

**UPLC ACOPLADO A DETECTOR DE LUZ EVAPORATIVO PARA VALORAR
TRITERPENOS PENTACICLICOS DE ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO
CECROPIA**

LAURA PATRICIA MONTOYA MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

**UPLC ACOPLADO A DETECTOR DE LUZ EVAPORATIVO PARA VALORAR
TRITERPENOS PENTACICLICOS DE ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO
CECROPIA**

LAURA MONTOYA MARTÍNEZ

PROYECTO DE GRADO

ASESOR: GUILLERMO LEON MONTOYA PELAEZ, Ph.D

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	3
1. RESUMEN DEL PROYECTO	5
2. INTRODUCCION	6
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
4. MARCO TEORICO.....	8
4.1 Metabolitos secundarios.....	8
4.2 Triterpenos pentacíclicos.....	8
4.3 Triterpenos pentacíclicos con actividad biológica.....	9
4.4 Genero Cecropia	10
4.5 Ácido serjánico y espergulajénico en Cecropias	11
4.6 Métodos instrumentales	11
4.6.1 RMN	11
4.6.2 SPE	11
4.6.3 UPLC.....	12
4.6.4 ELSD.....	13
5. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos específicos.....	14
6. METODOLOGÍA.....	15
6.1 Aislamiento y caracterización de ácido espergulajénico a partir de raíces de <i>C.telenitida</i> por medio de métodos cromatográficos y análisis RMN.....	15
6.2 Establecimiento de las condiciones cromatográficas por UPLC y de detección por ELSD para el ácido serjánico y espergulajénico.....	15
6.3 Establecimiento de las condiciones fisicoquímicas de extracción de ácido serjánico y espergulajénico a partir de raíces de <i>C.telenitida</i> disponibles en el laboratorio.	16
6.4 Evaluación del método de valoración de ácido serjánico y espergulajénico en tres plantas del genero Cecropia, obtenidas de campo.	18
7. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	19
7.1 Análisis de RMN del ácido espergulajénico.....	19
7.2 Establecimiento de las condiciones cromatográficas y de detección	22

7.3 Determinación de las condiciones de elución por medio de SPE.....	24
7.4 Recuperación de ácido serjánico y espergulajénico por medio del método SPE-UPLC-ELSD.....	25
7.5 Valoración de ácido serjánico y espergulajénico en tres especies del género Cecropias	28
8. CONCLUSIONES.....	31
9. RECOMENDACIONES	32
10. REFERENCIAS.....	33

1. RESUMEN DEL PROYECTO

Por medio de este proyecto fue posible estandarizar un método de valoración para ácido serjánico y espergulajénico, los cuales son triterpenos pentacíclicos que se encuentran principalmente en especies del género *Cecropia*. Para ello se partió de una fracción de raíces de *C.telenitida* a la cual se le realizó un proceso de extracción en acetato de etilo seguido de cromatografías líquidas y análisis de resonancia magnética nuclear (RMN). Posteriormente se llevaron a cabo varios experimentos con ambos triterpenos, acoplando la extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction-SPE) con la cromatografía líquida de ultra eficacia (UPLC) y detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), para conocer sus porcentajes de recuperación. Finalmente se retó este método en tres especies del género *Cecropia* con el fin de determinar la concentración de ambas moléculas.

Así pues, se pudieron identificar las señales de los grupos funcionales característicos del ácido espergulajénico en el espectro RMN de la molécula obtenida experimentalmente. Adicionalmente, por medio de la comparación de los espectros experimental y teórico se logró verificar la identidad de la estructura. Por otra parte, los ensayos de recuperación fueron mayores del 75% para ambos compuestos, aunque el porcentaje de recuperación para el ácido serjánico (84.4%) fue mayor que para el ácido espergulajénico (76.1%). Los resultados obtenidos de los ensayos con las tres *Cecropias* recolectadas de campo, mostraron que las concentraciones encontradas de estas moléculas fueron mucho menores a las descritas en la literatura.

2. INTRODUCCION

El género *Cecropia* comprende una variedad de plantas que forman parte de la flora nacional, ubicadas principalmente entre las cordilleras oriental y central. No obstante, a pesar de ser un género tan común en Colombia, poco se conoce sobre su composición química. (Costa, 2011), (Rocha, 2007), (Schinella, 2008). Estudios previos han reportado la presencia de triterpenos pentacíclicos (TP), los cuales pertenecen a una gran familia de metabolitos secundarios que cuentan con una amplia gama de actividades biológicas. Montoya et al (2013) demostraron que estas moléculas obtenidas a partir de raíces de *Cecropia telenitida*, inhiben la secreción de citoquinas proinflamatorias, al igual que óxido nítrico en células dendríticas; otorgándoles así propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias.

Sin embargo, estos estudios se han visto limitados por la baja disponibilidad de TP a nivel comercial, debido principalmente a que las casas comerciales de productos químicos más reconocidas a nivel mundial como MERCK, Sigma-aldrich, mallinckrodt, JT Baker, Dupont, Dow chemical, etc, no tienen dentro de su portafolio los compuestos que son objeto de este trabajo experimental. Uno de los principales inconvenientes con la producción de estas moléculas es que incluso en las plantas en las cuales estas estructuras han sido descritas, su contenido es usualmente muy bajo y este panorama es aun más complicado si tenemos en cuenta que debido a la alta complejidad estructural y al gran número de centros quirales, su síntesis química no es rentable ni sencilla.

Teniendo en cuenta los inconvenientes analizados en los párrafos anteriores, se hace imperativo establecer un método de valoración para estos triterpenos y a su vez determinar especies de *Cecropias* nativas que posean cantidades superiores de ácido serjánico y espergulajénico, ya que son estructuras promisorias para ser usadas en terapéutica.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los triterpenos pentacíclicos son metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se conocen al menos 4000 moléculas de este tipo y una alta proporción de ellas presentan actividad inmunomoduladora, ya que inhiben una o varias vías implicadas en la respuesta inflamatoria / inmune. Triterpenos pentacíclicos como el lupeol, ácido betulínico, ursólico, boswélico y oleanólico, han demostrado en estudios in vitro e in vivo un potencial para prevenir y tratar enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes (Laszczyk, 2009), (Ríos, 2010), (Farkas, 2012).

Por otra parte, los ácidos serjánico y espergulajénico que han sido reportados en las raíces de *C. telenitida* son TP de distribución restringida, lo que al mismo tiempo los convierte en moléculas promisorias que pueden ser aprovechadas en terapéutica. Sin embargo, estos compuestos no han sido muy estudiados y su actividad farmacológica apenas está siendo investigada. Estudios preliminares realizados en la universidad de Antioquia han encontrado que estas moléculas disminuyen los niveles de glicemia en modelos animales. (Datos preliminares aun no publicados).

Es evidente que para continuar con estos estudios preclínicos es una condición obligatoria que el laboratorio químico se encargue de aislar y purificar moléculas incluso en el rango de gramos con altos niveles de pureza. Poder soportar la administración oral y peritoneal para establecer parámetros de seguridad y efectividad, obliga definir diferentes dosis a las cuales se obtengan buenos efectos farmacológicos con escasos efectos secundarios. Este tipo de experimentación consume grandes cantidades de compuesto, que para el caso de aquellos que provienen de fuentes naturales se convierte en todo un reto analítico, no solo porque muchos de ellos no se encuentran disponibles a nivel comercial, sino también porque las plantas que los producen no lo hacen en altas concentraciones. Entonces, debido a su baja disponibilidad y alta complejidad estructural que limita su síntesis química, se ha dificultado el desarrollo de esta clase de estudios. Es por ello que se hace necesario estandarizar un método de valoración de ácido serjánico y espergulajénico a partir de raíces de *C.telenitida*, que permita evaluar su contenido en otras especies locales.

4. MARCO TEORICO

4.1 Metabolitos secundarios

A diferencia de otros organismos las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas, que no tienen una función específica en los procesos fisiológicos fundamentales, denominadas metabolitos secundarios. Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas concretas como atrayentes o repelentes de animales, pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, función protectora frente a predadores y también intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos. Estos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y de forma no generalizada, contando con una producción restringida a un determinado género de plantas, una familia, o incluso a algunas especies (Avalos, 2009).

4.2 Triterpenos pentacíclicos

Los TP son metabolitos secundarios en plantas, que se producen por arreglo del epóxido de escualeno en una disposición silla-silla-silla-bote seguido de una condensación (Saleem, 2009). Muchos triterpenos ocurren libremente, pero otros se dan como glucósidos (saponinas) o en formas combinadas especiales (Patocka, 2003). La mayoría de ellos poseen 30 o más átomos de carbono y uno o dos dobles enlaces carbono-carbono (Moreau, 2002). Los triterpenos pentacíclicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y por tanto, en todo el mundo. Están en cantidades variables en el epicarpio de frutas, hojas y corteza de tallos, lo que los hace constituyentes importantes de la dieta humana (Saleem, 2009).

4.3 Triterpenos pentacíclicos con actividad biológica

Triterpenos de los grupos lupano, oleano y ursano han mostrado diversos efectos farmacológicos, sin presentar toxicidad significativa (Ríos, 2010). Están implicados en los mecanismos de acción farmacológicos de muchas plantas medicinales, utilizadas en la medicina popular contra enfermedades relacionadas con el sistema inmune. Curiosamente, la mayor parte de los TP estudiados hasta el momento presentan actividad inmunomoduladora, ya que inhiben una o varias vías implicadas en la respuesta inflamatoria / inmune. Por lo tanto, la modulación del sistema inmune se está convirtiendo en un mecanismo central que explica, al menos en parte, las propiedades que tienen estas moléculas. Adicionalmente, los triterpenos pentacíclicos se han descrito como agentes antiinflamatorios, antivirales, antimicrobianos y antitumorales, por lo que constituyen un grupo prometedor de compuestos para el desarrollo de agentes bioactivos, que podrían ser utilizados para el desarrollo de formulaciones fitoterapéuticas (Ríos, 2010), (Jäger, 2009).

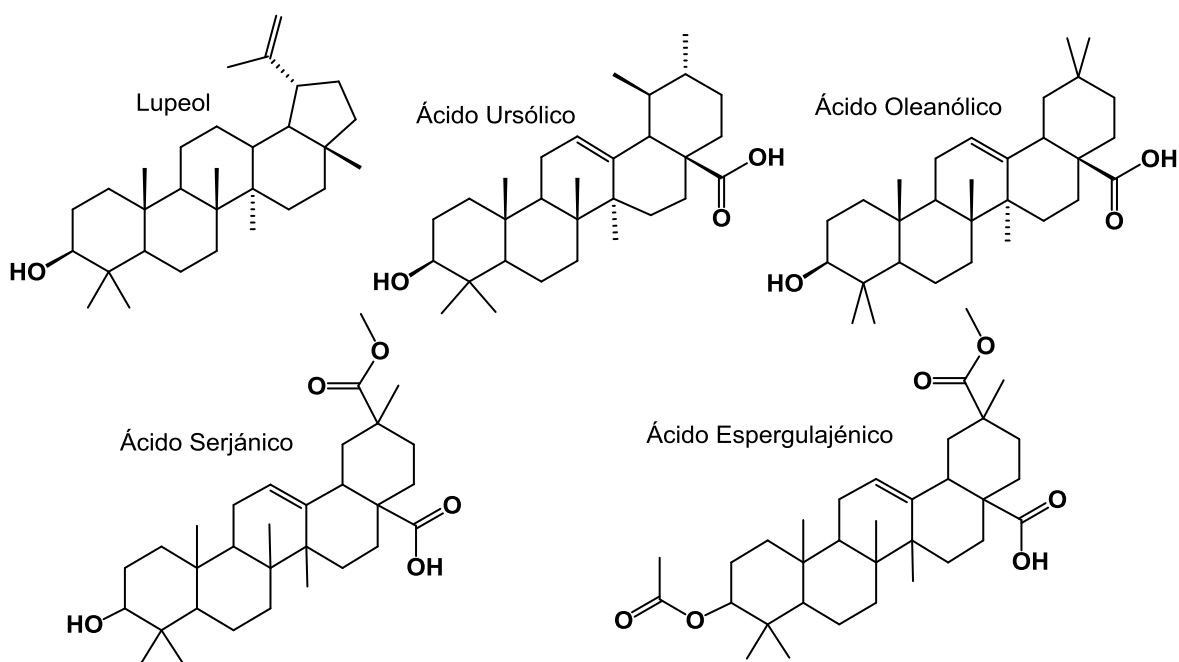


Figura 1. Estructuras de triterpenos pentacíclicos. El lupeol, el ácido ursólico y oleanólico se han descrito como moléculas con actividad biológica. El potencial terapéutico de los ácidos serjánico y espergulajénico apenas está siendo investigado.

Los ácidos ursólico y oleanólico han demostrado una significativa actividad antidiabética en modelos de ratas no dependientes de insulina. El principal modo de acción de los ácidos triterpénicos es producir una inhibición enzimática potente, reversible y selectiva de la proteína tirosin fosfato 1 β (PTP1 β). (Ramírez, 2011). El mecanismo de unión entre estos derivados triterpénicos y PTP1 β sugiere una nueva estrategia para obtener compuestos de mayor afinidad y especificidad. Lo que los convierte en potenciales fármacos para el tratamiento de la diabetes tipo 2 como sensibilizadores de insulina (Ramírez, 2011).

El lupeol ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antiinflamatorias en modelos in vitro y animales. Durante un estudio se probó que la aplicación tópica de lupeol (0,5 y 1 mg / oreja) disminuía la inflamación inducida por esteres de forbol en un modelo de oreja de ratón y los niveles de mieloperoxidasa (marcador específico de neutrófilos), causando así una reducción en la infiltración de células en los tejidos inflamados. Adicionalmente, el tratamiento previo con lupeol redujo significativamente la producción de prostaglandina E2 (PGE2) en macrófagos (Fernández, 2001). De igual forma, este triterpeno ha mostrado prometedores resultados como agente quimiopreventivo, por su actividad antiproliferativa en varias líneas celulares de cáncer. Reportes recientes han evidenciado que el lupeol inhibe directamente el crecimiento del tumor, la progresión del ciclo celular e induce apoptosis en células tumorales. Adicionalmente, presenta una fuerte actividad antimutagénica, lo que permite prevenir las mutaciones que se producen a través de rupturas de la cadena de ADN y que son precursoras del cáncer (Bradfort, 2007).

4.4 Genero Cecropia

El género Cecropia, que comprende muchas especies de plantas usadas en la medicina tradicional para las enfermedades inflamatorias, se conoce por tener una alta producción de TP. Cecropia es un género neotropical, que cuenta con 60 especies distribuidas en América Latina en zonas húmedas de hasta 2.600 metros sobre el nivel del mar. Este género se puede encontrar en lagunas naturales de bosques primarios de la región andina, al igual que en las regiones tropicales del Pacífico y los bosques amazónicos. También es característico de vegetación secundaria, en lugares como riberas expuestas, deslizamientos de tierra y a lo largo de las carreteras (Franco 1997), (Costa, 2011).

4.5 Ácido serjánico y espergulajénico en Cecropias

En los últimos años se han incrementado los reportes fitoquímicos y farmacológicos de las especies de Cecropia. Entre las propiedades farmacológicas descritas para el género las más frecuentes son la actividad hipoglucemiante de *C. obtusifolia* y *C. peltata*, y la actividad hipotensora de *C. glaziovii* (Costa, 2011). La *C. telenitida* no ha sido muy estudiada en términos de su composición química, no obstante, se han aislado y caracterizado triterpenos pentacíclicos, como el ácido serjánico y espergulajénico, los cuales han demostrado un efecto farmacológico en modelos animales (Montoya, 2013). Sin embargo, la escasa disponibilidad de estas moléculas a nivel comercial ha dificultado el desarrollo de los estudios.

4.6 Métodos instrumentales

4.6.1 RMN

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las técnicas más potentes en el campo de la química y bioquímica para la elucidación de estructuras moleculares. De igual forma, esta técnica también es útil para la determinación cuantitativa del analito.

La espectroscopia de resonancia magnética se basa en la medida de absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias. En contraste con la absorción ultravioleta, visible e infrarroja, en el proceso de absorción están implicados los núcleos de los átomos en vez de los electrones exteriores. Además, para poder desarrollar esta técnica es necesario colocar el analito en un intenso campo magnético, para lograr la aparición de los estados de energía de los núcleos que hacen posible la absorción. (Douglas, 2008)

4.6.2 SPE

La extracción en fase sólida (SPE) es la técnica más importante en el pretratamiento de las muestras que van a ser analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La SPE es un procedimiento analítico que cuenta con seis propósitos principales en la preparación de muestras:

- Remoción de interferencias
- Concentración o enriquecimiento del analito
- Intercambio de solvente
- Derivatización in-situ
- Almacenamiento y transporte de muestras

En su forma más simple la SPE emplea una columna o cartucho pequeño, plástico y desechable, que contiene entre 0,1 y 1,0 g de absorbente. Generalmente, el absorbente es un material de fase reversa (C18-silica), aunque también se puede utilizar uno de fase normal o un absorbente polimérico.

En su configuración más popular el empaque del SPE se encuentra constituido por fritas similares a las de una columna de HPLC, con un tamaño de partícula de 40µm, el cual es mucho mayor que el del HPLC (1,5-5µm). Por ello los cartuchos de SPE cuentan con una eficiencia menor que una columna de HPLC, y son menos costosos (Snyder, 2011).

El método de SPE involucra habitualmente cuatro pasos:

1. El acondicionamiento del empaque
2. La aplicación de la muestra (carga)
3. El lavado del empaque (para remover interferencias)
4. Recuperación del analito

4.6.3 UPLC

La cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) es una de las técnicas analíticas más utilizadas en la industria y diversos campos de la ciencia, ya que por medio de ella es posible separar, analizar y/o purificar diversos tipos de moléculas. Esta técnica cuenta con buena sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cualitativas exactas e idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles (Douglas, 2008).

Además, presenta algunas ventajas sobre la cromatografía líquida de alta eficiencia. Principalmente la reducción significativa en el tiempo y el gasto de muestra por análisis y una gama mucho mayor de velocidades lineales, flujos y contrapresiones, lo que permite una mejora en la eficacia y calidad de los resultados (Snyder, 2011).

4.6.4 ELSD

El detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD) cuenta con el potencial de poder usarse para cualquier muestra, dado que responde a la mayoría de compuestos analizados por HPLC, aunque su sensibilidad decrece en los analitos más volátiles.

Esta técnica consiste en evaporar la fase móvil, para medir la luz dispersada por las partículas del analito no volátil. El efluente de la columna se nebuliza en una corriente de nitrógeno y se evapora en un tubo de deriva caliente, dejando las partículas no volátiles suspendidas en el portador del vapor de gas. La luz dispersada por las partículas es detectada por un fotodetector montado en un ángulo fijo del haz incidente.

La respuesta del detector se relaciona con la cantidad de analito presente y no con sus propiedades espectrales. De igual manera, cuenta con una respuesta independiente del solvente, lo que permite utilizarlo con un gradiente de elución y sin fluctuaciones en cuanto a la temperatura y velocidad de flujo (Snyder, 2011).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estandarizar un método de valoración para ácido serjánico y espergulajénico presentes en raíces de *Cecropia telenitida*.

5.2 Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar ácido espergulajénico a partir de raíces de *C.telenitida* por medio de métodos cromatográficos y análisis RMN para emplearlo como estándar de trabajo.
2. Establecer las condiciones cromatográficas por UPLC y de detección por ELSD para el ácido serjánico y espergulajénico.
3. Establecer las condiciones de extracción de ácido serjánico y espergulajénico a partir de raíces de *C.telenitida* disponibles en el laboratorio.
4. Evaluar el método de valoración en tres plantas del genero *Cecropia*, obtenidas de campo.

6. METODOLOGÍA

6.1 Aislamiento y caracterización de ácido espergulajénico a partir de raíces de *C.telenitida* por medio de métodos cromatográficos y análisis RMN.

Para llevar a cabo la extracción de ácido espergulajénico se partió de una porción de raíces de *C.telenitida* previamente extraídas con acetato de etilo, la cual se disolvió en metanol y cloroformo, se le adicionó silica y se rotaevaporó. Este material fue posteriormente utilizado para el montaje de una cromatografía flash, que se corrió con 500ml de los siguientes solventes: hexano, diclorometano, cloroformo, metanol y acetona. Para determinar los componentes extraídos en cada fracción se realizó una cromatografía planar en acetato de etilo/diclorometano 7:3 y se reveló con vainillina/ ácido sulfúrico.

Debido a que las fracciones de diclorometano y cloroformo presentaron una banda con un Rf similar al del estándar de ácido espergulajénico, se continuó trabajando con estas fracciones y se descartaron las restantes. Para lograr una mejor separación y purificación del ácido espergulajénico se realizaron cromatografías líquidas con diferentes proporciones de diclorometano y acetato de etilo, a la vez que se iban desarrollando cromatografías planares de las fracciones recolectadas, para determinar en cuales se encontraba la molécula. Cuando finalmente se obtuvieron las muestras que contenían sólo el ácido espergulajénico se procedió a juntarlas, secarlas y tomar espectros de resonancia magnética nuclear (RMN).

6.2 Establecimiento de las condiciones cromatográficas por UPLC y de detección por ELSD para el ácido serjánico y espergulajénico.

Para establecer las condiciones del UPLC se realizó una curva de calibración a partir de estándares de ácido serjánico y espergulajénico, los cuales se elaboraron pesando 10mg de cada uno y aforando a 10ml con metanol. Con esta solución madre se crearon diluciones para obtener los siguientes valores de concentración: 500, 200, 150, 100, 50y 10ppm.

Por otra parte, para determinar los parámetros del ELSD se establecieron las mejores condiciones de evaporación del solvente, procurando no alterar químicamente el analito problema. Así pues, se fijaron los valores de la presión del gas de nebulización, la temperatura del tubo de deriva y el fotomultiplicador.

Cabe resaltar que las moléculas de ácido serjánico y espergulajénico ya fueron aisladas y caracterizadas por medio de una metodología reportada en el artículo de Montoya y colaboradores (2013). En el laboratorio se disponía de estándares de ambos ácidos, los cuales se utilizaron para establecer las mejores condiciones cromatográficas y de detección, por medio de una comparación entre el tiempo de retención del estándar y el tiempo de retención de la muestra. De esta manera se garantiza que la molécula que se está detectando es ácido serjánico y ácido espergulajénico y no otro triterpeno pentacíclico.

6.3 Establecimiento de las condiciones fisicoquímicas de extracción de ácido serjánico y espergulajénico a partir de raíces de *C.telenitida* disponibles en el laboratorio.

Evaluación de las condiciones de elución de ácido serjánico y espergulajénico

Como se necesitaba conocer en que solvente se recuperaban mayoritariamente los ácidos, se llevó a cabo una extracción en fase sólida. Para ello se comenzó pesando 12.5 mg del estándar de ácido espergulajénico y aforando a 25 mL con una mezcla 1:1 de hexano: cloroformo. Se adicionó 1 mL de esta solución a 4 cartuchos previamente activados con 1ml de hexano:cloroformo 1:1 y se recolectó la solución eluida. Posteriormente se adicionaron a cada cartucho los siguientes solventes:

Tabla 1. Solventes evaluados para determinar la elución más efectiva de ácido serjánico y espergulajénico por medio de SPE.

Cartucho	Cantidad	Solventes
1	1ml	Hexano: cloroformo 1:1
2	1ml	Cloroformo
3	1ml	Cloroformo: metanol 1:1
4	1ml	Metanol

Se recolectaron las fracciones de cada solvente. En total se tenían 8 muestras para evaluar, 4 que correspondían a las recolectadas después de adicionar el ácido espergulajénico y 4 después de adicionar los solventes respectivos.

Entonces para determinar en cual de ellas se encontraba la molécula se realizó una cromatografía planar con diclorometano:acetato de etilo 7:3 y revelada con vainillina/ ácido sulfúrico. En el cartucho eluido con cloroformo metanol 1:1 se observó una banda con el mismo Rf del estándar de ácido espergulajénico, por lo que se seleccionó este sistema de solventes para llevar a cabo el siguiente experimento.

Determinación de porcentajes de recuperación

Ahora, con el fin de establecer el porcentaje de recuperación de los ácidos serjánico y espergulajénico, se pesó aproximadamente 12,5mg de cada uno y se aforo a 25ml con una mezcla 1:1 de hexano: cloroformo. Posteriormente se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Tabla 2. Procedimiento realizado para el ensayo de recuperación de ácido serjánico y espergulajénico por medio de SPE.

Cartucho	Ácido a evaluar	Paso 1	Paso 2	Paso 3
1	Ácido serjánico	Se adicionó 1 ml de hexano:cloroformo 1:1	Se adicionó 1ml de solución de ácido serjánico	Se adicionaron 2ml de cloroformo:metanol 1:1
2				
3				
4				
5	Ácido espergulajénico	Se adicionó 1 ml de hexano:cloroformo 1:1	Se adicionó 1ml de solución de ácido espergulajénico	Se adicionaron 2ml de cloroformo:metanol 1:1
6				
7				
8				

La fracción recolectada del paso 3 se secó, se resuspendió con metanol HPLC, se filtró y se llevó a un vial para ser analizada en el UPLC. El procedimiento se hizo con cada una de las 8 fracciones recolectadas.

6.4 Evaluación del método de valoración de ácido serjánico y espergulajénico en tres plantas del genero Cecropia, obtenidas de campo.

Para evaluar el método de valoración en tres plantas del género cecropia fue necesario realizar una salida de campo, con el fin de recolectar las muestras. Se seleccionó el sector de pance, ubicado al sur de la ciudad para llevar a cabo este procedimiento. Así pues, se colectaron aproximadamente 15 cm de raíz de tres cecropias y se llevaron a secar en estufas de circulación de aire caliente. Posteriormente se molieron para garantizar un tamaño de partícula pequeño y facilitar la extracción.

Se pesaron 10g de cada una de las tres cecropias, se adicionaron 100ml de acetato de etilo: metanol 1:1 y se sonicaron por 20 minutos a 40°C. Posteriormente se filtraron, se secaron y se resuspendieron con 1 ml de hexano:cloroformo 1:1 para poder llevar a cabo la valoración.

Para las tres muestras se siguió el método de valoración previamente establecido, a excepción de que cada muestra se realizó por duplicado y después de adicionar cloroformo:metanol 1:1 se agregó 2ml de metanol, con el fin de garantizar que todo el ácido hubiera sido extraído en la tercera fase.

7. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Análisis de RMN del ácido espergulajénico

Tabla 3. Comparación de las señales obtenidas mediante un análisis RMN para el ácido espergulajénico adquiridas por medio de una simulación con el programa ChemDraw 12.0, el artículo de Montoya et al (2013) y la molécula aislada experimentalmente.

No de carbono	Tipo de carbono	Teórico	Simulación	Articulo	Experimental
1	Secundario	15-50	38.7	38.0	38.0
2	Secundario	15-50	24.1	23.3	22.8
3	Terciario	20-60	80.6	80.9	79.1
4	Cuaternario	30-40	37.7	45.8	36.2
5	Terciario	20-60	55.6	55.3	55.3
6	Secundario	15-50	18.3	18.1	17.4
7	Secundario	15-50	26.0	32.5	29.8
8	Cuaternario	30-40	39.9	39.2	38.7
9	Terciario	20-60	47.7	47.5	48.0
10	Cuaternario	30-40	37.6	23.5	35.6
11	Secundario	15-50	23.8	27.6	21.0
12	Terciario Doble enlace	100-150	123.0	123.2	123.7
13	Cuaternario Doble	100-150	144.1	142.9	136.4

	enlace				
14	Cuaternario	30-40	42.1	41.3	39.6
15	Secundario	15-50	29.0	27.6	28.0
16	Secundario	15-50	23.7	23.0	19.9
17	Cuaternario	30-40	46.3	37.6	45.8
18	Terciario	20-60	41.6	42.2	38.9
19	Secundario	15-50	42.2	41.9	42.4
20	Cuaternario	30-40	43.5	43.7	43.0
21	Secundario	15-50	30.5	30.3	29.4
22	Secundario	15-50	33.3	33.5	32.0
23	Primario	8-35	23.6	28.0	18.4
24	Primario	8-35	23.6	15.3	18.7
25	Primario	8-35	16.2	14.1	16.0
26	Primario	8-35	17.3	16.6	16.2
27	Primario	8-35	26.0	25.8	24.2
28	Cuaternario Ácido carboxílico	175-185	180.3	183.5	171.3
29	Primario	8-35	28.3	28.3	27.5
30	Cuaternario Ester	165-175	177.9	176.9	172.1
31	Primario Metoxilo	50-80	52.5	3.6	50.4
32	Cuaternario	165-175	170.2	171.0	171.3

	Ester				
33	Primario	8-35	21.0	21.2	18.0

Los triterpenos pentacíclicos contienen por lo general 30 o más átomos de carbono y uno o dos dobles enlaces carbono-carbono. El ácido espergulajénico es un TP de 33 átomos de carbono que cuenta con 4 grupos funcionales característicos, que lo diferencian de otras estructuras de este grupo.

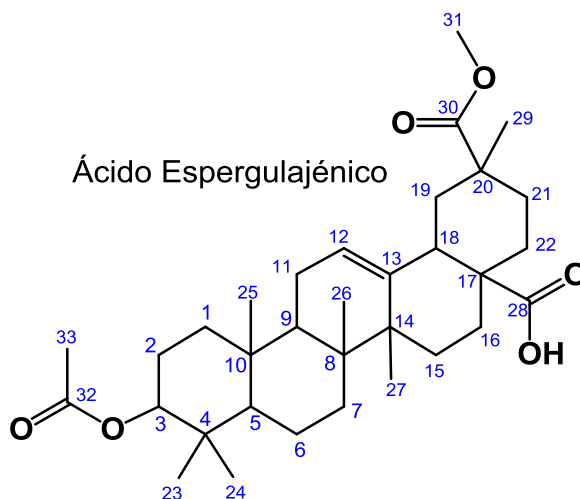


Figura 2. Estructura y numeración del esqueleto carbonado de ácido espergulajénico.

En la posición 28 se encuentra un carbono de ácido con un desplazamiento químico de 171.3 ppm. De igual manera, la molécula posee dos esteres, ubicados en el carbono 30 y 32, los cuales aparecen a un desplazamiento de 172.1 y 171.3 ppm respectivamente. Finalmente el doble enlace ubicado en los carbonos 12 y 13 aparecen a 123.7 y 136.4 ppm. Comparando los resultados obtenidos experimentalmente contra los reportados en la teoría y en el artículo publicado por Montoya y colaboradores (2013) se puede concluir que la estructura corresponde a los desplazamientos químicos típicos del ácido espergulajénico en cloroformo deuterado. Es aceptado que el alto número de protones metilénicos y metínicos hacen que el espectro de protón sea bastante complejo de analizar y poco útil por si solo (sin el uso de experimentos bidimensionales) para la identificación de este tipo de compuestos, por lo tanto los desplazamientos de los carbonos en comparación con los reportados en la literatura se convierten en una poderosa herramienta de identificación.

7.2 Establecimiento de las condiciones cromatográficas y de detección

Para poder llevar a cabo el análisis de los ácidos serjánico y espergulajénico en el UPLC-ELSD fue necesario establecer los siguientes parámetros:

Condiciones Cromatográficas

Tabla 4. Condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de las muestras.

Columna	BEH C18 1.7 μ m	
Temperatura	40°C	
Fase Móvil	Solvente A: Agua (0.05% Ácido Fórmico) Solvente B: Metanol	
Flujo	0.4 mL/min	
Gradiente Método UPLC	Gradiente 20% A – 80% B 20% A – 80% B 10% A – 90% B 5% A – 95% B 20% A – 80% B 20% A – 80% B	Tiempo Inicial 0.5 1.50 4.00 4.10 7.00

Condiciones de detección

Tabla 5. Condiciones de detección utilizadas para el análisis de las muestras.

Presión de nebulización	40psi
Temperatura de nebulización	Cooling (18°C)
Valor de ganancia ó fotomultiplicador	100

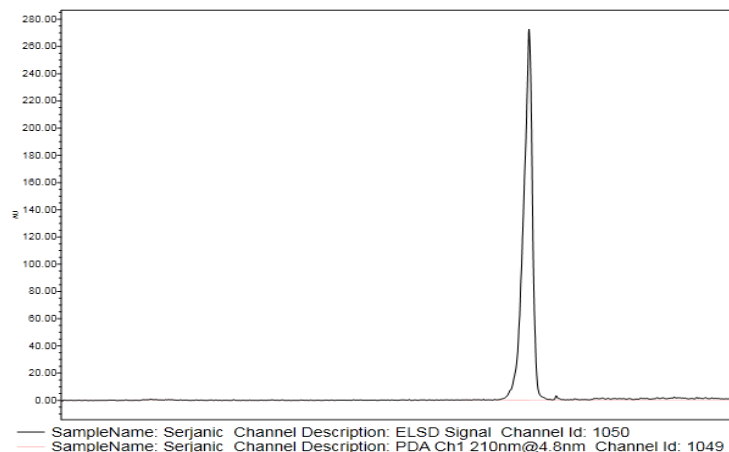


Figura 3. Cromatograma de ácido serjánico a una concentración de 500ppm detectado con ELSD (línea negra) y con PDA (línea rosada).

Fue necesario utilizar un detector de light scattering para realizar el análisis, dado que las moléculas de interés no absorben radiación en el espectro UV, como es posible observar en la figura 3, donde se hace una comparación de dos corridos cromatográficos a una misma concentración de ácido serjánico. La desventaja de este método radica en la baja sensibilidad que tiene comparado con el detector UV. No obstante, para aumentar la señal y disminuir el ruido se ajustaron parámetros que afectan la detección del analito, ya que influyen directamente en el proceso de evaporación como el valor de ganancia ó fotomultiplicador, la temperatura de nebulización y la presión de nebulización.

Una vez optimizados estos parámetros se realizó la lectura de la curva de calibración. De esta manera, se obtuvo la curva de calibración expuesta en la figura 4:

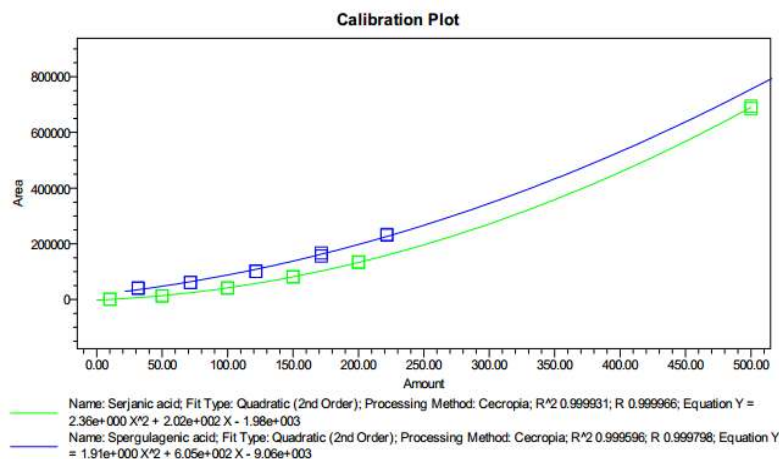


Figura 4. Curva de calibración de ácido serjánico (línea verde) y ácido espergulajénico (línea azul).

El detector ELSD a diferencia del UV utiliza una ecuación cuadrática y no lineal para el ajuste de los datos. Como se muestra en la figura, la línea verde corresponde al ácido serjánico y la azul al ácido espergulajénico. Las pruebas de bondad de ajuste evidencian que existe un ajuste matemático adecuado de los datos con la ecuación polinomial de segundo orden, el coeficiente de correlación fue de 0,999931 y 0,999596 respectivamente.

7.3 Determinación de las condiciones de elución por medio de SPE

A pesar de que la SPE se realiza por lo general en fase reversa, para llevar a cabo el procedimiento experimental se seleccionó la SPE en fase normal, ya que el solvente de fase reversa es agua y dada la polaridad de las moléculas podrían precipitar en este medio.

Con el fin de determinar cuál podría ser el mejor solvente para extraer las moléculas de la columna se seleccionaron cuatro solventes: hexano: cloroformo 1:1, cloroformo, cloroformo:metanol 1:1 y metanol. Con cada uno de ellos se realizó una SPE utilizando un estándar de ácido espergulajénico, ya que su estructura es más apolar que la del ácido serjánico, por lo que se asume que el solvente que muestre una mejor elución lo hará para ambas estructuras. Con el fin de verificar los resultados se hizo una cromatografía planar, la cual se muestra a continuación:

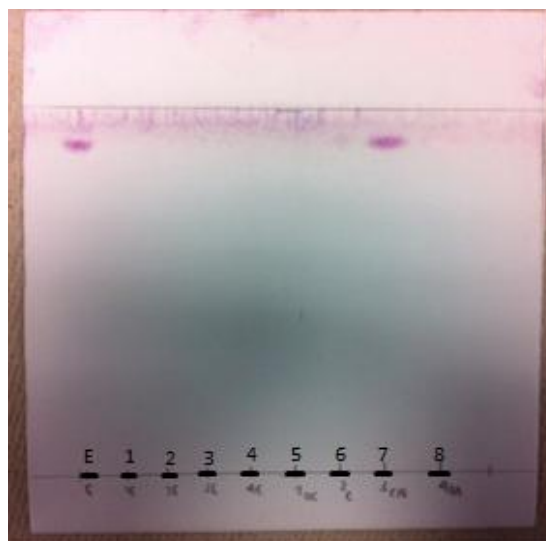


Figura 5. Cromatografía planar con el resultado de la prueba de elución de ácido serjánico y espergulajénico. En el carril 7 se observa una banda que coincide con la banda del estándar que se encuentra en el carril E.

El resultado obtenido mediante esta cromatografía planar demuestra que el sistema cloroformo:metanol 1:1 logró extraer el ácido espergulajénico de la columna y por ello fue seleccionado para realizar el ensayo de recuperación.

Se esperaba que este sistema pudiera eluir las moléculas de una forma más eficiente comparado con los otros solventes evaluados porque es el que más se asemeja en cuanto a polaridad al acetato de etilo, solvente con el cual se ha reportado previamente la extracción de estos ácidos.

7.4 Recuperación de ácido serjánico y espergulajénico por medio del método SPE-UPLC-ELSD

Una vez efectuada la SPE, se procedió a realizar la lectura de las muestras en el UPLC. Los resultados de los porcentajes de recuperación se muestran en la tabla 6:

Tabla 6. Resultados del ensayo de recuperación de ácido serjánico.

ÁCIDO SERJÁNICO					
Muestra	Inyección	Tiempo de retención	Área	Cantidad (mg/L)	Recuperación (%)

1	1	2.807	489743	415.270	83.054
	2	2.808	486185	413.624	82.725
2	1	2.813	511454	425.185	85.037
	2	2.807	516140	427.298	85.460
3	1	2.810	501086	420.477	84.095
	2	2.810	491774	416.206	83.241
4	1	2.809	517621	427.964	85.593
	2	2.808	523985	430.814	86.163
Mean			504748	422.105	84.4
Std. Dev.			14452	6.576	1.3
% RSD			2.9	1.6	1.6

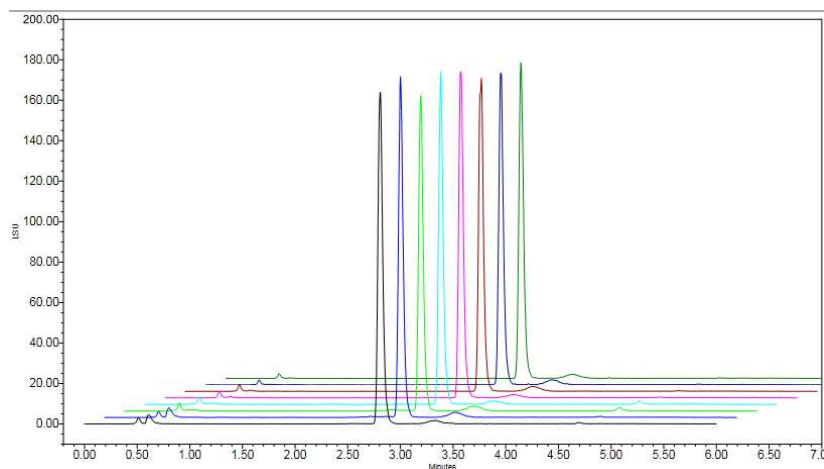


Figura 6. Cromatograma de las ocho lecturas realizadas de ácido serjánico en el UPLC acoplado a ELSD. Los resultados del ácido espergulajénico son prácticamente los mismos, lo único que varía es el tiempo de retención. Por ello se muestra solo un cromatograma.

Tabla 7. Resultados del ensayo de recuperación de ácido espergulajénico.

ÁCIDO ESPERGULAJÉNICO					
Muestra	Inyección	Tiempo de retención	Área	Cantidad (mg/L)	Recuperación (%)
1	1	3.741	531757	397.087	79.417
	2	3.746	535505	398.852	79.770
2	1	3.749	519806	391.419	78.284
	2	3.750	524509	393.656	78.731
3	1	3.749	473155	368.710	73.742

	2	3.752	476876	370.557	74.111
4	1	3.751	461020	362.640	72.528
	2	3.748	460986	362.624	72.525
Mean			497952	380.693	76.1
Std. Dev.			32788	15.948	3.2
% RSD			6.6	4.2	4.2

**Ensayo de recuperación de ambos triterpenos (500 mg/L)
en extracción de fase sólida en fase normal (n=8)**

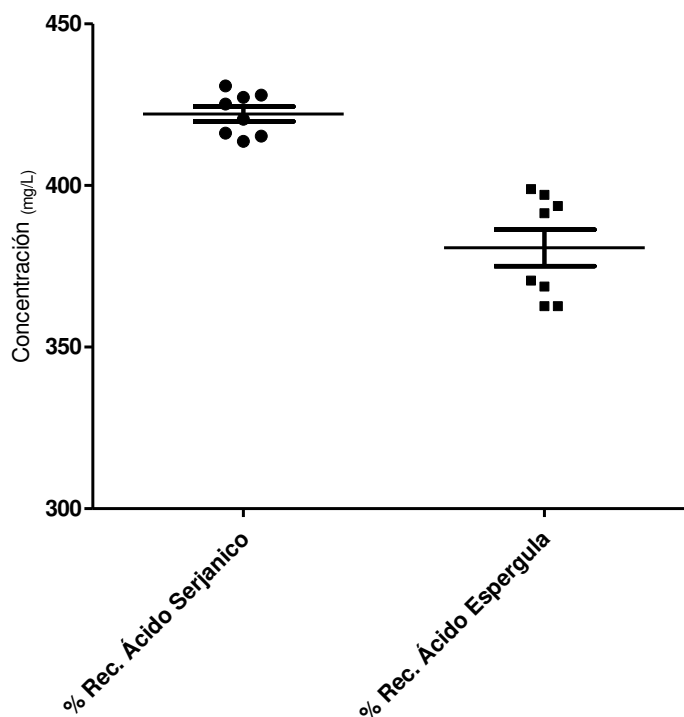


Figura 7. Gráfico de concentración de ácido serjánico y espergulajénico.

La SPE se realizó por cuadruplicado para cada ácido y la lectura en el UPLC se hizo por duplicado, por eso se encuentran 8 porcentajes de recuperación para cada molécula. Para el ácido serjánico se obtuvo un valor promedio de 84,4%, el cual fue mayor que el del ácido espergulajénico que fue 76,1%.

Por otra parte los porcentajes de desviación estándar relativa fueron 1,6% y 4,2% para el ácido serjánico y espergulajénico respectivamente (n=8), lo que representa

un buen resultado y muestra que las diferencias en los porcentajes obtenidos de cada ácido no son significativas.

7.5 Valoración de ácido serjánico y espergulajénico en tres especies del género *Cecropias*

Una vez establecidas las mejores condiciones de recuperación de estos triterpenos, se emplearon para valorar ácido serjánico y espergulajénico en raíces de 3 especies del género *cecropia*. El procedimiento se llevó a cabo de igual forma, pero para cerciorarse de que las moléculas estuvieran presentes en las fracciones recolectadas de la SPE se realizaron las siguientes cromatografías planares:

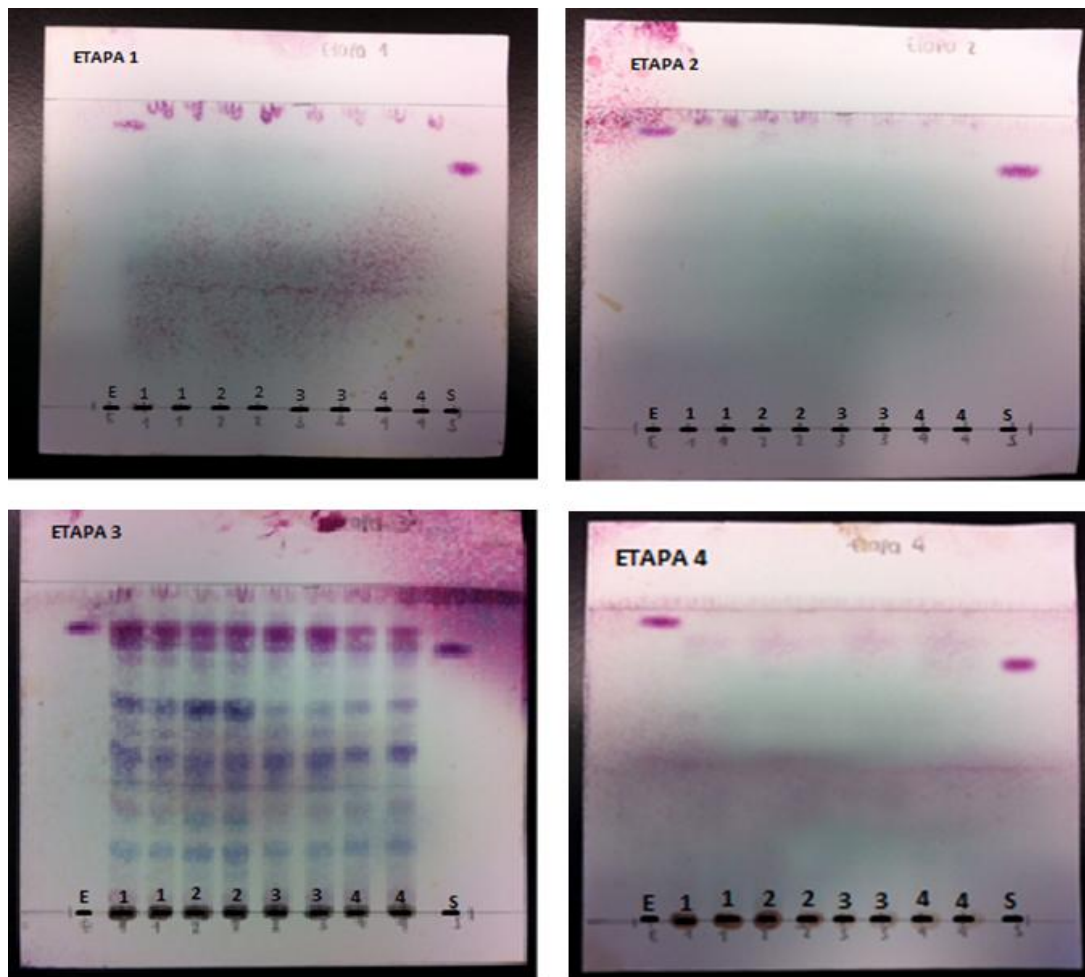


Figura 8. Cromatografías planares de los resultados obtenidos en la valoración de tres *Cecropias*.

La primera etapa corresponde al acondicionamiento de la columna realizado con hexano:cloroformo 1:1. Por ello no se observa la presencia de ninguno de los ácidos en la cromatografía planar. (Figura 8, etapa 1)

Para la segunda etapa se adicionaron los ácidos a las columnas. Si el método es efectivo se esperaría que las moléculas se quedaran retenidas en la columna y no eluyeran con el solvente, así como lo muestra la cromatografía planar. (Figura 8, etapa 2)

La tercera etapa se llevó a cabo lavando la columna con cloroformo:metanol 1:1, porque fue el sistema que mostro la elución más eficiente de las moléculas. Por consiguiente en esta etapa si se deberían observar los ácidos y otros triterpenos también. Así como se muestra en la cromatografía, se logró la elución de los ácidos de interés. (Figura 8, etapa 3)

La cuarta etapa se hizo con el fin de verificar que en la tercera etapa se hubieran extraído las moléculas en su totalidad y no se hubieran quedado retenidas una porción de ellas en la columna, para ello se lavó la columna con metanol. Como muestra la cromatografía planar de la etapa 4 no se observa ninguna banda correspondiente a los ácidos. (Figura 8, etapa 4).

Las fracciones de la tercera etapa se analizaron en el UPLC para determinar cuantitativamente los ácidos serjánico y espergulajénico. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 8. Resultado de la valoración de ácido serjánico en tres muestras de Cecropia

ÁCIDO SERJÁNICO				
Muestra	Inyección	Tiempo de retención	Área	Cantidad (mg/L)
1	1	3.032	253877	0.760
	2	3.072	396092	1.011
Mean			324985	0.885
Std. Dev.			100562	0.177
% RSD			30.9	20.0
2	1	3.043	283520	0.815
	2	3.043	176688	0.606
Mean			230104	0.711
Std. Dev.			75542	0.148
% RSD			32.8	20.8
3	1	3.052	158925	0.569

	2	3.049	158406	0.567
Mean			158665	0.568
Std. Dev.			367	0.001
% RSD			0.2	0.1

Tabla 9. Resultado de la valoración de ácido espergulajénico en tres muestras de *Cecropia*

ÁCIDO ESPERGULAJÉNICO				
Muestra	Inyección	Tiempo de retención	Área	Cantidad (mg/L)
1	1	4.420	88498	0.431
	2	4.440	81631	0.412
Mean			85064	0.421
Std. Dev.			4856	0.013
% RSD			5.7	3.2
2	1	4.414	18535	0.231
	2	4.389	25798	0.253
Mean			22166	0.242
Std. Dev.			5136	0.015
% RSD			23.2	6.2
3	1	4.457	102003	0.468
	2	4.457	96909	0.454
Mean			99456	0.461
Std. Dev.			3602	0.010
% RSD			3.6	2.1

En general, las concentraciones estimadas en este trabajo tanto de ácido serjánico como de espergulajénico se encuentran por debajo de las concentraciones reportadas en otros procedimientos experimentales que se han realizado con raíces de *C.telenitida* (Montoya,2013). Las raíces de *Cecropia* que se recolectaron para el desarrollo de esta valoración no fueron identificadas, por lo que posiblemente correspondan a otras especies del género que no cuentan con contenidos tan altos de los triterpenos.

8. CONCLUSIONES

- Fue posible identificar mediante RMN¹³C las señales características del ácido espergulajénico en la molécula aislada experimentalmente. Adicionalmente por medio de la comparación de los espectros obtenidos experimentalmente y los reportados en la literatura se logró verificar la identidad de la estructura
- Mediante una ecuación polinomial de segundo orden se obtuvo un ajuste matemático adecuado para las curvas de calibración de ácido serjánico y espergulajénico, con unos coeficientes de correlación de 0,999 y 0,999 respectivamente.
- Se determinó que el solvente que permitió la elución más eficiente de los ácidos serjánico y espergulajénico fue cloroformo:metanol 1:1.
- Se estandarizo un método de valoración para los ácidos; serjánico y espergulajénico, utilizando técnicas analíticas como SPE,UPLC,ELSD, con las cuales se obtuvieron porcentajes de recuperación del 84,4% y 76,1% y desviaciones estándar relativas (n=8) de 1,6% y 4,2% respectivamente.
- Fue posible utilizar el método estandarizado para valorar ácido serjánico y espergulajénico en tres especies del genero *Cecropia*, con el cual se obtuvo que las concentraciones de estos compuestos fueron bajas con respecto a los reportados para *C.telenitida*.

9. RECOMENDACIONES

- Dado que en las raíces de *C.telenitida* se han encontrado los ácido serjánico y espergulajénico, se recomienda hacer un análisis botánico a las 3 Cecropias recolectadas de campo, con el fin de identificar a que especie pertenecen y de esta manera poder hacer una comparación entre los resultados reportados en la literatura y los obtenidos experimentalmente.
- Cabe resaltar que este procedimiento experimental se basó en la estandarización de un método. Por lo que se podrían realizar otros ensayos que permitieran contar con un soporte estadístico sobre el método y de esta manera validarlo.

10. REFERENCIAS

Costa, G. M.; Schenkel, E. P.; Reginatto, F. H. (2011). Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Nat Prod Commun*, 6, (6), pp.913-20.

Rocha, G.d.G., Simoes, M., Lucio, K.A., Oliveira, R.R., Coelho Kaplan, M.A., Gattass, C. R., (2007). Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. *Bioorgan. Med. Chem.* 15, 7355-7360.

Schinella, G., Aquila, S., Dade, M., Giner, R., del Carmen Recio, M., Spegazzini, E., de Buschiazzo, P., Tournier, H., Rios, J. L., (2008). Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. *Planta Med* 74, 215,220.

Laszczyk, M. N. (2009). Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med*, 75, (15), pp.1549-60.

Ríos, J. L. (2010). Effects of triterpenes on the immune system. *J Ethnopharmacol*, 128, (1), pp.1-14.

Farkas, A.; Kemény, L. (2012). Monocyte-derived interferon-alpha primed dendritic cells in the pathogenesis of psoriasis: new pieces in the puzzle. *Int Immunopharmacol*, 13, (2), pp.215-8.

Montoya, G. L.; Sierra, J. A.; Alzate, F.; Holzgrabe, U.; Ramirez, J. R. (2013). Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* with immunomodulatory activity on dendritic cells. *Brazilian journal of pharmacognosy*, 23, pp. 754-751.

Avalos, A.; Perez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca, serie fisiologia vegetal*, 2, (3), pp.119-145.

Saleem, M. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Letters*, 285, (2), pp. 109-115.

Patocka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine significance. *Journal of applied biomedicine*, 1, pp.7-12

Moreau, R.A.; Whitaker, B.D.; Hicks, K.B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res*, 41, pp.457-500.

Jäger, S.; Trojan, H.; Kopp, T.; Laszczyk, M.N.; Scheffler, A. (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 14, (6), pp.2016-31.

Ramírez-Espinosa, J.J.; Rios, M.Y.; López-Martínez, S.; López-Vallejo, F.; Medina-Franco, J.L.; Paoli, P.; Camici, G.; Navarrete-Vázquez, G.; Ortiz-Andrade, R.; Estrada-Soto, S. (2011). Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP-1B: in vitro, in silico, and in vivo approaches. *European journal of medicinal chemistry*, 46, (6), pp.2243-51.

Fernández, M.A.; de las Heras, B.; García, M.D.; Sáenz, M.T.; Villar, A. (2001). New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J Pharm Pharmacol*, 53, pp.1533–1539.

Bradford, P.G.; Awad, A.B. (2007). Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res*, 51, pp.161–70.

Franco- Roselli, P.; Berg, C. (1997). Distributional patterns of cecropia (cecropiaceae): a panbiogeographic analysis. *Caldasia*, 19, (1).

Skoog, D. A.; Crouch S. R.; Holler J. F. (2008). Principles of instrumental analysis. Cengage Learning Latin America.

Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. (2011). Introduction to modern liquid chromatography. Wiley.