



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“SEPARACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE MARTIN GALVIS
(*Senna multijuga*) CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR

DIANA ELIZABETH SISALEMA SÁNCHEZ

RIOBAMBA- ECUADOR

2013

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía espiritual por haberme permitido llegar a este punto por darme la vida para lograr mis objetivos y por su infinita bondad y amor.

A mis padres por darme la vida y ser mi pilar fundamental de lucha y perseverancia.

A mi hermano Walter por estar conmigo y apoyarme siempre.

A mi esposo Huguito por su amor constante y por enseñarme a ser perseverante y a no desmayar frente a las adversidades de la vida.

A mis gemelitas Anahí y Fernandita quienes serán mi nueva guía de mis metas e ideales.

AGRADECIMIENTO

Mi gratitud, principalmente está dirigida a Dios por haberme dado la existencia y permitido llegar al final de una etapa más en mi vida.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser los forjadores de mi enseñanza.

A la Dra. Cumandá Játiva por su asesoramiento en la dirección de la presente tesis por sus conocimientos que han sido el eje fundamental para la culminación de mi trabajo.

Al Dr. Jacinto Mera, por la colaboración desinteresada que me ha brindado en el transcurso del trabajo de tesis y por motivarme a la realización de la misma.

A los Drs. Miembros del tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

A mis padres por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

A mi amor eterno Huguito por siempre estar a mi lado, brindándome todo su amor, entrega, dedicación y sobre todo tenerme mucha comprensión y paciencia.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de este trabajo de 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 DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE MARTIN GALVIS *Senna multijuga* CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**”, de responsabilidad de la señorita egresada Diana Elizabeth Sisalema Sánchez, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Alvarez L.

DECANO FAC. CIENCIAS

Dr. Iván Ramos.

DIRECTOR ESCUELA

BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Dra. Cumandá Játiva.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Jacinto Mera

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Tc. Carlos Rodríguez

DIRECTOR CENTRO

DE DOCUMENTACIÓN

NOTA TESIS

Yo, Diana Elizabeth Sisalema Sánchez 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

DIANA ELIZABETH SISALEMA SÁNCHEZ

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Bu(OH)	Butanol
C₆H₆	Benceno
CeSO₄	Sulfato de cerio
Cl₃CH	Cloroformo
CH₃COOH	Ácido acético
Et(OH)	Etanol
EtOAc	Acetato de etilo
Exten.conj	Extensión de la conjugación
g	Gramo
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
KOH	Hidróxido de potasio
Me(OH)	Metanol
mL	Mililitros
nm.	Nanómetros
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
UV	Ultravioleta
λ	Longitud de onda

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
INTRODUCCIÓN	

1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Plantas medicinales.....	1
1.2 <i>Cassia angustifolia-Valh (India)</i>	1
1.3 <i>Senna multijuga</i>	4
1.3.1 Clasificación científica.....	5
1.3.2 Descripción.....	5
1.4 Extractos vegetales.....	6
1.4.1 Métodos de Extracción.....	6
1.4.1.1 Maceración.....	6
1.4.1.2 Percolación o lixiviación.....	6
1.4.2 Clasificación de los Extractos Vegetales.....	7
1.4.3 Preparación de Extractos.....	7
1.4.4 Especificaciones de calidad de la droga vegetal.....	8
1.4.5 Concentración de extractos.....	9
1.5 Tamizaje Fitoquímico.....	9
1.5.1 Fundamento.....	9
1.5.2 Metodología en el análisis fitoquímico.....	10
1.5.3 Reacciones de identificación	10
1.6 Cromatografía de capa fina.....	15
1.6.1 Concepto de Rf.....	15
1.6.2 Cromatografía en columna.....	16
1.6.3 Cromatografía preparativa.....	16
1.7 Cromatografía en Capa Fina de <i>Senna fructus y follum</i>	17

1.8	Espectrofotometría.....	18
1.8.1	Espectrofotometría ultravioleta-visible.....	19
1.8.2	El espectrofotómetro.....	19
1.8.3	Características del sistema.....	19
1.9	Reglas de Woodward-Fieser	21
1.9.1	Aplicación de las reglas de Woodward-Fieser.....	23
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	28
2.1	Lugar de la investigación.....	28
2.2	Materiales, Equipos y Reactivos.....	28
2.2.1	Materiales.....	28
2.2.1.1	Material vegetal.....	28
2.2.1.2	Materiales de laboratorio.....	28
2.2.2	Equipos.....	30
2.2.3	Reactivos.....	30
2.3	Métodos y técnicas.....	31
2.3.1	Recolección.....	31
2.3.2	Comprobación taxonómica.....	31
2.3.3	Procesamiento de la materia prima.....	32
2.3.4	Obtención de los extractos botánicos.....	32
2.3.5	Preparación de los sub extractos.....	33
2.3.5.1	Sub extracto etéreo.....	33
2.3.5.2	Sub extracto clorofórmico.....	33
2.3.5.3	Sub extracto Butanólico.....	34
2.3.6	Determinación de las propiedades organolépticas y físicas.....	34
2.3.6.1	Color.....	34
2.3.6.2	Olor.....	34
2.3.6.3	Aspecto.....	34
2.3.6.4	Determinación de la densidad relativa.....	36
2.3.6.5	Determinación del índice de refracción.....	36
2.3.6.6	Determinación del pH del extracto	37

2.3.7	Tamizaje fitoquímico.....	37
2.3.7.1	Ensayo de la espuma.....	37
2.3.7.2	Ensayo de H ₂ SO ₄ concentrado.....	38
2.3.7.3	Ensayo de Shinoda.....	38
2.3.7.4	Ensayo del cloruro férrico.....	38
2.3.7.5	Ensayo de Bornträger.....	38
2.3.7.6	Ensayo de Dragendorff.....	39
2.3.7.7	Ensayo de Wagner.....	39
2.3.7.8	Ensayo de Rosentaler	39
2.3.7.9	Ensayo de Baljet.....	40
2.3.7.10	Ensayo de Sudan III.....	40
2.3.7.11	Ensayo de Liebermann-Burchard.....	40
2.3.8	Análisis cromatográficos del extracto y sub extractos.....	41
2.3.8.1	Comparación cromatográfica del Sen y <i>Senna multijuga</i>	41
2.3.8.2	Separación de metabolitos secundarios del sub extracto etéreo II.....	42
2.3.8.3	Tratamiento del Sub extracto clorofórmico III.....	44
2.3.8.4	Tratamiento del Sub extracto Butanólico IV.....	44
2.3.8.5	Purificación de metabolitos del extracto Etanólico I.....	45
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
3.1	Composición taxonómica e identificación botánica.....	55
3.2	Control de calidad de la droga.....	55
3.3	Propiedades organolépticas y tamizaje fitoquímico.....	55
3.4	Discusión de resultados de las cromatografías.....	57
3.5	Determinación de compuestos en el UV.....	60
3.5.1	Determinación de compuestos del sub extracto etéreo.....	60
3.5.2	Determinación de compuestos del sub extracto Butanólico.....	61
3.5.3	Determinación de compuestos del sub extracto Etanólico.....	62
4.	CONCLUSIONES.....	64
5.	RECOMENDACIONES.....	66
6.	RESUMEN.....	67
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	70

8.	ANEXOS	78
-----------	---------------------	-----------

.

INDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Esquema de preparación de los extractos y sub extractos.....	35
CUADRO No. 2	Preparación del extracto de sen.....	41
CUADRO No. 3	Tratamiento de las fracciones 7-22.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Valores de absorción para las BI y BII de los diferentes flavonoides.....	21
TABLA No. 2	Valores R _f y máximos de absorción de algunas antraquinonas.....	21
TABLA No. 3	Determinación de % de sub extractos.....	40
TABLA No. 4	Comparación del sen y <i>Senna multijuga</i>	41
TABLA No. 5	Resultados de propiedades físicas y reacciones de coloración del extracto etanólico.....	56
TABLA No. 6	Determinación de compuestos UV (cumarinas).....	60
TABLA No. 7	Determinación de compuestos UV (flavonoides).....	61
TABLA No. 8	Determinación de compuestos UV (sesquiterpeno lactonas).....	62
TABLA No. 9	Determinación de compuestos UV (antraquinonas).....	62

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	TLC de <i>Senna fructus</i> y <i>folium</i>	18
---------------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Estructuras de compuestos antracénicos	3
FIGURA No. 2	Placa preparativa.....	17
FIGURA No. 3	Estructura de senósidos	18

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Martin Galvis, <i>Senna multijuga</i>	4
------------------	---	---

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico.....	78
ANEXO No. 2	Espectrofotometría UV.....	79

INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen.

En la actualidad las especies del género *Senna* han sido segregadas en dos géneros más, *Chamaecrista Moench* (250 especies) y *Senna Mill.* (250 especies) basándose en el detalle androceo, de los frutos y la semillas se encuentran entre 2700 3800 msnm. Existen la *Cassia senna L.* (*Cassia acutifolia Delile*, *Senna alexandrine Mill*) y *Cassia augustifolia Valh*, la *Cassia tora L.* es utilizada en el Perú como sustituto del café, existe también la *Cassia alata L.* (*Senna alata L. Roxb*), la *Cassia occidentalis (Senna occidentalis L.)* usada como laxante y purgante.

Los vegetales del género *Cassia o Senna* son conocidas por la presencia de compuestos antraquinónicos, reportados con diferentes acciones farmacológicas. Estudios etnobotánicos realizados en Cuba, reconocen a varias especies de *Cassia* como plantas que poseen interés por sus propiedades medicinales y se reportan empleos tradicionales como antihipertensivos, antiinflamatorios, antiinfecciosos, diuréticos, antitumorales, antianémicos, antimicrobianos, antiherpéticos, anticatarrales, analgésicos, contra afecciones cutáneas, para el tratamiento de trastornos estomacales, espasmos, cólicos nefríticos y cálculos renales.

Se reporta como la acción más reconocida de las quinonas detectadas en las plantas del género *Cassia* la de laxante, por ejemplo, algunas antraquinonas presentes en el Sen (*Cassia augustifolia*). También se han reconocido los efectos beneficiosos de las hojas de estas plantas en el tratamiento antiparasitario y contra infecciones cutáneas de origen bacteriano y fúngico.

La revisión bibliográfica de la *Senna multijuga* indica se emplea en la Amazonía ecuatoriana, la infusión de Martín Galvis como antiinflamatorio.

En la Universidad Federal de Juiz de Fora, Laboratorio de productos Naturales Bioactivos, de Brasil, se realizó un estudio sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunos extractos de plantas en el que incluyen *Senna multijuga*, obteniendo resultado positivo para *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) por lo cual ha motivado el interés de investigación para realizar el análisis de sus metabolitos secundarios.

Con estas razones se planteó los siguientes objetivos identificar la especie de *Senna multijuga* existente en la Región del Oriente Ecuatoriano Lago Agrio, Preparar el extracto y subextractos, Identificar los grupos fitoquímicos por métodos físicos cromatográficos, Extraer, purificar y posible identificación de metabolitos secundarios del extracto de Martin Galvis (*Senna multijuga*).

Esta investigación empieza con la identificación taxonómica de la especie y una vez obtenida el vegetal fue necesario que en conocimiento de que las antraquinonas son los metabolitos secundarios presentes en las diversas variedades de *Sennas* se realizó la preparación de los extractos etanólicos y sub extractos etéreo, clorofórmico y butanólico seguida de la realización del Tamizaje Fitoquímico para determinar la presencia de que grupos fitoquímicos están presentes en la composición química de la *Senna multijuga*.

Posteriormente se separó, purificó y se determinó su posible estructura mediante métodos espectroscópicos (UV). Se hizo posible separar los metabolitos mediante la extracción de solventes orgánicos, separando cromatográficamente ya sea en CCF, placa preparativa o en columna y mediante las reglas de Woodward- Fieser la posible estructura de estos metabolitos teniendo como resultado a los flavonoides, cumarinas, terpenoides y antraquinonas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 PLANTAS MEDICINALES

Plantas medicinales: Son aquellos vegetales que elaboran unos productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes.(1)(3)(4)(20)

1.2 *Cassia angustifolia-Valh* (INDIA)

Los frutos y las hojas de la planta de sen contienen los llamados senósidos, que ejercen su efecto laxante bien tolerado y seguro en destino, en el extremo del intestino grueso. Senósidos actúan en total: laxante. La motilidad intestinal es estimulada. La liberación de sodio y agua en el intestino se inhibe, por lo que más agua que permanece en el intestino y las heces se mantiene húmedo.

La afluencia de agua y electrolitos en el intestino se promueve.(26)(27)

Aplicación

Se recomienda el uso de sen como laxante estimulante con un estreñimiento grave, si un cambio en la dieta y agentes de relleno no han tenido el efecto deseado. Además, una aplicación puede ser útil para:

Enfermedades en las que un taburete suave es deseable, como las hemorroides, fisuras anales o cirugía del recto-anal.

Limpieza del intestino antes y después de la cirugía en el abdomen o de los rayos X.

Contraindicaciones No se debe utilizar *Senna* en:

- Intestino (íleo)
- Apendicitis las enfermedades crónicas inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa.
- Dolor abdominal de causa desconocida
- Deshidratación severa.
- Alergia al sen en el embarazo y la lactancia
- Los niños menores de 12 años

Efectos secundarios

Si se aplica correctamente, son efectos secundarios raros. En raras ocasiones puede causar molestias gastrointestinales como calambres, que puede ser resuelto por una dosis más baja. También puede ocurrir en algunos casos de reacciones alérgicas tales como picor, urticaria y erupción cutánea. (14)(27)

Interacción

El uso a largo plazo no debe hacerse. En general, una aplicación es suficiente de 1 a 2 semanas. Si se abusa, puede causar una deficiencia de potasio. La deficiencia de potasio aumenta el efecto de ciertos medicamentos, tales como glucósidos cardiacos (para la insuficiencia cardíaca) y antiarrítmicos (para trastornos del ritmo cardiaco). Por otra parte, las pérdidas de

potasio se ven reforzadas por ciertos medicamentos como los diuréticos de tiazida, Nebenierenrindensteroid (cortisona) y raíz de regaliz.

Dosis

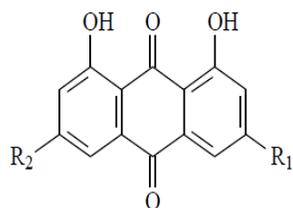
La dosis de la droga no debe exceder de 30 mg diario. Lo importante y útil es una dosis individual.

La diarrea o heces muy líquidas es un signo seguro de dosis muy altas o el uso frecuente de esta droga.

El *Senna* está disponible en formas farmacéuticas diferentes, por ejemplo en forma de comprimidos o té. Los tees debe aplicarse en forma de infusión en frío, porque es mejor tolerada.(47)

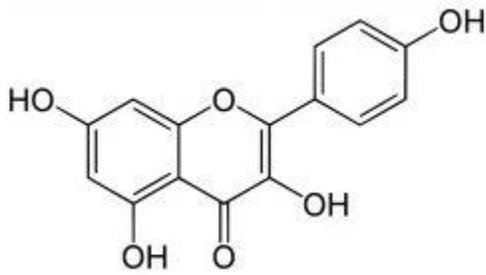
Componentes:

- Antraquinonas: Rehina, aloemodina, Senósidos A y B; C y D
- Flavonoides: Kamferol.
- Ácido crisofánico
- Cumarinas: visnadina
- β sitosterol
- Aceites y resinas(11)((18)

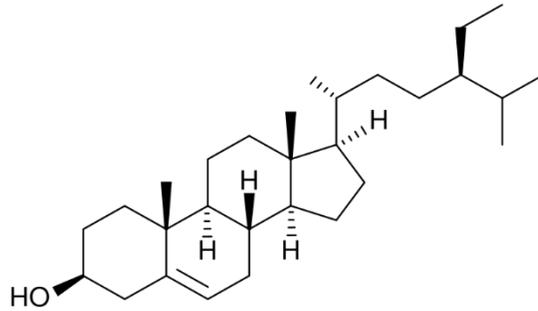


R ₁	R ₂	Compuesto
CH ₃	OH	Rheum-Emodina
CH ₃	OCH ₃	Fisción
CH ₃	H	Crisofanol
CH ₂ OH	H	Aloé-emodina
COOH	H	Rheína

FIG N°1 ESTRUCTURAS DE COMPUESTOS ANTRACÉNICOS



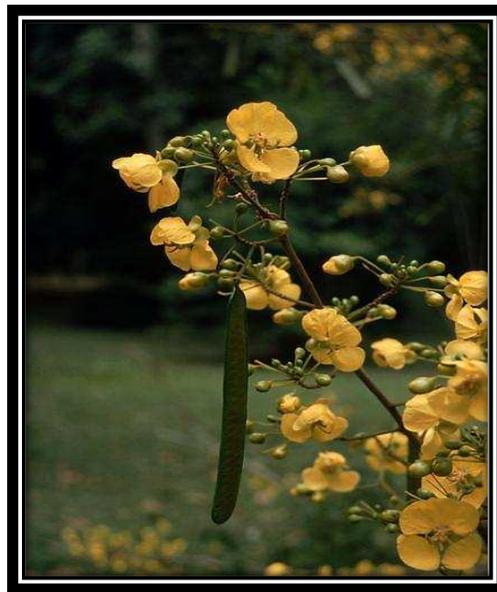
Kamferol



β Sitosterol

Uso Tradicional: las hojas de *Senna* se han utilizado tradicionalmente como una de las principales recursos para el tratamiento de estreñimiento.(32)(50)

1.3 *Senna multijuga*



FOTOGRAFÍA N°1 MARTIN GALVIS, *Senna multijuga*
FUENTE: <http://www.henrietteesherbal.com>

Senna es un género de la familia Fabaceae con alrededor de 250 especies. Es nativo de todas las regiones tropicales con alguna de las especies distribuidas por las regiones templadas.(43)(49)

1.3.1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Fabales Bromhead

Familia: Fabaceae Lindl.

Género: *Senna Mill.*

Especie: *Senna multijuga*

1.3.2 DESCRIPCIÓN

Nombre común: Martin Galvis

Forma de vida: Árbol de hasta 12 m de alto y a. d. p. de hasta 40 cm, tronco derecho y copa aplanada con las ramas ascendentes.

Corteza: externa lisa, pardo grisácea, con numerosas lenticelas protuberantes dispuestas en líneas horizontales. Interna pardo verdosa, ligeramente fibrosa de sabor muy amargo, exuda un jugo verde amarillento. Grosor de la corteza de 7 a 8 mm.

Hojas: Dispuestas en espiral, paripinnadas, de 5 a 13 cm de largo incluyendo el peciolo, compuestas por 20 a 50 pares de folíolos opuestos subsésiles; laminas lineares con margen entero y revoluto, ápice redondeado y mucronado. Haz verde opaco y ligeramente glauco en el envés con el margen pubescente.(43)(47)

Flor: En panículas o racimos axilares y terminales de 5 a 10 cm de largo, zigomorfas de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, de color amarillo. Florecen de julio a enero.

Fruto: Vainas de 10 a 15 cm de largo y de 1.5 a 2 cm de ancho, aplastadas con numerosas septos angostos y paralelos, negras y glabras, cada septo contiene una semilla aplastada de 1 cm de largo, de color pardo brillante. Fructificación de noviembre a febrero.

Distribución: Esta especie se presenta en la vertiente del Golfo desde el sur de Hidalgo hasta el norte de Chiapas. Es abundante en la vegetación secundaria derivada de selvas altas o medianas perennifolias y subperennifolias.

Usos: Se emplea frecuentemente como árbol de ornato. (50)

1.4 EXTRACTOS VEGETALES

Se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes. (10)(39)

1.4.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica; dentro de ésta, los métodos de extracción por maceración y la percolación o lixiviación son los más utilizados. (18)(19)

1.4.1.1 Maceración

El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta el agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto. (19)(20)

1.4.1.2 Percolación o lixiviación:

El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente de forma tal que el solvente cubra la capa de sólido en el tanque percolador. El

solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto. (23)

1.4.2 CLASIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

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

-Extractos fluidos o líquidos

-Extractos semisólidos o blandos

-Extractos secos (20)

1.4.3 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Es importante establecer los parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto medicinal. Por ejemplo: (1) (4)

•**Naturaleza química de la materia prima vegetal:** conocer las características del metabolito o compuesto químico a extraer.

•**Selección del solvente:** definir la selectividad del solvente a emplear, el solvente óptimo será el que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto de interés.

•**Relación sólido-líquido:** la proporción más conveniente de trabajo será aquella con la que se alcancen los mayores rendimientos de extracción.(2)

•**Tamaño de partícula del sólido:** de la forma y dimensión de los sólidos depende en gran medida el éxito de la lixiviación, a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto entre la droga y el disolvente, y por tanto, mayor acceso de los principios activos al medio líquido; no obstante, tamaños de partícula muy pequeños conducen a la formación de polvos demasiado finos, que pueden causar problemas en el proceso de extracción.

•**Temperatura:** el aumento de la temperatura favorece la extracción, hay que prestar especial atención cuando la sustancia de interés es termolábil o el mensturo es volátil, además, temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar cantidades excesivas de solutos indeseables.
(23)

•**Velocidad de agitación y tiempo de extracción:** los óptimos valores de estos parámetros serán aquellos que logren extraer un mayor rendimiento del producto. A mayor tiempo de contacto, mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones.

•**Viscosidad del medio:** no deben seleccionarse solventes de viscosidad relativamente alta.

El extracto vegetal obtenido se debe caracterizar en cuanto a: sustancias activas y marcadores, densidad, solventes residuales, sólidos totales, pH, control microbiológico y volumen total.
(39)

1.4.4 ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DE LA DROGA VEGETAL

Entre las especificaciones de calidad exigidas para la evaluación de materias primas vegetales con fines medicinales se encuentran:

- Características macroscópicas (forma, tamaño, caracteres superficiales, textura y fractura).
- Identificación y cuantificación de sustancias activas o marcadores.
- Sustancias solubles.
- Cenizas totales.
- Materias extrañas.
- Contenido de agua.
- Tamaño de partículas.
- Control microbiológico.
- Metales pesados(8)

1.4.5 CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS

Toda vez que se ha realizado la etapa de extracción y separación, se procede a eliminar parte del solvente de extracción para aumentar el contenido de sólidos en el extracto. Este proceso se realiza a presión reducida con lo que se disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente, el rotavapor es una buena alternativa para trabajos en el laboratorio y es ampliamente usado mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores).

También pueden utilizarse métodos de precipitación del principio activo, combinados con etapas de filtración, extracción líquido-líquido, entre otras. (18)

1.4.6 EXTRACTO ETANÓLICO

De 100g de planta fresca y molida se coloca en un matraz erlenmeyer de 500mL y se deja macerar con suficiente cantidad de etanol para cubrir completamente la planta. Después se filtra (papel filtro No. 4) u algodón y en un rotavapor se lleva a sequedad el extracto a 47°C y a presión reducida. Se pesa el extracto seco y se coloca en un vial bien cerrado, en el refrigerador (16)(23).

1.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas intermedias de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.

1.5.1 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 formación de precipitados, coloraciones, etc.

Estas reacciones se caracterizan son 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 (1) (3).

1.5.2 METODOLOGÍA EN EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO

En términos generales un análisis fitoquímico 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 farmacológicas (1).

1.5.3 REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN

Ensayo de Sudan

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 ml de una solución diluida en el agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayo respectivamente.

Ensayo de Dragendorff

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este se debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de HCl al 1% en agua. Si el extracto es acuoso a la alícuota se le añade 1 gota de HCl concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con una solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo tres gotas de reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

Ensayo de Mayer

A la solución ácida se le adiciona una pizca de NaCl en polvo, se agita y se filtra. Al filtrado se le adiciona 2 ó 3 gotas de solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

Ensayo de Wagner

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

Ensayo de Baljed

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos 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 del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.

Ensayo de Bornträger

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

Ensayo de Lieberman – Buchard

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Para ello, si la alícuota del extracto 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 H₂SO₄ concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración.

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

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

Ensayo de Resinas

Para detectar este tipo de compuestos, se adiciona a 2 ml de la solución alcohólica, 10 ml de agua destilada. La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo.

Ensayo de Fehling

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 ml de agua. Se adiciona 2 ml del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: Se pesa 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelve con agua hasta un volumen total de 1000 ml.

Solución B: Se pesa 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelve con agua hasta un volumen total de 1000 ml.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada de ellas justo en el momento de realizar en ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

Ensayo de Espuma

Para 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 el 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 persistente por más de 2 minutos.

Ensayo del Cloruro Férrico

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en 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 añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

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

Ensayo de Shinoda

Permite reconocer la presencia de flavonoides. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 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.

Ensayo de Kedde

Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 ml del reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos. Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas. El reactivo de Kedde se prepara de la siguiente forma:

- Solución 1: Ácido 3-5 dinitrobenzónico al 2% en metanol
- Solución 2: Hidróxido de potasio al 5-7 % en agua.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

Ensayo de Mucílagos

Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura de tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5⁰C, si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.

1.6 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La I.U.P.A.C define la cromatografía de forma más amplia. Para ellos es un 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.(21)(28)

1.6.1 CONCEPTO DE R_F

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_f 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 reproductibilidad de +/- 20%, por lo que es mejor correr duplicados de la misma placa.(30)(31)

1.6.2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa. Como fase estacionaria se usa, generalmente, gel de sílice o alúmina dentro de una columna. La elección del disolvente es crucial para una buena separación. Dicho disolvente pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o bien por aplicación de presión (cromatografía flash). La columna se prepara mezclando el soporte con disolvente y se rellena la columna poniendo en el fondo de ésta un poco de algodón o lana de vidrio, para evitar que la sílica o la alúmina queden retenidas en la columna y que el disolvente se engrase hasta el nivel del soporte. A continuación se introduce la muestra por la parte superior de la columna y se eluye con el disolvente elegido, recogién dose por lo general en tubos de ensayo. Una columna de cromatografía es un tubo de vidrio relleno con una sustancia sólida de propiedades adsorbentes constituida por pequeñas partículas: gel de sílice y alúmina son las más usadas. Este relleno es lo que se conoce en cromatografía como la fase estacionaria. A través de la columna se hará pasar una corriente de un disolvente o mezcla de disolventes denominada eluyente y/o fase móvil. La mezcla de compuestos a separar se disuelve en una pequeña cantidad de disolvente y se coloca sobre el adsorbente, en la parte superior de la columna, quedando adsorbida por el mismo.(30)(31)

1.6.3 CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA

Las placas utilizadas en cromatografía preparativa son placas grandes, de aproximadamente 20x20 cm. que permiten separar aproximadamente 1 g. de mezcla utilizando unos 35 g. de adsorbente.

La siembra de la muestra se realiza mediante la ayuda de una jeringuilla o tubo capilar. La siembra se realiza a lo largo de una línea recta (existen en el mercado diversos utensilios para

evitar torcerse). Si al terminar la primera siembra todavía queda muestra, se seca la primera siembra y se aplica la segunda, intentando que ésta quede sobre la anterior, para así conseguir que el frente sea lo más estrecho posible. La siembra debe realizarse a lo ancho de la placa.

Una vez sembrada la muestra se desarrolla la cromatografía. Se utiliza un adsorbente con indicador fluorescente para ver en la lámpara ultravioleta donde han quedado las manchas de los diferentes compuestos, dichas manchas se marcan.

Una vez localizados los compuestos, éstos se extraen de la fase estacionaria, uno a uno, con la ayuda de una espátula, sobre un papel de filtro u otro soporte. Posteriormente se coloca cada componente en un erlenmeyer, y se mezcla con un disolvente (metanol). Una vez disuelto el compuesto se filtra varias veces para separar el compuesto y la fase estacionaria. Una vez separado se elimina el disolvente (destilación), con lo cual se obtiene el componente separado.

Si no se dispone de indicador fluorescente, no se pueden usar reveladores químicos sobre toda la placa. El proceso a seguir es el siguiente: se raya la placa separando totalmente una pequeña franja de placa, sobre la cual se aplica el revelador químico, y a partir de esta franja se marcan las franjas de compuestos.(21)(30)

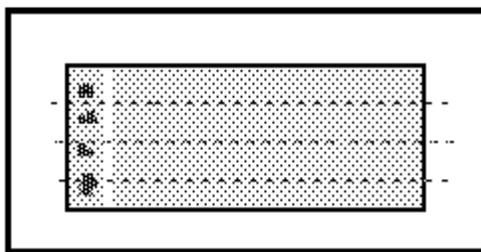


FIG:2 PLACA PREPARATIVA

FUENTE: <http://quimica.laguia2000.com/general/cromatografia-en-columna#ixzz2Msd2NjA>

1.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE *Senna fructus* y *follum*

Fase estacionaria: Sílica gel

Solvente de corrido: n-propanol-EtOAc-H₂O-Ácido acético glacial (40:40:29:1)

Muestra: *Senna fructus* y *follum*

Revelador: HNO₃-KOH

Senna Fructus (1) y folium (2)

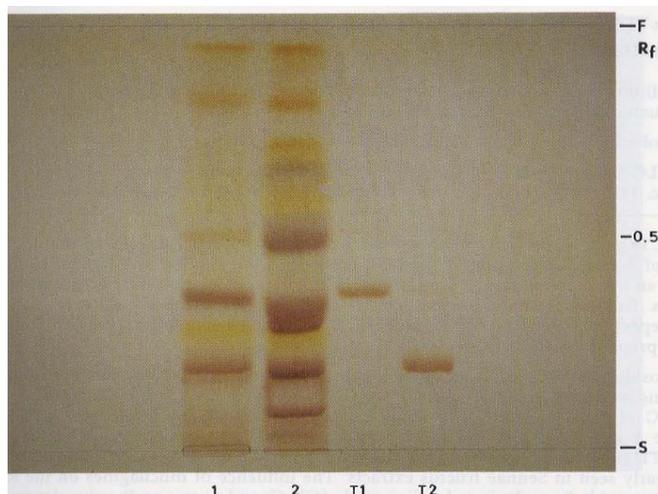
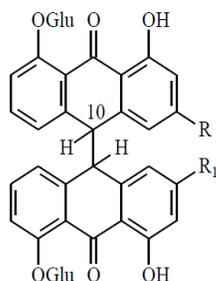


GRÁFICO N°1 TLC DE *Senna fructus* y *folium*

FUENTE: WAGNER.H. PAG 69.

Las zonas pardas corresponden a los senósidos B (T₂), A(T₁) : (R_f 0.25 y 0.40) y los senósidos D, C (R_f 0.5 y 0.7). Las zonas amarillas indican a la rehinina R_f-0.8 y sus glucósidos (R_f-0.3 a 0.6).



Sennósido-A: R, R1 = COOH, forma (+)
Sennósido-B: R, R1 = COOH, forma meso
Sennósido-C: R=COOH, R1=CH₂OH, forma (+)
Sennósido-D: R=COOH, R1=CH₂OH, forma meso

FIG:3 ESTRUCTURA DE SENÓSIDOS

FUENTE: WAGNER.H. PAG. 71

1.8 ESPECTROFOTOMETRIA

La espectrofotometría se utiliza para identificar compuestos por su espectro de absorción, conocer la concentración de un compuesto en disolución.

La espectrofotometría surgió con el estudio de la interacción entre la radiación y la materia como función de la longitud de onda (λ).

1.8.1 ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La espectroscopia UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados (30)(32).

Principio físico

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

La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV (31)(32).

1.8.2 EL ESPECTROFOTÓMETRO

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

Esta espectrofotometría utiliza radiaciones del campo UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm (UV cercano) y de luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar las soluciones en la región ultravioleta-visible del espectro.

1.8.3 CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA

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

Consideraciones generales

La espectroscopia ultravioleta-visible es la más limitada para la información de compuestos. Los compuestos que tengan un cromóforo o instauraciones son visibles en esta región.

Los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro UV. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrofotometría 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 (32).

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 300-500 nm (Banda I).

Podría indicarse como características de dihidroflavonas. Dihidroflavanoles e isoflavonas.(17)

TABLA 1.- VALORES DE ABSORCIÓN PARA LAS BI Y BII DE LOS DIFERENTES FLAVONOIDES.

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

TABLA 2.- VALORES RF Y MÁXIMOS DE ABSORCIÓN DE ALGUNAS ANTRAQUINONAS

Antraquinona	Rf(I)	Rf(II)	Máx. UV (nm)
Emodina	0.52	0.18	223, 254, 267, 290, 440
Crisofanol	0.76	0.42	225, 258, 279, 288, 432
Fisción	0.75	0.53	226, 255, 267, 288, 440
Aloé-emodina	0.36	0.53	225, 258, 279, 289, 430
Reína	0.24	0.80	230, 260, 432
Acido emódico	0.18	0.00	227, 252, 274, 290, 444

FUENTE: <http://quinonasp.pdf.com>

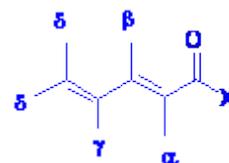
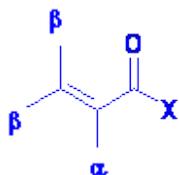
1.9 REGLAS DE WOODWARD-FIESER

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

Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV-Visible no es sin embargo, una prueba específica para ningún compuesto determinado, la naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos así como las variaciones en la anchura de la hendidura (ancho de banda efectivo) en el espectrofotómetro (32).

Espectroscopía UV/Vis

Reglas de Woodward para compuestos carbonílicos conjugados



Valores básicos:

X = R

Enona de partida con anillo de seis miembros o acíclica

$\lambda=215$ nm

Enona de partida en anillo de cinco miembros

$\lambda=202$ nm

Dienona acíclica

$\lambda=245$ nm

X = H

$\lambda=208$ nm

X = OH, OR

$\lambda=193$ nm

Incrementos para

Doble enlace conjugado adicional

30

Doble enlace exocíclico

5

Doble enlace endocíclico en un anillo de 5- o 7- miembros para X = OH, OR

5

Componente diénico homocíclico

39

Sustituyente alquilo o resto de anillo

α

10

β

12

γ o superior

18

Grupos polares

-OH

α

35

β

30

δ

50

-OC(O)CH₃

$\alpha, \beta, \gamma, \delta$

6

-OCH₃

α

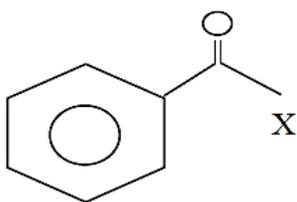
35

β

30

	γ	17
	δ	31
-Cl	α	15
	β, γ, δ	12
-Br	β	30
	α, γ, δ	25
-NR ₂	β	95
Corrección por disolvente	λ_{\max} (calc'd)	<u>variable</u>

Sistema básico:



X = H 250

Alquilo, cicloalquilo 246

OH 230

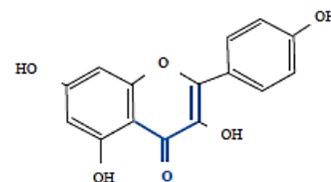
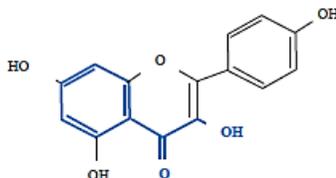
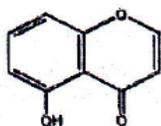
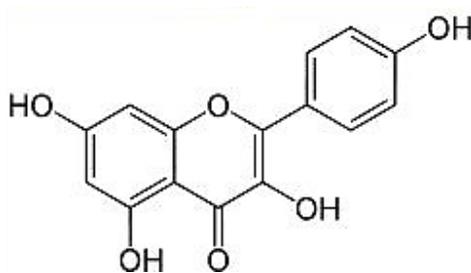
OR 230

Incrementos por cada sustituyente del anillo aromático:

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

1.9.1 APLICACIÓN DE LAS REGLAS WOODWARD-FIESER

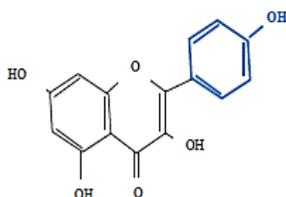
Flavonoide (Kamferol (250,266,298,320nm))



Benzo y pirona.....	246
OH (o).....	7
OH (p).....	25
Exten.conj.....	5
	<hr/>
	283nm

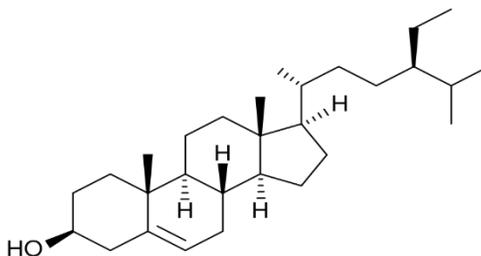
Anillo Base.....	230
OH (meta)x2.....	14
OCH ₃ (orto).....	7
Residuo de anillo.....	3
	<hr/>
	254

Anillo Base.....	215
C-sust (β).....	12
OH (α).....	35
C=C exocíclico.....	5
OCH ₃	30
	<hr/>
	297



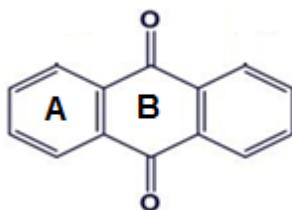
Anillo Base.....	211
C=C exocíclico.....	5
OCH ₃	14
OHβ.....	30
	<hr/>
	260

Terpenoide (β sitosterol (202-250nm))



Quinonas

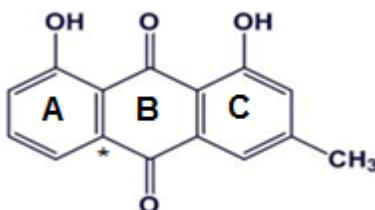
Las antraquinonas muestran intensa absorción bencenoide a 250 nm y de intensidad media 322 nm; la absorción quinoidea fuerte se observa a 263 y 277 nm y una debil a 405 nm.(17)



A=250 nm y 322 nm

B=quinoidea 263 y 272 nm debil a 405 nm

Crisofanol (228,257,277,289 nm)

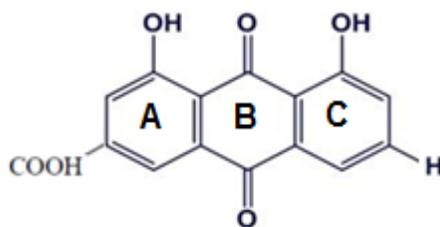


Anillo A.....	250
OH(o).....	7
C=O(o).....	3
C=O(m).....	3
	<hr/>
	263 nm

Anillo B.....	263
OH(o).....	7
OH(o).....	7
CH ₃ (m).....	3
	<hr/>
	280 nm

Anillo C fenol.....	211
C=O(o).....	3
C=O(m).....	3
CH ₃ (m).....	3
	<hr/>
	220nm

Rehina (230, 260, 432 nm)



Anillo A.....	250
OH(o).....	7
COOH(m).....	3
	<hr/>
	260 nm

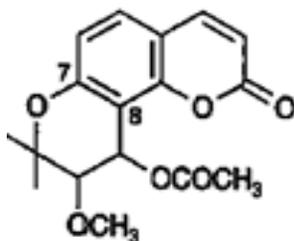
Quinoide.....	405
(A) OH(o).....	7
COOH(p).....	10
(C) OH(o).....	7
	<hr/>
	429 nm



Anillo base.....	204
OH(o).....	7
COOH(m).....	7
C=O(o).....	3
C=O(o).....	3
	<hr/>
	224 nm

Cumarinas (274 - 311)

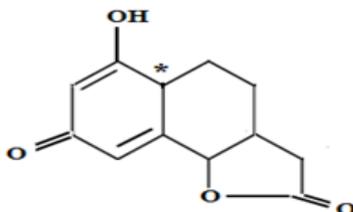
Las cumarinas muestran bandas de absorción ultravioleta características a 274 y 311 nm las cuales son atribuidas a los anillos de benceno y pirona respectivamente.(17)

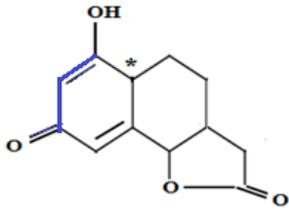


Benceno.....	274
O(m).....	7
C(o).....	3
	<hr/>
	284 nm

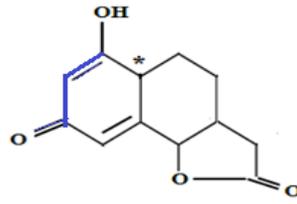
Pirona.....	311
O(m).....	7
C(o).....	3
	<hr/>
	321 nm

Sesquiterpeno lactona (250-270nm)





Enona cíclica.....	215 nm
OH (β).....	30 nm
Enlace.conj.....	30 nm
Residuo.....	3 nm
	<hr/>
	278 nm



Enona cíclica.....	215 nm
Exten.conj.....	5 nm
Residuo.....	3 nm
	<hr/>
	223 nm

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en la Facultad de Ciencias:

Laboratorio de Fitoquímica

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIALES

2.2.1.1 Material vegetal

-Martin Galvis (*Senna multijuga*), recolectada en la Amazonía Ecuatoriana (Puerto del Carmen) por Lennin Rea.

2.2.1.2 Material de Laboratorio

- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Balones esmerilados de 1000mL.
- Pipetas de 1, 5 ,10mL

- Pinzas para tubos
- Gradillas
- Embudo simple
- Varrilla de vidrio
- Papel aluminio
- Papel toalla absorbente
- Frascos ámbar de 10, 30, 50,1000 ml.
- Algodón
- Reverbero
- Mascarilla 3M
- Gafas
- Espátula
- Probetas
- Erlenmeyer
- Trípode
- Piceta
- Embudo
- Pera de succión
- Termómetro
- Cinta adhesiva
- Tapones de caucho para tubos
- Embudo de Separación
- Capilares
- Cuba de vidrio
- Mandil Blanco
- Estilete
- Mangueras
- Regla
- Tijeras

- Borrador
- Cuaderno de apuntes

2.2.2 EQUIPOS

- Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP)
- Balanza analítica (BOECO GERMANY)
- Desecador
- Cámara Fotográfica (SONNY)
- Refrigerador (ELECTROLUX)
- Estufa (MEMMERT)
- Cámara UV
- Refractómetro
- Espectrofotómetro
- Bomba de presión
- Computadora
- Peachímetro
- Sorbona
- Atomizador (Equipo de revelado cromatográfico).

2.2.3 REACTIVOS

- Agua destilada
- Alcohol potable 96%
- Reactivo Dragendorff
- Reactivo Wagner
- Reactivo Sudan III
- Reactivo de Bornträger
- Reactivo Mayer
- Cloroformo

- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de potasio o Sodio
- Reactivo de Baljet
- Hidróxido de Sodio
- Metanol
- Tricloruro férrico al 5%
- Solución de Ninhidrina al 5%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Éter Dietílico
- Ácido clorhídrico concentrado
- Limaduras de magnesio metálico
- Éter
- Benceno

2.3 MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.3.1 RECOLECCIÓN

La *Senna multijuga* recolectó Lennin Rea el 25 de Octubre del 2012 en la Amazonía Ecuatoriana, Puerto del Carmen a 900-1300 m.s.n.m., se trata de un árbol de hasta 12 m de alto, el mismo debe estar en flor (amarillas) y están dispuestas en racimos axilares y terminales de 5 a 10 cm de largo incluyendo el peciolo, sus frutos se tratan de vainas de 10 a 15 cm de largo aplastadas con numerosos septos angostos y paralelos, cada septo contiene una semilla aplastada de 1 cm de largo y de color pardo brillante, sus hojas de color verde opaco, dispuestas en espiral, paripinnadas, de 5 a 13 cm de largo incluyendo el peciolo.

2.3.2 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La identificación taxonómica fue realizada por el Ing. Jorge Caranqui; curador del herbario de la ESPOCH quien certificó el ejemplar

2.3.3 PROCESAMIENTO DE MATERIA PRIMA: LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

- Se tomo el vegetal 587g con todas sus partes y se desecha sus partes secas y dañadas, impurezas y cuerpos extraños.
- Se lavó con abundante agua sumergiendo en un recipiente con agua varias veces.
- Se sumergió el material vegetal en una solución de hipoclorito de Sodio al 1%.
- Se elimina el hipoclorito de sodio del vegetal con abundante agua.
- Se dejó escurrir a temperatura ambiente por 12 horas, hasta secarla.
- Se trituró toda la planta lo más fino posible.
- Se almacenó la droga evitando contacto con luz y humedad en bolsas de papel de ser posibles estériles o de plástico.

2.3.4 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS BOTÁNICO INICIALES

Para el desarrollo de esta investigación se llevo a cabo el siguiente proceso, el mismo que fue obtenido de todo el vegetal Martin Galvis (*Senna multijuga*).

1. En un recipiente de vidrio con su respectiva tapa, se transfiere la droga cruda triturada y pesada, se humedece directamente con el etanol a 96°, procurando que no quede líquido residual. (generalmente se emplea por cada gramo de droga, 2mL de alcohol para la humectación). Macerar por 3-5 días.
2. A los 3-5 días se transfiere a un erlenmeyer de 1000mL el líquido obtenido por decantación.

3. Filtrar la solución, para eliminar las impurezas.
4. El filtrado se coloca en un balón esmerilado (previamente pesado), para concentrar por destilación simple hasta 1/8 de su volumen inicial que da lugar al extracto.
5. El extracto se mantiene fuera del alcance de la luz y humedad.

2.3.5 PREPARACIÓN DE LOS SUB EXTRACTOS

2.3.5.1 Sub extracto Etéreo

100 ml de extracto etanólico se trató con solventes de menor constante dieléctrica e inmiscible para separar los metabolitos secundarios de acuerdo a su polaridad; generalmente se procesa en un embudo de separación al que se añade unos 20 ml de éter dietílico, y se agitó suavemente, dejar en reposo hasta separación en fases, la superior corresponde al éter II y la inferior al etanol I.

La extracción se lo realizó tantas veces fueron necesarias hasta que la parte etérea recobre su estado inicial transparente lo cual indico la extracción completa de los compuestos solubles en éter.

Colocar en un balón esmerilado previamente pesado, concentrar al vacío, dejar en desecador, posteriormente pesar.

2.3.5.2 Sub extracto Clorofórmico

A la fase etanólica I se agregó Cl_3CH en un embudo de separación agitar en forma circular y dejar en reposo, se forman dos fases en este caso el cloroformo corresponde a la fase inferior, la misma que se separa cuidadosamente.

Se procedió a realizar las extracciones necesarias hasta que el cloroformo no se colorea, recobre su característica de color inicial, el número de veces que se extrae depende de la coloración de la fase inferior.

Colocar todas las fases clorofórmicas en un balón esmerilado previamente pesado, concentrar y pesar forma el sub extracto clorofórmico III

2.3.5.3 Sub extracto Butanólico

A la fase superior etanólica I contenida en un embudo de separación agregar un volumen de butanol agitar y dejar en reposo, posteriormente separar la solución etanólica (fase inferior) de la butanólica (fase superior) extraer cuantas veces sean necesarias hasta recobre el color inicial del solvente puro. Las fases butanólicas se unen en un balón pesado concentrar por destilación normal se elimina el olor del solvente con aire comprimido, dejar en desecador, y pesar da el sub extracto Butanólico IV.

La fase inferior correspondiente al etanol I, se concentra en un balón pesado y se tiene el sub extracto etanólico. El producto que se obtuvo se envasó en frascos ámbar de vidrio, y se los conserva en refrigeración.

2.3.6 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DE LOS EXTRACTOS

2.3.6.1 Color

Se procedió a colocar en un vaso de precipitación limpio y seco se llenó las 3 cuartas partes con el extracto etanólico, se procedió a observar el color a tras luz, la presencia de partículas y la transparencia.

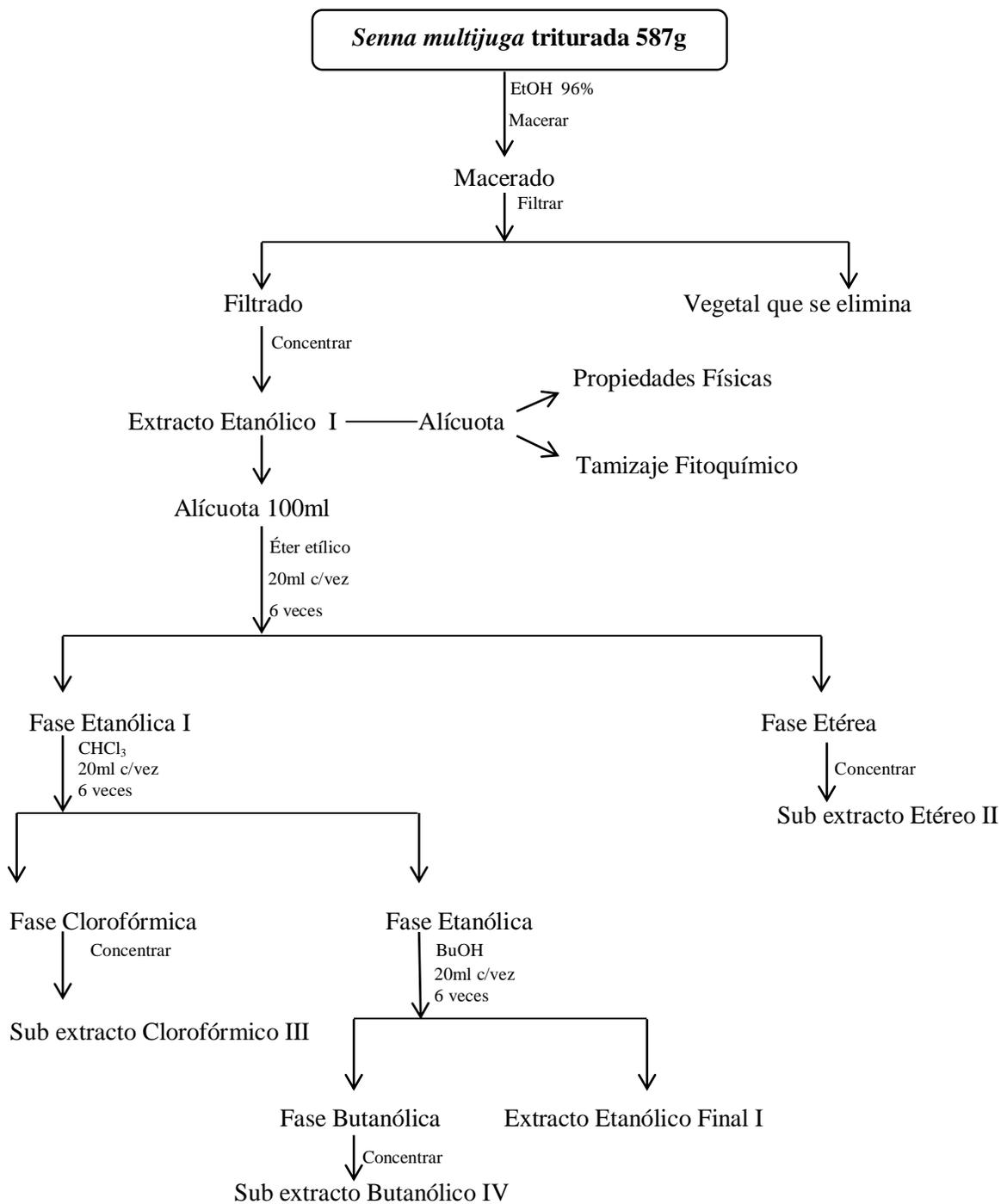
2.3.6.2 Olor

Se determinó con el olfato el olor característico del extracto.

2.3.6.3 Aspecto

Se analizó el aspecto externo, teniendo en cuenta la limpidez de la muestra de ensayo. Es decir la presencia o no de partículas.

CUADRO No. 1. ESQUEMA DE PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y SUB EXTRACTOS



2.3.6.4 Determinación de la densidad relativa

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

Primeramente pésese el picnómetro vacío y secos 2° C y llénese con la porción de ensayo, manténgalo a la temperatura de 25 °C (±1°C) durante 15 min y ajuste el líquido al nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer el exceso 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 limpio el picnómetro.

Expresión del resultado.

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

$$D_{25} = \frac{\text{Masa}}{\text{Volumen}}$$

2.3.6.5 Determinación del 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.

Para calibrar el equipo, se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, y se seleccionó 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.

Se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cerró el termo prisma y se enfocó la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incidió sobre la apertura de entrada del prisma de medición, y se procedió igual que con el agua.

2.3.6.6 Determinación del pH del extracto

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:

$$\text{pH} = - \log [\text{H}^+]$$

[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.

Se ajusta el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH de la muestra.

2.3.7 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje se realizó en el extracto alcohólico del vegetal objeto de estudio. Se toma 10 mL de extracto y se lo divide en tubos de ensayo, sobre los cuales se realiza las siguientes pruebas.

2.3.7.1 Ensayo de la espuma

Se añade sobre el extracto una proporción igual de agua, se agita vigorosamente y se observa. 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 persistente por más de 2 minutos.

2.3.7.2 Ensayo del H₂SO₄ concentrado

Por la pared del tubo de ensayo se deja caer ácido sulfúrico concentrado, una coloración fuertemente amarilla indica la presencia de flavonas y flavonoides, las flavonas forman un complejo soluble color naranja o guinda, las chalconas y auronas forman coloraciones rojo-guinda a rojo-azulado. (6) (49)

2.3.7.3 Ensayo de Shinoda

Permite determinar la presencia de flavonoides. En un tubo de ensayo se coloca una alícuota de extracto, y 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.

2.3.7.4 Ensayo del Cloruro Férrico

Se añade sobre el extracto de 2 a 3 gotas de Cloruro Férrico, y se observa.

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal.

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

2.3.7.5 Ensayo de Bornträger

Con este ensayo se determina la presencia de quinonas, para lo cual se tomó una alícuota de extracto en un tubo de ensayo y se agregó gotas de NaOH 5%, finalmente se añadió 1mL de

cloroformo y se observó la coloración de la fase acuosa alcalina. El ensayo es positivo cuando se presenta las siguientes coloraciones:

- Amarillo para Benzoquinonas
- Rosado para Naftoquinonas
- Violeta para Antraquinonas

2.3.7.6 Ensayo de Dragendorff

Este ensayo sirve para determinar la presencia de alcaloides, se añadió sobre una alícuota de extracto 3gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

2.3.7.7 Ensayo de Wagner

Este ensayo determina la presencia de alcaloides, a la solución formada en el ensayo de Bornträger, se le evaporó el cloroformo, obteniéndose un residuo al que se añadió 1mL de EtOH, una gota de HCl y unas gotas del reactivo de Wagner (2g de yodo y 2g de yoduro de potasio aforados a 100mL con agua), se agitó suavemente, los resultados se clasifican así:

Opalescencia: (+)

Turbidez definida: (++)

Precipitado: (+++)

2.3.7.8 Ensayo de Rosenthaler

Permite comprobar en los extractos etanólicos la presencia de terpenos. Se tomó una alícuota de extracto etanólico, se adicionó gotas de reactivo de Rosenthaler (solución 1% de vainillina en EtOH y 5mL de H₂SO₄ concentrado) y se calentó. Se considera positivo cuando se forma una coloración en gama de rosada a violeta o pardas.

2.3.7.9 Ensayo de Baljet

En un tubo de ensayo se colocó una pequeña porción de extracto etanólico y se añadió 2-3 gotas de Ácido Pírico y gotas de KOH 5%.

Una coloración anaranjada o rojiza indica que la prueba es positiva para sesquiterpenolactonas.

2.3.7.10 Ensayo de Sudan III

Con este ensayo se determina la presencia de monoterpenos, entonces, se añadió a la muestra 1mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III (solución al 6% en partes iguales de alcohol y glicerina.) Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente. (26) (28) (42).

2.3.7.11 Ensayo de Liebermann-Burchard

Mediante esta reacción se determina triterpenos, esteroides y esteroides. En un tubo se colocó una alícuota de extracto etanólico, se evaporó a sequedad. Se disolvió el evaporado en 1mL de CHCl_3 , y se añadió, por las paredes del tubo, 1mL de reactivo (anhídrido acético: H_2SO_4 (40:1), sin agitar.

Si forma un anillo verde la prueba será positiva o puede darse el siguiente cambio (rápido) de coloración de verde-azul, pasando por verde intenso hasta llegar a negro en la interfase.

Tabla #3 Determinación de % de sub extractos

Subextractos	Peso del Balón vacío	Peso del Balón vacío + muestra	% de muestra
--------------	----------------------	-----------------------------------	--------------

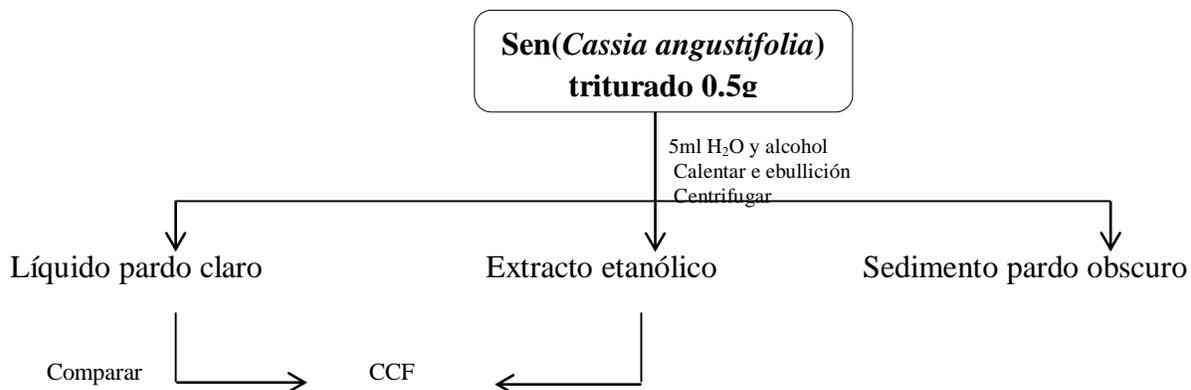
Etéreo	117.1985 g	117.3485 g	2.5%
Clorofórmico	117.2083 g	118.0113 g	13.68%
Butanólico	117.2199 g	118.1399 g	15.67%
Etanólico	117.2143 g	119.5843 g	34.82%

2.3.8 ANALISIS CROMATOGRÁFICOS DEL EXTRACTO Y SUB EXTRACTOS

Con los resultados del tamizaje fitoquímico se procede a comprobar la presencia de compuestos en placas de silicagel G_{F254} con solventes de recorrido para cada grupo fitoquímico, y revelando en soluciones características propuesto en bibliografía siendo estos Rosentaler para terpenos, Sulfato de Cerio para Flavonoides, KOH para cumarinas y antraquinonas buscando los parámetros cromatográficos, eficiencia, eficacia y resolución para la separación de los metabolitos secundarios.

2.3.8.1 Comparación cromatográfica del sen y *Senna multijuga*

Cuadro N°2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE SEN



Fase estacionaria de Sílica gel G_{F254}

Muestras: Extracto etanólico de Sen y de *Senna multijuga*

Solvente de recorrido: CH₃COOH, H₂O, EtOAc, 1 propanol; (1:30:40:40)

Revelador: KOH alcohólico

Al comparar la cromatografía del sen (1) y la *Senna multijuga* (2); determinamos que 4 manchas son similares en color y Rf. siendo así.

Tabla N°4 COMPARACION DEL SEN Y *Senna multijuga*

Especificaciones		Resultados	
Sen		<i>Senna multijuga</i>	
Rf		Rf	
0.5	Senósido D pardo	0.5	Senósido D pardo
0.7	Senósido C violeta	0.7	Senósido C violeta
0.8	Rehina amarilla	0.8	Rehina amarilla

FUENTE: WAGNER.H. PAG 69.

Según datos de bibliografía las manchas amarillas corresponden a antraquinonas agliconas con Rf 0.8 a la rehina y sus glucósidos crisofanol; cafés y violeta Rf 0.5 y 0.7 senósidos D y C. (CCF N°1)

Cromatografía en capa fina de los sub extractos

Se realizó cromatografía de los 3 sub extractos: Sub extracto Etéreo (II), Sub extracto Clorofórmico (III), Sub extracto Butanólico (IV) con solvente de recorrido: C₆H₆, CHCl₃, EtOH; (3:5:2) y Revelador: Rosentaler. (CCF N°2)

2.3.8.2 Separación de metabolitos secundarios del sub extracto etéreo II

El sub extracto etéreo fue de 0.15g de color verde amarillento, mucilaginoso con olor característico al solvente.

Separación por Cromatografía en Columna del Sub Extracto Etéreo (II)

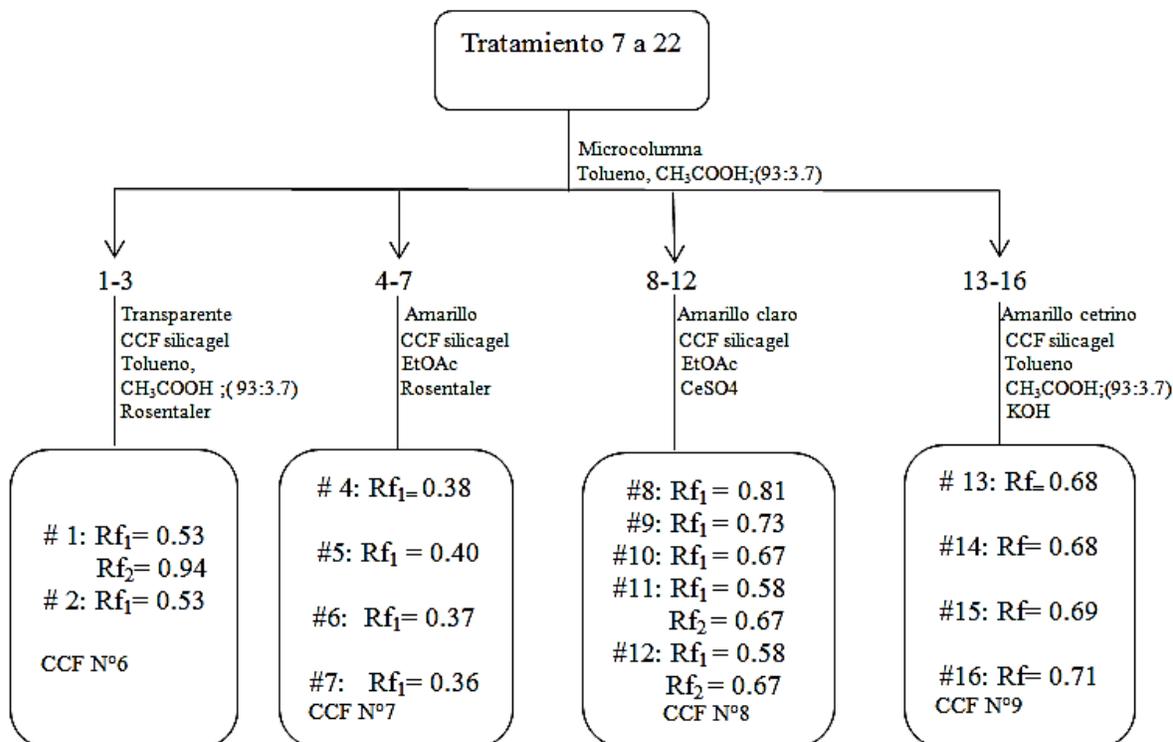
- De las fracciones #1 a #7 con C₆H₆

- De #8 al #11 con C₆H₆, EtOH; (90:10)
- De #12 a #16 con CHCl₃ (100)
- De #17 a #22 con CHCl₃, EtOH; (100:10)

Las fracciones se cromatografían para comprobar la presencia de metabolitos.

- En las fracciones 1-6 se utilizó solvente de recorrido: C₆H₆ y revelado con Rosentaler las muestras 4 y 5 presentan 3 manchas redondeadas con Rf 0,0; 0,59 y 0,9 se purifican en placa preparativa corrida en y EtOAc (10:5) y revelado con Rosentaler.(CCF N°4)
- Las fracciones 7 a 22 corridas en C₆H₆ (100) y revelado con I₂ tienen los mismos metabolitos, se reúnen y se cromatografían en micro columna con tolueno; ácido acético 93:3.7 revelado con Rosentaler da bandas coloreadas las fracciones de la 1 a la 3 es transparente y tiene dos manchas redondas con Rf 0.53 y 0.94 posiblemente siendo terpenos. (CCF N°6)
- Las fracciones 4-7 corridas con EtOAc tienen un Rf entre 0.36 a 0.40 ,la fracción 8 corrida en acetato de etilo presenta un compuesto a Rf 0.81, la fracción 9 Rf 0.73; la fracción 10 Rf 0.67 estas fracciones no se pudieron leer en el espectrofotómetro debido a que no existía suficiente muestra.(CCF N°7)
- La fracción 11 corrida con EtOAc 100% da 2 manchas se purifican en CCFP da un compuesto 11a con Rf 0.58 λ_{\max} 284 y 11b Rf 0.67 λ_{\max} 304 nm .(CCF N°8)
- En las fracciones 13 a16 corridas en Tolueno, CH₃COOH; (93:3.7) y revelado con KOH, la fracción 13 presenta un compuesto puro con Rf 0.68 posiblemente siendo una cumarina.(CCF N°9)

CUADRO N°3 TRATAMIENTO DE LAS FRACCIONES 7-22



2.3.8.3 Tratamiento del Sub extracto Clorofórmico III

El sub extracto clorofórmico fue amarillo sólido, corrido en CHCl_3 , MeOH;(6:2) tenemos los Rfs: 0.46, 0.48 y 0.93 (CCF N°10).

No se pudo purificar debido a que no existía suficiente muestra.

2.3.8.4 Tratamiento del Sub extracto Butanólico IV

Separación por cromatografía en columna

- El sub extracto butanólico 0.72g se fracciona; las fracciones 1-5 eluidas con Hexano, B Acetona;(50:40).
- La 6 -10 con Acetona 100 %.
- La 11 a #13 con Acetona, MeOH; (5:10)
- La 14 a #19 con MeOH 100%

Comprobación en CCF de las fracciones de la columna

- En las fracciones 1-4 se utilizó como solvente de corrido Acetona, EtOAc; (2:1) y revelado con Rosentaler dándonos manchas redondas de color rosado con valores de $Rf_1=0.42$, $Rf_2=0.43$, $Rf_3=0.40$, $Rf_4=0.43$ se unió las que presentan igual valor de Rfs. (CCF N° 11)
- La cromatografía de las fracciones 5 a 9 en acetona, acetato de etilo 2:1 y revelada con Rosentaler las fracciones 5 y 6 tienen un Rf 0.42-0.41 se unen. Las fracciones 7 a 9 presentan Rf 0.19 y 0.42 se unen y separan en capa fina en las mismas condiciones. (CCF N° 12)
- Las fracciones de 10 y 11 corridas con acetato de etilo, metanol 95:5 dan Rf de 0.25 y 0.44 se unen y separan en placa preparativa dan 3 bandas que se recuperan y se comprueba en el mismo solvente dando banda 1 Rf 0.60 λ_{max} 228 nm la 2 con Rf 0.46; la 3 con Rf 0.70 (CCF 13 y 14) al ser reveladas con Rosentaler son terpenos.
- Las fracciones 15 y 18 corridas en MeOH y reveladas con Rosentaler dan Rf 0.24 y 0.61 purificadas en capa fina en acetato de etilo (100) dan Rf entre 0.25 y 0.91 con buena resolución cromatográfica. (CCF 15 y 16).
- La fracción 19 corridas en Tolueno, EtOAc ;(80:20) y revelado con Rosentaler da 2 manchas que purificadas en capa fina la banda 1 Rf 0.75 λ_{max} 227 nm y la banda 2 Rf 0.92 λ_{max} 276 nm. (CCF N° 17)

2.3.8.5 Purificación de Metabolitos del Extracto Etanólico I

- La cromatografía del extracto etanólico corrido en solvente de corrido en $CH_3COOH:H_2O$: EtOAc: 1 propanol (1:30:40:40) y revelado con KOH alcohólico dan 6 manchas con Rf definidos por lo cual se fragmenta en columna 1.37 g con el mismo solvente (CCF N°18).
- La cromatografía de las fracciones de 1-6 con solvente de corrido: CH_3COOH , H_2O , EtOAc, 1 propanol; (1:30:40:40) y revelado con KOH alcohólico tenemos mezclas de

compuestos los que presentan Rf 0.50 y 0.70 son senósidos C y D.(CCF N°19). En la fracción 6 tenemos un compuestos puro con Rf 0.42 con λ_{\max} 277, 283 y 302 nm.

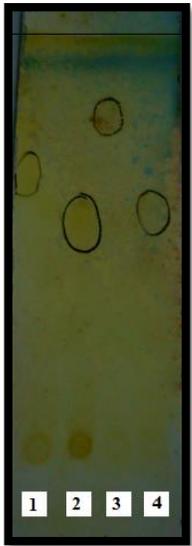
- Placa cromatográfica de las fracciones de 7-12 con solvente de corrido: CH₃COOH, EtOAc, 1 propanol; (1:40:40) unir de la 10 -12 presentan similares Rfs y purificar para realizar una microcolumna. (CCF N°20).
- La fracción 2 corrido en EtOAc, MetOH; (45:15) con Rf 0.45 y 0.53 dá a un compuesto puro. (CCF N°21). Para las muestras 3 y 4 se cambia el solvente con CH₃COOH, EtOAc, 1 propanol; (1:40:40) en la que existe 1 compuesto puro con Rf = 0.24 a una λ_{\max} 227, 271 y 313 nm. (CCF N°22).

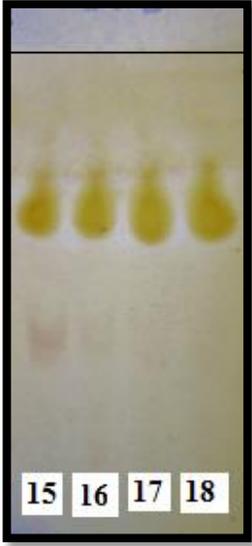
<p>Placa N°1 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra: 1. Extracto Etanólico del Sen 2. Extracto etanólico <i>Senna multijuga</i> Solvente de recorrido: CH₃COOH,H₂O,EtOAc,1 propanol; (1:30:40:40) Revelador: KOH alcohólico</p>	<p>Placa N°2 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Solvente de recorrido: C₆H₆, CHCl₃, EtOH; (3:5:2) Revelador: Rosentaler Muestras: Subextracto Etéreo II Subextracto Clorofórmico III Subextracto Butanólico IV</p>	<p>Placa N°3 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestras II : Fracciones 1-6 Solvente de recorrido: C₆H₆ Revelador: Rosentaler</p>
		
<p>1: Sen Rf₁: 0.50 Rf₂: 0.70 Rf₃: 0.80 Rf₄:0.82 Rf₅:0.93 2: <i>Senna multijuga</i> Rf₁: 0.50 Rf₂: 0.70 Rf₃: 0.80 Rf₄: 0.93</p>	<p>E: Etéreo C: Clorofórmico B: Butanólico</p>	<p>Fracción 4 y 5 Rf₁: 0,0 Rf₂: 0,59 Rf₃; 0,90</p>

<p>Placa preparativa II.4 y II.5 Solvente de recorrido: C₆H₆ Revelador: Rosentaler</p>	<p>Placa N°4 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestras: II.4 y II.5 Solvente de recorrido: C₆H₆ – EtOAc; (10:5) Revelador: Rosentaler</p>	<p>Placa N°5 Fase estacionaria Sílica gel G F₂₅₄ Muestra del Extracto: Fracción de la columna 7- 17 Solvente de recorrido: C₆H₆ Revelador: I₂</p>				
						
<p>Rf₁: 0.0 Rf₂: 0.23 Rf₃: 0.93</p>	<p>Rf₁: 0.0 Rf₂: 0.58 Rf₃: 0.93</p>	<table border="0"> <tbody> <tr> <td>Fracción 7 Rf₁: 0.65 Rf₂: 0.90</td> <td>Fracción 8 Rf₁: 0.67 Rf₂: 0.92</td> </tr> <tr> <td>Fracción 9 Rf₁: 0.68 Rf₂: 0.93</td> <td>Fracción 10 y 17 Rf₁: 0.65 Rf₂: 0.93</td> </tr> </tbody> </table>	Fracción 7 Rf ₁ : 0.65 Rf ₂ : 0.90	Fracción 8 Rf ₁ : 0.67 Rf ₂ : 0.92	Fracción 9 Rf ₁ : 0.68 Rf ₂ : 0.93	Fracción 10 y 17 Rf ₁ : 0.65 Rf ₂ : 0.93
Fracción 7 Rf ₁ : 0.65 Rf ₂ : 0.90	Fracción 8 Rf ₁ : 0.67 Rf ₂ : 0.92					
Fracción 9 Rf ₁ : 0.68 Rf ₂ : 0.93	Fracción 10 y 17 Rf ₁ : 0.65 Rf ₂ : 0.93					

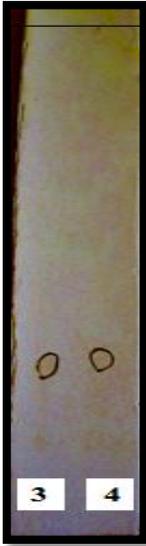
<p>Placa N°6 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra II: 22.1-22.2 Solvente de recorrido: Tolueno, CH₃COOH;(93:3.7) Revelador: Rosentaler</p>	<p>Placa N°7 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra II:22.4- 22.7 Solvente de recorrido: EtOAc Revelador: Rosentaler</p>	<p>Placa N°8 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra II.: 22.8-22.12 Solvente de recorrido: EtOAc (100%) Revelador: CeSO₄</p>
		
<p># 1: Rf₁= 0.53 Rf₂= 0.94 #2: Rf₁ = 0.53 Rf₂= 0.92</p>	<p># 4: Rf₁= 0.38 #5: Rf₁ = 0.40 #6:Rf₁= 0.37 #7:Rf₁= 0.36</p>	<p>#8: Rf₁= 0.81 #9: Rf₁=0.73 #10: Rf₁ = 0.67 #11: Rf₁= 0.58 Rf₂=0.67 #12: Rf₁= 0.58 Rf₂=0.67</p>

<p align="center">Placa N°9</p> <p>Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra II: 22.13-22.16 Solvente de recorrido: Tolueno, CH₃COOH; (93:3.7) Revelador: KOH</p>	<p align="center">Placa N°10</p> <p>Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de Subextracto: Clorofórmico III Solvente de recorrido: CHCl₃,MeOH ;(6:2) Revelador: KOH alcohólico</p>	<p align="center">Placa N°11</p> <p>Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de Subextracto IV: Fracción 1-4 Solvente de recorrido: Acetona,EtOAc; (2:1) Revelador: Rosentaler</p>
		
<p># 13:Rf= 0.68</p> <p>#14:Rf = 0.68</p> <p>#15:Rf= 0.69</p> <p>#16: Rf= 0.71</p>	<p>Rf: 0.46</p> <p>0.48</p> <p>0.93</p>	<p># 1:Rf= 0.42</p> <p>#2:Rf = 0.43</p> <p>#3:Rf= 0.40</p> <p>#4: Rf= 0.43</p>

<p>Placa N°12 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de Subextracto IV: Fracción 5-9 Solvente de recorrido: EtOAc Revelador: Rosentaler</p>	<p>Placa N°13 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de Subextracto IV: Fracción de 10-14 Solvente de recorrido: EtOAc,MeOH; (95:5) Revelador: Rosentaler</p>	<p>Placa N°14 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestras IV 11.1,11.2,11.3,11.4 Solvente de recorrido: EtOAc,MeOH; (95:5) Revelador: Rosentaler</p>
		
<p>#5:Rf= 0.42 #6:Rf = 0.41 #7:Rf= 0.18 0.42 #8: Rf= 0.19 0.40 #9: Rf= 0.19 0.38</p>	<p>#10:Rf= 0.25 0.44 #11:Rf= 0.25 0.44 #12: Rf=0.23 0.48 #13: Rf= 0.24 0.51 #14: Rf= 0.25 0.55</p>	<p>#1 Rf =0.60 #2 Rf =0.46 #3 Rf =0.70 #4 Rf =0.52</p>

<p>Placa N°15 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de Sub extracto IV: Fracción 15-18 Solvente de recorrido: MeOH 100% Revelador: Rosentaler</p>	<p>Placa N°16 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de Sub extracto IV : 18.1 ,18.2,18.3 Solvente de recorrido: EtOAc (100) Revelador: Rosentaler</p>	<p>Placa N°17 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de Sub extracto IV: 19.1 ,19.2,19.3 Solvente de recorrido: Tolueno,EtOAc ;(80:20) Revelador: Rosentaler</p>
		
<p>#15:Rf= 0.24 0.61 #16: Rf=0.24 0.61 #17: Rf=0.61 #18: Rf=0.61</p>	<p>#1 Rf=0.25 #2 Rf=0.35 0.69 0.90 #3 Rf=0.91</p>	<p>#1,2,3 Rf:0.75 0.92</p>

<p>Placa N°18 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de extracto: Etanólico I Solvente de recorrido: CH₃COOH,H₂O,EtOAc,1 propanol; (1:30:40:40) Revelador: KOH alcohólico</p>	<p>Placa N°19 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de extracto I: Fracción 1-6 Solvente de recorrido:CH₃COOH,H₂O,EtOAc,1 propanol; (1:30:40:40) Revelador: KOH alcohólico</p>	<p>Placa N°20 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de extracto I: 7-12 Solvente de recorrido: CH₃COOH,H₂O,EtOAc,1 propanol; (1:30:40:40) Revelador: KOH alcohólico</p>												
														
<p>Rf: 0.05 0.55 0.75 0.87 0.93</p>	<table border="0"> <tr> <td>Fracción 1 Rf: 0.50 0.67 0.70 0.93</td> <td>Fracción 2 Rf: 0.44 0.67 0.75 0.83</td> </tr> <tr> <td>Fracción 3 Rf: 0.45 0.66 0.70 0.83</td> <td>Fracción 4 Rf: 0.42 0.88</td> </tr> <tr> <td>Fracción 5 Rf: 0.40 0.76</td> <td>Fracción 6 Rf: 0.42</td> </tr> </table>	Fracción 1 Rf: 0.50 0.67 0.70 0.93	Fracción 2 Rf: 0.44 0.67 0.75 0.83	Fracción 3 Rf: 0.45 0.66 0.70 0.83	Fracción 4 Rf: 0.42 0.88	Fracción 5 Rf: 0.40 0.76	Fracción 6 Rf: 0.42	<table border="0"> <tr> <td>Fracción 7 Rf: 0.28 0.67 0.79</td> <td>Fracción 8 Rf: 0.28 0.67</td> </tr> <tr> <td>Fracción 9 10 Rf: 0.28 0.67</td> <td>Fracción 10 Rf: 0.23 0.50</td> </tr> <tr> <td>Fracción 11 12 Rf: 0.23 0.50 0.74</td> <td>Fracción 12 Rf: 0.23 0.50 0.76</td> </tr> </table>	Fracción 7 Rf: 0.28 0.67 0.79	Fracción 8 Rf: 0.28 0.67	Fracción 9 10 Rf: 0.28 0.67	Fracción 10 Rf: 0.23 0.50	Fracción 11 12 Rf: 0.23 0.50 0.74	Fracción 12 Rf: 0.23 0.50 0.76
Fracción 1 Rf: 0.50 0.67 0.70 0.93	Fracción 2 Rf: 0.44 0.67 0.75 0.83													
Fracción 3 Rf: 0.45 0.66 0.70 0.83	Fracción 4 Rf: 0.42 0.88													
Fracción 5 Rf: 0.40 0.76	Fracción 6 Rf: 0.42													
Fracción 7 Rf: 0.28 0.67 0.79	Fracción 8 Rf: 0.28 0.67													
Fracción 9 10 Rf: 0.28 0.67	Fracción 10 Rf: 0.23 0.50													
Fracción 11 12 Rf: 0.23 0.50 0.74	Fracción 12 Rf: 0.23 0.50 0.76													

<p>Placa N°21 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de extracto I : Fracción 1-4 Solvente de recorrido: EtOAc, MetOH; (45:15) Revelador: CeSO₄</p>	<p>Placa N°22 Fase estacionaria de Sílica gel G F₂₅₄ Muestra de extracto I: Fracción 3 y 4 Solvente de recorrido: en CH₃COOH, EtOAc, 1 propanol; (1:40:40) Revelador: KOH alcohólico</p>
	
<p>Rf: 0.45 0.53</p>	<p>Rf: 0.24</p>

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 COMPOSICIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La comprobación taxonómica e identificación botánica fue realizada por el curador del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo quien clasificó la muestra como *Senna multijuga*.

3.2 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA

Para el control de calidad se utilizó la planta completa de *Senna multijuga* a la cual se extrajo con etanol al 96%. El hinchamiento de la droga es importante porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y difusión del alcohol.

Los sub extractos preparados de *Senna multijuga* tiene un rendimiento de etéreo 2.5%, clorofórmico 13.68%, es así que el sub extracto etanólico con 34.82% presenta mayor cantidad obtenida y el extracto Butanólico con 15.67%.

3.3 PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE MARTIN GALVIS (*Senna multijuga*).

3.3.1 DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA

TABLA N°5. RESULTADOS DE PROPIEDADES FISICAS Y REACCIONES DE COLORACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO.

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Vegetal	<i>Senna multijuga</i>	587g
Extracto	Rendimiento	34.06 %
Aspecto	Líquido siruposo de color pardo oscuro, olor amaderado.	Líquido siruposo
Densidad	d=g/ml	0.9859
Índice de Refracción	1.321	1.321
pH	Acido o Básico	5.30
Tamizaje Fitoquímico	Bornträger Quinonas color rojo	Antraquinonas +++
	Shinoda color amarillo	Flavonoles +
	Sudan III color rojo	Aceites y grasas +
	Lieberman Buchard anillo verde oscuro	Triterpenos y/o esteroides +
	Baljet precipitado rojo	Lactonas y cumarinas ++

(+++) Alto contenido del metabolito secundario

(++) Contenido leve del metabolito secundario

(+) Bajo contenido del metabolito secundario

En la tabla No.5 muestra los resultados de las propiedades físicas, y de coloración determinadas en el extracto etanólico de Martín Galvis (*Senna multijuga*).

El vegetal *Senna multijuga* con 587g presenta un rendimiento de 34.06% bajo con relación a la muestra utilizada aspecto siruposo el color pardo oscuro característico de la especie, olor amaderado, un pH de 5,30 ligeramente ácido, la densidad de 0,9859 g/mL cercano a la densidad del agua, un índice de refracción igual a 1,321, en el Tamizaje fitoquímico las reacciones de cumarinas y Baljet verifican la presencia de cumarinas y lactonas, la reacción de Lieberman Buchard la presencia de esteroides, la de Bornträger dio la presencia de antraquinonas, Shinoda para flavonoides. Según datos bibliográficos concuerdan con Hering C. y Tapia J. en el que realizó pruebas fitoquímicas en *Senna multijuga* en la que determinó la presencia de, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, y esteroides.

3.4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LAS CROMATOGRAFÍAS DEL EXTRACTO Y SUB EXTRACTOS DE *Senna multijuga*.

En la placa cromatográfica de los sub extractos determinamos que hay una buena separación con el solvente de corrido; C₆H₆, CHCl₃, EtOAc; (3:5:2) y revelado con Rosentaler para el sub extracto etéreo compuestos de color amarillos, pardos y rosados mientras que para los sub extractos clorofórmico y Butanólico el solvente es muy apolar.

3.4.1 TRATAMIENTO DEL SUB EXTRACTO ETÉREO II

El sub extracto etéreo puede contener lactonas terpénicas o cumarínicas, flavonoides metoxilados e inclusive alcaloides los mismos que se comprobaron en cromatografía.

3.4.1.1 Cromatografía de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del sub extracto Etéreo

- En esta cromatografía las fracciones que corrieron fueron la #4 y la #5 las mismas que presentan igual valor de R_f=0.59 se unió la CCFP (CCF N°3).

- En la verificación en CCF se observan 2 manchas amarillas grandes separadas corridas en C_6H_6 , EtOAc; (10:5) y revelado con Rosentaler característica de terpenos en la que tenemos un compuesto puro con $Rf_1=0.58$ y $Rf_2=0.93$. (CCF N°4).
- En la placa N°5 corridas en C_6H_6 y revelado con I_2 muestra manchas redondas y separadas de la #1 a la # 9 presentan Rf diferentes mientras que la #10 y la #17 dándonos un solo compuesto unimos las fracciones de igual Rf y realizamos una microcolumna.
- La microcolumna isocrática dio 16 fracciones, las mismas se comprueban en CCF tenemos en las 3 primeras subfracciones con manchas de color azul y rosadas corridas en Tolueno, Ácido acético; (93:3.7) y reveladas con Rosentaler tenemos una buena separación cromatográfica y en la #2 con un $Rf=0.53$ siendo posiblemente terpenos. (CCF N°6)
- En la placa N°7 en las fracciones desde la #4 a la #7 buscando un solvente de corrido: EtOAc y revelado con Rosentaler corresponde a terpenos tenemos unas manchas de color amarillo con similares Rf siendo así en la 4 $Rf=0.38$, en la 5 $Rf=0.40$, en la 6 $Rf=0.37$ y en la 7 con un valor de $Rf=0.37$ podemos decir que tenemos compuestos puros.
- La CCF de la 8 a 12 teniendo como solvente de corrido EtOAc y revelado con $CeSO_4$, característica de flavonoides tenemos manchas redondeadas de color azul en la muestra 11 con λ_{max} de 205, 284 y 304 leídas en el UV tenemos a una posible estructura de un flavonol. (CCF N°8).
- Al cromatografiar las fracciones 13-16 en Tolueno, CH_3COOH ; (93:3.7) y reveladas con KOH tenemos un compuesto puro con λ_{max} de 215, 226 nm posiblemente siendo una cumarina. (CCF N°9).

3.4.2 TRATAMIENTO DEL SUB EXTRACTO BUTANÓLICO IV

3.4.2.1 Cromatografía de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del sub extracto Butanólico

Puede contener saponinas, flavonoides, cumarinas.

- Al realizar la separación en cromatografía en columna las fracciones 1-4 se utilizó como solvente de corrido Acetona, EtOAc; (2:1) y revelado con Rosentaler dándonos manchas redondas de color rosado con valores de $Rf_1=0.42$, $Rf_2=0.43$, $Rf_3=0.40$, $Rf_4=0.43$. (CCF N° 11)
- La cromatografía de las fracciones 5 a 9 en acetona, acetato de etilo 2:1 y revelada con Rosentaler las fracciones 5 y 6 tienen un Rf de 0.42-0.41; de la 7-9 con Rf entre 0.18 y 0.40 las mismas que presentan manchas de color amarillo. (CCF N° 12)
- Las 16 fracciones de la microcolumna y al purificar en CCFP en la fracción 11.1 una mancha de color amarilla cromatografiado con EtOAc, MeOH; (95:5) y revelado con Rosentaler presenta Rf 0.60 con λ_{max} de 228 nm siendo posiblemente un terpenoide (CCF N° 12).
- La CCF de la fracción 19 corridas en Tolueno, EtOAc (80:20) y revelado con Rosentaler y para purificar en CCFP recuperadas y comprobadas en las mismas condiciones la banda 1 y 2 están puras tiene Rf : 0.75 y 0.92 a λ_{max} 227 y 276nm posiblemente siendo una sesquiterpeno lactona. (CCF N°17)

3.4.3 TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO I

- En el análisis cromatográfico del extracto etanólico I corrido en CH_3COOH , H_2O , EtOAc, 1 propanol; (1:30:40:40) y como solvente revelador KOH alcohólico. Tenemos una buena separación de manchas con $Rf = 0.05, 0.55, 0.75, 0.87$ y 0.93 . (CCF N°18)

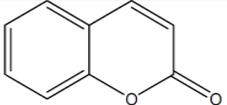
- La cromatografía en columna da 12 fracciones de la fracción 6 en el tratamiento CCFP da un compuesto puro en el UV con λ_{\max} de 236, 277, 283, 302 evidenciando posiblemente una antraquinona (crisofanol). (CCF N°19)
- En la cromatografía de las fracciones desde la #7 a la #12 en CH₃COOH, EtOAc, 1 propanol; (1:40:40) y reveladas con KOH tenemos manchas de color amarillo y pardas. (CCF N°20)
- Al realizar el análisis cromatográfico de las fracciones de la microcolumna de las fracciones #1 a la #4 utilizando como solvente de corrido EtOAc, MetOH; (45:15) y como solvente revelador CeSO₄ en el que solo la fracción 2 tuvo separación mientras que para la 3 y la 4 el solvente es apolar por lo que tenemos que aumentar la polaridad. (CCF N°21)
- En las fracciones #3 y #4 aumentando la polaridad con solvente de corrido en CH₃COOH, EtOAc, 1 propanol; (1:40:40) y como revelador KOH tenemos un compuesto puro con manchas de color rosado, son las mismas ya que tienen el mismo valor de R_f=24 en el UV a λ_{\max} de 227, 271 y 313 nm y calculado mediante a las reglas de Woodward-Fieser tenemos λ_{\max} de 224, 275 y 311 nm deduciendo que es una antraquinona (rehina). (CCF N°22)

3.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS EN EL UV

La composición química del Sen (*Cassia angustifolia*) contiene flavonoides, cumarinas, terpenos β sitosterol, y antraquinonas (crisofanol y rehina).

3.5.1 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DEL SUB EXTRACTO ETÉREO

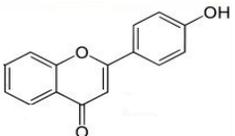
TABLA N°6 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS UV (CUMARINAS)

Sub extracto Etéreo	λ nm Práctico	Absorbancia	λ nm Bibliográfico
	215	3.585	211-307
	226	3.678	211-311

FUENTE: OLGA LOOK-1988

Al ser reveladas la fracción #13 de la microcolumna del sub extracto etéreo con KOH en concordancia con datos de bibliografía y mediante las reglas de Woodward-Fieser se deducen que son cumarinas.

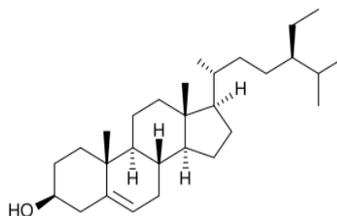
TABLA N°7 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS UV (FLAVONOIDES)

Sub extracto Etéreo	λ nm Práctico	Absorbancia	λ nm Bibliográfico (flavonoides)
	205	1.651	250-280
	284	0.131	300-330
	304	0.136	

FUENTE: OLGA LOOK-1988

En el sub extracto etéreo la fracción # 11 fue revelada con CeSO₄ con datos de bibliografía y mediante las reglas de Woodward-Fieser se deducen que son flavonoides.

3.5.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DEL SUB EXTRACTO BUTANÓLICO



En el sub extracto Butanólico que corresponde a la fracción IV.11.1 revelada con Rosentaler evidenciando que es un terpeno β sitosterol.

TABLA N°8 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS UV (SESQUITERPENO LACTONAS)

Sub extracto butanólico	λ nm Práctico	Absorbancia	λ nm Bibliográfico
	227	0.593	250-270
	276	0.141	

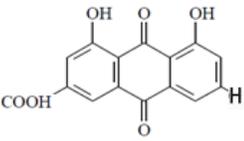
FUENTE: OLGA LOOK-1988

Al ser revelada la fracción IV.19.1 con Vainillina, H_2SO_4 en concordancia con datos de bibliografía y mediante las reglas de Woodward-Fieser se deducen que son sesquiterpeno lactonas.

3.5.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DEL SUB EXTRACTO ETANÓLICO

TABLA N°9 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS UV (ANTRAQUINONAS)

Sub extracto Etanólico	λ nm Práctico	Absorbancia	λ nm Bibliográfico Antraquinonas
	277	1.454	250-263-272-322
	283	1.467	
	302	1.210	

crisofanol			
	227	3.810	250-263-272-322
	271	1.811	
rehina	313	0.997	

FUENTE: OLGA LOOK-1988

Al ser reveladas las fracciones IV.6 y la fracción IV. 3 y 4 del extracto etanólico con KOH en concordancia con datos de bibliografía y mediante las reglas de Woodward-Fieser se deducen que son antraquinonas crisofanol y rehina.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. En el extracto etanólico por fragmentación en sub extractos, columnas y placas cromatográficas preparativas con diferentes solventes se identificó posiblemente cumarinas, flavonoides, β sitosterol, crisofanol, rehina y los senósidos por cromatografía de capa fina comparando con los Rf de Sen *Cassia angustifolia* 0.50, 0.70 y 0.8 la hipótesis es positiva.
2. El vegetal Martin Galvis en el Herbario de la ESPOCH fue identificada como *Senna multijuga*.
3. El extracto etanólico obtenido por maceración tiene 34.06% de rendimiento es siruposo, pardo oscuro, aroma a madera, pH 5.30 densidad 0,9629 g/mL, índice de refracción 1.321. Los grupos fitoquímicos son: antraquinonas, terpenos, aceites y esteroides, flavonoides, y cumarinas concuerdan con datos establecidos para el género *Senna*.
4. El rendimiento de los sub extractos fue de 2.5% etéreo, 13.68 % Clorofórmico 15,67% Butanólico y 40.37% de extracto etanólico.
5. En el sub extracto etéreo se aísla una cumarina corrido en Tolueno, CH₃COOH (93:3.7), y revelado con KOH con Rf= 0.68 a (λ_{\max}) 215 y 226 nm; un flavonoide con Rf= 0.58 a (λ_{\max}) 284, y Rf= 0.67 a (λ_{\max}) 304 nm.

6. En el sub extracto Butanólico fraccionado en columna de las fracciones 15 y 16 purificadas en placa preparativa corrida en EtOAc:MeOH; (95:5) y revelado con Rosentaler con λ_{\max} 228 nm posible β sitosterol y otro metabolito corrido en Tolueno:EtOAc ;(80:2) y revelado con Rosentaler con $Rf_1=0.75$ y $Rf_2=0.92$ a (λ_{\max}) 227 y 276 nm de acuerdo a las (λ_{\max}) están dentro de las sesquiterpeno lactonas.

7. En el sub extracto etanólico al realizar el análisis cromatográfico de capa fina corrido en CH₃COOH, EtOAc, 1 propanol; (1:40:40) y como solvente revelador KOH alcohólico tenemos dos antraquinonas la primera con $Rf: 0.42$ a (λ_{\max}) 236, 277, 283, 302 nm siendo posiblemente el crisofanol; la rehina con $Rf=0.24$ a (λ_{\max}) 227, 271, 313 nm.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

- Como tienen los mismos compuestos que el sen (*Cassia angustifolia*) se promocióne su comercialización.
- Se puede utilizar como laxantes y purgantes, en forma de tisanas, polvos, extractos, sales cálcicas de los senósidos A y B cristalizadas.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

La presente investigación “Separación de metabolitos secundarios de Martin Galvis (*Senna multijuga* con actividad antibacteriana” tiene como objetivo extraer, purificar y posible identificación de metabolitos secundarios en el extracto etanólico y sub extractos este estudio se realizó en los laboratorios de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

En el extracto etanólico presenta senósidos similar al Sen (*Cassia angustifolia*).

El tamizaje fitoquímico indicó que (*Senna multijuga*) contiene antraquinonas, triterpenos, esteroides, monoterpenos, sesquiterpeno lactonas, flavonoides y cumarinas.

Para la separación de estos metabolitos se utilizó métodos cromatográficos como: cromatografía en columna, microcolumna y para la purificación placa preparativa realizando corte de bandas para posteriormente concentrar y comprobar en cromatografía en capa fina corrido en sistemas de solventes el más apropiado en el que pueda evidenciar los 3 parámetros cromatográficos: eficacia eficiencia y resolución posteriormente determinar en el espectrofotómetro ultravioleta.

Los sub extractos; (II) presenta 2 compuestos a determinadas longitudes de onda(λ_{\max} 1=226 nm (cumarina) 2=304 (flavonoide) utilizando solvente de corrido: Tolueno, CH₃COOH

(93:3.7), y como revelador KOH y EtOAc (100%) revelado con CeSO_4 ; el (IV) 2 compuestos con longitudes de onda $(\lambda)_{\text{max}}$ 1=228 nm (β sitosterol); 2= 276 nm (sesquiterpeno lactonas) utilizando solvente de corrido EtOAc, MeOH (95:0.5); EtOAc; Tolueno, EtOAc ;(80:2) y como solvente revelador Rosentaler y (I) presentó 2 compuestos a $(\lambda)_{\text{max}}$ 1=302 nm (crisofanol) y 2=313nm utilizando solvente de corrido CH_3COOH , EtOAc, 1 propanol; (1:40:40) y revelado con KOH alcohólico aplicando las reglas de Woodward-Fieser se concluye que es la rehina.

Se recomienda que se profundice esta investigación de estos metabolitos secundarios identificados, para que sean aplicados en el campo de la Fitomedicina y Fitoterapia y así contribuya al desarrollo y emprendimiento en nuestra sociedad.

SUMMARY

This research is about “Separation of secondary metabolic from Martin Galvis (*Senna multijuga*) with antibacterial activity”, its objective is to extract, purify and identify possible secondary metabolites in the ethanol extract and ethereal sub extracts (II), chloroformic (III), butanolic (IV) and ethanol (I). This study was developed in Phytochemistry laboratories at the Science college of Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

In the ethanol extract has similar sennosides Sen (*Cassia angustifolia*).

The phytochemical screening indicated that (*Senna multijuga*) contains anthraquinones, triterpenes, sterols, steroids, monoterpenes, flavonoids and coumarins.

For preparing these metabolites, chromatographic methods were used as follows: column chromatography micro column, and for purification, preparative plate, performing cutting for later banding and checking concentrate in the thin layer chromatography in solvent systems route, the most appropriate in which to show the three chromatographic parameters: effectiveness, efficiency and resolution, to later determining in the UV spectrophotometer.

The sub extracts; (II) present 2 compounds to certain wavelengths (λ)_{max} 1= 226 nm (coumarin) 2= 304 nm (flavonoid) using solvent run; Toluene, CH₃COOH (93:3.7), and as developer KOH and EtOAc (100%) developed with CeSO₄; the (IV) 2 wavelengths compounds (λ)_{max} 1=228 nm (β sitosterol); 2= 276 nm (sesquiterpenolactonas) using solvent run EtOAc, MeOH (95:0.5) ; Toluene, EtOAc; (80:20) and as solvent developer Rosentaler and (I) presented 2 compounds at (λ)_{max} 1=302nm (chrysophanol) and 2= 313 nm using solvent run CH₃COOH, EtOAc, 1 propanol; (1:40:40) and revealed with alcoholic KOH: applying the Woodward-Fieser's rulers, is concluded that the Rehin.

It is recommended deepening Investigation of these identified secondary metabolites in order to be applied in the Phytomedicine and Phytotherapy areas, and in this way contribute to the development and entrepreneurship in our society.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **ACOSTA.M.**, Planta medicinales del Ecuador., s.ed., Quito-Ecuador Editorial Abya-Yala., 1992., Pp.117.
- 2.- **AGÁPITO.T.SUNG., I.**, Fitomedicina: 1100 Plantas Medicinales s.ed., Lima-Perú., Editorial Isabel., 2005., Pp. 22-35.
- 3.- **ALBORNOZ.A.**, Productos Naturales, Sustancias y Drogas Extraídas de Plantas., s.ed., Caracas-Venezuela., s.edt., 1980., Pp.68.
- 4.- **BIAZZI.E.**, El Maravilloso poder de las Plantas., 2a. ed., Buenos - Aires – Argentina., Casa Editora Sudamérica., 2008., Pp. 23-44.
- 5.- **BORGTOF.H.**, Plantas útiles del Ecuador, Aplicación, retos y Perspectivas., s.ed., Quito-Ecuador., Editorial Abya - Yala., 2007., Pp. 144-180.

- 6.- BRUNETON.J.**, Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales.,
2ª.ed., Zaragoza-España., Editorial Acribia S.A., 2001., Pp. 180-
200.
- 7.- CASTILLO.E.**, Manual de Fitoterapia., s.ed., Madrid - España.,
Elsevier Masson., 2007., Pp. 214-217.
- 8.- CORREA.B.**, Especies vegetales promisoras., 3a.ed., Bogotá-
Colombia., Editora Guadalupe Ltda., 2000., Pp.400-412.
- 9.- DOMINGUEZ.X.**, Método de investigación Fitoquímica., 2ª ed.,
México-México., Limusa., 2000., Pp33-48.
- 10.- DE LA TORRE.L.**, Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador.,
2ª ed., Quito-Ecuador., Herbario QCA.,2008 Pp 277, 336,
360,616.
- 11.- DUQUE. J;** Handbook of medicinal Herbs CRC PESS., 15 a ed.,
Printhing., 1987., Pp 102,103.
- 12.- ELSEVIER.**, Manual de Ensayos de Fitoterapia., Department of
Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I,
P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon. 2001. pp. 472-478.

- 13.- **HARRIS.C.**, Análisis Químico Cuantitativo., 3ª ed., México., Editorial McGraw -Hill Interamericana., 2000., Pp. 619-628.
- 14.- **HARRISON.C.**, Principios de Medicina Interna., 15a. ed., España., Mc Graw Hill Interamericana de España, S.A. Volumen I., 2002., Pp. 345-362.
- 15.- **ITZIK.A.**, Plantas curativas., 2a.ed., Colombia., Arquetipo grupo Editorial., 2007., Pp.251.
- 16.- **JATIVA.C.**, Texto básico de Farmacognosia y Productos Naturales., 2ª ed., Riobamba., Centro de Reproducción de Documentos de ESPOCH., 2000., Pp 56-60.
- 17.- **LOCK.O.**, Investigación Fitoquímica., 2ª.ed., Perú., Ed.Universidad Católica del Perú., 1994., Pp 27,270-278.
- 18.- **MIRANDA.G.**, Farmacognosia y productos naturales., s. ed., La Habana Cuba., Universidad de la Habana., 2006., Pp. 32-44, 56-62.
- 19.- **MORALES.M.**, Plantas Medicinales y Medicina Natural., 2da.ed., Santiago de Chile., s.edt., 2009., Pp. 1-7.
- 20.- **PAMPLONA.J.**, Enciclopedia de las Plantas Medicinales., 2a ed., Argentina., Editorial Safeliz., 2006., Pp. 365- 368.
- 21.- **SKOOG.D.**, Química Analítica., 7a. ed., México., Editorial McGraw-Hill Interamericana., 2001., Pp 666-673.

22.- WAGNER.H., Plant Drug Analysis., 2a. ed., Germany., Springer. 1996., Pp 68.

23.- WHITE. A., Hierbas del Ecuador Plantas Medicinales., s.ed., Quito, Ecuador., Imprenta Mariscal., 1976., Pp.146.

24.- HERING.C., Análise estrutural de folha de *Senna multijuga subsp.Lindleyana*(gardner) h.s. irwin & barneby (leguminosae, caesalpinoideae) e localização in situ decompostos com ação biológica de interés se farmacológico. Instituto de Botânica de la Consejería de Medio Ambiente, São Paulo-Brasil.**TESIS.**, 2010. Pp. 37.

25.- TAPIA.J., Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y subextractos clorofórmico y etéreo de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetiadubia* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador.**TESIS.**, 2012., Pp.103-104.

BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

26.- CASSIA

[http:// www.b botanical - online. com / medicinalbcasia. htm](http://www.botanical-online.com/medicinalbcasia.htm)
2012-10-20

27.- CASSIA MULTIJUGA

[http://www.tropicalbiology./org/species/Senna20% multijuga. htm](http://www.tropicalbiology.org/species/Senna20%multijuga.htm)
2012-10-20

28.- CROMATOGRAFIA

<http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa>

2012-10-20

29.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

<http://quimica.laguia2000.com/general/cromatografiaencapafina>

2013-02-25

30.- CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

<http://es.scribd.com/doc/14172697/6-Cromatografia-en-Columna>

2013-02-25.

31.- CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

<http://quimica.laguia2000.com/general/cromatografia-en-columna#ixzz2Msd2NjA>

2013-02-25.

32.- ESPECTROFOTOMETRIA UV

http://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_ultravioleta-visible

2013-02-25

33.- EXTRACTOS VEGETALES

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

2012-11-12

34.- GENOMMALAB FITOMEDICAMENTOS

<http://www.genommalab.com/investigacioncientifica/fitomedicamentos>.

2013-02-20

35.- METABOLITOS DE SENNA

<http://scielo.sld.cu/scielo.php?pidS102847962011000404scriptsca>
2012-09-20

36.- METABOLITOS SECUNDARIOS

http://www.psicostasia.com/nueva/psicostasia/?page_id=13
2012-09-20

37.- METABOLITOS SECUNDARIOS

<http://gusoman.webs.com/metabolitossecundarios.htm>
20120920

38.- OBTENCION DE EXTRACTOS

www.monografias.com/obtenciónextractos,htm
2013-01-12

39.- OBTENCION DE EXTRACTOS VEGETALES

<http://www.monografias.com/trabajosextractosplantasmedicinales/>
2012-10-12

40.- PLANTAS MEDICINALES

<http://www.marc moll.net/plantas-medicinales.html>
2012-11-2

41.- PLANTAS MEDICINALES

<http://www.plantasquecuran.com/>
2012-12-12

42.- PRODUCTOS NATURALES DE USO MEDICINAL

<http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP22361S966J.pdf>

2013-01-12

43.- SEN

[www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=senna+\(planta\).2](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=senna+(planta).2)

2012-10-06

44.- SENNA

<http://www.datoanuncios.org/?a=31750>

2012-10-06

45.- SENNA

[http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/652.](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/652.html)

[html](#)

2012-09-20

46.- SENNA ESTRUCTURAS

<http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n04a03toso.pdf>

2013-03-2

47.- SENNA MULTIJUGA

<http://www.henriettesherbal.com/pictures/senna-multijuga-2.htm>

2013-02-20

48.- SENNA MULTIJUGA

<http://132.2110/muestras/indexmainpageproductinfoproducti.htm>

2012-09-20

49.- TAXONOMIA VEGETAL

<http://biologia.laguia2000.com/taxonomia/taxonomia-vegetal>

2012-10-12

50.- USOS MEDICINALES

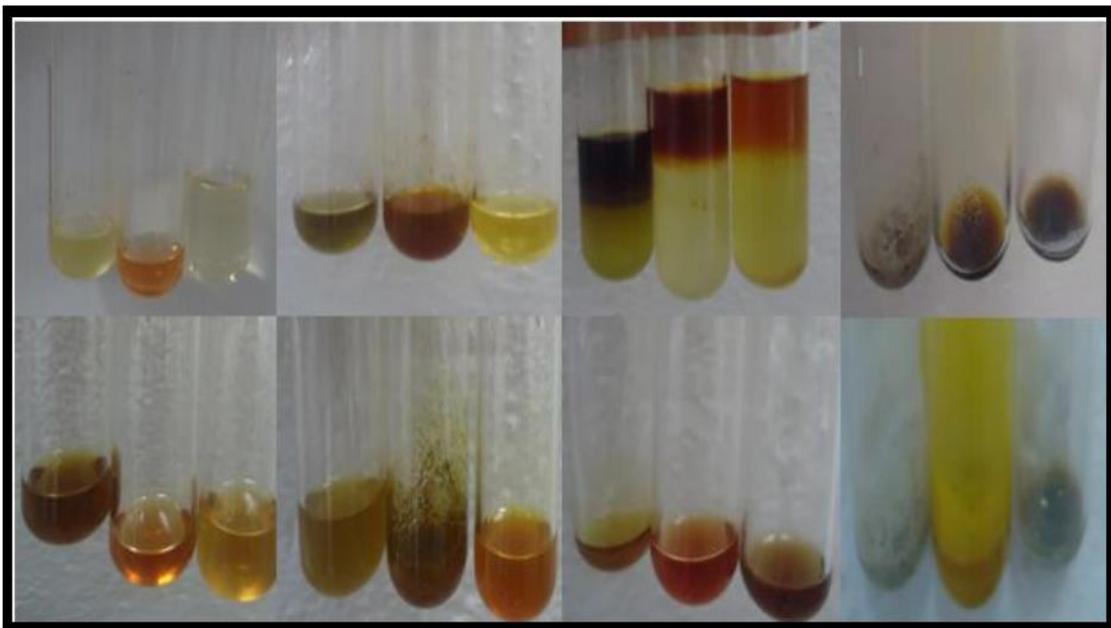
<http://www.saber.ula/bitstream/123456789/23804/1/articulo12.pdf>

2013-02-12

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

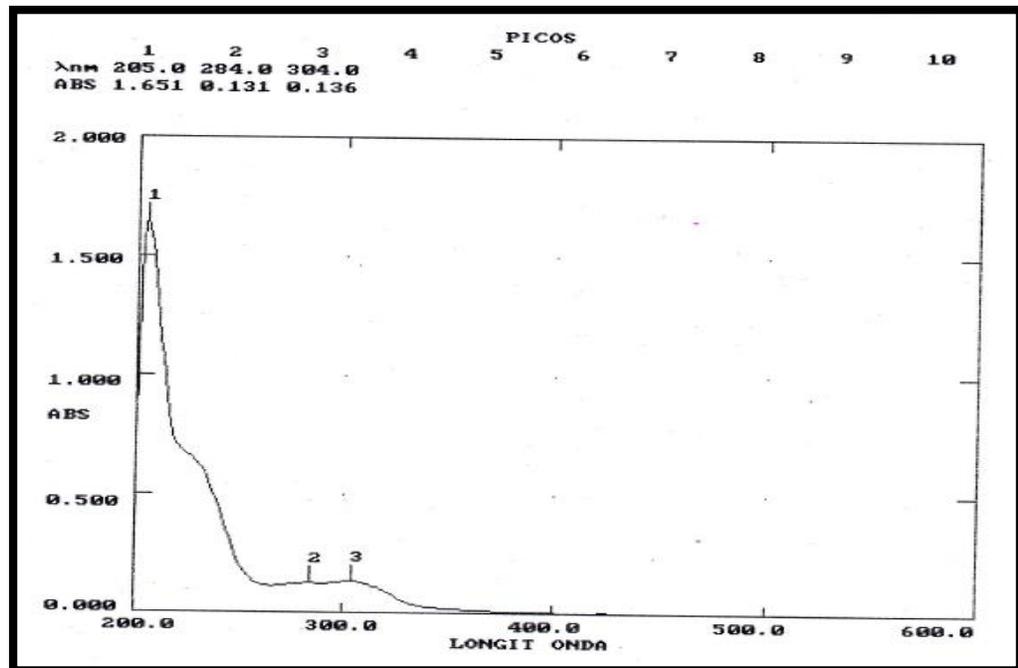
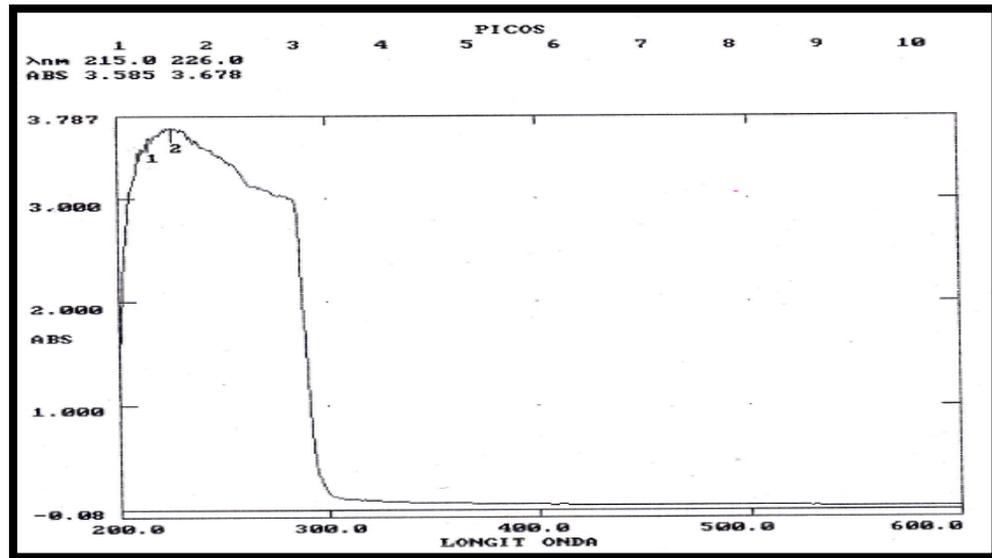
ANEXO 1 TAMIZAJE FITOQUIMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO



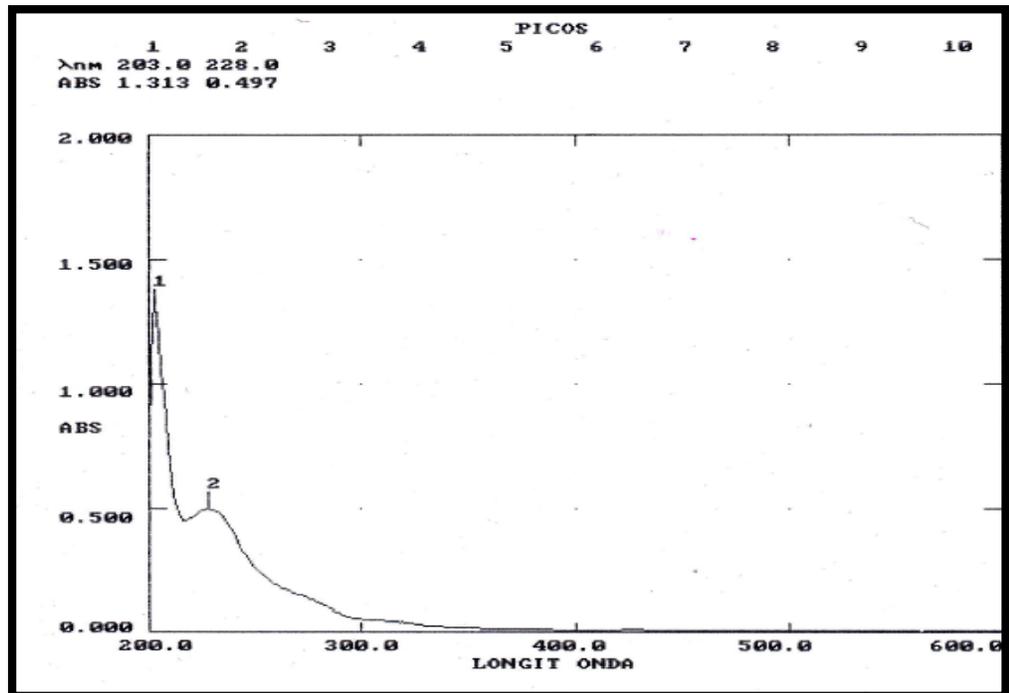
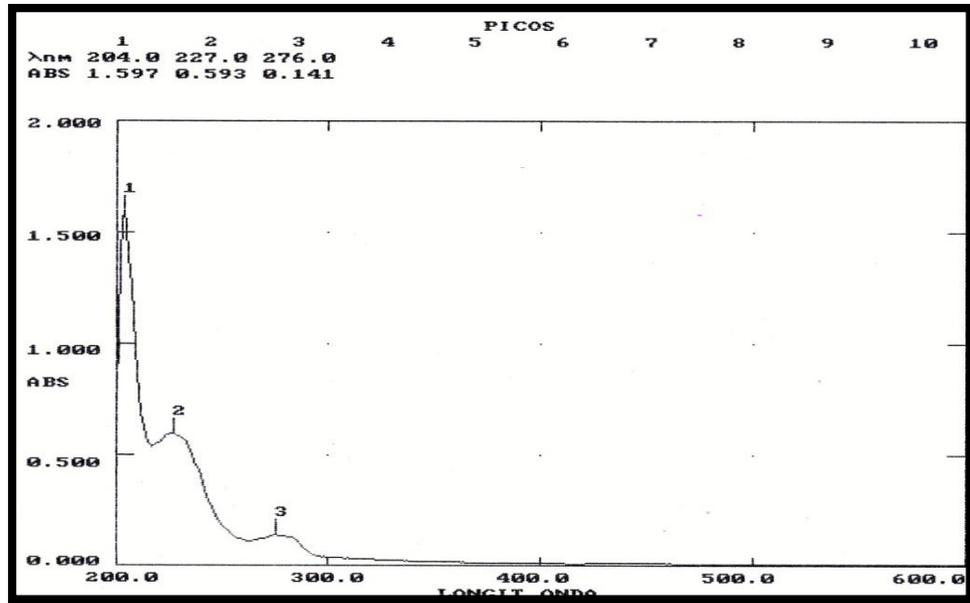
TAMIZAJE FITOQUIMICO REALIZADO AL EXTRACTO ETANÓLICO LABORATORIO DE FITOQUÍMICA.FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH OCTUBRE 2012

ANEXO N°2 ESPECTROFOTOMETRIA UV

Espectros del Sub extracto etéreo



Espectros del sub extracto butanólico



Espectros del extracto etanólico

