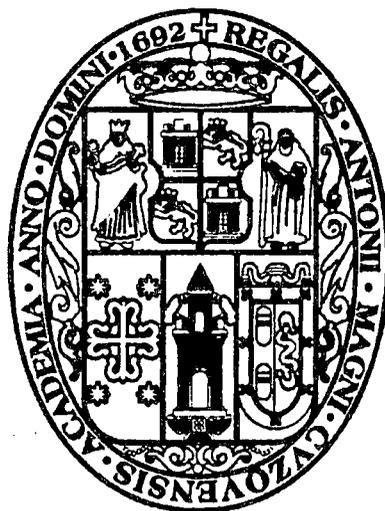


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO
ABAD DEL CUSCO**

FACULTAD DE CIENCIAS



ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA

**“EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PARTENÓLIDO DE LA ESPECIE
TANACETUM PARTHENIUM DE LA CIUDAD DEL CUSCO POR MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS UTILIZANDO EL ACETATO DE ETILO”**

Tesis para optar el título de Químico:

PRESENTADO POR:

- BACH. LORENA APAZA TACCA 070606
- BACH. MIKI GONZALES USCAMAYTA 091594

ASESOR: MGT. CARLOS A. SERRANO FLORES

Cusco, Diciembre 2015

TESIS FINANCIADA POR LA UNIVERSIDAD NACIONAL SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradecemos profundamente a nuestro asesor de tesis, Mgt. Carlos Serrano Flores. Trabajar usted ha sido un verdadero placer, usted ha sido una influencia constante a lo largo de nuestra tesis, ha orientado y apoyado con rapidez y cuidado; siempre ha sido paciente y alentador en tiempos de nuevas ideas y dificultades. Su capacidad de seleccionar y acercarse convincente a los problemas de investigación, sus altos estándares científicos y su trabajo duro son ejemplo. Admiramos su capacidad de equilibrar los intereses de investigación y actividades personales. Sobre todo sentimos a un amigo, lo que agradecemos de todo corazón.

Además, hemos tenido el privilegio de conocer a grandes personas que se convirtieron en amigos. Ha sido un placer trabajar con Jorge Choquenaira del laboratorio de Cromatografía. Del mismo modo agradecemos tanto al proyecto canon "Desarrollo de métodos preparativos de cuatro moléculas bioactivas a partir de plantas medicinales cusqueñas: Acido oleanólico, Acido ursólico, Acido rosmarínico y Partenólido" como al vicerrectorado de investigación UNSAAC por el financiamiento de este trabajo de tesis. Y al laboratorio de Química Orgánica por permitirnos realizar los análisis de IR.

Por último, pero no menos importante, dar las gracias a nuestros familiares por su apoyo espiritual.

ABREVIATURAS:

- AcOEt Acetato de etilo
- EP Éter de petróleo
- GC Cromatografía de Gases
- MNR Resonancia Magnética Nuclear
- MeCN Acetonitrilo
- EtOH Etanol
- DAD Detector de arreglo de diodos
- TLC Cromatografía en capa fina (Thin layer chromatography)
- HPTLC Cromatografía en capa fina de alto rendimiento
- SLs Sesquiterpenlactonas
- SiGel Sílica gel
- UV Ultra Violeta
- IR Infrarrojo
- Rf Factor de Retención
- Rfs Factores de Retención
- FID Detector de ionización de llama
- 1C2C Primera y segunda extracción con cloroformo
- 1A2A Primera y segunda extracción con acetato de etilo
- 1C2A Primera extracción con cloroformo y segunda extracción con acetato de etilo
- 1A2C Primera extracción con acetato de etilo y segunda extracción con cloroformo

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Esqueletos básicos de Sesquiterpenlactonas	31
Figura 2: Biogénesis del esqueleto de germacranólido	32
Figura 3: Formación del esqueleto básico germacranólido.....	33
Figura 4: Posible síntesis de sesquiterpenlactonas	34
Figura 5: Secuencia de la introducción de oxígeno en C-6 o C-8 y la transformación oxidativa del grupo isoprenil en formación del anillo lactónico	35
Figura 6: Ruta biosintética de partenólido a partir de farnesil pirofosfato; el paso 1 es catalizado por una germacreno A sintasa; los pasos 2,3 y 4 son catalizados por germacreno A oxidasa; paso 5a, 5b: costunólido sintasa; paso 6: custunólidoepoxidasa /partenólido sintasa.....	41
Figura 7: Mata florida de <i>Tanacetum parthenium</i> de la comunidad de Corao- Cusco, donde es conocida como Santa maría.....	42
Figura 8: Placa tlc de las fracciones colectadas del experimento 1.....	52
Figura 9: Cristales de Partenólido obtenidos – experimento 1.....	53
Figura 10. Espectro IR del partenólido obtenido –experimento 1.....	54
Figura 11. Espectro IR del partenólido – bibliografía	54
Figura 12. Curva de coincidencia de los picos del Espectro IR Datos bibliográficos Vs Datos Experimentales.....	56
Figura 13: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos - experimento 1	57
Figura 14: Equipo de cromatografía líquida al vacío – experimento 2...	60

Figura 15: Equipo de cromatografía en columna y colección de fracciones – experimento 2.	61
Figura 16. Placas tlc desarrolladas de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna – experimento 2.....	62
Figura 17. Espectro IR de los cristales I, obtenidos en el experimento 2	63
Figura 18: Espectro IR de de los cristales II obtenidos - experimento 2	63
Figura 19: Comparacion de los espectros IR obtenidos - experimento 1 y 2.....	64
Figura 20: Cromatograma de los cristales I obtenidos – experimento 2	65
Figura 21: Cromatograma HPLC de los cristales II obtenidos – experimento 2.....	66
Figura 22: Cromatogramas HPLC de las muestras ensayadas, estándar 1, estándar 2, estándar 3 y flores de Santa María respectivamente	69
Figura 23: Cromatofolios desarrollados de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna – experimento 4	72
Figura 24: Espectro IR de los cristales obtenidos –experimento 4	73
Figura 25: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos – experimento 4.....	75
Figura 26: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos del sistema de solvente A*	80
Figura 27: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos del sistema de solvente C*	81

Figura 28: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos del sistema de solvente 1C2A*	82
Figura 29: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos del sistema de solvente 1A2C*	83
Figura 30: Diagrama de elución utilizada en el equipo – experimento 6	86
Figura 31: Gráfico UV de las fracciones obtenidas en 2D –experimento 6.	87
Figura 32: Diagrama UV de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna automática – experimento 6	88
Figura 33: Espectro IR de los cristales obtenidos – experimento 6	89
Figura 34: Espectro IR de los cristales obtenidos – experimento 6	91
Figura 35: Espectro IR de las flores ensayadas en el experimento 6	91
Figura 36: Diagrama de elución utilizada en el equipo –experimento 7	95
Figura 37: Gráfico UV de las fracciones obtenidas en 2D –experimento 7	96
Figura 38: Diagrama UV de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna automática – experimento 7	97
Figura 39: Cromatofolio desarrollado, con las fracciones colectadas del equipo automático – experimento 7	98
Figura 40: Diagrama de elución utilizada en el equipo – experimento 8	101
Figura 41: Gráfico UV de las fracciones obtenidas en 2D –experimento 8.	102

Figura 42: Diagrama UV de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna automática – experimento 8.....	103
Figura 43: Espectro IR de los cristales obtenidos – experimento 8	104
Figura 44: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos – experimento 8.....	106
Figura 45: Cromatograma HPLC del estándar de partenólido	106
Figura 46: Cromatograma HPLC de las flores de Santa María ensayadas– experimento 8	107
Figura 47: Superposición de cromatogramas de los cristales obtenidos, flores y el estándar de partenólido – experimento 8.....	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de elución de la cromatografía en columna – experimento 1.....	51
Tabla 2. Comparación de picos de los espectros IR según Walsh et al. y los obtenidos experimentalmente.....	55
Tabla 3. Sistema de elución de la cromatografía líquida al vacío – experimento 2.....	59
Tabla 4. Resultados de los extractos obtenidos de VLC – experimento 2	59
Tabla 5. Sistema de elución de la cromatografía en columna – experimento 2.....	61
Tabla 6. Descripción de las muestras ensayadas para el análisis HPLC	68
Tabla 7: Sistema de elución de la cromatografía en columna – experimento 4.....	71
Tabla 8. Valores de Rfs de partenólido determinados bajo dos sistemas de fase móvil	73
Tabla 9. Resultados de los porcentajes de extracción de partenólido de los cuatro sistemas de extracción.	78
Tabla 10. Datos de Rf de la fracción que contiene partenólido y los Rfs de las impurezas que se presentan por encima y debajo – experimento 6.....	85
Tabla 11: Determinación del Rfs del partenólido contenido en las fracciones y sus respectivas impurezas por encima y debajo del mismo.....	94
Tabla 12. Identificación de la presencia de partenólido en las fracciones de elución VLC – experimento 8	100

Tabla 13: Preparación de la muestra y el estándar para análisis HPLC – experimento 8.....	105
Tabla 14. Resultados de porcentaje de rendimiento del experimento 1	109
Tabla 15. Resultados de porcentaje de rendimiento del experimento 2.	109
Tabla 16. Mili-unidades de absorbancia (mAU*s)de los picos correspondientes al partenólido de los diferentes estándares aplicados.	110
Tabla 17. Reportes de porcentaje de Partenólido en <i>Tanacetum parthenium</i> – bibliografía.	111
Tabla 18. Resultados del rendimiento de extracción del partenólido y el porcentaje de recuperación de la misma.....	112
Tabla 19. Contenido de partenólido en los extractos obtenidos con os sistemas de extracción – experimento 5.	113
Tabla 20. Porcentajes de recuperación del partenólido en los diferentes sistemas de extracción.....	114
Tabla 21. Rendimiento de los cristales obtenidos – experimento 6.....	115
Tabla 22. mAU*s de los cristales obtenidos y las flores ensayadas en el experimento 6.....	115
Tabla 23Rendimiento de los cristales obtenidos – experimento 7	116
Tabla 24. Rendimiento de los cristales obtenidos – experimento 8.....	117
Tabla 25. mAU*s de los cristales obtenidos y las flores ensayadas en el experimento 8.....	117

Tabla 26. Resultado de los diferentes experimentos con los diferentes sistemas de solvente, acetato de etilo, cloroformo, cloroformo/ acetato de etilo y acetato de etilo/ cloroformo. 118

RESUMEN:

En el presente trabajo de tesis se mejora un método para obtener Partenólido de las flores de *Tanacetum parthenium* de la ciudad del Cusco. El que tiene dos deficiencias: Bajo rendimiento de partenólido y alta toxicidad del cloroformo. Para tal caso (1) se mejora el tratamiento post-cromatográfico del aislamiento del partenólido y (2) se reemplaza el cloroformo por el acetato de etilo para mayor seguridad ambiental. El primer problema se resolvió cambiando el tratamiento post-cromatográfico y el segundo cambiando el solvente de extracción de cloroformo a acetato de etilo.

En el método original la evaporación de las fracciones EP/AcOEt conduce a un plástico (polímero) que no tiene utilidad, así el rendimiento del partenólido es pobre. En el presente trabajo se ha logrado mejorar el porcentaje de recuperación de 33.33 % en una metodología original a 69.42% en el extracto.

Dos sistemas de solvente para extracción de partenólido fueron encontrados como buenos candidatos cloroformo/acetato de etilo (1C2A) y acetato de etilo (1A2A). Sin embargo el cloroformo sigue siendo una buena opción como primer solvente de extracción. Finalmente, se ha encontrado que cuando se conjuga el aislamiento cromatográfico y el cambio de solvente se ve que el mejor procedimiento es 1C2A.

PREFACIO

Santa María, pertenece a la familia Asteraceae. Nativa de Europa y las islas británicas. En Perú se encuentra distribuida tanto de forma silvestre como cultivada, extendiéndose entre los departamentos de Apurímac, Cusco y Puno desde los 3000 hasta 4000 m.s.n.m. En el departamento de Cusco se distribuyen en los distritos de San Jerónimo, Limatambo y Andahuaylillas. Es una planta perenne que alcanza una altura de 14 a 50 cm (Cusco), de olor fuerte, verdoso-amarillo, hojas bipinnadas. Crece entre los meses de octubre – abril (Cusco). Como la mayoría de las plantas, Santa María, es muy complejo químicamente, contienen sesquiterpenlactonas, glucósidos de flavonoides, pinenos y otros compuestos. El partenólido, una sesquiterpenlactona, se reportó como el mayor componente químico activo en Santa María. Los efectos medicinales de la planta han sido conocidos por décadas particularmente para el tratamiento de cefalea y migraña. Desde que los efectos medicinales de Santa María para curar diferentes tipos de dolores se conocen hace décadas atrás, en estos días muchos preparados comerciales están disponibles en el mercado farmacéutico y de alimentos. Actualmente el partenólido se está usando para tratar el cáncer, leishmaniasis, mal de Chagas, e incluso el tratamiento de la adicción cocaínica, de ahí nuestro interés por aislar la sustancia.

Varios artículos han publicado sistemas de extracción de partenólido y métodos analíticos para su identificación. Ya en 1970 se realizó una extracción convencional de Feverfew (Santa María) usando cloroformo y éter de petróleo para extraer sesquiterpenlactonas (partenólido) y la espectroscopia RMN fue usada para su identificación. Trabajos posteriores, para identificar el partenólido en Feverfew, han reportado diversos tipos de extracción (con solventes, fluidos supercríticos etc.), procedimientos (como soxhlet, agitación y sonicación) y métodos analíticos (IR, RMN, GC y HPLC. Siendo el más común el método HPLC)

Los solventes de extracción utilizados incluyen cloroformo, éter de petróleo, acetona, acetonitrilo, 90% de acetonitrilo, alcohol y otros. Aunque el

etanol y metanol extraen el mayor el mayor porcentaje de partenólido sin embargo arrastran mucha materia orgánica (impurezas) haciendo engorrosa una purificación posterior del partenólido a partir del extracto crudo obtenido. El acetonitrilo ha sido reportado como el solvente de extracción, con el que se alcanzó la más alta cantidad de partenólido.

La mayoría de los trabajos publicados reportan extracción con un solvente y cuantifican la cantidad de partenólido en el extracto crudo. Sin embargo pocas investigaciones se han enfocado en reducir la toxicidad del solvente extractor, así también sucede en cuanto a la purificación y aislamiento a partir del extracto crudo. Mejorando la metodología de un trabajo anterior, este trabajo de tesis describe un cambio en el tratamiento post-cromatográfico que aumenta el porcentaje de recuperación de partenólido y reemplaza el cloroformo por acetato de etilo como solvente extractor en la segunda extracción (reparto líquido – líquido) reduciendo el impacto ambiental.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	21
1.1	hipotesis	21
1.2	Problema de investigación	21
1.2.1	Planteamiento del problema.....	21
1.2.2	Formulación del problema	22
1.2.3	Justificación de la investigación	22
1.3	Objetivos.....	22
1.3.1	Objetivo General	22
1.3.2	Objetivos secundarios	23
2	Marco teórico	24
2.1	Antecedentes	24
2.1.1	Aislamiento de partenólido	25
2.1.2	Extracción de partenólido con acetonitrilo/agua y determinación de partenólido en Santa maría por HPLC.	26
2.1.3	Purificación del extracto crudo por cromatografía flash.....	27
2.1.4	Obtención de partenólido a partir de las flores <i>Tanacetum parthenium</i> de la ciudad del Cusco. 28	
2.2	Bases teóricas.....	29
2.2.1	Familia Compositae.	29
2.2.2	Sesquiterpenlactonas	30
2.2.2.1	Definición.....	30

2.2.2.2	Biosíntesis.....	32
2.2.2.3	Extracción y separación	35
2.2.2.4	Características espectrales	36
2.2.2.5	Métodos analíticos	37
2.2.2.5.1	HPLC con detección UV.....	37
2.2.2.5.2	Cromatografía de capa fina (TLC).....	38
2.2.3	PARTENÓLIDO, una sesquiterpenlactona: Bioactividad y biosíntesis	39
2.2.4	Santa María (<i>Tanacetum parthenium</i>):.....	41
3	MÉTODO.....	47
3.1	Tipo y diseño de investigación.....	47
3.1.1	Tipo de investigación.....	47
3.1.2	Diseño de investigación.....	47
3.2	Variables	47
3.2.1	Independientes:	47
3.2.2	Dependientes:	48
3.3	Muestra	48
3.3.1	Tratamiento de la muestra:.....	48
3.4	Instrumentos de investigación	48
3.5	Procedimientos de recolección de datos.....	50
3.5.1	Experimento 1°.- EXTRACCIÓN CON CLOROFORMO(1C2C)	50
3.5.1.1	Primera extracción (maceración):	50

3.5.1.2	Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):	50
3.5.1.3	Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):	50
3.5.1.4	Cromatografía flash en Columna:	50
3.5.1.4.1	Impregnación del extracto en SiGel:	50
3.5.1.4.2	Preparación de la columna:	51
3.5.1.5	Cromatografía TLC	51
3.5.1.6	Tratamiento de las fracciones:	52
3.5.1.7	Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos:	53
3.5.1.7.1	Análisis por Espectroscopia infra roja IR:	53
3.5.1.7.2	Análisis cromatográfico DAD – HPLC	56
3.5.2	Experimento 2°.- EXTRACCIÓN CON ACETATO DE ETILO (1A2A)	58
3.5.2.1	Primera extracción (maceración):	58
3.5.2.2	Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):	58
3.5.2.3	Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):	58
3.5.2.4	Cromatografía líquida al vacío	58
3.5.2.4.1	Impregnado de la muestra en SiGel:	58
3.5.2.4.2	Preparación de la columna:	59
3.5.2.5	Cromatografía flash en Columna:	60
3.5.2.5.1	Impregnación del extracto en SiGel:	60
3.5.2.5.2	Preparación de la columna:	60
3.5.2.6	Cromatografía TLC	61

3.5.2.7	Tratamiento de las fracciones:	62
3.5.2.8	Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos.	62
3.5.2.8.1	Análisis por Espectroscopia infra roja IR.....	62
3.5.2.8.2	Análisis cromatográfico DAD – HPLC	64
3.5.3	Experimento 3°.- CUANTIFICACIÓN DEL PARTENÓLIDO POR ANÁLISIS HPLC DE LAS FLORES DE QORAO	67
3.5.3.1	Preparación del estándar:.....	67
3.5.3.2	Preparación de la muestra:.....	67
3.5.3.3	Análisis cromatográfico	67
3.5.4	Experimento 4°.- EXTRACCIÓN CON CLOROFORMO(1C2C)	70
3.5.4.1	Primera extracción (maceración):	70
3.5.4.2	Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):	70
3.5.4.3	Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):	70
3.5.4.4	Cromatografía flash en Columna:.....	70
3.5.4.4.1	Impregnación del extracto en SiGel.....	70
3.5.4.4.2	Preparación de la columna.	71
3.5.4.5	Cromatografía TLC	71
3.5.4.6	Tratamiento de las fracciones:	72
3.5.4.7	Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos.....	73
3.5.4.7.1	Análisis por Espectroscopia infra roja IR.....	73
3.5.4.7.2	Análisis cromatográfico DAD – HPLC	74

3.5.5	Experimento 5°.- EXTRACCIÓN COMPARATIVA CON ACETATO DE ETILO – CLOROFORMO (OPTIMIZACION DEL DIAGRAMA DE FLUJO DEL PARTHENOLIDO).....	76
3.5.5.1	Extracción con acetato de etilo (1A2A*).....	77
3.5.5.2	Extracción con cloroformo (1C2C*).	77
3.5.5.3	Extracción con cloroformo - acetato de etilo (1C2A*).....	77
3.5.5.4	Extracción con acetato de etilo – cloroformo (1A2C*).....	78
3.5.5.5	Extracción rápida de flores (mercado de San Pedro).	79
3.5.5.5.1	Análisis cromatográfico DAD – HPLC	79
3.5.6	Experimento 6°: EXTRACCIÓN 1C2A (CLOROFORMO/ ACETATO DE ETILO).....	84
3.5.6.1	Primera extracción (maceración):	84
3.5.6.2	Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):.....	84
3.5.6.3	Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):	84
3.5.6.4	Cromatografía flash en Columna (equipo automático):	84
3.5.6.4.1	Impregnación del extracto en SiGel:.....	85
3.5.6.4.2	Corrida de la muestra:	85
3.5.6.5	Cromatografía TLC	88
3.5.6.6	Tratamiento de las fracciones:	89
3.5.6.7	Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos.	89
3.5.6.7.1	Análisis por Espectroscopia infra roja IR.....	89
3.5.6.7.2	Análisis cromatográfico DAD – HPLC	90
3.5.7	Experimento 7°: EXTRACCIÓN 1A2A (ACETATO DE ETILO).....	93
3.5.7.1	Primera extracción (maceración):	93

3.5.7.2	Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):	93
3.5.7.3	Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):	93
3.5.7.4	Cromatografía líquida al vacío.	93
3.5.7.4.1	Impregnado de la muestra en SiGel:.....	93
3.5.7.4.2	Preparación de la columna:	93
3.5.7.5	Cromatografía flash en Columna (equipo automático):	94
3.5.7.5.1	Impregnación del extracto en SiGel:.....	94
3.5.7.5.2	Corrida de la muestra:	94
3.5.7.6	Cromatografía TLC	97
3.5.7.7	Tratamiento de las fracciones:	98
3.5.8	Experimento 8º: EXTRACCIÓN 1A2A (ACETATO DE ETILO).....	99
3.5.8.1	Primera extracción (maceración):	99
3.5.8.2	Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):	99
3.5.8.3	Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):	99
3.5.8.4	Cromatografía líquida al vacío.	99
3.5.8.4.1	Impregnado de la muestra en SiGel:.....	99
3.5.8.4.2	Preparación de la columna:	99
3.5.8.5	Cromatografía flash en Columna (equipo automático):	100
3.5.8.5.1	Impregnación del extracto en SiGel:.....	100
3.5.8.5.2	Corrida de la muestra:	100
3.5.8.6	Cromatografía HPTLC.....	103

3.5.8.7	Tratamiento de las fracciones:	104
3.5.8.8	Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos.	104
3.5.8.8.1	Análisis por Espectroscopia infra roja IR.....	104
3.5.8.8.2	Análisis cromatográfico DAD – HPLC	105
4	Resultados.....	109
4.1	Presentación de resultados	109
4.1.1	Experimento 1°	109
4.1.2	Experimento 2°	109
4.1.3	Experimento 3°	110
4.1.4	Experimento 4°	112
4.1.5	Experimento 5°	112
4.1.6	Experimento 6°	115
4.1.7	Experimento 7°	116
4.1.8	Experimento 8°	117
4.1.9	Cuadro resumen de resultados.	118
4.2	Discusión DE RESULTADOS	119
4.3	Conclusiones	121
4.4	Recomendaciones	121
5	Bibliografía.....	122
6	ANEXOS.....	127

1 INTRODUCCIÓN

1.1 HIPOTESIS

Resolver el problema del bajo rendimiento de cristales de partenólido debido a la formación de un plástico insoluble que se reportó en un trabajo anterior. Evitando reducir a sequedad las fracciones de EP/AcOEt en el tratamiento post-cromatográfico, que contienen partenólido y añadiendo EP 60 -80 °C para una mejor cristalización.

Lograr una metodología adecuada para extraer el partenólido con acetato de etilo y remplazar el cloroformo, reduciendo así el impacto ambiental.

1.2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.2.1 Planteamiento del problema

Las extracción de Partenólido de la especie *Tanacetum parthenium* ha sido llevada a cabo con éxito utilizando como solvente extractor el cloroformo por sus cualidades convenientes para este propósito. El cloroformo es un agente altamente irritante en el estado líquido, presenta una toxicidad tal que una exposición a largo plazo tiene efectos negativos sobre órganos humanos. A temperatura ambiente este se descompone lentamente por la acción combinada del oxígeno y la luz solar produciendo fosgeno y ácido clorhídrico. El fosgeno es un gas aún más tóxico. Al ser usado en la primera guerra mundial fue el responsable de la mayor cantidad de muertes.

El cloroformo es uno de los responsables del agotamiento del oxígeno estratosférico que se viene experimentado desde 1970. En Perú la especie *Tanacetum parthenium* L. Schulz. Bip. (Santa María) es una planta medicinal poco conocida y comercializada. No se han hecho trabajos científicos respecto a esta planta y sus principios activos a pesar de ser idónea para el tratamiento de diferentes malestares y enfermedades. A diferencia de otros países donde

se han realizado varios trabajos científicos sobre sus diferentes principios activos que se pueden emplear en el tratamiento de distintas enfermedades.

1.2.2 Formulación del problema

En el presente proyecto nos hemos planteado mejorar el rendimiento de 0.08% por modificación del tratamiento post-cromatográfico y experimentar con reactivos menos tóxicos como el acetato de etilo en búsqueda de un reemplazo del CHCl_3 que tenga características similares en cuanto a su poder extractivo para el partenólido.

1.2.3 Justificación de la investigación

- Se buscará utilizar el acetato de etilo en la extracción del partenólido, para evaluar su pureza y su rendimiento frente a otros métodos (evaluar resultados obtenidos con el cloroformo).
- El acetato de etilo es un solvente menos tóxico y más accesible que puede mejorar el rendimiento y la pureza de la molécula del partenólido.
- Al término del presente trabajo de investigación, usando el acetato de etilo se espera a contribuir a minimizar el riesgo de contaminación del ambiente, reducir el costo de extracción y su mayor accesibilidad en el mercado.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

- Utilizar el acetato de etilo en el proceso de extracción, purificación y cuantificación del Partenólido de la especie *Tanacetum parthenium* de la ciudad del Cusco por métodos cromatográficos (cromatografía flash en columna, cromatografía capa fina HTPLC, HPLC con detector de masas). Ya que el acetato de etilo es un solvente orgánico que cumple con las propiedades extractivas convenientes (baja toxicidad y de poco impacto ambiental).

- Solucionar el bajo rendimiento del partenólido debido al residuo verde formado tras el tratamiento post-cromatográfico de trabajo de investigación anterior.

1.3.2 Objetivos secundarios

Con esta investigación se pretende evaluar:

- Evaluar el rendimiento del acetato de etilo en la extracción.
- Evaluar el rendimiento en la utilización del acetato de etilo en la partición líquido – líquido.
- Evaluar la utilización del éter de petróleo 60 – 80 °C en el tratamiento post-cromatográfico.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Para identificar el partenólido en Feverfew (Santa María) se han reportado diferentes técnicas, métodos de extracción, procedimientos y métodos analíticos. La extracción convencional con solvente es una técnica sobre la que se han reportado numerosas publicaciones desde hace más de 40 años, ha sido realizada bajo diferentes métodos de extracción como extracción Soxhlet, extracción en baño de agua, agitación y sonicación. Los solventes de extracción utilizados incluyen cloroformo éter de petróleo acetona, acetonitrilo, 90% de acetonitrilo, alcohol y otros. Los métodos analíticos incluyen RMN, GC, IR y HPLC, entre los cuales, HPLC es el más común (Jin, Madieh, & Augsburg, 2008). Otras técnicas de extracción fueron también reportadas (no se especifica en este trabajo), por ejemplo la extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción a altas presiones

Ya en 1970 la extracción convencional de Santa María fue realizada con cloroformo y éter de petróleo para extraer sesquiterpenlactonas (incluido el partenólido) y RMN fue utilizado para su identificación (Yoshioka, Renold, Fisher, Higo, & Mabry, 1970). En 1978 en Polonia se reporta un método para la determinación cuantitativa de SLs (Bloszyk, Geppert, & Drozd, 1978). En 1983, para una extracción con cloroformo, se desarrolló un método HPLC en gradiente (Marchand, Mohan Behl, & Rodriguez, 1983). En Budakalász-Hungría el instituto investigación para plantas medicinales estudio las ventajas y el potencial de DCCC (droplet counter-current chromatography) en una escala preparativa y semipreparativa del aislamiento de partenólido, así como las sesquiterpenlactonas relacionadas, así dos sistemas de solventes fueron encontrados adecuados para aislar SLs de plantas Asteraceae. En este trabajo la extracción fue con cloroformo, los extractos se evaporaron a sequedad a 40°C bajo presión reducida. Se re-suspendió en etanol-agua (1:1), a continuación una solución de acetato de etilo fue añadida gota a gota para precipitar las sustancias lastre. Después de centrifugar, concentrar el líquido

claro bajo vacío, se extrajo con cloroformo, los extracto de cloroformo se secaron, filtraron y evaporaron hasta sequedad bajo presión reducida, las muestras crudas fueron seguidas por TLC y espectroscopia IR.

2.1.1 Aislamiento de partenólido

Kéry et al, purificó el partenólido a partir de extractos de plantas de Astereraceae (*Tanacetum parthenium*), el polvo del material seco (500 g) fue extraído por 3 x 4 L de cloroformo a temperatura ambiente por 5 horas cada vez, los extractos de cloroformo fueron mezclados y evaporados a sequedad a 40 ° C bajo presión reducida. Los residuos fueron disueltos en 100 ml de etanol agua 1:1 a continuación la solución de acetato de etilo (4 % p/p) fue adicionada gota a gota para precipitar material no deseado, después de 10 horas la solución fue centrifugada hasta alcanzar transparencia. El líquido fue concentrado (40 ml) bajo vacío y extraído con 4 x 50 ml de cloroformo. Los extractos de cloroformo fueron mezclados y secados (con sulfato de sodio anhidro), seguidamente fue filtrado y evaporado a sequedad bajo presión reducida. Las muestras crudas fueron evaluadas tanto para partenólido como sesquiterpenlactonas por TLC y espectroscopia IR en cloroformo. El contenido total de lactonas y partenólido fue comparado con un estándar de partenólido por medio de densitometría y espectroscopia IR respectivamente. Además el aislamiento de partenólido fue realizado por cromatografía DCC (o droplet counter current). El partenólido fue identificado por procedimientos estándar, y la identidad fue confirmada por técnicas espectroscópicas (UV, IR, RMN H y espectroscopía de masas) y comparación con muestras auténticas. (Kéry, Turiák, & Tétényi, 1988).

Rey reportó una extracción con cloroformo y análisis por HPLC (Rey, Levesque, & Pousset, 1992) . El grupo de Heptinstall ensayó una extracción por agitación (Groenewegen & Heptinstall, 1990) y una extracción soxhlet con éter de petróleo (Awang, Dawson, & Kind, 1991) combinando con un análisis de HPLC y RMN. Ellos también realizaron una extracción con acetona y un método HPLC con derivatización (Heptinstall 1992). Recientemente, Heptinstall et al reportaron la eficiencia de extracción de una serie de mezclas de

soluciones EtOH/buffer fosfato y acetonitrilo/ buffer fosfato para la resuspensión de los extractos de acetona (Brown, Lowe, Davey , Power, Knight, & Heptinstall, 1996). Por 1999, entre los métodos citados hasta ahora, la extracción soxhlet usando éter de petróleo combinado con un análisis HPLC fue el método más ampliamente usado en la industria herbal (Awang, Dawson, & Kind, 1991). En ese mismo año Zhou et al. desarrolló un método rápido y sensible para cuantificar partenólido en Santa María que lucía significativamente más rápida que las reportadas hasta entonces. El método de extracción consistió de acetonitrilo/agua (90:10 v/v) en una botella con agitación.

2.1.2 Extracción de partenólido con acetonitrilo/agua y determinación de partenólido en Santa maría por HPLC.

En 1999 Zhou, mediante una rápida y sensitiva extracción de partenólido a partir de Feverfew, hace una comparación de la efectividad de los sistemas de extracción. El mejor sistema de extracción fue determinado después que numerosos sistemas de solventes fueran examinados. Comparan la eficiencia de extracción de un método de extracción soxhlet y uno de agitación. El método Soxhlet descrito incluye una extracción en soxhlet por 24h in equipo Soxhlet bajo temperatura elevada (60°C), evaporando hasta sequedad y re-disolviendo y luego re-disolviendo el residuo en acetonitrilo para el análisis HPLC. Ellos encontraron que comparando la extracción Soxhlet, la agitación en botella por 30min a temperatura ambiente puede alcanzar la misma o una eficiencia de extracción mayor siempre que se seleccione un adecuado solvente de extracción. El método de agitación en botella provee resultados más reproducibles debido a que este proceso de extracción es más simple. Adicionalmente se comparan cinco solventes orgánicos y sus mezclas con diferentes proporciones de agua para la extracción de partenólido; y encuentran que el 90% de acetonitrilo exhibe la más alta eficiencia de extracción.

En la extracción Soxhlet, encontraron que evaporando el primer solvente extractor hasta sequedad deja un residuo verde en la matraz que no ira en la

solución después de la adición del solvente de re-suspensión, incluso después de muchas horas de mezclar. Así, recomiendan cuantificar directamente del primer solvente de extracción para mejores resultados debido por ser un método fácil y adecuado para la determinación de partenólido en un largo número de muestras.

Adicionalmente se comparó un significativo mejoramiento en las condiciones de HPLC respecto de los resultados reportados en la literatura. Las condiciones modificadas reportadas son: Columna Nacalai Tesque Cosmosil C 18-AR (150x4.6mm, 5µm, 120 Å); fase móvil de acetonitrilo/agua (55:45, v/v) (deferente de 45:55 como reporta Awang, 1991) a una velocidad de flujo de 1.5mL/min; y detección DAD a 210nm. El tamaño de inyección fue de 1-20µL. Información espectral desde 190 a 600 nm fue adquirido con el DAD para las muestras incluyendo los estándares de calibración de partenólido para confirmar la identidad del pico, pureza y el mejor ajuste de la longitud de onda. Adicionalmente cuantificó el partenólido (Zhou , Kou , & Stevens, 1999)

2.1.3 Purificación del extracto crudo por cromatografía flash.

En 2011 Walsh et al reporta una extracción con diclorometano por agitación. Después de filtrar evapora el solvente hasta una pequeña cantidad para transferir a una columna cromatográfica para su purificación. La cromatografía flash se describe como "un híbrido impulsado por la presión de aire de media presión y una columna cromatográfica corta la que ha sido optimizada para separaciones rápidas en particular". En el trabajo, una columna flash difiere de una columna cromatográfica normal en principio por el uso de una sílica gel fina y también por la aplicación de una presión de aire positiva por la cabeza de la columna para eliminar el solvente a través de la sílica, removiendo bolsas de aire atrapadas de la columna. Eliminando hexano a través de la columna se homogeniza la capa de sílica gel, sobre la que se transfiere el extracto de diclorometano. Después de aplicar una presión de aire positiva a la columna para forzar el extracto a través de la fase estacionaria se añade hexano por el top de la columna colectándose el eluyente. Entonces se adiciona el sistema gradiente acetato de etilo (9:1,6:1,5:1,4:1). Manteniendo la

presión de aire positiva se colectan 20 fracciones de 5mL de eluyente. Para identificar las fracciones que contienen el compuesto de interés puro se usó TLC. Desarrollando el plato en una fase móvil hexano: acetato de etilo (3:1). Y revelando con vainillina. Adicionalmente para la identificación del partenólido se realizaron análisis de espectroscopia IR, masas y RMN. Las señales más dominantes para el espectro IR del partenólido es la del carbonilo del éster cíclico a 1756 cm^{-1} , la absorción más débil a 1654 cm^{-1} indica la función alqueno y el pico a 940 puede sugerir la mitad de un epóxido (Walsh, Ashe, & Walsh, 2012).

Aunque muchos trabajos han reportado sobre extracción con solvente poco se ha hecho hasta ahora para encontrar un sistema solvente eficiente y poco toxico. Adicionalmente, la técnica de resuspender(o disolver) después de evaporar hasta sequedad el extracto crudo que incluido en los métodos publicados hace el método engorroso debido al residuo insoluble que queda.

Otro área problema en los métodos corrientes es la no adopción de un tratamiento post cromatográfico para cristalizar el partenólido.

2.1.4 Obtención de partenólido a partir de las flores *Tanacetum parthenium* de la ciudad del Cusco.

Se realiza la extracción modificando el método de Kéry et al. La primera extracción por maceración (llamada también lixiviación) con cloroformo por 3 veces 24 horas cada vez. Seguidamente, después de una evaporación a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y presión reducida, se resuspende en etanol: agua 1:1, luego se hace un reparto líquido – líquido con hexano descartando la fase hexánica y evaporando hasta que el extracto quede en fase acuosa solamente. A este se le hace una segunda extracción (reparto líquido - líquido) con cloroformo desechando la fase acuosa, después de secar con sulfato de magnesio se filtra y evapora a sequedad.

Para iniciar el proceso de purificación se disuelve el extracto anterior con acetato de etilo y se impregna en sílica gel, este se carga sobre una

columna preparada. La columna se prepara empacando con sílica gel disuelta en EP/AcOEt (180:20). La columna preparada se eluye con un gradiente EP/AcOEt, desde 90 % a 50 %. Tal que se recogen fracciones las cuales se monitorean por TLC en SiGel con EP:AcOEt (3:1) y revelado con ácido sulfúrico más calor. Las fracciones que contienen partenólido puro se juntan y se evaporan a sequedad obteniéndose una gran cantidad de plástico insoluble, el que no se logra redisolverse satisfactoriamente con hexano caliente, cloroformo y acetato de etilo o etanol calientes. Obteniéndose finalmente precipitar un 0.08 % de cristales y quedando una gran cantidad de plástico insoluble. La identificación de los cristales de partenólido se realizaron por IR y RMN. (Serrano Flores, Calsino, & Choquenaira, 2013)

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 Familia Compositae.

La familia Asteraceae, o de las compuestas, es el grupo de plantas vasculares más grande. Se estima que en el mundo existen alrededor de 1535 géneros y de 23000 a 32000 especies (Sancho & Pruski, 2004).

La distribución de las Compuestas alcanza casi todos los ambientes y continentes, excepto Antártica (Funk, y otros, 2005). Las diferencias morfológicas al interior de la familia llevaron tempranamente a la distinción de dos subfamilias, Asteroideae y Cichorioideae (antes Tubuliflorae y Liguliflorae), mientras que la subfamilia Barnadesioideae fue descrita recién en los 90' (Bremer & Jansen 1992). Últimamente, Baldwin et al. (2002) y Panero & Funk (2002), sobre la base de análisis morfológicos y moleculares, han propuesto una clasificación radicalmente nueva para las Asteraceae a nivel de subfamilias y tribus.

Características:

- Arbustos y plantas herbáceas, a veces con látex. Hojas alternas, raramente opuestas, simples, enteras o divididas, a veces

espinescentes. Inflorescencias en capítulo, los cuales pueden ser solitarios o bien estar agrupados en glomérulos o panículas.

- Flores de 2 tipos: actinomorfas (flósculos) y zigomorfas (lígulas). Además pueden ser hermafroditas, unisexuales o neutras. Dependiendo del taxón que se trate varía la disposición y presencia de los distintos tipos de flores.
- Cáliz absente o transformado en un vilano de pelos, setas, escamas o corona.
- Corola gamopétala, con tubo y limbo, el cual puede tener 3-5 dientes. - 5 estambres con las anteras soldadas formando un tubo.
- Gineceo con ovario ínfero de 2 carpelos soldados y 1 estilo con 1 estigma lobado.
- Fruto en cipsela, a menudo con papus. (Occidental)

2.2.2 Sesquiterpenlactonas

2.2.2.1 Definición

Las sesquiterpenlactonas son una clase de terpenoides de origen natural en plantas, representan una diversa y única clase de productos naturales y son importantes constituyentes de aceites esenciales. Constituyen un grupo largo y diverso de moléculas químicamente activas identificadas en varias familias de plantas, tales como Acanthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Rutaceae, Winteraceae y Hepatideae etc. Sin embargo, gran número se encuentran en la familia Compositae (Asteraceae) con más de 3000 estructuras diferentes reportadas.

De cabeza-a-cola teóricamente se forman de la condensación de tres unidades de isopreno y una posterior ciclación y transformación oxidativa para producir una cis o trans - lactona fusionada. Las SLs se clasifican principalmente sobre la base de sus esqueletos carbocíclicos en pseudoguainólidos, guaianólidos, germanocranólidos, eudesmanólidos, heliangólidos y hipocretenólidos, etc. (Figura 1).

El sufijo "olido" hace referencia al grupo funcional lactona y es en base al costunólido, un germacranólido que está relacionado con el sesquiterpeno carbocíclico de diez miembros, germacrano. Sin embargo, las SLs exhiben variedad de otras disposiciones esqueléticas. Una especie de planta generalmente produce un tipo de esqueleto de SL, concentrada principalmente en las hojas y cabezas de flores. El porcentaje de SLs por peso seco puede variar de 0.01% a 8%.

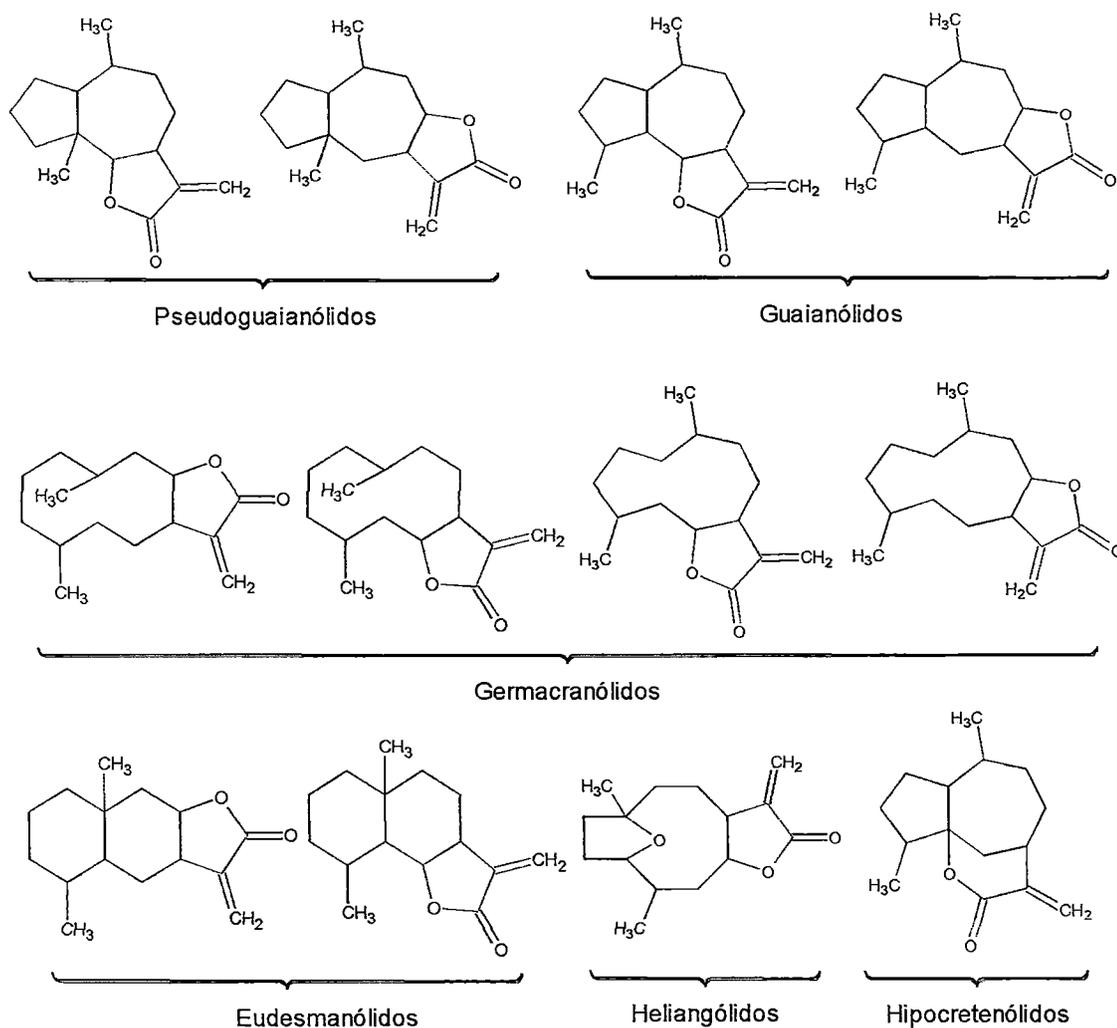


Figura 1: Esqueletos básicos de Sesquiterpenlactonas

Fuente: Chaturvedi, D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. En V. K. Tiwari, & B. B. Mishra, *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry* (pág. 314). Kerala: Research Signpost. Elaboracion: propia.

Una importante usual característica de las SLs es la presencia del anillo γ - lactona (orientado hacia el C-6 o C-8) conteniendo en muchos casos, un

grupo α metileno. Entre otras modificaciones, la incorporación de hidroxilos o hidroxilos esterificados y anillo epóxido son comunes. Pocas SLs se encuentran en forma de glicósido y algunas contienen átomos de azufre o halógenos (Chaturvedi, Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities, 2011)

2.2.2.2 Biosíntesis

Las sesquiterpenlactonas son en su mayoría derivadas de la ruta del ácido mevalónico (van Klink, Becker, & Boland, 2003), citado por (Majdi, y otros, 2011). Se originan a partir del farnesil difosfato. Después de una ciclación y posterior transformación oxidativa dan lugar a una lactona fusionada (custunólido) (GEISSMAN, 1973) . El costunólido se considera precursor de los tipos de sesquiterpenlactona germacranólido, eudesmanólido y guaianólido.

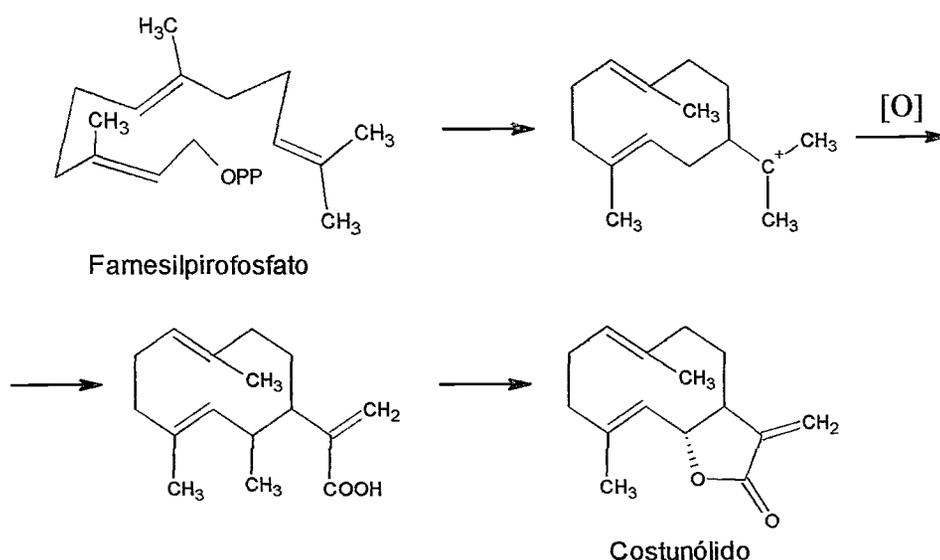


Figura 2: Biogénesis del esqueleto de germacranólido

Fuente: GEISSMAN, T. A. (1973). The Biogenesis of Sesquiterpene Lactones of the Compositae. En V. C. Runeckles, & T. J. Mabry (Edits.) Terpenoids: Structure, Biogenesis, and Distribution. Elaboración: propia

La formación del germacranólido básico, costunólido, de **1** requiere de dos cambios: (a) la introducción de oxígeno en la posición 6, y (b) la transformación oxidativa del grupo isopropenil (el desprotonado de la cadena lateral de 1). En la siguiente forma:

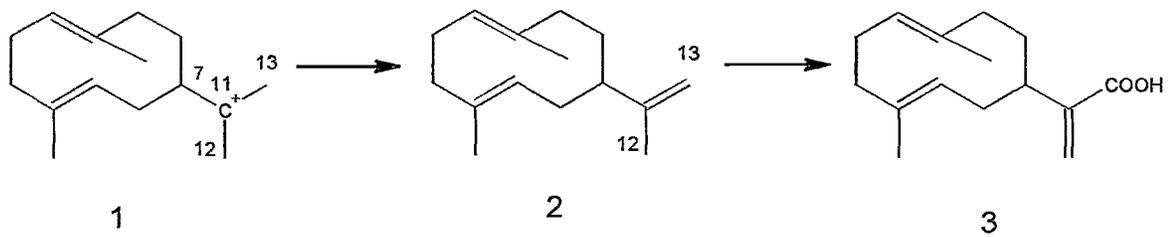


Figura 3: Formación del esqueleto básico germacranólido

Fuente: GEISSMAN, T. A. (1973). The Biogenesis of Sesquiterpene Lactones of the Compositae. En V. C. Runeckles, & T. J. Mabry (Edits.), Terpenoids: Structure, Biogenesis, and Distribution. Elaboración: propia

No se conoce con certeza a cerca de la naturaleza de la oxidación del seis-electrón que lleva de 2 a 3, menos aún, si el grupo $-COOH$ de 3 es derivado del C-12 o C-13 de 2. Sin embargo es probable que la introducción de oxígeno en compuestos de muchos tipos sea la epoxidación de un doble enlace carbono-carbono

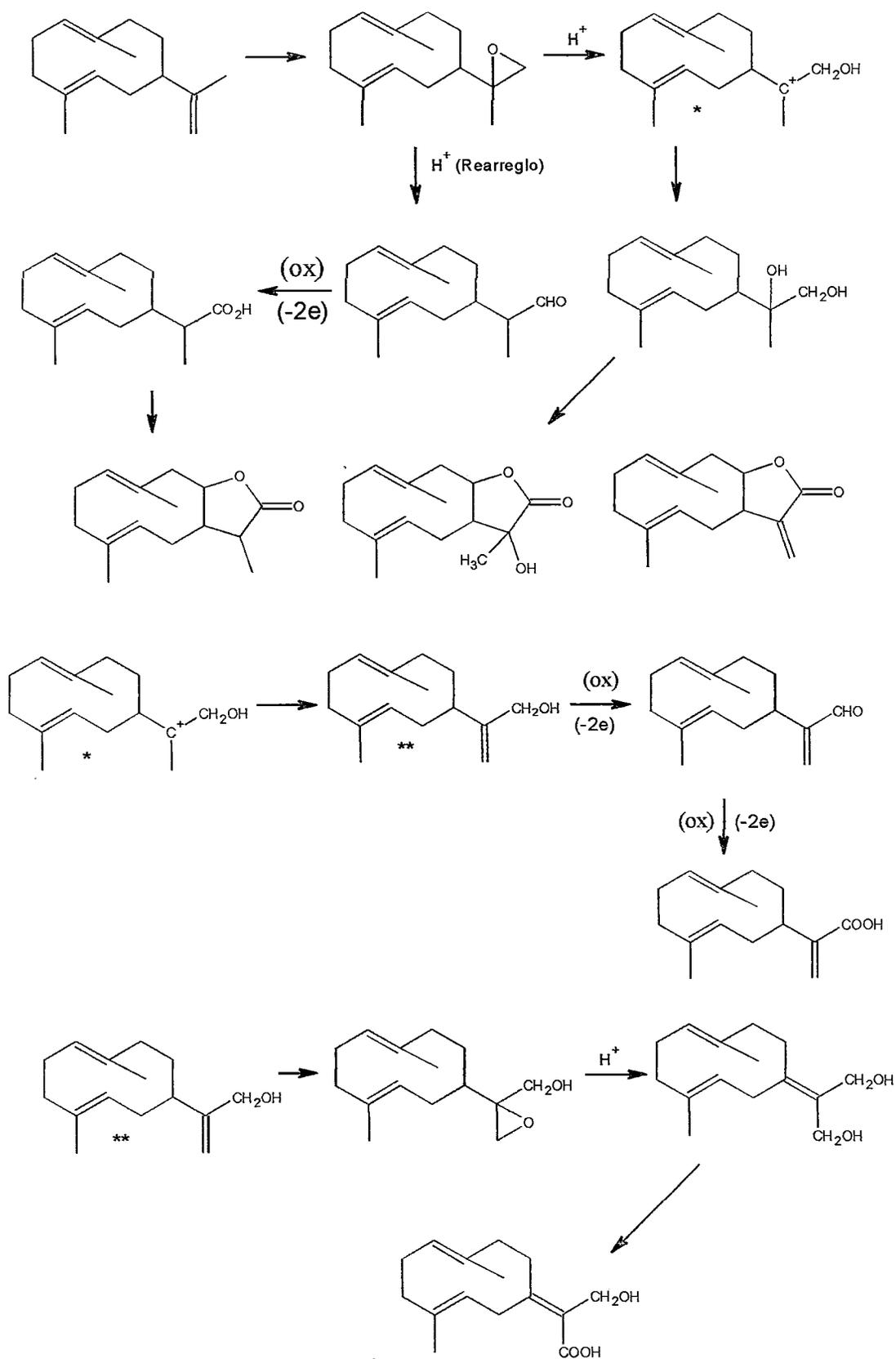


Figura 4: Posible síntesis de sesquiterpenilactonas

Fuente: Jessup, D. (1982). *Biologically active constituents of Chrysanthemum Parthenium* (Tesis doctoral inédita). University of London, Londres. Elaboración: Propia

El cómo y cuándo se introduce el átomo de oxígeno lactónico en el C-6 y C-8 parece no estar sujeta de un mecanismo sencillo. Se conocen compuestos con oxígeno en solo C-6, solo C-8, tanto C-6 como C-8; todos ellos en dos posibles configuraciones.

Se cree que eventos que llevan de 1 a 4 en los cuales el átomo de oxígeno lactónico es introducido en C-6 o C-8 pueden ocurrir antes (paso A, abajo) o después (paso B, abajo) de la oxidación a ácido carboxílico (en C-12) de la cadena lateral. Sin embargo existe evidencia que la oxidación directa de C-H a C-OH es un proceso biológico conocido

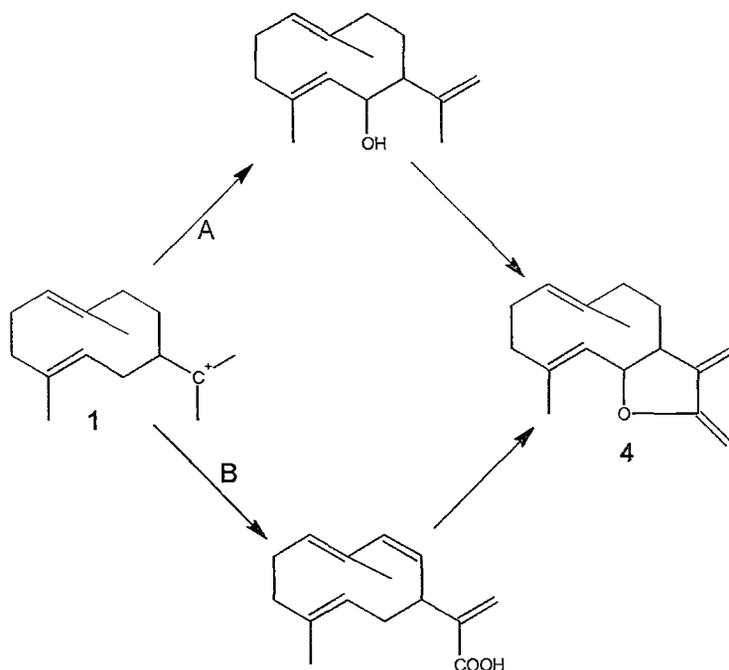


Figura 5: Secuencia de la introducción de oxígeno en C-6 o C-8 y la transformación oxidativa del grupo isoprenil en formación del anillo lactónico

Fuente: GEISSMAN, T. A. (1973). *The Biogenesis of Sesquiterpene Lactones of the Compositae*. En V. C. Runeckles, & T. J. Mabry (Edits.), *Terpenoids: Structure, Biogenesis, and Distribution*. Elaboración propia

2.2.2.3 Extracción y separación

Por encontrarse en forma libre en plantas que las poseen, las sesquiterpenlactonas naturales tienen las propiedades de solubilidad

características de la gran mayoría de terpenoides. Así son solubles en solventes relativamente apolares como cloroformo, diclorometano, benceno, éter etílico, etc.; siendo el cloroformo el más usado para su extracción (Martínez, 2001)

Se pueden separar y analizar sesquiterpenlactonas por cromatografía en columna o cromatografía en capa fina utilizando gel de sílice, eluyentes como: Cloroformo metanol 9:1 ó 19:1, cloroformo: éter etílico 4:1, cloroformo: éter etílico 5:1, Benceno: Acetona 4:1, benceno: acetato de etilo 5:5, etc.; y agentes reveladores (cromatografía en capa fina) como: Ácido sulfúrico concentrado y calentamiento, vapores de yodo, luz ultravioleta 254 nm, permanganato de potasio al 1%, etc. Sin embargo, actualmente es posible separar mezclas de SLs en poco tiempo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

2.2.2.4 Características espectrales

La estructura química de las sesquiterpenlactonas se elucida a partir de datos obtenidos por espectroscopia infrarroja (IR), ultravioleta (UV-vis), espectrometría de masas (MS), rayos X y principalmente por resonancia magnética nuclear (RMN-1H), ¹³C, DEPT y 2D (HMBC, HSQC, HSQC editado, HMBC, COSY y ROESY) (Mahabir P, 1995) citado por (Villacorta Hernandez, 2013).

En espectroscopía UV-vis, las sesquiterpenlactonas saturadas no absorben por encima de 200 nm, mientras que las sesquiterpenlactonas α,β -insaturadas absorben fuertemente entre 205-225 nm. La presencia de sistemas ciclohexanona o de ciclopentanona origina máximos de absorción de 214 -230 nm que cumplen con las reglas de Woodward.

En espectroscopía infrarroja IR el grupo carbonilo de lactonas saturadas absorbe alrededor de 1770 cm^{-1} , el de las lactonas α,β -insaturadas alrededor de 1750 cm^{-1} (con desplazamientos hasta 1795 cm^{-1} cuando hay variaciones estructurales), el anillo ciclopentanona absorbe a 1740 cm^{-1} , y del anillo

ciclopentenona absorbe a 1620 cm^{-1} . El grupo exo-metileno ligado al anillo lactónico absorbe a 1665 , $1405,965$ y 890 cm^{-1} (Martínez, 2001)

2.2.2.5 Métodos analíticos

Los métodos analíticos aplicados al análisis de sesquiterpenlactonas pueden ser divididos en dos grupos:

- Métodos cromatográficos como HPLC; SCF, GC, TLC, OPLC y MEKC para la separación en componentes individuales.
- Técnicas de guion tales como GC-MS, HPLC-UV, HPLC-RMN o SFC-UV mediante los cuales la caracterización y a menudo la identificación de compuestos separados es posible.

2.2.2.5.1 HPLC con detección UV

Las SLs son compuestos con baja volatilidad y muchas de ellas son termolábiles. Debido a estas propiedades; HPLC principalmente en fase reversa, es el método analítico de elección para el análisis de SLs en extractos crudos de vegetales. Sin embargo, la corrida HPLC de fase normal con gradiente de *n*-hexano-acetonitrilo-isopropanol puede ser preferible algunas veces. Estudios adicionales revelaron la utilidad del análisis HPLC cualitativo para la detección de SLs en extractos vegetales. Se dan algunos consejos para la aplicación. Para evitar la coelución picos, especialmente en los primeros, las SLs deberían estar disueltas en la misma proporción de la mezcla de disolventes en lugar de un solo disolvente. Se demostró que no hay diferencia en la calidad de separación de algunas SLs estructuralmente diferentes usando ya sea una columna RP 8 de $125 \times 4\text{ mm}$ ó $250 \times 4\text{ mm}$. Sin embargo, debido a la aplicación de bajas presiones y el corto tiempo de análisis la columna más corta es preferida. Para aplicaciones especiales una microcolumna puede ser útil. El HPLC es una valiosa herramienta para el análisis cuantitativo

2.2.2.5.2 Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina TLC fue uno de los primeros métodos cromatográficos y fue también aplicado al análisis de SLs. Su importancia ha decrecido en nuestros días. Sin embargo, en combinación con reactivos de spray especiales TLC provee información valiosa a cerca del tipo de SL. Los agentes de visualización (o reveladores) son numerosos e.g, vainillina/ácido *o*-fosfórico, anisaldehído o *p*- dimetilaminobenzaldehído- ácido sulfúrico, ácido sulfúrico, resorcinol - ácido sulfúrico o fosfórico, cloruro de aluminio o hidroxilamina. Las SLs carecedoras de un grupo exociclo- α -metileno pueden ser visualizadas con dimetilamina seguido del reactivo de dragendorff. En general esto depende del esqueleto para el cual el reactivo es más favorable. TLC puede ser usado para control de separación en cromatografía de columna (CC) o cromatografía líquida de presión media (MPLC) y como control de identificación de plantas medicinales como las publicadas para las flores de *Arnica*. TLC es aquí ventajoso, debido a su rapidez, fácil y barata resolución sin la necesidad de un equipamiento instrumental largo. Sin embargo, comparado con HPLC- o GC-MS este método cromatográfico provee poca información. Por otra parte, TLC puede ser usado para separar diastereoisómeros, tales como partenin e hymenin por desarrollo múltiple de platos TLC en el mismo sistema de solvente. Estas dos SLs solo difieren en la configuración del anillo ciclopentanona. En contraste, el apantallamiento del extracto de planta complejo, por TLC a menudo causa problemas, porque el amplio rango de colores producidos con todos los tipos de SLs, hacen su interpretación difícil.

Un método especial de TLC, que vale la pena mencionar es la cromatografía de capa fina a sobrepresión (OPLC). Como la separación en cámara OPLC es más rápida que TLC normal, el tiempo de separación es relativamente corto y la oportunidad de proporcionar artefactos es limitada o nula. Por lo tanto OPLC es especialmente conveniente para el estudio de numerosas muestras. Los dos desarrollos direccionales permiten la separación de más de 34 muestras en una misma corrida, mientras que HPLC usa las

fases RP 8 o Si 100 mediante eluciones isocráticas o en gradiente, respectivamente, puede ser la técnica preferida cuando se necesita información cualitativa o cuantitativa. Sin embargo, se demostró que OPLC combinado con densimetría directa también permite un análisis cuantitativo rápido de SLs, e.g., derivados de partenólido en diferentes plantas de *Zoegea lepturea*. El Partenólido puede también ser determinado en forma cuantitativa en *Crysanthmum parthenium* mediante el uso de TLC-FID (Merfort, 2002).

2.2.3 PARTENÓLIDO, una sesquiterpenlactona: Bioactividad y biosíntesis

El Partenólido, un germacranólido, es la principal SL responsable de la bioactividad de Santa María (*Tanacetum parthenium*), una planta tradicional que ha sido usada para el tratamiento de fiebre, migraña y artritis por siglos (Chaturvedi, Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities, 2011). Recientemente se ha incrementado el interés en este debido a su valor medicinal y sus actividades farmacológicas, especialmente como un agente profilaxis de la migraña y también para el tratamiento de cáncer. La rápida interacción con los diferentes objetivos biológicos se debe a la naturaleza nucleofílica del anillo metileno- γ -lactona y el grupo epóxido del partenólido. Por ejemplo, el partenólido puede promover apoptosis por inhibición de la actividad del complejo de factor de transcripción NF- κ B, y de esta manera los genes antiapoptóticos están regulados bajo el control de NF- κ B. (Liu, y otros, 2014). Se ha reportado que el partenólido puede atacar selectivamente las células madre leucémicas humanas, sin afectar a las células madre o progenitoras normales (Guzman, y otros, 2005). A pesar de estas actividades prometedoras, la aplicación de este potente producto natural está limitada por su escasa solubilidad en agua. Una serie de derivados de partenólido químicamente sintetizados con mayor solubilidad en agua – permitiendo por tanto la aplicación oral, han mostrado que conserva su bioactividad. Recientemente, el partenólido y su análogo ciclopropilo han sido sintetizados químicamente del costunólido (Liu, y otros, 2014)

El partenólido se deriva del costunólido a través de la epoxidación del doble en lace C4-C5 (Liu, y otros, 2011). El primer paso comprometido hacia la formación del costunólido es la formación de germacreno A a partir de farnesil difosfato (FDP), catalizado por la enzima (+)-germacreno A sintasa (GAS) (de Kraker, deGroot, Franssen, Konig, & Bouwmeester, 1998) citado por (Liu, y otros, 2014). En un serie de etapas de oxidación, el germacreno A es convertido en ácido germacranoico (germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-oico) por las enzimas citocromo P450 y germacreno A oxidasa (de Kraker, Franssen, M.C.R, Dalm, deGroot, & Bouwmeester, 2001), citado por (Liu, y otros, 2014) Posteriormente el ácido germacranoico es oxidado por la costunólido sintasa (COS) a ácido 6 α -hidroxi-germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-oico, el que sufre una espontánea formación de anillo lactónico para producir costunólido. Finalmente una monooxigenasa P450 cataliza la epoxidación del doble enlace C4-C5 del costunólido, dando partenólido (Liu, y otros, 2014).

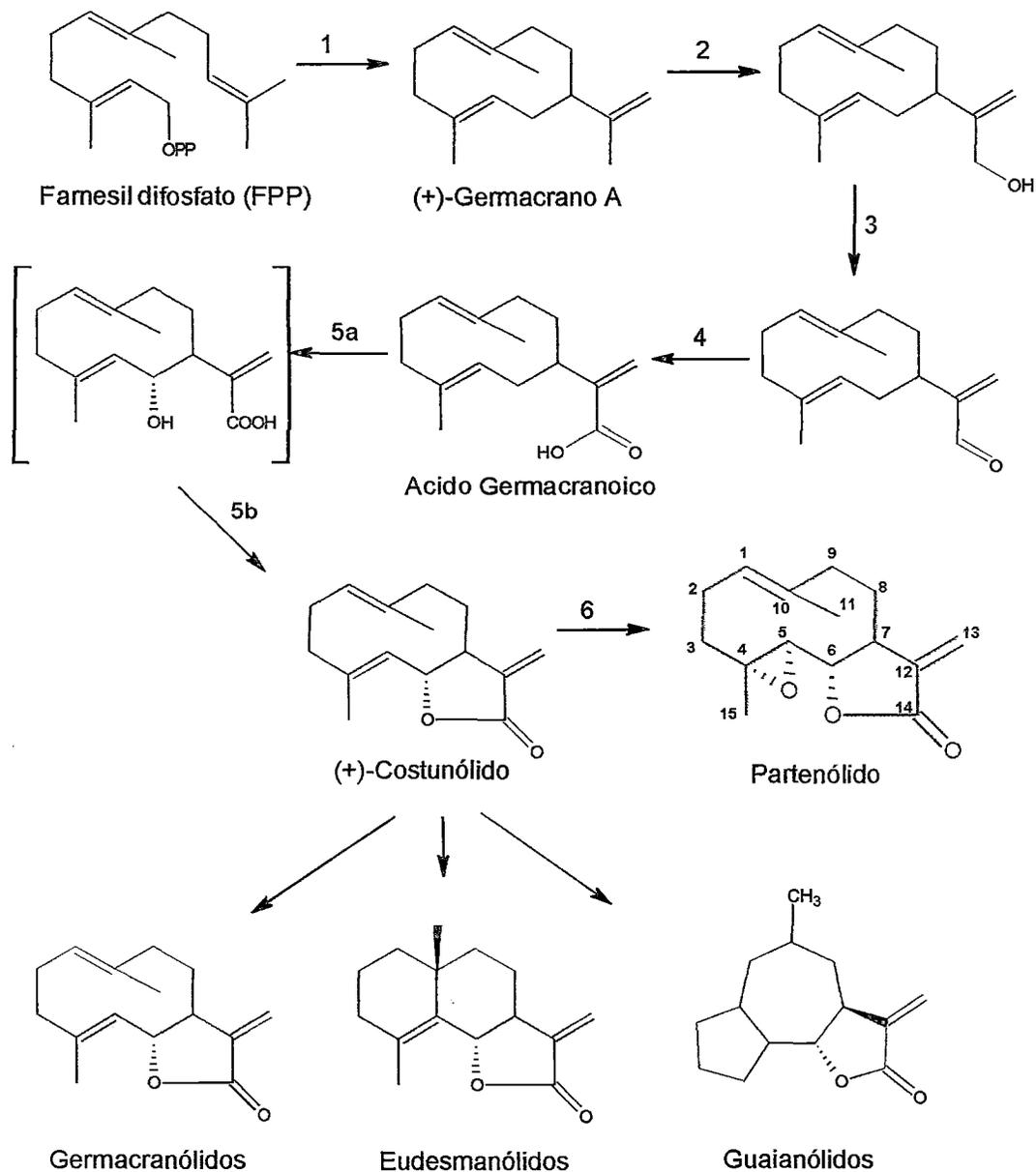


Figura 6: Ruta biosintética de partenólido a partir de farnesil pirofosfato; el paso 1 es catalizado por una germacreno A sintasa; los pasos 2,3 y 4 son catalizados por germacreno A oxidasa; paso 5a, 5b: costunólido sintasa; paso 6: costunólidoepoxidasa /partenólido sintasa.

Fuente: Majdi, M., Liu, Q., Karimzadeh, G., Malboobi, M. A., Beekwilder, J., Cankar, K., y otros. (2011). Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry*, 72, 1739–1750. Elaboración: Propia.

2.2.4 Santa María (*Tanacetum parthenium*):

Tanacetum parthenium, una planta perenne aromática de olor fuerte y amargo similar a la margarita, pertenece a la familia Asteraceae. De origen europeo, extendida en varias regiones del Perú como Cusco. Las

denominaciones son varias según el país y la zona, entre ellas “Feverfew” que deriva del latín *febrifugia* “reductor de fiebre” ó Santa María como se conoce en la región Cusco. Crece entre 0,3-1 m de altura. Sus hojas de color verde-amarillo son generalmente menos de 8 cm de longitud, casi sin pelo, y pinnadas-bipinnadas (como crisantemo). La planta crece a lo largo de los caminos, campos, áreas de residuos. También se ha reportado a lo largo de las fronteras de los bosques del este de Canadá a Maryland y hacia el oeste a Missouri.

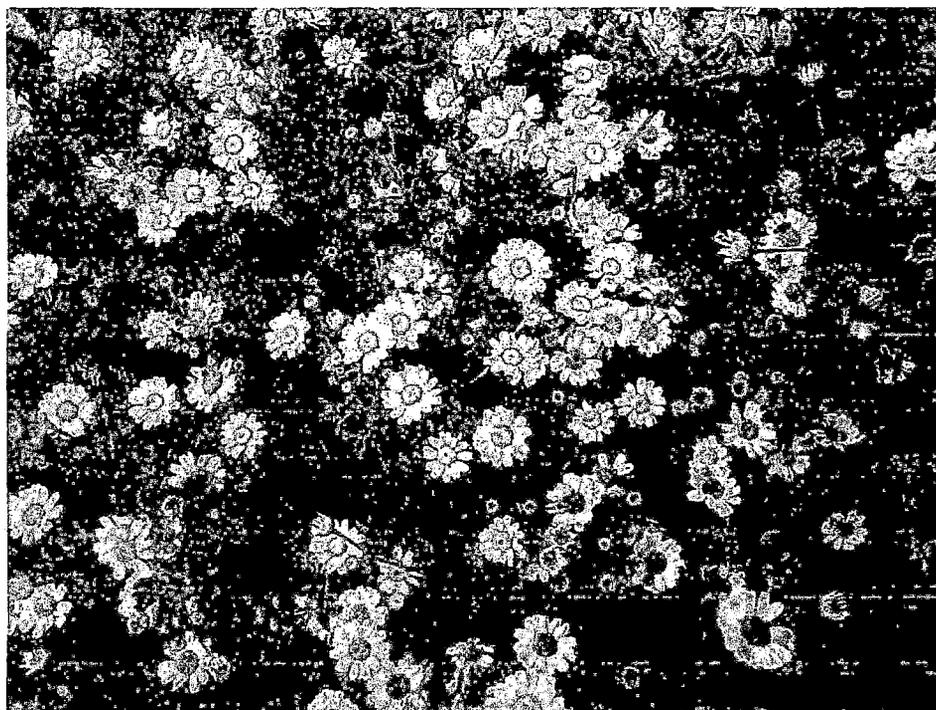


Figura 7: Mata florida de *Tanacetum parthenium* de la comunidad de Corao- Cusco, donde es conocida como Santa maría.

Originaria de la península de los Balcanes, la Santamaría se encuentra ahora en Australia, Europa, China, Japón, el norte de África, los Estados Unidos, Sudamérica y Centroamérica (Pareek, Suthar, Rathore, & Bansal, 2011). En Perú, se extiende entre los departamentos de Apurímac, Cusco y Puno desde los 3000 hasta 4000 m.s.n.m. Distribuida en los distritos de San Jerónimo, Limatambo (en Pampaconga) y Andahuaylillas (en Ttiomayo), del departamento de Cusco donde la hierba alcanza hasta 0,5 m de altura (Roersch, 1994); y crece entre los meses de octubre –abril.

La cosecha de las plantas en primavera produce una concentración mucho mayor de partenólido respecto de la cosecha en el otoño (Kemper MD & MPH)

La especie *Tanacetum parthenium* pertenece al género *Tanacetum*, la familia *Asteraceae* (familia *Aster*), el orden *Asterales*, subclase: *Asteridae*, y la clase: *Magnoliopsida* (Dicotiledóneas). A la división: *Mangliophyta* (Plantas floridas), la super división: *Spermatophyta* (Plantas con semilla), el subreino: *Trachiobionta* (Plantas vasculares), y el reino: *Plantae* (Plantas).

Históricamente, la planta se ha colocado en 5 géneros diferentes, por lo que existe cierta controversia en cuanto a qué nivel de género de la planta pertenece. Los antiguos nombres botánicos incluyen: *Chrysanthemum parthenium* (L.) Bernh., *Leucanthemum parthenium* (L.) Gren and Gordon, *Pyrethrum parthenium* (L.) Bernh., and *Matricaria parthenium* (L.). Alternativamente ha sido descrita como un miembro del genero *Matricaria*. [5,7].

Los nombres comunes que se le han asignado son (Ross, 2001):

NOMBRES COMUNES

Acetilla	México	Featherfew	USA
Alfinetes de Senhora	Madeira	Febrifuge plant	USA
Altamisa Mexicana	Mexico	Feverfew tansy	Madeira
Altamisa	Argentina	Feverfew	Canadá
Artemijio	Brasil	Feverfew	Croatia
Artemisia	Costa Rica	Feverfew	England
Artemisia	Madeira	Feverfew	Israel
Artmija	Madeira	Feverfew	USA
Boulet	France	Hierba Santa Maria	Canary Islands
Bouton d'argent	France	Luzab	Yemen
Camamieri	France	Matricaria común	Argentina
Camomilla	France	Mutterkraut	Europa
Camoumida	France	Santa María	Argentina
Camsumilha	France	Santa María	Mexico
Canamelha	France	Tanaceto	Canadá



Chrysanthemum parthenium, bachelor's button, featherfoil, febrifuge plant, midsummer daisy, nosebleed, wild chamomile, wild quinine, chamomile grande, *chrysanthemum atricaire*, federfoy, flirtwort, *Leucanthemum parthenium*, *Matricaria capensis*, *Matricaria eximia* hort, *Matricaria parthenium* L., MIG-99, mother herb, *Parthenium hysterophorus*, parthenolide, *Pyrenthrum parthenium* L, European feverfew, feather-fully, feddygen fenyw, flirtroot, grande chamomile, mutterkraut, and vetter-voe.[1-5] (Pareek, Suthar, Rathore, & Bansal, 2011). Las plantas de los EE.UU., México y Serbia parecen ser casi desprovistas de Partenólido (Kemper MD & MPH)

Los antiguos griegos la llamaban hierba "Parthenium", supuestamente porque se utilizaba medicinalmente para salvar la vida de alguien que había caído del Partenón durante su construcción en el siglo quinto antes de Cristo. El médico griego del siglo primero Dioscórides utiliza la Santa María como antipirético. *Matricaria* también era conocido como "aspirina medieval" o la "aspirina" del siglo 18.

La planta se ha utilizado para tratar la artritis, el asma, estreñimiento, dermatitis, dolor de oído, fiebre, dolor de cabeza, afecciones inflamatorias, picaduras de insectos, los trastornos menstruales, la psoriasis, espasmos, dolor de estómago, hinchazón, zumbido de oídos, dolor de muelas, vértigo, y gusanos. Santa María también se ha utilizado como un abortivo, como un insecticida, y para tratar la tos y los resfriados. Tradicionalmente, la hierba se ha utilizado como un antipirético, del que se deriva su nombre común (Pareek, Suthar, Rathore, & Bansal, 2011)

En Centro y Sur América, la planta se ha utilizado para tratar una variedad de trastornos. La gente del sur andino del Perú valoran su uso para el tratamiento del dolor de estómago, de matriz, de muelas, de oído; cólicos menstruales, fiebre, diarrea, bronconeumonía, reumatismo, resfriado, presión baja, etc. Así como para el tratamiento de afecciones nerviosas o fiebres infecciosas.

Santa María también se ha plantado alrededor de las casas para purificar el aire debido a su fuerte olor duradero y una tintura de sus flores se

utiliza como un repelente de insectos y bálsamo para las picaduras. Se ha utilizado como un antídoto para el exceso en el opio (Pareek, Suthar, Rathore, & Bansal, 2011) Otros estudios también demostraron que el partenólido era eficaz en la inhibición de algunas células tumorales y pro- inflamatorio del factor transcripcional NF-kB (Wu, y otros, 2006)

La química de la Santa María está bien definida; esta contiene lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, aceites volátiles y otros constituyentes químicos. No obstante los principios biológicamente activos más importantes son las lactonas sesquiterpénicas, siendo el principal el partenólido. El Partenólido ha sido observado mayoritariamente en las flores, seguido de las hojas y tallos. Sin embargo, no se detectó partenólido en las raíces. Entre las flores, los floretes del disco contienen alta concentración de partenólido respecto de los floretes de rayo, lo que coincide con la alta densidad de tricomas glandulares sobre los floretes del disco. Entre los floretes del disco es el ovario el que contiene la mayor cantidad de partenólido en comparación con la corola, lo que también coincide con la alta densidad de tricomas glandulares. Todo esto sugiere a los tricomas glandulares como el lugar más probable donde ocurre la acumulación de partenólido. La asociación del partenólido con los tricomas glandulares se fundamenta por el hecho que el partenólido no fue detectado en las raíces, que de hecho, no tienen tricomas glandulares (Majdi, y otros, 2011)

Más de 30 lactonas sesquiterpénicas se han identificado en Santa María. Santa María contiene eudesmanólidos, germacranólidos (Partenólido) y guaianólidos.

Los investigadores también han aislado las siguientes sesquiterpenlactonas: artecanin, artemorin, balchanin, canin, costunolide, 10-epicanin, epoxyartemorin, 1-beta-hydroxyarbusculin, 3-beta-hydroxy-costunolide, 8-alpha-hydroxyestagiatin, 8-beta hydroxyreynosinn, 3-beta-hydroxyparthenolide, manolialide, reynosin, santamarine, epoxysantamarine, secotanaparthenolide A, secotanaparthenolide B, tanaparthin-alpha-peroxide, and 3,4-beta-epoxy-8-deoxycumambrin B (Pareek, Suthar, Rathore, & Bansal, 2011).

Los primeros métodos para el análisis de Santa María incluyen extracción con solvente seguido de espectroscopia infrarroja, el mismo que solo indica la concentración total de sesquiterpenlactonas. Un método HPLC con detección UV (siguiendo la extracción con solvente) puede dar información individualmente sobre especies presentes pero, debido a que las SL carecen de grupos cromóforos es necesario llevar a cabo una paso de derivatización antes de la separación HPLC.

3 MÉTODO

3.1 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

3.1.1 Tipo de investigación

El proyecto de investigación es de tipo experimental debido a que se experimentará la extracción de partenólido de la especie *Tanacetum parthenium* de la ciudad del Cusco, con el solvente acetato de etilo en reemplazo del cloroformo (solvente extractor usado con éxito en otras investigaciones).

De tipo cuantitativo por que se cuantificará los porcentajes de rendimiento, pureza, contenido real de partenólido en los ensayos realizados con los diferentes solventes.

3.1.2 Diseño de investigación

- El plan experimental consta del siguiente orden:
- Recolección de la muestra.
- Primera extracción (maceración).
- Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado).
- Segunda extracción (reparto líquido - líquido).
- Cromatografía en columna.
- Cromatografía TLC
- Tratamiento de la fracciones.
- Caracterización cuantificación de los cristales obtenidos por espectroscopia IR, HPLC - DAD).

3.2 VARIABLES

3.2.1 Independientes:

- Método de extracción

3.2.2 Dependientes:

- Solventes en la extracción
- Solventes en la partición
- Tratamiento post cromatográfico

3.3 MUESTRA

La muestra empleada será las flores de Santa María, de algunos distritos de la Ciudad del Cusco (jardines del Cusco-Cusco, distrito de Qcorao, Urb. Mariscal Gamarra, mercado de San Pedro y cuyería el Mirador)

3.3.1 Tratamiento de la muestra:

Una vez colectadas las muestras de flores, se seleccionan solamente las cabezas y se secan al aire libre. Una vez secas las cabezas de las flores se proceden a la molienda (pulverización) en un molino de dientes.

3.4 INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

Materiales:

- Frascos color caramelo de 5 litros.
- Matraces esmerilados con tapa.
- Probetas de 10, 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Pipetas de 1, 5, 10 mL
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas de 2, 5 μ m.
- Vasos de precipitados
- Embudos
- Pera de decantación
- Balón de base redonda
- Cámara de revelado
- Cromatofolio HPTLC
- Columna cromatográfica

Reactivos

- Sílica gel 60
- Sílica gel flash
- Cloroformo
- Acetato de etilo
- Hexano
- Bencina
- Éter de petróleo
- Alcohol
- Acetonitrilo
- Metanol
- Agua destilada
- Ácido sulfúrico
- Bromuro de potasio
- Nitrógeno gas.

Equipos

- Bomba de vacío
- Bomba de acuario
- Baño ultrasónico
- Rotavapor
- Equipo IR
- Equipo HPLC
- Estufa
- Cámara extractora de gases
- Prensa
- Equipo cromatografía en columna automática.

3.5 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1 Experimento 1°.- EXTRACCIÓN CON CLOROFORMO(1C2C)

3.5.1.1 Primera extracción (maceración):

Se pesaron 89.000 g de flores secas y pulverizadas (Jardines del Cusco, 3300 msnm) los cuales se maceró con 500 ml de cloroformo por tres veces, dejándolos durante 24 horas por cada extracción en un frasco color ámbar de vidrio con tapa en un lugar frío y oscuro para evitar la evaporación del solvente. Los extractos obtenidos se filtran, se juntan y se evaporaron a sequedad en un rotavapor R-215 BUCHI, a una presión de 474 mBar, a una temperatura no mayor de 60 °C y con una rotación 50 a 100 rpm.

3.5.1.2 Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):

El extracto se disuelve con 100 ml etanol y 100 ml de agua. A esta solución se hizo un reparto líquido – líquido con 2 porciones de hexano de 50 mL cada una; se desechó la fase hexánica y se evaporó la fase hidroalcohólica hasta eliminar todo el etanol, quedando así el extracto en fase acuosa.

3.5.1.3 Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):

A la fase acuosa se hizo una partición con 3 porciones de 50 ml de cloroformo para quedarnos con moléculas apolares dentro de las cuales se encuentra el partenólido. A esta solución se le agregó sulfato de magnesio con el fin de secar la solución. Se filtra y se evaporó a sequedad, obteniéndose 4.071 g de extracto seco.

3.5.1.4 Cromatografía flash en Columna:

3.5.1.4.1 Impregnación del extracto en SiGel.

El extracto anterior se disolvió con 10 mL de acetato de etilo, y este se impregnó en SiGel 0.2 x 0.5 mm y se evaporó hasta sequedad.

3.5.1.4.2 Preparación de la columna.

Una cantidad de SiGel se mezcló con una solución hexano: acetato de etilo (180:20), esta mezcla se trasvasó en una columna de 3.5 cm de diámetro, alcanzando una altura de 18.5 cm. Sobre esto se adicionó el extracto impregnado en SiGel, de manera que se mantenga una superficie uniforme.

La columna se eluyó con el sistema de gradiente, éter de petróleo: acetato de etilo según la siguiente tabla:

N°	mL EP	mL AcOEt	% EP
1	180	20	90
2	85.7	14.3	85.7
3	83.3	16.7	83.3
4	400	100	80
5	50	50	50
6	0	100	0

Tabla 1. Sistema de elución de la cromatografía en columna – experimento 1

Se recogen 30 fracciones de 25 mL cada uno, excepto las 2 últimas de 50 mL.

3.5.1.5 Cromatografía TLC

Con la finalidad de identificar las fracciones que contienen partenólido, las fracciones colectadas se monitorearon por cromatografía de capa fina (HPTLC).

En un cromatofolio HPTLC se siembran 2 μ L de cada fracción, se seca para evaporar el solvente, luego se coloca en una cámara cromatográfica utilizando como eluyente una solución hexano: acetato de etilo (4:1). Después se seca y se revela con ácido sulfúrico: agua (1:9) en presencia de calor para desarrollar el color.

amarillos, los cuales se filtran, enjuagándolos con hexano frío y se seca, obteniéndose 8.9 mg de partenólido (cristales 3).

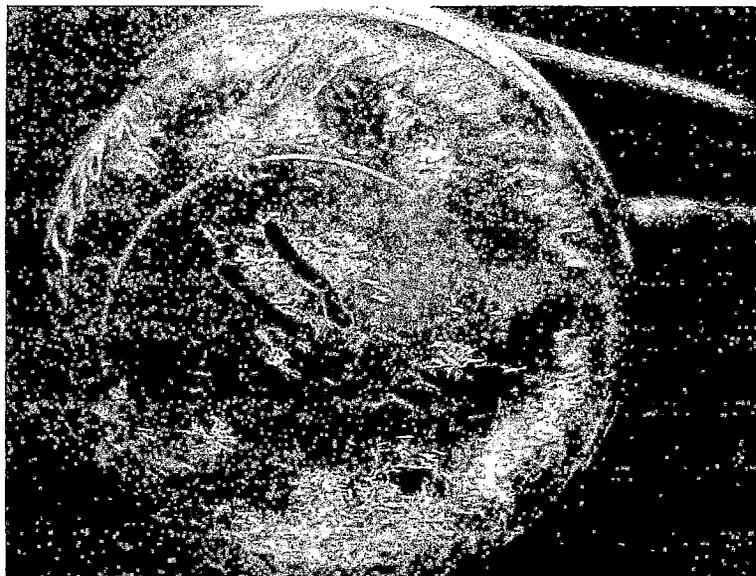


Figura 9: Cristales de Partenólido obtenidos – experimento 1

3.5.1.7 Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos.

3.5.1.7.1 Análisis por Espectroscopia infra roja IR

El análisis se realiza en pastilla de KBr, para lo cual se toma una pequeña cantidad de los cristales obtenidos y se mezcla con KBr en una proporción cristales: KBr (1:60), luego se somete a prensado para obtener la pastilla luego se procede a leer en el espectrometro IR (Thermoelectronics FTIR).

Se obtienen los siguientes espectros IR.

Cristales obtenidos y de bibliografía:

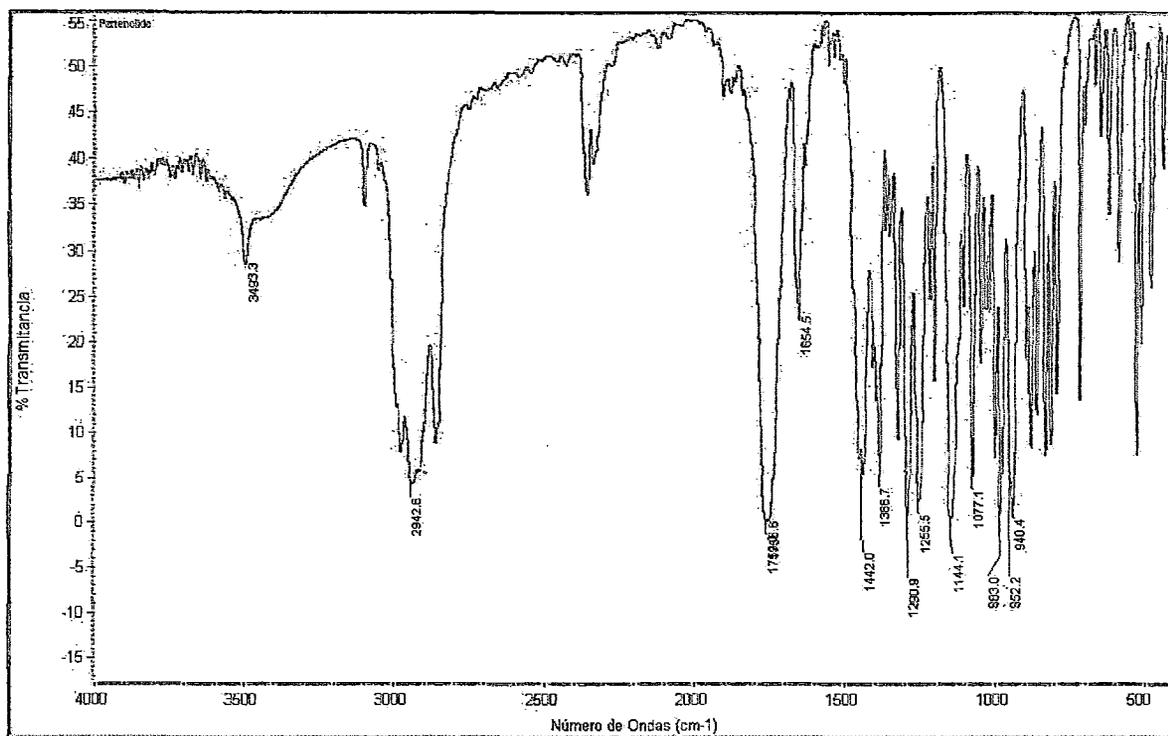


Figura 10. Espectro IR del partenólido obtenido –experimento 1.

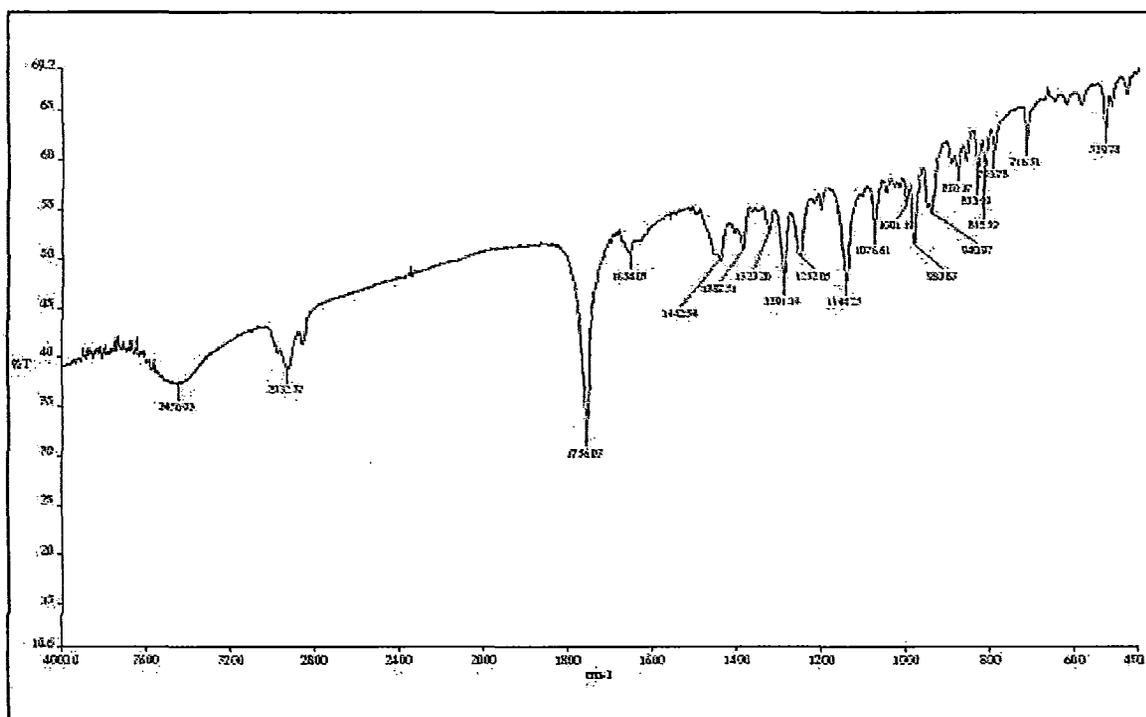


Figura 11. Espectro IR del partenólido – bibliografía

Fuente: Nature's Migraine Treatment: Isolation and Structure Elucidation of parthenolide from *Tanacetum parthenium*.

Datos según Walsh et al.	Datos Experimentales
3450.93	3493.3
2932.37	2942.6
1756.03	1759
1654.05	1654.5
1442.54	1442
1387.57	1386.7
1323.3	1320.6
1291.14	1290.9
1252.06	1255.5
1144.25	1141.1
1076.61	1077.1
1001.19	1003.2
983.83	983
940.97	940.4
880.17	881.4
833.99	815.5
793.78	790.9
716.51	716.6
529.78	529.7

Tabla 2. Comparación de picos de los espectros IR según Walsh et al. y los obtenidos experimentalmente

Se realizó una gráfica de los resultados reportados y obtenidos del espectro IR.

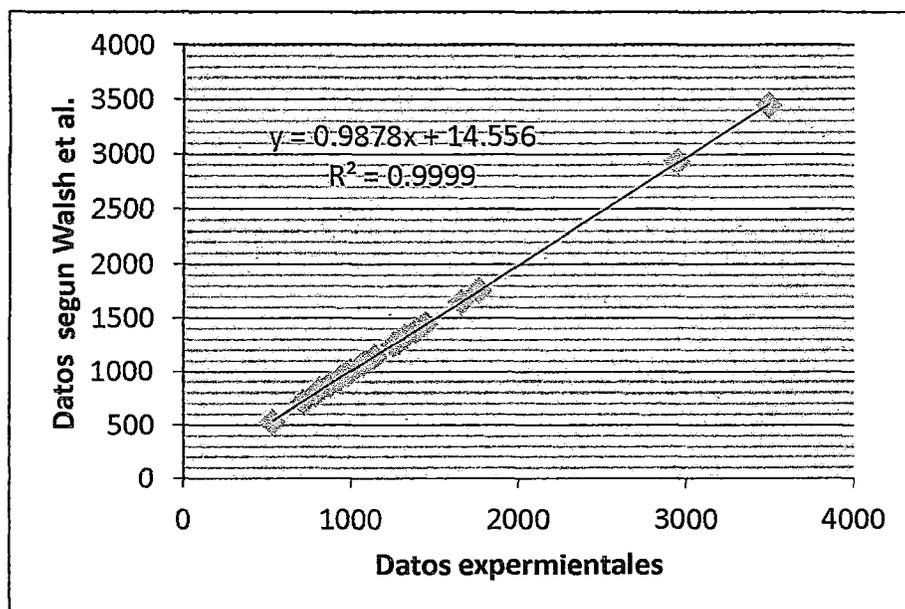


Figura 12. Curva de coincidencia de los picos del Espectro IR Datos bibliográficos Vs Datos Experimentales.

De acuerdo al coeficiente de correlación (R^2) podemos decir que los cristales obtenidos coinciden con los del partenólido de la bibliografía.

3.5.1.7.2 Análisis cromatográfico DAD – HPLC

Los cristales obtenidos se disolvieron en la fase móvil MeCN:H₂O (9:1) a una concentración de 1 mg/mL, este se analizó en equipo HPLC bajo las siguientes condiciones.

- Equipo: HPLC DAD Agilent 1200
- Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm x 5µm
- Modo de elución: Isocrático (MeCN:H₂O, 45:55 % v/v)
- Detección: 210nm
- Volumen de inyección: 0.5 µL
- Tiempo de análisis: 15 min.
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo: 1.5 mL/minuto
- Fase móvil: MeCN:H₂O (45:55 %)
- Modo de análisis: Isocrático

Obteniéndose el siguiente cromatograma

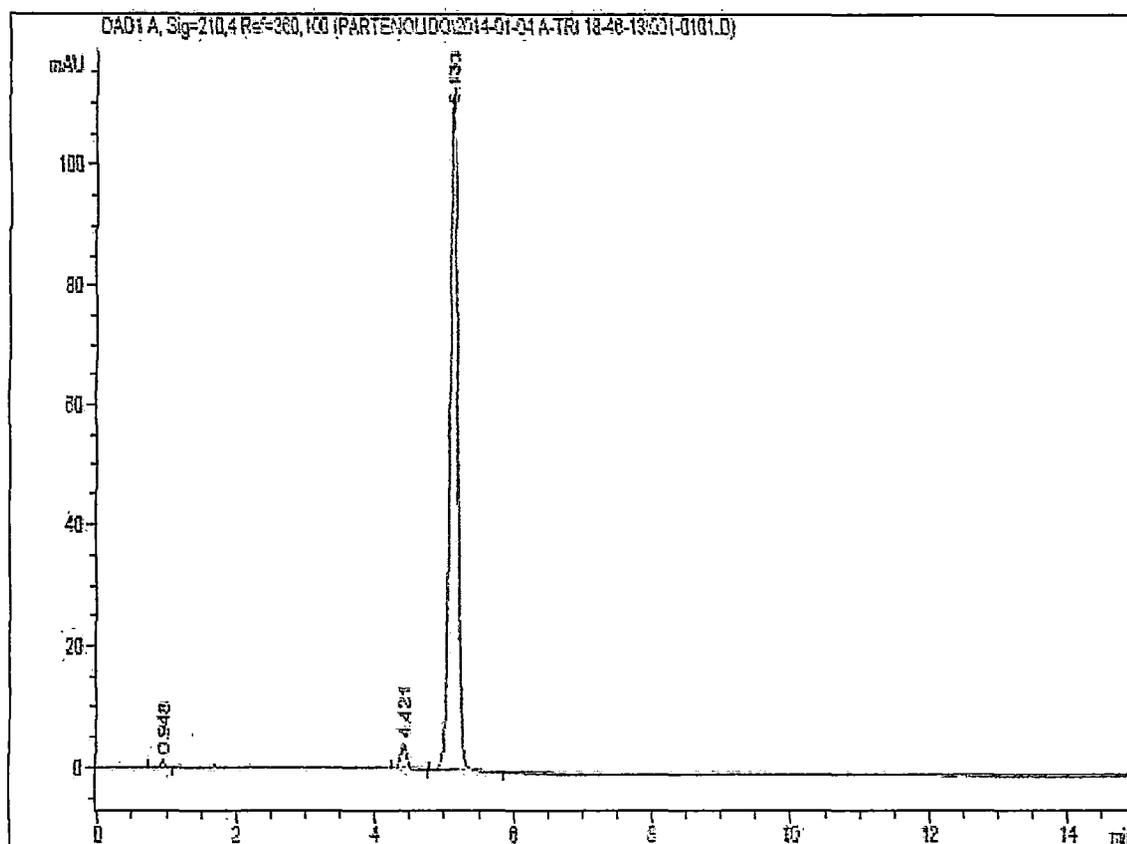


Figura 13: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos - experimento 1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.948	BB	0.0687	5.97820	1.22949	0.6556
2	4.421	BB	0.0969	25.69923	4.11410	2.8182
3	5.133	BB	0.1186	880.23279	113.36629	96.5263

De acuerdo a la bibliografía el tiempo de retención característico del partenólido es aproximadamente 5 min lo que se corrobora con el siguiente cromatograma. Como un resultado del análisis HPLC, los cristales de partenólido obtenidos tienen una pureza de 96.5263 %.

3.5.2 Experimento 2°.- EXTRACCIÓN CON ACETATO DE ETILO (1A2A)

3.5.2.1 Primera extracción (maceración):

100.650 g de flores secas y pulverizadas (Qorao, Cusco, 3600 msnm), se maceraron con 1 litro de acetato de etilo por 3 veces, dejándose durante 24 horas por cada extracción. Los extractos obtenidos se juntan, filtran y se evaporaron a sequedad como se indica en el experimento 1°.

3.5.2.2 Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):

El extracto se disolvió con 100 ml etanol y 100 ml de agua. A esta solución se hizo un reparto líquido – líquido con 2 porciones de hexano de 50 mL cada una; desechamos la fase hexánica y se evaporó la fase hidroalcohólica hasta eliminar todo el etanol, quedándonos con la fase acuosa.

3.5.2.3 Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):

Se hizo un reparto de la fase acuosa con 3 porciones de 50 mL de acetato de etilo, desechando la fase polar. Secamos la solución de acetato de etilo con sulfato de magnesio, se filtra y se evaporó a sequedad. Obteniéndose 8.520 g extracto seco (8.46 % respecto del peso de las flores secas). Como la cantidad de extracto es demasiado para hacer la cromatografía flash en columna, se prosiguió a realizar un procedimiento extra: la cromatografía líquida al vacío, el cual nos permitió disminuir el peso del extracto.

3.5.2.4 Cromatografía líquida al vacío

3.5.2.4.1 Impregnado de la muestra en SiGel:

El extracto se disolvió en 20 ml AcOEt, se agregó 4 cucharaditas de SiGel 60 A° y se evaporó a sequedad.

3.5.2.4.2 Preparación de la columna:

Se disolvió SiGel flash con una solución EP: AcOEt (95:5) y luego se cargó en una columna de 5.6 cm de diámetro, llegándose a una altura de empacamiento de 1.5 cm.

Sobre este se cargó la muestra impregnada en SiGel 60 alcanzando una altura de 1.4 cm y se eluyó la columna de acuerdo a la siguiente tabla:

Eluyente	EP (ml)	AcOEt (ml)	% EP	Vol. (ml)
A	142.5	7.5	95	150
B	85	15	85	100
C	105	45	70	150
D	—	100	0	100

Tabla 3. Sistema de elución de la cromatografía líquida al vacío – experimento 2

Se recogieron 4 fracciones (A, B, C y D) correspondientes a las 4 fracciones de elución y se evaporan a sequedad obteniéndose los siguientes pesos.

Fracción	Peso de extracto g	Presencia de partenólido (hptlc)
A	0.3491	-
B	0.4219	Trazas
C	1.4726	+
D	4.0344	+
Total	6.2779	

Tabla 4. Resultados de los extractos obtenidos de VLC – experimento 2

Se descartan las dos primeras fracciones (A y B) después de un monitoreo por HPTLC y se hace el tratamiento por cromatografía en columna flash de las 2 últimas fracciones (C y D) haciendo un peso total de 5.5070 g de extracto. Con este procedimiento se logró disminuir el peso del extracto para el siguiente paso (columna flash).



Figura 14: Equipo de cromatografía líquida al vacío – experimento 2

3.5.2.5 Cromatografía flash en Columna:

3.5.2.5.1 Impregnación del extracto en SiGel:

Las fracciones C y D se disolvieron con porciones de acetato de etilo (30 mL) para luego juntarlas, a este se le añadió 6 cucharadas de SiGel flash (40 - 63 μm de diámetro de partícula) evaporándose a sequedad.

3.5.2.5.2 Preparación de la columna.

Una cantidad de SiGel se mezcló con una solución hexano: acetato de etilo (270:30), esta mezcla se vierte en una columna de 3.5 cm de diámetro, alcanzando una altura de 15 cm. Sobre esto se adiciona el extracto impregnado en SiGel de manera que se mantenga una superficie uniforme y alcanza una altura de 2.8 cm.

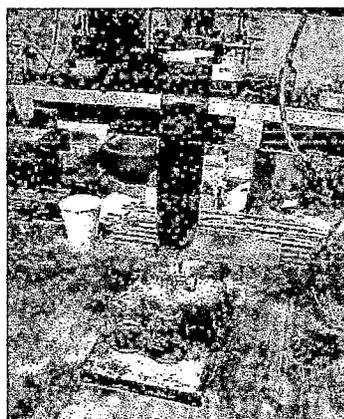


Figura 15: Equipo de cromatografía en columna y colección de fracciones – experimento 2.

La columna se eluyó con el sistema de gradiente éter de petróleo: acetato de etilo según la siguiente tabla:

Eluyente	EP (ml)	AcOEt (ml)	% EP	Vol. (ml)
I	270	30	90	300
II	85.7	14.3	85.7	100
III	83.3	16.7	83.3	100
IV	400	100	80	500
V	100	100	50	200

Tabla 5. Sistema de elución de la cromatografía en columna – experimento 2

Se recogen 44 fracciones de 25 mL cada uno.

3.5.2.6 Cromatografía TLC

Las fracciones colectadas se monitorearon por cromatografía de capa fina (HPTLC).

En un cromatofolio HPTLC se sembraron 2 μ L de cada fracción y un estándar, luego se colocó en una cámara cromatográfica utilizando como eluyente la solución hexano: acetato de etilo (4:1). Después se seca y se revela con ácido sulfúrico: agua (1:9) en presencia de calor para desarrollar el color. Una vez revelada la placa, se identificaron las fracciones que contenían el partenólido, las cuales tienen un aspecto rojizo como se muestra.

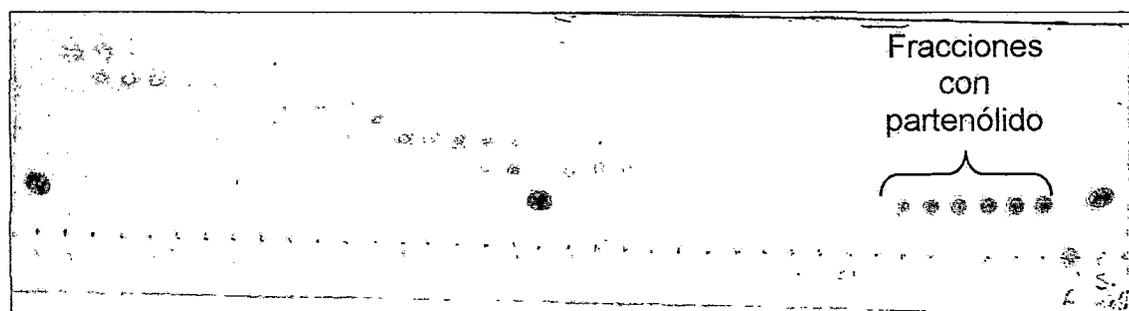




Figura 16. Placas tlc desarrolladas de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna – experimento 2

Las fracciones que tienen el mismo Rf del partenólido estándar fueron de la 32 al 42.

3.5.2.7 Tratamiento de las fracciones:

- Se juntan las fracciones del 32 a la 42 y se evaporan hasta un volumen aproximado de 15 mL. Seguidamente se le agregó 50 mL de EP (60-80 °C) y se volvió a evaporar hasta un volumen de 25 mL. Se dejó por 24 horas, se filtran los cristales y se enjuagan con EP 30-60 obteniéndose una primera cosecha de 132 mg (cristales I). El sobrenadante se concentra hasta un volumen de 20 ml el cual se abandona por 24 horas más, obteniéndose una segunda cosecha de 34.6 mg de cristales de partenólido (cristales II). El nuevo sobrenadante se volvió a concentrar y se dejó por otras 24 horas, obteniéndose un producto oscuro (brea).

3.5.2.8 Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos.

3.5.2.8.1 Análisis por Espectroscopia infra roja IR

El análisis se realizó en pastilla de KBr, siguiendo la misma metodología del experimento 1, luego se procede a la lectura en el espectrómetro IR (Thermoelectronics FTIR).

Obteniéndose los siguientes espectros IR.

Cristales I.

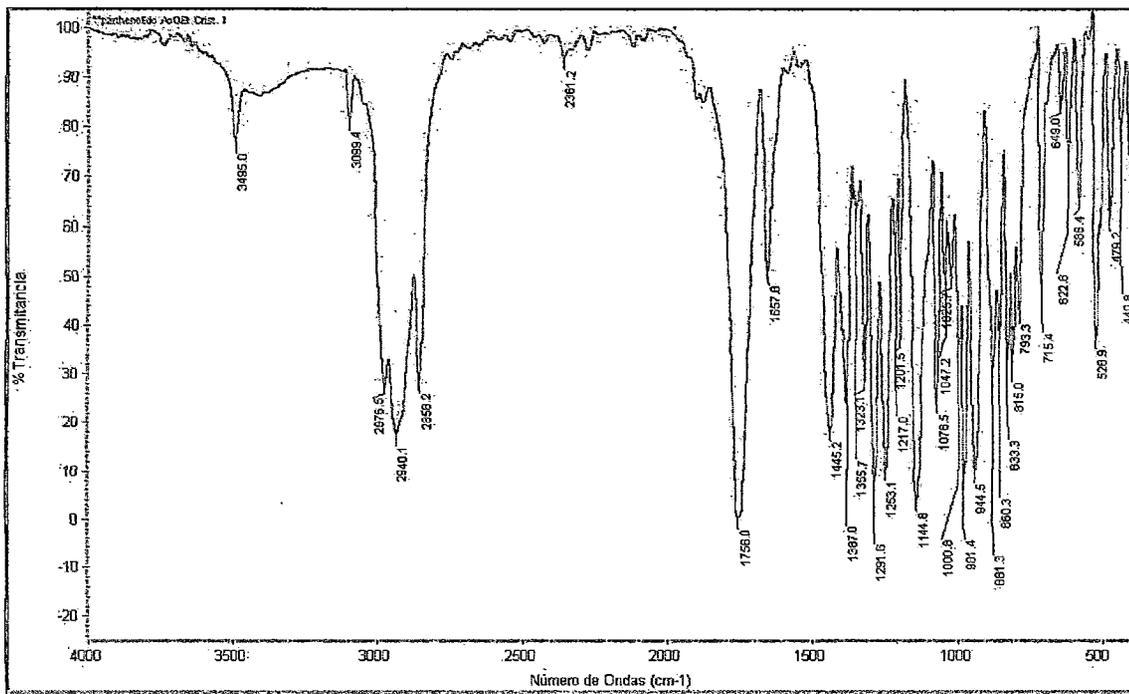


Figura 17. Espectro IR de los cristales I, obtenidos en el experimento 2

Cristales II.

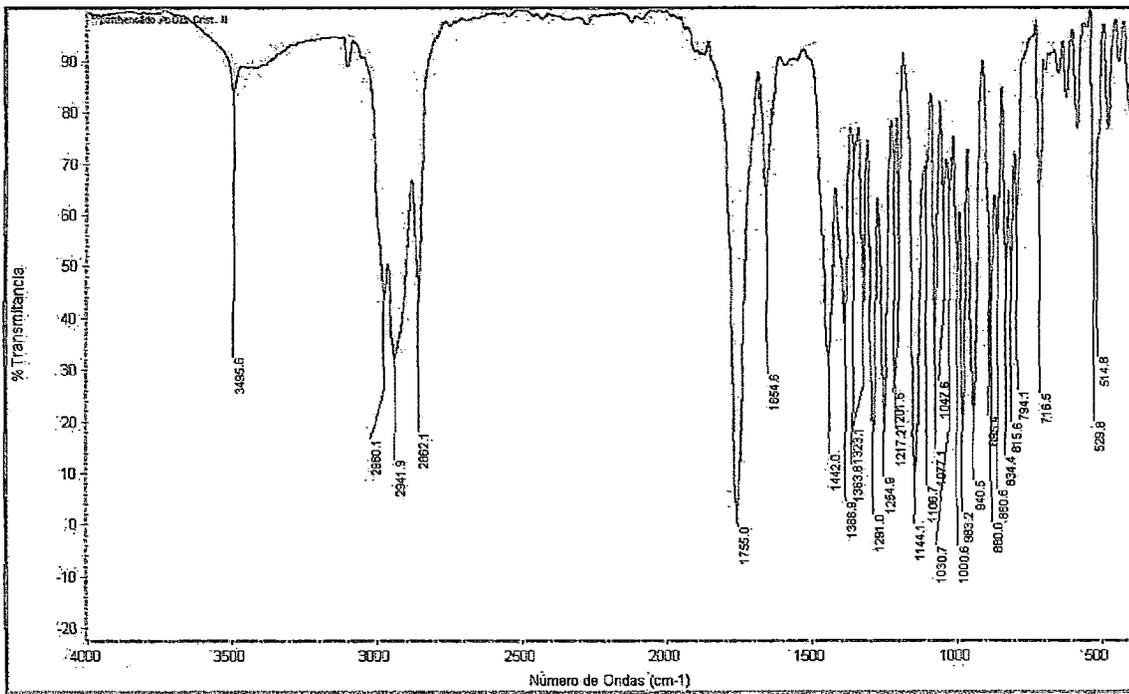


Figura 18: Espectro IR de de los cristales II obtenidos - experimento 2

Cristales I, II del experimento 2 y cristales obtenidos en el experimento 1.

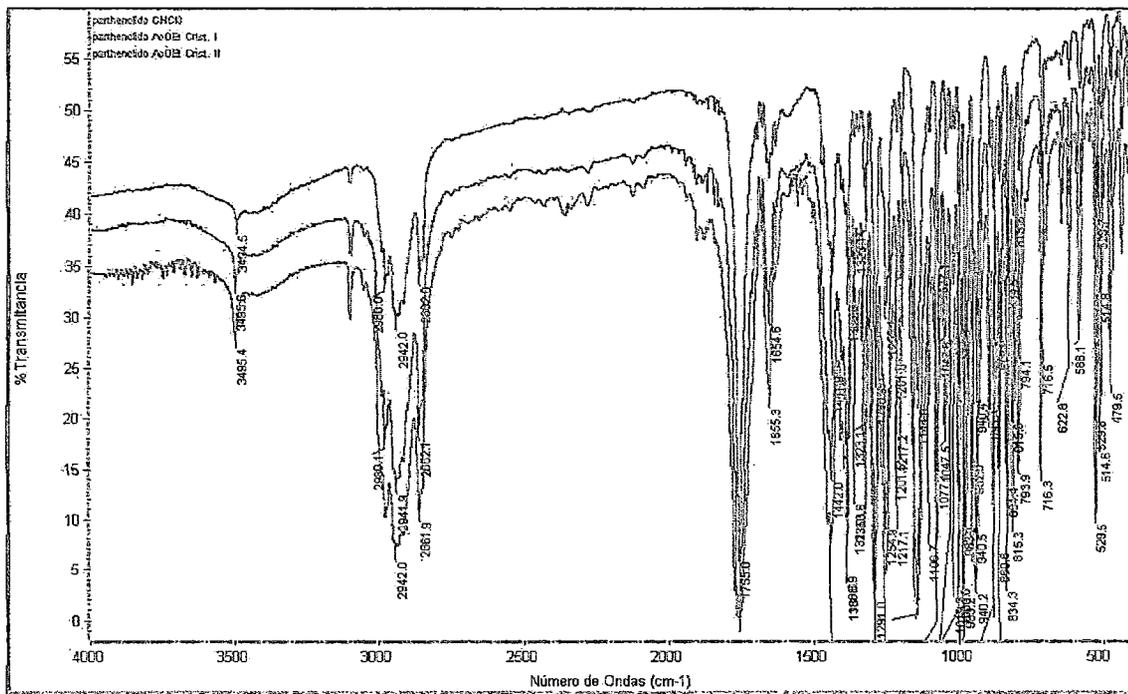


Figura 19: Comparación de los espectros IR obtenidos - experimento 1 y 2

Haciendo una comparación de los 3 espectros podemos decir que los espectros IR de los cristales I y II coinciden con el del partenólido.

3.5.2.8.2 Análisis cromatográfico DAD – HPLC

Los cristales obtenidos se disolvieron en la fase móvil (MeCN:H₂O 9:1) a una concentración de 1 mg/mL, este se analizó en equipo HPLC bajo las siguientes condiciones.

- Equipo: HPLC DAD Agilent 1200
- Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm x 5µm
- Modo de elución: Isocrático (MeCN:H₂O, 45:55 % v/v)
- Detección: 210nm
- Volumen de inyección: 0.5 µL
- Tiempo de análisis: 15 min.
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo: 1.5 mL/minuto
- Fase móvil: MeCN:H₂O (45:55 %)
- Modo de análisis: Isocrático

Obteniéndose los siguientes Cromatogramas:

Cristales I

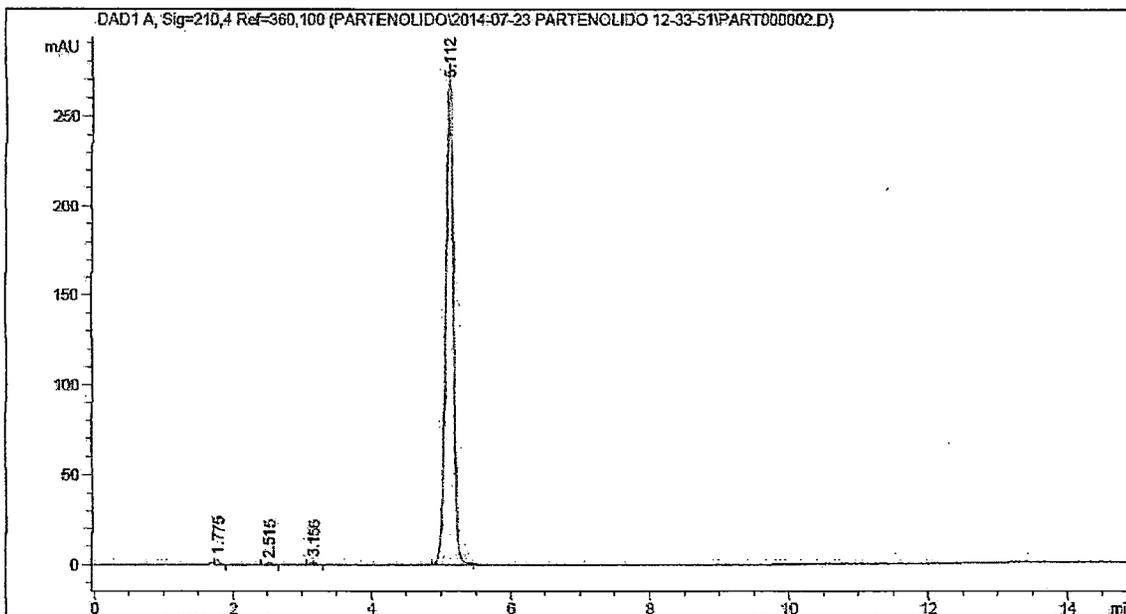


Figura 20: Cromatograma de los cristales I obtenidos – experimento 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.691	VB	0.0522	6.18906	1.88852	0.2408
2	2.507	BB	0.0771	7.00710	1.43145	0.2726
3	3.160	BB	0.0793	22.77612	4.33450	0.8862
4	5.120	BB	0.1157	2534.25952	336.97495	98.6004

Cristales II.-

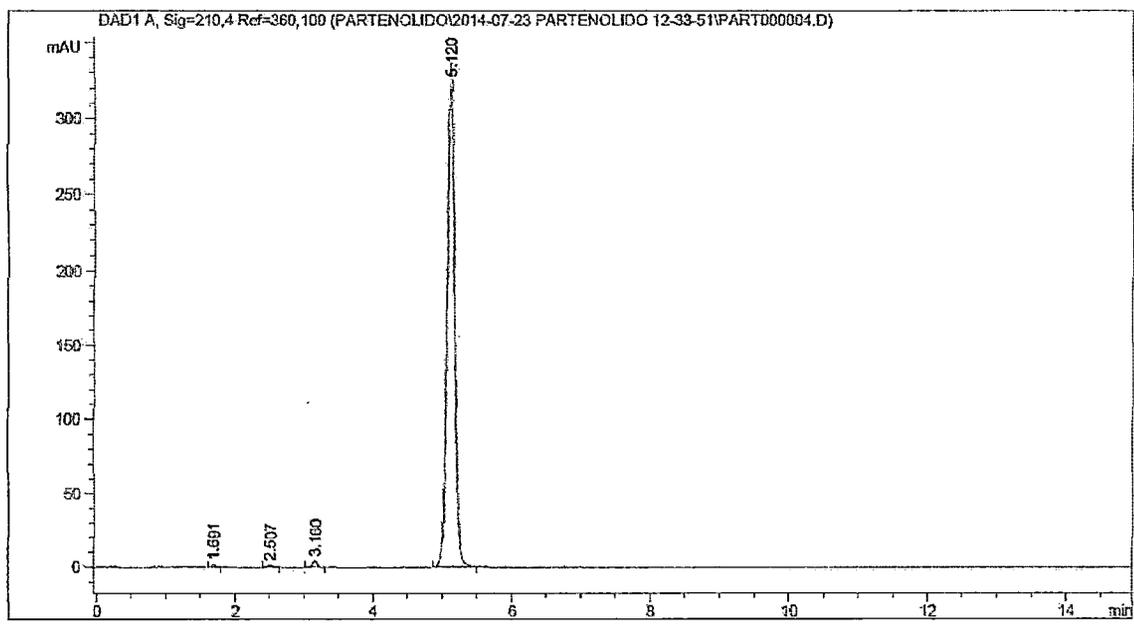


Figura 21: Cromatograma HPLC de los cristales II obtenidos – experimento 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.691	VB	0.0522	6.18906	1.88852	0.2408
2	2.507	BB	0.0771	7.00710	1.43145	0.2726
3	3.160	BB	0.0793	22.77612	4.33450	0.8862
4	5.120	BB	0.1157	2534.25952	336.97495	98.6004

De acuerdo a la bibliografía el tiempo de retención característico del partenólido es aproximadamente 5 min lo que se corrobora con el siguiente cromatograma. Como resultado del análisis HPLC, los cristales de partenólido obtenidos tienen una pureza de 98.8261 (cristales I) y 98.6004 %(cristales II).

3.5.3 Experimento 3°.- CUANTIFICACIÓN DEL PARTENÓLIDO POR ANÁLISIS HPLC DE LAS FLORES DE QORAO

3.5.3.1 Preparación del estándar:

Se preparó una solución patrón de 1 mg/ml del estándar de partenólido al 100 % de pureza (CHCl_3) en acetonitrilo (MeCN). Para realizar la curva patrón se inyecta al equipo HPLC los siguientes volúmenes:

- 0.1 μL
- 0.5 μL
- 1.0 μL

3.5.3.2 Preparación de la muestra:

Se pesaron 1.2686 g de muestra seca y pulverizada recolectadas del distrito de Qorao - Cusco, el cual se soniqueó con 10 ml de MeCN:H₂O (9:1) durante 5 minutos por 3 veces, se filtró y se aforó a 50 ml con MeCN:H₂O (9:1). En adelante se mencionará como flores.

3.5.3.3 Análisis cromatográfico

Se realizó una curva patrón de 3 puntos con los volúmenes de inyección que se especifican en "3.1" y se trabajó bajo las siguientes Condiciones HPLC.

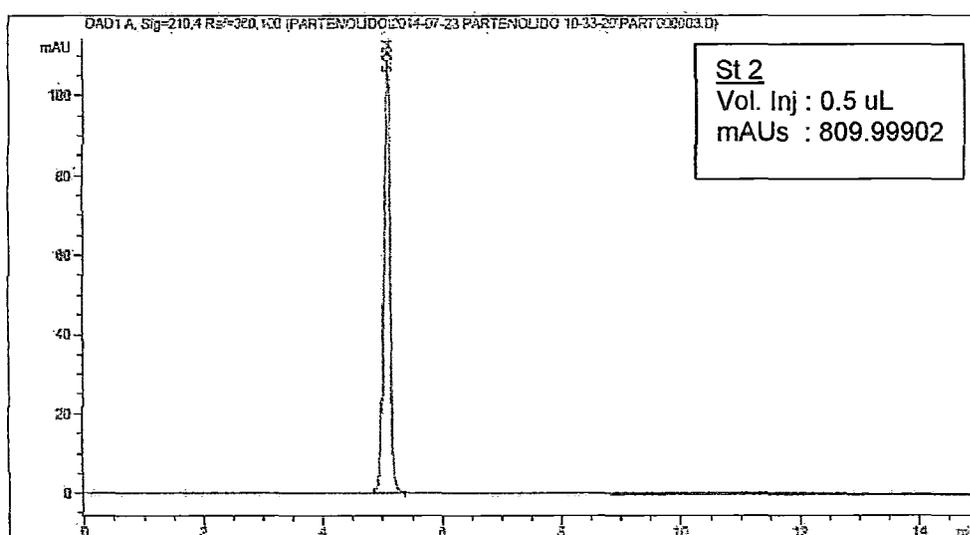
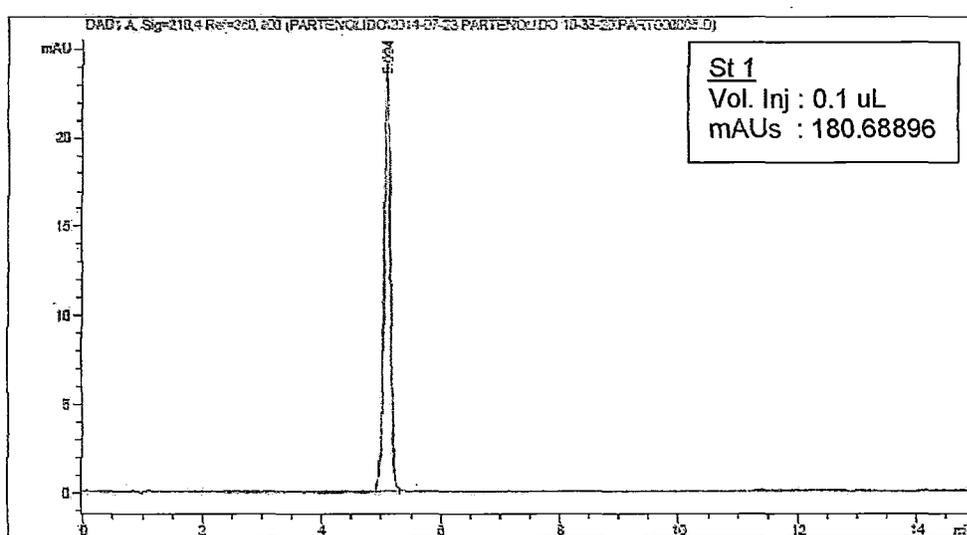
- Equipo: HPLC DAD Agilent 1200
- Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm x 5 μm
- Modo de elución: Isocrático (MeCN:H₂O, 45:55 % v/v)
- Detección: 210nm
- Volumen de inyección: Variable
- Tiempo de análisis: 15 min.
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo: 1.5 mL/minuto
- Fase móvil: MeCN:H₂O (45:55 %)
- Modo de análisis: Isocrático

Se realizaron 4 lecturas de HPLC las cuales se especifican a continuación:

Muestra	Descripción	Vol. de inyección
M1	Estándar 1	0.1 μ L
M2	Estándar 2	0.5 μ L
M3	Estándar 3	1.0 μ L
M4	Flores (Santa María)	1.0 μ L

Tabla 6. Descripción de las muestras ensayadas para el análisis HPLC

Aquí se muestran los respectivos cromatogramas.



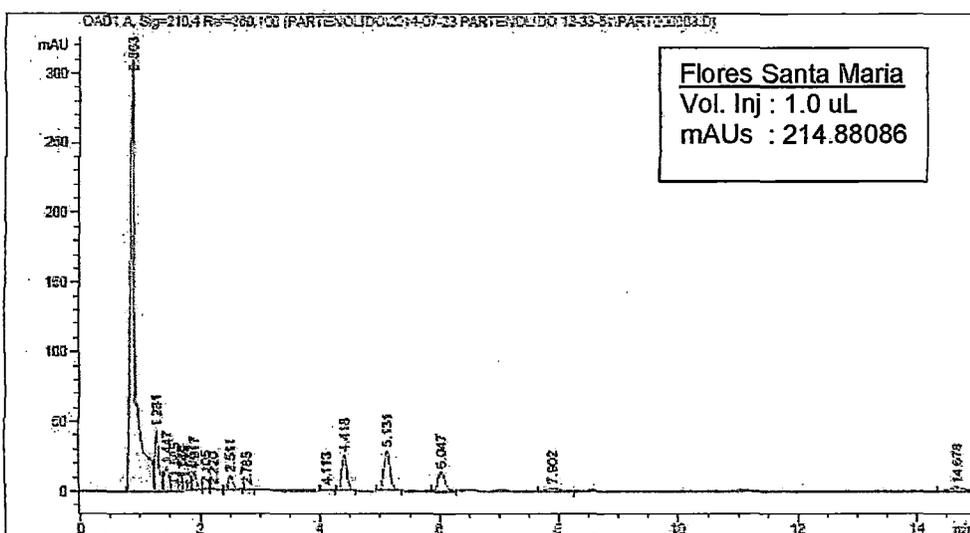
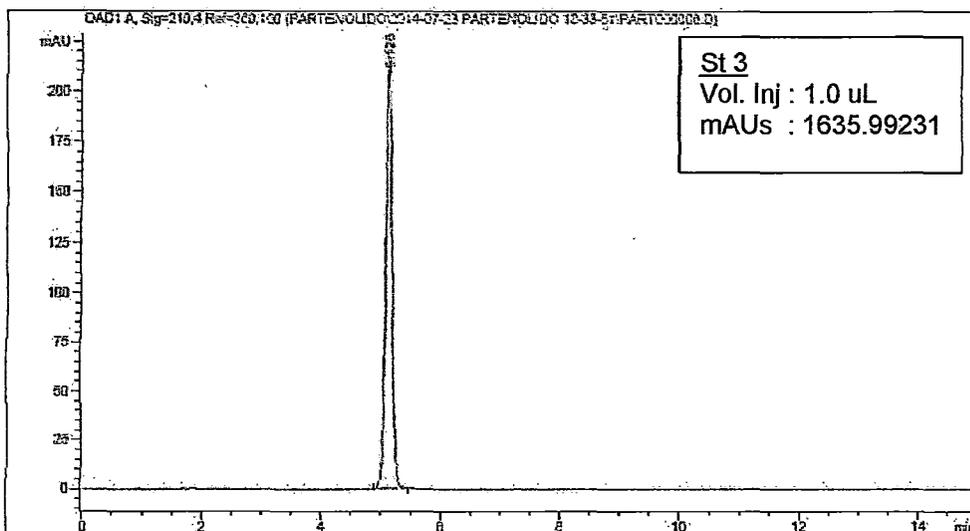


Figura 22: Cromatogramas HPLC de las muestras ensayadas, estándar 1, estándar 2, estándar 3 y flores de Santa María respectivamente

3.5.4 Experimento 4°.- EXTRACCIÓN CON CLOROFORMO(1C2C)

3.5.4.1 Primera extracción (maceración):

52.390 g de flores secas y pulverizadas (Qorao, Cusco, 3600 msnm) los cuales se maceró con 500 ml de cloroformo por tres veces, dejándolos durante 24 horas cada vez, Los extractos obtenidos se filtran, se juntan y se evaporan a sequedad como se indica en el experimento 1.

3.5.4.2 Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):

El extracto se disolvió con 100 ml etanol y 100 ml de agua con la ayuda de un sonicador. A esta solución se hizo un reparto líquido – líquido con 2 porciones de hexano de 40 mL cada una; se desechó la fase hexánica y evaporamos la fase hidroalcohólico hasta eliminar todo el etanol, quedando así el extracto en fase acuosa.

3.5.4.3 Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):

A la fase acuosa se hace una partición con 5 porciones de 30 mL de cloroformo desechando la fase polar. Secamos la solución clorofórmica con sulfato de magnesio, se filtra y se evapora a sequedad. Obteniéndose 785.7 mg de extracto seco (1.50 % respecto de las flores secas).

3.5.4.4 Cromatografía flash en Columna:

3.5.4.4.1 Impregnación del extracto en SiGel.

El extracto anterior se disolvió con 10 mL de acetato de etilo, y se le añade 3 cucharaditas de SiGel flash (40 - 63 µm de diámetro de partícula) evaporándose a sequedad.

3.5.4.4.2 Preparación de la columna.

La columna se preparó bajo las siguientes características: 1.5 x 15 cm y sobre esto se adicionó el extracto impregnado en SiGel alcanzando una altura de 2.0 cm.

La columna se eluyó con el sistema de gradiente éter de petróleo: acetato de etilo según la siguiente tabla:

Líquido	EP (ml)	AcOEt (ml)	% EP	Volumen (ml)
I	90	10	90	100
II	28.6	4.8	85.6	33.4
III	27.8	5.6	83.2	33.4
IV	153.3	33.3	82	186.6
V	33.3	33,3	50	200

Tabla 7: Sistema de elución de la cromatografía en columna – experimento 4

Se recogieron 32 fracciones de 9 mL.

3.5.4.5 Cromatografía TLC

Las fracciones colectadas se monitorearon por cromatografía de capa fina (HPTLC), sembrando 2 μ L de cada fracción en un cromatofolio HPTLC, luego se colocó en una cámara cromatográfica utilizando como eluyente una solución hexano: acetato de etilo (4:1). Después se seca y se revela con ácido sulfúrico: agua (1:9) en presencia de calor para desarrollar el color, el partenólido se identificó en las fracciones 11, 12 y 13 como se muestra en la imagen:

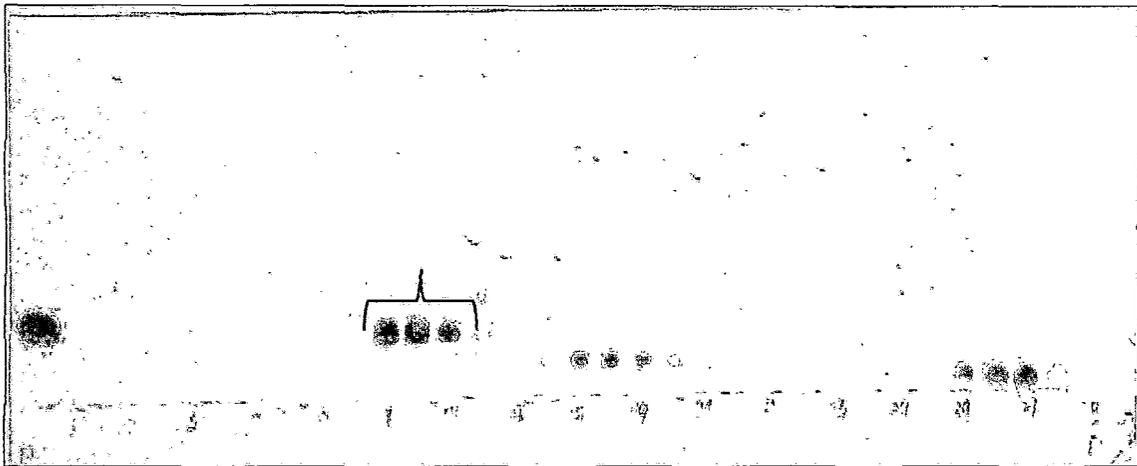


Figura 23: Cromatofolios desarrollados de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna – experimento 4

3.5.4.6 Tratamiento de las fracciones:

Juntas las fracciones 11, 12 y 13 y se evaporaron hasta un volumen aproximado de 15 mL. Se insistió la evaporación añadiendo 20 ml de EP (60-80 °C) luego se rotaevaporó a una presión de 474 mBar hasta un volumen aproximado de 15 mL. Pasada las 24 horas se cosechan los primeros cristales, se filtró, se enjuaga con EP (30-40°C) y se seca, obteniéndose un peso de 69.4 mg de partenólido.

⚡ Experimento accesorio:

Se realizaron análisis de capa fina del partenólido con los siguientes eluyentes con el fin de identificar cuál de las dos soluciones (eluyentes) presenta un buen Rf:

EP:AcOEt	Rf partenólido
4:2	0.425
3:2	0.525

Tabla 8. Valores de Rfs de partenólido determinados bajo dos sistemas de fase móvil

Donde se concluye que la mejor fase móvil es EP: AcOEt en la proporción 3:2, por tener el mejor Rf, el cual se utilizara para experimentos posteriores.

3.5.4.7 Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos.

3.5.4.7.1 Análisis por Espectroscopia infra roja IR

El análisis se realizó en pastilla de KBr, el cual se realizó según la metodología descrita en el experimento 1 y se procedió la lectura en un espectrómetro IR (Thermoelectronics FTIR).

Espectro IR del partenólido obtenido.

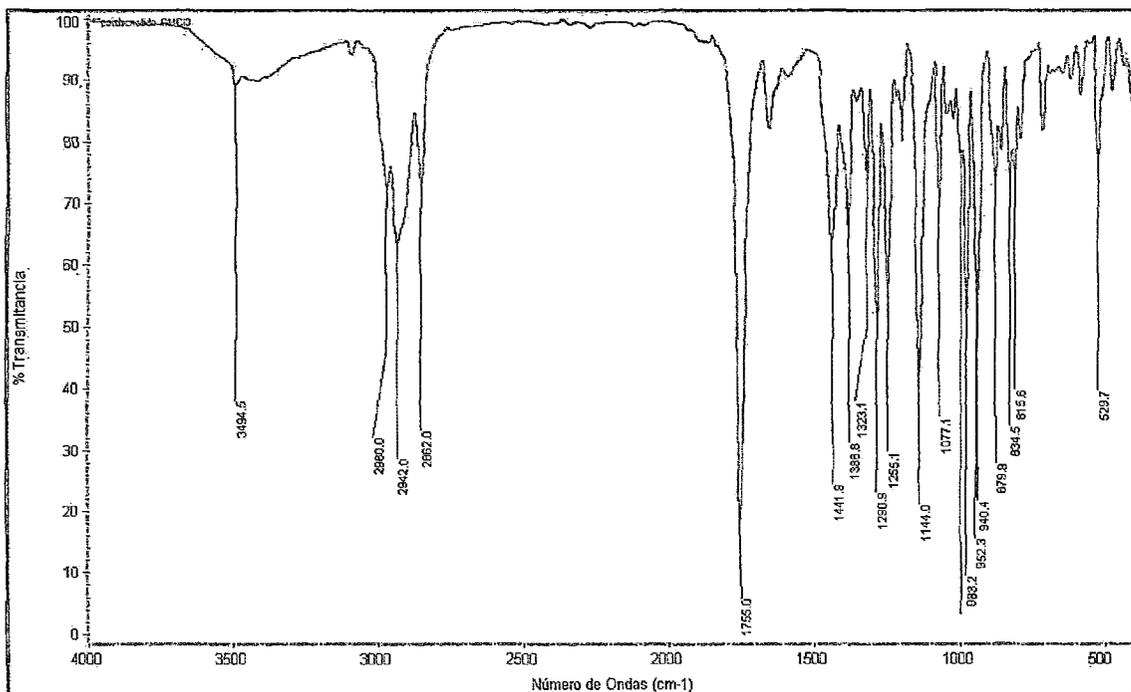


Figura 24: Espectro IR de los cristales obtenidos –experimento 4

3.5.4.7.2 Análisis cromatográfico DAD – HPLC

Los cristales se disolvieron en la fase móvil (MeCN: H₂O 9:1) a una concentración de 1 mg/mL, este se analizó en equipo HPLC bajo las siguientes condiciones.

- Equipo: HPLC DAD Agilent 1200
- Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm x 5µm
- Modo de elución: Isocrático (MeCN:H₂O, 45:55 % v/v)
- Detección: 210nm
- Volumen de inyección: 0.5 µL
- Tiempo de análisis: 15 min.
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo: 1.5 mL/minuto
- Fase móvil: MeCN:H₂O (45:55 %)
- Modo de análisis: Isocrático
- Flujo: 1.5mL/minuto

Obteniéndose el siguiente cromatograma

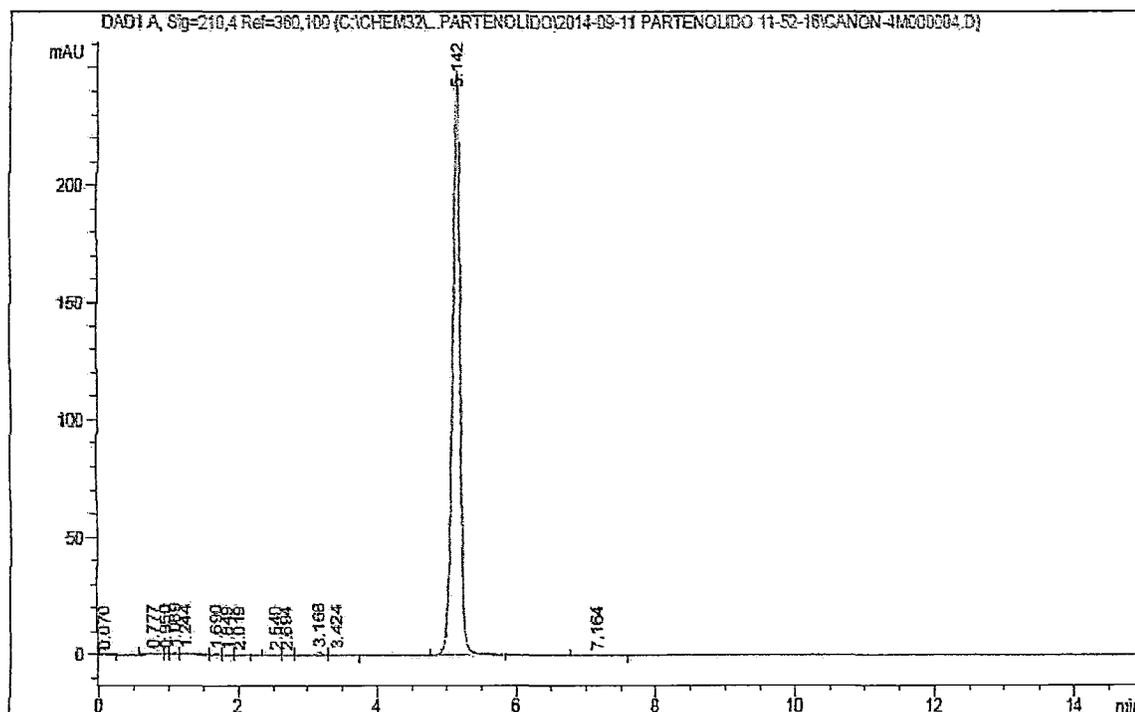
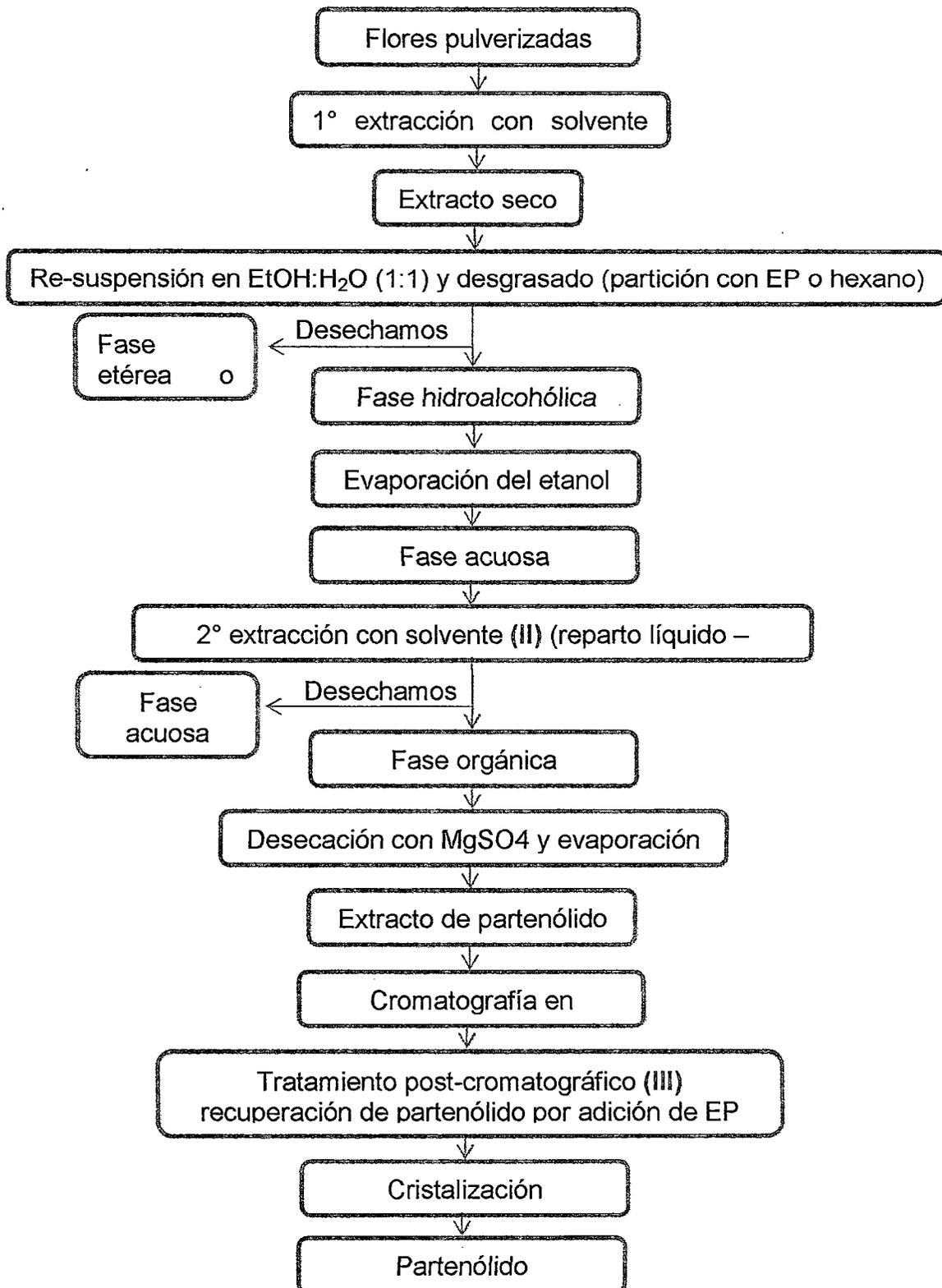


Figura 25: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos – experimento 4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.070	BB	0.1221	8.45258e-1	1.00560e-1	0.0434
2	0.777	BV	0.1492	5.19546	4.69045e-1	0.2671
3	0.950	VV	0.0540	9.53050e-1	2.52578e-1	0.0490
4	1.089	VV	0.0633	4.45260	1.01181	0.2289
5	1.244	VV	0.1585	4.88539	4.17706e-1	0.2511
6	1.690	VV	0.0548	2.43145	6.95360e-1	0.1250
7	1.849	VV	0.0853	7.09988e-1	1.30848e-1	0.0365
8	2.019	VV	0.0905	1.08359	1.69580e-1	0.0557
9	2.540	VV	0.0856	6.96223e-1	1.16725e-1	0.0358
10	2.694	VV	0.0856	1.04048	1.74362e-1	0.0535
11	3.168	VV	0.0902	7.58037	1.22480	0.3896
12	3.424	VB	0.1066	1.84951	2.49040e-1	0.0951
13	5.142	BB	0.1177	1911.18726	248.59988	98.2389
14	7.164	BB	0.2497	2.53801	1.25643e-1	0.1305

Al igual que en experimentos anteriores el tiempo de retención característico del partenólido es aproximadamente 5 min, Como resultado del análisis HPLC, los cristales de partenólido obtenidos en este experimento tienen una pureza 98.2389 %.

3.5.5 Experimento 5°.- EXTRACCIÓN COMPARATIVA CON ACETATO DE ETILO – CLOROFORMO (OPTIMIZACION DEL DIAGRAMA DE FLUJO DEL PARTHENOLIDO)



3.5.5.1 Extracción con acetato de etilo (1A2A*)

- Se pesaron 1.0000 g de muestra seca y triturada
- Se soniqueó por 3 veces con 10 ml de acetato de etilo cada vez para una mayor extracción y se rotaevaporó a sequedad obteniéndose **108.8 mg de extracto crudo (primera extracción)**.
- El extracto anterior se disolvió en 5 ml de etanol, luego se le adicionó 5 ml de agua.
- A esta mezcla se le añadió 4 ml de EP (60 - 80 °C) por 2 veces, se desechó la fase etérea, y evaporó el etanol de la fase hidroalcohólica.
- A la fase acuosa se le hizo un reparto líquido - líquido con 5 ml de acetato de etilo (desechamos la fase acuosa), se le agregó sulfato de magnesio para secar la solución y se rotaevapora a sequedad obteniéndose un **extracto de 39.9 mg (segunda extracción)**.

3.5.5.2 Extracción con cloroformo (1C2C*).

- Se pesaron 1.0001 g de muestra seca y triturada
- Se soniqueó por 3 veces con 10 ml de cloroformo cada vez para una mayor extracción y se rotaevaporó a sequedad obteniéndose **82.9 mg de extracto crudo (Primera extracción)**.
- El extracto anterior se disolvió en 5 ml de etanol, luego se le adicionó 5 ml de agua.
- A esta mezcla se le añadió 4 ml de EP (60 - 80 °C) por 2 veces, desechemos la fase etérea y evaporamos el etanol de la fase hidroalcohólica.
- A la fase acuosa se le hizo un reparto líquido - líquido con 5 ml de cloroformo (desechamos la fase acuosa), se le agregó sulfato de magnesio para extraer el agua restante y se rotaevapora sequedad, obteniéndose un **extracto de 20.9 mg (Segunda extracción)**.

3.5.5.3 Extracción con cloroformo - acetato de etilo (1C2A*)

- Se pesaron 1.0007 g de muestra seca y triturada
- Se soniqueó por 3 veces con 10 ml de cloroformo y se rotaevaporó a sequedad obteniendo **75.7 mg de extracto crudo (Primera extracción)**.
- El extracto anterior se disolvió en 5 ml de etanol, luego se le adicionó 5 ml de agua.

- A esta mezcla se le añadió 4 ml de EP (60 - 80 °C) por 2 veces, desechamos la fase etérea, evaporamos el etanol de la fase hidroalcohólica.
- A la fase acuosa se le hizo un reparto líquido - líquido con 5 ml de acetato de etilo (desechamos la fase acuosa), se le agregó sulfato de magnesio para extraer el agua restante y se rotaevaporó a sequedad, obteniéndose un **extracto de 37.3 mg (Segundo extracto)**.

3.5.5.4 Extracción con acetato de etilo – cloroformo (1A2C*)

- Se pesaron 1.0000 g de muestra seca y triturada
- Se soniqueó por 3 veces con 10 ml de acetato de etilo y se rotaevaporó a sequedad obteniendo **95 mg de extracto crudo (Primera extracción)**
- El extracto anterior se disolvió en 5 ml de etanol, luego se le adiciona 5 ml de agua.
- A esta mezcla se le añadió 4 ml de EP (60 - 80 °C) por 2 veces, desechamos la fase etérea y evaporamos el etanol de la fase hidroalcohólica.
- A la fase acuosa se le hizo un reparto líquido - líquido con 5 ml de cloroformo (desechamos la fase acuosa), se le agregó sulfato de magnesio para extraer el agua restante y se rotaevaporó a sequedad, obteniéndose un **extracto de 13.6 mg (Segundo extracto)**.

Tabla resumen de extracción comparativa.

Características	Sistemas de solventes de extracción			
	A*	C*	1C2A*	1A2C*
W muestra (g)	1.0000	1.0001	1.0007	1.0000
W primera extracción (mg)	108.80	82.90	75.70	95.00
Porcentaje de la 1° extr. %	10.88	8.29	7.56	9.50
W segunda extracción (mg)	39.90	20.90	37.30	13.60
Porcentaje de la 2° extr. %	3.99	2.09	3.73	1.36
mg de partenólido	8.33	4.00	7.88	3.24

Tabla 9. Resultados de los porcentajes de extracción de partenólido de los cuatro sistemas de extracción.

(*) Hace referencia a una doble extracción siguiendo una adaptación del procedimiento de Zhou et al.

3.5.5.5 Extracción rápida de flores (mercado de San Pedro).

Pesar 126.7 mg de flores sonicar por 5 min con 10 ml de MeCN: H₂O (9:1), por 3 veces, luego se filtra y se aforó a 50 ml.

3.5.5.5.1 Análisis cromatográfico DAD – HPLC

Los extractos obtenidos en el procedimiento anterior se disuelven en la fase móvil (MeCN: H₂O 9:1) y se aforan a 10 ml, estos se analiza en equipo HPLC bajo las siguientes condiciones.

- Equipo: HPLC DAD Agilent 1200
- Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm x 5µm
- Modo de elución: Isocrático (MeCN:H₂O, 45:55 % v/v)
- Detección: 210nm
- Volumen de inyección: Variable
- Tiempo de análisis: 15 min.
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo: 1.5 mL/minuto
- Fase móvil: MeCN:H₂O (45:55 %)
- Modo de análisis: Isocrático

Resultados HPLC

- a) Acetato de etilo

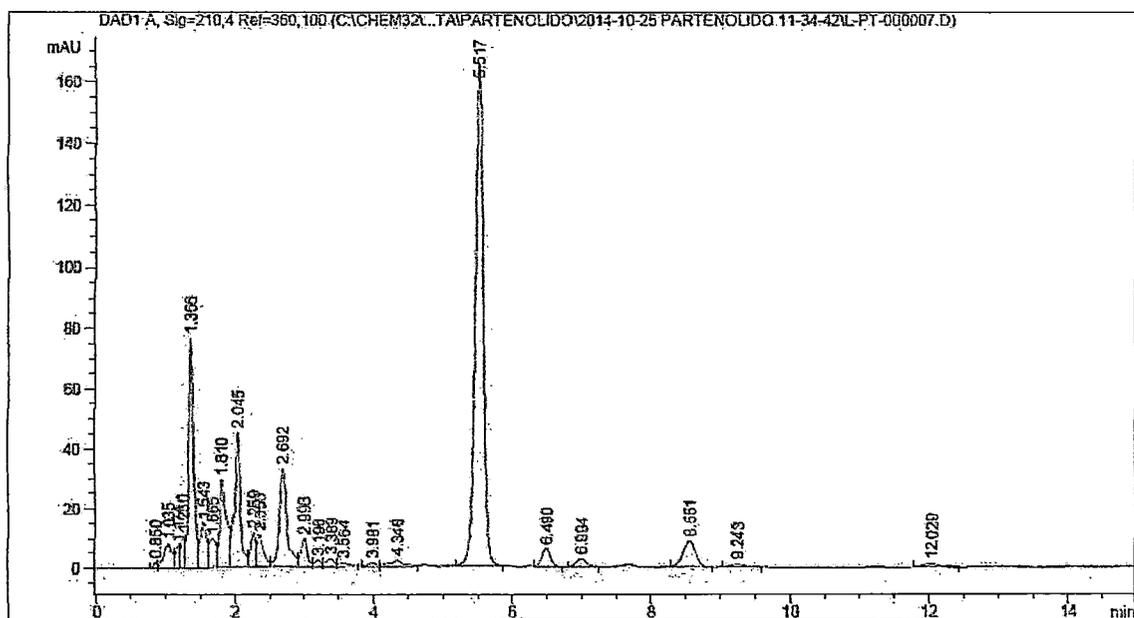


Figura 26: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos del sistema de solvente A*

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.850	BV	0.0531	6.55343	1.86176	0.1992
2	1.035	VV	0.1118	68.31593	7.98398	2.0766
3	1.174	VV	0.0552	26.89835	7.26710	0.8176
4	1.250	VV	0.0587	41.95948	10.49315	1.2754
5	1.366	VV	0.0697	366.85950	76.78637	11.1515
6	1.543	VV	0.1025	101.25427	15.04456	3.0778
7	1.665	VV	0.0898	66.73101	9.75200	2.0284
8	1.810	VV	0.0937	201.97337	29.57870	6.1394
9	2.045	VV	0.0828	268.19537	45.39795	8.1524
10	2.259	VV	0.0738	58.33558	11.77152	1.7732
11	2.350	VV	0.0911	72.68613	10.99722	2.2095
12	2.692	VV	0.1205	261.78409	33.02611	7.9575
13	2.996	VV	0.0923	60.01187	9.68913	1.8242
14	3.196	VV	0.0951	15.49157	2.34531	0.4709
15	3.389	VV	0.1273	24.84232	2.70222	0.7551
16	3.564	VB	0.1558	17.20579	1.47769	0.5230
17	3.981	BV	0.1301	12.36894	1.36025	0.3760
18	4.346	VV	0.2121	32.12900	1.99311	0.9766
19	5.517	BB	0.1239	1360.32959	165.46822	41.3501
20	6.490	BB	0.1363	52.18784	5.83760	1.5864
21	6.994	BB	0.1553	27.08116	2.69459	0.8232
22	8.551	BB	0.1930	111.95155	8.88232	3.4030
23	9.243	BB	0.2272	15.26739	1.01646	0.4641
24	12.029	BB	0.2454	19.36940	1.20557	0.5888

b) Cloroformo

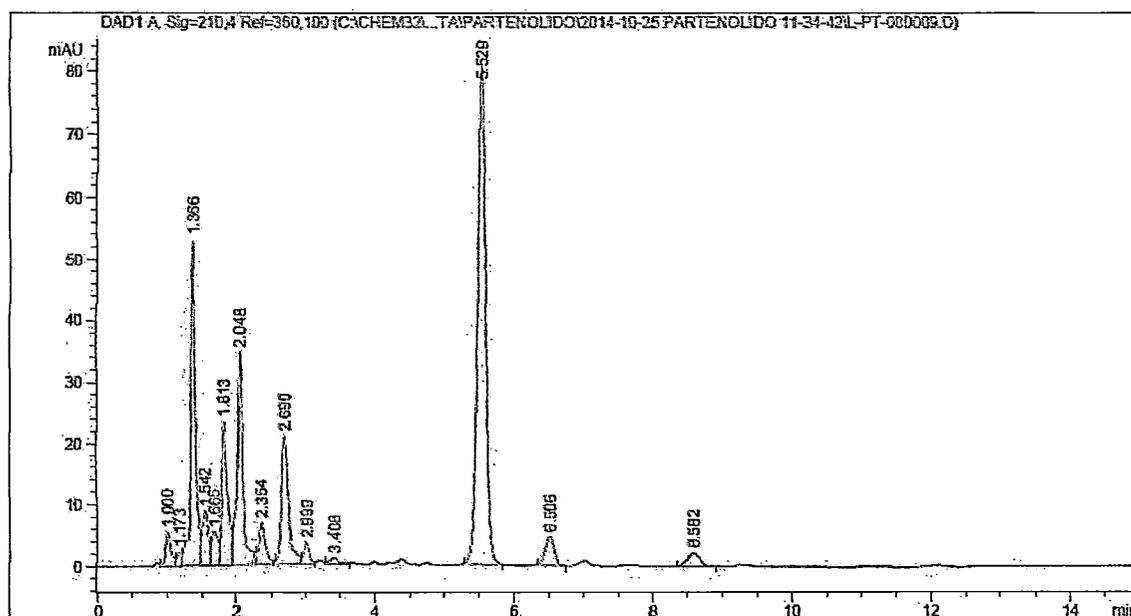


Figura 27: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos del sistema de solvente C*

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.000	VV	0.0820	31.18451	5.51503	1.8738
2	1.173	VV	0.0555	9.29766	2.38309	0.5587
3	1.366	VV	0.0683	247.13550	53.14555	14.8502
4	1.542	VV	0.0916	53.13592	8.91212	3.1929
5	1.665	VV	0.0917	36.71626	5.51365	2.2062
6	1.813	VV	0.0796	132.18147	23.49403	7.9427
7	2.048	VB	0.0786	192.92427	34.81590	11.5926
8	2.354	BB	0.0953	46.83200	6.88728	2.8141
9	2.690	BV	0.1129	152.33514	20.93108	9.1537
10	2.999	VV	0.0904	21.12682	3.50238	1.2695
11	3.408	VB	0.1331	10.38038	1.07124	0.6237
12	5.529	BB	0.1256	660.56079	80.59453	39.6925
13	6.506	BB	0.1380	42.86425	4.71617	2.5757
14	8.582	BB	0.1928	27.52022	2.21754	1.6537

c) Cloroformo / acetato de etilo

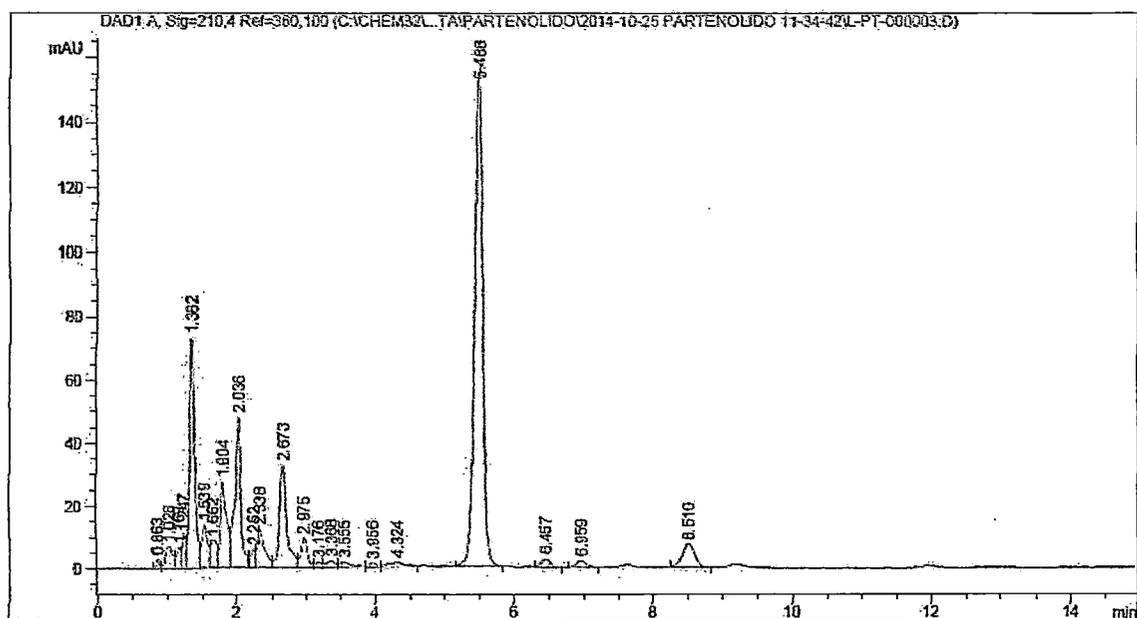


Figura 28: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos del sistema de solvente 1C2A*

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.863	BV	0.0526	9.44109	2.85509	0.3108
2	1.028	VV	0.1133	53.54075	6.99866	1.7627
3	1.169	VV	0.0556	24.48574	6.55471	0.8061
4	1.247	VV	0.0577	41.29101	10.54316	1.3594
5	1.362	VV	0.0697	349.39124	73.14179	11.5028
6	1.539	VV	0.0803	80.16125	13.68524	2.6391
7	1.662	VV	0.0951	64.03474	8.98883	2.1082
8	1.804	VV	0.0897	182.23816	27.36055	5.9997
9	2.036	VV	0.0824	280.79852	47.92039	9.2445
10	2.252	VV	0.0694	29.15556	6.13838	0.9559
11	2.338	VV	0.1043	93.47002	12.35231	3.0772
12	2.673	VV	0.1164	252.85237	32.62405	8.3245
13	2.975	VV	0.0902	58.54363	9.46221	1.9274
14	3.176	VV	0.0963	11.58136	1.72461	0.3813
15	3.368	VV	0.1323	20.28977	2.10757	0.6680
16	3.555	VB	0.1734	21.47653	1.65535	0.7071
17	3.956	BV	0.1194	11.50329	1.40687	0.3787
18	4.324	VV	0.2237	27.31921	1.59629	0.8994
19	5.488	BB	0.1255	1287.28516	157.19484	42.3804
20	6.457	BB	0.1349	23.24666	2.63549	0.7653
21	6.959	BB	0.1563	22.09315	2.14261	0.7274
22	8.510	BB	0.1950	93.25603	7.40291	3.0702

d) Acetato de etilo/ cloroformo

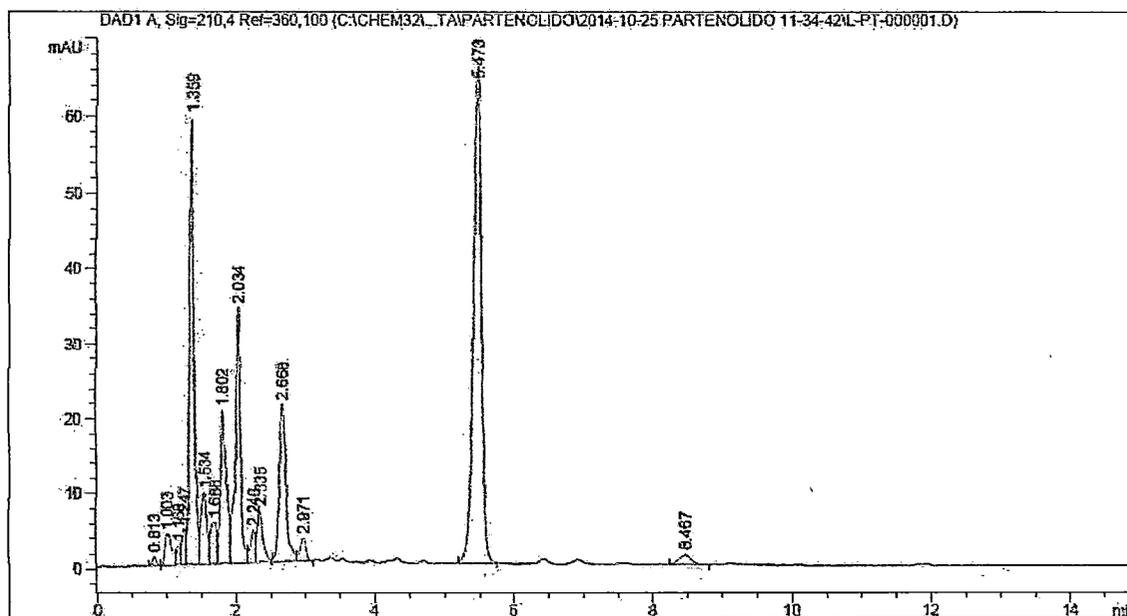


Figura 29: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos del sistema de solvente 1A2C*

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.813	BV	0.0662	5.08325	1.18151	0.3420
2	1.003	VV	0.1005	30.32208	4.09011	2.0399
3	1.168	VV	0.0520	8.74077	2.54630	0.5880
4	1.247	VV	0.0604	18.93357	4.75749	1.2737
5	1.359	VV	0.0641	254.85031	59.29463	17.1445
6	1.534	VV	0.0909	55.64371	9.41544	3.7433
7	1.688	VV	0.0929	38.15884	5.50328	2.5671
8	1.802	VV	0.0835	124.74054	20.36653	8.3917
9	2.034	VV	0.0738	174.66626	34.09204	11.7503
10	2.246	VV	0.0691	20.12098	4.26008	1.3536
11	2.335	VB	0.0860	41.39341	6.89523	2.7847
12	2.668	BV	0.1088	145.36697	20.98272	9.7793
13	2.971	VV	0.0834	16.49468	3.03686	1.1096
14	5.473	BB	0.1249	536.27606	65.95846	36.0769
15	8.467	BB	0.1917	15.69090	1.30998	1.0556

Como resultado preliminar del estudio comparativo del experimento 5, se puede ver que los sistemas de solvente 1A2A* y 1C2A* tienen el mayor porcentaje de recuperación de partenólido, por ese motivo es que se vuelve a ensayar dichos sistemas a mayor escala.

3.5.6 Experimento 6°: EXTRACCIÓN 1C2A (CLOROFORMO/ ACETATO DE ETILO)

3.5.6.1 Primera extracción (maceración):

14.680 g de flores secas y pulverizadas (Jardines del cusco, Huayruopata), el cual se extrajo con 150 mL de Cloroformo por 4 veces, dejándolos durante 24 horas por cada extracción. Los extractos obtenidos se filtran, juntan y se evaporan a sequedad como se indica en el experimento 1. Obteniéndose un peso de 1.5064 g (al cual le corresponde un 10.262 % de extracción).

3.5.6.2 Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):

El extracto se disuelve con 75 ml etanol y 75 ml de agua. A esta solución se hace un reparto líquido – líquido con 2 porciones de hexano de 60 mL cada una; deseamos la fase hexánica y se evapora la fase hidroalcohólica hasta eliminar todo el etanol, quedándonos con la fase acuosa.

3.5.6.3 Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):

Se hizo una partición de la fase acuosa con 45 mL de acetato de etilo, seguido de 15 ml de acetato de etilo por 3 veces desechando la fase acuosa. Secamos la solución de acetato de etilo con sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó a sequedad. Obteniéndose 0.8468 g de extracto seco (5.768 % respecto del peso de las flores secas).

3.5.6.4 Cromatografía flash en Columna (equipo automático):

En este experimento se utiliza un Sistema Cromatográfico Acelerado que tiene las siguientes características:

- Equipo: Isolera I Biotage
- Bomba: 10 mB
- DAD: 200 – 800 mm

3.5.6.4.1 Impregnación del extracto en SiGel:

Los 0.8468 g de extracto seco se disolvieron con porciones de acetato de etilo (30 mL), se le añadió SiGel flash (40 - 63 μm de diámetro de partícula) evaporándose a sequedad. Y seguidamente se carga la muestra en el cartucho Snap Ultra SiGel 25g (V=45 ml).

3.5.6.4.2 Corrida de la muestra:

La muestra se analiza bajo las siguientes condiciones:

- Volumen de columna: 45 mL
- Set up: 90 ml (10 % AcOEt)
- Se programa gradiente con el Wizard

Gasto	615 ml hexano
	341 ml AcOEt
	<hr/>
	956 ml en total

- ✚ Se realiza un análisis tlc de los Rf's del partenólido frente a los eluyentes EP: Acetato etilo en las siguientes proporciones 3:1(33.3 % AcOEt) y 3:2 (40.0 % AcOEt). El cual nos servirá como dato para la alimentar al sistema del equipo de cromatografía flash automático.

Tlc data

	33.3 % AcOEt	40 % AcOEt
Partenólido	0.5625	0.6625
Impureza 1	0.6750	0.8000
Impureza 2	0.4500	0.5500

Tabla 10. Datos de Rf de la fracción que contiene partenólido y los Rf's de las impurezas que se presentan por encima y debajo – experimento 6

A continuación se muestran los reportes del equipo automático.

User System Owner
Sample Name 2015-Nov-07 08.42
Date 2015-Nov-07 08.48
Method Jossie
Project
Comment
Cartridge SNAP KP-SII 25g **Detection Mode** UV1
Flowrate 75 ml/min **Baseline Correction** On
Solvent A n-Hexane **UV1 (Collection)** 210 nm
Solvent B Ethyl acetate **UV2 (Monitor)** 284 nm
Collect All On
Start Threshold 5 mAU
Rack Type 15x150 mm
Max Fraction Volume 15 ml
Dispense Order S

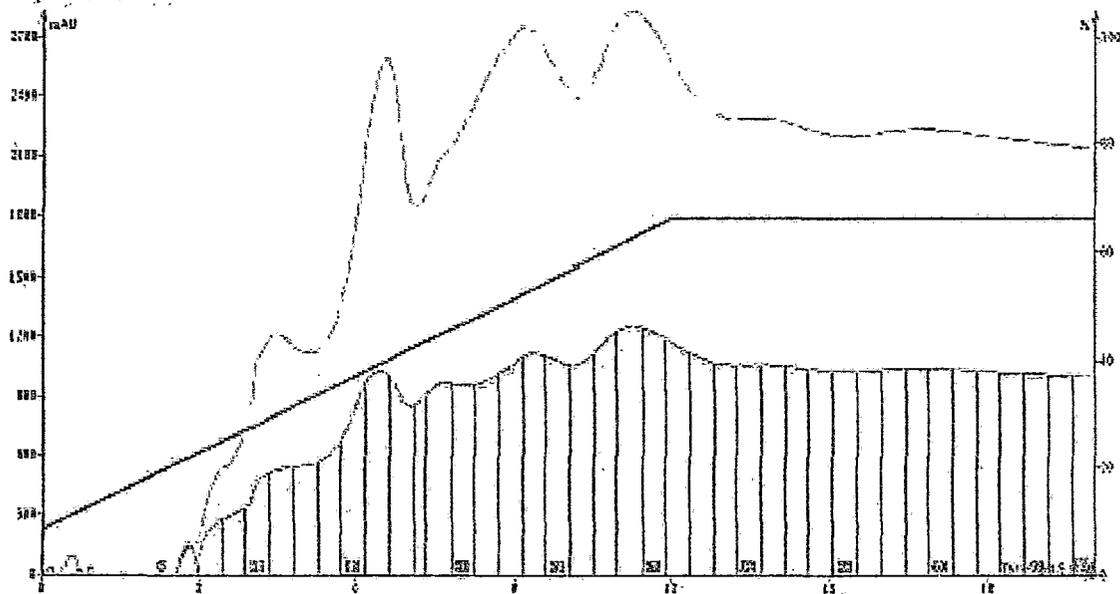


Figura 30: Diagrama de elución utilizada en el equipo – experimento 6

Gradient

	Solvents Mix	Length (CV)	
Equil.	A/B 8%	4.0	Flowrate 75 ml/min
1	A/B 8% - 88%	12.0	
2	A/B 88%	4.0	
3	A/B 88%	4.0	Auto Extend

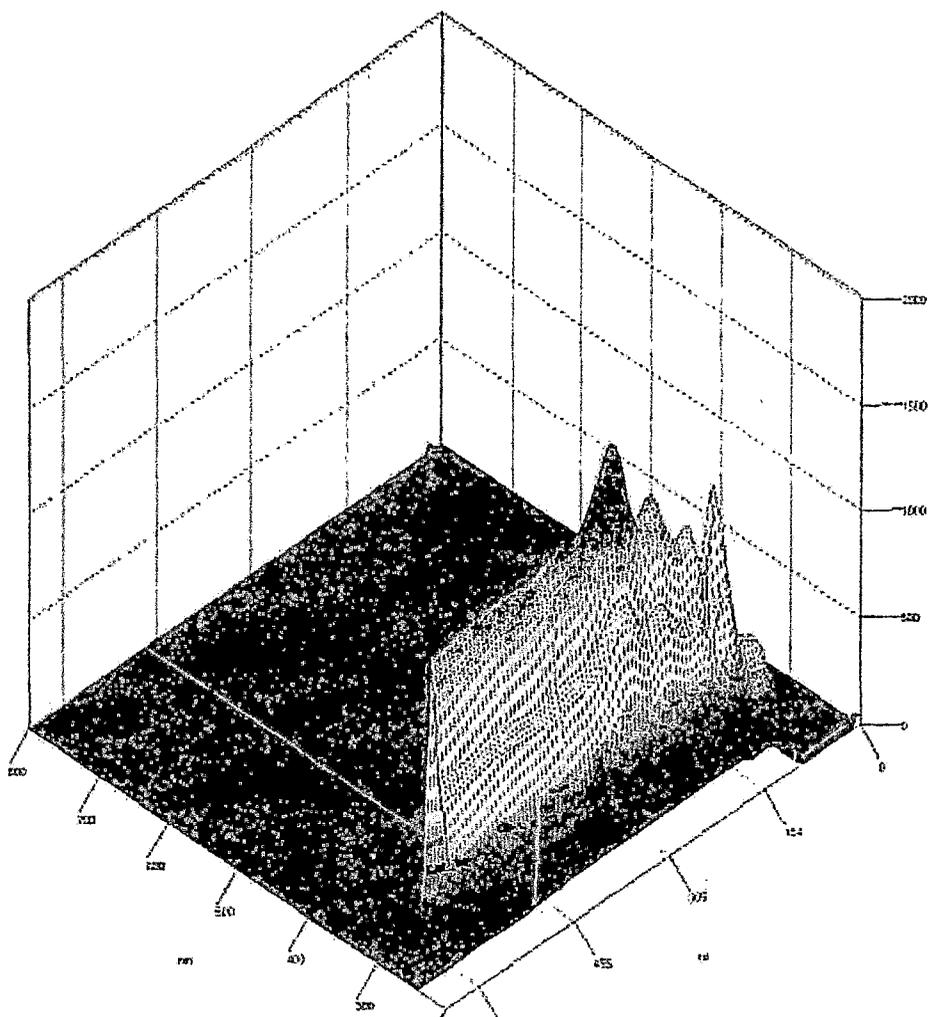


Figura 31: Gráfico UV de las fracciones obtenidas en 2D –experimento 6.

User	System Owner	Cartridge	SNAP KP-Sil 25g
Sample Name	2015-Nov-07 08.42	Rack Type	16x150 mm
Date	2015-Nov-07 08.48	Max Fraction	.15 ml
		Volume	
Method	Jossie	Solvent A	n-Hexane
Detection Mode	UV1	Solvent B	Ethyl acetate
UV1 (Collection)	210 nm		
UV2 (Monitor)	254 nm		

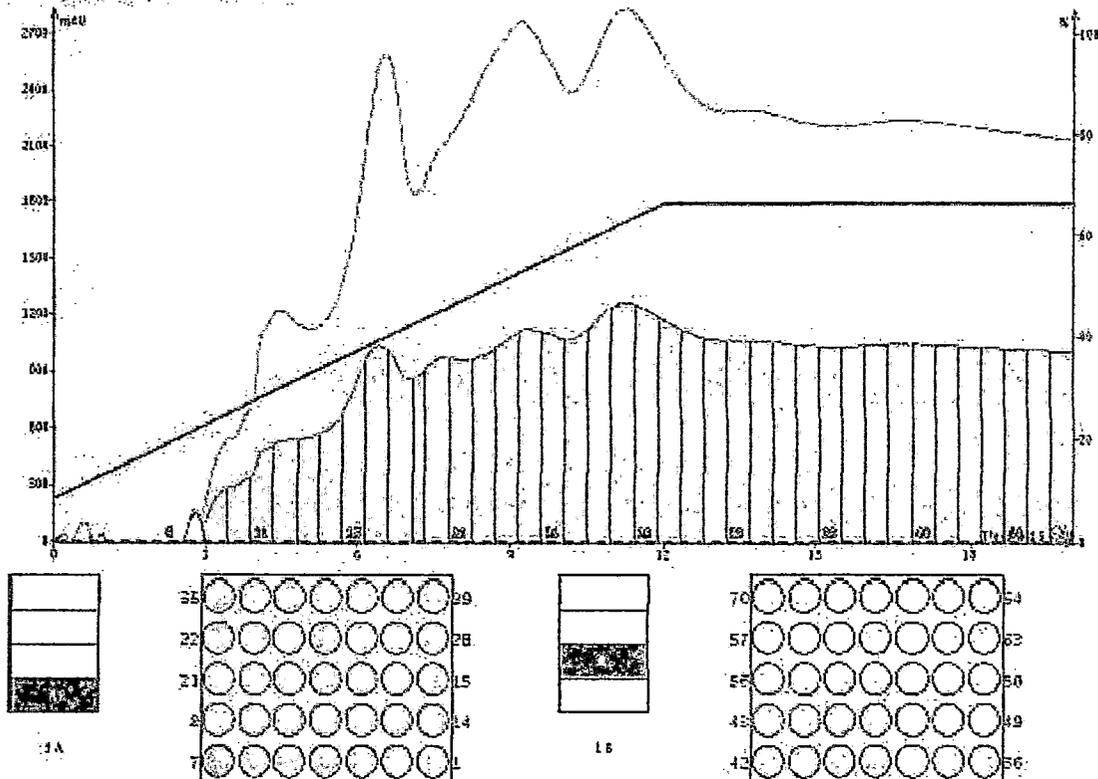


Figura 32: Diagrama UV de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna automática – experimento 6.

Se recogieron 46 fracciones de 15 ml.

3.5.6.5 Cromatografía TLC

Las fracciones colectadas del se monitorearon por cromatografía de capa fina (HPTLC). Se sembraron 2 µL de cada fracción en un cromatofolio HPTLC usando como eluyente EP:AcOEt (3:2) y revelado con ácido sulfúrico, el partenólido se identificaron en las fracciones 9-10, 11-12 y 13.

3.5.6.6 Tratamiento de las fracciones:

Juntas las fracciones 9-10, primero se le añaden 10 ml de EP (60 - 80 °C) luego otros 5 ml y se rotaevaporó a una presión de 474 mBar hasta un volumen aproximado de 15 mL. La cual se deja por 24 horas.

El tratamiento de las fracciones 11-12 y 13, se procedieron del mismo modo. Pasada las 24 horas se cosechan los cristales, se filtran, se enjuagó con EP (30 - 40°C) y se seca, obteniéndose un peso de **87.1 mg** de partenólido, que hacen un **0.593 %** de rendimiento.

3.5.6.7 Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos.

3.5.6.7.1 Análisis por Espectroscopia infra roja IR

El análisis se realizó en pastilla de KBr, el cual se realizó según la metodología descrita en el experimento 1 y se procedió la lectura en un espectrómetro IR (Thermoelectronics FTIR).

Se obtiene el siguiente espectro:

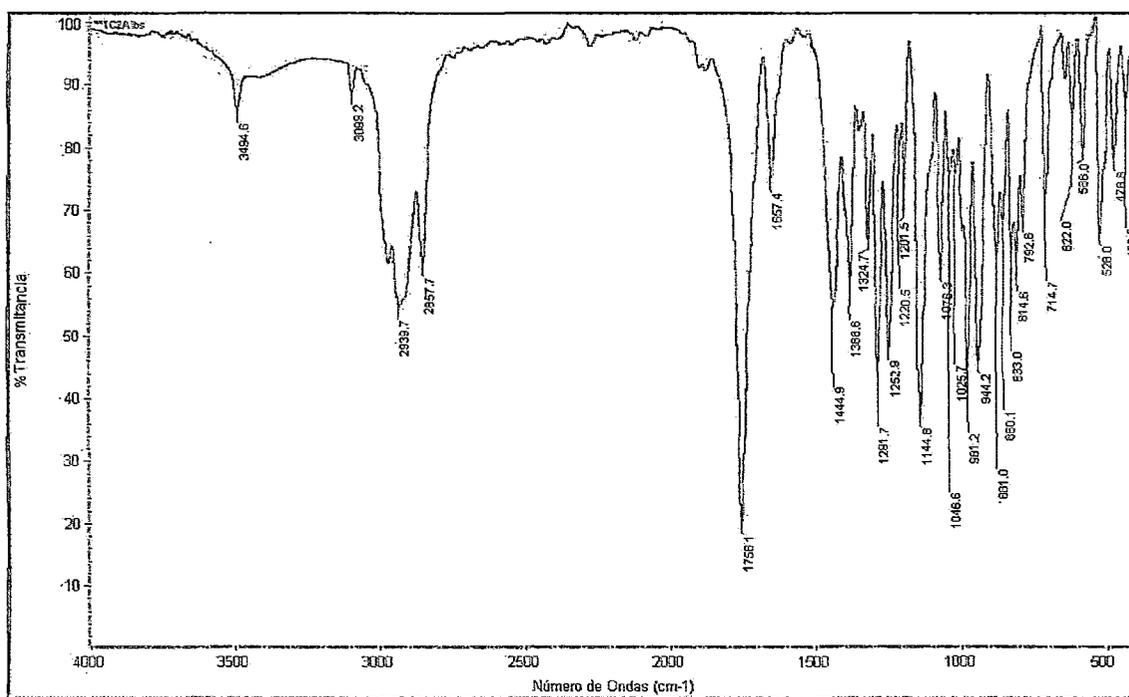


Figura 33: Espectro IR de los cristales obtenidos – experimento 6

3.5.6.7.2 Análisis cromatográfico DAD – HPLC

Los cristales obtenidos se disolvieron en la fase móvil (MeCN: H₂O 9:1) a una concentración de 1 mg/mL.

Del mismo modo se realiza una extracción rápida de flores secas según Zhou, para lo cual se pesan 1.0617 g, el cual se soniqueó con 10 ml (MeCN: H₂O 9:1) y finalmente se afora a 50 mL, este se analiza en equipo HPLC bajo las siguientes condiciones.

- Equipo: HPLC DAD Agilent 1200
- Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm x 5µm
- Modo de elución: Isocrático (MeCN:H₂O, 45:55 % v/v)
- Detección: 210nm
- Volumen de inyección: 0.5 µL
- Tiempo de análisis: 15 min.
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo: 1.5 mL/minuto
- Fase móvil: MeCN:H₂O (45:55 %)
- Modo de análisis: Isocrático
- Flujo: 1.5mL/minuto

Obteniéndose los siguientes cromatogramas

1C2A:

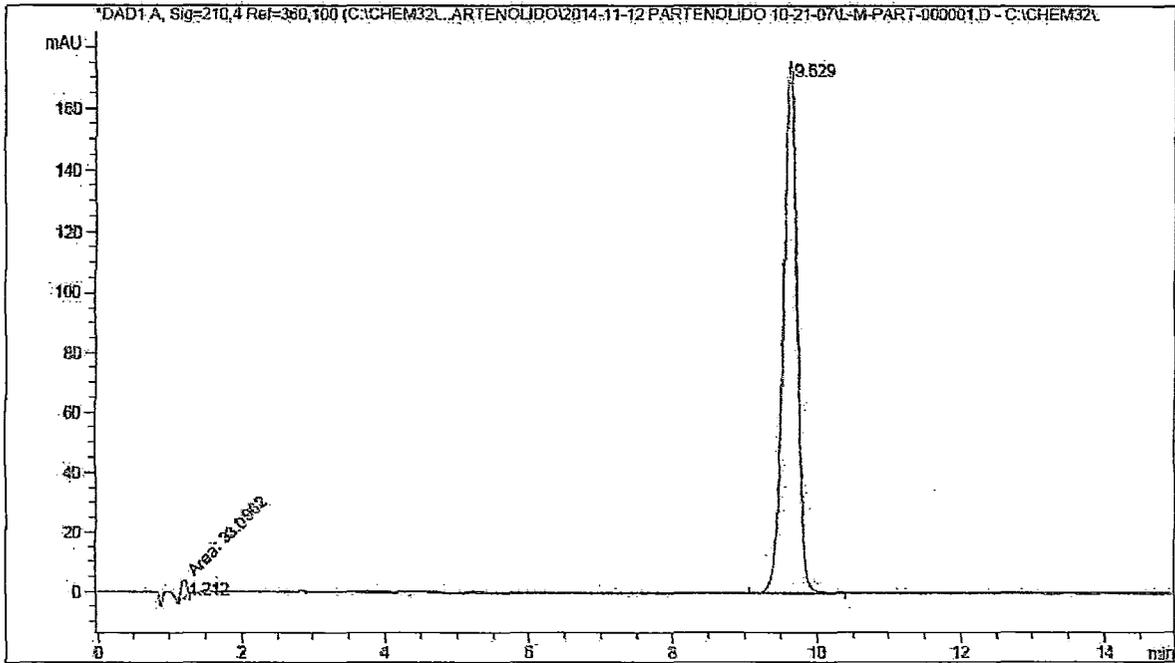


Figura 34: Espectro IR de los cristales obtenidos – experimento 6

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.212	MM	0.0916	33.09623	6.02296	1.3907
2	9.629	VB	0.2056	2346.65015	175.96558	98.6093

Flores:

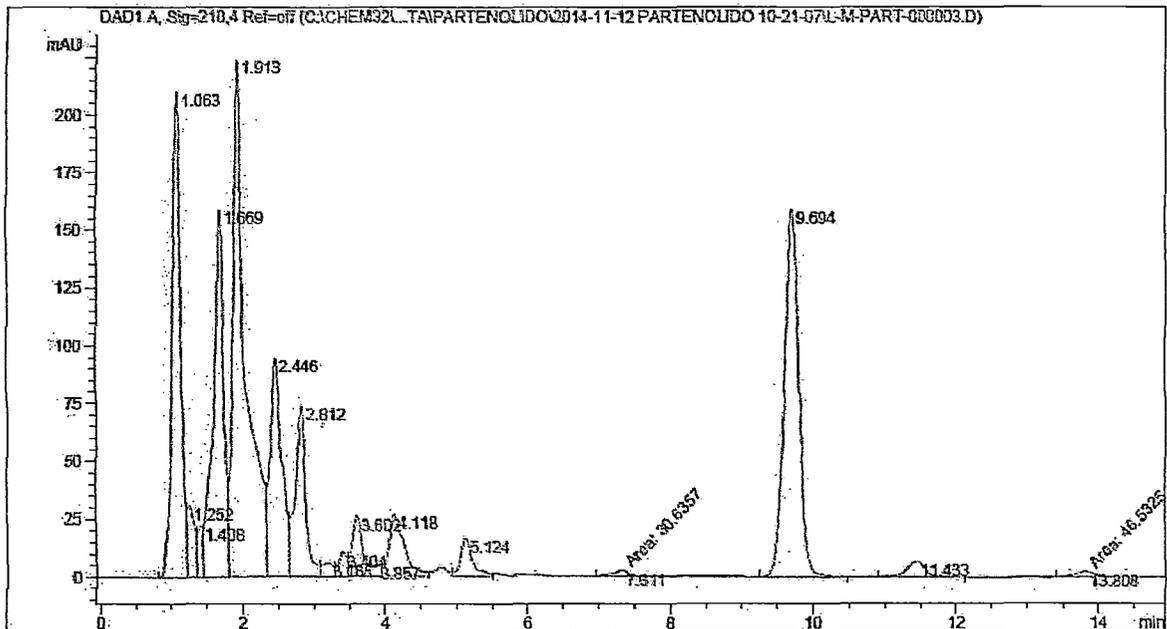


Figura 35: Espectro IR de las flores ensayadas en el experimento 6

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.063	BV	0.1176	1687.50012	210.27982	14.2898
2	1.252	VV	0.0980	207.99559	31.11337	1.7613
3	1.408	VV	0.0796	121.40557	22.25682	1.0281
4	1.669	VV	0.1426	1621.15332	159.41438	13.7280
5	1.913	VV	0.1718	2846.10229	224.63615	24.1009
6	2.446	VV	0.1565	1078.63818	94.94695	9.1340
7	2.812	VV	0.1464	755.64441	74.43140	6.3868
8	3.188	VV	0.1515	66.47353	6.28050	0.5629
9	3.404	VV	0.1185	87.20872	10.76500	0.7385
10	3.602	VV	0.1447	253.28391	26.22589	2.1448
11	3.857	VV	0.1411	51.21776	5.28457	0.4337
12	4.118	VV	0.1942	395.92331	27.14412	3.3527
13	5.124	VV	0.1668	193.11674	16.71410	1.6355
14	7.311	MM	0.2250	30.63574	2.26981	0.2594
15	9.694	BB	0.2158	2241.06616	159.59836	18.9775
16	11.433	BB	0.2737	125.19696	6.83363	1.0602
17	13.808	MM	0.3359	46.53251	2.30891	0.3940

El tiempo de retención del partenólido varía en este ensayo a diferencia de ensayos anteriores debido a que el acetonitrilo usado en esta prueba era nuevo. Como resultado del análisis HPLC, los cristales de partenólido obtenidos tienen una pureza 98.6093 %.

3.5.7 Experimento 7°: EXTRACCIÓN 1A2A (ACETATO DE ETILO)

3.5.7.1 Primera extracción (maceración):

Se trabajó con la flores del mercado de San Pedro (1.20 % de partenólido).

Se pesaron 12.6800 g de flores secas y pulverizadas, el cual se extrajo con 120 mL de acetato de etilo por 4 veces. Los extractos obtenidos se filtran, juntan y se evaporaron a sequedad como se indica en el experimento 1. Obteniéndose un peso de **1.451 g** (al cual le corresponde un 11.27 %).

3.5.7.2 Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):

El extracto se disuelve con 75 ml etanol y 75 ml de agua. A esta solución se hace un reparto líquido – líquido con 2 porciones de hexano de 60 mL cada una; desechamos la fase hexánica y se evaporó la fase hidroalcohólica hasta eliminar todo el etanol, quedándonos con la fase acuosa.

3.5.7.3 Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):

Se hizo una partición la fase acuosa con 45 mL de acetato de etilo, seguido de 15 ml de acetato de etilo por 3 veces desechando la fase acuosa. Secamos la solución de acetato de etilo con sulfato de magnesio, se filtra, se enjuaga con 10 ml de AcOEt y se evapora a sequedad. Obteniéndose **0.7104 g** de extracto seco (5.51 % respecto del peso de las flores secas).

3.5.7.4 Cromatografía líquida al vacío.

3.5.7.4.1 Impregnado de la muestra en SiGel:

El extracto anterior se disuelve en 20 ml AcOEt, se agrega SiGel 60 A° y evaporar a sequedad.

3.5.7.4.2 Preparación de la columna:

La columna se carga con SiGel 0.2-0.5 mm de diámetro, llegándose a una altura de empacamiento de 1.5 cm.

A este extracto se le hizo una filtración, con SiGel de 0.2 – 0.5 mm de diámetro. La elución fue solamente de acetato de etilo hasta que las fracciones recogidas no contengan más partenólido el cual se monitoreó por HPTLC. Hecho esto se obtiene un peso de extracto igual a 554.8 mg (4.31 %). Seguidamente se hizo un previo ensayo de capa fina para ver los Rfs del partenólido y las impurezas en el extracto, usando como fase móvil EP: AcOEt (4:2) como se muestra en el grafico siguiente:

Manchas	Rf
Impureza 1 (up)	0.550
Partenólido	0.425
Impureza 2 (low)	0.250

Tabla 11: Determinación del Rfs del partenólido contenido en las fracciones y sus respectivas impurezas por encima y debajo del mismo.

3.5.7.5 Cromatografía flash en Columna (equipo automático):

Al igual que en el experimento 6 se vuelve a utilizar el Sistema Cromatográfico Acelerado que tiene las siguientes características:

- Equipo: Isolera I Biotage
- Bomba: 10 mB
- DAD: 200 – 800 mm

3.5.7.5.1 Impregnación del extracto en SiGel:

Los 554.8 mg de extracto seco se disolvió con porciones de acetato de etilo, se le añadió SiGel flash (40 - 63 μ m de diámetro de partícula) evaporándose a sequedad. Seguidamente la muestra se cargó en el cartucho KP Sil 25g (VC=33 ml).

3.5.7.5.2 Corrida de la muestra:

La muestra se analizó bajo las siguientes condiciones:

- Volumen de columna: 33 mL

- Gradiente: 8 % AcOEt ----> 66 % AcOEt
- Flujo de 75 mL/min

A continuación se muestran los reportes del equipo automático.

Biotope		Isolera™ Archive Report - navidad		1:
User	Carlos			
Sample Name	navidad			
Date	2014-Dec-17 12:48			
Method				
Project				
Comment				
Cartridge	SNAP KP-Sil 25g	Detection Mode	Lambda-all	
Flowrate	75 ml/min	Baseline Correction	On	
Solvent A	n-Heptane	UV1 (Monitor)	280 nm	
Solvent B	Ethyl acetate	UV2 (Monitor)	210 nm	
		Start Threshold	5 mAU	
Rack Type	16x150 mm			
Max Fraction Volume	19 ml			
Dispense Order	S			

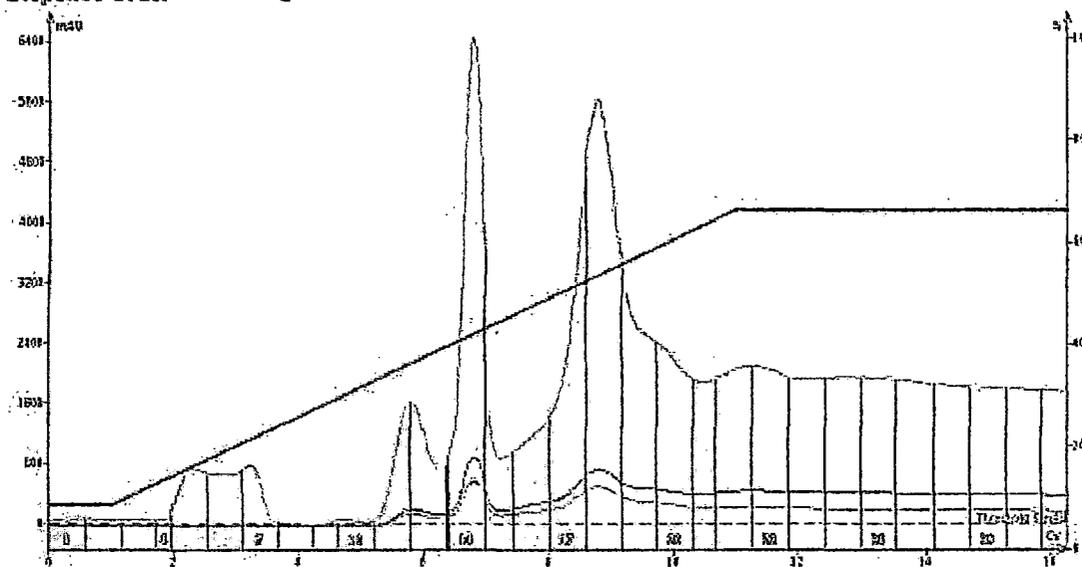


Figura 36: Diagrama de elución utilizada en el equipo –experimento 7

Gradient

	Solvents Mix			Length (CV)	
Equil.	A/B	8%		4.0	flowrate 75 ml/min
1	A/B	8%		1.0	
2	A/B	8% - 66%		10.0	
3	A/B	66%		2.0	
4	A/B	66%		3.2	Auto Extend

 Biotage

Isolera™ Archive Report - navidad

2

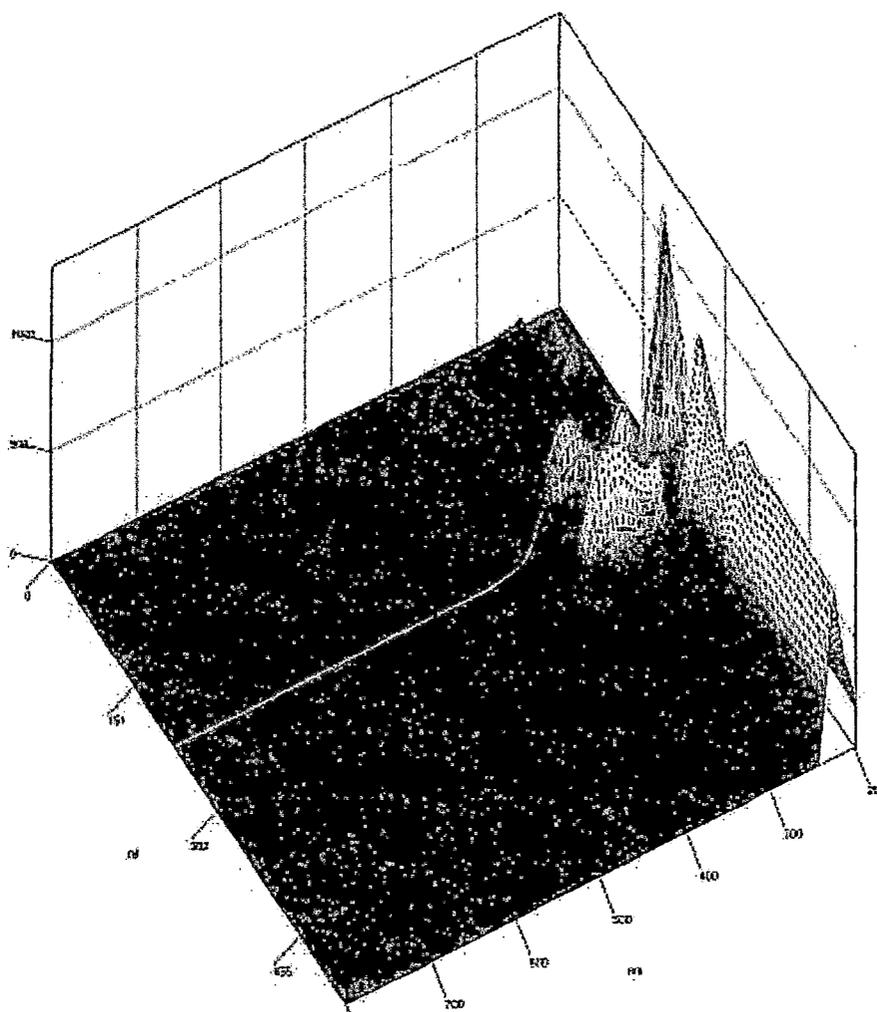


Figura 37: Gráfico UV de las fracciones obtenidas en 2D –experimento 7

User	Carlos	Cartridge	SNAP KP-Sil 25g
Sample Name	navidad	Rack Type	16x150 mm
Date	2014-Dec-17 12:48	Max Fraction	19 ml
Method		Volume	
Detection Mode	Lambda-all	Solvent A	n-Heptane
UV1 (Monitor)	200 nm	Solvent B	Ethyl acetate
UV2 (Monitor)	210 nm		

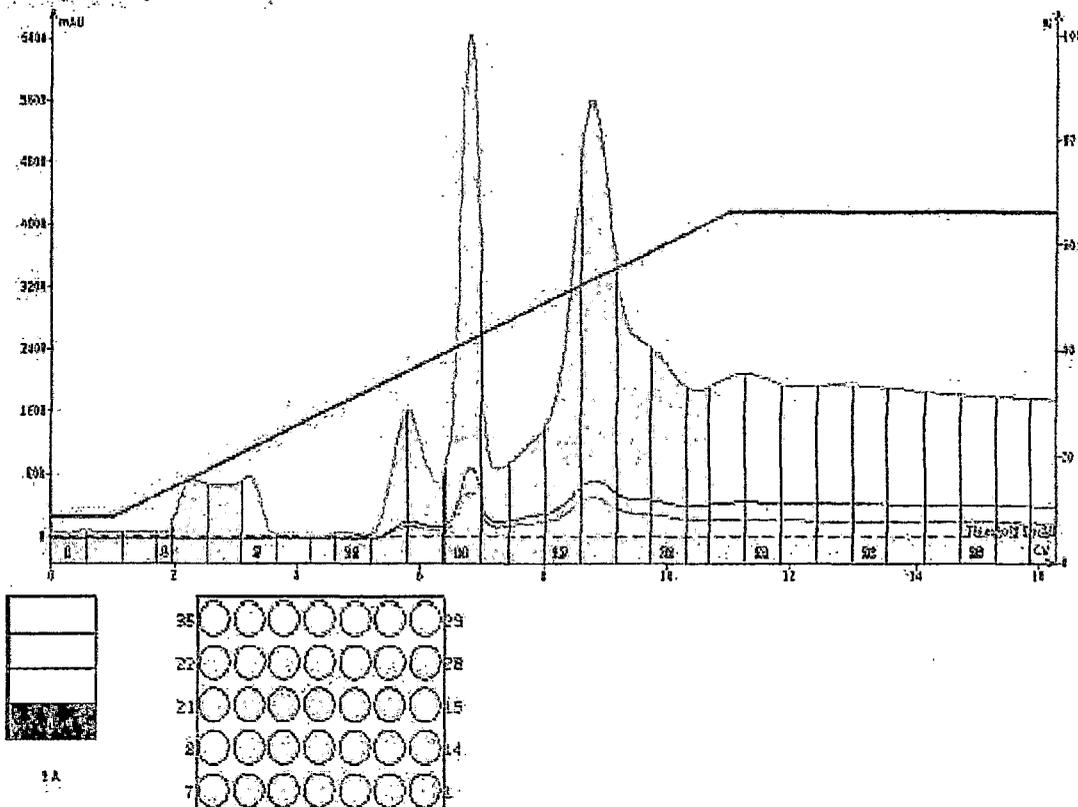


Figura 38: Diagrama UV de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna automática – experimento 7

Se recogieron 31 fracciones de 19 ml.

3.5.7.6 Cromatografía TLC

Las fracciones recogidas se monitorean por capa fina para identificar las fracciones con partenólido. Se siembran 4 μ L de cada fracción en un cromatofolio HPTLC, usando como fase móvil EP: AcOEt (4:2), el partenólido se identifican en las fracciones 14 y 15 como se muestra en la imagen:

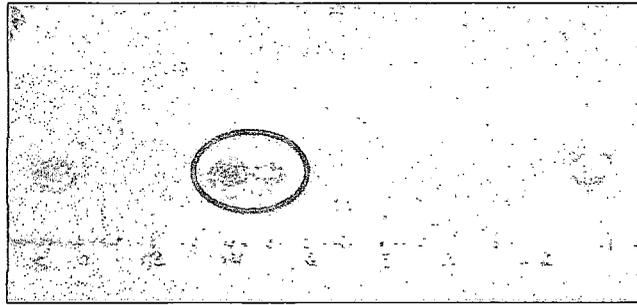


Figura 39: Cromatofolio desarrollado, con las fracciones colectadas del equipo automático – experimento 7

3.5.7.7 Tratamiento de las fracciones:

A cada fracción (14 y 15) se le añadió 15 ml de EP (80 - 100 °C) luego se evaporó el AcOEt hasta quedarnos solamente con EP (80 - 100 °C). El cual se dejó por 24 horas, cosechándose un total 35.4 mg (0.28 % de extracción).

3.5.8 Experimento 8°: EXTRACCIÓN 1A2A (ACETATO DE ETILO)

3.5.8.1 Primera extracción (maceración):

Se trabajó con las flores de la Cuyería el Mirador.

10.0092 g de flores secas y pulverizadas, se extrajo con 100 mL de acetato de etilo por 4 veces. Los extractos obtenidos se filtran, juntan y se evaporaron a sequedad como se indica en el experimento 1. Obteniéndose un peso de **1.893 g** (al cual le corresponde un 18.93 %)

3.5.8.2 Tratamiento del extracto (re-suspensión y desgrasado):

El extracto se disuelve con 75 ml etanol y 75 ml de agua. A esta solución se hace un reparto líquido – líquido con 2 porciones de hexano (40-60 °C) de 60 mL cada una; desechamos la fase hexánica y se evaporó la fase hidroalcohólica hasta eliminar todo el etanol, quedándonos con la fase acuosa.

3.5.8.3 Segunda extracción (Reparto líquido – líquido):

Se hizo una partición de la fase acuosa con 45 mL de acetato de etilo, seguido de 15 ml de acetato de etilo por 3 veces desechando la fase acuosa. Secamos la solución de acetato de etilo con sulfato de magnesio, se filtra, se enjuaga con 10 ml de AcOEt y se evaporó a sequedad. Obteniéndose 774.9 mg de extracto seco (7.74 % respecto del peso de las flores secas).

3.5.8.4 Cromatografía líquida al vacío.

3.5.8.4.1 Impregnado de la muestra en SiGel:

El extracto anterior se disuelve en 20 ml AcOEt, se agrega SiGel 60 A° y evaporar a sequedad.

3.5.8.4.2 Preparación de la columna:

La columna se carga con SiGel 0.2-0.5 mm de diámetro, llegándose a una altura de empacamiento de 2 cm.

A este extracto se le hace una filtración, con SiGel de 0.2 – 0.5 mm de diámetro. Se corre con tres volúmenes de AcOEt luego se monitorea por capa fina con el fin de identificar el partenólido, como se muestra en el siguiente gráfico:

Fracción	Vol. AcOEt (ml)	Partenólido
A	50	+
B	25	-
C	25	-

Tabla 12. Identificación de la presencia de partenólido en las fracciones de elución VLC – experimento 8

Evaporando a sequedad la fracción A que contiene el partenólido se obtiene un peso de extracto de 606.3 mg (6.06 %)

3.5.8.5 Cromatografía flash en Columna (equipo automático):

Al igual que en el experimento 6 y 7 se vuelve a utilizar el Sistema Cromatográfico Acelerado que tiene las siguientes características:

- Equipo: Isolera I Biotage
- Bomba: 10 mB
- DAD: 200 – 800 mm

3.5.8.5.1 Impregnación del extracto en SiGel:

Los 606.3 mg de extracto seco se disuelven con porciones de acetato de etilo, se le añade SiGel flash (40 - 63 µm de diámetro de partícula) evaporándose a sequedad. Seguidamente la muestra se carga al cartucho KP Sil 25g (VC=33 ml) y de empaque de 25 SiGel flash Merck.

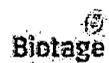
3.5.8.5.2 Corrida de la muestra:

La muestra se analiza bajo las siguientes condiciones:

- Volumen de columna: 33 mL

Gradient

	Solvents Mix		Length (CV)	
Equil	A/B	8%	4.0	flowrate 75 ml/min
1	A/B	8%	1.0	
2	A/B	8% - 66%	10.0	
3	A/B	66%	2.0	
4	A/B	66%	3.2	Auto Extend

 Biotage

Isolera™ Archive Report - enero

2

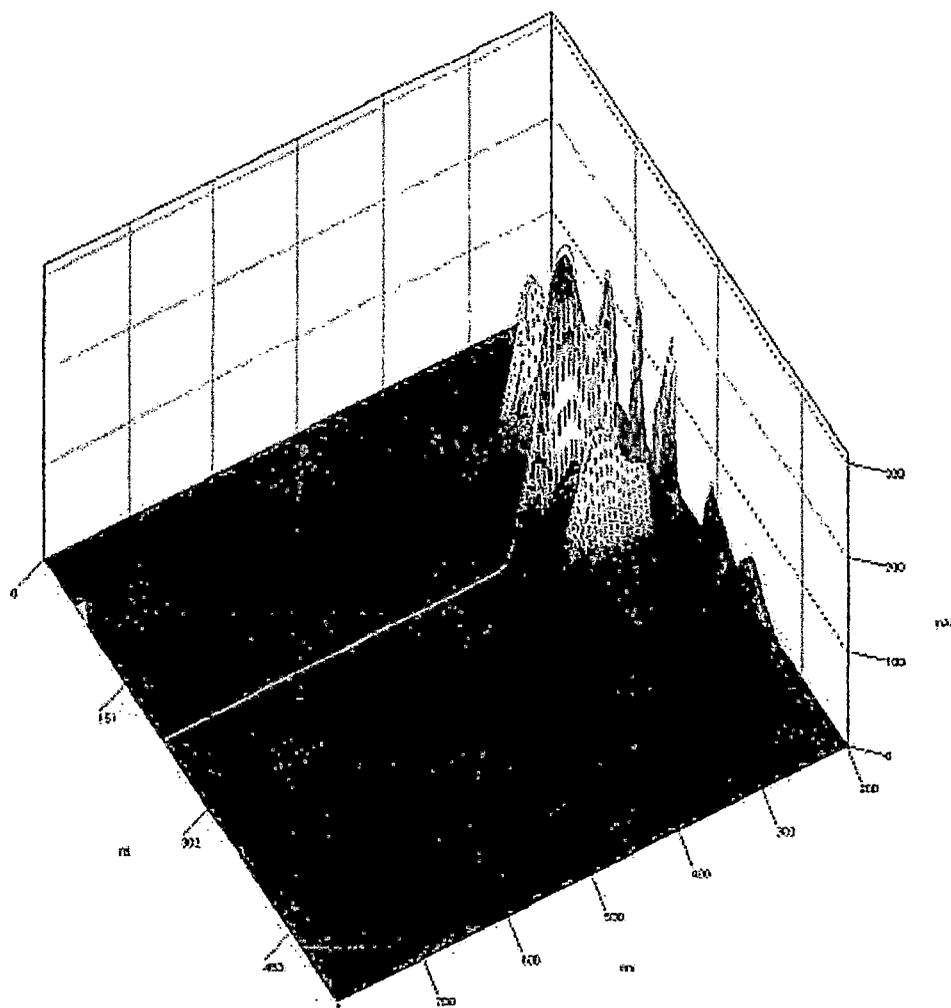


Figura 41: Gráfico UV de las fracciones obtenidas en 2D –experimento 8.

User	Carlos	Cartridge	SNAP KP-Sil 25g
Sample Name	enero	Rack Type	16x150 mm
Date	2015-Jan-14 08:58	Max Fraction	19 ml
		Volume	
Method		Solvent A	n-Heptane
Detection Mode	Lambda-all	Solvent B	Ethyl acetate
UV1 (Monitor)	200 nm		
UV2 (Monitor)	210 nm		

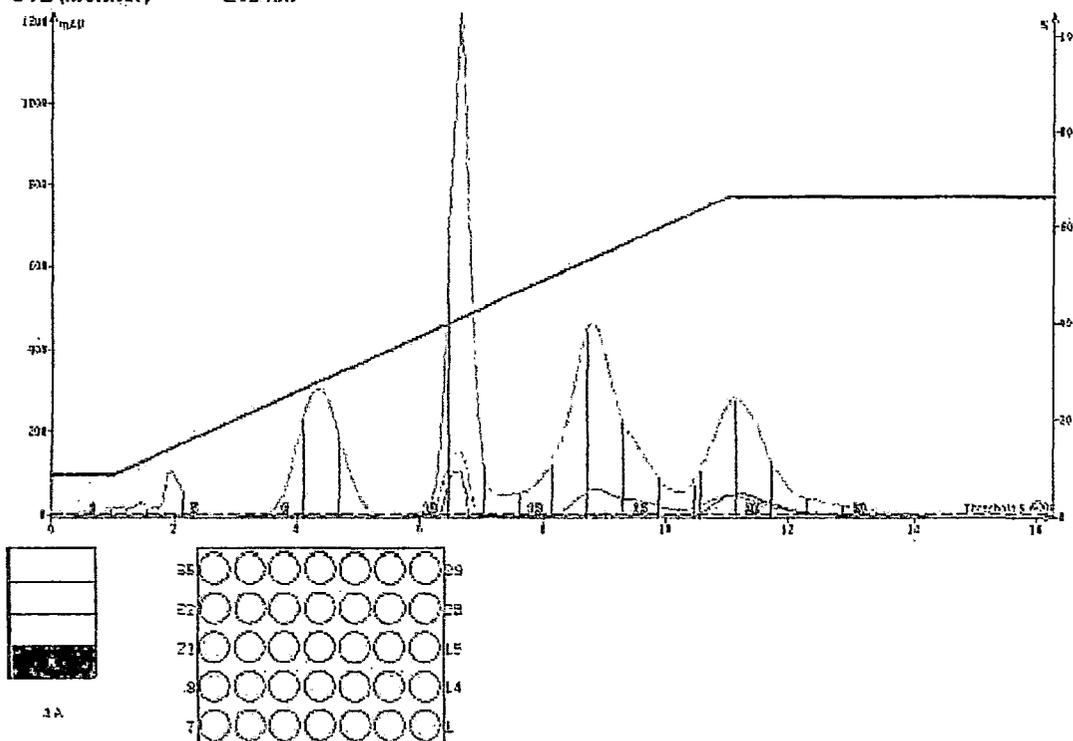


Figura 42: Diagrama UV de las fracciones colectadas de la cromatografía en columna automática – experimento 8.

Se recogieron 24 fracciones de 19 ml.

3.5.8.6 Cromatografía HPTLC

Las fracciones recogidas se monitorearon por capa fina para identificar las fracciones con partenólido. Se sembraron 4 µL de cada fracción en un cromatofolio HPTLC, usando como fase móvil EP: AcOEt (4:2), el partenólido se identificó en las fracciones 10 y 11.

3.5.8.7 Tratamiento de las fracciones:

Se juntan las fracciones 10 y 11 a este se le añaden 50 ml de EP (60 - 80 °C) luego se evaporó el AcOEt, se vuelve a añadir otros 20 ml de EP (60 - 80 °C) hasta quedarnos solamente con EP 60 - 80 °C. El cual se dejó por 24 horas obteniéndose un total de 66.3 mg de cristales de partenólido (0.66 % de extracción)

3.5.8.8 Caracterización de los cristales de partenólido obtenidos.

3.5.8.8.1 Análisis por Espectroscopia infra roja IR

El análisis se realizó en pastilla de KBr, el cual se realizó según la metodología descrita en el experimento 1 y se procedió la lectura en un espectrómetro IR (Thermoelectronics FTIR).

Obteniéndose el siguiente espectro.

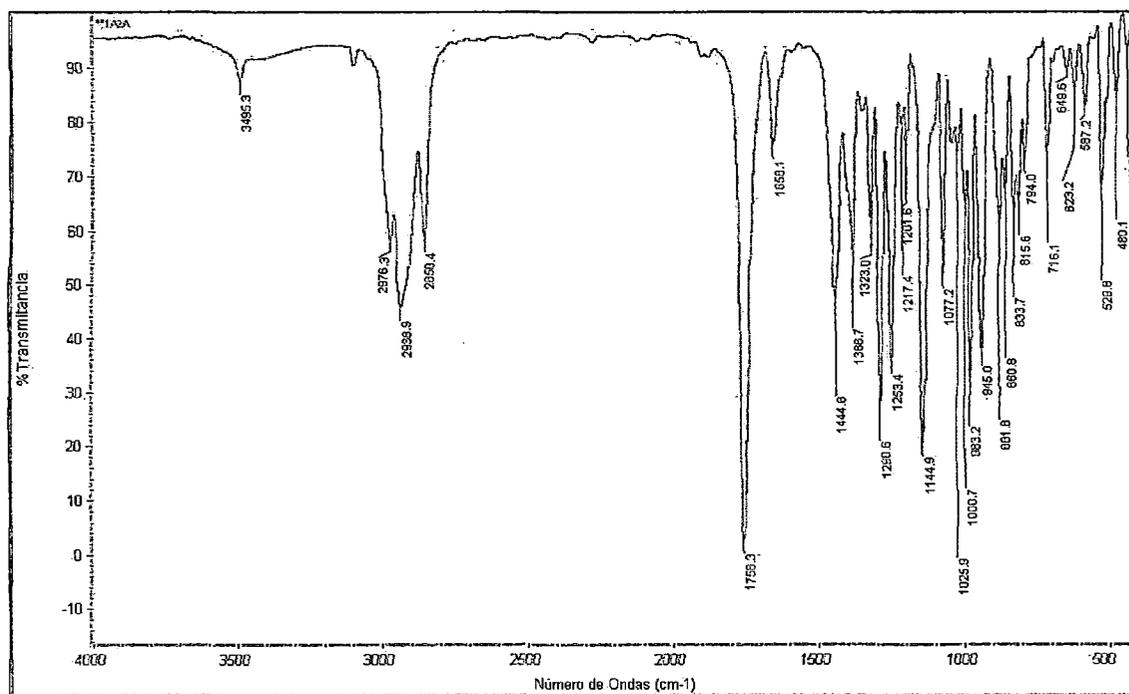


Figura 43: Espectro IR de los cristales obtenidos - experimento 8

3.5.8.8.2 Análisis cromatográfico DAD – HPLC

Los cristales obtenidos y el estándar se disolvieron en la fase móvil (MeCN:H₂O 9:1) a una concentración de 1 mg/mL según:

Muestra	Concentración
1A2A	1 µg/µL
Estándar	1 µg/µL

Tabla 13: Preparación de la muestra y el estándar para análisis HPLC – experimento 8

Así mismo se realizó una extracción rápida de flores, pesando 1.0919 g el cual se soniqueó por 5 min con 10 ml de MeCN: H₂O (9:1), por 3 veces, luego se filtra y se afora a 50 ml, estas muestras se analizaron por HPLC bajo las siguientes condiciones.

- Equipo: HPLC DAD Agilent 1200
- Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm x 5µm
- Modo de elución: Isocrático (MeCN:H₂O, 45:55 % v/v)
- Detección: 210nm
- Volumen de inyección: 0.5 µL
- Tiempo de análisis: 15 min.
- Temperatura de la columna: 25°C
- Flujo: 1.5 mL/minuto
- Fase móvil: MeCN:H₂O (45:55 %)
- Modo de análisis: Isocrático
- Flujo: 1.5mL/minuto

Obteniéndose los siguientes cromatogramas

Cristales obtenidos:

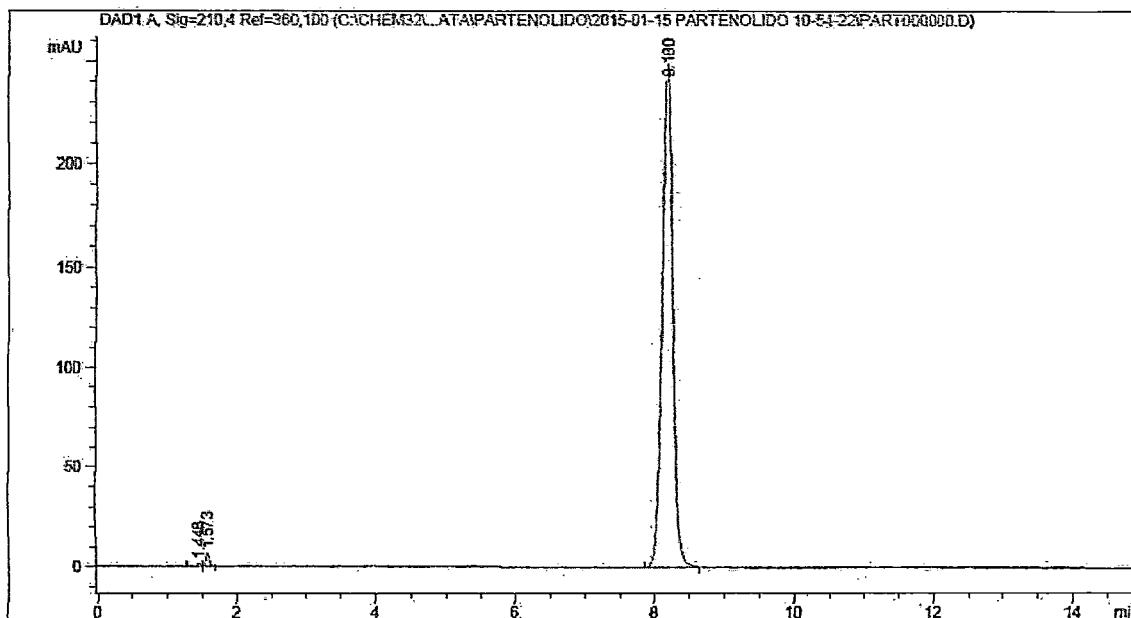


Figura 44: Cromatograma HPLC de los cristales obtenidos – experimento 8

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.448	BV	0.0611	6.65873	1.64892	0.2451
2	1.573	VB	0.0556	23.45129	6.57018	0.8633
3	8.180	BB	0.1655	2686.23975	249.66827	98.8915

Estándar:

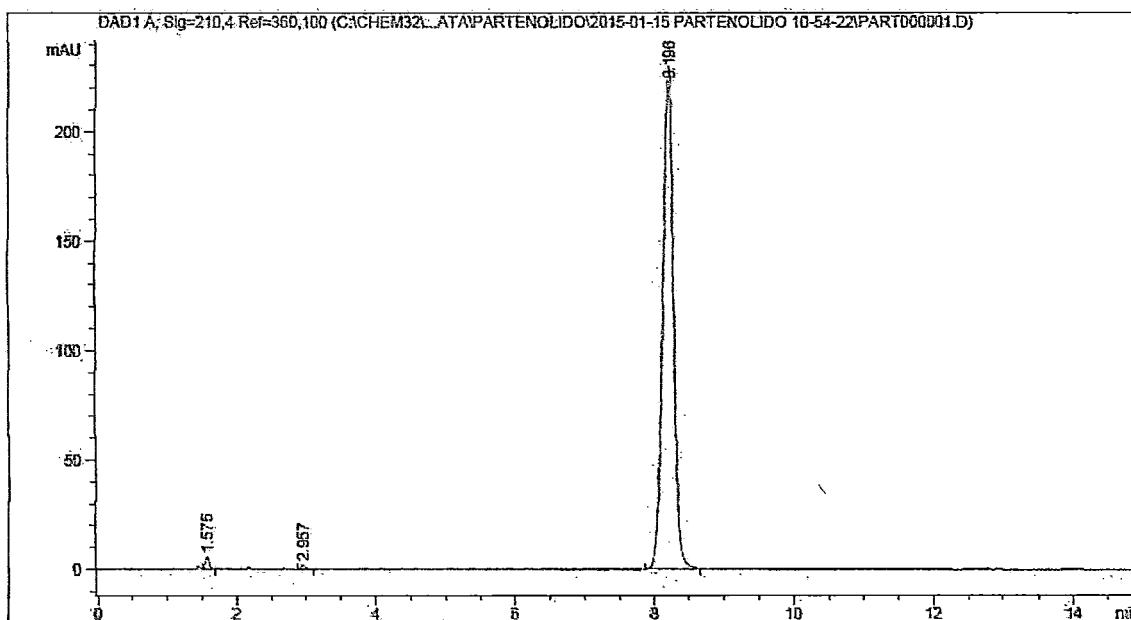


Figura 45: Cromatograma HPLC del estándar de partenólido

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.575	VB	0.0537	20.20921	5.65186	0.8047
2	2.957	BB	0.0701	7.45170	1.66731	0.2967
3	8.196	BB	0.1659	2463.83130	230.25497	98.8986

Flores:

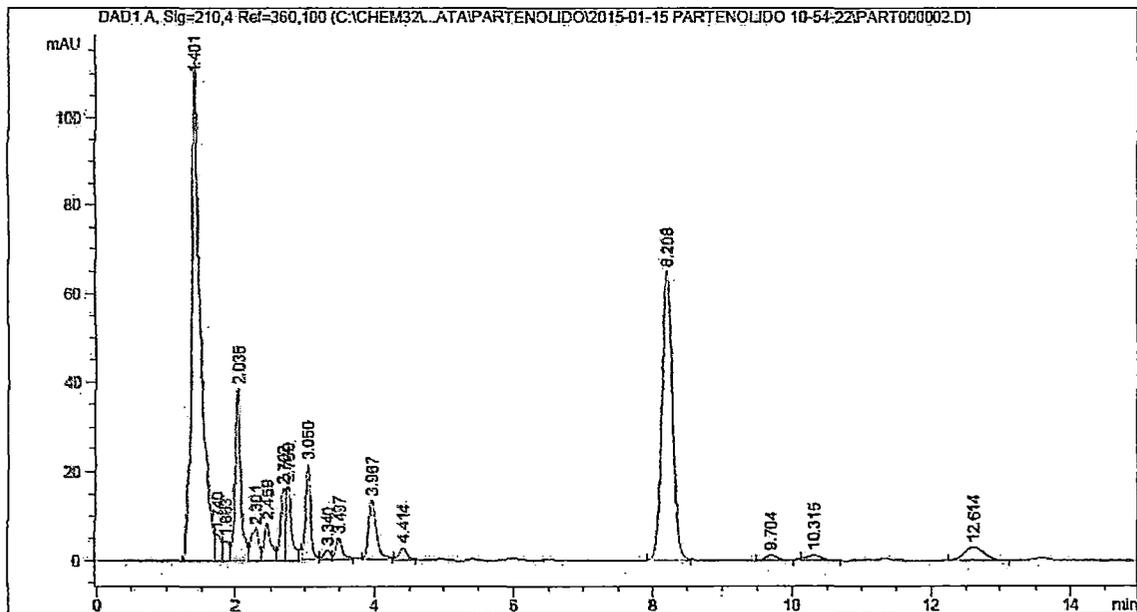


Figura 46: Cromatograma HPLC de las flores de Santa María ensayadas- experimento 8

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.401	BV	0.1210	1018.68304	113.14059	38.5253
2	1.740	VV	0.0874	34.22905	5.92126	1.2945
3	1.863	VV	0.0958	28.23490	4.46563	1.0678
4	2.035	VV	0.0817	210.50470	38.55960	7.9610
5	2.301	VV	0.1084	57.33721	7.08800	2.1684
6	2.459	VV	0.0954	56.43966	8.28948	2.1345
7	2.702	VV	0.0634	70.77682	16.06216	2.6767
8	2.760	VB	0.0775	89.46484	16.43800	3.3834
9	3.050	BV	0.0780	110.15974	21.40488	4.1661
10	3.340	VV	0.1045	16.02695	2.26614	0.6061
11	3.497	VB	0.0995	32.05428	4.70691	1.2123
12	3.967	BB	0.1158	107.04069	13.30901	4.0481
13	4.414	BB	0.1184	21.23944	2.68052	0.8032
14	8.208	BB	0.1645	693.33398	64.98794	26.2210
15	9.704	BB	0.1949	16.34273	1.26337	0.6181
16	10.315	BB	0.2295	19.31545	1.25508	0.7305
17	12.614	BB	0.3119	63.00700	3.03866	2.3828

Se realiza una superposición de los cromatogramas de los Cristales obtenidos, flores y el estándar de partenólido.

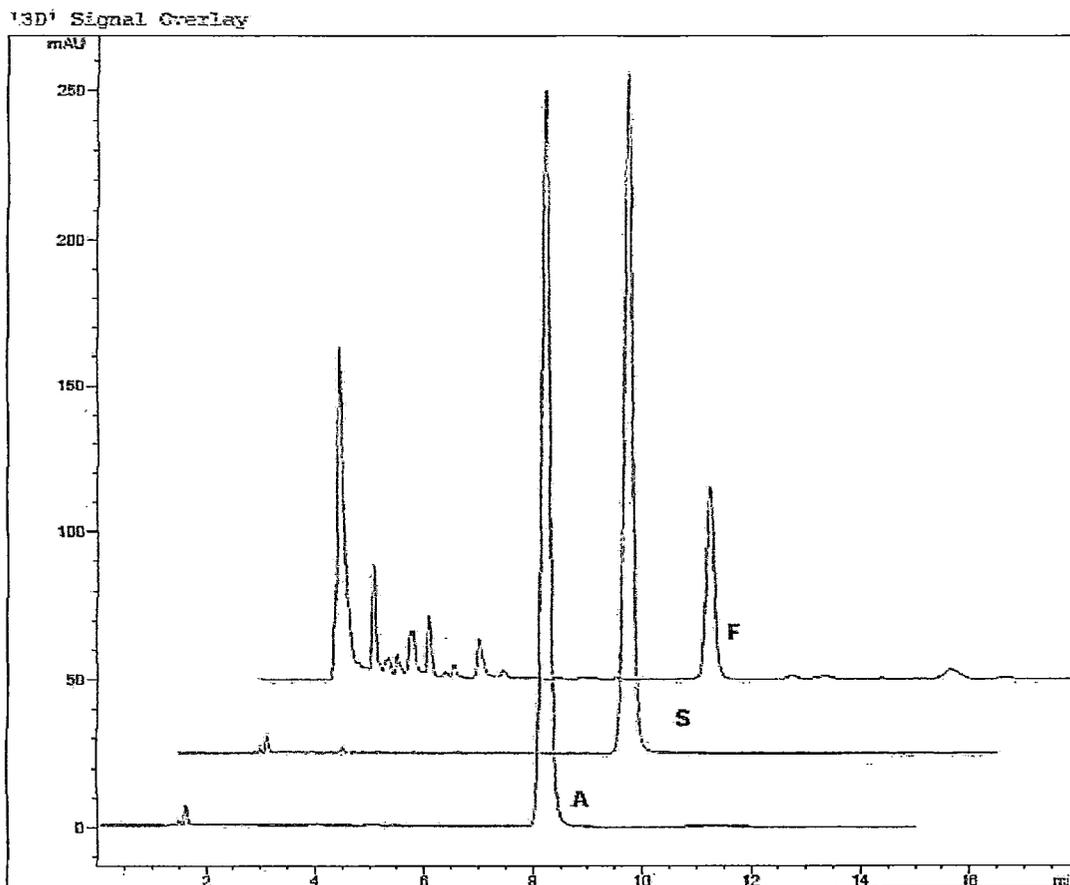


Figura 47: Superposición de cromatogramas de los cristales obtenidos, flores y el estándar de partenólido – experimento 8

Del análisis HPLC podemos decir que los cristales obtenidos tienen una pureza de 98.8915 %, y una vez más el tiempo de retención es variable respecto a los primeros experimentos, el cual se debe a la utilización del nuevo solvente.

De la comparación de los cromatogramas del estándar, cristales obtenidos y las flores se concluye que realmente la utilización del nuevo solvente interfiere en el tiempo de retención del partenólido.

4 RESULTADOS

4.1 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1.1 Experimento 1°

Se cosecharon un total 282.1 mg de cristales de partenólido.

$$\begin{aligned}89000mg &\rightarrow 100\% \\282.1mg &\rightarrow x \\x &= 0.32\% \text{Partenolido}\end{aligned}$$

Peso de material crudo	89.00 g
Peso de cristales obtenidos	282.1 mg
% de rendimiento	0.32

Tabla 14. Resultados de porcentaje de rendimiento del experimento 1

4.1.2 Experimento 2°

Se cosecharon un total 166.0 mg de cristales de partenólido.

$$\begin{aligned}100650mg &\rightarrow 100\% \\166mg &\rightarrow x \\x &= 0.165\% \text{Partenolido}\end{aligned}$$

Peso de material crudo	100.650 g
Peso de 1° extracción	---
Peso de 8° extracción	8.520 g
Peso de cristales obtenidos	166.0 mg
% de rendimiento	0.165

Tabla 15. Resultados de porcentaje de rendimiento del experimento 2.

4.1.3 Experimento 3°

Con los datos obtenidos de los cromatogramas:

Muestra	Conc. Partenólido ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	mAU*s
St 1	0.1	180.68896
St 2	0.5	809.99902
St 3	1.0	1635.99231
Flores	—	214.88086

Tabla 16. Mili-unidades de absorbancia (mAU*s) de los picos correspondientes al partenólido de los diferentes estándares aplicados.

Se realizó un gráfico de la concentración del partenólido vs el área bajo la curva (mAU*s)

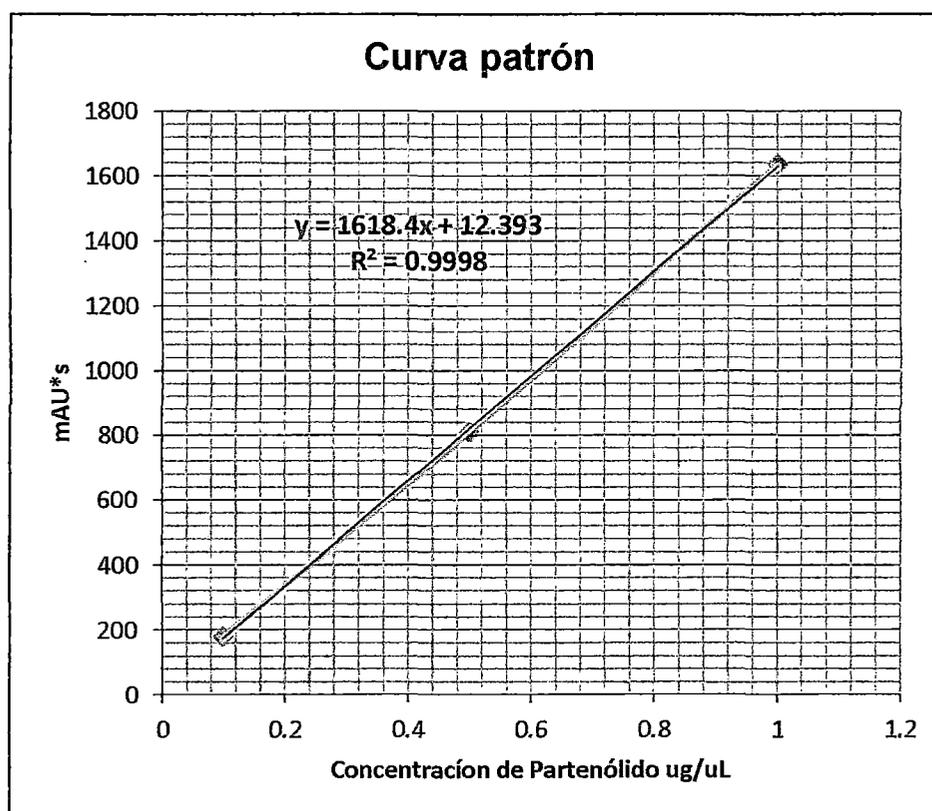


Ilustración 1. Curva patrón (curva de calibración) del estándar de partenólido - experimento 3

Con la ecuación obtenida del gráfico se calcula la concentración real de partenólido en las flores de Santa María.

$$y = 1618.4x + 12.393$$

$$214.88086 = 1618.4x + 12.393$$

$$x = 0.12511\mu g$$

$$\left\{ \begin{array}{l} 0.12511\mu g \rightarrow 1.0\mu L \\ y(\mu g) \rightarrow 50000\mu L \end{array} \right\}$$

$$y = 6255.5\mu g = 6.2555mg$$

$$\left\{ \begin{array}{l} 1268.6mg \rightarrow 100\% \\ 6.2555mg \rightarrow Z(\%Parth) \end{array} \right\}$$

$$Z(\%) = 0.4931Partenólido$$

Se halla que el porcentaje de partenólido en las flores es de **0.4931 %**.

Extra: Hallando el porcentaje de recuperación del partenólido del experimento N° 2

% extracción preparativo: 0.166 %

% de partenólido en flores: 0.493 %

$$\%recup. = \frac{\%_{extraccion}}{\%_{cont.real}} \times 100 = \frac{0.166}{0.493} \times 100$$

$$\%recup. = 33.67\%$$

Este resultado es congruente con los valores reportados en la literatura:

Autor	Porcentaje
Kery, 1999	0.520
Cretnik, 2005	0.350
Guo, 2006	0.493
El Shamy, 2007	0.164
Majdi, 2011	0.550
Vegh, 2014	0.604

Tabla 17. Reportes de porcentaje de Partenólido en *Tanacetum parthenium* – bibliografía.

4.1.4 Experimento 4°

Se cosecharon un total 69.4 mg de cristales de partenólido.

$$\begin{aligned} 52390\text{mg} &\rightarrow 100\% \\ 69.4\text{mg} &\rightarrow x \\ x &= 0.132\% \text{Partenolido} \end{aligned}$$

% de recuperación:

$$\begin{aligned} \%recup. &= \frac{\%extraccion}{\%cont.real} \times 100 \\ \%recup. &= \frac{0.132}{0.493} \times 100 \\ \%recup. &= 26.7\% \end{aligned}$$

Peso de material crudo	52.390 g
Peso de 1° extracción	—
Peso de 2° extracción	785.7 mg
Peso de cristales obtenidos	69.4 mg
% de rendimiento	0.132
% de recuperación	26.7

Tabla 18. Resultados del rendimiento de extracción del partenólido y el porcentaje de recuperación de la misma.

4.1.5 Experimento 5°

Con los resultados de la cromatografía HPLC se pueden calcular el porcentaje real de partenólido que contienen los diferentes extractos:

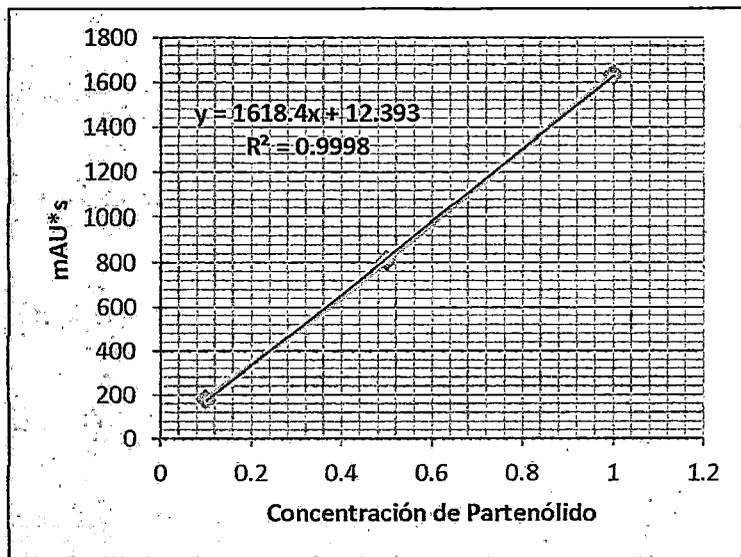


Ilustración 2. Curva patrón del estándar de partenólido – experimento 3

Los mg de partenólido en cada extracto se determinan mediante la ecuación de la curva patrón realizada en el experimento 3:

$$y = 1618.4x + 12.393 \dots\dots(1)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} x(\mu\text{g}) \rightarrow \text{vol. Iny}(\mu\text{L}) \\ y(\mu\text{g}) \rightarrow \text{vol. Aforo}(\mu\text{L}) \end{array} \right\} \dots\dots(2)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} W_{\text{muest}}(\text{mg}) \rightarrow 100\% \\ y(\text{mg}) \rightarrow Z(\% \text{Parth}) \end{array} \right\} \dots\dots(3)$$

Muestra	Vol. iny.	mAU*s	$\mu\text{g/ml}$	mg de P. en el extracto.	% partenólido
A	1 μL	1360.32959	0.833	8.33	0.833
C	1 μL	660.56079	0.400	4.00	0.400
1C2A	1 μL	1287.28516	0.788	7.88	0.788
1A2C	1 μL	536.27606	0.324	3.24	0.324
Flores	5 μL	258.08646	0.152	1.52	1.20

Tabla 19. Contenido de partenólido en los extractos obtenidos con os sistemas de extracción – experimento 5.

- Hallando el porcentaje de recuperación del partenólido tenemos el siguiente cuadro.

$$\%recup. = \frac{\%_{Part.extracto}}{\%_{cont.real}} \times 100$$

Cuadro resumen del experimento:

Parámetros	Extracciones			
	1A2A	1C2C	1C2A	1A2C
W muestra (g)	1.0000	1.0001	1.0007	1.0000
Primera extracción %	10.88	8.29	7.56	9.50
Segunda extracción %	3.99	2.09	3.73	1.36
mg de partenólido en el extracto	8.33	4.00	7.88	3.24
% de partenólido en el extracto	0.833	0.400	0.787	0.324
% de recuperación en el extracto	69.42	33.33	65.62	27.00

Tabla 20. Porcentajes de recuperación del partenólido en los diferentes sistemas de extracción

- Gráfico de mg de partenólido en el extracto final Vs sistema de solventes

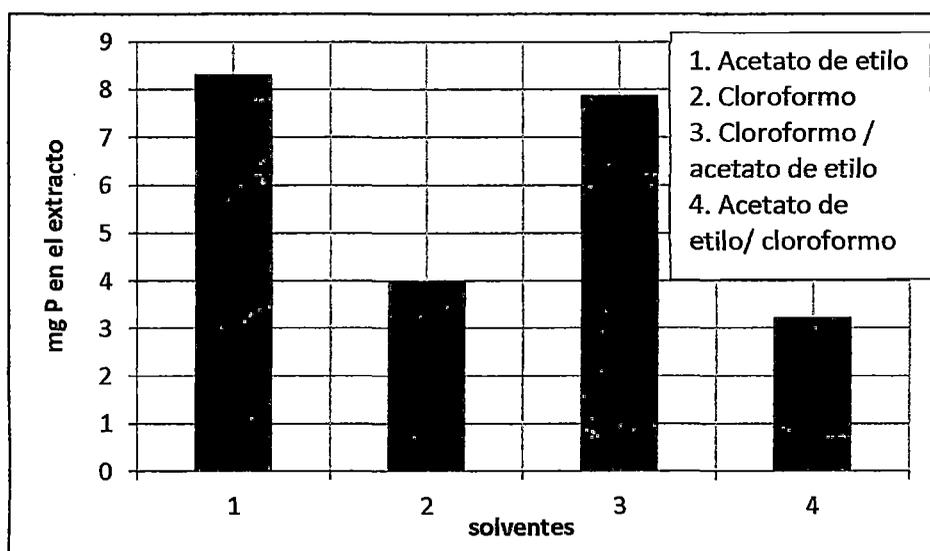


Ilustración 3: Resultados de extracción en porcentaje de partenólido encontrado en el mismo lote de muestra de Santa maría usando método de rapid extraction(Zhou,1999) y diferentes sistemas de solventes. El condiciones HPLC descritas en Zhou et al 1999 fueron usadas para la cuantificación con variación en la fase móvil (acetonitrilo/ agua 45:55 v/v).

De acuerdo a los resultados mostrados en el gráfico, se concluye los sistemas de extracción A y 1C2A tienen los valores más altos en cuanto a recuperación de partenólido en el extracto, en adelante se proseguirá a realizar dichos ensayos a escala mayor y poder evaluar el rendimiento de los cristales a obtener y su respectivo porcentaje de recuperación.

4.1.6 Experimento 6°

Se cosecharon un total 166.0 mg de cristales de partenólido.

$$14680mg \rightarrow 100\%$$

$$87.1mg \rightarrow x$$

$$x = 0.593\% \text{Partenolido}$$

Peso de material crudo	14.6800 g
Peso de 1° extracción	1.5064 g
Peso de 2° extracción	0.8468 g
Peso de cristales obtenidos	87.1 mg
% de rendimiento	0.593

Tabla 21. Rendimiento de los cristales obtenidos – experimento 6

De los cromatogramas hallamos el contenido real de partenólido en las flores analizadas:

Muestra	Vol. Iny. (µL)	mAU*s	µg Part.	% área
1C2A	1	2346.65015	0.9861	98.6093
F	5	2241.06616	0.9417	18.9775

Tabla 22. mAU*s de los cristales obtenidos y las flores ensayadas en el experimento 6

$$2346.65015mAU \rightarrow 0.9861\mu g$$

$$2241.06616mAU \rightarrow X$$

$$X = 0.9417\mu g$$

$$0.9471\mu g \rightarrow 5\mu L$$

$$Y \rightarrow 50000\mu L$$

$$Y = 9471\mu g = 9.491mg$$

$$1061.7\text{mg} \rightarrow 100\%$$

$$9.417\text{mg} \rightarrow Z$$

$$Z = 0.887\% \text{Partenolido}$$

El contenido real de partenólido en las flores es de 0.887 %.

Halando el % de recuperación:

$$\%recup. = \frac{\%extraccion}{\%cont.real} \times 100 = \frac{0.593}{0.887} \times 100$$

$$\%recup. = 66.85\%$$

4.1.7 Experimento 7°

Se cosecharon un total 35.4 mg de cristales de partenólido.

$$12680\text{mg} \rightarrow 100\%$$

$$35.4\text{mg} \rightarrow x$$

$$x = 0.279\% \text{Partenolido}$$

Peso de material crudo	12.6800 g
Peso de 1° extracción	1.4510 g
Peso de 2° extracción	0.7104 g
Peso de cristales obtenidos	35.4 mg
% de rendimiento	0.279

Tabla 23 Rendimiento de los cristales obtenidos – experimento 7

Halando el % de recuperación:

$$\%recup. = \frac{\%extraccion}{\%cont.real} \times 100 = \frac{0.279}{1.20} \times 100$$

$$\%recup. = 0.233\%$$

Ojo: el ensayo se vuelve a repetir porque ocurrió un accidente con los cristales obtenidos de ahí el bajo rendimiento.

4.1.8 Experimento 8°

Se cosecharon un total 166.0 mg de cristales de partenólido.

$$10009.2mg \rightarrow 100\%$$

$$66.3mg \rightarrow x$$

$$x = 0.662\% \text{Partenolido}$$

Peso de material crudo	10.0092 g
Peso de 1° extracción	1.893 g
Peso de 2° extracción	774.9 mg
Peso de cristales obtenidos	66.3 mg
% de rendimiento	0.662

Tabla 24. Rendimiento de los cristales obtenidos – experimento 8

Del cromatograma:

Muestra	Vol. de Iny.	mAU*s	µg Part.	% área
1A2A	1	2686.23975	0.9889	98.8915
F	1	693.33398	0.2552	26.2210

Tabla 25. mAU*s de los cristales obtenidos y las flores ensayadas en el experimento 8

Hallando el porcentaje de partenólido en las flores de Santa María (Cuyeria El Mirador)

$$2686.23975mAU \rightarrow 0.9889\mu g \quad 0.2552\mu g \rightarrow 1\mu L$$

$$693.33398mAU \rightarrow X \quad Y \rightarrow 50000\mu L$$

$$X = 0.2552\mu g \quad Y = 12762\mu g = 12.762mg$$

$$1091.9mg \rightarrow 100\%$$

$$12.762mg \rightarrow Z$$

$$Z = 1.169\% \text{Partenólido}$$

Se encontró que el contenido real de partenólido en las flores de Santa María es de 1.169 %

Hallando el % de recuperación:

$$\%recup. = \frac{\%extraccion}{\%cont.real} \times 100$$

$$\%recup. = \frac{0.662}{1.169} \times 100$$

$$\%recup. = 56.46\%$$

4.1.9 Cuadro resumen de resultados.

Experimento	Contenido real de partenólido %	% de extracción (cristales partenólido)	% de recuperación de cristales
Exp. 1 cloroformo(1C2A)	---	0.320	---
Exp. 2 acetato de etilo(1A2A)	0.493	0.166	33.67
Exp. 4 cloroformo	0.493	0.132	26.70
Exp. 6 cloroformo/ acetato de etilo (1C2A)	0.887	0.593	66.85
Exp. 8 acetato de etilo (1A2A)	1.169	0.662	56.56

Tabla 26. Resultado de los diferentes experimentos con los diferentes sistemas de solvente, acetato de etilo, cloroformo, cloroformo/ acetato de etilo y acetato de etilo/ cloroformo.

4.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Sistema de extracción óptimo y procedimiento

El proceso de extracción es optimizado basándonos en la comparación de los métodos de la literatura. La figura 9 muestra los resultados de la extracción de partenólido de Santa María de la región Cusco usando varios sistemas de solventes. Es claro que el acetato de etilo extrajo el más alto porcentaje de partenólido de Santa María y es el mejor solvente de extracción para la muestra de Santa María ensayada. Se observa que tanto el sistema de extracción 1A2A como el de 1C2A son los mejores candidatos para la extracción de partenólido, sin embargo el cloroformo, a pesar de su elevada toxicidad podría ser el solvente a utilizarse en la primera extracción por las siguientes razones:

- Extrae menos material haciendo más sencillas las etapas siguientes. Por ejemplo evitaría un tratamiento VLC preliminar.
- En Perú es un insumo con mayor disponibilidad debido a que es un insumo no fiscalizado.
- En cuanto a su toxicidad, el cloroformo como macerante de flores no implica gran exposición para el operador.

Además, considerando el porcentaje de recuperación del partenólido en el experimento comparativo, el sistema de extracción 1A2A* (69.42 %) tiene el mayor porcentaje de recuperación, seguido del sistema 1C2A (65.62 %) que es inferior.

Para verificar los resultados obtenidos del estudio comparativo se desarrolla los dos mejores candidatos bajo la metodología mejorada. Encontrándose el mayor porcentaje de recuperación para el sistema de extracción 1C2A (66.85 %) seguido de 1A2A (56.56 %), contradiciendo el resultado del experimento comparativo; esto debido a que la extracción con acetato de etilo arrastra mayor material orgánico no deseado obligándonos a realizar un paso extra de purificación (VLC) en el que se pierde parte del partenólido.

A diferencia de un trabajo anterior descrito en los antecedentes (Carlos Serrano et al.), en este trabajo se evita reducir a sequedad el solvente contenedor del partenólido en el tratamiento post-cromatográfico. Al quedar, el partenólido, disuelto solamente en éter de petróleo, tras el abandono de 24 horas precipitan cristales de partenólido. Así incrementa el porcentaje de recuperación de 33.33 % a 69.42 %. En el presente trabajo no se ha procesado aquellas fracciones en donde el partenólido está mezclado otras sustancias. Así el redimiendo reportado es producto de las fracciones cromatográficas donde el partenólido está puro.

Identificación de partenólido por espectroscopía IR y análisis HPLC (DAD)

Del análisis IR se puede decir que los picos obtenidos coinciden con los picos característicos del partenólido. La bibliografía reporta que: la señal a 1756 cm^{-1} del espectro IR es la que pertenece al carbonilo del éster cíclico, la banda más débil de absorción a 1664 cm^{-1} indica la función alqueno y el pico a 940 cm^{-1} sugiere una mitad de epóxido. Haciendo una comparación lineal de los datos obtenidos con los de la bibliografía se obtiene un valor del coeficiente de correlación $R^2 = 0.9999$, por lo que se puede concluir que los cristales obtenidos son realmente partenólido.

Tanto el tiempo de retención como la información espectral adquirida con el DAD a 210 nm en el análisis HPLC de las muestras, fueron comparados con los tiempos de retención y el espectro de referencia del estándar de partenólido, el cual presenta una buena resolución. La curva de calibración de partenólido que se construyó fue lineal, con un valor del coeficiente de correlación R de 0.9998.

Partenólido en plantas de la ciudad del Cusco

Las concentraciones de partenólido fueron evaluadas en brotes cultivados y silvestres de las localidades de la Ciudad del Cusco (distrito de Qorao, Jardines de la urbanización Mariscal Gamarra, Cuyería el Mirador,

Mercado San Pedro) por extracción con sistemas de extracción con solvente. Se encontró que, evaluando bajo el sistema extracción de solvente 1C2C la especie de los jardines de la urbanización Mariscal Gamarra y el distrito de Qorao, el más alto porcentaje de rendimiento se encontró en la mata de los jardines de la urbanización Mariscal Gamarra. Y evaluando bajo el sistema 1A2A, la especie de la cuyería El Mirador tiene el más alto rendimiento de cristales de partenólido (0.66%); respecto de Santa María del distrito de Qorao (0.166%).

4.3 CONCLUSIONES

Tal como se planteó en la hipótesis, al cambiar el tratamiento post-cromatográfico evitando reducir a sequedad el solvente en el que se encuentra el partenólido se logra precipitar mayor cantidad de cristales de partenólido mejorando así el rendimiento de partenólido respecto del material seco. También se logró un adecuado sistema para extraer partenólido con acetato de etilo. Sin embargo, a pesar que el sistema 1A2A muestra un alto porcentaje de rendimiento de partenólido, después de realizar el estudio comparativo de los sistemas de extracción y desarrollando los dos mejores sistemas de solventes se concluye que el sistema 1C2A es el que presenta el más alto porcentaje de recuperación de partenólido. Así, a pesar de su toxicidad, el cloroformo sigue siendo una buena opción como primer solvente extractor.

4.4 RECOMENDACIONES

Evaluar el porcentaje de recuperación de partenólido de especies de diferentes localidades con un mismo solvente para determinar en qué localidad se encuentra Santa María con mayor concentración de partenólido. Adicionalmente hacer el ensayo recomendado arriba en diferentes meses del año para determinar si al contenido de partenólido varía de acuerdo a la temporada en la que se obtienen las flores de Santa María. falta

5 BIBLIOGRAFÍA

(s.f.). Obtenido de <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/aster.htm>

Walsh, E. L., Ashe, S., & Walsh, J. J. (2012). Nature's Migraine Treatment: Isolation and Structure Elucidation of Parthenolide from *Tanacetum parthenium*. *Journal of Chemical Education*.

Awang, D. V., Dawson, B. A., & Kind, D. G. (1991). Parthenolide Content of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) Assessed by HPLC and ¹H-NMR Spectroscopy. *J. Nat. Prod*, 54, 1516–1521.

Bloszyk, E., Geppert, B., & Drozd, B. (1978). Quantitative Determination of Sesquiterpene Lactones in Plant Material by Infrared Spectroscopy. *Planta Med.*

Brown, A. M., Lowe, K. C., Davey, M. R., Power, J., Knight, D. W., & Heptinstall, S. (1996). Comparison of Extraction Procedures for Parthenolide in *Tanacetum parthenium*. *Phytochemical Analysis*, 7, 86-91.

Chaturvedi, D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. En V. K. Tiwari (Ed.), *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*. India: Research Signpost.

Chaturvedi, D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. En V. K. Tiwari, & B. B. Mishra, *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*. Kerala: Research Signpost.

Chatuvedi, D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. En V. Tiwari, & B. B. Mishra (Eds), *Opportunity, Challenge and scope of Natural Products in Medicinal Chemistry* (págs. 320-321). Kerala: Research Signpost.

- Chatuveri, D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. En V. K. Tiwari, & B. B. Mishra (Eds), *Oppportunity, Challenge and Scope of Natural Products in medicinal Chemistry* (pág. 313). Kerala: Research Signpost.
- Cretnik, L., Kotnik, P., Skerget, M., & Knez, Z. (2000). Separation of Parthenolide from Tanacetum Parthenium.
- de Kraker, J. W., deGroot, A., Franssen, M. C., Konig, W. A., & Bouwmeester, H. J. (1998). (+)-Germacrene A biosynthesis-The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiol.*(117), 1381–1392.
- de Kraker, J. W., Franssen, M.C.R, M. C., Dalm, M. C., deGroot, A., & Bouwmeester, H. J. (2001). Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. Demonstration of a cytochrome P450 (+)-germacrene A hydroxylase and NADP (+)-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. *PlantPhysiol.*(125), 1930–1940.
- Funk, V. A., Bayer, R., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., y otros. (2005). *Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae.*
- GEISSMAN, T. A. (1973). The Biogenesis of Sesquiterpene Lactones of the Compositae. En V. C. Runeckles, & T. J. Mabry (Edits.), *Terpenoids: Structure, Biogenesis, and Distribution.*
- Groenewegen, W. A., & Heptinstall, S. (1990). A Comparison of the Effects of an Extract of Feverfew and Parthenolide, a Component of Feverfew, on Human Platelet Activity In-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42, 553-557.
- Guzman, M. L., Rossi, R. M., Karnischky, L., Li, X., Peterson, D. R., Howard, D. S., y otros. (2005). The sesquiterpene lactone parthenolide induces

apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*(105), 4163–4169.

Jin, P., Madieh, S., & Augsburger, L. L. (2008). Selected Physical and Chemical Properties of Feverfew (*Tanacetum Parthenium*) Extracts Important for Formulated Product Quality and Performance. *AAPS PharmSciTech*.

Kemper MD, K. J., & MPH. (s.f.). *Longwood Herbal Task Force*. Recuperado el 12 de octubre de 2015, de <http://www.herbmed.org/Herbs/Herb124.htm>

Kéry, Á., Turiák, G., & Tétényi, P. (1988). Isolation of parthenolide by droplet counter current chromatography. *Journal of Chromatography*, 157-161.

Kéry, A., Turiák, G., Zámbo, I., & Tétényi, P. ((1987)). *Acta Pharm. Hung.*, 57 , 228.

Liu, Q., Majdi, M., Cankar, K., Goedbloed, M., Charnikhova, T., Verstappen, F., y otros. (2011). Reconstitution of the costunolide biosynthetic pathway in yeast and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One*(e23255).

Liu, Q., Manzano, D., Tanić, N., Pesic, M., Bankovic, J., Pateraki, I., y otros. (2014). Elucidation and in planta reconstitution of the parthenolide biosynthetic pathway. *Metabolic engineering*.

Mahabir P, G. (1995). *270 plantas medicinales iberoamericanas*. Bogotá Colombia: Editorial Presencia Ltda.

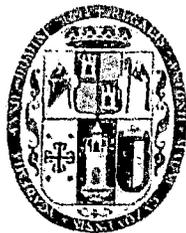
Majdi, M., Liu, Q., Karimzadeh, G., Malboobi, M. A., Beekwilder, J., Cankar, K., y otros. (2011). Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry*, 72, 1739–1750.

Marchand, B., Mohan Behl, H., & Rodriguez, E. (1983). Application of high-performance liquid chromatography for analysis and isolation of sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography A*.

- Martínez, A. (2001). *Sesquiterpenlactonas*. Medellín: Universidad de Antioquía.
- Merfort, I. (2002). Review of analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *J. Chromatography*, 967, 115-130.
- Occidental, H. V. (s.f.). *Herbario Virtual del Mediterraneo Occidental*. Recuperado el 02/01/2016 de enero de 2016, de <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/familia/2076.html>
- Pareek, A., Suthar, M., Rathore, G. S., & Bansal, V. (2011). Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacogn Rev*, 103-110.
- Rey, J.-P., Levesque, J., & Pousset, J. L. (1992). Extraction and high-performance liquid chromatographic methods for the γ -lactones parthenolide (*Chrysanthemum parthenium* Bernh.), marrubiin (*Marrubium vulgare* L.) and artemisinin (*Artemisia annua* L.). *Journal of Chromatography A*, 605, 124-128.
- Roersch, C. (1994). *Plantas Medicinales del sur andino del peru*. Koeltz Scientific Books.
- Ross, I. A. (2001). *Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses*. Totowa N. J.: Humana Press Inc.
- Sancho, G., & Pruski, J. (2004). *Laennecia araneosa* (Compositae:Astereae), a new combination for the West Indies. . *Novon*.
- Serrano Flores, C., Calsino, B., & Choquenaira, J. (2013). Obtencion de Pathenolido a partir de flores de *Tanacetum parthenium* (Anthemidae, Astereace). *Revista "CIENCIA"*, 30 - 37.
- van Klink, J. B. (2003). Biosynthesis of anthecotutoide, an irregular sesquiterpene lactone from *Anthemis cotula* L. (Asteraceae) via a non-famesyl diphosphate route. *Org. Biomol. Chem.*, 1, 1503-1508.

- van Klink, J., Becker, H., & Boland, W. (2003). Biosynthesis of antheotuloide, an irregular sesquiterpene lactone from *Anthemis cotula* L. (Asteraceae) via a non-farnesyl diphosphate route. *Org Biomol Chem.*, 1503-1508.
- Villacorta Hernandez, J. R. (2013). Cuantificación de las Sesquiterpenlactonas provenientes de las hojas de *Calea urticifolia* (juanislama) recolectadas en el periodo de enero a junio de 2012. *Universidad de El Salvador*. San Salvador.
- Wu, C., Chen, F., Wang, X., Kim, H.-J., He, G.-q., Haley-Zitlin, V., y otros. (2006). Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. *Food Chemistry*, 96, 220-227.
- Yoshioka, H., Renold, W., Fisher, N. H., Higo, A., & Mabry, T. (1970). Sesquiterpene lactones from *Ambrosia confertiflora* (Compositae). *Phytochemistry*.
- Zhou, J. Z., Kou, X., & Stevens, D. (1999). Rapid Extraction and High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Parthenolide in Feverfew (*Tanacetum parthenium*). *J. Agric. Food Chem*, 47, 1018–1022.

6 ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CERTIFICACION

El que suscribe, Profesor Investigador Asociado del Herbario Vargas (CUZ), certifica que los Bachilleres en Química: Lorena Apaza Tacca Código 070606 y Miki Gonzales Uscamayta Código 091594, de la Facultad de Ciencias, han sometido a consulta muestras botánicas colectadas para su determinación, las que al ser diagnosticadas a tratamiento taxonómico corresponden a la especie:

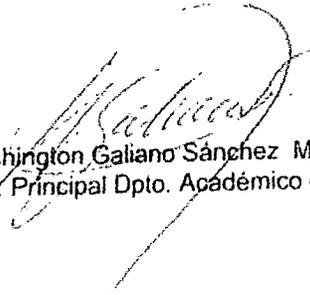
***Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip.** Asteraceae Nombres comunes: Hierba Santa María, Tanaceto.

En la clasificación APG III (Angiosperm Phylogenetic Group) la ubicación taxonómica corresponde a:

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteraceae Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
- Tribu: Heliantheae
- Género: *Minthostachys* (Benth.) Spach
- Especie: *Minthostachys acris* Schmidt-Leb.

Lo que se certifica para los fines concernientes al caso.

Cusco, 11 de Enero del 2016


Washington Galiano Sánchez M. Sc., Dr. (c).
Prof. Principal Dpto. Académico de Biología