



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DE ESPINO CHIVO
(*Duranta triacantha*)”**

**TESIS DE GRADO PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

PRESENTADO POR:

ADRIANA ÁNGELA LUNA INCA

RIOBAMBA – ECUADOR

2015

Mi agradecimiento a Dios por otorgarme la vida, por su amor y su infinita misericordia.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, A mí querida Escuela de Bioquímica de Farmacia, mi segundo hogar, así como a cada uno de los maestros por la excelente formación académica

A mi directora de tesis Dra. Susana Abdo quién ha compartido su conocimiento científico en la dirección de este trabajo.

A la Dra. Cumandá Játiva, por su loable colaboración valores y virtudes enmarcados en la ética profesional y humana, y me ha sabido aconsejar con sabiduría.

A los Dres. Miembros del tribunal de Tesis por el su valioso aporte en la elaboración del trabajo.

A mi esposo por su apoyo durante toda la experimentación y realización de esta labor.

A mi familia, amigos y todas las personas que se involucraron de una u otra manera para la finalización de esta investigación y en la vida misma.

Adriana Ángela Luna Inca

Dedico esta Investigación a Dios por ser el eje principal en mi vida.

A mis amados padres: Ángel Luna y Martha Inca por sus oraciones, su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, por brindarme todo su amor y guía. Porque gracias a ustedes he aprendido a ser una mejor persona día a día, a luchar por mis sueños.

A mis hermanos que han sido siempre un apoyo.

A mis hijos Mateo y Danna, el motivo para luchar cada día.

A mi esposo Hugo, mi compañero fiel y mi gran amigo, sustento impulsador a nuevos logros.

La presente es dedicada a ustedes, con amor.

Adriana Ángela Luna Inca

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: “ESTUDIO FITOQUÍMICO DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacantha*)”, de responsabilidad de la señorita egresada Adriana Ángela Luna Inca, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Nancy Veloz DECANO FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dra. Ana Albuja DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	-----	-----
Dra. Susana Abdo DIRECTORA DE TESIS	-----	-----
Bqf. Víctor Guangasig ASESOR DE TESIS	-----	-----
Bqf. Fausto Contero MIEMBRO DE TRIBUNAL	-----	-----
Abg. Bertha Quintanilla COORDINADOR SISBIB ESPOCH	-----	-----
NOTA DE TESIS ESCRITA	-----	

Yo, **Adriana Ángela Luna Inca**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

ADRIANA ÁNGELA LUNA INCA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
¹H-RMN,	Espectroscopia de protón
¹³C-RMN	Espectroscopia de carbono 13
Bu(OH)	Butanol
CC	Columna Cromatográfica
CCF	Cromatografía de capa fina
cm	centímetros
Cl₃cH	Cloroformo
CeSO₄	Sulfato de cerio
EM	Espectroscopia de Masas
Et(OH)	Etanol
EtOAc	Acetato de etilo
Fig.	Figura
Fot.	Fotografía
g	Gramos
g/mL	Gramos por mililitro
HCl	Ácido clorhídrico
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
IR	Espectroscopia Infrarroja
L	litro
Me(OH)	Metanol
mm	Milímetros
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
NaOH	Hidróxido de sodio
pH	Potencial de Hidrógeno
PP	Placa Preparativa
rpm	Revoluciones por minuto
µg	Microgramos
UV	Ultravioleta
λ_{max}	Longitud de onda máxima
↓	Precipitado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE TABLAS

INDICE DE ANEXOS

RESUMEN

SUMARY

INTRODUCCIÓN

1.	Marco teórico	- 1 -
1.1.	Verbenaceae.....	- 1 -
1.2.	Género <i>duranta</i>	- 1 -
1.3.	Especies del género <i>duranta</i> estudiadas	- 1 -
1.4.	<i>Duranta triacantha</i>	- 3 -
1.4.1.	Descripción botánica.....	- 3 -
1.4.2.	Taxonomía.....	- 4 -
1.4.3.	Área de distribución.....	- 5 -
1.4.4.	Usos.....	- 5 -
1.5.	Extracto.....	- 5 -
1.6.	Metabolitos.....	- 5 -
1.7.	Descripción de algunos metabolitos.....	- 6 -
1.7.1.	Flavonoides.....	- 6 -
1.7.2.	Quinonas.....	- 7 -
1.7.3.	Taninos.....	- 9 -
1.8.	Análisis fitoquímico.....	- 10 -

1.9.	Tamizaje fitoquímico.....	- 11 -
1.9.1.	Ensayo de sudan.....	- 11 -
1.9.2.	Ensayo de w\Wagner.....	- 11 -
1.9.3.	Ensayo de Baljed.....	- 11 -
1.9.4.	Ensayo de Bornträger.....	- 11 -
1.9.5.	Ensayo de espuma.....	- 12 -
1.9.6.	Ensayo del cloruro férrico.....	- 12 -
1.9.7.	Ensayo de Shidona.....	- 12 -
1.9.8.	Ensayo de Rosentaler.....	- 13 -
1.10.	Cromatografía.....	- 13 -
1.10.1.	Concepto de Rf.....	- 14 -
1.10.2.	Cromatografía en capa fina.....	- 14 -
1.10.3.	Cromatografía en placa preparativa	- 16 -
1.10.4.	Cromatografía de columna.....	- 16 -
1.11.	Análisis espectrofotométrico.....	- 17 -
1.11.1.	Espectrofotometría.....	- 17 -
1.11.2.	Espectroscopia ultra violeta.	- 17 -
1.12.	Ley de Beer.....	- 18 -
1.12.1.	Limitaciones propias de la ley de Beer.....	- 18 -
1.12.2.	Desviaciones químicas.....	- 19 -
1.12.3.	Desviaciones instrumentales originadas por la radiación policromática.....	- 19 -
1.12.4.	Desviaciones instrumentales originadas por la radiación parásita.....	- 19 -
1.12.5.	Aplicaciones	- 20 -
1.12.6.	Características.....	- 20 -
1.12.7.	Métodos de medida.....	- 20 -
1.12.8.	Consideraciones generales.....	- 21 -

1.13.	Reglas de Woodward - Fieser.....	- 21 -
2.	Parte experimental	- 23 -
2.1.	Lugar de la investigación	- 23 -
2.2.	Recursos materiales	- 23 -
2.2.1.	Equipos.....	- 23 -
2.2.2.	Materiales.....	- 24 -
2.2.3.	Reactivos.....	- 25 -
2.3.	Factores de estudio.....	- 25 -
2.4.	Recolección del vegetal.....	- 26 -
2.5.	Identificación botánica.....	- 26 -
2.6.	Preparación del extracto	- 26 -
2.7.	Caracterización de propiedades organolépticas y físicas del extracto	- 27 -
2.7.1.	Requisitos organolépticos.....	- 27 -
2.7.2.	Requisitos físicos.....	- 27 -
2.8.	Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico (A).....	- 28 -
2.9.	Determinación de las condiciones cromatográficas del extracto etanólico (A) de espino chivo (<i>duranta triacantha</i>).....	- 28 -
2.9.1.	Cromatografía de capa fina del extracto etanólico (A).....	- 28 -
2.9.2.	Fragmentación líquido-líquido del extracto etanólico.....	- 29 -
2.9.3.	Cromatografía de capa fina del subextracto clorofórmico (B).....	- 30 -
2.10.	Análisis y separación cromatográfica del subextracto butanólico (C) de espino chivo (<i>Duranta triacantha</i>).....	- 36 -
2.11.	Análisis y separación cromatográfica del subsubextracto hexánico (D) de espino chivo (<i>duranta triacantha</i>)	- 37 -
2.11.1.	Cromatografía de las fracciones de columna del subsubextracto hexánico (D).....	- 38 -
2.12.	Cuantificación de taninos pirocatécolicos, por permanganometría.....	- 41 -

3.	Resultados y discusiones.....	- 43 -
3.1.	Especie vegetal	- 43 -
3.1.1.	Recolección del vegetal.....	- 43 -
3.1.2.	Identificación botánica.....	- 43 -
3.2.	Extracto alcohólico del vegetal en estudio.....	- 43 -
3.2.1.	Análisis de características organolépticas y físicas los extractos.....	- 43 -
3.2.2.	Tamizaje fitoquímico.....	- 44 -
3.2.3.	Cromatografías del extracto etanólico (A) de espino chivo (<i>Duranta triacantha</i>).....	- 45 -
3.2.4.	Separación y purificación del subextracto clorofórmico (B).....	- 45 -
3.2.5.	Cromatografía del subextracto butanólico (C) de espino chivo (<i>Duranta triacantha</i>)	- 47 -
3.2.6.	Cromatografía del subsubextracto hexánico (D) de espino chivo (<i>Duranta triacantha</i>).	- 48 -
3.2.7.	Cuantificación de taninos pirocatécolicos, por permanganometría:.....	- 49 -
3.3.	Posibles estructuras dadas por espectroscopia UV.....	- 49 -
	CONCLUSIONES.....	- 53 -
	RECOMENDACIONES.....	- 54 -
	BIBLIOGRAFÍA.....	- 55 -
	ANEXOS.....	- 61 -

INDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1	Ensayos y Metabolitos identificados.....	28
CUADRO N° 2	Fracciones separadas en columna CC1 de subextracto clorofórmico (B).....	31
CUADRO N° 3	Fracciones separadas de muestra 9-15 en Columna Cromatográfica (CC2).....	33
CUADRO N° 4	Fracciones obtenidas en columna CC3 de la fraccion 7 de la muestra 14.....	35
CUADRO N° 5	Fracciones separadas en la CC4.....	35
CUADRO N° 6	Fracciones separadas en la columna cromatográfica CC5 del subsubextracto hexánico (D).....	38
CUADRO N° 7	Fracciones obtenidas en la columna cromatográfica de la subfracción 22-23.....	40
CUADRO N° 8	Características organolépticas y físicas del Extracto Etanólico de <i>Duranta triacantha</i>	44
CUADRO N° 9	Resultados del tamizaje fitoquímico.....	44
CUADRO N° 10	Longitudes de onda calculadas para aplicando las reglas de Woodward y Fieser.....	50
CUADRO N° 11	Longitudes de onda calculadas para flavonoides aplicando las reglas de Woodward y Fieser.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1	Estructura molecular de Verbascosídeo aislado de <i>D. vestita Cham</i>	2
FIGURA N° 2	Enumeración de carbonos en el núcleo de las Antraquinonas.....	8
FIGURA N° 3	Definición de Rf.....	14
FIGURA N° 4	Sistema básico de Woodward-Fieser	21
FIGURA N° 5	Ejemplo de Aplicación de Leyes de Woodward-Fieser.....	22
FIGURA N° 6	Diagrama de extracción y fraccionamiento de Espino chivo....	30
FIGURA N° 7	Posible Antraquinona.....	33
FIGURA N° 8	Posible estructura del flavonoide A aplicando las Reglas de Woodward Fieser.....	34
FIGURA N° 9	Diagrama del fraccionamiento del subextracto butanólico (C)..	37
FIGURA N° 10	Posible Estructura del Flavonoide B aplicando las Reglas de Woodward Fieser.....	41
FIGURA N° 11	Determinación de la posible Antraquinona por aplicación de las Reglas de Woodward Fieser.....	50
FIGURA N° 12	Determinación de los posibles Flavonoides (A, B) por aplicación de las Reglas de Woodward Fieser.....	51

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N° 1	Ejemplar de Espino Chivo.....	3
FOTOGRAFÍA N° 2	<i>Duranta triacantha</i>	4
FOTOGRAFÍA N° 3	Cromatografía de Capa Fina 1 de Extracto Etanólico (A) CCF1.	29
FOTOGRAFÍA N° 4	Cromatografía de Capa Fina 2 de subextracto clorofórmico (B) CCF2.....	31
FOTOGRAFÍA N° 5	CCF3 de fracciones de columna CC1 del Subextracto clorofórmico.....	32
FOTOGRAFÍA N° 6	CCF4 de la fracción de 1 a 4 de CC1 del subextracto clorofórmico (B).....	32
FOTOGRAFÍA N° 7	CCF5 de la fracción de 9 a 15 de CC1 del subextracto clorofórmico (B).....	33
FOTOGRAFÍA N° 8	CCF6 de las fracciones de columna CC2 de la muestra 9-15.....	34
FOTOGRAFÍA N° 9	CCF7 de las fracciones obtenidas en CC3.....	35
FOTOGRAFÍA N° 10	CCF8 de las fracciones de columna CC4 de la muestra 17-20...	36
FOTOGRAFÍA N° 11	CCF9 de las fracciones de columna CC de la muestra 21-25.....	36
FOTOGRAFÍA N° 12	CCF10 del subextracto butanólico (C).....	37
FOTOGRAFÍA N° 13	CCF11 del subsubextracto hexánico (D).....	37
FOTOGRAFÍA N° 14	CCF12 de las fracciones 1-7.....	38
FOTOGRAFÍA N° 15	CCF13Cromatografía de la fracción 9-10.....	39
FOTOGRAFÍA N° 16	PP8 de la fraccion 12-16.....	40
FOTOGRAFÍA N° 17	CCF15 de la Columna Cromatográfica de D22-23.....	41
FOTOGRAFÍA N°18	Reacción positiva de taninos pirocatecólicos.....	41
FOTOGRAFÍA N°19	Compuesto aislado al UV.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1	Valores de Absorción para las BI Y BII de los diferentes tipos de Flavonoides.....	7
TABLA N°2	Técnicas Cromatográficas.....	13

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1.	Procedimiento en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.....	61
------------	---	----

RESUMEN

Se realizó el “Estudio Fitoquímico de Espino chivo (*Duranta triacantha*)”, con el objetivo de extraer, purificar e identificar metabolitos secundarios, utilizando métodos cromatográficos; la especie vegetal recolectada en el cantón Guano, se preparó por maceración en etanol, se concentró y determinó las propiedades físicas y químicas, resultando un extracto líquido verdoso dulce, con densidad 0.985g/mL, pH=5.89 e índice de refracción 1.362 y por pruebas colorimétricas presentó los grupos funcionales de sesquiterpenolactonas, alcaloides, benzoquinonas y taninos. Para la purificación cromatográfica se preparó el subextracto clorofórmico y subsubextracto hexánico, después de realizar cromatografías en columna, microcolumna, placas preparativas con cortes de bandas, posteriormente se concentró y comprobó en cromatografía de capa fina en sistemas de solventes apropiados con evidencia de eficacia, eficiencia y resolución, se determinó su espectro ultravioleta; aislando: el 1,3,4,7-tetrahidroxi-9,10-antraquinona con $R_f = 0.95$ y $\lambda_{max} = 282.0\text{nm}$, 292.0nm , 315.0nm , con un R_f de 0.44 cuyo espectro UV reveló la $\lambda_{max} = 222.0\text{nm}$, 276.0nm , la flavona 1'5'-oxi-7-hidroxi-flavona, con $R_f: 0.76$ con $\lambda_{max} = 212.0\text{nm}$, 289.0nm , el 7-hidroxi-flavananol y en la cuantificación por permanganometría se obtuvo 0.31 mEqg. de taninos picatecólicos como consumo de permanganato de potasio. Este estudio fitoquímico comprueba la presencia de flavonoides y taninos cuyas propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y antisépticos benefician a la piel, además se aporta con estudios sobre la planta y para su uso comercial en la industria farmacológica y cosmética en nuestro país, de acuerdo al contenido de metabolitos de la planta.

SUMMARY

It was realized the "Phytochemical study of Espino chivo (*Duranta triacantha*)", with the objective of extract, purify and identify secondary metabolites, using chromatographic methods; the vegetal specie collected in Guano canton, it was prepared for maceration in ethanol, the physical properties were concentrated and prepared, resulting a liquid greenish and sweet extract, with density 0.985g / mL, pH = 5.89 and refractive index 1.362 and for colorimetric tests are presented the functional groups of sesquiterpenolactones, alkaloids, benzoquinones and tanines. For the chromatographic purification was prepared the chloroformic substrates and the hexanic substrates, before to realize chromatographies in column, microcolumn, preparatory plates with cutting of bands, afterwards it is concentrated and proved in thin layer chromatography, in system of proper solvents with evidence of effectiveness, efficiency and resolution, it was determined its spectrum ultraviolet; isolating: the 1,3,4,7-tetrahydroxi-9,10-Anthraquinone with Rf = 0.95 and λ_{\max} = 282.0nm, 292.0nm, 315.0nm, with a Rf of 0.44 whose spectrum UV revealed the λ_{\max} =222.0nm, 276.0 nm, the flavone 1'5'-oxi -7-hydroxi-flavone, with Rf 0.76 with λ_{\max} = 212.0nm, 289.0nm, the 7-hydroxi-flavananol and in the quantification for permanganometry was obtained 0.31 mEq of picatecolics tanines like consumption of potassium permanganate. This phytochemical study established the presence of flavonoids and tanines whose antioxidant, anti-inflammatory, antiseptic properties, benefit to the skin, besides contributes with studies about the plant and for its commercial use in the pharmacology and cosmetic industry in our country, according to the content of metabolites in the plant.

INTRODUCCIÓN

Duranta triacantha conocida vulgarmente como Espino Chivo, se utiliza generalmente en el campo como lindero o matorral, en medicina tradicional para el tratamiento de infecciones cutáneas en forma tópica, su potente acción se ha comprobado en el estudio de actividad antimicrobiana para microorganismos ATCC activados como son: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* por el método de Mitschel, con resultados positivos, esto se lo hizo en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH (Uvidia, 2012).

Estos precedentes permitieron realizar una búsqueda de investigaciones del vegetal hallando estudios botánicos de: *D. cajamarcensis* Mold. “hualongo”, *D. erecta* L. “lila”, *D. mandonil*. Mold. *D. mutisii* L.f. “cantus”, *D. abtusifolia* HBK. “tandul”, *D. sprucei* Briq. “upacantur”, realizados en el Perú, y estudios fitoquímicos de *D. vestita* Cham, *D. repens* y *D. erecta*. En el Ecuador existe solamente reportada *D. triacantha*, con antecedentes del tiempo de las Vírgenes del Sol quienes la utilizaban para tener la piel limpia e hidratada.

Con el fin de aportar con estudios fitoquímicos de *D. triacantha*, se emprendió esta investigación desde: la recolección, identificación botánica, preparación de extractos por maceración y la fragmentación en subextractos, análisis cromatográficos, cristalización y recristalización de sólidos, determinación de espectroscopia ultravioleta.

Para cumplir este proceso se planteó: Identificar la taxonomía de Espino chivo (*D. triacantha*); Preparar los extractos etanólicos y subextractos clorofórmico, butanólico, subsubextracto hexánico de la especie y tamizaje fitoquímico; Separar y purificar los metabolitos secundarios presentes, mediante Cromatografía de capa fina y cromatografía en columna; y realizar el Análisis espectrofotométrico de las fracciones purificadas. La investigación dio como resultado el aislamiento y purificación de cinco metabolitos secundarios; los mismos que con la técnica del ultravioleta se determinó la presencia de anillos de quinonas, flavonoides y taninos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. VERBENACEAE

La familia Verbenaceae contiene alrededor de 35 géneros y 1.000 especies, registradas en áreas tropicales y extratropicales. (47) (52)

Son plantas muy aromáticas y con propiedades medicinales difundidas en los pobladores de la región, quienes la usan en infusión o como saborizantes del tradicional mate. (1) (5) (6)

Una especie perteneciente a esta familia es la *Lippia alba*, la cual varios estudios han demostrado que es analgésica, protectora de la mucosa gástrica, antioxidante e antimicrobiana, además de tener efectos en el Sistema Nervioso Central. (3) (8) (48)

1.2. GÉNERO DURANTA

En lo que respecta al género *Duranta* (Verbenaceae) hay informes sobre la presencia de flavonoides, alcaloides, acetofenona, cumarinas, iridoides, diterpenos, triterpenos, saponinas, hidratos de carbono, glucósidos fenólicos, glucósidos esteroideos y esteroides. (2) (4) (45) (46) (13)

1.3. ESPECIES DEL GÉNERO DURANTA ESTUDIADAS

1.3.1. *Duranta vestita Cham*

Esta planta nativa se encuentra en el sur y sureste de Brasil, en la selva tropical. Los frutos son muy utilizados en el tratamiento de la malaria (46), El estudio de algunas actividades biológicas con los extractos y fracciones mostró tener actividad contra

Plasmodium berghei, y ser antihelmíntico (10) (12), además de ser utilizado para el tratamiento de absceso. En México y Guatemala se utilizan las flores como un estimulante y frutas como febrífugo. Y en Indochina, se considera diurético (12).

Tiene actividad inhibidora demostrada hacia la trombina, que se relaciona con la enfermedad vascular trombótica (12), y hacia enzimas prolil endopeptidasa. A demás sustancias aisladas a partir de la fracción soluble en cloroformo poseen actividad antioxidante potente contra de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). (10)

El extracto de metanol de las hojas tiene citotoxicidad, además de actividad insecticida contra el *Aedes aegypti* y *piceus* anti-alimentaria *Attagenus* (2). También se informó de la actividad contra los hongos y *Ceratocystis paradoxa* *Phytophthora capsici* (50) (13).

En cuanto a la fracción soluble de acetato registra actividad antioxidante y antiviral. Además un estudio reveló un compuesto aislado de esta fracción por medio de columnas cromatográficas, e identificado por espectroscopia de UV, ¹³C-RMN y ¹H-RMN, dicho compuesto se lo conoció como Verbascosídeo. (10) (32)

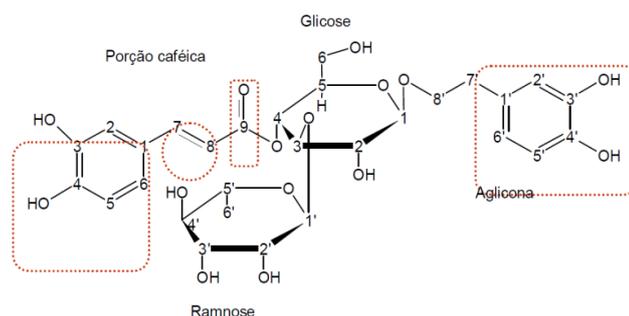


FIGURA N° 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE VERBASCOSÍDEO AISLADO DE *D. vestita Cham*

Presenta inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y extracto de cetona inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo todas las muestras tienen alguna actividad alelopática (43). Además de la fracción de extracto cetona y cloroformo de la corteza también posee actividad hemolítica (10) (13)

1.3.2. *Duranta repens*

A partir de hierbas medicinales orientales, cincuenta y un taninos y cuarenta y un flavonoides aislados se evaluaron por su capacidad antioxidante con 2-picrilhidrazil 1,1-difenil (DPPH) sistema generador de radicales, y que su actividad contra el radical

DPPH está estrechamente relacionada con su estructura química. Una comparación de las dos clases de compuestos mostró que los taninos tienen más potencial que los flavonoides porque casi todos los taninos demostraron acción de eliminación significativa dentro de un rango de baja concentración, mientras que la actividad de los flavonoides variaba distintivamente entre los diferentes compuestos. (46) (51)

Tres compuestos fueron aislados de la fracción de acetato de etilo del extracto de metanol de *D. repens* L. (Verbenaceae), el glucósido feniletanoides acteosida (verbascosideo), el iridoide lamiide y la saponina pseudo-ginsenoside-RT1. Acteosida mostró actividad de captación de radicales en el ensayo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), mientras lamiide y la pseudo-ginsenosido-RT1 no estaban activos. (51)

Flavonoides Isoprenilados y un derivado de acetofenona isoprenilada junto con compuestos conocidos aislados por primera vez a partir de esta especie, mostraron actividad inhibitoria frente a la prolil endopeptidasa y trombina. (2). Dos triterpenos, se aislaron como una mezcla de la fracción soluble en cloroformo de un extracto de etanol de *D. repens* Linn (Verbenaceae) del vástago. La mezcla de beta-amirina y 3-beta-12-oleanene, 21-beta-diol era muy eficaz contra las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). (37)

1.4. *Duranta triacantha*



FOTOGRAFÍA N°1. EJEMPLAR DE ESPINO CHIVO

1.4.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Nombre científico: *Duranta triacantha* Juss.

Nombres vernáculos: Espino chivo, chivo caspi, chupucalla.

Origen y forma de vida: Nativa; arbusto (30).

Dentro de la familia Verbenaceae se encuentra el género *Duranta*, a la que pertenecen 17 especies de arbustos y pequeños árboles nativos de América, su extensión va desde el sur de Florida y México hasta el norte de Argentina. (45)

Son arbustos de hoja perenne, muy considerados debido a su aspecto y floración. Sus ramas son arqueadas y vigorosas, algunas con espinas largas, hojas verde medio y flores en ramilletes semipéndulos de coloración lila. Se reproducen en primavera por semillas, o a fines del verano por esquejes semileñosos. (45)(47)

1.4.2. TAXONOMÍA

Domain: *Eukaryota*

Taxón Superior: *Duranta*

Taxón Superior Principal: *Duranta*

Reino: Vegetal

Phyllum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Duranta*

Especie: *Duranta triacantha*

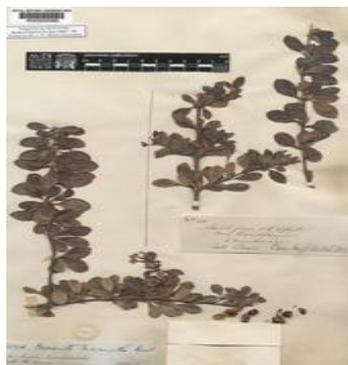
Nivel: Especie

Nombre científico: *Duranta triacantha* Juss.

Autor Epíteto Específico: Juss.

Determinador: Liesner, R.

Fecha determinación: 2001(20) (45) (47)



FUENTE: THE BOARD OF TRUSTEES OF THE ROYAL BOTANIC GARDENS, HERBARIUM CATALOGUE.

FOTOGRAFÍA N° 2. *Duranta triacantha*.

1.4.3. ÁREA DE DISTRIBUCIÓN

SUR AMÉRICA OCCIDENTAL: **Nativo:** Bolivia - Cochabamba, La Paz, Santa Cruz, Colombia, Venezuela, Ecuador - Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha, Tungurahua, Perú - Ancash, Apurímac, Arequipa, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Junín. (30)

1.4.4. USOS

Se usa como forraje de animales (ganado bovino). Tiene uso combustible. El tallo delgado se utiliza para azar cuyes, construir cercas, y como escoba. (45)

En la región interandina el Espino chivo (*Duranta triacantha*), es ampliamente utilizado para eliminar manchas en la piel, hongos e irritaciones cutáneas. El fruto maduro contiene mucílago, por lo que es utilizado para elaborar cosmético y para tratar quemaduras. La infusión de las hojas, flor y el fruto trata resfríos, fiebre y tos (23). En la antigüedad las Vírgenes del sol la usaban como hidratante de la piel (20). En Pakistán es usada como barrera o como planta ornamental. (21)(45)

1.5. EXTRACTO

Los extractos son concentraciones cuya consistencia varía, así puede ser: líquida (extractos fluidos y tinturas), semisólida (extractos blandos o densos), sólida (extractos secos), los cuales se obtienen mediante drogas vegetales o tejidos animales generalmente en estado seco. (31) (40)

1.6. METABOLITOS

En los vegetales el metabolismo se divide en metabolismo primario y metabolismo secundario. (35)

El Metabolismo primario comprende los procesos metabólicos vitales del vegetal (fotosíntesis, respiración, transporte de solutos), cuyos compuestos implicados, tienen una disposición total en el vegetal, (ej.: aminoácidos, carbohidratos, clorofila). (35)

En el metabolismo secundario ocurre lo contrario pues no son vitales para todos los vegetales, interaccionan con el ambiente que los rodean.

Aparecen en forma restringida en algunos grupos taxonómicos, se los considera artículos de lujo, ya que tienen un gran valor desde un punto económico y social. (35)

En general los metabolitos primarios y secundarios pueden tener actividad biológica determinada: medicinal, tóxica, alimenticia; puede tener aplicación casera o industrial en síntesis, es necesario conocer los vegetales de nuestro país y darles un uso adecuado, una producción sustentable y sostenible; aprovechar y disfrutar de los recursos que la naturaleza nos ofrece. (16) (17)

1.7. DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS METABOLITOS

1.7.1. FLAVONOIDES

Se han estudiado alrededor de diez clases de flavonoides. Se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono en el núcleo esencial, con el sistema C₆-C₃-C₆, donde dos anillos aromáticos A y B se unen por tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que de presentarse se llama anillo C. (12)

Son relativamente polares y en agua tienden a solubilizarse; son detectados por colorimetría, con la intensa coloración verde, púrpura, azul o negro, producida con la adición de una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico. Por la naturaleza aromática de los compuestos, muestran intensa absorción en la región UV del espectro, que sirve en su identificación y análisis cuantitativo. En presencia de álcalis muestra un desplazamiento batocrómico.

Los espectros flavonoides son determinados comúnmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en rangos de 240-285 nm (Banda II) y 300 – 550 (Banda I). Podría indicarse como características de dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavonas. (31)

TABLA N° 1. VALORES DE ABSORCIÓN PARA LAS BI Y BII DE LOS DIFERENTES TIPOS DE FLAVONOIDES

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

FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Actividad Biológica de los Flavonoides

Durante siglos, los preparados con estos compuestos activos han sido utilizados para tratar enfermedades humanas. Presentan múltiples actividades biológicas in vivo e in vitro, como antioxidante, antibacteriano, anti-alérgica, vasodilatador, hepatoprotectora, anticancerígeno, estimulante inmune, anti-inflamatorios, antivirales y los efectos estrogénicos, así como inhibidores de diversas enzimas, tales como fosfolipasa A2, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, xantina oxidasa y glutatión reductasa. (18) (34) (36)

Los glicósidos de quempferol, quercetina y myrcetina, presentan alelopatía. (43)

El extracto de hexano generalmente tiene clorofilas gomas y, cuando están presentes agliconas de flavonoides altamente metoxiladas como quersetina 3,7,3',4'-tetrametiléter y 6 metoxiquercetina 3,7,3',4'-tetrametiléter, y los extractos de cloroformo y acetato de etilo son ricos en flavonoides.

Este proceso favorece la extracción de gran parte de flavonoides, pero no con antocianidinas o flavonoides de baja polaridad. (12)

Los flavonoides tienen afinidad de unión elevada con proteínas, hormonas y ácidos nucleicos, y con iones divalentes de metales, catalizan el transporte de electrones y captan radicales libres. Esto hace de los flavonoides un grupo con potencial terapéutico importante, especialmente por sus capacidades antioxidantes. (25)

1.7.2. QUINONAS

Las quinonas naturales son un grupo de compuestos cuya coloración puede ser desde el amarillo pálido hasta casi negro. Se encuentran frecuentemente en la corteza, en el

corazón de la madera o de la raíz, y en algunos casos en las hojas, donde su color está enmascarado por otros pigmentos. En general están ampliamente distribuidos pero contribuyen en muy poca extensión a la coloración de las plantas superiores, a diferencia por ejemplo de los carotenoides y antocianinas, en cuanto hacen mayor contribución en las bacterias hongos y líquenes. (9) Para confirmar su presencia puede ser útil una simple reacción de color basada en las propiedades redox de las quinonas; así la reducción a un producto incoloro (o menos intensamente coloreado) y la fácil regeneración de su color por oxidación es característica y distintiva de ellas. (35)

Antraquinonas

Las antraquinonas son una clase de metabolitos secundarios vegetales con una funcionalidad p-quinoides en un núcleo antracénico, cuyos carbonos se enumeran tal como se muestra en la Fig. 2. (31)

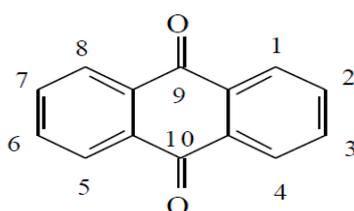


FIGURA N° 2. ENUMERACIÓN DE LOS CARBONOS EN EL NÚCLEO DE LAS ANTRAQUINONAS

Las antraquinonas en general presentan en solución etanólica hasta cuatro bandas de absorción entre 220 y 290 nm (=9000-3000), otra entre 300 y 350 nm (=3000-6000), y otra entre 400 y 500 nm (=2000-9000). (31)

Propiedades Farmacológicas

Las antraquinonas y otros compuestos fenólicos y flavonoides de drogas usadas de plantas del género *Frangula*, tienen acción purgante, antioxidante y antimicrobiana. (28) Se ha reportado la síntesis de antraquinonas como agentes anticancerígenos potenciales. Algunas antraquinonas naturales han mostrado actividad *in vitro* contra células hepáticas dañadas.

Debido a la importancia que tienen las drogas con compuestos antracénicos, existen estudios para su obtención a partir del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, y mediante métodos de síntesis química.

Las 4,5-dihidroxi-antraquinonas son los principios activos de drogas laxantes como el sen, el ruibarbo, la cáscara sagrada y la penca zábila.

La droga Hierba de San Juan, *Hypericum perforatum* usada como antidepresivo, también contiene la diantrona llamada hipericina.

Otra acción biológica es la antimicótica, como los compuestos tipo antrona de *Picramnia*. Además de actividad contra parásitos como el causante de la elefantiasis, contra hongos fitopatógenos. (28)

1.7.3. TANINOS

Los taninos vegetales son considerados compuestos polifenólicos, presentes en diferentes partes de la planta, particularmente en la corteza de numerosos árboles, donde se pueden obtener gran cantidad de estos.

Durante años los taninos eran compuestos con actividad biológica en duda, y sin beneficios farmacológicos de relevancia, ya que parte importante de su estructura aún era desconocida para la ciencia. La definición de la misma hizo posible el estudio y prescripción de nuevas propiedades para estos compuestos, así como la posibilidad de su uso en humanos. (24)

Indiscutiblemente, la actividad antiviral contra el virus herpes simple tipo 1 y 2 (HSV-1, HSV-2), y más recientemente sobre el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) constituyen uno de los más importantes reportes acerca de la actividad biológica de estos compuestos, asociada esta con la estructura química. (42) Además se reportan estudios en los cuales el extracto etanólico con estos compuestos, contiene actividad gastroprotectora. (19)

Cuantificación de Taninos Pirocatécolicos por Permanganometría, Permanganato de Potasio como Valorante

El análisis de valoración volumétrica es la determinación del volumen exacto de una norma, para reaccionar cuantitativamente con una solución cuya concentración de

solución se determina (49). Esta es una técnica ampliamente utilizada para la determinación cuantitativa de diversas sustancias, incluso siendo actualmente una técnica clásica de determinación. La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) es una organización internacional con más de 120 años de experiencia en la validación y aprobación de métodos de análisis de los alimentos, describen un total de 2813 los métodos de análisis, de los cuales 442 pacientes, el 16% son métodos volumétricos, mostrando su importancia y aplicabilidad. (29)

La permanganometría se basa en reacciones de Óxido-Reducción, en las que KMnO_4 interviene como agente oxidante para la determinación volumétrica del agente reductor. Este tipo de reacción fue propuesta primero por F. Marguerite en la determinación de Fe(II) en soluciones ácidas.(26)

Normalización de Permanganato de Potasio

Dado que el permanganato no es un patrón primario, se recomienda la normalización de sus soluciones con oxalato de sodio en un medio ácido. Esto significa la sal del ácido débil se protona para formar el ácido oxálico La normalización se realiza añadiendo el patrón de KMnO_4 al 90 a 95% del volumen requerido para el punto de equivalencia calculado previamente a una temperatura de alrededor de 60°C , como punto final de la titulación la coloración rosa pálido, debido al pequeño exceso de KMnO_4 (28)

1.8. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

El análisis fitoquímico determina los metabolitos secundarios presentes en la especie a estudiar (ej. plantas medicinales), (31) aplicando una serie de técnicas de extracción, de separación y purificación y de determinación estructural (UV, IR, RMN, EM). (33)

Un análisis fitoquímico comprende en general, las siguientes etapas:

- Recolección y clasificación botánica de la especie en estudio(11)
- Extracción, separación y purificación de constituyentes químicos
- Determinación estructural , y
- Ensayos farmacológicos (16) (17)

1.9. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Son pruebas de orientación preliminares simples y rápidas que ayudan a la detección cualitativa de grupos de compuestos determinados, formando precipitados, coloraciones, etc., propias para las clases o grupos de compuestos, en mínima cantidad posible, utilizando un mínimo de equipo de laboratorio. (33)

Los resultados del tamizaje deben ser interpretados junto a los resultados de las pruebas, ya que la actividad biológica es atribuida en ocasiones por el fitocomplejo y en otras por un cierto compuesto al que se lo llama marcador. (33). Incluye los ensayos de: (44)

1.9.1. ENSAYO DE SUDAN

A una alícuota del extracto, se añadió 1mL de solución del colorante Sudan III o Sudan IV diluido con anterioridad en agua. Se calentó en baño de agua hasta que el solvente se evaporó. Si se divisa una película o gotas al interior del líquido de color rojo en las paredes del tubo de ensayo, se considera positiva para compuestos grasos.

1.9.2. ENSAYO DE WAGNER

Se parte de una solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo de Wagner, y los resultados obtenidos se reportan igual que en la reacción anterior.

1.9.3. ENSAYO DE BALJED

A una alícuota del extracto, se evaporó el solvente en baño de agua y se lo disolvió en alcohol (1mL). Se adicionó 1mL de Reactivo de Baljed, donde el ensayo es positivo si aparece coloración (++) o precipitado rojo (+++) para la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico en un extracto, exclusivamente cumarinas, además de otros compuestos lactónicos.

1.9.4. ENSAYO DE BORNTRÄGER

A una alícuota del extracto se evaporó el solvente en baño de agua y se lo disolvió en 1mL de cloroformo. Se agregó 0.5mL de hidróxido de potasio o de sodio o amonio al

5%. Se agitó y se dejó reposar hasta su separación. Se considera un ensayo positivo para quinonas cuando la fase acuosa alcalina (superior) se tiñe rosada (++) o roja (+++).

1.9.5. ENSAYO DE ESPUMA

Reconoce saponinas esteroidales y triterpénicas. A una alícuota alcohólica del extracto, se diluyó en agua en proporción 1:2, se agitó con fuerza por 5-10 min. Se considera positivo si existe espuma persistente por más de 2 min. en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura.

1.9.6. ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO

Revela la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos sí el extracto es alcohólico. A una alícuota del extracto alcohólico se agregó 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua).

En extractos acuosos se determina fundamentalmente taninos. Se neutraliza una alícuota añadiendo acetato de sodio y tres gotas de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo se considera:

- Color rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Color verde intensa, taninos pirocatecólicos.
- Color azul, taninos pirogalotánicos.

1.9.7. ENSAYO DE SHIDONA

Si la alícuota es acuosa o alcohólica, se adicionó 1mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Luego de 5 min., se agregó 1mL de alcohol amílico, se mezcló y se dejó reposar hasta su separación.

El resultado es positivo para flavonoides, sí el alcohol amílico se torna intensamente amarillo, naranja, carmelita o rojo.

1.9.8. ENSAYO DE ROSENTER

Evidencia a terpenos. A una alícuota etanólica del extracto, se añadió unas gotas de reactivo de Rosenthaler (sol. 1% de vainillina en EtOH y 5mL de H₂SO₄ conc.) se calentó y en presencia de color en escala de rosada a violeta o pardas se da como positivo.

1.10. CROMATOGRAFÍA

TABLA N° 2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

I.	De extracción	En soxhlets. Maceración. Percolación. Arrastre de vapor. Fluido supercrítico.
II.	De separación y purificación	
	Cromatografía en papel CP	Ascendente CPA Descendente CPD Circular CPC Preparativa CPP
	Cromatografía de capa delgada, CCD	Analítica CCD Preparativa CCDP Bidimensional CCDB
	Cromatografía líquida (de columna; CC)	Adsorción Partición Exclusión Flash Al vacío Intercambio iónico Alta performance, HPLC
	Cromatografía en contra corriente, CCC	A la gota (DCCC) Alta velocidad (HSCCC)
	Cromatografía gas-líquida, CGL	
	Electroforesis	
III.	De determinación estructural	
	Espectrométricas	Ultravioleta-visible, UV-Vis Infrarrojo, IR Resonancia magnética nuclear De protón y de carbono 13, ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN De masa, EM
	Rayos X	
	Reacciones de coloración y de precipitación	
	Propiedades físicas	

FUENTE: LOCK O., MANUAL DE FITOTERAPIA, FONDO EDITORIAL PUCP, 1994 (29)(40)

Cromatografía es la separación de compuestos de una mezcla por partición entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. Por la índole de las fases la

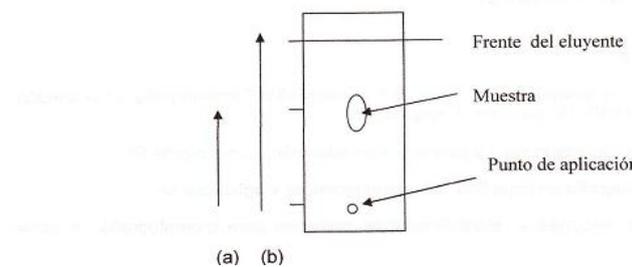
cromatografía puede ser: sólido-líquido (capa fina, papel o columna), líquido-líquido y gases-líquido (fase vapor). (31)

Los sólidos pulverizados finamente absorben en mayor o menor grado otras sustancias en su superficie; y, equivalentemente, todas las sustancias pueden ser adsorbidas, en mayor o menor grado. Esta adsorción selectiva es la base de la cromatografía, (15)

1.10.1. CONCEPTO DE Rf

A Rf se la define como:

$$R_f = \frac{(a) \text{ distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{(b) \text{ distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.}}$$



FUENTE: www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografiaThin.htm#historia

FIGURA N° 3. DEFINICIÓN DE Rf

Las condiciones en las que se corre la muestra, como las condiciones de la placa, el adsorbente, eluyente, temperatura, vapor de saturación, etc. Serán quienes den el valor del Rf.

La reproducibilidad es de $\pm 20\%$, así se recomienda duplicar el corrido de la misma placa. (15)

1.10.2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

En este tipo de cromatografía se utilizan placas que pueden ser de vidrio, aluminio o poliéster, recubiertas de fase estacionaria con espesor constante. El eluyente asciende por la placa por capilaridad, produciendo "manchas" que son los componentes arrastrados.

El grado de elución depende de la polaridad de las sustancias y eluyente empleado. Las placas utilizadas convencionalmente miden: 20x20, 10x20 y 5x2 cm

Existen adsorbentes que incluyen indicador de fluorescencia, esto ayuda a la identificación con mayor facilidad de las muestras. Si los componentes son incoloros y no se usa indicador, se revelan con distintas técnicas. (15)

Reveladores más comunes

Las manchas coloreadas son visibles en forma inmediata; las incoloras se pueden revelar con:

- Luz Ultravioleta: si la sustancia absorbe luz UV, es posible usar la fase estacionaria con un indicador de fluorescencia (F_{254} ó F_{366}).
- Vapores de Yodo: La placa es introducida en vapores de yodo.
- Solución de agua/ H_2SO_4 1:1 Se rocía dentro de una campana de extracción de gases, se calienta, hasta carbonizar los compuestos.

Adsorbentes más Comunes

- Gel de sílice
- Alúmina u Óxido de Aluminio (ácida, neutra o básica)
- Poliamidas
- Celulosa (Nativa o micro-cristalina)

Al elegir el adsorbente se debe tomar en cuenta: la Pureza, Polaridad, Diámetro, Tamaño de partícula, Homogeneidad, y Área Superficial. (15)

Factores que influyen en la separación

- Temperatura: las sustancias a temperatura baja se fijan más en la fase estacionaria.
- Corrientes de aire.
- Placas contaminadas: contienen grasa o agentes plastificantes o adhesivos. Se limpian al correrla en una mezcla de cloroformo y metanol y después se seca por completo antes de aplicar la muestra.
- Grado de Pureza del disolvente.

1.10.3. CROMATOGRAFÍA EN PLACA PREPARATIVA

La cromatografía preparativa es útil en la separación y aislamiento de componentes de una mezcla en cantidades entre 100-200 mg. Se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio. (15)

En la superficie del adsorbente, a través de una pipeta Pasteur, se traza una línea continua con la muestra disuelta y con la placa en posición vertical se introduce en una cuba cromatográfica tapada, que evita la evaporación del disolvente, y ayuda a un ambiente uniforme. Separados los productos, se marca con una cuchilla el contorno del compuesto a aislar y con una espátula se desprende del soporte de vidrio el gel de sílice con el compuesto adsorbido. Se introduce en un Erlenmeyer con un disolvente soluble, se filtra el gel de sílice, se elimina el disolvente y se tiene el producto puro. (15)

1.10.4. CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

En este tipo de cromatografía la separación de las moléculas de una mezcla se lo hace por afinidad a la fase estacionaria o a la fase móvil. Si la afinidad de una molécula A por la fase estacionaria es mayor que B, B bajará más rápido que A. Existen otras como:

- **Filtración en gel.** Las moléculas son separadas por su tamaño. (15)
- **Intercambio iónico:** Es utilizada en purificación de proteínas. Para la separación se toma en cuenta la carga iónica de las moléculas. (15)
- **Fase inversa:** La matriz de fibras de silicato con cadenas de hidrocarburos atrae las moléculas hidrofóbicas de la muestra, y aquellas hidrofílicas salen con el amortiguador.

Análisis de los eluatos de la columna

Cuando los eluatos son coloreados, la monitorización es visual. En compuestos incoloros, el eluato se recoge en tubos rotulados en fracciones pequeñas y en secuencia, la composición de cada fracción es analizada por cromatografía en capa fina. Se reúnen las fracciones con el mismo producto, el disolvente es eliminado y los componentes se analizan por espectroscopia. (15)

1.11. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

1.11.1. ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrometría nace con el estudio de la radiación y la materia como función de la longitud de onda (λ).

Estima la concentración o cantidad de especies en una muestra, a través de un espectrómetro o espectrógrafo. Se pueden identificar sustancias mediante el espectro emitido o absorbido por las mismas a ciertas longitudes de ondas. (26)(27)

1.11.2. ESPECTROSCOPIA ULTRA VIOLETA.

1.11.2.1. Fundamentos Básicos

Su base consiste en la capacidad de absorción de radiación ultravioleta-visible de una molécula, causando la excitación de un electrón por su paso de un estado basal al estado excitado. La excitación corresponde a los electrones de enlace, por lo que esta espectroscopia es útil para identificar grupos funcionales en una molécula. El rango de la longitud de onda oscila entre 160 a 780 nm. (22)

Al absorber radiación UV-visible, la molécula lo hace en 2 etapas:

- Excitación electrónica
- Relajación: que puede ser por:
 - Emisión de calor
 - Reacción fotoquímica
 - Emisión de fluorescencia / fosforescencia

1.11.2.2. Aplicaciones

La espectrometría UV/Vis se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos llamados dienos conjugados. (38)

Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles. No todos los disolventes orgánicos son apropiados para este fin ya que pueden tener una significativa absorción de UV. La absorción del espectro de un compuesto orgánico puede ser afectada por la polaridad y el pH del disolvente. El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. (38) (14)

Aunque los complejos de transferencia de carga también dan lugar a colores, éstos son a menudo demasiado intensos para ser usados en mediciones cuantitativas. (33)

Existe una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración de la solución, por lo que la espectrometría UV_{VIS} puede aplicarse para definir la concentración de una solución. Esto se manifiesta en La ley de Beer-Lambert. (38)

1.12. LEY DE BEER

Enuncia una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración, hallándose a menudo desviaciones que se relacionan con el fundamento de la ley y representan limitaciones propias de la misma. Otras veces surgen debido a la forma en que se realizan cambios químicos asociados con cambios de concentración; conocidas como desviaciones instrumentales y desviaciones químicas, respectivamente. (22)

1.12.1. LIMITACIONES PROPIAS DE LA LEY DE BEER

La ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas; en este sentido es una ley límite. A concentraciones altas (generalmente $>0.01M$), la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas y la capacidad para absorber la radiación de una determinada longitud de onda de las moléculas. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración. Algo similar se encuentra, a veces, en medios que contienen concentraciones de absorbente bajas pero concentraciones de otras especies altas, en particular electrólitos. La estrecha

proximidad de los iones al absorbente altera la absorptividad molar de éste por interacciones electrostáticas; el efecto se reduce mediante dilución.

En ciertos iones o moléculas orgánicas grandes aparecen algunas excepciones al efecto de las interacciones moleculares no significativo para concentraciones inferiores a 0.01M. Por ejemplo, se ha comprobado que la absorptividad molar del catión del azul de metileno en disoluciones acuosas, incluso por debajo de 10^{-6} M no se observa cumplimiento estricto de la ley de Beer. (22)

1.12.2. DESVIACIONES QUÍMICAS

Al disociarse un analito, se asocia o reacciona con un disolvente dando un producto con un espectro de absorción diferente al del analito, produciendo desviaciones de la ley de Beer. Las disoluciones acuosas de los indicadores ácido-base son un ejemplo característico de este comportamiento, el cambio de color asociado se produce como consecuencia de los cambios en el equilibrio.

1.12.3. DESVIACIONES INSTRUMENTALES ORIGINADAS POR LA RADIACIÓN POLICROMÁTICA

Sólo si la radiación es monocromática se observa el cumplimiento estricto de la ley de Beer. Desafortunadamente, el uso de esta en la práctica no es frecuente ya que los dispositivos que aíslan porciones de la señal de salida de una fuente continua generan una banda de longitudes de onda más o menos simétrica en torno a la deseada.

1.12.4. DESVIACIONES INSTRUMENTALES ORIGINADAS POR LA RADIACIÓN PARÁSITA

El monocromador emerge radiación que suele estar contaminada con pequeñas cantidades de radiación dispersada o parásita, la cual alcanza la rendija de salida como resultado de dispersiones y reflexiones en varias superficies internas. La radiación parásita, difiere sustancialmente en su longitud de onda de la radiación principal, y además, puede no haber atravesado la muestra. En presencia de radiación parásita, la absorbancia observada viene dada por:

$$A' = \log[(P_o + P_s)/(P + P_s)]$$

Donde P_s es la potencia de radiación parásita no absorbida.

Cuando las concentraciones y caminos ópticos son elevados, la radiación parásita puede causar desviaciones significativas en la relación lineal entre la absorbancia y el camino óptico. (26) (27)

1.12.5. APLICACIONES

En el Análisis Cualitativo, el disolvente empleado influye en las posiciones de los máximos, los polares desplazan a mayor longitud de onda. Al medir la absorción se descubren ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos.

En el Análisis cuantitativo podemos medir la concentración de la sustancia que absorbe al medir la cantidad de radiación absorbida, independiente de la radiación incidente.

1.12.6. CARACTERÍSTICAS

- Se cuantifican especies inorgánicas y orgánicas que absorben UVvis y; otras que no absorben por sí mismas pueden hacerlo al ser tratadas químicamente
- Alta sensibilidad: hasta 10^{-7} M según se modifique una técnica.
- Selectividad: se analiza cada especie por separado.
- Facilidad y comodidad.(22)

1.12.7. MÉTODOS DE MEDIDA

- Espectrofotométrico ordinario.
- Espectrofotométrico de escala expandida o de análisis de trazas.
- Determinaciones simultáneas.
- Adición estándar.
- Espectroscopia de derivadas.
- Valoraciones espectrofotométricas.

1.12.8. 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. (22)

1.13. 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. (31)

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 existentes en la molécula. La absorción UV-Visible, sin embargo, no es una prueba específica para ningún compuesto determinado, ya que muchos factores presentes en esta técnica pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos.

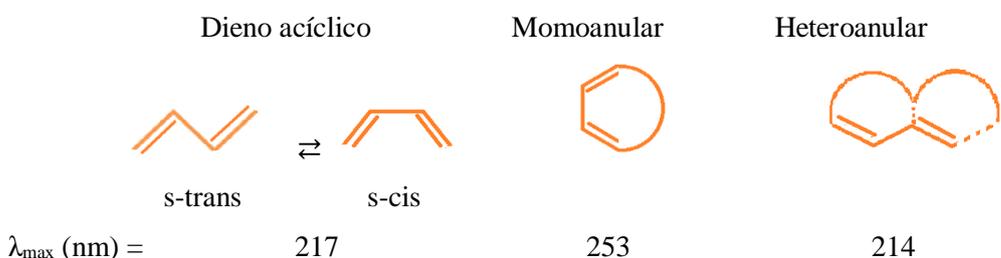


FIGURA N° 4. SISTEMA BÁSICO DE WOODWARD-FIESER (44)(16)

Incrementos:

Por cada doble enlace conjugado adicional +30

Por cada doble enlace exocíclico +5

Por cada sustituyente:

C-sustituyente +5

-Cl, -Br +5

-OR +6

-OC(O)CH₃ 0

-NR₂ +60

-SR +30

Corrección del disolvente ≈0

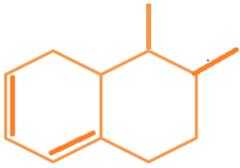
	Valor base:253 3 C-sust. (3x5).....15 1 C=C exo.....5 λ_{\max} = 273nm Valor teórico
--	---

FIGURA N° 5. EJEMPLO DE APLICACIÓN DE WOODWARD-FIESER (44)(16)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

Esta investigación se desarrolló en:

- Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. RECURSOS MATERIALES

2.2.1. EQUIPOS

- Aspersor
- Balanza analítica (BOECO Germany)
- Bomba de vacío
- Cámara digital
- Cámara UV
- Centrífuga (Dynac CA)
- Computadora
- Desecador
- Espectrofotómetro UV 1603 (Shimadzu)
- Estufa de circulación de aire (MEMMERT)
- pH-metro
- Refrigeradora (MABE)
- Refractómetro
- Reverbero eléctrico (HACEB)

- Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP)
- Sorbona

2.2.2. MATERIALES

- Algodón
- Balones de aforo
- Balones esmerilados
- Cámaras cromatográficas
- Capilares
- Columna cromatográfica
- Embudo de separación
- Embudo normal
- Erlenmeyers
- Frascos ámbar
- Frascos de vidrio boca ancha
- Gradilla
- Mangueras
- Mascarilla
- Papel aluminio
- Pera de succión
- Picnómetro
- Pipeta Pasteur y de 1 mL 5 mL 10mL
- Pinzas universales
- Piseta
- Placas de sílica gel
- Probeta 25mL
- Refrigerante
- Tijera
- Trípode
- Tubos de ensayo
- Varilla de agitación
- Vasos de precipitación

2.2.3. REACTIVOS

- Acetato de etilo
- Acetona
- Ácido acético
- Ácido clorhídrico
- Ácido fórmico
- Ácido sulfúrico 0.1 N
- Ácido sulfúrico - Vainillina
- Agua destilada
- Alcohol etílico
- Alcohol metílico
- Amoniac
- Butanol
- Cloroformo
- Cloruro férrico
- Éter Hexano
- Hidróxido de sodio
- Índigo de carmín
- Limaduras de magnesio
- Permanganato de potasio 0.01 N
- Reactivo de Baljeth
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Shinoda
- Reactivo de Sudan III
- Sulfato de Cerio
- Tolueno
- Vainillina
- Yodo

2.3. FACTORES DE ESTUDIO

- Identificación taxonómica de Espino chivo.

- Preparación de los extractos etanólicos y subextractos clorofórmico, butanólico, subsubextracto hexánico de Espino chivo y tamizaje fitoquímico.
- Separación y purificación de los metabolitos secundarios presentes en los subextractos y subsubextractos, mediante cromatografía de capa fina y cromatografía en columna.
- Análisis espectrofotométrico de las fracciones purificadas.

2.4. RECOLECCIÓN DEL VEGETAL

El vegetal fue recolectado selectivamente, es decir, solo la parte aérea de Espino Chivo y aquellos que estaban frescos y completos, el 29 de Septiembre del año 2012, en la colina de Lluishi del cantón Guano ubicada a 8Km de la ciudad de Riobamba;

2.5. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA.

Se tomó la muestra de Espino chivo, la misma que incluyó tallos con ramas, hojas, flores, frutos y semillas y fue llevada al Herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien certificaría que se trataba de un ejemplar de *Duranta triacantha*.

2.6. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

Para la preparación del extracto etanólico de Espino chivo (*Duranta triacantha*), se utilizó el vegetal fresco y completo excepto la raíz, (40) mediante el siguiente procedimiento:

Una vez recolectado el material vegetal se procedió a su limpieza:

- Se realizó una separación manual de hojas secas y otras macroimpurezas.
- Se lavó para eliminar polvo y cualquier otro residuo del proceso anterior.
- Se colocó sobre papel, para escurrir y favorecer el secado completo.
- Se trozó muy finamente todas las partes del vegetal con una tijera de podar.

Se agregó etanol al 96%, empleando 3mL por cada gramo del vegetal limpio seco y triturado (455g), en un frasco de vidrio con tapa, se agitó y se dejó en maceración por 72 horas. (29)

Después de transcurrido este tiempo, se filtró; el líquido obtenido se trasvasó a un balón esmerilado para concentrarlo en el rotavapor a una temperatura no mayor a 50°C y a 200rpm, hasta la completa eliminación del etanol.

La porción restante del balón (extracto concentrado) se recogió, determinó su volumen y peso, se dejó en refrigeración por 24 horas para precipitación de clorofilas.

Posterior a las 24 horas, se filtró, recogiendo así el extracto libre de clorofilas (Extracto Etanólico A) en un recipiente ámbar limpio y seco cerrando herméticamente y se almacenó en refrigeración.

2.7. CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DEL EXTRACTO

2.7.1. REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS

Los parámetros organolépticos comprenden: la Determinación del color, aspecto y olor, de acuerdo con la legislación vigente para fabricación, uso y comercialización de plantas medicinales y fitomedicamentos. (41) (29) (39)

2.7.2. REQUISITOS FÍSICOS

Se determina la densidad relativa (método del picnómetro con la Normativa Ecuatoriana), índice de refracción (Método de Refractómetro descrito por Ernst Abbe 1879), el pH (Método Potenciométrico de EGAN, 1995). (39)

2.8. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO (A)

CUADRO N°1. ENSAYOS Y METABOLITOS IDENTIFICADOS (31)

ENSAYO	METABOLITO
Dragendorff	Alcaloides
Mayer	Alcaloides
Wagner	Alcaloides
Baljet	Lactonas
Bornträger	Quinonas
Lieberman-Buchard	Triterpenos y/o esteroides
Catequinas	Catequinas
Resinas	Resinas
Fehling	Azúcares Reductores
Espuma	Saponinas
Cloruro Férrico	Compuestos Fenólicos / Taninos
Shinoda	Flavonoides
Principios Amargos	Aceites Esenciales
Sudan III	Grasas

FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

2.9. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO (A) DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacantha*).

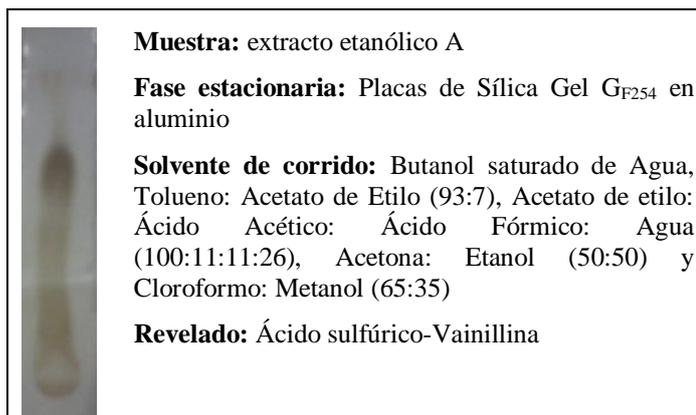
Se realizó una cromatografía en capa fina del extracto para verificar la presencia de los metabolitos secundarios determinados en el tamizaje fitoquímico.

Esto nos permite utilizar solventes específicos que busca la presencia de manchas en las que se determina los parámetros de eficiencia, eficacia y resolución, para seleccionar el método cromatográfico de separación y purificación para el extracto y subextractos.

2.9.1. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANÓLICO (A).

Para evaluar el contenido de metabolitos secundarios determinados en el tamizaje fitoquímico, se realizó cromatografías del extracto alcohólico de *Duranta triacantha* (A) en:

1. Butanol saturado de Agua, 2. Tolueno: Acetato de Etilo (93:7), 3. Acetato de etilo: Ácido Acético: Ácido Fórmico: Agua (100:11:11:26), 4. Acetona: Etanol (50:50) y 5. Cloroformo: Metanol (65:35); pero en ninguno de los casos el extracto etanólico presentó resolución en las manchas al ser reveladas con Ácido sulfúrico-Vainillina (CCF1), razón por la cual se fraccionó en subextractos.



FOTOGRAFÍA N°3. CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANÓLICO (A). CCF1.

2.9.2. FRAGMENTACIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Con la finalidad de separar y purificar los metabolitos secundarios del Espino chivo (*Duranta triacantha*), se procedió a la preparación de los subextractos y subsubextractos, con otros solventes en orden de polaridad inmiscibles con el etanol, fragmentando el fitocomplejo (Fig.6):

2.9.2.1. Procedimiento

A 50mL del extracto etanólico (A) en un embudo de separación se le agregó 10mL de cloroformo, se agitó en forma circular, se dejó reposar hasta su separación, la fase superior corresponde al etanol y se dejó en el embudo, la fase inferior corresponde al cloroformo, esta se lo recogió en un Erlenmeyer o balón previamente pesado. La extracción se lo repitió hasta tener la fase del cloroformo clara, las fases clorofórmicas se las unió y evaporó en un rotavapor previamente pesado, lo que dio lugar al subextracto Clorofórmico (B).

Al restante del embudo de separación se le añadió 50mL de butanol, se agitó en forma circular, después se dejó separar en fases: la fase superior fue correspondiente al etanol, mientras que la inferior al subextracto butanólico (C), después de varias extracciones, y de haber recogido las fases butanólicas en un balón o erlenmeyer previamente pesado se lo evaporó en el rotavapor.

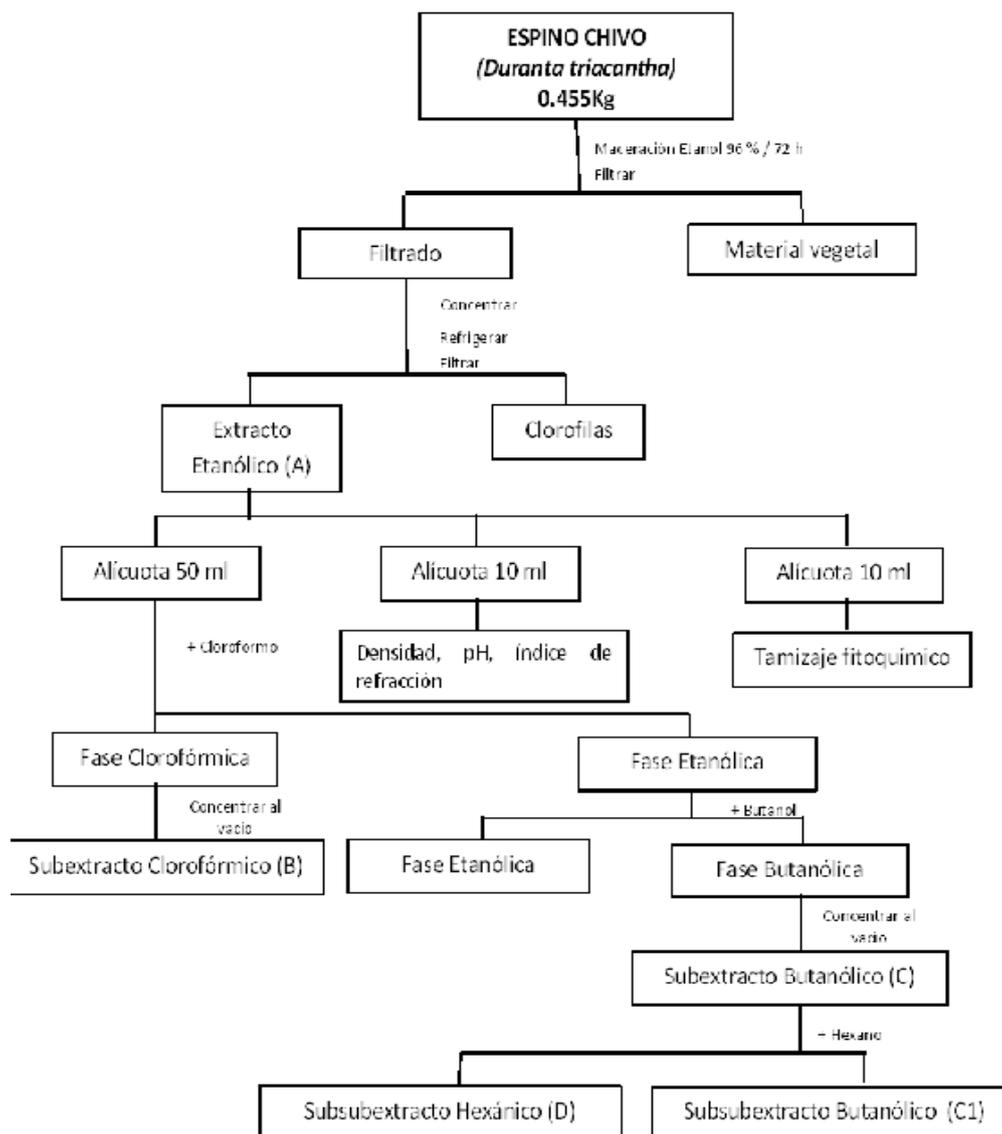


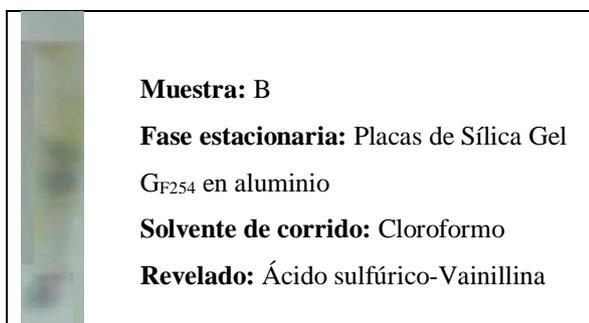
FIGURA N° 6. DIAGRAMA DE EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE ESPINO CHIVO

Al subextracto butanólico se le añadió 10mL de hexano, se agitó en círculos y luego se dejó reposar para que exista separación de fases, la fase líquida correspondiente al hexano mientras que la turbia al butanol, la fase hexánica o subsubextracto hexánico (D) se la recogió en un balón ó Erlenmeyer para su concentración.

2.9.3. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B).

Al correr el subextracto en Cloroformo y ser revelado con Ácido sulfúrico-Vainillina se tuvo manchas definidas en el frente de la placa cromatográfica (CCF2) y residuos en la

base, por lo que se corrió por segunda vez en 2-propanol-ácido acético (9.5:0.5), se observó una separación pero no lo suficiente para obtener compuestos puros, razón por lo cual se preparó una columna cromatográfica con los solventes en polaridad creciente.



FOTOGRAFÍA N°4. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA 2 DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B) CCF2

2.9.3.1. Columna Cromatográfica de Subextracto Clorofórmico (B).

La columna cromatográfica (CC1) se llenó con 20g de sílica por cada gramo de muestra, se homogenizó con Cloroformo, y adicionó el subextracto disuelto en el mismo solvente, por la parte superior, se abrió la llave para que la muestra penetre en la sílica de la columna, permitiendo la separación en franjas, al no existir más separación se cambió el solvente de corrido, hasta terminar con el de mayor polaridad de acuerdo con el Cuadro N°2.

CUADRO N°2. FRACCIONES SEPARADAS EN COLUMNA CC1 DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B)

SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Cloroformo	100	1-20
Cloroformo : 2-.Propanol	90:10	21-27
Cloroformo : 2-.Propanol	50:50	28-30
2-.Propanol	100	31-32
2-.Propanol-Ácido Acético	95:5	33

Las fracciones fueron muestreadas por aspecto, color y cantidad de solvente eluído, se determinó la presencia de compuestos, por cromatografía en capa fina CCF3, y se unieron aquellos con Rfs, color y forma de manchas similares, y posterior se los purificó en placa preparativa:

	<p>Muestra: B:4,9,11,14,15,17,19,25,30,32</p> <p>Fase estacionaria: Placas de Sílica Gel G F₂₅₄ en aluminio</p> <p>Solvente de corrido: Cloroformo</p> <p>Revelado: Ácido sulfúrico-Vainillina.</p>
<p>Unión de las muestras:</p> <p>De la 1 a la 4 = 4</p> <p>De la 9 a la 15 = 14</p> <p>De la 17 a la 20 = 17</p> <p>De la 21 a la 25 = 21</p> <p>De la 30 a 32 = 32</p>	<p>Rfs:</p> <p>0.98</p> <p>0.79 y 0.96</p> <p>0.26 y 0.75</p> <p>0.26 y 0.79</p> <p>no hay manchas</p>

FOTOGRAFÍA N°5. CCF3 DE FRACCIONES DE COLUMNA CC1 DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO.

A cada una de las fracciones muestreadas se realizó cromatografía en capa fina con variación de los solventes de corrido con el fin de mejorar la resolución; así, se obtuvo lo siguiente:

- De la unión de fracciones de 1 a 4 se corrió en Acetato de Etilo: Metanol (3:03), y reveló con Ácido sulfúrico – Vainillina (CCF4), la placa presentó dos manchas definidas, una con coloración amarilla y otra de color marrón con Rfs de 0.34 y 0.95 respectivamente, estas condiciones fueron adecuadas para separarlas en placa preparativa (PP1).

	<p>Muestra: B:de 1 a 4</p> <p>Fase estacionaria: Placas de Sílica Gel G F₂₅₄ en aluminio</p> <p>Solvente de corrido: Acetato de Etilo : Metanol (3:03)</p> <p>Revelado: Ácido sulfúrico-Vainillina</p> <p>Rfs.: 0.95, 0.34</p>
---	--

Fotografía N°6. CCF4 de la fracción de 1 a 4 de CC del subextracto clorofórmico (B).

En la placa preparativa las franjas definidas, se recuperaron de la placa de sílica gel con etanol, se eliminó el solvente y determinó el espectro UV: franja 1 Rf:0.34 con λ_{\max} 451.0nm, 549.0nm, 581.0nm, para cuyos valores no se encontró referencias bibliográficas por lo que no se puede dar su posible estructura; franja 2 Rf: 0.95 con λ_{\max} 282.0nm, 296.0nm, 315.0nm los cuales son valores cercanos a antraquinonas.

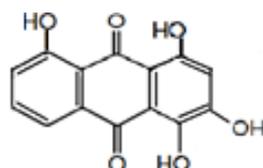


FIGURA N°7. POSIBLE ANTRAQUINONA

- De la unión de las muestras 9 a la 15 se cromatografió (CCF5) con Tolueno-Acetato de Etilo (9.3 : 7) y se reveló con Ácido sulfúrico-Vainillina lo que dio manchas con poco espacio de separación, por lo que se realizó una columna cromatográfica (CC2), como se detalla en el Cuadro N°3:

	<p>Muestra: B:de 9-15</p> <p>Fase estacionaria: Placas de Sílica Gel G_{F254} en aluminio</p> <p>Solvente de corrido: Tolueno-Acetato de Etilo (9.3:7)</p> <p>Revelado: Ácido sulfúrico-Vainillina</p>
--	--

FOTOGRAFÍA N°7. CCF5 DE LA FRACCIÓN DE 9 A 15 DE CC1 DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B).

CUADRO N°3. FRACCIONES SEPARADAS DE MUESTRA 9-15 EN COLUMNA CROMATOGRÁFICA (CC2)

SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Tolueno – Acetato de Etilo	9.3:7	1-13
Tolueno – Acetato de Etilo	9:1	14-17
Tolueno – Acetato de Etilo	4:1	18-30
Tolueno – Acetato de Etilo	5:5	31-37
Acetato de Etilo	100	38-41
Acetato de Etilo – Metanol	90:10	42-43

En las fracciones recolectadas se determinó la presencia de compuestos por cromatografía en capa fina (CCF6), realizando las siguientes uniones debido a que tenían Rfs similares:

	Muestra: B: 9-15= 14 Fracciones: 1, 4, 7, 12, 17, 22, 25, 28, 31, 34, 37,40,42,43 Fase estacionaria: Placas de Sílica Gel G _{F254} en aluminio Solvente de corrido: Tolueno-Acetato de Etilo (93:7) Revelado: Ácido sulfúrico-Vainillina											
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Unión de las muestras B14</th> <th>Rfs:</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>De la 1 a la 6 = 4</td> <td>0.8, 0.9</td> </tr> <tr> <td>De la 7 a la 10 = 7</td> <td>0.73, 0.35</td> </tr> <tr> <td>De la 12 a la 17 = 17</td> <td>0.8, 0.42</td> </tr> <tr> <td>De la 21 a la 29 = 25</td> <td>0.8, 0.42</td> </tr> <tr> <td>De la 31 a la 43 = 36</td> <td>0.8</td> </tr> </tbody> </table>	Unión de las muestras B14	Rfs:	De la 1 a la 6 = 4	0.8, 0.9	De la 7 a la 10 = 7	0.73, 0.35	De la 12 a la 17 = 17	0.8, 0.42	De la 21 a la 29 = 25	0.8, 0.42	De la 31 a la 43 = 36
Unión de las muestras B14	Rfs:											
De la 1 a la 6 = 4	0.8, 0.9											
De la 7 a la 10 = 7	0.73, 0.35											
De la 12 a la 17 = 17	0.8, 0.42											
De la 21 a la 29 = 25	0.8, 0.42											
De la 31 a la 43 = 36	0.8											

FOTOGRAFÍA N°8. CCF6 DE LAS FRACCIONES DE COLUMNA CC2 DE LA MUESTRA 9-15

Con cromatografía de capa fina (CCF6) en Tolueno–Acetato de Etilo (93:7) y revelado con Ácido Sulfúrico-Vainillina, de las muestras se observó que tenían un compuesto común de color marrón al UV visible y con fluorescencia violeta al UV365 con Rf de 0.42, por lo que se hizo una placa preparativa (PP2) de la unión de 14.4, 14.17, 14.25 y 14.36 para separar y determinar su espectro, los resultados fueron λ_{\max} 222.0nm, 276.0nm; de cuyos valores de acuerdo con las referencias corresponden a flavonoides, del tipo flavona como se ve a continuación (Fig. 8):

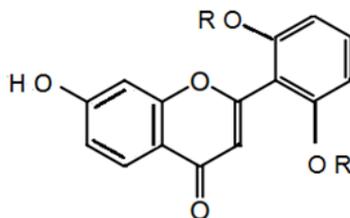


FIGURA N° 8. POSIBLE ESTRUCTURA DEL FLAVONOIDE A APLICANDO LAS REGLAS DE WORDWARD FIESER

A la muestra 14.7 se le corrió en cromatografía de columna (CC3) obteniendo lo que se detalla: en el Cuadro N°4:

CUADRO N° 4. FRACCIONES OBTENIDAS EN COLUMNA CC3 DE LA FRACCION 7 DE LA MUESTRA 14

SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Tolueno – Acetato de Etilo	9.3:7	14.7.1-14.7.10
Tolueno – Acetato de Etilo	9:1	14.7.11-14.7.14

Con la cromatografía de capa fina (CCF7) de las fracciones se obtuvo:

	<p>Muestra: B14: 1,4,7,11,13</p> <p>Fase estacionaria: Placas de Sílica Gel G_{F254} en aluminio</p> <p>Solvente de corrido: Tolueno</p> <p>Revelado: Ácido sulfúrico-Vainillina</p>
<p>Unión de las muestras: De la 1 a la 13=14.7.1</p>	<p>Rf: 0.78</p>

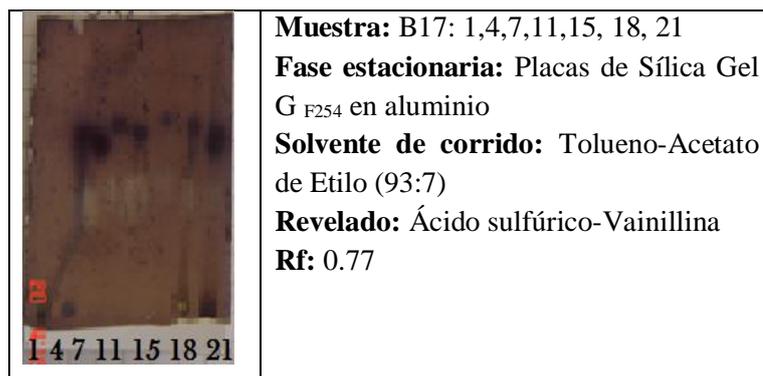
FOTOGRAFÍA N°9. CCF7 DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN CC3

La franja con un Rf: 0.78 de color azul intenso fue aislada en placa preparativa (PP3) en forma pura, se lo analizó en espectrofotómetro de UV, así se obtuvo λ_{\max} 429.0nm, 519.0nm, 591.0nm valores de los cuales no se hallaron referencias por lo que no se pudo dar una posible estructura.

- A las fracciones de la 17 a la 20 se sometió a una columna cromatográfica (CC4) de polaridad creciente (Cuadro N°5) , se cromatografió las fracciones muestreadas (CCF8) en Tolueno-Acetato de Etilo (93:7) y con revelador Ácido Sulfúrico y Vainillina (Fot.10), unió y separó en forma pura los posibles metabolitos con un Rf de 0.77 con coloración azul intenso (PP4) y se determinó se espectro UV con : λ_{\max} 429.0nm, 519.0nm, 591.0nm.

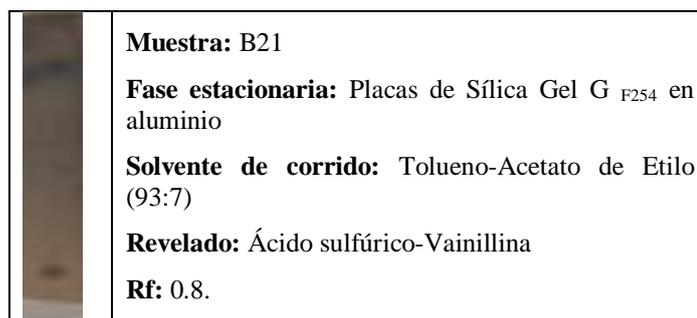
CUADRO N°5. FRACCIONES SEPARADAS EN LA CC4

SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Tolueno – Acetato de Etilo	9.3:7	1-10
Tolueno – Acetato de Etilo	8:2	11-13
Acetato de Etilo	100	14-16
Acetato de Etilo – Metanol	8:2	17-19
Metanol	100	20-22



FOTOGRAFÍA N°10. CCF8 DE LAS FRACCIONES DE COLUMNA CC4 DE LA MUESTRA 17-20

- A las fracciones 21 a la 25 se corrió en cromatografía de capa fina (CCF9) con Tolueno-Acetato de Etilo (93:7) y reveló con Ácido Sulfúrico y Vainillina, se obtuvo una mancha de color azul con Rf 0.8; la que se la preparó en placa preparativa (PP5) para obtenerla en forma pura, y debido a que tiene un Rf y coloración en igual solvente y revelador se decidió no analizarla en el UV ya que tendría λ_{\max} 429.0nm, 519.0nm, 591.0nm



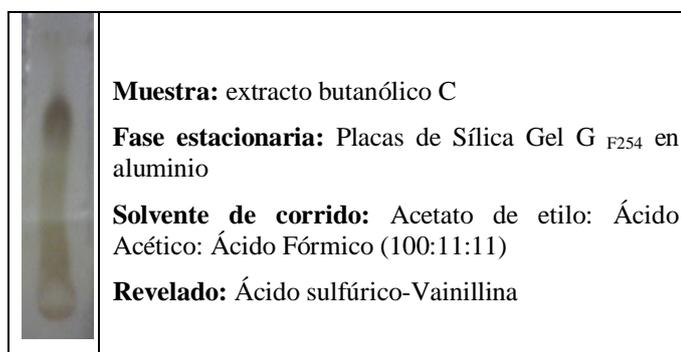
FOTOGRAFÍA N° 11. CCF9 DE LAS FRACCIONES DE COLUMNA CC DE LA MUESTRA 21-25

- Las fracciones 30 a la 32 se corrió en Tolueno-Acetato de Etilo (93:7) y fueron reveladas con Ácido Sulfúrico y Vainillina, observando que no existía muestra.

2.10. ANÁLISIS Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (C) DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacantha*).

Se preparó una cromatografía en capa fina del extracto (CCF10) con solvente: Acetato de Etilo, Ácido Acético, Ácido Fórmico (100:11:11) para verificar la presencia de los metabolitos secundarios determinados en el tamizaje fitoquímico, el Ácido sulfúrico-

Vainillina reveló tres manchas sin resolución, por lo que se efectuó un fraccionamiento del mismo como se explica en la Fig. 9



FOTOGRAFÍA N°12. CCF10 DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (C)

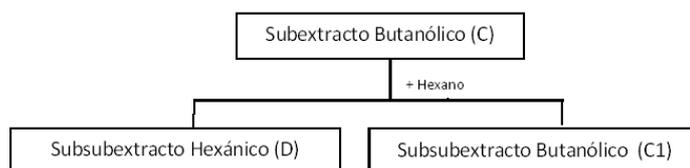
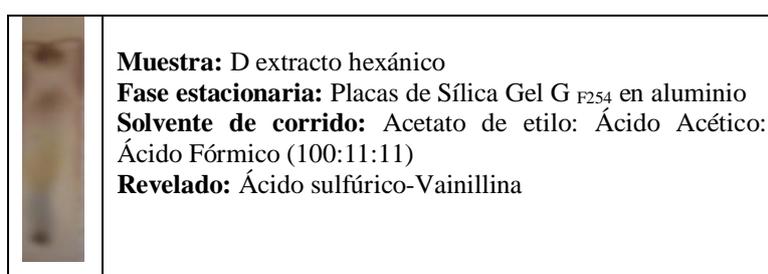


FIGURA N°9. DIAGRAMA DE FRACCIONAMIENTO DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (C)

2.11. ANÁLISIS Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL SUBSUBEXTRACTO HEXÁNICO (D) DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacantha*)

El subsubextracto hexánico (D) se corrió en capa fina (CCF12) en Acetato de Etilo, Ácido Acético, Ácido Fórmico (100:11:11) y se reveló con Ácido sulfúrico-Vainillina mostrando cuatro manchas sin resolución adecuada para una separación pura de compuestos y con muestra no corrida en la base por lo que se fracciona en columna (CC5) con incremento de polaridad en el solvente de elución como se muestra en el Cuadro N°6, obteniendo:



FOTOGRAFÍA N°13. CCF11 DEL SUBSUBEXTRACTO HEXÁNICO (D)

CUADRO N°6. FRACCIONES SEPARADAS EN LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA CC5 DEL SUBSUBEXTRACTO HEXÁNICO (D).

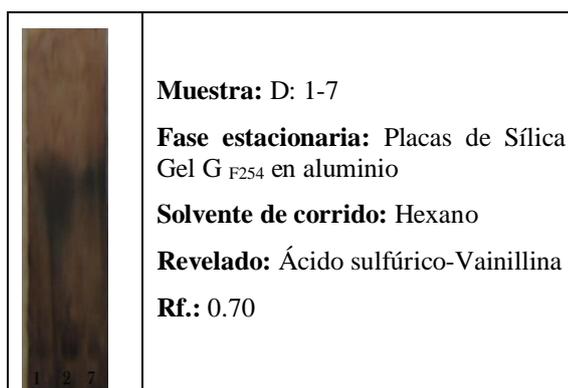
SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Hexano	100	1-7
Hexano-Acetato de Etilo	90:10	8-10
Acetato de Etilo	100	11-16
Acetato de Etilo- Ácido acético	90:10	17-18
Acetato de Etilo-Ac.Acético- Ác. Fórmico	100:11:11	19-22
Metanol	100	23-24

2.11.1. CROMATOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES DE COLUMNA DEL SUBSUBEXTRACTO HEXÁNICO (D)

Se aplicó cromatografía de capa fina a cada fracción obtenida para verificar la presencia de metabolitos, se reunió las fracciones iguales y purificó con placas preparativas;

Separación de metabolitos en las subfracciones D: 1-7.

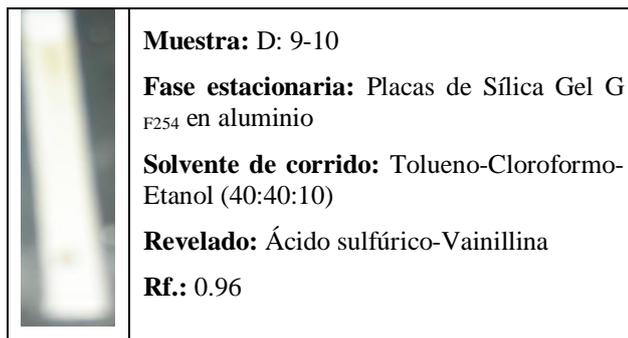
A las muestras 1-7 se realizó una cromatografía de capa fina (CCF12) con Hexano como solvente y se reveló con Ácido Sulfúrico-Vainillina obteniendo en todas las muestras una mancha redondeada de color azul intenso, debido a esta similitud se las unió, se purificó con placa preparativa PP6 dando un Rf: de 0.70, se analizó en espectrofotómetro de UV, obteniendo λ_{\max} 429.0nm, 519.0nm, 591.0nm, sin poder determinar su posible estructura por no existir datos bibliográficos de estos datos.



FOTOGRAFÍA N° 14. CCF12 DE LAS SUBFRACCIONES 1-7

Separación de metabolitos en las subfracciones D.9-10

Las fracciones 9 y 10 se las unió y se corrió en placa preparativa PP7 (Fot. 15), se obtuvo una mancha redondeada con Rf: 0.96, de color marrón, separada con Tolueno-Cloroformo-Etanol (40:40:10) como solvente de corrido y con Ácido Sulfúrico-Vainilla como revelador, la que con el espectrofotómetro UV su λ_{\max} fue de 282.0nm, 296.0nm, 315.0nm: lo que demostró que se trataba de un posible anillo de antraquinona.



FOTOGRAFÍA N°15. CCF13 CROMATOGRFÍA DE LA SUBFRACCIÓN 9-10

Separación de metabolitos en las subfracciones D: 12-16

Las fracciones 12 y 16 fueron corridas con Tolueno-Acetato de Etilo (97:3) en cromatografía de capa fina, al ser revelada con Ácido Sulfúrico-Vainillina se notó varias manchas definidas, con Rfs: 0.22 con color amarillo; 0.44, de color marrón al revelar y fluorescencia azul-violeta al UV 365; 0.76 con coloración azul intensa por lo que se unió las muestras y se las corrió en placa preparativa (PP8) para su obtención en forma pura y al correrlas en el UV en la primera franja se tuvo diez valores de λ_{\max} lo que se daría por una degradación de la muestra; la segunda λ_{\max} 222.0nm, 276.0nm; que de acuerdo a estos valores corresponden a flavonoides (Fig. 8), y en la última λ_{\max} 451.0nm, 549.0nm, 581.0nm datos que no se tienen referencia.

	Muestra: D: 12-16
	Fase estacionaria: Placas de Sílica Gel G F254 en aluminio
	Solvente de corrido: Tolueno-Acetato de Etilo (97:3)
	Revelado: Ácido sulfúrico-Vainillina
	Rf.: 0.22, 0.44, 0.76

FOTOGRAFÍA N° 16. PP8 DE LA SUBFRACCIÓN 12-16

Separación de metabolitos en las subfracciones D: 22-23.

Las fracciones 22 y 23 fueron cromatografiadas en capa fina (CCF14) en Acetato de Etilo-Ac. acético-Ac.Fórmico (3.2:1.5:0.2), dando manchas sin suficiente resolución en el Rf por lo que se las sometió a una cromatografía de columna (CC6).

CUADRO N°7. FRACCIONES OBTENIDAS EN LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE LA SUBFRACCIÓN D22-23

SOLVENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Acetato de Etilo-Ac. acético-Ac.Fórmico	3.2:1.5:0.2	1-15
Metanol	100	16-20

Cada fracción obtenida en capa fina (CCF15) se cromatografió para reunir fracciones y purificar; en Hexano-Acetato de Etilo-Ácido Acético (3.2:1.5:0.2) como solvente de corrido y con Ácido Sulfúrico- Vainillina como revelador se obtuvo un compuesto con Rf: 0.76, y otro de 0.34, de color azul intenso y violeta respectivamente después de reveladas, se unió las muestras y se realizó una placa preparativa (PP8) para obtenerlas en forma pura y al correrlas en UV su λ_{\max} fue de 451.0nm, 549.0nm, 581.0nm datos que no se tienen referencia y de λ_{\max} 212.0nm 289.0nm; precedente que indicó la presencia de flavonoides de acuerdo con la literatura.

	Muestra: D: 22-23
	Fase estacionaria: Placas de Sílica Gel G F254 en aluminio
	Solvente de corrido: Hexano-Acetato de Etilo-Ácido acético (3.2:1.5:0.2)
	Revelado: Ácido sulfúrico-Vainillina
	Rf: 0.76, 0.34

FOTOGRAFÍA N°17. CCF15 DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE D22-23

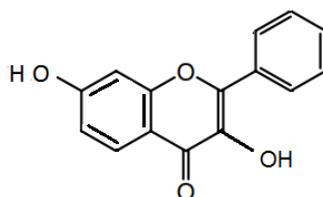


FIGURA N°10. POSIBLE ESTRUCTURA DE FLAVONOIDE B APLICANDO LAS REGLAS DE WORDWARD FIESER

Separación de metabolitos en las subfracciones D: 18-19

Las fracciones 18 -19 se las corrió en varios solventes sin hallar eficacia por lo que se realizó la técnica del cloruro férrico con resultado positivo con coloración verde, indicando la presencia de taninos del tipo pirocatecólico.



FOTOGRAFÍA N°18. REACCIÓN POSITIVA DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS.

2.12. CUANTIFICACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS, POR PERMANGANOMETRÍA

Preparación de permanganato de potasio 0.01N

$$0.01 \frac{\text{eq KMnO}_4}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ mol KMnO}_4}{5 \text{ eq}} \times \frac{158.03 \text{ g KMnO}_4}{1 \text{ mol}} \times 1 \text{ L} = 0.316 \text{ gKMnO}_4$$

Preparación de la solución de Na₂C₂O₄:

$$PM = 133.9 \text{ g/mol Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

$$\text{masa} = \frac{PM}{2}$$

$$\text{masa} = \frac{133.9 \text{ g/mol}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}}{2} = 66.96 \text{ Eqq}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}$$

$$\# \text{Eqq Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 = 66.96$$

$$\# \text{meqqNa}_2\text{C}_2\text{O}_4 = 0.06696$$

$$\# \text{Eqq KmNO}_4 = \# \text{Eqq Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

$$N_A \times V_A \times \text{meqB} = \text{g B}$$

$$0.01 \times 26 \times 0.06696 = \text{g B Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

$$\text{g B} = 0.017 \text{ g Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

- En el erlenmeyer con 13 mL de extracto EtOH y 10 mL del indicador índigo de carmín y 375 mL de agua destilada.
- Se tituló con KMnO₄ (0.01N) hasta obtener color amarillo.
- La muestra tuvo un viraje con 31 mL de KMnO₄ de concentración 0.01N valorado con Na₂C₂O₄ 0.01 N. (44)

Datos:

Muestra = 398 mL solución

Titulante = 31 mL KMnO₄ 0.01 N

Dónde:

$$\# \text{Eqqg m} = \# \text{Eqqg T}$$

$$\# \text{Eqqgm} = 0.01 \times 31 \text{ mL} \times 1/100 \text{ mL}$$

$$\# \text{Eqqg m} = 0.01 \times 3.1 \times 10^{-4} = 3.1 \times 10^{-4}$$

$$\# \text{mEqg} = 3.1 \times 10^{-4} \times 1000 = 0.31 \text{ mEqg.}$$

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. ESPECIE VEGETAL

3.1.1. RECOLECCIÓN DEL VEGETAL

Espino chivo es un vegetal que se recolectó en el sector de la colina de Lluishi del cantón Guano, ubicada a 8Km de la ciudad de Riobamba a una altura de 2360msnm, el día 29 de septiembre de 2012.

3.1.2. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

El ejemplar de Espino chivo fue certificado por el curador del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, como *Duranta triacantha*, familia de las *Verbenaceae*.

3.2. EXTRACTO ALCOHÓLICO DEL VEGETAL EN ESTUDIO

Se partió de 120mL del extracto alcohólico de Espino chivo. Los subextractos y subsubextractos tienen un rendimiento en peso de: Subextracto clorofórmico 1.56g y el subextracto butanólico de 5.90g

3.2.1. ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS LOS EXTRACTOS

Se determinó las características organolépticas y físicas del extracto alcohólico total (29), obteniendo un líquido de color verde oscuro y de olor dulce debido a que el vegetal tenía hojas verdes y semillas gruesas verde amarillentas; tuvo una densidad relativa de 0.95g/mL que es menor al del agua, e índice de refracción mayor al del agua

1.362 lo que orienta a pensar que existen sólidos, y su pH de 5.86 indican que es ácido puede ser a la presencia de ácido nítrico.

CUADRO N° 8. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Duranta triacantha*.

Parámetro	<i>Duranta triacantha</i>
Aspecto	líquido
Color	verde oscuro
Olor	Dulce
Densidad	0.985 g/ml
Ph	5.86
índice de refracción	1,362

3.2.2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Los resultados obtenidos a partir del método de colorimetría de Espino chivo o *Duranta triacantha* son: positivo para taninos pirocatecólicos, flavonoides, antraquinonas y la mínima presencia de alcaloides y sesquiterpenolactonas (Ver Cuadro N° 9).

CUADRO N° 9. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO

PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN Grupo fitoquímico	REACCIÓN POSITIVA	EXTRACTO ETANÓLICO <i>Duranta triacantha</i>
ESPUMA Saponina	Espuma + de 1 min	(-).
CLORURO FÉRRICO Compuestos fenólicos Taninos catéquicos Taninos pirocatecólicos	Azul Azul negro Verde o azul verdoso	(-) (-) (+) verde oscuro
SHINODA Flavonoides	Gama de rosado a amarillo	(+)
WAGNER Alcaloides	↓ pardos	(±) pardo y ↓ amarillo
BALJET Sesquiterpenolactonas	↓ anaranjados o rojos	(±) ↓ pardos
SUDAN III Monoterpenos	Aceite rojo	(-)
BORNTRAGER Quinonas	rojo	(++)

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia, ± En duda, ↓ Precipitado

3.2.3. CROMATOGRAFÍAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO (A) DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacantha*).

La cromatografía en capa fina permite utilizar solventes específicos que busca la presencia de manchas en las que se determina los parámetros de eficiencia, eficacia y resolución, para seleccionar el método cromatográfico de separación y purificación para el extracto y subextractos.

Sabiendo esto; al extracto alcohólico, se lo corrió en Cromatografía de Capa Fina (CCF1) con solventes, orientados en los resultados del tamizaje fitoquímico:

Butanol saturado de Agua, Tolueno: Acetato de Etilo (93:7), Acetato de etilo: Ácido Acético: Ácido Fórmico: Agua (100:11:11:26), Acetona: Etanol (50:50) y Cloroformo: Metanol (65:35);(Ver Fot.3) pero en ninguno de los casos el extracto etanólico (A) presentó resolución ya que no son manchas que no se separan entre ellas a pesar de que cada una presentó color diferente, debido a esto se realizó un fraccionamiento, para que tal manera exista eficacia, eficiencia y resolución (Ver Fig.6). Luego se procedió al análisis de cada uno de los subextractos obtenidos; así:

3.2.4. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (B).

Se realizó dos cromatografías CCF2 con cloroformo y 2-Propanol-Ácido Acético (9.5:0.5) para determinar los compuestos presentes; por no existir manchas completamente redondeadas con buena resolución, (Ver Fot.4), se realizó una columna cromatográfica teniendo en cuenta la polaridad de los solventes de corrido utilizados, lo que mejoraría la separación y purificación de los metabolitos secundarios presentes en el subextracto clorofórmico:

Se separó 33 fracciones (Ver Cuadro N°2); las mismas que se muestrean por el aspecto, color y cantidad de solvente extraído con el fin de no desperdiciar muestra y solventes en la investigación; se aplicó CCF3 para unificar aquellas muestras similares, corriéndolas en Cloroformo y revelando con Ácido sulfúrico-Vainillina, se tuvo (Ver Fot. 5):

- Las fracciones, de la 1 a la 4, para mejorar la resolución se corrió en Acetato de Etilo : Metanol (3:03), se reveló con Ácido sulfúrico – Vainillina, y existiendo 2 manchas definidas, una de color amarillo y otra de color marrón con Rf de 0.34 y 0.95 respectivamente (Ver Fot.6), se separaron en placa preparativa (PP1), al ser separadas las dos franjas o compuestos puros, se las analizó en el espectrofotómetro, teniendo una λ_{\max} para la franja 1 de 451.0nm, 549.0nm, 581.0nm que por no existir referencias bibliográficas de su espectro UV no se puede dar la posible estructura del compuesto aislado; y para la franja 2: λ_{\max} = 282.0nm, 296.0nm, 315,0nm, que comparando los valores de longitud de onda calculados al de referencia bibliográfica, (29) (47) correspondería a antraquinonas, por aplicación de las Leyes de Woodward-Fieser se determinó su posible estructura (Ver Fig. 7).
- Las fracciones de la 9 a la 15 se las unió y, se realizó una cromatografía de microcolumna ya que las manchas obtenidas en CCF5 con Tolueno-Acetato de Etilo (9.3 : 7) y reveladas con Ácido sulfúrico-Vainillina no cumplían con el parámetro de resolución suficiente para su purificación (Ver Fot.7), resultaron 43 fracciones con los solventes de eluido con polaridad creciente detallados en el Cuadro N°3, se las corrió en cromatografía de capa fina CCF6 con para la unión de fracciones similares(Ver Fot. 8). De la unión de las la subfracciones 4, 17, 25 y 36, corridas con Tolueno-Acetato de Etilo (9.3 : 7) y reveladas con Ácido sulfúrico-Vainillina tuvieron un Rf de 0.42 y de coloración marrón y con fluorescencia azul-violeta cuyo espectro UV reveló la λ_{\max} = 222.0nm, 276.0nm, comparando la longitud de onda práctica y la teórica (*genkwanina* Rf: 0.5 con fluorescencia violeta a 366 nm, que vira al naranja por exposición al amoníaco y además absorbe a 254 nm) , se deduce que corresponde a la estructura de una flavona; a la subfracción 7 se la cromatografió en columna obteniendo 14 fracciones más, de las cuales se pudo aislar con Tolueno, y con Ácido sulfúrico – Vainillina como revelador, a un compuesto que presentó Rfs= 0.78 de coloración azul y con λ_{\max} = 429.0nm, 519.0nm, 591.0nm; cuyos valores no pueden dar su posible estructura.
- Se unió la fracción 17 hasta la 20 se sometió a una columna cromatográfica (CC4) de polaridad creciente (Cuadro N°5) , se cromatografió las fracciones muestreadas (CCF8) en Tolueno-Acetato de Etilo (93:7) y con revelador Ácido Sulfúrico y Vainillina (Fot. 10), se unió y separó en forma pura los posibles metabolitos con un

Rf de 0.77 con coloración azul intenso (PP4) y se determinó se espectro UV con :
 λ_{\max} 429.0nm, 519.0nm, 591.0nm.

- A las fracciones desde la 21 a la 25, se cromatografió con CCF en iguales condiciones a la anterior dándonos Rf: 0.8 λ_{\max} . igual, y por lo tanto sin estructura posible.
- En las fracciones de la 30 a la 32 al ser corrida con Tolueno-Acetato de Etilo (93:7) y revelandolas con Ácido Sulfúrico y Vainillina no existe evidencia de muestra, esto se debe a que con los solventes anteriores ya se extrajo toda la muestra y por tanto el líquido recolectado corresponde a solo solvente usado para aislar fracciones puras.

3.2.5. CROMATOGRAFÍA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (C) DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacantha*).

Al subextracto butanólico C se lo corrió en una cromatografía en capa fina, teniendo como solvente: Acetato de Etilo Ácido Acético Ácido Fórmico (100:11:11), y se obtuvo manchas distintas sin eficiencia por lo que se efectuó un fraccionamiento del mismo. Añadiendo al subextracto 10mL de hexano, se agitó en círculos y dejó reposar para que exista separación de fases, la fase líquida corresponde al hexano mientras que la turbia al butanol, la fase hexánica o subsubextracto hexánico (D) fue recogida en un balón ó Erlenmeyer para su concentración.

Este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides, pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad, los cuales aparecen en la superficie de las plantas de acuerdo a Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001) (12). El extracto de hexano generalmente tiene clorofilas gomas y, cuando están presentes agliconas de flavonoides altamente metoxiladas como quersetina 3,7,3''4''tetrametileter y 6-metoxiquercetina 3,7,3'',4''tetrametieter.

3.2.6. CROMATOGRAFÍA DEL SUBSUBEXTRACTO HEXÁNICO (D) DE ESPINO CHIVO (*Duranta triacantha*).

Al subsubextracto hexánico fue corrido en placa de sílica gel CCF y por no haber suficiente resolución se le fracciona en cromatografía de columna CC5: obteniendo con los solventes en orden de polaridad creciente detallados en el Cuadro N°6, 24 fracciones las cuales fueron corridas en CCF en condiciones distintas para su purificación:

- En las subfracciones *1 a la 7*, con Rf 0.7 en placas de sílica gel con solvente Hexano y revelador Ácido Sulfúrico-Vainillina (CCF13) obteniendo en todas las muestras una mancha redondeada de color azul intenso, y λ_{\max} = 429.0nm, 519.0nm, 591.0nm.
- En la subfracciones *9 a 10* en placa preparativa con Tolueno-Cloroformo-Etanol (40:40:10) y revelada con Ácido Sulfúrico-Vainillina, se obtuvo una mancha redondeada con Rf: 0.96, de color marrón y λ_{\max} = 282.0nm, 296.0nm, 315.0nm, en el UV, que correspondería posiblemente a quinonas al comparar los datos experimentales con los de referencia (Emodin Rf: 0.95, de coloración marrón al UV visible y con fluorescencia de rojo a naranja al UV 365; de acuerdo a Wagner 1984 p. 64 (52) y por aplicación de las Leyes de Woodward-Fieser, resultó una estructura de antraquinona (Ver Fig. 7)
- De las subfracciones *12 a 16* al analizarlas con cromatografía de capa fina con Tolueno-Acetato de Etilo (97:3) y revelar con Ácido Sulfúrico-Vainillina dieron varias manchas definidas, con Rfs: 0.22 con color amarillo; 0.44, de color violeta al revelar y fluorescencia al UV 365; 0.76 con coloración azul intensa por lo que se unió las muestras y se las corrió en placa preparativa (PP8) para su obtención en forma pura y al correrlas en el UV en la primera franja se tuvo diez datos incongruentes de λ_{\max} lo que no permiten dar una posible estructura ya que estos valores son evidencia de una degradación del compuesto, además verifica que se trata de compuestos fotosensibles; La segunda franja su lectura λ_{\max} = 222.0nm, 276.0nm , cuyos antecedentes evidencian la presencia de flavonoides al ser comparados con los valores de la referencia bibliográfica (Ver Fig. 8); y en la tercera λ_{\max} = 451.0nm, 549.0nm, 581.0nm., sin datos bibliográficos de longitud de onda máxima.

- A las subfracciones 22 y 23, se aplicó una cromatografía de capa fina (CCF14) en Hexano-Acetato de Etilo-Ácido Acético (3.2:1.5:0.2), dando manchas redondeadas pero no con la separación suficiente para su purificación en placa preparativa por lo que se corrió en cromatografía de columna (CC6) con el mismo solvente y revelador, a las fracciones se las corrió en placa preparativa para su extracción pura y leídas en el espectrofotómetro UV; dando que para el Rf: 0.76, y 0.34, de color azul y violeta respectivamente después de reveladas la λ_{\max} de la primera fue de 451.0nm, 549.0nm, 581,0nm, y la segunda de $\lambda_{\max}=212.0\text{nm}$, 289.0nm que indicó la presencia de flavonoles de acuerdo con la literatura de referencia de acuerdo a Wagner (1984) (52) quercetin (Rf = 0.80) and kaempferol (Rf = 0.89 de coloración amarilla al UV visible y Fluorescencia entre verde y amarilla al UV 365)

3.2.7. CUANTIFICACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS, POR PERMANGANOMETRÍA:

Se obtuvo 0.31 mEqg. de taninos picatecólicos como consumo de permanganato de potasio, cuantificado por permanganometría.

3.3. POSIBLES ESTRUCTURAS DADAS POR ESPECTROSCOPIA UV

QUINONAS

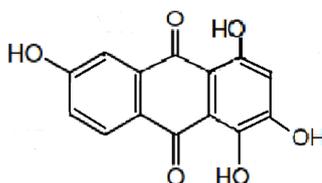
FRACCIONES: Subextracto clorofórmico fracción 1-4; Subsubextracto hexánico fracción 9-10.

REACCIÓN DE COLORACIÓN: Bornträger (++) rojo; CCF: Coloración marrón con Rf: 0.95 Compuesto de referencia: emodin con coloración marrón al UV visible en el frente de la placa y fluorescencia naranja al UV 365.(Wagner 1996, pp.64)



FOTOGRAFÍA N° 19. COMPUESTO AISLADO AL UV

Quinonas λ_{\max} : BI 263.0 nm); (BII 272.0 nm); (BIII 400.0 nm) FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FOTOQUÍMICO.



1,3,4,7-tetrahydroxi-9,10-antraquinona

FIGURA N° 11. DETERMINACIÓN DE LA POSIBLE ANTRAQUINONA POR APLICACIÓN DE REGLAS DE WORDWARD FIESER

CUADRO N° 10. LONGITUDES DE ONDA CALCULADAS PARA APLICANDO LAS REGLAS DE WOODWARD Y FIESER.

Anillo base	246 nm	Anillo base	246 nm
OH (p)	25 nm	OH (o)	7 nm
OH (o)	7 nm	Residuo	3 nm
OH (m)	7 nm	Extensión	5 nm
Residuo	3nm	λ_{\max} calculada	286 nm
Extensión	5 nm	λ_{\max} experimental	282 nm
λ_{\max} calculada	293 nm		
λ_{\max} experimental	286 nm		

FLAVONOIDES

FRACCIONES: Subextracto clorofórmico fracción 9-15; Subsubextracto hexánico fracción 12-16, 22-23

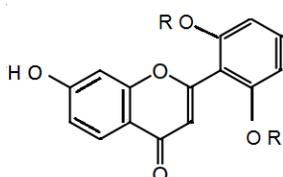
Reacción de coloración: Shinoda (+); CCF: Coloración marrón al UV visible, y fluorescencia violeta al UV 365; con Rf: 0.42 para flavonoide A, y Coloración marrón al UV visible con Rf: 0,76, en flavonoide B.

Compuesto de referencia:

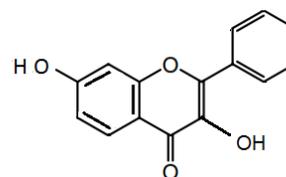
Flavonol: quercetin (Rf = 0.80) and kaempferol (Rf = 0.89) de coloración amarilla al UV visible y Fluorescencia entre verde y amarilla al UV 365. (Wagner 1996, pp.210-212)

Flavona: *genkwanina* Rf: 0.5 con fluorescencia violeta a 366 nm, que vira al naranja por exposición al amoníaco y además absorbe a 254 nm (Palacios, P., G. Gutkind, R.V.D. Rondina, R. de Torres y JD. Coussio. 1983)

Flavonoides λ_{\max} : (BI 245-275 nm); (BII 310-330 nm), FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FITOQUÍMICO;



1,5'-oxi-7-hidroxi-flavona



7-hidroxi-flavananol

FIGURA N° 12. DETERMINACIÓN DE LOS POSIBLES FLAVONOIDES (A, B) POR APLICACIÓN DE REGLAS DE WORDWARD FIESER

Dichas estructuras se verifican además ya que cuando se trata de flavonoides como flavonas y flavoles son muy solubles en agua, y cuando se los corría en solventes combinados con este líquido las muestras en estudio se deformaban mientras corrían la placa de sílica gel.(13)

CONCLUSIONES

- La muestra vegetal, fue recolectada e identificada como *Duranta triacantha* y contiene metabolitos secundarios que se pueden aislar e identificar.
- Se preparó el extracto etanólico obteniendo un porcentaje de rendimiento de 29.63%, es un líquido de color verde oscuro y de olor dulce, con densidad de 0.985g/mL, índice de refracción de 1.362 y pH de 5.86.
- El extracto etanólico de *Duranta triacantha* por Reacciones de colorimetría contiene taninos pirocatéquicos, flavonoides, alcaloides, sesquiterpenolactonas y quinonas; además tuvo 0.31 mEqg. de taninos picatecólicos como consumo de permanganato de potasio cuantificado por permanganometría.
- En el Análisis Cromatográfico de los extractos, subextractos y subsubextractos se aislaron compuestos que después de su estudio correspondiente se concluyó que: En el subextracto clorofórmico: la fracción 1-4 en CCF en Acetato de Etilo:Metanol (3:03) y de la subsubfracción 9-10 del subsubextracto Hexánico se extrajo con Tolueno-Cloroformo-Etanol (40:40:10) y revelados en ambos casos con Ácido sulfúrico – Vainillina; presentan una antraquinona con $R_f = 0.95$ y $\lambda_{max} = 282.0nm, 292.0nm, 315.0nm$ la 1,3,4,7-tetrahidroxi-9,10-antraquinona. De la unión de las la subfracciones 4, 17, 25 y 36, y del subextracto hexánico fracción 12-16, corridas con Tolueno-Acetato de Etilo (9.3 : 7) , y reveladas con Ácido sulfúrico-Vainillina tuvieron un R_f de 0.44 y de coloración marrón y con fluorescencia azul-violeta cuyo espectro UV reveló la $\lambda_{max} = 222.0nm, 276.0nm$, que corresponde a la estructura de una flavona 1'5'-oxi-7-hidroxi-flavona. De la subsubfracción 22-23 del subextracto hexánico; se logró aislar un compuesto que tiene $R_f: 0.76$ con Hexano-Acetato de Etilo-Ácido Acético (3.2:1.5:0.2); de color amarilla y con $\lambda_{max} = 212.0nm, 289.0nm$ que corresponde al 7-hidroxi-flavanol.

RECOMENDACIONES

1. El material vegetal debe ser recolectado en flor, mas no con frutos, ya que estos contienen azúcar que dificultan la separación de los metabolitos.
2. Trabajar con mayor cantidad de material vegetal para obtener suficiente cantidad de metabolitos secundarios y así poder realizar la MS y determinar la estructura.
3. Las muestras a trabajar no deben ser expuestas a la luz solar ya que como hemos visto se trata de compuestos fotosensibles.
4. Realizar convenios con otras universidades en el caso de no ser posible la adquisición de equipos, materiales y reactivos, como el espectrofotómetro de masas o de resonancia magnética nuclear, ya que mediante estos se pueden obtener resultados más concretos, claros y específicos del vegetal en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. **AGUIAR., JACIANA S. MARIA C.** Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Revista Brasileira de farmacognosia.* v.18. n.3. July/Sept. 2008. Paraná-Brasil. pp.436-440.
2. **ALEA, JA., et al.** Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. *Revista Cubana de Farmacia.* v.30 n.1. Ene/Abr. 1996., Habana-Cuba. pp. 29-35.
3. **ANIS, I. et al.** Thrombin Inhibitory constituents from *Duranta repens.*, *Helvetica Chimica A.* v. 84. n3. 2001. Karachi-Pakistan. pp. 649–655.
4. **AWADH, ALI NA., et al.** Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities *Journal of. Ethnopharmacol.* v. 74. 2001. pp. 173-179.
5. **BAKSHU., LMD. et al.** Antimicrobial activity of *Securinega leucopyrus.* *Fitoterapia.* v.72. n.8. 2001. pp. 930-933.
6. **CAMPBELL, P.; SMITH, A.D.; PETERS, T. J.** Bioquímica ilustrada. Bioquímica y biología molecular en la era pos genómica. 5a ed. Elsevier Masson. 2006. p.199
7. **CANTELI, VANESSA CRISTINA DÍAS.** Composição fitoquímica e atividades biológicas de *Duranta vestita Cham,* Verbenaceae. (Tesis) (Doc. Ciencias Farmaceuticas) Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências. 2013. Curitiba-Brasil. pp.11-30.
8. **CARTAYA, O., REYNALDO, I.** Reseña bibliográfica flavonoides: características químicas y aplicaciones, *Cultivos tropicales.* v.22 n.2. 2001, pp.5-14.
9. **CROMATOGRFÍA. QUÍMICA HIDROCARBUROS:**
http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html
2013-09-18

10. CROMATOGRAFÍA, QUÍMICA ORGÁNICA

http://organica1.org/1311/1311_6

<https://quimicahidrocarburos.wordpress.com>

2012-15-09

11. **CUMANDÁ, J.**, Principios de Farmacognosia., Riobamba–Ecuador., CDR., 2000., p. 5.

12. **CUMANDÁ, J.**, Texto Básico de Farmacognosia., Riobamba–Ecuador., CDR., 2004., 112. p.

13. **CUSHNIE, TIM., LAMB, ANDREW.** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* v.26. n.5. 2005. pp. 343–356.

14. **DÁVALOS PINTO JENNY.,** Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de llantén (*Plantago major*). *Biofarbo.* v.16. 2008. p.36.

15. **DE LA TORRE, LUCÍA. et. al.** Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. 2008. pp. 277, 336, 360,616.

16. *Duranta triacantha*

<http://www.slideshare.net/Abbypao>

http://zipcodezoo.com/Plants/D/Duranta_triacantha/

2012-19-09

17. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

<http://ocw.uc3m.es/ingenieria-quimica/quimica-ii/practicas-1/PR-F-Anexos>

2012-16-09

18. **ESTUPIÑÁN RUALES, Carlos, et al.** Estudios para la recuperación de la flora nativa en el valle de Tumbaco-Distrito Metropolitano de Quito: inventario florístico y ensayo de propagación vegetativa. 2007. Quito-Ecuador

<http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/886/1/84737.pdf>

2007-05-01

19. **FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O.** Introdução à análise fitoquímica. *Farmacognosia: da planta ao medicamento,* v. 6. 2003. Porto alegre - Brasil. pp.165-182

20. **GONZALO J. C, RIVAS., GARCÍA, ALONSO.** Flavonoides en Alimentos Vegetales: Estructura y Actividad Antioxidante Nutrición y Bromatología. Facultad de farmacia. Universidad de Salamanca. 2002. pp 31-38.
21. **HARVEY, D., & RODRÍGUEZ, L. C.** Química Analítica Moderna. Quito-Ecuador. Graw Hill. 2009. pp. 146, 229-301, 402-403.
22. **HARRIS, DANIEL.** Análisis Químico Cuantitativo., 2a. ed., 2001. pp. 619.
23. **JEFFERY, G.H.; BASSETT, J.; y OTROS.** Analise Química Qualitativa. 2a ed. Vogel. 1992. pp. 396, 168, 268.
24. **LEGISLACIÓN VIGENTE EN ECUADOR PARA LA FABRICACIÓN, USO Y COMERCIALIZACIÓN DE PLANTAS MEDICINALES Y FITOMEDICAMENTOS. REGULACIÓN 28-02 (2001).** Requisitos para la solicitud de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de origen natural de uso humano. CECMED. MINSAP. OMS.
<http://www.redalyc.org/pdf/856/85680109.pdf>
2009-09-26
25. **LEÓN, YÁNEZ.** Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 1999, v. 75, p. 1-1181.
26. **LOCK, O.** Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. Manual de Fitoterapia. Lima-Perú. PUCP. 1994. pp.7-8, 114, 127,182, 190
27. **LOPES, ROCHELE. et.al.** Revisão das atividades biológicas e toxicidade das plantas ornamentais mais utilizadas no Rio Grande do Sul. Brasil. *Revista Brasileira De Biociências*,. v.7. n. 3. 2009. pp.305-315.
28. **MARTINEZ, A., et al.** Manual de prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica., Medellín. Universidad de Antioquia. 2008. 96.p.
29. **MESA GONZÁLEZ LEONORA., et al.** Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea carolinensis*. *Revista Cubana de Farmacia*, 2006, v. 40, n.2, pp. 312-316.

- 30. METABOLITOS SECUNDARIOS.** La guía. Química.
<http://quimica.laguia2000.com/reacciones-quimicas/metabolitos-secundarios-de-pl>
2012-16-09
- 31. MODAK, BRENDA. et al.** Actividad Antibacteriana de Flavonoides Aislados del Exudado Resinoso de *Heliotropium Sinuatum*: Efecto del Tipo de Estructura. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 2002, v. 47, n.1, pp. 19-23.
- 32. NIKKON, Farjana, et al.** Mosquitocidal triterpenes from the stem of *Duranta repens*. *Pharmaceutical biology*, 2010, v. 48, n 3, pp. 264-268.
- 33. NOLLER, C.,** Química Orgánica. 3a ed. México. Interamericana. 1968. pp. 454-473.
- 34. PINO ALEA, J.A., et al.** Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 30, n. 1, 1996, p. 0-0.
- 35. RED DE ALIADOS PARA LA SINERGIA EN LA GESTIÓN AMBIENTAL DEL ESTADO LARA. PREPARACIONES FITOTERAPEUTICAS**
http://musguito.net.ve/salud/preparaciones_fitoterapeuticas.htm
2010-03-26
- 36. ROMERO, Gemma Baulies; CASTELLA, Rosa María Torres.** Actualización en fitoterapia y plantas medicinales. *FMC-Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 2012, v. 19, n. 3, pp. 149-160.
- 37. RUIBAL., IGNACIO JUAN, et.al.** Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus caribaea* Morelet. *Rev. Cubana Farm.* v.37. n.2. 2003. Habana., p.0-0.
- 38. SAMPIETRO., D. A.** Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. *Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales "Dr. Antonio R. Sampietro" Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán Ayacucho.* v. 12. 2002
<http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/alelopatia>
2012-11-20

39. **SANABRIA., A. et.al.** Análisis fitoquímico preliminar y Letalidad. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia. *Revista Colombiana de Ciencias.* Bogotá-Colombia. n.26. 1997. pp.15-19.
40. **SCIENCE PRESS.** "Duranta" in Flora of China. *Botanical Garden Press and Missouri Botanical Garden Press.* v. 17. May. 2014. Beijing. p. 2
41. **SHAHAT, A. A. et al.** Phytochemical Investigation and Antioxidant Activity of *Duranta repens.* *Phytotherapy Research.* v.19. 2005. pp. 1071-1073.
42. **SHARAPIN, N.** Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de Fitoterapia,* 2002, v.1. n.3, pp. 23-28.
43. **SHOU-LIANG CHEN., MICHAEL G., GILBERT.** "Verbenaceae" en Flora de China Pekín y Missouri Botanical Garden. *Science Press.* 2005, vol. 17.. p. 11
44. **SOARES, LUCIANO., E** Estudo tecnológico, fitoquímico e bilógico da *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown ex Britt & Wils (*Falsa melissa*) Verbenácea. (Tesis) (Mestrado em Farmácia). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis 2001. 121p.
45. **SOLIS., PABLO, et al.** Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos.. Bogotá-Colombia., S.l. FAO. 2003. 132 p
46. **TERRA, J., ROSSI, A. V.** Sobre o desenvolvimento da aná-lise volumétrica e algumas aplicações atuais. *Quim. Nova.* v. 28. n.1. 2005. p.166.
47. **VIJAYA, H. K.; KULKARNI, S.; HEGDE, Y. R.** Evaluation of Plant Extracts Against *Ceratocystis paradoxa* Causing Sett Rot of Sugarcane. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences.* v. 20. n.1. 2010. pp.168-169.
48. **W. MISIUK, H. PUZANOWSKA.** Analytical Letters. *Tarasiewics* v. 35. 2002. pp. 1163-1170.
49. **WAGNER, H., BLADT, S., & ZGAINSKI, E. M.** Plant Drug Analysis. Translated by A. Scott. 1984. pp. 62 - 64
50. **WETTSTEIN, R.** Tratado de Botanica Sistemática. 4ª ed. Paris-Francia. Reliure., 1944. 1039.p.

- 51. WHITE, A.** Hierbas del Ecuador - Plantas Medicinales. Mariscal. Quito-Ecuador. 1976. p.146.
- 52. YOKOZAWA, T., CHEN, C. P., DONG, E., TANAKA, T., NONAKA, G. I., & NISHIOKA, I.** Study on the Duranta e inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical pharmacology*. v.56 n.2. 1998. pp. 213-222.

ANEXOS

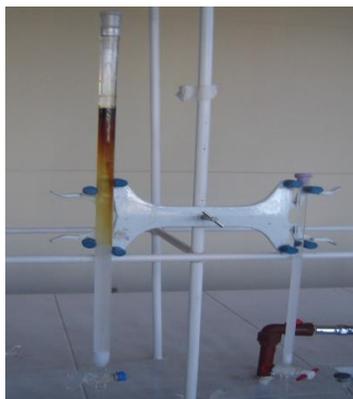
Anexo1. Procedimiento en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.



LABORATORIO DE FITOQUÍMICA



OBTENCIÓN DE SUBEXTRACTOS Y SUBSUBEXTRACTO



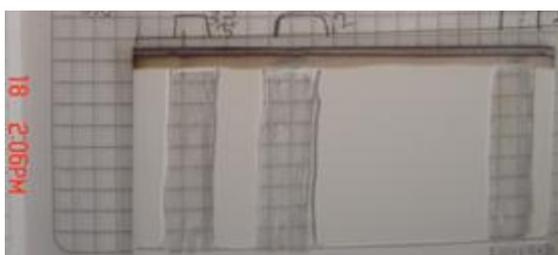
COMATOGRAFÍA EN COLUMNA



MUESTREO



CORRIDO DE SOLVENTES EN LA CUBA CROMATOGRÁFICA



PLACA PREPARATIVA, CORTES EN BANDA