



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

“Separación y Posible identificación de metabolitos secundarios de la Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*) con fines de aporte a una técnica de análisis químico”

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

**PRESENTADO POR**

**ADRIANA PAOLA LEMA AUCACAMA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2013**

## **DEDICATORIA**

*El presente trabajo investigativo va dedicado a mis padres, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera y de mi vida, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.*

*A mi hermana Natalia por ser el ejemplo de una hermana mayor, por apoyarme en cada momento de mi vida y a mi hermana Daniela por su ayuda y gran apoyo a quienes amo mucho y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.*

**ADRIANA LEMA**

## **AGRADECIMIENTO**

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

*Agradezco con mucho Amor a mis padres, hermanas, tíos y a mis primos quienes me han apoyado no solo en mi vida estudiantil, si no en mi formación como ser humano.*

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

*Quiero agradecer profundamente a mi directora de tesis Dra. Cumandá Játiva al miembro del tribunal Dr Jacinto Mera por su aporte científico para el desarrollo de este trabajo de investigación.*

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

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“SEPARACIÓN Y POSIBLE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA JACARANDA (*Jacaranda mimosifolia*) CON FINES DE APORTE A UNA TÉCNICA DE ANÁLISIS QUÍMICO”**, de responsabilidad de la señorita egresada Adriana Paola Lema Aucacama, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr(a). Cumandá Játiva  
**DIRECTOR(A) DE TESIS**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr(a). Jacinto Mera  
**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr(a)Ana Albuja  
**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tc. Carlos Rodríguez  
**DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**NOTA DE TESIS ESCRITA** \_\_\_\_\_

Yo, **Adriana Paola Lema Aucacama**, 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 PAOLA LEMA AUCACAMA**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
EtOAc	Acetato de Etilo
H.Ac	Ácido acético glacial
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
NH <sub>3</sub>	Amoníaco
B1	Banda 1
BuOH	Butanol
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
TLC	Cromatografía en capa fina
TLCP	Cromatografía Capa Fina Preparativa
EtOH	Etanol
ETOH	Extracto Etanólico
NaOH	Hidróxido de Sodio
$\Lambda$	Longitud de onda
mg	Miligramos
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
%	Porcentaje
ph	Potencial de hidrógeno
Ce(SO <sub>4</sub> )	Sulfato de Cerio
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

INDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE ANEXOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

INTRODUCCIÓN

<b>1.</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
1.1	JACARANDA ( <i>Jacaranda mimosifolia</i> ).....	1
1.1.1	Origen y Distribución Geográfica.....	1
1.1.2	Descripción Botánica.....	2
1.1.3	Clasificación Científica.....	3
1.1.4	Formas de utilización.....	3
1.1.4.1	Usos en Medicina Tradicional.....	3
1.1.4.2	Recomendaciones.....	5
1.1.4.3	Advertencias y Contraindicaciones.....	5
1.1.5	Composición Química.....	5
1.1.6	Toxicidad.....	6
1.2	RECOLECCIÓN, MUESTREO, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA SU PROCESAMIENTO.....	6
1.2.1	Recolección del Material Vegetal.....	6
1.2.2	Muestreo.....	7
1.2.2.1	Fragmentación.....	7
1.2.2.2	Transporte y Conservación.....	7
1.2.2.3	Limpieza y descontaminación.....	7
1.2.3	Extracción.....	8

1.2.3.1	Maceración.....	8
1.2.3.2	Percolación o Lixiviación.....	8
1.2.3.3	Clasificación de los extractos Vegetales.....	9
1.3	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	9
1.3.1	Fundamento.....	9
1.3.1.1	Metodología en el Análisis Fitoquímico.....	9
1.3.2	Reacciones de Identificación.....	10
1.3.2.1	Ensayo de Dragendorff.....	10
1.3.2.2	Ensayo de Wagner.....	11
1.3.2.3	Ensayo de Mayer.....	11
1.3.2.4	Ensayo de Lieberman-Buchard.....	11
1.3.2.5	Ensayo de Borntrager.....	12
1.3.2.6	Ensayo de Catequinas.....	12
1.3.2.7	Ensayo de Espuma.....	13
1.3.2.8	Ensayo de Benedict.....	13
1.3.2.9	Ensayo de Shinoda.....	13
1.3.2.10	Fehling.....	14
1.4	HIDRÓLISIS.....	14
1.5	CROMATOLOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	15
1.5.1	Definición de Cromatografía.....	15
1.5.2	Concepto de Rf.....	15
1.5.3	Cromatografía De Capa Fina.....	16
1.5.3.1	Eluyentes más comunes para cromatografía en capa fina.....	16
1.5.3.2	Reveladores más comunes para cromatografía en capa fina.....	17
1.5.3.3	Adsorbentes más comunes para Cromatografía en capa fina.....	17
1.5.4	Factores que influyen en una separación por cromatografía en capa fina.....	18
1.5.5	Técnica para la aplicación de Muestras.....	18
1.5.6	Constante de Distribución.....	19
1.5.7	Factor de Capacidad.....	19
1.5.8	Factor de Selectividad.....	19
1.5.9	Eficiencia de una Columna.....	20
1.5.10	Resolución de la Columna.....	21
1.6	ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	21
1.6.1	Espectrometría.....	21
1.6.2	Espectrometría Ultravioleta-Visible.....	21



1.6.3	Aplicaciones.....	22
1.6.4	Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible.....	23
1.6.5	Espectro Ultravioleta-Visible.....	23
1.6.6	Reglas de Woodward-Fieser.....	24
<b>2</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>27</b>
2.1	LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN.....	27
2.2	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	27
2.2.1	Obtención del Vegetal.....	27
2.2.2	Equipos.....	27
2.2.3	Materiales de Laboratorio.....	28
2.2.4	Reactivos.....	29
2.3	FACTORES DE ESTUDIO.....	30
2.4	COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA.....	30
2.5	METODOLOGÍA DE LA PREPARACIÓN DE MUESTRA, SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	30
2.5.1	Obtención del Extracto.....	30
2.5.2	Preparación de Subextractos.....	31
2.5.2.1	Subextracto Toluénico.....	31
2.5.2.2	Subextracto Butanólico.....	31
2.5.2.3	Subextracto Etanólico.....	32
2.6	TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA SOLUCIÓN TÓNICA.....	32
2.6.1	Ensayo de Dragendorff (Alcaloides).....	32
2.6.2	Ensayo de Wagner (Alcaloides).....	33
2.6.3	Ensayo de Lieberman-Buchard (Esteroles y/o esteroides).....	33
2.6.4	Ensayo de Baljet (Cumarinas).....	33
2.6.5	Ensayo de Catequinas.....	34
2.6.6	Ensayo de Saponinas.....	34
2.6.7	Ensayo de Benedic (Taninos).....	34
2.6.8	Ensayo de Shinoda (Flavonoides).....	35
2.7	MÉTODOS FÍSICOS-QUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE EXTRACTOS.....	35
2.7.1	Determinación de los Requisitos Organolépticos.....	35

2.7.1.1	Determinación del Olor.....	35
2.7.1.2	Determinación del Color.....	35
2.7.1.3	Determinación del Aspecto.....	35
2.7.2	Determinación de la Densidad Relativa.....	36
2.7.3	Determinación del Índice de Refracción.....	37
2.7.4	Determinación del pH.....	38
2.8	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DEL EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS.....	41
2.8.1	Tratamiento del Subextracto Etanólico.....	41
2.8.1.1	Separación por Cromatografía en Columna del Subextracto Etanólico....	41
2.8.1.2	Cromatografías de las fracciones obtenidas de la Columna del Subextracto Etanólico.....	42
2.8.1.3	Cromatografías de las Placas Preparativas de las fracciones obtenidas de la Columna del Subextracto Etanólico.....	43
2.8.2	Tratamiento del Subextracto Toluénico.....	43
2.8.2.1	Análisis Cromatográfico del Subextracto Toluénico.....	43
2.8.2.2	Cromatografía en Capa Fina de los Sub-subextractos.....	44
2.8.3	Separación por Cromatografía en Columna del Sub-subextracto de acetato de etilo.....	44
2.8.3.1	Cromatografías de las Fracciones obtenidas de la Columna del Sub-subextracto de Acetato de Etilo.....	45
2.8.3.2	Cromatografías de las Fracciones obtenidas de la Micro Columna del Sub-subextracto de Acetato de Etilo de la fracción #18 a la #20.....	46
2.8.3.3	Cromatografías de las Placas Preparativas de las fracciones obtenidas de la Columna del Sub-subextracto de Acetato de Etilo.....	47
2.8.4	Tratamiento del Subextracto Butanólico .....	49
2.8.4.1	Análisis Cromatográfico de los Sub-subextractos.....	50
2.8.4.2	Separación por cromatografía en Columna del Sub-subextracto Etéreo...	50
2.8.4.3	Cromatografías de las Fracciones obtenidas de la Columna del Sub-subextracto Etéreo.....	50
2.8.4.4	Cromatografías de las Placas Preparativas de las fracciones obtenidas de la Columna del Sub-subextracto Etéreo.....	51
2.9	Placas Cromatográficas del Extracto y Subextracto.....	52
2.9.1	Placas Cromatográficas del Subextracto Etanólico.....	54
2.9.2	Placas Cromatográficas de las fracciones de la Columna Sub-Subextracto de acetato de Etilo.. ..	56

2.9.2.1	Placas Preparativas de las Fracciomes de la Columna del Sub-subextracto de Acetato de Etilo.....	60
2.9.3	Placas Cromatogáficas del Sub-subextracto Etéreo.....	63
2.9.3.1	Placas Preparativas de las Fracciones de la Columna del Sub-subextracto Etéreo.....	64
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>65</b>
3.1	CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA.....	65
3.2	TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	66
3.3	ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA JACARANDA .....	66
3.4	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL SUB-SUBEXTRACTO ETANÓLICO.....	67
3.4.1	Placa preparativa para la unión de las fracciones de la #27 a la#32 del subextracto etanólico.....	68
3.4.2	Cromatografía de la fase clorofórmica y metanólica de la unión de las fracciones#33 a la #35.....	68
3.5	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL SUBEXTRACTO TOLUÉNICO.....	68
3.5.1	Cromatografía del Sub-Subextracto Metanólico.....	69
3.5.2	Cromatografía del Sub-Subextracto de Acetato De Etilo.....	69
3.5.3	Cromatografía de las Fracciones #1 a la #5 del Sub- Subextracto De Acetato De Etilo.....	69
3.5.4	Placa Preparativa de la Fracción #1.....	69
3.5.5	Placa Preparativa de la Fracción #3.....	70
3.5.6	Placa Preparativa de la Fracción #4.....	70
3.5.7	Placa Preparativa de la Fracción #5.....	70
3.5.8	Cromatografía de las fracciones #6 a la #9 del sub- subextracto de acetato de etilo.....	71
3.5.9	Cromatografía de las fracciones #10 a la #14 del sub- subextracto de acetato de etilo.....	71
3.5.10	Placa Preparativa de la Fracció 16, #17.....	71
3.5.11	Cromatografía de las fracciones #1 a la #3 de la Microcolumna de la unión de las fracciones #18 a la #20.....	71
3.5.12	Cromatografía de las fracciones #4 a la #6 de la Microcolumna de la unión de las fracciones #18 a la #20.....	71

3.5.13	Cromatografía de las fracciones #7 a la #9 de la Microcolumna de la unión de las fracciones #18 a la #20.....	72
3.5.14	Cromatografía de las fracciones #10 a la #16 de la Microcolumna de la unión de las fracciones #18 a la #20.....	72
3.6	<b>CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO.....</b>	<b>72</b>
3.6.1	Cromatografía de las fracciones de la Columna.....	73
3.6.2	Placa preparativa del Subextracto etéreo de la unión de las fracciones #1, #2 y #6.....	73
3.6.3	Placa preparativa del Sub-subextracto etéreo de la unión de las fracciones #3, #4, #5.....	73
3.7	<b>POSIBLES ESTRUCTURAS DADAS POR EL UV.....</b>	<b>74</b>
3.7.1	Flavonoides.....	74
3.7.2	Terpenoides.....	74
3.7.2.1	Acido Jacoumárico.....	75
3.7.2.2	Jacaranona.....	76
3.7.2.3	Maetil-jacaranona.....	77
3.7.3	Sesquiterpenolactonas.....	77
3.7.4	Cumarinas.....	78
		79
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>5</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>92</b>

.

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Valores de Absorción para las Bandas BI y BII de los diferentes tipos de Flavonoides.....	24
TABLA No. 2	Determinación del peso en Concentración de Extractos.....	32
TABLA No. 3	Determinación de Propiedades físicas del Extracto.....	39

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Valores de longitud de onda de la fracción #10, #11, #12.....	46
CUADRO No. 2	Valores de longitud de onda de la banda #4 de la fracción #1.....	47
CUADRO No. 3	Valores de longitud de onda de la banda #4, #5 de la fracción #3.	47
CUADRO No. 4	Valores de longitud de onda de la banda #1, #2 de la fracción #4.	48
CUADRO No. 5	Valores de longitud de onda de la banda #1, #2 de la fracción #5.	48
CUADRO No. 6	Valores de longitud de onda de la banda #4 de la unión de la fracción de la #15 a la #17.....	49
CUADRO No. 7	Valores de longitud de onda de la placa preparativa fracción #4, #2, #6.....	51
CUADRO No. 8	Valores de longitud de onda de la banda #3 y #4 de la placa preparativa de la fracción #4 a la 35.....	52
CUADRO No. 9	Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de la Jacaranda ( <i>Jacaranda mimosifolia</i> ).....	66
CUADRO No.10	Cromatografías de las fracciones de columna del subextracto etanólico.....	67
CUADRO No.11	Longitudes de onda calculadas para flavonoides aplicando las reglas de Woodward y Fieser.....	74
CUADRO No.12	Longitudes de onda calculadas para terpenoides aplicando las reglas de Woodward y Fieser .....	75
CUADRO No.13	Longitudes de onda calculadas para sesquiterpenolactonas aplicando las reglas de Woodward y Fieser.....	78
CUADRO No.14	Longitudes de onda calculadas para cumarinas aplicando las reglas de Woodward y Fieser	79

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Árbol de la Jacaranda.....	1
GRÁFICO No. 2	Principales metabolitos presentes en la Jacaranda.....	6
GRAFICO No. 3	Incrementos por cada sustituyente del anillo aromatico.....	25
GRÁFICO No. 4	Aplicación de leyes de Woodward-Fieser.....	26
GRÁFICO No. 5	Preparación del Extracto y Subextractos de la Jacaranda...	40

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Espectros del Sub-subextracto de Acetato de Etilo.....	92
ANEXO No. 2	Espectros de las placas preparativas del Sub-subextracto de acetato de etilo.....	94
ANEXO No. 3	Espectros de las placas preparativas del sub-subextracto etéreo.....	98



## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Cromatografía del extracto y subextractos.....	53
FOTOGRAFÍA No. 2	Cromatografía de las fracciones #1, #4, #5, #14, #15, #17, #19.....	54
FOTOGRAFÍA No. 3	Cromatografía de las fracciones #20, #21, #24, #26, #27, #30, #31.....	54
FOTOGRAFÍA No. 4	Cromatografía de las fracciones #33, #34, #35, #36, #37, #38.....	54
FOTOGRAFÍA No. 5	Cromatografía de la fase clorofórmica y metanólica.....	55
FOTOGRAFÍA No. 6	Cromatografía de las fracciones #39, # 40, # 41.....	55
FOTOGRAFÍA No. 7	Placa preparativa de la fracción #27 a la #32.....	55
FOTOGRAFÍA No. 8	Cromatografía de la placa preparativa de la fracción #27 a la#32.....	55
FOTOGRAFÍA No. 9	Cromatografía del Subextracto toluénico.....	56
FOTOGRAFÍA No. 10	Cromatografía del sub-subextracto metanólico.....	56
FOTOGRAFÍA No. 11	Cromatografía del sub-subextracto de acetato de etilo.....	56
FOTOGRAFÍA No. 12	Cromatografía de las fracciones #1 a la #5.....	57
FOTOGRAFÍA No. 13	Cromatografía de las fracciones #6 a la #9.....	57
FOTOGRAFÍA No. 14	Cromatografía de las fracciones #10 a la #15.....	57
FOTOGRAFÍA No. 15	Cromatografía de las fracciones #15 a la #17.....	58
FOTOGRAFÍA No. 16	Cromatografía de las fracciones #18 a la #20.....	58
FOTOGRAFÍA No. 17	Cromatografía de la microcolumna fracciones #1 a la #3..	58
FOTOGRAFÍA No. 18	Cromatografía de la microcolumna fracciones #4 a la #6..	59
FOTOGRAFÍA No. 19	Cromatografía de la microcolumna fracciones #7 a la #9..	59
FOTOGRAFÍA No. 20	Cromatografía de la microcolumna fracciones #10 a la #16.....	59
FOTOGRAFÍA No. 21	Placa preparativa de la fracción #1.....	60
FOTOGRAFÍA No. 22	Cromatografía de la Placa preparativa fracción #1.....	60
FOTOGRAFÍA No. 23	Placa preparativa de la fracción #3.....	60
FOTOGRAFÍA No. 24	Cromatografía de la Placa preparativa fracción #3.....	60
FOTOGRAFÍA No. 25	Placa preparativa de la fracción #4.....	61
FOTOGRAFÍA No. 26	Cromatografía de la Placa preparativa fracción #4.....	61
FOTOGRAFÍA No. 27	Placa preparativa de la fracción # 5.....	61
FOTOGRAFÍA No. 28	Cromatografía de la Placa preparativa fracción #5.....	61
FOTOGRAFÍA No. 29	Placa preparativa de la unión de las fracciones #15 a la #17.....	62
FOTOGRAFÍA No. 30	Cromatografía de la Placa preparativa de la fracción #15 a la #17.....	62
FOTOGRAFÍA No. 31	Cromatografía del Sub-subextracto etéreo y de acetona...	63
FOTOGRAFÍA No. 32	Cromatografía de las fracciones de la columna #1, #2,	

	#5,#8,#13,#14;#18,#20.. .....	63
FOTOGRAFÍA No. 33	Cromatografía de la unión de las fracciones de la columna.....	63
FOTOGRAFÍA No. 34	Cromatografía de la unión de las fracciones de la columna.....	63
FOTOGRAFÍA No. 35	Placa preparativa de la unión de las fracciones #1,#2,#6...	64
FOTOGRAFÍA No. 36	Cromatografía d la placa preparativa unión de la fracción#1,#2,#6.....	64
FOTOGRAFÍA No. 37	Placa preparativa de la unión de las fracciones #3,a la #5.	64
FOTOGRAFÍA No. 38	Cromatografía d la placa preparativa unión de la fracción #3,a la #5.....	64
FOTOGRAFÍA No. 39	Columna cromatográfica.....	53
FOTOGRAFÍA No. 40	Microcolumna.....	53

## INTRODUCCIÓN

Las plantas pueden ser utilizadas como fuentes terapéuticas de varias maneras. Pueden ser utilizadas como té u otros remedios hechos en casa, como extractos crudos o fracciones concentradas en preparaciones farmacéuticas tales como tinturas, extracto fluído, polvos, tabletas y cápsulas cuando son consideradas como preparaciones fitofarmacéuticas o medicinas herbolarias. Finalmente las plantas pueden ser sujetas a extracciones sucesivas y procedimientos de purificación para aislar compuestos de interés, los cuales pueden ser ellos mismos los activos y ser usados directamente como droga.

El Gualanday (*Jacaranda mimosifolia*), es utilizado por la población de Colombia como planta medicinal ya que es uno de los remedios que tiene fama para curar las afecciones sífilicas, combate afecciones cutáneas, neuralgias y dolores de los huesos. También cura las hemorroides, las várices, las diferentes afecciones del hígado, los eczemas, forúnculos y todo aquello que esté relacionado con las impurezas de la sangre, esta es una de las razones para realizar el estudio de la separación de los metabolitos secundarios.

Casi todas las especies del género *Jacaranda* se utilizan frecuentemente como plantas medicinales en Colombia, además se les atribuye más o menos iguales propiedades terapéuticas. Las especies relacionadas son: Abey o *J. coreulea*, que crece en forma espontánea en el Caribe, Grises *J. filicifolia* originaria de Brasil y Gualanday o Tarco *J. mimosifolia* existentes en el país.

*Jacaranda mimosifolia*, es un árbol subtropical oriundo se Sudamérica (Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay) y ampliamente extendido a causa de sus bellas y duraderas flores azules. Alcanza hasta los 10 metros de altura. Crece como preferencia en zonas húmedas. La floración se realiza en primavera-verano.

Las soluciones tónicas son preparaciones concentradas de consistencia líquida, sólida o intermedia, obtenida normalmente a partir de materia vegetal. Para algunas preparaciones, la materia a extraer puede requerir un tratamiento previo, como por ejemplo, inactivación de enzimas, trituración o desengrasado. Los extractos se preparan por maceración, percolación o por otros métodos validados que utilizan etanol u otro disolvente adecuado. Después de la extracción, si es necesario, se eliminan las sustancias no deseadas.

Generalmente se prepara un extracto alcohólico obtenido por maceración de las hojas, tallos y flores en alcohol y luego se realiza un tamizaje fitoquímico, que es la base para determinar los grupos fotoquímicos presentes.

Se planteó los siguientes objetivos: realizar la separación y la posible identificación de metabolitos secundarios de la Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*) con fines de aporte a una técnica de análisis químico, identificar taxonómicamente a la Jacaranda del Ecuador, preparar los extractos y sub extractos de la Jacaranda, extraer y purificar los metabolitos secundarios de los extractos y sub extractos obtenidos, por procesos físicos cromatográficos y realizar la posible identificación de los metabolitos secundarios encontrados por métodos cromatográficos y espectrofotométricos.

Fue posible separar los metabolitos por fraccionamiento del extractos y sub extractos, mediante la extracción con solventes orgánicos, separando cromatográficamente en capa fina, en columna y finalmente se realizó cromatografía en capa fina preparativa y a continuación se pudo verificar la pureza y su determinación por espectroscopia UV.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 JACARANDA (*Jacaranda mimosifolia*)



GRÁFICO No.1 ARBOL DE JACARANDA (*Jacaranda mimosifolia*).

#### 1.1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

América Meridional, natural de la Selva Tucumano-Boliviana, árbol semicaduco, de segunda magnitud, presenta hojas ligeras y elegantes, compuestas y bipinadas, con folíolos pequeños que recuerdan a las Leguminosas, de color verde vivo. Fruto leñoso, dehiscente, plano, similar a castañuelas y contienen pequeñas semillas aladas. Flores llamativas, numerosas, el color varía del azul claro al violáceo, también hay variedades de flores blancas. La floración se realiza en primavera-verano, muy difícil encontrarlas en Bonsai, ya que florece en ramas de 2 o 3 años.

Presenta una corteza lisa en su juventud y rugosa en la vejez. Las variedades más frecuentes son, Jacarandá Cuspidifolia: hasta 10 mts., flor azul vivo, Jacarandá Jazminoides: forma arbustiva, flor color púrpura oscuro y Jacarandá Ovalifolia: llega a los 6 mts. Se lo conoce como “Llama Azul “,, flores azul brillante con una variedad alba de flores blancas (25).

El jacarandá está distribuido en Brasil, Bolivia, Paraguay y también en el Noroeste argentino. Habita pocas regiones limítrofes del Chaco Boreal, tales como los cañones de Cerro León y bajadas cerca de Filadelfia.

En Paraguay: básicamente en todo el país, encontrándose en toda la zona oriental, mientras que en la zona occidental o Chaco, va decreciendo su aparición según se hace más seca o árida la zona.

Como árbol ornamental es cultivado en numerosas partes del mundo, incluso en los Estados Unidos. Crece con preferencia en zonas húmedas y forma en el Chaco paraguayo juntamente con Urunday, Para todo y especies de Quebracho, isletas de árboles grandes (28).

### 1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La copa del jacarandá no tiene una forma uniforme, algunas veces en forma de una sombrilla, algunas veces de forma piramidal, pero nunca densa. En general, forma una copa ovoidal e irregular. La estructura es de ramificación principal extendida. La copa alcanza un diámetro de 4 a 6 m, proyectando una sombra de mediana intensidad.

El **tallo** principal tiene una forma algo torcida. El tronco tiene una altura de 6 a 9 m y un diámetro de 40 a 70 cm. El jacarandá alcanza 8 a 12 m de altura. Es un árbol semidecíduo de crecimiento medio y una longevidad de más de 100 años.

**Hojas** grandes de 30 a 50 cm de longitud; **hojas** compuestas, opuestas, **bipinnadas**, con hojuelas de 25 a 30 pares de folíolos pequeños de forma ovaloblonga, apiculados; de color verde claro, textura de su superficie lisa pubescente.

**Flores** grandes de 4 a 5 cm; en panículas terminales de 20 a 30 cm, racimos erectos de flores muy vistosas. Son de forma tubular, acampanada y con lóbulos desiguales; color azul violeta.

**Fruto** leñoso, dehiscente, plano, en forma de castañuela, con gran cantidad de semillas pequeñas; cápsula loculicida de 6 cm; oblonga y orbicular pardo oscuro. Los frutos aparecen a finales de otoño y permanecen todo el año (28).

### 1.1.3 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

Observamos la taxonomía y morfología de la Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*).

**Nombre común:** Jacaranda, Gualanday o Tarco

**Nombre Científico:** *Jacaranda mimosifolia*

**Familia:** Bignoniaceae

**Género:** Jacaranda

**Especie:** *J. mimosifolia*

**Clase:** Magnoliopsida

**Nombres Comunes:** jacaranda, tarco, gualanday, palisandro (aunque no debe confundirse con el palisandro africano). (25)

### 1.1.4 FORMAS DE UTILIZACIÓN

Algunas de las formas terapéuticas son la decocción, la infusión, el jarabe y el polvo.

#### 1.1.4.1 Usos en Medicina Tradicional

La Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), es utilizada por la población como planta medicinal ya que es uno de los remedios que tiene más fama para curar las afecciones sifilicas,

combate afecciones cutáneas, neuralgias y dolores de los huesos. También cura las hemorroides, las várices, las diferentes afecciones del hígado, los eczemas, forúnculos y todo aquello que tenga que ver con las impurezas de la sangre.

- La infusión y tintura de flores, hojas y corteza se usa por vía oral para el tratamiento de disentería amebiana y otras afecciones gastrointestinales agudas.
- La decocción de la raíz se emplea como diaforético.
- El jarabe de la raíz se utiliza especialmente contra las enfermedades venéreas y la forunculosis, además se usa contra las afecciones del hígado, las hemorroides, las varices los eczemas e impurezas de la sangre.
- La decocción de la corteza o de las raíces se utiliza en lavados para cicatrizar úlceras, artritis, várices, varicela, llagas rebeldes.
- Por vía oral se usa para curar el paludismo, la sífilis, blenorragia, diabetes, dolor en los huesos, reumatismo y artritis, en forma de gargarismos, para sanar las afecciones de la garganta.
- La infusión de 30g de hojas en 1L de agua tomando 1 vaso diario, se recomienda como depurativo de la sangre, contra el reumatismo.
- La decocción o el jarabe de las hojas o de la corteza, tomada por vía oral o aplicada en baños calientes sobre la parte afectada, se recomienda para aliviar la sífilis así como otras enfermedades venéreas, cutáneas o reumáticas, la soriasis.
- El polvo de las hojas secas, espolvoreando sobre las úlceras, se emplea como desinfectante de heridas abiertas.

Se le atribuye propiedad antiséptica, antiamebiana, antitumoral y espasmolítica.

La droga aprobada es las hojas aunque la corteza es la droga más rica en principios activos.

(26)(27)(28)



### 1.1.4.2 Recomendaciones

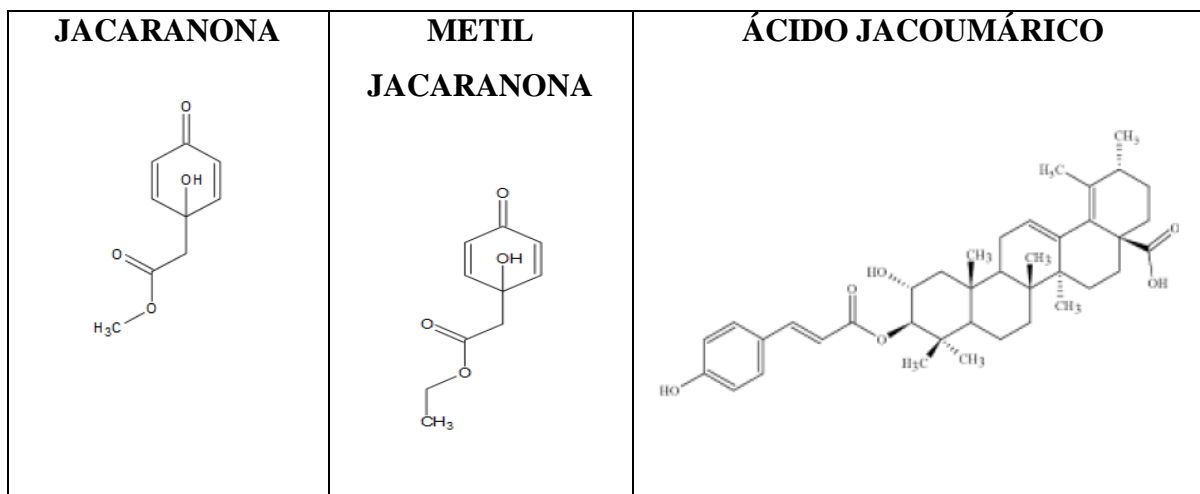
Casi todas las especies del género *Jacaranda* se utilizan frecuentemente como plantas medicinales en Colombia, asimismo, se les atribuye más o menos iguales propiedades terapéuticas.

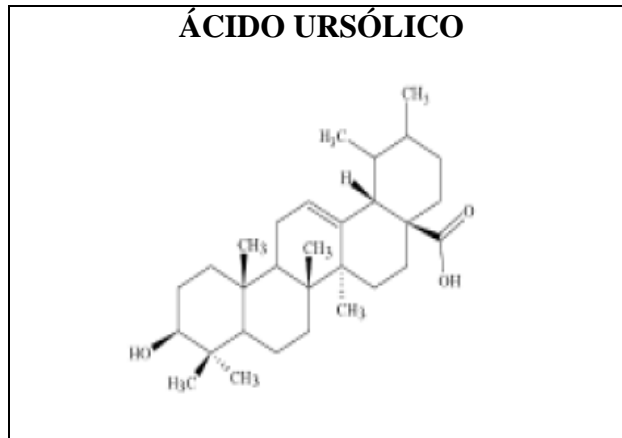
### 1.1.4.3 Advertencia y Contraindicaciones

En ningún caso se pueden ingerir preparados mezclados con yoduro de potasio, estos son únicamente para uso externo o lavados. En general el uso debe ser externo ya que el gualanday es citotóxico.

### 1.1.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los principales metabolitos reportados a nivel del género de la *Jacaranda* es el ácido jacarándico, jacaranona, ácido jacoumárico, ácido ursólico y otras sustancias como los flavonoides. (30)





**GRÁFICO No.2 PRINCIPALES METABOLITOS PRESENTES EN LA JACARANDA**

### 1.1.6 TOXICIDAD

El extracto etanólico muestra una moderada toxicidad por la presencia de la jacaranona. (32)

## 1.2 RECOLECCIÓN, MUESTREO, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA SU PROCESAMIENTO.

### 1.2.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

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

- No tenga infecciones microbianas dado que las mismas pueden inducir cambios en los metabolitos producidos por la planta.
- Recolectarse en lugares alejados de fuentes de contaminación o fumigadas con compuestos químicos.
- Asegurarse de la especie con la que se va a trabajar, así como de la identificación, recolección y secado.

## 1.2.2 MUESTREO

El objetivo es obtener una muestra representativa del total, para realizar el análisis y determinar los niveles de los diversos componentes de la materia vegetal, como minerales, macro y micronutrientes, o residuos de plaguicidas permanentes en los vegetales. (8)

Se deben utilizar envases nuevos y en perfecto estado de limpieza.

### 1.2.2.1 Fragmentación

Es un proceso mecánico donde se reducen sustancias sólidas a porciones menores o partículas. El objetivo es aumentar la superficie de contacto de un solvente adecuado con el material a extraer para facilitar la mejor y mayor disolución de principios activos. (6)

### 1.2.2.2 Transporte y conservación

Para el transporte y almacén, la muestra se mantendrá en las condiciones más parecidas a las de campo. Pueden ser refrigeradas, conservadas en bolsas de papel o de plástico, pero en estas el tiempo de permanencia ha de ser el mínimo posible, ya que las reacciones enzimáticas pueden llevar a cambios en la estructura química.(6)

### 1.2.2.3 Limpieza y descontaminación

La descontaminación es necesaria para eliminar sustancias no nativas si se determina que el tejido foliar está cubierto de polvo o de materiales de fumigación. Se debe utilizar solución de hipoclorito de sodio a 10 ppm/ o 2 gotas de cualquier hipoclorito por cada litro de agua, no maltratará la planta durante este proceso. (6)

### 1.2.3 EXTRACCIÓN

Antes de empezar un proceso extractivo en una escala piloto o industrial, se debe definir la selectividad del solvente a ser usado en el proceso. Dependiendo del propósito al que se destine se puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con una determinada característica.

En el primer caso, normalmente se usa un solvente de naturaleza general, de alta polaridad, como el alcohol etílico o el metanol. En el segundo caso se emplea un solvente selectivo de menor polaridad, como el hexano que solo extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares.

La escogencia del solvente de extracción, así como la permanencia en la composición química de la materia vegetal, representan dos aspectos de suma importancia en cualquier proceso de fabricación, bien sea de productos fitoterapéuticos o bien sea de sustancias naturales aisladas. (2)

#### **1.2.3.1 Maceración**

Consiste en poner en contacto la droga y el solvente, durante varios días. Es un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente, y depende de factores que estén unidos a la droga, como por ejemplo, su naturaleza, el tamaño de partícula, su contenido de humedad y cantidad y factores que están relacionados con el solvente como la selectividad y la cantidad. (4)

#### **1.2.3.2 Percolación o lixiviación**

Consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva de la droga con el

solvente siempre renovado, de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto. (4)

### **1.2.3.3 Clasificación de los extractos vegetales**

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

- Extractos fluídos o líquidos
- Extractos semisólidos o blandos
- Extractos secos (29)

## **1.3 TAMIZAJE FITOQUIMICO**

### **1.3.1 FUNDAMENTO**

Se basa en pruebas preliminares sencillas y rápidas que permiten detectar cualitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos. Se ayudan de la micro química para evidenciar estos grupos de constituyentes mediante la formación de precipitados, coloraciones, etc.

Estas reacciones se caracterizan por ser selectivas para las clases o grupos de compuestos que se investigan, son simples y rápidas, detectan la mínima cantidad posible y utilizan un mínimo de equipo de laboratorio (11) (12).

#### **1.3.1.1 Metodología en el Análisis Fitoquímico**

En términos generales un análisis fotoquímico debe comprender cuatro etapas bien definidas:

- Recolección y clasificación botánica de la especie en estudio.
- Extracción, separación y purificación de constituyentes químicos.
- Determinación estructural, y
- Ensayos farmacológicos (20).

Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados de las pruebas, ya que en ocasiones la actividad biológica está dada por el fitocomplejo y en otras por un determinado compuesto conocido como marcador.(12)

Comprende los siguientes ensayos:

### 1.3.2 REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN

#### 1.3.2.1 Ensayo de Dragendorff

Utilizado para detectar la presencia de alcaloides se debe tomar en cuenta que si el extracto está disuelto en solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de HCl al 1% en agua.

Si se trata de un extracto acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de HCl concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). (11) (4)

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

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

### **1.3.2.2 Ensayo de Wagner**

Se parte de la solución ácida, de igual, a esta solución, se le adiciona 2 o 3 gotas de reactivo Wagner y se reporta los resultados en intensidad determinada. (11) (4)

### **1.3.2.3 Ensayo de Mayer**

Se parte de la solución ácida. A esta solución, se le adiciona 2 ò 3 gotas del reactivo de Mayer y se reporta los resultados. (4)

### **1.3.2.4 Ensayo de Lieberman-Buchard**

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroide, ambos tipos de productos deben poseer un núcleo de androstrano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de cloroformo. Se adiciona 1 ml de anhídrido acético y se mezcla bien.

Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración. (4)

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

El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

Para realizar este ensayo no debe haber agua en el medio de reacción pues está con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

La reacción de Liebermann-Burchard es también utilizada para diferenciar las estructuras esteroides de esteroidales, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura.

Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes. (4)

#### **1.3.2.5 Ensayo de Borntrager**

Es útil para detectar la presencia de quinonas.

Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de cloroformo. Se adiciona 1 ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua.

Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.(4)

El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) , o rojo para lo cual se reporta (+++).

#### **1.3.2.6 Ensayo de Catequinas**

Para ello, tomar de la solución alcohólica obtenida, una gota con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. (4)

La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica positiva la prueba.



### **1.3.2.7 Ensayo de Espuma**

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

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y es persistente por más de 2 minutos.(4)

### **1.3.2.8 Ensayo de Benedict**

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos de un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua).

Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se le añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general. (4)

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

### **1.3.2.9 Ensayo de Shinoda**

Permite reconocer la presencia de flavonoides en el extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de HCl concentrado y un pedacito de

cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

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

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.(4)

### 1.3.2.10 Fehling

Permite reconocer en los extractos la presencia de azúcares reductores. Para ello si no se encuentra agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redissolver en 1-2 mL de agua. Se adiciona 2 mL de reactivo y se calienta en baño de agua de 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. (4)

## 1.4 HIDRÓLISIS

Hidrólisis (del griego: ὑδωρ, *hudōr*, ‘agua’; y λύσις, *lysis*, ‘ruptura’ o ‘disociación’) es una reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar parte de otra especie química. Esta reacción es importante por el gran número de contextos en los que el agua actúa como disolvente.

Al ser disueltos en agua, los iones constituyentes de una sal se combinan con los iones hidronio u oxonio,  $\text{H}_3\text{O}^+$  o bien con los iones hidroxilo,  $\text{OH}^-$ , o ambos. Dichos iones proceden de la disociación o autoprotólisis del agua. Esto produce un desplazamiento del equilibrio de disociación del agua y como consecuencia se modifica el valor del Ph.



Los iones  $A^-$ ,  $BH^+$  procedentes de ácidos débiles AH o bases débiles B se hidrolizan por acción del agua, dependiendo el grado de la reacción de la debilidad del ácido o de la base, procedentes de ácidos o bases fuertes no se hidrolizan apreciablemente. Así las sales obtenidas a partir de ácidos y bases fuertes no se hidrolizan, las obtenidas a partir de ácidos y bases débiles se hidrolizan de forma que el pH depende de las dos constantes, y en las obtenidas a partir de una combinación de ácido y base en las que solo uno es fuerte, será el fuerte el que determine el pH. (4)

## 1.5 CROMATOGRÀFIA EN CAPA FINA

### 1.5.1 DEFINICIÓN DE CROMATOGRAFÍA

La I.U.P.A.C define la a la cromatografía de forma más amplia como:

“Método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película etc. (20)

### 1.5.2 CONCEPTO DE R<sub>F</sub>

R<sub>f</sub> = es el registro y se define como la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación / distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.

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

El valor de R<sub>f</sub> depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de absorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación,

etc.). Tiene una reproducibilidad de +/- 20%, por lo que es mejor correr duplicados de la misma placa. (19)

### 1.5.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCf o TLC)

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas. (20)

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. (20)

Los tamaños de la placa para CCf convencional son de 20x20; 10x20 y 2x5 cm.

#### 1.5.3.1 Eluyentes más comunes para cromatografía en capa fina (20)

- Acetato de etilo
- Acetona
- Ácido acético
- Ciclohexano
- Cloroformo\*
- Diclorometano
- Dietil-eter, t-butil-eter
- Etanol
- Éter de petróleo
- Éter dietílico

- Isopropanol
- Metanol
- N-pentano, n hexano
- Tetracloruro de carbono\*
- Tolueno
- Benceno\*

\*compuestos cancerígenos

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

### **1.5.3.2 Reveladores más comunes para cromatografía en capa fina**

Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles; las incoloras pueden revelarse mediante: (20)

- Luz UV: si la sustancia absorbe luz ultravioleta, se puede usar una fase estacionaria impregnada con un indicador fluorescente (F254 ó F366).
- La introducción de la placa en vapores de yodo.
- El rocío con una solución de magnesio/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1(dentro de un compartimento especialmente protegido y bajo una campana de extracción de gases).
- El reactivo de Sulfato de Cerio, nos permite identificar flavonoides.
- Para la identificación de Terpenos, se utiliza Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- El reactivo de Dragendorff y Wagner son utilizados para la identificación de alcaloides, produciendo manchas anaranjadas.
- Después calentar intensamente, por ejemplo, con un mechero hasta carbonizar los compuestos.

### **1.5.3.3 Adsorbentes más comunes para Cromatografía en Capa Fina**

- Silica-gel (se utiliza en el 80% de las separaciones).

- Oxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra ó básica).
- Celulosa (Nativa o micro-cristalina).

Para la selección de adsorbentes se debe tomar las siguientes consideraciones:

- Polaridad
- Tamaño de partícula (diámetro, área superficial)
- Homogeneidad pureza (20)

#### 1.5.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN UNA SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

- Temperatura: a menor temperatura las sustancias se adsorben más en la fase estacionaria.
- La cromatografía debe llevarse a cabo en un área sin corriente de aire.
- Limpieza de las placas: muchas placas están contaminadas con grasa o agentes plastificantes o adhesivos. Para el trabajo a pequeña escala éstas deben limpiarse corriendo primero una mezcla de cloroformo y metanol y después dejar secar completamente antes de aplicar la muestra.
- Pureza de los disolventes. (20)

#### 1.5.5 TÉCNICA PARA APLICACIÓN DE MUESTRAS

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

Una vez colocado el toque se deja secar para evaporar el disolvente, de forma que en la placa, solo quedará la muestra a analizar. (20)

### 1.5.6 CONSTANTE DE DISTRIBUCIÓN

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

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

$$K = C_S / C_M$$

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

### 1.5.7 FACTOR DE CAPACIDAD

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

$$k_A' = k_A \cdot V_S / V_M$$

Donde  $k_A$  es la constante de distribución;  $V_S$  es el volumen de la fase estacionaria y  $V_M$  es el volumen de la fase móvil. (20)

### 1.5.8 FACTOR DE SELECTIVIDAD

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

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

$$\alpha = K_A / K_B$$

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

### 1.5.9 EFICIENCIA DE UNA COLUMNA

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

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

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

Se utilizan dos términos a fines con frecuencia con medida cuantitativa de la eficacia de una columna cromatográfica:

- La altura equivalente de plato teórico o  $H$
- El número de platos teóricos  $N$

Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = L/H$$

Donde  $L$  es la longitud (centímetros), del relleno de la columna.

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuando mayor es el número de platos, y cuando menor es la altura de plato. (9)



### 1.5.10 RESOLUCIÓN DE LA COLUMNA

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

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

Donde:  $W_A$  y  $W_B$  son los anchos de las bases de los picos o bandas A y B respectivamente.(9)

## 1.6 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

### 1.6.1 ESPECTROMETRÍA

La espectrometría surgió con el estudio de la interacción entre la radiación y la materia como función de la longitud de onda ( $\lambda$ ).

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

La espectrometría a menudo se usa en física y química analítica para la identificación de sustancias mediante el espectro emitido o absorbido por las mismas. (9) (10)

### 1.6.2 ESPECTROMETRÍA ULTRAVIOLETA – VISIBLE

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-VIS implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano. (10)

En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas. Está técnica es complementaria de la espectrometría de fluorescencia, que trata con transiciones desde el estado basal al estado excitado. (10)

### 1.6.3 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. (10)

Soluciones de iones metálicos de transición: las soluciones de iones metálicos de, transición pueden ser coloreadas (es decir, absorben la luz visible) debido q ue los electrones en los átomos de metal se pueden excitar desde un estado electrónico a otro. El color de las soluciones de iones metálicos se ve muy afectado por la presencia de otras especies, como algunos aniones o ligandos. (10)

Compuestos orgánicos: Los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría UV. El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico. (19) (10)

Aunque los complejos de transferencia de carga también dan lugar a colores, éstos son a menudo demasiado intensos para ser usados en mediciones cuantitativas.(13)

La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría UV/VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución. (13)

#### 1.6.4 ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE

El instrumento utilizado en la espectrometría ultravioleta- visible se llama espectrofotómetro UV-Vis. Mide la intensidad de la luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra ( $I_0$ ). La relación  $I/I_0$  se llama transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje (%T). La absorbancia (A) se basa en la transmisión: (15)

$$A = -\log (\%T)$$

Las partes básicas de un espectrofotómetro son una fuente de luz (a menudo una bombilla incandescente para las longitudes de onda visibles, o una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta), un soporte para la muestra, una rejilla de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la luz y un detector. (15)

#### 1.6.5 ESPECTRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Un espectro ultravioleta- visible es esencialmente un gráfico de absorbancia de luz frente a una longitud de onda en el rango de ultravioleta o la luz visible. Este espectro puede ser producido directamente con los espectrofotómetros más sofisticados. O bien pueden registrarse de una sola longitud de onda con los instrumentos más simples.

La longitud de onda se representa con el símbolo  $\lambda$ . Del mismo modo para una determinada sustancia, puede hacerse un gráfico estándar del coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) frente a la longitud de onda ( $\lambda$ ). Este gráfico estándar sería efectivamente “la concentración corregida” y por lo tanto, independiente de la concentración. Para una sustancia determinada, la longitud de onda en la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro se llama  $\lambda_{\max}$ , y se pronuncia “lambda-max”. (15)

### 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 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) insaturados.
- Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en los rangos de 240-285 nm (Banda II) y 300 – 550 nm (Banda I). Podría indicarse como características de dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavononas. (11)

**TABLA No 1. VALORES DE ABSORCIÓN PARA LAS BI Y BII DE LOS DIFERENTES TIPOS DE FLAVONOIDES**

<b>BANDA II, nm</b>	<b>BANDA I, nm</b>	<b>TIPO DE FLAVONOIDE</b>
<b>250-280</b>	310-350	Flavonas
<b>250-280</b>	330-360	Flavonoles (3OH Substituido)
<b>250-280</b>	350-385	Isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxo)
<b>275-295</b>	300-330	Isoflavonas, dihidroflavonoles
<b>230-270 (baja intensidad)</b>	340-390	Chalconas
<b>230-270 baja intensidad)</b>	380-430	Auronas
<b>270-280</b>	465-560	Antocianidinas, antocianinas

FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANALISIS FITOQUIMICO

#### 1.6.6 REGLAS DE WOODWARD – FIESER

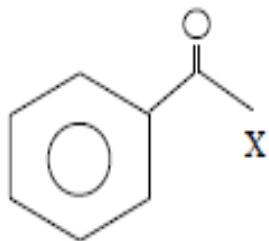
Las reglas de Woodward – Fieser son un conjunto de observaciones empíricas que pueden utilizarse para predecir la longitud de onda de la absorción ( $\lambda$  max) UV-Visible, para compuestos orgánicos conjugados como dienos y cetonas.(6)

Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV-Visible no es, sin embargo, una prueba específica para ningún determinado, la naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos así como las variaciones en anchura de la hendidura (ancho de banda efectivo) en el espectrofotómetro.

Las reglas de Woodward- Fieser, son un conjunto de observaciones empíricas que pueden utilizarse para predecir la  $\lambda_{\max}$ , la longitud de onda de la absorción UV-Vis, para compuestos orgánicos conjugados como dienos y cetonas. (6)

Ejemplo: Aplicación de las reglas de Woodward-Fieser en cetonas

Sistema Básico:

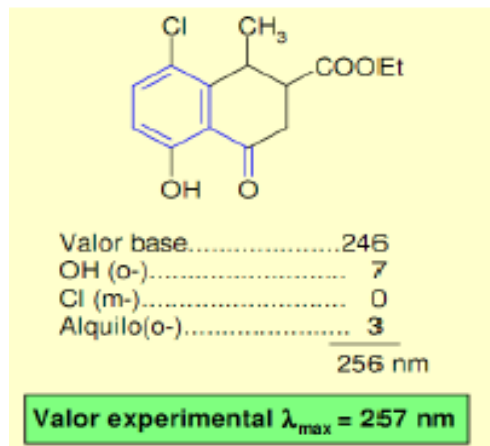


X= H	250 nm
Alquilo, cicloalquilo	246 nm
OH	230 nm
OR	230 nm

GRÁFICO No. 3 INCREMENTOS POR CADA SUSTITUYENTE DEL ANILLO AROMÁTICO.

	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>
<i>Alquilo, cicloalquilo</i>	3	3	10
<i>-Cl</i>	0	0	10
<i>-Br</i>	2	2	15
<i>-OH, OR</i>	7	7	25
<i>-O<sup>+</sup></i>	11	20	78
<i>-NH<sub>2</sub></i>	13	13	58
<i>-NMe<sub>2</sub></i>	20	20	85
<i>-NHCOMe</i>	20	20	45

GRÁFICO No. 4 APLICACIÓN DE LEYES DE WOODWARD-FIESER



Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse, con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV-Vis no es, sin embargo, una prueba específica para ningún compuesto determinado. La naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos, así como las variaciones en la anchura de la hendidura (ancho de la banda efectivo) en el espectrofotómetro. (6)

## **CAPITULO II**

### **2. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN**

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

#### **2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **2.2.1 OBTENCIÓN DEL VEGETAL**

Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*) se adquirió en la ciudad de Riobamba, en las calles Argentinos y Carlos Zambrano sector del “Hotel el Galpón”.

##### **2.2.2 EQUIPOS**

- Estufa de circulación de aire Memmert
- Balanza analítica Boeco Germany
- Rotavapor Buchí R 110
- Desecador
- Peachimetro
- Reverbero
- Bomba de vacío Vacum Pressure Pump 115 VAC -60 Hz
- Centrifuga Dynac CA

- Refrigerador
- Sorbona
- Cámara digital
- Computadora
- Espectrofotómetro UV 1603 Shimadzu
- Atomizador (Equipo de revelado cromatográfico).

### 2.2.3 MATERIALES DE LABORATORIO

- Vaso de precipitación 100 ml
- Vaso de precipitación 50 ml
- Balón esmerilado sin base de 250 ml
- Balón esmerilado sin base de 100 ml
- Capilares
- Cronómetro
- Cuaderno de apuntes
- Cuba de vidrio
- Émbolo de succión
- Embudo de filtración
- Embudo de separación de 250 ml
- Envase de vidrio transparente de 500 ml
- Estilete
- Frasco de vidrio
- Botellas oscuras
- Gradillas para tubos de ensayo
- Guantes descartables
- Manguera
- Erlenmeyer de 250 ml
- Papel aluminio
- Papel filtro



- Papel toalla
- Pera de succión
- Pipetas varias
- Piseta
- Placas cromatográficas 10\*20 cm
- Placas cromatográficas 10\*40 cm
- Probeta de 100ml
- Probeta 10ml
- Reverbero electrónico
- Termómetro
- Tijeras

#### 2.2.4 REACTIVOS

- Acetato de etilo
- Cloroformo
- Butanol
- Metanol
- Etanol
- Ácido Acético
- Ácido clorhídrico
- Ácido fórmico
- Ácido sulfúrico
- Agua destilada
- Cloruro férrico
- Ácido sulfúrico vainillina
- Reactivo de Wagner
- Alcohol
- Vapores de Yodo
- Amoniaco

- Sulfato de Cerio

## **2.3 FACTORES DE ESTUDIO**

**Los factores de estudio de esta investigación fueron:**

- Identificación taxonómica de la Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*).
- Eliminación de hojas dañadas, lavado del vegetal y secado.
- Preparación del extracto alcohólico de las ramas, hojas y flores de la Jacaranda.
- Fraccionamiento del extracto (total) en subextractos (toluenico, butanólico y etanólico).
- Condiciones de separación de los metabolitos secundarios presentes en la solución alcohólica.
- Análisis espectrofotométrico de los metabolitos presentes en los subextractos.

## **2.4 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA**

Se tomaron muestras completas de la especie en estudio de la Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*) y se llevaron al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien certificó el ejemplar, comprobando así que se trata de una especie introducida de Colombia.

## **2.5 METODOLOGÍA DE LA PREPARACIÓN DE MUESTRA SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

### **2.5.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO**

El extracto alcohólico de la Jacaranda fue obtenido por el método de maceración.

**Procedimiento:**

- Identificar física y taxonómicamente a la Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*).
- Eliminar contaminantes, lavar.
- Trocear tanto las ramas, hojas y flores de la Jacaranda.
- Pesar una cantidad de la muestra de jacaranda (troceada) en un recipiente de vidrio.
- Adicionar alcohol etanólico al 96% sobre la muestra hasta cubrir la muestra, dejar en reposo 72 h.
- Filtrar, concentrar y determinar las propiedades físicas.
- Este filtrado se recoge en un recipiente pesado para determinar el volumen y peso.

## 2.5.2 PREPARACIÓN DE SUBEXTRACTOS

La maceración contiene numerosos compuestos de difícil purificación, razón fundamental para preparar subextractos por extracción con solventes inmiscibles.

### 2.5.2.1 Subextracto Toluénico

- A la solución alcohólica concentrar, pasar a un embudo de separación.
- Añadir un volumen igual de tolueno agitar por varios minutos dejar en reposo.
- Separar la solución alcohólica (fase superior) de la solución toluénica (fase inferior) repetir el proceso hasta tener incolora la fase toluénica repetir cuantas veces sean necesarias.
- A la solución clorofórmica recoger en un balón esmerilado pesado y llevar a sequedad a presión reducida y pesar.

### 2.5.2.2 Subextracto Butanólico

- A la fase superior alcohólica agregar un volumen de butanol y llevar al embudo de separación

- Agitar levemente sin que se produzca emulsión para luego dejar en reposo.
- Separar la solución alcohólica (fase inferior) de la solución butanólica (fase superior) repetir cuantas veces sean necesarias hasta tener incolora la fase butanólica.
- Las fases butanólicas recoger en un balón esmerilado pesado y llevar a concentración a sequedad por destilación directa y pesar.

### 2.5.2.3 Subextracto etanólico

- Recoger el residuo de todas las extracciones realizadas anteriormente y esta solución llevar a sequedad en un balón previamente limpio, seco, pesado y concentrar hasta sequedad. Pesar

**TABLA No 2. DETERMINACIÓN DEL PESO EN CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS**

<b>Extractos</b>	<b>W<sub>1</sub> Balón Vacío</b>	<b>W<sub>2</sub> Balón Vacío + Muestra</b>	<b>% de Muestra</b>
Extr. Alcohólico Total	40.9256	45.9576	5.032g
Subextr. Toluénico	40.9527	41.6201	0.667 g
Subext. Butanólico	40.8190	41.5079	0.688 g
Subext. Etanólico	41.0501	41.8597	0.809 g

## 2.6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA SOLUCIÓN ETANÓLICA

### 2.6.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF (ALCALOIDES)

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

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

### 2.6.2 ENSAYO DE WAGNER (ALCALOIDES)

Adicionar dos o tres gotas del reactivo de Wagner y se reporta los resultados de igual forma

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

### 2.6.3 ENSAYO DE LIEBERMAN-BUCHARD (ESTEROLES Y/O ESTEROIDES)

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

Se adiciona 1 ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración.

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

Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes

### 2.6.4 ENSAYO DE BALJET (CUMARINAS)

Para detectar la presencia de Coumarinas.

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento láctónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos láctónicos pueden dar positivo al ensayo.

Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1 mL de reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++, +++) respectivamente.

#### 2.6.5 ENSAYO DE CATEQUINAS

Para ello, tomar de la solución alcohólica obtenida, una gota con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique solución de Carbonato de Sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica positiva la prueba.

#### 2.6.6 ENSAYO DE ESPUMA (SAPONINAS)

Colocar 1 ml del extracto. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye su volumen cinco veces en agua y se agita la mezcla fuertemente la formación de espuma sobre la fase acuosa que perdura tres minutos es positiva.

#### 2.6.7 ENSAYO DE BENEDICT (TANINOS)

Este ensayo permite reconocer en un extracto la presencia de taninos y compuestos fenólicos. En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de extracto y se adicionó 2-3 gotas de  $\text{FeCl}_3$ .

Se considera positiva cuando hay coloración:

- Rojo vino para compuestos fenólicos libres.
- Verde intenso para taninos pirocatéquicos
- Azul para taninos pirogalotánicos.

#### 2.6.8 ENSAYO DE SHINODA (FLAVONOIDES)

Permite determinar la presencia de flavonoides. En un tubo de ensayo se coloca una alícuota de extracto, con la ayuda de una paleta se agrega una pequeña cantidad de limaduras de Mg y unas gotas de HCl concentrado.

La reacción se considera positiva cuando se presenta coloración amarilla, naranja, carmelita, rosada o rojo guinda; intensos en todos los casos.

### 2.7 MÉTODOS FÍSICOS-QUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE EXTRACTOS.

Permite establecer la cantidad de los extractos obtenidos a partir de drogas crudas: así como controlar su estabilidad.

#### 2.7.1 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS

**2.7.1.1 Determinación de olor:** Se introdujo un extremo de una tira de papel filtro de 1 x10 cm en el extracto, se percibió y determino el olor que éste poseía.

**2.7.1.2 Determinación del color:** En tubo de ensayo se colocó extracto hasta cubrir la base del mismo y se observó el color.

**2.7.1.3 Determinación del aspecto:** En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de extracto y a contra luz se determinó el aspecto del mismo, su transparencia y la presencia de partículas o de fases.

## 2.7.2 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

Se entiende por densidad relativa a la relación entre la masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25 °C y la masa de un volumen igual de agua la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

Materiales y reactivos:

- Picnómetro de al menos 10 ml de capacidad.
- Balanza analítica y D 0.1 mg LSP 200g.

Procedimiento:

- Pese el picnómetro vacío y seco a 2 °C y llénese con la porción de ensayo, manténgalo a la temperatura de 25 °C (+ 1 °C) durante 15min, y ajústese el líquido al nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer el exceso y secar exteriormente el picnómetro
- Se pesa cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repite la operación con el agua destilada a 25 °C, después de limpiar el picnómetro.

Expresión de los resultados.

La densidad relativa a 25 °C se calcula por la siguiente fórmula:

$$\frac{m}{V} \quad M_1 - M/V$$

Dónde:

$M_1$ = peso de picnómetro con la muestra (g)

$M$ = peso del picnómetro vacío (g)

$V$ = del picnómetro.

Los resultados se aproximan hasta la tercera cifra.



### 2.7.3 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio

Esta relación viene dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{\sin i}{\sin r} = n$$

Así los refractómetros utilizan como principio de medición; la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente.

Materiales y reactivos:

- Refractómetro
- Varilla de vidrio

Solución mezcla de alcohol etílico-éter di etílico (1:1) para la limpieza del equipo.

Procedimiento

- Se coloca sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajusta el equipo seleccionado la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.
- Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra sobre el prisma de medición, se cierra el termo prisma y se enfoca la luz por

medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

#### Expresión de resultados

Se hacen tres lecturas y se calcula el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0.002.

Si las determinaciones no se efectúan a la temperatura de referencia se emplea la fórmula siguiente:

$$Nd^{25} = Nd + 0.00044 (t-25)$$

- ✓ Dónde:  $Nd^{25}$  = índice de refracción
- ✓  $Nd^t$  = valor leído en la escala del aparato a la temperatura t.
- ✓ t = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C)
- ✓ 0.00044 = factor de corrección por grado Celsius. Los valores se aproximan hasta las milésimas.

#### 2.7.4 DETERMINACIÓN DEL pH

La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno, pH. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógenos. Se calcula teóricamente mediante la ecuación.

$$pH = - \log a [H^+]$$

a  $[H^+]$  = actividad de los iones hidrógeno

En la práctica la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea igual o analógico.

Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.

**TABLA No 3. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS DEL EXTRACTO**

<b>PARÁMETROS</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>MÉTODO</b>
Color	Verde oscuro	Visual
<b>Olor</b>	Aromático	Olfato
<b>Sabor</b>	Dulce	Gusto
<b>Aspecto</b>	Pegajoso	Visual
<b>Densidad</b>	0.95 g/ml	Picnómetro
<b>Ph</b>	5.5	Phmetro
<b>IndIce de refracción</b>	1.3618	Refractómetro
<b>°Brix</b>	26	Refractómetro

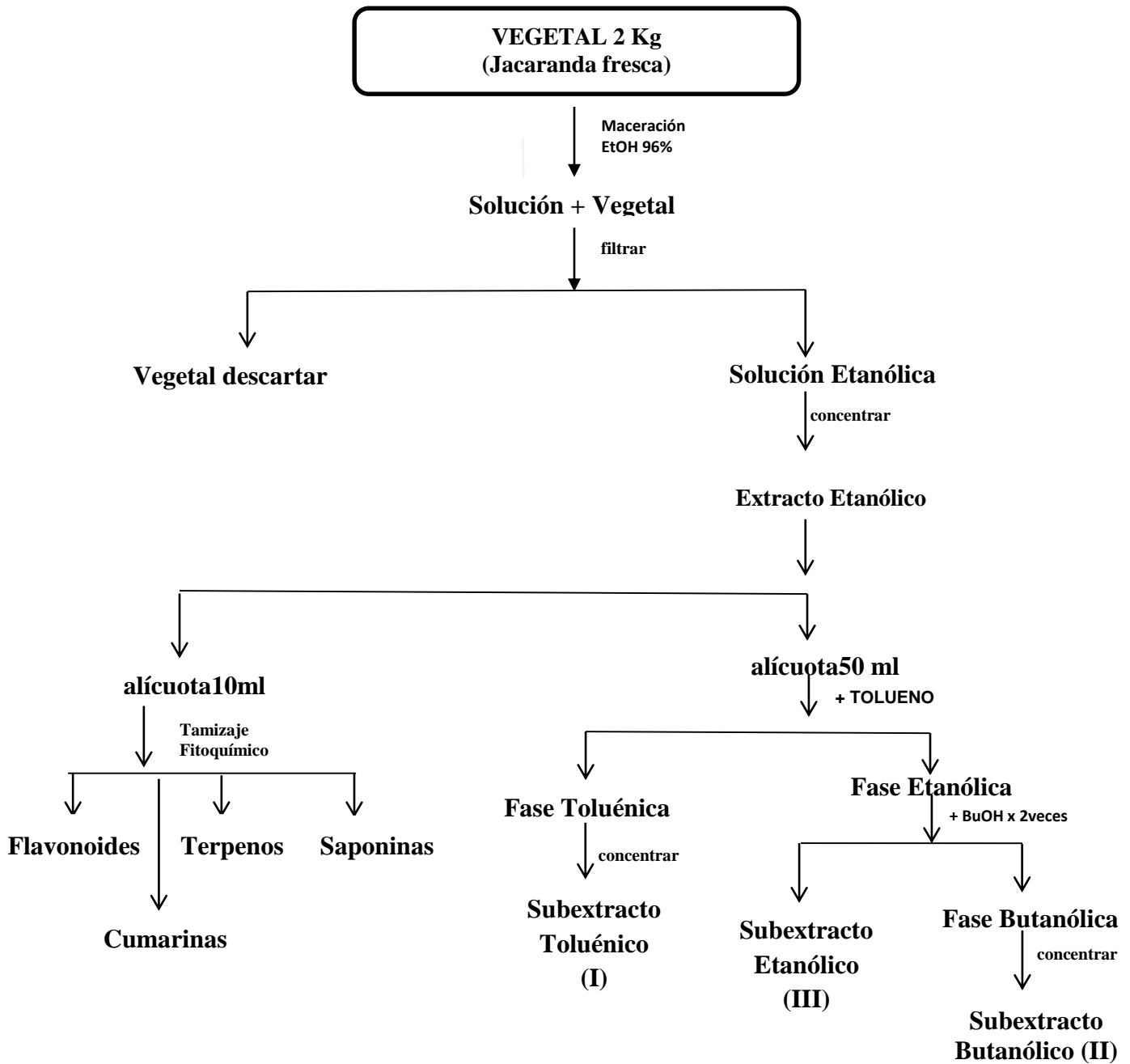


Gráfico N°5. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS DE LA JACARANDA (*Jacaranda mimosifolia*)

## **2.8 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DEL EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS**

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

Este solvente es adecuado para el subextracto etanólico ya que en capa fina da varias manchas por lo cual se considera que son complejos que necesitan fraccionarse.

Para el subextracto butanólico y toluénico se busca otros solventes para la separación de los compuestos (Ver fotografía #1).

### **2.8.1 TRATAMIENTO DEL SUBEXTRACTO ETANÓLICO (III)**

#### **2.8.1.1 Separación por Cromatografía en Columna**

- La cantidad del subextracto etanólico es 0.75 g lo que permite separar en columna utilizando como solvente adecuado de acuerdo a la escala de polaridad.
- Concentrar el subextracto etanólico a sequedad y luego obtener su peso en gramos.
- Por cada gramo de muestra pesar 20g de silica y agregar en la columna Cromatográfica.
- Agregar el solvente de corrido el menos polar.
- Recoger fracciones de 8 mL , en tubos de ensayo numerados.
- De las fracciones # 1 a la # 19 percolar con hexano.
- De las fracciones # 20 a la # 32 utilizar Cloroformo: Acetato de Etilo (100:10).
- De las fracciones # 33 a la # 38 utilizar Cloroformo
- De las fracciones # 39 a la # 41 utilizar Metanol: Acido Acético (95).

### 2.8.1.2 Cromatografías de las fracciones obtenidas de la Columna del Subextracto

#### Etanólico.

- La fracción #1 y #4 obtenidas por cromatografía en Columna del subextracto Etanólico indican sus manchas de forma pura. Mientras que para las fracciones #5, #6, #7 se unen y se cambia de solvente a uno de mayor polaridad; al igual que las fracciones #8, #9, #10 y #11 por presentar manchas iguales se unen lavándoles con benceno. A las fracciones #14, #15, #16, #17, #18 y #19 se unen las fracciones y se las deja ahí en reposo (Ver fotografía #2).
- Las fracciones #20, #21 obtenidas, muestran compuestos puros, mientras que para las demás fracciones muestras similitud en los compuestos por lo que se procede a unir las fracciones desde la #27 hasta la #32 que se les añade hexano, se las concentra para realizar cromatografía en placa preparativa (Ver fotografía #3).
- Para las fracciones de la #33 a la #35 debido a que presentan manchas parecidas se unen con el solvente de corrido que es Cloroformo: Me(OH) (9:2) separar las fases , para su posterior cromatografía. Mientras que para las otras fracciones #36, 37 y 38 resulta ser demasiado polar (Ver fotografía #4).
- Las fases tanto clorofórmica y metanólica, se puede observar que las manchas son claras o redondas, esto demuestra que los compuestos tienen pureza cromatográfica, indicando que la polaridad del solvente de corrido es apropiado (Ver fotografía #5).
- La presencia de manchas redondas, confirman la presencia de un solo compuestos en cada una de las fracciones, verificándose al revelar con Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> da una manchas de color pardo, por lo que se puede asumir que se trata de un terpeno por que se revelo con el reactivo de Rosenthaler (Ver fotografía #6).

### **2.8.1.3 Cromatografías de las Placas Preparativas de las fracciones obtenidas de la Columna del Subextracto Etanólico.**

- **Placa Preparativa de las fracciones #27 a la #32**

Se corta cada una de las bandas para así recuperar los metabolitos por extracción con metanol, concentrar y se tiene soluciones transparentes. La verificación de la pureza se corren en las mismas condiciones de separación. (Ver fotografía #7).

- **Verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de la unión de las fracciones #27 a la #32 del subextracto etanólico.**

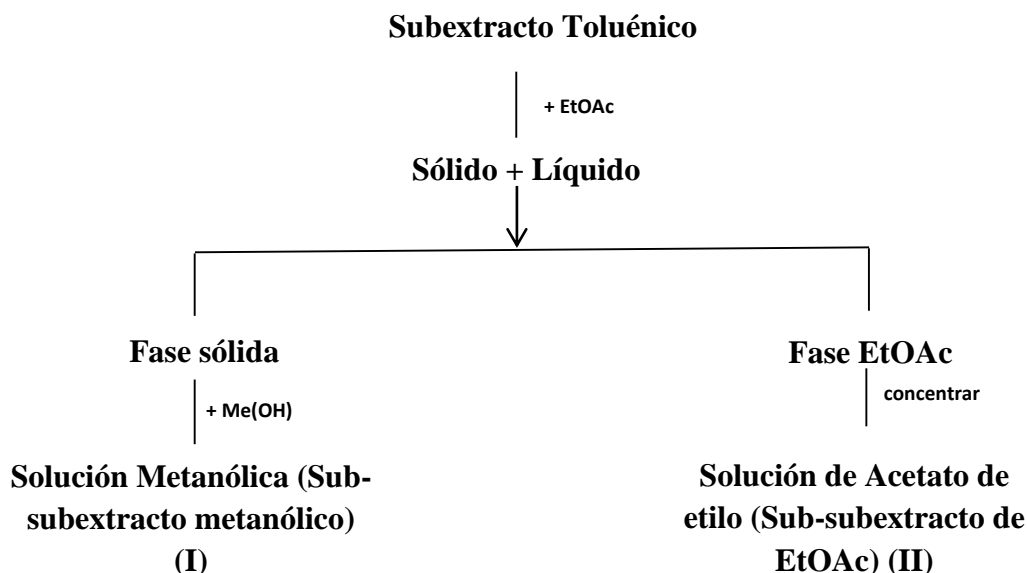
Las bandas #1, #2, #5, #6 no muestran pureza, por lo que se las deja ahí por no haber suficiente muestra para seguirlas purificando (Ver fotografía #8).

### **2.8.2 TRATAMIENTO DEL SUBEXTRACTO TOLUÉNICO (I)**

El subextracto toluénico al presentar una mancha en vela se cambia el sistema de solvente a otro que presente la misma polaridad.

#### **2.8.2.1 Análisis cromatográfico del Subextracto Toluénico**

Al realizar placas cromatográficas de la fracción del Subextracto toluénico, observamos el desplazamiento del solvente de corrido no presenta eficacia, eficiencia y resolución es por esto que se procede a realizar una semisubextracción (Ver fotografía #9).



### 2.8.2.2 Cromatografía en Capa Fina de los Sub-subextractos

- La cromatografía del sub-subextracto metanólico (I) no presenta buenos los parámetros cromatográficos, como eficacia, eficiencia y resolución ya que se probó en varios sistemas de solventes que no dieron cambio alguno, por lo que se le añade metanol y se lo deja que cristalice, pueden ser resinas (Ver fotografía #10).
- Este sub-subextracto de acetato de etilo (II), en el solvente de corrido presenta una buena separación, lo que permite aplicar una columna cromatográfica para fraccionar la muestra y poder separar los compuestos presentes en este sub-subextracto (Ver fotografía #11).

### 2.8.3 SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL SUB-SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

- La cantidad del sub-subextracto de acetato de etilo es 0.80 g lo que permite separar en columna utilizando como solvente adecuado de acuerdo a la escala de polaridad.



- Concentrar el sub- subextracto de acetato de etilo a sequedad y luego obtener su peso en gramos.
- Por cada gramo de muestra pesar 20g de silica y agregar en la columna Cromatográfica.
- Agregar el solvente de corrido el menos polar.
- Recoger fracciones de 8 mL , en tubos de ensayo numerados.
- De las fracciones # 1 a la # 5 percolar con acetato de etilo.
- De las fracciones # 6 a la # 9 utilizar Acetato de Etilo: Me(OH) (95: 5).
- De las fracciones # 10 a la # 14 utilizar Metanol
- De las fracciones # 15 a la # 20 utilizar Metanol: Ácido Acético (99:1).

#### **2.8.3.1 Cromatografías de las fracciones obtenidas de la Columna del Sub- subextracto de Acetato de Etilo.**

- La presencia de manchas redondeadas, separadas y distribuidas desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente de las fracciones #1 a la #5, permite realizar una placa preparativa de cada una de las fracciones, para luego verificar las bandas (Ver fotografía #12).
- A cada una de estas fracciones de la #6 a la #15 se le añade metanol caliente, y se les deja en reposo para que cristalicen (Ver fotografía #13 y #14).
- Como hay buena separación de las muestras, se procede a realizar una placa preparativa uniendo las fracciones de la #15 a la #17 (Ver fotografía #15).
- Como se presentan manchas redondeadas, separadas y distribuidas de la fracción #18 a la #20, desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente se procede a realizar una microcolumna de la unión de estas fracciones, para purificar los compuestos (Ver fotografía #16).

### 2.8.3.2 Cromatografías de las fracciones obtenidas de la Micro-Columna del Sub-subextracto de Acetato de Etilo de las fracciones de la #18 a la #20.

- A cada una de las fracciones de la #1 a la #3 se les añade metanol, para que cristalice (Ver fotografía #17).
- De igual manera a las fracciones #4 a la #9, se las adiciona metanol y se los deja en reposo, porque son compuestos fotosintéticos que se degradan en presencia de la luz (Ver fotografía #18 y #19).
- Las fracciones #10, #11 y #12 se puede observar claramente la presencia de una sola mancha en cada una de ellas lo que se puede decir que se trata de compuestos puros, mientras que para las fracciones #13, #14, #15 y #16 hay varias manchas, por lo que se dice que se tratan de compuestos fotosintéticos que se descomponen en presencia de la luz, dando lugar a nuevos compuestos (Ver fotografía #20). Los datos del UV obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

CUADRO No 1. VALORES DE LONGITUD DE ONDA DE LA FRACCIÓN #10, #11, #12.

	UV Práctico	Absorbancia	UV Teórico (Ac. jacoumárico, jacaranona, metil jacaranona)
<b>F #10</b>	203.0 nm	0.781	208.0 nm
<b>F #11</b>	203.0 nm	0.340	208.0 nm
	300.0 nm	0.006	259.0 nm
<b>F #12</b>	203.0 nm	1.160	208.0 nm
	276.0 nm	0.096	275.0 nm

### 2.8.3.3 Cromatografías de las Placas Preparativas de las fracciones obtenidas de la Columna del Sub-subextracto de Acetato de Etilo.

- **Placa Preparativa de las fracciones #1**

Se corta cada una de las bandas para así recuperar los metabolitos por extracción con metanol, concentrar y se tiene soluciones transparentes. La verificación de la pureza se corren en las mismas condiciones de separación. (Ver fotografía #21). Para realizar una nueva cromatografía (Ver fotografía #22). En el análisis espectroscópico de la banda #4 se obtiene los siguientes valores:

**CUADRO No 2. VALORES DE LONGITUD DE ONDA DE LA BANDA #4 DE LA FRACCIÓN #1**

<b>UV Práctico BANDA #4</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>UV teórico (Cumarina)</b>
204.0 nm	1.828	
227.0 nm	0.816	230 nm
275.0 nm	0.131	279.0 nm

- **Placa Preparativa de las fracciones # 3** (Ver fotografía #23).

La verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de esta fracción, en el análisis espectroscópico dio los siguientes resultados (Ver fotografía #24).

**CUADRO No 3. VALORES DE LONGITUD DE ONDA DE LA BANDA #4, #5 DE LA FRACCIÓN #3.**

<b>UV Práctico</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>UV teórico (Terpenos)</b>
<b>BANDA #4</b> 223.0 nm	0.140	222 nm
<b>BANDA #5</b> 281.0 nm	0.076	281 nm

- **Placa Preparativa de las fracciones # 4** (Ver fotografía #25).

A cada una de las bandas, se les adiciona metanol, y se las deja en reposo. (Ver fotografía #26).

El análisis espectroscópico da los siguientes valores para las bandas #1 y para la #2.

**CUADRO No 4. VALORES DE LONGITUD DE ONDA DE LA BANDA #1, #2 DE LA FRACCIÓN #4.**

	<b>UV Práctico</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>UV Teórico (Sesquiterpenolactona)</b>
<b>BANDA #1</b>	204.0	1.538	
	225.0	1.421	222.0
<b>BANDA #2</b>	202.0	0.937	
	223.0	0.330	222.0

- **Placa Preparativa de las fracción #5** (Ver fotografía #27).

Se obtienen cuatro bandas, a las cuales se las hace una nueva cromatografía, en las mismas condiciones. (Ver fotografía #28).

El análisis espectroscópico, de la banda #1 y de la #2, nos dan los siguientes valores

**CUADRO No 5. VALORES DE LONGITUD DE ONDA DE LA BANDA #1 Y #2 DE LA FRACCIÓN #5.**

	<b>UV Práctico</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>UV Teórico (Cumarina)</b>
<b>BANDA #1</b>	206.0 nm	2.358	
	226.0 nm	1.251	230.0 nm
	275.0 nm	0.209	279.0 nm
<b>BANDA #2</b>	230.0 nm	3.804	230.0 nm
	279.0 nm	1.530	279.0 nm

- **Placa Preparativa de las fracciones # 15, #16, #17** (Ver fotografía #29).

Para la verificación de compuestos, se realiza una nueva placa cromatográfica, corrida en solventes adecuados, para lograr una buena separación. (Ver fotografía #30).

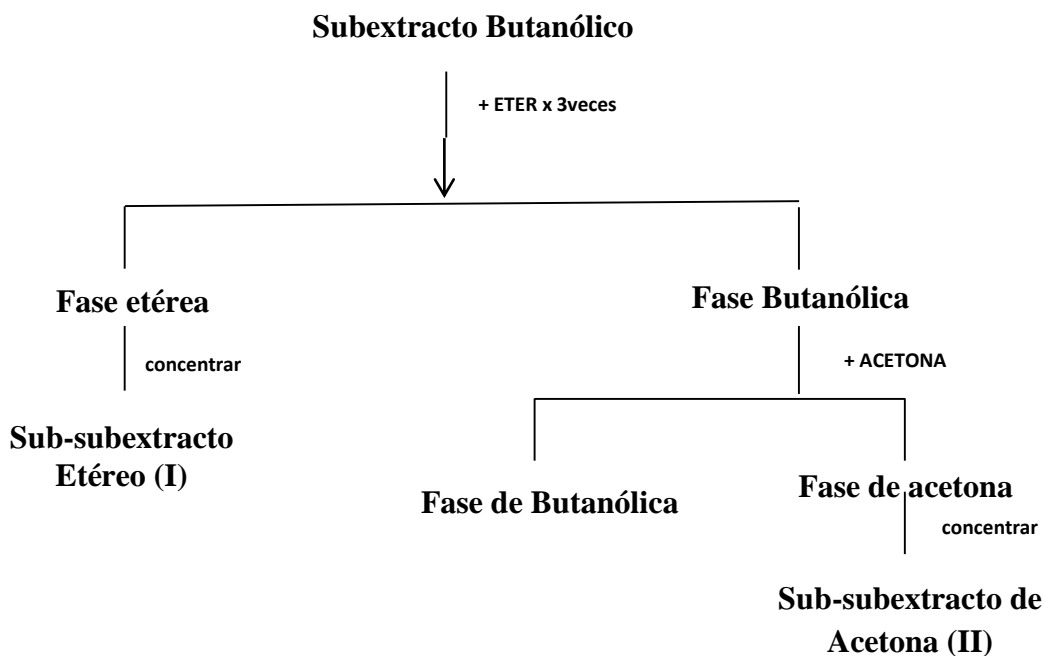
En la banda #4, del análisis espectroscópico en el UV, nos da la siguiente longitud de onda.

**CUADRO No 6. VALORES DE LONGITUD DE ONDA DE LA BANDA #4 DE LA UNIÓN DE LA FRACCIÓN DE LA #15, #16, #17.**

UV Práctico	Absorbancia	UV Teórico (TERPENOS)
BANDA #4 202.0 nm	0.373	
282.0 nm	0.027	281 nm

#### 2.8.4 TRATAMIENTO DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (I)

Al realizar placas cromatográficas del subextracto butanólico observamos que el desplazamiento del solvente de corrido no presente eficacia, eficiencia y resolución es por eso que se procede a realizar una semisubextracción (Ver fotografía #1).



#### **2.8.4.1 Análisis Cromatográfico de los Sub-subextractos**

El sub-subextracto etéreo, con el sistema de solvente de corrido, presenta manchas marrones separadas y distribuidas , lo que permite separar sus compuestos en una columna cromatográfica, para su purificación, pudiendo ser flavonoides ya que se revelo con  $Ce(SO_4)$ . Lo que no se puede ver en el Sub-subextracto de acetona, que no presenta manchas. (Ver fotografía #31).

#### **2.8.4.2 Separación Por Cromatografía En Columna del Sub-subextracto Etéreo.**

- La cantidad del sub-subextracto etéreo es 0.75g lo que permite separar en columna utilizando como solvente adecuado su sistema de corrido.
- Concentrar el sub- subextracto etéreo a sequedad y luego obtener su peso en gramos.
- Por cada gramo de muestra pesar 20g de silica y agregar en la columna Cromatográfica.
- Agregar el sistema de solventes.
- Recoger fracciones de 8 mL , en tubos de ensayo numerados.
- De las fracciones # 1 a la # 22 percolar con el sistema de solvente de corrido Cloroformo: Metanol: Agua (65: 35:15).

#### **2.8.4.3 Cromatografías de las fracciones obtenidas por Cromatografía en Columna del Sub- subextracto Etéreo.**

- La presencia de manchas redondas e iguales permite unir las fracciones, para su posterior cromatografía y verificar si están puras. Se unen las fracciones de la #2 a la #5 ya que en la fracción #1 no existen compuestos; las fracciones de la #6 a la #8; de la #9 a la #10; de la #11 a la #12, de la #13 a la #16; de la #17 a la #18 y de la #19 a la #22 (Ver fotografía #32).
- Como no presenta muy buena separación de los compuestos, se cambia de solvente, para tener eficacia, eficiencia y resolución. De las fracciones #1, #3, #4,

#5, #6, #7 de la #2 no se realiza por la presencia de muchos compuestos (Ver fotografía #33).

- Como hay similitud de las manchas en las diferentes fracciones, se procede a unir las fracciones #1, #2, #6 y la #3, #4 y #5 para su posterior aplicación en placa preparativa, ya que hay manchas separadas, redondeadas y distribuidas desde el punto de aplicación, hasta el frente del solvente, de esta manera se verifica sus bandas (Ver fotografía #34).

#### 2.8.4.4 Cromatografías de las Placas Preparativas de las fracciones obtenidas de la Columna del Sub-subextracto de Etéreo.

- **Placa Preparativa de las fracciones #1, #2 y #6** (Ver fotografía #35).

Se realiza una nueva cromatografía, para la verificación de compuestos en las bandas de la unión de estas fracciones, en las mismas condiciones. (Ver fotografía #36).

El análisis espectroscópico en el UV, da longitudes de onda de las siguientes bandas:

CUADRO No 7. VALORES DE LONGITUD DE ONDA DE LA PLACA PREPARATIVA FRACCIÓN #1, #2, #6.

	UV Práctico	Absorbancia	UV Teórico (Terpenos)
<b>BANDA #1</b>	202.0 nm	0.275	
	280.0 nm	0.071	281 nm
<b>BANDA #2</b>	202.0 nm	0.459	
	281.0 nm	0.031	281 nm
<b>BANDA #3</b>	202.0 nm	0.346	
	217.0 nm	0.083	222 nm
<b>BANDA #4</b>	202.0 nm	0.235	
	220.0 nm	0.258	222 nm

- **Placa Preparativa de la unión: fracciones #3, #4 y #5** (Ver fotografía #37).

La cromatografía de la verificación de las bandas de las placas preparativas, se observa manchas redondas y separadas por lo que se pueden asumir como compuestos puros. (Ver fotografía #38)

Las longitudes de onda obtenidas de las bandas se presentan en la siguiente tabla.

**CUADRO No 8. VALORES DE LONGITUD DE ONDA DE LA BANDA #3 Y #4 DE LA PLACA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN #3, #4, #5.**

	<b>UV Práctico</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>UV Teórico (Isoflavonas)</b>
<b>BANDA #3</b>	203.0 nm	0.610	
	231.0 nm	0.536	232 nm
	279.0 nm	0.295	279 nm
	310.0 nm	0.285	314 nm
<b>BANDA#4</b>	202.0 nm	0.354	
	229.0 nm	0.266	232 nm
	279.0 nm	0.123	279 nm
	310.0 nm	0.113	314 nm

## **2.9 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DEL EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS**

**Placa de Silicagel G<sub>F254</sub>**

**Muestras:**

1. Extracto alcohólico
2. Subextracto etanólico
3. Subextracto butanolico
4. Subextracto toluénico

**Solvente de recorrido:** Benceno: Cloroformo: Acetato de etilo (30:50:20)

**Revelador:** VainillinaH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>





**FOTOGRAFÍA No. 1 CROMATOGRAFÍA DEL EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS**


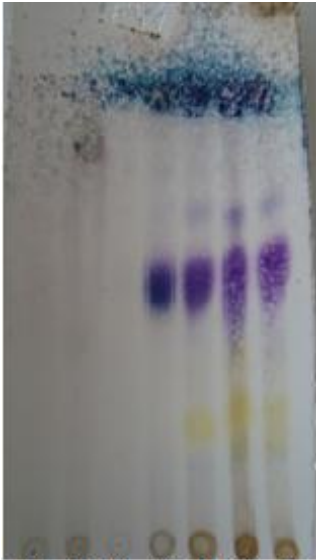







**FOTOGRAFÍA No. 39 COLUMNA CROMATOGRÁFICA**





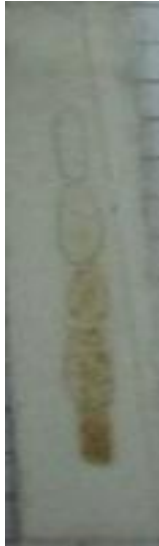
**FOTOGRAFIA No.40 MICROCOLUMNA**




2.9.1 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DEL SUBEXTRACTO ETANÓLICO




<p><b>Placa de Silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b> Benceno  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b> Cloroformo:Acetato de etilo (30:10).  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b> Cloroformo: Metanol (90:20).  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>
 <p>1 4 5 14 15 17 19</p>	 <p>20 21 24 26 27 30 31</p>	 <p>33 34 35 36 37 38</p>
<p>Rf #1 = 0.87  Rf #4 = 0.91</p>	<p>Rf #21 = 0.81</p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 4</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LAS</b>  <b>FRACCIONES #33, #34, #35, #36,</b>  <b>#37, #38.</b></p>
<p><b>FOTOGRAFÍA No. 2</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LAS</b>  <b>FRACCIONES #1, #4, #5, #14,</b>  <b>#15, #17, #19.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 3</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LAS</b>  <b>FRACCIONES #20, #21, #24, #26,</b>  <b>#27, #30, #31.</b></p>	




<p><b>Placa de Silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>            Cloroformo: Metanol            (90:20).  <b>Revelador:</b>            Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>            Metanol.  <b>Revelador:</b>            Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b> Cloroformo: EtOAc (30:10).  <b>Revelador:</b>            Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	
 <p>1 2</p>	 <p>39 40 41</p>	 <p>B1 B2 B3 B4 B5 B6</p>	 <p>B1 B2 B3 B4 B5 B6</p>
<p>Rf F. Cloroformica = 0.886 Rf F. Metanólica = 0.811</p>	<p>Rf # 39: 0.423 Rf # 40: 0.711 Rf # 41: 0.653</p>	<p>B #2. Rf : 0.181 B #3. Rf : 0.272 B #4. Rf : 0.327 B #5. Rf : 0.6 B #6. Rf : 0.890</p>	<p>B #3. Rf : 0.566 B #4. Rf : 0.509</p>
<p><b>FOTOGRAFÍA No. 5 CROMATOGRAFÍA DE LA FASE CLOROFORMICA, Y METANÓLICA.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 6 CROMATOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES #39, #40, #41.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 7 PLACA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN #27 A LA #32.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 8 CROMATOGRAFÍA DE LA PLACA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN #27 A LA #32.</b></p>

2.9.2 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA DEL SUB-SUBEXTRACTO DE CETATO DE ETILO

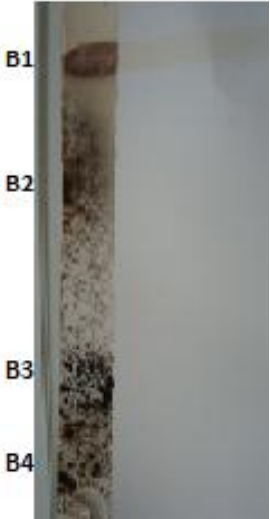



<p><b>Placa de Silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>            Tolueno:AtOAc (93:7).  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>            Cloroformo:Me(OH):Agua            (65:35:15)  <b>Revelador:</b> Ce (SO<sub>4</sub>)</p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>            Acetato de Etilo  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>
		
<p><b>FOTOGRAFÍA No. 9</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DEL</b>  <b>SUBEXTRACTO TOLUÉNICO.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 10</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DEL SUB-</b>  <b>SUBEXTRACTO METANÓLICO</b>  <b>(I)</b></p>	<p>Rf 1: 0.222            Rf 2: 0.444            Rf 3: 0.622            Rf 4: 0.844</p> <p><b>FOTOGRAFÍA No. 11</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DEL SUB-</b>  <b>SUBEXTRACTO DE ACETATO</b>  <b>DE ETILO(II)</b></p>

<p><b>Placa de Silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Tolueno:AtOAc (93:7)  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      AtOAc:Me(OH) (95:5)  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b> Metanol  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>		
 <p style="text-align: center;"><b>1 2 3 4 5</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>6 7 8 9</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>10 11 12 13 14</b></p>		
<p style="text-align: center;"><b>FOTOGRAFÍA No. 12</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LAS</b>  <b>FRACCIONES #1, #2, #3, #4, #5.</b></p>	<p><b>Rf # 6</b></p>	<p>Rf<sub>1</sub>= 0.130                      Rf<sub>2</sub>= 0.326                      Rf<sub>3</sub>= 0.934</p>	<p><b>Rf # 10</b></p>	<p>Rf<sub>1</sub>= 0.478</p>
	<p><b>Rf # 7</b></p>	<p>Rf<sub>1</sub>= 0.180                      Rf<sub>2</sub>= 0.326                      Rf<sub>3</sub>= 0.565                      Rf<sub>4</sub>= 0.934</p>	<p><b>Rf # 11</b></p>	<p>Rf<sub>1</sub>= 0.608                      Rf<sub>2</sub>= 0.652</p>
	<p><b>Rf # 8</b></p>	<p>Rf<sub>1</sub>= 0.260                      Rf<sub>2</sub>= 0.456                      Rf<sub>3</sub>= 0.630                      Rf<sub>4</sub>= 0.913</p>	<p><b>Rf # 12</b></p>	<p>Rf<sub>1</sub>= 0.782</p>
	<p><b>Rf # 9</b></p>	<p>Rf<sub>1</sub>= 0.304</p>	<p><b>Rf # 13</b></p>	<p>Rf<sub>1</sub>= 0.086                      Rf<sub>2</sub>= 0.673</p>
	<p style="text-align: center;"><b>FOTOGRAFÍA No. 13</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LAS</b>  <b>FRACCIONES #6, #7, #8, #9.</b></p>	<p><b>Rf # 14</b></p>	<p>Rf<sub>1</sub>= 0.086                      Rf<sub>2</sub>= 0.673</p>	
<p style="text-align: center;"><b>FOTOGRAFÍA No. 14</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LAS</b>  <b>FRACCIONES #10, #11, #12, #13,</b>  <b>#14, #15.</b></p>				





<b>Placa de Silicagel GF<sub>254</sub></b> <b>Solvente de recorrido:</b> Cloroformo: Me(OH) (40:10) <b>Revelador:</b> Vainillina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		<b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b> <b>Solvente de recorrido:</b> AtOAc <b>Revelador:</b> Vainillina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
 <p>15 16 17</p>		 <p>18 19 20</p>		 <p>1 2 3</p>	
<b>Rf # 15</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.083 Rf <sub>2</sub> = 0.291 Rf <sub>3</sub> = 0.395	<b>Rf # 18</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.403 Rf <sub>2</sub> = 0.557 Rf <sub>3</sub> = 0.923	<b>Rf # 1</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.781
<b>Rf # 16</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.104 Rf <sub>2</sub> = 0.291 Rf <sub>3</sub> = 0.395	<b>Rf # 19</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.423 Rf <sub>2</sub> = 0.557 Rf <sub>3</sub> = 0.903	<b>Rf # 2</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.454 Rf <sub>2</sub> = 0.727
<b>Rf # 17</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.104 Rf <sub>2</sub> = 0.291 Rf <sub>3</sub> = 0.395	<b>Rf # 20</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.442 Rf <sub>2</sub> = 0.923	<b>Rf # 3</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.472 Rf <sub>2</sub> = 0.818
<b>FOTOGRAFÍA No. 15</b> <b>CROMATOGRAFÍA DE LAS</b> <b>FRACCIONES #15, #16, #17.</b>		<b>FOTOGRAFÍA No. 16</b> <b>CROMATOGRAFÍA DE LAS</b> <b>FRACCIONES #18, #19, #20.</b>		<b>FOTOGRAFÍA No. 17</b> <b>CROMATOGRAFÍA DE LA</b> <b>MICROCOLUMNA,</b> <b>FRACCIONES #1, #2, #3.</b>	



<p><b>Placa de Silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de Corrido:</b> AtOAc:Ac.Acético:Ac.Fórmico:Agua                      (100: 11: 11: 26)  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>		<p><b>Placa de Silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de Corrido:</b>                      Cloroformo: Me(OH)                      (40:10)  <b>Revelador:</b> Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>			
 <p>4 5 6</p>		 <p>7 8 9</p>		 <p>10 11 12 13 14 15 16</p>	
<b>Rf # 5</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.208 Rf <sub>2</sub> = 0.645 Rf <sub>3</sub> = 0.854	<b>Rf # 7</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.276 Rf <sub>2</sub> = 0.787	<b>Rf # 10</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.5
<b>Rf # 6</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.145 Rf <sub>2</sub> = 0.229 Rf <sub>3</sub> = 0.812	<b>Rf # 8</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.319	<b>Rf # 11</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.5
		<b>Rf # 9</b>	Rf <sub>3</sub> = 0.340	<b>Rf # 12</b>	Rf <sub>1</sub> = 0.521
<p><b>FOTOGRAFÍA No. 18</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LA</b>  <b>MICROCOLUMNA FRACCIONES #4,</b>  <b>#5, #6.</b></p>		<p><b>FOTOGRAFÍA No. 19</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LA</b>  <b>MICROCOLUMNA</b>  <b>FRACCIONES #7, #8, #9.</b></p>		<p><b>FOTOGRAFÍA No. 20</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LA</b>  <b>MICROCOLUMNA,</b>  <b>FRACCIONES #10, #11, #12,</b>  <b>#13, #14, #15, #16.</b></p>	

2.9.2.1 PLACAS PREPARATIVAS DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA DEL SUB-SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO





<p><b>Placa de Silicagel GF<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Tolueno:AtOAc (93:7)  <b>Revelador:</b>                      CeSO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Cloroformo:AtOAc (93:7).  <b>Revelador:</b>                      CeSO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Tolueno:AtOAc (93:7)  <b>Revelador:</b>                      Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Cloroformo: Me(OH) (40:20)  <b>Revelador:</b>                      Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>
			
<p>B #2. Rf : 0.163                      B #3. Rf : 0.327                      B #4. Rf : 0.727</p>	<p><b>B #1</b> Rf<sub>1</sub> = 0.479                      Rf<sub>2</sub> = 0.875</p> <p><b>B #2</b> Rf<sub>1</sub> = 0.5                      Rf<sub>2</sub> = 0.854</p> <p><b>B #3</b> Rf<sub>1</sub> = 0.520                      Rf<sub>2</sub> = 0.645                      Rf<sub>3</sub> = 0.833</p> <p><b>B #4</b> Rf<sub>1</sub> = 0.791</p>	<p>B #2. Rf : 0.129                      B #3. Rf : 0.222                      B #4. Rf : 0.333                      B #5. Rf : 0.425</p>	<p><b>B #1</b> Rf<sub>1</sub>= 0.253                      Rf<sub>2</sub>= 0.571                      Rf<sub>3</sub>= 0.714</p> <p><b>B #2</b> Rf<sub>1</sub>= 0.238                      Rf<sub>2</sub>= 0.539                      Rf<sub>3</sub>= 0.619</p> <p><b>B #3</b> Rf<sub>1</sub>= 0.253                      Rf<sub>2</sub>= 1.05                      Rf<sub>3</sub>= 0.730</p> <p><b>B #4</b> Rf<sub>1</sub>= 0.634</p> <p><b>B #5</b> Rf<sub>1</sub>= 0.650                      Rf<sub>2</sub>= 0.730</p>
<p><b>FOTOGRAFÍA No. 21</b>  <b>PLACA PREPARATIVA</b>  <b>DE LA FRACCIÓN #1.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 22</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE</b>  <b>LA PLACA</b>  <b>PREPARATIVA</b>  <b>FRACCIONES #1</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 23</b>  <b>PLACA PREPARATIVA</b>  <b>DE LA FRACCIÓN #3.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 24</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE</b>  <b>LA PLACA</b>  <b>PREPARATIVA DE LA</b>  <b>FRACCIÓN #3.</b></p>







<p><b>Placa de Silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Tolueno:AtOAc (93:7)  <b>Revelador:</b>                      Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Cloroformo:Metanol:                      Agua (65:35:15).  <b>Revelador:</b>                      Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Tolueno:AtOAc (93:7)  <b>Revelador:</b>                      Ce(SO<sub>4</sub>)</p>	<p><b>Placa de silicagel GF<sub>254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Cloroformo:                      Me(OH):Agua                      (65:35:15)  <b>Revelador:</b>                      Ce(SO<sub>4</sub>)</p>
			
<p>B #2. Rf : 0.096                      B #3. Rf : 0.826                      B #4. Rf : 0.865</p>	<p><b>B #1</b> Rf<sub>1</sub> = 0.254                      Rf<sub>2</sub> = 0.8</p>	<p>B #2. Rf : 0.132                      B #3. Rf : 0.320                      B #4. Rf : 0.849</p>	<p><b>B #1</b> Rf<sub>1</sub>= 0.413                      Rf<sub>2</sub>= 0.913</p>
	<p><b>B #2</b> Rf<sub>1</sub> = 0.345                      Rf<sub>2</sub> = 0.763</p>		<p><b>B #2</b> Rf<sub>1</sub>= 0.5                      Rf<sub>2</sub>= 0.934</p>
	<p><b>B #4</b> Rf<sub>1</sub> = 0.281                      Rf<sub>2</sub> = 0.618                      Rf<sub>3</sub> = 0.727</p>		<p><b>B #4</b> Rf<sub>1</sub>= 0.260                      Rf<sub>2</sub>= 0.326                      Rf<sub>3</sub>= 0.739                      Rf<sub>4</sub>= 0.956</p>
<p><b>FOTOGRAFÍA No. 25</b>  <b>PLACA PREPARATIVA</b>  <b>DE LA FRACCIÓN #4.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 26</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE</b>  <b>LA PLACA</b>  <b>PREPARATIVA</b>  <b>FRACCION #4</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 27</b>  <b>PLACA PREPARATIVA</b>  <b>DE LA FRACCIÓN #5.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 28</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE</b>  <b>LA PLACA</b>  <b>PREPARATIVA DE LA</b>  <b>FRACCIÓN #5.</b></p>

<p align="center"><b>Placa de Silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b> Tolueno:AtOAc (93:7)  <b>Revelador:</b>  Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p align="center"><b>Placa de Silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b> Cloroformo: Metanol (40:10)  <b>Revelador:</b>  Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>
	
<p>B #2. Rf : 0.12  B #3. Rf : 0.54  B #4. Rf : 0.96</p>	<p><b>B #1</b> Rf<sub>1</sub> = 0.277  Rf<sub>2</sub> = 0.925  <b>B #2</b> Rf<sub>1</sub> = 0.5  Rf<sub>2</sub> = 0.925  <b>B #3</b> Rf<sub>1</sub> = 0.574  Rf<sub>2</sub> = 0.925  <b>B #4</b> Rf<sub>1</sub> = 0.925</p>
<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA No. 29</b>  <b>PLACA PREPARATIVA DE LA UNION DE LAS</b>  <b>FRACCIONES #15 A LA #17.</b></p>	<p align="center"><b>FOTOGRAFÍA No. 30</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE LA PLACA PREPARATIVA</b>  <b>DE LA UNIÓN DE LAFRACCIÓN #15 A LA #17.</b></p>

2.9.3 PLACAS CROMATOGRÁFICAS DEL SUB-SUBEXTRACTO ÉTEREO

<p><b>Placa de Silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      Cloroformo:Metanol:Agua                      (65:35:15)  <b>Revelador:</b>                      Ce(SO<sub>4</sub>)</p>		<p><b>Placa de Silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      AtOAc:Me(OH):Agua                      (100:24:10)  <b>Revelador:</b>                      Ce(SO<sub>4</sub>)</p>	
 <p>1 2</p>	 <p>1 2 5 8 13 14 18 20</p>	 <p>1 2 3 4 5 6 7</p>	 <p>1 2 3 4 5 6</p>
<p><b>FOTOGRAFÍA No. 31</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DEL</b>  <b>SUB-SUBEXTRACTO</b>  <b>ÉTEREO(1) Y DE</b>  <b>ACETONA (2).</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 32</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE</b>  <b>LAS FRACCIONES DE</b>  <b>LA COLUMNA #1, #2, #5,</b>  <b>#8, #13, #14, #18, #20.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 33</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE</b>  <b>LA UNIÓN DE</b>  <b>FRACCIONES DE LA</b>  <b>COLUMNA #1(2-5),</b>  <b>#2(6-8), #3(9-10), #4(11-</b>  <b>12), #5(13-16), #6(17-</b>  <b>18), #7(19-22).</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 34</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE</b>  <b>LA UNIÓN DE</b>  <b>FRACCIONES DE LA</b>  <b>COLUMNA #1(2-5), #2(9-</b>  <b>10), #3(11-12), #4(13-16),</b>  <b>#5(17-18), #6(19-22).</b></p>

2.9.3.1 PLACAS PREPARATIVAS DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA DEL SUB-SUBEXTRACTO ETereo

<p><b>Placa de Silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b> AtOAc:Me(OH):Agua                      (100:24:10)  <b>Revelador:</b>                      Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>Placa de silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      AtOAc:Me(OH):Agua                      (100:24:10)  <b>Revelador:</b>                      Ce(SO<sub>4</sub>)</p>	<p><b>Placa de silicagel G<sub>F254</sub></b>  <b>Solvente de recorrido:</b>                      AtOAc: Me(OH):Agua                      (100:24:10)  <b>Revelador:</b>                      Ce(SO<sub>4</sub>)</p>	
			
<p>B #1. Rf : 0.037                      B #2. Rf : 0.215                      B #3. Rf : 0.518                      B #4. Rf : 0.909</p>	<p><b>B #1</b> Rf<sub>1</sub> = 0.878  <b>B #2</b> Rf<sub>1</sub> = 0.848  <b>B #3</b> Rf<sub>1</sub> = 0.212                      Rf<sub>2</sub> = 0.878  <b>B #4</b> Rf<sub>1</sub> = 0.696</p>	<p>B #1. Rf : 0.038                      B #2. Rf : 0.558                      B #3. Rf : 0.805                      B #4. Rf : 0.948</p>	<p><b>B #3</b> Rf<sub>1</sub>= 0.4  <b>B #4</b> Rf<sub>1</sub>= 0.657</p>
<p><b>FOTOGRAFÍA No. 35</b>  <b>PLACA PREPARATIVA</b>  <b>DE LA UNION DE LA</b>  <b>FRACCIÓN #1, #2, #6.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 36</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE</b>  <b>LA PLACA</b>  <b>PREPARATIVA UNION</b>  <b>DE LA FRACCIÓN #1,</b>  <b>#2, #6</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 37</b>  <b>PLACA PREPARATIVA</b>  <b>DE LA UNION DE LA</b>  <b>FRACCIÓN #3, #4, #5.</b></p>	<p><b>FOTOGRAFÍA No. 38</b>  <b>CROMATOGRAFÍA DE</b>  <b>LA PLACA</b>  <b>PREPARATIVA DE LA</b>  <b>FRACCIÓN #3, #4, #5.</b></p>

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA

La identificación taxonómica realizada a la Jacaranda del Ecuador, se verificó en el herbario de la ESPOCH, siendo este un árbol introducido y cultivado, originario de Colombia. Presenta vegetación arbórea, en algunos casos alcanza una altura de 8 m, tallo leñoso y maderable, hojas simples y opuestas en forma de panaje. Se encuentra en las provincias del Azuay, Chimborazo. Pertenece a la familia de la Bignoniaceae.

Para el análisis de control de calidad se utilizó las ramas, hojas y flores troceadas de la Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), para lo cual se utilizó etanol al 96%, para su extracción, por el método de maceración. El hinchamiento de la droga es importante porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y difusión del alcohol.

Se parte de 5.032 g del extracto Alcohólico Total, preparado de las hojas, ramas y flores de la Jacaranda. Los subextractos tienen un rendimiento en peso de: subextracto etanólico 0.809 g, subextracto butanólico 0.688 g; el subextracto toluénico con 0.667 g.

El tamizaje fitoquímico determina la presencia de flavonoides por las reacciones positivas de Shinoda, contiene terpenos por reacción positiva para, Rosentaler, Lieberman Buchard, Baljet para coumarinas y espuma a lo cual se procede a realizar Cromatografías en capa fina.

### 3.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Los resultados obtenidos en el extracto de la Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*) se aprecian en la siguiente tabla. Con respecto a las reacciones de coloración o aparición de precipitados, aplicadas según las técnicas de tamizaje fitoquímico.

**CUADRO No. 9 RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE LA JACARANDA (*Jacaranda mimosifolia*)**

TIPO DE COMPUESTO	PRUEBAS	EXTRACTO DE CORTEZA DE QUINA ROJA ( <i>Cinchona pubescens</i> )
Triterpenos y Esteroides	Lieberman Buchard	(++)
Coumarinas	Baljet	(+)
Saponinas	Espuma	(+)
Taninos	Cloruro Férrico	(+)
Flavonoides	Shinoda	(++)

(+) ó (++) cuando la presencia del metabolito secundario es poco o escaso.

En el análisis del tamizaje fitoquímico se puede apreciar mediante la tabla N° 4 que existe una presencia considerable de flavonoides, triterpenos y/o esteroides, sesquiterpenos, saponinas, compuestos fenólicos y/o taninos en una proporción representativa vista en el vegetal.

### 3.3 ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA JACARANDA

Las pruebas fueron aplicadas al extracto alcohólico del vegetal de la jacaranda que fue obtenido e inmediatamente se realizaron los ensayos.

Mediante los requisitos organolépticos se estableció la densidad relativa de 0.95 g/mL que al realizar una comparación con el agua esta es menor; el índice de refracción es de 1.3618 así como su pH de 5.5 que es ligeramente ácido.

### 3.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DEL SUB-SUBEXTRACTO ETANÓLICO

Para determinar, los compuestos presentes en el subextracto etanólico, se realizó una cromatografía de capa fina, con solventes de corrido, adsorbentes determinados para luego determinar los Rfs encontrados de los compuestos puros.

Como se obtuvo manchas redondeadas, separadas y distribuidas desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente se procedió a realizar una columna cromatográfica teniendo en cuenta la polaridad del solvente de corrido utilizado.

**CUADRO No. 10 CROMATOGRAFÍAS DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA DEL SUBEXTRACTO ETANÓLICO**

<b>Fracciones</b>	<b>Solvente de Recorrido</b>	<b>Solvente de revelado</b>	<b>Rf obtenidos</b>
# 1 a la # 19	Benceno	Vainillina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rf #1 = 0.87 Rf #4 = 0.91
# 20 a la # 32	Cloroformo:Acetato de etilo (30:10).	Vainillina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rf #21 = 0.81
# 33 a la # 38	Cloroformo: Me(OH) (90:20)	Vainillina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Demasiados compuestos
# 39 a la # 41	Me(OH)	Vainillina H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rf # 39: 0.423 Rf # 40: 0.711 Rf # 41: 0.653

Luego de realizar una cromatografía de las fracciones indica que tenemos un  $R_f \#1 = 0.87$ ;  $R_f \#4 = 0.91$ ;  $R_f \#21 = 81$ ;  $R_f \#39 = 0.42$ ;  $R_f \#40 = 0.71$  y  $R_f \#41 = 0.65$ , indicando de esta manera que se trata de compuestos puros.

#### 3.4.1 PLACA PREPARATIVA PARA LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES DE LA #27 A LA #32 DEL SUBEXTRACTO ETANÓLICO.

Al realizar la placa preparativa de la unión de las fracciones desde la #27 a la #32 y utilizar solvente de recorrido Cloroformo: Acetato de etilo (30:10) y como revelador  $H_2SO_4$  vainillina es apropiado para la separación de compuestos, para luego realizar el corte de las bandas de la placa y realizar otra cromatografía de cada una de las bandas utilizando como solvente de recorrido Cloroformo: Acetato de etilo (30:5) y como revelador  $H_2SO_4$  vainillina, tenemos  $R_f$  banda #3 = 0.57;  $R_f$  #4 = 0.51, que presentan manchas de color marrón indicando de esta manera que se trata de terpenos.

#### 3.4.2 CROMATOGRAFÍAS DE LA FASE CLOROFÓRMICA Y METANÓLICA DE LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES #33 A LA #35

Al realizar la cromatografía en capa fina de las fases metanólica así como la clorofórmica con solvente de corrido Cloroformo: Me(OH) (90:20) y como agente revelador vainillina  $H_2SO_4$  se obtuvo un  $R_f F_{\text{CLOROFÓRMICA}} = 0.89$  y un  $R_f F_{\text{METANÓLICA}} = 0.81$ , dando una coloración marrón lo que indica que se trata de terpenos.

### 3.5 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL SUBEXTRACTO TOLUÉNICO

Al presentar, las cromatografías en vela con el solvente Benceno: Cloroformo: Acetato de Etilo (30:50:20), Vainillina  $H_2SO_4$  como agente revelador indicando que no hay una buena separación de los compuestos, se procede a cambiar el sistema de solvente de recorrido a Tolueno: Acetato de etilo (93:7), pero no se logra obtener los parámetros cromatográficos, es así que se procede a realizar una semisubextracción, obteniendo un sub-subextracto metanólico y un sub-subextracto de acetato de etilo.



### 3.5.1 CROMATOGRAFÍA DEL SUB-SUBEXTRACTO METANÓLICO

Al sub-subextracto metanólico, se realizó una cromatografía en capa fina utilizando como solvente de recorrido Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15) y como agente revelador  $Ce(SO_4)$ , se nota que no hay separación de la misma, se prueban otros sistemas de solventes pero no da resultado alguno ya que son resinas, presentando una consistencia pastosa este sub-subextracto.

### 3.5.2 CROMATOGRAFÍA DEL SUB-SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

La cromatografía en capa fina del sub-subextracto de acetato de etilo con solvente de recorrido acetato de etilo y como agente revelador Vainillina  $H_2SO_4$ , presenta los siguientes  $R_f$ s,  $R_{f1} = 0.22$ ,  $R_{f2} = 0.44$ ,  $R_{f3} = 0.62$ ,  $R_{f4} = 0.84$ , las mismas que son de color pardo marrón indicando que se trata de terpenos.

### 3.5.3 CROMATOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES #1 A LA #5 DEL SUB-SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Luego de realizar una cromatografía de las fracciones de la #1 a la #5, utilizando como solvente de recorrido Tolueno: Acetato de Etilo (93:7) y Vainillina  $H_2SO_4$ , como agente revelador se observan manchas, redondeadas, separadas por lo que nos permite aplicar placa preparativa para cada una de estas fracciones.

### 3.5.4 PLACA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN #1

Al realizar una placa preparativa del sub-subextracto acetato de etilo de la fracción #1, con solvente de recorrido Tolueno: Acetato de etilo (93:7) y  $Ce(SO_4)$  como agente revelador, seguidamente se procede al corte de las bandas para realizar una nueva cromatografía en capa fina con el mismo sistema de solvente y agente revelador presenta en la banda #4 un  $R_f = 0.79$  con  $\lambda_{max} = 227, 275$  nm, comparamos los valores de longitud de onda calculados de referencia bibliográfica, se puede determinar la posible estructura de cumarinas.

### 3.5.5 PLACA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN #3

La placa preparativa de la fracción #3, en el solvente de corrido Tolueno: Acetato de Etilo (93: 7) y revelada con Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> da la presencia de 5 bandas por lo que se procede al corte de cada una y a su cromatografía en Cloroformo: Metanol (40:20), presenta un Rf<sub>B4</sub> = 0.63 con una  $\lambda_{\max}$  = 223 nm y Rf<sub>B5</sub> = 0.65, 0.73 con una  $\lambda_{\max}$  = 281 nm, comparando los valores de longitud de onda calculados con los de bibliografía se puede determinar la presencia de terpenos y sesquiterpenolactonas.

### 3.5.6 PLACA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN #4

Hacer una placa preparativa de la fracción 4 del sub-subextracto de acetato de etilo con solvente de recorrido Tolueno: Acetato de Etilo (93:7) y Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como solvente revelador, seguidamente se procede al corte de las bandas para una nueva cromatografía en otro solvente de mayor polaridad para que las manchas se desprendan del punto de aplicación Cloroformo: Metanol: Agua (65: 35: 15), se obtienen los siguientes Rf: Rf<sub>B1</sub> = 0.25, 0.8 con una  $\lambda_{\max}$  = 225 nm y en la B#2 un Rf<sub>B2</sub> = 0.35, 0.76; con una  $\lambda_{\max}$  = 223 nm, tanto la longitud de onda práctica así como la teórica son iguales se deduce que corresponde a la estructura de sesquiterpenolactonas.

### 3.5.7 PLACA PREPARATIVA DE LA FRACCIÓN #5

La fracción #5 en la placa preparativa dio como resultado 4 bandas con el sistema de solvente Tolueno: Acetato de Etilo (93: 7) y Ce(SO<sub>4</sub>) como revelador, las cromatografías de cada corte de las bandas se aumentó la polaridad con el siguiente sistema Cloroformo: Metanol: Agua (65: 35: 15) y revelador Ce(SO<sub>4</sub>); dando como resultado los siguientes Rf de las bandas: Rf<sub>B1</sub> = 0.41, 0.91 con una  $\lambda_{\max}$  = 226 nm, 275nm; Rf<sub>B2</sub> = 0.5, 0.93 con una  $\lambda_{\max}$  = 230nm, 279nm; comparados los valores de longitud de onda calculados son similares a la de los espectros se puede deducir que corresponde a la estructura de las cumarinas. La banda #3 no muestra manchas indicando que no hay compuesto alguno.

### 3.5.8 CROMATOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES #6 A LA #9 DEL SUB-SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Al realizar la cromatografía en capa fina de las fracciones #6 a la #9 en l solvente de recorrido Acetato de etilo: metanol (95:5) y agente revelador Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, presenta Rf #9 = 0.30 lo que indica la presencia de un compuesto puro de color marrón. Así las otras fracciones presentas más de un Rf, ya que no se encuentran puras.

### 3.5.9 CROMATOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES #10 A LA #14 DEL SUB-SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

La fracción #10 da un Rf= 0.49 y la fracción # 12 Rf = 0.78, en cromatografía en capa fina con el sistema de solvente Metanol y como revelador utilizado Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lo que indica que se trata de terpenos ya que se encuentran revelados con el reactivo de Rosentaler. Las otras fracciones no se encuentran puras.

### 3.5.10 PLACA PREPARATIVA DE LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES #15, #16, #17

La placa preparativa de las fracciones de la #15 a la #16, en el solvente de recorrido Tolueno: Acetato de Etilo (93:7), revelada con Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, seguida al corte de cada una de la bandas y realizada una nueva cromatografía en Cloroformo: Metanol (40:10), dio el siguiente Rf de las banda#4: Rf<sub>B4</sub> = 0.93 con una  $\lambda_{\max}$ = 202,282 nm, se determina que corresponde a la estructura de los terpenos por los valores de longitud de onda calculados y los obtenidos experimentalmente, al ser iguales.

### 3.5.11 CROMATOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES #1 A LA #3 DE LA MICROCOLUMNA DE LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES #18 A LA #20

Al realizar la cromatografía en capa fina de las fracciones de la #1 a la #3 con solvente de recorrido Acetato de etilo y usado Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de revelador da como resultado Rf #1 = 0.78 de un color pardo asumiendo la presencia de un terpeno, no así para las otras fracciones que hay la presencia de dos compuestos.

### 3.5.12 CROMATOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES #4 A LA #6 DE LA MICROCOLUMNA DE LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES #18 A LA #20

La cromatografía en capa fina de cada una de estas fracciones con el sistema de solventes Acetato de Etilo: Ácido Acético: Ac Fórmico: Agua (100: 11: 11: 26) y  $Ce(SO_4)$  como revelador dio la presencia de varias manchas, por lo que no se pueden considerar compuestos puros, de otra forma son compuestos fotosintéticos que se degradan con gran facilidad en presencia de la luz.

### 3.5.13 CROMATOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES #7 A LA #9 DE LA MICROCOLUMNA DE LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES #18 A LA #20

La cromatografía de cada una de estas fracciones, arrojó dos manchas redondas, separadas y distribuidas desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente dando un  $Rf_{\#8} = 0.32$  y  $Rf_{\#9} = 0.34$  con un sistema de solvente para flavonoides Acetato de Etilo: Ácido Acético: Ac Fórmico: Agua (100: 11: 11:26) y  $Ce(SO_4)$  como revelador.

### 3.5.14 CROMATOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES #10 A LA #16 DE LA MICROCOLUMNA DE LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES #18 A LA #20

Al realizar la cromatografía de cada una de estas fracciones, con el sistema de solventes Cloroformo: Me(OH) (40: 10) y Vainillina  $H_2SO_4$ , dio como resultado una mancha redonda en las fracciones #10 con un  $Rf = 0.5$  con una  $\lambda_{max} = 203$  nm, #11 con un  $Rf = 0.5$  con una  $\lambda_{max} = 203, 300$  nm y la #12 con un  $Rf = 0.52$  con una  $\lambda_{max} = 203, 276$  nm. Comparamos los valores de longitud de onda calculados como los obtenidos de la práctica, siendo estos similares por lo que se deduce que se trata de una estructura de terpenos.

Mientras que en las otras hay la presencia más compuestos, no están puros lo que se debe a que son compuestos que se degradan con facilidad en la presencia de la luz.

### **3.6 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DEL SUB-EXTRACTO BUTANÓLICO**

Se realizó una semiextracción, del subextracto butanólico, ya que no presentaba una buena separación de sus compuestos, de la cual se obtuvo un sub-subextracto etéreo, y de acetona a los mismos que se los realizó una cromatografía, utilizando como solvente de corrido Cloroformo: Me(OH): Agua (65: 35: 15) y revelado con Ce(SO<sub>4</sub>), dio manchas en el sub-subextracto etéreo lo que permitió hacer una columna cromatográfica. Lo que no sucedió con el Sub-subextracto de acetona que no dio la presencia de manchas, indicando que no hay compuestos presentes en el mismo.

#### **3.6.1 CROMATOGRAFÍAS DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA**

Se realizó cromatografías, de las siguientes fracciones, #1, #2, #5, #8, #13, #14; #18 y #20 de las 22 fracciones recogidas con el solvente de corrido Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15) usando como agente revelador Ce(SO<sub>4</sub>), dando manchas semejantes lo que permite unir las fracciones #6 a la #8; de la #9 a la #10; de la #11 a la #12, de la #13 a la #16; de la #17 a la #18 y de la #19 a la #22, para su posterior cromatografía de estas.

Se volvió a correr, la fracciones unidas en las mismas condiciones anteriores, pero no dio una buena separación de los compuestos por lo que se cambió de solvente a otro en el cual haya mejor separación de las manchas a Acetato de etilo: Me(OH): Agua (100: 24: 10), Ce(SO<sub>4</sub>) como revelador con doble corrido y en el cual se pudo ver una mejor eficiencia, eficacia y resolución de la placa.

Así se procedió a la unión de fracciones, para aplicar placa preparativa.

#### **3.6.2 PLACA PREPARATIVA DEL SUB-SUBEXTRACTO ÉTEREO DE LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES #1, #2 Y #6**

Una vez realizada la placa preparativa de la unión de las fracciones #1, #2 y #6, utilizando como solvente de recorrido Acetato de etilo: Me(OH): Agua (100: 24: 10) y como revelador Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, al hacer el corte de cada una de las bandas para luego aplicar una

cromatografía en las mismas condiciones se obtiene un  $Rf_{B1} = 0.88$  con una  $\lambda_{max} = 202, 280$  nm;  $Rf_{B2} = 0.85$  con una  $\lambda_{max} = 202, 281$  nm; por la longitud de onda calculada y la que se obtiene experimentalmente se deduce que su posible estructura sea un terpenoide. La B#4 presenta un  $Rf_{B4} = 0.67$  con una  $\lambda_{max} = 202, 220$  nm, se puede determinar que su posible estructura sea una sesquiterpenolactona al comparar los valores de longitud de onda calculado y el práctico.

### 3.6.3 PLACA PREPARATIVA DEL SUB-SUBEXTRACTO ÉTEREO DE LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES #3, #4 Y #5

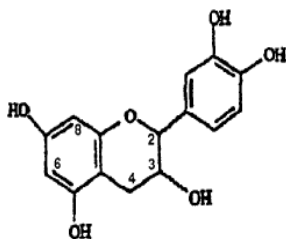
Realizada la placa preparativa, de estas fracciones se procede al corte de sus bandas obtenidas, de la cromatografía en Acetato de etilo: Me(OH): Agua (100: 24: 10) y como revelador  $Ce(SO_4)$ , se obtiene la presencia de 4 bandas. A cada una de estas, se realiza una nueva cromatografía en capa fina en las mismas condiciones, obteniendo de la banda #3 un  $Rf = 0.4$  con una  $\lambda_{max} = 203, 231, 279, 310$  nm y de la banda #4 un  $Rf = 0.66$  con una  $\lambda_{max} = 202, 229, 279, 310$  nm. Por lo tanto se deduce que tanto el UV teórico y el práctico son similares se deduce que corresponde a la estructura de Isoflavona. Mientras que para las dos primeras no se observa la presencia de otras manchas. Indicando que estas se encuentran puras.

## 3.7 POSIBLES ESTRUCTURAS DADAS POR EL UV

### 3.7.1 (+) FLAVONOIDES:

FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FITOQUÍMICO (BI 245-275 nm); (BII 310-330 nm)

**CUADRO No 11. LONGITUDES DE ONDA CALCULADAS PARA FLAVONOIDES APLICANDO LAS REGLAS DE WOODWARD Y FIESER**



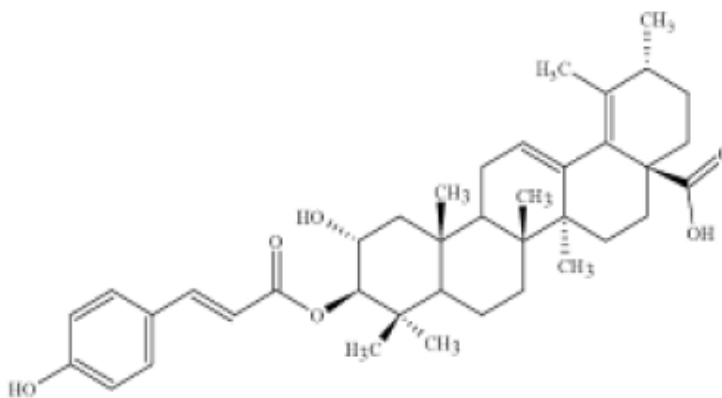
	Benzo $\gamma$ pirona	246 nm
	OH (p)	25 nm
	OR (o)	7 nm
	$\lambda_{\max}$ calculada	278 nm
	$\lambda_{\max}$ experimental	279 nm
	Pirona	315 nm
	OR (o)	7 nm
	Residuo	3 nm
	$\lambda_{\max}$ calculada	325 nm
	$\lambda_{\max}$ experimental	310 nm
	Pirocatecol	214 nm
	OH (m)	12 nm
	Residuo	3 nm
	$\lambda_{\max}$ calculada	229 nm
	$\lambda_{\max}$ experimental	231 nm

### 3.7.2 (+) TERPENOIDES

FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FITOQUÍMICO    Comp. Insaturados:  $\lambda_{\max}$  217- 250 nm  
 Comp. Aromáticos:  $\lambda_{\max}$  250- 270 nm

CUADRO No 12. LONGITUDES DE ONDA CALCULADAS PARA TERPENOIDES APLICANDO LAS REGLAS DE WOODWARD Y FIESER

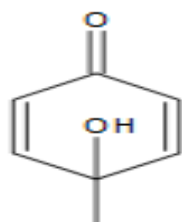
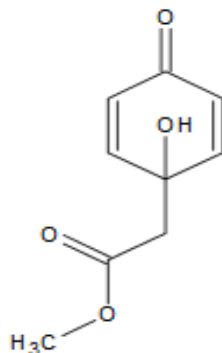
### 3.7.2.1 Acido Jacoumárico (204, 276, 300 Nm)



	<p>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>- OH      180 nm                      OH (p)            25 nm                      Residuo            <del>3 nm</del>  <math>\lambda_{\text{max}}</math> calculada    208 nm  <math>\lambda_{\text{max}}</math> experimental   203 nm</p>
	<p>Anillo base            215 nm                      Adición C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>        30 nm                      OR (<math>\beta</math>)                <del>30 nm</del>  <math>\lambda_{\text{max}}</math> calculada       275 nm  <math>\lambda_{\text{max}}</math> experimental    276 nm</p>
	<p>Anillo base            214 nm                      Sustituyente          <u>20 nm</u>  <math>\lambda_{\text{max}}</math> calculada       234 nm  <math>\lambda_{\text{max}}</math> experimental    230 nm</p>



### 3.7.2.2 Jacaranona (259 nm)

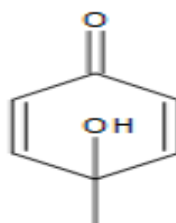
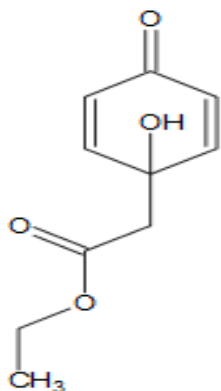


---

Anillo Base	214 nm
c ( $\beta$ )	10 nm
Exten.Cadena	10 nm
OH (p)	<u>25 nm</u>
$\lambda_{\max}$ calculada	259 nm
$\lambda_{\max}$ experimental	300 nm

---

### 3.7.2.3 Metiljacaranona (259 nm)



---

Anillo Base	214 nm
c ( $\beta$ )	10 nm
Exten.Cadena	10 nm
OH (p)	<del>25 nm</del>
$\lambda_{\max}$ calculada	259 nm
$\lambda_{\max}$ experimental	300 nm

---

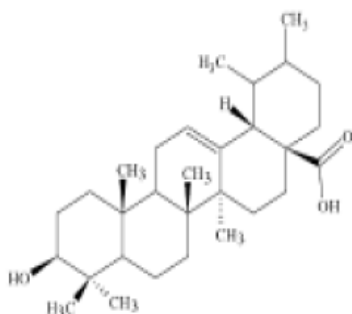
---

---

## ÁCIDO URSÓLICO

---

---

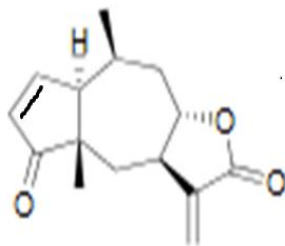


Este compuesto, no presentan longitud de onda ya que no tienen grupos cromóforos, es decir dienos conjugados.


### 3.7.3 (+) SESQUITERPENOLACTONAS

FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FITOQUÍMICO  $\lambda_{\max}$  205-212 nm

CUADRO No 13. LONGITUDES DE ONDA CALCULADAS PARA SESQUITERPENOLACTONAS APLICANDO LAS REGLAS DE WOODWARD Y FIESER



---

	Anillo Base	202 nm
	Ext. Conjugación	5 nm
	OH (m)	12 nm
	Residuo	-3 nm
	$\lambda_{\max}$ calculada	222 nm
	$\lambda_{\max}$ experimental	223 nm

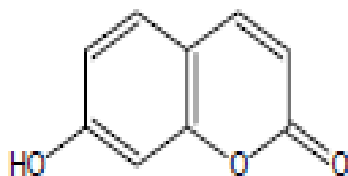
---

---

### 3.7.4 (+) CUMARINAS

FUENTE: OLGA LOOCK-1998. ANÁLISIS FITOQUÍMICO  $\lambda_{\max}$  274 y 311 nm

CUADRO No 14. LONGITUDES DE ONDA CALCULADAS PARA CUMARINAS APLICANDO LAS REGLAS DE WOODWARD Y FIESER



	<p>Anillo Base 215 nm            Ext. Conjugación 5 nm            Residuo 3 nm            OH (o) 7 nm  <math>\lambda_{\max}</math> calculada 230 nm  <math>\lambda_{\max}</math> experimental 227 nm</p>		<p>Anillo Base 246 nm            Ext. Conjugación 5 nm            Residuo 3 nm            OCH<sub>3</sub> (o) 25 nm  <math>\lambda_{\max}</math> calculada 279 nm  <math>\lambda_{\max}</math> experimental 279 nm</p>
--	--	--	--

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES

1. La Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), del Ecuador se identificó taxonómicamente, en el herbario de la ESPOCH, originario de Colombia, e introducido y cultivado en las Provincias del Azuay y Chimborazo.
2. El extracto Etanólico de 2 Kg de la planta por maceración y concentrado se obtuvo 5.32g, tiene un color verde, olor aromático, sabor dulce, aspecto pegajoso, con densidad de 0.95 g/mL, pH de 5.5 ligeramente ácido y el índice de refracción de 1.3618. Los subextractos se prepararon por extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente, obteniéndose con tolueno 0.67g, con butanol 0.69g, y del etanólico 0.81g. En el tamizaje fitoquímico presenta flavonoides, terpenoides, sesquiterpeno lactonas, coumarinas y saponinas.
3. De la cromatografía en columna del subextracto etanólico en la fracción #1 y #4 del análisis por cromatografía en capa fina corrido en Benceno da un Rf #1 = 0.87 y Rf #4 = 0.91. La fracción # 21 da un Rf de 0.81 con el solvente de corrido Cloroformo: Acetato de etilo (30:10). De igual manera con solvente de corrido Metanol dan los siguientes Rfs: Rf#39 = 0.42; ; Rf#40 = 0.71 y : Rf#41 = 0.65. Cada una de estas fracciones reveladas con Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

En la verificación de compuestos en las bandas de la placa preparativa de la unión de la fracción de la #27 a la 32, con eluyente de Cloroformo: Acetato de Etilo (30:5) y revelado con Vainillina  $H_2SO_4$  en la banda #3 indica la presencia del compuesto con  $R_f = 0.57$  y la banda #4 con  $R_f = 0.51$ .

El análisis cromatográfico de capa fina, de la fase metanólica da un  $R_f = 0.81$  y de la fase clorofórmica  $R_f = 0.89$ , en el solvente de corrido Cloroformo: Me(OH) (90: 20) y como agente revelador  $H_2SO_4$  vainillina.

4. En la verificación de compuestos en las bandas de las placas preparativas de la fracción #1 del Sub-subextracto de acetato de etilo presentó un  $R_{f\ B4} = 0.79$  con una  $\lambda_{max} = 230, 279$  nm cromatografiado con: cloroformo: acetato de etilo (93: 7) revelado con sulfato de cerio al comparar los valores de longitud de onda calculados y el obtenido experimentalmente así como el de referencia bibliográfica se deduce que pertenece a una cumarina.

La verificación de la fracción #3, de la Columna en la banda #4 cromatografiado con: cloroformo: metanol (40:20) revelado con Vainillina  $H_2SO_4$  indica la presencia de un compuesto con  $R_{f1} = 0.63$  con una  $\lambda_{max} = 223$  nm; según la longitud de onda calculada, la experimental, así como en bibliografía se trata de una sesquiterpenolactona.

De la unión de la fracción #15 a la #17 de la placa preparativa dio un  $R_f$  en la banda #4 de 0.93 con una  $\lambda_{max} = 282$  nm, cromatografiado con: cloroformo: metanol (40:10) revelado con Vainillina  $H_2SO_4$  determinando así su posible estructura de un Terpeno ya que los valores calculados de la longitud de onda son similares con los obtenidos experimentalmente, como los que se muestran en bibliografía.

El análisis cromatográfico de cada una de las fracciones de la microcolumna de la unión de la fracción #18 a la #20; la fracción #1 indica la presencia de un compuesto con  $R_f = 0.78$  corrida con Acetato de Etilo y revelada con Vainillina  $H_2SO_4$ . La

fracción #8 da un  $R_f = 0.32$  y la fracción #9 con un  $R_f = 0.34$  con un sistema de solvente Acetato de Etilo: Acido acético: Ac. Fórmico: Agua (100:11:11:26), usado Vainillina  $H_2SO_4$ , como agente revelador.

La fracción #10 y la #11 dan un  $R_f = 0.5$  con  $\lambda_{max} = 203,300$  nm y la fracción #12 da un  $R_f = 0.52$  con  $\lambda_{max} = 203, 276$  nm corridas en Cloroformo: Metanol (4:1), reveladas de igual manera con Vainillina  $H_2SO_4$ . Tratándose así de posibles Triterpenos como el ácido jacoumarico, la jacaranona y la metil jacaranona ya que los valores de longitud de onda calculados, los experimentales y los de referencia bibliográfica para terpenoides son similares.

5. La cromatografía de las bandas de las placas preparativas del Sub-subextracto etéreo cromatografiado con: acetato de etilo: metanol: agua (100:24:10) revelado con sulfato de cerio la unión de las fracción #1, #2 y #6, indican la presencia de compuestos en las bandas #1 con un  $R_f = 0.88$ ; en la banda #2  $R_f = 0.85$  y en la banda #4 con un  $R_f = 0.67$ , respectivamente. En las fracciones unidas de la #3 a la #5 en la banda #3 se tiene un  $R_f = 0.4$  con  $\lambda_{max} = 203, 231, 279, 310$  nm y en la banda #4 un  $R_f = 0.66$  con  $\lambda_{max} = 202, 229, 279, 310$  nm; de acuerdo a la longitud de onda calculada, la experimental así como la de referencia bibliográfica de los flavonoides se determina la estructura de una posible Isoflavona.
6. Por espectroscopía en el UV, se determinó que aquellos compuestos que presentan uno y dos longitudes de onda respectivamente pertenecen a terpenoides comprendidas entre  $\lambda_{max} = 215-250$  nm para compuestos insaturados, y  $\lambda_{max} = 250-270$  nm para compuestos aromáticos. Aquellos compuestos que presentan  $\lambda_{max} = 205-212$  nm pertenecen a los sesquiterpenolactonas. Las coumarinas presentan entre  $\lambda_{max} = 274$  y  $311$  nm. Los que presentan tres longitudes de onda se consideran flavonoides (Isoflavonas) entre  $\lambda_{max} = 270-275$  nm y  $310-330$  nm, determinando de esta manera sus posibles estructuras.

## CAPITULO V

### RECOMENDACIONES

1. Se sugiere que se haga convenios con otras universidades que posean equipos, como el espectrofotómetro de masas, para realizar estudios más profundos a la especie vegetal y de esta manera determinar estructuras, para que los trabajos puedan ser publicados en revistas.
2. Seguir con el estudio de esta planta, pues por los componentes que esta presenta, se puede determinar que posee otras propiedades biológicas para lo cual se deberá realizar un monitoreo para detectar la mayor cantidad de compuestos con posibilidad de actividad farmacológica.
3. Realizar pruebas de extracción con diferentes mezclas de solventes, de acuerdo a su polaridad, para obtener un mayor rendimiento de los metabolitos.
4. Al utilizar los solventes de corrido, se deben utilizar de forma creciente de menor a mayor polaridad, para que de esta manera se pueda ir utilizando la misma placa gradualmente y así llegar al sistema de solvente apropiado.
5. Para revelar ya sea con  $\text{Ce}(\text{SO}_4)$  o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  Vainillina, utilizar mascarilla y guantes para evitar quemarnos o posibles intoxicaciones con estos ácidos.

## CAPÍTULO VI

### RESUMEN

La Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), es utilizada como antibacteriano, esta investigación orienta a la técnica de análisis químico para lo cual se separa e identifica los metabolitos secundarios que son la jacaranona, ácido jacoumárico y la metil jacaranona realizada en el Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias; se prepara por maceración del vegetal con Etanol, se concentra por evaporación y se analiza con reacciones de coloración e identificación para flavonoides (Shinoda), saponinas (espuma), terpenoides (Liebermam Buchart), y lactonas (Baljet). El extracto etanólico se fragmenta en subextractos tolueno, butanol y etanólico residual, la cromatografía en capa fina en fase estacionaria de silica gel G<sub>F254</sub> del sub-sub extracto de acetato de etilo corrida la fracción 1 corrida en cloroformo: acetato de etilo (93:70) y revelada con Ce(SO<sub>4</sub>) da un R<sub>fB4</sub>: 0.79 a  $\lambda_{\max}$ = 230, 279 nm deduciendo la estructura de una cumarina.

La cromatografía en capa fina de la fracción 10 y 11 dan un R<sub>f</sub> : 0.5 con  $\lambda_{\max}$  = 203,300 nm que corresponde posiblemente a la jacaranona y metil jacaranona en la fracción 12 da un R<sub>f</sub>= 0.52 a una  $\lambda_{\max}$  = 203, 276 nm posiblemente corresponde al ácido jacoumárico, corridas en Cloroformo: Metanol (4:1), reveladas con Vainillina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Al subextracto butanólico tratado con éter, se obtiene un sub-subextracto etéreo, la cromatografía en capa fina con Cloroformo:Metanol:Agua (65:35:15) revelada con Ce(SO<sub>4</sub>), presenta R<sub>f</sub>s similares por lo que se fracciona la muestra en una columna cromatográfica de la fracción 3 a la 5 dan manchas redondas, separadas y similares por lo que se les une, cromatografiadas en AtOAc:Me(OH):Agua (10:2.4:1) por lo que se aplica una placa preparativa, en la verificación de compuestos se tiene en la banda 3 un R<sub>f</sub> = 0.4 con  $\lambda_{\max}$  =



203, 231, 279, 310 nm, en la banda 4 un  $R_f = 0.66$  con  $\lambda_{\max} = 202, 229, 279, 310$  nm; determinando posiblemente flavonoides y la estructura de una Isoflavona.

Comprobando así, que hasta dos picos corresponde a terpenos y tres a flavonoides. Se recomienda, que se realicen posteriores estudios para determinar la estructura química de los metabolitos mencionados.

## ABSTRACT

The Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), is used as an antibacterial, this research aims to chemical analysis technique which separates and identifies secondary metabolites that are jacaranona, jacoumárico acid and metiljacaranona conducted in the Laboratory of Phytochemistry School of Biochemistry and Pharmacy, Faculty of Science, is prepared by steeping the plant with ethanol, evaporated and analyzed with staining reactions and identification for flavonoids (Shinoda), saponins (foam), terpenoids (LiebermamBuchart), and lactones (Baljet). The ethanolic extract subextractos fragments in toluene, butanol and residual ethanolic, thin layer chromatography on silica gel stationary phase sub-sub  $G_{F254}$  ethyl acetate extract fraction run 1 run in chloroform: ethyl acetate (93:70 ) and revealed with Ce (SO<sub>4</sub>) gives an  $R_{F_{B4}}$  0.79 to  $\lambda_{max} = 230, 279$  nm subtracting a coumarin structure.

Thin layer chromatography of fraction 10 and 11 give an Rf: 0.5 with  $\lambda_{max} = 203.300$  nm which corresponds to the jacaranona and possibly metil jacaranona in fraction 12 gives an Rf = 0.52 at a  $\lambda_{max} = 203, 276$  nm corresponds to the acid may jacoumárico, cum in chloroform: methanol (4:1), revealed with vanillin H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

At subextracto butanólico tratado with ether yields a sub-subextracto ethereal, thin layer chromatography with chloroform: methanol: water (65:35:15) disclosed with Ce(SO<sub>4</sub>) presents similar Rfs so the sample is fractionated into a chromatographic column fraction 3 to 5 give round spots separated and the like so that joins them, chromatographed on AtOAc: me (OH): water (10:2.4:1) as preparative plate is applied in verification of the compounds in the band 3 has an Rf = 0.4 with  $\lambda_{max} = 203, 231, 279, 310$  nm, in the band 4 with an Rf = 0.66  $\lambda_{max} = 202, 229, 279, 310$  nm; determining flavonoids and possibly an isoflavone structure.

Thus proving that even two peaks corresponding to three to terpenes and flavonoids. It is recommended that further studies are conducted to determine the chemical structure of the metabolites mentioned.

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA

1. **ACOSTA, M.**, Vademécum de Plantas Medicinales del Ecuador. Quito-Ecuador FESO-Abya-Yala., 1992., Pp. 45-50.
2. **BRUNETON, J.**, Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. 2<sup>a</sup>. ed. Barcelona-España., Alambra; 2001., Pp. 1094.
3. **CORREA, B.**, Especies vegetales promisoras. SECAB. Editora Guadalupe Ltda.A.A29765. Bogotá-Colombia., 1989., Pp. 400-412.
4. **CUMANDÁ, J.**, Texto Básico de Farmacognosia. Editorial CDR. Riobamba– Ecuador., 2004., Pp. 97.
5. **DOMINGUÉZ, A.**, Cromatografía en papel y en Capa Delgada. Ed. Eva. México- DF-México., 1975., Pp. 62-63.
6. **DOMINGUEZ, X.**, Métodos de Investigación Fotoquímica. Editorial Limusa Ciudad de México-México., 1973., Pp. 81-82.

7. **GARCIA-BARRIGA, H.**, Flora medicinal de Colombia. Botánica Médica. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad nacional de Colombia. Talleres Editoriales de la Imprenta Nacional. Bogotá-Colombia., 1975., Pp. 139-143.
8. **GROS, E.**, Introducción al estudio de los Productos Naturales. Barcelona-España., 1985., Pp. 78-90.
9. **HARVEY, D.**, Química Analítica Moderna. Quito-Ecuador., Editorial. Graw Hill. 2009., Pp. 146, 229-301, 402-403.
10. **HARRIS, M.**, Análisis Químico Cuantitativo, 2<sup>a</sup>. ed. Grupo Editorial Iberoamérica., 2008., Pp. 619.
11. **LOK, O.**, Investigación Fitoquímica. 2<sup>a</sup>. ed. Lima-Perú., Editorial Universidad Católica del Perú., 1994., Pp. 27, 270-278.
12. **MARTINEZ, A.**, Manual de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica. Universidad de Antioquia., 2008., Pp. 65-72.
13. **NOLLER, C.**, Química Orgánica. 3<sup>a</sup>.ed. Ciudad de México-México., Interamericana., 1968., Pp. 454-473.
14. **PAMPLONA, J.**, Enciclopedia de las Plantas Medicinales. 2<sup>a</sup>.ed. Buenos Aires-Argentina., Editorial Safeliz., 2006., Pp. 365- 368.

**15. SILVERSTEIN, R.,** Identificación Espectrométrica de Compuestos Orgánicos. Ciudad de México-México., Diana., 1980., Pp. 253-258.

**16. WHITE, A.,** Hierbas del Ecuador. Plantas Medicinales. Imprenta Mariscal. Quito- Ecuador., 1976., Pp. 146.

**17. ANALISIS FITOQUÍMICO**

[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2575.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2575.pdf)

2012/09/10

**18. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA JACARANDA**

<http://herbario.medellin.unal.edu.co/MEDEL/?controlador>

2012/07/10

**19. CONSTANTE DE DISTRIBUCIÓN: Cromatografía**

[http://www.Constantedistribución.net/pageID\\_0597340.html](http://www.Constantedistribución.net/pageID_0597340.html)

2013/02/14

**20. CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA: Eluyentes**

<http://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicass>

2013/02/14

**21. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE LA JACARANDA**

<http://fichas.infojardin.com/bonsai/jacaranda-mimosifolia>

2012/09/10

**22. EL MUNDO DE LAS PLANTAS**

[http://www.conganat.org/7congreso/trabajo.asp?id\\_trabajos](http://www.conganat.org/7congreso/trabajo.asp?id_trabajos)

2012/09/20

**23. ETNOGRAFÍA: Etnobotánica**

<http://www.aranzadi-zientziak.org/.php?id=432>

2012/09/20

**24. EXTRACTOS VEGETALES.**

<http://www.sanopordentro.com/extractos-vegetales.html>

2012/09/26

**25. FICHA TÉCNICA JACARANDA**

[http://www.edirights.com/WebRoot/ce\\_es/Shops/2809](http://www.edirights.com/WebRoot/ce_es/Shops/2809)

2012/09/26

**26. GUALANDAY EN COLOMBIA**

<http://www.hipernatural.com/es/pltgualanday.html>

2012/07/10

**27. HERBOLARIA**

[http://dialnet.unirioja.es/servlet/revista?tipo\\_busqued](http://dialnet.unirioja.es/servlet/revista?tipo_busqued)

2012/09/25

**28. JACARANDA**

<http://books.google.com.ec/books?id=K8eI7ZeFpsC&pg=>

2012/07/10

**29. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.**

<http://www.monografias.com/trabajos66/extractosplantas>

2012/09/26

**30. ORIGEN DE LA JACARANDA**

<http://todobonsai.blogspot.com/2007/02/ficha-jacaranda>

2012/09/26

### **31. TAXONOMIA DE LA JACARANDA**

[http://www.natureduca.com/botan\\_clasif\\_taxonom1.php](http://www.natureduca.com/botan_clasif_taxonom1.php)

2012/09/26

### **32. USOS DE LA JACARANDA**

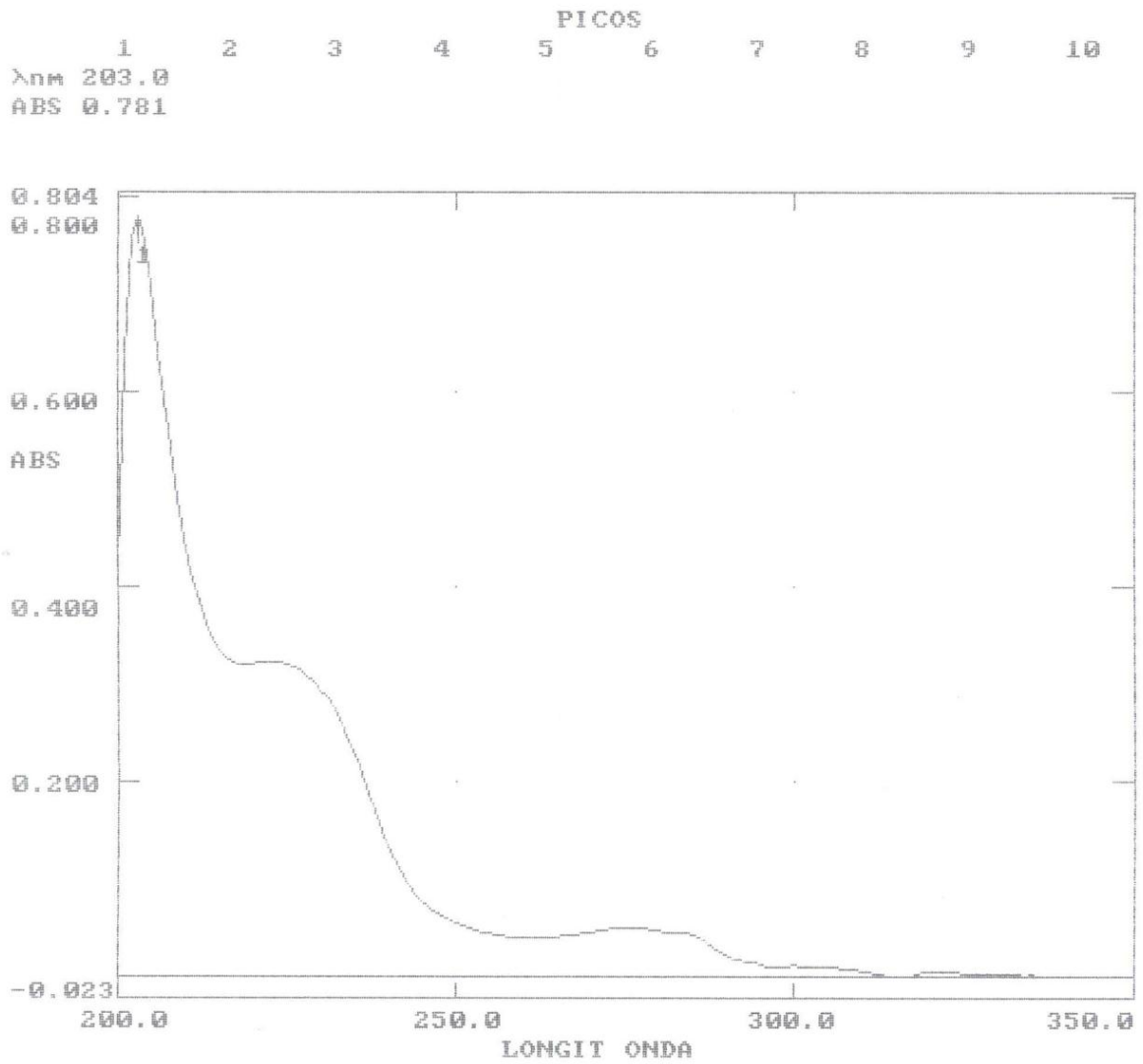
<http://books.google.com.ec/books?id=fefaqvwHHoYC&pg>

2012/09/13

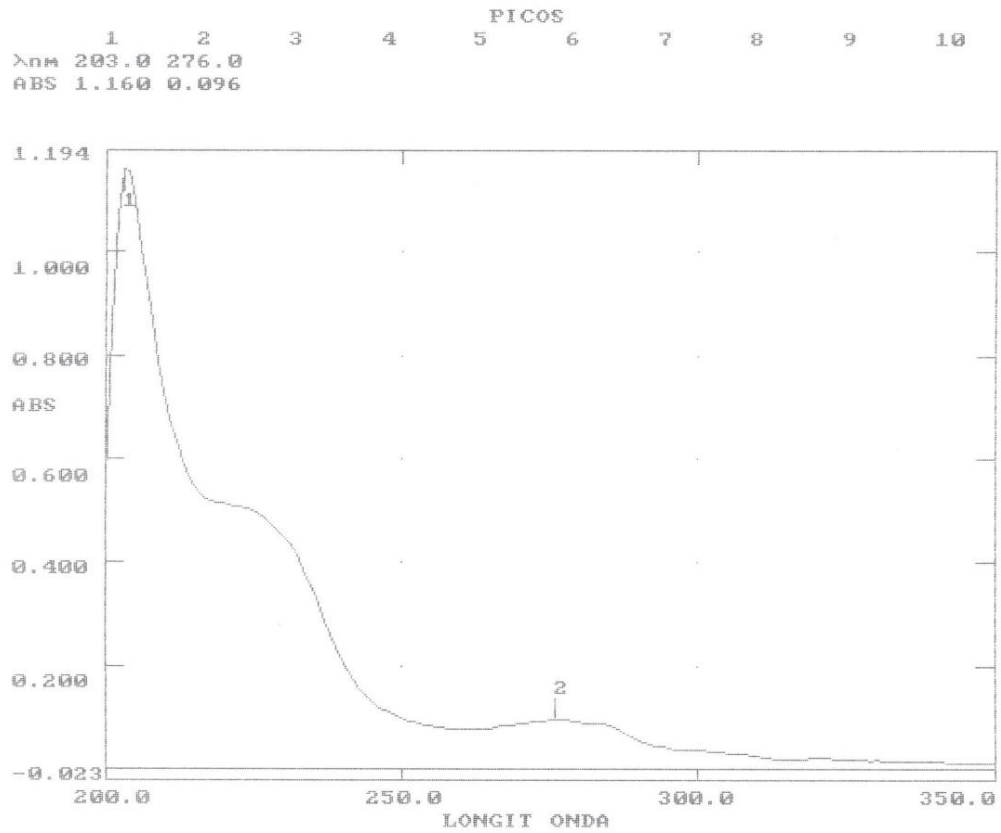
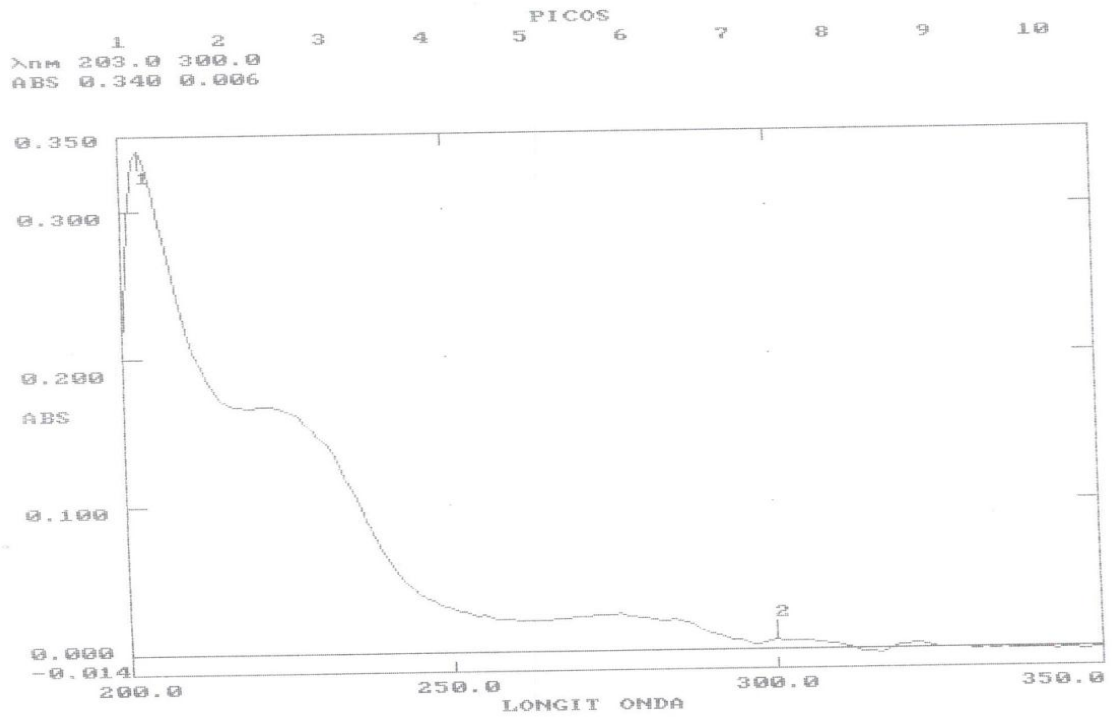
# CAPITULO VIII

## ANEXOS

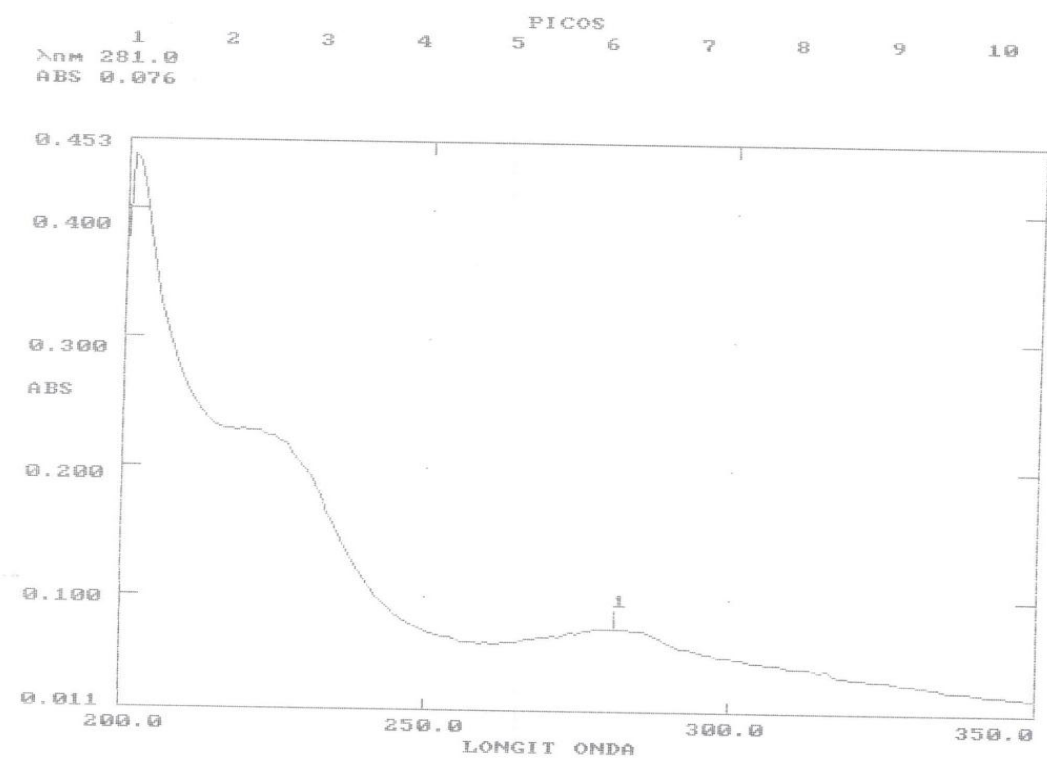
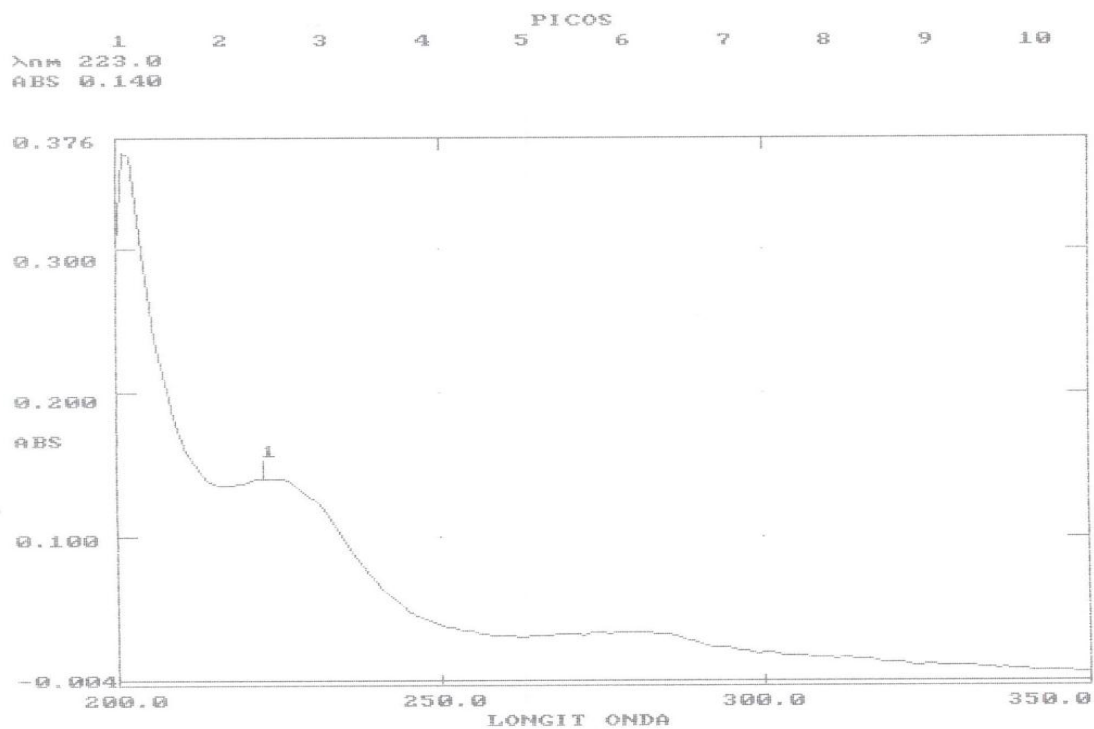
### ANEXO No 1. ESPECTROS DE LAS FRACCIONES DE LA MICROCOLUMNA DEL SUB-SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

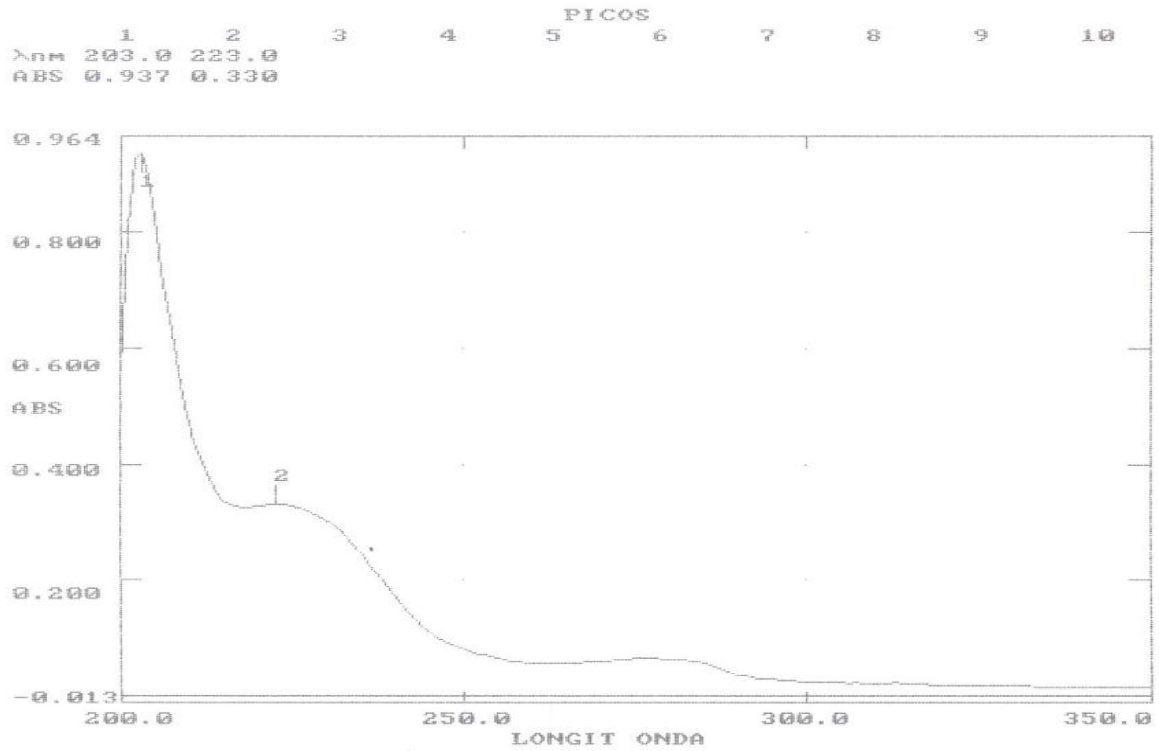
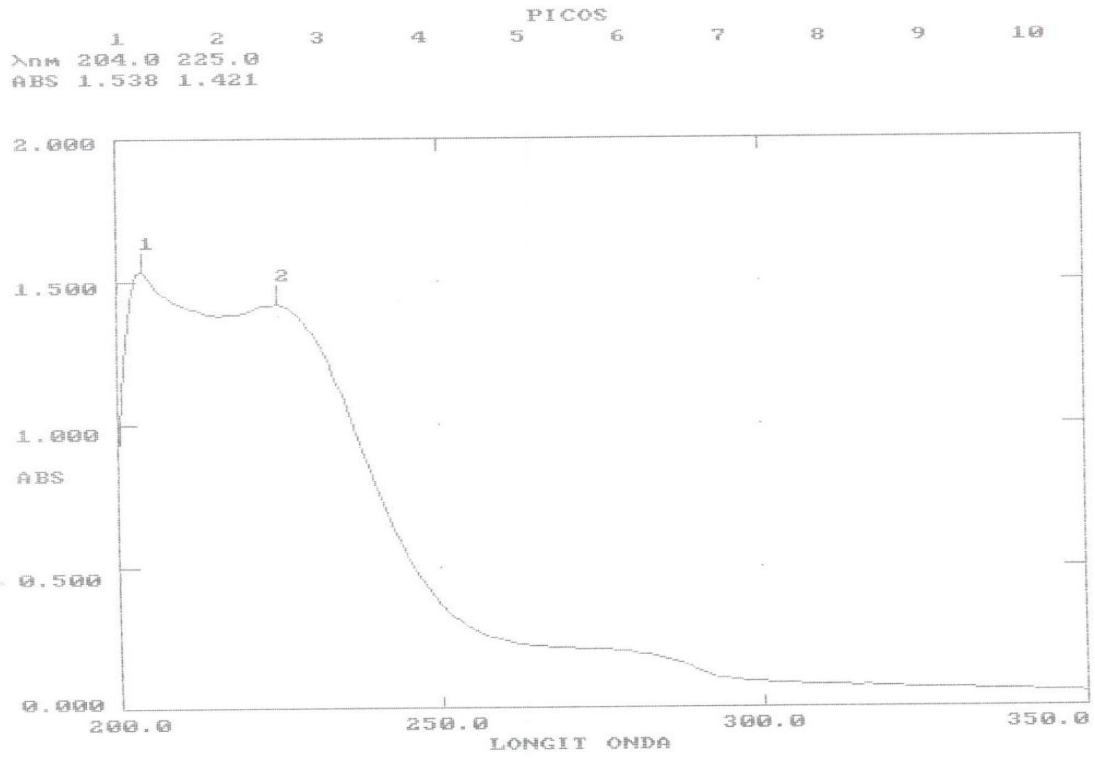


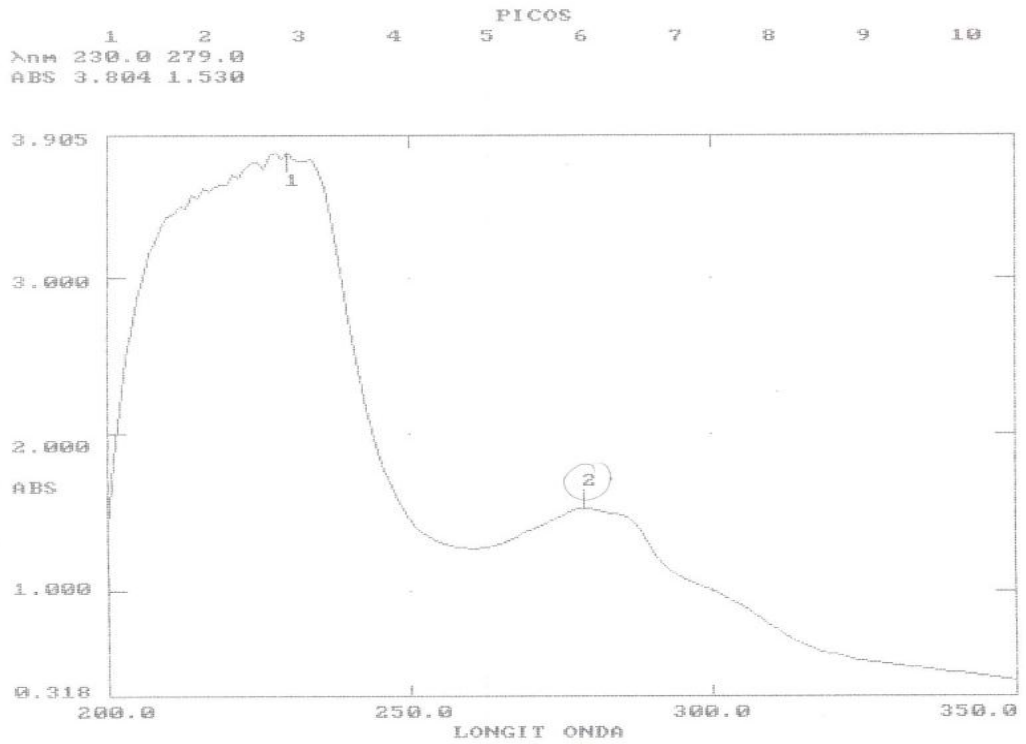
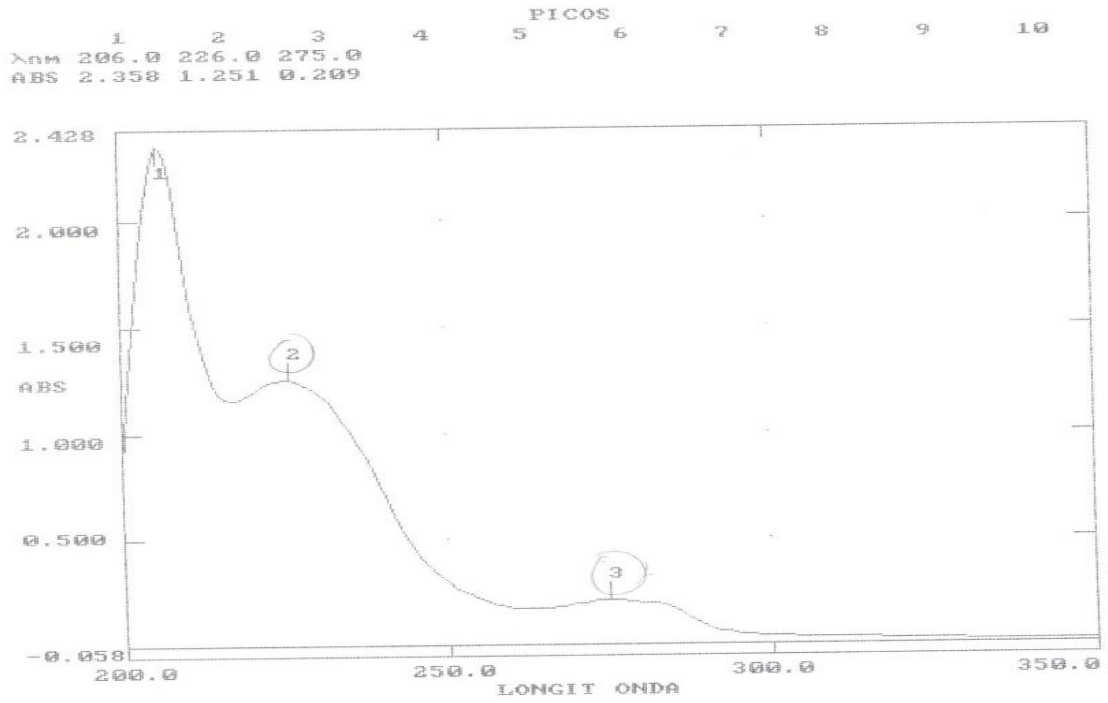


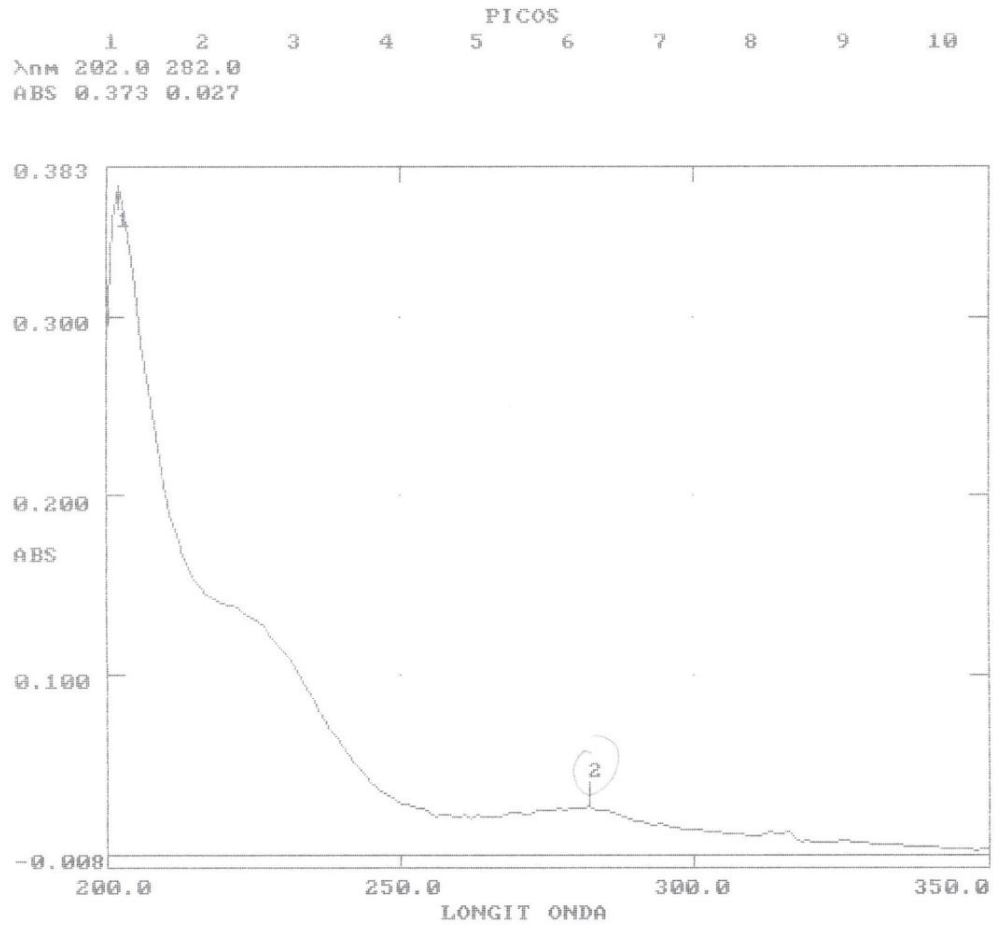


**ANEXO No 2. ESPECTROS DE LAS PLACAS PREPARATIVAS DEL SUB-SUBEXTRACTO DE ACETATO DE ETILO**

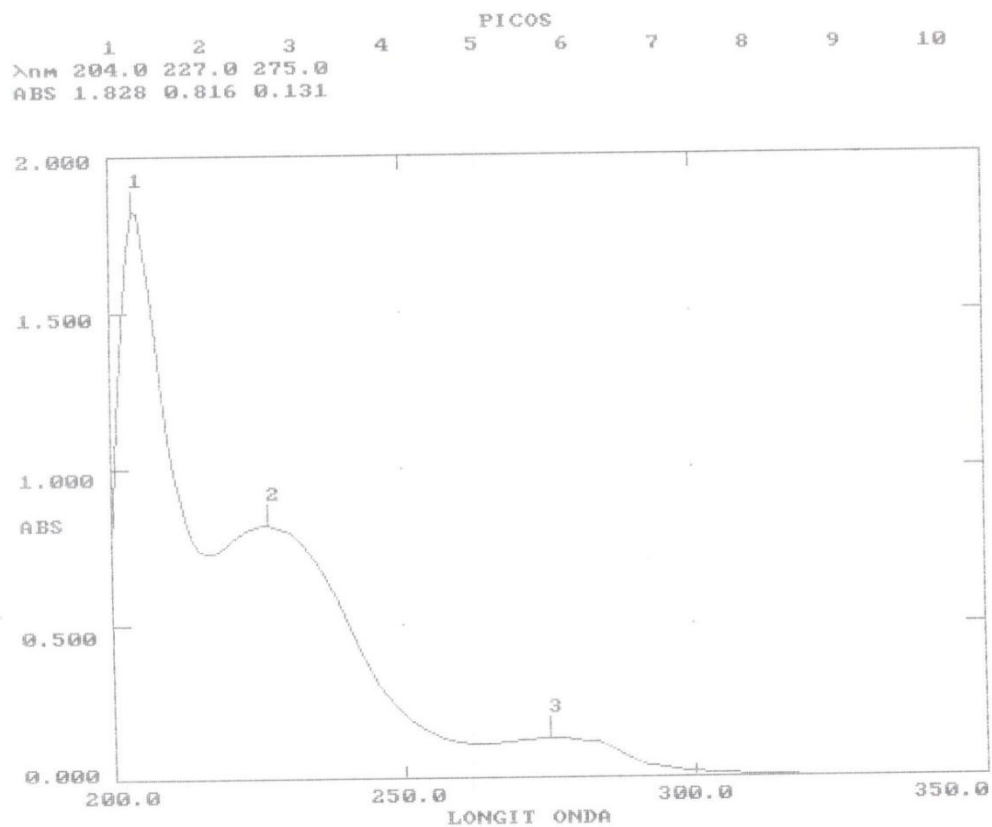


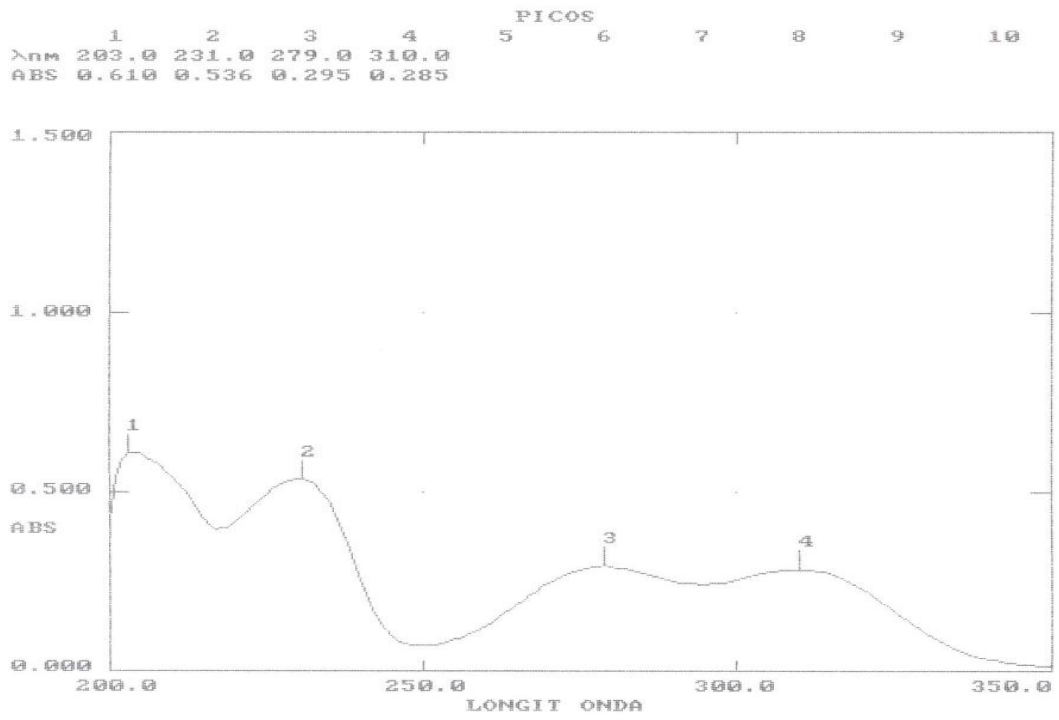
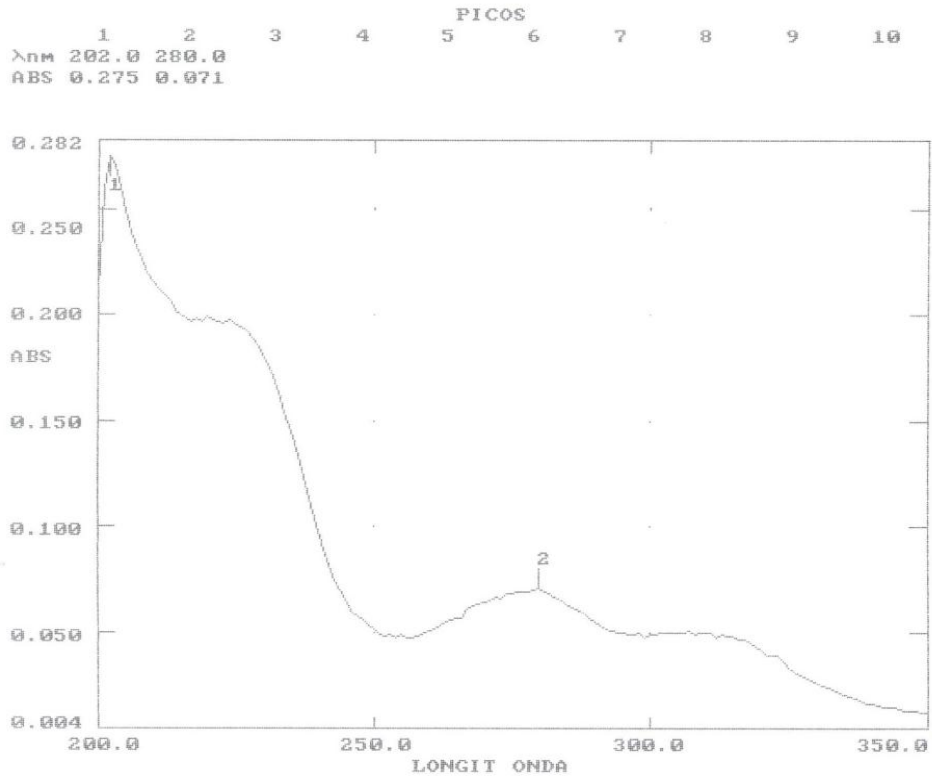




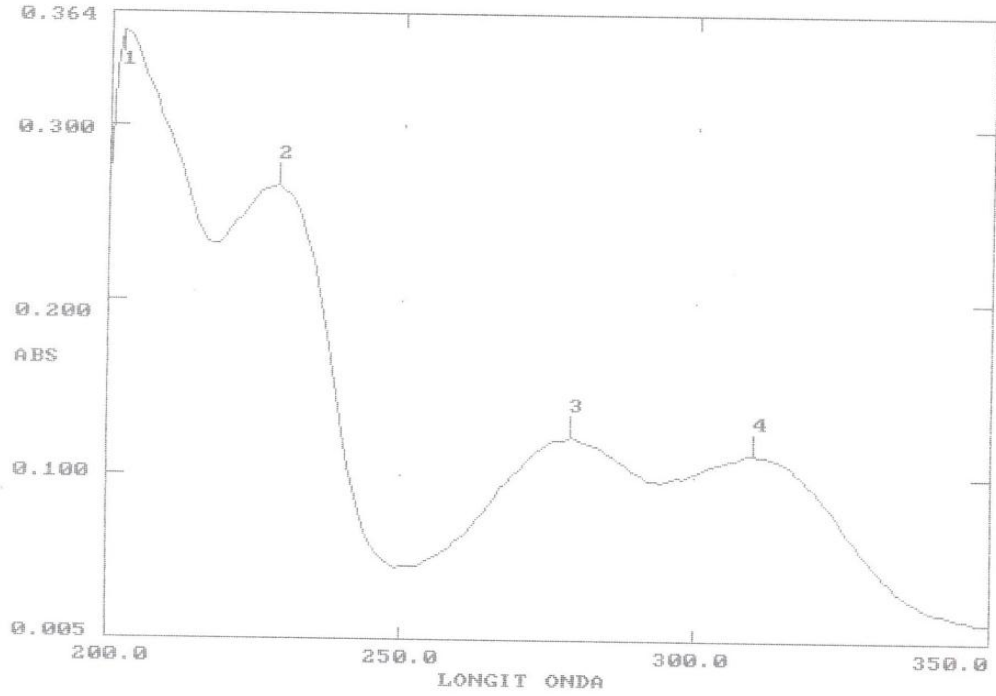


**ANEXO No 3. ESPECTROS DE LAS PLACAS PREPARATIVAS DEL SUB-SUBEXTRACTO ETÉREO.**





	PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\lambda_{nm}$	202.0	229.0	279.0	310.0						
ABS	0.354	0.266	0.123	0.113						



	PICOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\lambda_{nm}$	202.0	217.0								
ABS	0.211	0.188								

