



UNAP

**FACULTAD DE FARMACIA Y
BIOQUIMICA**

TESIS

"RENDIMIENTO DE TASPINA AISLADA DE 2 MUESTRAS DE
Croton lechlerii (SANGRE DE GRADO) DE LAS CUENCAS
DEL BAJO NANAY Y ALTO NAPO
RESPECTIVAMENTE".

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORES:

- Bach. F.Bq. Lindbergh, ARBILDO TELLO.
- Bach. F.Bq. Jorge Eduardo, PÉREZ MACEDO.

ASESORES:

- Q.F. Luis Alberto, VILCHEZ ALCALÁ. Mgr.
- Ing. Quím. Julio, ARCE HIDALGO

IQUITOS-PERÚ

2014

"RENDIMIENTO DE TASPINA AISLADA DE 2 MUESTRAS DE *Croton lechlerii* (SANGRE DE GRADO) DE LAS CUENCAS DEL BAJO NANAY Y ALTO NAPO RESPECTIVAMENTE".

Presentado por:

- Bach. F.Bq. Lindbergh, ARBILDO TELLO.
- Bach. F.Bq. Jorge Eduardo, PÉREZ MACEDO.

RESUMEN

Este estudio tuvo el propósito de determinar el rendimiento de Taspina en *Croton lechlerii* (sangre de grado) de las Cuencas de los ríos Nanay (Bajo) y Napo (Alto), alcaloide que se halla en el látex del género *Croton sp.* con la finalidad de señalar cual es la cuenca más promisoría en rendimiento, para que los expertos en fitomejoramiento logren establecer una progenie de rendimiento y las relaciones biogenéticas de la especie en estudio, pero de diferentes cuencas. El **objetivo** fue determinar el rendimiento de Taspina aislada de dos muestras auténticas del látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*) procedente de las cuencas del Bajo Nanay y del Alto Napo respectivamente. El **método** empleado fue experimental, descriptivo de diseño cuantitativo. La **población** estuvo constituido por un rodal de árboles (30 árboles esparcidos en un espacio de 600m²), seleccionándose un árbol corpulento de 30cm de diámetro y 15mt de altura. La **muestra** fue un litro de sangre de grado por cada cuenca. Se llevó a ambas muestras a extracto hidroalcohólica (v/v), luego se llevó este extracto a medio alcalino (pH 11) con amoniaco al 35% y se extrajo repetidas veces con cloroformo con el propósito de separar el alcaloide de las otras sustancias; que por diferenciación de solubilidad se obtuvo dos fases: la fase acuoso que es la capa superior y la segunda fase clorofórmica capa inferior. El extracto clorofórmico se concentró en rotavapor y se obtuvo un polvo blanco que se lavó con dioxano (éter corona) para lograr su pureza la que fue verificada por cromatografía TLC; punto de fusión 253°C similar a la literatura señalada por otros autores. Las pruebas espectrométricas de RMN (¹H y ¹³C) aplicadas a ambas muestras reportaron las mismas señales, lo que demuestra que la sustancia aislada corresponde a la taspina. En consecuencia la variabilidad del contenido de taspina obtenidos de acuerdo con los estudios que realizamos nos demostraron por **resultado** que el látex de Sangre de grado procedente de la Cuenca del río Nanay (bajo) tiene mayor rendimiento de taspina 7.2%, en relación con el látex de Sangre de grado procedente de la cuenca del río Napo (Alto) cuyo rendimiento es de 6.45%, lo que nos lleva a la **conclusión** que puede deberse a las variaciones interespecíficas y evolutivas de la planta y el medio geográfico que permite que la magnoflorina precursor químico de la taspina se transforma con mayor facilidad en Taspina en la Cuenca del Nanay (Bajo) que en la Cuenca del Napo (Alto).

Palabras Claves: *Croton lechlerii*, Alcaloide Taspina, Cuencas, Rendimiento de taspina.

**“EFFICIENCE OF TASPINE OF 2 SAMPLES FROM *Croton lechlerii*
(BLOOD OF DRAGO) OF THE BASIN’S TO NANAY LOW AND TO
NAPO UPPER RESPECTIVELY”**

Presented by:

- Bach. F.Bq. Lindbergh, ARBILDO TELLO.
- Bach. F.Bq. Jorge Eduardo, PÉREZ MACEDO.

ABSTRACT

This study was realized to determine the efficiency of Taspine to *Croton lechlerii* (blood of drago) of the basins of the rivers Nanay (Low) and Napo (upper), alkaloid that is occurrence in the latex of the genus *Croton sp.* in order to point out which is the most promising basin performance for experts able to establish breeding progeny efficiency and biogenetic relationships of the species under study, but in different basins. The objective was to determine the efficiency of taspina of two authentic samples isolated from the latex of Sangre de grado (*Croton lechlerii*) from the basins to Nanay Lower and Napo Upper respectively. The experimental method had consisted of a stand of trees scattered over an area of 600m²), selected a stout tree 30cm diameter and 15mt higher. It is take is sample a liter of latex per basin level, to 200 ml of both samples is addition 150 ml distille wáter and 40 ml of etanol at hydroalcoholic extract, then this extract to alkaline medium (pH 11) with ammonia to 35% was carried and extracted repeatedly with chloroform in order to remove the alkaloid of other substances; solubility differentiation that two phases are obtained: the aqueous phase is the upper layer and the second lower layer chloroform layer. The chloroform extract was concentrated in rotary evaporator and a white powder which was washed with dioxane (crown ether) to obtain the purity was verified by TLC was obtained; melting point 253 ° C similar to that reported by other authors literature. NMR spectrometric tests (1H and ¹³C) applied to both signals reporting identical samples, demonstrating that the isolated substance corresponds to the taspina. Consequently variability taspine content obtained according to our studies we showed results in the latex of Blood of grade from Nanay River Basin (bass) has higher efficiency taspine 7.2% compared with latex Blood of grade from the Napo (Upper) river whose yield is 6.45%, which leads to the conclusion that may be due to interspecific variation and evolution of the plant and the geographical environment which allows the precursor magnoflorina taspine chemist becomes more easily taspina Nanay Basin (Lower) in Napo Basin (Upper).

Keywords: **Keywords:** *Croton lechlerii*, Taspine, Basin Lower Nanay, Basin Upper Napo

**TESIS APROBADA EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA EN LA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA EL 21 DE NOVIEMBRE
DEL 2014 POR EL JURADO CALIFICADOR CONFORMADO POR:**

Ing. Reyna Gladys CÁRDENAS DE REÁTEGUI Mgr.
Presidenta

Ing. Cleto JARA HERRERA
Miembro

Q.F. Henry Vladimir DELGADO WONG
Miembro

Q.F. Luis Alberto VILCHEZ ALCALÁ Mgr.
Asesor

Ing. Julio ARCE HIDALGO
Asesor

DEDICATORIA

Para comenzar, el éxito de todo esto no hubiera sido posible sino es por el enorme esfuerzo y apoyo que realizaron mis padres Humberto Arbildo Panduro y Alida Tello Cohelo, a quienes les debo la vida, mis estudios y en parte lo que soy en estos momentos.

A mis hermanos Viana y Renzo que me aguantaron en todo momento cuando andaba enojado producto de las duras pruebas y las traspasadas por trabajos, les prometo que ya no pasarán más esos momentos, por eso y muchas cosas mas de todo corazón gracias.

Por ultimo quiero dar gracias a mi tío Wilman Tello Rodas que gracias a su apoyo, humor y confianza logre alcanzar una de mis metas, y ahora le prometo que voy por nuevas metas, por eso más que un familiar lo considero un gran amigo.

LINDBERGH ARBILDO TELLO.

DEDICATORIA

A Dios por darme la Sabiduría, fuerzas y valentía para enfrentar este camino duro pero provechoso con mucha Fe y atravesar los obstáculos en mi vida.

A mis padres Roosvelth Pérez Hidalgo y Rosa Leonila Macedo Ríos por darme la vida y sus enormes apoyos en todo momento, por los consejos, las enseñanzas, el ejemplo, el respeto y la admiración que les tengo el cual me fortalece día a día.

A mis hermanos Abraham, Licenia, Hortencia, Roosvelth, Juan Carlos, Claudio M., Rosita A. y Segundo por sus apoyo moral y económico en mi vida universitaria.

A Elizabeth por darme todo su amor y apoyo incondicional, por enseñarme a ver la vida con nuevas perspectivas y su fiel compañía en todo momento.

JORGE EDUARDO PÉREZ MACEDO.

RECONOCIMIENTOS

Esta Tesis lo realizamos bajo el asesoramiento y la dirección de nuestros Maestros: Ingeniero Julio Arce Hidalgo y el Químico Farmacéutico Luis Alberto Vilches Alcalá, a quienes expresamos nuestro respeto y mas sinceros agradecimientos por el fortalecimiento personal y profesional.

A nuestra prestigiosa Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNAP, a sus Directivos y trabajadores que nos brindaron sus apoyo en nuestros estudios, a los Docentes quienes compartieron sus conocimientos, enseñanzas y consejos para formarnos con calidad y hacer de nosotros excelentes profesionales.

A los miembros del jurado examinador Ing. Reyna Gladys Cárdenas de Reátegui, Ing. Cleto Jara Herrera, Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong, por sus valiosas sugerencias que nos permitieron culminar el trabajo de investigación.

Al Laboratorio de RMN, Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP-Lima) y el área de Fitoquímica y Recursos Naturales de la UNAP, por permitirnos hacer uso de sus instalaciones.

A todos aquellos familiares, amigos y conocidos que de una u otra forma colaboraron en la realización de este trabajo de investigación.

Muchas gracias.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen.....	02
Abstract.....	03
Dedicatoria.....	04
Reconocimientos.....	06

CAPITULO I

1.1. Introducción.....	11
1.2. Planteamiento del Problema.....	15
1.2.1. Formulación del Problema.....	17
1.3. Objetivos.....	18
1.3.1. Generales.....	18
1.3.2. Específicos.....	18

CAPITULO II

2.1. Marco Teórico.....	20
2.1.1. Antecedentes.....	20
2.1.2. Identificación Taxonómica de la Especie.....	24
2.1.3. Procedencia.....	24
2.1.4. Descripción Botánica.....	25
2.1.5. Distribución Geográfica.....	27
2.1.6. Propiedades Medicinales.....	28
2.1.7. Consideraciones generales de los compuestos químicos de las Euforbiáceas.....	29
2.1.8. Aspectos Farmacológicos.....	31
2.1.9. Alcaloides.....	32
2.1.9.1. Clasificación de Alcaloides.....	34
2.1.10. Biogénesis.....	37
2.1.11. Determinación Cualitativa de Alcaloides.....	43
2.1.12. Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	44
2.1.13. Determinación de las Pruebas Fisicoquímicas.....	46
2.1.14. Determinación del Peso molecular por el Método clásico de Rast.....	47
2.1.15. Determinación de la estructura química por RMN.....	48
2.1.15.1. Espectrometría de RMN de protones.....	53

2.1.15.2. Espectrometría de RMN de C-13.....	58
2.2. Definiciones operacionales.....	60
2.2.1. Variable Independiente.....	60
2.2.2. Variable Dependiente.....	60
2.2.3. Operacionalización de las variables.....	61
2.3. Hipótesis.....	63

CAPITULO III

3.1. Metodología.....	65
3.1.1. Tipo de Investigación.....	65
3.1.2. Diseño de la Investigación.....	66
3.1.3. Población y Muestra.....	66
3.1.4. Procedimiento de recolección de datos.....	67
3.1.5. Criterios de Inclusión y Exclusión.....	67
3.1.6. Ubicación.....	68
3.2. Procedimiento Experimental.....	70
3.3. Materiales, Instrumentos y Reactivos de Laboratorio.....	82

CAPITULO IV

4.1. Resultados.....	85
4.2. Discusión.....	90
4.3. Conclusiones.....	92
4.4. Recomendaciones.....	93
4.5. Bibliografía.....	94

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo N° 1. Constancia del Herbarium Amazonense de la UNAP-CIRNA.....	101
Anexo N° 2: Procedimiento experimental del rendimiento de Taspina aislada de 2 muestras de <i>Croton lechlerii</i> (Sangre de grado) de las cuencas del Nanay (Bajo) y Napo (Alto) respectivamente.....	102
Anexo N° 3. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN H ⁺) San Pablo de Cuyana Nanay (Bajo).....	103
Anexo N° 4. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C (RMN C-13) San Pablo de Cuyana Nanay (Bajo).....	104
Anexo N° 5. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN H ⁺) Santa María del río Curaray (Alto).....	105
Anexo N° 6. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN C-13) Santa María del río Curaray (Alto).....	106
Anexo N° 7. Certificado de los Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y Carbono 13 (RMN H ⁺ ; C-13) S.P. Cuyana Nanay Bajo.....	107
Anexo N° 8. Certificado de los Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y Carbono 13 (RMN H ⁺ ; C-13) S.M. Curaray Napo Alto.....	108
Anexo N° 9. Imágenes del Látex de Sangre de grado y Taspina aislada.....	109

LISTA DE CUADROS	Pág.
Cuadro 1 Especies de Sangre de gado reportados en el Perú.....	27
Cuadro 2 Tamizaje Fitoquímico del látex de Sangre de grado (<i>Croton lechlerii</i>).....	8
5	
Cuadro 3 Cantidad de Taspina aislada del látex de Sangre de grado (<i>Croton lechlerii</i>).....	86
Cuadro 4 Determinación del rendimiento de Taspina aislada de las muestras de <i>Croton lechlerii</i> (Sangre de grado), procedentes de las cuencas de los ríos Nanay (Bajo) y Napo (Alto) respectivamente.....	86
Cuadro 5 Resultados de las pruebas físico-químicas de la Taspina aislada de las 2 muestras de <i>Croton lechlerii</i> (Sangre de grado).....	87

LISTA DE IMÁGENES.	Pág.
Imagen 1. Tumba del árbol de Sangre de grado y aplicación de las técnicas de cortes transversales.....	85
Imagen 2.- Recolección del látex de Sangre de grado.....	85
Imagen 3. Látex de sangre de grado (<i>Croton lechlerii</i>).....	109
Imagen 4. Hojas e inflorescencia del árbol de sangre de grado (<i>Croton lechlerii</i>).....	109
Imagen 5. Hojas y fruto del árbol de sangre de grado (<i>Croton lechlerii</i>).....	109
Imagen 6. Látex de Sangre de Grado Procedentes de la Cuenca del Nanay (Bajo) y Napo(Alto).....	110
Imagen 7. Colocar cloroformo a la Muestra de látex.....	110
Imagen 8. Agitación de Solución.....	110
Imagen 9. Separación la fase clorofórmica y fase acuosa.....	111
Imagen 10. Fase clorofórmica.....	111
Imagen 11. Látex de Sangre de grado llevado a sequedad.....	111
Imagen 12. Taspina aislada (Color amarillo).....	112

Imagen 13. Recristalización de Taspina.....	112
Imagen 14. Peso de la Taspina Cristalizada.....	112

LISTAS DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1. Otros alcaloides del látex de <i>Croton lechlerii</i>	37
Figura 2. Alcaloides de la hoja de <i>Croton lechlerii</i>	37
Figura 3. Vía de la Formación de la Aporfina a Partir de Feniletilamina.....	38
Figura 4.- Biosíntesis de la Taspina.....	40
Figura 5. Dimero complejo II.....	41
Figura 6. Reacción del N-butil-litio.....	41
Figura 7. Reacción con I ₂ (IV).....	41
Figura 8. Estructura de Taspina en medio de Dioxano y Bu ₃ Sn.....	42

CAPITULO I



1.1. INTRODUCCIÓN

Este estudio tiene el propósito de determinar el rendimiento de Taspina de dos muestras auténticas de sangre de grado (*Croton lechlerii*) procedentes de las cuencas de los ríos amazónicos: Nanay (Bajo) y Napo (Alto). Es importante conocer cuál de estas cuencas tiene mejores aptitudes agroforestales, que servirá para promover su óptimo cultivo, ya que se trata de una planta medicinal cuyo látex tiene gran demanda en el mercado nacional e internacional por el contenido de Taspina alcaloide dilactónico de amplias propiedades medicinales como: cicatrizante, antihemorrágico, antileucémico, antihemorroidal, etc. ⁽²⁾

Pues siendo ambas muestras de la misma familia, especie y género es posible que exista entre ellos una variación del rendimiento de Taspina debido al medio donde crecen y se desarrollan, y en función de las respuestas adaptativas que genera ⁽¹⁵⁾, esto quiere decir una evolución surgida por variación interespecífica según el lugar de origen, suelos de aparición reciente y de expansión geográfica más septentrional o suelos antiguos de procedencia rocosa ⁽³⁶⁾. También puede variar el rendimiento según el ciclo vegetativo, momento de floración o de fructificación tiempo de cosecha dando lugar a las variaciones de los componentes, finalmente los factores del entorno, condiciones climáticas naturales del suelo, influyen directamente en la presencia de Taspina ⁽³⁶⁾.

Nuestro estudio pretende resolver la disyuntiva respecto a cuál de las cuencas posee las condiciones que le ofrece el medio en el que se desenvuelve para biosintetizar la Taspina en mayor cantidad. Por otro lado se brindará información necesaria para alentar su cultivo masificado y responder a las demandas y exigencias del mercado nacional e internacional.

En la actualidad el látex de sangre de grado (*Croton lechlerii*), no es solo usado por los nativos amazónicos sino que se ha constituido en un producto de importancia económica mundial a tal punto que son elocuentes las cifras estadísticas de producción del látex de sangre de grado (*Croton lechlerii*) señalados por Nalvarte W. et al en su libro “Plantas Amazónicas de uso Medicinal”, en una proyección de la producción anual al 0.5% en el año 2013 esta era de 6,471 litros, en este año (2014) será de 6503 litros. Cifra muy conservadora, por cierto pero que demuestra que cada vez es mayor la demanda de Sangre de grado por sus propiedades curativas⁽²⁴⁾.

Según Meza E., en su libro “Sangre de Grado”, la producción que se viene logrando bajo criterios sustentables del látex de Sangre de grado se está exportando a los países siguientes: EE.UU, Francia, Rusia, Italia, Lituania y Chile a los que se ha sumado la India y ha producido ingresos para el país por un monto de 1'420,800 dólares aproximadamente⁽²⁰⁾. No se dispone de datos confiables informado por los productores, pero de seguro la demanda supera largamente las cifras del volumen de oferta; por no haberse aperturado otros mercados.

La Taspina en el Canadá se aísla del trébol rojo, pero el rendimiento es del 0.1%, la Sangre de Grado aporta un rendimiento de 0.7% según un estudio realizado por Mustiga M. de una muestra procedente de Loreto, sin precisar específicamente de que parte de la Región⁽²³⁾.

Desde que se iniciaron los estudios fitoquímicos y ensayos biológicos con sangre de grado, se han registrado cuatro patentes americanas, de las cuales sólo una que es la SP-303 de la SHAMAN PHARMACEUTICAL INC, tuvo éxito con el desarrollo de un producto farmacéutico de nombre comercial PROVIR que se introdujo en el mercado en 1999, para el

tratamiento de la diarrea ocasionado por *cryptosporidium* en pacientes con SIDA ⁽³⁴⁾, actualmente SHAMAN PHARMACEUTICALS INC se ha desactivado y vendido sus acciones que han pasado a otras empresas pero durante su existencia promovieron las plantaciones de ***Croton lechlerii*** en las zonas de Puerto Inca departamento de Huánuco e Iquitos departamento de Loreto, sin embargo existen limitaciones en cuanto al tipo de suelo en el que se debe realizar los sembríos ya que la procedencia geográfica da lugar a la formación de quimiotipos (razas químicas) ⁽¹⁹⁾, que son responsables de la variación en el contenido de principios activos (por ejemplo: el *Croton lechlerii* del Ecuador contiene Magnoflorina precursor químico de Taspina, pero poca cantidad de Taspina)⁽²²⁾. Sin embargo actualmente existen empresas como: Laboratorios PCUP, laboratorios JALK, laboratorio de INDUQUÍMICA. INKANAT, HERSIL, entre otros que se encuentran interesados en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos a partir de la Taspina aislada de la Sangre de grado (*Croton lechlerii*), en donde la información científica referida a la reforestación de Sangre de grado en el Perú, viene siendo coordinada con el Ministerio de agricultura, organizaciones indígenas, organizaciones no gubernamentales, etc.

El inconveniente que tiene el beneficio del látex de Sangre de grado es que se derriba el árbol para extraerlo. Un árbol produce en promedio diez litros de látex dependiendo de la edad y el tamaño.

El árbol puede ser beneficiado a partir de los 5 años de edad, arboles de más edad por cierto presentan mayor cantidad de látex, hasta 40 litros según refieren pobladores del Caserío San Pablo de Cuyana (Bajo Nanay). Para salvar el inconveniente señalado y evitar que la planta pueda extinguirse por una extracción continuada es preciso que se

desarrolle un plan de reforestación teniendo en cuenta la elección de aquellas cuencas donde el látex arroje un mayor rendimiento de Taspina.

El cultivo y repoblamiento de la Sangre de grado es alentador porque tiene más ventajas comparativas en relación a cultivos alternativos a la coca, café, cacao, más aun si se pretende vender la producción del látex a los laboratorios farmacéuticos para obtener Taspina, alcaloide que posee un valor superior a la cocaína.

Un kilo de Taspina de alta pureza cuesta U\$. 250,000 dólares, mientras que un kilo de cocaína según Aldrich catológ. Fine Chemical 2001, cuesta U\$. 80,000 dólares. Con 6503 litros de látex de Sangre de grado se puede obtener 81.3 Kg de Taspina al precio de 250,000 dólares/Kg; la ganancia fuera de 20'325,000 dólares; razón para que esta actividad genere puestos de trabajos para los campesinos asentados en las cuencas de los ríos donde los arboles poseen altos rendimientos de Taspina, propiciando la posibilidad de desarrollar una industria de Química-fina (Fine Chemistry) de productos naturales en base al precio alentador de la Taspina en el mercado internacional⁽³⁾.

Por esta razón el estudio propone determinar dos muestras de sangre de grado; una procedente de las afueras de Iquitos de la Cuenca del bajo Nanay centro poblado de San Pablo de Cuyana de donde se abastece a la ciudad de Iquitos, y otra procedente de la cuenca del rio Napo centro poblado de Santa María del Rio Curaray que también provee de Sangre de grado a la ciudad de Iquitos.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Croton lechlerii (Sangre de grado), es una de las plantas amazónicas con mayor demanda por el tratamiento casero de hemorragias producidas accidentalmente por cortes, heridas sangrantes y como cicatrizante debido a la presencia del alcaloide conocido como taspina que induce migración fibroblástica para regenerar el tejido conectivo lesionado. Es ampliamente conocida a tal punto que su demanda resulta ser cada vez mayor debido a una serie de factores entre los cuales debemos destacar en muchos casos el conocimiento preciso de su composición química, y el hecho de que en la actualidad dicha utilización se fundamenta en numerosos ensayos farmacológicos *in vivo* como *in vitro*, así como en ensayos químicos. También se da el caso de que muchas veces la Sangre de grado se ha empleado de forma empírica basada en la tradición curanderil, pero hoy tiene una base científica que cimienta y afirma el esfuerzo logrado por la medicina tradicional, por eso es grande su demanda al punto tal que quienes venden el látex de sangre de grado tratan de adulterarlo, desnaturalizando la actividad biológica del principio activo y poniendo en descrédito su valor medicinal. En Iquitos la mayor cantidad de sangre de grado que se oferta en el mercado proviene de dos cuencas⁽³⁾:

- Cuenca Baja del río Nanay: Centros Poblados (3 unidos y San pablo de cuyana).
- Cuenca Alta de río Napo: Centros Poblados (Santa Clotilde y Santa María del río Curaray).

Otro aspecto importante que se debe hacer notar es que resulte difícil certificar su pureza y calidad debido a que el mercado de Productos Naturales ubicado en el Pasaje “Paquito” de la ciudad de Iquitos donde

su venta es ambulatoria y no cuentan con Registro Sanitario, ni pruebas de certificación; no se conoce las características que existe entre la Sangre de grado de la cuenca del río Nanay (Bajo) y el de la cuenca del río Napo (Alto), es otra de las razones por lo que nuestro estudio se propuso determinar el contenido de Taspina de 2 muestras auténticas de sangre de grado procedentes de estas cuencas para conocer con certeza cuál de estas posee mayor rendimiento. Es sabido que los principios activos de una planta varían en rendimiento según el suelo, clima, altitud; aspectos que intervienen directamente en su biogénesis y crean nuevos quimiotipos como parte de su ventaja adaptativa ⁽⁵⁾, además de señalar la vegetación a la que se halla asociada, etc ⁽²³⁾ ⁽²⁴⁾.

1.2.1.FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Es posible determinar el rendimiento de Taspina aislada de 2 muestras de *Croton lechlerii* (Sangre de grado) procedentes de las cuencas del Bajo Nanay y Alto Napo respectivamente?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. GENERAL:

Determinar el Rendimiento de Taspina aislada de dos muestras auténticas del látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*) procedente de las cuencas del Bajo Nanay y del Alto Napo respectivamente.

1.3.2. ESPECÍFICOS:

- Obtener el látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*).
- Aislar el alcaloide di-lactónico Taspina de dos muestras del látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*).
- Determinar el rendimiento de Taspina de ambas muestras, y señalar cual es la cuenca más promisoría.
- Identificar por espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y de ^{13}C , las muestras de Taspina aislada.

CAPITULO II



2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1. ANTECEDENTES:

Croton lechlerii (Sangre de grado), es una planta amazónica de la familia de las Euforbiáceas de relativa abundancia en los bosques de la amazonia y ampliamente usado como cicatrizante, antihemorrágico y antiinflamatorio, el principio activo principal de esta planta se llama taspina y se halla mezclado junto con saponinas, proantocianinas, magnoflorina, y triterpenos tales como: eufol, forbol y tirucalol ⁽⁹⁾. Al aplicar el látex sobre la hemorragia causada por una lesión abierta en la piel o el músculo rápidamente se detiene esta; mas no debe usarse cuando hay heridas con hematomas y tumefacción a la vez porque se crearía una falsa costra que evitaría el drenaje de pus. ⁽³⁷⁾

Por analogía de su actividad cicatrizante sobre heridas externas limpias (sin presencia de patógenos) se cree que también puede usarse en el tratamiento de úlceras internas sangrantes en pequeñas cantidades (4 gotas por litro de agua), se usa para el tratamiento de la gastritis ⁽³⁷⁾; pero no es menos cierto que contiene además clerodanos y dos sustancias tóxicas cocarcinogénicas activas (eufol y forbol), presente en la mayoría de plantas del género *Croton* y que cuando son usados en cantidades mayores a una dosis homeopática puede manifestarse sus efectos adversos ⁽³⁸⁾.

También cabe hacer mención la presencia de flavonoides condensados (proantocianinas) utilizados en el tratamiento de diarreas por *cryptosporidium* común en las personas que padecen SIDA ⁽³⁷⁾, contiene saponinas que contribuyen en detener las hemorragias que si bien son

importantes quedan minimizados por la ostensible actividad cicatrizante de la Taspina considerado como su principal y más activo constituyente.

Persinos and col. 1979, aislaron del látex de *Croton lechlerii* (Sangre de grado), la Taspina, esta constatación tardía se debió al interés de conocer cuál es el principio activo beneficioso que proporciona el uso del látex como cicatrizante, antihemorrágico, antiangiogeno, antiulceroso, etc. ⁽²⁶⁾

Mustiga M. en 1982, aisló la Taspina de una muestra de sangre de grado procedente de la selva Amazónica, no se señala exactamente el lugar de procedencia ⁽²³⁾.

Milla M.E. 1985 estudió el mecanismo de acción de la Taspina y encontró que en forma de clorhidrato muestra citotoxicidad por encima de 300 mg/ml ⁽²²⁾.

Vaisberg A, Millan J. 1989, trabajando con Taspina aislada de una muestra de Sangre de grado procedente de Iquitos y también con el mismo látex encontró actividad cicatrizante, debido a que este alcaloide induce migración fibroblástica cuando actúa sobre las células del tejido conjuntivo ⁽³⁶⁾.

Málaga G.E. en 1991, encontró que la Taspina posee actividad cicatrizante en úlcera gástrica, inducida en ratas ⁽¹⁹⁾, lo que verifica en cierto modo el uso popular que se da a la sangre de grado en esta enfermedad en mínimas cantidades

La Taspina se caracteriza por promover la formación de fibroblastos y colágeno hasta la formación del cicatrizal contrariamente como señalan ciertos autores que atribuyen a la Taspina propiedades cocarcinogénicas,

su actividad antiangiogena le permite más bien inhibir la formación de vasos sanguíneos que impide la proliferación del cáncer y su reducción ha sido comprobada en una prueba empírica realizada con la señora Delfina Huayta anciana de 78 años de edad de la localidad de Padre Cocha (Rio Nanay) que sufre de un cáncer de piel localizado en la nariz, conocido como carcinoma basocelular, a la que se aplicó Taspina en crema promoviendo la forma de cicatrizal y deteniendo la formación de vasos sanguíneos, experimento que no continuo por las limitaciones económicas ya que un estudio serio demanda de un grupo profesional multidisciplinario y con manejo de recursos económicos adecuados⁽³⁾ (22).

Los arboles de sangre de grado (*Croton lechlerii*) según su hábitat varían en su contenido de Taspina, esta variación inter específica puede ser atribuida al suelo, pH, y otras condiciones geomorfológicas y ambientales, pero también a su edad, un árbol de menos de 5 años tiene un bajo rendimiento de Taspina, es sabido que la sangre de grado que crece en terrenos de arcilla rojiza con presencia de fierro contiene mayor cantidad de Taspina en relación con aquellas plantas que crecen en terrenos bajos y arenosos. La presencia de rafidios (cristales de oxalato de calcio) en el látex da un indicio acerca de la presencia de Taspina⁽³⁶⁾.

Hay una ostensible variación de Taspina en el látex según la zona de donde provenga, por ejemplo si se compara el látex de sangre de grado de Perú con el del Ecuador, se observa que en el látex del Perú la Taspina se presenta como el componente principal, mientras que en el látex de Sangre de Grado de Ecuador se presenta en pequeñas cantidades pero contiene mayor cantidad de Magnoflorina que es un precursor de la Taspina⁽²⁰⁾, al punto tal que Shamma Maurice and Moniot J.L. lograron la síntesis de la Taspina a partir de Magnoflorina⁽²⁸⁾.

Por ser un alcaloide que tiene una amplia respuesta biológica debido a su estructura lactónica ha despertado grandes expectativas como molécula anticancerígena y se viene probando con variedades de cáncer sobre las que tiene respuesta antiangiogena frente a la enzima que segrega el cáncer para generar vasos sanguíneos y logra su actividad invasiva, además de su probada actividad cicatrizante, tiene potente actividad anti-inflamatoria y anti-hemorroidal que supera largamente la actividad de cualquier fármaco anti-hemorroidal por ejemplo: “Hemorrodil, Venocurón, Scheriproct, etc⁽²²⁾”.

Casi siempre la sangre de grado (*Croton lechlerii*) adquirido en el mercado de “Productos Naturales” de Iquitos (Psj. Paquito) es adulterado y no existe patrón de comparación que pruebe su autenticidad. Los organismos de control como INDECOPI y DIGEMID no poseen infraestructura para realizar el control de calidad, pero la adulteración permite que un producto natural de innatas bondades se desacredite y pierda interés.

Cuando la Sangre de grado se aplica como remedio casero, la exigencia de saber si posee Taspina no tiene mayor importancia, más si se pretende exportar para obtención de Taspina; requiere de certificación, un buen control de calidad y rendimiento de este alcaloide en el látex.

2.1.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE

Las muestras de las que obtuvimos el látex procedentes de las cuencas de los ríos Nanay (Bajo) y Napo (alto) respectivamente. Para la realización del presente estudio se recolectaron las hojas, flores y frutos; la muestra tanto del látex como de flores y fruto procedente de la Cuenca del Río Napo (alto) fue recolectada por el alumno de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Santa María del Curaray (Alto), los cuales fueron identificados en el Herbarium Amazonense de la UNAP- CIRNA (ver Anexo N° 1) por comparación con aquellas exsicatas que obran en el estante de especies clasificadas que de acuerdo con las consideraciones Filogenéticas de Judd, Campbell, Kellogg, Meza, Stevens y Donoghue esta especie vegetal responde a la jerarquización siguiente:

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsidae
- Orden: Malphygiales
- Familia: Euforbiaceae
- Subfamilia: Crotonoideae
- Género: Croton
- Especie: *Croton lechlerii*. Muell-Arg
- Nombre Vulgar: “Sangre de grado”, “Sangre de drago” (Perú), blood (USA), Sangre de grado (Bolivia), Sangre de dragão (Brasil), Sangre grado (Colombia), Sangre de drago y balsa macho (Ecuador).⁽²⁰⁾

2.1.3. PROCEDENCIA:

Cuencas de los ríos Nanay (Bajo) y Napo (Alto).

2.1.4. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:

Es un arbusto que luego adquiere las características de un árbol y puede alcanzar hasta 20 metros de altura, se caracteriza por tener copa amplia, globosa y redondeada; corteza de color grisáceo blanquecino, en la cual se encuentran vasos laticíferos donde se halla un látex de color rojo vinoso o color “sangre” de donde proviene su nombre. El látex no es cáustico como el de *Hura crepitans* (Catahua) sumamente venenoso e ictiófago.⁽¹⁵⁾ (Ver Imagen 3).

Posee hojas usualmente alternas, algunas veces opuestas, simples, enteras, aserradas con venación pinnada⁽¹⁵⁾.

Los Crotonoideos tienen polen poliporato (granos de polen con muchas aberturas semejante a los poros). La flor carpelada posee alrededor numerosas flores unisexuales estaminadas cada una de las cuales es reducida a un simple estambre dentro de una estructura semejante a copa formada de una inflorescencia cimosa. (Ver Imagen 4).

Brácteas asociadas con una o cinco glándulas nectáreas, algunos semejantes a pétalos añadidos, están asociados al eje de la estructura semejante a copa de cada Cyathium (unidad de inflorescencia cimosa parecida a copa).

Pétalos usualmente de 0-5, distintos a los débilmente connatos, valvados o embrionados, estambres de uno a numerosas carpelos, usualmente tres connatos, con placentación axilar; ovario súpero.⁽¹⁵⁾

Son polinizados por moscas, abejas, avispa y mariposas cuyo néctar es el atrayente floral, probablemente pueden también ser polinizadas por

pájaros, murciélagos y otros mamíferos. El fruto es esquizocarpo, con semillas lisas. ⁽¹⁵⁾ (Ver Imagen 5).

El género *Croton* es cosmopolita en América tropical y subtropical se ha identificado unas 400 especies, varios de las cuales son venenosas y otras tienen aplicación medicinal por ejemplo *Croton palanostigme*, *Croton cuneatum* y *Croton cajucara* usado en Brasil en perfumería.

La sangre de grado (*Croton lechlerii*) es una especie ampliamente conocida y requerida principalmente por sus propiedades medicinales. Contiene el alcaloide Taspina de acción cicatrizante, biogenéticamente derivado de un precursor conocido como magnoflorina, además presenta proantocianidinas oligoméricas (SP-303). Especies de esta familia presentan agentes antitumorales y alcaloides como: Piridona, indolaporfina, quinoleína, tropano, ácidos grasos insaturados, antraquinonas, epoxi-ácidos-grasos, triterpenoides. Del género *Croton*, se han aislado 30 alcaloides, 22 con estructura conocida, siendo los principales: Solutaridina, taspina, sinoacutina, sparciflorina ⁽²⁹⁾.

También se encuentra ácido benzoico, pigmentos, taninos y otros compuestos ⁽²⁹⁾. En cantidades relativamente pequeñas por ejemplo cuatro gotas diluidas en un litro de agua se usa para la gastritis producido por *Helicobacter pylori*, para lavados vaginales para combatir lesiones producidas por *Candida albicans*, es activo contra *Trichophyton mentagrophytes*, que produce tiña asociada a *Epidermophyton floccosum* contra cuyo hongo también es activo. ⁽¹⁹⁾

2.1.5. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La familia de la Euforbiácea crece en los trópicos húmedos así como en las zonas templadas de ambos hemisferios, cuenta con más de 250 géneros y 7500 especies ⁽³¹⁾, de este grupo en el Perú sobresale el género *Croton* con 51 especies, de las cuales 6 producen látex conocidos como “Sangre de Grado” ⁽¹⁸⁾; utilizado en la medicina tradicional principalmente para el tratamiento de hemorragias y en la cicatrización de heridas. (Ver cuadro N° 1)

Cuadro N° 1.- Especies de Sangre de Gado reportadas en el Perú

Especie	<i>Macbride (1964)</i>
<i>C. draconoides</i> M.Arg	Selva Peruana
<i>C. erythrochilus</i> M.Arg.	Tumbes, Huánuco, Pozuso, Cuzco.
<i>C. lechleri</i> M.Arg.	Tarapoto, Huánuco, Yurimaguas, Quillabamba, San Gabán, Pongo de Manseriche.
<i>C. perpeciosus</i> Croizat	San Martín, Ayacucho, Cuzco, Pazco.
<i>C. palanostigma</i> Klotzsch.In Hook.	Tarapoto, Morona cocha, Misuyacu, Rio Nanay.
<i>C. sampatik</i> M.Arg.	Chicoplaya, La Merced

La sangre de grado habita en los bosques primarios, de la Amazonia continental: Brasil, Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú; pero también en áreas disturbadas, en la ribera de los ríos, que han cambiado de curso y en áreas deforestados donde las semillas experimentan un rápido crecimiento, encontrándose también en bosques secundarios. ⁽²⁴⁾

En el Perú crece en la selva alta y selva baja en mayor profusión en Selva baja. En Loreto existe plantaciones sembrados haciendo uso de métodos agroforestales en san Pablo de Cuyana (Bajo Nanay), Mazan (Amazonas), cuencas del río Napo (Alto Curaray) y en el distrito de Calleria (Pucallpa). ⁽³⁾

2.1.6. PROPIEDADES MEDICINALES

Croton lechlerii (Sangre de grado) resulta ser una de las plantas más reconocidas en la Amazonia peruana por sus propiedades medicinales, ya que posee un principio activo antihemorrágico que detiene rápidamente el sangrado por cortaduras en la piel u otras partes del tejido conjuntivo, y que cuando no es muy pronunciado la herida con su aplicación se evita su suturación y cuando cicatriza no deja huellas visibles o queoideas pues como cicatrizante promueve migración fibroblástica, es decir traslación de células jóvenes procedentes del mesénquima con cuerpo fusocelular y núcleo alargado, que intervienen en la formación de sustancia intercelular del tejido conjuntivo (sustancia cementante ante un corte o herida) al final de dicha actividad secretora se convierte en fibrocito (célula fija de tejido conjuntivo alargado, con abundantes prolongaciones y dotado de un núcleo ovalado que es la forma de reposo del fibroblasto).^{(8) (36)}

Ya Cai et al, citado por Whitson Anna señala que *Croton lechlerii* es activo contra *Escherichia coli*⁽³⁷⁾. Unas pocas gotas en agua se puede beber para cortar la diarrea⁽³⁷⁾. La determinación de los metabolitos secundarios de *Croton lechlerii* así como los ensayos biológicos son importantes para corroborar y/o rechazar la información etnobotánica y etnofarmacológica acopiada acerca de sus propiedades.

La Taspina es el alcaloide dilactónico de Sangre de Grado que tiene acción antiinflamatoria aplicada siguiendo diversos modelos farmacológicos; la Taspina como clorhidrato muestra actividad cicatrizante en pruebas in vivo con ratones debido a que promueve migración fibroblástica dando lugar a que células jóvenes procedentes del mesénquima (tejido conjuntivo embrionario) con cuerpo fusocelular y

núcleo alargado intervienen en la formación de sustancia intercelular del tejido conjuntivo y al finalizar la actividad secretora forman los fibrocitos que conforman el tejido conjuntivo. ⁽³⁶⁾

2.1.7. CONSIDERACIONES GENERALES DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS EUFORBIÁCEAS.

Casi todas las euforbiáceas contienen vasos lactíferos que producen látex y otras sustancias que metaboliza diferentes contenidos y grados de toxicidad por ejemplo la yuca brava (*Manihot esculenta*) contiene una sustancia venenosa conocido como fase o lunatina una glucocianoacetona que por calentamiento se desdobra el ácido cianhídrico y acetona quedando la glucosa libre en el jugo, que los nativos lo utilizan para preparar una salsa negra conocida como Tucupi. ⁽³⁵⁾

Euforbiáceas como *Hura Crepitans* (Catahua) contiene un látex blanco con presencia de ácido oxálico en forma de Oxalato de calcio de propiedades causticas y una lectina muy tóxica conocida como Hurina usada en la actualidad para el aglutamiento de células malignas, aglutinan los glóbulos rojos de la sangre en ciertos casos con un alto grado de especificidad, motivo por cual es usado para tipificar sangre humana. ⁽¹²⁾

Los géneros *Croton*, *Euforbia*, *Hura* y *Jathropa* contienen diterpenos relacionados con los esqueletos del Tigliano (Ej. Forbol que tiene propiedades cocarcinogénicas), sobre todo presente en *Croton Tiglium*; con esqueleto Dafniano (Ej. Resiniferol); con esqueleto Ingenano (Ej. Ingenol). Los compuestos de esqueleto tigliano, dafniano, Ingenano son irritantes de la piel y mucosas, citotóxicos; paradójicamente a pesar de la actividad cocarcinógena del forbol exhibe propiedades antileucémicas in

vitro y es modelo molecular de importancia para pruebas experimentales en la inducción de cáncer.⁽¹⁹⁾

Jathropona aislada de *Jathropa gossypifolia* posee propiedades inhibitorias de tumores; mientras que la *Jathropa tatrira* aislada de *Jathropa microrhiza* si bien no presenta la lactona insaturada posee actividad antitumoral debido a la presencia de una dienona. De *Jathropa glandulifera* (Roxb) se ha aislado dos naftoquinonas:

- Alcanina y alcanan que se utiliza para colorear alimentos y cosméticos se ha aislado de *Jathropa curcas* (Piñon).⁽¹¹⁾

En el extracto etanolico de *Croton californicus*, Wilson Stephen et al 1976 ha aislado un componente diterpénico conocido como metilbarbascoato de los denominados transclerodanos moléculas que provienen de un reordenamiento de grupos metilos. *Croton lechlerii* (Sangre de grado), contiene además de Taspina, esterés eufólicos y forbólicos cocarciogénicos se usan como modelos moleculares para inducir cáncer en animales de experimentos. Contiene proantocianinas que le dan el color rojizo al látex y tiene propiedades antioxidantes y antidiarreicas, en diarreas producidas por *Criptosporidium* muy frecuente en los que padecen de SIDA⁽³⁸⁾.

En *Croton lechlerii* también está presente un neolignano, el 4-O-metilcedrusina-2-(3',4'dimetoxifenil)-3-hidroximetil-2,dihidro-7-hidroxibenzofurano-5-propan-1-ol⁽²⁰⁾; de los extractos clorofórmicos del látex de *Croton lechlerii* es posible aislar los compuestos siguientes: 1,3,5-trimetoxifenil, 2,4,6-trimetoxifenil, 3,4-dimetoxifenil, 3,4-dimetoxifenil alcohol, 4-hidroxifenilato alcohol y su acetato, también se obtiene Sitosterol, sitosterol- β -D-glucopiranosido y β -Sitostenona.⁽²⁰⁾

Desmarchelier et al 1997, calculó el potencial total de reactividad antioxidante en un sistema de generación de radicales peróxidos (H₂O₂).⁽⁷⁾

El TRAP (potencial total de Reactividad antioxidante frente a peróxidos), se mide en equivalente de TROLOX necesarios para suprimir la quimioluminiscencia emitida por el sistema ABAP/ luminal. El TRAP calculado para el látex crudo de Sangre de grado fue de 935.4 + 141 micromoles (µm), a bajas concentraciones, el látex de sangre de grado incrementa la luminiscencia lo que sugiere que posee actividad pro-oxidante.⁽⁷⁾

2.1.8. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS:

La Taspina es una molécula con amplias alternativas bioactivas en el tratamiento del cáncer (leucemia y carcinoma baso celular) asociado a otros medicamentos por sus propiedades antiangiogénicas (inhibidor de la producción de vasos sanguíneos que evita la proliferación del cáncer); como antihemorrágico, en el tratamiento de hemorroides, cicatrización de úlceras y como antimicrobiano⁽²⁾.

- Según Persinos la Taspina y el clorhidrato de Taspina exhiben propiedad anti-inflamatoria.⁽²⁵⁾
- Según Lewis W. H. et al, posee actividad antiulcerosa.⁽¹⁷⁾
- Según Itokawa et al tiene actividad citotóxica.⁽¹⁴⁾
- Según Sethi M.L actúa como inhibidor de la polimerasa viral del ADN.⁽³⁰⁾

Comparando fenilbutazona 200-250 mg/kg de peso con 58 mg/kg dosis efectiva oral media de Taspina, resulta ser que Clorhidrato de Taspina es

3 a 4 veces más potente como anestésico y antiinflamatorio que la fenilbutazona. ⁽²⁰⁾

Planas 1984 aisló Taspina extraída de *Croton Lechlerii* (sangre de grado) y para que sea hidrosoluble la llevó a clorhidrato de Taspina e hizo pruebas cicatrizantes *in vivo* con ratones, al ser administradas en solución acuosa a una dosis de 0.066 mg/ml, observó que posee actividad cicatrizante en las primeras 60 horas del tratamiento.

Según Vaisberg la dosis efectiva típica ED₅₀ es de 0.375 mg/kg el clorhidrato de Taspina aumenta la migración fibroblástica de fibroblastos humanos del prepucio en cultivos celulares. ⁽³⁶⁾

La Taspina inhibe algunos virus que causa cáncer tales como: Sarcoma tipo I (virus del Sarcoma de monos) y la leucemia (virus de la leucemia Rauscher y Murina). ⁽³⁶⁾

Sethi señala que probablemente la Taspina actúa sobre la transcriptasa reversa de los virus que se usan en la replicación viral de células normales, es posible que los inhibidores de esta enzima sean capaces de inhibir cáncer en humano. ⁽³⁰⁾

Chen et al citado por Meza señala que la taspina tiene potente actividad cicatrizante contra células KB y V-79. ⁽²⁰⁾

2.1.9. ALCALOIDES:

Muchos compuestos naturales contienen átomos de Nitrógeno en sus moléculas y pueden ser: aminoácidos, aminoglicósidos cianogénicos, índoles, purinas, pirimidinas, citoquininas, alcaloides, etc. ⁽⁹⁾

Friedrich W. Serturner (1783 - 1841) descubrió en 1816 el principio activo del opio procedente de la amapola que contiene un principio somnífero que dio lugar a que Gay Lussac le denominará morfina en honor al dios griego del sueño “Morfeo”, mientras que Osler le denominó “la medicina de dios” por qué se aplicó contra el dolor y desde ese entonces empezó una revolución en el campo de los anestésicos, además de la peculiaridad de calmar el dolor sin producir hipnosis.

El término alcaloide fue acuñado en 1818 por Wilhelm Meissner para denominar a los compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas, que recuerdan la reacción de los minerales con carácter básico. ⁽¹⁵⁾. Por la posición de los átomos de nitrógeno, muchos de dichos compuestos si bien notables exhiben una basicidad medible en medio acuoso lo que posibilita su aislamiento selectivo de extractos naturales crudos.

Su diversidad estructural y su variada actividad biológica conceden a los alcaloides una gran importancia terapéutica para combatir innumerables enfermedades: malaria, esquizofrenia, cáncer, enfermedades oculares, hipertensión, artritis reumatoide se usa como regenerador del tejido conjuntivo cicatrizante, como emético, como catártico, como estimulante del sistema nervioso, analgésico, etc. ⁽²⁶⁾

Los alcaloides pueden considerarse como compuestos orgánicos de origen natural (generalmente vegetal) con presencia de nitrógeno, donde esté por lo general es intra-cíclico y deriva generalmente de aminoácidos procedentes del par fenilalanina/tirosina, del triptófano, del par ornitina/lisina de la histidina, del ácido nicotínico y pseudo alcaloides ⁽³⁵⁾.

Su distribución está restringida a ciertas familias de plantas: Rubiaceae, Asteraceae, Piperaceae, Solanaceae, Berberidaceae, Papaveraceae,

Celastraceae, Cannabaceae, Menispermaceae, Euforbiaceae, Acantaceae, Convolvulaceae, Asclepidaceae, Malpighiaceae, Miristicaceae, etc.

2.1.9.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES

2.1.9.1.1 De acuerdo con su estructura química

Se clasifican en cuatro clases:

- a) Alkaloides verdaderos: derivan su estructura total o parcial de aminoácidos proviniendo el resto de la vía metabólica del acetato-mevalonato del ácido shikímico o de algunos precursores isoprénicos, tienen siempre un nitrógeno intracíclico, son de carácter básico y existen en la naturaleza en forma de sales.
- b) Proto-alkaloides: son aminas simples con nitrógeno extra cíclico, de carácter básico y provienen del metabolismo de aminoácidos.
- c) Pseudo-alkaloides: Cuando el aminoácido proporciona únicamente el átomo de nitrógeno a través de un proceso de transaminación perteneciendo el resto de la estructura a alguna de las grandes vías metabólicas. ⁽²⁶⁾
- d) Alkaloides Imperfectos: son derivados de bases purínicas y no dan respuestas positivas a los reactivos específicos para alkaloides: Dragendorff, Mayer, Wagner, etc.

2.1.9.1.2. De acuerdo con sus propiedades farmacológicas pueden ser:

a) Modificadores del sistema nervioso central tales como:

a.1. Estimulantes nerviosos: alcaloides de la IBOGA: *Ibogaína*, *Cafeína* (café).

a.2. Alucinógenos: alcaloides del peyote (mezcalina), alcaloides del *Banisteriopsis caapi* (Ayahuasca): Harmina. Harmol, Harmalina harmani y *Psychotria viridis* (chacrana) que asociada con la ayahuasca promueven estados de conciencia alterada al actuar sobre la glándula pineal en la zonas donde se localiza el sistema límbico.

b) Modificadores del Sistema Autónomo:

b.1. Parasimpaticomiméticos de acción directa: tal como la pilocarpina aislada de *Jaborondiantra chinesterasies* o como la eserina aislada de Habas de calabar.

b.2. Para simpaticolíticos: alcaloides de la belladona, alcaloides de efedra, efedrina.

2.1.9.1.3. De acuerdo con su jerarquización botánica:

Pueden ser alcaloides de Solanaceae, nicotina del tabaco, solanidina, solamarina de *Solanum sp.* En Rubiaceae, cafeína, mitrafilina, pteropodina, quinina. Quinidina en Menispermeaceas, biscilisoquinoleinas, etc.

2.1.9.1.4. De acuerdo con su origen biosintético:

- a) Alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos: ornitina, lisina, por ejemplo: hiosciamina de *Brugmansia grandiflora*, cocaína de *Erythroxylon coca*, lupinina de *Lupinus luteus*, etc.

- b) Alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina, triptófano por ejemplo Harmina de *Banisteriopsis caapi*, Yohimbina de *Pansinystalia yohimba*, Ibogaina de *Tabernanthei boga*, Estrictina de *Strychnos toxifera*, Quinina de *Cinchona peruviana*, etc.

2.1.9.1.5. Alcaloides de otros tipos estructurales:

- a) Alcaloides procedentes de la histidina: como dolicotelina de *Dolichotheles phaerica*, pilocarpina de *Pilocarpus spp.*
- b) Alcaloides procedentes del ácido nicotínico: Nicotina de *Nicotiana tabacum*, Ricinina de *Ricinus communis*.
- c) Pseudoalcaloides: como actinidina de *Actinidia polygama*, aconitina de *Aconitum spp.* Tomatina glicoalcaloide esteroideal de *Lycopersicum esculentum*, etc.

2.1.9.1.6. Otros alcaloides de Euforbiaceas.

En *Croton lechlerii* Muell Arg. se encontró además de Taspina, otros alcaloides tales como: Isobaldina (A), Norisocoridina (B), Magnoflorina (C).

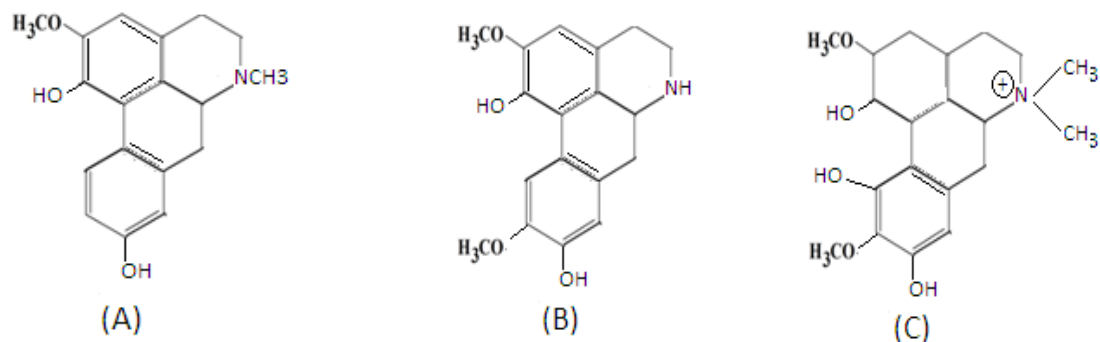


Figura N° 1.- Otros alcaloides del látex de *Croton lechlerii*.

Milanowsky, Dennis J. et al 2002, analizó por HPLC muestras de hojas de *Croton lechlerii* procedentes de Perú y Ecuador, encontrando además de Taspina, Taliporfina (D) y Glaucina (E) ⁽²¹⁾.

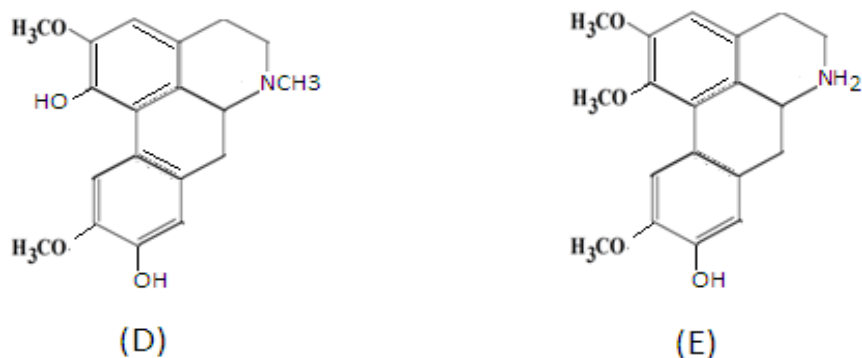


Figura N° 2.- Alcaloides de la hoja de *Croton lechlerii*.

2.1.10. BIOGÉNESIS

Las plantas producen diversos compuestos orgánicos que aparentemente no parecen tener una función directa en su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen como metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Estos compuestos no se relacionan directamente con el proceso de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, formación de

carbohidratos, los cuales forman parte del metabolismo primario de la planta.

Pero el metabolismo primario proporciona las moléculas de partida para las rutas del metabolismo secundario, entre las que se encuentran ⁽³³⁾:

- Ácido shikímico que da origen a muchos componentes aromáticos, aminoácidos aromáticos, ácido cinámico y ciertos polifenoles.
- Aminoácidos: precursores de los alcaloides y antibióticos peptídicos, que incluyen las penicilinas y cefalosporinas.

La Taspina ocupa una única posición en el dominio de la química de los alcaloides encontrado por Platanova T.F et al (1965) en *Leontice eversmanni* (*Berberidaceae*) ⁽²⁷⁾. Aunque se podría pensar de acuerdo con la estructura química de la Taspina que su origen Biogénico proceda de la Fenilalanina que se transforma en derivado Feniletilamina que se dimetila, se cicla hasta formar un derivado bencilisoquinoleínico que luego se vuelve a ciclar para dar lugar a una aporfina ⁽⁶⁾. (Ver Fig. 3)

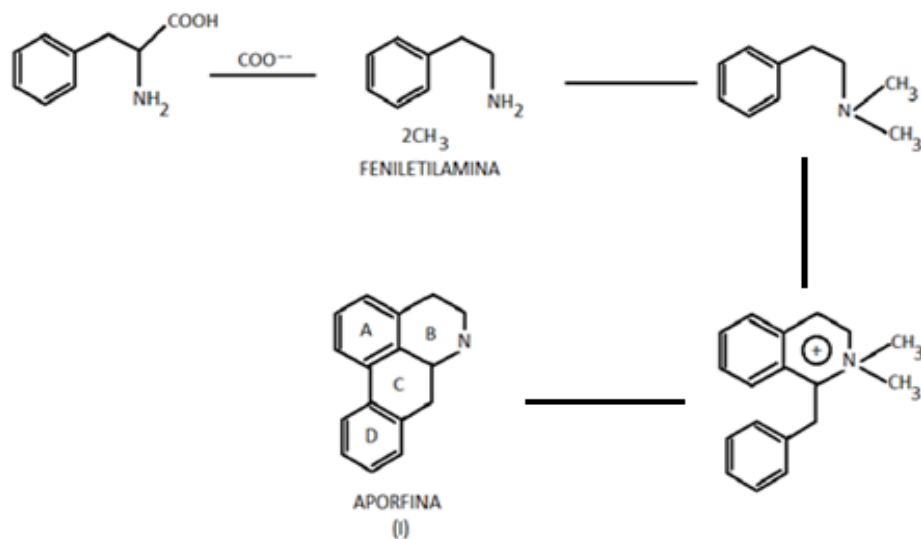


Figura N° 3.- Vía de la Formación de la Aporfina a Partir de Feniletilamina

Según Shamma M. et al (1971) parece que la biogénesis de Taspina procede de la eliminación de Hoffmann a través de un catalizador enzimático, para la apertura del anillo B. Las aporfinas son estructuras bien conocidas por su sencillez esquelética, como los sustituyentes de las aporfinas son grupos OH dioximetileno, metoxilo (OCH₃), presentan los anillos A y D aromáticos, algunos tienen débiles enlaces entre 6,6a y/o 4 y 5, los sitios de Oxigenación más frecuentes son 1 y 2 le siguen 9, 10 y 11, luego 3, 4, 7 y 8, casi siempre son tetraoxigenados y el nitrógeno puede ser secundario, terciario o cuaternario. La formación del grupo aporfínico a partir de las bencilisoquinoleínas siguen un camino de acoplamiento C-C el cual tiene lugar a través de un intermediario espiroquinoideo, para ello es necesario átomos de oxígeno; OH y OCH₃ en posiciones conjugadas al sitio de acción ⁽²⁸⁾.

Se han propuesto dos estructuras quinoideas las cuales dependen del acoplamiento orto-para o para-para, que conducirán a diferentes patrones de oxigenación en las aporfinas resultantes.

Una vía para la formación de las aporfinas es aquella del acoplamiento C-orto-C-orto o C-orto-C-para, por el cual las bencilisoquinoleínas pasan directamente a aporfinas; en el caso de la bioformación de magnoflorina.

La magnoflorina se convierte en magnoflorina metino con apertura del anillo B seguido de la oxidación del doble enlace 9,10; se produce la acetilación de la magnoflorina metino, luego la introducción de grupos aldehídos en posición 9 y 5 y la lactonización correspondiente que da lugar a la Taspina según el esquema siguiente. (Ver figura 4)

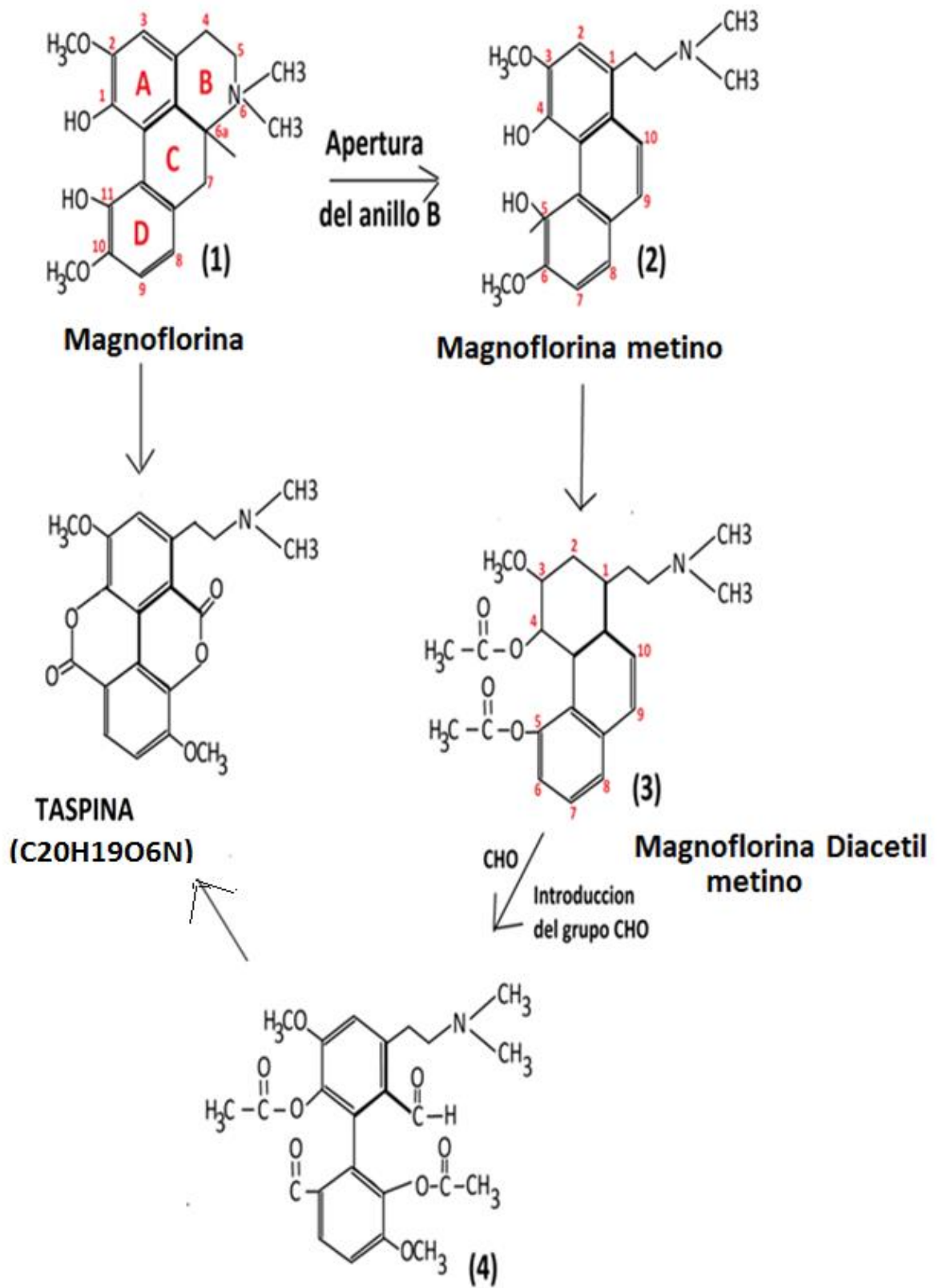


Figura 4.- Biosíntesis de la Taspina.

Kelly T. Ross, and Xie Roger L 1998, lograron la síntesis total de la Taspina siguiendo un esquema de análisis retrosintético de la Taspina sumamente compleja hasta llegar a un dímero complejo (II) ⁽¹⁶⁾. (Ver figura 5)

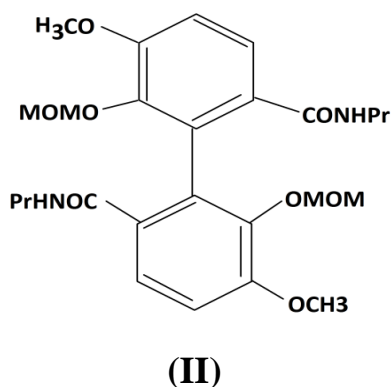


Figura N° 5. Dímero complejo II

Que por reacción con el N-butil-litio dio (III) ⁽¹⁶⁾. (Fig. 6)

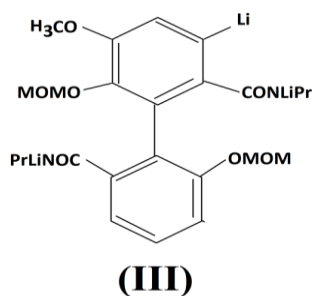


Figura N° 6. N-butil-litio dio

Al reaccionar con el I₂ en medio ácido y en sistema de reflujo dio (IV) ⁽¹⁶⁾. (Fig. 7)

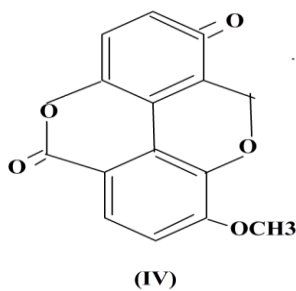


Figura N° 7. Reacción con I₂ (IV)

Usando Pd (PPH₃)₄ en medio de dioxano y Bu₃Sn con reflujo se obtuvo (V). (Ver fig. 8)

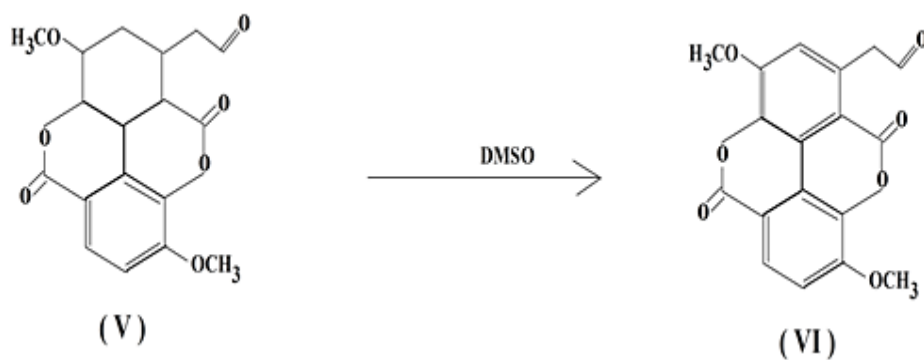


Figura N° 8. Estructura de Taspina en medio de Dioxano y Bu₃Sn

Al que se ozonizo en medio de Dimetil sulfóxido obteniéndose (VI), finalmente al hacerlo reaccionar con HN (CH₃)₂ en NaBH (CH₃COO)₃ y ClCH₂CH₂-Cl se obtuvo taspina; este método resulta inviable en la práctica. ⁽¹⁶⁾

2.1.11. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ALCALOIDES:

El estudio del *Croton lechlerii* Muell- Arg (Sangre de grado) solo tuvo para nosotros interés particular por determinar experimentalmente cuál de los látex procedente de las cuencas de los ríos Nanay (Bajo) y Napo (Alto) posee mayor rendimiento de Taspina que es el metabolito secundario que posee la mayor importancia por sus propiedades biológicas para el tratamiento de enfermedades.

Se realizarán 3 pruebas con tres métodos diferentes de identificación química con agentes cromogénicos tales como:

- a) **Método de Dragendorff:** consiste en la identificación de alcaloides, que se origina por la presencia de nitrógeno en su molécula, genera una reacción básica débil. En el cual el precipitado al ser sometido a la reacción Dragendorff, genera una coloración anaranjada.
- b) **Método de Mayer:** se emplea para la caracterización de alcaloides. La mayoría de los alcaloides reaccionan dando un precipitado rojo oscuro, amorfo o cristalino. El precipitado (una sal compleja) puede disolverse posteriormente en algún solvente menos polar para su identificación.
- c) **Método de Wagner:** permite detectar la presencia e identificación de alcaloides al tornar una coloración marrón.

2.1.12. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC).

La cromatografía en capa fina (en inglés Thin Layer Chromatography o TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en un laboratorio de Química Orgánica. Entre otras cosas permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto. Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.
- Comparar muestras. Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado.

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente.

➤ **Determinación del R_f:**

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria. Así, las moléculas de soluto se

encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil. La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar, que están en función de:

- La polaridad del compuesto, determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.
- Naturaleza del disolvente. Así, para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa.

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como R_f , y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa.

Para calcular el R_f se aplica la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}} \times 100^{(10)}$$

Propiamente el método de cromatografía TLC, constituirá una prueba física de identificación del estado de pureza de la sustancia.

2.1.13. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

➤ **Punto de fusión (P.f):**

El punto de fusión de un componente es el intervalo de temperatura en el cual la sustancia pasa del estado sólido al estado líquido. Cuando un compuesto es puro el punto de fusión (p.f.) en muchos casos tiene un solo valor de temperatura, ya que el intervalo de fusión puede ser muy pequeño ($<10\text{ }^{\circ}\text{C}$) en cambio cuando la sustancia es impura, en donde las impurezas hacen que el punto de fusión disminuya y el intervalo de fusión se amplíe, por ejemplo: el punto de fusión del ácido benzoico impuro puede ser $17\text{-}20\text{ }^{\circ}\text{C}$; $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ de diferencia.

El punto de fusión clásicamente se determina por el método de Thiele, métodos más modernos son los realizados mediante la barra de Maquenne el aparato de Fisher-Johns, el aparato de Nalge Axelrod. El aparato de Fisher-Johns y el de Nalge-Axelrod son los más modernos, aunque existe un aparato de Nalge-Axelrod modificado.

El aparato Fisher-Johns tiene una platina de aluminio que se calienta eléctricamente y está provisto de un termómetro que registra lecturas hasta 300°C , la muestra se coloca entre dos cubre-objetos de 18 mm de los usados en microscopía, los cubre-objetos con la muestra se colocan en la depresión de la platina de aluminio; el punto de fusión se observa con ayuda de un foco de iluminación y una lupa que agranda la imagen y se observa los cristales con mayor nitidez en la transición entre el estado sólido y el estado líquido.

El aparato Nalge-Axelrod, consiste en un microscopio de 25 aumentos que tiene insertado un filtro polaroide, una fuente de iluminación, una platina de aluminio para calentamiento eléctrico, controlado mediante un transformador variable y un termómetro que registra la temperatura hasta 400 °C.

La muestra se coloca entre dos cubre-objetos de 18 mm y luego se coloca dentro de la depresión de la platina de aluminio, la cubierta que tiene un orificio pequeño se coloca en su lugar, se enciende la luz y se enfoca el microscopio, el tubo se gira hasta que casi se crucen los filtros polaroides y se observa los cristales a medida que va ascendiendo la temperatura hasta que finalmente se funde. ⁽³²⁾

2.1.14. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR POR EL MÉTODO CLÁSICO DE RAST.

Cuando no se dispone de un aparato de espectrometría de masa es posible utilizar el método de Rast para determinar el peso molecular que consiste en medir la depresión del punto de Fusión del D-Camphor natural. ⁽³²⁾

La diferencia entre el punto de Fusión de la mezcla del alcaloide más el D-camphor menos el punto de fusión del Camphor da la depresión.

El peso molecular se calculará por la fórmula:

$$M = \frac{39.7 \times p \times 1000}{\Delta T \times P}$$

Dónde:

- K= 39,7; constante de depresión molar.
- p = peso del componente en estudio.
- P = peso del Camphor.
- ΔT = depresión en el punto de fusión

2.1.15. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

La resonancia magnética nuclear es una de las más útiles herramientas que se dispone para determinar la estructura de las moléculas orgánicas, proporciona información acerca del número, tipo y conectividad del hidrogeno con los átomos de carbono.

La técnica involucra la interacción (Resonancia) de energía de una fuente de energía externa con las propiedades magnéticas de un núcleo que puede ser de hidrogeno (H^+) o de ^{13}C .

➤ Propiedades Nucleares

Los núcleos son partículas cargadas que rotan y tan igual que los electrones se considera que poseen estados de spin; un spin que gira según las manecillas del reloj y otra en contra de las manecillas del reloj (dos estados de spin). Las partículas cargadas con spin generan un campo magnético. El campo magnético actúa igual que una pequeña barra magnética (Imán). Las agujas de una brújula son como un pequeño imán que puede alinearse con o entre un campo magnético externo.

Las agujas alineadas con el campo magnético de la tierra y los puntos norte. Si queremos alinear las agujas hacia el punto sur, una pequeña cantidad de energía podría ser necesaria para hacer girar la aguja en la dirección opuesta. La aguja volverá al punto norte (su estado inicial), cuando esté libre del influjo del campo magnético. La aguja podría tener que moverse al azar si los campos magnéticos de la tierra no existieran. ⁽⁴⁾

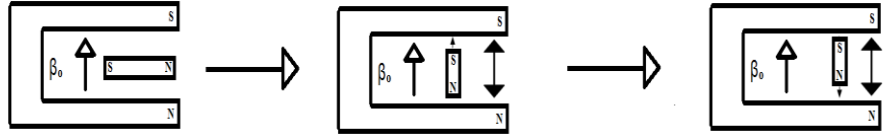
➤ **Estados de spin:**

El núcleo se parece a las agujas de una brújula. Su componente magnético se orientaría en direcciones al azar en ausencia de un campo magnético externo fuerte. En presencia de un campo magnético externo fuerte el pequeño magneto (spin nuclear), puede orientarse con o contra el campo magnético externo.

El más bajo estado de energía existe cuando el spin nuclear se orienta hacia el campo magnético externo. Si el núcleo absorbe la cantidad apropiada de energía el componente magnético puede alinearse contra el campo externo, igual que las agujas de la brújula forzosamente se orientan hacia el punto sur. El componente magnético de un estado de spin orientado con un campo magnético externo es llamado alfa spin de estado. El estado Beta de spin existe cuando el componente magnético está orientado contra un campo magnético externo.

Un protón (núcleo de Hidrogeno) puede existir en dos estados de spin: alfa y beta. Para que un núcleo cambie de un estado alfa a un estado beta la cantidad de energía requerida para ir de alfa a beta es directamente proporcional a la fuerza del campo magnético en relación con el núcleo ; se necesita mayor fuerza magnética para que el spin nuclear cambie de dirección.

La resonancia magnética nuclear se refiere a la absorción de energía de radiación electromagnética para producir un desdoblamiento de spin. Cuando un imán se coloca dentro de un campo magnético externo, este gira para alinearse en el sentido del campo magnético externo (B_0).



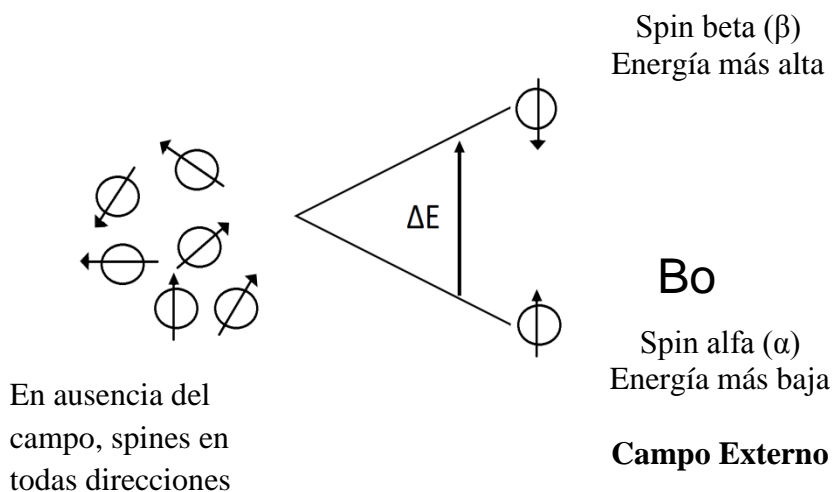
Imán antes de ser sometido a un campo magnético extremo.

Imán alineado en el sentido del campo magnético extremo.

Imán alineado en el sentido contrario al campo magnético extremo.

En esas condiciones se halla en el estado de energía más baja que el correspondiente a una orientación en sentido contrario al campo externo.

Este mismo efecto sucede cuando se coloca un protón en un campo magnético externo (B_0). Según la mecánica cuántica se requiere que el momento magnético del protón se alíne, bien en el mismo sentido del campo magnético externo o en el sentido contrario al campo externo. Al estado de energía más baja con el protón alineado con el campo magnético se le conoce con el nombre de estado de spin alfa (α), al estado de energía más alto con el protón alineado en contra del campo magnético externo, se le conoce con el nombre de estado spin beta (β).



En ausencia de un campo magnético externo, los momentos magnéticos del protón están orientados al azar. Cuando se aplica un campo magnético externo cada protón de la muestra adquiere el estado α o el estado β ; como el estado de spin α es más bajo en energía hay más espines α que espines β .

En un campo magnético intenso, la diferencia de la energía entre los dos estados de spin es mayor que en un campo más débil cuando un núcleo está sometido a la combinación correcta de campo magnético y radiación electromagnética para producir el cambio en el spin se dice que está en resonancia y la energía que absorbe es detectado por el espectrómetro de resonancia magnética nuclear.

A los espectrómetros de resonancia magnética nuclear suelen incorporar imanes muy poderosos de forma que la diferencia de energía ΔE sea la mayor posible y fácilmente detectable. La radiofrecuencia que se necesita para la resonancia se calcula en base a la intensidad del campo externo con el que se trabaja. En el pasado la frecuencia de los espectrómetros solía ser de 60 MHz (1 millón de ciclos por segundo) que corresponde a un campo magnético de 14,092 gauss.

Los espectrómetros de resolución más alta generalmente operan a frecuencias de 100, 300, 400, 500, 600, 800 y 900 MHz, actualmente están en fase experimental espectrómetros de un Gigahertzio. Cuando los protones de los compuestos orgánicos no están aislados están rodeados por electrones que lo apantallan parcialmente del campo magnético externo, los electrones giran en torno a los núcleos y generan un pequeño campo magnético inducido que se opone al campo externo aplicado.

En una molécula la nube de electrones que hay alrededor de cada núcleo actúa como una espiral metálica, rotando en función del campo externo, esta rotación inducida es una corriente circular cuyo campo magnético se opone al campo externo. El resultado es que el campo magnético en el núcleo es más débil que el campo externo y se dice que el núcleo está apantallado. El campo magnético total en el protón apantallado es siempre más débil que el campo externo por lo que se debe aumentar el campo aplicado para que se produzca resonancia a una frecuencia dada.

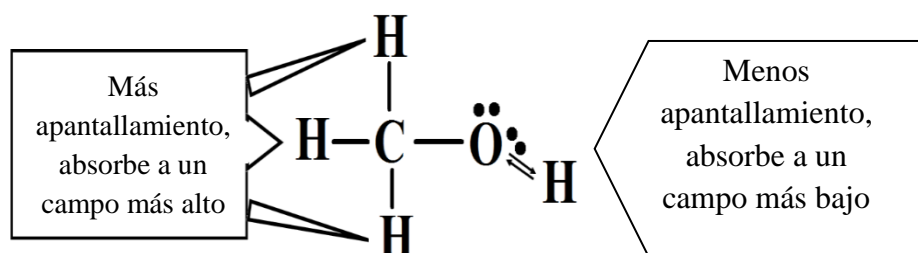
A 300 MHz, un protón aislado desapantallado absorbe a 70,459 Gauss pero un protón apantallado requiere un campo más intenso. Por ejemplo si un protón está apantallado por un gauss cuando el campo externo es de 70,459 Gauss, el campo magnético resultante efectivo en el protón es de 70,458 Gauss. Si el campo externo se incrementa a 70,460 Gauss, el campo magnético resultante en el protón se incrementa a 70,459 Gauss, lo que hace que el protón entre en resonancia.

Si todos los protones estuvieran igualmente apantallados estarían todos en resonancia para la misma combinación de frecuencia y de campo magnético, afortunadamente los protones con entornos químicos diferentes están apantallados de manera desigual.

En el metanol por ejemplo, el átomo electronegativo de Oxígeno (3.5 en la escala de Pauling) hace que la densidad electrónica alrededor del protón del grupo Hidróxilo disminuya. El protón hidroxilo no está tan apantallado como los protones del grupo metilo (el carbono tiene electronegatividad de 2.5 y el Hidrógeno una electronegatividad de 2.1), por lo que los protones del grupo hidroxilo están a un campo más

bajo que los protones metilo (aunque todavía a un campo más alto que los protones aislados).

Se dice que el protón hidroxilo está algo desapantallado por la presencia de átomos de oxígeno electronegativos



Debido a las estructuras diversas y complejas de las moléculas orgánicas, los efectos de apantallamiento de los electrones en varias posiciones son generalmente diferentes. La medida cuidadosa de las intensidades de campo requerido para la resonancia de varios protones en una molécula, proporciona dos clases de información importante. El núcleo de absorción diferentes también llamados señales o picos indica cuantos tipos diferentes de protones están presentes. El grado de apantallamiento mostrado por esas absorciones indica la densidad electrónica de la molécula próxima a cada tipo de protón. Otros dos aspectos de la RMN que se consideraran son las intensidades de las señales y sus modelos de desdoblamiento.

2.1.15.1. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA

MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN-H⁺):

Un protón por definición es un átomo de hidrogeno sin un electrón. La RMN de protones es un estudio de los átomos de Hidrogeno covalentemente conjugadas con otro átomo, usualmente carbono y no

el estudio del protón libre. Sin embargo las discusiones en RMN usan los términos Protón y átomos de hidrógenos intercambiable.

Para la RMN será herramienta diagnóstica los átomos de hidrogeno en diferentes ambientes químicos necesarios para absorber radioondas a diferentes frecuencias. Los núcleos del átomo de hidrogeno esta rodeados por una nube electrónica (densidad del electrón) de sus electrones de enlace. El campo magnético exterior posee una fuerza (Torque) sobre los electrones obligándolos a generar un campo magnético H_{local} que es opuesto al campo magnético externo H_0 .

La densidad electrónica alrededor de un núcleo de Hidrogeno es diferente de los protones que existen en diferentes ambientes químicos. Desde luego la densidad electrónica varia el campo magnético filtrado por un núcleo de hidrogeno de modo que la diferencia ente campo magnético externo $H_0 - H_{local}$ es conocido como campo efectivo.

$$H_{eff} = H_0 - H_{local}$$

Si el campo magnético cambia por núcleos filtrados su frecuencia a la cual la radiación es absorbida también cambia. La frecuencia al cual la radiación es absorbida da información acerca del medio químico responsable de estas absorciones.

Los protones en una molécula en estudio por RMN se designan como protones equivalentes y protones no equivalentes. Protones en diferente medio químico reciben el nombre de protones no equivalentes, ellos absorben radiaciones a frecuencia ligeramente diferentes en valores medidos en megahercios.

Es más conveniente expresar estas diferencias de frecuencias relativas en base a Standard. El Standard elegido en la mayoría de los casos es el tetrametilsilano $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ o TMS.

Todos los protones se miden en TMS y cuando un medio químico es idéntico a los protones se denominan equivalentes y todos absorben radiación a la misma frecuencia. La diferencia en frecuencias de absorción de estos valores Standard es en Hertz (No en megahertz).

Los desplazamientos químicos (δ) son la escala horizontal que va de cero a 10 de derecha a izquierda. La escala es en ppm o unidades delta (δ). Una unidad (δ) es igual a un ppm.

Los protones no equivalentes absorben radiación de radioondas de valores ligeramente diferentes. La mayoría de protones absorben a valores de la izquierda 0 a 10 de TMS en esta escala.

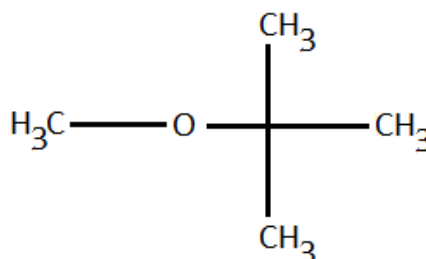
Las líneas verticales representan la absorción de protones. La diferencia entre la absorción de un protón y el TMS se denomina desplazamiento químico. Se dice que un desplazamiento es a campo alto cuando esta entre 5 y 0 y campo bajo cuando es de 5 a 10.

La mayoría de protones en los compuestos orgánicos están enlazados a átomos de carbono. La electronegatividad del átomo de carbono varia como una función de la hibridación de los átomos de carbono, los átomos de carbono hibridizados como Sp son más electronegativos que hibridizados como Sp^2 mas electronegativos que los Sp^3 .

Protones en alcanos (Sp^3) tienen desplazamientos químicos de 0 a 15 ppm y protones atacados por alquenos (Vinilos), átomos de carbono

Sp^2 absorben entre 4.5 – 6.5 ppm y protones atacados átomos de carbono alquilo (Sp) absorben en el rango de 2.5 a 3.0.

Los efectos de inducción se dan cuando la dirección del campo magnético inducido está en la misma dirección que el campo magnético exterior. El área de cada pico es proporcional al número de protones, que están representados por este pico. El número relativo de átomos de hidrogeno de una molécula depende de los grupos equivalentes y no equivalentes, por ejemplo en la molécula de Tert-Butiléter metilo.



El grupo tert-butil contiene 9 protones equivalentes y el grupo metilo contiene 3 protones químicamente equivalente.

Hay moléculas como la del acetato de Etilo $CH_3COOCH_2CH_3$ que sufren desdoblamiento Spin-Spin, por eso el espectro debe aparecer en 8 picos: cuatro protones a campo bajo centrales en 4.1 ppm que comprende al grupo carbono, tres picos a campo alto centrales a 1.3 ppm que corresponde al grupo metilo y un solo pico Singlete del grupo metilo a 2.1 de 3 protones equivalentes.

Cuando algunos protones equivalentes aparecen con pico múltiple se denomina desdoblamiento Spin-Spin en ese caso hacen la interpretación del espectro más complejo. Un desdoblamiento de la absorción en 2 o más picos se denomina Multipletes, dos picos se

denomina Doblete, tres Triplete, Cuatro Quartete, cinco Quintuplete, etc.

En toda molécula se asignan valores de desplazamiento químico. Los patrones de desdoblamiento y las áreas relativas de los picos en el Acetato de Etilo son un buen ejemplo, estas absorciones (desplazamiento químico) podrían ser asignadas para los tres grupos de protones no equivalentes.

Los protones Metilenos o Carbenicos (CH_2) están en relación con los electrones aislados del átomo de Oxígeno cuya electronegatividad es de 3.5 por esa razón se espera que se desplace a campo bajo tan igual que el grupo metilo. Los protones del Metileno deberían aparecer como un cuarteto ya que ellos son adyacentes al grupo metilo, tiene una absorción a campo bajo centrado a 4.1 ppm, los otros dos desplazamientos químicos deberán ser de los 2 grupos metilos, el grupo metilo enlazado a los electrones retirados del grupo Carbonilo $\text{C}=\text{O}$ deberán aparecer como Singlete ya que no hay protones adyacentes que causen el desdoblamiento, el Singlete es asignado un grupo metilo ya que se halla a 2.1 ppm, el desdoblamiento a campo alto que es el Triplete puede ser asignado al grupo metilo que esta enlazado al grupo Metileno.

Este grupo metileno tiene una absorción centrada en 1.3 ppm. El valor de un desplazamiento químico en ppm para un Singlete puede ser leído directamente en el espectro de RMN. El desplazamiento químico de un Multiplete es el valor del centro del Multiplete a la mitad entre dobletes, el pico del centro en un triplete, así sucesivamente.

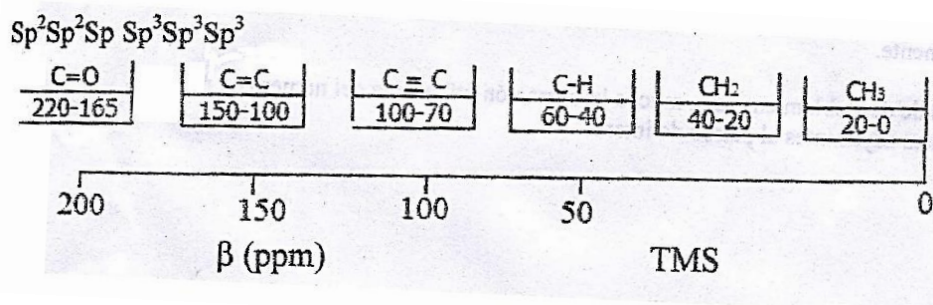
Los protones de desdoblamiento dan mucha información útil acerca del número de protones no equivalentes adyacentes al patrón de interés.

2.1.15.2. ESPECTROMETRÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN C-13):

La identificación de un compuesto es obtenido por análisis del espectro de Carbono - 13, además del espectro de RMN-H⁺. Hay varias diferencia entre la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 y de protones. La energía para arrancar un Spin de una posición alfa a otra beta ocurre a diferente rango de frecuencia (Energía).

La absorción de C-13 no aparece en el espectro de protones. El desplazamiento químico en RMN-H⁺ aparece en un rango de 0- 10 ppm. El rango para el espectro de C-13 es entre 0 – 220 ppm: lo cual es una ventaja ya que las absorciones de C-13 están mucho más alejadas que las absorciones de protones y hay menos posibilidad de que se sobrepongan los picos no equivalentes.

El rango aproximado de los desplazamientos químicos de átomos de carbono no equivalentes es el siguiente:



Mediante la espectrometría de RMN C-13 se puede determinar el número de carbonos que tiene la molécula en estudio.

Cuando los carbonos son equivalentes aparecen a un mismo valor de desplazamiento. Un complejo de patrón de desdoblamiento puede ser amplificado por desacoplamiento Spin-Spin o una tercera llamada desacoplamiento de banda ancha, elimina toda interacción de acoplamiento spin-Spin carbono hidrogeno.

Cuando un espectro esta desacoplado el Multiplete se transforma en un pico simple elevado la relación señal-ruído.

2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES

2.2.1. Variable Independiente:

Dos muestras de látex de la especie *Croton lechlerii* (Sangre de grado); procedentes de las cuencas de los ríos Nanay (Bajo) y Napo (Alto) respectivamente.

2.2.2. Variable Dependiente:

Rendimiento de Taspina de cada muestra

2.2.3. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES:

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA Y TIPO DE VARIABLE	ÍNDICE
<p>Dos muestras de <i>Croton lechlerii</i>; procedentes de las cuencas del bajo Nanay y alto Napo respectivamente.</p>	<p><i>Croton lechlerii</i> (sangre de grado), es una de las plantas más reconocidas en la Amazonía Peruana, perteneciente a la familia Euforbiaceae que crece en bosques primarios.</p>	<p>La extracción de látex de sangre de grado se realizó seleccionando un árbol corpulento de 30 cm de Diámetro y altura de 15 metros que tienen la característica de proporcionar 2 litros de látex promedio; se extrajo utilizando la técnica de tumba del árbol y aplicando cortes transversales respectivamente.</p>	<p>Obtención en mililitros.</p>	<p>Cantidad de látex de <i>Croton lechlerii</i>.</p>	<p>Látex.</p>

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA Y TIPO DE VARIABLE	ÍNDICE
<p>Rendimiento de Taspina de cada muestra.</p>	<p>Una vez aislada y purificada la Taspina y se haya cuantificado el peso.</p> <p>Se estableció una relación matemática entre el peso de 200 ml de látex llevado a extracto seco y la cantidad de Taspina obtenidos se mide la multiplicidad por 100 y se obtiene el rendimiento porcentual, pero para estar seguros de que el alcaloide aislado es Taspina se somete a análisis Espectrométricos por RMN H⁺ y C-13.</p>	<p>A 200 de látex se agregó 50 ml de agua para rebajar la densidad. Luego se agregara 18 ml de amoniaco para basificar la muestra hasta pH 11. Se lleva a una pera de decantación y se agrega 250 ml de CHCl₃, se extrae 3 veces.</p> <p>Se reunieron los extractos clorofórmicos, se filtró y concentró en rotavapor a presión reducida, se obtiene el alcaloide Taspina de color amarillo blanquecino. Se lava repetidas veces con Dioxano y se cristaliza obteniéndose un polvo blanco cristalino.</p>	<p>El rendimiento de alcaloide aislado se midió en gramos y porcentajes.</p>	<p>Porcentaje de Taspina aislada</p>	<p>Taspina</p>

2.3. HIPÓTESIS

La muestra de látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*) procedente de la Cuenca del río Nanay (Bajo) tiene mayor rendimiento de Taspina en relación al látex de la Sangre de grado procedente de la Cuenca del río Napo (Alto).

CAPITULO III



3.1. METODOLOGÍA

3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN:

3.1.1.1. Experimental:

El estudio realizado es de naturaleza Experimental porque se realizó el control sistemático de los aspectos referidos a las variables dependiente e independiente, siguiendo un plan sistematizado con el fin de aislar la Taspina mediante un método común para ambas muestras de que nos permita determinar sus rendimientos y poder explicar algunas razones de esta variación al color de consideraciones biogenéticas y quimiotipos como el hecho de que la magnoflorina precursor químico de la taspina no haya lactonizado en su integridad en una de las muestras y de diferente variación interespecífica de sus componentes debido a que la misma planta por crecer en lugares distintos separado por kilómetros de distancia y crecer en cuencas cuyas aguas son diferentes tiene la propiedad de variar en cuanto a su contenido.

3.1.1.2. Descriptivo:

Es Descriptivo porque el estudio interpreta las propiedades de cada muestra y determinar de dónde provienen la muestra con mayor rendimiento de metabolitos secundario (Taspina) y finalmente es explicativo porque tiene la necesidad de responder a que se debe la variación del contenido de taspina en las muestras procedentes de 2 cuencas diferentes.

3.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN:

El estudio será de diseño cuantitativo porque se realizará con la Taspina aislada de dos muestras del látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*) de la familia Euforbiaceae, provenientes de las cuencas de los ríos: Nanay (Bajo) Caserío de San Pablo de Cuyana y Napo (Alto) Santa María del Curaray del Departamento de Loreto; posteriormente se procederá a pesar los resultados en balanza analítica para determinar cuál de las muestras presenta mayor rendimiento de Taspina, el mismo que será llevado a una análisis Espectrométrico con RMN H⁺ y de C-13 para tener la certeza de que la sustancia aislada corresponde a la estructura molecular de la Taspina.

3.1.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.1.3.1. POBLACIÓN:

La población de estudio en las dos cuencas estuvo constituido por un rodal de árboles (30 árboles en un espacio de 600 m², eligiéndose el área de más densidad poblacional de Sangre de grado (*Croton lechlerii*), de estos rodales se seleccionó un árbol corpulento de 30 cm de Diámetro y altura de 15 metros que tienen la característica de proporcionar 20 litros de látex promedio; no se extrajo el látex de varios árboles por las consideraciones siguientes:

- a) No causar impacto ambiental negativo al medio.
- b) Porque eligiendo un árbol de las características señaladas (30 cm de diámetro y 15 metros de altura) se hizo la selección del mejor espécimen.

3.1.3.2. MUESTRA:

La muestra de estudio que se necesitó para evaluar el rendimiento de taspina fue de un litro de Sangre de grado por cada cuenca. (Ver imagen 6)

3.1.4. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

- Revistas Científicas.
- Revisiones bibliográficas.
- Información etnobotánica del Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
- Datos extraídos de fuentes del Internet.

3.1.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

3.1.5.1. CRITERIO DE INCLUSIÓN:

- Muestra autentica tomada de su habitad natural asociada en rodales.
- Árbol corpulento de 30 cm de diámetro y 15 metros por su abundancia de látex.

3.1.5.2. CRITERIO DE EXCLUSIÓN:

- Árbol menor de 30 cm de diámetro y 15 metros de altura.
- Árboles que no pertenecen a la zona de estudio.

3.1.6. UBICACIÓN:

Los árboles de las que se recolectó la Sangre de grado provienen de dos cuencas:

- a) Cuenca del río Nanay (Bajo); se recolectó en el Caserío de San Pablo de Cuyana ubicado en el sector sur de la ciudad de Iquitos a una Latitud $3^{\circ}46'20.9''S$, Longitud $73^{\circ}21'47.5''W$, Departamento de Loreto, Provincia de Maynas, Distrito de San Juan Bautista

- b) Cuenca del río Napo (Alto); se recolectó en el Caserío de Santa María del Curaray, ubicado en el sector norte de la ciudad de Iquitos a una Latitud $2^{\circ}17'54''N$, Longitud $74^{\circ}16'02''W$, Departamento de Loreto, Provincia de Maynas, Distrito del Napo.

Haber elegido muestras procedentes de estas dos cuencas significa poner en consideración la importancia de dos lugares de donde se adquiere la mayor cantidad de látex que llega al mercado de Iquitos; además se hace necesario responder las interrogantes siguientes:

1. ¿En qué medida hay una influencia del medio ambiente sobre el contenido de Taspina considerando a priori que las muestras que son tomadas cerca de la ciudad?, tal vez están afectadas por el impacto ambiental que es mayor en la ciudad, frente a aquellas plantas que crecen en lugares apartados de los centros urbanos y que consideramos que son muestras limpias, exentas de las alteraciones que causan la contaminación y la adulteración que realizan los comerciantes de poca solvencia⁽³⁾.

2. ¿Cómo puede influir el suelo?, pues ambas zonas tienen cierta similitud en cuanto a su relieve: suelo accidentado con lomeríos de arcillas rojas y ambos ríos poseen aguas lenticas.

3. ¿Cómo disponer de muestras auténticas de látex recolectadas *in situ* que permita una evaluación de rigor en cuanto a su contenido de Taspina? El estudio que desarrollamos se hizo tomando muestras no probabilísticas dado a que el alcance de su contenido no depende del número de plantas que hay que seleccionar para recoger el látex, sino de tomar de un árbol seleccionado que generalmente es el de mejor tamaño las dos muestras auténticas de látex de la cual se aislara el contenido de Taspina para la evaluación de su rendimiento, por las razones que se hace necesario precisar en primer lugar: no se quiere causar impacto ambiental sobre el bosque tumbando varios árboles para la obtención de varias muestras para ser estudiadas una por una, y por otro lado porque no es fácil viajar a Santa María del río Curaray (Alto Napo) para disponer de varias muestras, además de que el estudio de hecho es más costoso porque demanda de mayor cantidad de reactivos a utilizar, aquí se trata de evaluar el rendimiento de Taspina en función del látex que han suministrado dos árboles procedentes de dos cuencas extraídas según los criterios siguientes: Corpulencia del árbol, derribado y sangrado muy temprano para evitar que el látex se difunde por todos los tejidos vegetales y disminuye la cantidad y calidad del látex⁽¹³⁾.

3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.2.1. Recolección del material Vegetal: (Hojas, Flores, Frutos y látex de Sangre de grado): La recolección del material vegetal se realizó con dos propósitos:

- Identificación botánica de la especie vegetal.
- Utilización del látex para el aislamiento de taspina y la evaluación del rendimiento por cuenca.

Para la recolección del material vegetal se tuvo en cuenta los aspectos siguientes:

- **Conservación de la muestra:** La muestra obtenida se conservó en alcohol, para evitar el ataque de hongos, que es común por que el látex posee sustancias glicosídicas.
- **Purificación del látex:** Para fines de análisis, se procedió a filtrar la muestra para separar sucias y astillas pequeñas del proceso de extracción de la Sangre de grado.

3.2.2. Aislamiento del Alcaloide total Taspina del material vegetal:

Este procedimiento se aplicó tanto para la muestra procedente de la cuenca del río Nanay (Bajo); como para la muestra procedente de la Cuenca del río Napo (Alto):

- Se tomó 200 ml de látex de sangre de grado que equivale a 50 gr de muestra seca y se diluyó agregando 50 ml de agua.

- Se filtró la muestra pasando por mallas de 80 Astm para eliminar pequeñas impurezas.
- Se agregó 10 ml de NH_4OH de 25% hasta lograr un pH 11.
- Se colocó la solución en una pera de Decantación de 1 L.
- Se agregó 250 ml. de CHCl_3 para completar una relación muestra - solvente 1:1 v/v para evitar la emulsificación; y se agitó fuertemente por 4 horas en forma espaciada.
- Se dejó en reposo hasta que se separe la fase clorofórmica de la fase acuosa, este procedimiento se repitió 3 veces.
- Se juntó la fase clorofórmica.
- Se concentrará en rota vapor a presión reducida hasta 1/10 de su volumen.
- Se Filtró la solución concentrada.
- Se dejó en reposo la solución en la Campana extractora.
- Se formó un precipitado amarillo-blanquecino.

3.2.3. Cristalización:

- Se Lavó el precipitado con Dioxano (éter corona).
- Se Filtró, y en el papel filtro queda la Taspina y el filtrado es el Dioxano con las impurezas.
- Este lavado se repite varias veces, hasta que se obtiene un polvo blanco que es la taspina purificada.
- Se diluyó en cloroformo esta Taspina, se calentó para evaporar la parte clorofórmica.
- Se dejó en reposo y se obtuvo un polvo blanco cristalino de estructura monoclinica (forma de agujas).
(Ver Anexo N° 2 Diagrama del proceso experimental)

3.2.4. Evaluación del rendimiento

De la muestra procedente del río Nanay (bajo):

- Con 200 ml de muestra procedente de la Cuenca del río Nanay (bajo), el rendimiento se evaluó después que se concluyó el proceso de cristalización.
- Se pesó en balanza analítica OHAUS (Ver Imagen 14) y se obtuvo el resultado siguiente:
 - Peso de la Taspina puro obtenida:.....3,6 gr.
 - Peso del extracto seco en 200 ml de Sangre de grado:50 gr.
 - Volumen de Sangre de grado llevado a sequedad:200 ml.

a) Rendimiento de Taspina sobre el peso seco del látex de Sangre de grado.-

Este se obtuvo llevando a sequedad 200 ml de látex de sangre de grado en baño de arena a 45°C por 3 días cuando se obtuvo el látex seco se pulverizó y pesó, el cual se obtuvo 50 gr de látex seco que representa el 25 % de extracto sólido contenido en 200 ml de látex puro de sangre de grado que representa 50 gramos. (Ver imagen 11)

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Taspina aislada}}{\text{Peso seco del látex de Sangre de grado}} \times 100$$

CALCULO:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{3.6 \text{ gr.}}{50 \text{ gr.}} \times 100$$

% Rendimiento = 7.2

De la muestra procedente del río Napo (Alto):

- Se tomó 200 ml de látex de Sangre de grado, se llevó a sequedad en baño de arena a 45 °C, para conocer qué cantidad de extracto seco representa 200 ml de la muestra líquida, el proceso de secado culmina cuando se obtuvo una sustancia sólida, se pulverizó en motor, se pesó y se obtuvo 49.600 gr. (Ver imagen 14)
- El procedimiento seguido para el cálculo del rendimiento es el mismo que se desarrolló para la muestra procedente del río Nanay (Bajo).
- Peso de la Taspina puro obtenida:.....3,2 gr.
- Peso del extracto seco en 200 ml de Sangre de grado:49,6 gr.
- Volumen de Sangre de grado llevado a sequedad:200 ml.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Taspina aislada}}{\text{Peso seco del látex de Sangre de grado}} \times 100$$

CALCULO:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{3.2 \text{ gr.}}{49.6 \text{ gr.}} \times 100$$

% Rendimiento = 6.45

3.2.5. Evaluación de la Taspina sobre la base de 1 litro de látex de Sangre de grado.

Muestra de la Cuenca del río Nanay (Bajo).

Un litro de látex de Sangre de grado del río Nanay (Bajo) es equivalente a 250 gr de látex seco.

Si de:

50 gr de látex seco (200ml) \longrightarrow 3.6 gr. de taspina de
250 gr de látex seco (1000ml) \longrightarrow x

X= 18 gr. de Taspina

Muestra de la Cuenca del río Napo (Alto).

Si de:

49.6 gr. de látex ————— 3.2 gr. Taspina
250 gr. de látex ————— X

X= 16 gr de Taspina

3.2.6. ANÁLISIS QUÍMICO CROMOGÉNICO DE LA MUESTRA DE *Croton lechlerii* PROCEDENTE DE LA CUENCA DEL RÍO NANAY (BAJO).

➤ Método del reactivo de Dragendorff:

Previamente se preparó el reactivos disolviendo 8.0 gr. de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Nitrato de Bismuto pentahidratado) en 20 ml de HNO_3 (densidad 1.18 ósea al 30 %) y 27.2 gr. de KI en 50 ml de agua se juntaron ambas soluciones y lo aforamos en una fiola a 100 ml.

Se preparó la muestra de Sangre de grado procedente del río Nanay (Bajo), filtrando $\frac{1}{2}$ ml. de látex, se diluyó en 5 ml de agua acidulado (HCl 0.1 N).

Las gotas de esté preparado se puso sobre 6 agujeros de la placa de Tagne y se aplicó a cada muestra en las que se aplicó el reactivo, donde dieron lugar a la formación de un precipitado anaranjado-marrón que indica la presencia de alcaloide.

➤ Método del reactivo de Mayer.

Previamente se preparó el reactivo de Mayer del modo siguiente: disolvió 1.36 gr. de HgCl_2 en 60 ml de agua destilada y 5 gr. de KI en 10 ml de agua. Se juntaron las 2 soluciones y se aforaron en una fiola a 100 ml. se preparó la muestra de sangre de grado siguiendo el mismo procedimiento de (Método del reactivo de Dragendorff), se aplicó el reactivo de Mayer y apareció un precipitado rojo oscuro, que indica la presencia de alcaloide.

➤ **Método del reactivo de Wagner.**

Previamente se preparó el reactivo disolviendo 1.27 gr. de yodo (resublimado) y 2 gr. de KI en 20 ml de agua destilada, la solución se aforó a 100 ml en una fiola, agregando agua destilada.

Se preparó la muestra de Sangre de grado siguiendo el mismo procedimiento señalado en (Método del reactivo de Dragendorff). Dio un precipitado color marrón flocculento que indica la presencia de alcaloide.

3.2.6.1. Análisis químico Cromogénico de la muestra de látex de *Croton lechlerii* procedente de la cuenca del río Napo (Alto)

Se realizaron las pruebas por el método de Dragendorff, Mayer y Wagner, siguiendo el mismo procedimiento adoptado para el análisis de la muestra de látex de *Croton lechlerii* procedente de la Cuenca del río Nanay (Bajo). Las tres pruebas dieron resultados positivos.

3.2.7. MÉTODO DE AISLAMIENTO DE LA TASPINA DE *Croton lechlerii* (SANGRE DE GRADO).

La extracción se hizo en medio alcalino y se utilizó el método de partición de fases donde por diferencia de solubilidad entre un solvente polar donde se halla el alcaloide y un solvente apolar donde el alcaloide se separa cuando esto pasa al solvente apolar. Se tomó 200 ml del látex de *Croton lechlerii*, se filtró para eliminar impurezas, se agregó 150 ml de agua destilada y 40 ml de alcohol, se volvió a filtrar, luego se basificó hasta pH 11 con amoníaco al 35% (a 15 ml de amoníaco), agitando el

recipiente (Beaker) con una bagueta. Se colocó la muestra en una pera de decantación de 1 litro y se agregó 350 ml de Cloroformo (CHCl_3) (Ver imagen 7), se agitó por 4 horas a intervalos de tiempo para que el alcaloide pase a la fase clorofórmico (ver imagen 8); finalmente por diferenciación de densidad se separaron dos fases: la fase acuosa que es la capa superior y la segunda capa la fase la Clorofórmica (Ver imagen 9), capa inferior se descartó la fase acuosa y se tomó la fase clorofórmica se filtra previamente, luego se concentrará en rota-vapor a presión reducida, hasta $1/7$ de su volumen; se filtró y el concentrado se dejó en reposo en campana extractora para que cristalice el alcaloide (Ver imagen 10). El precipitado se lavó con dioxano y se obtuvo un polvo blanco. Como paso alternativo en vez de dioxano se disolvió el polvo en metanol caliente, se filtró y puso a refrigerar, precipitando un polvo blanco levemente amarillo (Ver imagen 12). Se volvió a diluir el polvo blanco en 100 ml de cloroformo (CHCl_3), el filtrado se concentró a sequedad y se lavó con dioxano hasta cristalizar como un polvo blanco (Ver imagen 13).

3.2.8. PRUEBAS FISICOQUÍMICAS:

3.2.8.1. Punto de fusión:

Se determinó el punto de fusión en el aparato Nalge-Axelrod modificado (Kisatom) del laboratorio de Orgánica de la FIQ, el resultado fue el siguiente: los cristales se licuaron a 253°C idéntico al p.f que señala la literatura para la Taspina pura⁽²³⁾.

3.2.8.2. Cromatografía TLC:

Se tomó una placa Kieselgel 60 F254, cuyo espesor del adsorbente es 0.2 mm, dimensiones de 5 x 20 cm; Se aplicó 2 nanolitros de las dos muestras de estudio previamente diluidas, en cloroformo usando pipeta de Pasteur a 2 cm arriba del borde inferior (origen) en forma de spots. Cada spot tenía dos milímetros de diámetro con una separación de 2 cm entre spot y spot pero a las misma altura se preparó la cámara cromatografía introduciendo el solvente de resolución constituido por una mezcla de diclorometno (98:2), se corrió por 30 minutos, se sacó la placa de la cámara, se secó al medio ambiente y se midió los parámetros para determinar el valor hRf aplicando la ecuación siguiente: que consiste en lo siguiente:

$$hRf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}} \times 100^{(10)}$$

Este método solo lo utilizamos con propósito analítico para determinar el valor del Rf y observar si la taspina se halla en alto grado de pureza.

El procedimiento es el siguiente

El corrido de la placa dio los valores siguientes:

Frente del solvente: 16 cm.

Distancia del recorrido de soluto (Taspina): 8 cm.

$$hRf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}} \times 100$$

$$hRf = \frac{8}{16} \times 100 = 50\text{cm}$$

Se observó que la distancia de recorrido de soluto es idéntica para ambas muestras, lo que evidencia que se trata de la misma sustancia

3.2.8.3. Determinación del Peso Molecular por el Método de Rast

Este método se utiliza cuando no se cuenta con un equipo de espectrometría de masas.

Se tomó 500 mg de D-camphor y se mezcló con 50 mg de taspina aislada. Se procedió según lo anotado en el Marco teórico (2.1.14), para obtener el resultado se aplicó la fórmula:

$$M = \frac{39.7 \times \text{peso de la taspina} \times 1000}{\Delta T \times \text{Peso del D-camphor}}$$

- Punto de fusión del D-camphor = 176
 - Punto de fusión de la mezcla de D-camphor + Taspina = 165.246
- $\Delta T = \text{punto de fusión del D-camphor} - \text{Punto de fusión de la mezcla de D-camphor + Taspina.}$

Peso de taspina = 50 mg = 0.05 gr

Peso del D-camphor = 0.05 gr.

$$\Delta T = 176 - 165.245 = 10.745$$

$$M = \frac{39.7 \times 0.05 \times 1000}{10.745 \times 0.5}$$

$$M = \frac{1985}{5.377}$$

$$M = \mathbf{369.165}$$

Este valor comparado con el peso molecular de la taspina de 369.152 de la literatura ⁽²³⁾, mantiene un leve error que es despreciable y que se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ error} = \frac{(\text{Peso molecular experimental de la taspina} - \text{Peso molecular de la taspina})}{\text{Peso molecular experimental}}$$

$$\% \text{ error} = \frac{(369.165 - 369.152)}{369.165} \times 100$$

$$\% \text{ error} = \frac{0.013 \times 100}{369.165}$$

$$\% \text{ error} = 3,52 \times 10^{-3}$$

3.2.9. PRUEBAS ESPECTROSCÓPICAS:

Para la identificación de la estructura química se aplicaran las siguientes pruebas:

3.2.9.1. Resonancia Magnética Nuclear de Protones H⁺:

Se realizó en el laboratorio de resonancia Magnética Nuclear de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP-Lima) en un espectrómetro Bruker AC 300 a 300.13 MHz.

Para correr el espectro se preparó una solución con 5 mg de la muestras disueltas en 1 ml de cloroformo deuterado y se realizó un total de 16 adquisiciones, utilizando un pulso de 2.70 microsegundo y un ancho espectral ($S\omega = 6,024 \cdot 10\text{Hz}$) de 20.07 ppm.

La señal residual del solvente (CDCl_3) aparecen alrededor de 7.26 ppm y los picos de interés se hallan en el rango de δ (9-1 ppm) (ver anexos de espectros de RMNH^+).

3.2.9.2. Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C :

Para el espectro de C-13 se preparó una solución de 20 mg que se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl_3), usando un cabezal de 75.47 MHz, se realizó un total de 20.600 adquisiciones utilizando un pulso de 8.6 microsegundos y un ancho espectral de 245.38 ppm ($S\omega = 18,518.52 \text{ Hz}$).

En el espectro de RMN de C-13 la señal residual del solvente esta centrada a δ (77.19 ppm) y las señales de interés se hallan en el rango δ (160-30 ppm)

3.3. MATERIALES, INSTRUMENTOS Y REACTIVOS DE LABORATORIO

3.3.1. Materia vegetal

200 ml de Látex fresco de la especie:

- ✓ *Croton lechlerii* (Sangre de grado) procedente de San pablo de Cuyana (Bajo Nanay).
- ✓ *Croton lechlerii* (Sangre de grado) procedente de Santa María del Rio Curaray (Alto Napo).

3.3.2. Materiales de vidrio y otros:

- Vaso de precipitado.
- Embudo.
- Luna de reloj.
- Bagueta.
- Pipetas.
- Probetas.
- Tubos de ensayo.
- Balón Plano.
- Papel filtro.
- Pera de Separación.
- Cromatografía de Silicagel F254.
- Cámara de Cromatografía.

3.3.3. Materiales de metal:

- Espátula.
- Pinzas.
- Soporte universal.
- Aros de soporte universal.
- Escobilla de metal.

3.3.4. Equipos de Laboratorio:

- Rotavapor Buchi R-3000.
- Hot-plate.
- Kisatom para p.f.
- Campana extractora.
- Balanza analítica.
- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (Bruker AC 300-PUCP)

3.3.5. Reactivos:

- Cloroformo (CHCl_3)
- Hidróxido de Amonio (NH_4OH)
- Agua Destilada. (H_2O)
- Dioxano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$).
- Alcohol etílico. ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Mayer.
- Reactivo de Hager.
- Reactivo de Wagner
- IK.
- HgCl_2
- Nitrato de bismuto.

3.3.6. Materiales de Bioseguridad:

- Mandil.
- Guantes de goma.
- Mascara.

CAPITULO IV



4.1. RESULTADOS

4.1.1. OBTENCIÓN DE MATERIA PRIMA

El látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*) se recolecto de dos Cuencas distintas Nanay (Bajo) y Napo (Alto) respectivamente, mediante el método de tumba de árbol del cual se obtuvo 1 litro de látex, del cual se aisló la taspina



Imagen N° 1.- Tumba del árbol de Sangre de grado y aplicación de las técnicas de cortes transversales.



Imagen N° 2.- Recolección del látex de Sangre de grado.

4.1.1.1. Análisis químico cromogénico de las muestras de *Croton lechlerii* procedente de las cuenca del río nanay (bajo) y napo (alto).

Cuadro N° 2.- Tamizaje Fitoquímico del látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*).

	Cuenca del Nanay (Bajo)	Cuenca del Napo (Alto)
Reactivo de Dragendorff	+++	+++
Reactivo de Mayer	+++	+++
Reactivo de Wagner	+++	+++

Leyenda: (+) poco, (++) Regular, (+++) Abundante

4.1.2. Aislamiento del alcaloide:

Cuadro N° 3.- Cantidad de Taspina aislada del látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*).

Procedencia de látex	Cantidad de látex (ml)	Cantidad de látex seco (gr)	Cantidad de taspina aislada.
Cuenca del Nanay (Bajo)	1000 ml	250 gr.	18 gr
Cuenca del Napo (Alto)	1000 ml.	248 gr.	16 gr.

*En el presente cuadro se observa que de 1000 ml de la látex procedente de la cuenca del Nanay (Bajo) se obtiene 18 gr de Taspina, sin embargo la muestra procedente de la Cuenca del Napo (Alto) se obtuvo 16 gr. Existiendo una diferencia de 2 gramos en el rendimiento.

4.1.3. Rendimiento de Taspina.

Cuadro N° 4.- Determinación del rendimiento de taspina aislada de las muestras de *Croton lechlerii* (Sangre de grado), procedentes de las cuencas de los ríos Nanay (Bajo) y Napo (Alto) respectivamente.

Procedencia de látex	Cantidad de látex (ml)	Peso de látex como extracto seco (gr)	Peso de los cristales de taspina aislada.	% del rendimiento de Taspina.
Cuenca del Nanay (Bajo)	200 ml.	50 gr.	3.6 gr.	7.2 %
Cuenca del Napo (Alto)	200 ml.	49.6 gr.	3.2 gr.	6.45%

Como se puede apreciar en el cuadro; la cantidad de taspina aislada en 200 ml de látex de Sangre de grado de la Cuenca del Nanay (Bajo) fue de 3.6 gr mostrando un rendimiento de 7.2%, a diferencia de la Cuenca del Napo (Alto) la cantidad de Taspina aislada en 200 ml de látex de Sangre de grado fue de 3.2 gr con un rendimiento de 6.45%.

4.1.3.1. Pruebas Físicoquímicas.

Cuadro N° 5.- Resultados de las pruebas físico-químicas de la taspina aislada de las 2 muestras de *Croton lechlerii* (Sangre de grado).

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS					
PESO MOLECULAR		p.f. muestra de la cuenca Nanay (Bajo)	p.f. muestra de la cuenca Napo (Alto)	Forma y color de cristales	TLC hRf
Experimental	Literatura	Experimental	Experimental		
369.165	369.152	253	253	Blanco monoclínico	50

* En el Cuadro N°5 las pruebas físicoquímicas de Taspina de las dos Cuencas, indican que los resultados obtenidos en la parte experimental concuerdan con los datos de la literatura.

4.1.4. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESPECTROMÉTRICAS:

La lectura del espectro de RMN H⁺ y de C-13 de las dos muestras son idénticas (Ver anexos 3, 4, 5, 6)

4.1.4.1. RMNH⁺ (300 MHZ en CDCl₃)

Se puede observar un Singlete de 6 protones de los grupos metilos equivalentes en posición 1, con relación al nitrógeno del grupo etilamina en posición 4 a un desplazamiento δ 2.38 ppm.

Se observó un triplete de 2 protones del grupo carbeno (CH₂) en posición 3 respecto al grupo dietilamina y en posición 4 respecto a la dilactona y una constante de acoplamiento J= 8.1 Hz.

Se observó un triplete de dos protones correspondientes al grupo CH₂N (CH₃)₂ a 3.5 ppm y una constante de acoplamiento a 7.5 Hz.

Se observa un singlete a 7.18 ppm de un protón en posición 3.

Se observa un doblete a 7.31 ppm de un protón en posición 9 y una constante de acoplamiento J= 8.7 Hz.

Se observa un doblete a 8.21 ppm de un protón en posición 10 y una constante de acoplamiento J= 8.7Hz.

Esta lectura es válida por los espectros de la Taspina aislada de las dos muestras de látex de sangre de grado.

4.1.4.2. RMN C-13

Se observa 20 sendas que significa que la molécula de Taspina tiene 20 átomos de carbono no equivalentes.

Los desplazamientos de 33.2, 45.5 y 60.5 corresponden a los grupos carbonos del grupo sustituyente en posición 4, los valores 56.6 y 56.8 corresponden a los carbonos de los grupos metilos en posición 2 y 8.

A partir de los valores 111.7, 151.1, 151.4, 157.8 y 158.9 se puede señalar que estos valores corresponden a la estructura de los grupos cetona y de los anillos bencénicos que son parte constitutiva de estructura química.

4.2. DISCUSIÓN

El látex de sangre de grado (*Croton lechlerii*) procedente de las cuencas de los ríos Nanay (bajo) y Napo (Alto respectivamente varían en relación con su contenido de alcaloide (taspina) aislado siguiendo el mismo procedimiento para su aislamiento y purificación; pues mientras el látex de Sangre de grado procedente del río Nanay (Bajo) reporta un valor de 7.2% de rendimiento, el látex de Sangre de grado procedente del río Napo (Alto) reporta un rendimiento de 6.45% existiendo una diferencia significativa de rendimiento de 0.8 % que se puede visualizar, por lo que es evidente que lo mencionado por Vaisberg ⁽³⁶⁾, el cual señala que la variabilidad de rendimiento de un principio activo se debe a las variaciones interespecíficas que presenta la zona propia del clima y de las dinámicas geomorfológica del sendo.

Si tomamos como base de cálculo un litro de Sangre de grado que equivale a 248 gr de extracto seco para el látex del río Napo (Alto), el rendimiento sería el siguiente: 16 gr de Taspina, mientras que para un litro de latex de Sangre de grado procedente del río Nanay (Bajo) equivale a 250 gr de extracto seco se obtiene 18 gr de Taspina; mostrando una diferencia de 2 gr de taspina en relación a la producción de latex.

El gramo de taspina en el mercado Internacional se cotiza a 300 dólares USA (según <http://www.alibaba.com>)⁽³⁹⁾ 18 gr con este precio FOB equivaldría a 5,400 dolores USA, 16 gr equivale a 4,800 dólares USA una diferencia de 600 dólares USA; quiere decir que mayor ganancia se obtuviera del látex procedente de la Cuenca del río Nanay (Bajo), en comparación a lo mencionado por Meza E. que sostiene que la ganancia

anual es de \$1'420,800 USD, hoy en día la ganancia anual sería de \$1'971,000 USD, existiendo una diferencia de \$550,200 USD.

Esta evaluación del rendimiento permite establecer una ventaja comparativa útil para elegir al látex de Sangre de grado del Nanay (Bajo) y para su procesamiento a escala industrial sin menospreciar el látex de Sangre de grado procedente del río Napo (alto).

El análisis fisicoquímico de la sustancia aislada nos permite confirmar que se trata del alcaloide Taspina. El punto de fusión de 253° C es similar al de la literatura (23).

El valor de $R_f \times 100$ de TLC de 0.50 es un valor adecuado para valorar la pureza del alcaloide.

La prueba de $RMNH^+$ y de C-13 de espectros similares a los reportados por la literatura (23 y 28) con lo que queda demostrado que la sustancia aislada corresponde a la Taspina un derivado Benzopirano cuya fórmula es $C_{20}H_{19}O_6N$ y según la nomenclatura IUPAC se denomina 1-[2-(dimetilamino) etil]-3,8-dimetoxi [1]-Benzopirano [5,4,3-ede] [1] Benzopirano-5,10-diona.

4.3. CONCLUSIONES

De la identificación preliminar de alcaloide en las muestras de látex de Sangre de grado procedente de las cuencas de los ríos Nanay (Bajo) y Napo (Alto) respectivamente. El análisis químico Cromogénico con reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner confirma que ambas muestras poseen alcaloides.

De acuerdo a los objetivos y los resultados obtenidos el látex de Sangre de grado procedente de la Cuenca del río Nanay (bajo) tiene mayor rendimiento de taspina (7.2%) en relación al látex de sangre de grado procedente de la Cuenca del río Napo (Alto) cuyo rendimiento es de 6.45%.

El factor de variabilidad puede tener origen botánica referida al origen geográfico, evolución de la planta que permite que la magnoflorina precursor químico de la taspina se transforme con mayor facilidad en Taspina en la Cuenca del río Nanay (Bajo) que en la cuenca del río Napo (Alto).

Puede deberse al ciclo vegetativo, fecha en que predomina el periodo de floración que hace que disminuya el catabolismo del metabolito secundario taspina, o factores del entorno es sabido que cuando el río Amazonas de la cual es tributario el río Nanay está en época de creciente el río Napo se halla en periodo de vaciante y viceversa.

4.4. RECOMENDACIONES

Seguir investigando los motivos de la variabilidad al contenido de taspina del látex de Sangre de grado (*Croton lechlerii*) procedentes de estas dos Cuencas: río Nanay (Bajo) y río Napo (alto) respectivamente, además tener en cuenta el estudio de suelo y la zona más promisoría para mejoras filogenéticas de esta especie.

Realizar proyectos de desarrollo agroforestal con entidades gubernamentales para el mejoramiento socioeconómico de los poblados de la Cuenca del Nanay (Bajo).

Derivatizar la Taspina a clorhidrato de taspina para que sea un alcaloide hidrosoluble.

Realizar la cosecha teniendo en cuenta los modelos de manejo que utilizan los campesinos tales como: hora de cosecha, diámetro del árbol, follaje, ángulo de corte, precipitación y fase lunar.

Realizar estudios de látex de Sangre de grado considerando otros parámetros como edad, época de extracción, características de suelo, etc.

La cosecha puede empezar a partir del séptimo año, cuando tiene de 30 cm. de diámetro a la altura del pecho.

Realizar un estudio de prefactibilidad técnico-económico a fin de determinar el potencial de la especie con fines industriales.

El látex de la sangre de grado del presente estudio tiene condiciones óptimas para replicarse en plantaciones forestales con fines farmacéuticos.

Realizar ensayos cuantitativos y citotóxicos de otros alcaloides presentes en el látex de Sangre de grado con fines industriales.

4.5. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alberto M, Química de los Productos Naturales. 2006. España. Editorial Síntesis. Pág. 145-147.
2. Herforth A., Antifungal plants of the Peruvian Amazon: A Survey of ethnomedicinal uses and biological activity. [Honors Thesis]. Cornell University USA; 2002.
3. Arce J, Comunicación Personal; Iquitos, 2013.
4. Bloch D, Orgánica Chemistry. 2005. México D.F, Editorial Limusa, S.A., Pág. 690-698.
5. Brunenton J, Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. 1991. España, Editorial Acribia. Pág. 594 – 596.
6. De Marcano D, Hasegania M, Fitoquímica Orgánica. [Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico]. Caracas. Universidad Central de Venezuela, 1991.
7. Desmercheliere A, Witting F, Estudio del potencial de Reactividad Antioxidante en látex de Sangre de grado. Journal of the Ethnopharmacology. 1997. USA. 2 (58): 103-108.
8. Lobardo J. Diccionario Médico. 1994. España, Ediciones Doyna. Pág. 400.
9. Domínguez A. Fitoquímica y Caracterización del alcaloide. 1985. USA, Editorial WHO, Pág. 1456-1458.

10. Domínguez X. Cromatografía en papel y en capa delgada. 1882. Washington D.C. (USA). Editorial OEA), Pag. 1154- 1157.
11. Gibaja S. Pigmentos naturales Químicos. 1998, Lima-Perú. Editorial UNMSM. Pag. 345-346
12. Goodwin D, Merced A. Introduction to plant Biochemistry. 1988. USA, Editorial Pergamon Press (USA). Pag. 425- 427
13. Hernández R., Fernández C, Baptista L, María P. Metodología de la Investigación. 2010. México. 5^{ta} Edición. Editorial Me Grow Hill: Pag. 235-236.
14. Itokawich, Ichiharax, Mochizukim, Enomorit, Morita H, et al. Chemical Pharmaceutical Bolletin. 1981; 2(39): 1041-1042.
15. Judd, Campbell, Kellogg, Meza, Steveus y Donoghue. Plant Systematics. 2002. USA. Editorial Sinaver. Pag. 1057- 1062
16. Kelly Ross, Xie L. Total Synthesis of Taspina. Department of Chemistry.. E.F. Merkert Chemistry Center. Journal of organic. 1998 (USA). 2(63): pág. 8045-8048.
17. Lewis W, Stonard R, Porra J, Muso B, US. Patent. 5 (156,846)-1992. Chemical Abstract USA. 1992-117 (245630).
18. Macbride J. Flora of Perú V. XIII. , Publicación Field Natural Botánica Chicago. 1951. 3(1) (USA). pág. 61-80.

19. Málaga E, Efecto del Clorhidrato de Taspina sobre la curación de la ulcera gástrica inducida en ratas. 1991. [Tesis de Bachillerato en Biología] PUCP-Lima. Servicio de Publicaciones e intercambio Científico. Pontifica Universidad Católica del Perú.
20. Meza N. "Sangre de grado, el reto de su preservación sustentable en el Perú. 1999. Lima-Perú. Edición Elsa N. Meza.
21. Milanowsky I, Dennis J., Winter E, Lewis W. Journal of Natural Products. J. Pharm. 2002 USA. 3(65): 814-819.
22. Mille M. Estudio sobre el Mecanismo de acción del principio activo Taspina de Sangre de grado. 1985. [Tesis Bachiller en Biología]. PUCP- Lima. Servicio de Publicaciones e intercambio Científico. Pontifica Universidad Católica del Perú.
23. Mustiga M, T. Aislamiento del alcaloide de Taspina del látex de *Croton lechlerii* (sangre de grado). 1982. [Tesis Bachiller] PUCP-Lima. Servicio de Publicaciones e intercambio Científico. Pontifica Universidad Católica del Perú.
24. Nalvarte W. Plantas Amazónicas de uso Medicinal. 1999. Lima- Perú. Ed. U.A la Molina. Pag. 47-49
25. Persinos G. Amazon Natural Drug Co. Us. Patent 3694. Chemical Abstract. 1973: 7827-78.
26. Persinos G, Blomister R, Blake D., Farnsworth N. South American Plants II: Taspine Isolation and Anti-antiinflammatory activity. 1979. Journal of pharmaceutical Science - USA. 68(1): 124-126.

27. Platanova T, Kusovkov A, Sheeinker Y., Zhur K. *Orgánica Chemistry. Journal Chemistry*. 2005. 7(2). 34-45
28. Shamma M, Moniot J. A Biogenetically Patterned Conversion of Magnoflorine in to Taspina. 1971. *Journal Chemical Society*. 2(6). pág. 1065 - 1066.
29. Shaman Pharmaceuticals. El Manejo Sostenible de Sangre de grado. *Material Educativo*. 1999. 1(1). pág. 1-3.
30. Sethi L. *Chemical Pharmaceutical Bolletin. Journal Pharmaceutical Science*. 1977. 2(12): 7-9.
31. Schiper R. Contribución a la flora de la Amazonia Peruana. 1990. *Boissiera* (44) pág. 44-58.
32. Shriner, Fuson, Curtin. *Identificación de los compuestos Orgánicos*. 1965. USA. Editorial John Willey S.A. Pag 456-463
33. Taiz, L., E. Zeiger. *Plant Physiology*. 2002. 3ª Ed. *Sinauer Associates Inc*, Publisers: Massachusetts. Pag: 171-192, 285-291.
34. *The Wall Street Journal*. 1997, 1(3). USA.
35. Ustinenko C, Bakamoviwk. *Compuestos químicos de las euforbiáceas*. 1980. Moscu-Rusia. Ed. M.R.
36. Vaisber A. Millan J. Taspine in the Cicatrizant Principle in Sangre de Grado Extracte from (*Croton lechlerii*). 1989. Córdova. *Plantas M.C* Vol. 5 (2): 140 – 143.

37. Whitson A. Antifungal Plants of the Peruvian Amazon. A survey of Medicinal uses and biological activity of plants. [Tesis Cornell University] U.S.A. 2002.
38. Wilson S, Nembert L., Huffman J. The chemistry of the Euforbiaceae a New Diterpen from *Croton Californicus*. Journal of the American Chemical Society. 1976. 98(12): 3669-3673.
39. Precio de Taspina 2014. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.alibaba.com/Sangre de grado/taspine.htm>. Consultado 20 de Setiembre 2014.

ANEXOS.

Anexo N° 1. Constancia del Herbarium Amazonense de la UNAP- CIRNA.



UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales

CONSTANCIA N° 55

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por los Bachilleres: **LINDBERGH ARBILDO TELLO** y **JORGE EDUARDO, PÉREZ MACEDO**; de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; son parte de la tesis titulada: **"RENDIMIENTO DE TASPINA AISLADA DE 2 MUESTRAS DE *Croton lechleri* (SANGRE DE GRADO) DE LAS CUENCAS DEL BAJO NANAY Y ALTO NAPO RESPECTIVAMENTE"**. La cual fue verificado e identificado en este Herbarium Amazonense- AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

Familia	Nombre Científico	Nombre Vulgar
EUPHORBIACEAE	<i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.	"sangre de grado"

Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

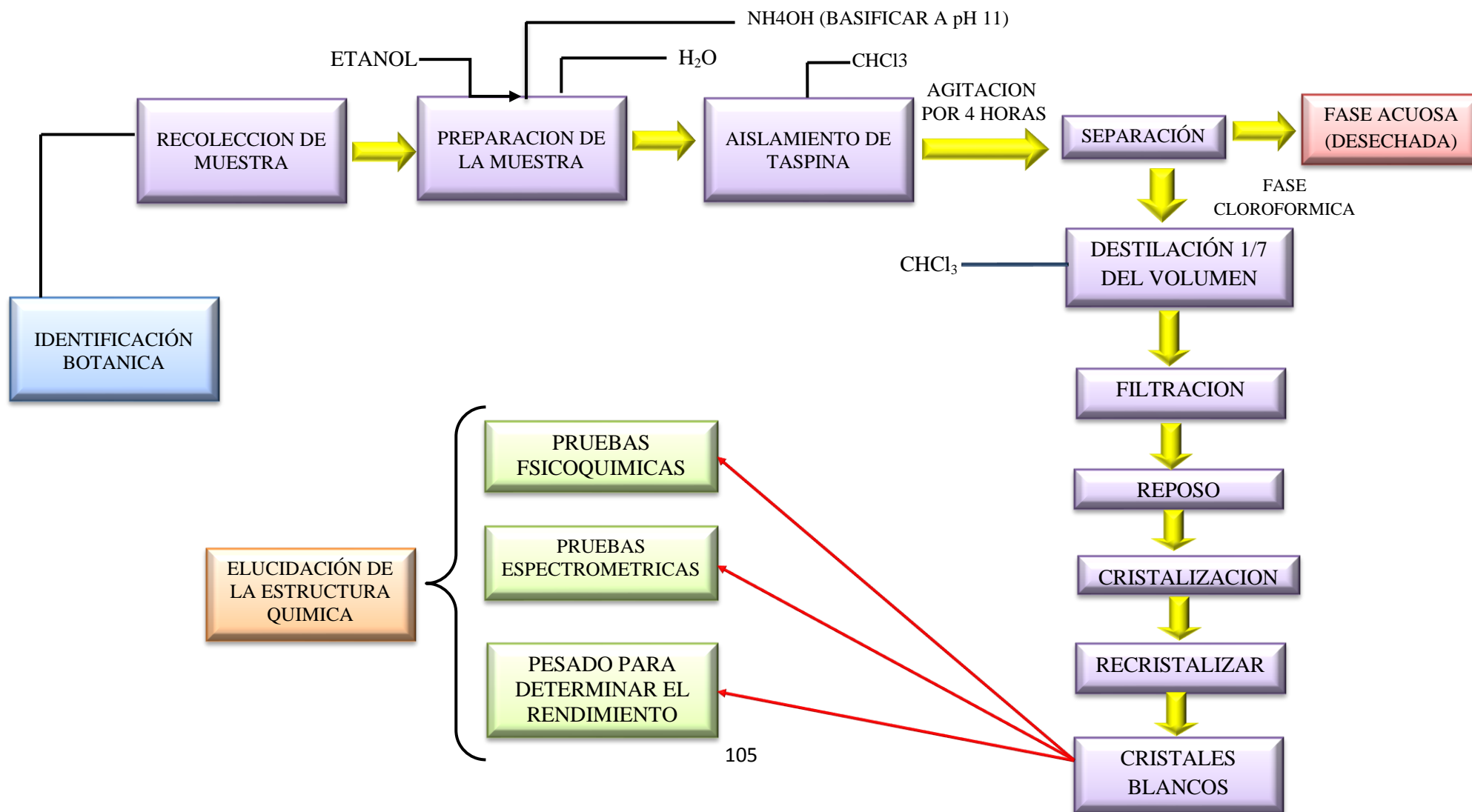
Iquitos, 17 de Octubre del 2014

Atentamente,

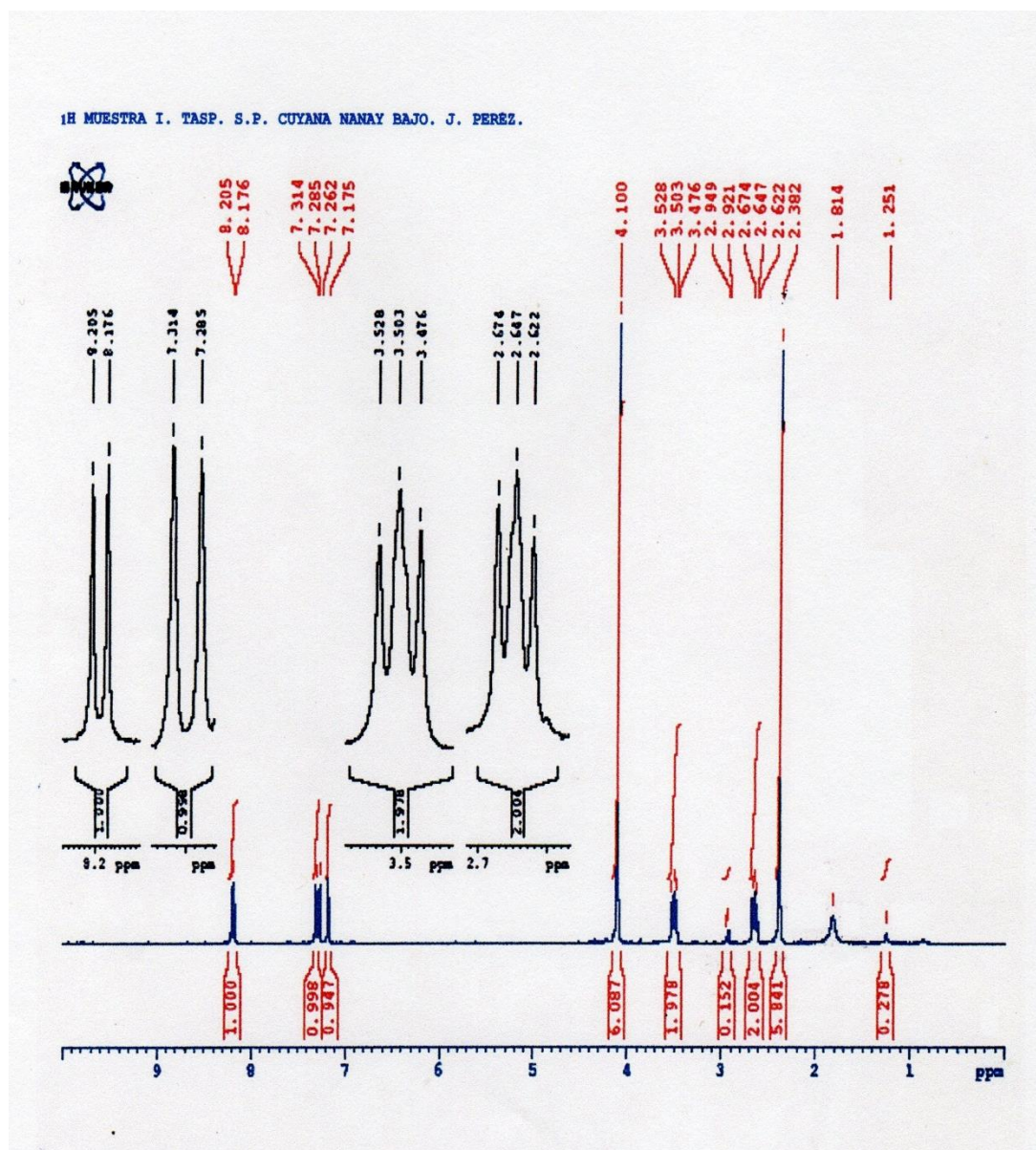
Blgo. RICHARD HUARANCA ACOSTA
Coordinador, AMAZ-CIRNA-UNAP



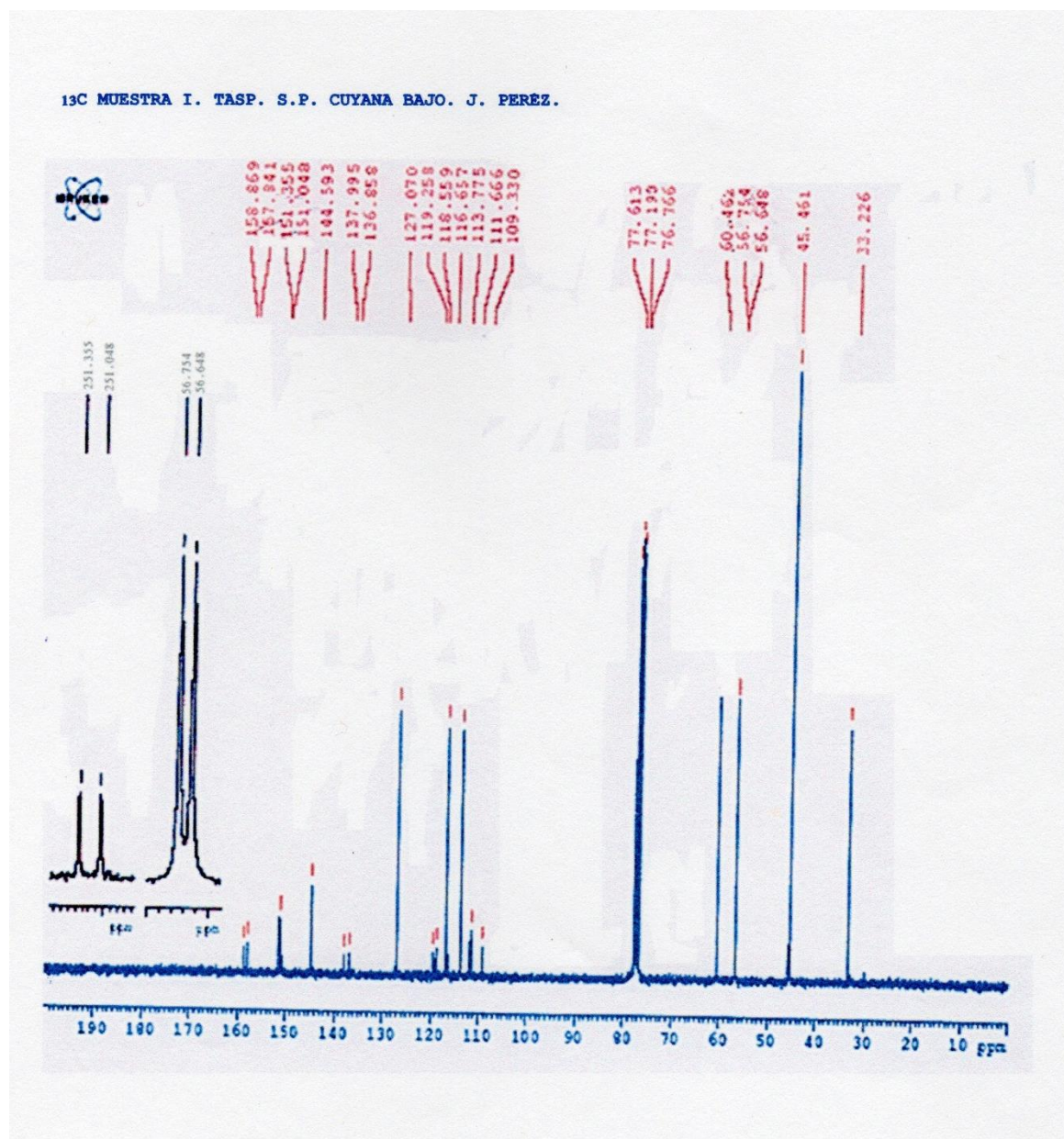
Anexo N° 2: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DEL RENDIMIENTO DE TASPINA AISLADA DE 2 MUESTRAS DE *Croton lechlerii* (SANGRE DE GRADO) DE LAS CUENCAS DEL BAJO NANAY Y ALTO NAPO RESPECTIVAMENTE.



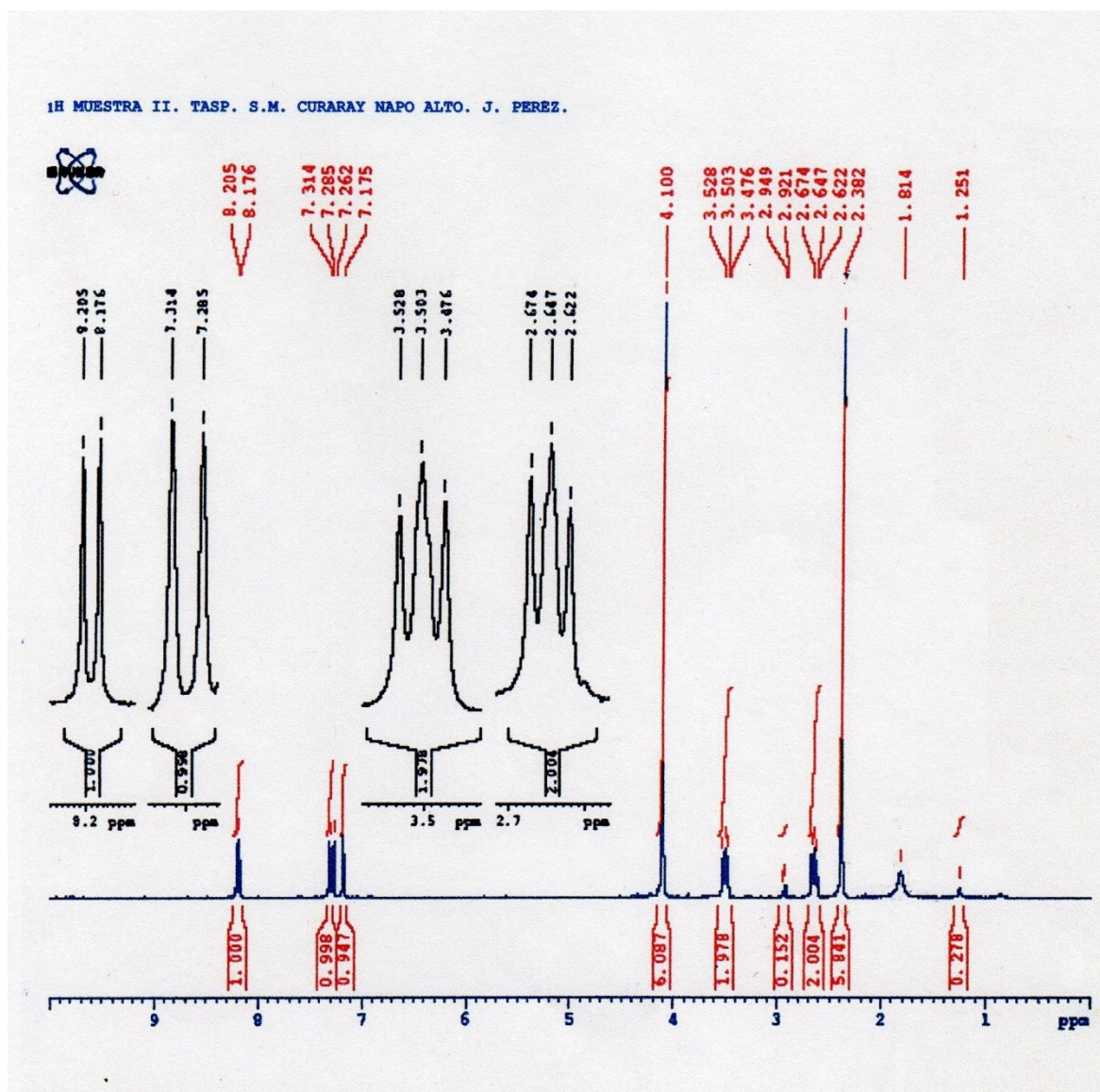
Anexo N° 3. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN H⁺) San Pablo de Cuyana Nanay (Bajo).



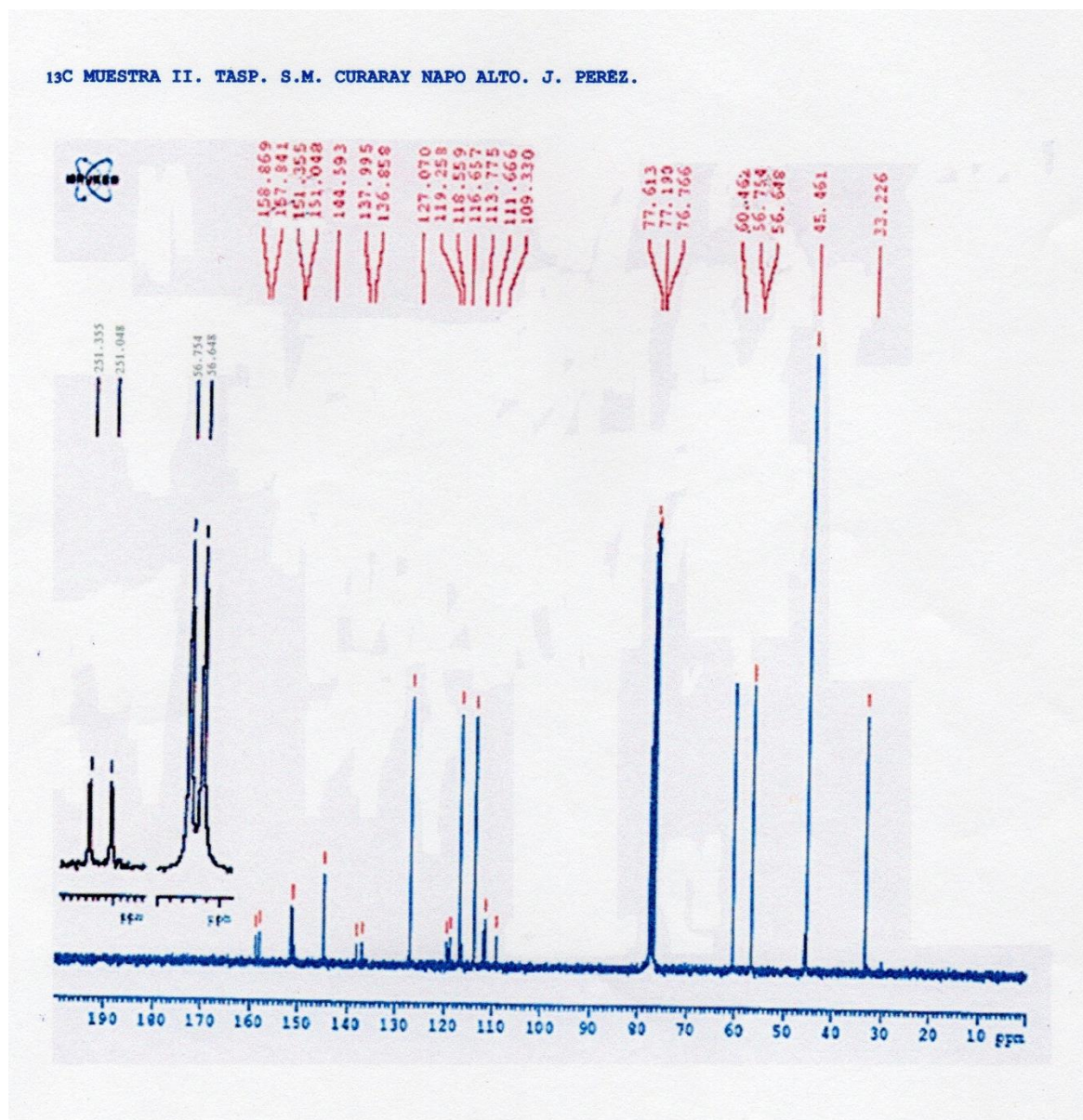
Anexo N° 4. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN C-13)
San Pablo de Cuyana Nanay (Bajo).



Anexo N° 5. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN H+) Santa María del río Curaray (Alto).



Anexo N° 6. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN C-13)
Santa María del río Curaray (Alto).



**Anexo N° 7. Certificado de los Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones
y Carbono 13 (RMN H⁺; C-13) S.P. Cuyana Nanay Bajo.**



Pontificia Universidad Católica del Perú
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
SECCIÓN QUÍMICA

REPORTE DE ANÁLISIS DE RMN

EL laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Sección Química, se complace en brindarles apoyo en el análisis RMN ¹H, ¹³C solicitado para la muestra **TASP. S.P. CUYANA NANAY BAJO**.

De ser utilizados los resultados de este informe en alguna presentación pública o escrita, por favor indicar que los espectros fueron obtenidos en el espectrómetro **Bruker Avance III 300 de la Pontificia Universidad Católica del Perú**, a 300.13 MHz para el núcleo de ¹H y 75.47 MHz para el de ¹³C.

Muestra: TASP. S.P. CUYANA NANAY BAJO

Para el espectro de protón (¹H – RMN) se preparó una solución con 5 mg de la muestras disueltas en 1 ml de cloroformo deuterado y se realizó un total de 16 adquisiciones, utilizando un pulso de 2.70 microsegundo y un ancho espectral ($S_{\omega} = 6,024.10\text{Hz}$) de 20.07 ppm.

En el espectro ¹H – RMN obtenido, la señal residual del solvente (CDCl₃) aparecen alrededor de 7.26 ppm y los picos de interés se hallan en el rango de δ (9-1 ppm).

Para el espectro de (¹³C – RMN) se realizaron un total de 20600 adquisiciones utilizando un pulso de 8.6 microsegundos y un ancho espectral de 245.38 ppm ($SW = 18,518.52\text{Hz}$).

En el espectro ¹³C - RMN de), las señales detectadas están dentro del rango δ (160-30 ppm).


Luis A. Nieva



Lima, 20 de Agosto de 2014.

**Anexo N° 8. Certificado de los Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones
y Carbono 13 (RMN H⁺; C-13) S.M. Curaray Napo Alto.**



Pontificia Universidad Católica del Perú

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
SECCIÓN QUÍMICA

REPORTE DE ANÁLISIS DE RMN

EL laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Sección Química, se complace en brindarles apoyo en el análisis RMN ¹H, ¹³C solicitado para la muestra **TASP. S.M.CURARAY NAPO ALTO**.

De ser utilizados los resultados de este informe en alguna presentación pública o escrita, por favor indicar que los espectros fueron obtenidos en el espectrómetro **Bruker Avance III 300 de la Pontificia Universidad Católica del Perú**, a 300.13 MHz para el núcleo de ¹H y 75.47 MHz para el de ¹³C.

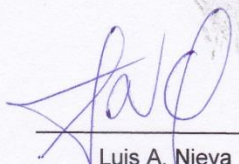
Muestra: TASP. S.M CURARAY NAPO ALTO

Para el espectro de protón (¹H – RMN) se preparó una solución con 5 mg de la muestras disueltas en 1 ml de cloroformo deuterado y se realizó un total de 16 adquisiciones, utilizando un pulso de 2.70 microsegundo y un ancho espectral (S_{ω} = 6,024. 10Hz) de 20.07 ppm.

En el espectro ¹H – RMN obtenido, la señal residual del solvente (CDCl₃) aparecen alrededor de 7.26 ppm y los picos de interés se hallan en el rango de δ (9-1 ppm).

Para el espectro de (¹³C – RMN) se realizaron un total de 20600 adquisiciones utilizando un pulso de 8.6 microsegundos y un ancho espectral de 245.38 ppm (SW= 18,518.52 Hz).

En el espectro ¹³C - RMN de), las señales detectadas están dentro del rango δ (160-30 ppm).


Luis A. Nieva



Lima, 20 de Agosto de 2014.

Anexo N° 9. Imágenes del Látex de Sangre de grado y Taspina aislada.



Imagen 3. Látex de sangre de grado (*Croton lechlerii*).



Imagen 4. Hojas e inflorescencia del árbol de Sangre de grado (*Croton lechlerii*).

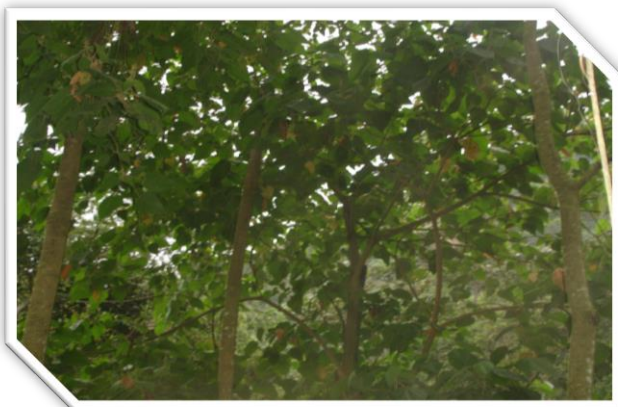


Imagen 5. Hojas y fruto del árbol de sangre de grado (*Croton lechlerii*).



Imagen 6. Látex de Sangre de Grado Procedentes de la Cuenca del Nanay (Bajo) y Napo (Alto).



Imagen 7. Colocar cloroformo a la Muestra de látex.



Imagen 8. Agitación de Solución.



Imagen 9. Separación la fase clorofórmica y fase acuosa



Imagen 10. Fase clorofórmica.



Imagen 11. Látex de Sangre de grado llevado a sequedad.



Imagen 12. Taspina aislada (Color amarillo)



Imagen 13. Recristalización de Taspina

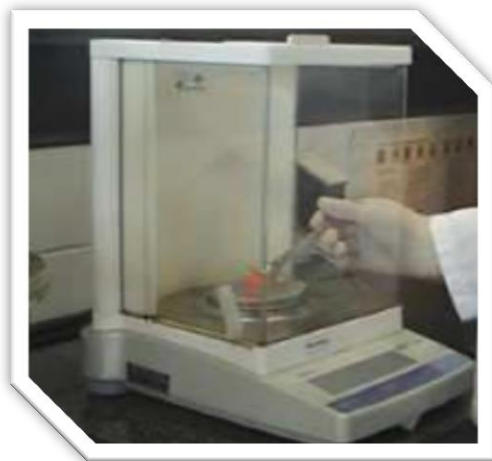


Imagen 14. Peso de la Taspina Cristalizada