se logró determinar la concentración de Hemantamina y de alcaloides totales, en función a esta, de los extractos de muestras de Charazani y plantas del invernadero de física de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales. En la tabla 14 se muestra la masa de extracto rico en alcaloides obtenida de cada muestra y la cantidad de Hemantamina en el extracto rico en alcaloides. Por otro lado, en la tabla 15 se muestra la cantidad de Hemantamina por gramo de muestra seca disponible en cada una de las muestras y, de igual manera, la cantidad de alcaloides totales, respecto a la Hemantamina, por gramo de muestra seca.

Tabla 14. Masa de los bulbos secos, extracto rico en alcaloides y Hemantamina obtenida a partir de bulbos secos de las diferentes muestras.

Colecta	Muestra seca [g]	Ext. Rico en Alcaloides [mg]	Hemantamina en el extracto [mg]
Charazani	69,8448	520	45,75
Campus AD	67,3460	450	54,70
Campus AF	60,7466	743	76,47

Tabla 15. Cantidad de Hemantamina y de alcaloides totales presentes en las muestras colectadas.

Colecta	Hemantamina [mg/g de muestra seca]	Porcentaje de Hemantamina en el extracto [%]	Alcaloides totales [mg/g de muestra seca]
Charazani	0,66	8,80	7,45
Campus AD	0,81	12,15	6.68
Campus AF	1,26	10,29	11.31

- Análisis de muestras de *Stenomesson miniatum* por GC-MS

El análisis por GC-MS de muestras de la especie *Stenomesson miniatum* se realizó en colaboración con la Universidad de Barcelona. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16. Resultados reportados por la universidad de Barcelona del análisis por GC-MS.
*La codeína se utilizó como patrón interno.**

Alcaloide	Rt	RI	Total [%]
Ismine	21,324	2390,8	0,83
Trisphaeridine	21,627	2410,2	<0,1
Galanthamine	23,231	2524,9	<0,1
Codeine	24,100	2571,8	10,68
Vittatine (crinine)	24,666	2609,4	8,99
Galanthandole	24,962	2630,0	2,95
8-O-demethylmaritidine	25,075	2637,8	0,51
Anhydrolycorine	25,080	2638,2	0,40
O-methyltazettine	26,543	2740,0	4,15
11,12-dehydroanhydrolycorine	26,627	2745,8	0,70
Haemanthamine	27,146	2782,0	39,69
Tazettine	27,254	2789,5	4,51
Hippamine	27,555	2810,4	<0,1
Stembergine	28,024	2843,1	0,77
11-hydroxyvittatine	28,137	2850,9	2,18
Lycorine	28,670	2888,0	1,27
Homoycorine	29,455	2942,7	6,59
8-O-demethylhomolycorine	29,499	2945,7	1,00
Hippeastrina	30,589	3021,6	5,23

En los resultados obtenidos se observa que la Hemantamina es el alcaloide mayoritario y que existen otros alcaloides en concentraciones significativas: crinina, galantindol, O-metiltazetina, tazetina, licorina y homolicorina.

Las pruebas realizadas en la Universidad de Barcelona muestran que el extracto rico en alcaloides muestra una buena actividad como inhibidor de la Acetilcolinesterasa

y una actividad media contra la butirilcolinesterasa. La tabla 17 muestra los resultados de estas pruebas.

Tabla 17. Resultados de las pruebas del extracto de alcaloides contra AChE y BuChE.

	IC ₅₀ (µg/ml)	R ²
AChE	7,16±0,23	>0,99
BuChE	61,25±8,11	>0,99



10 CONCLUSIONES

Mediante el método descrito en diagrama 1 se logró obtener un extracto rico en alcaloides a partir de un extracto alcohólico de bulbos secos de la especie *Stenomesson miniatum*. A partir de 5076.74g de muestra fresca se obtuvieron 887.35g de muestra seca. La muestra de bulbos frescos contiene en promedio un 82.59% de agua. A partir de la muestra seca y gracias a la metodología descrita en la sección 8.3 se obtuvieron 2,3045g de extracto rico en alcaloides, lo que representa un rendimiento de 0.26% respecto a la masa de muestra seca. En el extracto rico en alcaloides se logró confirmar la presencia de al menos 7 alcaloides (ver figura 12) mediante identificación en placas de TLC reveladas con reactivo de Dragendorff. Se logró determinar que existen dos alcaloides mayoritarios presentes en los bulbos de esta planta.

Se logró identificar uno de los compuestos mayoritarios de esta especie mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Mediante espectros obtenidos de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC Y HMBC se logró determinar la estructura que se muestra en la figura 12 que corresponde a la Hemantamina, un alcaloide tipo Crinina que es común en plantas del género *Stenomesson*.

Se realizó la cuantificación de hemantamina y del contenido total de alcaloides de muestras de plantas colectadas en el municipio de Charazani y en el invernadero del Instituto de Investigaciones Físicas ubicado en el campus de Cota Cota de la FCPN de la UMSA. Se logró determinar que en los bulbos de la especie *Stenomesson miniatum* colectada en el municipio de Charazani, se pueden encontrar 0.66mg de Hemantamina por gramo seco de bulbos y 7,45mg de alcaloides totales por gramo de muestra seca. Por otro lado, en las muestras colectadas en el invernadero tienen se pueden encontrar 0.81mg de Hemantamina por gramo de muestra seca y 6,68mg de alcaloides totales por gramo de muestra seca para plantas que recibieron poca radiación UV (dentro de carpa) y 1,26mg de Hemantamina por gramo de muestra seca y 11,31mg de alcaloides totales por gramo de muestra seca en plantas que han estado expuestas a la radiación solar de manera constante (al aire libre y sin sombra natural).

Se observa que las plantas colectadas en el invernadero tienen una mayor concentración de alcaloides totales que las muestras colectadas en Charazani. Por otro lado, entre las plantas colectadas en el invernadero, se observó que aquellas que recibieron mayor cantidad de radiación presentan una mayor concentración de alcaloides totales. Si bien la cantidad de radiación juega un papel importante en la producción de metabolitos secundarios en las plantas, en este caso, existen otros factores que hacen que la concentración de alcaloides varíe entre plantas de distintos lugares. Un factor importante a tomar en cuenta es la etapa de desarrollo de la planta en el momento de la colecta, las plantas colectadas en Charazani se encontraban en flor y sin presencia de hojas, por otro lado, las plantas colectadas en el campus de la FCPN si presentaban hojas y no se encontraban en etapa de floración.

Si bien las plantas que reciben mayor radiación presentan mayor contenido de alcaloides totales, se observa que el contenido de Hemantamina es menor en estas. Esto puede deberse a que el exceso de radiación beneficia la producción de alcaloides específicos priorizando materia prima y energía en la producción de estos alcaloides en desmedro de la producción de otros como la Hemantamina.

Los resultados del análisis de extractos de bulbos de *Stenomesson miniatum* por GC-MS, realizados en colaboración con la Universidad de Barcelona, y en estudios de la especie *Stenomesson auriantiacum* (K. Acosta, 2014) se ha verificado la presencia de hemantamina como uno de los alcaloides mayoritarios presentes en los bulbos de esta especie. Algunos de los alcaloides identificados en plantas de este género son; licorina, tazatina, galantamina, hipeastidina, (*Stenomesson auriantiacum*) y crinina, galantindol, O-metiltazetina, tazetina, licorina y homolicorina (*Stenomesson miniatum*), por lo que se esperaría que los alcaloides identificados en la especie *Stenomesson miniatum*, cuya estructura no ha sido determinada, se traten de alcaloides con esqueletos similares a los presentes en otras plantas de este género.

El uso que la medicina tradicional boliviana le da a la planta *Stenomesson miniatum* o “Pulu Pulu” se justifica debido al contenido de alcaloides como la Hemantamina, lycorina y otros. El extracto rico en alcaloides es activo como inhibidor de acetilcolinesterasa y distintos alcaloides, por sí solos, tienen propiedades de alto interés como inductores de apoptosis en líneas de cáncer resistentes a este proceso, además de presentar propiedades citotóxicas y citostáticas contra diversas líneas de cáncer.



11 RECOMENDACIONES

Al realizar la separación de los alcaloides de los extractos se ha observado que los métodos de cromatografía en columna, tanto flash como de exclusión no resultaron eficientes ya que solo lograron separar un compuesto mayoritario. Por este motivo, dado que el método de HPLC utilizado permite una buena separación de los metabolitos presentes en el extracto rico en alcaloides, se recomienda utilizar este método a mayor escala en un equipo de HPLC preparativo para obtener compuestos puros para su análisis por RMN y GC-MS.

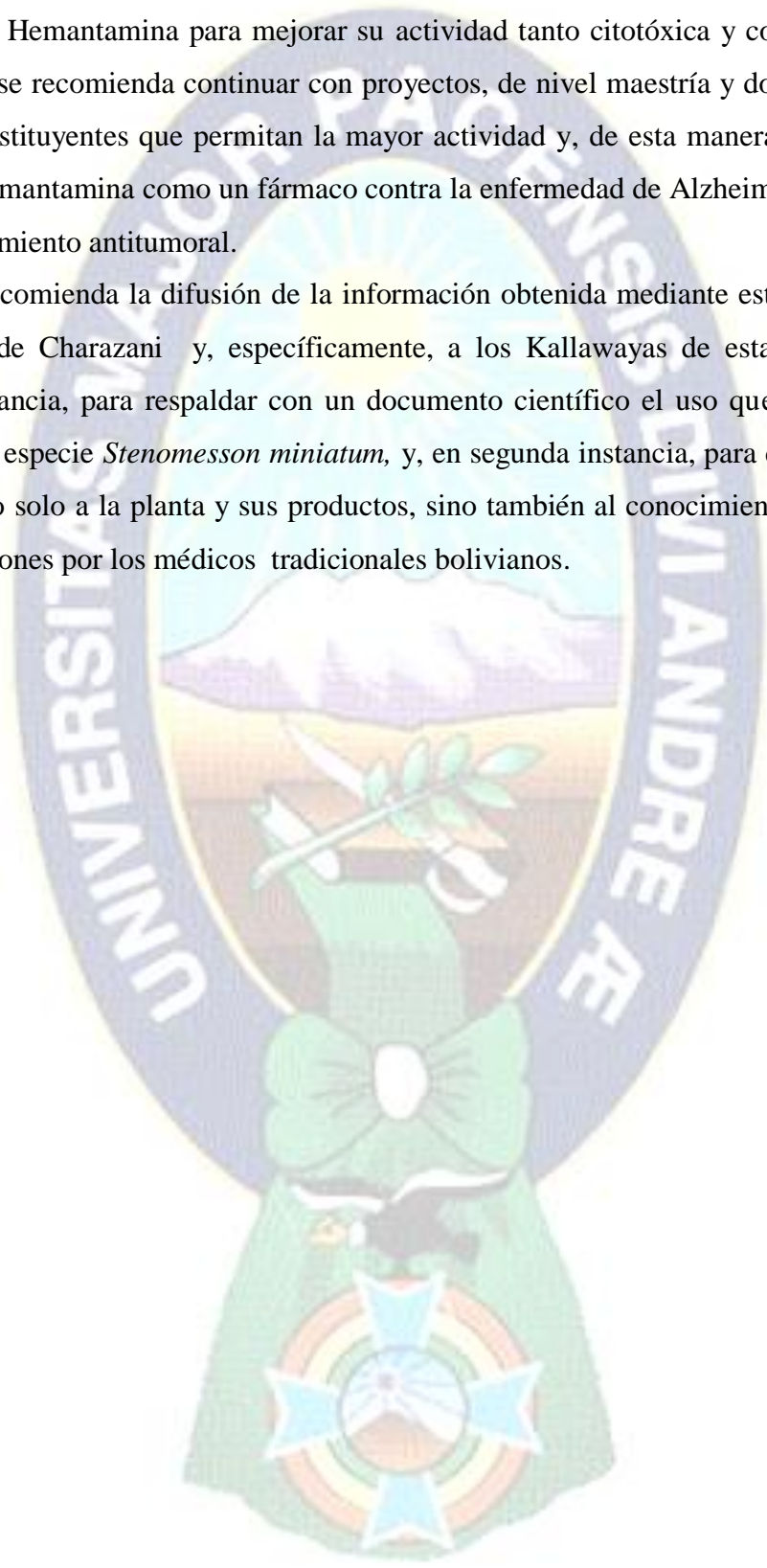
Si bien se ha logrado comparar la producción de alcaloides totales y de Hemantamina entre las plantas colectadas en Charazani y en el invernadero de física, se recomienda que se realice una nueva cuantificación con plantas que hayan sido colectadas en la misma época del año y, por ende, en la misma etapa de desarrollo. De igual manera se recomienda colectar plantas en ambos sitios de muestreo en distintas etapas de maduración y compararlas entre sí.

Dado que se ha observado que la concentración de Hemantamina disminuye en plantas que han recibido mayor radiación. Se recomienda realizar pruebas en condiciones controladas con plantas irradiadas con distintas intensidades de luz UV y por distintos periodos de tiempo para verificar si existe una relación directa entre el incremento de la radiación UV que recibe la planta y tanto el incremento de la producción de alcaloides totales, como la disminución de la concentración de Hemantamina.

Una vez que se cuente con los alcaloides aislados y se haya determinado su estructura, se recomienda realizar pruebas de actividad como inhibidores de Acetilcolinesterasa, actividad apoptótica, citotóxica, citostática y propiedades antibacterianas, antiparasitarias y antifúngicas.

En vista de que se han empezado a realizar estudios de hemisíntesis sobre la molécula de Hemantamina para mejorar su actividad tanto citotóxica y como inhibidor enzimático, se recomienda continuar con proyectos, de nivel maestría y doctorado, para encontrar sustituyentes que permitan la mayor actividad y, de esta manera, permitan el uso de la Hemantamina como un fármaco contra la enfermedad de Alzheimer y como un posible tratamiento antitumoral.

Se recomienda la difusión de la información obtenida mediante este trabajo a la comunidad de Charazani y, específicamente, a los Kallawayas de esta región. En primera instancia, para respaldar con un documento científico el uso que le dan a los bulbos de la especie *Stenomesson miniatum*, y, en segunda instancia, para darle un valor agregado, no solo a la planta y sus productos, sino también al conocimiento acumulado por generaciones por los médicos tradicionales bolivianos.



11 ANEXOS

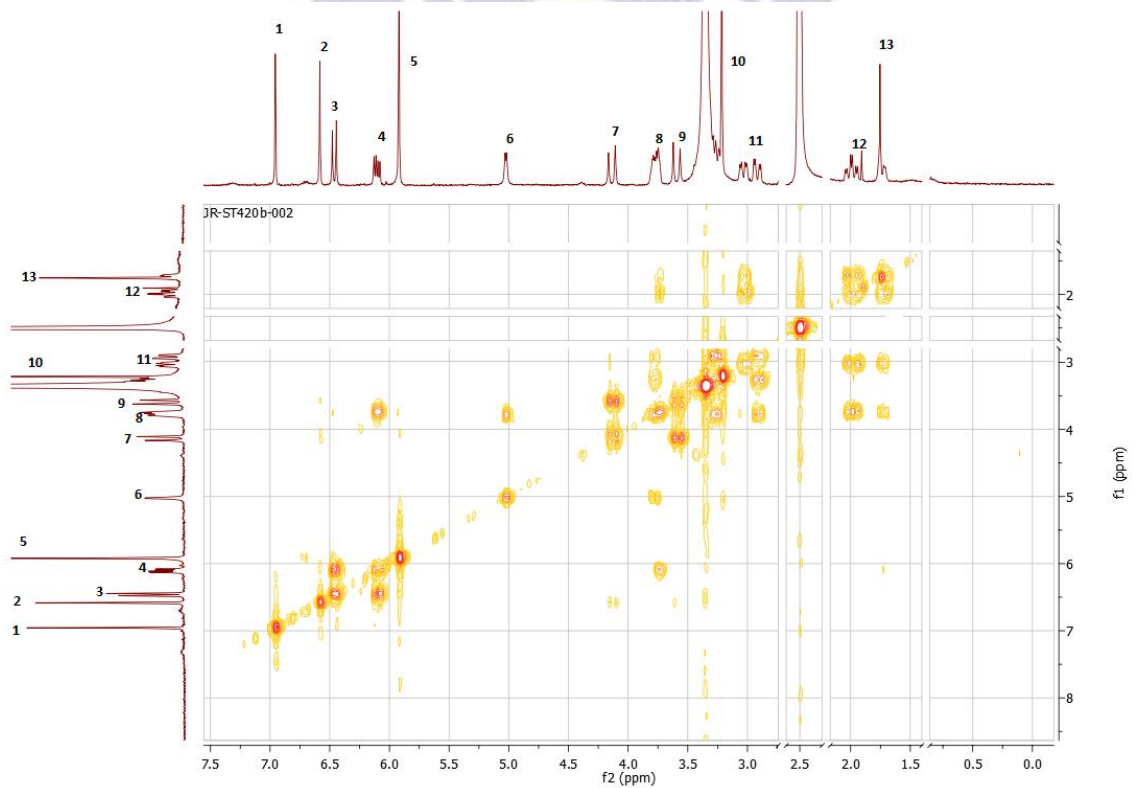
Anexo 1

Pruebas de presencia de alcaloides con reactivo de Dragendorff para las placas de las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía flash.

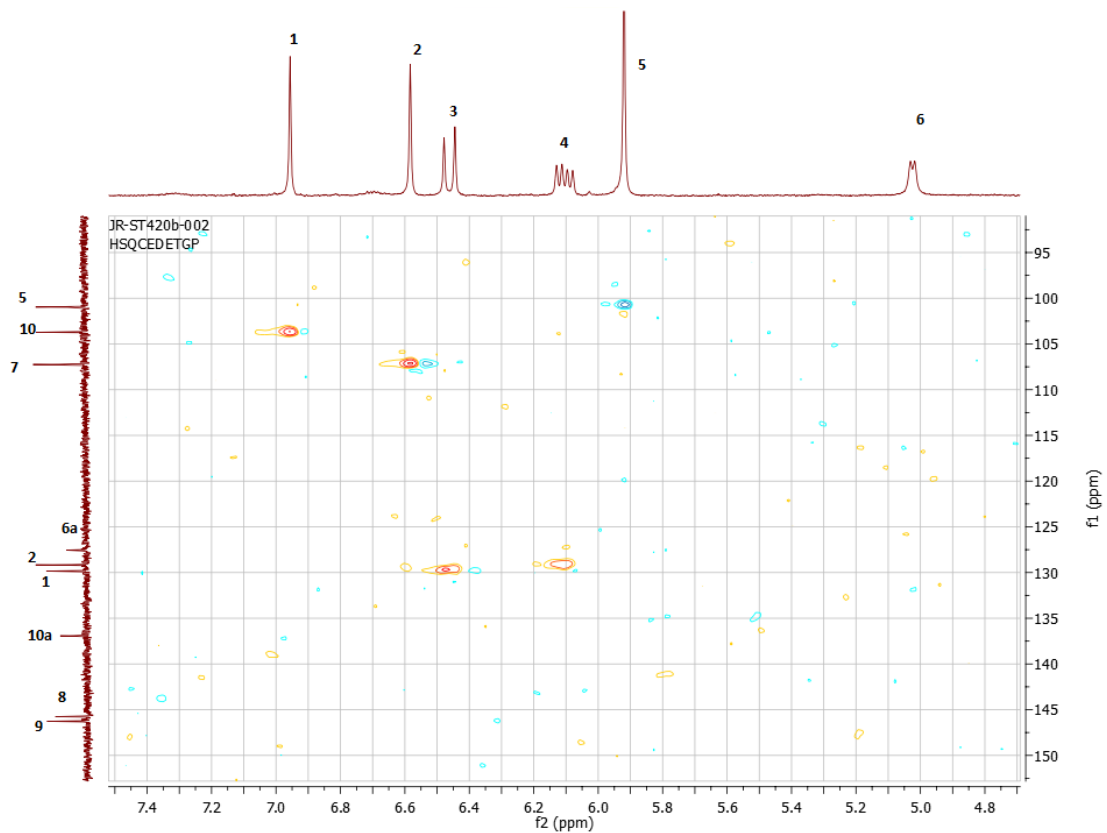
Fracción	Dragendorff	Fracción	Dragendorff
1	-	8B	++
4	-	12B	++
8	-	16B	++
12	-	20B	++
16	-	24B	-
20	-	28B	-
24	-	32B	+
28	-	36B	+
32	-	40B	+
36	-	44B	+
40	-	48B	+
44	-	1C	+
48	-	4C	+
52	-	8C	+
56	-	12C	+
60	-	16C	+
64	-	20	+
68	-	24C	+
72	-	28C	+
76	-	32C	+
80	-	36C	+
84	-	40C	+
88	-	44C	-
92	-	48C	-
96	-	52C	+
100	-	56C	+
1 A	-	60C	+
4 A	-	64C	+
8 A	-	68C	+
12 A	-	72C	+
16 A	-	76C	+
20 A	-		
24 A	+		
28 A	+		
32 A	+		
36 A	+		
40 A	+		
1B	++		
4B	++		

Anexo 2

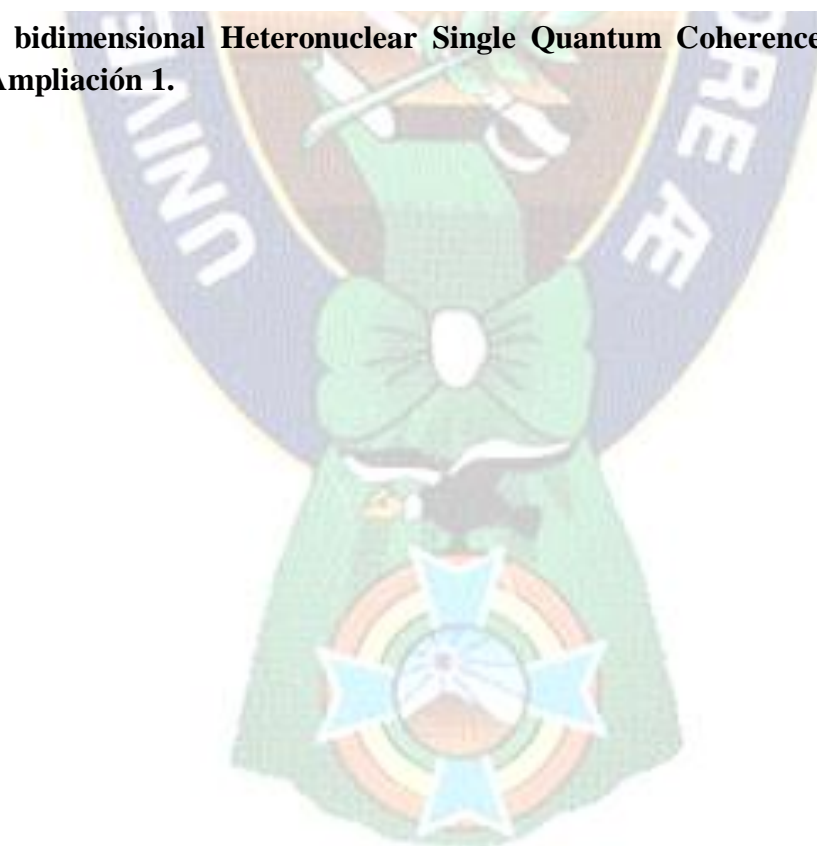
Espectros bidimensionales obtenidos de la muestra de Hemantamina.

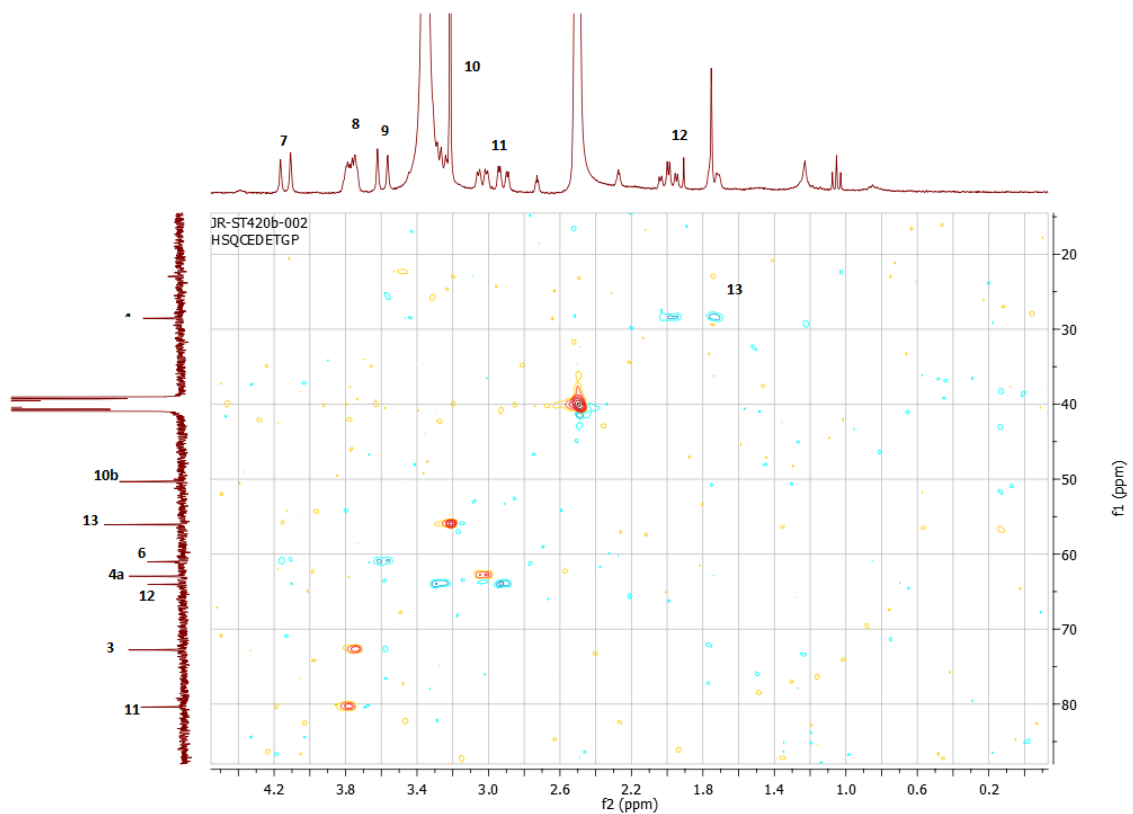


Espectro bidimensional Correlated Spectroscopy COSY.

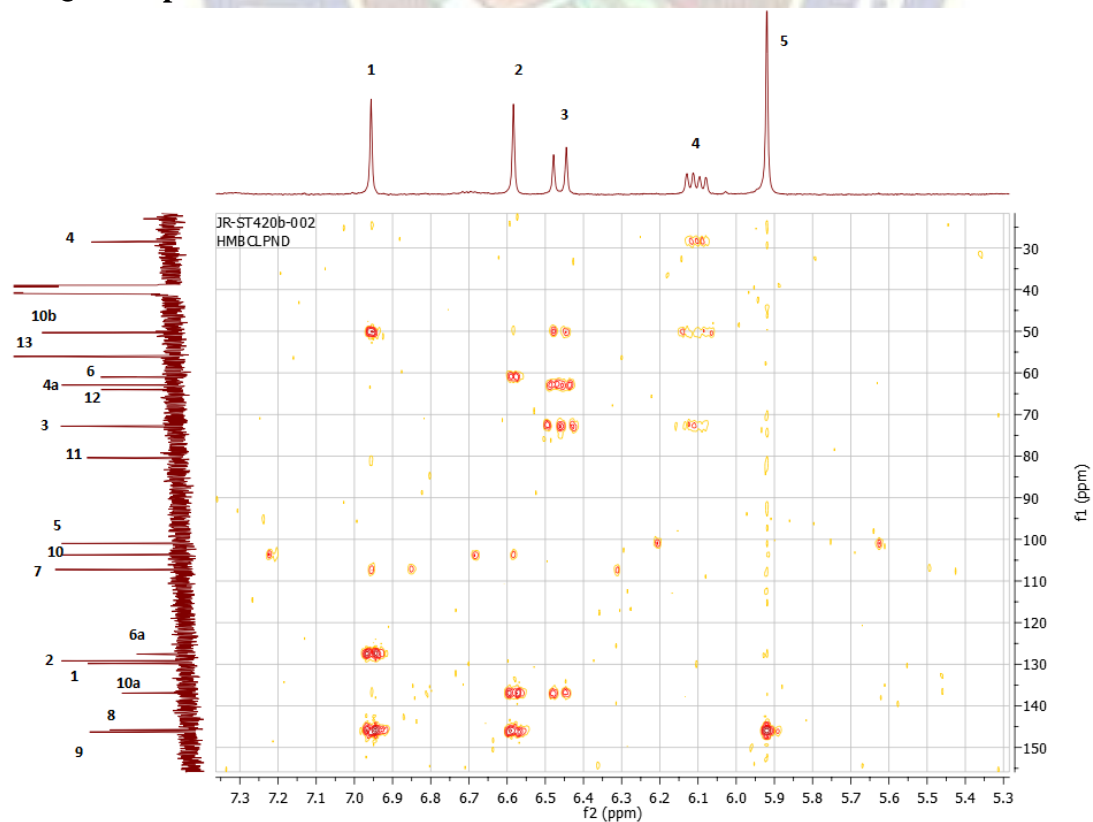


Espectro bidimensional Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy HSQC. Ampliación 1.

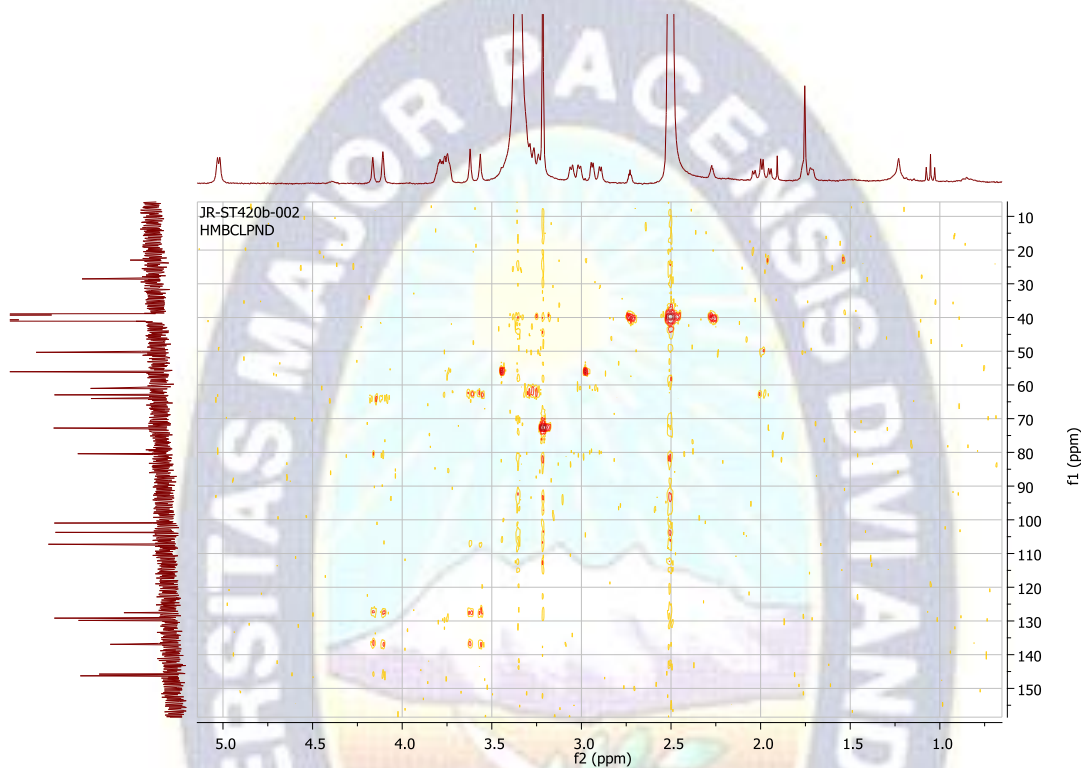




Espectro bidimensional Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy HSQC. Ampliación 2.



**Espectro bidimensional Heteronuclear Multiple Bond Correlation HMBC.
Ampliación 1.**

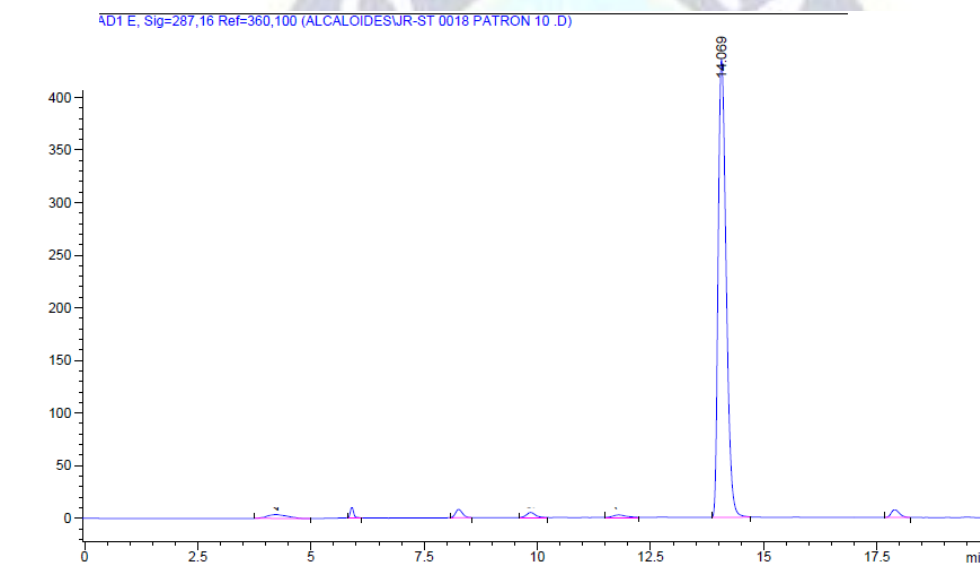


**Espectro bidimensional Heteronuclear Multiple Bond Correlation HMBC.
Ampliación 2.**



Anexo 3

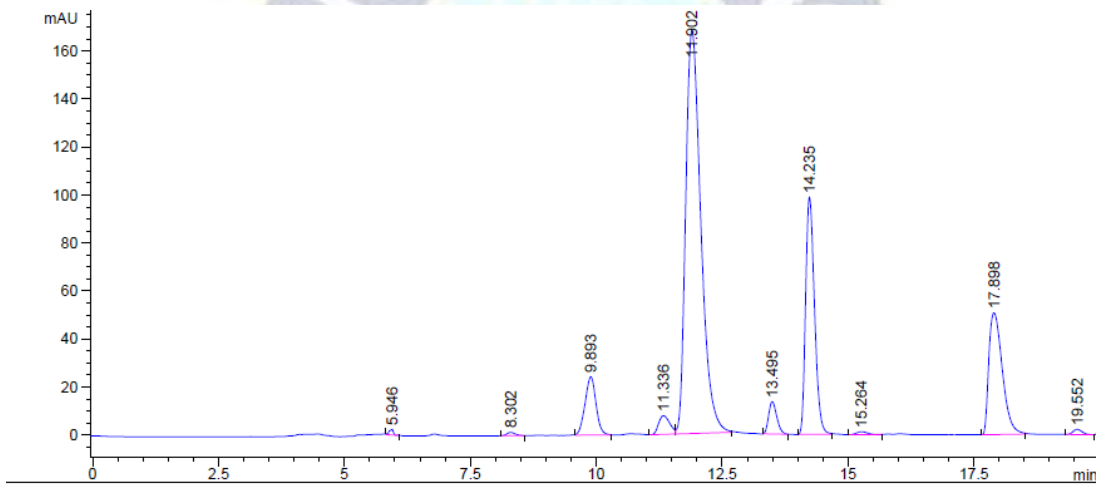
Se muestra el cromatograma obtenido para el patrón de Hemantamina. A partir de este patrón se preparó una curva de calibración con 5 patrones de distintas concentraciones.



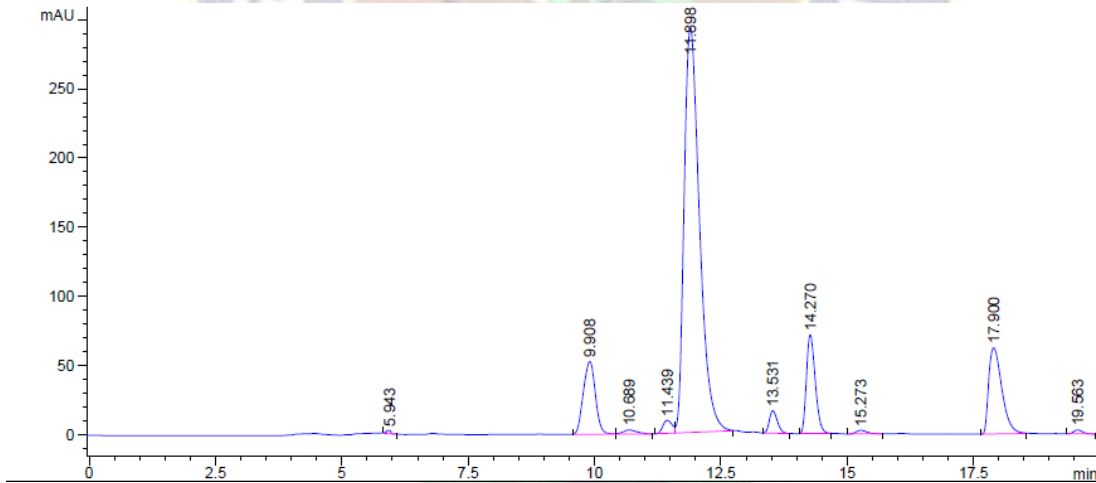
En el cuadro se muestran los resultados de los patrones de hemantamina. Se utilizó el área del pico para elaborar la curva de calibración.

Lectura	Concentración	Area uAU*S
Patrón 1	192	1517,37
Patrón 2	160	1271,27
Patrón 3	128	1031,09
Patrón 4	64	481,04
Patrón 5	32	269,63
Charazani	45,74	361,76
ADB	109,391	866,30
AFB	152,95	1211,61

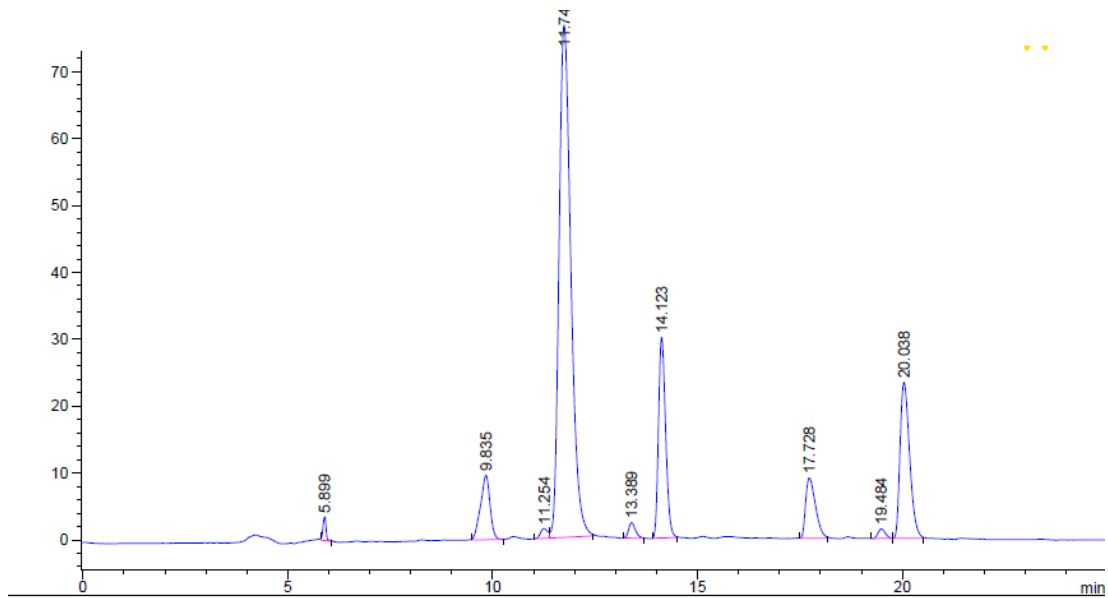
Se muestran los cromatogramas obtenidos para las muestras AFB, ADB (cota cota) y Charazani.



Cromatograma de la muestra ADB



Cromatograma de la muestra AFB.



Cromatograma de la muestra de Charazani.



12 BIBLIOGRAFÍA

- A. Emir, D. C. (2013). Simultaneous Determination of Lycorine and Galanthamine in *Galanthus woronowii* by HPLC-DAd.
- AMEisen, J. (1996). The Origin of Programmed Cell Death. *Science*.
- Amina H. Abou-Donia, S. M. (2008). New Rapid Validated HPTLC Method for the Determination. *Phytochemical analysis*.
- Armarego, W. L., & Chai, C. L. (2003). Purification of laboratory chemicals. *Butterworth-Heinemann*.
- B. Weniger, L. I. (1994). Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica*.
- biosciences, A. (2018). Handbook of gel filtration. *Amersham biosciences*, 81-85.
- Cai, L. (2018). Thin Layer Chromatograph. *Division of Mathematics and Science, University of South Carolina Salkehatchie, Walterboro,, Unit 6.3*.
- Craig D. Simpson, K. A. (2008). Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Letters*.
- Cram, D. J. (1978). Flash Chromatography. *Journal of Organic chemistry*.
- Eliška Kohelová, R. P. (2019). Derivatives of the B.crinine Amaryllidaceae Alkaloid Haemantamine as Multi-Target Direct ligands for Alzheimers disease. *Molecules*.
- Esameldin E. Elgorashi, J. v. (2009). Bioactivity and bioactive compounds of African Amaryllidaceae. American Chemical Society.
- Faustin Armel Etiendele Sosso, O. N. (2017). Epidemiology of Alzheimers disease. *Journal of Neurology and Neuroscience*.
- Giovanni Luchetti, R. J.-T. (2012). Bulbispermine: A Crinine-Type Amaryllidaceae Alkaloid Exhibiting Cytostatic Activity Toward Apoptosis-Resistant Glioma Cells. *ChemMedChem*.
- Gwendoline Van Goietsenoven, A. A. (2009). Amaryllidaceae Alkaloids Belonging to Different Structural Subgroups Display Activity against Apoptosis-Resistant Cancer Cells. *Journal of Natural Products*.
- Heinrich, M. (2010). Galanthamine from *Galanthus* and other amaryllidaceae. En M. Heinrich.
- Hengartner., M. (2000). The Biochemistry of Apoptosis. *Nature*.
- Ibisch, P. L. (2001). Bolivia is a megadiversity country and a developing country. *Institute of botany, University of Bonn, Germany*.

- Ioannis Gerathanassis, A. T. (2002). Nuclea Magnetic Resonance Spectroscopy: Basic Principles and Phenomena. *University of Ioannina*.
- J.C. Cedrón, D. G. (2012). Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine and haemanthidine-type derivatives. *Bioorganic and Medical Chemistry*.
- José Esteban Jimenes, P. J.-F. (2018). Rediscovery of *Phaedranassa carmiolii* (Amaryllidaceae). *New York Botanical Garden Press*.
- K. Acosta, N. P. (2014). IDENTIFICATION OF THE ALKALOIDS OF STENOMESSION AURANTIACUM(KUNTH) HERB., AN AMARYLLIDACEAE SPECIES FROM THE ECUADORIAN ANDES. *Pharmacology online*.
- K. Geoffrey White, A. C. (2002). Memory deficits in Alzheimers disease: the encoding hypothesis and cholinergic function. *Psychonomic Bulletin & Review*.
- Lyndon Carvajal Rojas, Y. H. (2009). Análisis Fitoquímico Preliminar de Hojas, Tallos y semillas de cupatá. *revista Colombia Forestal*.
- Maark W. Chase, J. L. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xhantarrhoeaceae.
- Malviya R, B. V. (2010). High Performanc Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Global Pharma Technology*.
- NCI. (2015). *What is Cancer*.
- OMS. (2018). Latest Global Cancer Data. *International Agency for Research on Cancer*.
- Peter J. Houghton, J. M. (2004). Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian. *Molecules*.
- Radim Havalek, M. S. (2014). The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine andhaemanthidine on cell cycle progression and apoptosis inp53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*.
- Silvia -arroyo Leuenberger, B. E. (1996). Types Specimens of names in Américan Amaryllidaceaeat the Berlin Dahlem Herbarium. *Herbario de Berlin*.
- susana López, J. B. (2002). Acetylcholinesterase inhibitor activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life sciences*.
- Taha, S. M. (2018). An introduction to Gas Chromatography. *Agriculture Research Center, Egypt*.
- Thompson, C. (1995). Apoptosis in the Phatogenesis and Treatment of Disease. *Science*.

Tram, N. T. (2002). Crinum L. Amaryllidaceae ž / . *Fitoterapia*.

Xiao Shan Liu, J. J.-Y.-e.-H.-M. (2009). Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human Leukemia Cells. *Cancer Letters*.

