

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

TITULO DE TESIS

**“SEPARACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
PULPA DE CAÑA DE FISTULA (*Cassia fistula*) UTILIZADA
COMO ESPECTORANTE”**

TESIS DE GRADO

**Previo a la obtención del Título de:
BIOQUÍMICA FARMACEUTICA**

**Presentado por:
MYRIAM PATRICIA PÉREZ FREIRE**

RIOBAMBA – ECUADOR

2010-2011

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

NOMBRE

FIRMA

FECHA

DECANA

Dra. Yolanda Días

DIRECTOR DE ESCUELA

Dr. Luis Guevara

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Cumandá Játiva

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Msc. Simón Moreano

DIRECTOR DEL CENTRO

DE DOCUMENTACIÓN

Sr. Carlos Rodríguez

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo, está dedicado a Dios, mis padres; Luis Pérez, Fanny Freire a mi hijo Mateo Navas por ser el motor de mi vida a mi esposo Alex Navas por su apoyo incondicional y a todos quienes participaron en este sueño hoy hecho realidad.

BQF. Miriam Pérez

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por brindarme la vida y la oportunidad de compartir mis logros con mis seres queridos.

Agradezco con mucho Amor a mis padres, hermanas, esposo e hijo quienes me han apoyado no solo en la vida estudiantil, sino en mi formación como ser humano.

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia por su excelente formación académica.

Quiero agradecer profundamente a mi directora de tesis Dra. Cumandá Játiva al miembro del tribunal Msc. Simón Moreano por su aporte científico brindado para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Un agradecimiento fraterno a la Escuela de Bioquímica y Farmacia que a través de la Dra. Cumandá Játiva brindaron su confianza, el aporte Técnico, Científico para que de esta forma se haya llevado a cabo esta investigación.

Yo Myriam Patricia Pérez Freire, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis de grado y el patrimonio intelectual de la tesis de grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO.

Myriam Patricia Pérez Freire.

INDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| °C | Grados Celsius |
| cm | Centímetros |
| g | Gramo |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| EtOAc | Acetato de etilo |
| CL ₃ CH | Cloroformo |
| Me(OH) | Metanol |
| Bu(OH) | Butanol |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| Ce SO ₄ | Sulfato de cerio |
| L | Litro |
| mL | Militro |
| mm | Milímetro |
| nm | Nanómetro |
| UV | Ultravioleta |
| - | Negativo |
| ↓ | Precipitado |
| op | Opalescencia |
| TLCP | Cromatografía Capa Fina Preparativa |
| λ | Longitud de onda |

INDICE GENERAL

| | |
|------------------------|--|
| Agradecimiento | |
| Dedicatoria | |
| Índice de abreviaturas | |
| Índice General | |
| Índice de Gráficos | |
| Índice de Tablas | |

CONTENIDO

| CAPITULO | Pág. |
|---|------|
| INTRODUCCION..... | 6 |
| CAPITULO II | |
| 1. MARCOTEÓRICO..... | 7 |
| 1.1. DESCRIPCIÓN BOTANICA..... | 7 |
| 1.1.1. ORIGEN..... | 7 |
| 1.1.2. Clasificación botánica..... | 8 |
| 1.1.3. Características botánicas..... | 8 |
| 1.1.4. Formas de utilización..... | 8 |
| 1.1.5. Composición Química..... | 9 |
| 1.1.6. Toxicidad..... | 9 |
| 1.2. Recolección e Identificación del Material Vegetal para su Procesamiento..... | 10 |
| 1.2.1 Recolección del Material Vegetal..... | 10 |
| 1.2.2. Fragmentación..... | 10 |
| 1.3.3. Extracción..... | 11 |
| 1.3.1.1 Métodos de extracción..... | 12 |
| 1.3.1.2. Clasificación de los extractos vegetales..... | 12 |
| 1.4. GLUCOSIDOS..... | 12 |
| 1.5. GRUPOS FITOQUÍMICOS..... | 12 |
| 1.6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO..... | 12 |
| 1.6.1 REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN..... | 12 |
| 1.6.1.1. Ensayo de Dregendorff..... | 13 |
| 1.6.1.2. Ensayo Wuagner..... | 13 |
| 1.6.1.3. Ensayo Mayer..... | 14 |

| | |
|---|----|
| 1.6.1.4. Ensayo de Lieberman – Buchard..... | 14 |
| 1.6.1.5 Ensayo de Espuma..... | 14 |
| 1.6.1.6 Ensayo de Cloruro Férrico..... | 14 |
| 1.6.1.7 Ensayo de Shinoda..... | 15 |
| 1.6.1.8. Baljet | 15 |
| 1.6.1.9. Fehling..... | 15 |
| 1.7 Hidrólisis..... | 15 |
| 1.8 LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA..... | 16 |
| 1.8.1 IDENTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA..... | 16 |
| 1.8.2. ADSORBENTES..... | 17 |
| 1.8.3. SILICAGEL..... | 17 |
| 1.8.4 TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE PLACAS..... | 18 |
| 1.8.5. TÉCNICA APLICACIÓN DE MUESTRAS..... | 19 |
| 1.8.6. ELECCIÓN DEL ELUYENTE..... | 19 |
| 1.8.7. Constante de Distribución..... | 20 |
| 1.8.8. Factor de Capacidad..... | 21 |
| 1.8.9. Factor de Selectividad..... | 21 |
| 1.8.10 Eficiencia de una Columna..... | 21 |
| 1.8.11. Resolución de una columna..... | 22 |
| 1.8.12. Desarrollo de la cromatografía..... | 22 |
| 1.8.13. Localización de Sustancias..... | 23 |
| 1.8.14. Constantes R_f Y R_x | 24 |
| 1.9. LA ESPECTROSCOPIA..... | 24 |
| 1.9.1. El espectrofotómetro ultravioleta – visible..... | 26 |
| 1.10.Reglas de Woodward – Fieser..... | 28 |
| CAPITULO III | |
| 2.- PARTE EXPERIMENTAL..... | 29 |
| 2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN..... | 29 |
| 2.2 OBTENCIÓN DEL VEGETAL..... | 29 |
| 2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS..... | 29 |
| 2.3.1 EQUIPOS..... | 29 |
| 2.3.2 MATERIAL DE LABORATORIO..... | 29 |
| 2.3.3 REACTIVOS..... | 30 |
| 2.4 FACTORES DE ESTUDIO..... | 30 |

| | |
|--|-----|
| 2.5 Metodología de la preparación de muestra, separación y purificación de metabolitos secundarios..... | 30 |
| 2.5.1 EXTRACCIÓN DE PULPA..... | 30 |
| 2.5.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS..... | 31 |
| 2.5.2.1 Extracto en Acetato de Etilo..... | 31 |
| 2.5.2.2 Extracto Clorofórmico..... | 31 |
| 2.5.2.3. Extracto Metanólico..... | 31 |
| 2.5.2.3.1. Preparación del extracto Hidrolizado..... | 31 |
| 2.5.2.4. Extracto Butanólico..... | 32 |
| 2.5.2.5. Extracto Básico..... | 32 |
| 2.5.2.6 Extracto Acuoso..... | 32 |
| 2.6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA SOLUCIÓN DE LOS EXTRACTOS..... | 34 |
| 2.7. EXTRACCIÓN DE TERPENOIDES..... | 35 |
| 2.7.1. Según el tamizaje Cromatografía para identificación de metabolitos flavonoides).... | 36 |
| 2.7.1.1. Placa Preparativa del extracto Butanólico..... | 36 |
| 2.7.1.2. Verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa del extracto butanólico..... | 37 |
| 2.7.2. Cromatografía para identificación de terpenos..... | 37 |
| 2.7.3 Cromatografía para identificación de terpenoides de baja polaridad..... | 38 |
| 2.7.4.1 Metodología de separación de metabolitos en placa preparativa..... | 38 |
| 2.7.4.2 Placa preparativa de la unión del extracto Metanólico y Butanólico..... | 39 |
| 2.7.4.3. Verificación de pureza de metabolitos aislados en placa preparativa de la unión del extracto Metanólico y Butanólico..... | 39 |
| 2.8. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFIA COLUMNA..... | 40 |
| 2.8.1. Placa de las fracciones obtenidas Cromatografía en Columna del Extracto Clorofórmico..... | 40 |
| 2.8.2. Cromatografía de fracciones en Columna del extracto clorofórmico..... | 40. |
| 2.8.3. Placa de las fracciones #15 a #18 obtenida por Cromatografía en Columna..... | 41 |
| 2.8.4. Cromatografía de comprobación de las fracciones unidas del extracto Clorofórmico..... | 42 |
| 2.8.5 Cromatografía de las fracciones #1,#3 del extracto clorofórmico..... | 43 |
| 2.8.6. Cromatografía de las fracciones #5, #7 del extracto clorofórmico..... | 43 |
| 2.9 Extracción de flavonoides por cromatografía columna del extracto Butanólico..... | 44 |

| | |
|---|----|
| 2.9.1. Cromatografía de las fracciones #1, #3 del extracto butanólico..... | 44 |
| 2.9.2. Cromatografía de las fracciones #4, #5, #6, #7 del extracto butanólico..... | 45 |
| 2.9.3. Cromatografía de las fracciones #8, #9 del extracto butanólico..... | 45 |
| 2.9.4. Cromatografía de las fracciones #10, #11, #12, #13 del extracto butanólico..... | 46 |
| 2.9.5. Cromatografía de las fracciones #14 y #15 del extracto butanólico..... | 46 |
| 2.9.6. Cromatografía de las fracciones #16, #17, #18, #19, del extracto butanólico..... | 47 |
| 2.9.7. Cromatografía de las fracciones #20, #21, #22, #23, del extracto butanólico..... | 47 |
| 2.9.8. Cromatografía de las fracciones #1, #2, #3, #4, #5 del extracto clorofórmico..... | 48 |
| 2.9.9. Cromatografía de las fracciones #6, #7, #8, #9 del extracto clorofórmico..... | 49 |
| 2.9.10. Placa Preparativa del extracto clorofórmico de la unión de las fracciones #3 y #4..... | 50 |
| 2.9.11. Verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de la unión de las fracciones 3 y 4 del extracto Clorofórmico..... | 51 |
| 2.9.12. Placa Preparativa del extracto clorofórmico de la unión de las fracciones #6 y #7..... | 51 |
| 2.9.13. Verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de la unión de las fracciones 6 y 7 del extracto Clorofórmico..... | 52 |
| 2.9.14. Placa Preparativa del extracto clorofórmico de la unión de las fracciones 8 y 9..... | 52 |
| 2.9.15. Verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de la unión de las fracciones 8 y 9 del extracto Clorofórmico..... | 53 |
| CAPITULO IV. | |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 59 |
| 3.1 CONTROL CALIDAD DE LA DROGA..... | 59 |
| CAPITULO V | |
| 4.- CONCLUSIONES..... | 63 |
| 5.- RECOMENDACIONES..... | 63 |
| 6.- BIBLIOGRAFÍA..... | 64 |
| 6.1. GENERAL..... | 64 |
| 6.2 .ESPECÍFICA..... | 64 |
| INDICE DE ABREVIATURAS..... | 65 |
| LISTA DE GRÁFICOS | 68 |

| | |
|----------------------|----|
| LISTA DE TABLAS..... | 69 |
|----------------------|----|

LISTA GRAFICOS

| N° DESCRIPCIÓN | Pág |
|--|-----|
| Grafico#1: Caña fistula (<i>Cassia fistula</i>)..... | 7 |
| Grafico #2 Principios activos de la <i>Cassia fistula</i> | 10 |
| Grafico #3.-Forma de aplicar la muestra..... | 14 |
| Grafico #4.-Preparación del extracto de caña fistula (<i>cassia fistula</i>)..... | 33 |
| Grafico #5.- Terpenoides que se encuentran presentes en el extracto de caña fistula (<i>cassia fistula</i>)..... | 60 |

LISTA DE TABLAS

| N° DESCRIPCIÓN | Pág |
|---|-----|
| Tabla #1.- Valores de absorción para las BI y BII de los diferentes..... | 27 |
| Tabla #2.-Reglas de Woodward para compuestos carbonílicos conjugados..... | 28 |
| Tabla #3. Determinación del peso en concentración de extractos..... | 32 |
| Tabla #4.-De las cromatografías que se obtiene realizar una reunión | 42 |
| Tabla #5.-De las cromatografías que se obtiene realizar una nueva reunión de los extractos concentrados..... | 44 |
| Tabla #6 Tamizaje Fitoquímico de los extractos..... | 56 |
| Tabla #7.-Extractos con terpenos son: Acuoso, Butanólico y Clorofórmico..... | 57 |
| Tabla #8.-Cromatografía en capa fina para identificación de saponinas..... | 57 |
| Tabla #9.- Placa preparativa de la unión del extracto Metanólico y Butanólico..... | 57 |
| Tabla #10.- Verificación de pureza de metabolitos aislados en placa preparativa de la unión del extracto Metanólico y Butanólico..... | 58 |
| Tabla #11.-Extracción de saponinas por CC de las fracciones | 58 |
| Tabla# 12 Determinación de terpenos por medio Woodward y Fieser..... | 57 |
| Tabla #13 Reglas para dienos Woodward y Fieser..... | 59 |

INTRODUCCIÓN

Desde hace milenios, las drogas provenientes de plantas han sido utilizadas para aliviar o curar enfermedades del hombre, siendo en tiempos remotos la única fuente de medicina para el género humano. En nuestros días se estima que un 80% de la población que vive en países en desarrollo depende fundamentalmente de la práctica de la medicina tradicional para sus necesidades de cuidados primarios de salud y cerca de 121 sustancias químicas son reconocidas como drogas medicinales y son comercializadas en todo el mundo, con importantes rendimientos. De los 25 medicamentos mejor vendidos durante 1991 aproximadamente la mitad son productos provenientes o derivados de los mismos. (22)

La revisión bibliográfica de la caña fístula (*Cassia fistula*) indica que tiene varios usos en la medicina ancestral o etnomédica como, analgésico, antiinflamatorio, purgante laxante débil, hipoglucemiante antioxidante, antibacteriano, antiviral, laxante, protectora del hígado, anti tumoral, reducir el colesterol, aliviar el dolor y reducir la fiebre y como expectorante e hipocolesterémica esta es una de las razones para realizar el estudio de la composición química, como lo demuestra se emplea en etnobotánica americana como hipoglucemiante.

Las referencias bibliográficas determinan la presencia de antraquinonas que son las responsables del efecto laxante, pero el tamizaje fitoquímico de la pulpa de la caña fístula indica la presencia de saponinas las cuales son abundantes, pero no están reportadas razón por la cual nos incentiva a realizar un estudio de estos metabolitos.

En el mercado de los fitofármacos se encuentran varios productos en forma de jarabe los cuales no indican la composición química y tampoco la cantidad de metabolitos activos “puede ser porque no existe publicaciones sobre este tema.”

Se planteó los siguientes objetivos: Separar, purificar e identificar con pruebas cualitativas el grupo fitoquímico presente en pulpa de caña fístula, Preparar los extractos de pulpa de caña fístula, Realizar el tamizaje fitoquímico de los extractos de separación cromatografía de los extractos obtenidos, Purificar los metabolitos y obtener los espectros UV.

Del tamizaje fitoquímico se tiene que están derivados fenólicos, terpenos y alcaloides la separación por cromatografía de capa fina, preparativa y columna; la pureza también se comprueba por capa fina normal. Se tiene referencia de que son los terpenoides los responsables del efecto expectorante que han sido aislados en el presente trabajo pero no se pueden determinar su estructura.

CAPITULO I

1.- MARCO TEÓRICO

1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

CAÑA FISTULA (*Cassia fistula*)



Grafico #1: *Cassia fistula* (14)

1.1.1. ORIGEN

Originario de Asia tropical. Presente en climas cálido, semicálido, semiseco y templado entre los 8 y los 2300 msnm. Crece en terrenos de cultivo y de temporal. Adorna zonas urbanas, asociado a vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, además de matorral xerófilo.(15)

Historia y Cultivo

Fray Francisco Jiménez en su Historia Natural del Reino de Guatemala menciona la abundancia de estos árboles en tierras calientes y húmedas (Williams 1981); en la región de Petén se observa el árbol en las orillas de las aguadas y ruinas de antiguas ciudades Mayas (Lundell, 1937). Se ha introducido en otras regiones tropicales del Viejo Mundo como árbol ornamental por lo vistoso de sus flores (Geilfus 1989, Morton 1981, Standley & Steyermark 1946)

1.1.2. Clasificación botánica

La Red Latinoamericana de Cooperación Técnica de Sistemas Agroforestales la clasifica de la siguiente manera:

Nombre común LLUVIA DE ORO, CAÑA FÍSTULA

Nombre: *Caña Fístula*

Nombre científico: *Cassia fistula L.*

Familia: *Fabaceae*

Género: *Fabaceae o Leguminosae*

Clase: *Magnoliópsida.*

Sinónimos: *C. grandis L., C. fistuloides, C. bonplandiana DC., C. rhombifolia Roxb., C. mollis Vahlç (13)*

1.1.3. Características botánicas

Árbol grande , hasta 30 m de alto, ramas extensas, pilosas, corona redondeada esparcida, tronco de un metro de diámetro, corteza escamosa, fibrosa, café, estipulas muy pequeñas, lineares, deciduas. Hojas pinadas, peciolo corto; foliados oblongos, 8-20 pares, redondos en los extremos, 3-5 cm de largo, brillantes, puberulentos o glabros. Flores amarillas hasta blancas. Fruto en vaina cilíndrica negruzco, leñoso, indehiscente, 30-80 cm. de largo, septado, pulpa azucarada. Semillas numerosas, transversas, aplanadas, comprimidas, negras o cafés. (23)

1.1.4. Formas de utilización

Propiedades Farmacológicas

Catártico: (laxante y purgante): La actividad laxante se atribuye a las antraquinonas, que aumentan el tono del músculo liso en la pared del intestino grueso (Arteche 1992).

Antibacteriana: Los extractos de caña fístula ejercen una acción antibacteriana, frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* (Gupta 1995), *Staphylococcus flexneri*, *S. dysenteriae* y *S. paratyphi A y B* (Duke 1986).

Se trata de un laxante muy suave, con un doble mecanismo de acción:

- Las antraquinonas, actúan estimulando las terminaciones nerviosas de la pared del intestino.
- Las pectinas, mucílagos y demás glúcidos, aumentan la presión osmótica en la luz intestinal, lo que se traduce en un aumento volumétrico de las heces.
- La caña fístula se emplea en etno-botánica americana como hipoglucemiante, actividad que ha sido comprobada experimentalmente.
- Se ha descrito una acción antiviral, al inducir la estimulación del interferón.
- Además es inmunomoduladora, por activación de la blastogénesis de los linfocitos.

(4)

Usos significativos encontrados en la Investigación Etnobotánica Nicaragüense:

La Caña Fístula fue reportada por 83 personas; (10.8 %) de ellas refieren usarla para el hígado; en menor porcentaje, la utilizan para afecciones de la sangre, afecciones del estómago, afecciones de la piel y tos. (24)

1.1.5. Composición Química

En las hojas y vainas de *C. fístula* se han detectado los flavonoides: (-)-epiafzelquina, (+)-catequina, kaempferol y sus glicósidos; clitorina; 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona, ácido crisofánico, fisciona, rheína y su glicósido, sennósidos A y B, b-sitosterol, stigmasterol y triptófano (Gupta 1995).

Epi-afzelechín, camferol y sus derivados metoxilados y glicosilados, así como (marcador) quercetín, que sólo se encuentra en las hojas, donde también se han identificado los derivados antraquinónicos fisiól, rehína, su glucósido y los senósidos A y B. Dentro de este grupo de compuestos, la senidina y la reína han sido identificadas en la pulpa del fruto.

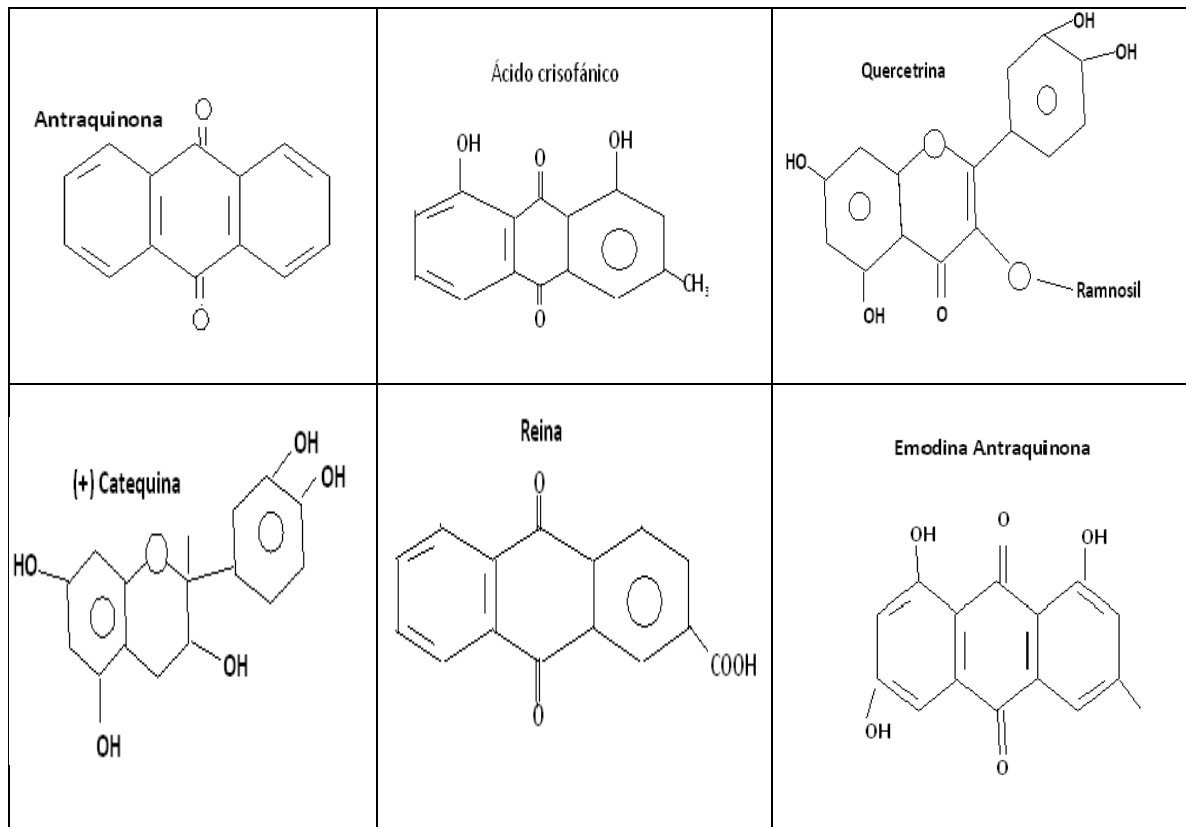
En las flores se han identificado los esteroloes daucosterol, estigmasterol, iso-fucosterol, beta-sitosterol, y el alcaloide acetato de aurantiamida; y en los pétalos, anteras y filamentos la giberelina A-3.

En la savia de la madera se han detectado algunos de los flavonoides encontrados en las hojas, y el componente quinónico ácido crisofánico.(7)

Principios activos.

Se ha comprobado que los senósidos y otros glucósidos antraquinónicos ejercen una actividad laxante en diversos animales.

Grafico #2 Principios activos de la *Cassia fistula*



1.1.6. Toxicidad.

En estudios de toxicidad en ratones, se demostró que la máxima dosis tolerada de un extracto etanol-acuoso de la vaina, por vía intraperitoneal, fue de 250 mg/kg.

Se describe en la literatura el caso de 49 niños que se envenenaron accidentalmente al ingerir la planta completa presentándose los siguientes síntomas, náusea, vómito dolor abdominal, ardor de la boca, somnolencia, delirio y diarrea. Para contrarrestar los efectos, los niños se trataron con ipecacuana.

Su sobredosificación conduce a la aparición de colitis reactivas. (11)

1.2. Recolección e Identificación del Material Vegetal para su Procesamiento.

1.2.1 Recolección del Material Vegetal

Durante la recolección del material se debe tener en cuenta que:

- El mismo no tenga infecciones microbianas dado que las mismas pueden inducir cambios en los metabolismos producidos por la planta.
- Debe recolectarse en lugares alejados de fuentes de contaminación o fumigadas con compuestos químicos.
- Se asegura de la especie con que trabaje y seguir los cuidados referidos a identificación, recolección y secado.

1.2.2. Fragmentación.

La fragmentación es un proceso mecánico donde se reducen sustancias sólidas a porciones menores o partículas.

El objeto principal de este paso es el de aumentar la superficie de contacto de un solvente adecuado con el material a extraer para facilitar la mejor y mayor disolución de principios activos.

Si el material vegetal tiene como destino la producción de extractos o tinturas se usa en general, el polvo clasificado como “moderadamente grueso” o “semi fino” según la farmacopea brasileña. (3)

1.3.3. Extracción.

El aislamiento y la purificación de los compuestos orgánicos son aspectos decisivos para cualquier investigación experimental en Química Orgánica ya se refiera a la determinación de estructuras o al estudio de una reacción orgánica.

El proceso de extracción implica el tratamiento de la sustancia bruta con un disolvente apropiado que en caso ideal disuelva sólo el constituyente deseado, permaneciendo sin disolver las demás sustancia.

La maceración es el procedimiento más simple de extracción en plantas, consiste sumergir en un líquido el material vegetal a temperatura ambiente para extraer de ellas sus componentes.

Se fundamenta en la salida de los constituyentes de la planta por ingreso del solvente a la célula, produciéndose turbidez celular, ruptura y finalmente de fusión de los componentes en la solución

La fase de la maceración obtenida se filtra, el residuo formado por el vegetal se elimina, la fase alcohólica se evapora a sequedad en un rotavapor. (3)

1.3.1.1 Métodos de extracción

a) Maceración

El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta el agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto.

b) Percolación o lixiviación

El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente de forma tal que el solvente cubra la capa de sólido en el tanque percolador. El solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto.(8)

1.3.1.2. Clasificación de los extractos vegetales

Dependiendo del grado de concentración de los extractivos, los extractos pueden clasificarse en:

- Extractos fluidos o líquidos
- Extractos semisólidos o blandos
- Extractos secos

1.4. GLUCOSIDOS

Los glucósidos generalmente contienen Hidratos de Carbono $C_n(H_2O)_n$ o sacáridos, constituyen un grupo importante de vegetales que contienen elementos energéticos y sustancias de reserva que aparecen como primeros productos de la fotosíntesis. Habitualmente se dividen los glucósidos en: azúcares simples y asociación de azúcares. (10)

1.5. GRUPOS FITOQUÍMICOS

La composición química del vegetal indica la presencia de flavonoides (+ catequinas), terpenoides (estigmasterol), quinonas (ácido crisofánico) las mismas que son derivadas de estructuras básicas diferentes y sus propiedades químicas, espectroscópicas también se la conoce como grupos fitoquímicos para facilitar su estudio quimiotaxónomicos que sirven para clasificar o agrupar en la taxonomía vegetal.

Los grupos Fitoquímicos están representados por terpenoides derivados del isopreno como son los monoterpenos(C_{10}), sesquiterpenos(C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos(C_{25}), triterpenos(C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}) comprenden a flavonoides Cumarinas, quinonas, xantonas, derivados de aminos de este grupo los más conocidos son los alcaloides(12)

1.6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Es una de las etapas iniciales de la investigación que permite determinar cualitativamente los principales grupos fitoquímico presentes en el vegetal, para de allí poder orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos e identificación de los metabolitos secundarios de un vegetal (2)

Consiste en la extracción de la pulpa de la caña fistula (*cassia fistula*) con solventes y la aplicación de reacciones de coloración; debe permitir la evaluación rápida con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo, los resultados del mismo constituyen únicamente una orientación y de interpretarse.

1.6.1 REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN

1.6.1.1. Ensayo de Dragendorff:

Utilizado para determinar la presencia de alcaloides se debe tomar en cuenta que si el extracto está disuelto en solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo disolverse en etanol y 2 a 3 gotas de ácido clorhídrico al 1% en agua . Si se trata de un extracto acuoso a la alícuota se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar).

Para el ensayo, a la solución ácida se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa.

- Opalescencia: (+)
- Turbidez definida: (++)
- Precipitado: (+++)

1.6.1.2. Ensayo Wagner

Se parte de la solución etanólica ácida. A esta solución se le adiciona 2 a 3 gotas del reactivo de Wagner y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior.

1.6.1.3. Ensayo Mayer

Se parte de la solución etanólica ácida. A esta solución se le adiciona 2 a 3 gotas del reactivo de Mayer se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior

1.6.1.4. Ensayo de Lieberman – Buchard:

El ensayo permite reconocer en un extracto la presencia de esteroides y/o esteroides, en ambos tipos de productos debe poseer un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de maría y el residuo redisolverse en 1mL cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo se deja resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración.

- Rosado – azul muy rápido.
- Verde intenso – visible aunque rápido.
- Verde oscuro –negro- final de la reacción

1.6.1.5 Ensayo de Espuma:

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroide como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye su volumen dos a cinco veces en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y es persistente por más de 2 minutos.

1.6.1.6 Ensayo de Cloruro Férrico.

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Sí el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adiciona tres gotas de solución de tricloruro férrico al 5% en una solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos.

A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo – vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogaláctónicos.

1.6.1.7 Ensayo de Shinoda.

Permite reconocer la presencia de flavonoides en extracto vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos se añade 1mL de alcohol amílico se mezclan la fases y se dejan reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera como positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo intenso en todos los casos

1.6.1.8. Baljet

Es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos puedan dar resultados positivos si la alícuota de la muestra no está en alcohol debe evaporarse el solvente en baño de agua y redissolver en 1mL de alcohol. Seguidamente se añade 1mL del reactivo, La prueba es positiva cuando aparece un precipitado (++ y +++) de color rojo respectivamente.

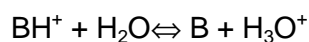
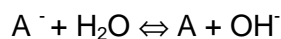
1.6.1.9. Fehling

Permite reconocer en los extractos la presencia de azúcares reductores. Para ello si no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redissolver en 1- 2 mL de agua. Se adiciona 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua de 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. (5)

1.7. Hidrólisis

Se llama hidrólisis (del griego: ὑδῶρ (hudōr), *agua*; y λύσις (lisis), pérdida o disociación) a una reacción ácido-base entre una sustancia, típicamente una sal, y el agua.¹ Esta reacción es importante por el gran número de contextos en los que el agua actúa como disolvente. También se aplica a algunas reacciones ácido-base en las que participa el agua y se rompe un enlace covalente, como se ilustra en la figura.(18)

Al ser disueltos en agua, los iones constituyentes de una sal se combinan con los iones hidronio u oxonio, H_3O^+ o bien con los iones hidroxilo, OH^- , o ambos. Dichos iones proceden de la disociación o autoprotólisis del agua. Esto produce un desplazamiento del equilibrio de disociación del agua y como consecuencia se modifica el valor del pH.



Los iones A^- , BH^+ procedentes de ácidos débiles AH o bases débiles B se hidrolizan por acción del agua, dependiendo el grado de la reacción de la debilidad del ácido o de la base; los iones procedentes de ácidos o bases fuertes no se hidrolizan apreciablemente. Tanto la reacción como su constante de equilibrio se pueden obtener por combinación de la reacción ácido-base con la reacción de autoprotólisis del agua. Así, las sales obtenidas a partir de ácidos y bases fuertes no se hidrolizan, las obtenidas a partir de ácidos y bases débiles se hidrolizan de forma que el pH depende de las dos constantes, y en las obtenidas a partir de una combinación de ácido y base en las que sólo uno es fuerte, será el fuerte el que determine el pH. (18)

1.8 LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

1.8.1 IDENTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

Cromatografía es un método físico para la comprobación de presencia de compuestos o grupos fitoquímico que contiene el vegetal en estudio; conocidos los grupos fitoquímico se tiene una orientación para la identificación cromatográfica.

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues, un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen

las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas.

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

Ventajas de la cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa,) permite trabajar con cantidades de muestras que van desde 0.1 a 1 gramo poco solvente de corrido y buena separación de compuestos. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos.

1.8.2. ADSORBENTES

Al realizar la elección del adsorbente se debe tener en cuenta el tamaño de las partículas del adsorbente, cuanto más finamente dividido esté mayor será su adhesión al soporte, aunque también se le puede añadir un adherente (yeso,...). Algunos de los adsorbentes más utilizados son:

Celulosa, Almidón, Azúcares, Gel de sílice (silicagel), Óxido de aluminio (alúmina), Carbón activo (carbón en polvo), Kieselguhr, Los tres primeros se utilizan para extraer componentes polifuncionales de plantas y animales.

1.8.3. SILICAGEL

El gel de sílice o ácido silícico es uno de los más utilizados, es débilmente ácido, su pH oscila entre 4-5. Con lo cual no se deberá utilizar con sustancias que se corrompan con los ácidos. Los geles de sílice normales suelen contener impurezas de hierro y/o aluminio, este factor también se debe tener en cuentas respecto al uso de componentes. El tamaño del grano suele ser de 10 a 40 micras (μ) y el tamaño de poro varía de 20 a 150Å.

Generalmente lleva incorporado un agente aglomerante, yeso (sulfato de cálcico semihidratado), para proporcionar firmeza al adsorbente. También han sido incorporados dos indicadores del ultravioleta, juntos o por separados (amarillo y/o verde), en diversos tipos de gel de sílice.(2)

Alúmina

La alúmina u óxido de aluminio es un adsorbente ligeramente básico debido a que en el proceso de extracción de la alúmina a partir de la bauxita quedan algunas moléculas de hidróxido de aluminio adheridas a la alúmina, dándole a ésta un carácter básico. No consigue un desarrollo tan alto de la sustancia depositada como el gel de sílice.

La alúmina puede ser tratada químicamente para conseguir alúminas ácidas, básicas y neutras. Puede contener aglomerantes y/o indicadores ultravioletas. Es un adsorbente de carácter polar, de tal forma que retendrá con mayor avidez a los componentes polares.(1)

1.8.4 TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE PLACAS.

La placa debe quedar libre de grumos y rugosidades, que afectarían al desarrollo del proceso cromatográfico. Para ello existen en el mercado extensores que se utilizan para crear de forma mecánica placas homogéneas del espesor deseado. Si no se dispone de extensor, el proceso a seguir es el siguiente:

- Mezclar en un erlenmeyer el agua y el adsorbente.
- Agitar enérgicamente.
- Extender la papilla sobre el soporte de vidrio.
- Hacer oscilar la papilla de un lado a otro.
- Golpear con el dedo la parte inferior del soporte.

Las placas, normalmente, se dejan reposar un corto espacio de tiempo después de cubrirlas; luego se colocan en bandejas metálicas. En este momento puede activarse el agente adsorbente, bien dejando las placas reposar toda la noche a temperatura ambiente, bien calentándolas durante 30-60 minutos a 105-110 °C (las placas de celulosa no deben calentarse más de 10 minutos a 105 °C) para expulsar así el aire. Es conveniente dejar secar las placas inicialmente al aire, para evitar los agrietamientos que se producirían por efecto del cambio de temperatura.(16)

1.8.5 TÉCNICA PARA APLICACIÓN DE MUESTRAS

Los productos a examinar se disolverán, cuando sea posible, en un disolvente orgánico no polar que tenga un punto de ebullición lo suficientemente bajo para que se evapore después de la aplicación. Sin embargo a menudo se necesitan disolventes polares; la mezcla cloroformo: metanol (1:1) es efectiva. Frecuentemente se emplean disoluciones al 1%, de manera que al aplicar 2 µl resulta en la carga 20 µg de producto sólido. Muchos reactivos de revelado llegan a detectar 0.1 µg de material; por esto con esta carga puede llegarse a observar un 5% de impurezas.

Una vez colocado el toque se deja secar para evaporar el disolvente, de forma que en la placa solo quedará la muestra a analizar.

1.8.6 ELECCIÓN DEL ELUYENTE

La elección del eluyente dependerá lógicamente del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo.

Principales eluyentes en orden creciente de polaridad:

Éter de petróleo,

Éter dietílico.

Ciclohexano.

Acetato de etilo.

Tetracloruro de carbono.*

Benceno.*

Etanol.

Cloroformo.*

Metanol.

Diclorometano.

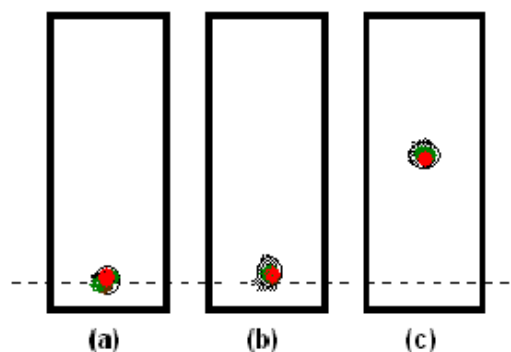
Agua.

Ácido acético.

*compuestos cancerígenos.

La elección del eluyente se realiza de forma empírica. Hay que estudiar la polaridad del componente y probar con eluyentes cada vez menos polares

Grafico #3.-Forma de aplicar la muestra.



- a) Toque de la muestra sin aplicar ningún eluyente.
- b) Aplicando un eluyente poco polar.
- c) Aplicando un eluyente más polar.

Al aplicar en primer lugar eluyentes poco polares, podemos seguir utilizando la misma placa para aplicar otros eluyentes más polares, hasta dar con el más apropiado.

Otra técnica para realizar la elección del eluyente consiste en sembrar varias muestras distanciadas suficientemente, y aplicar con un tubo capilar distintos eluyentes sobre el centro de cada muestra. Esto permite desarrollar cada eluyente radialmente por capilaridad, de forma que se aprecie el eluyente con el cual la separación se realiza de una manera más eficaz.

1.8.7 Constante de Distribución

Los equilibrios de distribución implicados en cromatografía se describen por ecuaciones simples que suponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y móvil.

La constante de este equilibrio K se denomina, constante de distribución y se define como:

$$K = C_S/C_M$$

Donde C_S es la concentración molar de analito en la fase estacionaria y C_M es la concentración molar de analito en la fase móvil.(20)

1.8.8 Factor de Capacidad

Es un parámetro (k') que se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna. Para una especie A, el factor de capacidad k_A' se define como:

$$K_A' = K_A V_S / V_M$$

Donde K_A es la constante de distribución, V_S es el volumen de la fase estacionaria y V_M es el volumen de la fase móvil (19)

1.8.9 Factor de Selectividad

El factor de capacidad α de una columna, como su nombre lo indica, es un término que define que tan selectiva es una columna para separar dos picos. Es de hacer notar, que la columna puede ser selectiva a una separación, que se identifica por un valor alto de este factor, pero si no se considera la mejora de los parámetros que pueden afectar el ancho de un pico, aun así no se lograría la separación de los mismos.

Entonces el factor de selectividad de una columna para dos especies A y B se define como:

$$\alpha = K_A' / K_B'$$

Donde K_B' es el factor de capacidad del compuesto B, que es el más retenido y K_A' es el factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido.(11)

1.8.10 Eficiencia de una Columna.

Como se dijo anterior mente, si no se toma en cuenta los factores que afectan el ancho de un pico para la separación cromatografía no se podría lograr una buena separación aun cuando se tenga un factor de selectividad alto para estos picos en una columna particular.

Es decir que mientras mayor es la capacidad de la columna de producir picos más estrechos mayor es su eficiente.

La anchura de una banda aumenta a medida que se mueve a través de la columna, debido a que cuanto más tiempo transcurre mayor es la dispersión que puede tener lugar. Por ello la anchura de la zona está relacionada directamente con el tiempo de residencia en la columna, e inversamente con la velocidad a la que fluye la fase móvil.

Se utilizan dos términos afines con frecuencia como medida cuantitativa de la eficacia de una columna cromatográfica: (1) la altura equivalente de plato teórico o H y (2) el número de platos teóricos N . Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = L / H$$

donde L es la longitud (normalmente en centímetros) del relleno de la columna.

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuando mayor es el número de platos, y cuando menor es la altura de plato.(17)

1.8.11 Resolución de una Columna

La resolución R_S de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos, en este término si se toma en cuenta el ensanchamiento de los picos, así que la magnitud de este valor si permite asegurar la separación de dos picos.

$$R_S = 2 [(t_R)_B - (t_R)_A] / W_A + W_B$$

donde W_A y W_B son los anchos en las bases de los picos o bandas A y B respectivamente.

1.8.12 Desarrollo de la cromatografía

El desarrollo de los cromatogramas en capa fina se realiza normalmente por el método ascendente, esto es, al permitir que un eluyente ascienda por una placa casi en vertical, por la acción de la capilaridad. La cromatografía se realiza en una cubeta. Para conseguir la máxima saturación posible de la atmósfera de la cámara, las paredes se tapizan con papel impregnado del eluyente. A veces pueden obtenerse separaciones mejores sin poner papeles en las paredes, cosa que no debe olvidarse.

Generalmente el eluyente se introduce en la cámara una hora antes del desarrollo, para permitir la saturación de la atmósfera. El tiempo de desarrollo, por lo general, no llega a los 30 minutos. El tiempo de una cromatografía cualitativa suele ser de un par de minutos, mientras que el tiempo de una cromatografía preparativa puede llegar a un par de horas.

Las placas pueden desarrollarse durante un tiempo prefijado, o hasta que se alcance una línea dibujada a una distancia fija desde el origen. Esto se hace para estandarizar los valores de RF. Frecuentemente esta distancia es de 10 cm.; parece ser la más conveniente para medir valores de RF. Después del desarrollo, las placas pueden secarse rápidamente con una corriente de aire caliente.

La mejor posición de desarrollo para un componente es el punto medio entre el origen y el frente del eluyente, ya que permite separar las impurezas que se desplazan con mayor y menor velocidad. El frente del eluyente nunca debe llegar a tocar el borde de la placa.

1.8.13 Localización de Sustancias

Si los compuestos separados no son coloreados es necesario revelar la posición de dichos compuestos, para ello existen dos tipos de métodos:

- Métodos químicos.
- Métodos físicos.

a) Métodos químicos

Consisten en realizar una reacción química entre un reactivo revelador y los componentes separados, para ello se pulveriza la placa con los reactivos reveladores con la ayuda de un pulverizador de vidrio y una pera de goma, o mediante un dispositivo que proporcione aire comprimido.

Es preferible pulverizar con las placas en posición horizontal. Si el reactivo revelador es peligroso o muy corrosivo, la pulverización deberá realizarse en una vitrina de gases bien ventilada.

La pulverización se realizará poco a poco. En cromatografía en capa fina no puede realizarse el bañado del cromatograma (en cromatografía en papel sí).

Generalmente se utiliza como reactivo revelador yodo, el cual forma complejos coloreados con los componentes orgánicos (con tonos amarillo-marrón), pero las manchas desaparecen con el tiempo con lo que es conveniente señalar las manchas aparecidas.

Otro reactivo revelador bastante utilizado es el ácido sulfúrico, que reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas negras.

El tamaño de las manchas no está relacionado con la cantidad de componente separado.

Además de estos reveladores generales, existen otros específicos:

- 2,4 - dinitrofenilhidracina (para aldehídos y cetonas).
- Verde de bromocresol (para ácidos carboxílicos).
- Paradimetil amino benzaldehído (para aminas).
- Ninhidrina (para aminoácidos).

b) Métodos físicos.

El más común consiste en añadir al adsorbente un indicador fluorescente. De tal forma que al colocar la placa bajo una lámpara ultravioleta, y dependiendo del indicador y de la longitud de onda, aparecen manchas fluorescentes en las zonas en las que hay componentes, o en otros casos aparece toda la placa fluorescente excepto donde hay componentes.

Algunos compuestos poseen cierta fluorescencia (aunque no es normal) con lo que pueden ser detectados directamente en una lámpara de ultravioleta. (6)

1.8.14. Constantes R_f Y R_x

La constante R_f (Ratio of Front) es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente. Se define como:

La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el centro de la mancha, los cálculos se simplifican si el denominador es 10. Para que los RF sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (Espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de RF que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un RF entre 0.65 y 0.7.

Para averiguar si dos compuestos son iguales, se colocan ambos sobre la misma placa y se desarrolla con varios eluyentes. Una vez desarrollados se calculan los RF y si son distintos, puede deducirse con toda seguridad que no se trataba del mismo compuesto. Por el contrario si los RF son iguales los compuestos pueden ser iguales o no serlo.

Si se sospecha que dos compuestos son muy parecidos se eluyen sobre la misma placa con el mismo eluyente u otros de menor polaridad, hasta apreciar una separación mínima. En este caso no se pueden usar reveladores químicos, ya que alterarían los compuestos, sino indicador ultravioleta.

También se puede operar de la manera siguiente: Se selecciona un compuesto (X), que tenga una posición de desarrollo conveniente; todos los demás compuestos sobre la placa se relacionan con éste. De esta manera se tiene el, Rf, ya que:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto (Y)}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto de referencia (X)}}$$

1.9. LA ESPECTROSCOPIA

La espectroscopía surgió con el estudio de la interacción entre la radiación y la materia como función de la longitud de onda (h). En un principio se refería al uso de la luz visible dispersada según su longitud de onda, por ejemplo por un prisma. Más tarde el concepto se amplió enormemente para comprender cualquier medida en función de la longitud de onda o de frecuencia. Por tanto, la espectroscopía puede referirse a interacciones con partículas de radiación o a una respuesta a un campo alternante o frecuencia variante, (ν)

Una extensión adicional del alcance de la definición añadió la energía (E) como variable al establecerse la relación $E=h\nu$ para los fotones. Un gráfico de la respuesta como función de la longitud de onda (o más comúnmente la frecuencia) se conoce como espectro.

La espectrometría es la técnica espectroscópica para tasar la concentración o la cantidad de especies determinadas. En estos casos, el instrumento que realiza tales medidas es un Espectrómetro.

Longitud de onda: se define como la distancia entre los picos adyacentes y puede ser medida en metros, centímetros, o nanómetros (10^{-9} metros).

Frecuencia: es el número de ondas por ciclos usualmente sus unidades están dadas en Hertz que son ciclos por segundos (Hz).

La luminiscencia ocurre debido a la emisión de luz por una sustancia determinada y esto ocurre cuando un electrón regresa a su estado inicial después de haber sido excitado y libera una energía como un fotón. Podemos encontrar tres tipos de nombres para la espectroscopia de luminiscencia, para diferentes técnicas:

- Espectroscopia de fluorescencia molecular
- Espectroscopia de fosforescencia molecular
- Espectroscopia de quimiluminiscencia.

Principio físico

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta – visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 800 nm.

La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV, como es el caso del β -caroteno.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se utilizará la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ (ϵ : coeficiente de absorptividad molar, l : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente).(11)

1.9.1. El espectrofotómetro ultravioleta – visible

El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Esta espectrofotometría utiliza radiaciones del campo UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm (UV cercano) y de luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar las soluciones en la región ultravioleta-visible del espectro. Se rige por una ley muy importante: la ecuación de Beer-Lambert.

Ley de Beer-Lambert

Una expresión para la ecuación de Beer-Lambert es la siguiente: $I_t / I_0 = 10^{-k/c}$ donde:

I_t es la intensidad del rayo de luz captado por el tubo de fotocolorimetría,

I_0 es el rango de luz que sale del tubo de fotocolorimetría y que va a llegar a la celda fotoeléctrica donde es captada y medida

k es la capacidad de captación del haz del campo electromagnético,

l es la longitud del tubo de fotocolorimetría en cm,

c es la concentración de la muestra ubicada en el tubo de fotocolorimetría.

La ley de Beer permite cuantificar la concentración de una muestra por UV, también puede ser expresada de la siguiente manera: $A = \epsilon Cl$

A : Absorbancia - cantidad de radiación absorbida por la sustancia molar.

ϵ : Coeficiente de extinción (Característico de cada sustancia) – cantidad de radiación absorbida por una mol de sustancia.

l : Largo del paso de la cuba (cm).

C : Concentración (moles/l).

Sólo absorben los grupos cromóforos que son aquellos que poseen enlaces pi conjugados y heteroátomos con pares de electrones no compartidos (O, N).

Características del sistema

- Las muestras en solución se ponen en una pequeña celda de cuarzo o vidrio.
- Se utilizan dos lámparas: una de H o deuterio para la región UV, y una de W / halógeno para la región visible
- Se utiliza también una celda de referencia que contiene sólo solvente.
- La luz (radiación) pasa simultáneamente por la celda de muestra y la celda de referencia.
- El espectrómetro compara la luz que pasa por la muestra con la que pasa por la celda de referencia.
- La radiación transmitida es detectada y el espectrómetro obtiene el espectro de absorción al barrer la longitud de onda de la luz que pasa por las celdas.

Consideraciones generales

La máxima absorción se debe a la presencia de cromóforos en una molécula.

Este tipo de espectroscopia sirve principalmente para el análisis de compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos (α y β) insaturados.

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en los rangos de 240-285 nm (Banda II) y 300 – 550 nm (Banda I) .Podría indicarse como características de dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavononas (3).

Tabla1.- Valores de absorción para las BI y BII de los diferentes tipos de flavonoides (4)

| Banda II, nm | Banda I, nm | Tipo de flavonoide |
|--------------------------|-------------|---------------------------------|
| 250-280 | 310-350 | flavonas |
| 250-280 | 330-360 | Flavonoles (3OH subst) |
| 250-280 | 350-385 | Flavonoles (3OH libre) |
| 245-275 | 310-330 | Isoflavonas (5-deoxi-,6,7dioxi) |
| 275-295 | 300-330 | Isoflavonas,dihidroflavonoles |
| 230-270(baja intensidad) | 340-390 | Chalconas |
| 230-270(baja intensidad) | 380-430 | Auronas |
| 270-280 | 465-560 | Antocianidinas,antocianinas |

1.10. Reglas de Woodward - Fieser

Las reglas de Woodward – Fieser son un conjunto de observaciones empíricas que pueden utilizarse para predecir la longitud de onda de la absorción (λ max) UV- Visible, para compuestos orgánicos conjugados como dienos y cetonas.

Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV- Visible No es, sin embargo, una prueba específica para ningún compuesto determinado, la naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes

pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos así como las variaciones en anchura de la hendidura (ancho de banda efectivo) en el espectrofotómetro.

CAPITULO II

2.- PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Fitoquímica de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 OBTENCIÓN DEL VEGETAL

Adquisición de vainas de caña fistula en la sección hierbas (*cassia fistula*) se realizó en el Centro Comercial la Condamine.

2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.3.1 EQUIPOS

| | |
|---|---------------------------------------|
| • Balanza Analítica (Boeco Germany) | • Espectrofotómetro (UV)1603 Shimadzu |
| • Bomba de vacío (Vacum Pressure pump 115 VAC- 60 Hz) | • Rotavapor (Bjüshi R 110) |
| • Cámara digital | • Sorbona |
| • Cámara UV (Chromato – VUE model CC-20) | • Centrífuga (Dynac CA) |
| • Aspersor | • |

2.3.2 MATERIAL DE LABORATORIO

| | |
|------------------------|-------------------------------|
| • Erlenmeyer | • Piseta |
| • Mecheros | • Embudo de separación |
| • Pipetas 5 mL | • Papel filtro |
| • Probeta 10 mL | • Embudo normal |
| • Gradilla | • Refrigerante |
| • Tubos de ensayo | • Vasos de precipitación |
| • Varilla de agitación | • Balón esmerilado boca ancha |

| | |
|---------------------------|---------------------------------|
| • Trípode | • Cuba de vidrio |
| • Rollo de papel aluminio | • Placas cromatográficas 10 x 5 |
| • Reverbero eléctrico | • |

2.3.3 REACTIVOS

| | |
|------------------------|---------------------------------|
| • Agua destilada | • Éter |
| • Alcohol etílico | • Hexano |
| • Alcohol amílico | • Reactivo Dragendorff |
| • Acetona | • Reactivo Wagner |
| • Acetato de etilo | • Tolueno |
| • Ácido sulfúrico 0.1M | • Cinta de magnesio metálico |
| • Amoníaco | • Ácido Clorhídrico concentrado |
| • Butanol | • Tetracloruro de carbono |
| • Cloroformo | • Ácido sulfúrico concentrado |
| • Alcohol metílico | • Tricloruro Férrico al 5% |

2.4 FACTORES DE ESTUDIO

- Terpenoides presentes en la pulpa de caña fístula (*cassia fistula*)
- Análisis Espectrofotométrico de los terpenoides aislados.

2.5 Metodología de la preparación de muestra, separación y purificación de metabolitos secundarios.

2.5.1 EXTRACCIÓN DE PULPA

- Lavar las vainas enteras
- Presionar cuidadosamente las vainas de la planta *Cassia fistula*.
- Seleccionar las semillas de la vaina que no presenten impurezas u hongos
- Extracción de semillas y pulpa
- Separar la pulpa de la semilla manualmente
- Eliminación de las semillas
- Pulpa sola

Un peso de 214.6 g de muestra de pulpa de la vaina se disuelve en diferentes solventes en orden de polaridad desde el menos polar para extraer sustancias apolares como ceras, parafinas, terpenos apolares, fenoles metoxilados.

Al aumentar la polaridad se pretende extraer quinonas presentes en el vegetal.

2.5.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Proceso de extracción en orden de polaridad ascendente comenzando con Acetato de etilo.

2.5.2.1 Extracto en Acetato de Etilo

Pesar 214.6 g de pulpa de la vaina y colocar porciones de 70 mL de Acetato de Etilo en la licuadora dejar sedimentar y filtrar por decantación repetir el proceso hasta cuando el solvente este transparente pasar un embudo de separación y luego dejar en reposo para separar la pulpa la solución de Acetato de Etilo este ultimo recoger en un balón esmerilado previamente pesado llevar a concentración hasta sequedad determinar por gravimetría el peso.

2.5.2.2 Extracto Clorofórmico

A la pulpa añadir un volumen igual de Cloroformo y licuar dejar en reposo, filtrar separar la pulpa de la solución clorofórmica repetir el proceso hasta tener incoloro la fase clorofórmico pasar al embudo de separación dejar en reposo y separar la pulpa de la solución de cloroformo repetir cuantas veces sean necesarias hasta que Cloroformo tome una coloración transparente.

- A la solución en Cloroformo recoger en un balón esmerilado pesado y llevar a sequedad.

2.5.2.3. Extracto Metanólico

- A la pulpa anterior agregar igual volumen de Metanol y licuar dejar en reposo, filtrar separar la pulpa de la solución metanólica esta ultima colocar en el embudo de separación dejar en reposo y separar la pulpa de la solución repetir cuantas veces sean necesarias hasta que el Metanol tome una coloración transparente para luego la solución en metanólica recoger en un balón esmerilado pesado y llevar a sequedad.

2.5.2.3.1 Preparación del extracto Hidrolizado.

Los extractos metanólicos y acuosos presentan cristales que dan positivos las reacciones de Fehling, indicando que son azúcares y dificultan la separación de los metabolitos como geninas, razón por la cual se hidrolizan con HCl.

2.5.2.4. Extracto Butanólico

- A la pulpa anterior agregar igual 100 mL de butanol y llevar al embudo de separación agitar levemente sin que se produzca emulsión para luego dejar en reposo y separar el extracto acuoso la solución butanólica repetir cuantas veces sean necesarias hasta que metanol tome una coloración transparente.
- A la solución butanólica recoger en un balón esmerilado pesado y llevar a concentración a sequedad.

2.5.2.5 Extracto Básico

- A la pulpa anterior añadir NH_3 hasta ph 8 y luego $\text{Me}(\text{OH})$ y separar la pulpa de la nueva solución para llevar a sequedad en un balón previamente limpio , seco y pesado realizar el tamizaje Fitoquímico y concentrar hasta sequedad.

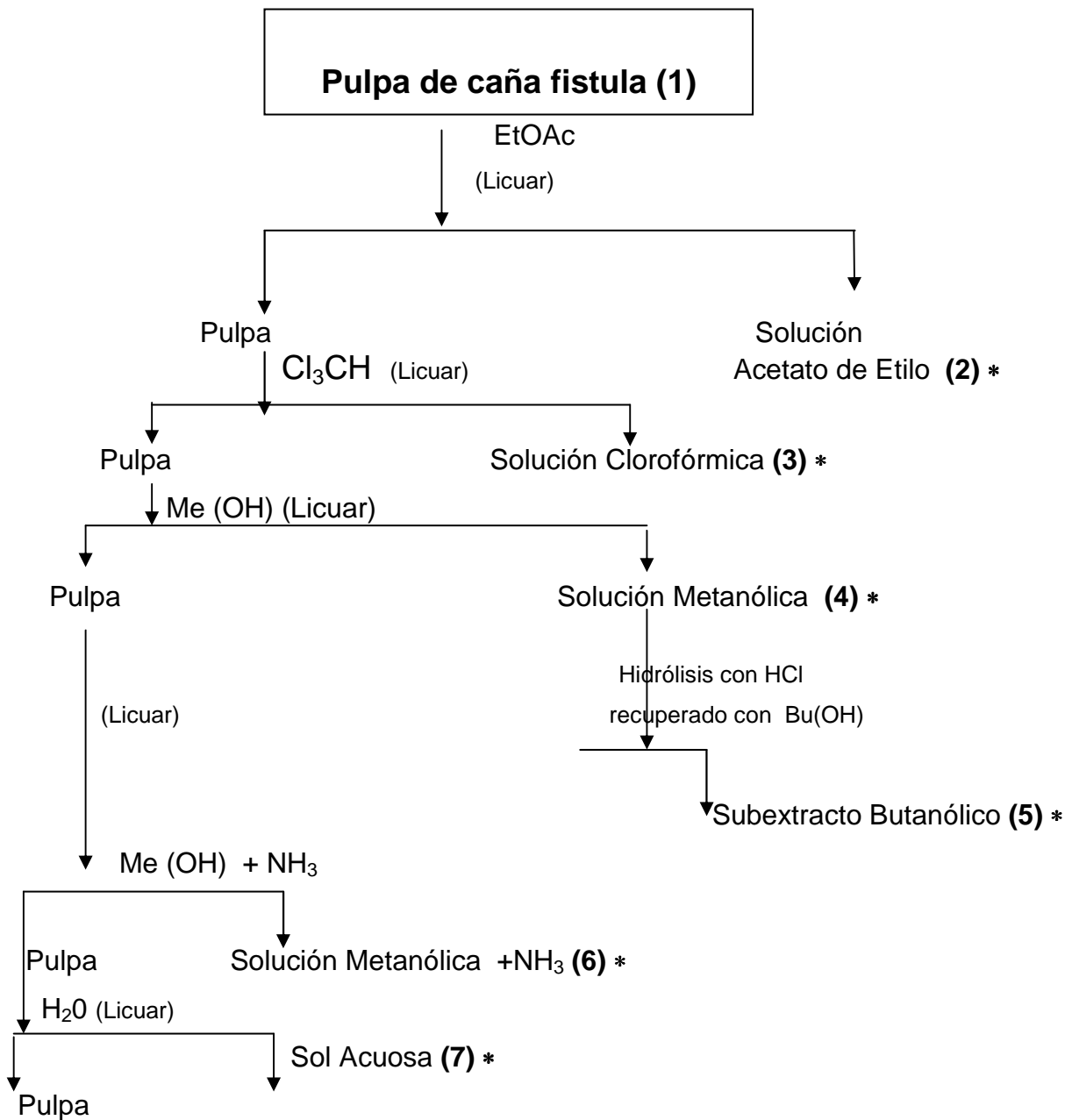
2.5.2.6 Extracto Acuoso

- A la pulpa añadir agua destilada y licuar luego separar la pulpa y la solución acuosa.

Tabla #3. Determinación del % peso en concentración de extractos.

| Extractos | W ₁ Balón vacío | W ₂ Balón vacío + muestra | %de muestra |
|------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------|
| Acetato de Etilo | 101,8 g | 101.87 g | 0.42% |
| Clorofórmico | 103,7 g | 104.51 g | 4.88% |
| Butanólico | 103,7 g | 104.62 g | 70.07% |
| Metanólico | 101,8 g | 103.1 g | 7.83% |
| Extracto Básico | 103,7 g | 111.0 g | 43.97% |
| Extracto Acuoso | 103,6 g | 109.8 g | 37.34% |

Grafico #4.-Preparación del extracto de caña fistula (*cassia fistula*)



* = Evaporar, concentrar, realizar el tamizaje fitoquímico de cada uno de los extractos y su respectiva Cromatografía en capa fina.

2.6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA SOLUCIÓN DE LOS EXTRACTOS

2.6.1. Ensayo de Espuma (Saponinas)

Colocar 1 mL de cada uno de los diferentes extractos: La muestra está constituida por extracto de EtOAc, Cl_3CH , Bu(OH), Me(OH) hidrolizad y Acuoso. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye su volumen cinco veces en agua y se agita la mezcla fuertemente para lo cual es positivo.

2.6.2. Ensayo Wagner (Alcaloides)

En tubos de ensayos colocar 1 mL de cada uno de los diferentes extractos disolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua . Si se trata de un extracto Basificado acuoso a la alícuota se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado.

A esta solución se le adiciona 2 a 3 gotas del reactivo de Wagner y se observa. Opalescencia: (+) en el extracto $\text{NH}_3 + \text{Cl}_3\text{CH}$.

2.6.3. Ensayo Mayer (Alcaloides)

En tubos de ensayos colocar 1 mL de cada uno de los diferentes extractos, disolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua . Si se trata de un extracto acuoso a la alícuota se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez).

A esta solución se le adiciona 2 a 3 gotas del reactivo de 2 a 3 gotas del reactivo de Mayer y se observa. Opalescencia: (+) en el extracto $\text{NH}_3 + \text{Cl}_3\text{CH}$

2.6.4. Ensayo de Lieberman – Buchard (esteroles y/o esteroides)

En tubos de ensayos colocar 1 mL de cada uno de los diferentes extractos Acuoso, EtOAc, Cl_3CH , Bu(OH), Me(OH) y $\text{NH}_3 + \text{Cl}_3\text{CH}$. Para ello si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de maría y el residuo redisolverse en 1mL cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo

se deja resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tienen por un cambio rápido de coloración café oscuro final de la reacción en los extractos Acuoso, Clorofórmico y Butanólico.

2.6.5. Ensayo de Cloruro Férrico. (Fenólicos y/o taninos)

Colocar 1 mL de cada uno de los diferentes extractos, llevar hasta sequedad y reconstituir con etanol. A una alícuota del extracto alcohólico se le adiciona tres gotas de solución de tricloruro férrico al 5% en una solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua) un ensayo positivo presenta el extracto Acuoso, Bu(OH), desarrollando una coloración rojo – vino lo que indica la presencia de compuestos fenólicos en general.

2.6.6. Ensayo de Shinoda (flavonoides)

Colocar 1 mL de cada uno de los diferentes extractos, llevar hasta sequedad y reconstituir con Me(OH) se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos se añade 1mL de alcohol amílico se mezclan la fases y se dejan reposar hasta que se separen.

El ensayo se considera como positivo en el extracto acuoso y clorofórmico ya que el alcohol amílico se colorea de café intenso.

2.6.7. Baljet (Sesquiterpeno lactonas, y lactonas)

Colocar 1 mL de cada uno de los diferentes extractos, llevar hasta sequedad y reconstituir con Me(OH) Seguidamente se añade 1mL del reactivo, La prueba es positiva para Acuoso, Cl₃CH, Bu(OH) por la presencia de precipitado de color anaranjado.

2.6.8. Fehling (azúcares reductores.)

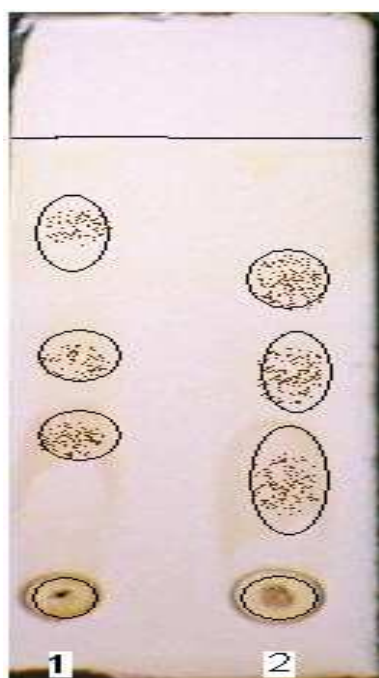
Colocar 1 mL de cada uno de los diferentes extractos, llevar hasta sequedad y reconstituir con H₂O.

Se adiciona 2mL del reactivo y se calienta en baño de agua de 5-10 minutos la mezcla. La prueba es positiva para Acuoso, Cl₃CH, pues la solución se colorea de rojo.

2.7. EXTRACCIÓN DE TERPENOIDES

Como los resultados son positivos para flavonoides en los extractos de Cl₃CH, Bu(OH) y Acuoso para verificar la presencia de los grupos fitoquímicos determinados en el tamizaje fitoquímico se prepara cromatografías en capa fina.

2.7.1. Según el tamizaje Cromatografía para identificación de metabolitos (flavonoides).



Placa de Silicagel G_{F254} (#5)

Muestras de extractos:

1. Clorofórmico
2. Bu (OH).

Solvente de recorrido: Cl₃ CH: Acetato de Etilo; (6:4)

Solvente revelador: CeSO₄

Rf de los extractos:

| 1- Clorofórmico | 2.- Butanólico |
|------------------------|------------------------|
| Rf ₁ =0 | Rf ₁ =0 |
| Rf ₂ =0.325 | Rf =0.287 |
| Rf ₃ =0.50 | Rf ₃ =0.437 |
| Rf ₄ =0.812 | Rf ₄ =0.575 |

La presencia de manchas redondeadas, separadas permite aplicar a la placa preparativa para la separación y purificación.

2.7.1.1. Placa Preparativa del extracto Butanólico.

Placa de silicagel G_{F254} (#6)

Muestra de extractos: Bu (OH).

Solvente de recorrido: Tolueno
:Acetato de Etilo; (6:4)

Solvente revelador: CeSO₄

Rfs del extracto Acetato de Etilo

#1 Rf= 0

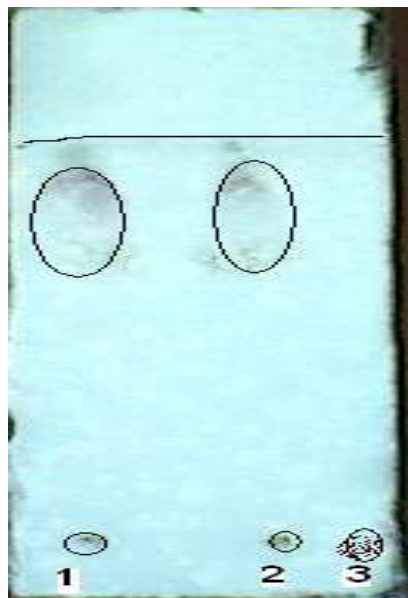
#2 Rf= 0.32

#3 Rf= 0.74



La recuperación de los compuestos se realiza por corte de bandas.

2.7.1.2. Verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa del extracto butanólico.



Placa de silicagel GF₂₅₄ (#7)

Muestras de extractos:

- Banda #1
- Banda #2
- Banda #3

Solvente de recorrido: Tolueno

:Acetato de Etilo; (6:4)

Solvente revelador: CeSO₄

Bandas del extracto Acetato de Etilo

- Banda #1 R_f=0.816
- Banda #2 R_f=0.816
- Banda #3 R_f= 0

2.7.2. Cromatografía para identificación de terpenos (#1)

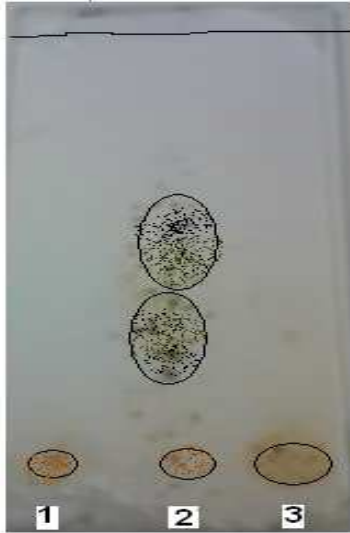
Los extractos acuosos, clorofórmico y butanólico dan por tamizaje la presencia de terpenos se verifica en placas de silicagel.

Muestras de extractos:

- 1) Acuoso
- 2) Clorofórmico
- 3) Butanólico

Solvente de Recorrido:

Cl₃CH; à A glacial; Me (OH);
H₂O: (60; 32; 12; 8)



Este solvente es para flavonoides se verifica la presencia de 2 flavonoides en el extracto clorofórmico.

La determinación de terpenos se prueba con solvente de corrido apolar, considerando que es positivo para esteroides y esteroides.

2.7.3 Cromatografía para identificación de terpenoides de baja polaridad.



Placa de Silicagel GF₂₅₄ (#2)

Muestras extractos:

- 1.- Clorofórmico 2.- Metanólico
3.- Butanólico 4.- Acuoso

Solvente de Recorrido: Tolueno; Acetato de Etilo: (9; 1)

Solvente de revelado: vainillina H₂SO₄

Rf de los extractos:

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| 1. Clorofórmico | Rf1=0.333 Rf2=0.487 |
| 2. Metanólico | Rf1=0.307 Rf2=0.564 Rf3=0.794 |
| 3. Butanólico | Rf1=0.308 Rf2=0.565 |
| 4. Acuoso | Rf1=0.308 Rf2=0.487 |

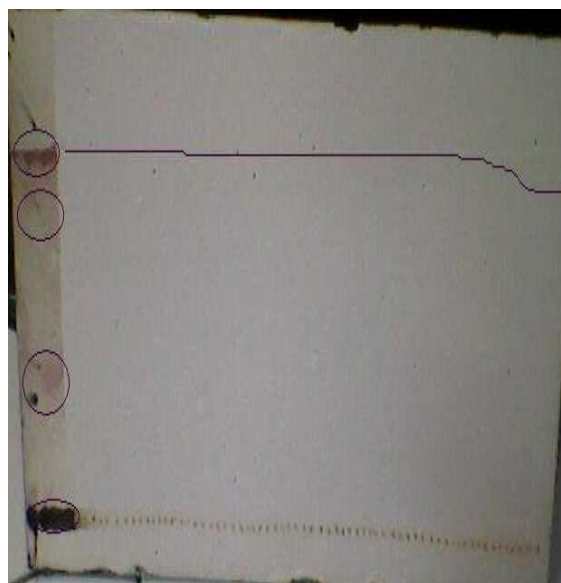
Unir el extracto Metanólico y Butanólico para realizar una placa preparativa ya que sus manchas son semejantes, el extracto acuoso usar como referencia.

2.7.4.1 Metodología de separación de metabolitos en placa preparativa

Utilizar placa de vidrio 20 x 10 cm con absorbente de placas de silicagel G_{F254} .

- Aplicar la muestra en banda para saturar la base.
- El desplazamiento del solvente corrido: el establecido para establecer eficacia eficiencia y resolución debe llegar hasta 1cm antes del borde superior.
- Para revelar utilizar el solvente de revelado usado en la identificación solamente 0.5 cm no toda la placa.
- Realizar la recuperación de la franja que contiene el metabolito.
- Extraer el componente de la banda por maceración con el solvente de recorrido
- Filtrar el solvente de recorrido.
- Comprobar la pureza de los componentes de las bandas por TLC.
- En caso de presencia de impurezas repetir el proceso de placas preparativa hasta obtener compuestos puros.

2.7.4.2 Placa preparativa de la unión del extracto Metanólico y Butanólico (#3)



Placa de Silicagel G_{F254} (#3) de los extractos: Metanólico y Butanólico

Solvente de Recorrido: Tolueno;
Acetato de Etilo: (9;1)

Solvente de revelado: vainillina
 H_2SO_4

Bandas:

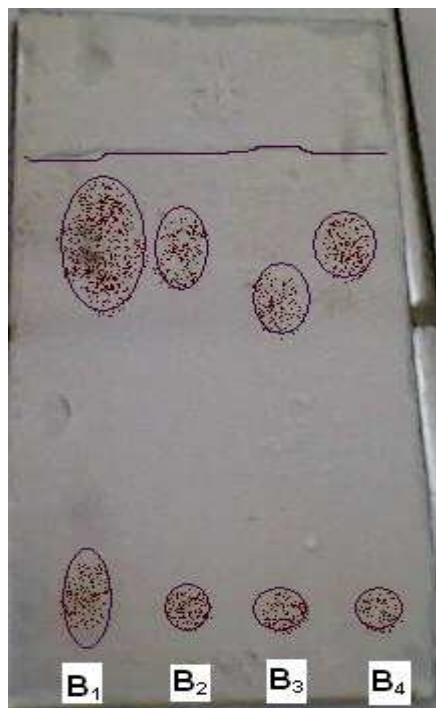
$B\#_1 R_f=0$

$B\#_2 R_f=0.462$

$B\#_3 R_f=0.805$

$B\#_4 R_f=0.910$

2.7.4.3. Verificación de pureza de metabolitos aislados en placa preparativa de la unión del extracto Metanólico y Butanólico.



Placa de silicagel G_{F254}(#4)

Bandas y Rfs de extractos:

- **Banda #1** Rf=0.740
- **Banda #2** Rf=0.790
- **Banda #3** Rf=0.543
- **Banda #4** Rf=0.802

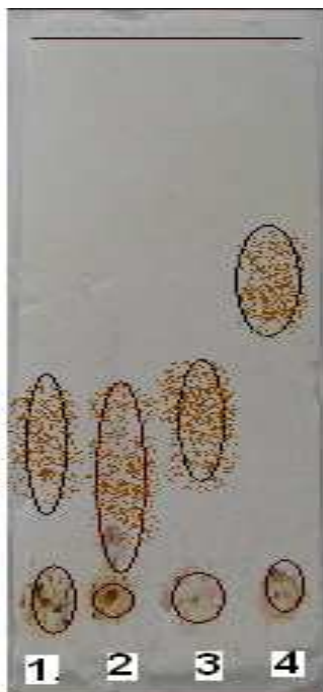
Solvente de Recorrido: Tolueno;
Acetato de Etilo: (9; 1)

Solvente de revelado: vainillina H₂SO₄

2.8. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA COLUMNA

- La cantidad de extracto clorofórmico es 0,81 g permite separar en columna utilizando como solvente adecuado de acuerdo a la escala de polaridad.
- Concentrar el Extracto Clorofórmico a sequedad y luego obtener su peso en gramos.
- Por cada gramo de muestra pesar 20g de sílica y agregar en la Columna con Frita de Vidrio.
- Agregar el solvente de recorrido el menos polar.
- Recoger Fracciones de 8 mL cada una separar en diferentes tubos de ensayo previamente enumerados.
- De las fracciones # 1 al # 12 percolar con hexano.
- A partir de la fracción # 13 utilizar Hexano: Éter etílico;(9:1).
- A partir de la fracción # 20 utilizar Hexano: Éter;(6:4)

2.8.1. Placa de las fracciones obtenidas Cromatografía en Columna del Extracto Clorofórmico.



Placa de silicagel G_{F254} (8)

Muestras de las fracciones:

#1, #2, #3, #4

Solvente de recorrido: Hexano: Éter; (9:1)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Rf de la fracción:

#1=0.2

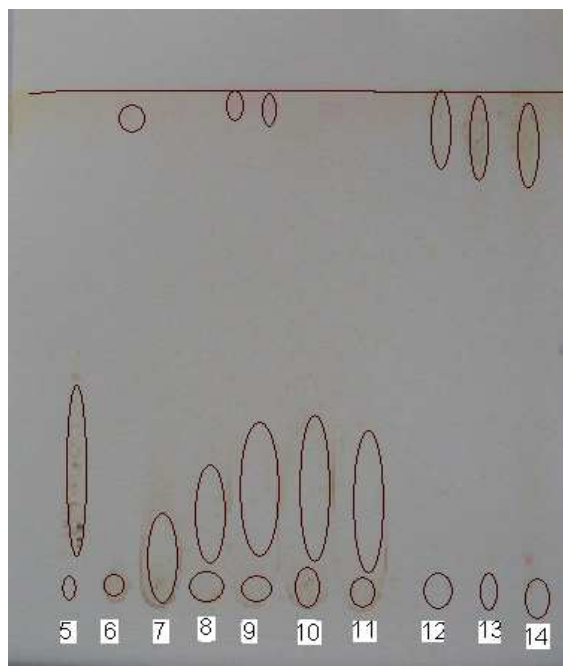
#2=0.228

#3=0.271

#4=0.485

Las fracciones #1, #2, #3 y #4 obtenidas Cromatografía en Columna del Extracto Clorofórmico indican sus manchas de forma pura.

2.8.2. Cromatografía de fracciones en Columna del extracto clorofórmico.



Placa de Silicagel G_{F254} (#9)

Muestras de las fracciones: #5 a la #14

Solvente de recorrido: Hexano: Éter; (9:1)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Fracciones

Rf #5 = 0.40

Rf #6 = 0.90

Rf #7 = 0.86

Rf #8 = 0.109

Rf #9 = 0.205

Rf #10 = 0.238

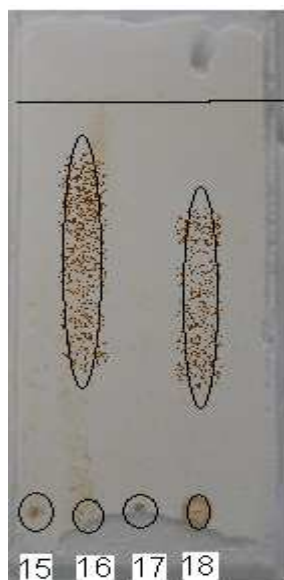
Rf #11 = 0.219

Rf #12 = 0.849

Rf #13 = 0.849

Rf #14 = 0.849

2.8.3. Placa de las fracciones #15 a #18 obtenida por Cromatografía en Columna



Placa de Silicagel G_{F254} (#10)

Muestras de las fracciones:

#15 a la #18

Solvente de recorrido:

- Hexano: Éter;(9:1)

Solvente revelador:

- H₂SO₄ vainillina

Rf de las fracciones:

#15 Rf=0

#16 Rf=0.736

#17 Rf=0.

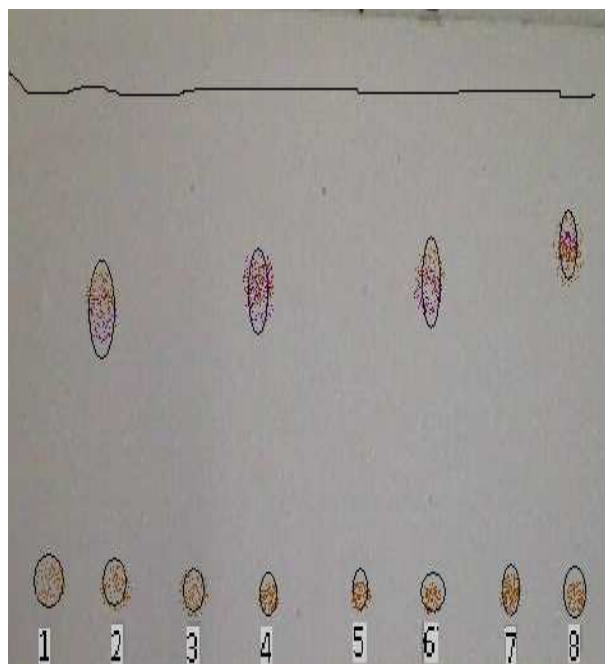
#18 Rf=0.75

Las fracciones #16, #18 si resulta este solvente puesto que si separa los compuestos lo que no acontece para las fracciones, #15 y #17 a las cuales se tendrían que realizar la cromatografía de las misma con otro solvente más polar.

Tabla #4.-De las cromatografías que se obtiene realizar una reunión de las fracciones con Rfs similares:

| UNION DE FRACCIONES | COMPUESTOS |
|---------------------|------------|
| 1 | 1 |
| 2.3.4.5.6 | 2 |
| 7 | 3 |
| 8.9.10 | 4 |
| 11.12.13.14.15. | 5 |
| 16.17 | 6 |
| 18.19.20 | 7 |
| 21.22.23.24.25 | 8 |

2.8.4. Cromatografía de comprobación de las fracciones unidas del extracto clorofórmico.



Placa Silicagel GF₂₅₄(#11)

SOLVENTES DE RECORRIDO:Tolueno, Acetato de Etilo; (8:2)

Solvente de revelado: vainillina
H₂SO₄

Bandas del extracto Acetato de Etilo

- Fracción #2 Rf= 0.638
- Fracción #4 Rf= 0.625
- Fracción #6 Rf=0.652
- Fracción #8 Rf=0.694

Las fracciones #2, #4, #6, #8, si resulta este solvente puesto que si separa los compuesto lo que no sucede para la fracciones, #1, #3, #5, y #7 a las cuales se tendría que realizar la cromatografía de elevando la polaridad del solvente.

2.8.5 Cromatografía de las fracciones #1,#3 del extracto clorofórmico.



Placa Silicagel G_{F254} (#12)

Solvente de Recorrido: Hexano, Éter; (8:2)

Solvente de revelado: vainillina H_2SO_4

Fracciones del extracto clorofórmico.

Fracción #1 $R_f=0.90$

Fracción #3 $R_f=0.63$

2.8.6. Cromatografía de las fracciones #5, #7 del extracto clorofórmico.



Placa Silicagel G_{F254} (#13)

Solvente de Recorrido:

Tolueno, Acetato de Etilo; (2:8)

Solvente de revelado: H_2SO_4

vainillina

Fracciones del extracto clorofórmico.

Fracción #5 $R_f= 0.771$

Fracción #7 $R_f= 0.600$

2.9 EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA COLUMNA DEL EXTRACTO BUTANÓLICO

- Concentrar el Extracto Butanólico a sequedad y luego obtener su peso en gramos.
- Por cada gramo de muestra pesar 20g de sílica y agregar en la Columna con Frita de Vidrio.
- Eluír con Tolueno hasta la fracción #3
- Eluír con Tetracloruro de Carbono y recoger las fracciones #4 a #8.
- Para la fracción #9 eluír con el solvente de recorrido Tolueno: Acetato de Etilo: Tetracloruro de Carbono:(18:10:10).
- A partir de la fracción #14 eluír con Tolueno: Acetato de Etilo: Ácido Acético; (10:10:0.5)
- Percolar la fracción #16 y #17 con Tolueno: Et(OH);(8:2)
- La fracción #18 eluír Et(OH):NH₃; (8:2)
- Evaluar el contenido en las fracciones obtenidas.

2.9.1.Cromatografía de las fracciones #1,#3 del extracto butanólico.



Placa de silicagel G_{F254} #14

Muestras de las fracciones:

#1 a la fracción #3

Solvente de recorrido: Tolueno;(10)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

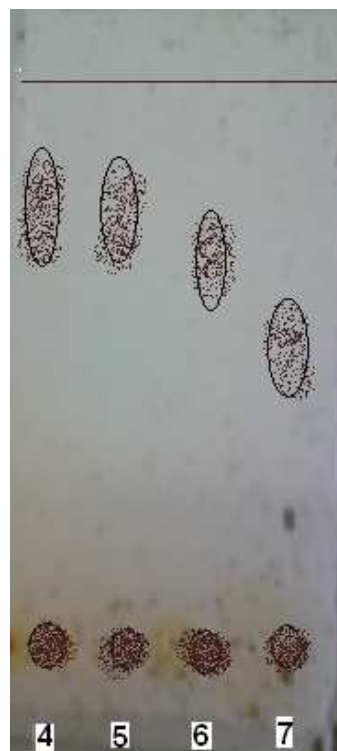
R_f de las fracciones:

R_{f1} = 0.24

R_{f2} = 0.77

R_{f3} = 0.86

2.9.2. Cromatografía de las fracciones #4, #5, #6, #7 del extracto butanólico.



Placa de silicagel G_{F254} #15

Muestras de las fracciones:

#4 a la #7

Solvente de recorrido:

Tolueno; Acetato de Etilo

Tetracloruro de

Carbono;(18;10;10)

Solvente revelador: vainillina

H₂SO₄

Rf de las fracciones:

#4 Rf = 0.87

#5 Rf = 0.82

#6 Rf = 0.74

#7 Rf = 0.53

2.9.3. Cromatografía de las fracciones #8, #9 del extracto butanólico.



Placa de silicagel G_{F254} #16

Muestras de las fracciones:

#8 y la fracción #9

Solvente de recorrido:

Tolueno; Acetato de Etilo

Et(OH);(8;10;2)

Solvente revelador:

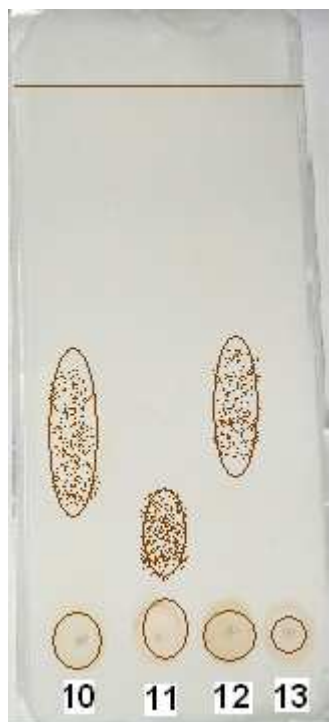
vainillina H₂SO₄

Rf de las fracciones:

#8Rf= 0.35

#9Rf=0

2.9.4. Cromatografía de las fracciones #10, #11, #12, #13 del extracto butanólico.



Placa de silicagel G_{F254} #17

Muestras de las fracciones:

#10 a la fracción # 13

Solvente de recorrido:

Tolueno; Acetato de Etilo Et(OH);(8;10;2)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Rf de las fracciones:

#10 Rf= 0.40

#11 Rf= 0.20

#12 Rf= 0.46

#13 Rf =0.

2.9.5 Cromatografía de las fracciones #14 y #15 del extracto butanólico.



Placa de silicagel G_{F254} #18

Muestras de las fracciones:

#14 y #15

Solvente de recorrido:

- Tolueno; Et(OH);(8;2)

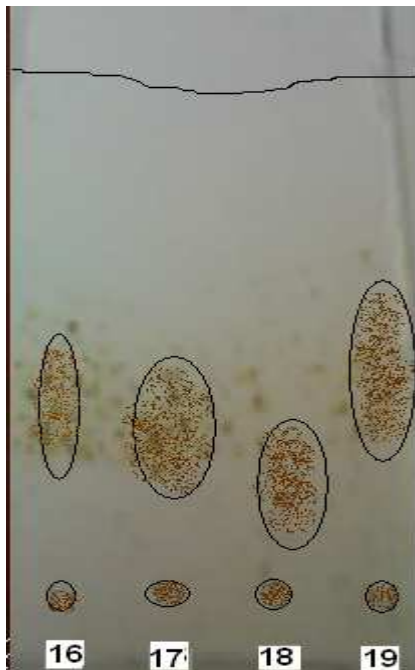
Solvente revelador: vainillina
H₂SO₄

Rf de las fracciones:

#14Rf=0.560

#15Rf=0.58

2.9.6 Cromatografía de las fracciones #16, #17, #18, #19, del extracto butanólico.



Placa de silicagel GF₂₅₄ #19

Muestras de las fracciones:

#16 a la fracción #19

Solvente de recorrido: Tolueno; Acetato de etilo; à Acético;(10;10;0.2)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Rf de las fracciones:

#16= 0.35

#17= 0.31

#18=0.20

#19=0.47

2.9.7. Cromatografía de las fracciones #20, #21, #22, #23, del extracto butanólico.



Placa de silicagel GF₂₅₄ #20

Muestras de las fracciones:

#19 a la fracción #22

Solvente de recorrido: Tolueno; Acetato de etilo; à Acético;(10;10;0.2)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Rf de las fracciones:

#20=0.32

#21=0.59

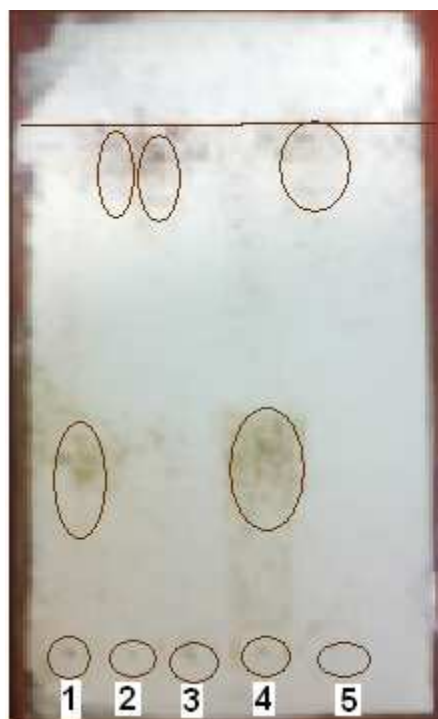
#22=0.84

#23=0.44

Tabla #5.-De las cromatografías que se obtiene realizar una nueva reunión de los extractos concentrados:

| Fracciones a Unir | COMPUESTOS |
|-------------------|------------|
| 1 | #1 |
| 2,3,4 | #2 |
| 5,6,7 | #3 |
| 8,9,10,11,12, | #4 |
| 13,14,15,16 | #5 |
| 17 | #6 |
| 18,19 | #7 |
| 20,21,22 | #8 |
| 23,24,25 | #9 |

2.9.8.Cromatografía de las fracciones #1, #2, #3, #4, #5 del extracto clorofórmico.



Placa de silicagel G_F254 #21

Muestras de las fracciones:

#1 a la fracción # 5

Solvente de recorrido:

- **Acetato de E tilo: Me (OH);(9:1)**

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Rf de las bandas:

Rf banda # 1=0.750

Rf banda # 2=0.812

Rf banda # 3=0.80

Rf banda # 4 = 0.425

Rf banda # 5 =0.875

Para las muestras #1 y #2 este solvente es positivo puesto que si las separa, lo que no sucede con las muestras #2, 3,5 que resulta ser demasiado polar.

2.9.9. Cromatografía de las fracciones #6, #7, #8, #9 del extracto clorofórmico.



Placa de silicagel GF₂₅₄ #22

Muestras de las fracciones:

#6 a la fracción # 9

Solvente de recorrido: Acetato de E tilo: Me (OH);(9:1)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

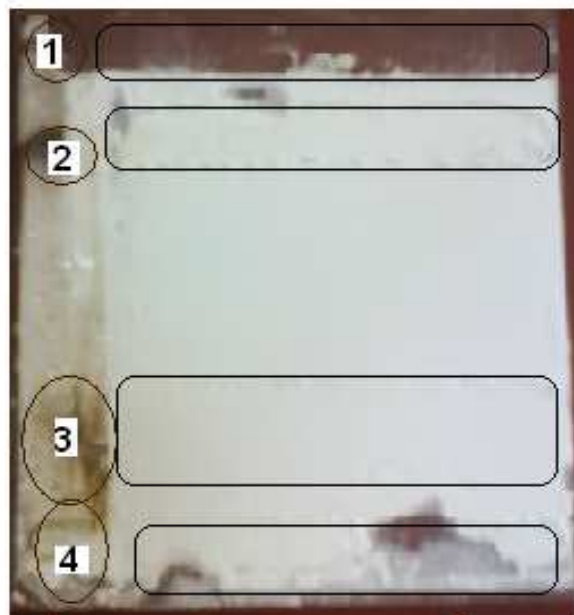
Rf fracción #6 = 0

Rf fracción #7 = 0.812

Rf fracción #8 = 0

Rf fracción #9 = 0

2.9.10. Placa Preparativa del extracto clorofórmico de la unión de las fracciones #3 y #4



Placa preparativa de silicagel GF₂₅₄ 23

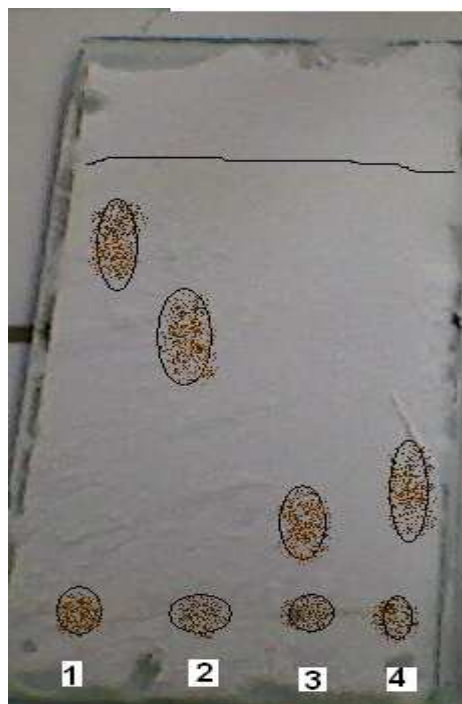
Muestra: Unión de las fracciones #3 y #4

Solvente de recorrido: Acetato de Etilo: Me (OH);(9:1)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Es importante recalcar que no se revela toda la placa, únicamente 0.5cm cubriendo con otra placa de vidrio lo que falta para luego poder cortar y recuperar los metabolitos purificados.

2.9.11. Verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de la unión de las fracciones #3 y #4 del extracto Clorofórmico



Placa preparativa de silicagel GF₂₅₄ #24

Muestras de las bandas:

#1, #2, #3 y #4.

Solvente de recorrido: Acetato de Etilo:

Me(OH);(9:1)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Rf de las Fracciones:

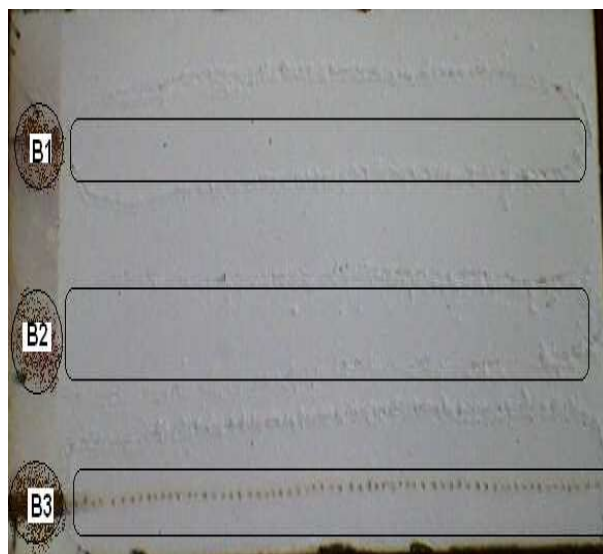
1 Rf = 0.875

2 Rf = 0.712

3 Rf = 0.2

4 Rf = 0.562

2.9.12. Placa Preparativa del extracto clorofórmico de la unión de las fracciones #6 y #7



Placa preparativa de silicagel GF₂₅₄ (#25)

Muestras:

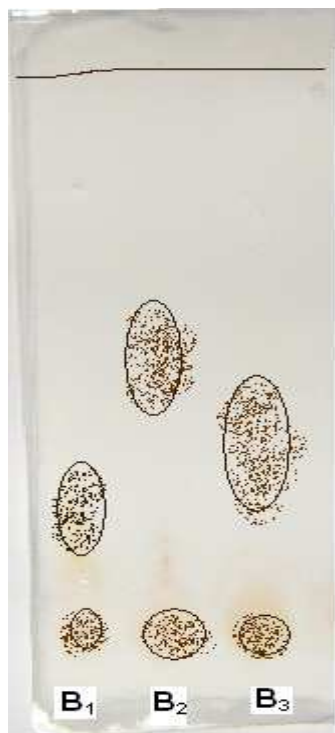
Unión de las fracciones: #6 y #7

Solvente de recorrido: Acetato de Etilo:

Me(OH);(85;15)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

2.9.13. Verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de la unión de las fracciones #6 y #7 del extracto Clorofórmico.



Placa preparativa de silicagel GF₂₅₄ #26

Muestras de las bandas:

#1, #2, y #3.

Solvente de recorrido: Acetato de Etilo: Me(OH);(9:1)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

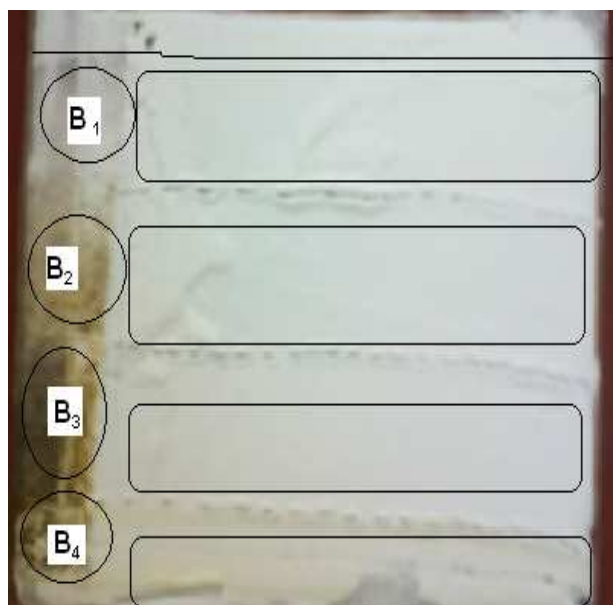
Rf de las bandas:

Rf banda # 1 =0.328

Rf banda # 2 =0.657 (Quercetín 3 O glucósido)

Rf banda # 3= 0.479

2.9.14. Placa Preparativa del extracto clorofórmico de la unión de las fracciones #8 y #9 #9



Placa preparativa de silicagel GF₂₅₄

(#27)

Muestras:

Unión de las fracciones: #8 y #9

Solvente de recorrido: Acetato de Etilo:
Me(OH);(8.5;1.5)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

2.9.15. Verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de la unión de las fracciones #8 y #9 del extracto Clorofórmico



Placa preparativa de silicagel G_{F254} #28

Muestras de las bandas:

#1, #2, #3 y #4.

Solvente de recorrido:

Acetato de Etilo: Me(OH);(9:1)

Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

R_f de las bandas:

R_f banda # 1=0.32

R_f banda # 2=0.28

R_f banda # 3=0.466 (á Clorogénico)

R_f banda # 4=0.12

TABLA # 12 DETERMINACION DE TERPENOS EN UV

| EXTRACTO | LONGITUD DE ONDA (λ)nm | ABSORBANCIA (Abs) |
|--------------|------------------------|-------------------------|
| Butanólico | | |
| Compuesto #1 | 549 | 0.284 |
| Compuesto #2 | 405 | 0.115 |
| Compuesto #3 | 444 | 0.241 |
| Compuesto #4 | 408 452 549 | 0.289 0.273 0.273 |
| Compuesto #5 | 549 | 0.115 |
| Compuesto #6 | 408 452 549 | 0.106 0.107 0.122 |
| Compuesto #7 | 408 452 549 | 0.107 0.108 0.124 |

| | | |
|--------------|-----|-------|
| Compuesto #8 | 405 | 0.113 |
| | 452 | 0.102 |
| | 549 | 0.112 |
| Compuesto #9 | 405 | 0.291 |
| | 444 | 0.273 |
| | 549 | 0.285 |

| EXTRACTO | LONGITUD DE ONDA (λ)nm | ABSORBANCIA (Abs) |
|---------------|----------------------------------|-------------------|
| Clorofórmico | | |
| Compuesto # 1 | 405 | 0.186 |
| | 549 | 0.202 |
| Compuesto # 2 | 405 | 0.119 |
| | 452 | 0.107 |
| | 549 | 0.112 |
| Compuesto # 3 | 408 | 0.108 |
| | 452 | 0.107 |
| | 549 | 0.123 |
| Compuesto # 4 | 405 | 0.265 |
| | 452 | 0.269 |
| | 549 | 0.281 |

Discusión

- El principio de la absorción ultravioleta esta dado por la presencia de grupos cromóforos, la determinación del ultravioleta del extracto Butanólico las fracciones 1, 2, 3, dan un solo valor y con absorbancia baja con λ 549 nm se revela con Vainillina H_2SO_4 es un terpeno.
- Si se revela con Sulfato de cerio es un flavonoide se puede determinar que bandas entre 465 -560 indica antocianidinas, antocianinas para las fracciones del extracto Butanólico #4,#5 con absorbancia baja con λ 549 nm .
- Entre los valores de 380 -430 para flavonoide tipo Auronas para las fracciones del extracto Butanólico # 6 al #9 con absorbancia baja con λ 549 nm ($A=0.291$).
- Si se revela con Vainillina H_2SO_4 es un terpeno se puede determinar que bandas entre 465 -560 indica antocianidinas, antocianinas para las fracciones del extracto Clorofórmico #1,#4 con absorbancia baja con λ 405 nm .

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CONTROL CALIDAD DE LADROGA

Para el análisis de control de calidad se utilizó las vainas a la cual se extrae la pulpa fresca de *cassia fistula* de los mismos que se separó las semillas pulpa contaminada con hongos para que interfiera en falsos resultados, la materia prima fue adquirida en el Centro Comercial Condamine sección hierbitas.

3.2 Los extractos preparados con la pulpa tienen un rendimiento de Acetato de etilo con 0.42%, Clorofórmico con 4.88%, Butanólico con 5.54%, Metanólico con 7.83%, es así que el extracto Básico con 43.97% presenta la mayor cantidad obtenida y Acuoso con 37.34%.

3.3. El tamizaje fitoquímico determina cual extracto contiene terpenos por reacción positiva para espuma, Rosenthaler, Liberman Buchard y Baljet a lo cual se procede a realizar Cromatografía en capa fina.

3.4 El tamizaje fitoquímico de los extractos determina la presencia de azúcares reductores comprobada con reacción positiva de Fehling en el extracto Acuoso y Clorofórmico

Tabla # 6 Tamizaje Fitoquímico de los extractos

| ENSAYOS | Acetato de Etilo | Clorofórmica | Metanólica | Metanólica Hidrolizada | Butanólica | Metanólica +NH₃ | Acuosa |
|---|-------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Espuma (Saponinas) | Espuma ≥ 2mm (+) | Espuma ≥ 2mm (+) | Espuma ≥ 2mm (+) | – | Espuma ≥ 2mm (+) | – | Espuma ≥ 2mm (+) |
| Börtrager (Quinonas) | – | – | Color tomate (+) | Color tomate (+) | Color tomate (+) | – | Color Tomate (+) |
| Wagner (alcaloides) | – | – | – | – | – | op | – |
| Mayer (alcaloides) | – | – | – | – | – | op | – |
| Baljet (lactonas) | – | ↓ Color café (+) | – | – | ↓ Color café (+) | – | ↓ Color tomate (+) |
| Cloruro férrico (fenoles y taninos) | – | – | – | – | color café (+) | – | color café intenso (+) |
| Lieberman Buchard (triterpenos esteroides) | – | color café (+) | – | – | color café (+) | – | Café a negro (+) |
| Rosenthaler (terpenoides) | Café claro | – | ↓ color café (+) | ↓ color café (+) | – | – | ↓ color café (+) |
| Fehling (azúcaresreductores) | – | color café (+) | – | – | color café (+) | – | ↓ Color tomate |
| Shinoda (flavonoides) | – | café intenso (+) | – | – | – | – | Color rojo |

3. 5.1.Tabla #7.-Extractos con terpenos son: Acuoso, Butanólico y Clorofórmico

| Extracto | Acuoso | Butanólico | Clorofórmico |
|----------------------|---|---|---|
| Solvente de corrido | Cl ₃ CH; à A glacial; Me(OH); H ₂ O: (60;32;12;8), | Cl ₃ CH; à A glacial; Me(OH); H ₂ O: (60;32;12;8), | Cl ₃ CH; à A glacial; Me(OH); H ₂ O: (60;32;12;8), |
| Solvente de revelado | CeSO ₄ | CeSO ₄ | CeSO ₄ |
| Rf obtenido | Rf =0. | Rf =0 | Rf =0.29. Rf =0.45 |

Este solvente es para flavonoides se verifica la presencia de 2 flavonoides en el extracto clorofórmico el Rf =0.45.

Para el extracto acuoso y butanólico se recomienda este solvente ya que resulta poco polar para la separación de los compuestos y el extracto acuoso usar como referencia.

3.5.2. Tabla #8.-Cromatografía en capa fina para identificación de saponinas

| Extracto | Me(OH +Bu(OH)) |
|----------------------|---|
| Solvente de corrido | Tolueno; Acetato de Etilo: (9;1) |
| Solvente de revelado | vainillina H ₂ SO ₄ |
| Rf obtenido | Banda #1 Rf=0.16 Banda #2 Rf=0.42 Banda #3 Rf=0.57 Banda #4 Rf=0,73. |

Unir el extracto Metanólico y Butanólico para realizar una placa preparativa ya que sus manchas son semejantes, lo que confirma con la igualdad de sus Rfs (Rf1=0.308Rf2=0.565) para los dos extractos y el extracto acuoso usar como referencia.

3.5.3. Tabla #9.- Placa preparativa de la unión del extracto Metanólico y Butanólico (#3)

| | |
|----------------------|---|
| Extracto | Me(OH +Bu(OH)) |
| Solvente de corrido | Tolueno; Acetato de Etilo: (9;1) |
| Solvente de revelado | vainillina H ₂ SO ₄ |
| Rf obtenido | Banda #1 Rf=0 Banda #2 Rf=0.462 Banda #3 Rf=0.805 Banda #4 Rf=0,910. |

Al revelar esta cromatografía con vainillina H₂SO₄ para terpenos confirma con su color rosado hay que realizar la recuperación de los compuesto puros para realizar otra cromatografía, indica que los solventes utilizados afirma la eficacia, eficiencia y resolución de la placa.

3.5.4. Tabla #10.- Verificación de pureza de metabolitos aislados en placa preparativa de la unión del extracto Metanólico y Butanólico.

| | |
|----------------------|---|
| Extracto | Me(OH +Bu(OH)) |
| Solvente de corrido | Tolueno; Acetato de Etilo: (9;1) |
| Solvente de revelado | vainillina H ₂ SO ₄ |
| Rf obtenido | Banda #1 Rf=0.740 Banda #2 Rf=0.790 Banda #3 Rf=0.543 Banda #4 Rf=0,802. |

La forma redondeada de las manchas nos confirma que los compuestos se encuentran puros.

3.5.5. Tabla #11.-Extracción de saponinas por cromatografía en columna

| | | | | |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Extracto Clorofórmico | fracciones #1, | fracciones #2 | fracciones #3 | fracciones #4 |
| Solvente de corrido | Hexano: Éter; (9:1) | Hexano: Éter; (9:1) | Hexano: Éter; (9:1) | Hexano: Éter; (9:1) |
| Solvente de revelado | Rosentaler | Rosentaler | Rosentaler | Rosentaler |
| Rf obtenido | Banda #1 Rf= 0.2 | Banda #2 Rf=0.228 | Banda #3 Rf=0.271 | Banda #4 Rf= 0.458 |

La forma redondeada de las manchas nos confirma que los compuestos se encuentran puros

3.5.6. Cromatografía de fracciones en Columna del extracto clorofórmico

Luego de realizar una cromatografía de las fracciones # 5 a # 14 y utilizar Solvente de recorrido: Solvente de recorrido: Hexano: Éter;(9:1) y Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Indica que tenemos Rf #5 = 0.40, Rf #6 = 0.90 Rf #12 = 0.849.

3.5.7. Cromatografía de fracciones en Columna del extracto clorofórmico

Luego de realizar una cromatografía de las fracciones # 15 a # 18 y utilizar Solvente de recorrido: Solvente de recorrido: Hexano: Éter;(9:1) y Solvente revelador: vainillina H₂SO₄

Indica que para las fracciones #16 Rf=0.736 y #18 Rf=0.75 es el solvente adecuado para la separación de compuestos.

3.5.8. Cromatografía de comprobación de las fracciones unidas del extracto clorofórmico.

Al realizar la cromatografía en capa fina de las fracciones # 1 a # 8 con solvente de recorrido: Solvente de recorrido: Tolueno, Acetato de Etilo; (8:2) y como Solvente revelador: vainillina H₂SO₄, las fracciones #2, #4, #6, #8, presenta Fracción #2 Rf= 0.638, Fracción #4 Rf= 0.625, Fracción #6 Rf=0.652, Fracción #8 Rf=0.694si resulta este solvente puesto que si separa los compuesto lo que no sucede para la fracciones, #1, #3, #5, y #7 a las cuales se tendría que realizar la cromatografía de elevando la polaridad del solvente.

3.5.9. Cromatografía de las fracciones #1,#3 del extracto clorofórmico.

Al realizar la cromatografía en capa fina de las fracciones # 1 y # 3 con solvente de recorrido: Hexano, Éter; (8:2) y como Solvente revelador: vainillina H₂SO₄, las fracciones #1, y #3 presenta la fracción #1 Rf=0.90 y la fracción #3 Rf=0.63 es decir que al subir la polaridad del solvente de recorrido es apropiada para la separación de compuestos.

3.5.10. Cromatografía de las fracciones #5,#7 del extracto clorofórmico.

Al realizar la cromatografía en capa fina de las fracciones # 5 y #7 con solvente de recorrido: Tolueno, Acetato de Etilo; (2:8) y como Solvente revelador: vainillina H₂SO₄, las Fracción #5 Rf= 0.771 y la fracción #7 Rf= 0.600 es decir que al subir la polaridad del solvente de recorrido es apropiada para la separación de compuestos dando una buena eficacia, eficiencia y resolución de la placa.

3.5.11. Cromatografía de las fracciones #1, #3 del extracto butanólico.

Al realizar la cromatografía en capa fina de las fracciones # 1 a la #3 con solvente de recorrido: Tolueno;(10) y como Solvente revelador: vainillina H_2SO_4 , presenta la fracción # 1 $R_f = 0.24$, # 2 $R_f = 0.77$, # 3 $R_f = 0.86$ lo que indica que la polaridad del solvente de recorrido es apropiada puesto que sus manchas son claras y redondas.

3.5.12. Cromatografía de las fracciones #1, #2, #3, #4, #5 del extracto clorofórmico.

Para las muestras #1 y #4 R_f banda # 1 = 0.750, R_f banda # 4 = 0.425 este solvente es adecuado puesto que si las separa, lo que no sucede con las muestras #2, 3, 5 que resulta ser demasiado polar.

3.5.13. Cromatografía de las fracciones #6, #7, #8, #9 del extracto clorofórmico.

Al realizar la cromatografía en capa fina de las fracciones # 6 a la #9 con solvente de recorrido: Tolueno, Acetato de Etilo; (9:1) y como Solvente revelador: vainillina H_2SO_4 , solo para la Fracción #7 R_f fracción #7 = 0.812

$R_f = 0.771$ y la fracción #7 presenta $R_f = 0.600$ es decir que se debe subir la polaridad del solvente de recorrido para la fracción #6, #8 y #9 para que se la separación de compuestos.

3.5.14. Cromatografía en placa preparativa para la unión de las fracciones #3 y #4, del extracto clorofórmico.

Luego de realizar una placa preparativa unión de las fracciones # 3 y # 4 y utilizar Solvente de recorrido: Tolueno: Acetato de Etilo;(9.7:0.3), y para luego hacer correr en Acetato de Etilo: Me(OH);(9:1) y revelar con H_2SO_4 vainillina es apropiado para la separación de compuestos seguidamente realizar el corte de las bandas de la placa para realizar otra cromatografía de las mismas usando como solvente de recorrido Cl_3CH ; Me (OH); H_2O (6.5;3.5;1,5) y solvente revelador: H_2SO_4 vainillina tenemos R_f de las bandas: R_f banda # 1 = 0.49, R_f banda # 2 = 0

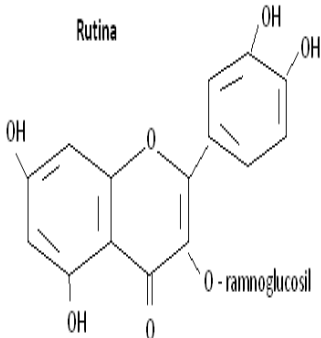
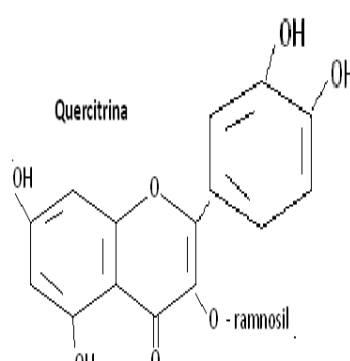
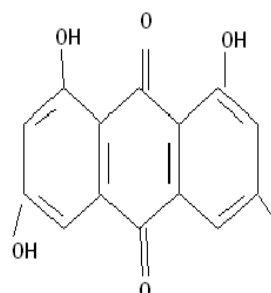
3.5.15. Placa Preparativa del extracto clorofórmico de la unión de las fracciones #6 y #7

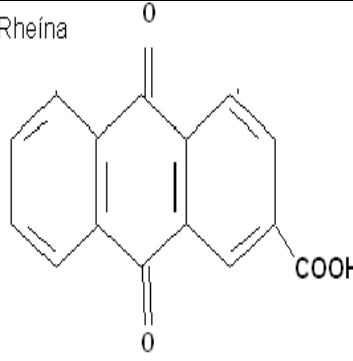
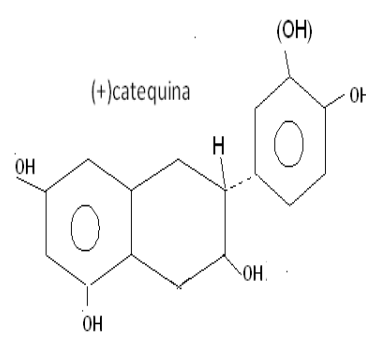
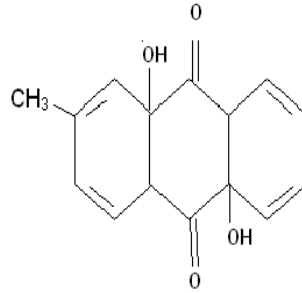
Hacer una placa preparativa de la unión de las fracciones #6 y #7 Solvente de recorrido: Acetato de Etilo; Me(OH);(8.5;1.5) y Solvente revelador: vainillina H_2SO_4 seguidamente realizar el corte de las bandas de la placa para realizar otra cromatografía de las mismas usando como solvente de recorrido Cl_3CH ; Me (OH); H_2O (6.5;3.5;1,5) y solvente revelador: H_2SO_4 vainillina tenemos R_f de las bandas R_f banda # 1 = 0.328, R_f banda # 2 = 0.657 (Quercetín 3 O glucósido) y R_f banda # 3 = 0.479.

3.5.16. Placa Preparativa del extracto clorofórmico de la unión de las fracciones #8 y #9

Luego de realizar una placa preparativa unión de las fracciones # 8 y #9 y utilizar Solvente de recorrido: Acetato de Etilo: Me(OH);(9:1) y como solvente revelador: H₂SO₄ vainillina se la presencia de, Rf de las bandas: Rf banda # 1=0.32, Rf banda # 2=0.28, Rf banda # 3=0.466 (á Clorogénico),Rf banda # 4=0.12 lo que indican que se encuentran puros

Grafico #5.- Terpenoides que se encuentran presentes en el extracto de caña fistula (*cassia fistula*)

| Rutina: 258,359 nm | Quercitrina : 254, 370 nm | Emodina Antraquinona |
|--|---|--|
| <p>Rutina</p>  | <p>Quercitrina</p>  | <p>Emodina Antraquinona</p>  |

| Rheína | (+) Catequina | 1,8-dihidroxi-3- metil-antraquinona |
|---|--|--|
| <p>Rheína</p>  | <p>(+)catequina</p>  | <p>1,8-dihidroxi-3- metil-antraquinona</p>  |

CAPITULO IV

4.-CONCLUSIONES

- 1.- De 250g de pulpa obtiene diferentes porcentajes de extracto concentrado de pulpa de caña fistula (*cassia fistula*).
- 2.- Se preparo extractos de acetato de etilo 0,07%, extracto clorofórmico 4,81 %, extracto metanólico 7.83% el cual por presentar azúcares se realiza hidrólisis para hacer un subextracto butanólico 70.7%, extracto básico 43.9% y finalmente 37.3% del extracto acuoso. En el tamizaje fitoquímico extracto clorofórmico determina la presencia de saponinas, sesquiterpeno lactonas, fenoles y terpenoides, el extracto metanólico presenta quinonas y terpenoides; extracto acuoso hay saponinas, quinonas, sesquiterpeno lactonas, fenoles, esteroides y esteroides (terpenoides) en general azúcares.
- 3.- La presencia de terpenoides glicósidos en el extracto metanólico y acuoso determinados por la presencia de cristales transparentes, dulces se hidrolizaron con HCl para liberar las geninas que fueron extraídas con butanol formando un subextracto. El tamizaje fitoquímico del subextracto butanólico da saponinas, sesquiterpeno lactonas, fenoles y terpenoides.
- 4.-El análisis cromatográfico de capa fina del extracto clorofórmico corrido en cloroformo: ácido acético glacial: metanol: agua; (60:32:12:8) revelado Sulfato de cerio da dos terpenos con Rf 0.29 y 0.45.
- 5.- De la cromatografía en columna en la fracción # 57 del extracto clorofórmico del análisis por cromatografía en capa fina corrido en Acetato de Etilo: Me (OH) ; (9:1) revelado vainillina H₂SO₄ da el terpeno con Rf 0.812 lo que indica que su Rf la referencia al compuesto.
- 6.- En la verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de la unión de las fracciones #6 y #7 del extracto Clorofórmico en la Banda #2 indica la presencia del compuesto con Rf =0.657.
- 7.-De la cromatografía en columna la fracción extracto clorofórmico del análisis por cromatografía en capa fina corrido en Hexano: Éter;(9:1) y revelado vainillina H₂SO₄ con Rf #5 = 0.40 , Rf #6 = 0.90, Rf #12 = 0.849.
- 8.-. Determinando así los compuestos que presentan uno, dos longitudes de onda pertenece a terpenoides y los que presentan tres longitudes de onda se consideran flavonoides para que en lo posterior se pueda determinar la estructura de los mismos.

CAPITULO IV

5.- RECOMENDACIONES

- Utilizar guantes y mascarilla sobre todo en el momento de revelar con Rosentaler.
- Al realizar el proceso de extracción de la pulpa esta debe licuarse en la velocidad más débil y por poco tiempo.
- Trabajar con la pulpa hidrolizada para evitar el alto contenido de azúcares que presenta la cassia fistúlala que interfiere en la separación de los metabolitos.
- Al utilizar los solventes de corrido se debe utilizar los de menor a mayor polaridad para poder seguir utilizando la misma placa gradualmente y dar con el más apropiado.
- La elección del eluyente dependerá lógicamente del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo.
- El espesor de la placa es otro factor a tener en cuenta al preparar la placa, recomienda 0.1-0.2 mm. Para separaciones analíticas y 0.2 - 0.5 mm para separaciones preparativas.
- Se recomienda que a este estudio se realicen posteriores estudios para determinar la estructura química de los metabolitos mencionados.

CAPITULO VI

6.- BIBLIOGRAFÍA

6.1. GENERAL

- 1.- BARCELO, J. Diccionario Terminológico de Química. 2ª. ed. Barcelona, Océano, 1979
Pp. 289
- 2.- BLADT, W. Plant Drug Análisis. 2ª. ed. Berlín, Springer Verlag, 1996. pp. 54-58.
- 3.- BRUNETON, J. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. 2ª. ed. Barcelona, Alambra, 2001. pp. 1094.
- 4.- CACERES, A. Plantas de Uso Medicinal. Guatemala, Universitaria, 1997. pp. 153-158.
- 5.- COSSIO, J. Farmacognosia. 2ª. ed. Buenos Aires, Universidad Argentina, 2000. pp. 197- 200.
- 6.- DOMINGUÉZ, A. Cromatografía en Papel y en Capa Delgada. Ed. México, Eva, 1975. pp. 62-63.
- 7.- DOMINGUÉZ, X. Método de Investigación Fitoquímica. México, Limusa, 1979. pp. 33-48.
- 8.- FLORES, R. Atlas de las Plantas Medicinales y Curativas. 2ª. ed. Madrid, Cultural, 1998. pp. 93-94
- 9.- GROS, E. Introducción al estudio de los Productos Naturales. Washington D.C, 1985. pp. 78-90.
- 10.- JÁTIVA, C. Texto Básico de Farmacognosia y Productos Naturales. Riobamba, Centro de Reproducción de Documentos de ESPOCH, 2000. pp. 56-60.
- 11.- LOK, O. Investigación Fitoquímica. 2ª. ed. Perú, ed. Universidad Católica del Perú, 1994. pp. 27,270 – 278.
- 12.- PAMPLONE, R. Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Argentina, ACes. pp. 674.

6.2. ESPECÍFICA

13.- CASSIA FISTULA: Clasificación botánica

http://concursos.colombiaaprende.edu.co/expediciones_botanicas/ver_herbarios
2011/05/06

14.- CASSIA FISTULA: Especie

www.jungleseeds.com/images/CassiaFistula.jpg
2011/09/10

15.- CAÑA FISTULA: Planta medicinal

www.rain-tree.com/canafistula.htm
2011/09/10

16.- CROMATOGRAFIA: Capa fina

http://cromatografía_capa_fina.edu.co/expediciones_
2011/05/06

17.- CONSTANTE DE DISTRIBUCIÓN: Cromatografía

http://www.Constante_distribución.net/pageID_0597340.html
2011/07/14

18.- GALLEGO, O. Plantas Medicinales: Cuba

<http://www.azurina.cult.cu/sitios/patrimonio/museos/gallego/plantas/r/romero.ht>
2011-06-19

19.- HIDRÓLISIS ÁCIDA.

http://www.marcmoll.net/pageID_7297340.html
2011/-06-19

20.- HIDROLISIS: clasificación

http://www.midrólisisl.net/pageID_7297340.html
2011/06/01

22.- MEDICINA ANCESTRAL

www.hierbitas.com/nombrecomun
2011/09/10

23.- MORALES, C. Cassia Fistula Descripción

<http://www.plantasyhogar.com/jardin/arboles/arboles/?pagina=jardin>
2011/09/08

24.- LUZ, S. Cassia fistula Usos

<http://books.google.Com.ec/books>
2011/06/19

RESUMEN

De la pulpa de Caña fistula (*Cassia fistula*) usada en expectorante, no se conoce sus metabolitos secundarios esto motivó a estudiarlos por preparación de extractos; acetato de etilo (I), clorofórmico (II), metanólico (III), butanólico (IV) y acuoso (V).

El tamizaje fitoquímico dio (I) terpenoides (saponinas); (II) triterpenos (saponinas), sesquiterpeno lactonas, fenoles, taninos, azúcares reductores y flavonoides; (III) tiene alcaloides, (IV) presenta triterpenos (saponinas), quinonas y azúcares reductores una vez hidrolizado (V) tiene triterpenos (saponinas), sesquiterpeno lactonas, fenoles y taninos finalmente la fase acuosa tiene triterpenos (saponinas esteroidales), quinonas, sesquiterpeno lactonas, fenoles y taninos azúcares reductores y flavonoides.

En el caso de más de dos componentes se separa TLCP, la aplicación en banda, corrido en solventes determinados anteriormente, realizando corte de bandas para luego concentrar comprobar en TLC y la determinación en UV. Los extractos; (II) presenta 2 compuestos, (III) 3 compuestos y (IV) presentó 2 utilizando solvente de corrido Tolueno, Acetato de Etilo; (6:4) y solvente revelador para Rosenthaler.

Los extractos II y V se purifica por cromatografía en columna, con solventes en aumento de polaridad desde hexano a etanol, luego unir fracciones con Rfs similares, purificar en TLCP, y la pureza determinada en el TLC así el extracto (II)A $\lambda_{max/Et(OH)}$ 405, 549nm ; (II)B $\lambda_{max/Et(OH)}$ 405, 452 549nm; (II)C $\lambda_{max/Et(OH)}$ 408, 452, 549nm, (II)D $\lambda_{max/Et(OH)}$ 405, 452, 549nm y (V)A $\lambda_{max/Et(OH)}$ 549nm; (V)B $\lambda_{max/Et(OH)}$ 405nm; (V)C $\lambda_{max/Et(OH)}$ 444nm y (V)D $\lambda_{max/Et(OH)}$ 444nm. Comprobando que hasta dos picos corresponde a terpenos y tres a flavonoides.

SUMMARY

From fistula cane pulp (*cassia fistula*) which is used in expectorant, secondary metabolites aren't known that is why they were studied by extract preparation; ethyl acetate (I), chloroform (II), methanolic (III), butanol (IV), and watery (V).

Phytochemical screening gave: (I) terpenoids (saponins); (II) triterpenos (saponines), lactone sesquiterpeno, phenols, reducing sugar tannins and flavonoids; (III) has alkaloids, (IV) presents triterpenos (saponins), quinones and reducing sugar, when it is hydrolyzed (V) has triterpenos (saponins), lactone sesquiterpene, phenols and tannins. Finally watery phase has triterpenos (steroidal saponins), quinines, lactone sesquiterpene, phenols, tannins, reducing sugar and flavonoids.

When there two or more components Toxicity characteristic leaching procedure TLCP is separated by frequency application, applied in solvents determined previously, doing frequency cutting and then to concentrate and checkup in TLC and determination in UV.

Extracts; (II) show 2 components, (III) 3 components and (IV) 2 components by using toluene solvent, ethyl acetate; (6:4) and revealing solvent for Rosentaler

Extracts II y IV are purified by column chromatography whit solvent which are increasing in polarity from hexane to ethanol and so to join fractions with similar Rfs and purify in TLCP (Long Term Control Plan), pureness determined in TLC, so extract (II)A $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 405,549nm; (II)B $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 405.452 y 549nm; (II)C $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 408, 452, 542nm; (II)D $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 405, 452, 549nm; y (V)A $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 549nm; (V)B $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 405nm; (V)C $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 444nm; (V)D $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 408, 452, 549nm; (V)E $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 408, 452, 549nm; (V)F $\lambda_{\text{Et(OH)}}^{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ 405, 444, 549nm. It is proved that until 2 peaks correspond to terpenes and three ones to flavonoids.