



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**"IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN LOS
EXTRACTOS ETANÓLICOS DE (*Tagetes* sp), (*Tagetes multiflora*) Y (*Tagetes
zipaquirensis*) POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS"**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR

KAREN CRISTINA SOLORIZANO ALVARADO

RIOBAMBA – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

A Dios por ser el eje primordial, quien me guía y me da fuerzas para conseguir cada sueño en mi vida porque con su fe y su amor me mantiene viva hasta alcanzar cada uno de mis metas.

A mi madre quien es mi orgullo un ejemplo de lucha y perseverancia porque gracias a su amor y paciencia me ha hecho una hija de bien, enseñándome con valores y principios el verdadero sentido de la vida quien con valentía y tenacidad a dirigido mi camino sin rendirse.

A mi Padre, mi ídolo un pilar fundamental en mi formación académica quien me enseñó a nunca rendirme y alcanzar cada uno de mis propósitos apoyándome en cada paso que doy entregándome todo su amor y cariño incondicional.

A mis hermanos (Johanna y Jesús) quienes son mi motivación para seguir adelante, los adoro con todo mi corazón.

A mi precioso Erick la luz de mis ojos que en cada sonrisa me impulsa a alcanzar cada uno de mis sueños.

AGRADECIMIENTO

A Dios, y a mis padres quienes me guiaron por el camino del bien, un agradecimiento incansable por la confianza depositada en mí, por el amor, el esfuerzo y los valores que me inculcaron; sirviéndome de orientación para que mis metas se vean realizadas.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme las puertas de su institución y brindarme sus conocimientos en cada una de sus cátedras.

A mi hermosa Escuela de Bioquímica y Farmacia quien me enseñó con tenacidad y esfuerzo hacer una mujer fuerte, luchadora y a nunca rendirme aun en los momentos de soledad.

Al Dr. Segundo Trujillo y Dr. Carlos Pilamunga por su valiosa y desinteresada colaboración en la dirección y asesoramiento de la presente tesis.

A todas aquellas personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo investigativo.

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

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: "**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE (*Tagetes sp*), (*Tagetes multiflora*) Y (*Tagetes zipaquirensis*) POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**", de responsabilidad de la señorita egresada Karen Cristina Solorzano Alvarado, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. César Ávalos DECANO FAC. CIENCIAS	_____	_____
Dra. Ana Albuja DIRECTORA DE ESCUELA	_____	_____
Dr. Segundo Trujillo DIRECTOR DE TESIS	_____	_____
Dr. Carlos Pilamunga MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Dra. Elizabeth Escudero MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
COORDINADOR ENCARGADO DE SISTEMA DE BIBLIOTECA	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

Yo, **Karen Cristina Solorzano Alvarado**, 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

(KAREN CRISTINA SOLORZANO ALVARADO)

RESUMEN

Se investigó la identificación y cuantificación de los flavonoides en los extractos etanólicos de (*Tagetes* sp), (*Tagetes multiflora*) y (*Tagetes zipaquirensis*) por métodos cromatográficos, realizado en el Laboratorio de HPLC e Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, con la finalidad de crear insecticidas naturales que beneficien a las plantas y mejoren la calidad de las mismas. Se realizó la identificación taxonómica, el control de calidad de los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* como vegetales crudos y de los extractos etanólicos, las pruebas físico – químicas, aplicando metodologías cualitativas como el Tamizaje Fitoquímico y la Cromatografía de Capa Fina, observándose la presencia de tres Rf en los *Tagetes* sp pertenecientes a los flavonoides isoramnetina glucósidos con un Rf 0.50 y la quercetina Rf 0.60 y 0.68, en los *Tagetes multiflora* flavonoides de tipo isoramnetina glucósidos con Rf 0.13, 0.20, 0.25, 0.35 y la Rutina con el Rf 0.58 y para los *Tagetes zipaquirensis* flavonoides de tipo rutina con un Rf 0.51, ácido cloragénico con un Rf 0.64 y el ácido fenólico Rf 0.74, para la cuantificación se aplicaron la técnicas modernas espectrofotométrica dando como resultado en *Tagetes* sp con 11.03 ppm, *Tagetes multiflora* 17.36 ppm y *Tagetes zipaquirensis* 4.81 ppm y la cromatografía líquida de alta resolución HPLC utilizando como fase móvil Etanol-Acetonitrilo (75:25v/v) y arrojando concentraciones puras en los *Tagetes* sp con 31.04 ppm, *Tagetes multiflora* con 136.94 ppm y en *Tagetes zipaquirensis* con 3.21 ppm. Se concluye que el mejor método de cuantificación para los flavonoides en el extracto etanólico de fase móvil Etanol-Acetonitrilo *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* es el HPLC permitiendo obtener concentraciones altas de principio activo. Se recomienda elaborar un fitofármaco aplicado en el campo industrial como productos agroquímicos, por su alto contenido de flavonoides y por la actividad insecticidas que se han investigado.



SUMMARY

Flavonoid identification and quantification was investigated in the ethanol extracts of (*Tagetes* sp), (*Tagetes multiflora*) and (*zipaquirensis Tagetes*) by chromatographic methods, conducted in the Laboratory of HPLC (high resolution liquid chromatography) and instrumental in the Sciences Faculty at the Polytechnic School of Chimborazo in order to create natural insecticides which benefit to the plants and improve the quality of them. Taxonomic identification, *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* and *zipaquirensis Tagetes* quality control was performed as crude vegetables, and from the ethanol extracts physicochemical tests, applying qualitative methodologies such as phytochemical screening and thin layer chromatography, observing three factors retention in *Tagetes* sp, belonging to the isorhamnetine flavonoid, glycosides with 0.50 Rf and quercetin 0.60 and 0.68 Rf, in *Tagetes multiflora* flavonoids type isorhamnetine glycosides with 0.13, 0.20, 0.25, 0.35 Rf, the stand with 0.58 Rf and *zipaquirensis Tagetes* flavonoids with 0.51Rf, chlorogenic acid with 0.64 Rf and phenolic acid with 0.74 Rf, for quantification was applied spectrophotometric new technique getting as result in *Tagetes* sp 11.03 ppm, *Tagetes multiflora* 17.36 ppm and 4.81 ppm in *Tagetes zipaquirensis* and the high resolution liquid chromatography HPLC using ethanol-acetonitrile 75:25 (v/v) and spewing pure concentrations in *Tagetes* sp with 31.04 ppm, *Tagetes multiflora* with 136.94 ppm and *zipaquirensis Tagetes* with 3.21 ppm. It concluded that the best method of flavonoids quantitation in the ethanol extract of *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* and *zipaquirensis Tagetes* ethanol-acetonitrile mobile phase is the high-resolution liquid chromatography allowing to obtain high concentrations of active substances. It recommended to develop a hytopharmaceutical applied in the industrial field as agrochemicals products, for its high content of flavonoids and the insecticidal activity that have been investigated.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO	-1-
1.1. Descripción botánica	-1-
1.1.1. Familia asteraceae	-1-
1.1.2. Origen y distribución geográfica.....	-1-
1.1.3. Descripción botánica.....	- 2 -
1.1.4. Composición química de la familia asteraceae	- 2 -
1.1.5. Especies pertenecientes a la familia asteraceae	- 3 -
1.1.6. Usos de las asteraceae.....	- 4 -
1.2. Género tagetes	- 4 -
1.2.1 <i>Tagetes</i> sp	- 5 -
1.2.2. <i>Tagetes multiflora</i>	- 7 -
1.3. Flavonoides	- 11 -
1.3.1. Definición.....	- 11 -
1.3.2. Datos históricos.....	- 11 -
1.3.3. Estructura química	- 12 -

1.3.4. Características generales	- 12 -
1.3.5. Propiedades de los flavonoides	- 13 -
1.3.6. Nomenclatura	- 13 -
1.3.7. Funciones de los flavonoides en las plantas.....	- 14 -
1.3.8. Biosíntesis de metabolitos secundarios de origen vegetal	- 14 -
1.3.9. Clasificación de los flavonoides	- 15 -
1.4. Recolección, conservación limpieza y desinfección del vegetal.....	- 16 -
1.4.1. Muestreo.....	- 16 -
1.4.2. Recolección.....	- 17 -
1.4.3. Comprobación taxonómica e identificación botánica	- 17 -
1.4.4. Conservación.....	- 17 -
1.4.5. Limpieza y desinfección	- 18 -
1.4.6. Maceración.....	- 18 -
1.4.7. Extracción	- 19 -
1.5. Propiedades físico – químicas del extracto	- 19 -
1.5.1. Control de calidad	- 20 -
1.6. Tamizaje fitoquímico	- 20 -
1.7. Análisis espectrofotométrico.....	- 21 -
1.7.1. Espectrometría	- 21 -
1.7.2. Espectrometría ultravioleta – visible.....	- 22 -
1.8. Cromatografía.....	- 25 -
1.8.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	- 26 -
1.8.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	- 30 -
1.8.3. Parámetros cromatográficos.....	- 35 -

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL	- 37 -
2.1. Lugar de investigación.....	- 37 -
2.2. Recursos materiales	- 37 -
2.2.1. Materia prima.....	- 37 -
2.2.2. Equipos	- 38 -
2.2.3. Materiales de laboratorio	38
2.2.4. Reactivos.....	- 39 -
2.3. Factores de estudio.....	- 40 -
2.4. Unidad experimental o de análisis	- 40 -
2.5. Metodología.....	- 40 -
2.5.1. Muestreo y recolección.....	- 40 -
2.5.2. Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	- 41 -
2.5.3. Maceración.....	- 41 -
2.5.4. Extracción	- 42 -
2.6. Determinación de las propiedades físicas - químicas de los extractos	- 42 -
2.6.1. Características organolépticas.....	- 42 -
2.6.2. Propiedades físicas.....	- 43 -
2.7. Control de calidad del vegetal	- 47 -
2.7.1. Determinación del contenido de humedad.....	- 47 -
2.7.2. Determinación de cenizas totales.....	- 48 -
2.7.3. Determinación de cenizas solubles en agua.....	- 49 -
2.7.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	- 50 -
2.8. Tamizaje fitoquímico	- 50 -
2.9. Análisis espectrofotométrico.....	- 51 -

2.10. Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (CCF)	- 52 -
2.11. Análisis cuantitativo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	- 54 -
2.11.1. Preparación del estándar de flavonoides (RUTINA)	- 54 -
2.11.2. Preparación de la fase móvil (etanol – acetonitrilo)	- 55 -
2.11.3. Preparación del principio activo (flavonoides)	- 55 -

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 57 -
3.1. Control de calidad de la droga	- 57 -
3.1.1. Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	- 57 -
3.1.2. Muestreo, recolección, conservación, limpieza y desinfección.....	- 58 -
3.2. Maceración y obtención de los extractos	- 58 -
3.3. Análisis físicos químicos	- 60 -
3.3.1. Control de calidad de los extractos	- 60 -
3.3.2. Control de calidad de las drogas crudas.....	- 61 -
3.4. Tamizaje fitoquímico.....	- 63 -
3.5. Análisis espectrofotométrico.....	- 67 -
3.5.1. Cuantificación de la rutina.....	- 67 -
3.5.2. Cuantificación de los flavonoides en los tagetes	- 68 -
3.6. Análisis cromatográfico.....	- 70 -
3.6.1. Identificación cualitativa de flavonoides por cromatografía en capa fina (CCF) -	70 -
3.7. Análisis cuantitativo de flavonoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	- 73 -

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES	- 74 -
------------------------------	---------------

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES - 76 -

BIBLIOGRAFÍA - 76 -

CAPÍTULO VI

6. ANEXOS..... - 86 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

msms	Metros sobre el nivel del mar
cm	Centímetros
m	Metros
sp	Especie
mm	Milímetros
UV	Ultravioleta
REM	Radiación electromagnética
NRSP	Norma ramal de salud pública
CCF	Cromatografía de capa fina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
THF	Tetrahidrofurano
MeCN	Acetonitrilo
ml	Mililitros
tR	Tiempo de retención
k	Factor de capacidad
t_M	Tiempo muerto
°C	Grados centígrados
PUCE	Pontificia Universidad Católica del Ecuador
g	Gramos
min	Minutos
h	Horas
mg	Miligramos
µm	Micrómetros
%	Porcentaje
v/v	Volumen sobre volumen
Rf	Factor de retención
ppm	Partes por millón
PKS	Policétido sintasa
PAM	Plantas Aromáticas medicinales
λ	Longitud de onda
nm	Nanómetros
Ce(SO₄)₂	Sulfato de cerio
µg	Microgramos
M	Molar
µl	Microlitros
g/ml	Gramos sobre mililitro

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Comprobación taxonómica e identificación de <i>Tagetes</i>	57
CUADRO No. 2	Muestreo, recolección, conservación, limpieza y descontaminación de los <i>Tagetes</i>	58
CUADRO No. 3	Rendimiento del extracto etanólico de los <i>Tagetes</i>	59
CUADRO No. 4	Control de calidad del extracto etanólico de <i>Tagetes</i> sp, <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	60
CUADRO No. 5	Control de calidad de las drogas crudas <i>Tagetes</i> sp, <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	62
CUADRO No. 6	Tamizaje Fitoquímico de los metabolitos secundarios de los <i>Tagetes</i> sp, <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	64
CUADRO No. 7	Resultados de absorbancia de la rutina de diluciones a diferentes concentraciones.....	67
CUADRO No. 8	Ecuación de la recta obtenida para la curva de calibración del estándar de rutina para la determinación del contenido de flavonoides totales.....	68
CUADRO No. 9	Cuantificación de flavonoides totales de <i>Tagetes</i> sp, <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i> a una la longitud de onda de 410 nm.....	69
CUADRO No. 10	Cuantificación de flavonoides por método HPLC.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Rangos de las regiones del espectro ultravioleta – visible.....	23
TABLA No. 2	Vegetal elegido, sustancia a identificarse.....	40
TABLA No. 3	Esquema para el análisis de flavonoides en capa fina.....	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Morfología de las flores de las Asteraceae.....	2
GRÁFICO No. 2	Componentes químicos de la familia Asteraceae.....	3
GRÁFICO No. 3	Vista espacial de Tagetes.....	5
GRÁFICO No. 4	Estructura básica de los flavonoides.....	12
GRÁFICO No. 5	Biosíntesis de metabolitos secundarios de origen vegetal.....	15
GRÁFICO No. 6	Tipos de flavonoides.....	16
GRÁFICO No. 7	Componentes del espectrofotómetro UV-Visible.....	24
GRÁFICO No. 8	Clasificación de los Métodos Cromatográficos.....	26
GRÁFICO No. 9	Cromatografía en capa fina.....	27
GRÁFICO No. 10	Esquema de un equipo de HPLC.....	31
GRÁFICO No. 11	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.....	51
GRÁFICO No. 12	Curva de calibración del estándar rutina.....	68

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	<i>Tagetes sp.</i>	6
FOTOGRAFÍA No. 2	<i>Tagetes multiflora</i>	8
FOTOGRAFÍA No. 3	<i>Tagetes zipaquirensis</i>	9
FOTOGRAFÍA No. 4	Espectrofotómetro.....	24
FOTOGRAFÍA No. 5	Equipo de HPLC.....	30
FOTOGRAFÍA No. 6	Extracción alcohólica.....	42
FOTOGRAFÍA No. 7	Perfil cromatográfico se aprecian manchas de tres compuestos flavonoides del extracto etanólico de los <i>Tagetes sp.</i>	70
FOTOGRAFÍA No. 8	Perfil cromatográfico se aprecian manchas de seis compuestos de flavonoides del extracto etanólico de los <i>Tagetes multiflora</i>	71
FOTOGRAFÍA No. 9	Perfil cromatográfico se aprecian manchas de tres compuestos de flavonoides del extracto etanólico de los <i>Tagetes zipaquirensis</i>	72
FOTOGRAFÍA No. 10	Muestras de los <i>Tagetes</i> conservadas para su identificación taxonómica.....	87
FOTOGRAFÍA No. 11	Concentración de los extractos etanólicos de los <i>Tagetes sp</i> , <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	87
FOTOGRAFÍA No. 12	Requisitos organolépticos de los <i>Tagetes sp</i> , <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	88
FOTOGRAFÍA No. 13	Propiedades físico-químicas de los <i>Tagetes sp</i> , <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	88
FOTOGRAFÍA No. 14	Determinación de sólidos totales de los <i>Tagetes sp</i> , <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	89
FOTOGRAFÍA No. 15	Determinación de humedad de los <i>Tagetes sp</i> , <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	89
FOTOGRAFÍA No. 16	Determinación de cenizas totales de los <i>Tagetes sp</i> , <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	90
FOTOGRAFÍA No. 17	Determinación de cenizas solubles en agua de los <i>Tagetes sp</i> , <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i> ...	90
FOTOGRAFÍA No. 18	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico de los <i>Tagetes sp</i> , <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	91
FOTOGRAFÍA No. 19	Ensayo de espuma.....	91
FOTOGRAFÍA No. 20	Ensayo de resina.....	91
FOTOGRAFÍA No. 21	Ensayo de Shidona.....	92
FOTOGRAFÍA No. 22	Ensayo de Borntrager.....	92
FOTOGRAFÍA No. 23	Ensayo de Rosenthaler.....	92
FOTOGRAFÍA No. 24	Ensayo de Sudan.....	92
FOTOGRAFÍA No. 25	Ensayo de Catequinas.....	93
FOTOGRAFÍA No. 26	Ensayo de Baljet.....	93

FOTOGRAFÍA No. 27	Ensayo de Lieberman-buchard.....	93
FOTOGRAFÍA No. 28	Ensayo de Antocianas.....	93
FOTOGRAFÍA No. 29	Ensayo de Fehling.....	94
FOTOGRAFÍA No. 30	Ensayo de Dragendorff.....	94
FOTOGRAFÍA No. 31	Ensayo de Wagner.....	94
FOTOGRAFÍA No. 32	Ensayo de Mayer.....	95
FOTOGRAFÍA No. 33	Ensayo de Cloruro férrico.....	95
FOTOGRAFÍA No. 34	Ensayo de Catequinas.....	95
FOTOGRAFÍA No. 35	Cuantificación de flavonoides.....	96
FOTOGRAFÍA No. 36	Reactivos utilizados para la cuantificación de flavonoides.....	96
FOTOGRAFÍA No. 37	Cromatografía de capa fina de los <i>Tagetes sp</i> , <i>Tagetes multiflora</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	97
FOTOGRAFÍA No. 38	Revelado de las cromatografías con sulfato cerio.....	98
FOTOGRAFÍA No. 39	Identificación de Rf método de cromatografía en capa fina (TLC).....	98
FOTOGRAFÍA No. 40	Preparación de reactivos para la cuantificación de flavonoides.....	99
FOTOGRAFÍA No. 41	Filtrado de las muestras.....	99
FOTOGRAFÍA No. 42	Cromatograma del estándar rutina a 50 ppm.....	100
FOTOGRAFÍA No. 43	Cromatograma de <i>Tagetes sp</i> 10 ppm.....	101
FOTOGRAFÍA No. 44	Cromatograma de <i>Tagetes zipaquirensis</i> 10 ppm.....	101
FOTOGRAFÍA No. 45	Cromatograma de <i>Tagetes multiflora</i> 10 ppm.....	102

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Identificación taxonómica de los Tagetes.....	86
ANEXO No. 2	Muestreo y recolección de la materia prima.....	87
ANEXO No. 3	Maceración de los Tagetes.....	87
ANEXO No. 4	Determinación de los parámetros físico químico de los extractos etanólicos.....	88
ANEXO No. 5	Control de calidad de la materia prima.....	89
ANEXO No. 6	Tamizaje Fitoquímico de los extractos etanólicos.....	91
ANEXO No. 7	Análisis espectrofotométrico.....	96
ANEXO No. 8	Cromatografía en capa fina.....	97
ANEXO No. 9	Análisis cuantitativo de los extractos en el HPLC.....	99

INTRODUCCIÓN

Los flavonoides se encuentran en la naturaleza en forma de glucósidos, existiendo numerosas variedades caracterizado por una estructura química básica de dos anillos aromáticos, como pigmento son los causantes de los colores atractivos de flores y frutos. Brindan un papel fundamental en el metabolismo de las plantas, desempeñan un control minucioso en el desarrollo y protección de los rayos X y trabajan como excelente repelentes por presentar un sabor característico amargo. (CENTRO DE CONOCIMIENTO TEÓRICO, 2010)

El texto de Taxonomía de las especies habitadas en el Ecuador revela que en nuestro país se han patentado 217 géneros con 918 especies de las cuales son endémicas 360, entre las que destacan Asteraceae, Eupatorium s.l., Senecio y Helichrysum. La Asteraceae Bercht.& J.Presl es una familia que se encuentra a 2.750 msnm; está situada en los páramos de la serranía ecuatoriana.

Asteraceae es la familia más relevante en cuanto a plantas con flores biodiversas se encuentran en el mundo. La variedad de géneros que esta familia presenta ha permitido analizar diferentes cambios fitoquímicos e investigar nuevos mecanismos defensivos. Esta familia se caracteriza por la presencia de flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales (con predominio de terpenoides), alcaloides (especialmente pirrolizidínicos) y diversos derivados acetilénicos. (FRANCO J, 2003)

El propósito de esta propuesta investigativa es comprobar si existe flavonoides en las tres especies de *Tagetes* de la familia Asteraceae como se establece en diferentes bibliografías la presencia significativa de isoflavonoides mediante métodos espectrofotométricos, cromatográficos y técnicas de coloración.

Se efectuó la identificación y cuantificación de flavonoides en los extractos etanólicos de *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* con el objetivo de determinar cuál de las tres especies presentan mayor concentración de Flavonoides, compararlos entre ellos y determinar cuál método es el más apropiado para su cuantificación. Se desarrolló el tamizaje fitoquímico afirmando que las tres especies presenta grupos flavonólicos en su composición química, se realizó el control de calidad tanto del extracto como de la materia prima con la finalidad de asegurar la validez y la eficacia del compuesto investigado; demostrando que los *Tagetes* sp presenta un 53% de rendimiento, además de realizar el estudio cualitativo de los flavonoides por cromatografía de capa fina exponiendo que el *Tagetes zipaquirensis* es el que más eficacia, eficiencia y resolución el cual presenta como compuestos a la rutina Rf 0.51, ácido clorangénico con Rf 0.64 y ácido fenólico con un Rf 0.74 y el análisis cuantitativo mediante métodos cromatográficos (HPLC) el cual determinó que los *Tagetes multiflora* con 136.94 ppm presenta la mayor concentración de flavonoides.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

1.1.1. FAMILIA ASTERACEAE

La familia de Asteraceae comprende cerca de 23.500 a 32.000 especies, repartidas en unos 1.600 géneros, clasificada en 5 subfamilias y 19 tribus. Pertenece a la familia de las angiospermas caracterizada por la inflorescencia compuesta que presentan sus flores.

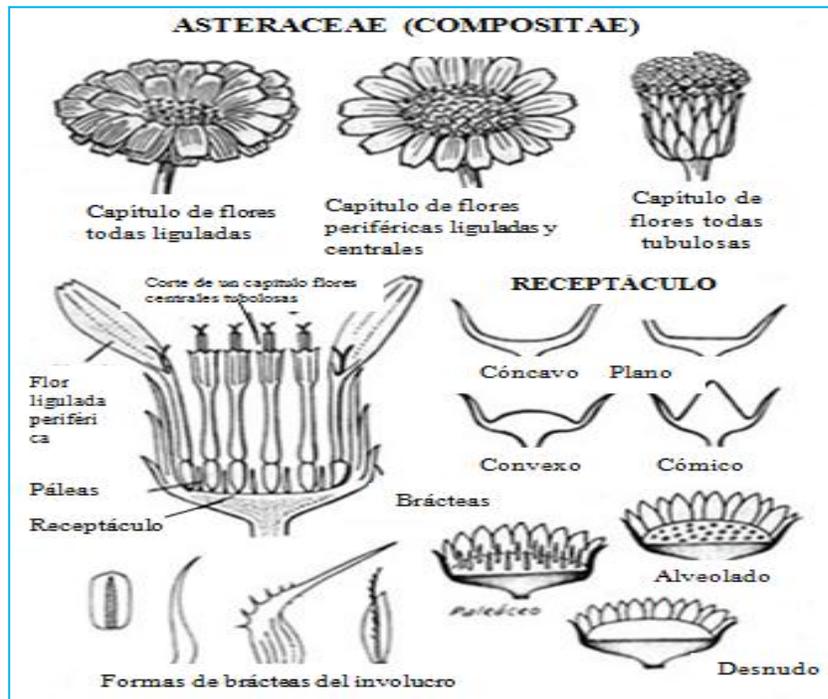
El palabra Aster se deriva del expresión latina “aster” que significa “estrella” que describe a las diferentes formas de inflorescencias. La mayor parte de las Asteraceae tienen cualidades entomófilas aportando con néctar y polen para los insectos. (CALLE, S. 2001)

1.1.2. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La familia de las Asteraceae se distribuye abundantemente a nivel mundial especialmente en zonas semiáridas, tropicales y subtropicales llegando a ocupar el 10% de la flora nativa del mundo especialmente en Rusia, Estados Unidos y América del Sur, logrando sobrevivir a tiempo de sequías. (CASTRO, A. 2012)

1.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Las Asteraceae son plantas leñosas o herbáceas que alcanzan los 60 cm hasta los 2 metros de altura, sus raíces presentan una profundidad de 30 cm. De hojas simples contrapuestas y alternadas bipinnadas de forma dentada o lobada, con flores de tamaño pequeño regulares o irregulares; presenta de capítulos homógamos y heterógamos con inflorescencias, sus sépalos tienen forma de pelos, su androceo presenta 5 estambres formado por un tubo por el cual circula el estilo con filamentos libres. Su gineceo exhibe dos carpelos que forma un ovario que finaliza en su estigma hondamente bífido. (ARIZA, L. 2005)

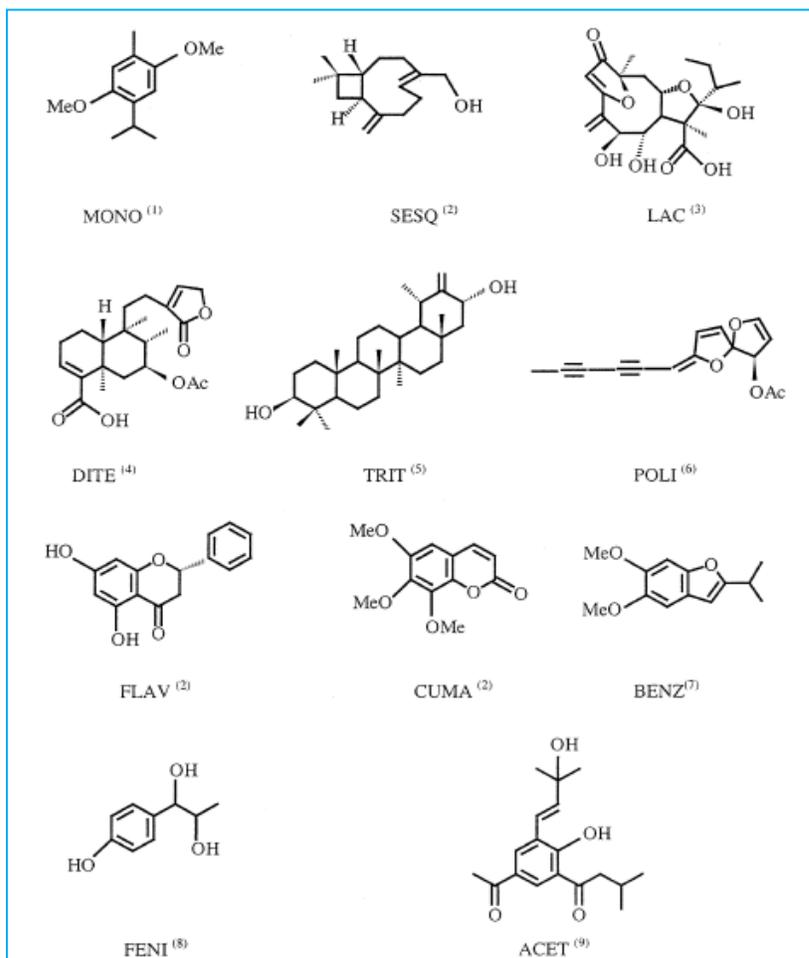


FUENTE: <http://www.chlorischile.cl/cursoonline/guia15/CMPflor.jpg>
GRÁFICO No. 1. MORFOLOGÍA DE LAS FLORES DE LAS ASTERACEAE

1.1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FAMILIA ASTERACEAE

La composición química de la familia Asteraceae presenta compuestos polifenólicos (flavonoides y taninos) flavonoides como apigenina, quercetina, silibina, rutina y

luteolina, cumarinas, saponinas en ciertas familias , monoterpenos como el piquerol y acetato de carquejilo, sesquiterpenos como partenólidos, sesquiterpenos lactonas, diterpenos, triterpenos ,benzofuranos, poliacetilenos aceites esenciales como bisabolol, α -terpineno *o* -cimeno *p* -cimeno limoneno y 1,8-cineol (ESCOBAR, P. 2013)



FUENTE: http://bvs.sld.cu/revistas/Fla/vol10_esp_05/f0610303405.gif

GRÁFICO No. 2. COMPONENTES QUÍMICOS DE LA FAMILIA ASTERACEAE

1.1.5. ESPECIES PERTENECIENTES A LA FAMILIA ASTERACEAE

Barnadesia spinosa L.f., *Baccharis macracantha* Kunth., *Chuquiraga jussieui* J.F.Gmel, *Monticalia vacciniodes* (Kunth) C. Jeffrey, *Smallanthus somchifolius* (Poepp) H.Rob, *Critioniopsis sodiroi* (Hieron) H.Rob, *Verbesina arborea* Kunth, *Verbesina latisquama*

S.F.Blake *Gynoxys buxifolia* (Kunth) Cass, *Gynoxys acostae* Cuatrec, *Werneria nubiegena* Kunth, *Llerasia hypoleuca* (Turcz) Cuatrec, *Dorobea pimpiellifolia* (Kunth) B.Nord, *Diplostephium hartwegii* Hieron, *Hypochaeris sessiliflora* Kunth, *Espeletia pycnophylla* Cuatrec, *T lacera* Brandegge, *T filifolia* Lag., *T. erecta* Linn., *T. lucida* Cav., *T. coronopifolia* Willd., *T. subulata* Cerv., *T. lunulata* Ortega, *T. tenuifolia* Cav., *T. parryi* A. Gray, *T. pringlei* S. Wats., *T. minuta* Linn., *T. triradiata* Greenm., *T. hartwegii* Greenm., *T. palmeri* A. Gray, *T. stenophylla* B. L. Rob., *T. linifolia* Seaton, *T. terniflora* H. B. & K., *T. lemmonii* A. Gray y *T. persicaefolius* Benth. (NATURAL RESOURCE CONSERVATION SERVICE, 2000)

1.1.6. USOS DE LAS ASTERACEAE

Se conoce que las plantas pertenecientes a la familia de las Asteraceae tienen una gran aceptación al néctar de las abejas por el 50% de azúcares que presentan. Además presenta propiedades insecticidas aprovechadas especialmente en la Sierra y Amazonía, con el fin de liquidar a las plagas de los cultivos e insectos y sirve de forraje para la producción ganadera. Los metabolitos secundarios de las Asteraceae son utilizados especialmente a nivel industrial y farmacéutico.

1.2. GÉNERO TAGETES

El género *Tagetes* perteneciente a la familia de las Asteraceae exhibe 50 especies de arbustos perennes por año, distribuidas muy ampliamente por toda América de las cuales 24 de ellas se encuentran en territorio ecuatoriano.

Estas plantas herbáceas son utilizadas con frecuencia para la decoración de jardines especialmente de sagrarios y tumbas por lo que se lo conoce a este género como “Flor de muerto”, presentan hojas lanceoladas e incididas, sus flores muestran inflorescencias en su corola con olor desagradable varía en sus colores desde amarillas hasta naranjas como se representa a través del gráfico No. 3.



FUENTE:http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e0/Gc31_tagetes_erecta_and_patula.jpg/257px/Gc31_tagetes_erecta_and_patula.jpg

GRÁFICO No. 3. VISTA ESPACIAL DE TAGETES

Diferentes especies de *Tagetes* presentan aspectos biológicos actuando frente a organismos como: bacterias, nematodos, hongos, virus, insectos, ácaros comprendiendo incluso otras variedades de plantas. (MONTES, R y otros. 2011)

Otras de las propiedades que presentan los *Tagetes* es la actividad antifúngica destacándose los *Tagetes erecta*, *Tagetes filifolia* y los *Tagetes patula* todos con acción inhibitoria contra los hongos.

1.2.1 *Tagetes* sp

Los *Tagetes* sp son nativos del Ecuador, estados de México, Nicaragua, Perú, Panamá en general gran parte de América donde es un género que se desarrolla en espacios descubiertos de bosques preferentemente en climas cálidos, crecen en cualquier tipo de suelo y de mejor forma si presentan buen drenaje, pueden tener hasta 2 m de altura según la especie, son plantas herbáceas o perennes pertenecientes a la familia Asteraceae. (AGUIRRE, R. 2008)

Como se observa en la fotografía No. 1.



FOTOGRAFIA No. 1. *Tagetes* sp

1.2.1.1. Clasificación Científica de *Tagetes* sp

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Clase:	Equisetopsida C.Agardh
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht
Superorden:	Asteranae Takht
Orden:	Asterales Link
Familia:	Asteraceae Bercht.& J.Presl
Género:	<i>Tagetes</i> L.
Especie:	Sp

1.2.1.2. Descripción Botánica

Las especies de *Tagetes* sp su tamaño difiere desde 90 cm hasta los 2 m de altura. Presentan hojas piñadas de color verde. Presencia de flores amarillo, naranjas, oro, blanco y en ocasiones con reflejos brillantes. Su corona floral es de 0.1 a 4 y 6 cm de diámetro en su mayoría los floretes de disco y de rayo. Tienden a ser utilizados en horticultura como especies anuales plantadas sin embargo las especies perennes han ganado popularidad. (DEL VITTO, L y otros. 2011)

1.2.1.3. Componentes Fitoquímicos

Los *Tagetes* sp en su mayoría contienen aceite esencial como monoterpenos geraniol, limoneno, linalol, mentol, ocimeno, beta-felandreno, dipenteno, alfa y beta-pineno y tagetona y los flavonoides comferitrín, camferol y su ramnósido. Las flores son ricos en carotenoides de los que se han reconocido la luteína, xantofila y cinco ésteres con ácidos grasos de 10, 16 y 18 carbonos; los monoterpenos dipenteno y mentol así como piretrinas y el flavonoide quercetagequina y en sus raíces se han identificado elementos azufrados de tiofenos, bitienilo y tertienilo (VÁSQUEZ, A. 2013)

1.2.1.4. Usos y Propiedades

Los *Tagetes* sp tiene propiedades insecticidas contra los nematodos del suelo plagas e insectos por la presencia de los tiofenos antibacterianos exudados provenientes de las raíces también tiene usos ornamentales por las inflorescencias que presentan sus flores, farmacéuticos e industriales y por el alto contenido de flavonoides es utilizado como colorante y antioxidante.

1.2.2. *Tagetes multiflora*

Los *Tagetes multiflora* son nativos de América del Sur en países como Ecuador, Bolivia, Perú, Cuzco, Arequipa, Chile y Argentina se desarrolla en zonas excesivamente áridas, tierras arcillosas con la afluencia de lluvia aunque pueden sobrevivir a las sequías duran de 6-12 meses consiguiendo medir de 100 a 150 cm de altura. (PROGRAMA NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS, 2014)



FOTOGRAFÍA No. 2. *Tagetes multiflora*

1.2.2.1. Clasificación Científica de *Tagetes multiflora*

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Clase:	Equisetopsida C.Agardh
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht
Superorden:	Asteranae Takht
Orden:	Asterales Link
Familia:	Asteraceae Bercht.& J.Presl
Género:	<i>Tagetes</i> L.
Especie:	<i>multiflora</i> Kunth

1.2.2.2. Descripción Botánica

Arbusto herbáceo anual, su tamaño varía de 100 a 150 cm aunque pueden tener diferente tamaño de acuerdo al país donde se desarrolle. Sus hojas compuestas se disponen alternadamente en un tallo cilíndrico y delgado. Presentan flores dimorfas de colores púrpura, amarillas con inflorescencia y con 9 foliolos sectados en el borde del ápice agudo que involucra 5 filarios unidos brindando aroma muy fuerte pero aromático. (VASQUÉZ, A y otros. 2013)

1.2.2.3. Componentes Fitoquímicos

Tagetes multiflora es un género de plantas herbáceas anuales o perennes en la familia de las (Asteraceae). Entre los aceites esenciales se encuentran Tagetenona, (Z)- β -Ocimeno y la Tagetona. (VILLAGRÁN, C y otros. 2004)

1.2.2.4. Usos y Propiedades

Los *Tagetes multiflora* poseen propiedades digestivas se emplean en malestares de la vesícula y la bilis, dolores estomacales, carminativo (gases), como purgante, parar la hinchazón, ayuda al tacto urinario sobretodo en el mal de orina, uso comestible como condimento en la elaboración de comidas por su sabor picante. (BIBLIOTECA VIRTUAL MEXICANA, 2009)

1.2.3. *Tagetes zipaquirensis*

Los *Tagetes zipaquirensis* o también conocido como Zorillo es originaria de las regiones templadas y montañosas de Sudamérica en países como Ecuador, Perú, Bolivia Chile y Argentina son arbustos herbáceos o perennes se encuentran especialmente en las cordilleras y a cualquier época del año crecen cerca de los bosques y sobreviven a sequías muy fuertes.



FOTOGRAFÍA No. 3. *Tagetes zipaquirensis*

1.2.3.1. Clasificación Científica de *Tagetes zipaquirensis*

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Clase:	Equisetopsida C.Agardh
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht
Superorden:	Asteranae Takht
Orden:	Asterales Link
Familia:	Asteraceae Bercht.& J.Presl
Género:	<i>Tagetes</i> L.
Especie:	<i>zipaquirensis</i> Bonpl.

1.2.3.2. Descripción Botánica

Los *Tagetes zipaquirensis* pertenecen a la familia de las Asteraceae logran hasta 50 cm de altura, sus hojas son pinnadas de color verde, sus flores son axilares de colores anaranjados- amarillos cada cabeza mide de 10 a 15 mm de largo incluyendo a los rayos florales sus tallos están bien ramificados estos junto con las flores derivan olores repugnantes. (CAMACHO, D. 2011)

1.2.3.3. Componentes Fitoquímicos

El aceite esencial contiene dehidrotagetona, β - ocimeno y tagenona. La composición química del aceite varía según las diferentes partes de la planta y de su estado de crecimiento. Como compuestos secundarios, tenemos acíclicos y bicíclicos monoterpenos monocíclicos, sesquiterpenos, flavonoides, tiofenos, y los compuestos aromáticos. (BALDEÓN, X. 2011)

1.2.3.4. Usos y Propiedades

Se le atribuyen propiedades digestivas, en infusión las hojas del Zorrillo es utilizado como fármaco para los dolores menstruales, hepáticas, carminativos, antiinflamatorias, conjuntivitis, se usa también el aceite esencial es utilizado para perfumería y como uso tópico para fracturas o torceduras, sus flores y hojas frescas para aliviar los catarras y bronquitis; como pesticidas por su olor fuerte-picante ahuyentando a las plagas e insectos y en la gastronomía peruana como un condimento para sus comidas.

1.3. FLAVONOIDES

1.3.1. DEFINICIÓN

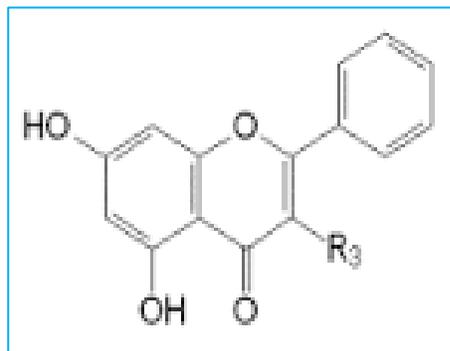
Etimológicamente la palabra flavonoide proviene del latín "flavus", que significa "amarillo". Los Bioflavonoides son los pigmentos no nitrogenados que se presentan en los vegetales tiene la función de proteger al cuerpo de agentes oxidantes, sus flores lucen matices que van desde los amarillos, anaranjados, rojos hasta azules característico en los flavonoides.

1.3.2. DATOS HISTÓRICOS

- Tiene acción antioxidante y es un excelente eliminador de radicales libres.
- Fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930.
- Fue aislado de una cáscara de limón obteniéndose una sustancia llamada citrina.
- Fueron denominados como vitamina P y vitamina C₂ pero dejaron esta dominación en el año 1950. (MARTÍNEZ, A. 2005)

1.3.3. ESTRUCTURA QUÍMICA

Los flavonoides presentan en su estructura química grupos de hidroxilo fenólicos que pueden variar dependiendo de la clase de flavonoide, poseen una actividad antioxidante por su extraordinaria capacidad de formar quelatos con los metales de transición; tienen bajo peso molecular por la presencia de dos anillos de fenilos (A y B) unidos al pirano (anillo C). (HARO, D. 2012)



FUENTE: <http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar33c4.htm>
GRÁFICO No. 4. ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS FLAVONOIDES

1.3.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES

- Son moléculas atóxicas por su acción lenta y son fácilmente tolerables al organismo.
- Se disponen muy ampliamente en el dominio vegetal en forma de glucósidos en las plantas vasculares.
- Está representado por una estructura química benzopirano.
- Son de gran importancia en las actividades de las plantas porque regulan y protegen de los rayos solares, ayudan a la polinización y potencialmente ahuyentadores de insectos.

1.3.5. PROPIEDADES DE LOS FLAVONOIDES

- Tiene propiedades antioxidantes.
- Tienen la capacidad de reaccionar con otros compuestos como anhídrido sulfuroso y los sulfitos.
- Son sólidos cristalinos.
- Forman quelatos con los metales como aluminio, hierro, sodio, potasio y estaño.
- Son pigmentos no nitrogenados de olor fuerte y sabor amargo.
- Presentan fluorescencia al UV, especialmente en las hojas y flores.
- Son ionizables en medio básico por la presencia del fenol en su estructura química.
- Son medianamente solubles en agua esto depende del número de azúcares que presentan su estructura.
- Alto poder de solubilidad en ácidos fuertes, acetona, cloroformo, éter etílico y acetato de etilo.
- Los flavonoles, flavonas, auronas exhiben colores amarillos hasta rojos, en cambio, las antocianinas lucen colores rojos intensos violetas, morados hasta llegar a tonos azulados.

1.3.6. NOMENCLATURA

- La nomenclatura de los flavonoides se describe mediante dos sistemas: el sistemático y el basado en nombres triviales resaltando que este último es el más común para nombrar a los Bioflavonoides.
- De acuerdo a la posición que se encuentra el grupo carbonilo (Ver gráfico No. 4) toma su nominación así por ejemplo:
- Si se encuentra en la posición 4 se denomina flavona.
- Si se encuentra en la posición 3 se denomina dihidroflavonol.
- En ocasiones se suele utilizar el nombre sistemático aumentando la palabra genina por ejemplo: apigenina y apiína. (CARRIÓN, A y otros. 2010)

1.3.7. FUNCIONES DE LOS FLAVONOIDES EN LAS PLANTAS

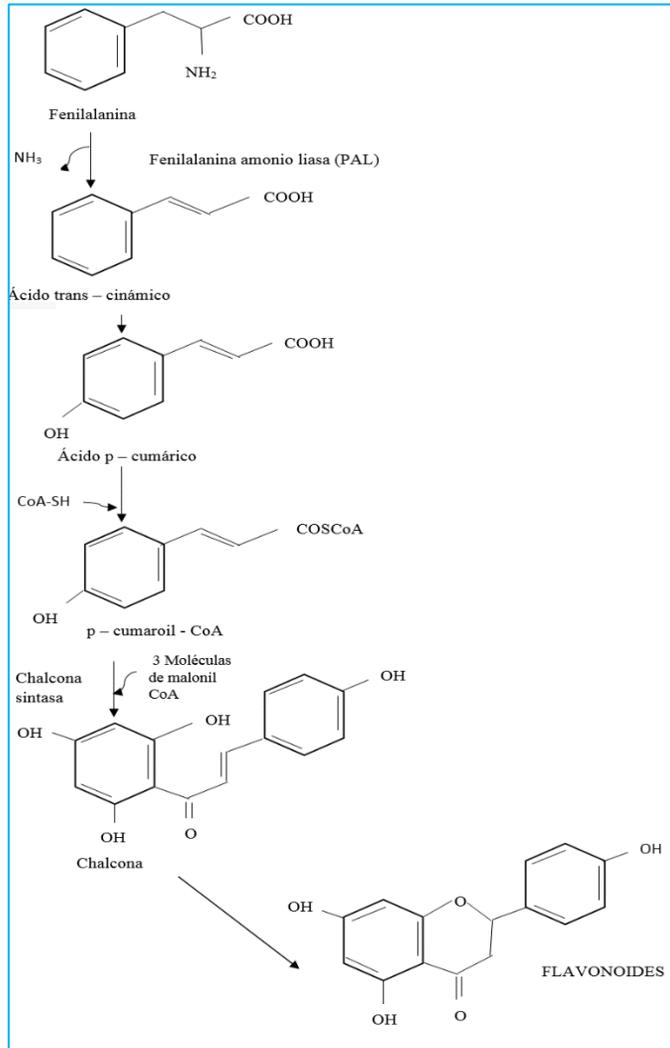
- Debido a su alta pigmentación son ahuyentadores de insectos
- Por la gama de colores vivos que presentan sus flores lo cual ayuda a la polinización.
- Protegen de los rayos UV y regula el crecimiento de la planta.
- Funcionan como mensajeros químicos en el ciclo celular.

1.3.8. BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL

La biosíntesis de los flavonoides se regula mediante dos vías:

- La vía del ácido shikímico que es dependiente de la luz.
- La acción de la fenilalanina.

La biosíntesis de los flavonoides sigue la vía metabólica del fenilpropano, en la que a partir del aminoácido fenilalanina se forma el cumaril-SCoA que, conjugado con el malonil-CoA, crean un grupo de sustancias llamadas chalconas que constituyen el esqueleto para la biosíntesis de todos los flavonoides y antocianos. Esta reacción está catalizada por la enzima chalcona sintasa, que pertenece a la familia de las policétido sintasa (PKS). Esta familia PKS contiene también la olivetol sintasa que es la responsable de la síntesis de los cannabinoides. (SALAZAR, J y otros. 2011)



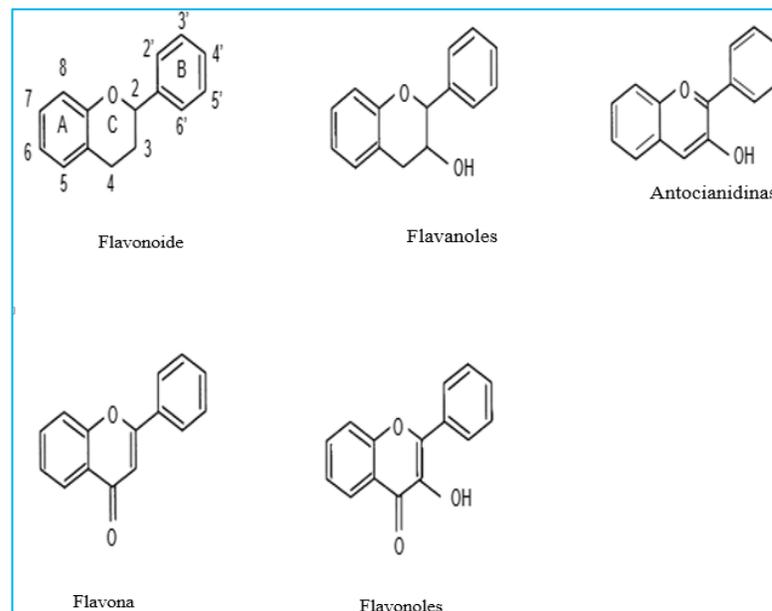
FUENTE: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001>

GRÁFICO No. 5. BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL

1.3.9. CLASIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES

Existen seis subcategorías de flavonoides cada una de ellas con la misma estructura principal: dos anillos aromáticos unidos al anillo pirano. (Ver gráfico No. 4) integra el grupo más grande de los polifenoles junto con los ácidos fenólicos. La clasificación está dada por la posición de los grupos hidroxilos los cuales otorga la actividad. (VALENCIA, C. 2010)

- Antocianidinas
- Flavanoles
- Flavanonas
- Flavonas
- Flavonoles
- Isoflavonas



FUENTE: <http://www.scielo.org.mx/img/revistas/sm/v35n5/a4f2.jpg>

GRÁFICO No. 6. TIPOS DE FLAVONOIDES

1.4. RECOLECCIÓN, CONSERVACIÓN LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL VEGETAL

1.4.1. MUESTREO

El propósito del muestreo es conseguir una proporción representativa del vegetal para el estudio de sus propiedades, composición química. Esto se lo debe realizar en el tiempo de recolección y cuando la planta tenga la mayor cantidad de nutrientes para alcanzar el máximo de sus componentes. (ECO AGRICULTOR, 2012)

1.4.2. RECOLECCIÓN

La recolección de plantas aromáticas y medicinales (PAM) es una práctica que se ha ido extendiendo a nivel mundial ésta debe ser recolectada cuando sus principios activos presenten la máxima cantidad de compuestos; su recolección debe ser en horas de la mañana evitando la presencia de lluvia o niebla el vegetal debe estar con absoluta limpieza de impurezas; evitando amontonarlas porque se disminuiría su valor nutricional o terapéutico. (FRONDA, 2013)

1.4.3. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTANICA

La comprobación taxonómica de una especie vegetal es paso fundamental ya que nos provee con precisión que especies estamos utilizando y por medio de este recibir la designación a que clase taxonómica corresponde es recomendable utilizar la materia prima seca para la identificación de la planta.

1.4.4. CONSERVACIÓN

Existen dos métodos de conservación y esto se realiza a los requerimientos del vegetal

1.4.4.1. Secado

Es un procedimiento que se realiza con el objetivo de eliminar el contenido de agua que presenta el vegetal para impedir que la materia prima se descompongan y pierda sus principios activos. De acuerdo a las sustancias activas a investigar el secado en ocasiones no deben ser a través de los rayos solares como es el caso de los flavonoides debido a que estos compuestos pueden verse afectados significativamente en su color, composición química, generar reacciones termo-degradativas, disminuir su concentración ya que son compuestos altamente susceptibles a los cambios de temperatura y pH. El tiempo de secado debe ser prolongado para evitar la proliferación de bacterias. (BARAJAS, J. 2009)

1.4.4.2. Congelado

Es una técnica muy fácil y rápida de realizar se utiliza con el fin de conservar los vegetales y evitan cualquier tipo de plaga o bacteria que pueda alterar el análisis ya que hay microorganismos o parásitos no resisten a las bajas temperaturas esta mantiene los principios activos y evita pérdida de aceites esenciales de la materia prima.

1.4.5. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Son procedimientos necesarios antes de la extracción de los compuestos activos en el vegetal generalmente el lavado y la desinfección se lo realiza con cloro para impedir la profanación bacteriana que pueden presentarse en los análisis que se van a realizar. Estos procesos se lo realizan después de la selección y recolección de la materia prima con el objetivo de separar las partículas que sean ajenas del vegetal. (PORTAL EDUCATIVO UNAD, 2003)

1.4.6. MACERACIÓN

Es un proceso sólido-líquido donde el material vegetal es extraído con una serie de mezclas solubles afines a los componentes que se desea obtener, es frecuente emplear como fase líquida al agua, pero también se pueden utilizar solventes polares o apolares. (HERBOLARIA, 2005)

La extracción se desarrolla a temperatura ambiente y el tiempo de maceración esta expresado por el prototipo de la droga que se desea investigar; existen dos clases de maceración: en frío y en caliente.

1.4.7. EXTRACCIÓN

Es un proceso donde son separados del vegetal los compuestos activos de los inactivos, luego de ser macerados eliminando parcialmente o completamente el disolvente que se utilizó en la planta el resultado son dos o más componentes: el extracto y el bagazo. (PALACIOS, M. 2012)

1.5. PROPIEDADES FÍSICO – QUÍMICAS DEL EXTRACTO

Se las conoce también como intensivas se utilizan para identificar los componentes que están presentes en el vegetal de las cuales se pueden mencionar.

Requisitos organolépticos

- Color
- Olor
- Sabor
- Apariencia.

Ensayos físico-químicos

- pH de extractos
- Densidad relativa
- Índice de refracción
- Sólidos totales (PEÑA, C. 2010)

1.5.1. CONTROL DE CALIDAD

Es un proceso que se lo realiza con el fin de inspeccionar mediante ensayos, pruebas químicas-físicas la calidad del vegetal comprobando si la planta cumple o no con los límites establecidos por la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) No. 309 del MINSAP. Esta se la debe realizar antes, durante y después del proceso de extracción de un vegetal cuando su principio activo se lo va a utilizar con fines medicinales, alimenticios, cosméticos, etc. (PETENATTI, M. 2013)

Entre los ensayos realizados tenemos:

- Humedad
- Cenizas totales
- Cenizas solubles en agua
- Cenizas insolubles en ácido clorhídrico

1.6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El Tamizaje Fitoquímico establece cualitativamente los grupos químicos existentes en el vegetal con el fin de que estos grupos preponderantes sean aislados y estudiados con mayor interés. Se lo realiza mediante reacciones de coloración o precipitación de acuerdo a las pruebas positivas que se obtengan. Se puede realizar una actividad farmacológica como estudio investigativo. (LOCK, O. 2012)

El análisis cualitativo se ejecuta mediante los siguientes metabolitos secundarios:

METABOLITO	ENSAYO
	Dragendorff
Alcaloides	Mayer Wagner
Triterpenos y esteroides	Lieberman – Buchard
Flavonoides	Shinoda
Fenoles y taninos	Cloruro férrico
Saponinas	Espuma
Azúcar reductores	Felhing
Compuestos Grasos	Sudan III
Quinonas	Borntrager
Cumarinas	Baljet
Flavonoides	Antocianidinas
Catequinas	Catequinas
Resinas	Resinas
Mucilagos	Mucilagos
Principios amargos	Sabor

1.7. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

1.7.1. ESPECTROMETRÍA

La espectrofotometría es una técnica cuantitativa que mide la cantidad de luz absorbida por una muestra en función a la longitud de la onda. En este análisis tanto las moléculas como la cantidad de luz absorbida dependen de la concentración, es un método muy utilizado para reconocer los compuestos presentes de una sustancia química a través de un espectrofotómetro. (TORRES, C. 2006)



FOTOGRAFÍA No. 4. ESPECTROFOTÓMETRO

Un espectrofotómetro es un equipo que presenta un haz de luz de Radiación Electromagnética (REM), este establece la cantidad que se transfiere a través de una longitud de onda específica, las muestras que se analizan poseen un aspecto líquido las cuales serán colocadas en pequeñas celdas. (TÉLLEZ, M. 2008)

Existen varios tipos de espectrofotómetros:

- Absorción Atómica
- De emisión
- Ultravioleta
- Infrarrojo

1.7.2. ESPECTROMETRÍA ULTRAVIOLETA – VISIBLE

La espectrometría ultravioleta – visible se fundamenta en analizar la cantidad de radiación electromagnética absorbida o transmitida en una muestra en función a la cantidad de sustancia empleando la luz en rangos longitudes de onda.

Espectrofotometría visible: Esta técnica es usada para medir muestras coloreadas absorbe la radiación UV-Visible de moléculas orgánicas e inorgánicas (PORTAL INSTRUMENT, 2014)

TABLA No. 1. RANGOS DE LAS REGIONES DEL ESPECTRO ULTRAVIOLETA – VISIBLE

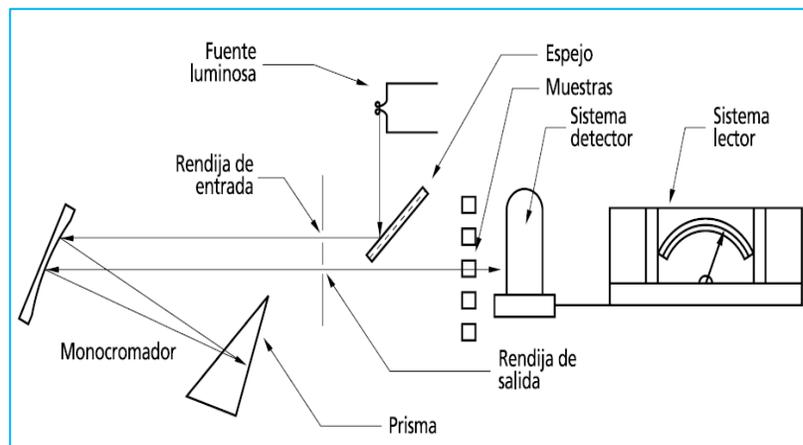
Rango de longitudes de onda(nm)	Color absorbido	Color transmitido (observado)
100-190	Ultravioleta del vacío	Ninguno
190-380	Ultravioleta cercano	Ninguno
380-435	Violeta	Amarillo-Verde
435-480	Azul	Amarillo
480-500	Verde-azul	Naranja-Rojo
500-560	Verde	Púrpura
560-580	Amarillo-Verde	Violeta
580-595	Amarillo	Azul
595-650	Naranja	Verde-Verde
650-780	Rojo	Azul-Verde

Se lo representa mediante un gráfico en donde se visualiza la absorbancia frente a la longitud de onda de luz ultravioleta o visible para lo cual es necesario recurrir a estándares para identificar y cuantificar una muestra. Para cualquier sustancia analizada la longitud de onda se la expresa (λ) máxima y para esto se utiliza las reglas de Woodward-Fieser. (ABRIL, N y otros. 2012)

1.7.2.1. Componentes De Espectrofotómetro Uv-Visible

- Fuente de luz: son lámparas que suministra de energía en forma de luz visible o no visible
 - Lámpara de filamentos de Tungsteno
 - Lámpara de filamentos de haluros de Tungsteno
 - Lámpara de Hidrógeno o Deuterio
 - Lámpara de vapores de mercurio

- Rendija de entrada
- Monocromadores
 - Prismas
 - Redes de difracción
- Rendija de salida
- Cubeta
- Detector
 - Fotocélulas o células fotovoltaicas
 - Fototubos multiplicadores
- Medidor



FUENTE: <http://arturobola.tripod.com/spectro/specuvv.gif>
GRÁFICO No. 7. COMPONENTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VISIBLE

El propósito de la espectrometría ultravioleta – visible es realizar estudios cuantitativos y cualitativos de muestras que se desconoce su composición química, también es un método que permite revelar el grado de contaminación del aire, el agua para determinar residuos presentes en los alimentos y reactivos. (URIBE, R. 2013)

1.7.2.2. Ley de Beer-Lambert

Esta ley es utilizada con frecuencia para determinar cuantitativamente la concentración y absorción de diferentes sustancias por el método de espectrometría UV-Visible. (LEGAZ, E y otros. 2011)

Mediante esta fórmula:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon \cdot c \cdot L$$

dónde: A = es la Absorbancia medida

I = es la intensidad de transmisión

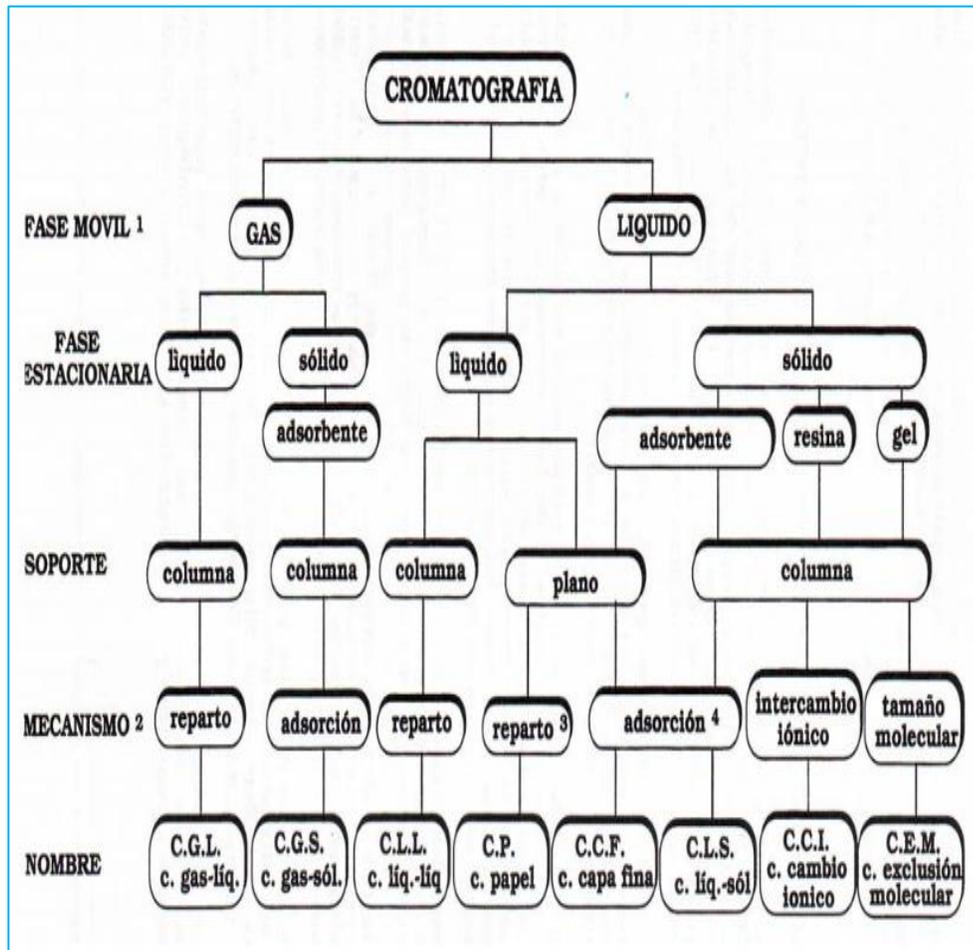
L= la longitud de ruta a través de la muestra

c= la concentración del soluto

ϵ = es una constante conocida como absorptividad molar o coeficiente de extinción.

1.8. CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es un método físico de separación de dos o más componentes de una muestra compartidas entre dos fases (estacionaria, móvil) existen diferentes clases de cromatografías como se detalla en el gráfico No. 8. El análisis cromatográfico se presenta como bandas que pueden ser analizadas cuantitativamente o cualitativamente. (GÓMEZ, R. 2004)



FUENTE: <http://es.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones>

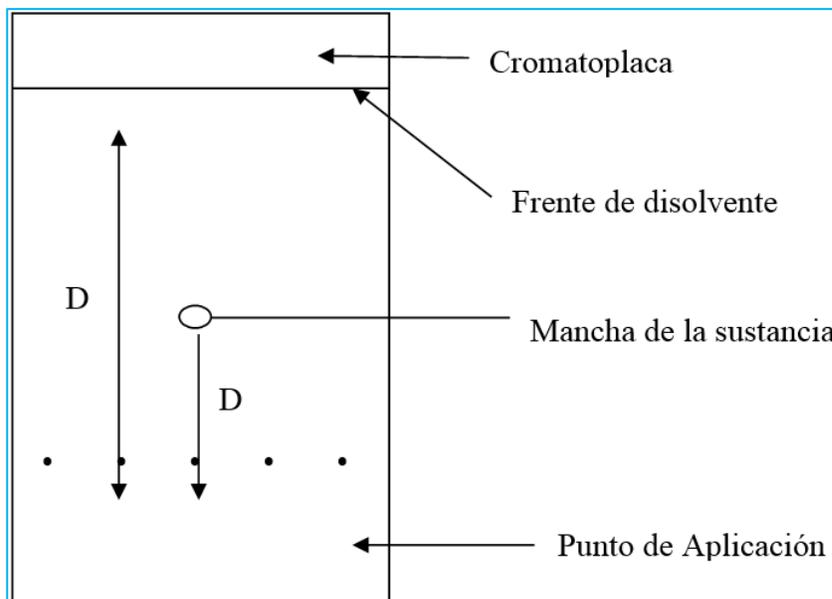
GRÁFICO No. 8. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

1.8.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

La cromatografía de capa fina (CCF) es un método analítico que se aplica para separar los componentes de una sustancia posee una similitud con la cromatografía en papel; a diferencia que esta actúa más rápidamente y da mejores resultados permitiendo reconocer cuantos componentes están presentes en una mezcla. (OZORES, M. 2012)

Consiste en una lámina de vidrio cubierta por un sólido adsorbente (alúmina o sílica gel) al cual se coloca una pequeña proporción de la solución problema, esta placa es sumergida

en una cámara cromatográfica observando los componentes presentes en la mezcla así como la distancia que cada uno de ellos presenta.



FUENTE: http://organica1.org/1311/1311_6.pdf
GRÁFICO No. 9. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

- Los disolventes más frecuentes en la cromatografía capa fina se enlistan a continuación:

Disolvente	Fórmula química	Punto de ebullición (°C)	Constante dieléctrica	Densidad (g/ml)
Disolventes no polares				
Hexano	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	69	2,0	0,655
Benceno	C ₆ H ₆	80	2,3	0,879
Tolueno	C ₆ H ₅ -CH ₃	111	2,4	0,867
Éter dietílico	CH ₃ CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₃	35	4,3	0,713
Cloroformo	CHCl ₃	61	4,8	1,498
Acetato de etilo	CH ₃ -C(=O)-O-CH ₂ -CH ₃	77	6,0	0,894
Disolventes polares apróticos				
1,4-Dioxano	CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ - O	101	2,3	1,033
Tetrahidrofurano (THF)	CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂	66	7,5	0,886
Diclorometano (DCM)	CH ₂ Cl ₂	40	9,1	1,326
Acetona	CH ₃ -C(=O)-CH ₃	56	21	0,786
Acetonitrilo (MeCN)	CH ₃ -C≡N	82	37	0,786
Dimetilformamida (DMF)	HC(=O)N(CH ₃) ₂	153	38	0,944
Dimetil sulfóxido (DMSO)	CH ₃ -S(=O)-CH ₃	189	47	1,092
Disolventes polares próticos				
Ácido acético	CH ₃ -C(=O)OH	118	6,2	1,049
<i>n</i> -Butanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	118	18	0,810
Isopropanol (IPA)	CH ₃ -CH(-OH)-CH ₃	82	18	0,785
<i>n</i> -Propanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -OH	97	20	0,803
Etanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	79	24	0,789
Metanol	CH ₃ -OH	65	33	0,791
Ácido fórmico	H-C(=O)OH	100	58	1,21
Agua	H-O-H	100 °C	82	1,000

1.8.1.1. Reveladores utilizados con mayor frecuencia en CCF

Existen tres maneras para revelar las placas en la cromatografía CCF puede haber la posibilidad de que algunas manchas presenten color pero en el caso de que sean incoloras se debe revelar con:

- Luz UV
- Vapores de Yodo
- Solución de H₂O y H₂SO₄ en proporciones (1:1)

1.8.1.2. Absorbentes más comunes en la CCF

Para poder elegir el absorbente más apropiado es importante considerar: la polaridad, el tamaño de la partícula, el diámetro, el área superficial, la homogeneidad y la pureza.

Los absorbentes más comunes en la cromatografía de capa fina son:

- Gel de sílice (se maneja en el 80% de las separaciones)
- Óxido de aluminio o alúmina (ácida, neutra o básica)
- Celulosa (nativa o microcristalina)
- Poliamidas

1.8.1.3. Cálculo del factor de retención, R_f en CCF

Es el trayecto recorrido del disolvente en una muestra, es utilizado como el punto de referencia donde se observa el desplazamiento de varios compuestos presentes en la placa. El resultado de las distancia van a depender de las situaciones en las que se encuentre la placa, tipo de adsorbente, eluyente y la temperatura.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida del disolvente}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

1.8.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un proceso analítico en donde los componentes de una mezcla son transportados en un equipo al interior de una columna que va a analizar, separar y cuantificar la composición química de una sustancia, el cual presenta una fase fija y una líquida. (PÉREZ, F. 2009)



FOTOGRAFÍA No. 5. EQUIPO DE HPLC

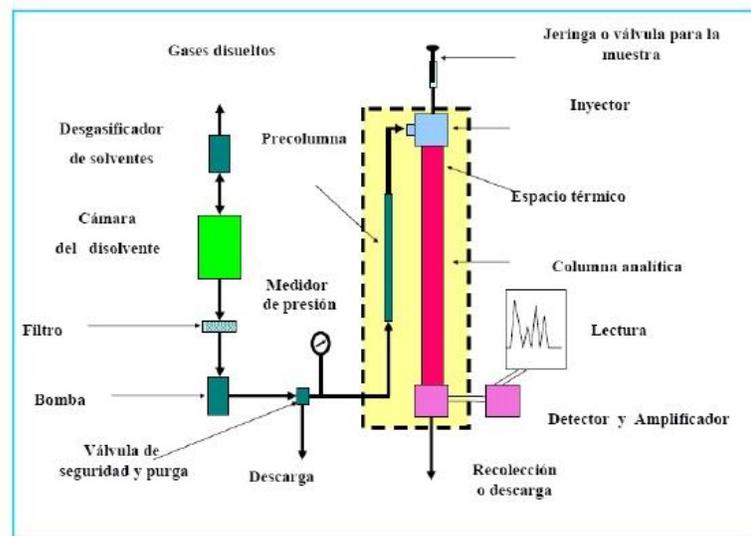
La disolución está fundamentada por la velocidad, de migración entre los componentes de la muestra que están limitadas por las condiciones de los analitos y la interacción con la fase móvil.

- **Fase estacionaria:** son partículas sólidas con una zona microporosa se presentan de dos formas en columna o en placas es esta fase son retenidos los componentes de la mezcla los cuales recorrerán la fase móvil.
- **Fase móvil:** es una etapa en donde se da la separación de los componentes de la muestra.

1.8.2.1. Instrumentación

El método cromatográfico HPLC tiene los siguientes elementos:

- Bomba cuaternaria
- Contenedor de disolventes
- Inyector automático
- Columna analítica
- Registrador de datos
- Los detectores



FUENTE: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/gas.jpg>

GRÁFICO No. 10. ESQUEMA DE UN EQUIPO DE HPLC

a. Bombas

Tiene como función mantener un flujo duradero en la fase líquida por medio de una columna cromatográfica, generar las fuerzas necesarias a la fase móvil a través de la columna y suministrar constantemente a la columna de fase móvil; existiendo con ellos dos tipos de bombas la de presión constante y las de flujo contante. (BARKOVICH, M. 2007)

Los parámetros que debe cumplir la bomba son:

- Rango de flujo: de 0.01 a 10 ml/min
- Rango de presión: de 1 a 6000 psi
- Pulsos de presión: menos del 1% para HPLC normal

b. Contenedor de Disolventes

Son botellas de vidrio transparente o de color ámbar que sirven para recolectar la fase móvil y desgasificarla aislándola de componentes presentes en el aire estas deben estar correctamente sellados para evitar la contaminación cruzada.

c. Inyector automático

Los inyectores son pequeñas agujas que permite inyectar sucesivamente una serie de muestras líquidas por lo general cada inyector recoge volúmenes desde 0,1 ml a 100 ml desde los viales hasta la columna cromatográfica, este además tiene la capacidad de eliminar las burbujas que se quedan para evitar falsos positivos en los resultados. (PORTAL QUIMINET, 2014)

d. Columnas analíticas

Es la parte más importante del sistema cromatográfico, es aquí donde se va a dar la separación cromatográfica, es necesario seleccionar la mejor fase móvil, la composición química de la muestra para que la separación sea de calidad, su longitud varía de 5 a 30 cm enrolladas en un diámetro de 4 a 10 cm, el tamaño de la partícula es de 3.5 a 10 μm .

e. Registrador de datos del cromatograma

Se representa mediante un gráfico es el resultado de la transformación de las señales eléctricas del detector esto nos indica el tiempo y la separación que se presentó en el cromatógrafo. El detector visualiza cada compuesto presente en la muestra y lo representa a través de picos el cual identifica varios compuestos de acuerdo a la composición química de la muestra. Aquí se puede observar el (t_0) que es el tiempo cero en el que se realizó la inyección y el (t_r) que es el tiempo de retención cuando el pico alcanza su valor máximo. (RIVERA, L. 2004)

f. Detectores

En el HPLC los detectores son elementos importantes que determina y cuantifica la propiedad física de una muestra; detectando cada uno de los compuestos individualmente a través de la fase móvil y mediante esta trasportar las señales eléctricas a una base registradora de datos.

Existen varios tipos de detectores obedeciendo a las propiedades de cada compuesto:

- Absorbancia
- Fluorescencia
- Electroquímico
- Índice de Refracción
- Conductividad
- Espectroscopia de masas

1.8.2.2. Tipos de HPLC

1. Cromatografía de fase normal:

Es el primer tipo de HPLC tenía como fundamento separar los analitos basándose en su polaridad. Usando una fase móvil no polar y una fase fija polar método que se utiliza cuando el analito es polar. (CHANDLER, S. 2009)

2. Cromatografía de fase inversa

Este método cromatográfico es el más utilizado en el cual se emplea una fase móvil medianamente polar y una fase estacionaria no apolar.

3. Cromatografía de exclusión por tamaño

También renombrada cromatografía de permeabilidad tiene la característica de separar partículas de acuerdo al tamaño de la muestra es muy utilizada para determinar proteínas de estructuras terciarias y cuaternarias además de que nos proporciona el peso molecular de los polímeros.

4. Cromatografía de intercambio iónico

Está fundamentada en la afinidad entre iones del soluto y la carga de la fase estacionaria en este tipo de cromatografía se maneja columnas que en su interior contienen resinas de intercambio iónico que va permitir separar en los iones de la muestra destacando que ambas fases son de naturaleza iónica.

5. Cromatografía de afinidad

Se caracteriza por formar complejos estables, específicos y reversibles a partir de materias bioactivas es decir mezclas proteicas donde esa involucrada las fuerzas moleculares Van der Waals.

1.8.3. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

En la actualidad la cromatografía tiene como finalidad separar la mayor cantidad de compuestos en tan corto tiempo para esto la cromatografía líquida de alta resolución debe considerar los siguientes parámetros (TEXTOS CIENTÍFICOS, 2007)

1.8.3.1. Tiempo de Retención (t_R)

Es el tiempo que tarda una muestra en llegar al detector luego de ser inyectada hasta alcanzar el pico máximo del analito.

1.8.3.2. Factor de Capacidad (k)

Se lo define también como factor de retención. Es un parámetro que especifica la velocidad de los analitos en las columnas es decir el equilibrio de las moléculas que persisten en la fase móvil con relación a la fase estacionaria.

1.8.3.3. Tiempo Muerto (t_M)

Se lo define también como tiempo cero; es el tiempo que se necesita para que un compuesto no retenido migre por la columna cromatográfica.

1.8.3.4. Selectividad

Establece la disolución de dos compuestos representados en forma de picos, el cual está en función de la química de la columna y la fase móvil es decir separa una banda de la otra.

1.8.3.5. Eficacia

Se manifiesta como el número de platos teóricos nos revela la cantidad de veces que el soluto es distribuido en la fase móvil y fase fija mientras realiza su paso por la columna cromatográfica.

1.8.3.6. Resolución

Determina cuantitativamente la separación de dos picos y está en función de la eficacia, selectividad y retención de la columna cromatográfica.

1.8.3.7. Asimetría

Es un elemento no deseable que influye en la calidad de las columnas, principalmente cuando la conexión señal ruido es baja.

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La descrita investigación fue ejecutada en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en la Facultad de Ciencias:

- Laboratorio de Fitoquímica.
- Laboratorio de Química Instrumental.
- Laboratorio de HPLC.

Para la identificación taxonómica y certificación del vegetal se utilizó:

- Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

2.2. RECURSOS MATERIALES

2.2.1. MATERIA PRIMA

- *Tagetes* sp
- *Tagetes multiflora*
- *Tagetes zipaquirensis*

Las tres especies de *Tagetes* fueron recolectadas en la Provincia de Chimborazo en el sector de la ESPOCH aproximadamente a 2.750 msnm, temperatura de 17°C y una humedad relativa de 55 - 87% previo a la obtención de los extractos.

2.2.2. EQUIPOS

- Balanza Analítica
- Bomba al vacío
- Cámara Digital
- Cámara UV
- Desecador
- Espectrofotómetro
- Estufa
- HPLC
- Mufla
- pH metro
- Rotavapor
- Sorbona
- Ultrasonido

2.2.3. MATERIALES DE LABORATORIO

- Balones aforados
- Balones esmerilados
- Cápsulas de porcelanas
- Crisoles
- Embudo
- Frascos de vidrio
- Gradilla
- Guantes desechables
- Mortero
- Manguera
- Mascarilla
- Micro pipetas
- Papel filtro
- Pera de succión
- Piceta
- Picnómetro
- Pinza para tubos
- Pinza para crisoles
- Pipetas 0.1; 1.5 y 10 ml
- Puntas estériles para micro pipetas
- Probetas
- Placas Cromatográficas
- Reverbero

- Termómetro
- Trípode
- Tubos de ensayo
- Tubos tapa rosca
- Vasos de precipitación de 50, 250 ml

2.2.4. REACTIVOS

- Acetonitrilo
- Acetato de Etilo
- Ácido acético glacial
- Ácido clorhídrico concentrado
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido fórmico
- Agua destilada
- Agua bidestilada
- Anhídrido acético
- Alcohol n-amílico
- Borntrager
- Carbonato de calcio
- Cloruro férrico
- Cloruro de sodio
- Estándar de Rutina
- Etanol al 96%
- Etanol al 99.98%
- Hidróxido de sodio al 5%
- Hidróxido de sodio 1M
- Nitrito de sodio al 5%
- Limaduras de magnesio
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Fehling
- Reactivo de Lieberman – Buchard
- Reactivo de Wagner
- Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)
- Sudan III
- Sulfato de serio
- Tricloruro de aluminio al 10%

2.3. FACTORES DE ESTUDIO

- Flavonoides presentes en los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*.
- Análisis cromatográficos de los flavonoides obtenidos.

2.4. UNIDAD EXPERIMENTAL O DE ANÁLISIS

Se utilizaron las hojas y las flores en mezcla de los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*.

TABLA No. 2. VEGETAL ELEGIDO, SUSTANCIA A IDENTIFICARSE

VEGETAL	SUSTANCIA A IDENTIFICARSE
<i>Tagetes</i> sp,	
<i>Tagetes multiflora</i>	Metabolitos secundarios (Flavonoides)
<i>Tagetes zipaquirensis</i>	

Realizado por: Karen Cristina Solorzano Alvarado

2.5. METODOLOGÍA

2.5.1. MUESTREO Y RECOLECCIÓN

Las hojas y flores de los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* fueron recogidas en la Provincia de Chimborazo, en los predios de la ESPOCH a 2.750 msnm el 1 de marzo del 2014, cabe recalcar que las tres especies presentaban flores (amarillas), con hojas verdes pinnadas.

2.5.2. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Se realizó la identificación taxonómica en el Herbario de la PUCE a cargo del curador Álvaro Pérez Castañeda quién identificó y autentificó la muestra de los vegetales.

2.5.2.1. Conservación

Los vegetales fueron almacenados en refrigeración a cuarentena en el herbario de la PUCE para evitar cualquier tipo de sustancia extraña ajena a la planta.

2.5.2.2. Limpieza y desinfección

1. A los tres vegetales se les enjuagó con abundante agua, sin lavarlos desmedidamente ya que podrían perderse el principio activo que vamos a investigar.
2. Una vez realizados los pasos anteriores se aísla las flores y las hojas del tallo.
3. Pesar y triturar el vegetal a analizar.

2.5.3. MACERACIÓN

Este procedimiento se efectuó para las tres especies vegetales objeto de estudio.

- Se trasladó 600 g de vegetal fresco triturado y pesado en un frasco de vidrio que contenía etanol al 96% dejando en maceración por 72 horas.
- Pasada las 72 horas se filtra y se guarda el material líquido conseguido para proceder a concentrarlo a la $\frac{1}{4}$ parte de su volumen inicial.
- El líquido alcanzado se guardó y refrigeró a 4°C para eliminar las clorofilas.

2.5.4. EXTRACCIÓN

Los extractos son concentrados a presión comprimida en el Rotavapor Heidolphhei-VAP a 60°C (temperatura máxima de los flavonoides), durante 30 min tiempo en que se evapora a sequedad el producto.



FOTOGRAFÍA No. 6. EXTRACCIÓN ALCOHÓLICA

Conseguidos los tres extractos y libre de clorofilas pueden ser utilizados para cada uno de los análisis que se mencionan a continuación.

2.6. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS - QUÍMICAS DE LOS EXTRACTOS

Este procedimiento se efectuó para los tres extractos etanólicos.

2.6.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

- **COLOR**

Se tomó un tubo de ensayo seco y limpio llenándolo las $\frac{3}{4}$ con los extractos etanólicos, observando contra luz la presencia de partículas y su nitidez.

- **OLOR**

Se sumerge un papel secante en los extractos etanólicos mediante el olfato podemos determinar el olor característico del extracto vegetal.

- **SABOR**

Se toma una muestra significativa de extracto y mediante el gusto se aprecia qué tipo de sabor presenta el extracto vegetal.

- **APARIENCIA**

Se analizó el aspecto externo mediante el análisis visual.

2.6.2. PROPIEDADES FÍSICAS

2.6.2.1. Densidad relativa

Se deduce que la densidad relativa es la relación que existe entre la masa de un volumen de la sustancia a experimentar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

Matemáticamente se utiliza la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

dónde: D_{25} = Densidad relativa del extracto etanólico vegetal a 25°C

M_1 = peso del picnómetro con la muestra (g)

M_2 = peso del picnómetro con el agua (g)

M = peso el picnómetro vacío (g).

Procedimiento

(BALDEÓN, X. 2011)

- Se pesa el picnómetro vacío y seco.
- Llenar con los extracto etanólicos a estudiar a una temperatura de 25°C y anotar su peso.
- Se repite el mismo proceso pero con agua destilada y se anota su peso.

2.6.2.2. Índice de refracción

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

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

Procedimiento

(BALDEÓN, X. 2011)

- Se ubica una gota de agua destilada en el prisma de medición, se iguala el refractómetro con la zona del espectro visible que está situada en rango límite del campo visual utilizando el compensador cromático; situando la intersección del visor sobre la línea límite del campo oscuro y claro.

- Una vez ajustado el equipo, se coloca una gota del extracto etanólico sobre el prisma de medición se tapa el termoprisma dirigiendo la luz por medio del espejo, de tal modo que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición anotar el valor que se visualiza en el refractómetro.

Matemáticamente se utiliza la fórmula siguiente:

$$B_d^{25} = B_d^t + 0.00044$$

dónde: B_d^{25} = Índice de refracción a 25°C

B_d^t = valor leído en la escala del aparato a la temperatura t.

t = temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044 = factor de corrección por grado Celcius.

2.6.2.3. Determinación del pH de extractos

El pH es un índice numérico que se maneja para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de la concentración de los iones hidrógeno. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

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

Procedimiento

(SILVA, C. 2010)

Lavar el electrodo con agua destilada, calibrar el ph-chimetro Hanna referencia HI 2221 con la disolución tampón una vez enjuagado el medidor de pH se introduce en la muestra de ensayo a analizar, anotar el valor determinado en la pantalla.

2.6.2.4. Determinación de los sólidos totales.

Se visualiza si existe o no pérdida de sustancias volátiles cuando es sometido al calor. Este proceso es realizado en una estufa mediante la evaporación de humedad de la muestra a investigar, hasta obtener una masa constante.

Procedimiento

(SILVA, C. 2010)

Se coloca 5 ml de la muestra a investigar en una cápsula de porcelana preliminarmente tarada a 105°C, se hierve en un baño maría hasta sequedad. Culminado este proceso se transfiere la cápsula a una estufa hasta obtener un peso constante (alrededor de 3 h) la cápsula es aislada en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente manteniendo intervalos de 30 min entre medición de masa y masa.

Matemáticamente se calcula por la siguiente fórmula:

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

dónde: P_r = masa de la cápsula más el residuo (g)

P = masa de la cápsula vacía (g)

V = volumen de la porción de ensayo.

100=factor matemático que convierte a tanto por ciento.

2.7. CONTROL DE CALIDAD DEL VEGETAL

2.7.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Para la determinación del contenido de humedad se utilizó el método gravimétrico. Esta prueba se realizó para observar la presencia de agua existente en los extractos el cual determina el deterioro del vegetal y su vida útil. Según la farmacopea en las drogas vegetales la humedad no debe oscilar entre 8 y 14% con pocas excepciones.

El método gravimétrico se utilizó para esta investigación debido a que las tres especies de *Tagetes* no presentan sustancias volátiles basada en la pérdida de masa luego de ser desecada en una estufa.

Procedimiento

(SILVA, C. 2010)

- Se pesan 2 g del vegetal triturado y se coloca en una cápsula previamente tarada.
- Luego se deseca a 105°C durante 3h.
- Corrida las 3 h se deseca el crisol durante 30 min hasta que enfrié, se pesa y se coloca durante 1 h más a la estufa.
- Volver a pesar hasta obtener un peso invariable.

Matemáticamente se calcula por la siguiente fórmula:

$$\text{Hg} = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

dónde: Hg = pérdida en peso por desecación (%).

M_2 = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M_1 = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático para convertir a tanto por ciento.

2.7.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

Procedimiento

(CAMACHO, D. 2011)

- Se pesa 2 g de la materia prima triturada y cernida en un crisol de porcelana previamente tarado.
- Calcinar la muestra de ensayo en una mufla a una temperatura de 700 a 750°C durante 2 h.
- Enfriar el crisol en una desecadora y se pesa, frecuentemente se realiza dos pesadas continuadas cada 30 min observando que no difieran en más de 0.5 mg por g (masa constante).
- Si la ceniza presenta traza de carbón, se agrega unas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% calentándole hasta la evaporación de los solventes.
- El resultado debe presentarse como cenizas de color blanco o casi blanco.
(CAMACHO, D. 2001)

Matemáticamente se calcula así:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

dónde: C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

2.7.3. DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA

Procedimiento

(CAMACHO, D. 2011)

- A cada una de las cenizas totales conseguidas en la sección 2.7.2, se le agregan de 15 a 20 ml de agua.
- Se hierva la solución durante 5 min.
- Se filtra las soluciones obtenidas y luego se trasfiere al mismo crisol en donde se va a calcinar en la mufla a 700-750°C, durante 2 h.
- Luego es colocado el crisol en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa hasta mantener el peso constante.

Matemáticamente se calcula con la siguiente fórmula:

$$Ca = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} \times 100$$

dónde: Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M₂ = masa del crisol con las cenizas totales (g).

M_a = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M₁ = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.7.4. DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO

Procedimiento

(CAMACHO, D. 2011)

- A las cenizas totales conseguidas en sección 2.7.2 se le añaden de 2-3 ml de ácido clorhídrico al 10%.
- Calentar el crisol tapado con un vidrio reloj a baño maría durante 10 min.
- Lavar el vidrio reloj con 5 ml de agua hervida y acoplar al contenido de crisol restante.
- Y a este se le adiciona una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1 mol/L para acidular.
- Desecar durante 30 min; luego incinerar en una mufla a una temperatura de 700-750°C durante 2 h.
- Sacar de la mufla desecar durante 30 min pesar hasta obtener una masa constante.

Matemáticamente se calcula por la siguiente fórmula:

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

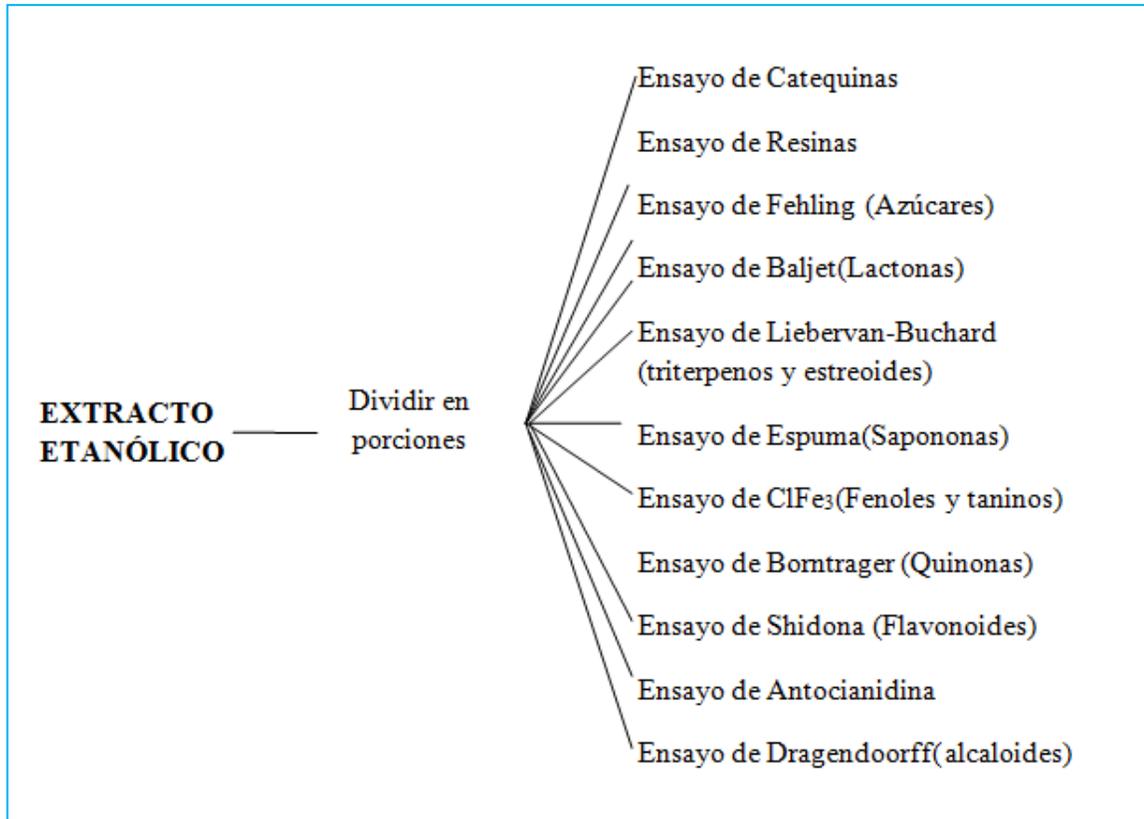
M₂= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

2.8. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Es una fase fundamental para establecer cualitativamente los grupos químicos importantes presentes en los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*, el cual permite utilizar solventes adecuados en las reacciones de coloración; siendo su objetivo primordial

establecer los metabolitos secundarios presentes en el vegetal a investigar. (VALENCIA, P. 2006)

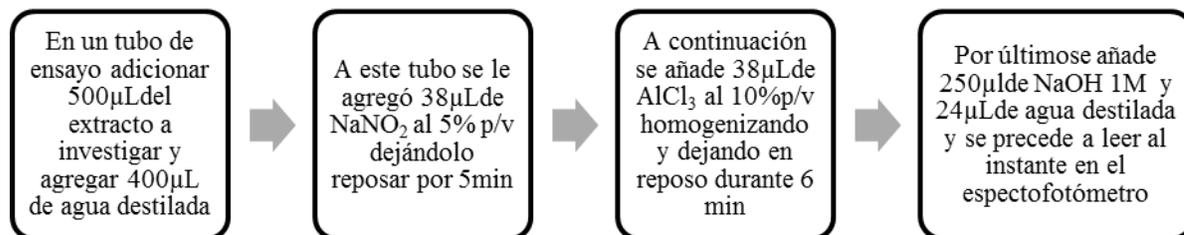


FUENTE: Normas ramales. Drogas crudas y extractos y tinturas. NRSP 309, 311 Y312. MINSAP 1992
GRÁFICO No. 11. ESQUEMA DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EL EXTRACTO ALCOHÓLICO

2.9. ANÁLISIS ESPECTOFOTOMÉTRICO

La cantidad de flavonoides contenidos en el extracto etanólico vegetal fue cuantificado mediante espectroscopia UV- Visible, según la técnica descrita por Helmja. (JARAMILLO, A. 2003)

Como se esquematiza a continuación:



Se realizó los siguientes pasos:

- Los flavonoides fueron medidos a una longitud de onda de 417 nm.
- Para calcular la concentración de flavonoides se estableció una curva de calibración preparando soluciones etanólicas de rutina en concentraciones que van desde 20 ppm - 100 ppm empleando el mismo proceso de las muestras a investigar a 417 nm.

2.10. ANÁLISIS CUALITATIVO POR CROMATOGRÁFIA EN CAPA FINA (CCF)

Para el análisis cuantitativo de flavonoides en los extractos vegetales se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina, luego haber logrado concentrar cada uno de los extractos se realizó el análisis cromatográfico.

Procedimiento

- Ubicamos las placas de sílice gel en una estufa por el lapso de unos 10 min para su activación.
- Sacamos las placas de la estufa y dejamos que se enfríen a temperatura ambiente.
- Se elabora el sistema de corrido (ver tabla No. 3)

TABLA No. 3. ESQUEMA PARA EL ANÁLISIS DE FLAVONOIDES EN CAPA FINA

VEGETAL REVELADOR	ABSORVENTE	SISTEMA DE SOLVENTE	
<i>Tagetes</i> sp		Acetato de Etilo, Metanol, Agua (100:13.5:10)	
<i>Tagetes multiflora</i>	Sílica gel 60 F ₂₅₄	Ácido acético glacial, Agua, Acetona, Butanol (10:20:35:35)	Sulfato de cerio Ce (SO ₄) ₂
<i>Tagetes zipaquirensis</i>		Acetato de Etilo, Ácido acético, Ácido Fórmico, Agua (100:11:11:26)	

Elaborado por: Karen Cristina Solorzano Alvarado

- Se adiciona en uno de los bordes de 2-3 aplicaciones del extracto con la ayuda de capilares en las placas previamente activadas a una distancia de 1 cm cada uno tomando un tiempo prudente de sequedad y evitando colocar demasiada muestra para que no se sobrepongan.
- Se sumerge la placa en el frasco de vidrio esperando que recorra el extracto hasta las $\frac{3}{4}$ partes de la placa.
- Retiramos la placa y aguardar por unos 5 min hasta que se seque.
- Procedemos a revelar la placa con sulfato de cerio preparado en ácido nítrico procurando no dañar la placa y con mucho cuidado en una sorbona para evitar contaminación por gases.
- Una vez seca la placa pasar por un reverbero para que las manchas se visualicen por acción del calor, se manifiestan con la presencia de tonalidades que van desde los amarillos, azules, anaranjados hasta violeta en la cromatografía de capa fina.

- Medimos la distancia que recorrió el sistema de solvente en el extracto desde el punto donde se aplicó la muestra hasta el trayecto final del solvente.
- Se procede a calcular los Rf para cada extracto vegetal de los Tagetes mediante la ecuación 1.

2.11. ANÁLISIS CUANTITATIVO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para la cuantificación de flavonoides se aplicó el método de: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para este estudio se requiere preparar nuevos extractos.

Condiciones Cromatográficas

- Columna C-18, 2.5 cm
- Flujo 1 ml/min
- Tamaño de la partícula: 5 μ m
- Temperatura de columna: 32°C
- Longitud de onda: 417 nm
- Fase móvil: Etanol al 99.98%, Acetonitrilo (75:25 v/v).

2.11.1. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE FLAVONOIDES (RUTINA)

- Pese 0.0025 g de rutina (estándar).
- Aforar a 50 ml con etanol al 99.98 % (Solución Estándar de Flavonoides 50 ppm).
- Instalamos la solución estándar en el ultrasonido por 10 min.
- Tome 1 ml de esta solución y afore a 10 ml (Solución a 10 ppm).
- Filtre la solución con acrodiscos de membranas de 0.45 μ m.

- En un vial de vidrio colocamos la solución pasada por el filtro de membrana y ubicar en el HPLC para ser inyectada.

2.11.2. PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL (ETANOL – ACETONITRILO)

- En un balón de aforo de 500 ml añadir 375 ml de etanol al 99.98% y 125 ml de Acetonitrilo mezclando la solución.
- Con la bomba de presión pasar por un papel filtro enjuagando varias veces el matraz.
- Llevar esta solución filtrada al ultrasonido durante 10 min.
- Traspasamos la fase móvil a un frasco de vidrio para ser utilizado al inyectar el estándar y los extractos.

2.11.3. PREPARACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO (FLAVONOIDES)

Esta técnica se aplicó para las tres especies vegetales objeto de este estudio

- Tomar 0.1 ml de cada extracto y aforar con la fase móvil (Etanol : Acetonitrilo) (Solución a 10 ppm)
- Se filtra esta solución 10 ppm con acrodiscos de membrana de 0.45µm
- Esta solución se coloca en viales de vidrio para su inyección.

Procedimiento:

- Inyectar por separado los volúmenes iguales del estándar y de cada una de las soluciones problema.
- Observar las cromatografías y el pico principal de cada una de las muestras.
- Calcular la concentración en mg de los flavonoides que nos proporcionó el equipo de HPLC contenidos en cada vial.

Para cuantificar los flavonoides matemáticamente se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Rutina (mg/100g)} = (\text{Am} \times \text{Cst} \times \text{Vaf}) / (\text{Ast} \times \text{M} \times 10)$$

dónde: **Am** = Área de la muestra.

Cst = Concentración del Estándar.

Vaf = Volumen aforado de la muestra (ml).

Ast = Área del Estándar.

M = peso de la muestra en gramos

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA

Para el estudio del control de calidad, se usó las flores y las hojas de las plantas frescas de *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* se separó las raíces y tallos para que no interfiera en el análisis.

3.1.1. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La identificación y comprobación taxonómica estuvo a cargo del curador Álvaro Pérez Castañeda encargado del Herbario de la PUCE quien estudio las tres especies de *Tagetes* y contribuyó con la siguiente información:

CUADRO No. 1. COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN DE TAGETES

CLASE	SUBCLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
Equisetopsida C.Agardh	Magnoliidae	Asterales Link	Asteraceae Bercht.& J.Presl	<i>Tagetes</i> L.	Indeterminada
					<i>multiflora</i> Kunth
					<i>zipaquirensis</i> Bonpl.

Realizado por: Curador Álvaro Pérez Castañeda

3.1.2. MUESTREO, RECOLECCIÓN, CONSERVACIÓN, LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

CUADRO No. 2. MUESTREO, RECOLECCIÓN, CONSERVACIÓN, LIMPIEZA Y DESCONTAMINACIÓN DE LOS TAGETES

Muestreo	Recolección	Conservación	Limpieza y Desinfección
Se logró conseguir muestras frescas de los <i>Tagetes</i> : <i>sp</i> , <i>multiflora</i> y <i>zipaquirensis</i>	Fueron recolectadas tres especies de <i>Tagetes</i> el 1 de marzo del 2014	Los vegetales fueron almacenados en el herbario de la PUCE en cuarentena con el fin de evitar interferencias al momento de los análisis	Se logró el peso en (g) Peso de <i>Tagetes</i> : <ul style="list-style-type: none">• <i>sp</i>:138.00 (g)• <i>multiflora</i>:156.45 (g)• <i>zipaquirensis</i>:140.00(g)

Realizado por: Karen Cristina Solorzano Alvarado

3.2. MACERACIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para el desarrollo de maceración de la planta fresca de las tres especies de *Tagetes* se utilizó el mismo solvente alcohol al 96% en el cuadro No. 3 se puede observar cuál de los tres *Tagetes* presento el mejor rendimiento.

CUADRO No. 3. RENDIMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LOS TAGETES

ESPECIE	SOLVENTE	PESO (g)	EXTRACTO (ml)	RENDIMIENTO (%)
<i>Tagetes</i> sp		138.00	258	53
<i>Tagetes multiflora</i>	Alcohol 96 %	156.45	350	44
<i>Tagetes zipaquirensis</i>		140.00	475	29

Realizado por: Karen Cristina Solorzano Alvarado

De los tres extractos analizados, el que presento mayor rendimiento fueron los *Tagetes* sp con un 53% frente a los *Tagetes multiflora* en el que presento un 44% y a los *Tagetes zipaquirensis* donde su rendimiento fue del 29% esto dependía del tiempo de maceración del vegetal con el solvente, de la temperatura que fueron concentrados los extractos; destacando que la cantidad de extracto disminuye porque es aquí donde se recupera parte del solvente presentándose el extracto con un aspecto un tanto espeso y separado de etanol.

Para la preparación de los extractos por agotamiento se utilizó alcohol al 96%, determinando que de las tres especies de *Tagetes* la que presentó mejor rendimiento son, los *Tagetes* sp con un 53%, seguido por los *Tagetes multiflora* con un 44% y por último con un 29% los *Tagetes zipaquirensis* con relación al vegetal pulverizado. Estos porcentajes tienen mucho que ver con la polaridad de los flavonoides frente al solvente utilizado, el cual garantiza un alto porcentaje de concentración de metabolitos secundarios que se encuentran presentes en la planta.

3.3. ANÁLISIS FÍSICOS QUÍMICOS

3.3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS

Se efectuó el control de calidad y las pruebas de análisis físico-químico a los extractos etanólicos de los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*, acentuando que estos análisis se realizaron por duplicado tal como lo dice la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) No. 309, 311 y 312 del MINSAP. 1992.

CUADRO No. 4. CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*

ENSAYO	<i>Tagetes</i> sp	<i>Tagetes multiflora</i>	<i>Tagetes zipaquirensis</i>	
	Aspecto	Líquido	Líquido	Líquido
Características organolépticas	Olor	Aromático	Picante	Fuerte penetrante
	Color	Ámbar	Amarillo	Verdoso
	Sabor	Mentolado	Picante	Amargo
	pH	5.03	5.10	5.10
Ensayos Físicos-Químicos	Densidad relativa	1.001 g/ml	1.009 g/ml	0.9707 g/ml
	Índice de refracción	1.342	1.344	1.373
	Sólidos totales	20.30 g/100 ml	20.21 g/100 ml	20.12 g/100 ml

Realizado por: Karen Cristina Solorzano Alvarado

En cuanto a las características organolépticas las tres especies de *Tagetes* muestran el mismo aspecto líquido, los *Tagetes* sp presentan un olor agradable aromático, a diferencia de los *Tagetes zipaquirensis* que su olor es fuerte penetrante y los *Tagetes multiflora* con un olor y sabor picante, en cuanto a la coloración varía de acuerdo a la especie observándose una tonalidad ámbar en los *Tagetes* sp, en los *Tagetes multiflora* un amarillo claro y en los *Tagetes zipaquirensis* tono verdoso, en cuanto que en los *Tagetes* sp presentan un sabor mentolado y los *Tagetes zipaquirensis* un sabor amargo poco agradable.

En el cuadro No. 4, las tres especies de *Tagetes* (sp, *multiflora* y *zipaquirensis*) presentan un pH medianamente ácido en su composición química, la densidad relativa en *Tagetes zipaquirensis* presenta un nivel más bajo que en los *Tagetes* sp con 1.001 g/ml y *Tagetes multiflora* 1.009 g/ml constando las tres especies dentro de las especificaciones establecidas del agua (1 g/ml). En cuanto al índice de refracción es levemente superior a la del agua (1.333) y en los sólidos totales se puede visualizar que los *Tagetes* sp contienen un 20.30 g/100 ml a diferencia del *Tagetes multiflora* 20.21 g/100 ml y el *Tagetes zipaquirensis* con un 20.12 g/100 ml.

3.3.2. CONTROL DE CALIDAD DE LAS DROGAS CRUDAS

En el siguiente cuadro No. 5 se muestra las especificaciones establecidas por la Norma Ecuatoriana de Fitomedicamentos (2001) y Norma Internacional, para cada uno de estos parámetros sus resultados están expresados en porcentajes.

CUADRO No. 5. CONTROL DE CALIDAD DE LAS DROGAS CRUDAS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*

PARÁMETRO	ESPECIE	RESULTADO %	LÍMITES MÁXIMOS (Norma Ecuatoriana de Fitomedicamentos, 2001)
Humedad	<i>Tagetes</i> sp	6.89	10%
	<i>Tagetes multiflora</i>	6.21	
	<i>Tagetes zipaquirensis</i>	7.77	
Cenizas totales	<i>Tagetes</i> sp	12.69	5-15%
	<i>Tagetes multiflora</i>	13.54	
	<i>Tagetes zipaquirensis</i>	11.83	
Cenizas solubles en agua	<i>Tagetes</i> sp	4.6	7%
	<i>Tagetes multiflora</i>	2.8	
	<i>Tagetes zipaquirensis</i>	5.9	
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	<i>Tagetes</i> sp	3.8	2-6%
	<i>Tagetes multiflora</i>	5.6	
	<i>Tagetes zipaquirensis</i>	2.1	

Realizado por: Karen Cristina Solorzano Alvarado

El control de calidad de los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* crudos se hallan dentro de límites establecidos en cuanto a la humedad sus valores están debajo del 10% dándole mayor estabilidad a las drogas prologando el tiempo de vida útil y evitando la propagación bacterias y hongos.

Las cenizas totales señala el contenido de minerales que están presentes en el vegetal, en estas existe pérdida de compuestos volátiles y como resultado se obtiene el residuo inorgánico de la planta los valores logrados son en *Tagetes* sp con el 12.69%, *Tagetes multiflora* 13.54% y *Tagetes zipaquirensis* 11.83% destacando que se encuentran dentro de las especificaciones establecidas que es del 5-15%, en cuanto a las cenizas solubles en agua los *Tagetes* sp con el 4.6%, *Tagetes multiflora* 2.8% y *Tagetes zipaquirensis* 5.9% y las cenizas insolubles en ácido clorhídrico están presentes en los *Tagetes* sp con el 3.8% en *Tagetes multiflora* 5.6 % y los *Tagetes zipaquirensis* 2.1% están dentro de los límites requeridos es necesario realizar el análisis de las tres clases de cenizas para estar segura de la calidad del extracto. (AGUIRRE, R. 2008)

3.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Los resultados alcanzados en las tres especies de *Tagetes* están representados en el siguiente cuadro en cuanto a las reacciones de coloración y precipitación que se han conseguido con las técnicas de tamizaje

CUADRO No. 6. TAMIZAJE FITOQUIMICO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*

ENSAYO	EXTRACTO ETANÓLICO		
	<i>Tagetes sp</i>	<i>Tagetes multiflora</i>	<i>Tagetes zipaquirensis</i>
ESPUMA	(-)	(-)	(-)
SHINODA	(++)	(+++)	(+++)
FeCl ₃	(+++)	(+++)	(+++)
BORNTRAGER	(++)	(+++)	(++)
DRAGENDORFF	(-)	(-)	(-)
WAGNER	(-)	(-)	(-)
MAYER	(-)	(-)	(-)
ROSERNTHALER	(-)	(-)	(-)
BALJET	(+)	(+)	(+)
SUDAN III	(+++)	(+++)	(++)
LIEBERMAN- BUCHARD	(+)	(+)	(+)
CATEQUINAS	(-)	(-)	(-)
RESINAS	(-)	(-)	(-)
ANTOCIANAS	(-)	(++)	(+++)
FEHLING	(++)	(++)	(+++)

(-) Ausencia cantidad de metabolitos.

(+) Baja cantidad de metabolito

(++) Ligera cantidad de metabolito

(+++) Elevada cantidad de metabolitos

En el cuadro No. 6, la composición química que se evidencia en los extractos etanólicos de *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* es:

Para el ensayo de espuma de los *Tagetes* sp (-), *Tagetes multiflora* (-) y *Tagetes zipaquirensis* (-), los resultados fueron negativos ausencia de saponinas.

Para el ensayo de Shidona los resultados fueron positivos en los *Tagetes* sp (++) señalando que tiene una Ligera cantidad de metabolito, en cuanto que para los *Tagetes multiflora* (+++) y *Tagetes zipaquirensis* (+++) presentan una elevada cantidad de metabolitos, prueba que determina cualitativamente la presencia de flavonoides en el vegetal.

Para el ensayo de cloruro férrico el resultado fue positivo en los *Tagetes* sp (+++), *Tagetes multiflora* (+++) y *Tagetes zipaquirensis* (+++) los cuales presentan una elevada cantidad de metabolitos, prueba que determina cualitativamente la presencia de compuestos fenólicos y taninos en el vegetal.

Para el ensayo de Borntrager el resultado fue positivo en los *Tagetes* sp (++) y *Tagetes zipaquirensis* (++) reportándose una ligera cantidad de metabolitos y para los *Tagetes multiflora* (+++) se reportó una elevada cantidad de metabolitos, prueba que determina cualitativamente la presencia de quinonas en el vegetal.

Para el ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer las pruebas de los *Tagetes* sp (-), *Tagetes multiflora* (-) y *Tagetes zipaquirensis* (-), los resultados fueron negativos ausencia de alcaloides.

Para el ensayo de Rosenthaler, las pruebas de los *Tagetes* sp (-), *Tagetes multiflora* (-) y *Tagetes zipaquirensis* (-), los resultados fueron negativos ausencia de compuestos terpénicos.

Para el ensayo de Baljet, los resultados fueron positivos en los *Tagetes* sp (+), *Tagetes multiflora* (+) y *Tagetes zipaquirensis* (+) presenta una baja cantidad de metabolitos,

prueba que determina cualitativamente la presencia de compuestos lactónicos en el vegetal.

Para el ensayo de Sudan III, los resultados fueron positivos en los *Tagetes* sp (+++), *Tagetes multiflora* (+++) y *Tagetes zipaquirensis* (+++) presentan una elevada cantidad de metabolitos, prueba que determina cualitativamente la presencia de compuestos grasos (lípidos y/o aceites esenciales) en el vegetal.

Para el ensayo de Lieberman-Buchard, los resultados fueron positivos en los *Tagetes* sp (+), *Tagetes multiflora* (+) y *Tagetes zipaquirensis* (+) presenta una baja cantidad de metabolitos, prueba que determina cualitativamente la presencia de triterpenos y/o esteroides en el vegetal.

Para el ensayo de Catequinas y Resinas, las pruebas de los *Tagetes* sp (-), *Tagetes multiflora* (-) y *Tagetes zipaquirensis* (-), los resultados fueron negativos ausencia de estos compuestos.

Para el ensayo de Antocianinas, la prueba de los *Tagetes* sp (-) el resultado fue negativo ausencia de metabolitos, pero dio positivas las pruebas de los *Tagetes multiflora* (++) con una ligera cantidad de metabolitos y *Tagetes zipaquirensis* (+++) con una elevada cantidad de metabolitos, ensayo que determina cualitativamente la presencia de flavonoides de secuencia C₆-C₃-C₆ en el vegetal.

Para el ensayo de Fehling, la prueba de los *Tagetes* sp (++) y *Tagetes multiflora* (++) con una ligera cantidad de metabolitos y *Tagetes zipaquirensis* (+++) con una elevada cantidad de metabolitos, ensayo que determina cualitativamente la presencia de azúcares reductores en el vegetal.

3.5. ANÁLISIS ESPECTOFOTOMÉTRICO

3.5.1. CUANTIFICACIÓN DE LA RUTINA

Para la curva de calibración se empleó como estándar a la rutina de las cuales se leyeron cinco Absorbancias a distintas concentraciones y a una longitud λ de 415nm.

CUADRO No. 7. RESULTADOS DE ABSORVANCIA DE LA RUTINA DE DILUCIONES A DIFERENTES CONCENTRACIONES

Diluciones ml/ml	Concentración (ppm)	Absorbancia (nm)
2/10	20	0.217
4/10	40	0.254
6/10	60	0.477
8/10	80	0.759
10/10	100	0.840

Realizado por: Karen Cristina Solorzano Alvarado

Como se puede observar en el cuadro No. 7, la concentración de flavonoides totales fue interpretada por medio de la curva de calibración de estándar rutina con concentraciones que van desde los 20 a 100 ppm, siguiendo la técnica para la identificación de los flavonoides detallada en el (cap. II – esquema No. 1) obteniéndose la siguiente ecuación.

CUADRO No. 8. ECUACIÓN DE LA RECTA OBTENIDA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR DE RUTINA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES

Estándar	Rango de Concentración (ppm)	Ecuación de la Recta	R ²
Rutina	20-100	$y = 0.1751x - 0.0159$	0.9481

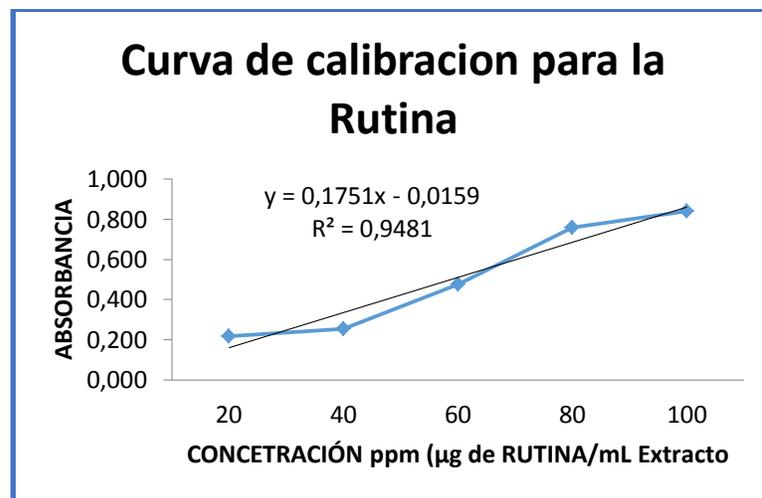


GRÁFICO No. 12. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR RUTINA

3.5.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES EN LOS TAGETES

Una vez concentrados los extractos etanólicos de los Tagetes sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* se realizó las respectivas mediciones en el espectrofotómetro se leyó en primera instancia la muestra estándar (curvas de calibración) y consecutivamente las muestras de las tres especies de Tagetes.

CUADRO No. 9. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES DE *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* A UNA LA LONGITUD DE ONDA DE 410 nm.

ESPECIE	PARÁMETRO		CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDE	
			Porcentaje	ppm (µg/ml)
<i>Tagetes</i> sp	Absorbancia	1.948	17.67	11.03
	Humedad	6.89%		
	Masa	2 g		
<i>Tagetes multiflora</i>	Absorbancia	0.859	30.74	17.36
	Humedad	7.77%		
	Masa	2 g		
<i>Tagetes zipaquirensis</i>	Absorbancia	3.055	6.90	4.81
	Humedad	6.21		
	Masa	2 g		

Realizado por: Karen Cristina Solorzano Alvarado

En el cuadro No. 9 los resultados obtenidos fueron 11.03 ppm con un 17.67% para los *Tagetes* sp, en los *Tagetes multiflora* con 17.36 ppm representando un 30.74% y en los *Tagetes zipaquirensis* con 4.81 ppm equivalente al 6.90%, calculados como rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$) a una longitud de onda de 410 nm. Esta cuantificación se realizó mediante el método espectrofotométrico indicándonos que de las tres especies de *Tagetes* el que más concentración de principios activos (flavonoides) presentó es fue el *Tagetes multiflora* lo que tiene una relación directa con el resultado del tamizaje fitoquímico.

3.6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.6.1. IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRÁFIA EN CAPA FINA (CCF)

Este análisis cualitativo nos permite obtener e identificar los posibles flavonoides presentes en cada uno de los extractos demostrando que deben presentar una excelente resolución, eficiencia y eficacia.

MUESTRA: *Tagetes* sp

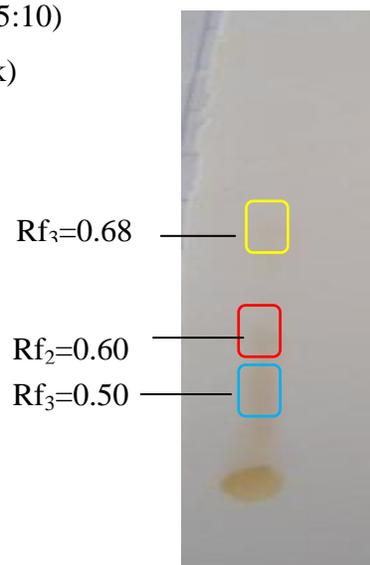
FASE MÓVIL: Acetato de Etilo, Metanol, Agua (100:13.5:10)

FASE ESTACIONARIA: Placas sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck)

REVELADOR: Ce (SO₄)₂

Distancia de recorrido del solvente: 9 cm

MANCHAS	Rf (cm)
1	0.50
2	0.60
3	0.68



FOTOGRAFÍA No. 7 PERFIL CROMATOGRÁFICO SE APRECIAN MANCHAS DE TRES COMPUESTOS FLAVONOIDES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LOS *Tagetes* sp.

En la fotografía No. 7 se muestra la cromatografía en capa fina del *Tagetes* sp, extracto que fue aplicado en la placa de sílica gel, utilizando como fase móvil Acetato de Etilo, Metanol, Agua (100:13.5:10) y revelada con sulfato de cerio, para detectar la presencia de flavonoides. Se identificaron tres componentes con sus respectivos Rf relacionando la mancha con la estructura de los flavonoides de la caléndula perteneciente a la familia de las Asteraceae. De acuerdo con (Wagne & Blad, 1996) las características que presenta los

flavonoides pueden ser de tipo: isoramnetina glucósidos ($R_f \sim 0.4$) con un R_f 0.50 y con un R_f 0.60 y 0.68 la quercetina ($R_f \sim 0.60-0.70$) con esto comprobamos la presencia de flavonoides en el extracto etanólico.

MUESTRA: *Tagetes multiflora*

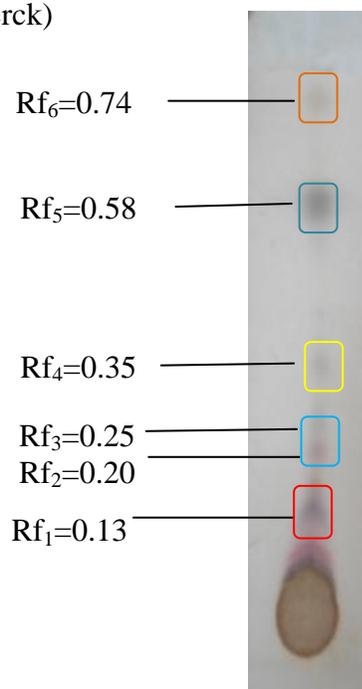
FASE MÓVIL: Ácido acético glacial, Agua, Acetona, Butanol (10:20:35:35)

FASE ESTACIONARIA: Placas sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck)

REVELADOR: Ce (SO₄)₂

Distancia de recorrido del solvente: 8 cm

MANCHAS	Rf (cm)
1	0.13
2	0.20
3	0.25
4	0.35
5	0.58
6	0.74



FOTOGRAFÍA No. 8 PERFIL CROMATOGRÁFICO SE APRECIAN MANCHAS DE SEIS COMPUESTOS DE FLAVONOIDES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LOS *Tagetes multiflora*

En la fotografía No.8 se muestra la cromatografía en capa fina del *Tagetes multiflora*, extracto que fue aplicado en la placa de sílica gel, utilizando como fase móvil Ácido acético glacial, Agua, Acetona, Butanol (10:20:35:35) y revelada con sulfato de cerio, para detectar la presencia de flavonoides.

De acuerdo con (Wagne & Blad, 1996) se presentan flavonoides con características similares a la Asteraceae caléndula de tipo:

- Isoramnetina glucósidos (Rf ~0.4) para los Rf 0.13, 0.25, 0.35
- Rutina (Rf ~0.60) para el Rf 0.58
- Acido fenólico para el Rf 0.74 según (Brunet, 2003)

MUESTRA: *Tagetes zipaquirensis*

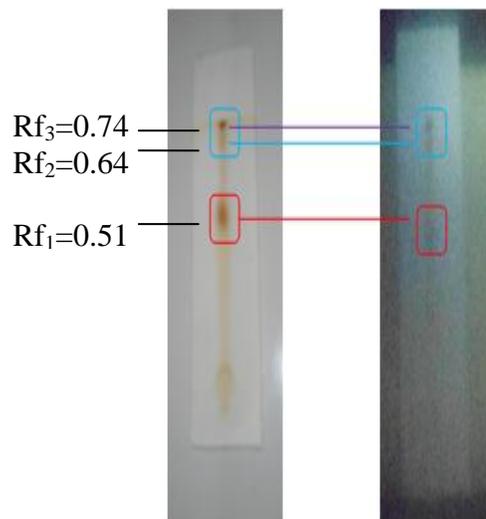
FASE MÓVIL: Acetato de Etilo, Ácido acético glacial, Ácido Fórmico, Agua (100:11:11:26)

FASE ESTACIONARIA: Placas sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck)

REVELADOR: Ce (SO₄)₂

Distancia de recorrido del solvente: 8.5 cm

MANCHAS	Rf (cm)
1	0.51
2	0.64
3	0.74



FOTOGRAFÍA No. 9 PERFIL CROMATOGRÁFICO SE APRECIAN MANCHAS DE TRES COMPUESTOS DE FLAVONOIDES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LOS *Tagetes zipaquirensis*

En la fotografía No. 9 se muestra la cromatografía en capa fina del *Tagetes zipaquirensis*, extracto que fue aplicado en la placa de sílica gel, utilizando como fase móvil Acetato de Etilo, Ácido acético glacial, Ácido Fórmico, Agua (100:11:11:26) y revelada con sulfato de cerio, para detectar la presencia de flavonoides. Se identificaron tres componentes con sus respectivos Rf. De acuerdo con (Wagne & Blad, 1996) las características que presenta los flavonoides pueden ser de tipo: rutina (Rf ~0.5) con un Rf 0.51, ácido clorangénico (Rf ~ 0.60) según (Brunet, 2003) con un Rf 0.64 y por ultimo con un Rf de 0.74 la presencia de ácido fenólico (Rf ~ 0.75) según (Brunet, 2003), comprobando la presencia de metabolitos en el extracto etanólico.

3.7. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CUADRO No. 10. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES POR MÉTODO HPLC

MUESTRA	Concentración (ppm)	Tiempo de retención (min)
Estándar Rutina	50	9.20
Tagetes sp	31.04	8.17
<i>Tagetes multiflora</i>	136.94	6.50
<i>Tagetes zipaquirensis</i>	16.51	3.21

Mediante el método cromatográfico (HPLC) se determinó cuantitativamente la concentración de flavonoides presente en cada uno de los *Tagetes*, como se observa en el cuadro No. 10, en el que se utilizó como fase móvil Etanol-Acetonitrilo (75:25v/v) observándose la presencia de un pico por cada especie, como resultado los *Tagetes multiflora* presentaron una concentración alta con 136.94 ppm con un tiempo de retención de 8.17 min, a diferencia de los *Tagetes sp* con una concentración media de 31.04 ppm y con un tiempo de retención de 6.50 min y con una concentración baja de 16.51 ppm en los *Tagetes zipaquirensis* con un tiempo de retención de 3.21 min, calculados en función de la rutina (C₂₇H₃₀O₁₆) a una longitud de 410 nm.

Además se puede observar la diferencia de concentraciones que existe entre el cromatograma y el espectrofotómetro con relación a los compuestos que existe determinando que el mejor método para cuantificar flavonoides es el HPLC porque permite separar compuestos más puros y en mayores concentraciones.

CAPÍTULO IV

1. CONCLUSIONES

Una vez culminado el estudio investigativo en la identificación y cuantificación de flavonoides de los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* se identificó los metabolitos secundarios, se efectuó el control de calidad, pruebas espectrofotométricas y la cuantificación mediante el análisis cromatográfico del HPLC con lo que se concluye:

1. En los extractos etanólicos de los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*, se lograron la extracción de los flavonoides mediante el proceso de maceración y concentración evidenciándose la presencia de bioflavonoides con el ensayo positivo de shidona y del cloruro férrico. (Cuadro No. 6)
2. En el tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos de los *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* se observaron otros grupos fitoquímicos como: taninos, cumarinas, ácidos grasos, antocianas, azúcares, triterpenos y esteroides además de la presencia de flavonoides que tienen una actividad contra los insectos utilizados en su mayoría para la fabricación de repelentes. (Cuadro No. 6)
3. La cuantificación espectrofotométrica se realizó a 417 nm de flavonoides expresados como rutina, en cada uno de los extractos etanólicos se evidencio una elevada cantidad de flavonoides en los *Tagetes* sp con 11.03 ppm (17.67 %), en el *Tagetes multiflora* con un 17.36 ppm (30.74 %) y en el *Tagetes zipaquirensis* con un 4.81 ppm equivalente a un (6.90 %), reportados como principio activo.

4. En el análisis cualitativo de cromatografía de capa fina se evidenció la presencia de tres manchas cromatográficas en *Tagetes* sp perteneciente a los flavonoides isoramnetina Rf 0.50, glucósidos Rf 0.60 y la quercetina Rf 0.68. En los *Tagetes multiflora* se observó la presencia de seis flavonoides como la isoramnetina glucósidos Rf 0.13; 0.20; 0.25 y 0.35, rutina Rf 0.58 y ácido fenólico Rf 0.74 (Brunet, 2003) y en los *Tagetes zipaquirensis* se detectó la presencia de tres flavonoides pertenecientes a Rutina Rf 0.51, ácido clorangénico Rf 0.64 y ácido fenólico Rf 0.74. (Fotografía No. 7, No. 8, No. 9)

5. En la cuantificación de flavonoides por HPLC se evidenció una mayor concentración de flavonoides, comparándolos con el análisis cuantitativo espectrofotométrico, dando como resultado en los *Tagetes* sp con 31.04 ppm, en los *Tagetes multiflora* con 136.94 ppm y en los *Tagetes zipaquirensis* con un 16.51 ppm, para lo cual se concluye que el mejor método para cuantificar flavonoides es el HPLC permitiendo obtener concentraciones más altas del principio activo para posibles investigaciones.(Cuadro No. 10)

CAPÍTULO V

2. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio de los *Tagetes* con la finalidad de promover nuevos principios activos para la realización de modernos fármacos por el elevado porcentaje de aceites esenciales.
2. Continuar con el estudio de los *Tagetes* que por su gran actividad insecticida se podría elaborar insumos agrónomos que ayudarían al mejoramiento de los cultivos y a la calidad de vida de las planta.

BIBLIOGRAFÍA

ABRIL, N y otros. Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. (Luventicus). Vol. 3, Córdoba-Argentina, pp 1-8. Mayo-Agosto 2012

AGUIRRE, R. Etnobotánica de Asteraceae. (Boletín de la Sociedad Botánica de México). Vol. 83, México, pp 30-35. Diciembre 2008

ARIZA, L y otros. Aportes botánicos de las Asteraceae. 3a ed, Buenos Aires-Argentina. CAL. 2005, pp 95-102

BALDEÓN, Ximena. Actividad insecticida de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Tagetes terniflora* y *Tagetes zipaquirensis* sobre *premnnotrypes vorax*. (Tesis). (Bioq Farm). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 2011, pp 36-37

BARAJAS, J. Propiedades plaguicidas de cinco especies del género *Tagetes*. (Tesis). (Maestría en ciencias manejo agroecológico de plagas y enfermedades). Instituto Politécnico Nacional, Facultad de Ciencias, Escuela de Ingeniería Química. Yautepec-México. 2009, pp 3-20

BARKOVICH, M. Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento, Barcelona-España. Axis. 2007, pp 63-69

BIBLIOTECA VIRTUAL DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009.

http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tagetes_lucida&id=8002

2014/03/04

BRUNET, V. y otros. Análisis de cromatografía y la comparación en capa fina de flavonoides. Actividad del extracto caléndula (caléndula officinalis). 5ª ed. Buenos Aires-Argentina. CAL. 2003. pp 96-98

CALLE, S. Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales. (Tesis). (Ing. Química Industrial). Universidad Politécnica de Catalunya, Facultad de Ciencias. Escuela de Ingeniería Química. Barcelona-España. 2011, pp 52-54

CAMACHO, Danny. Determinación de la actividad insecticida del shampoo con extracto de Sambucus nigra L. Franseria artemisioides W, y Tagetes Zipaquirensis H en Ctenocephalides canis. (Tesis). (Bioq Farm). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2011, pp 31-33

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BIOFLAVONOIDES. Funciones de los Flavonoides en las plantas. 2011.

http://centrodeartigo.com/articulos-utiles/article_105624.html

2014/08/09

CARRIÓN, A y otros. Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica. (Tesis). (Bioq Farm). Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Cuenca-Ecuador. 2010, pp 130-135

CARTAYA, O y otros. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. (Redalyc). Vol. 22, La Habana-Cuba, pp 5-14. Abril-Mayo 2001

CASTRO, A. Origen y naturaleza de los Tagetes. (Gayana Botánica). Vol. 10, Chile, pp 3-7. Junio- Octubre 2012

**CENTRO DE CONOCIMIENTO TEÓRICO Y CURSOS PRÁCTICOS DE PNI
CÍNICA Y TERAPIA NUTRICIONAL.** Flavonoides. 2010

<http://www.naturafoundation.es/monografie/Flavonoides.html>

2014/05/20

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATAN, La Familia Asteraceae. 2010

http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/2010/diciembre/la-familia-asteraceae

2014/07/18

CHANDLER, S. Técnicas de HPLC. Francia. 2009, pp 8-9

DEL VITTO, L y otros. Asteraceas de Importancia Económica y Ambiental. Valencia-España. (Ardeola). 2011, pp 102-118

ECO AGRICULTOR. Fitoterapia cómo recolectar las plantas medicinales. 2012

<http://www.ecoagricultor.com/2012/12/fitoterapia-como-recolectar-secar-almacenar-y-usar-plantas-medicinales/>

2014/03/20

ESCOBAR, P y otros. Composición química y actividad anti-tripanosomal de aceites esenciales obtenidos de Tagetes (Fam. Asteraceae), recolectados en Colombia. Bogotá-Colombia. 2013, pp 3-7

FRANCO, J. Diversidad florística medicinal altoandina y propuesta de aprovechamiento de especies endémicas como recurso terapéutico del departamento de Tacna. (Tesis). (Biólogo). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Tacna-Perú. 2003, pp 17-19

FRONDA. Recolección y conservación de las plantas culinarias. 2013

<http://www.fronda.com/recoleccion-y-conservacion-de-las-plantas-culinarias>

2014/10/02

GÓMEZ, R y otros. Cromatografía principios y aplicaciones. 2004, pp 11-12

<https://es.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones>

2014/06/15

HARO, Daniel. Taninos y Flavonoides. Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador. Quito. pp 6-10

HERBARIO DE LA UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA. Composición química de las Asteraceae. 2004

<http://www.unavarra.es/herbario/htm/Compositae.htm>

2014/02/01

HERBOLARIA. Maceración de las plantas vegetales. 2005.

<http://herbolaria.wikia.com/wiki/Maceraci%C3%B3n>

2014/09/09

JARAMILLO, Ángela. Plantas medicinales en los jardines de las veredas mancilla, la tribuna, pueblo viejo y tierra morada. (Tesis). (Bióloga). Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Bogotá-Colombia. 2003, pp 52-59

LEGAZ, E y otros. Introducción y práctica de laboratorio cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter. (Reduca). Vol. 32, Madrid-España, pp 7-8

LOCK, O. Análisis Fitoquímico y metabolitos secundarios. 4a ed, Lima-Perú. Arnaldoa. 2012, pp 50-51

MARTINEZ, A. Flavonoides. 2a ed, Medellín-Colombia, Caldasia. 2005, pp 18-24

MONTES, R y otros. Propiedades antifúngicas en especies del género Tagetes. (Boletín de la Sociedad Botánica de México). Vol. 34, Yau-tepec-México, pp 85-91. Agosto-
Noviembre 2011

NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE. Clasificación de la familia Asteraceae. 2000

<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=Asteraceae>

2014/05/24

OZORES, M. Principios de la cromatografía. Laboratorio de técnicas instrumentales UVA. Valladolid-España. Espasa. 2012, pp 10-12

PALACIOS, María. Introducción a la Farmacognosia. Universidad Católica del Lima-Perú. Andorra. 2009, pp 8-10

PEÑA, Claudia. Determinación de cenizas totales o residuo mineral. Cuba. Cubarte. 2010, pp 20-23

PÉREZ, F y otros. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Aplicación de compuestos orgánicos. Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 2009. pp 11-25

PETENATTI, M. Control de calidad de productos vegetales. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. (Multequina). Vol. 18, San Luis-Argentina, pp 36-42. Julio-Diciembre 2013

PORTAL EDUCATIVO DE LA UNAD. Operaciones Básicas. Lavado – Limpieza y Desinfección. 2003

http://datateca.unad.edu.co/contenidos/215080/Modulo/exe_215080_Mod/leccin_ochoope_racionesbasicaslavadolimpiezaydesinfeccin.html

2014/08/01

PORTAL INSTRUMET, Espectrofotometría.

<http://www.calibracion.com.mx/espectrofotometro.html>

2014/03/21

PORTAL QUIMINET. Cromatografía líquida de Alta Eficiencia.

<http://www.quiminet.com/articulos/que-es-la-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-hplc-14764.htm>

2014/07/25

PROGRAMA NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS. Tagetes multiflora Kunth.
2014.

<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?423954>

2014/10/31

RIVERA, L. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). 9a ed, Chicago-Estados Unidos. Baileya. 2004, pp 1-2

SALAZAR, J y otros. Los Flavonoides en el Instituto de Química, una relación histórica. 5a ed, Coyoacán-México. Santillana. 2011, pp 63-64 y 915

SERRATO, M. Investigación documental sobre Tagetes para dimensionar su origen y diversidad genética en México. (Multequina). Vol. 24, Chapingo-México, pp 1-5. Enero-Mayo 2010

SILVA, Carolina. Cuantificación de los alcaloides de Berberis halliii “casarilla” Sector la Josefina San Isidro del cantón Guano provincia de Chimborazo. (Tesis) (Bioq Farm). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2010, pp 13-23

TÉLLEZ, M. Fundamentos de espectrofotometría. 2a ed, Barcelona-España. Encatala. 2008, pp 2-8

TEXTOS CIENTÍFICOS, Métodos cromatográficos. 2007

<http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia>

2014/10/03

TOASA, G y otros. Taxonomía de las especies endémicas del Ecuador. 2a ed, Galápagos-Ecuador. Axis. 2011, pp 28-32

TORRES, C. Procedimiento para la Identificación Taxonómica de Especies Vegetales. (Santillana). Vol. 10, México, pp 1-5. Abril-Mayo 2006

URIBE, R. Cromatografía. 2013. pp 10-15

www.udea.edu.co/portal/page/portal/bibliotecaSedesDependencias/Departamentos/Cromatografia-farmacologia-toxicologia-medicina-udea.pdf

2014/09/08

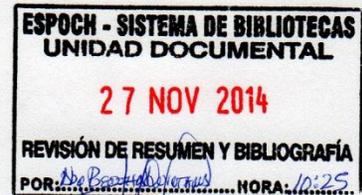
VALENCIA, C. Introducción a la Cromatografía. (Alhambra). Vol. 12, Madrid, 54-56. Junio-Octubre 2010

VALENCIA, P. Propiedades Físico-Químicas de los vegetales. 3e ed, Bogotá-Colombia. Rionegro. 2006, pp 21-22

VÁZQUEZ, A y otros. Determinación de compuestos orgánicos volátiles de *Tagetes filifolia* Lag. (Asteraceae) proveniente de Córdoba (Argentina) utilizando análisis por HS-SPME. (Redalyc). Vol, 12, Santiago-Chile, pp 143-149. Enero-Marzo 2013

VILLAGRÁN, C y otros. Ciencia Indígena de los Andes del Norte de Chile. Ed. Santiago de Chile. Melior. 2004, pp 217-219

WAGNE, H. & BLAD, S. Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas. 2 ed, Munich-Alemania. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1996, p.p. 221-223.



CAPÍTULO VI

6. ANEXOS

ANEXO No. 1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS TAGETES

Quito DM, 10 de Octubre del 2013

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

1. *Tagetes zypaquirensis* Bonpl.

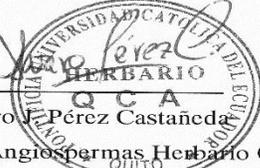
- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
- Género: *Tagetes* L.
- Especie: *zypaquirensis* Bonpl.

2. *Tagetes multiflora* Kunth

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
- Género: *Tagetes* L.
- Especie: *multiflora* Kunth

3. *Tagetes* sp.

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
- Género: *Tagetes* L.
- Especie: indeterminada


Álvaro Pérez Castañeda
Curador de Angiospermas Herbario QCA

ANEXO No. 2. MUESTREO Y RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA



FOTOGRAFÍA No. 10. MUESTRAS DE LOS TAGETES CONSERVADAS PARA SU IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

ANEXO No. 3. MACERACIÓN DE LOS TAGETES



FOTOGRAFÍA No. 11. CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*

ANEXO No. 4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS



FOTOGRAFÍA No. 12. REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*



FOTOGRAFÍA No. 13. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*



FOTOGRAFÍA No. 14. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*

ANEXO No. 5. CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA



FOTOGRAFÍA No. 15. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*



FOTOGRAFÍA No. 16. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*



FOTOGRAFÍA No. 17. DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*

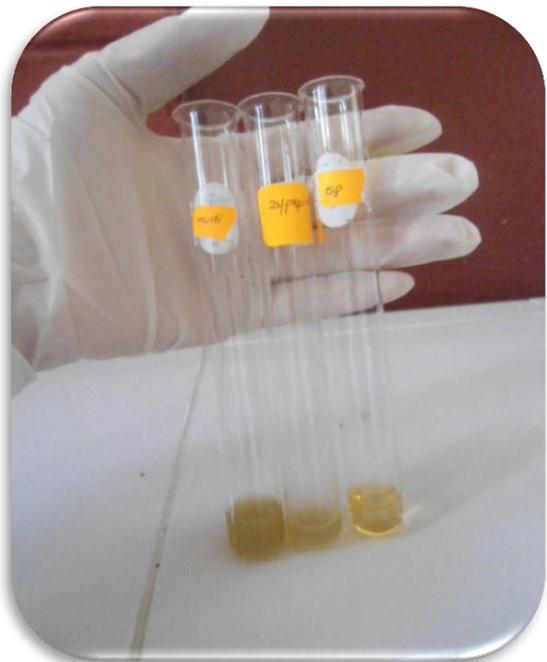


FOTOGRAFÍA No. 18. DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*

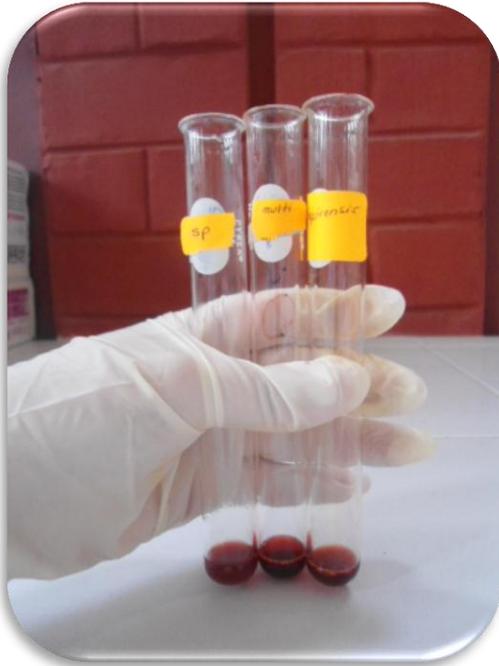
ANEXO No. 6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS



FOTOGRAFÍA No. 19. ENSAYO DE ESPUMA



FOTOGRAFÍA No. 20. ENSAYO DE RESINA



FOTOGRAFÍA No. 21. ENSAYO SHIDONA



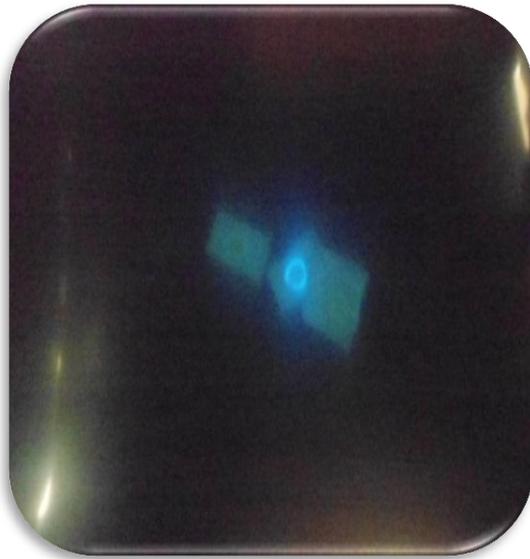
FOTOGRAFÍA No. 22. ENSAYO DE BORNTRAGER



FOTOGRAFÍA No. 23. ENSAYO DE ROSENTHALER



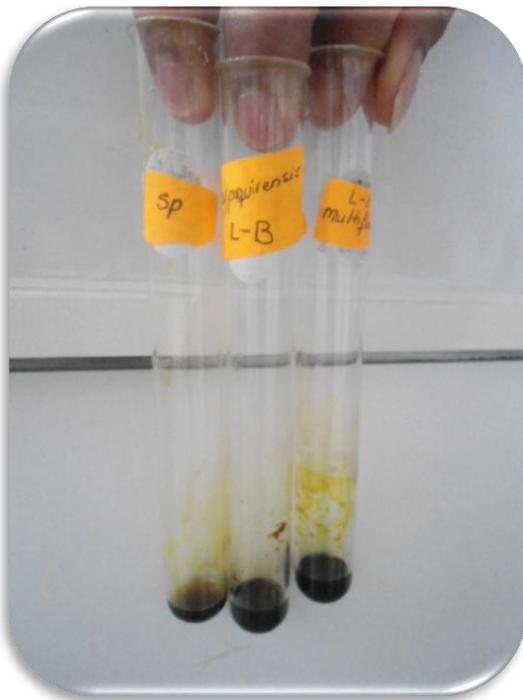
FOTOGRAFÍA No. 24. ENSAYO DE SUDAN



FOTOGRAFÍA No. 25. ENSAYO DE CATEQUINAS



FOTOGRAFÍA No. 26. ENSAYO DE BALJET



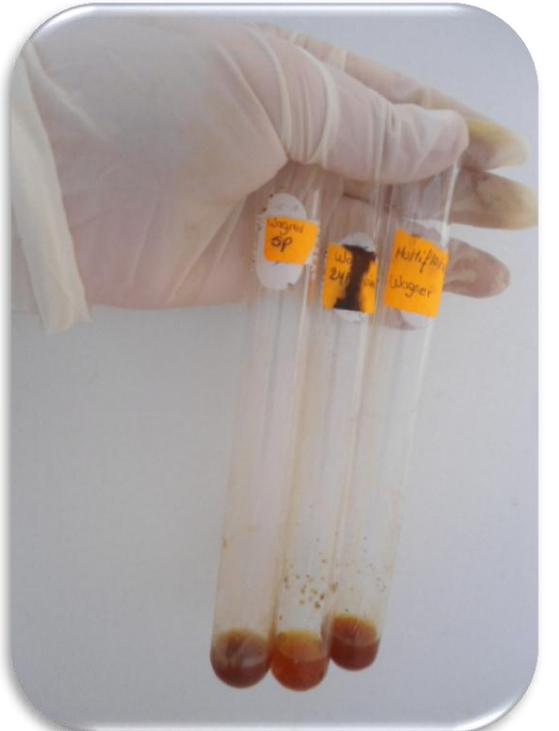
FOTOGRAFÍA No. 27. ENSAYO DE LIEBERMAN-BUCHARD



FOTOGRAFÍA No. 28. ANTOCIANAS

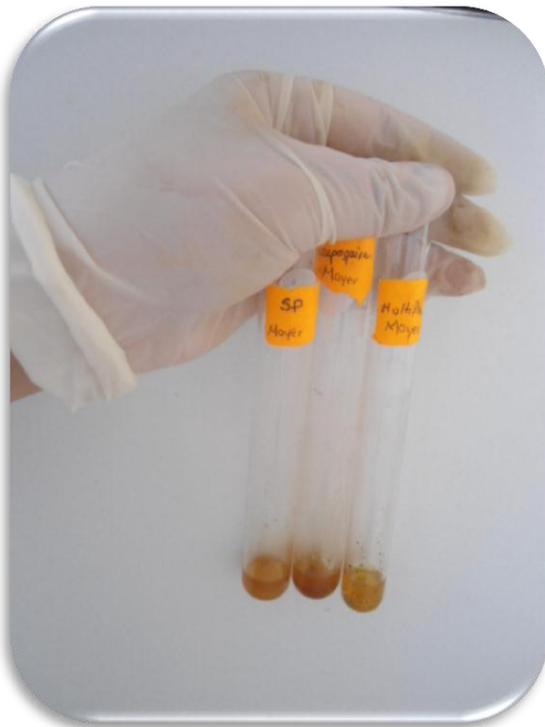


FOTOGRAFÍA No. 29. ENSAYO DE FEHLING

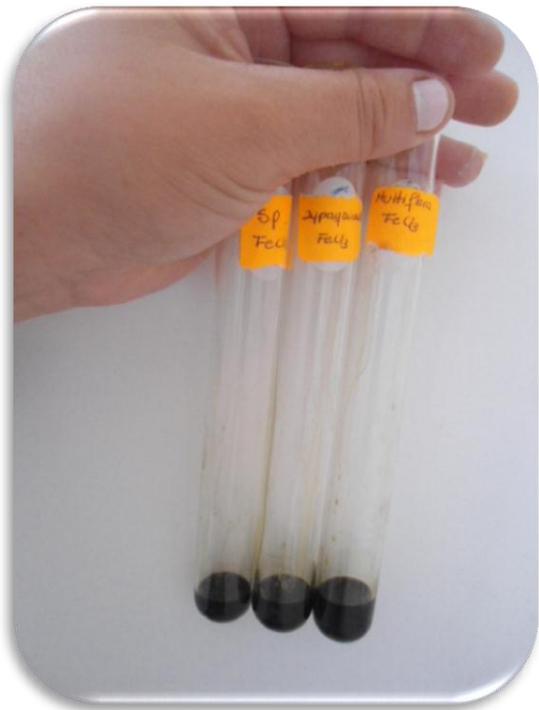


FOTOGRAFÍA No. 30. ENSAYO DE DRAGENDORFF

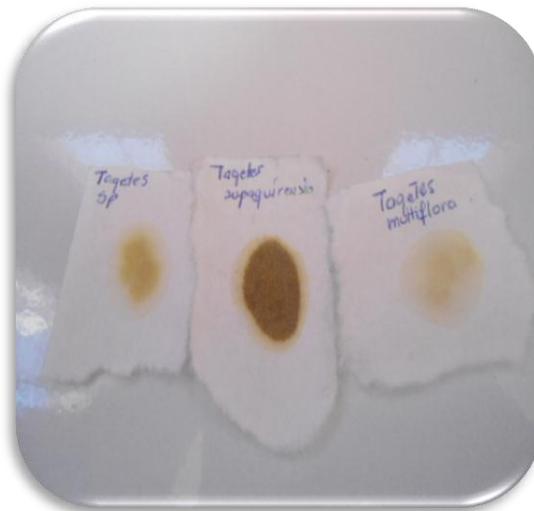
FOTOGRAFÍA No. 31. ENSAYO DE WAGNER



FOTOGRAFÍA No. 32. ENSAYO DE MAYER



FOTOGRAFÍA No. 33. ENSAYO DE CLORURO FERRICO



FOTOGRAFÍA No. 34. ENSAYO DE CATEQUINAS

ANEXO No.7. ANÁLISIS ESPECTOFOTOMÉTRICO

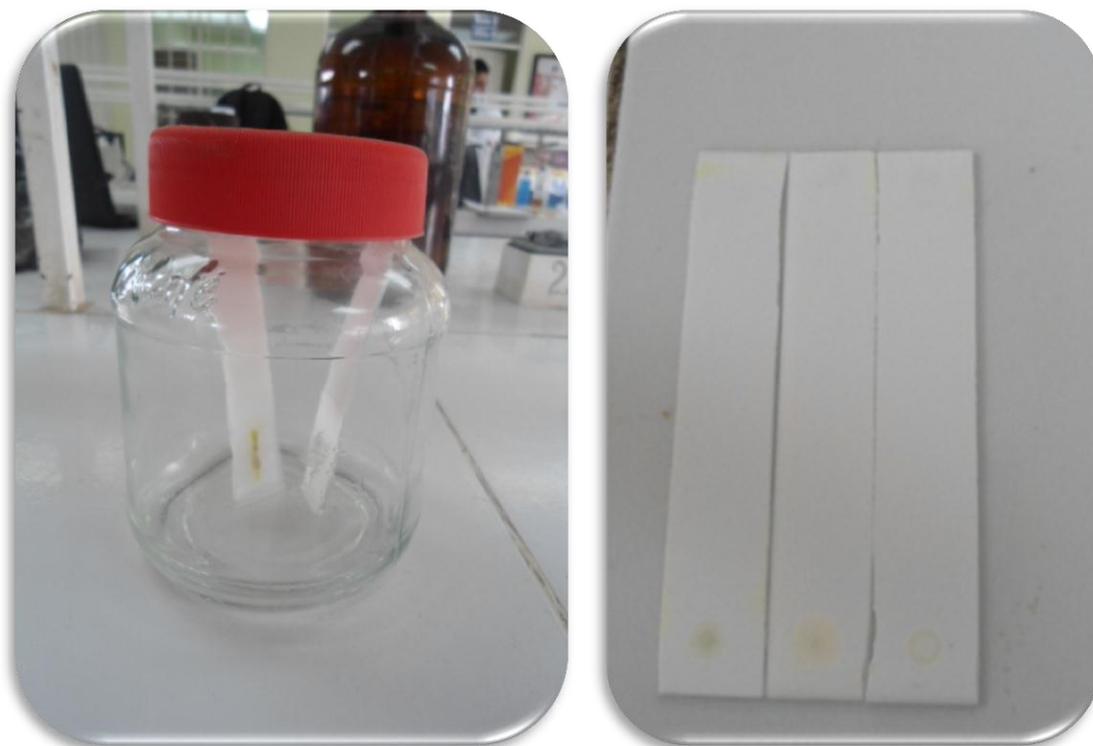


FOTOGRAFÍA No. 35. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

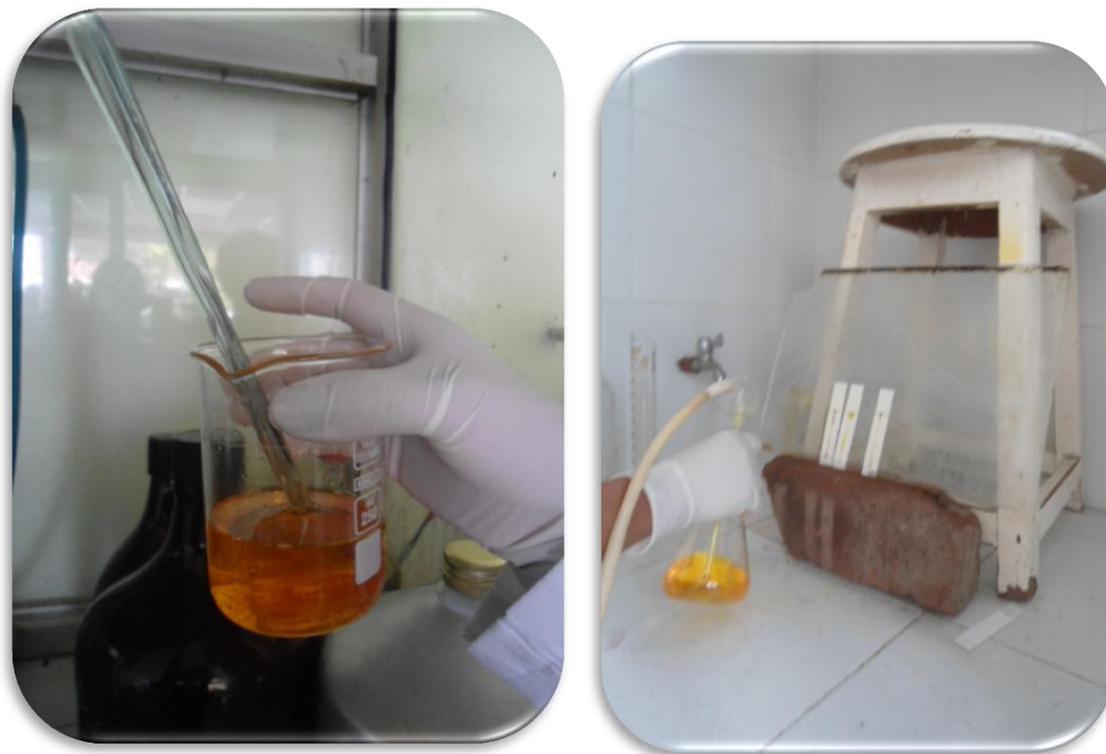


FOTOGRAFÍA No. 36. REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

ANEXO No. 8. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA



FOTOGRAFÍA No. 37. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE LOS *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis*



FOTOGRAFÍA No. 38. REVELADO DE LAS CROMATOGRAFÍAS CON SULFATO CERIO



FOTOGRAFÍA No. 39. IDENTIFICACION DE RF MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

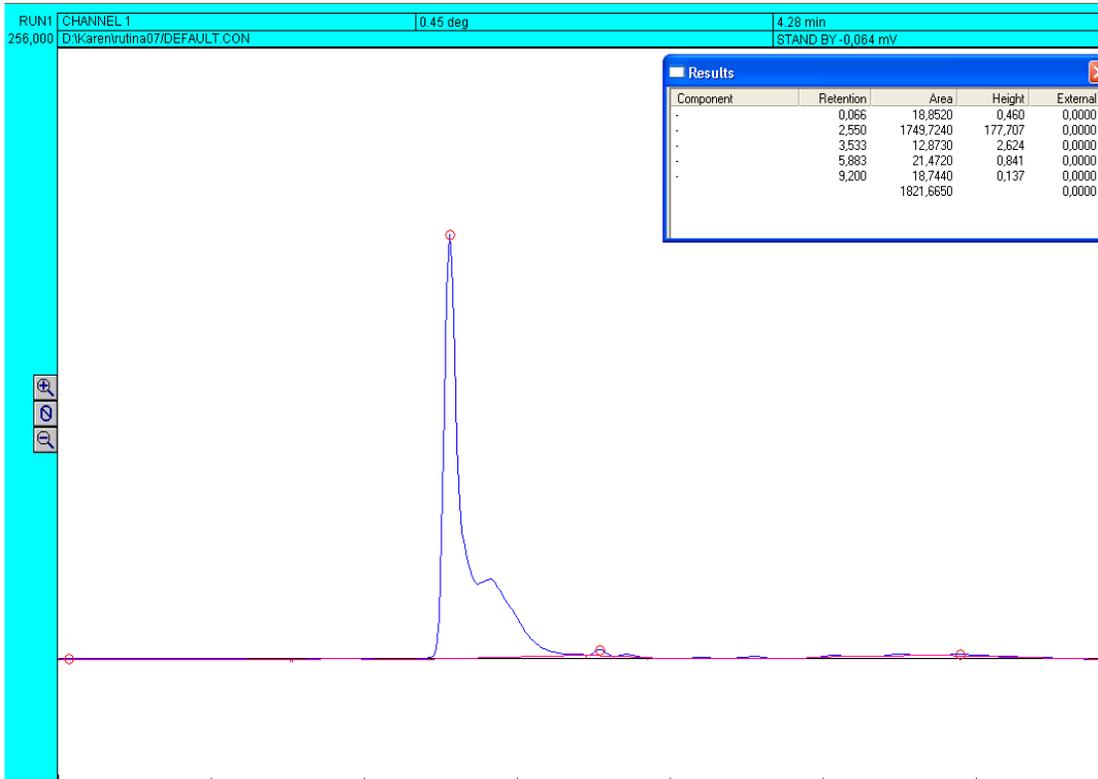
ANEXO No. 9. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS EXTRACTOS EN EL HPLC



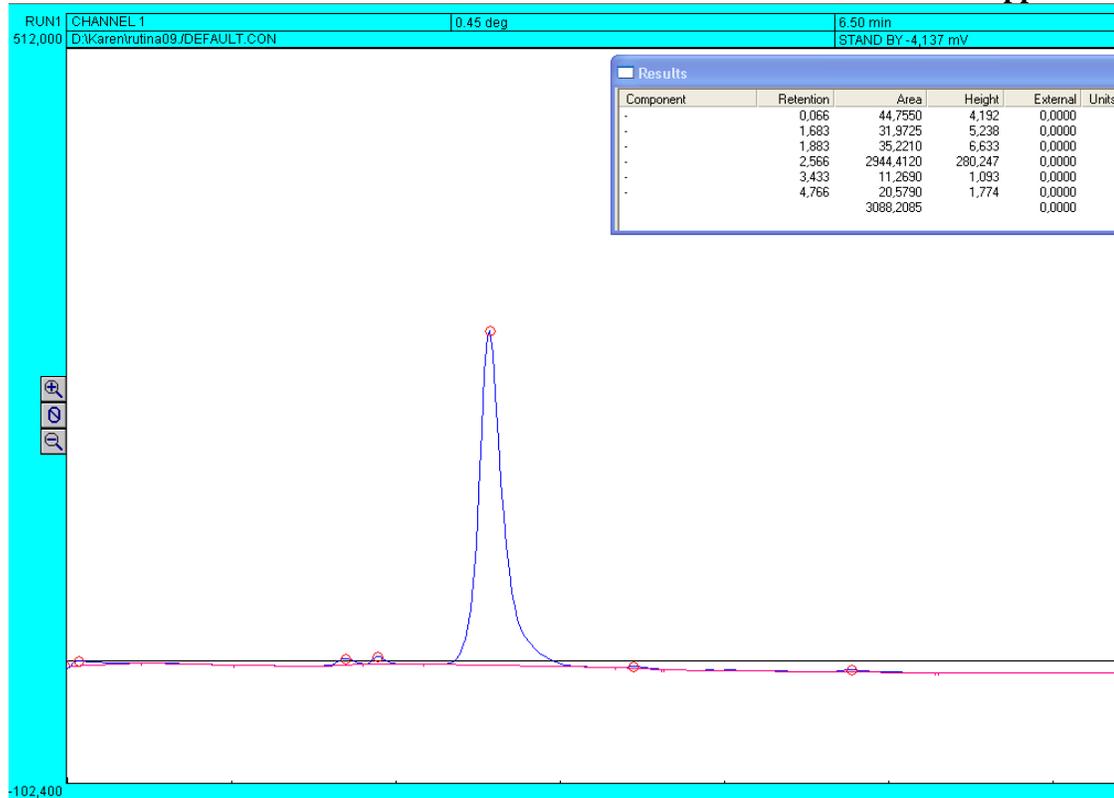
FOTOGRAFÍA No. 40. PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES



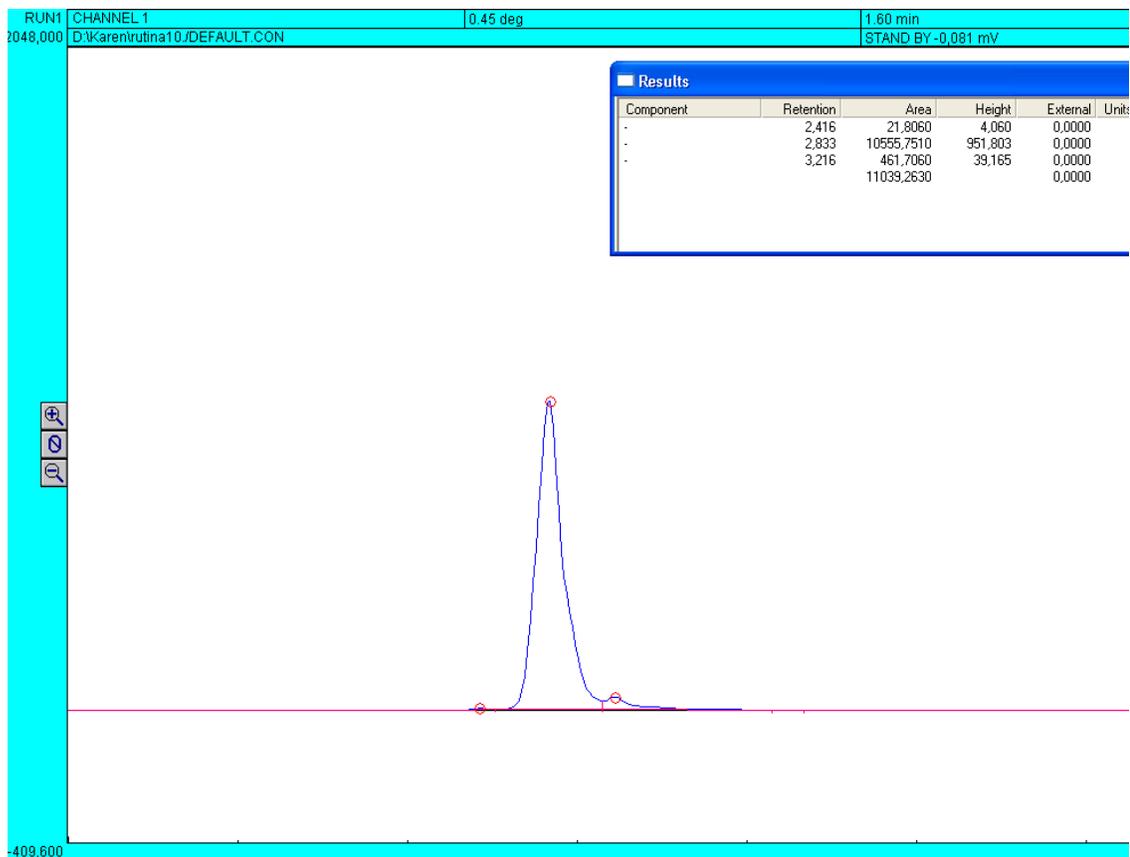
FOTOGRAFÍA No. 41. FILTRADO DE LAS MUESTRAS



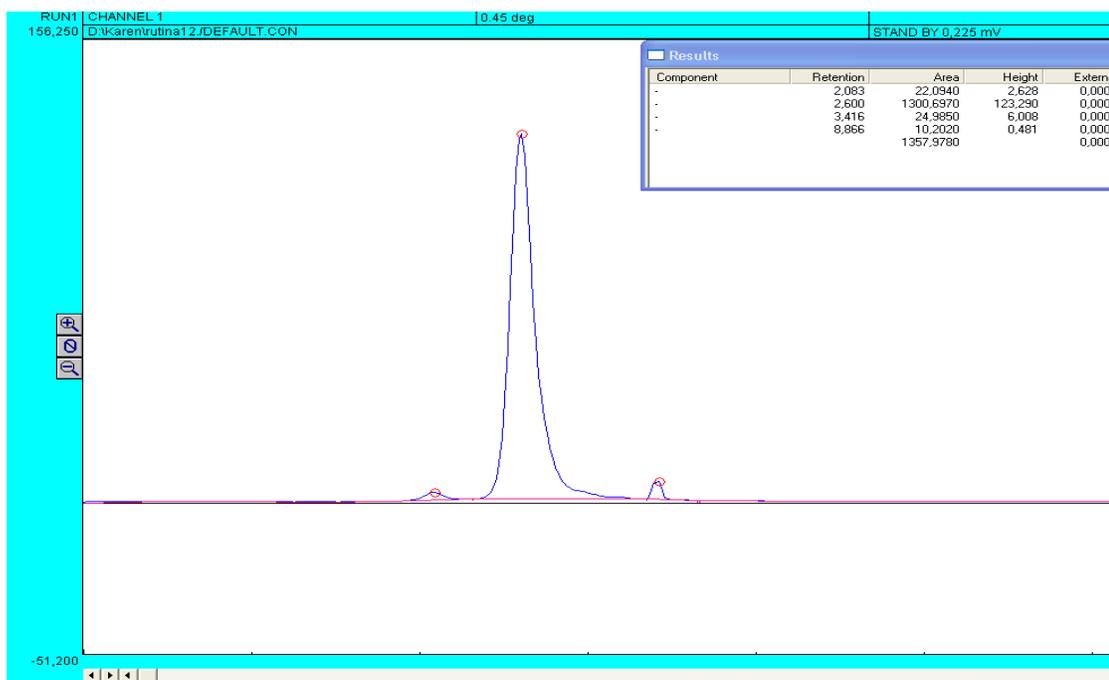
FOTOGRAFÍA No. 42. CROMATOGRAMA DEL ÉSTANDAR RUTINA A 50 ppm



FOTOGRAFÍA No. 43. CROMATOGRAMA DE TAGETES SP 10 ppm



FOTOGRAFÍA No. 44. CROMATOGRAMA DE TAGETES ZIPAQUIRENSIS 10 ppm



FOTOGRAFÍA No. 45. CROMATOGRAMA DE TAGETES MULTIFLORA 10 ppm

