

**CREACIÓN DE UNA BIBLIOTECA ESPECTRAL DE ALCALOIDES DE
*AMARYLLIDACEAE***

CINDY MARCELA RIVERA BAZÁN

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA DE FARMACÉUTICA
CALI
2015**

**CREACIÓN DE UNA BIBLIOTECA
ESPECTRAL DE ALCALOIDES DE
*AMARYLLIDACEAE***

SANTIAGO DE CALI

2015

CINDY MARCELA RIVERA BAZÁN

**Trabajo de grado para optar al
grado de**

Pregrado en Química Farmacéutica

Tutor:

**GUILLERMO LEÓN MONTOYA,
Ph.D.**



APROBADO POR:

Marcela Santaella Tenorio

Marcela Santaella Tenorio Ph. D
Evaluador

Nora E. Valderruten

Nora Elena Valderruten Posso Ph. D
Evaluador

Guillermo León Montoya Peláez

Guillermo León Montoya Peláez Ph. D
Director del Proyecto.

Santiago de Cali, 07 Septiembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme, acompañarme, brindarme fortaleza y sabiduría en cada una de las etapas de mi carrera de pregrado.

Especial agradecimiento al doctor Guillermo Montoya Ph.D., por todo el conocimiento y tiempo brindado y de guiarme en el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la doctora Marcela Santaella Ph.D., por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto de investigación y de formar parte del grupo de investigación de Biotecnología.

Agradezco a la Universidad Icesi, al grupo de investigación de biotecnología y al grupo de investigación de productos naturales.

A mi madre, mi padre, mis tías y tíos por todo el apoyo incondicional.

A mis amigos y compañeros por brindarme su ayuda en los momentos que más necesite.

CONTENIDO

1. RESUMEN DEL PROYECTO.....	9
2. ABSTRACT.....	10
3. INTRODUCCIÓN.....	11
4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	13
4.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia	13
4.2. Marco teórico y estado del arte:.....	14
5. Objetivos.....	23
5.1.1. Objetivo general	23
5.1.2. Objetivos específicos	23
6. Metodología.....	24
7. Resultados y Análisis de resultados	29
7.1. Extracción y purificación de la fracción total de alcaloides	29
7.2. Creación de la Librería espectral de alcaloides	30
7.2.1. Creación de la librería espectral de alcaloides: Fracción 2	31
7.2.2. Creación de la librería espectral de alcaloides: Fracción 3	35
7.3. Análisis de los resultados obtenidos a partir de la librería espectral de <i>Amaryllidaceae</i>	40
8. CONCLUSIONES	47
9. RECOMENDACIONES.....	48
10. Bibliografía	49
11. ANEXOS	52
11.1. Anexo 1. Procedimiento para la Extracción de la Fracción total de Alcaloides.....	52
11.2. Anexo 2. Condiciones cromatográficas UPLC y espectrometría de masas.....	54
11.3. Anexo 3. Patrón de fragmentación identificados en <i>Zephyranthes grandiflora</i> por UPLC-DAD/ESI-MS/MS (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012).....	56

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Alcaloide representativo de cada clase: (1) Licorina; (2) Licorenina; (3) Narciclasina; (4) Galantamina; (5) Crinina; (6) Pretazetina; (7) Latisodina y (8) Montanina (Martin, 1987).....	16
Figura 2. Ruta biosintética de la formación de los precursores de los alcaloides de <i>Amaryllidaceae</i> (Sousa da silva, 2009).....	17
Figura 3. Imagen de <i>Zephyranthes grandiflora</i> (Knight, 2007).....	18
Figura 4. Esquema simplificado del sistema ESI. El cono tiene como función fragmentar y captar los iones para ser transportados al detector. (Waters, 2015)	21
Figura 5. Gradiente de potencial después de la formación de los iones (Waters, 2015).....	21
Figura 6. Esquema de generación de iones por electrospray (Montoya, 2011).....	22
Figura 7. Fracción total de alcaloides en el sistema metanol: acetato de etilo 9:1 (izquierda); Purificación de la fracción total de alcaloides (derecha)	30
Figura 8. Cromatograma obtenido de la fracción 2	31
Figura 9. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 318 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)	32
Figura 10. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Galantina (Galanthine) de ión molecular 318 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der).....	33
Figura 11. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Crinamidina (Crinamidine) de ión molecular 318 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der).....	33
Figura 12. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Hemantamina (Haemanthamine) de ión molecular 302 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der).....	34
Figura 13. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 348 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)	34
Figura 14. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Tipo Tortuosina de ión molecular 296 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)	35
Figura 15. Cromatograma obtenido del tubo 3 (Sistema metanol) a voltaje de cono 10V (der) y 70V (izq).....	35
Figura 16. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 290 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)	36
Figura 17. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Licoramina (Lycoramine) de ión molecular 290 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der).....	37
Figura 18. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 334 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)	37
Figura 19. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 334 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)	38
Figura 20. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Vitatina (Vittatine) de ión molecular 272 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)	38
Figura 21. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 320 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)	39
Figura 22. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Tipo Licorina (Lycorine type) de ión molecular 282 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der).....	39

Figura 23. Estructuras de los alcaloides identificados (PubChem, 2015)	40
Figura 24. Patrón de fragmentación del alcaloide galantina (galanthine) (Bergoñón, 1994).....	41
Figura 25. Representación de las dos señales de fragmentación en el espectro de masas de la galantina (Galanthine) con voltaje de cono 70V	42
Figura 26. Patrón de fragmentación del alcaloide Hemantamina (Haemanthamine) (Hanks, 2002)	43
Figura 27. Representación de las cuatro señales de fragmentación en el espectro de masas de la Hemantamina (Haemanthamine) con voltaje de cono 70V.....	44
Figura 28. Proceso de extracción y purificación de la fracción total de alcaloides.	53

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Matriz de marco lógico para la realización de la librería espectral de alcaloides provenientes de <i>Zephyranthes grandiflora</i>	24
Tabla 2. Reactivos utilizados para la extracción y análisis en el UPLC/MS de los alcaloides provenientes de <i>Zephyranthes grandiflora</i>	26
Tabla 3. Clasificación de las muestras de <i>Zephyranthes grandiflora</i>	26
Tabla 4. Sistema de fases móviles para la purificación de alcaloides por “Dry-Column Flash Chromatography”	29
Tabla 5. Identificación de alcaloides de acuerdo al tiempo de retención e ión molecular presentes en la fracción 2 (T2) (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012)	32
Tabla 6. Identificación de alcaloides de acuerdo al tiempo de retención e ión molecular presentes en la fracción 3 (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012)	36
Tabla 7. Fragmentaciones reportadas en “Simultaneous quantification of <i>Amaryllidaceae</i> alkaloids from <i>Zephyranthes grandiflora</i> by UPLC-DAD/ESI-MS/MS” (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012) con respecto a las fragmentaciones obtenidas a voltaje de cono 10V y 70V	45
Tabla 8. Condiciones empleadas en el UPLC (Peralta, 2014)	54
Tabla 9. Condiciones para el sistema cromatográfico UPLC acoplado a espectrometría de masas (Peralta, 2014)	55
Tabla 10. Tiempo de retención, máximo de absorción, patrón de fragmentación de los componentes identificados en <i>Zephyranthes grandiflora</i> por UPLC-DAD/ESI-MS/MS	56

1. RESUMEN DEL PROYECTO

Las plantas pertenecientes a la familia *Amaryllidaceae* aparte de presentar un valor ornamental, también se caracterizan por los alcaloides que producen. A pesar de los estudios fitoquímicos llevados a cabo con géneros de la zona mediterránea, los géneros andinos y de distribución restringida, se carece de aportes y estudios de caracterización de sus principales marcadores quimiotaxonómicos. Para la identificación moderna de los alcaloides de esta familia se emplea principalmente la espectrometría de masas. Esta moderna herramienta de análisis posee no solo alta sensibilidad para determinación de compuestos en muy bajas concentraciones, sino además, permite analizar mezclas complejas multicomponente.

La finalidad de este proyecto es desarrollar una librería espectral la cual será una herramienta útil debido a que permitirá conocer a nivel fitoquímico los alcaloides presentes en el género *Zephyranthes*, y relacionar si estas moléculas se encuentran en los distintos géneros de esta familia. Esta librería será alimentada con el transcurrir de los proyectos de investigación que se sigan realizando en esta línea. Para determinar la veracidad de la librería espectral, los resultados obtenidos durante la fase experimental bajo las condiciones determinadas previamente, se compararon con el artículo “Simultaneous quantification of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS” (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012), los datos reportados en proyectos de grados anteriores, además de los reportados en la literatura.

Se logró la creación de la librería de espectros de masas de la especie *Zephyranthes grandiflora* (*Amaryllidaceae*), constituida por 13 alcaloides que fueron identificados y caracterizados por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UPLC/MS). Por medio de esta librería se logró establecer las condiciones de ionización más adecuadas para la caracterización de estas moléculas.

Palabras claves: *Amaryllidaceae*, *Zephyranthes grandiflora*, Cromatografía, Espectrometría de masas.

2. ABSTRACT

The plants belonging to the Amaryllidaceae family, apart from presenting an ornamental value, are also characterized by alkaloids produced. Despite the phytochemical studies conducted with the Mediterranean genres, the Andean genres and the restricted distribution, lack of contributions and their characterization studies of their chemotaxonomic markers. For the modern identification of these family's alkaloids, it is mainly used mass spectrometry. This modern analysis tool not only has high sensitivity for determination of compounds in very low concentrations, but also allows the analysis of complex multicomponent mixtures.

The purpose of this project is to develop a spectral library which will be a useful tool and will be fed with the passing of the research projects that continue to be made in this line. To determine the accuracy of the spectral library, the results obtained during the pilot phase under previously determined conditions, will be compared with reported data in previous degree projects in addition to those reported in the literature.

The creation of the mass spectra library of the species *Zephyranthes grandiflora* (Amaryllidaceae) was achieved, constituted by 13 alkaloids were identified and characterized by high efficiency liquid chromatography (UPLC) coupled to mass spectrometry (UPLC/MS). Through this library it achieved to establish the most appropriate ionization conditions for the characterization of these molecules.

Key words: *Amaryllidaceae*, *Zephyranthes grandiflora*, Chromatography, mass spectrometry.

3. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el hombre ha tenido que valerse de una gran variedad de recursos naturales para sobrevivir, las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y curación de sus enfermedades. En la industria farmacéutica, a pesar de la gran variedad de moléculas derivada de los progresos en el ámbito de la química combinatoria y la síntesis orgánica, los productos naturales continúan desempeñando un papel fundamental en el desarrollo de fármacos.

Colombia presenta una alta diversidad de plantas debido a que se encuentra ubicada en la región del trópico húmedo ecuatorial. Es un país que abarca distintas culturas que se han beneficiado durante años de la riqueza natural por las innumerables propiedades farmacológicas que presentan las plantas para el tratamiento de enfermedades (Cabezas, Codina, Bastidas, & Viladomat, 2009).

En la actualidad, existen casos de fármacos que se obtienen directamente a partir del material vegetal, siendo una necesidad de generar fuentes renovables y promover la protección de la biodiversidad vegetal. El uso racional de los recursos naturales es esencial para evitar un posible deterioro irreversible.

Las plantas de la familia *Amaryllidaceae*, presentan un alto valor fitoquímico y farmacológico, son hierbas perennes o bienales con bulbos cubiertos por catáfilas, ocasionalmente con rizomas y con un escapo terminal. La familia tiene una amplia distribución y se encuentra bien representada en los trópicos. Algunas especies de los géneros de esta familia que se encuentran en Colombia son: *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes*, *Hippeastrum* y *Crinum*. Los géneros: *Eucharis*, *Crinum* y *Caliphuria* se encuentran en vía de extinción por lo que presenta una distribución restringida. (Cabezas F. B., 2007)

Los estudios fitoquímicos y farmacológicos se centraron en esta familia de plantas por el aislamiento del alcaloide licorina a partir de la especie *Narcissus pseudonarcissus* (*Amaryllidaceae*) en 1874, a partir de ese primer descubrimiento más de 200 especies de esta familia han sido estudiadas. Estos estudios se han centrado en la importancia farmacéutica dado el amplio rango de actividad biológica que tienen. (López & Espejo, 2002)

En Colombia existen pocos trabajos de investigación centrado en el área fitoquímica de esta familia de plantas, a pesar de que es muy reconocida en muchos países, se puede observar que los estudios se han centrado en entender la parte farmacológica de sus metabolitos secundarios.

El presente trabajo de investigación surgió ante la necesidad de indagar y dar a conocer la composición química de los alcaloides de plantas que pertenecen a la

especie *Zephyranthes grandiflora* (*Amaryllidaceae*), brindando un aporte al conocimiento de estas moléculas por medio de una caracterización cualitativa.

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo identificar y caracterizar, por espectrometría de masas, alcaloides presentes en *Z. grandiflora* y la creación de la librería espectral a partir de los alcaloides identificados. Esta librería espectral en la medida en que se siga alimentando brindará información acerca de los alcaloides presentes en estas plantas y servirá además como una base para futuros estudios en la cual se quieran identificar perfiles metabólicos entre los diferentes géneros y especies.

4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

4.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia

Colombia es un país que presenta una alta diversidad de plantas en la cual muchas de ellas tienen un alto potencial para la industria farmacéutica. Entre la diversidad de plantas se encuentra la familia *Amaryllidaceae*, que se ha caracterizado por tener la capacidad de biosintetizar un grupo de sustancias químicas de tipo alcaloidal pero de carácter exclusivo para esta familia. Muchos estudios se han centrado en los géneros: *Crinum*, *Ecucharis*, *Caliphruria*, *Narcisus* y *Phaedranasa*, y se ha observado que la mayoría de estos géneros se encuentran amenazados. Sin embargo, el género *Zephyranthes* es muy abundante en Colombia y se ha visto que es una especie poco estudiada por lo que se debe de realizar estudios a nivel fitoquímico.

Las investigaciones que se conocen sobre el género *Zephyranthes* en Colombia, se relacionan con la caracterización morfológica desde un punto de vista fisiológico y biológico, que han enriquecido el conocimiento de la biodiversidad botánica y ha permitido identificar y establecer diferencias de las distintas especies del género. Sin embargo, es esencial conocer el contenido de metabolitos secundarios que han sido objeto de inspiración para la mayoría de estudios que actualmente se siguen realizando en esta familia de plantas.

El realizar análisis a nivel químico, biológico e identificación de posibles grupos farmacológicos en las plantas, es importante ya que permite enriquecer el conocimiento de la biodiversidad botánica de una familia de plantas debido a que permite corroborar que estas características muy posiblemente se comparten entre los distintos géneros. El detectar nuevas aplicaciones a nivel farmacológico de los metabolitos que contienen, permite hacer una selección racional de la especie para el estudio de nuevas aplicaciones farmacológicas.

Por medio de la librería de alcaloides de *Zephyranthes grandiflora*, se busca brindar información clara acerca de los tipos de alcaloides que contiene, de esta manera se podrían identificar moléculas que son producidas y que ya fueron reportadas en otros géneros de la familia *Amaryllidaceae*. El realizar una caracterización de tipo cualitativo de los alcaloides y crear un perfil de los mismos, aportara al reconocimiento químico que presentan estas plantas.

4.2. Marco teórico y estado del arte:

Metabolitos secundarios en las plantas: alcaloides

Las plantas han ido desarrollando diversas estrategias de defensa en condiciones de estrés biótico y abiótico. Una de estas estrategias es la producción de metabolitos secundarios como parte de protección química contra animales, microorganismos patógenos e incluso de las condiciones ambientales (Sepúlveda-Jiménez, 2004).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular y de acuerdo a su composición química se clasifican en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios nitrogenados comprenden a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos. Por su parte, los metabolitos no nitrogenados se dividen en terpenoides, policétidos y fenilpropanoides (Sepúlveda-Jiménez, 2004).

Entre los diversos metabolitos secundarios se enfatizará en los alcaloides, el cual es el objeto de estudio. Los alcaloides son un grupo de los metabolitos secundarios más numerosos con reportes que sobrepasan los 15000 alcaloides. Estas sustancias son solubles en agua a valores de pH bajos, contiene al menos un átomo de nitrógeno en su estructura y presenta actividad biológica (Ávalos García & Pérez-Urria, 2009). La mayoría son heterocíclicos, aunque existen compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) y se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, siendo la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Ávalos García & Pérez-Urria, 2009).

Los alcaloides abundan en los tejidos de intensa actividad celular, por ejemplo en hojas, raíces, semillas, pero hay variaciones en cuanto a la concentración de estos metabolitos y dependiendo de la madurez, suelo, método de cultivo e incluso factores del ambiente (Marcano & Hasegawa, 2002). Generalmente, las especies de una misma familia producen alcaloides estructuralmente similares, por lo tanto el conocimiento a nivel fitoquímico de la planta de interés es de utilidad para predecir los posibles tipos de alcaloides presentes (Marcano & Hasegawa, 2002).

Extracción de la fracción total de alcaloides

Las diferencias de solubilidad de los alcaloides dan lugar a diferentes métodos para su aislamiento a partir del material vegetal y para su separación de las sustancias no alcaloídicas presentes en los extractos. Los alcaloides contienen un N (nitrógeno) el cual otorga un carácter básico; por lo tanto, las bases libres son poco solubles en agua pero solubles en solventes orgánicos. Sin embargo; en las sales ocurre un efecto contrario, siendo solubles en agua y escasamente solubles en solventes orgánicos. (Ringuelet & Viña, 2013).

Los métodos más generales de extracción, de acuerdo a su solubilidad son:

- Extracción en medio básico
- Extracción en medio ácido
- Extracción con solventes orgánicos

Alcaloides de la familia *Amaryllidaceae*: Generalidades

Las plantas de la familia *Amaryllidaceae* se conocen por ser hierbas cosmopolitas, perennes o bienales con bulbos cubiertos por catáfilas, ocasionalmente con rizomas, con un escapo terminal y algunos géneros florecen, por lo que tienen un valor ornamental. La familia tiene una amplia distribución y se encuentra bien representada en los trópicos con centros importantes de diversidad en Sudáfrica, en los Andes de Suramérica y en el mediterráneo. Además agrupa alrededor de 860 especies en 50 géneros (López & Espejo, 2002).

Los alcaloides provenientes de la familia *Amaryllidaceae* han tenido gran importancia en estudios farmacéuticos. Esto se remonta desde la historia con el aislamiento del primer alcaloide de *Amaryllidaceae*, la licorina, que fue obtenido de la especie *Narcissus pseudonarcissus* por Gerard en 1874, por lo que más de 200 especies de esta familia han sido estudiadas por la presencia de alcaloides, los cuales han adquirido características quimiotaxonómicas para los géneros de la familia (Cabezas, Codina, Bastidas, & Viladomat, 2009)

Los alcaloides de *Amaryllidaceae* se definen como un sistema de anillos compuesto de C6-C1 y de N-C2-C6, como un bloque estructural derivado biogenéticamente de los aminoácidos L-Tirosina y L-Fenilalanina. Generalmente son moderadamente básicos (valores de pKa entre 6-9). Cada alcaloide presenta un solo átomo de Nitrógeno, el cual puede ser secundario, terciario y eventualmente cuaternario. El número de carbonos varía entre 16 a 20 átomos (Cabezas, Codina, Bastidas, & Viladomat, 2009).

Los alcaloides de *Amaryllidaceae* constituyen un importante grupo de origen natural que posee una diversa funcionalidad y estructura. Se han aislado más de 300 alcaloides de *Amaryllidaceae*, donde la mayoría de estos compuestos se han clasificado en 9 subgrupos principales de acuerdo a la homología estructural. Los alcaloides representativos son: Licorina, licorenina, narciclasina, galantamina, crinina, pretazetina, latisodina y montanina (Martin, 1987).

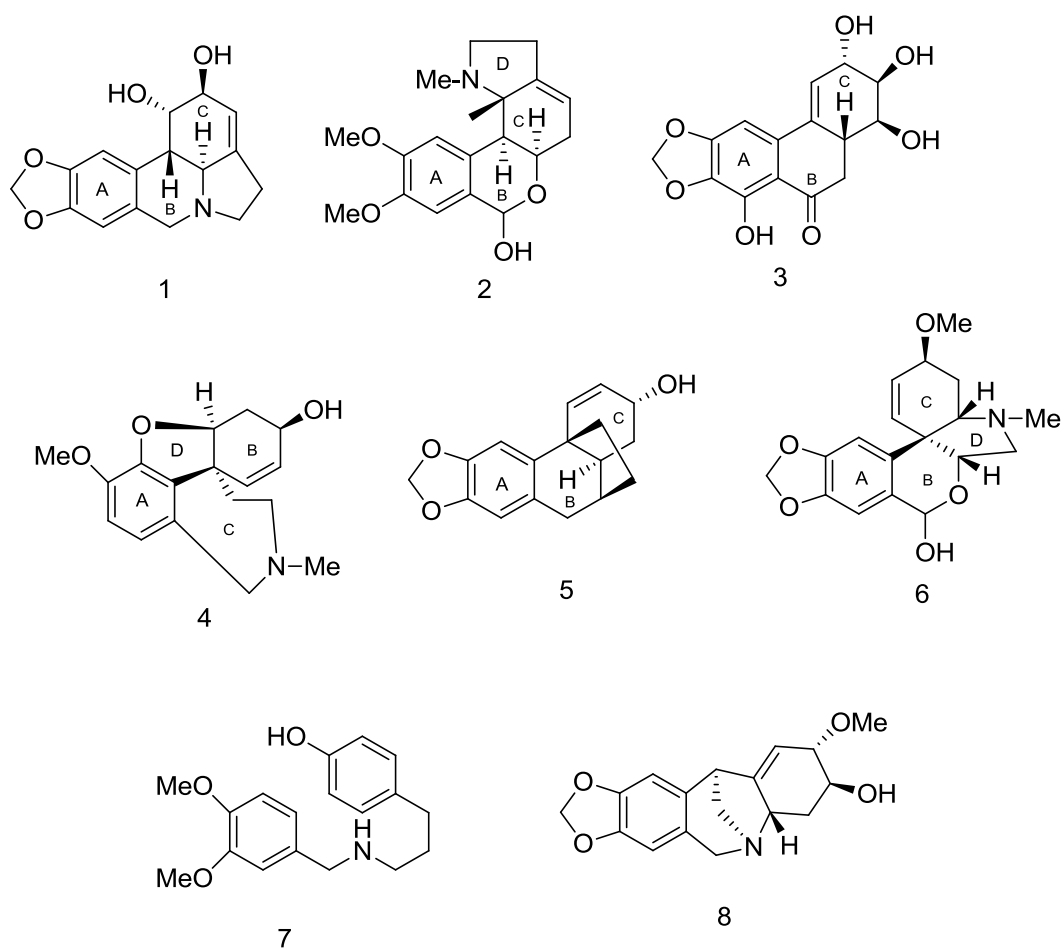


Figura 1. Alcaloide representativo de cada clase: (1) Licorina; (2) Licorenina; (3) Narciclasina; (4) Galantamina; (5) Crinina; (6) Pretazetina; (7) Latisodina y (8) Montanina **(Martin, 1987)**

En general, estos alcaloides presentan diferencias a nivel estructural, todos se derivan de la Norbelladina, que se produce del aldehído aromático 3,4-dihidroxibenzaldehído y la tiramina, que se forma a partir de la fenilalanina y la tirosina por medio de la ruptura de la cadena lateral del ácido cinámico (Sousa da silva, 2009). A continuación se presenta la ruta biosintética de la formación de los precursores de los alcaloides de *Amaryllidaceae*.

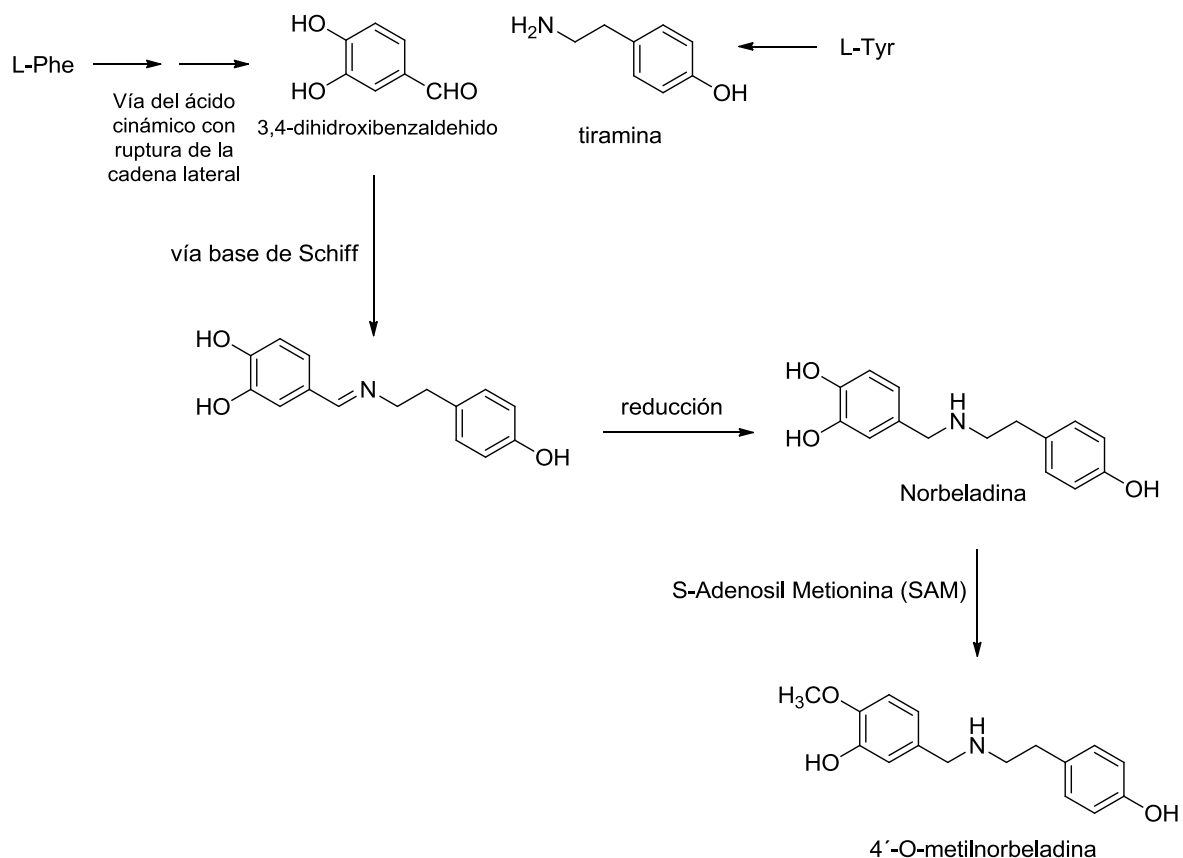


Figura 2. Ruta biosintética de la formación de los precursores de los alcaloides de *Amaryllidaceae* (Sousa da Silva, 2009)

La numeración de los alcaloides de *Amaryllidaceae* no sigue estrictamente las normas establecidas por la IUPAC, de hecho fue propuesta por Ghosal y colaboradores en 1985 que tienen en cuenta principalmente la ruta biosintética (Osorio, 2008):

- La enumeración del anillo aromático A es siempre la misma independiente del tipo de esqueleto.
- La posición bencílica α con respecto al heteroátomo siempre es 6.
- La posición vecinal del N en el anillo pirrolidínico no comprometida con los anillos B o C, es siempre 12.
- La enumeración del anillo C es siempre en el sentido de las agujas del reloj, excepto para los alcaloides del tipo homolicorina, debido a su proceso biosintético.
- En los alcaloides de tipo norbelladina, la notación ['] hace referencia al anillo que tiene como precursor la L-Phe.

Descripción del género de estudio: *Zephyranthes* sp

Las plantas del género *Zephyranthes* pertenecen a la familia de *Amaryllidaceae* y son plantas nativas del continente de América. Estas plantas, son conocidas por su valor ornamental y sus propiedades terapéuticas (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012). Se han realizado estudios en este género de plantas y se ha evidenciado que presenta alcaloides de interés farmacológico, que se han ido estudiando en otros géneros de la misma familia.

El género *Zephyranthes* consta de aproximadamente de 70 especies y crecen en climas cálidos. Presenta un bulbo parecido a la cebolla con una cobertura similar al papel, y produce flores de color rosa, blanco o amarillo por tallo (Knight, 2007).



Figura 3. Imagen de *Zephyranthes grandiflora* (Knight, 2007)

Las especies del género *Zephyranthes* han sido ampliamente utilizadas en la medicina alternativa por muchos países. Por ejemplo, se han empleado las hojas de *Z. candida* en el tratamiento de la diabetes mellitus en Sudáfrica, y en Perú se ha utilizado la *Z. parulla* para el tratamiento de tumores (Cahlíková & Valterová, 2011) .

A pesar de que hay pocos estudios fitoquímicos del género *Zephyranthes*, se ha reportado el uso de la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) en la identificación de 8 alcaloides en *Z. citrina* (Cahlíková & Valterová, 2011). Por lo tanto, la caracterización fitoquímica de estos metabolitos secundarios en este género será de gran ayuda, para identificar posibles componentes que tengan en común para estudios terapéuticos.

Cromatografía líquida: UPLC

La cromatografía líquida fue descrita a principios de 1900 por el botánico ruso Mikhail S. Tsweet. Sus estudios se centraron en la separación de pigmentos de las hojas extraídos de plantas utilizando un disolvente en una columna empaquetada con partículas. El desarrollo de columnas en los últimos años y de los sistemas de suministro de solvente capaz de entregar con precisión la fase móvil, ha permitido que la cromatografía líquida se convierta en la columna vertebral a nivel analítico para muchas industrias (Waters, 2015).

En 2004, nuevos avances en la tecnología de la instrumentación han logrado aumentos de forma significativa en cuanto a resolución, velocidad y sensibilidad en la cromatografía líquida. Se han elaborado columnas cromatográficas con un tamaño de partícula cada vez más pequeño lo que genera aumento de la presión de trabajo (15000 psi), esta nueva tecnología fue inicialmente patentada con las siglas UPLC-Ultra-Performance Liquid Chromatography (Waters, 2015).

El UPLC es un derivado del HPLC, cuyo principio subyace en el relleno de la columna. La columna cromatográfica para el UPLC tiene un relleno con un tamaño de partícula significativamente pequeño, por lo que aumenta la eficiencia y la resolución. La ecuación de van Deemter define que la eficiencia del proceso cromatográfico y es proporcional a la disminución del tamaño de partícula. (Nováková, Matysová, & Solich, 2005)

La ecuación de van Deemter es una fórmula empírica que describe la relación entre la velocidad lineal (flujo) y la altura teórica de los platos (HETP):

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde A, B y C son constantes y v es la velocidad lineal. El término A representa la difusión de Eddy y es independiente de la velocidad, es más pequeño cuando las partículas de las columnas son pequeñas y uniformes. El término B representa la difusión longitudinal, este efecto disminuye a altas tasas de flujo por lo que se divide por v . El término C es la resistencia a la transferencia de masa. (Sridhar, Divya, Madhuri, & Sudhakar, 2013).

Espectrometría de masas y fuente de iones por Electrospray (ESI)

Consideraciones generales sobre la espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica poderosa utilizada en la cuantificación, identificación y caracterización de moléculas dentro de una muestra. El proceso implica la conversión completa de la muestra en iones gaseosos, con o

sin fragmentación, que luego se caracterizan por la relación masa/carga (m/z) y las abundancias relativas. Esta técnica estudia básicamente el efecto de la energía ionizante en las moléculas y depende de las reacciones químicas en la fase gaseosa en el que las moléculas de la muestra se consumen durante la formación de especies iónicas y neutras (Lam, Chan, Cheung, & Law, 2003).

Un espectrómetro de masas genera múltiples iones de la muestra, entonces los separa según su proporción específica de masa a carga (m/z), y luego graba la abundancia relativa de cada tipo de iones.

El primer paso en el análisis de espectrometría de masas de los compuestos es la producción de iones en fase gaseosa, a partir de los iones se obtiene el ión molecular (corresponde al ión de la molécula sin fragmentar) que es sometido a fragmentación obteniendo múltiples iones derivados de este. Los iones se separan en el espectrómetro de masas en función de su relación masa-carga y se detectan en proporción a su abundancia. En un espectro de masas se muestra el resultado en forma de señales que corresponden a la abundancia de los iones y estos iones proporcionan información sobre la naturaleza química y la estructura de su molécula precursora. En el espectro de un compuesto puro, el ion molecular, si está presente, aparece en el valor más alto de m/z (seguido por iones que contienen isótopos más pesados) y da la masa molecular del compuesto (Gross, 2011).

Generación de iones en una fuente de electrospray

La ionización por electrospray (ESI) es una técnica en la cual la generación de los iones se realiza a presión atmosférica en vez de alto vacío. La muestra se solubiliza en un solvente polar y se bombea a través de un capilar de acero inoxidable que lleva entre 2000 y 4000 Voltios (V). De acuerdo a la figura 4, el líquido en aerosol sale del capilar a la presión atmosférica, por lo tanto hay una desolvatación de los iones que llegan al espectrómetro de masas y en la figura 5 se puede apreciar el potencial de cargas que se genera posterior a la formación de los iones (Waters, 2015).

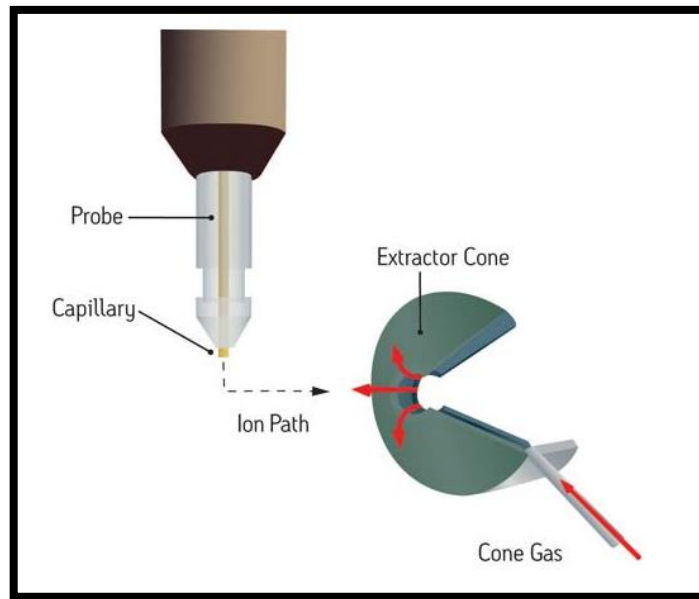


Figura 4. Esquema simplificado del sistema ESI. El cono tiene como función fragmentar y captar los iones para ser transportados al detector. **(Waters, 2015)**

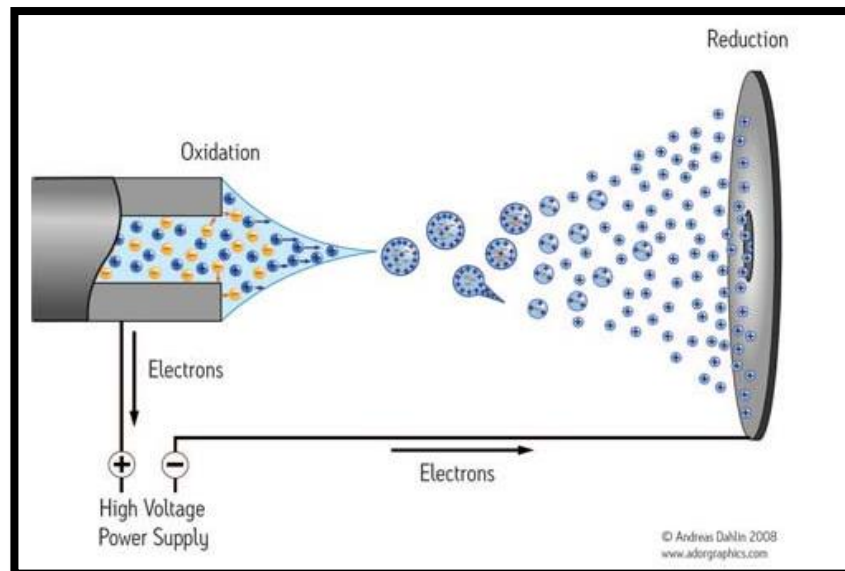


Figura 5. Gradiente de potencial después de la formación de los iones **(Waters, 2015)**

Una condición que mejora la ionización por ESI es tener en solución especies ya ionizadas. Sin embargo, el uso de aditivos como ácido fórmico puede favorecer la ionización incluso en compuestos típicamente neutros. Electro spray es la técnica de

ionización más suave actualmente disponible del mercado, en la figura 6 se aprecia el principio del generador de iones por electro spray ESI en la cual estos iones se genera apartir de presión atmosférica y se genera un potencial entre el capilar y el cono dando lugar a la desolvatación de los iones. Este generador de iones tiene gran aplicación para moléculas de hasta 100.000 Da (Montoya, 2011).

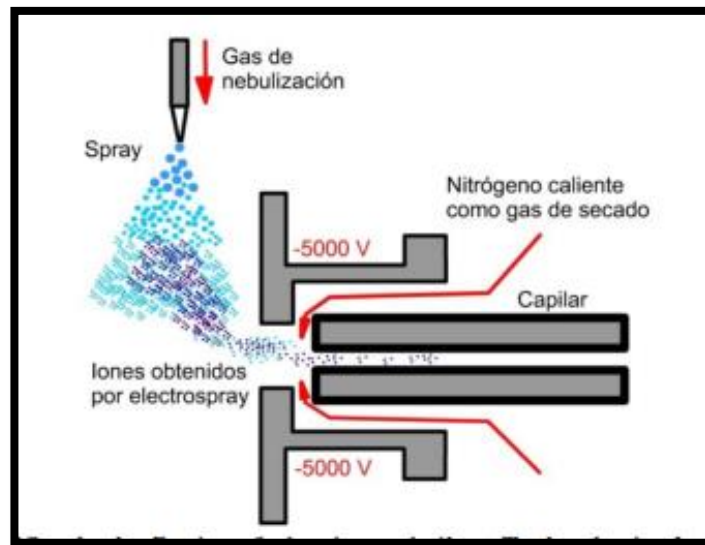


Figura 6. Esquema de generación de iones por electro spray (Montoya, 2011)

5. Objetivos

5.1.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar los alcaloides más predominantes presentes en la especie *Zephyranthes grandiflora* provenientes del vivero de la Universidad Icesi.

5.1.2. Objetivos específicos

- Determinar todos alcaloides que han sido reportados para el género *Zephyranthes* según datos bibliográficos.
- Establecer las mejores condiciones de ionización de los alcaloides empleando la fuente de iones por electrospray.
- Crear la biblioteca de espectros de masas, mediante el registro de espectros en el software: Masslynx.

6. Metodología

El alcance de este proyecto es la creación de una librería espectral de alcaloides de la especie *Zephyranthes grandiflora*, en la cual los resultados serán documentados. El proyecto se llevará a cabo en la Universidad Icesi, en el laboratorio de investigación de Productos Naturales y en el vivero. La matriz de marco lógico que se muestra en la tabla 1 y la metodología descrita a continuación se empleará con el fin de realizar la librería espectral de alcaloides.

Tabla 1. Matriz de marco lógico para la realización de la librería espectral de alcaloides provenientes de *Zephyranthes grandiflora*.

Objetivo general			
Identificar y caracterizar los alcaloides más predominantes presentes en las plantas <i>Zephyranthes grandiflora</i> provenientes del vivero de la Universidad Icesi.			
Objetivos específicos	Actividades	Supuestos	Indicador
Determinar todos alcaloides que han sido reportados para el género <i>Zephyranthes</i> según datos bibliográficos.	<ul style="list-style-type: none"> Investigar, los alcaloides más representativos presente en el género <i>Zephyranthes grandiflora</i>. Determinar el método de extracción de alcaloides. Reconocer la presencia de alcaloides en el extracto obtenido, por medio de reactivo de Dragendorff. 	Se disponen de los equipos y reactivos necesarios, para la extracción de los alcaloides.	<ul style="list-style-type: none"> Prueba colorimétrica positiva, en la fracción de alcaloides extraída.
Establecer las mejores condiciones de ionización de los alcaloides	<ul style="list-style-type: none"> Realizar una infusión de la muestra en el espectrómetro de masas y 	Disponibilidad del equipo del espectrómetro de masas y la fuente	<ul style="list-style-type: none"> Obtención de espectros de masas con mayor resolución.

empleando la fuente de iones por electrospray.	establecer el valor del voltaje de cono.	de ionización de iones.	
Crear la biblioteca de espectros de masas, mediante el registro de espectros en el software: Masslynx.	<ul style="list-style-type: none"> Ingresar los espectros obtenidos al software del equipo. Construyendo así la biblioteca. 	Disponibilidad del equipo espectrómetro de masas y su software Masslynx.	<ul style="list-style-type: none"> Obtención de una biblioteca de espectros de masas de alcaloides de <i>Zephyranthes grandiflora</i>.

Materiales

El material vegetal empleado son las plantas de la especie *Zephyranthes grandiflora* que se encuentran en el vivero de la Universidad Icesi. Cabe mencionar que dichas plantas se encuentran a cargo del grupo de investigación de biotecnología.

Los materiales utilizados en la parte experimental fueron: placas de cromatografía planar TLC sílica gel 60 G con indicador de fluorescencia a 254 nm y la columna cromatográfica ACQUITY UPLC BEH C18 tamaño de partícula de 1,7 µm (2,1 x 100 mm), equipo de cromatografía UPLC acoplado a un espectrómetro de masas marca Waters® (SQD2), Rotaevaporador Heidolph, Rapidvap y Sonicador Elma 60KHz.

Se utilizaron los siguientes reactivos que se describen en la tabla 2, con el fin de realizar la extracción de la fracción total de alcaloides y su identificación mediante el UPLC/MS.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la extracción y análisis en el UPLC/MS de los alcaloides provenientes de *Zephyranthes grandiflora*

Reactivo	Pureza	Marca
Acetonitrilo grado hypergrade	99,9%	MERCK
Metanol grado HPLC	99%	ALDRICH Chemistry
Acido clorhídico	97,8%	J. T. BAKER
Cloroformo	99,9%	MERCK
Acetato de etilo	89%	J. T. BAKER
Acido fómico	85%	ALDRICH Chemistry
Soda cáustica	70%	J. T. BAKER

➤ Preparación del Material vegetal

Se hizo una clasificación a nivel morfológico entre las especies *Z. carinata* y *Z. grandiflora*, esto se aprecia en la tabla 3. El cuidado de las plantas fue compartido junto con el grupo de investigación de biotecnología. Cada maceta se encontraba rotulada y de acuerdo al rótulo se determinó la procedencia de cada planta en estudio.

Tabla 3. Clasificación de las muestras de *Zephyranthes grandiflora*.

	Código Identificación	Procedencia
Origen 1	IA-023	Desconocido
	IA-025	Desconocido
	IA-026	Desconocido
Origen 2	IA-035	Tuluá
Origen 3	IA-044	Barranquilla
Origen 3	IA-045	Barranquilla
Origen 4	IA-100	Cali, San Fernando (El bosquecito)
Origen 5	IA-113	Ibagué

De cada planta se tomó aproximadamente de 3 a 5 hojas, las hojas se lavaron con una solución de extran 2% con el fin de retirar impurezas procedentes del vivero.

➤ **Extracción de la fracción total de alcaloides**

El fundamento acerca de la metodología de la extracción de alcaloides se basó en el proyecto de grado “Caracterización química de alcaloides del género *Zephyranthes* sp” de Andrea Escobar (ver anexo 1):

1. Se toma una muestra de hojas y se macera con nitrógeno líquido.
2. El material macerado se acidifica con HCL al 5% y se sonica a 40°C por 15 minutos.
3. Al extracto obtenido se filtra y se lava con HCl al 5%, se realiza una extracción con cloroformo descartando la fase orgánica.
4. A la fase acuosa se adiciona soda caustica pH 14 con el fin de basificar el medio a pH 9-11 y nuevamente se realiza una extracción con cloroformo recuperando la fase orgánica.
5. Por último la fase orgánica se lleva a sequedad y se reconstituye con metanol grado MS, obteniendo el extracto total de alcaloides.
6. Para comprobar la presencia de alcaloides en el extracto, se realizar una cromatografía planar y por medio del reactivo de Dragendorff el cual corresponde a una prueba de tipo cualitativo, debido a que es una prueba colorimétrica rápida y sencilla de realizar. (Escobar, 2014).

➤ **Análisis de la muestra en la espectroscopia de masas**

1. Reconstituir la fracción total de alcaloides en metanol grado MS.
2. Filtrar con un filtro de jeringa de 0,22 µm.
3. Inyectar en el equipo UPLC-MS
4. De acuerdo al espectro, se seleccionan entre 5 a 6 señales más predominantes.
5. Se establece el grado de ionización, presión y temperatura, para la resolución de los picos seleccionados.

➤ **Análisis de la muestra en UPLC-MS**

1. Reconstituir la fracción total de alcaloides en metanol grado MS.
2. Filtrar con un filtro de jeringa de 0,22 µm.
3. Inyectar en el equipo UPLC-MS.
4. Se programa el equipo con las condiciones de voltaje de cono del eslectrospray ESI establecidas.
5. Se seleccionan los alcaloides del extracto por medio del UPLC-MS respecto a los tiempos de retención para la comparación con la literatura reportada.

➤ **Creación de la biblioteca espectral de alcaloides**

Con los espectros obtenidos, se realiza una clasificación de acuerdo a los tiempos de retención e identificando el tipo de alcaloides. Cada uno de los espectros seleccionados se realizara el registro mediante el software Masslynx.

7. Resultados y Análisis de resultados

7.1. Extracción y purificación de la fracción total de alcaloides

De acuerdo a los proyectos anteriores, se ha determinado que el órgano de la planta donde hay una mayor cantidad de alcaloides son las hojas, por lo tanto la extracción de la fracción total de alcaloides se realizó a partir de las hojas de la especie *Z. grandiflora* (*Amaryllidaceae*).

Para la purificación del extracto obtenido se procedió a realizar el método de “Dry-Column Flash Chromatography”, esta técnica ofrece la separación de los compuestos de una forma segura, fácil y económica. La columna consta de una cama “seca” de gel de sílice, se eluye mediante el uso de succión y se drena en seco después de cada fracción (Shusterman, Glasfeld, & McDougal, 1997) (Ver anexo 1). Se emplearon 4 fases móviles variando la polaridad del sistema, los cuales se muestran a continuación:

Tabla 4. Sistema de fases móviles para la purificación de alcaloides por “Dry-Column Flash Chromatography”

Fracción	Sistema (Fase móvil)
1	Acetato de etilo
2	Acetato de etilo: Metanol (1:1)
3	Metanol
4	Acetona

Se realizó una cromatografía planar para determinar la presencia de alcaloides en los diferentes sistemas, además se empleó el estándar del alcaloide boldina para su validez. De acuerdo a la figura 7 se observa que las fracciones 2 y 3 presentan alcaloides debido a que dieron positivo a la prueba de Dragendorff y se contrastó con el estándar de boldina que también da un resultado positivo.

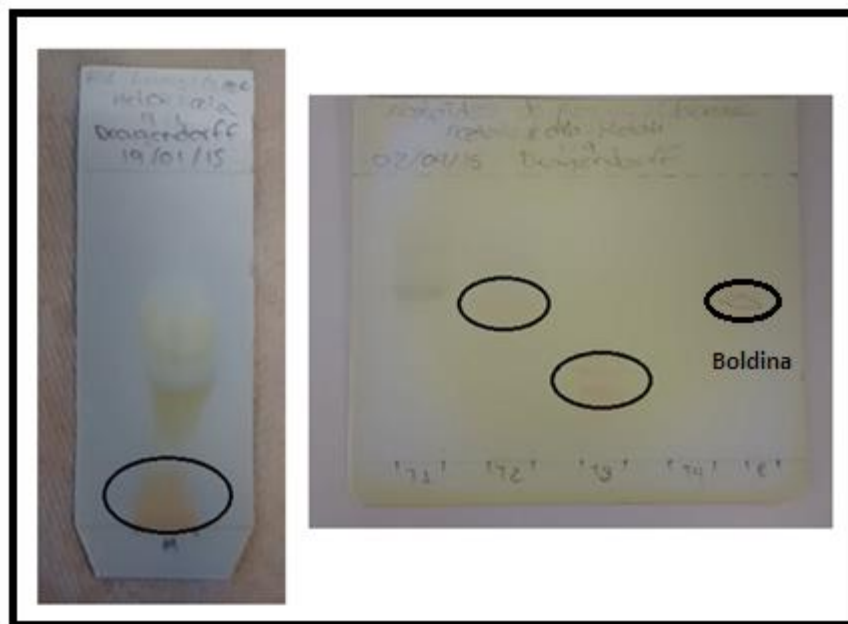


Figura 7. Fracción total de alcaloides en el sistema metanol: acetato de etilo 9:1 (izquierda); Purificación de la fracción total de alcaloides (derecha)

7.2. Creación de la Librería espectral de alcaloides

Las fracciones 2 y 3 descritas en la sección 7.1, fueron llevadas al UPLC/MS para la identificación y caracterización de los alcaloides presentes en dichas fracciones. Para determinar el grado de ionización para la fragmentación de las moléculas, se hizo una infusión en el espectrómetro de masas y se decidió ajustar el valor del cono a dos tipos de voltaje: 10V y 70V (Ver anexo 2 y figura 4).

En los espectros obtenidos para la identificación de los alcaloides se observa que en el voltaje de cono de 10V se presenta un menor número de reacciones de fragmentación, respecto al voltaje de cono 70V. Esto se debe a la capacidad del cono de fragmentar y atraer los iones para llevarlos al analizador, por lo tanto a mayor voltaje de cono se observa que el analizador reporta mayor cantidad de iones correspondientes a las fragmentaciones del ión molecular.

En los espectros de masas representadas en las figuras 9, 10, 12 y 17 correspondientes a los alcaloides Desconocido (Unknown), Galantina (Galanthine), Hemantamina (Haemanthamine) y Licoramina (Lycoramine) respectivamente, se observa de forma clara el comportamiento descrito anteriormente, donde hay una mayor abundancia del ión molecular a voltaje de cono 10V. En los demás espectros se observa la presencia de varias señales que posiblemente pueden corresponder a impurezas.

De acuerdo al artículo “Simultaneous quantification of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS” (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012) y los proyectos de grado “Caracterización química de alcaloides del género *Zephyranthes*” (Escobar, 2014) y “Cultivo in-vitro de tejidos vegetales de plantas del género *Zephyranthes* y evaluación de su producción de alcaloides” (Peralta, 2014), fue posible tener una aproximación en establecer el tipo de alcaloide con el espectro de masas obtenido, esto se aprecia en las tablas 5 y 6 donde se indica el alcaloide identificado de acuerdo al ión molecular y su patrón de fragmentación.

7.2.1. Creación de la librería espectral de alcaloides: Fracción 2

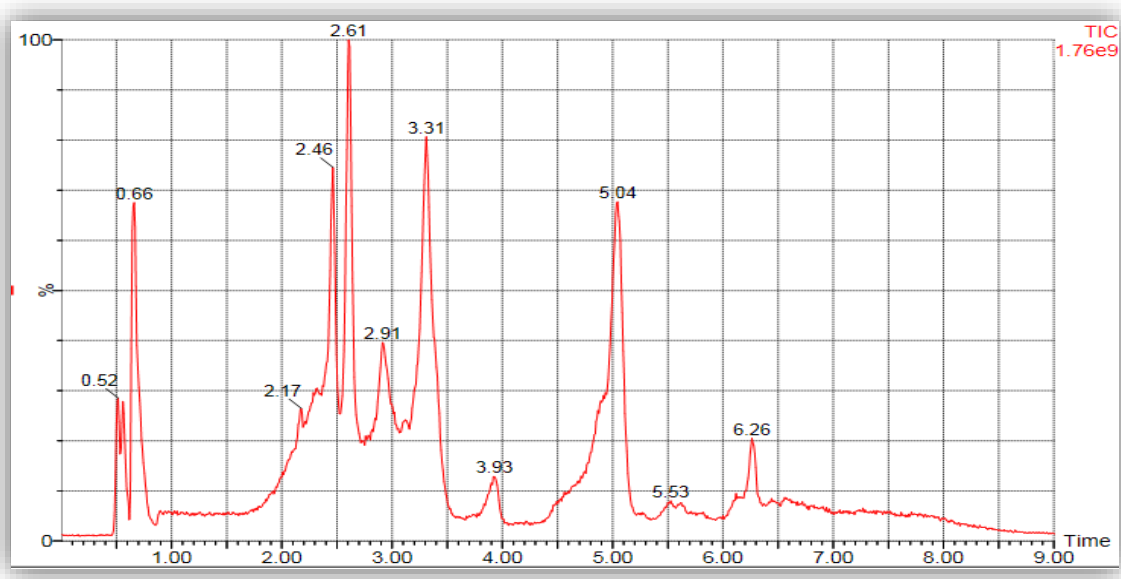


Figura 8. Cromatograma obtenido de la fracción 2

En la figura 8 se observa el cromatograma correspondiente a la fracción 2 y de acuerdo a los tiempos de retención y al patrón de fragmentación reportado en el artículo “Simultaneous quantification of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS” (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012) se identificaron 6 alcaloides descritos en la tabla 5.

Tabla 5. Identificación de alcaloides de acuerdo al tiempo de retención e ión molecular presentes en la fracción 2 (T2) (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012)

Fracción 2					
Tiempo de retención (min)	Ión molecular [M+H] ⁺	Alcaloide	Tiempo de retención (min)	Ión molecular [M+H] ⁺	Alcaloide
0,6	318	Desconocido	3,300	302	Hemantamina (Haemanthamine)
2,598	318	Galantina (Galanthine)	5,010	348	Desconocido (Unknown)
3,45	318	Crinamidina	6,254	296	Tipo tortuosina

- Alcaloide Desconocido (Unknown) con un tiempo de retención 0,6

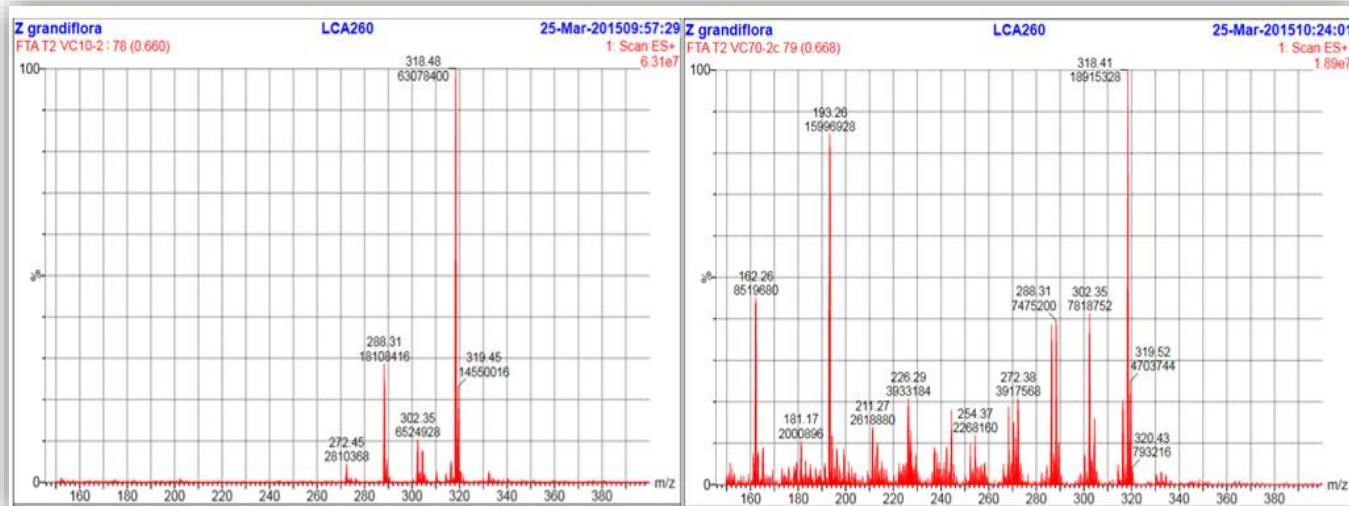


Figura 9. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 318 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Galantina (Galanthine) con un tiempo de retención 2,598

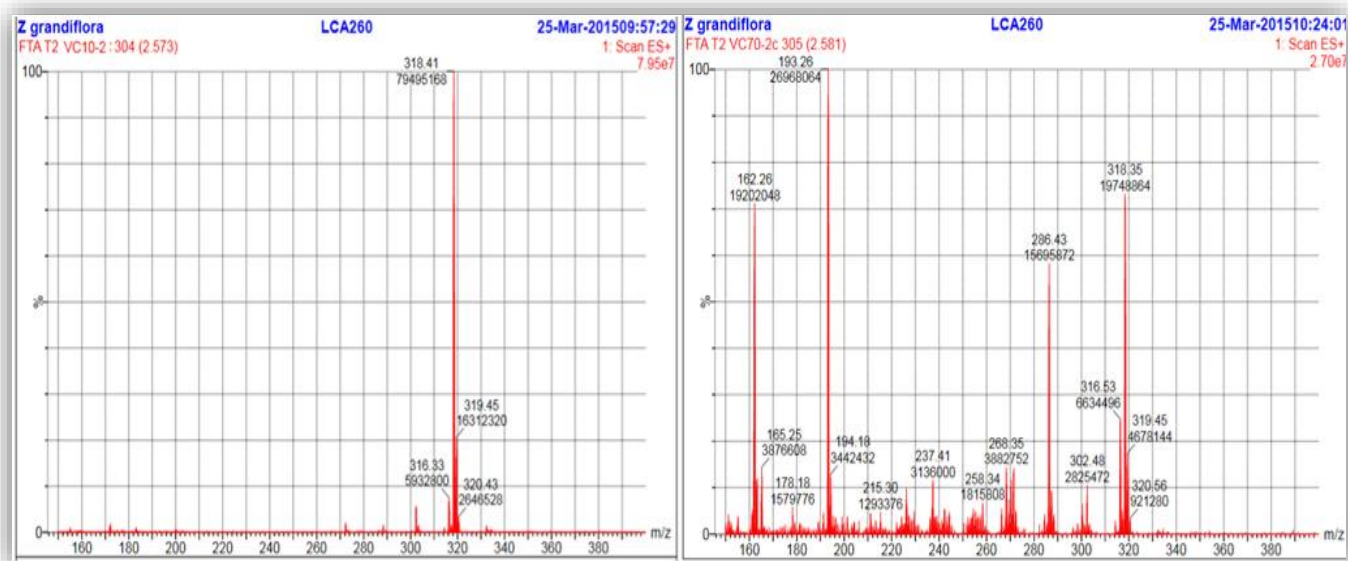


Figura 10. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Galantina (Galanthine) de ión molecular 318 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Crinamidina (Crinamidine) con un tiempo de retención de 3,45

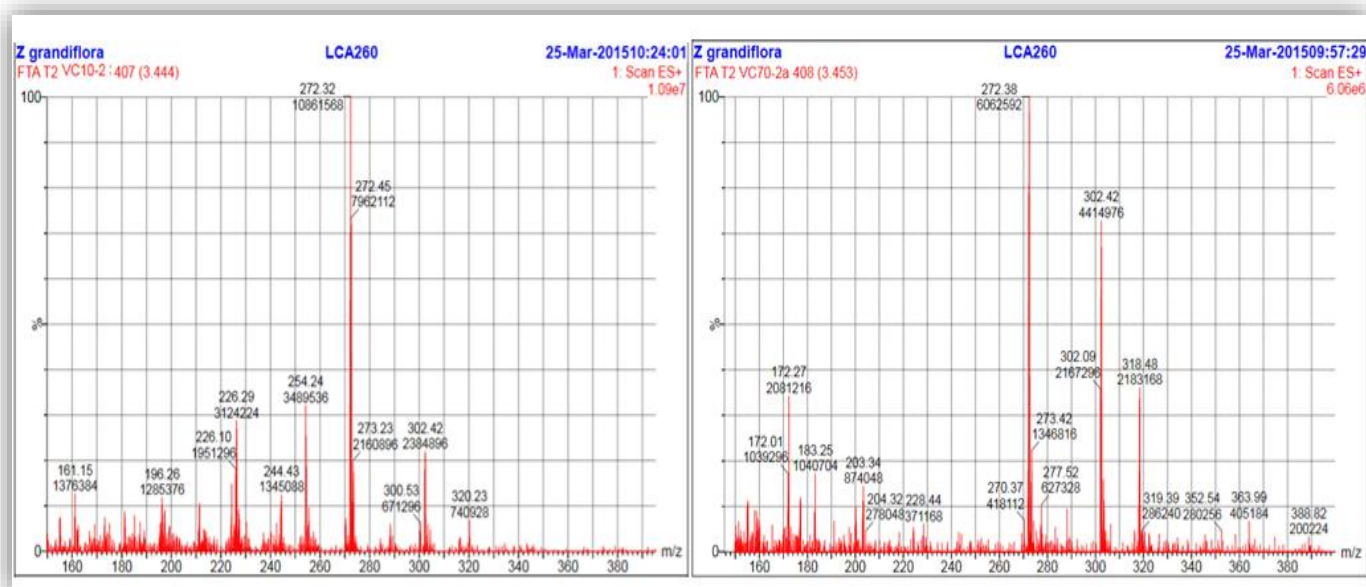


Figura 11. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Crinamidina (Crinamidine) de ión molecular 318 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Hemantamina (Haemanthamine) con un tiempo de retención 3,300

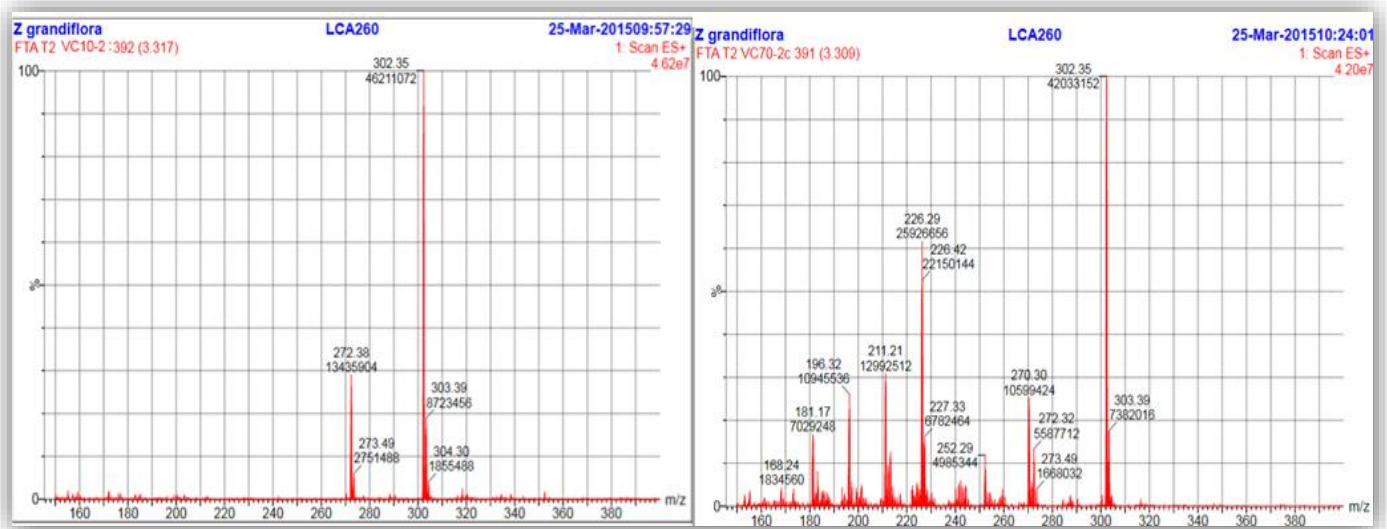


Figura 12. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Hemantamina (Haemanthamine) de ión molecular 302 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Desconocido (Unknown) con un tiempo de retención 5,010

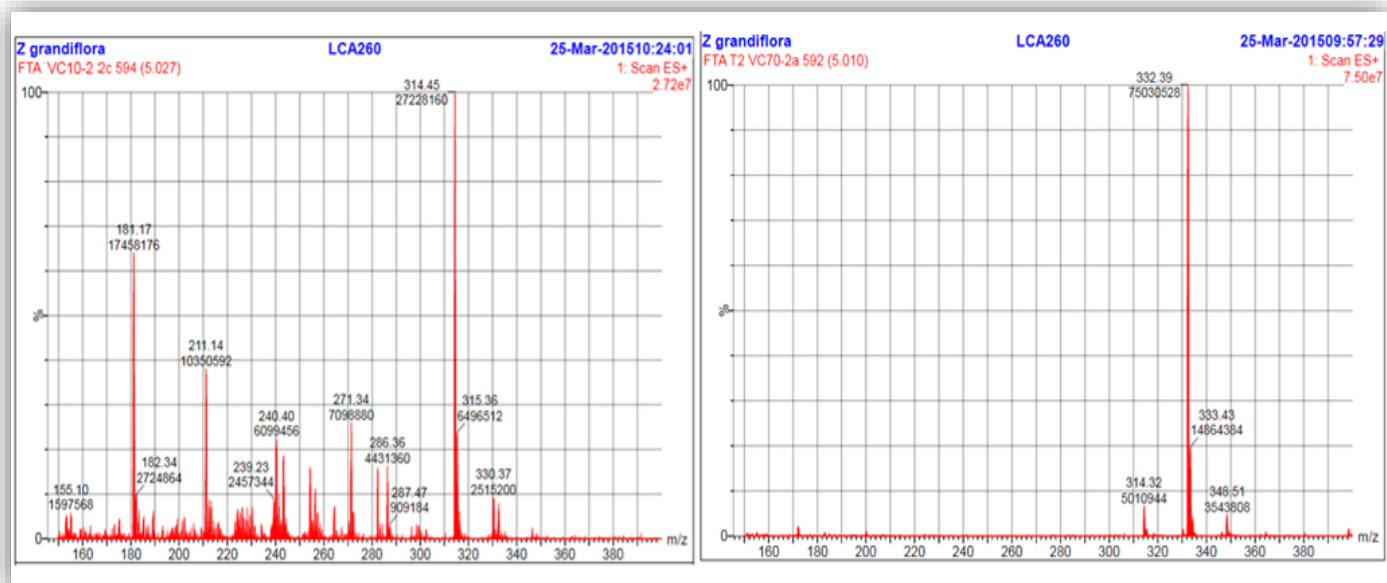


Figura 13. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 348 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Tipo tortuosina (Tortuosine type) con un tiempo de retención 6,254

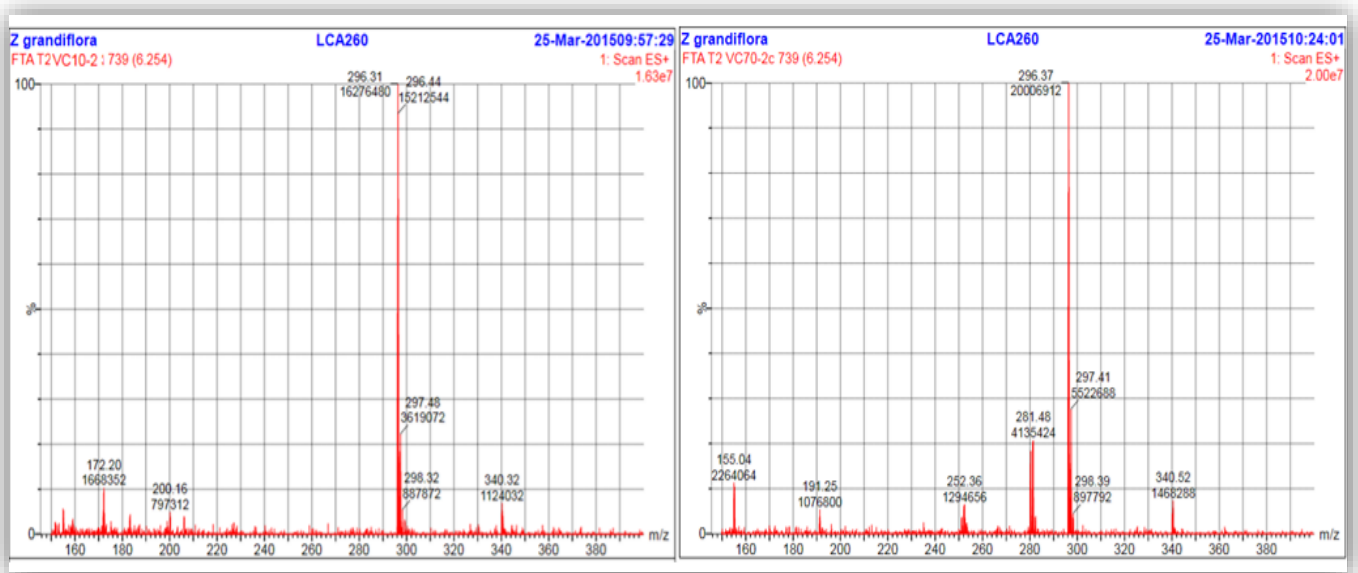


Figura 14. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Tipo Tortuosina de ión molecular 296 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

7.2.2. Creación de la librería espectral de alcaloides: Fracción 3

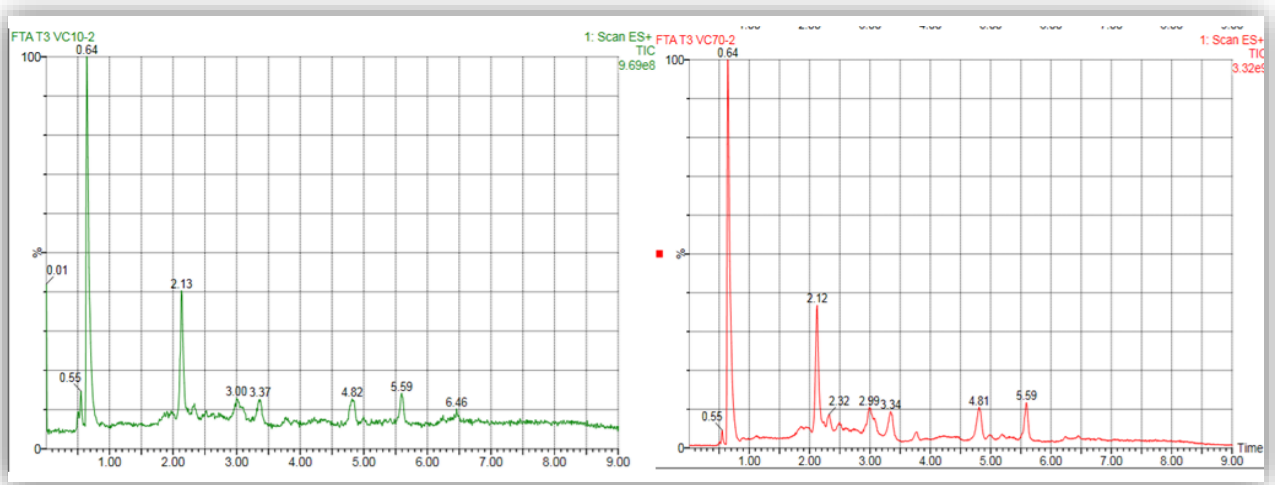


Figura 15. Cromatograma obtenido del tubo 3 (Sistema metanol) a voltaje de cono 10V (der) y 70V (izq)

En la figura 15 se observa el cromatograma correspondiente a la fracción 3 y de acuerdo a los tiempos de retención y al patrón de fragmentación reportado por *Deepali Katoch y col 2012* se identificaron 7 alcaloides descritos en la tabla 6.

Tabla 6 Identificación de alcaloides de acuerdo al tiempo de retención e ión molecular presentes en la fracción 3 (**Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012**)

Fracción 3					
Tiempo de retención (min)	Ión molecular [M+H] ⁺	Alcaloide	Tiempo de retención (min)	Ión molecular [M+H] ⁺	Alcaloide
2,996	334	Desconocido (Unknown)	3,309	272	Vitatina (Vittatine)
0,652	290	Desconocido (Unknown)	4,824	320	Desconocido (Unknown)
2,099	290	Licoramina (Lycoramine)	5,611	282	Tipo licorina (Lycorine type)
3,013	334	Desconocido			

- Alcaloide Desconocido (Unknown) con un tiempo de retención 0,652

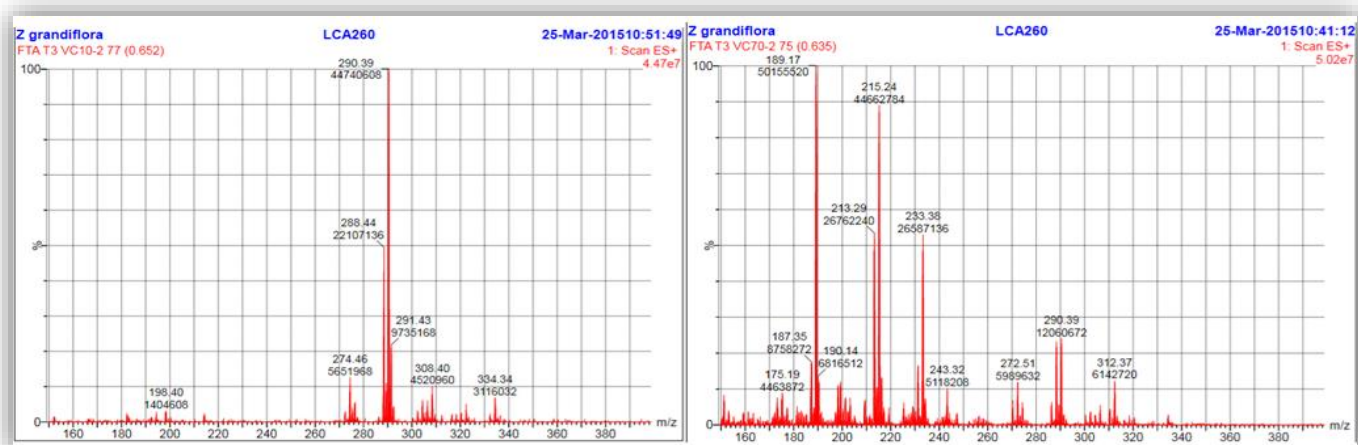


Figura 16. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 290 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Licoramina (Lycoramine) con un tiempo de retención 2,099

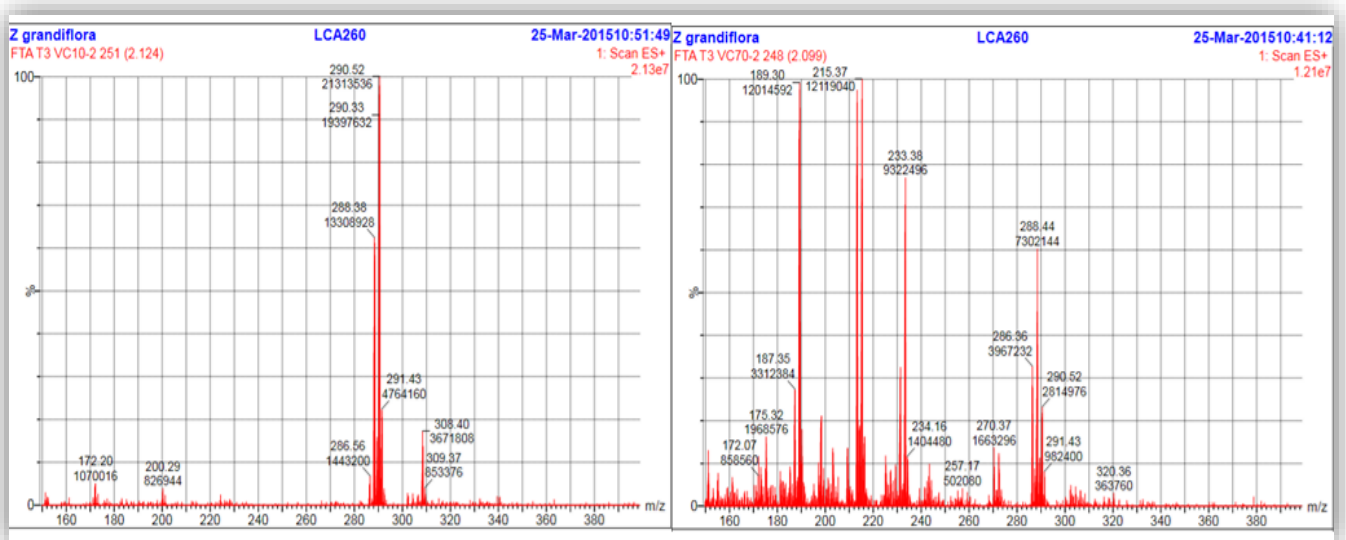


Figura 17. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Licoramina (Lycoramine) de ión molecular 290 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Desconocido (Unknown) con un tiempo de retención de 2,996

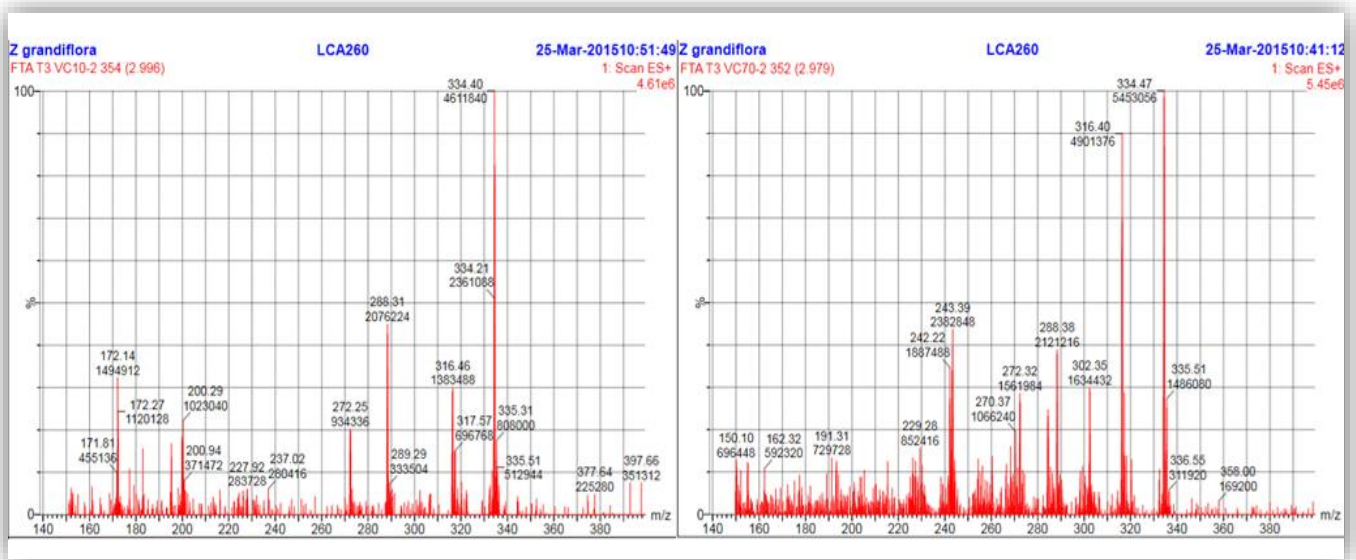


Figura 18. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 334 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Desconocido (Unknown) con un tiempo de retención 3,013

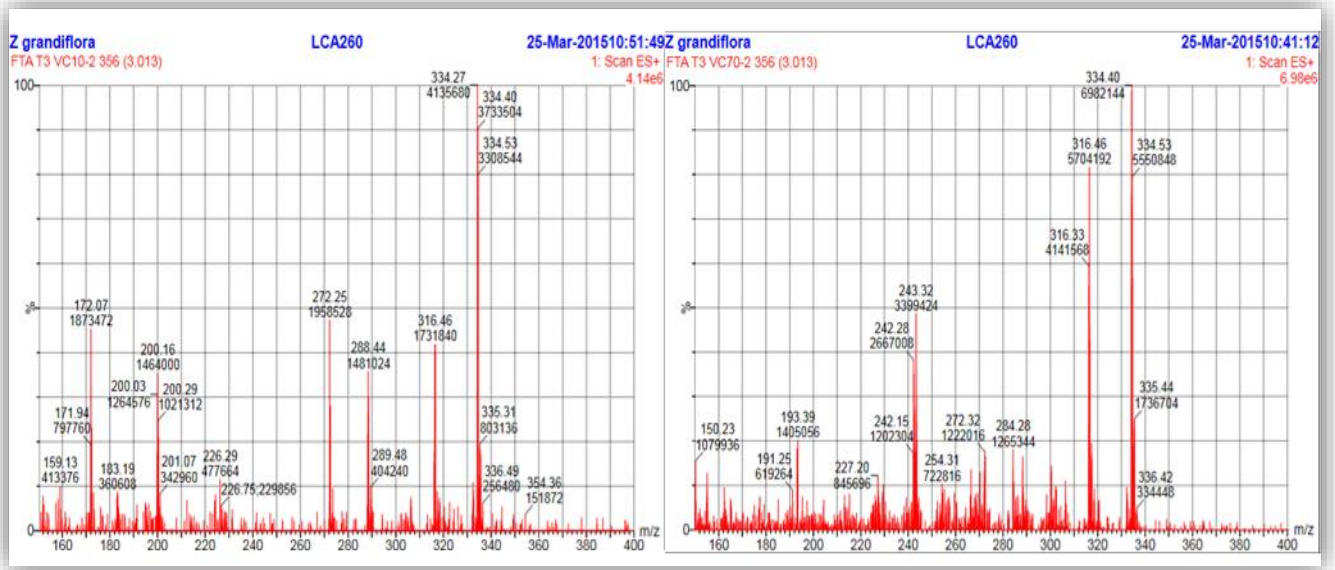


Figura 19. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 334 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Vitatina (Vittatine) con un tiempo de retención 3,309

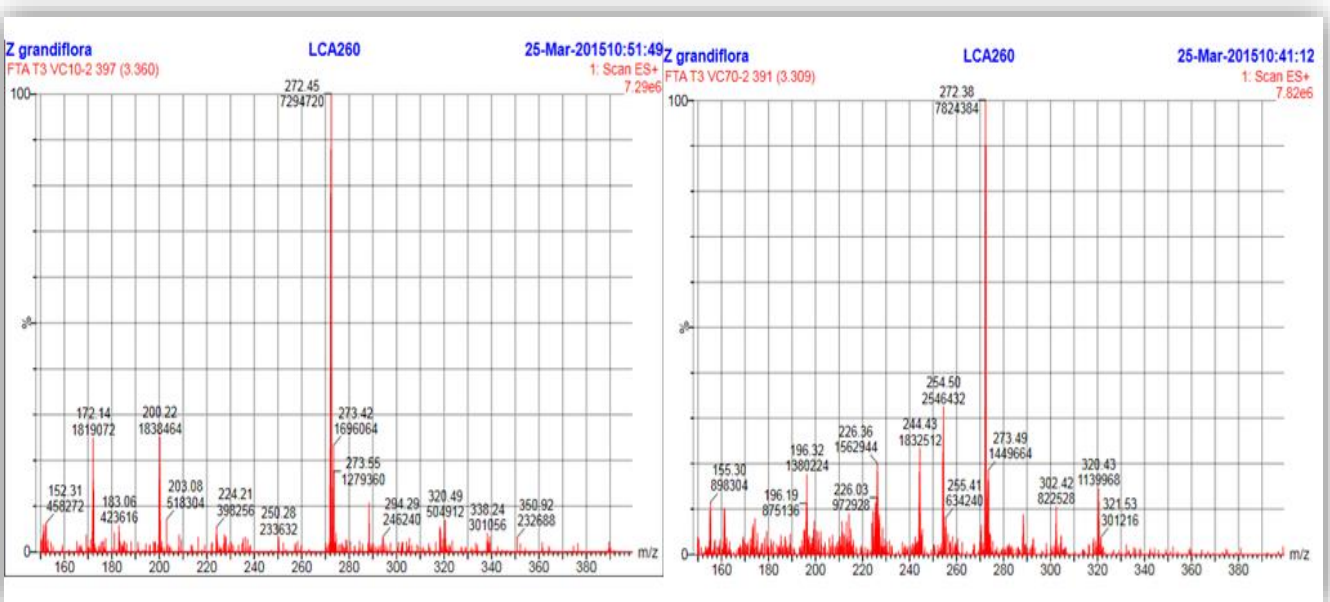


Figura 20. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Vitatina (Vittatine) de ión molecular 272 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Desconocido (Unknown) con un tiempo de retención 4,824

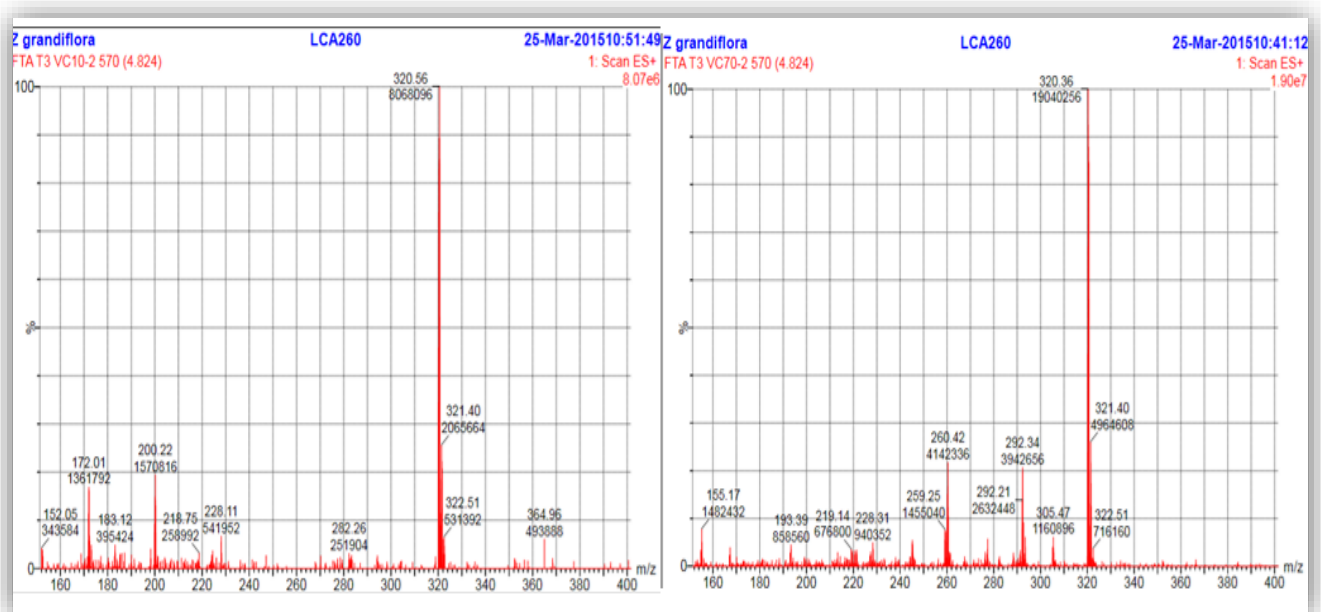


Figura 21. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Desconocido (Unknown) de ión molecular 320 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

- Alcaloide Tipo Licorina (Lycorine type) con un tiempo de retención de 5,611

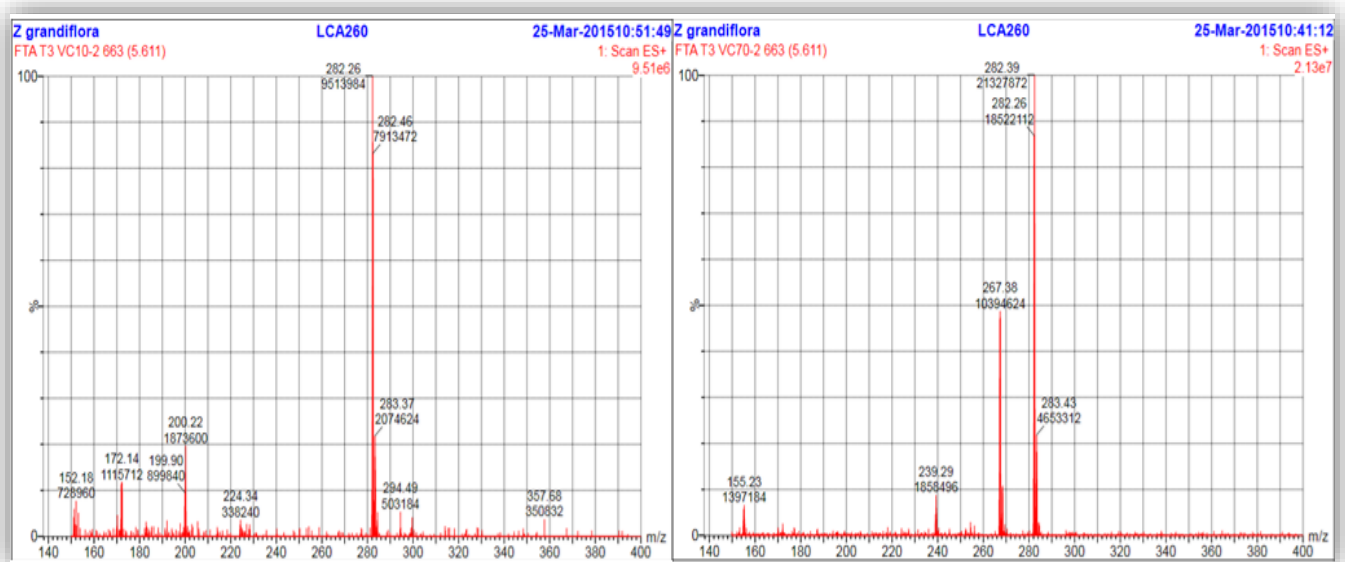


Figura 22. Espectro de masas correspondiente para el alcaloide Tipo Licorina (Lycorine type) de ión molecular 282 a voltaje de cono 10 (izq) y 70 (der)

7.3. Análisis de los resultados obtenidos a partir de la librería espectral de *Amaryllidaceae*

Se identificaron 13 alcaloides de los cuales 5 de ellos son conocidos y reportados en los distintos géneros de la familia *Amaryllidaceae*, 6 son reportados como desconocidos “unknown” debido a que se desconoce su estructura, sin embargo los alcaloides se caracterizan en presentar un peso molecular impar debido a que presentan átomos de Oxígeno (-O) y Nitrogeno (-N) y de acuerdo a las figuras 9, 13, 16, 18, 19 y 21 se consideran alcaloides debido a que su ión molecular es impar y por ultimo, se tiene que 2 corresponden a alcaloides de tipo licorina y tortuosina. Esta identificación se basó en el artículo “Simultaneous quantification of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS” (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012) , debido a que es uno de los pocos artículos que trabaja en la identificación de alcaloides de la *Zephyranthes grandiflora* con UPLC/MS.

En la figura 23 se observan las estructuras correspondientes a los alcaloides identificados, se puede apreciar que estos alcaloides corresponden a la descripción de los alcaloides de *Amaryllidaceae* debido a que en su estructura solo presenta un átomo de nitrógeno (-N) que puede ser terciario e incluso cuaternario.

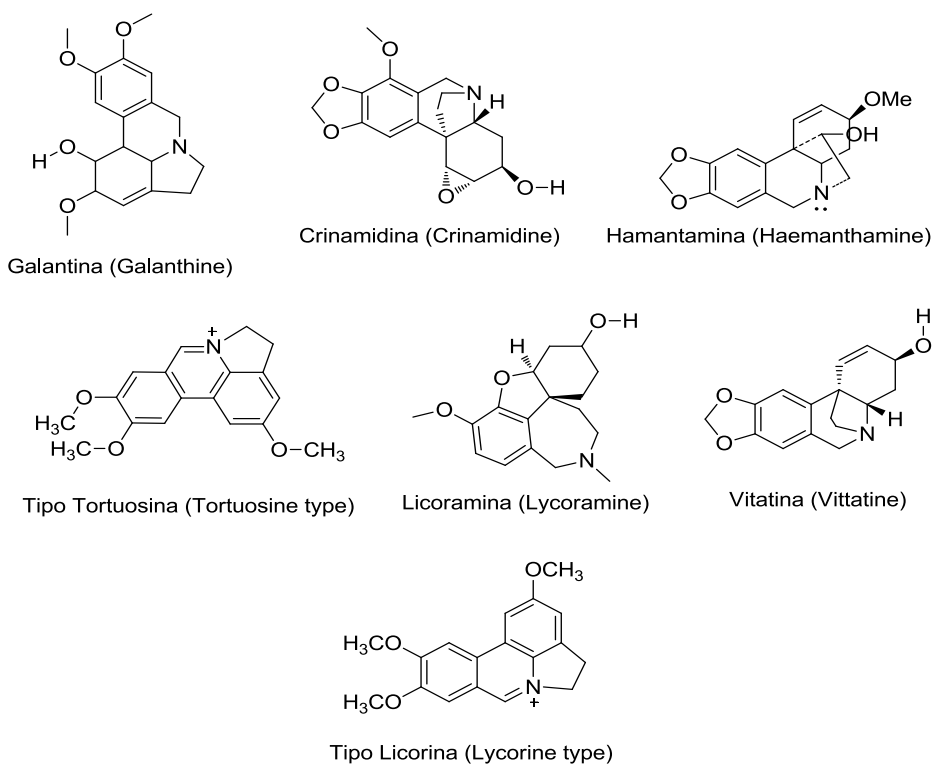


Figura 23. Estructuras de los alcaloides identificados (PubChem, 2015)

Meanismos de fragmentación de alcaloides de Amaryllidaceae empleando UPLC/MS

Son muy pocos los reportes bibliográficos que explican el patrón de fragmentación de estos alcaloides, sin embargo se presenta el patrón de fragmentación más representativo de los alcaloides galantina (galanthine) y Hemantamina (haemanthamine).

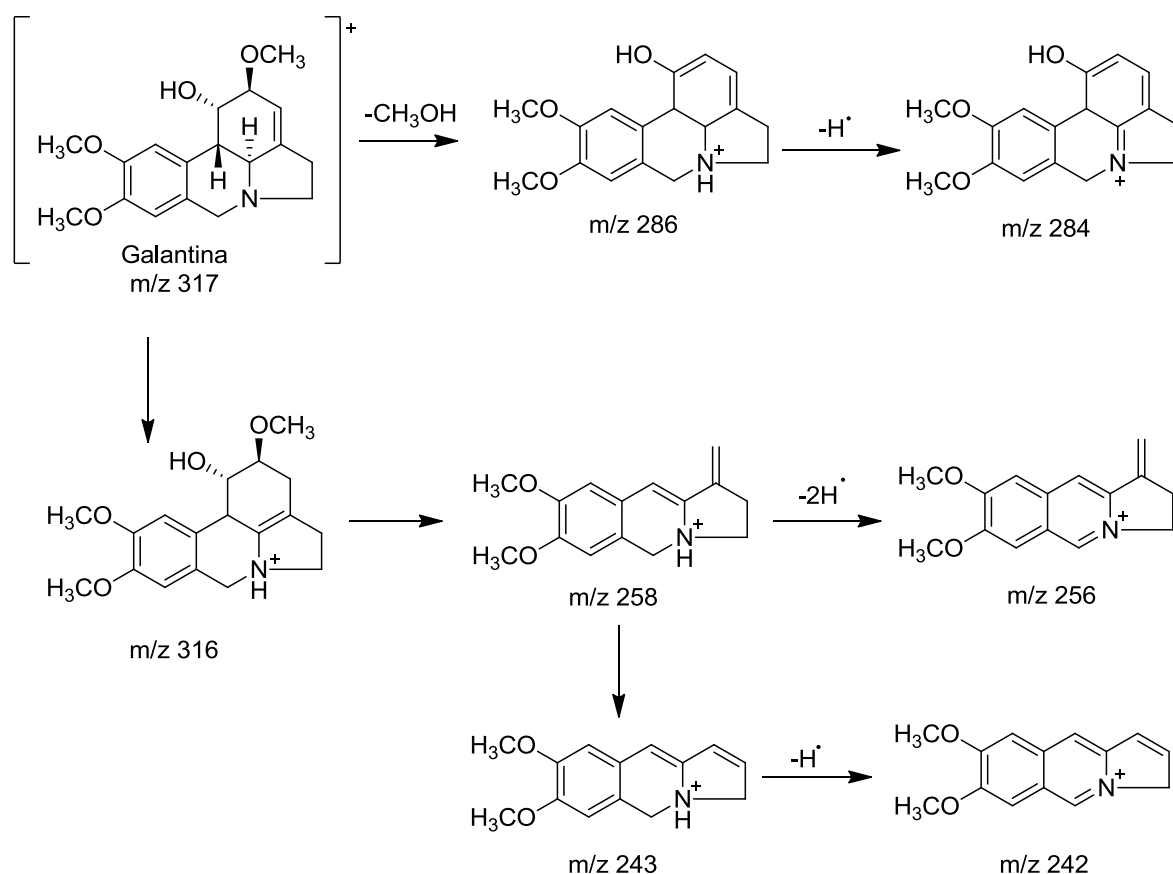


Figura 24. Patrón de fragmentación del alcaloide galantina (galanthine)
(Bergoñón, 1994)

En la fragmentación del alcaloide galantina (galanthine) representada en la figura 24, se observa la pérdida de 32, 60 y 61 unidades de masa, donde no se manifiesta la fragmentación en el anillo A. En cuanto al patrón de fragmentación, se observa un proceso del tipo retro Diels-Alder que justifica la señal m/z 258. (Bergoñón, 1994)

De acuerdo al patrón de fragmentación del alcaloide galantina (galanthine) (Bergoñón, 1994), se puede apreciar que en el espectro obtenido a 70V corresponden a dos señales de m/z 286 y m/z 258. En la figura 25, se observa las dos señales que corresponden a la fragmentación de la molécula.

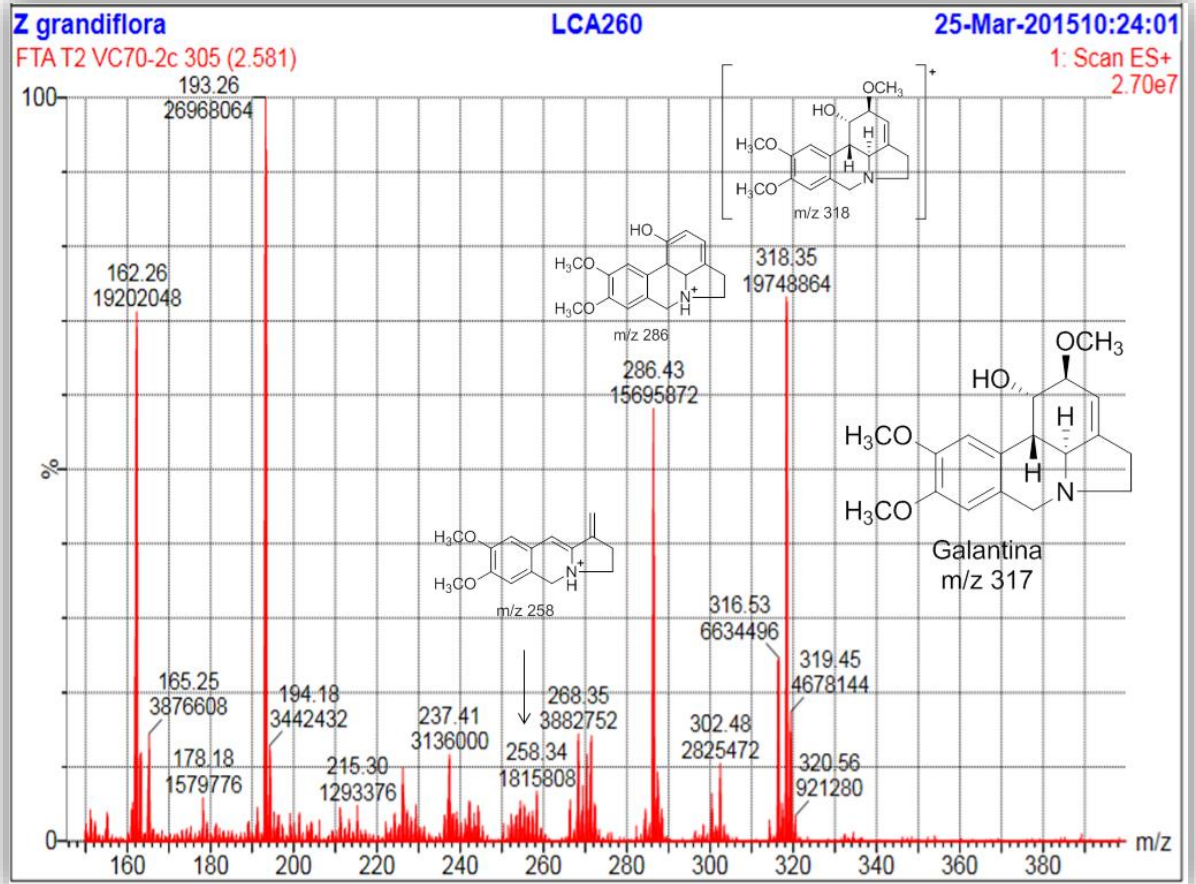


Figura 25. Representación de las dos señales de fragmentación en el espectro de masas de la galantina (Galanthine) con voltaje de cono 70V

Otra de las moléculas identificadas fue el alcaloide Hemantamina (Haemanthamine), en la figura 26 se observa el patrón de fragmentación de la Hemantamina (Hanks, 2002) y de acuerdo a la figura 27 que corresponde al espectro de masas obtenido a voltaje de cono 70V se observa el comportamiento de fragmentación para 2 señales.

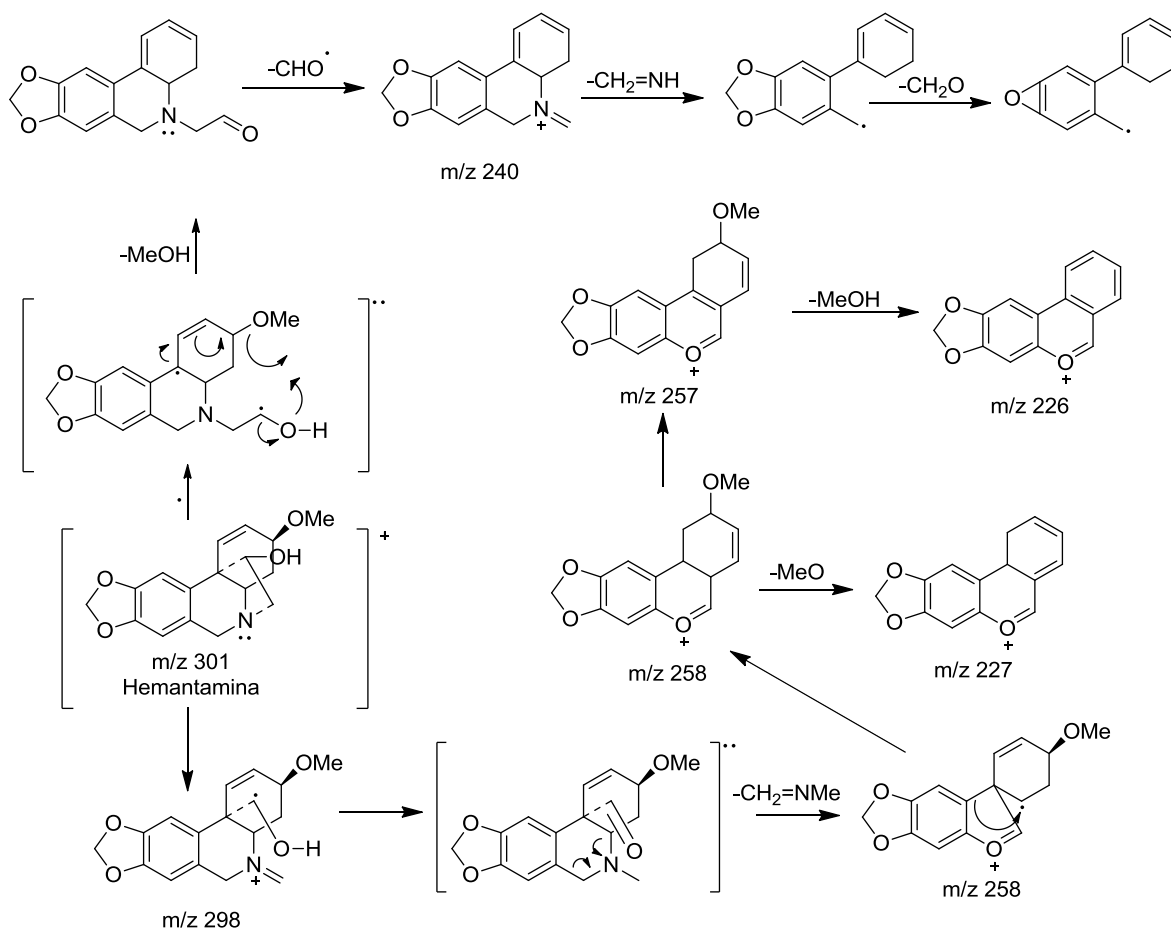


Figura 26. Patrón de fragmentación del alcaloide Hemantamina (Haemanthamine) (Hanks, 2002)

En el patrón de fragmentación del alcaloide Hemantamina (haemanthamine) (figura 26), se emplea como fuente de iones el impacto electrónico (EI) este método tiene una limitación y es que el exceso de energía impartida a los analitos durante el bombardeo puede favorecer muchas fragmentaciones (Hanks, 2002). La presencia del grupo hidroxilo en el carbono 11 (C-11) es el responsable de los drásticos cambios en el patrón de fragmentación además de que se encuentra influenciada por la estereoquímica. Existen tres patrones fundamentales en la fragmentación de la figura 26 (Hanks, 2002):

1. Existe una pérdida del grupo metoxilo CH_3OH , es el más favorable cuando el puente de dos carbonos y el sustituyente en el carbono 3 (C-3) se encuentran en el mismo lado de la molécula.
2. La pérdida de $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$ tiene una importancia relativa debido a que la pérdida del nitrógeno se rige por la facilidad con la que la molécula de metanol se elimina.

- La pérdida de CHO se debe a la pérdida de un radical aldehído que se encuentra presente en todos los compuestos derivados del alcaloides Hemantamina (Haemanthamine).

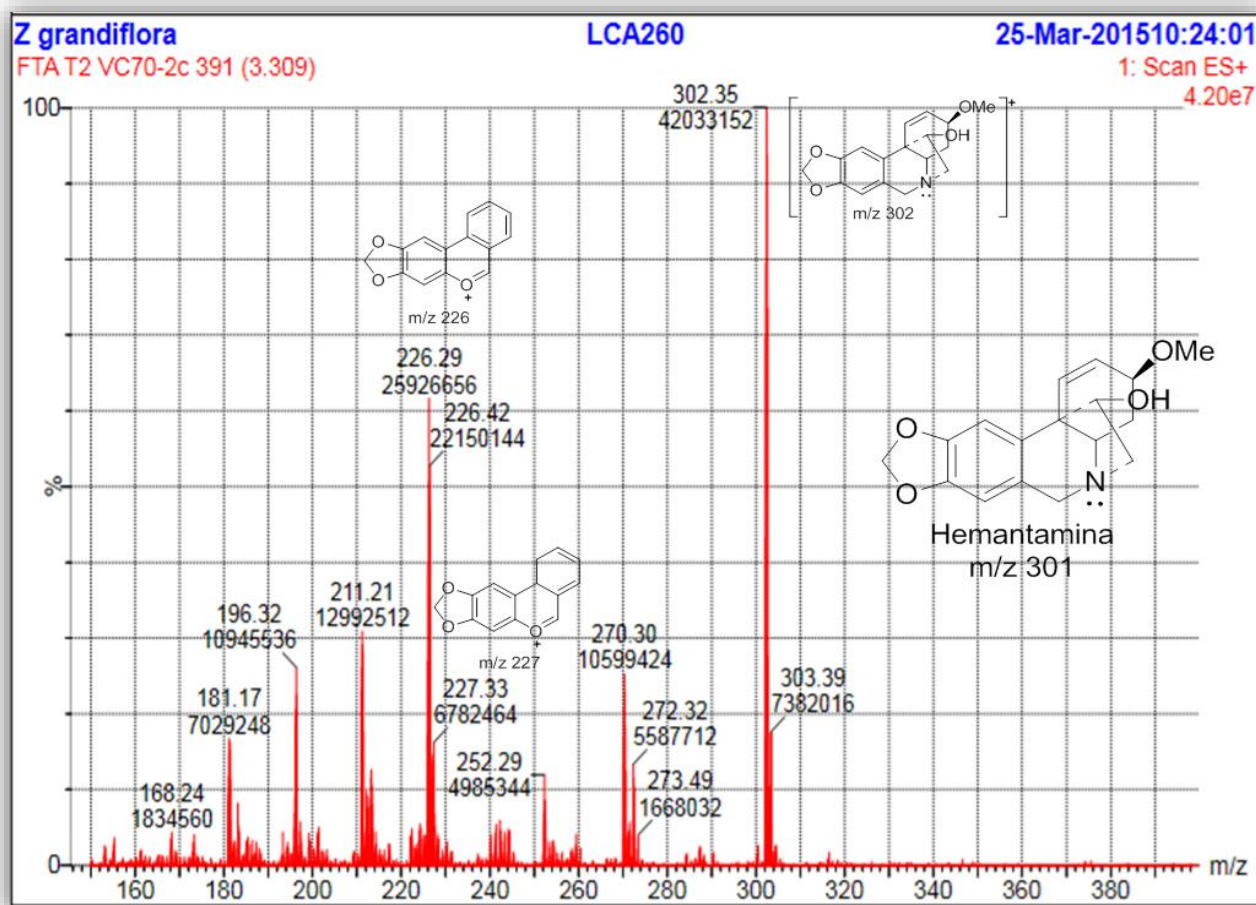


Figura 27. Representación de las dos señales de fragmentación en el espectro de masas de la Hemantamina (Haemanthamine) con voltaje de cono 70V

De acuerdo a la bibliografía se han reportado más de 100 alcaloides del género *Zephyranthes* (Nanase, Yusuke, & Shunsuke, 2014), la mayoría de estos se encuentran en otros géneros de plantas de la misma familia, esto permite cumplir el primer objetivo al considerar que la mayoría de estos alcaloides reportados en los géneros *Crinum*, *Eucharis* se encuentran en el género *Zephyranthes*, lo que permite hacer una elección más racional acerca del género de planta a estudiar, debido a que los géneros más estudiados *Crinum* y *Eucharis* se encuentran amenazadas.

De acuerdo al artículo “Simultaneous quantification of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS” (Katoch, Kumar, Kumar, &

Singh, 2012) fue posible identificar 13 alcaloides de acuerdo a sus pesos moleculares y algunas relaciones m/z descritas que obedecen a sus patrones de fragmentación. A manera de resumen en la tabla 7 se aprecia que se identificaron más señales de fragmentación en el voltaje de cono de 70V con respecto al de 10V. Con esto fue posible cumplir con el segundo objetivo debido a que se estableció que las mejores condiciones de ionización para la caracterización de estas moléculas por espectrometría de masas corresponden a un voltaje de cono 70V (Ver anexo 2)

Tabla 7. Fragmentaciones reportadas en “Simultaneous quantification of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS” (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012) con respecto a las fragmentaciones obtenidas a voltaje de cono 10V y 70V

Alcaloide	[M+H] ⁺	Fragmentaciones por Deepali Katoch y col 2012	10V	70V
Galantina (Galanthine)	318	318, 286, 268, 237, 193, 162, 147	318	318, 286, 268, 237, 193, 162
Crinamidina (Crinamidine)	318	318, 300, 286, 268, 250, 227, 212	318	300, 286, 268, 237, 193, 162.
Hemantamina (Haemanthamine)	302	302, 270, 226, 211, 181, 153	302	302, 270, 226, 211, 181
Tipo tortuosina (Tortuosine type)	296	296, 280, 237, 209, 180	296	196, 237, 209
Licoramina (Lycoramine)	290	290, 233, 215, 189	290	290, 233, 215, 189
Vitatina (Vittatine)	272	272, 254, 226, 196, 149, 118	272	272, 254, 226, 196
Tipo licorina (Lycorine type)	282	282, 267, 239, 210, 196, 168	282	282, 267, 239
Desconocido (Unknown)	318		318, 302, 288, 272	318, 302, 288, 272, 254,

				226 211, 193, 181, 162
Desconocido (Unknown)	348		348, 333, 332, 314	330, 315, 314, 286, 271, 240, 211, 181
Desconocido (Unknown)	290		290, 288, 274, 198	290, 272, 233, 215, 189, 187, 175
Desconocido (Unknown)	334		334, 316, 288, 272, 200, 172	334, 316, 302, 288, 272, 270, 243, 242, 228, 191, 162
Desconocido (Unknown)	334		334, 316,288, 272, 200, 172, 171	334, 316, 284, 272, 243, 242, 193, 191
Desconocido (Unknown)	320		320, 282, 228, 200, 172	320, 292, 260, 259, 228

La construcción de la librería espectral inicia con el registro de 13 alcaloides identificados en la especie *Zephyranthes grandiflora*, con las condiciones de ionización establecidas, sin embargo se requieren realizar más estudios acerca de este género de plantas debido a que hay pocos reportes bibliográficos a nivel fitoquímico.

8. CONCLUSIONES

- Se logró extraer la fracción total de alcaloides a partir de las hojas de *Zephyranthes grandiflora*, esto se evidenció mediante los resultados de la cromatografía en planar y a la aplicación del método “dry column flash chromatography”.
- Se logró establecer las condiciones de ionización para las moléculas identificadas por medio de la fuente de iones por electrospray, siendo a 70V y adquisición de iones en modo positivo.
- Se obtuvo la separación de los alcaloides mediante el método cromatográfico UPLC acoplado a espectrometría de masas, obteniendo cromatogramas y espectros de masas con una resolución adecuada, permitiendo realizar los análisis correspondientes para la identificación y caracterización de las moléculas encontradas en las muestras.
- Se creó la librería espectral de alcaloides a partir de la especie *Zephyranthes grandiflora* (*Amaryllidaceae*), conformada por 13 alcaloides que fueron identificados de forma cualitativa mediante las fragmentaciones reportadas en el espectro de masas.

9. RECOMENDACIONES

- El análisis llevado en este proyecto de investigación fue de tipo cualitativo, es recomendable realizar un análisis de tipo cuantitativo por medio de la espectrometría de masas, para brindar mayor información acerca del contenido y la abundancia de alcaloides presentes en la especie *Zephyranthes grandiflora* (*Amaryllidaceae*).
- Es recomendable hacer una clasificación y registro entre las especies *Zephyranthes grandiflora* y *Zephyranthes carinata* presentes en el vivero de la Universidad Icesi.
- En la extracción de la fracción total de alcaloides, es recomendable purificar la muestra por el método “Dry-Column Flash Chromatography”, ya que permite obtener una fracción más pura de los alcaloides y facilita el análisis instrumental.
- En la identificación de los alcaloides “Desconocidos” (Unknown), se recomienda realizar otras técnicas analíticas como: IR, RMN con el fin de lograr de dilucidar las estructuras de dichas moléculas.
- Se recomienda que esta librería se siga alimentando con el fin de seguir aportando conocimiento a nivel fitoquímico de este género de plantas.

10. Bibliografía

- Ávalos García, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. En A. Ávalos García, & E. Pérez-Urria, *Reduca (Biología)* (págs. 139-140). Madrid: Universidad complutense.
- Bergoñón, S. (1994). Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Producción de galantamina por cultivos "in vitro" de *Narcissus confusus*. *Unidad de fisiología vegetal-Facultad de farmacia-Universidad Barcelona*, 112-113.
- Cabezas, F. B. (2007). ALCALOIDES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, ESPECIES COLOMBIANAS DE AMARYLLIDACEAE. *Scientia et Technica*, 237.
- Cabezas, F., Codina, C., Bastidas, J., & Viladomat, F. (2009). Algunas especies colombianas de Amaryllidaceae como fuentes potenciales de inhibidores de enzimas. *Universidad del Cauca, Departamento de Química*, 1-3.
- Cahlíková, L., & Valterová, I. (2011). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Brazilian journal of pharmacognosy*, 1-6.
- Escobar, A. (2014). *Caracterización química de alcaloides del género Zephyranthes*. Cali: Universidad Icesi.
- Flurhr, J. (2011). *Practical Aspects of Cosmetic Testing*. Berlin: Springer.
- Gross, J. (2011). Mass spectrometry: a textbook. En J. Gross, *What is mass spectrometry?* (págs. 5-8). Heidelberg: Springer.
- Hanks, G. (2002). *Narcissus and Daffodil*. En G. Hanks, *Mass fragmentation pattern of haemanthamine* (págs. 117-118). London: Taylor & Francis INC.
- Katoch, D., Kumar, S., Kumar, N., & Singh, B. (2012). Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 187-192.
- Knight, A. (2007). A guide to poisonous house and garden plants. En A. Knight, *A guide to poisonous house and garden plants* (pág. 291). New York: Tenton NewMedia.

- Kumar, A., Saini, G., Nair, A., & Sharma, R. (2012). UPLC: A PREEMINENT TECHNIQUE IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS. *Polish pharmaceutical society*, 10.
- Lam, C., Chan, M., Cheung, R., & Law, L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clinical biochemical review*, 1-10.
- López, A., & Espejo, A. (2002). *Flora de veracruz: Amaryllidaceae*. Ciudad de Mexico: Instituto de Ecología.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. En D. Marcano, & M. Hasegawa, *Fitoquímica Orgánica* (pág. 329). Caracas: Editorial Torino.
- Martin, S. (1987). *The amaryllidaceae alkaloids*. Texas: Academic press.
- Montoya, G. (2011). Consideraciones sobre la espectrometría de masas debido a sus moderno acople con cromatografía líquida y su modo de aplicación en la química de productos naturales. *Icesi University*, 9-10.
- Nanase, S., Yusuke, H., & Shunsuke, H. (2014). Four new Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes candida*. *The japanese society of pharmacognosy and Springer Japan*, 5.
- Nováková, L., Matysová, L., & Solich, P. (2005). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 10.
- Osorio, E. (2008). *Búsqueda de sustancia bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: Alcaloides de phaedaranassa dubia (amaryllidaceae) y biblavonoides de garcinia madruno (clusiaceae)*. Barcelona: Universidad de Barcelona-Facultad de farmacia.
- Peralta, L. (2014). *Cultivo in-vitro de tejidos vegetales de plantas del género Zephyranthes y evaluacion de su producción de alcaloides*. Cali: Universidad Icesi.
- PubChem. (20 de Mayo de 2015). *PubChem Compound*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>
- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). Productos naturales vegetales. En J. Ringuelet, & S. Viña, *Productos naturales vegetales* (págs. 51-54). Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata.
- Sepúlveda-Jiménez, G. (2004). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de Fitopatología*, 10.

- Shusterman, A., Glasfeld, A., & McDougal, P. (1997). Dry-Column Flash Chromatography. *Journal of chemical education*, 1222-1223.
- Sousa da silva, M. (2009). *Alcalóides de plantas da família Amaryllidaceae: Isolamento caracterização e teste de inibição de Acetilcolinesterase*. Brasil: Universidad estadual de Campinas.
- Sridhar, S., Divya, S., Madhuri, R., & Sudhakar, M. (2013). UPLC: A dynamic and expeditious approach to liquid chromatography. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences*, 1140-1152.
- Waters. (2015). *Waters the science of what's possible*. Obtenido de Mass spectrometry: http://www.waters.com/waters/es_CO/Common-Ionization/nav.htm?cid=10073251&locale=es_CO

11. ANEXOS

11.1. Anexo 1. Procedimiento para la Extracción de la Fracción total de Alcaloides.

1. Se hizo una clasificación de las especies *Z. grandiflora* y *Z. carinata* encontradas en el vivero de la Universidad Icesi.
2. Se recolectaron las hojas de la especie *Z. grandiflora* (aproximadamente de 4 a 5 hojas por maceta), se lavaron con Extran al 2% y agua para retirar los residuos de tierra y demás impurezas.
3. Se llevó a la licuadora con 100mL de HCl 5% aproximadamente 15 minutos.
4. Se sónico 25 minutos por 5 veces y en cada pausa se realizó un proceso de filtrado por gravedad.
5. Al filtrado obtenido se le realizó una extracción con cloroformo, empleando una cantidad proporcional al volumen resultado del extracto ácido y se agito con precaución por 15 minutos. La fase con cloroformo se descartó.
6. Al componente ácido, se le adicionaron unas gotas de soda caustica pH 14 para basificar el medio hasta alcanzar un pH aproximadamente de 9,0-10,0. Esto se comprobó empleando papel indicador.
7. Al componente básico se le realizó otra extracción con cloroformo, empleado nuevamente una cantidad proporcional al volumen de la muestra. Se dejó en reposo por un tiempo prolongado (aproximadamente 24 horas) para lograr una mejor extracción los alcaloides.
8. La fracción total de alcaloides se concentró en el rotaevaporador a una temperatura no mayor a 50°C, llevando a sequedad.

Para obtener una mayor pureza de la fracción de alcaloides se realizó el método de “dry column flash chromatography”

9. Se disolvió la muestra concentrada en 3mL de metanol.
10. Se adiciono 1,0735g de Sílica gel 60 marca Merck (0,040-0,063mm), y se concentró en el rotaevaporador con el mayor vacío posible, obteniendo un polvo fino.
11. Se realizó la cromatografía preparativa de la siguiente forma: en una columna se adiciono 5,058g de sílica gel 60 marca Merck, sobre la sílica se colocó un papel filtro, posterior a ello se adiciono la muestra con sílica, papel filtro y por ultimo algodón.
12. Se hizo con tres sistemas de fase móviles mediante una bomba de vacío 15mL de cuatro sistemas: Acetato de etilo, Acetato de etilo:Metanol (1:1), Metanol y acetona.
13. Cada fracción de cada fase móvil se concentró en el Rapidvap
Las muestras se disolvieron en metanol para llevar al análisis de UPLC/MS

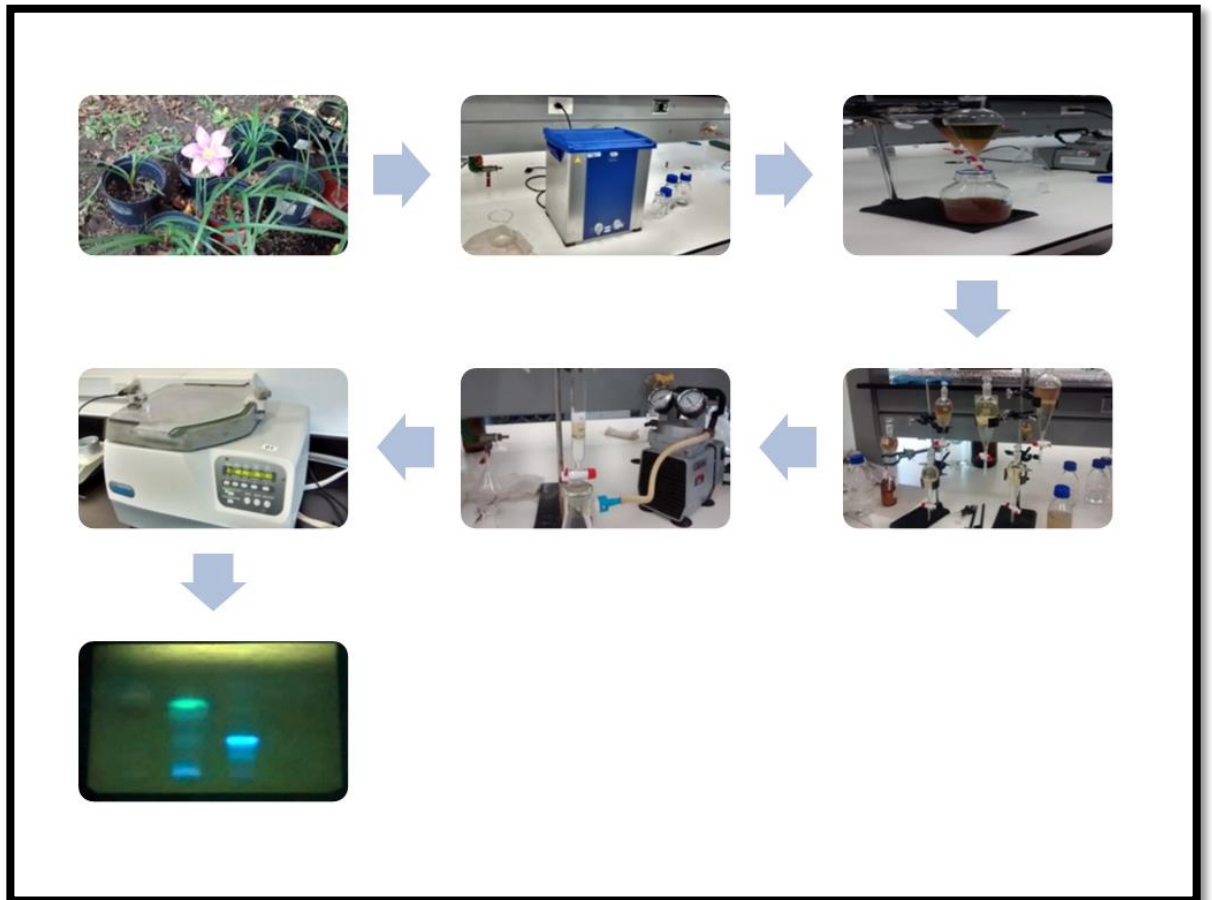


Figura 28. Proceso de extracción y purificación de la fracción total de alcaloides

11.2. Anexo 2. Condiciones cromatográficas UPLC y espectrometría de masas

Las condiciones para el UPLC y espectrometría de masas, se basaron en el proyecto de grado Luis peralta 2014

Tabla 8. Condiciones empleadas en el UPLC (**Peralta, 2014**)

Condiciones cromatográficas empleadas en el UPLC	
Columna	Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 100mm, tamaño de partícula 1,7µm)
Temperatura	Solvente A: Agua (0,05% Ácido Fórmico) Solvente B: Acetonitrilo grado hypergrade
Flujo	0,3 mL/min
Longitud de Onda	280nm
Gradiente	0,0-2,0 min 95% A 0,7-2,2 min 87% A 2,5-3,6 min 84% A 4,2-4,8 min 77% A 5,0-6,0 min 70% A 7,0-7,8 min 95% A

Tabla 9. Condiciones para el sistema cromatográfico UPLC acoplado a espectrometría de masas **(Peralta, 2014)**

Fuente (ES+)	Configuración	Característica	MS1 Scan
Capilar (Kv)	3,5	Modo del Ión	ES+
Cono (V)	10; 70	Formato de datos	Continum
RF (V)	2,5	Masa inicial	100,0
Extractor (V)	3	Masa final	500,0
Temperatura de la fuente (°C)	150	Tiempo de Scan (Sec)	3,000
Temperatura de Desolvatación (°C)	450	Interscan delay (Sec)	Automatic
Flujo del gas del cono (L/Hr)	20	Tiempo de inicio (min)	0,0
Flujo del gas para desolvatación (L/Hr)	900	Tiempo final (min)	9,0

11.3. **Anexo 3.** Patrón de fragmentación identificados en *Zephyranthes grandiflora* por UPLC-DAD/ESI-MS/MS (Katoch, Kumar, Kumar, & Singh, 2012)

Tabla 10. Tiempo de retención, máximo de absorción, patrón de fragmentación de los componentes identificados en *Zephyranthes grandiflora* por UPLC-DAD/ESI-MS/MS

Retention time, UV spectral data, mass fragmentation pattern and compound identified in *Z. grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS.

Peak no.	t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M+H]^+$	MS/MS	Compound identified
1	0.84	269	381	381, 336, 230, 219, 201, 156	Unknown
2	1.02	260	268	268, 253, 177, 136, 109	Unknown
3	1.76	252, 285	286	286, 268, 228	Unknown
4	1.91	232, 288	288	288, 270, 252, 147, 119	Lycorine ^a
5	2.11	232, 286	290	290, 233, 215, 189	Lycoramine ^a
6	2.27	238, 285	274	274, 256, 228, 196	Dihydrovittatine [7,16]
7	2.45	240, 281	306	306, 290, 233, 216, 189	Lycoramine N-oxide [17]
8	2.61	239, 288	318	318, 286, 268, 237, 193, 162, 147	Galanthine [9]
9	2.74	237, 287	288	288, 270, 226, 196, 181, 153	Hamayne ^a
10	3.52	236, 285	318	318, 287, 268, 258, 239, 199, 167	Zaidein [18]
11	3.68	239, 288	314	314, 300, 282, 266, 242, 213, 181	Haemanthamine type [7]
12	3.74	243, 289	332	332, 300, 282, 264, 225, 195, 167	Ambelline [7]
13	3.80	244, 288	318	318, 300, 286, 268, 250, 227, 212	Crinamidine [19]
14	3.95	243, 290	302	302, 270, 226, 211, 181, 153	Haemanthamine ^a
15	4.12	245, 292	272	272, 254, 226, 196, 149, 118	Vittatine ^a
16	4.50	239, 277	268	268, 254, 225, 209, 179	Zefbetaine [20]
17	4.93	260, 275	266	266, 236, 208, 179	Ungeremine [20]
18	5.60	238, 277	412	412, 326, 272, 244, 218, 186	1-O-(3-hydroxybutyryl)-pancratistatin ^a [13]
19	6.14	263	282	282, 267, 239, 210, 196, 168	Lycorine type [9,12]
20	6.80	263	296 [M] ⁺	296, 280, 237, 209, 180	Tortuosine ^a

^a Conclusively identified by isolated standards.

