



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Desmodium adscendens* (Hierba del infante) Y ELABORACIÓN DE UNA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DEL METABOLITO DE MAYOR PRESENCIA”**

**TESIS DE GRADO**

**Previo a la Obtención del Título de**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR**

**ALEXIS HERNÁN SALAZAR TOAQUIZA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2015**



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Desmodium adscendens* (Hierba del infante) Y ELABORACIÓN DE UNA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DEL METABOLITO DE MAYOR PRESENCIA”**

**TESIS DE GRADO**

**Previa a la Obtención del Título de**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR: SALAZAR TOAQUIZA ALEXIS HERNÁN**

**TUTOR: Dr. CARLOS ESPINOZA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2015**

# ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

## FACULTAD DE CIENCIAS

### ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: “ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Desmodium adscendens* (Hierba del infante) Y ELABORACIÓN DE UNA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DEL METABOLITO DE MAYOR PRESENCIA”, de responsabilidad del señor Alexis Hernán Salazar Toaquiza, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA      FECHA

Dr. Carlos Espinoza

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Carlos Pilamunga

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

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

Yo, **Alexis Hernán Salazar Toaquiza**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta investigación **“ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Desmodium adscendens* (Hierba del infante) Y ELABORACIÓN DE UNA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DEL METABOLITO DE MAYOR PRESENCIA”**. El patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

**ALEXIS HERNÁN SALAZAR TOAQUIZA**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por su bendición incondicional y haberme otorgado una familia maravillosa. A mis padres Mario y Mónica quienes han creído en mí siempre, demostrándose primero como amigos en mis tropiezos, y cumpliendo el mejor papel de padres con su ejemplo de superación, sacrificio, y llenando mi corazón siempre de humildad, sencillez, amor, que orgullosamente me atrevo a decir gracias a Dios por darme los mejores padres.

A Pamela por su apoyo y amor incondicional y por ser mi gran inspiración en la vida,

A la Dra. Cumandá Játiva por el apoyo brindado a lo largo de la carrera, por su tiempo, amistad, consejos y conocimientos transmitidos. Al Dr. Carlos Pilamunga y Dr. Carlos Espinoza por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección del presente trabajo de investigación.

Alexis Salazar

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación lo dedico a mis padres, Mónica Toaquiza, Mario Salazar por ser mi ejemplo de constancia y perseverancia, a mi hermana por brindarme su amor incondicional.

A mi abuelita Eufemia Vallejo que desde el cielo me bendice, cuida, protege, por ser el motor de inspiración para alcanzar todas mis metas y ser el mejor ejemplo de humildad.

A Katty Riofrío por caminar juntos en este sueño ahora hecho realidad.

Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

Salazar Alexis

## ÍNDICE GENERAL

|   |       |
|---|-------|
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....                      | viii  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                           | x     |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                            | xii   |
| ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS .....                       | xiii  |
| ÍNDICE DE ANEXOS .....                            | xiv   |
| RESUMEN .....                                     | xv    |
| SUMMARY .....                                     | xvi   |
| INTRODUCCIÓN .....                                | xvii  |
| SITUACIÓN PROBLEMÁTICA .....                      | xvii  |
| FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....                    | xvii  |
| JUSTIFICACIÓN TEÓRICA .....                       | xvii  |
| JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA .....                      | xviii |
| OBJETIVOS .....                                   | xviii |
| OBJETIVO GENERAL .....                            | xviii |
| OBJETIVO ESPECÍFICO .....                         | xviii |
| CAPÍTULO I  |       |
| 1. MARCO TEÓRICO .....                            | 1     |
| 2. MARCO EPISTEMOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN ..... | 1     |
| 1.2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN .....       | 2     |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.2.1.   | Actividad de los Flavonoides   | 6  |
| 1.2.1.1. | Clasificación  | 6  |
| 1.2.1.2. | Determinación Cromatográfica del Canferol – Quercetina                     | 7  |
| 1.2.1.3. | Infrarrojo de Flavonoides  | 9  |
| 1.2.1.4. | Espectroscopía Infrarroja de los Flavonoides ( <i>Cheilanthes Glauca</i> ) | 10 |
| 1.2.2.   | Triterpenos  | 11 |
| 1.2.2.1. | Triterpenos Pentacíclicos  | 12 |
| 1.2.2.2. | Glicósidos   | 13 |
| 1.2.2.3. | Técnicas de Extracción de Saponinas  | 15 |
| 1.2.2.4. | Preparación de Extractos de Saponinas                                      | 16 |
| 1.2.2.5. | Infrarrojo de Saponinas  | 20 |
| 1.2.3.   | Análisis General de Drogas por Cromatografía de Capa Fina y Columna        | 22 |
| 1.2.3.1. | Cromatografía en Columna   | 23 |
| 1.3.     | BASE TEÓRICA   | 24 |
| 1.3.1.   | Descripción del Vegetal  | 24 |
| 1.3.1.1. | Desmodium  | 24 |
| 1.3.1.2. | Manayupa   | 25 |
| 1.3.2.   | Taxonomía  | 25 |
| 1.3.2.1. | Nombre Científico  | 25 |
| 1.3.2.2. | Nombre Común   | 25 |
| 1.3.2.3. | Familia  | 25 |
| 1.3.2.   | Usos Medicinales   | 25 |



|  |    |
|--|----|
| 1.3.3.1. Broncodilatador .....                   | 26 |
| 1.3.3.2. Diurético .....                         | 26 |
| 1.3.3.3. Antiinflamatoria .....                  | 26 |
| 1.3.3.4. Emenagoga .....                         | 26 |
| 1.3.3.5. Depurador Sanguíneo .....               | 27 |
| 1.3.3.6. Tratamiento de Heridas .....            | 27 |
| 1.3.4. Composición Química .....                 | 27 |
| 1.3.5. Marcha Fitoquímica.....                   | 27 |
| 1.3.6. Principio Activo .....                    | 28 |
| 1.3.7. Extracto .....                            | 28 |
| 1.3.8. Extracto Etanólico .....                  | 28 |
| 1.3.9. Metabolitos .....                         | 28 |
| 1.3.10. Cromatografía .....                      | 30 |
| 1.3.10.1. Cromatograma .....                     | 30 |
| 1.3.10.2. Técnicas Cromatográficas .....         | 30 |
| 1.3.10.3. Cromatografía en Plano (TLC) .....     | 30 |
| 1.3.10.4. Cromatografía Preparativa .....        | 31 |
| 1.3.10.5. Cromatografía Bidimensional .....      | 31 |
| 1.3.10.6. Cromatografía Preliminar .....         | 31 |
| 1.3.10.7. Reveladores más Comunes para TLC ..... | 31 |
| 1.3.10.8. Manchas .....                          | 32 |
| 1.3.10.9. Manchas (Cola) .....                   | 32 |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.3.10.10. Frente de la Fase Móvil .....                         | 32        |
| 1.3.10.11. Distancia de la Fase Móvil .....                      | 33        |
| 1.3.10.12. Distancia del Solute .....                            | 33        |
| 1.3.10.13. Factor de Retardo (RF) .....                          | 33        |
| 1.3.10.14. Cromatografía en Columna .....                        | 34        |
| 1.3.11. Infrarrojo .....   | 34        |
| 1.3.12. El HPLC o Cromatografía Líquida de Alta Resolución ..... | 34        |
| 1.3.13. Monitoreo .....  | 34        |
| 1.3.14. Eluir .....  | 35        |
| 1.3.15. Purificación .....                                       | 35        |
| 1.3.16. Polaridad de Solventes .....                             | 35        |
| 1.3.17. Eficacia.....  | 37        |
| 1.3.18. Eficiencia .....   | 37        |
| 1.3.19. Resolución .....   | 37        |
| 1.3.20. Sólidos Pulvulentos .....                                | 37        |
| 1.3.21. Sustancias Aceitosas .....                               | 37        |
| 1.3.22. Variable Dependiente .....                               | 38        |
| 1.3.23. Variable Independiente .....                             | 38        |
| <br><b>CAPÍTULO II</b>   |           |
| <b>METODOLOGÍA .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>2.1. UNIDAD EXPERIMENTAL .....</b>                            | <b>39</b> |
| 2.1.1. Química .....   | 39        |

|   |    |
|---|----|
| 2.2. TIPO DE DISEÑO .....   | 39 |
| 2.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS .....   | 40 |
| 2.3.1. Tipo de Investigación .....  | 40 |
| 2.4. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN .....  | 41 |
| 2.5. RECURSOS MATERIALES .....  | 41 |
| 2.5.1. Recolección del Vegetal .....  | 41 |
| 2.5.2. Equipos .....  | 41 |
| 2.5.3. Materiales .....   | 42 |
| 2.5.4. Reactivos .....  | 42 |
| 2.6. PARTE EXPERIMENTAL .....   | 43 |
| 2.6.1. Comprobación Taxonómica e Identificación Botánica .....                    | 43 |
| 2.6.2. Factor de Estudio .....  | 43 |
| 2.6.3. Preparación del Extracto Etanólico .....                                   | 43 |
| 2.6.4. Evaluación de las Propiedades Físicas y Químicas del Extracto Botánico ... | 44 |
| 2.6.4.1. Determinación de los Requisitos Organolépticos .....                     | 44 |
| 2.6.4.2. Determinación de los Requisitos Físicos .....                            | 44 |
| 2.6.4.3. Determinación del Peso del Extracto Etanólico .....                      | 45 |
| 2.6.4.4. Marcha Fitoquímica .....   | 45 |
| 2.6.5. Análisis Cromatográfico Preliminar .....                                   | 46 |
| 2.6.6. Fraccionamiento en Columnas del Extracto Etanólico .....                   | 46 |
| 2.6.7. Monitoreo de las Fracciones en Capa Fina .....                             | 46 |
| 2.6.8. Tratamiento de las Fracciones de las Columnas C1 .....                     | 48 |

|   |    |
|---|----|
| 2.6.8.1. Cromatografía de las Fraccione 1, 2,3,4: en Hexano (Cromatografía TLC2)        | 48 |
| 2.6.8.2. Cromatografía de las Fracciones 4*, 5, 6, 7, 8                                 | 48 |
| 2.6.8.3. Cromatografía de las Fracciones 8* y 9   | 49 |
| 2.6.8.4. Cromatografía de las Fracciones 10 y 11  | 49 |
| 2.6.8.5. Cromatografía de las Fracciones 12 y 13  | 49 |
| 2.6.8.6. Tratamiento de la Fracción 14 de C1  | 52 |
| 2.6.8.7. Tratamiento de las Fracciones 15, 16, 17, 18 de C1                             | 53 |
| 2.6.8.8. Tratamiento de las Fracciones 19, 20, 21, 22, 23 de C1                         | 54 |
| 2.6.9. Placas de las Cromatografías en Capa Fina (TLC) y de Columna Cromatográfica (CC) | 54 |
| 2.6.9.1. Placa Cromatográfica Preliminar del Extracto Etanólico                         | 54 |
| 2.6.9.2. Separación del Extracto Etanólico en Columna (C1)                              | 55 |
| 2.6.9.3. Placas Cromatográficas de las Fracciones (0-23) del Extracto Etanólico         | 56 |
| <b>CAPÍTULO III</b>   |    |
| 3.1. ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS                                 | 59 |
| 3.1.1. Análisis de la Especie Vegetal   | 59 |
| 3.1.2. Análisis del Extracto Etanólico  | 59 |
| 3.1.3. Análisis Físico – Químico y Cromatográfico del Extracto Etanólico                | 60 |
| 3.1.3.1. Determinación de las Características Físicas y Químicas                        | 60 |
| 3.1.4. El Análisis Cromatográfico Preliminar  | 61 |
| 3.1.5. Análisis del Fraccionamiento del Extracto Etanólico                              | 62 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.6. Monitoreo de Fracciones .....      | 62 |
| 3.2. PRUEBAS DE HIPÓTESIS .....           | 71 |
| 3.3. PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS ..... | 71 |
| CONCLUSIONES .....                        | 73 |
| RECOMENDACIONES .....                     | 75 |
| BIBLIOGRAFÍA .....                        | 76 |
| ANEXOS .....                              | 79 |

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                                    |                         |
|------------------------------------|-------------------------|
| <b>°C</b>                          | Grados Celsius          |
| <b>Bu(OH)</b>                      | Butanol                 |
| <b>cm</b>                          | Centímetros             |
| <b>Cl<sub>3</sub>CH</b>            | Cloroformo              |
| <b>CeSO<sub>4</sub></b>            | Sulfato de Cerio        |
| <b>Et(OH)</b>                      | Etanol                  |
| <b>EtOAc</b>                       | Acetato de Etilo        |
| <b>g</b>                           | Gramos                  |
| <b>HCl</b>                         | Ácido Clorhídrico       |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | Ácido Sulfúrico         |
| <b>L</b>                           | Litro                   |
| <b>Me(OH)</b>                      | Metanol                 |
| <b>m</b>                           | Metros                  |
| <b>mm</b>                          | Milímetros              |
| <b>mg</b>                          | Miligramos              |
| <b>mg/ ml</b>                      | Miligramo por mililitro |

|             |  |
|-------------|--|
| <b>min</b>  | Minutos                                  |
| <b>ml</b>   | Mililitros                               |
| <b>NaOH</b> | Hidróxido de Sodio                       |
| <b>pH</b>   | Potencial de Hidrógeno                   |
| <b>ppm</b>  | Partes por Millón                        |
| <b>P/V</b>  | Peso por Volumen                         |
| <b>rpm</b>  | Revoluciones por Minuto                  |
| <b>V/V</b>  | Volumen por Volumen                      |
| <b>μl</b>   | Microlitros                              |
| <b>μg</b>   | Microgramos                              |
| <b>UV</b>   | Ultravioleta                             |
| <b>TLC</b>  | Cromatografía de Capa Fina               |
| <b>CC</b>   | Columna Cromatográfica                   |
| <b>λ</b>    | Longitud de Onda                         |
| <b>RF</b>   | Factor de Retardo                        |
| <b>HPLC</b> | Cromatografía Líquida de Alta Resolución |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| FIGURA 1-1. Estructura de la Astragalina y la Cianidina ...   | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| FIGURA 2-1. Flavonoides. Estructura Básica y Tipos .....  | 7                                    |
| FIGURA 3-1. Estructura Básica Canferol - Quercetina .....   | 8                                    |
| FIGURA 4-1. Datos Espectrales UV de Flavonoides de CH, Glauca y sus Productos de Hidrólisis .....   | 8                                    |
| FIGURA 5-1. Espectro IR de la Quercetina .....  | 9                                    |
| FIGURA 6-1. Espectro IR de una Flavona .....  | 9                                    |
| FIGURA 7-1. Estructura <i>Cheilanthes glauca</i> .....  | 10                                   |
| FIGURA 8-1. Estructura Básica Canferol .....  | 11                                   |
| FIGURA 9-1. Estructura Básica Astragalina .....   | 11                                   |
| FIGURA 10-1. Esqueleto Triterpenoide Pentacíclico .....   | 13                                   |
| FIGURA 11-1. Esqueleto Saponinas Esteroidales .....   | 13                                   |
| FIGURA 12-1. Representación Estructural de las Sapogeninas Triterpénicas .....  | 14                                   |
| FIGURA 13-1. Ejemplo de Sapogeninas Glicósidas .....  | 15                                   |
| FIGURA 14-1. Sapogeninas de Quinoa .....  | 16                                   |
| FIGURA 15-1. Sapogenina .....   | 19                                   |
| FIGURA 16-1. Espectro IR de Saponina .....  | 19                                   |
| FIGURA 17-1. Cromatografía de Capa Fina .....   | 33                                   |
| FIGURA 18-1. Propiedades de Solventes más Comunes .....   | 35                                   |
| FIGURA 19-1. Propiedades de Solventes más Comunes .....   | 36                                   |
| FIGURA 20-1. Propiedades de Solventes más Comunes .....   | 36                                   |
| FIGURA 21-3. Espectro Infrarrojo del Compuesto I. (Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero del 2015). .....                     | 63                                   |
| FIGURA 22-3. Espectro Infrarrojo del Compuesto II (C <sub>4</sub> ). (Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero del (2015). ..... | 66                                   |



|  |    |
|--|----|
| FIGURA 23-3. Estructura Básica Quercetina.....   | 66 |
| FIGURA 24-3. Espectro Infrarrojo Representativo de los Compuestos III y IV (C <sub>2</sub> y C <sub>1</sub> ). (Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero del 2015)..... | 67 |
| FIGURA 25-3. Espectro Infrarrojo Representativo de los Compuestos V. (Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias). ESPOCH. Enero del 2015). ....   | 68 |
| FIGURA26-3. Espectro Infrarrojo Representativo de los Compuestos VI (C <sub>3</sub> ). (Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero del 2015.).....                        | 70 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| TABLA 1-1. Bandas Características de Algunos Grupos Orgánicos.....   | 21 |
| TABLA 2-1. Clasificación de los Metabolitos .....  | 29 |
| TABLA 3-2. Equipos.....  | 41 |
| TABLA 4-2. Materiales.....   | 42 |
| TABLA 5-2. Reactivos .....   | 42 |
| TABLA 6-2. Cálculo del Extracto Etanólico.....   | 45 |
| TABLA 7-2. Solventes Adecuado para el Monitoreo y Análisis de las Fracciones en TLC de la Columna C <sub>1</sub> .....   | 47 |
| TABLA 8-2. Resultados de los Rfs en TLC de las Fracciones 8 Y 9 C <sub>1</sub> .....                                     | 49 |
| TABLA 9-2. Solventes Adecuados para el Monitoreo y Análisis de las Fracciones en TLC de la Columna C <sub>2</sub> .....  | 50 |
| TABLA 10-2. Resultados de los Rfs en TLC de las Fracciones 3 Y 18 C <sub>2</sub> .....                                   | 50 |
| TABLA 11-2. Resultados de los Rfs en TLC de las Fracciones 9 y 11 C <sub>2</sub> .....                                   | 51 |
| TABLA 12-2. Solventes Adecuado para el Monitoreo y Análisis de las Fracciones en TLC de la Columna C <sub>21</sub> ..... | 51 |
| TABLA 13-2. Resultados de los Rfs en TLC de las Fracciones 1- 9 C <sub>2</sub> y 10-16 C <sub>2</sub> .....              | 52 |
| TABLA 14-2. Solventes Adecuados de Elución para la Fracción 14 aceitosa C <sub>1</sub> .....                             | 53 |
| TABLA 15-2. Resultados de los Rfs en TLC de las Fracciones 15- 18 C <sub>1</sub> .....                                   | 53 |
| TABLA 16-2. Resultados de los Rfs en TLC de las Fracciones 19 -23 C <sub>1</sub> . .....                                 | 54 |
| TABLA 17-3. Parámetros Físicos – Químicos del Extracto Etanólico .....   | 60 |
| TABLA 18-3. Solventes Adecuado para el Monitoreo y Análisis de las Fracciones en TLC de la Columna C <sub>1</sub> .....  | 62 |

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

|   |    |
|---|----|
| FOTOGRAFÍA 1-2. Prototipo <i>Desmodium molliculum</i> Ubicado en la Parroquia de Guanando del Cantón Guano..... | 25 |
| FOTOGRAFÍA 2-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C <sub>1</sub> ).....                                     | 55 |
| FOTOGRAFÍA 3-2. Columna Cromatográfica del Extracto Etanólico (C <sub>1</sub> ).....                            | 55 |
| FOTOGRAFIA 4-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C <sub>1</sub> ).....                                     | 56 |
| FOTOGRAFÍA 5-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C <sub>1</sub> ).....                                     | 56 |
| FOTOGRAFÍA 6-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C <sub>1</sub> ).....                                     | 57 |
| FOTOGRAFÍA 7-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C <sub>1</sub> ).....                                     | 57 |
| FOTOGRAFÍA 8-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C <sub>1</sub> ) Y(C <sub>2</sub> ).....                  | 58 |
| FOTOGRAFÍA 9-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C <sub>1</sub> ) Y(C <sub>2</sub> ).....                  | 58 |
| FOTOGRAFÍA 10-3. Placa preparativa del extracto Etanólico.....  | 61 |
| FOTOGRAFÍA 11-3. Placa Cromatográfica Bidimensional de la Fracción 3 y 4 C <sub>1</sub> ..                      | 64 |
| FOTOGRAFÍA 12-3. TLC de las Fracciones Clorofílicas 5, 6, 7, 8 (C <sub>1</sub> ).....                           | 64 |
| FOTOGRAFÍA 13-3. TLC de las Fracciones 1 – 18 (C <sub>4</sub> ).....  | 65 |
| FOTOGRAFÍA 14-3. Placa Preparativa de las Fracciones 5,6,7 (C <sub>4</sub> ).....                               | 65 |
| FOTOGRAFÍA 15-3. Cromatografía en Capa Fina de las Fracciones 1- 18 (C <sub>2</sub> ).....                      | 67 |
| FOTOGRAFÍA 16-3. TLC de las Fracciones 15- 19 (C <sub>1</sub> ).....  | 69 |
| FOTOGRAFÍA 17. Prueba de Cloruro Férrico para Taninos.....  | 70 |

## ÍNDICE DE ANEXOS.

|   |    |
|---|----|
| ANEXO N° 1 Recolección del Vegetal en la Parroquia de Guanando..... | 79 |
| ANEXO N° 2 Tratamiento del Vegetal y Obtención del Extracto.....    | 79 |
| ANEXO N° 3 Fraccionamiento y Monitoreo Cromatográfico.....          | 81 |
| ANEXO N° 4 Propiedades Físicas y Químicas.....                      | 82 |
| ANEXO N° 5 UV, IR y HPLC.....                                       | 85 |
| ANEXO N° 6 Espectros Infrarrojos de los Compuestos Puros.....       | 86 |

## RESUMEN

El estudio fitoquímico del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* y la elaboración de una técnica de cuantificación del metabolito de mayor presencia se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), recolectada en la Parroquia de Guanando e identificada en el herbario de la ESPOCH como *Desmodium molliculum*. La metodología utilizada para el extracto fue, macerado del vegetal fresco con etanol al 96%, reducido a 200 ml, recuperada la fase líquida para determinar las propiedades físicas, análisis cromatográfico preliminar, la separación en columna cromatográfica y monitoreo de fracciones en Cromatografía de Capa Fina (TLC). Las mezclas repurificadas, hasta pureza cromatográfica, aplicar espectroscopia Infrarrojo (IR) y Ultra Violeta. Como resultado se obtuvo un líquido verde oscuro de olor herbario y amargo, con densidad 0.1567g/ml. La TLC del extracto etanólico corrida con Hexano: Acetato de Etilo (EtOAc) 1:1 dio manchas redondas separadas, coloraciones azul violeta con Rosenthaler y 5g se cromatografiaron en columna en 90g de sílica gel y se diluyó con Hexano, EtOAc y Metanol puros y en mezclas, obteniéndose 23 fracciones. Se realizó TLC corridos con Hexano, EtOAc (7:3); EtOAc (100), Cloroformo: Ácido Acético: Metanol: Agua (60:32:12:8) se reveló con Rosenthaler y EtOAc: Ácido Acético: Ácido Fórmico (100:11:26) con Sulfato de Cerio. Se obtuvieron los Terpenoides en las fracciones 12, 13, 15 y 19. Las Saponinas se identificaron por el IR por bandas, características a  $(3650) \text{ cm}^{-1}$  y  $(1050) \text{ cm}^{-1}$  que son del OH secundario; las bandas a  $(1680) \text{ cm}^{-1}$  características del estiramiento C=C característico del anillo Triterpénico derivados del Oleano. La separación en Cromatografía Líquida de Alta Resolución de las saponinas se realizó con Diclorometano-Metanol a los 7 minutos. Se recomienda aplicar otras técnicas que permitirían mayor especificidad de resultado se identificación de metabolitos.

Palabras clave: <LABORATORIO DE FITOQUÍMICA><HERBARIO ESCUELA POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO><ESTUDIO FITOQUÍMICO EXTRACTO ETANÓLICO><MONITOREO CROMATOGRÁFICO><ESPECTROSCOPIA INFRARROJA Y ULTRAVIOLETA><<TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DEL METABOLITO DE MAYOR PRESENCIA><CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN>

## SUMMARY.

The Phytochemical Study of Ethanol Extract from *Desmodium molliculum* and the Development of a Quantification Technique of the Metabolite of Highest Presence were performed at the Phytochemical laboratory at Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), collected in Guanando Parish and identified at the herbarium of ESPOCH as *Desmodium molliculum*. The methodology used for the extract was, maceration of the fresh plant with ethanol to 96% reduced to 200 ml, the liquid phase recovered to determine the physical properties, preliminary chromatographic analysis, separation in chromatographic column and monitoring of the fractions in Thin Layer Chromatography (TLC). The purified mixtures, to reach chromatographic purity, apply in Infrared spectroscopy (IR) and Ultra Violet. As a result a dark-greened herb-smelled and bitter liquid with density 0.1567 g/ml. was obtained. The TLC of ethanol extract run with Hexane: Ethyl Acetate (EtOAc) 1:1 reveal separated spots, blue violet colorations with Rosenthaler and 5g. were chromatographed in column in 90g of silica gel and was melted with Hexane EtOAc and methanol in pure and mixed state, having thus, 23 fractions. TLC with Hexane was done, EtOAc (7:3); EtOAc (100), Chloroform: Acetic Acid: Methanol: Water (60:32:12:8) as revealed with Rosenthaler and EtOAc: Acetic Acid: Formic Acid (100:11:26) with Cerium Sulfate. Triterpenoids in fractions 12, 13, 15 and 19 were obtained. Saponines were identified by means of the IR by bands, features to  $(3650) \text{ cm}^{-1}$  and  $1050 \text{ cm}^{-1}$  which are the secondary OH, bands to  $(1680) \text{ cm}^{-1}$  as features of stretching  $\text{C}=\text{C}$ , typical of the Triterpenical ring derived from Olean. The separation in Liquid Chromatography of High Resolution of saponine was done with Dichloromethane Methanol at 7 minutes. It is recommended to apply other techniques that allow higher specificity of results and identification of metabolites.

Key words: PHYTOCHEMICAL LABORATORY, HERBARIUM, ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, PHYTOCHEMICAL STUDY ETHANOL EXTRACT, CHROMATOGRAPHIC MONITORING. INFRARED AND ULTRA VIOLET ESPECTROCOPY, QUANTIFICATION TECHNIQUE OF THE METABOLITE OF HIGHEST PRESENCE, LIQUID CHOMATOGRAPHIY OF HIGH RESOLUTION.

## **INTRODUCCIÓN**

### **SITUACIÓN PROBLEMÁTICA**

La selección del estudio fitoquímico de la Hierba del Ángel se efectúa por ser un vegetal utilizado en fitofármacos con actividad antiinflamatoria en varias industrias como Ozono, Fitoter y al momento es importada del Perú y en el Ecuador no se encuentra ningún estudio fitoquímico.

### **FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

En la Sierra del Ecuador se produce en forma silvestre la Hierba del Ángel utilizada ancestralmente como antiinflamatoria, pero el avance de la ciencia determina que el efecto biológico está dado por la presencia de metabolitos secundarios los mismo que deben ser separados y purificados y en el mejor de los casos identificados para darle al industrial una metodología de identificación y una técnica aplicable en los Fitomedicamentos.

### **JUSTIFICACIÓN TEÓRICA**

La Manayupa del Perú es la misma especie de la Hierba del Ángel del Ecuador de nombre científico *Desmodium molliculum* por lo cual se presume que la composición química de este especie en dos ecosistemas diferentes es la misma por cuanto se utilizan en estos dos países para el tratamiento de la inflamación. Por lo cual es necesario realizar el estudio fitoquímico de la especie *Desmodium molliculum* del Ecuador.

## **JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA**

Obtener una metodología de fácil aplicación que permita repetir los diferentes pasos para obtener un extracto de condiciones adecuadas para la aplicación cromatográfica e identificación espectroscópica IR de la mezcla de Saponinas Terpénicas y los Flavonoides que posiblemente son los responsables de la actividad biológica como complejo fitoquímico.

## **OBJETIVOS**

### **• OBJETIVO GENERAL**

Separar aislar purificar e identificarlos posibles metabolitos secundarios del *Desmodium molliculum*, y elaboración de una metodología de cuantificación del metabolito secundario de mayor presencia por procesos físicos químicos y espectroscópicos.

### **• OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Recolectar e identificar la especie de *Desmodium molliculum* de Guanando del Cantón Guano
  
- ✓ Preparar el extracto etanólico crudo y verificar la presencia de grupos fitoquímico.



- ✓ Separar y purificar los grupos fitoquímico por métodos cromatográficos de capa fina y de columna, la pureza cromatográfica.
- ✓ Identificación de los metabolitos puros por métodos físicos y espectroscópicos.
- ✓ Elaborar metodología de cuantificación aplicable al metabolito de mayor presencia.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. MARCO EPISTEMOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN

De acuerdo a F. S. Kerlinger es el estudio sistemático, empírico y crítico de proposiciones hipotéticas en esta primera parte el vegetal *Desmodium molliculum*, identificado taxonómicamente, su uso ancestral como antiinflamatorio pero en la rama de la Bioquímica se conoce que son moléculas orgánicas específicas como los Terpenos, Flavonoides y Alcaloides aisladas o formando un fitocomplejo que le dan la actividad.

Administrado en forma oral como infusión aplicando el método científico, la observación del uso ancestral nos obliga a realizar primero un estudio taxonómico para determinar la especie, luego un estudio fitoquímico con la preparación de un extracto, observando las condiciones de maceración y eliminación del solvente. El extracto debe ser representativo y contener los metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios deben ser separados, purificados, comprobados su pureza e identificados por métodos espectroscópicos como es el Cromatográfico e Infrarrojo. En el caso del espectro IR las bandas son características para grupos orgánicos y específicas para un determinado agrupamiento como los grupos gem-dimetil de los Terpenos y en el caso de los flavonoides las bandas aromáticas de 900- 800  $\text{cm}^{-1}$  (ROBERT, M.1980. p. 85)

## 1.2. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN

Basados en la teoría epistemológica de F. S. Kerlinger (2006) del estudio sistemático, controlado, empírico y crítico de proposiciones hipotéticas, las plantas terapéuticas han acompañado la evolución del hombre, históricamente han estado ligadas a la forma ancestral de sanar, las que eran usadas por las virtudes que se les había reconocido.

Es por ello que constituyen parte de lo que ahora se conoce como medicina popular, folklórica y medicina ancestral donde se agrupaba a un conjunto de conocimientos y de saber la manera de curar y prevenir enfermedades, rescatándose a través de los tiempos lo que cada pueblo ha sabido mantener y guardar. (WHITE, A. 1985. p. 125)

A partir de 1960 se institucionaliza en las universidades el estudio de la composición química de los vegetales y la aplicación de técnicas biológicas para la determinación de la actividad farmacológica, comprobadas in vitro y en animales de experimentación. (LOCK, O. 1994. p.62)

En la actualidad para comercializar los productos fitoquímicos se han estos de categoría C (vegetales secos), presentaciones en tabletas, cápsulas, extractos, corresponden de la categoría B y requieren de análisis microbiológico fitoquímico farmacológico in vitro, finalmente inyectables y productos de administración oral requieren de pruebas in vivo a más de las in vitro.

Por lo mismo debe a más del estudio taxonómico realizarse el fitoquímico para conocer si es el extracto total o alguno de los metabolitos responsable de la actividad. (PEREZ, I. 2010)

Según el artículo 380 de la Ley Orgánica de Salud (2014) del Ministerio de Salud, se señala que:

**Producto natural procesado de uso medicinal.-** Es el producto medicinal terminado y etiquetado cuyos ingredientes activos están formados por cualquier parte de los recursos naturales de uso medicinal o sus combinaciones, como droga cruda, extracto o en una forma farmacéutica reconocida, que se utiliza con fines terapéuticos.

No se considera un producto natural procesado de uso medicinal, si el recurso natural de uso medicinal se combina con sustancias activas definidas desde el punto de vista químico, inclusive constituyentes de recursos naturales, aislados y químicamente definido.

Los metabolitos terapéuticos en la mayoría de las plantas de las especies de *Desmodium molliculum* son semejantes, salvo en ciertas variaciones en la proporción de metabolitos específicos. El estudio Fitoquímico de Peruvian Nature S&S SAC determina la presencia de metabolitos secundarios como:

**Ácidos orgánicos; Esteroides; Saponinas:** Dehidrosoyasaponina I, Soyasaponina I, Soyasaponina II, Soyasaponina III, Soyasaponina B; (aglicona común de soyasaponinas I-IV) que constituyen los metabolitos secundarios característicos de leguminosas y son los principios activos del efecto antiinflamatorio de la hierba del Ángel o del infante como se le conoce en Chimborazo y Ecuador. (ROBERT, M. 1980. p. 85)

**Otras saponinas (triterpenoides)** Astragalina, Beta-fenilaretilamina, Cosmosiína, Cianidino-3-ortosoforosido, Hordenina, Pelargonidin-3-orto-ramnósido, Salsolina Tectorigenina, Tetrahidroisoquinolinas, Tiramina. (ROBERT, M. 1980. p. 85)

Hasta el momento es silvestre pero puede ser cultivada para constituirse en recurso sustentable para las poblaciones donde crece en forma espontánea.

La Hierba del Infante hierba con hojas pequeñas redondas, se la conoce como una hierba nativa del Ecuador, la infusión se utiliza generalmente como antiinflamatoria y en cataplasma sobre la piel. En el Perú indica que contiene 4 mg/k de alcaloide expresada Tryptamina, 3% de ácidos grasos insaturados.<sup>(WHITE, A. 1985. p.125)</sup>

En el Ecuador existen *Desmodium adscendens* (Sw) Dc .En Carchi las hojas secas son aplicadas en el área irritada de la piel para los eczemas; en Pichincha por los Tsáchilalas raíces son utilizadas para los dolores en el pecho cuando existe resfrío.

Quito se le utiliza en la mordedura de serpiente y picadura de insectos, además que la infusión de esta planta con Santa María y Matico silvestre se aplica o se lava con esta solución el sitio afectado las veces que sean necesarias, una infusión de solución similar de mamá Juana (*Adenostemalaveña*) se lava de igual forma las veces que sean necesarias.<sup>(RIOS, M. 2007. p.234)</sup>

- *Desmodium axilliare*, que en el Carchi se utiliza esta especie para tumores. Las hojas secas son maceradas y aplicadas sobre el sitio afectado para absorber la hinchazón.
- *Desmodium sericophyllum* Schldt, en San Antonio de Saraguro utilizado para curar heridas se usa la decocción de esta planta con “cáncer sacha” genero indeterminado.
- *Desmodium uncinatum* (jacq.) Dc, la comunidad de Tsáchila utiliza para inducir el aborto las vainas son hervidas y la decocción se toma.
- *Desmodium sp*, en Saraguro después del parto se lavan mediante la decocción de la misma.<sup>(RIOS, M. 2007. p.234)</sup>

Estudios preclínicos del extracto acuoso de *Desmodium molliculum*, del Perú determinan la presencia de Taninos que se ligan a las proteínas dando una propiedad astringente.

Además indican la presencia de las siguientes Saponinas: I saponinas: Dehydrosoyasaponin I, Soyasaponin I y Soyasapornin III, que revelan la capacidad para la activación de los canales del potasio activados por los iones de calcio siendo un broncodilatador. (TORRES, J.2012. p. 327,328)

Del screening fitoquímico del extracto etanólico de masa homogénea consistencia blanda color verde petróleo u rendimiento del 2%; las pruebas cualitativas determinaron la presencia de flavonoides compuestos fenólicos taninos esteroides y saponinas alcaloides y carbohidratos. (TORRES. J. 2012.p. 327-328)

Realizando las siguientes reacciones químicas preliminares del extracto etanólico:

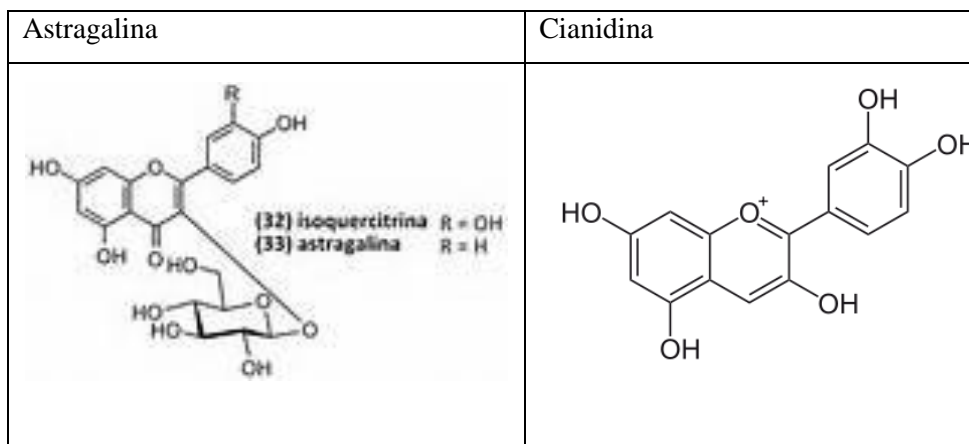
**Reacción de Cloruro férrico:** es característica para compuestos Fenólicos, resultan coloraciones de verde a marrón para derivados de Catecol y coloraciones azuladas para derivados de Piragalol.

**Reacción Shinoda:** en una lámina para reacción a la gota, se depositan una solución poco coloreada del extracto vegetal, se agrega pequeños trozos de magnesio metálico y gotas de HCL concentrado, las coloraciones que se generan indicaran la presencia y tipos de Flavonoides.

**Reacción Lieberman Bouchard:** a un miligramo del extracto se le agrega pocas gotas de ácido acético más 3ml de  $Ac_2O/H_2SO_4$  (50:1), una coloración verde azul verdoso indica la presencia de un núcleo esteroidal o triterpetenoidal.

Este tipo de estructura esta relacionadas con los compuestos reportados en *Desmodium molliculum*.

FIGURA 1-1. Estructura de las Astragalina y la Cianidina



Fuente: (TOSO. 2012)

Una vez que se conozca la metodología de separación, purificación e identificación de los metabolitos secundarios de la hierba del infante se propondrá una metodología para cuantificar el metabolito de mayor presencia, para la validación farmacológica del uso del vegetal, en fitomedicamentos; determinados por la cantidad de principios activos y que puedan utilizarse métodos físicos químicos o espectroscópicos para su identificación.

### 1.2.1. Actividad de los Flavonoides

Los flavonoides que generalmente son constituyentes de las flores juegan un papel importante en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades como infecciones bacterianas, procesos inflamatorios, antivirales, antiagregantes, mutagénicos e inclusive algunos cánceres.

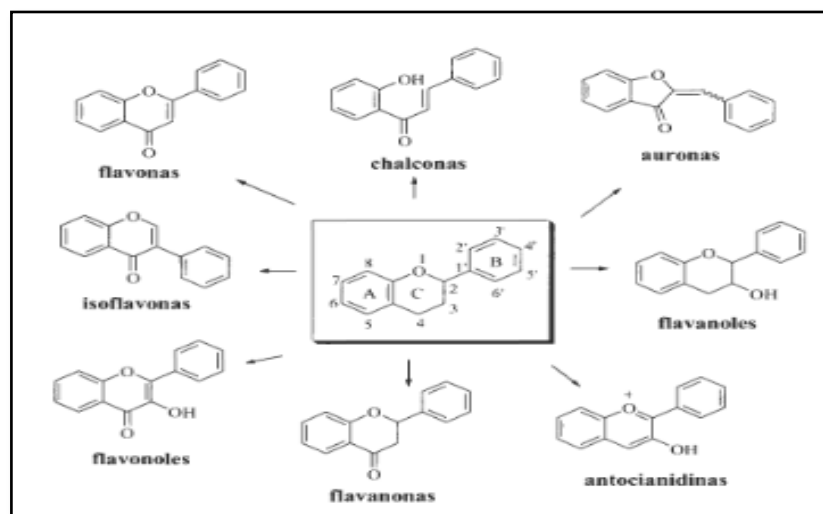
#### 1.2.1.1. Clasificación

La estructura clásica de los flavonoides está basada en un esqueleto C<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub> compuesto por dos anillos aromáticos A y B unidos por un fragmento de 3 carbonos.

Las diferentes clases de flavonoides difieren en el anillo B, proveniente de la condensación de las unidades acetato, está unido al C $\alpha$  de la unidad fenilpropano formando así los flavonoides propiamente dichos o flavanos.

Estos polifenólicos, son fenilbenzopironas de bajo peso molecular derivados de la unión de tres anillos A, B y C, dos de ellos aromáticos. (TORRES, J, 2012, p. 329,330)

FIGURA 2-1. Flavonoides. Estructura Básica y Tipos



Fuente:(GONZALES. 2008)

### 1.2.1.2. Determinación Cromatográfica del Canferol– Quercetina

Cromatografía en capa fina (CCF) La fracción acetato de etilo fue concentrada en rotavapor y se aplicó en forma de banda sobre placas de sílica gel 60 A<sup>o</sup> K6F de 250 mm de espesor (5 x 20 cm). El Cromatograma se desarrolló utilizando un sistema de solventes compuesto por acetato de etilo-metanol (100:10, v/v).

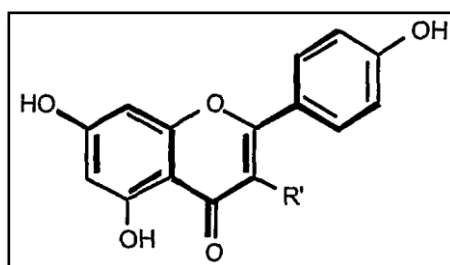
Las bandas con similares R<sub>f</sub>s a los estándares auténticos de quercetina y canferol fueron recuperadas, eluidas con 1 ml de metanol (3 x) y evaporadas bajo una corriente de nitrógeno.



Una alícuota de extracto metanólico seco resuspendido con metanol se cromatografió utilizando placas de sílica gel 60 A° K6F de 250µm de espesor (5 x 10 cm) en forma conjunta con estándares auténticos de quercetina, canferol, rutina y apigenina.

Se desarrollaron dos Cromatograma diferentes utilizando como sistema de solvente acetato de etilo -metanol (10:1, v/v) para uno de ellos y para el otro tolueno-cloroformo -acetona (40:25:35, v/v/v)'' (RIOS. M. 2007. p.234)

FIGURA 3-1. Estructura Básica Canferol - Quercetina



Fuente: (GONZALES. 2008)

FIGURA 4-1. Datos Espectrales UV de Flavonoides de CH, Glauca y sus Productos de Hidrólisis

| Compuesto                            | MeOH                 | NaOMe                 | AlCl <sub>3</sub>       | AlCl <sub>3</sub> /HCl   | NaOAc                 | NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Quercetina-3-O-ramnoglucósido (CG-1) | 260, 270h, 300h, 360 | 270, 327, 405         | 275, 290h, 435          | 271, 300, 365h, 400      | 276, 325, 395         | 270, 298, 385                        |
| Canferol-3,7-O-diramnósido (CG-2)    | 344, 320h, 266       | 405, 275              | 394, 344, 299h, 274     | 394, 341, 300h, 275      | 357, 267              | 346, 266                             |
| Quercetina                           | 254, 270h, 290h, 370 | 243, 330, (desc.)     | 424 273, 304h, 330, 458 | 266, 392h, 358, 430      | 257h, 274, 390(desc.) | 329, 260, 294h, 378                  |
| Canferol                             | 266, 294h, 318h, 366 | 276, 320, 406 (desc.) | 250, 270, 303h, 344,424 | 268h, 270, 303h, 344,424 | 274, 304, 385         | 266, 300h, 368                       |

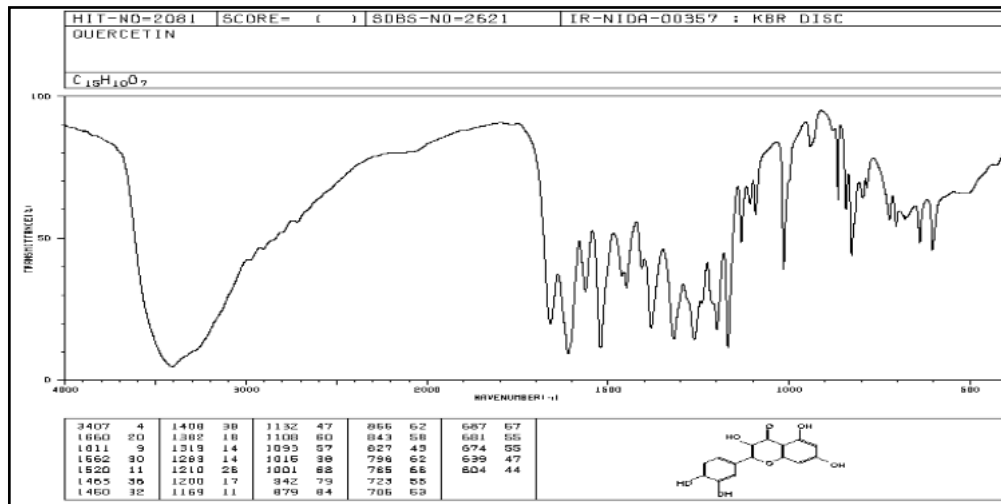
h : hombro

Fuente: (PASTEN, E 2001. p.89)

### 1.2.1.3. Infrarrojo de Flavonoides

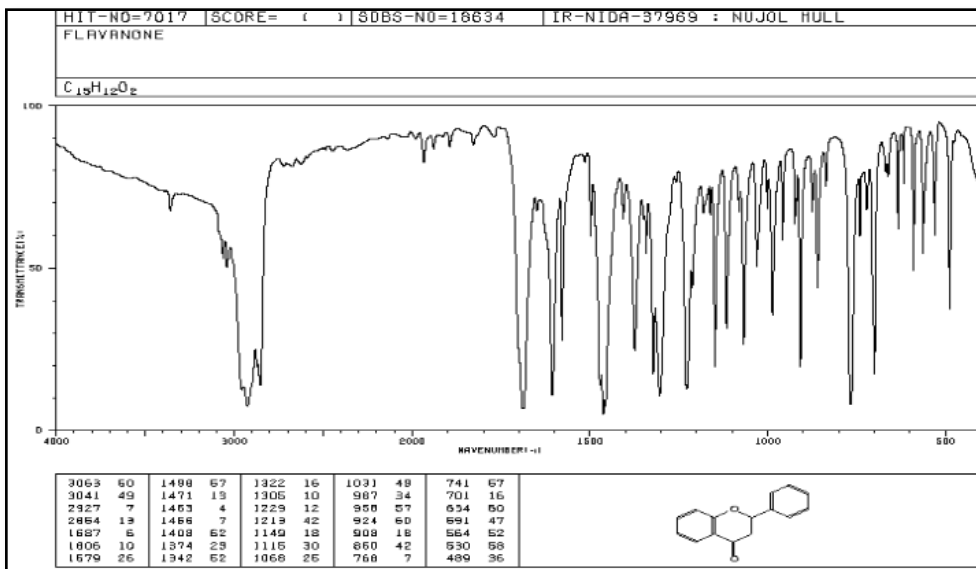
En los flavonoides la espectroscopía IR no es muy aplicada, pero permite diferenciar fenoles de fenóxidos, y las bandas características de los aromáticos.

FIGURA 5-1. Espectro IR de la Quercetina



Fuente:(MARTINEZ A, 2013)

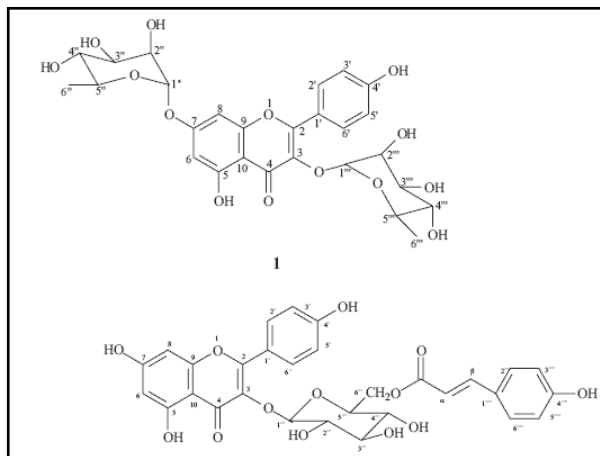
FIGURA 6-1. Espectro IR de una Flavona



Fuente:(MARTINEZ, A. 2013)

#### 1.2.1.4. Espectroscopía Infrarroja de los Flavonoides (*Cheilanthes Glauca*)

FIGURA 7-1. Estructura *Cheilanthes glauca*



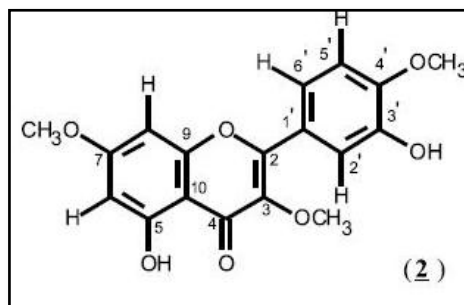
Fuente:(GONZALES. 2008)

El espectro infrarrojo muestra una banda larga a  $3374\text{ cm}^{-1}$  sugiriendo OH fenólico o de alcohol, esta información fue corroborada con el pico a  $1212\text{ cm}^{-1}$  típico de deformación axial de C-O. absorciones para deformación axial de C=C de aromáticos fueron observadas entre  $1602$  y  $1449\text{ cm}^{-1}$ .

Dos bandas en  $2937$  y  $2981\text{ cm}^{-1}$  referentes a estiramientos de C-H de grupos metílicos o metilénicos. Una fuerte absorción a  $1659\text{ cm}^{-1}$  permite inferir sobre la presencia de un carbonilo conjugado que forma un puente de hidrógeno. (MASSHISA. H. 2002.)

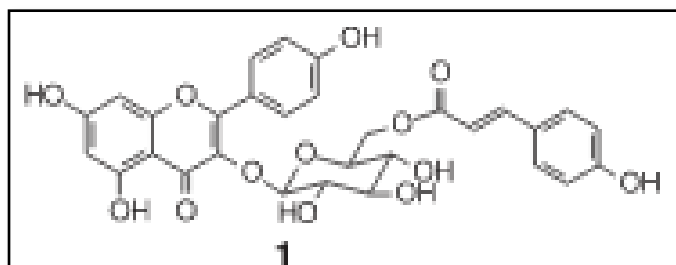
Flavonoides glicosilados de *Herissantiatubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) y estudios farmacológicos preliminares de canferol 3,7-di-O--L-ramnopiranosídeo presente deducen que es un sólido amarillo cristalizado mp.  $171^{\circ}\text{C}$  con descomposición, presenta fluorescencia a  $366\text{nm}$ . El IR presenta banda a  $3400\text{ cm}^{-1}$  (OH), a  $1599$ ,  $1498$  y  $1446\text{ cm}^{-1}$  (C=C aromático);  $1561\text{ cm}^{-1}$  (C=O carbonilo conjugado). (MASSHISA. H. 2002.)

FIGURA 8-1. Estructura Básica Canferol



Fuente: (TOSO. 2012)

FIGURA 9-1. Estructura Básica Astragalina



Fuente: (TOSO. 2012)

La astragalina en literatura es 3-glicopiranosil 5, 7,4trihidroxi flavona característico de *solanaceceas* como la dulcamara. El espectro IR de flavonoides presenta bandas típicas de grupos hidroxilados a  $3450\text{ cm}^{-1}$ , de sistemas aromáticos a  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500$ ,  $1450$  de grupo éter a  $1230\text{ cm}^{-1}$ . ((MASSHISA. H. 2002).)

### 1.2.2. Triterpenos.

**Introducción y nomenclatura:** el laboratorio natural de los vegetales que sintetizan los metabolitos secundarios y de acuerdo a estudios previos se conoce que las leguminosas biosintetizan terpenos de 30 átomos de carbono conocidos como triterpenos.

El término terpeno viene del Alemán *terpentin* viene = trementina, se encuentran especialmente en el reino vegetal y están formados especialmente por unidades de isopreno o isopentano, aunque nunca se hayan separado de los vegetales. La formulación de la regla del isopreno la que fue enunciada por Ruzicka que dice que un terpenoide debe ser divisible en unidades de isopreno.

En dicha regla se basa la definición de estos compuestos: son aquellos compuestos que tienen una arquitectura relacionada con la molécula simple  $C_5H_{10}$  isopreno.

Dentro del grupo de los terpenos están triterpenos compuestos, ampliamente difundidos en el reino vegetal como los glicósidos, ésteres o libres. Por definición se consideran productos naturales que tienen un esqueleto de 30 átomos de carbono y que se derivan del escualeno (6 unidades de isopreno) por ciclaciones o modificaciones de éster.

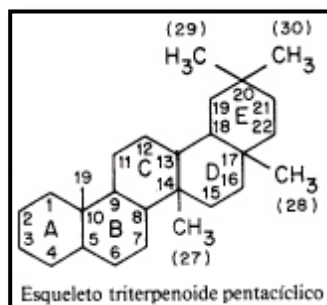
(SILVA, M. 1992. p. 353)

#### **1.2.2.1. Triterpenos Pentacíclicos**

Compuestos de 30 átomos de carbono con esqueleto perhidrofenantreno con 30 átomos de carbono originados desde el escualeno, presentes en todos los vegetales especialmente en dicotiledóneas sea como glicósidos (unidos a azúcares), geninas, o ésteres.

Su estructura de 5 anillos de ciclohexano fusionados con líneas de adosamiento entre anillos y enumerados como A, B, C, D y E son de dos tipos saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales. (SILVA, M. 1992.p. 353)

FIGURA 10-1. Esqueleto Triterpenoide Pentacíclico



Fuente: (TOSO, 2012)

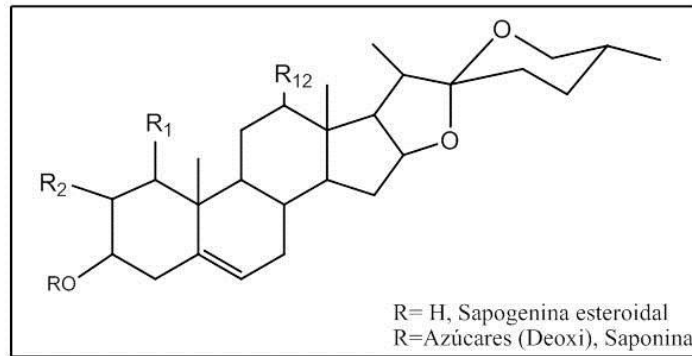
### 1.2.2.2. Glicósidos

Las saponinas esteroidales poseen de una a seis unidades de monosacáridos unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos. Estas unidades son comúnmente hexosas, pentosas y desoxihexosas, entre los que se encuentran principalmente glucosa, ramnosa, galactosa y xilosa.

Los enlaces glicosídicos pueden tener configuración a o b. Este resto glicosídico, que puede ser lineal o ramificado en la mayoría de los casos se une con el aglicón a través del C-3 del mismo. Uno de los compuestos representativos de estas saponinas es el sapogenol y sus derivados.

En capa fina de sílica gel corre en la mezcla de CC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH), 70:30 el compuesto I corresponde al Sapogenol B. 3-O-( $\beta$ -D-Glucuronopyranosyl)- Soyasapogenol B se presenta como polvo blanco con pf 176-177 °C. El compuesto 3-O- $\alpha$ -L-Ramnopiranosil (1-2  $\beta$ -D-Galactopiranosil 1-2)-  $\beta$ -D-Galactopiranosil- Soyasapogenol B presenta como polvo blanco fp 218-220 °C cristaliza en MeOH. (MASSHISA. H. 2002).

FIGURA 11-1. Esqueleto Saponina Esteroidal



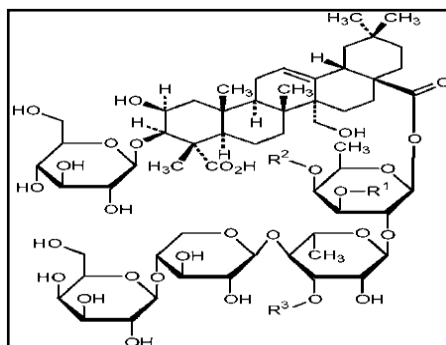
Fuente: (TOSO, 2012)

FIGURA 12-1. Representación estructural de las Saponinas Triterpénicas

| Estructura | Saponina (Abreviación)        | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|            | Sojassapogenol A (SYOL - A)   | OH             | H              | H              |
|            | Sojassapogenol B (SYOL - B)   | H              | H              | H              |
|            | Sojassaponina I (SYA - 1)     | H              | H              | -AcGlc-Gal-Rha |
|            | Sojassaponina II (SYA - 2)    | H              | H              | -AcGlc-Ara-Rha |
|            | Sojassaponina III (SYA - 3)   | H              | H              | -AcGlc-Gal     |
|            | Deidrosojassaponina I (DHSYA) | H              | ***            | -AcGlc-Gal-Rha |
|            | Sojassapogenol A (SYOL - A)   | OH             | H              | H              |
|            | Sojassapogenol B (SYOL - B)   | H              | H              | H              |

Fuente: ABBAS.F y ZAYED, 2012, p.544)

FIGURA 13-1. Ejemplo de Sapogeninas Glicósidas



Fuente: ABBAS.F y ZAYED, 2012, p.548)

### 1.2.2.3. Técnica de Extracción de Saponinas

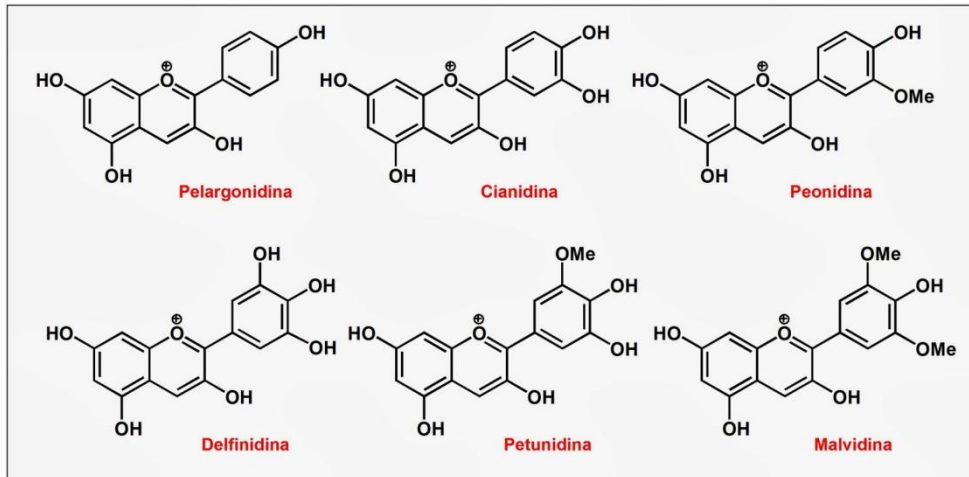
El fundamento de la técnica propuesta es la extracción de la saponina con una mezcla de etanol al 50% V/V, filtrado al vacío. La solución obtenida es diluida con el mismo etanol hasta que la concentración de la saponina total se encuentre dentro de la curva de calibración que se encuentra de 0 a 350 ppm.

Para dar coloración a la solución de saponina total extraída se utiliza el reactivo de color que es una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico en una proporción de 1:5 (16.7 %). La proporción de la muestra con el reactivo de color 1:3.5 (22.23%). La muestra será leída a una longitud de onda de 528 nm.

La presente técnica no tiene interferencia con colores que pueda presentar la quinua y tiene la virtud de determinar el total de las saponinas presentes en el producto. Contiene Saponinas como: (MASSHISA. H. 2002).



FIGURA 14-1. Sapogeninas de Quinoa



Fuente: ABBAS.F y ZAYED, 2012, p.54)

#### 1.2.2.4. Preparación de Extractos de Saponinas

Un extracto es un tipo de maceración, en la que el líquido solvente es una mezcla de alcohol etílico y agua, que disuelve las sustancias activas contenidas en una planta medicinal. En otras palabras, es el poder de una Planta Medicinal transformado en "Medicamento".

El proceso de obtención de un extracto incluye las siguientes etapas:

- Proceso de desengrase del material vegetal: El mismo tiene como objetivo eliminar los compuestos lipídicos que posee la planta, que pueden afectar operaciones posteriores. El desengrase puede realizarse directamente al material vegetal o a extractos obtenidos de éste.

b) Obtención del "crudo" de saponinas: Se realiza la extracción del material vegetal empleando solventes polares tales como metanol, etanol y n-butanol o mezclas hidroalcohólicas de cada uno de ellos. El n-butanol es muy utilizado por su especificidad para este tipo de compuestos.

c) Hidrólisis de las saponinas: Generalmente se realiza por vía química utilizando un Ácido mineral como catalizador y su finalidad es liberar las sapogeninas.

d) Extracción de las sapogeninas liberadas en el proceso de hidrólisis: En este proceso se utilizan solventes de mediana polaridad como acetato de etilo y cloroformo los pasos c y d se realizan para obtener las sapogeninas que se encuentra en forma de glicósidos y proceder a su caracterización como información previa en la elucidación estructural de las saponinas.

En los últimos años, aparejado al desarrollo de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear, es cada vez más posible determinar estructuras de estas moléculas sin necesidad de utilizar métodos destructivos por lo que estas etapas pueden omitirse.<sup>(SILVA, M. 1992. p. 353)</sup>

Fueron pesados 2g de polvo del vegetal y extraídos por reflujo con 10 ml de etanol al 70%. Filtrar, el filtrado es llevado por evaporación a 5 ml, solo de 20 a 40µl fueron utilizados para cromatografía de capa fina.

Un método de enriquecimiento de saponinas es tratar el extracto etanólico con una solución de butanol saturado de agua, el butanol queda en la parte superior y extrae las saponinas. La fase estacionaria puede estar constituida de sílica gel G<sub>F254</sub> placas Meck precocidad.<sup>(TAKIWASI, A.1996. p. 567)</sup>

Los solventes más utilizados son:

- Cloroformo: ácido acético glacial: agua (64:32:12:8), especialmente para separar mezclas en capa fina preparativa.
- Cloroformo: metanol: agua (70:30:4) para la raíz del Ginseng.
- Acetato de etilo: etanol: agua: amoníaco (65:25:9:1) para glicerreticos y raíz de liqueritzia.<sup>(TAKIWASI, A. 1996.)</sup>

En el aislamiento y purificación de estos compuestos los métodos cromatográficos juegan un papel decisivo. En la literatura se reporta el uso de la cromatografía de capa delgada preparativa (CCDP) y cromatografía de columna (CC).

Entre los adsorbentes más utilizados en estas técnicas se encuentran la alúmina, sílica gel de diferentes granulometrías y más recientemente sephadex LH-20.

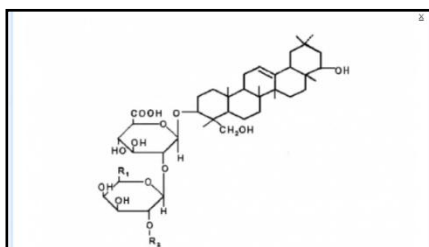
La cromatografía gaseosa (CG) y más recientemente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) así como las técnicas de cromatografía de partición a contracorriente RLCC (Rotation Locular Countercurrent Chromatography) y DCCC (Droplet Counter Chromatography) se han utilizado con estos propósitos.<sup>(TAKIWASI, A. 1996.)</sup>

En algunos trabajos encontrados en la literatura aparece el uso combinado de estas técnicas, especialmente en el caso de las saponinas, que por ser altamente polares y solubles en agua su purificación es una tarea difícil.

Ejemplos de esto último son los trabajos de Fukahara y Kuboen los cuales se logró la obtención de glicósidos con propiedades alelopáticas combinando técnicas basadas en la partición y los de Hostettmanet, en los que aíslan saponinas esteroidales de la corteza del *Cornusfloridus* mediante la utilización combinada de CC (Filtración por gel utilizando LH-20) y DCCC.<sup>(TAKIWASI, A. 1996.)</sup>

En el aislamiento de saponinas esteroidales de las raíces y corteza de la planta denominada *Balanitesaegyptiaca* fue utilizada esta última combinación y comparada con técnicas convencionales de CCD preparativa y CC. Utilizando sucesivamente la CC con sephadex LH-20 y sílica gel así como la aplicación de técnicas de HPLC se logró en la misma planta el aislamiento de saponinas de sus semillas.

FIGURA 15-1. Sapogenina

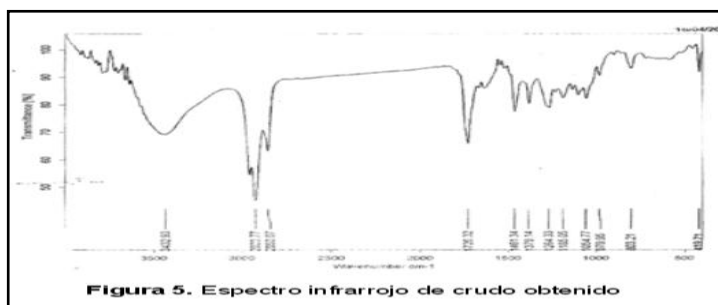


Fuente: ABBAS.F y ZAYED, 2012, p.54)

En el presente caso son saponinas triterpénicas con un grupo ácido en la posición 17, un OH en la posición 3 que se esterifica con azúcares. El segundo azúcar tiene sustituyentes diferentes que pueden ser hidrógenos, alcoholes o azúcares para dar lugar a los diferentes tipos de soyasapogeninas. (TAKIWASI, A. 1996.)

Como se observa la estructura no posee dobles enlaces conjugados por lo tanto no es posible determinar su estructura por aplicación de espectroscopia Ultra Violeta. Queda en nuestro medio la determinación Infrarroja.

FIGURA 16-1. Espectro IR de Saponina



Fuente: ABBAS.F y ZAYED, 2012, p.5

Aislamiento de Friedelina y friedenol de la corteza de *Klusiaellipticifolia*. Se aislaron Friedelina (friedeooleonan-3-ona) 0.038% y epifriedelinol 0.022% (friedeoolenan-3 $\beta$  ol. La espectroscopia IR para el compuesto I da bandas 1708 ( $>C=O$ ), 1380 gem-dimetil  $cm^{-1}$ . Compuesto Ibpf 286 289 °C IE a 3325 (OH), 1380 gem-dimetil, 1123 (tensión de C-O)  $cm^{-1}$ . Espectro UV 212 nm.

Compuesto transformado en acetato da bandas a 1735 ( $>C=O$ ) y 1245 (C-O)  $cm^{-1}$  que indica la presencia del grupo  $-OCOCH_3$  y no muestra ninguna señal debida al O de posición 3 forma un acetato. (MASAHISA, 2002, p. 123)

### 1.2.2.5. Infrarrojo de Saponinas

El origen del infrarrojo se debe a que las moléculas no son estructuras rígidas, sino que a la temperatura ordinaria, los átomos que la forman oscilan o vibran alrededor de las posiciones de equilibrio. En efecto al iluminar un conjunto de moléculas con luz infrarroja de frecuencia apropiada ocurre una absorción por las moléculas de la energía de la radiación, el registro de la radiación incidente es lo que se llama radiación infrarroja.

La región del espectro en que aparece una banda de absorción de radiación se llama banda de absorción, la frecuencia del pico de máxima absorción llamada frecuencia de la banda y el porcentaje de absorción son datos para el estudio de la estructura molecular. (MORCILLO, R.1974. p.345-356)

Las moléculas orgánicas absorben la radiación infrarroja y la convierten en energía de vibración molecular que van acompañados de energía rotacional las que se presentan de los  $4000\text{ cm}^{-1}$  -  $660\text{ cm}^{-1}$ . La frecuencia o la longitud de onda de la absorción dependen de las masas relativas de los átomos, las constantes de fuerza de los enlaces y la geometría de los átomos.

El número teórico de vibraciones fundamentales raramente se pueden observar debido a que los sobretonos de una frecuencia dada y los sobretonos de combinación aumentan el número de bandas. Así mismo hay vibraciones que disminuyen el número de bandas como las bandas débiles, bandas degeneradas, falta de vibraciones.

(MORCILLO, R.1974. pp.345-356)

La asignación de las frecuencias de alargamiento pueden aproximarse mediante la aplicación de la Ley de Hooke. En esta ley dos átomos y su enlace de conexión se tratan como un oscilador armónico simple formado por dos masas unidas por medio de un muelle.

La existencia de bandas características originada por las vibraciones características cuya frecuencia se mantiene aproximadamente constante, los mismos que constan en diferentes compuestos que se indican a continuación. (ROBERT. M. 1980. p. 85)

TABLA 1-1. Bandas características de algunos grupos orgánicos

| Grupo Atómico                     | Vibración de Tensión $\text{cm}^{-1}$ | Grupo Atómico                                     | Vibración de Tensión $\text{cm}^{-1}$ | Grupo Atómico        | Vibración de Flexión $\text{cm}^{-1}$ |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| -OH                               | 3600                                  | $>\text{C}=\text{C}<$                             | 2100                                  | $-\text{NH}_2$       | 1600                                  |
| $>\text{NH}$                      | 3400                                  | $>\text{C}=\text{O}$                              | 1700                                  | $>\text{CH}_2$       | 1460                                  |
| $\equiv\text{CH}$                 | 3300                                  | $>\text{C}=\text{N}-$                             | 1650                                  | $-\text{CH}_3$       | 1450                                  |
| $>\underset{ }{\text{C}}\text{H}$ | 3050                                  | $>\text{C}=\text{C}<$                             | 1650                                  | $-\text{CH}_3$       | 1375                                  |
|                                   | 2950                                  | $>\text{C}=\text{S}$                              | 1350                                  | -OH                  | 1400                                  |
| -SH                               | 2550                                  | $>\underset{ }{\text{C}}-\underset{ }{\text{C}}<$ | 900                                   | $>\text{C}=\text{O}$ | 1250                                  |
| -PH                               | 2400                                  |   |                                       | $\equiv\text{CH}$    | 700                                   |
|                                   |                                       |   |                                       | $\text{NO}_2$        | 650                                   |

Fuente: (ROBERT. M 1980.)

En la tabla de saponinas que se indica a continuación se observa que el poder hemolítico y coadyuvante de las saponinas está dado por la polaridad sustituyentes unidos a la aglicona. (MORCILLO, R.1974, p.345-356)

Existen miles de compuestos, pero escogen saponinas derivadas del ácido oleanicosojasapogenósidos. A y B , hederagenina, protoaescigenina y barrintogenol C, con las mismas configuraciones en C-3, C-4, C-8, C-10, C-14, C17, C-20.<sup>(MORCILLO, R. 1974. p.345-356)</sup>

### **1.2.3. Análisis General de Drogas por Cromatografía de Capa Fina y Columna.**

Uno de los métodos rápidos para el análisis de metabolitos secundarios en vegetales y preparados de vegetales es la cromatografía de capa fina (TLC) y tiene las siguientes partes.

- El tiempo requerido para la demostración de muchas de las características constituyentes de una droga por TLC en tiempo corto.
- En adición una detección cualitativa, la TLC da información semi-cuantitativa, información de principios activos, permiten aseguración de la droga.
- La cromatografía de capa fina permite una huella o característica que indica la pureza, adulteración o sustitución de un vegetal.
- Incluye una metodología apropiada de procesos de separación, TLC puede ser usada para analizar drogas combinaciones y preparaciones fitoquímicas.
- Maceración: Métodos de extracción según la USP.
- A menos que se especifique lo contrario, el material crudo que se va a extraer, es reducido a tamaño apropiado, mezclando con el solvente específico y dejando en reposo a temperatura ambiente en un recipiente por tiempo apropiado, con frecuente agitación hasta que la materia soluble se disuelva.

La mezcla se filtra, el material insoluble se lava con el mismo solvente utilizado para la maceración y los filtrados se combinan y concentran a la consistencia deseada, bajo presión reducida y temperatura controlada.

### **1.2.3.1. Cromatografía de Columna**

Es el método que permite separar 1g o más de un extracto o sub-extracto vegetal a escala preparativa. La fase estacionaria se coloca en el interior de un tubo de vidrio que termina en una placa porosa que evita el paso del sólido (fase estacionaria), colocar el solvente menos polar de la mezcla de corrido para capa fina.

Sobre el adsorbente humedecido en el mismo solvente generalmente 20g por 1g de extracto, dejar pasar el solvente hasta que llegue a la adsorbente, cerrar la llave y colocar el extracto en forma uniforme hasta que penetre en la fase estacionaria.<sup>(MORCILLO, R. 1974. p. 345)</sup>

Colocar el solvente de elución en pequeña cantidad hasta que toda la muestra se distribuya en la superficie del adsorbente de la columna. Se procede a la elución recogiendo fracciones de poco volumen, si se forman bandas de color los volúmenes se recogen hasta cuando toda la banda se eluye.

Primero se eluyen los compuestos menos polares, al último salen los más polares por adición de solventes o mezclas más polares, este es el caso de columna de polaridad.<sup>(JATIVA, C. 2013. p. 89-96)</sup>

Monitoreo de fracciones: se concentran por eliminación del solvente y cromatografian en capa fina generalmente el solvente de corrido es menos polar que el utilizado en la separación. Fracciones de igual Rf se unen y decide el siguiente proceso de acuerdo al Cromatograma.



Las variables que más influyen en la cromatografía de columna es la eficacia y utilizando gel de sílice como fase estacionaria son las siguientes:

- Diámetro de la columna y cantidad de gel de sílice. La altura del adsorbente está relacionada con la diferencia de Rf de los componentes de la mezcla. El diámetro de la columna con la cantidad a separar.

-Elección del disolvente: la elección del disolvente tiene que conducir a una buena separación de los componentes de una mezcla previamente analizada en capa fina.  
(JATIVA, 2013, pp. 89-96)

### **1.3. BASES TEÓRICAS**

#### **1.3.1. Descripción Del Vegetal**

##### **1.3.1.1. Desmodium**

Género con cerca de 350 especies de las regiones tropicales y subtropicales menos de Europa y nueva Zelanda bien representada en toda América desde Canadá hasta Argentina central. Plantas con hojas pinnadas, trifoliadas, con inflorescencias en glomérulos, racimos o en panículas axilares o terminales y legumbres en lomento.

Con artejos frecuentemente indehiscentes siempre con una sola semilla que queda en libertad en la madures, alcanzan un tamaño de hasta 0.5 m de alto posee flores rosadas a moradas. (TORRES, J. 2012. p.327-328)

### 1.3.1.2. Manayupa (*Desmodium molliculum*):

Etimológicamente su nombre genérico *Desmodium* proviene del griego *Desmos*: equivale a “cinta que sujeta”

### 1.3.2. Taxonomía

1.3.2.1. Nombre científico: *Desmodium molliculum*.

1.3.2.2. Nombre común: Hierba del Infante, pega pega, manayupa (Español), "Ranamanayupana" (Vocablo Quechua), *beggarlice, hardman, hardstick, strong back* (Ingles).

1.3.2.3. Familia: *Fabaceae*.<sup>(TORRES, J. 2012. p. 32- 38)</sup>

FOTOGRAFÍA 1-2. Prototipo *Desmodium molliculum* ubicado en la parroquia de Guanando del Cantón Guano



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

### 1.3.3. Usos Medicinales

El gran utilidad de esta especie son sus aplicaciones terapéuticas, por su composición química como diurética, antiinflamatoria, emenagoga, depurador sanguíneo, tratamiento de heridas.<sup>(RIOS, M. 2007. p.234)</sup>

#### **1.3.3.1. Broncodilatador.**

Aumento del diámetro o de la luz de los bronquios, lo que permite un mayor flujo de aire hacia los pulmones y desde ellos, es decir; bronquios y bronquiolos se dilatan por la acción terapéutica de la planta.

#### **1.3.3.2. Diurética**

Se denomina diurético a toda sustancia que al ser ingerida acelera la tasa de formación de orina por diversos mecanismos y el resultado es que extraen del organismo sodio y agua. Los lugares de acción se determinan por la forma como inhiben los sistemas de transporte del Na y otros electrolitos localizados a lo largo de la nefrona.

#### **1.3.3.3. Antiinflamatoria**

El término antiinflamatorio se aplica al medicamento o sustancia usada para prevenir o disminuir la inflamación de los tejidos. En el caso de los medicamentos generalmente el mecanismo por el cual actúan es el de impedir o inhibir la biosíntesis de sus agentes mediadores, principalmente los denominados eicosanoides o derivados del ácido araquidónico.

Los procedimientos antiinflamatorios son en general medidas físicas como reposo e inmovilización.

#### **1.3.3.4. Emenagoga**

Propiedad de una sustancia o planta medicinal con acción estrogénica, facilitadora de la menstruación, como consecuencia de la acción congestiva que desarrollan a nivel de útero y ovario. Algunas dosis superiores a las terapéuticas pueden ser abortivas.

#### **1.3.3.5. Depurador Sanguíneo**

El concepto de depuración implica esencialmente el proceso de eliminación renal de una sustancia. Sin embargo, este concepto se ha extendido para describir la eliminación por o desde órganos como el hígado y otros de menor importancia como el estómago, pulmones, etc.

#### **1.3.3.6. Tratamiento De Heridas**

Una herida es una falta de la continuidad de la piel que puede estar originada por diferentes causas, como un golpe, un corte con un objeto afilado o una mordedura y su tratamiento aplicado es una limpieza aséptica, tanto interna como externa.

#### **1.3.4. Composición Química**

El estudio de la composición química se conoce como Fitoquímica, fundamentada en ensayos cualitativos y cuantitativos para valorar los principios activos que se encuentran en un vegetal con acción terapéutica, que se producen durante el metabolismo de las plantas.

#### **1.3.5. Marcha Fitoquímica**

Tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, siendo el caso de una planta medicinal, aplicando una serie de técnicas de extracción, de separación y purificación y determinación estructural de los metabolitos causantes de la acción terapéutica. (LOCK, O. 1994. p. 265-268)

### **1.3.6. Principio Activo**

Sustancia simple o compleja proveniente de la biosíntesis del vegetal en dependencia de la ruta metabólica de su fotosíntesis con acción farmacológica sobre estipuladas molestias o enfermedades aminorando sus efectos o solucionando su curación, localizado en partes específicas o en todo el vegetal por lo que dependerá su técnica extractiva para su dosificación y conservación. (GOMEZ, A. 2005.p.. 22-23)

### **1.3.7. Extracto**

Mezcla compleja, multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología.

### **1.3.8. Extracto Etanólico**

Obtenido a partir de una maceración alcohólica etanol 96% (v/v).

### **1.3.9. Metabolitos.**

Productos Naturales o sustancias orgánicas presentes en los vegetales se han dividido en dos grandes grupos con cierta arbitrariedad los metabolitos primarios polímeros naturales como almidones, ceras, aceites, azúcar y los secundarios o macromoléculas con las siguientes características:

TABLA 2-1. Clasificación de los Metabolitos

| METABOLITO PRIMARIO   | METABOLITO SECUNDARIO  |
|---|--|
| 1. Producto del metabolismo general   | 1. Productos del metabolismo especial.   |
| 2. Ampliamente distribuido en plantas y microorganismos.<br>Ejemplos: Aminoácidos de proteínas, monosacáridos, nucleótidos, ácidos carboxílicos del ciclo cítrico, lípidos glicéridos, etc. | 2. Biosintetizado a partir de metabolitos primarios. Con distribución restringida a ciertas plantas y microorganismos (a veces es característica de género dado o de una especie).<br>Ejemplo: alcaloides, terpenoides, flavonoides, oligosacáridos. |

Fuente: MONOGRAFIAS, 2014

Realizado por: SALAZAR, Alexis. 20015

El estudio fitoquímico de un vegetal se refiere a los metabolitos secundarios, la clasificación precedente es sobre todo biosintética, y en menor grado de tipo funcional, un ejemplo sencillo se puede comprobar que la D-glucosa es un metabolito primario, la 2-6-didesoxi-D-arabinosa-exosa es un azúcar de antibióticos, un metabolito secundario, un “producto natural.”<sup>(GROS, Eduardo. 1985)</sup>

La característica más importante de muchos metabolitos secundarios es su distribución relativamente restringida en la naturaleza, que en algunos casos, se limita a especies o subespecies únicas, en consecuencia son casos de la individualidad del organismo que las contiene.<sup>(GROS, Eduardo. 1985)</sup>

Se analizará los metabolitos secundarios de vegetales en el presente caso del estudio fitoquímico de *Desmodium molliculum* ya que en las publicaciones que existen, miles de productos naturales que comúnmente se han descrito y se los ha clasificado de acuerdo a su estructura o taxonomía relacionada, es muy difícil estimar con seguridad el número exacto, no existe un inventario de todos ellos.

### **1.3.10. Cromatografía**

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una que es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra, (la fase móvil) se mueve en una dirección determinada.

#### **1.3.10.1. Cromatograma**

Es un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, de la concentración del analito en el efluente o de otra magnitud utilizada para medir una propiedad del efluente frente al volumen de efluente o tiempo. En cromatografía en plano, "Cromatograma" puede ser el papel o capa con las zonas separadas.

#### **1.3.10.2. Técnicas Cromatográficas**

Conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

#### **1.3.10.3. Cromatografía en Plano (TLC)**

Es una técnica de separación en la que la fase estacionaria es un plano o está sobre un plano. Este plano puede ser un papel utilizado como tal, o impregnado con una sustancia a modo de lecho estacionario (cromatografía en papel, PC), o bien una capa de partículas sólidas que recubren un soporte, como por ejemplo una placa de vidrio (cromatografía en capa fina, TLC).

A veces, la cromatografía en plano se denomina también cromatografía de lecho abierto.

#### **1.3.10.4. Cromatografía Preparativa**

Cromatografía preparativa es el aislamiento de unos pocos miligramos de una sustancia requerida para evaluar más de un intermedio puro. Por lo tanto, todas las separaciones preparativas implican la colección real de un componente eluído y no sólo comprenden el control de perfil pico para la estimación cuantitativa y medición del tiempo de elución.

#### **1.3.10.5. Cromatografía Bidimensional**

Se refiere al proceso cromatográfico que hace que los componentes migren primero en una dirección y luego en otra perpendicular a ella; las dos eluciones se llevan a cabo con eluyentes diferentes.

#### **1.3.10.6. Cromatografía Preliminar**

La cromatografía en capa fina preliminar es el paso crítico en la separación y determinación de los compuestos que tiene el vegetal dentro de un análisis fitoquímico planteado, partiendo con solventes que tengan polaridad determinada para tener una buena separación de manchas cromatográficas, para posteriormente utilizar diferentes técnicas cromatográficas para la purificación de sus compuestos y su análisis fitoquímico.

#### **1.3.10.7. Reveladores más Comunes para TLC.**

Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles, las incoloras pueden ser reveladas por:



- Luz UV placas impregnadas de un fluorescente como el F254.
- La introducción de la placa en vapores de yodo hace visibles compuestos con dobles enlaces.
- Rociar con reactivo de Rosenthaler (Vainillina ácido sulfúrico) revela los terpenos de color azul, azul, violeta, rosado, pardo rojizo después del calentamiento a 105°C.
- Rociar con reactivo de sulfato de cerio los derivados flavónicos dan en la gama de rosado. Después de calentar a 100°C.
- Rociar con agua destilada las saponinas dan manchas blancas.

#### **1.3.10.8. Mancha**

Es una zona sobre el papel o capa fina que tiene una apariencia más o menos circular de un compuesto la misma que tiene anchura antes o después de la cromatografía.

#### **1.3.10.9. Mancha (Cola)**

Asimetría del pico con respecto a la línea base, de tal forma que la línea de subida es más pendiente que la de bajada. En cromatografía en papel y capa fina, se refiere a la distorsión de una mancha que muestra una región difusa en la parte trasera, en la dirección del flujo.

#### **1.3.10.10. Frente De La Fase Móvil**

Es el borde delantero de la fase móvil cuando atraviesa el medio plano. En todas las formas de desarrollo, excepto en el radial, el frente de la fase móvil es esencialmente, una línea recta paralela a la superficie de la fase móvil. Se llama también frente líquido o frente del disolvente.

### 1.3.10.11. Distancia De La Fase Móvil

Es la distancia recorrida por la fase móvil que se desplaza a lo largo del medio, desde el punto o línea de aplicación hasta el frente de la fase móvil.

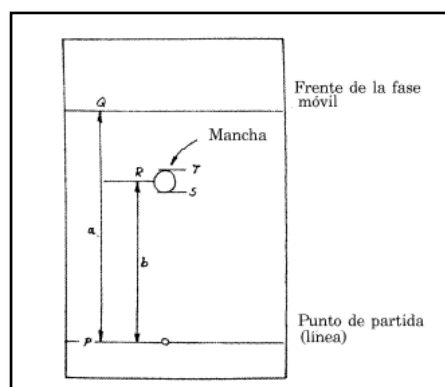
### 1.3.10.12. Distancia Del Soluto

Es la distancia recorrida por el soluto a lo largo del medio desde el punto o línea de aplicación hasta el centro de la mancha del soluto. Si la mancha no es circular, se toma un círculo imaginario cuyo diámetro es el eje más pequeño de la mancha.

### 1.3.10.13. Factor de retardo (RF)

Es el registro y se define como el coeficiente de dividir la distancia desde el centro de aplicación hasta el centro de la mancha desplazada para la distancia desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente. El valor del Rf tiene un 20% de reproducibilidad está influida por la pureza de los solventes, las fases estacionarias, la saturación de la cámara, la cantidad de muestra aplicada, la solubilidad de la muestra en el eluyente aplicado.

FIGURA 17-1. Cromatografía de Capa Fina



Fuente: (ETTRE, LS. 2015. p.356)

#### **1.3.10.14. Cromatografía en Columna**

Es una técnica de separación en la que el lecho estacionario está dentro de un tubo. Las partículas de la fase estacionaria sólida, o del soporte recubierto con la fase estacionaria líquida, pueden llenar el volumen interno del tubo (columna rellena), o concentrarse sobre o a lo largo de la pared interna del tubo, dejando un camino abierto sin restricción, en la parte media, por el que circula la fase móvil (columna abierta).

#### **1.3.11. Infrarrojo**

La radiación Infrarroja se refiere a la parte del espectro electromagnético comprendida entre las regiones del visible y las microondas, está limitada entre los  $400\text{ cm}^{-1}$  -  $660\text{ cm}^{-1}$ , más allá de la región visible, es un movimiento ondulatorio, formado por campo eléctrico oscilante perpendicular a la dirección de propagación y un campo magnético oscilante con la misma frecuencia y perpendicular al campo eléctrico. (ALVAREZ, R. 2010, p.325-364)

#### **1.3.12. El HPLC o Cromatografía Líquida de Alta Resolución**

Es una técnica cromatográfica usada para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica. Básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector. (ALVAREZ, R. p. 364)

#### **1.3.13. Monitoreo**

Descripción de un proceso mediante el cual se reúne, observa, estudia y emplea información para luego poder realizar un seguimiento de un programa o hecho particular es decir; inspeccionar, controlar y registrar una circunstancia o situación del estudio planteado. (QUIMINET, 2006)

### 1.3.14. Eluir

Extracción de una sustancia absorbida desde un lecho poroso o columna de cromatografía mediante un chorro de líquido o gas o mediante la aplicación de calor. El proceso de elución se puede detener mientras todos los componentes están aún en el lecho cromatográfico, o continuar hasta que todos los componentes lo hayan abandonado. (QUIMINET, 2006)

### 1.3.15. Purificación

En el método de purificación se busca una fase móvil adecuada, la misma formada por un solvente o mezclas de estos en proporciones específicas que le dan una polaridad determinada para así tener una buena eficacia, eficiencia y resolución en las diferentes técnicas cromatográficas. (QUIMINET, 2006)

### 1.3.16. Polaridad de Solventes

Depende de su estructura y constante dieléctrica.

FIGURA 18-1. Propiedades de Solventes más Comunes

| Disolvente                    | Fórmula química  | Punto de ebullición | Constante dieléctrica | Densidad   |
|-------------------------------|--|---------------------|-----------------------|------------|
| <b>Disolventes no polares</b> |  |                     |                       |            |
| Hexano                        | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$                          | 69 °C               | 2,0                   | 0,655 g/ml |
| Benceno                       | $\text{C}_6\text{H}_6$   | 80 °C               | 2,3                   | 0,879 g/ml |
| Tolueno                       | $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_3$                                 | 111 °C              | 2,4                   | 0,867 g/ml |
| Éter dietílico                | $\text{CH}_3\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$          | 35 °C               | 4,3                   | 0,713 g/ml |
| Cloroformo                    | $\text{CHCl}_3$  | 61 °C               | 4,8                   | 1,498 g/ml |
| Acetato de etilo              | $\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ | 77 °C               | 6,0                   | 0,894 g/ml |

Fuente: ABBAS.F y ZAYED, 2012, p.59)

FIGURA 19-1. Propiedades de Solventes más Comunes

| Disolventes polares apróticos   |  |        |     |            |
|---------------------------------|--|--------|-----|------------|
| <u>1,4-Dioxano</u>              | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ | 101 °C | 2,3 | 1,033 g/ml |
| <u>Tetrahidrofurano (THF)</u>   | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$          | 66 °C  | 7,5 | 0,886 g/ml |
| <u>Diclorometano (DCM)</u>      | $\text{CH}_2\text{Cl}_2$                                     | 40 °C  | 9,1 | 1,326 g/ml |
| <u>Acetona</u>                  | $\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$                              | 56 °C  | 21  | 0,786 g/ml |
| <u>Acetonitrilo (MeCN)</u>      | $\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$                         | 82 °C  | 37  | 0,786 g/ml |
| <u>Dimetilformamida (DMF)</u>   | $\text{H-C(=O)N(CH}_3)_2$                                    | 153 °C | 38  | 0,944 g/ml |
| <u>Dimetil sulfoxido (DMSO)</u> | $\text{CH}_3\text{-S(=O)-CH}_3$                              | 189 °C | 47  | 1,092 g/ml |

Fuente: ABBAS.F y ZAYED, 2012, p.59)

FIGURA 20-1. Propiedades de Solventes más Comunes

| Disolventes polares próticos |   |        |     |            |
|------------------------------|---|--------|-----|------------|
| <u>Ácido acético</u>         | $\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$                                | 118 °C | 6,2 | 1,049 g/ml |
| <u>n-Butanol</u>             | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ | 118 °C | 18  | 0,810 g/ml |
| <u>Isopropanol (IPA)</u>     | $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_3$                            | 82 °C  | 18  | 0,785 g/ml |
| <u>n-Propanol</u>            | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$             | 97 °C  | 20  | 0,803 g/ml |
| <u>Etanol</u>                | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$                         | 79 °C  | 24  | 0,789 g/ml |
| <u>Metanol</u>               | $\text{CH}_3\text{-OH}$                                     | 65 °C  | 33  | 0,791 g/ml |
| <u>Ácido fórmico</u>         | $\text{H-C(=O)OH}$  | 100 °C | 58  | 1,21 g/ml  |
| <u>Agua</u>                  | $\text{H-O-H}$  | 100 °C | 82  | 1,000 g    |

Fuente: ABBAS.F y ZAYED, 2012, p.58)

### **1.3.17. Eficacia**

Cuando se realizar una separación cromatográfica óptima de distribución para la especie más fuertemente retenida.

### **1.3.18. Eficiencia**

Disposición de una cromatografía visible en este caso con manchas definidas y distribuidas para un análisis y discusión cromatográfica.

### **1.3.19. Resolución**

La resolución cromatográfica de una columna es una medida cuantitativa de su capacidad o grado para separar dos analitos. La resolución de una columna se define como RS.

### **1.3.20. Sólidos Pulverulento**

Grupo de partículas individuales que, juntas, forman una masa. Además, están en combinación con el aire y, a veces, con algún líquido (agua).

### **1.3.21. Sustancia Aceitosa**

Compuestos propios del vegetal obtenida mediante lavados con solventes puros y mezclas.

### **1.3.22. Variable Dependiente**

Consideramos el extracto total, las mezclas de solventes, las fases estacionarias de capa fina y columna.

### **1.3.23. Variables Independiente**

Estructura de los metabolitos conformados por la Soyasapogeninas que son Triterpenos con OH libres y esterificados con azucares, con polaridades similares a los flavonoides.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1. UNIDAD EXPERIMENTAL

##### 2.1.1. Química

Extracto de *Desmodium molliculum*.

#### 2.2. TIPO DE DISEÑO

Se aplicará un Diseño Experimental Descriptivo:

- VARIABLE INDEPENDIENTE: extracto y metabolitos secundarios constituidos por saponinas triterpénicas y flavonoides de la “Hierba del infante”.
- VARIABLE DEPENDIENTE: se considera los solventes puros y en mezclas utilizados en los procesos cromatográficos y las fases estacionarias de capa fina y de columna constituidas por sílica gel de diferente espesor para separar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico.



## **2.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS**

### **2.3.1. Tipo de Investigación**

- ✓ POR EL ALCANCE: Experimental y Explicativa.
  
- ✓ ESTUDIO: Longitudinal.
  
- ✓ POR LA SECUENCIA DEL ESTUDIO: Longitudinal.
  
- ✓ POR LA METODOLOGÍA: Método Científico- Experimental.
  
- ✓ POR EL TIPO DE DATOS A RECOLECTAR Y ANALIZAR: Es de tipo cualitativo relacionado a la presencia de manchas en cromatografía de capa fina, y cuantitativo porque permite ver el diámetro de la mancha la forma y la intensidad de la coloración después de revelada.
  
- ✓ POR LAS CONDICIONES DE ESTUDIO: Bibliográfica porque se utilizan referencias de trabajos realizados en otros vegetales que contienen el mismo grupo fitoquímico.
  
- ✓ EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO: Porque son procesos manuales en placas cromatográficas y en columnas que orientan al tipo de separación, cambios de solventes, reactivos cromogénicos y observación directa del aspecto físico que presenta cada uno de los compuestos en los recipientes de purificación (vasos de precipitación).
  
- ✓ POR LA UTILIZACIÓN DE CONOCIMIENTOS: Es de tipo aplicativo por que se utiliza los conceptos básicos de cada uno de los procesos como extracción separación, etc.

✓ POR EL TIEMPO: A mediano plazo

## 2.4. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fitoquímica, Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

## 2.5. RECURSOS MATERIALES

### 2.5.1. Recolección del Vegetal

Se recolectó el vegetal tanto tallo, hojas, flores de *Desmodium molliculum*, que se encuentran en una elevación natural de terreno, la misma que se halla en la parroquia de Guanando del cantón Guano, provincia de Chimborazo, Ecuador; tomando en cuenta en su recolección modelos representativos para nuestro estudio. .

### 2.5.2 Equipos

TABLA 3-2. Equipos

|   |                         |
|---|-------------------------|
| • Balanza analítica (BOECO Germany)         | • pH-metro              |
| • Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP) | • Centrifuga (Dynac CA) |
| • Estufa de circulación de aire (MEMMERT)   | • Cámara UV             |
| • Refrigeradora (MABE)                      | • Infrarrojo            |
| • Bomba de vacío                            | • HPLC                  |

Fuente: SALAZAR Alexis, 2015

### 2.5.3 Materiales

TABLA 4-2. Materiales

|   |                          |
|---|--------------------------|
| • Vasos de precipitación                          | • Pipeta 1 ml            |
| • Balones esmerilados                             | • Pipeta 5 ml            |
| • Tubos de ensayo                                 | • Pipeta 10ml            |
| • Gradilla  | • Pipeta Pasteur         |
| • Frascos de vidrio boca ancha                    | • Capilares              |
| • Frascos ámbar                                   | • Columna cromatográfica |
| • Embudo normal                                   | • Erlenmeyer             |
| • Embudo de separación                            | • Cámaras Cromatográfica |
| • Refrigerante                                    | • Varilla de agitación   |
| • Mangueras                                       | • Balones de aforo       |
| • Piseta  | • Algodón                |
| • Trípode   | • Papel aluminio         |
| • Mascarilla                                      | • Probeta 25ml           |
| • Placas de sílica gel <sub>F254</sub> (Aluminio) | • Pera de succión        |
| • Tijera  | • Pinzas universales     |

Fuente: SALAZAR Alexis, 2015

### 2.5.4 Reactivos

TABLA 5-2. Reactivos

|                              |                    |
|------------------------------|--------------------|
| • Agua destilada             | • Acetona          |
| • Etanol                     | • Butanol          |
| • Metanol                    | • Cloroformo       |
| • Acetato de etilo           | • Hexano           |
| • Ácido sulfúrico vainillina | • Yodo             |
| • Ácido acético              | • Sulfato de cerio |
| • Amoniaco                   | • Ácido fórmico    |
| • Cloruro de Metilo          | • Tolueno          |

Fuente: SALAZAR Alexis, 2015

## **2.6. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.6.1. Comprobación Taxonómica e Identificación Botánica.**

Se consiguió una muestra representativa de *Desmodium molliculum*, la misma que incluyo tallos, hojas, flores, luego de su prensado, fue trasladada al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien certificó el modelo como *Desmodium*.

### **2.6.2. Factores de Estudio**

Los factores de tesis de esta investigación fueron:

- Preparación del extracto etanólico.
- Separación y purificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto, mediante Cromatografía de Capa Fina, Cromatografía en Columna, Infrarrojo y HPLC.
- Análisis e identificación de las fracciones purificadas en UV, IR y HPLC.
- Elaboración de una técnica de cuantificación del metabolito de mayor presencia.

### **2.6.3. Preparación del Extracto Etanólico**

Se recolecto 1kg del vegetal Hierba del infante en la Parroquia de Guanando del Cantón Guano y en los predios de la ESPOCH en Septiembre del 2014, lavado con hipoclorito de sodio al 0.5% por contacto durante 5 minutos, enjuagado hasta eliminación del cloro.

Triturado en pedazos de 1 cm y licuados con etanol de 96°, dejados macerar en recipiente de vidrio por 72 horas en sitio oscuro con agitación esporádica, filtrada; el filtrado evaporado a presión reducida de 3 L a 250 ml de extracto botánico y se lo conservo a temperatura ambiente (14-18 ° C).

#### **2.6.4. Evaluación de las Propiedades Físicas y Químicas del Extracto Botánico**

##### **2.6.4.1. Determinación de los Requisitos Organolépticos**

A. *Aspecto*: Se colocó un volumen de 5 ml en tubo de ensayo de 10 ml y observó contra luz la presencia de partículas y/o turbidez en el tubo de ensayo con muestra.

B. *Color*: Se colocó un volumen de 5 ml en tubo de ensayo de 10 ml y observó contra luz y se observa el color, transparencia y/o formación de fases en el tubo de ensayo con muestra.

C. *Olor*: Se tomó una tira de papel filtro de 10 cm de largo y 1 cm de diámetro e introduce un extremo en el tubo de ensayo con muestra para determinar el aspecto durante 3 minutos, luego se saca y percibe el olor impregnado en el papel.

D. *Sabor*: Colocar una pequeña cantidad de muestra con una pipeta pasteur y colocar en el borde de la mano difundir con la yema del dedo pulgar, poner la punta de la lengua en la muestra y determinar las características sápidas.

##### **2.6.4.2. Determinación de los Requisitos Físicos**

A. *Densidad relativa*: es el coeficiente entre la masa de un volumen determinado de una sustancia a analizar M2 a 25°C enrasado y la masa del mismo volumen del agua M1 enrasado a la misma temperatura. Este término equivale al peso específico, proceso que se realiza en un picnómetro limpio y seco previamente pesado M.

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

$$D = \frac{M_2 - M}{M_1 - M}$$

M<sub>2</sub> peso del picnómetro con el extracto. (g)

M<sub>1</sub> peso del picnómetro con el agua. (g)

M peso del picnómetro vacío. (g)

D = 0.1567 g/ml.

#### 2.6.4.3. Determinación del Peso del Extracto Etanólico.

TABLA 6-2. Cálculo del Extracto Etanólico

| <b>Extracto</b>    | <b>W<sub>1</sub> Balón vacío</b> | <b>W<sub>2</sub> Balón + Muestra</b> | <b>g de Muestra</b> |
|--------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Extracto Etanólico | 102.788 g                        | 150.981 g                            | 48.193g             |

Fuente: UDCA, 2010

Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015

#### 2.6.4.4. Tamizaje Fitoquímico.

Para la prueba de Cloruro férrico se colocó un volumen de 5 ml en tubo de ensayo de 10 ml y observó contra luz y se observa el color característico del grupo fitoquímico.

Para la prueba de Shinoda se colocó un volumen de 5 ml en tubo de ensayo de 10 ml y observó contra luz y se observa el color característico del grupo fitoquímico.

Para la prueba de Lieberman Bouchard se colocó un volumen de 5 ml en tubo de ensayo de 10 ml y observó contra luz y se observa el color característico del grupo fitoquímico.

### **2.6.5. Análisis Cromatográfico Preliminar**

Cromatografía de capa fina en sílica gel  $G_{F254}$  en placas de aluminio de 2cm de ancho y 8 cm de largo, colocada la muestra del extracto etanólico a 1 cm del borde inferior 0.5 cm del costado se corrió en solventes como Hexano (100), Tolueno, Acetato de Etilo (9:1 v/v), Hexano: Acetato de Etilo diferentes proporciones y revelaron con vainillina Ácido Sulfúrico reactivo de Rosenthaler específico para terpenos, observándose buena separación en Hexano: Acetato de Etilo (1:1 v/v). Cromatografía (TLC1).

### **2.6.6. Fraccionamiento en Columna del Extracto Etanólico**

Armar una columna de vidrio de 3 cm de diámetro por 50 cm de largo con 90g de sílica gel utilizando como solvente Hexano. Medir un volumen correspondiente a 5g del extracto etanólico en vaso de precipitación, agregar 5g de sílica de columna mezclar y colocar en la parte superior de la fase estacionaria sin solvente.

Una vez unificada la muestra se procede a diluir con Hexano y recoge las fracciones 0, Hexano: Acetato de Etilo (70:30) las fracciones 1, 2, 3, 4,5 con Hexano: Acetato de Etilo (90:10) las fracciones 6,7,8 con Acetato de Etilo (100) las fracciones 9,10, con Acetato de Etilo :Metanol (95:5) las fracciones 11,12,13, con Acetato de Etilo :Metanol (50:50) las fracciones 14, 15,16,17,18,19 y Metanol (100) las fracciones 20, 21, 22, 23.

### **2.6.7. Monitoreo de las Fracciones en Capa Fina**

Cada una de las fracciones se monitorearon en cromatografía de capa fina de sílica gel  $G_{F254}$  con un solvente de menor polaridad al solvente de elución de la siguiente manera:

TABLA 7-2. Solventes Adecuado para el Monitoreo y Análisis de las Fracciones en TLC de la Columna C<sub>1</sub>.

| <b>Fracciones</b>                | <b>Solvente de Corrido</b>  |
|----------------------------------|---|
| 0, 1, 2, 3, 4                    | Hexano (100)  |
| 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 | Hexano : Acetato de Etilo (90:10)   |
| 13, 14                           | Acetato de Etilo (100)  |
| 15, 16                           | Metanol (100)<br>Butanol saturado de Agua<br>Butanol: Ác. Acético: Acetona 25: 15: 10   |
| 17, 18, 19, 20                   | Metanol : Amoníaco (98:2)<br>Acetato de Etilo: Ác. Acético: Ác. Fórmico: Agua 100:11:11:26<br>Metanol: Acetato de Etilo 40:12 |
| 21, 22, 23                       | Cloroformo: Ácido Acético: Metanol: Agua 60:32:12: 8  |

**Fuente:** (JÁTIVA, Cumandá, 2015, p.221)

**Realizado por:** SALAZAR, Alexis.

Análisis de las cromatografías determinan que:

- La fracción 2 esta pura, compuesto I.
- Fracción 3, 4 tiene 4 manchas por lo cual se unen.
- Fracciones 5, 6, 7, 8, se unen.
- Fracciones 8\*,9, se unen.
- Fracción 10 sola.



- Fracción 11 sola, fraccionamiento en C<sub>4</sub>,C<sub>41</sub>,C<sub>42</sub>.
- Fracción 12, 13 se unen y fracciona en columna C<sub>2</sub>
- Fracción 14 presenta sólidos Amarillos.
- Fracciones 15, 16, 17, 18 corren en solvente Cloroformo: Ácido Acético: Metanol: Agua (60:32:12: 8) y revelan con Rosenthaler y fraccionan en columna C<sub>3</sub>.
- Fracciones 19 a 23 corren el Bu (OH): CH<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>H: H<sub>2</sub>O (5:1:4) y revelan con Sulfato de Cerio.

La unión de fracciones se realizan por similitud de contenido en manchas y para tener cantidades representativas que permitan la purificación de los compuestos que presentan manchas redondeadas y en mayor cantidad se las fragmenta en columna cromatográfica, placa cromatográfica preparativa, placa bidimensional, adición de solventes en orden de polaridad o cristalización dependiendo del caso como se detalla a continuación.

## **2.6.8. Tratamiento de las Fracciones de la Columna C<sub>1</sub>**

### **2.6.8.1. Cromatografía de las Fracciones 1, 2, 3, 4: En Hexano (Cromatografía TLC2)**

Determinan una sola mancha en la fracción 2 por lo cual se asume que está pura se ha purificado el compuesto I de color amarillo y se tratara de identificarlo en UV, IR.

### 2.6.8.2. Cromatografía de las Fracciones 4\*, 5, 6, 7, 8

Unidas la fracción 3,4, 4\* se aplicó TLCB cromatografía bidimensional corrida con Hexano: Acetato de Etilo en placas de sílica gel G<sub>F254</sub> en base de aluminio de 18 cm de ancho por 10 cm de largo, se reveló 0.5 cm de ancho y observo 4 franjas de color azul violeta que se cortan y recuperan los compuestos con Metanol (Cromatografía TLC3), mientras las fracciones de la 5 a la 8 se realiza un monitoreo de TLC más detallado.

### 2.6.8.3. Cromatografía de las Fracciones 8\* y 9

Se unen tienen los mismos compuestos en pequeña cantidad. (Cromatografía TLC4).

TABLA 8-2 Resultados de los Rfs en TLC de las Fracciones 8 Y 9 C<sub>1</sub>

| <b>FASE ESTACIONARIA: Sílica G<sub>F254</sub> 8 Y 9 C<sub>1</sub></b> |          |          |
|---|----------|----------|
| <b>SOLVENTE: Hexano:EtOAc 70:30</b>                                   |          |          |
| <b>REVELADOR: ROSENTHALER</b>   |          |          |
| <b>FRACCIONES</b>   | <b>8</b> | <b>9</b> |
| <b>Rf</b>   | 0.10     | 0.10     |
|   | 0.19     | 0.19     |
|   | 0.84     | 0.77     |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

### 2.6.8.4. Cromatografía de la Fracción 10 y 11

Se deja sola la fracción 10 por tener una mancha anaranjada con el frente del solvente con Rf= 0.94 y la fracción 11 se monitorea en columna C<sub>4</sub>, y TLC que dan el compuesto II.

### 2.6.8.5. Cromatografía de las Fracciones 12 y 13

Se sub-fraccionan en la columna C<sub>2</sub> que contiene 8 g de sílica gel y eluye con solventes en orden de polaridad, dio las siguientes fracciones:

TABLA 9-2. Solventes Adecuados para el Monitoreo y Análisis de las Fracciones en TLC de la Columna C<sub>2</sub>

| <b>Solvente</b>                  | <b>Fracciones</b> |
|----------------------------------|-------------------|
| Hexano 100                       | 1, 2              |
| Hexano: Acetato de Etilo (50:50) | 3 a 17            |
| Hexano: Acetato de Etilo (25:75) | 18                |
| Acetato de Etilo 100             | 19                |
| Metanol 100                      | 20 a 25           |

Fuente: (JÁTIVA, Cumandá, 2015, p.221)

Realizado por: SALAZAR, Alexis.

Se monitorearon cada una de las fracciones de la siguiente manera (Cromatografía TLC7).

TABLA 10-2. Resultados de los R<sub>f</sub>s en TLC de las Fracciones 3 Y 18 C<sub>2</sub>

| <b>FASE ESTACIONARIA : Sílica G<sub>F254</sub> 1 y 18 C<sub>2</sub></b> |                |                |                |                |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>SOLVENTE: Hexano :EtOAc (80:20)</b>                                  |                |                |                |                |
| <b>REVELADOR: ROSENTHALER</b>   |                |                |                |                |
| <b>Fracción</b>   | <b>3(PURO)</b> | <b>4(PURO)</b> | <b>5(PURO)</b> | <b>6(PURO)</b> |
| <b>R<sub>f1</sub></b>   | 0.68           | 0.68           | 0.68           | 0.68           |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

Se unen por tener los mismos compuestos, mientras que las fracciones 9 a 11 se unen por tener los mismos R<sub>f</sub>s.

TABLA 11-2. Resultados de los Rf's en TLC de las Fracciones 9 y 11 C<sub>2</sub>

| <b>FASE ESTACIONARIA: Sílica G<sub>F254</sub> 9y 11 C<sub>2</sub></b> |          |           |           |
|---|----------|-----------|-----------|
| <b>SOLVENTE: Hexano:EtOAc (80:20)</b>                                 |          |           |           |
| <b>REVELADOR: ROSENTHALER</b>   |          |           |           |
| <b>FRACCIONES</b>   | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> |
| <b>Rf</b>   | 0.48     | 0.48      | 0.48      |
|   | 0.87     | 0.87      | 0.87      |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

Purificar en columna C<sub>21</sub> de 1cm de diámetro x 30 cm de largo que contiene 8g de sílica gel las fracciones 9, 10, 11 unidas, se eluyó de la siguiente manera:

TABLA 12-2. Solventes Adecuado para el Monitoreo y Análisis de las Fracciones en TLC de la Columna C<sub>21</sub>.

| Solvente                        | Fracción      |
|---------------------------------|---------------|
| Hexano 100                      | 1, 2, 3, 4, 5 |
| Hexano : acetato de etilo 80:20 | 6, 7, 8, 9    |
| Hexano : acetato de etilo 50:50 | 10, 11, 12    |
| Acetato de etilo 100            | 13            |
| Metanol 100                     | 14            |

Fuente: (JATIVA, Cumandá, 2015, p.221)

Realizado por: SALAZAR, Alexis.

El control de las fracciones se realiza en capa fina con diferente solventes y proporciones cambian los reactivos de revelado lo cual demuestra que hay mezcla de terpenos y flavonoides.

De la siguiente manera:

TABLA 13-2. Resultados de los Rfs en TLC de las Fracciones 1- 9 C<sub>2</sub> y 10-16 C<sub>2</sub>.

| Fase Estacionaria: Sílica G <sub>F254</sub> 1 - 9 C <sub>2</sub> |        |        | Fase Estacionaria: Sílica G <sub>F254</sub> 10 - 16 C <sub>2</sub> |         |         |
|--|--------|--------|--|---------|---------|
| Solvente: Hexano:EtOAc (80:20)                                   |        |        | Solvente: Tolueno: EtOAc (90:10)                                   |         |         |
| Revelador: ROSENTHALER   |        |        | Revelador: Sulfato De Cerio  |         |         |
| Fracciones   | 3,4,5  | 6 y 7  | Fracciones   | 10 A 14 | 15 A 16 |
| Rf   | 0.9375 | 0.8125 | Rf   | 0.48    | 0.9     |
| Decisión   | UNIR   | PURO   | Decisión   | UNIR    | UNIR    |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

La unión de las fracciones se realiza de la siguiente manera:

- Fracciones 3, 4, 5, 6 se unen color violeta forman el compuesto III.
- Fracciones 6 y 7 están puras constituyen el compuesto IV.

#### 2.6.8.6 Tratamiento de la Fracción 14 de C1

El eluido de color amarillo se concentró en rota vapor deo por 24 horas presentando un sólido amarillo que se deja en el vial sacando únicamente el líquido. La cromatografía del sólido da el compuesto V. La fase aceitosa se cromatografió en columna C<sub>5</sub> y eluye de la siguiente manera:

TABLA 14-2. Solventes Adecuados de Elución para la Fracción 14 aceitosa C<sub>1</sub>.

| <b>Solvente de Elución</b> | <b>Fracción</b> |
|----------------------------|-----------------|
| EtOAc (100)                | 1, 2, 3         |
| MeOH                       | 4, 5, 6         |

Fuente: (JÁTIVA, Cumandá, 2015, p.221)

Realizado por: SALAZAR, Alexis.

La cromatografía de todas las fracciones en sílica gel G<sub>F254</sub> y como solvente de corrido en BAW no da manchas definidas.

#### 2.6.8.7 Tratamiento de las Fracciones 15, 16, 17, 18 de C<sub>1</sub>

Que se obtuvieron en mayor cantidad como extracto pardo rojizo se cromatografió en capa fina de sílica gel G<sub>F254</sub> con B: A: W Butanol: Ácido Acético: Agua (5:1:4) (Cromatografía TLC 5) dio los siguientes R<sub>f</sub>:

TABLA 15-2. Resultados de los R<sub>f</sub> en TLC de las Fracciones 15- 18 C<sub>1</sub>.

| <b>PLACA Sílica G<sub>F254</sub> 15 - 18 C<sub>1</sub></b> |           |           |           |           |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>SOLVENTE: BAW 5:1:4</b>                                 |           |           |           |           |
| <b>REVELADOR: YODO</b>                                     |           |           |           |           |
| <b>FRACCIONES</b>  | <b>15</b> | <b>16</b> | <b>17</b> | <b>18</b> |
| <b>R<sub>f</sub></b>                                       | 0.25      | 0.27      | 0.18      | 0.18      |
|  | 0.39      | 0.41      | 0.27      | 0.44      |
|  | 0.62      | 0.53      | 0.41      |           |
|  | 0.74      | 0.74      |           |           |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

La fracción 15 a 18 presenta sólidos amorfos pardo rojizos, se une para columna C<sub>3</sub> y ser monitoreadas en TLC, posible flavonoide se verificará el IR y UV.

### 2.6.8.8 Tratamiento de las Fracciones 19, 20, 21, 22, 23 de C1.

Fueron eluidas en la columna C<sub>3</sub> con Acetato de Etilo: Metanol (50:50) v/v son coloreadas, la cromatografía de capa fina para flavonoides con Acetato de Etilo: Ácido Acético: Ácido Fórmico: Agua (100:11:11:26) dio manchas indefinidas y con cola. Al cambiar el solvente a B: A: W Butanol: Ácido Acético: Agua (5:1:4) se definieron en manchas redondas en tercio medio y que se intensifican con sulfato de cerio con los siguientes Rfs. (TLC 6)

TABLA 16-2. Resultados de los Rfs en TLC de las Fracciones 19 -23 C<sub>1</sub>.

| FRACCIONES 19 a 23 C <sub>1</sub> |      |      |      |      |      |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|
| SOLVENTE: BAW 5:1:4               |      |      |      |      |      |
| Fracción                          | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   |
| Rf1                               | 0.71 | 0.68 | 0.75 | 0.73 | 0.82 |

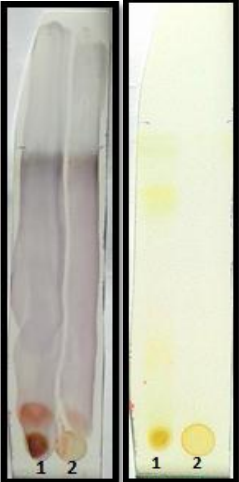
Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

La unión de las fracciones de 19 a 23 eliminadas el solvente son pastosas y pardas por lo cual se agregó Hexano y agito con espátula, dio una fase hexánica amarilla; al residuo etanólico se agregó acetona y removió con espátula dio una fase coloreada y dio un residuo pardo líquido pardo oscuro denso que da reacción positiva para fenoles con Cloruro Férrico.

### 2.6.9 Placas de las Cromatografías en Capa Fina (TLC) y Columna Cromatográfica (CC).

#### 2.6.9.1. Placa Cromatográfica Preliminar del Extracto Etanólico.

FOTOGRAFÍA 2-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C<sub>1</sub>)

|   |  |
|---|--|
| <b>TLC 1</b>  |  |
| <b>Placa de Sílica gel <math>G_{F254}</math></b>                                  |  |
| <b>Solvente corrido</b>   | de Hexano: Acetato de Etilo (1:1)          |
| <b>Revelador</b>  | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Rosenthaler |
|  |  |
| <b>Muestras</b>   |  |
| 1   | Extracto Etanólico                         |
| 2   | Extracto Toluénico                         |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

### 2.6.9.2. Separación del Extracto Etanólico en Columna (C<sub>1</sub>).

FOTOGRAFÍA 3-2. Columna Cromatografía del Extracto Etanólico (C<sub>1</sub>)





Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015



### 2.6.9.3. Placas Cromatográficas de las Fracciones (0-23) del Extracto Etanólico

FOTOGRAFÍA 4-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C1)



FOTOGRAFÍA 5-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C1)

| TLC 2  |  | TLC 3   |  |
|--|--|---|--|
| Placa de sílica gel $G_{F254}$   |  | Placa de sílica gel $G_{F254}$  |  |
| Solvente de corrido  | Tolueno: EtOAc (90:10)                     | Solvente de corrido   | Hexano:EtOAc(70:30)                        |
| Revelador  | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Rosenthaler | Revelador   | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Rosenthaler |
|  |  |  |  |
| Fracción   | Rf   | Fracción  | Rf   |
| 0  | 0  | 4   | 0.07<br>0.23<br>0.36<br>0.58               |
| 1  | 0  | 5   | 0.07<br>0.15<br>0.61                       |
| 2  | 0.9  | 6   | 0.07<br>0.18<br>0.64                       |
| 3  | 0.71<br>0.88                               | 7   | 0.07<br>0.15<br>0.66                       |
| 4  | 0.71<br>0.88                               | 8   | 0.18<br>0.66                               |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

FOTOGRAFÍA 6-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C<sub>1</sub>)

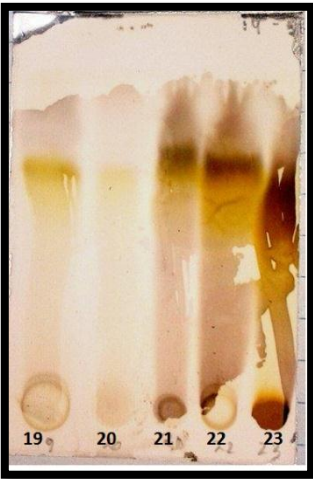
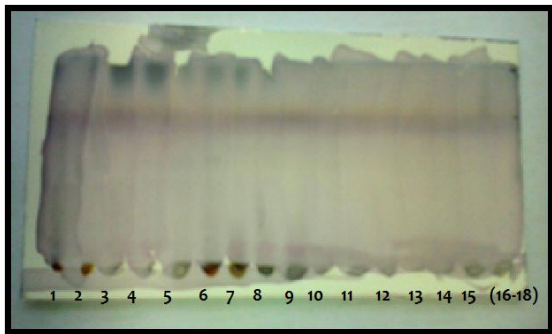
FOTOGRAFÍA 7-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C<sub>1</sub>)

| TLC 4  |  | TLC 5   |   |
|--|--|---|---|
| Placa de sílica gel $G_{F254}$   |  | Placa de sílica gel $G_{F254}$  |   |
| Solvente corrido de  | Hexano:EtOAc(70:30)                        | Solvente corrido de   | EtOAc:Ác.Acético:Ác.Fórmico: Agua (100:11:26) |
| Revelador  | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Rosenthaler | Revelador   | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Rosenthaler    |
|  |  |  |   |
| Fracción   | Rf   | Fracción  | Rf  |
| 8-9  | 0  | 15  | 0.25<br>0.39<br>0.62<br>0.74                  |
| 10   | 0.22<br>0.33<br>0.94                       | 16  | 0.27<br>0.41<br>0.53<br>0.74                  |
| 11   | 0.31                                       | 17  | 0.18<br>0.27<br>0.41                          |
| 12   | 0.22                                       | 18  | 0.18<br>0.44                                  |
| 13   | 0.63                                       | 16  | 0.23  |
|  |  | 19  | 0.30<br>0.65                                  |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

FOTOGRAFÍA 8-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C<sub>1</sub>) Y (C<sub>2</sub>)

FOTOGRAFÍA 9-2. Cromatografía del Extracto Etanólico (C<sub>1</sub>) Y (C<sub>2</sub>)

| TLC 6  |                  | TLC 7   |                      |
|--|------------------|---|----------------------|
| Placa de sílica gel $G_{F254}$   |                  | Placa de sílica gel $G_{F254}$  |                      |
| Solvente de corrido  | BAW (5:1:4)      | Solvente de corrido   | Hexano:EtOAc (80:20) |
| Revelador  | Sulfato de Cerio | Revelador   | Rosenthaler          |
|  |                  |  |                      |
| Fracción   | Rf               | Fracción  | Rf                   |
| 19   | 0.71             | 3   | 0.68\                |
|  |                  |   | 0.90                 |
| 20   | 0.68             | 4   | 0.68                 |
|  |                  |   | 0.90                 |
| 21   | 0.75             | 5   | 0.68                 |
|  |                  |   | 0.90                 |
| 22   | 0.73             | 6   | 0.68                 |
|  |                  |   | 0.90                 |
| 23   | 0.82             | 9   | 0.48                 |
|  |                  |   | 0.87                 |
|  |                  | 10  | 0.48                 |
|  |                  |   | 0.87                 |
|  |                  | 11  | 0.48                 |
|  |                  |   | 0.87                 |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

## CAPÍTULO III

### 3.1. ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1.1 Análisis de la Especie Vegetal

El vegetal de nombre común Hierba del Ángel fue identificado por el curador del herbario de le ESPOCH Ing. Jorge Caranqui, el mismo que la identifico como *Desmodium*, genero *molliculum* perteneciente a la familia *Fabaceae* su nombre científico *Desmodium molliculum*, conocido comúnmente como Hierba del Infante, Pega, Manayupa, *Ranamanayupana* (Vocablo Quechua).

Vegetal exótico de regiones tropicales y subtropicales de Europa, muy representativa en toda América desde Canadá hasta Argentina, en nuestro país es una especie silvestre encontrada a una altura de 2. 550 msnm.

#### 3.1.2 Análisis del Extracto Etanólico

Se prepara 1 kg de vegetal lavando con hipoclorito al 5% para eliminar microorganismos, se trituro y licuo con etanol de 96% por tratarse de planta fresca que contiene una cantidad específica de agua, se colocó en un recipiente de vidrio de boca ancha para macerar por 72 horas con agitación manual esporádica.

El solvente de extracción debe cubrir completamente la muestra, dejar en un sitio y a la oscuridad para evitar los procesos clorofilianos. El macerado se filtra por decantación sobre un cernidor plástico para retener los sólidos que se eliminan, mientras que el líquido se concentra en rota vapor hasta un 1/8 de volumen total (250 ml).

El concentrado etanólico se dejó en refrigeración por 24 horas precipitando la clorofila que se elimina por centrifugación queda en la base de los tubos de centrifuga, el sobrenadante se recoge, determinando sus propiedades físicas, y cromatografía preliminar.

### 3.1.3 Análisis Físico - Químico y Cromatográfico del Extracto Etanólico

#### 3.1.3.1. Determinación de las Características Físicas y Químicas

Entre las propiedades físicas están comprendidas las organolépticas en la cual se aplica la evaluación sensorial para determinar el olor y el sabor y los procesos gravimétricos para determinar la densidad obteniéndose los siguientes

TABLA 17-3. Parámetros Físicos – Químicos del Extracto Etanólico

| PARÁMETRO |                    |
|-----------|--------------------|
| ASPECTO   | Líquido (Turbidez) |
| COLOR     | Verde oscuro       |
| OLOR      | Herbal             |
| SABOR     | Amargo             |
| DENSIDAD  | 0.1567 g/ml        |

| TAMIZAJE    | REACCIONES |
|-------------|------------|
| FENOLES     | +          |
| SHINODA     | +          |
| LIEBERMAN   | +          |
| ROSENTHALER | +          |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

El extracto etanólico se le puede denominar también extracto botánico por cuanto no se le adicionado ningún conservante, indica que se trata de una solución parda verdosa turbia de sabor amargo y olor herbal con la densidad relativa a 25 °C lo cual indica que es más liviana que el agua.

En el tamizaje fitoquímico para derivados dio positivo en la prueba de Fenólicos con cloruro férrico (Taninos - verde marrón), al igual que con las pruebas Shinoda (derivados Fenólicos – amarillo a rojo) y Lieberman Bouchard (Terpenos – verde azulado).

### 3.1.4 El Análisis Cromatográfico Preliminar

Se realiza en capa fina de sílica gel  $G_{F254}$  como adsorbente y como solventes de corrido mezclas Hexano: Acetato de Etilo (7:3), (1:1), (4:6) revelados con Rosenthaler se obtienen manchas redondeadas y coloreadas. Dando como resultado una buena separación con manchas redondeadas y distribuidas desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente de corrido Hexano: Acetato de Etilo (1:1).

Esta es la condición básica para aplicarse en la separación de columna cromatográfica de una mayor cantidad de extracto etanólico.

FOTOGRAFÍA 10-3. Placa Preparativa del Extracto Etanólico



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

### 3.1.5 Análisis del Fraccionamiento del Extracto Etanólico

Fraccionamiento en columna C<sub>1</sub> de sílica gel de 5g del extracto etanólico de *Desmodium* se realiza en orden de polaridad con Hexano, Hexano: Acetato de Etilo (70:30) y (90:10) posteriormente con Acetato de Etilo (100), Acetato de Etilo: Metanol (95:5), Acetato (5:5) y finalmente Metanol (100).

En el extracto etanólico están presentes sustancias orgánicas conocidas como metabolitos secundarios que según la información bibliográfica se tratan de terpenos y flavonoides formando un complejo fitoquímico las mismas que deben ser aisladas purificadas y si las condiciones se prestan determinado el tipo de metabolito. Para la determinación espectroscópica se requiere que los metabolitos secundarios estén puros.

### 3.1.6 Monitoreo de Fracciones

El monitoreo de las fracciones C<sub>1</sub> se realizan de la siguiente manera:

TABLA 18-3. Solventes Adecuado para el Monitoreo y Análisis de las Fracciones en TLC de la Columna C<sub>1</sub>

| Fracciones                       | Solvente de corrido   |
|----------------------------------|---|
| 0, 1, 2, 3                       | Hexano (100)  |
| 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 | Hexano : Acetato de Etilo (90:10)   |
| 13, 14                           | Acetato de Etilo (100)  |
| 15, 16                           | Metanol (100)<br>Butanol saturado de Agua<br>Butanol: Ácido Acético: Acetona (25: 15: 10)                                       |
| 17, 18, 19, 20                   | Metanol : Amoníaco (98:2)<br>Acetato de Etilo: Ác.Acético: Ác.Fórmico: Agua (100:11:11:26)<br>Metanol: acetato de etilo (40:12) |
| 21, 22, 23                       | Cloroformo: Ácido Acético: Metanol: Agua (60:32:12: 8)  |

Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

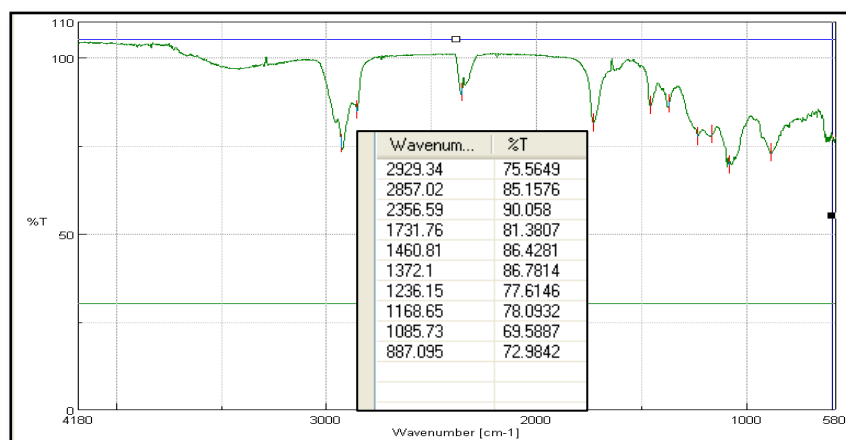
a) La fracción 0-1 se elimina por ausencia de compuestos.

b) La fracción 2 esta pura considerándole compuesto I, con los siguientes datos:

IR= 2929, 2857, (OH), 1731, (Pirano), 1450, 1236 (C-H), 887 (Aromático)

Posible Canferol los datos comparados con reportes de Olga look.

FIGURA 21-3. Espectro Infrarrojo del Compuesto I. (Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero del 2015).



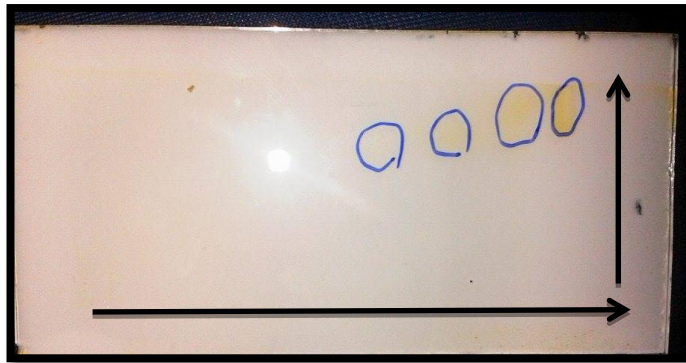
Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

c) A La fracción 3 y 4 se le agregó Metanol y Hexano, en la fase hexánica superior se extrajo los pigmentos verdes (Clorofila) dejando un solo compuesto líquido oleoso ligeramente amarillo, se trató de purificar en corrido bidimensional dan 4 franjas  $R_f = (0.67, 0.65, 0.63, 0.61)$ .

Que monitoreadas en capa fina presentan una sola mancha están en pequeña cantidad y si se quiere determinar de qué compuesto se trata será necesario separar mayor cantidad de extracto etanólico.



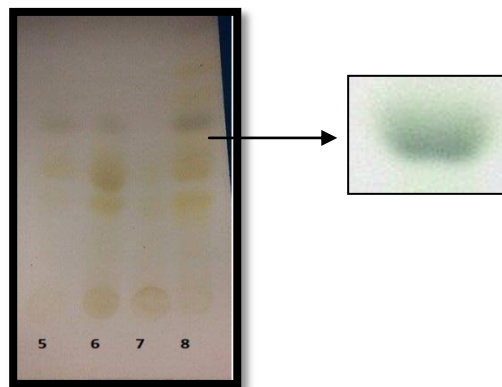
FOTOGRAFÍA 11-3. Placa Cromatográfica Bidimensional de la Fracción 3 y 4 C<sub>1</sub>.



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

- d) Las fracción 5, 6, 7, 8 tienen los mismos compuestos en el tercio inferior con manchas verdes típicas de clorofilas, y una mancha azul-violeta que se encuentra con el frente del solvente en pequeña cantidad que no permite aplicar ninguna espectroscopía por lo cual se eliminan.

FOTOGRAFÍA 12-3. TLC de las Fracciones Clorofílicas 5, 6, 7, 8 (C<sub>1</sub>)



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

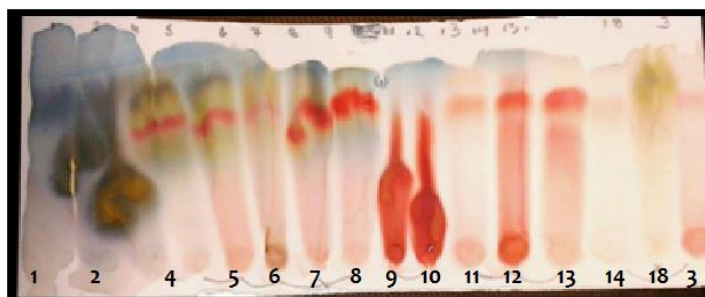
- e) Las fracciones (8-9) se unen porque tienen compuestos similares. En pequeña cantidad por lo cual no se trata.

f) La fracción 10 tiene una mancha azul-violeta y una anaranjada la última en mayor cantidad por lo cual se deja sola.

g) La fracción 11 a más de la mancha violeta y anaranjada tiene una mancha azul-violeta en el tercio inferior y se fracciona para separar los componentes que están en mayor proporción que son los violetas.

Se fracciona en la columna C<sub>4</sub> Hexano: Acetato de Etilo: Metanol puro y en mezclas de las fracciones 5,6, 7 eluidas con Hexano: Acetato de Etilo (1:2.5) en TLC preparativa da 5 franjas reveladas con Rosenthaler dan los compuestos rojos.

FOTOGRAFÍA13-3. TLC de las Fracciones 1 – 18 (C<sub>4</sub>)



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

FOTOGRAFÍA 14-3. Placa Preparativa de las Fracciones 5,6,7 (C<sub>4</sub>)



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

Se purificó el compuesto II en la fracción 1 dando una mancha de color azul – violeta.

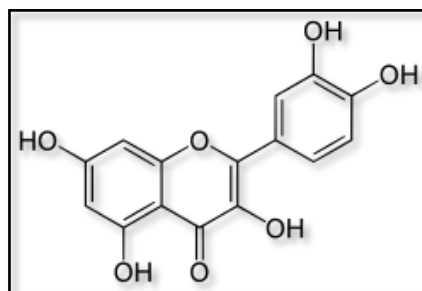
FIGURA 22-3. Espectro Infrarrojo del Compuesto II (C<sub>4</sub>). (Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero del 2015).



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

Posible estructura:

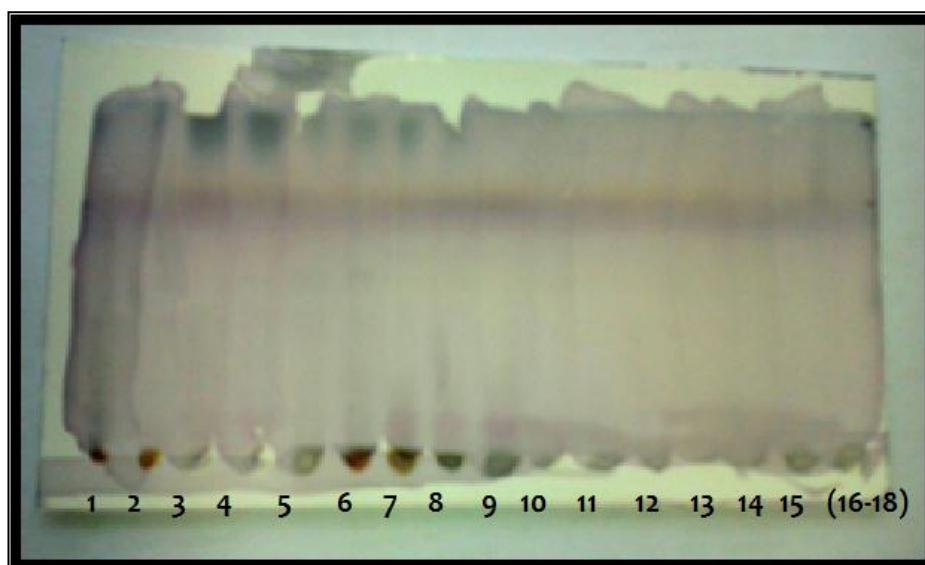
FIGURA 23-3. Estructura Básica Quercetina



Fuente: GONZALES, 2008.

- h) La fracción 12 y 13 tienen dos compuestos unidos en el tercio superior y se purificarán en la columna C<sub>2</sub> se recogieron 18 fracciones eluyendo con Hexano Acetato de Etilo y Etanol en las fracciones 3, 4, 5, 6 un solo compuesto con el frente del solvente que se reúne el compuesto III.

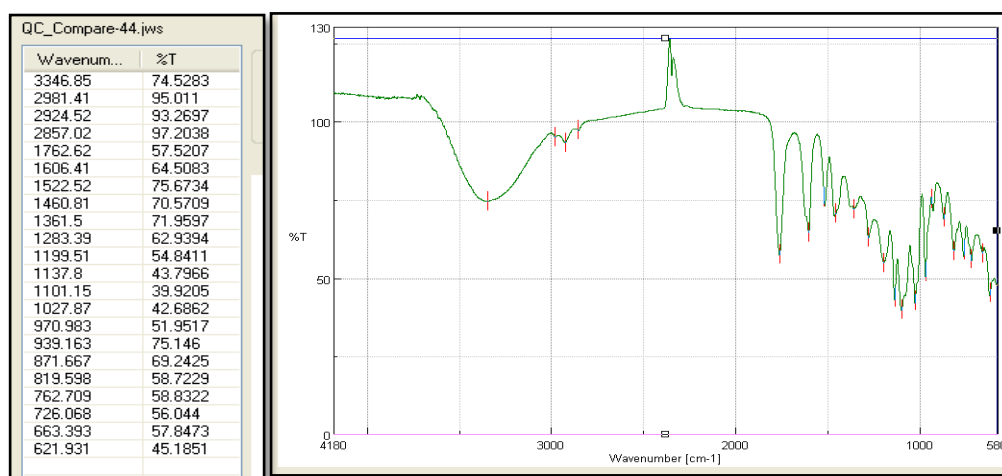
FOTOGRAFÍA 15-3. Cromatografía en Capa Fina de las Fracciones 1- 18 (C<sub>2</sub>)



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

De acuerdo a la figura las fracciones 9,10,11 tienen un compuesto violeta unido al punto de aplicación los mismos que se reúnen y purifican en la columna C<sub>21</sub> y en las fracción 6 y 7 se obtiene un compuesto IV puro.

FIGURA 24-3. Espectro Infrarrojo Representativo de los Compuestos III y IV (C<sub>2</sub> y C<sub>1</sub>). (Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero del 2015).

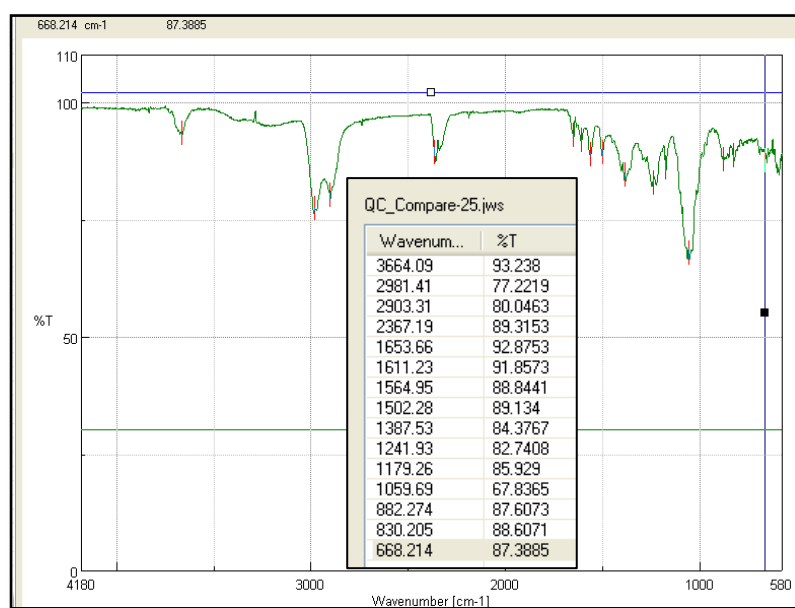


Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

Las bandas características corresponden al gem-dimetil por lo cual se lo considera que es un terpeno.

- i) La fracción 14 una vez concentrada a las 48 horas presenta un sólido amorfo de color amarillo en la base lo cual hace suponer que ese trate de un flavonoide ya que en su cromatografía corre con solventes polares como el Acetato de Etilo y se revela con Sulfato de Cerio. Compuesto V.

FIGURA 25-3. Espectro Infrarrojo Representativo de los Compuestos V. (Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero del 2015).



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

Los valores característicos de 3664, 1241 y 882 son correspondientes al fenol y son similares a los reportados para la Quercetina en *Uncaria Guianensis*.

- a) Las fracciones 15 hasta la 19 dan buena separación en Cloroformo, Ácido Acético, Metanol, Agua (60:32:12:8) y se revela con Rosenthaler lo cual nos indica que contiene saponinas y de acuerdo a la información bibliográfica de este vegetal contiene Soyasapogeninas 1, 2, 3, 4 las mismas que se fraccionaron en columna para purificar estos metabolitos.

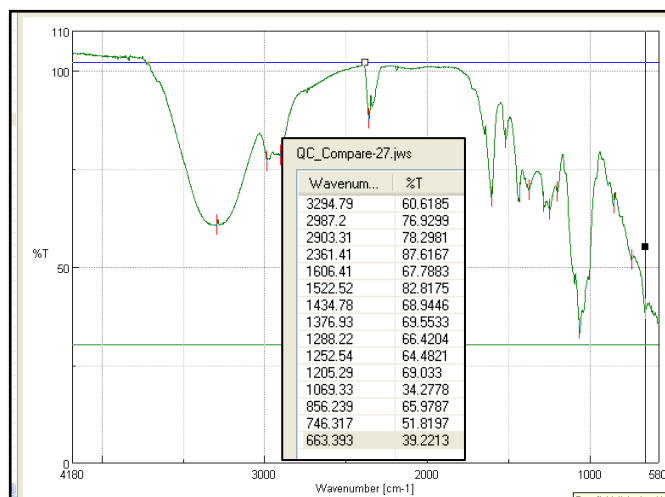
FOTOGRAFÍA 16-3. TLC de las Fracciones 15- 19 (C<sub>1</sub>)



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

Fracciones 15, 16 y 17 y 18 contienen los mismos compuestos por lo cual se purifica en la columna C<sub>3</sub> dando 25 fracciones eluido con Hexano: Acetato de Etilo: Metanol puros y en mezclas, se unieron las fracciones de 2 a 6, 7 a 11, 12 a 14, 19 a 21, 22 sola y 23 a 25 corridas con Acetato de Etilo: Metanol (4:2) y reveladas con Sulfato de Cerio en la fracción 16 hay un compuesto puro compuesto VI.

FIGURA 26-3. Espectro Infrarrojo Representativo de los Compuestos VI (C<sub>3</sub>).  
(Realizado en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Ciencias. ESPOCH. Enero del 2015.)



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

Las bandas a 3362 (OH), 2961(H<sub>2</sub>C-H), 2984(C-H), 1725 (Pirona) correspondiendo ala estructura de un flavonoide posiblemente la Astragalina. Las fracciones 17, 18 ,19 de C<sub>3</sub> se unen y fragmentan en la columna C<sub>32</sub> y fraccionan con Acetato de Etilo y metanol en puras y en mezclas.

En las fracciones de 1 a 6 se encuentra el compuesto VII y en las fracciones de 11 a 14 el compuesto VIII no se obtuvo un espectro claro pero al adicionar cloruro férrico dan coloración azul por lo cual se presume que son taninos.

FOTOGRAFÍA 17-3. Prueba de Cloruro Férrico para Taninos.



Fuente: SALAZAR, Alexis. 2015

- b) Las fracciones 19 a 23 se cromatografían en BAW (Butanol, Ác. Acético, Agua) (5:1:4) y se revelan con Sulfato de Cerio lo cual hace suponer que contienen flavonoides entre los flavonoides uno de los reportados están como la pelargonina orto fosfato lo cual se puede verificar con los espectros UV.

### **3.2. PRUEBAS DE HIPÓTESIS**

Los metabolitos secundarios correspondientes a los terpenos del grupo de las saponinas se separan en cromatografía de capa fina sílica gel con el solvente de corrido Cloroformo, Ácido Acético, Metanol, Agua (60:32:12:8) y se visualizan con el reactivo de Rosenthaler dando la coloración de azul violeta a rojo.

Los compuestos flavonoides se separan en capa fina de sílica gel con el solvente de corrido BAW (Butanol, Ácido. Acético, Agua) (5:1:4) revelados con Sulfato de Cerio dan las coloraciones de rosado a rojo. Los flavonoides tienen la facilidad de cristalizar o precipitar como polvos amarillos solubles en Etanol

### **3.3 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS**

- a. La fracción 2 de la C<sub>1</sub> presenta una sola mancha redondeada se presenta como líquido de color amarillo y corresponde al compuesto I con Rf = 0.9 posible Flavonoide.
- b. A la fracción 3 y 4 purificadas en placa bidimensional dan 4 franjas Rf = (0.67, 0.65, 0.63. 0.61), monitoreadas en TLCB presentan una sola mancha, están en pequeña cantidad y si se quiere determinar de qué compuesto se trata será necesario separar mayor cantidad de extracto etanólico.
- c. De las fracciones 5, 6, 7, 8 unidas presentan manchas verde clorofílicas que no permite aplicar ninguna espectroscopía por lo cual se eliminan.



- d. Las fracciones 8\* y 9 tienen los mismo compuestos en mínima cantidad y no se los trata.
- e. La fracción 10 poca muestra se la deja sola mientras a la fracción 11 se purifica en columna de C<sub>4</sub> se recupera el compuesto II con Rf = 0.58 color azul-violeta posible Flavonoide (Quercetina).
- f. Las fracciones 12 y 13 se purifican varias veces en columna, se monitorean en capa fina y se obtiene el compuesto III con Rf =0.68, el compuesto IV con Rf = 0.81 Terpenos por revelarse con Rosenthaler el grupo fitoquímico se verifica con el IR.
- g. Fracción 14 el sólido amorfo amarillo que precipita en la base del recipiente constituye el compuesto V posible Flavonoide (Quercetina).
- h. Las fracciones 15, 16, 17 y 18 separadas en columna dan compuestos VI posible flavonoide (Astragalina), VII, VIII posible Taninos.
- i. Las fracciones de la 19 a 23 de C<sub>1</sub> se presume de Taninos.

## CONCLUSIONES

- ✓ El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* fresco es fraccionado en columna de sílica gel con Hexano: Acetato de etilo metanol puro y en mezclas en orden de polaridad para obtener los metabolitos Terpénicos en las fracciones 12 y 13 que se revela con Rosenthaler y en el infrarrojo dan las bandas características de 3650-3590 1680-1620.

Se logró en HPLC obtener las saponinas en columna de fase reversa eluidas con Diclorometano-Metanol con un tiempo de retención de 7 minutos por lo cual la hipótesis es positiva.

- ✓ La muestra recolectada en el Cantón Guano parroquia Guanando, provincia de Chimborazo el 21 de Diciembre del 2014 fue identificada taxonómicamente por el curador del herbario de la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO, como *Desmodium molliculum*, vegetal originario de las zonas tropicales, subtropicales y andinas.
- ✓ El vegetal fresco lavado y macerado con etanol 96% dio un extracto verde oscuro, de olor herbario, sabor amargo, densidad 0.1567 g/ml. La cromatografía preliminar da buena separación en Hexano: Acetato de Etilo (1:1).

Se combinaron las técnicas de extracción y eliminación de clorofilas para evitar la interferencia en la extracción de los metabolitos secundarios que forman complejos de difícil separación y purificación, el uso de vegetal fresco que contiene una cantidad suficiente de agua para extraer los componentes del vegetal.

El Tamizaje fitoquímico para derivados Fenólicos con cloruro férrico (Taninos), derivados (Fenólicos) con Shinoda y para (terpenos) Lieberman Bouchard.

Los procesos de maceración, separación en columna cromatográfica, el monitoreo de fracciones y otros procesos de repurificación permitieron obtener especialmente triterpenos conocidos como saponinas y taninos verificados por espectroscopia infrarroja, reacciones de coloración específicas como Rosenthaler para terpenos y Sulfato de Cerio para flavonoides.

- ✓ Mediante el método infrarrojo, se determinó bandas representativas de los compuestos puros, lo que permitió establecer posibles estructuras de metabolitos secundarios presentes en el *Desmodium molliculum*.

El compuesto I presenta bandas IR= 2929, 2857, (OH), 1731 (Pirano), 1450-1236 (C-H), 887 (Aromático) posiblemente Canferol, compuesto II con bandas posiblemente Quercetina, compuestos III y IV las bandas características entre (1376-1335) corresponden al Gem-dimetil posiblemente Terpenos, compuesto V sólido amorfo amarillo posiblemente Flavonoide, compuestos VI bandas entre 1731 (Pirano), 1450- 1236 (C-H), posible Flavonoide, y finalmente en los compuesto VII, VIII dio positiva la prueba de Cloruro Férrico posibles Taninos reportados en la Manayupa del Perú.

- ✓ De la misma manera se logró determinar una metodología para la cuantificación de terpenos de tipo saponina que son los metabolitos predominantes del vegetal que fueron determinados por HPLC, que puede ser reproducidos para la aplicación de cuantificación en un laboratorio de Fitomedicamentos.

## RECOMENDACIONES

1. Se debe mantener una seguridad adecuada cuando se trata de solventes y/o reactivos corrosivos, volátiles, inflamables; en lo posible usar mascarilla, guantes, mandil.
2. Seguir con el estudio del vegetal ya que existen muchas técnicas que permitirían mayor especificidad de resultados y mejor monitoreo, además con la presencia de varios metabolitos, se debería determinar para que otras actividades farmacológicas es óptimo este vegetal.
3. Debemos conservar todas las sustancias ya sean extractos, fracciones y demás fuera de la incidencia de la luz y oxígeno para evitar la degradación de los compuestos presentes y así tener resultados más verídicos en su monitoreo detallado.
4. Teniendo en cuenta este estudio se podría difundir al industrial la técnica de cuantificación y el estudio e identificación que se realizó de la especie de *Desmodium molliculum* que se encuentra en nuestro país para la elaboración de fitomedicamentos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **GOMEZ**, A. Manual de ensayos toxicológicos y farmacológicos experimentales in vivo e in vitro. 2<sup>a</sup>. ed. Zacapa - Guatemala. Servicio de Publicaciones. Universidad de San Carlos Guatemala. 2005. p. 22-23.
2. **MASAHISA**, H. IR-Infrarrojo en fotoquímica orgánica. 2<sup>a</sup>. ed. Torino-Italia Fondo Editorial. PUCP. 2002. p. 123.
3. **RIOS**, M. Plantas útiles del Ecuador. Aplicaciones, retos y perspectivas. 4<sup>a</sup>. ed. Quito-Ecuador. Ediciones Abya-Yala. 2007. p. 325.
4. **ROBERT**, M. En identificación espectroscópica de compuestos orgánicos. 6<sup>a</sup>. ed. Mexico .D.F. – Mexico. Diana. 1980. p. 85.
5. **SILVA**, M. Terpenos, química de los triterpenos. 2<sup>a</sup>. ed. Concepción-Chile Publicación. Universidad de la Concepción. 1992. p. 353-355.
6. **TAKIWASI**, A. Productos medicinales de tecnología farmacéutica. 2<sup>a</sup>. ed. California Estados Unidos de América. Wagners. 1996. p. 567.
7. **TORRES**, J. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. 4<sup>a</sup>. ed. Torres- Perú Concytec. 2012. p. 256.
8. **JATIVA**, C. Prácticas de Fitoquímica Facultad de Ciencias. Parámetros físicos – químicos del extractos vegetales. Riobamba – Ecuador. ESPOCH. 2013. p. 221-235.
9. **WHITE**, A. Hierbas del Ecuador. 4<sup>a</sup>. ed. Quito-Ecuador. Libri Mundi. 1985. p. 345-356.

**10. FLAVONOIDES.**

<http://farmacia.udea.edu.co>

2015/01/22.

**11. PRODUCTO NATURAL PROCESADO DE USO MEDICINAL.**

<http://www.derechoecuador.com>

2014/08/18.

**12. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES.**

<http://www.monografias.com>

2015/01/22.

**13. ACCIONES DIURÉTICAS – ANTIHIPERTENSIVOS.**

<http://www.buenastareas.com>

2015/02/23.

**14. DETERMINACIÓN DE SAPONINAS.**

<http://laquinua.blogspot.com>

2015/03/24.

**15. DESCRIPTION OF PLANTS AND FLOWERS.**

<http://ip.aaas.org>.

2014/05/12.

**16. ESPECTROSCOPÍA UV DE SAPONINAS.**

<http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar>

2015/05/24.

**17. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA.**

<http://www.quiminet.com>

2015/03/15.

**18. USO DE SOLVENTES CROMATOGRÁFICOS.**

<http://www.peruviannature.com>

2015/05/24.

**19. USO DE SOLVENTES EN CROMATOGRAFÍA.**

<http://www.quiminet.com>

2015/05/24.

**20. DATABASE, TROPICAL PLANT.**

<http://www.rain-tree.com>

23 de Enero de 2015.

**21. ESTRUCTURAS DE LAS SAPONINAS.**

[www.ub.edu](http://www.ub.edu)

2015/05/24.,

## ANEXOS

### ANEXO 1. Recolección del Vegetal en la Parroquia de Guanando.



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015

### ANEXO 2. Tratamiento del Vegetal y Obtención del Extracto Etanólico.



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015





**Realizado por:** SALAZAR, Alexis. 2015



**Realizado por:** SALAZAR, Alexis. 2015



**Realizado por:** SALAZAR, Alexis. 2015

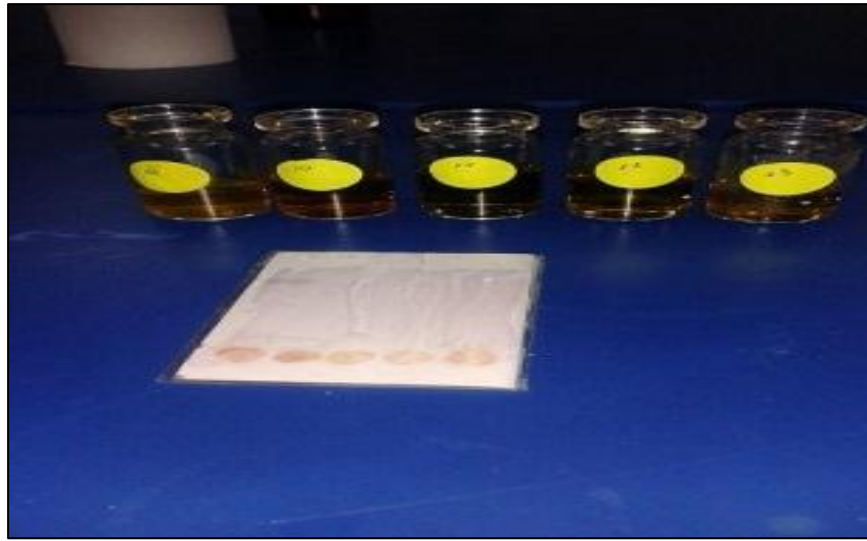


**Realizado por:** SALAZAR, Alexis. 2015

### **ANEXO 3. Fraccionamiento y Monitoreo Cromatográfico.**

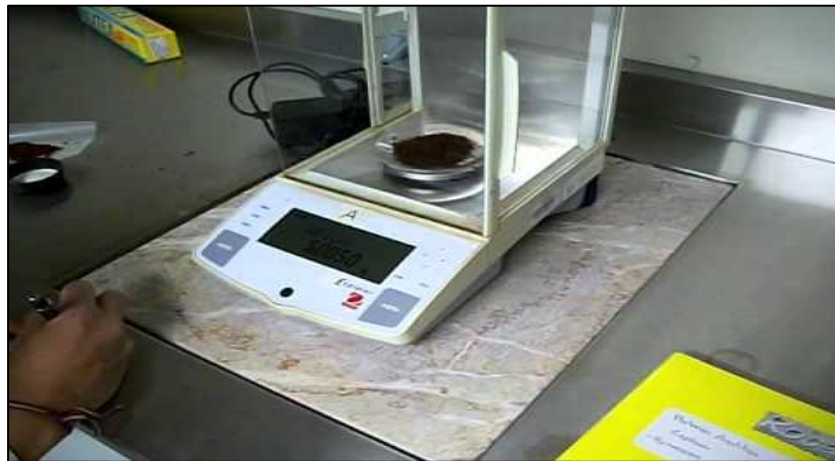


**Realizado por:** SALAZAR, Alexis. 2015



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015

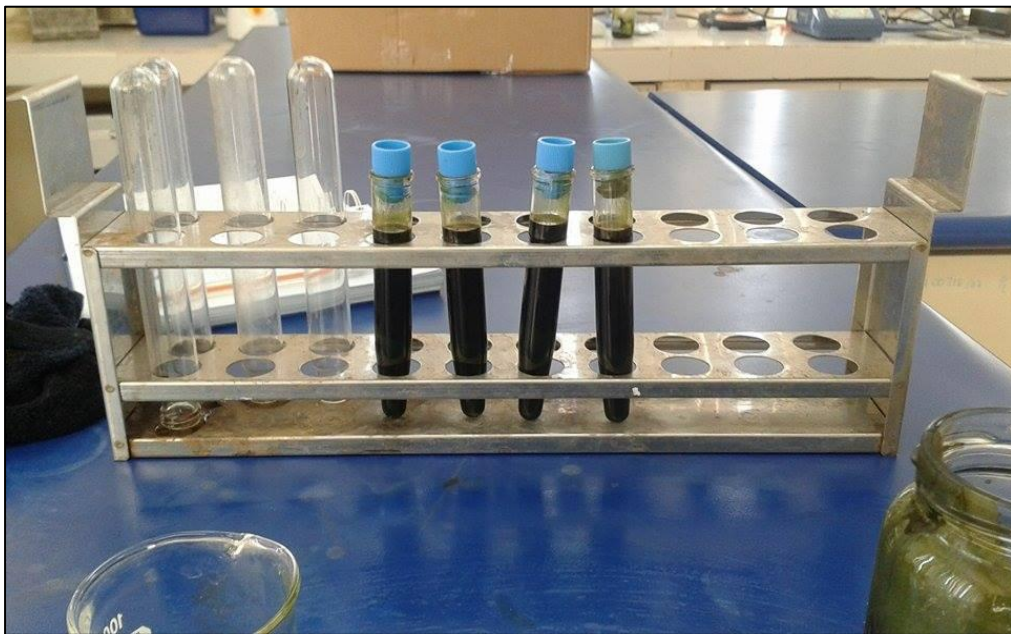
#### ANEXO 4. Propiedades Químicas - Físicas.



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015



**Realizado por:** SALAZAR, Alexis. 2015



**Realizado por:** SALAZAR, Alexis. 2015

### Prueba de Cloruro Férrico (TANINOS)



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015

### ANEXO 5. UV, IR Y HPLC



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015





**Realizado por:** SALAZAR, Alexis. 2015

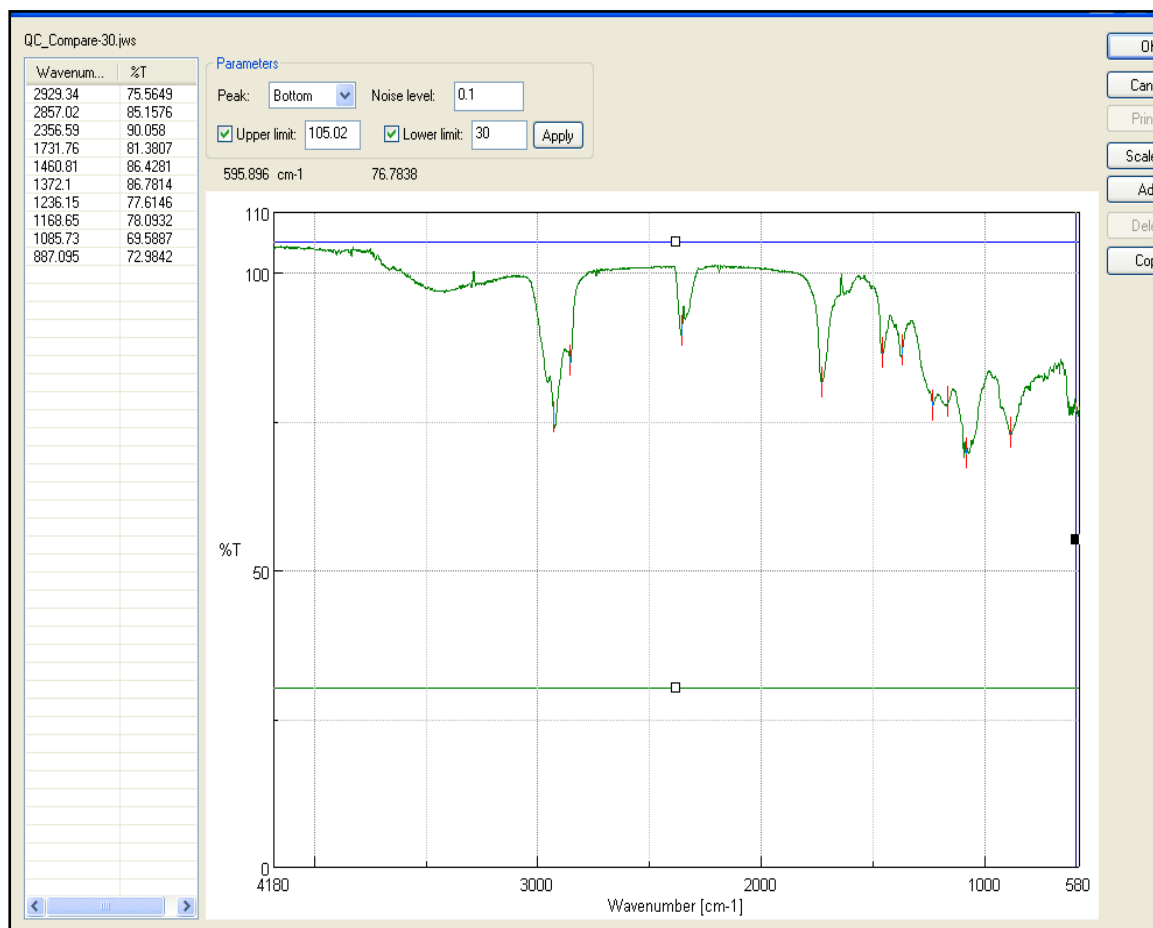


**Realizado por:** SALAZAR, Alexis. 2015

## ANEXO 6.

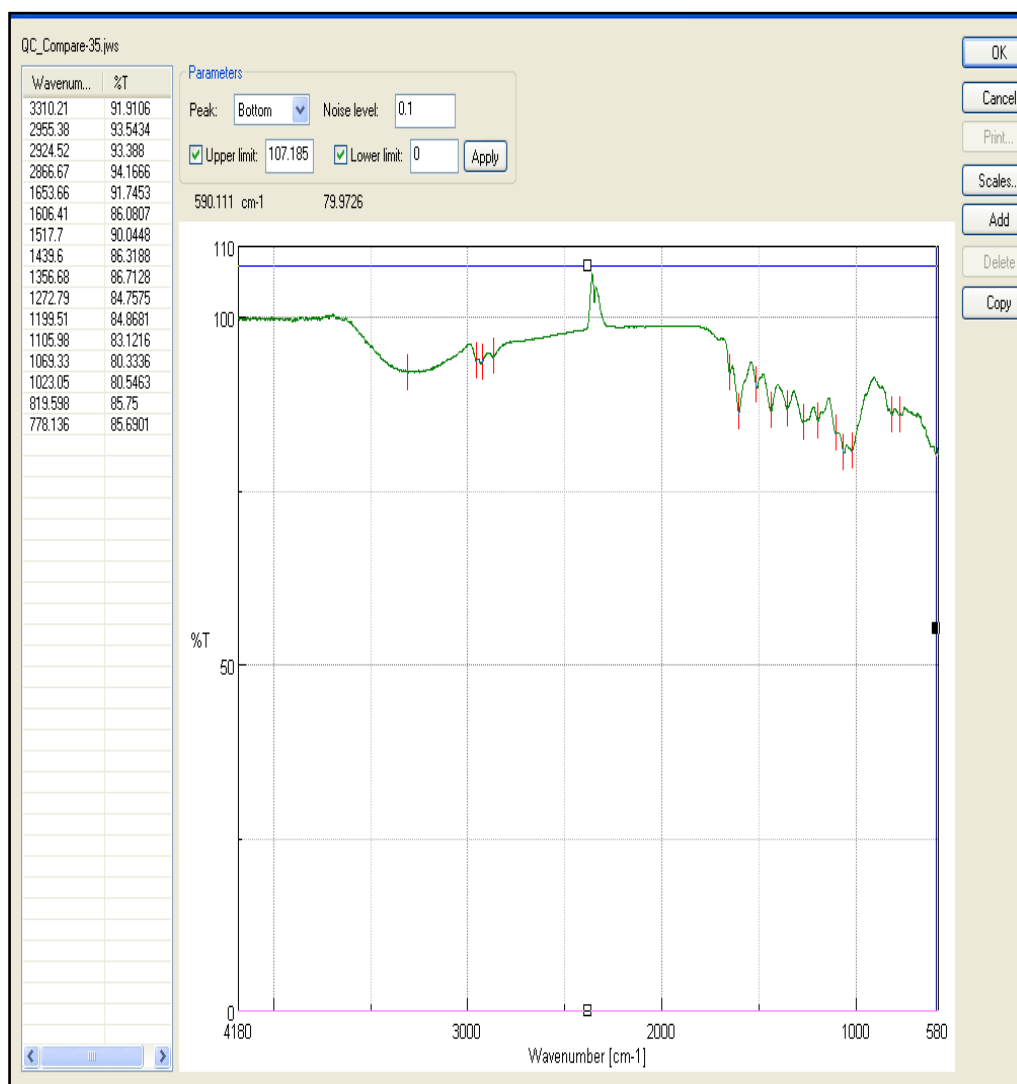
### Espectros Infrarrojos de los Compuestos Puros

#### Compuesto I



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015

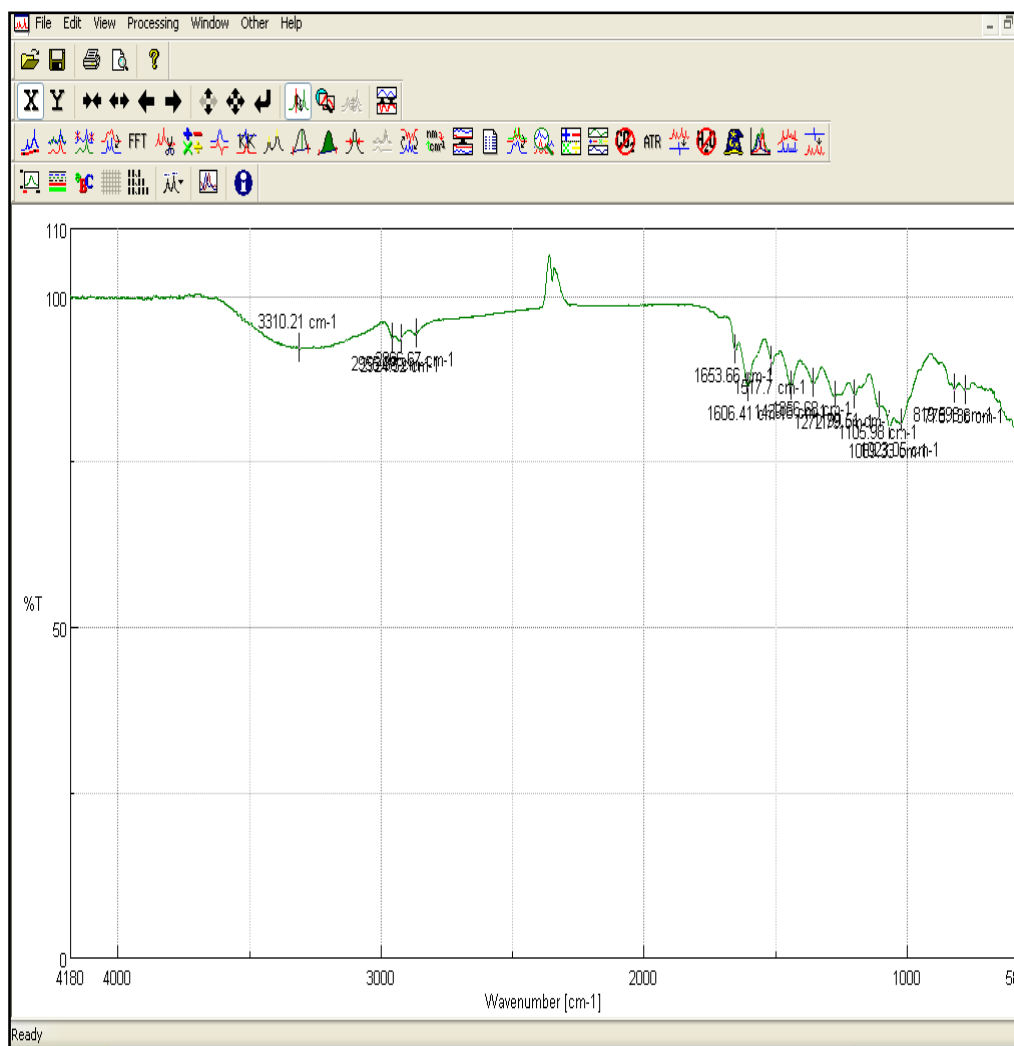
## Compuesto II



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015

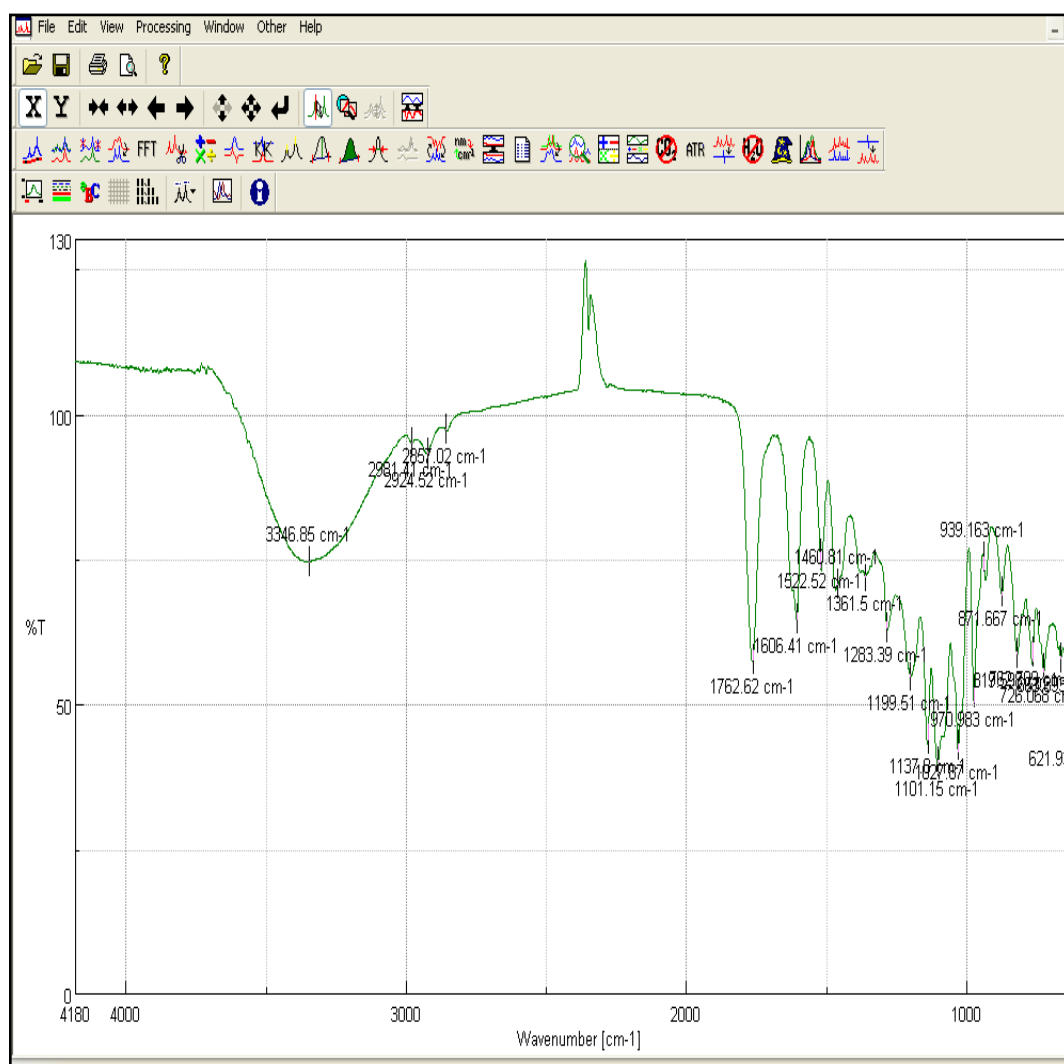


## Compuesto II.



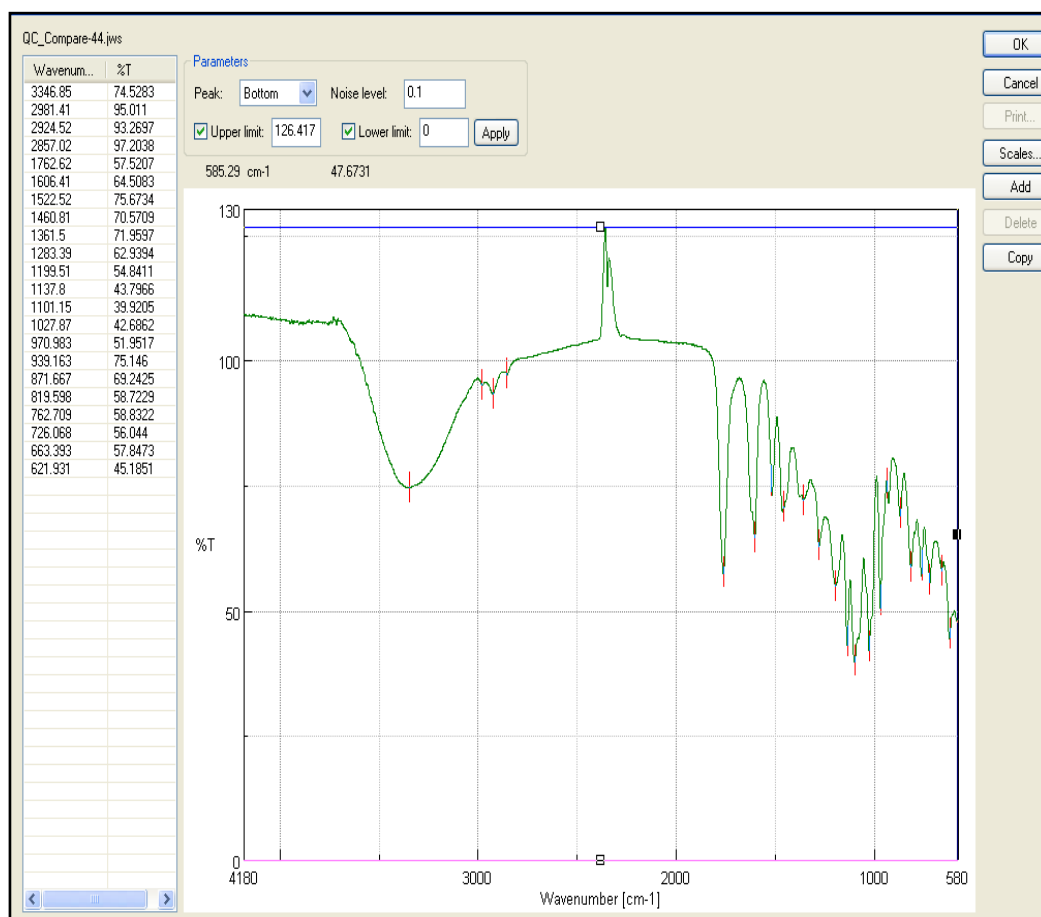
Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015.

### Compuesto III.



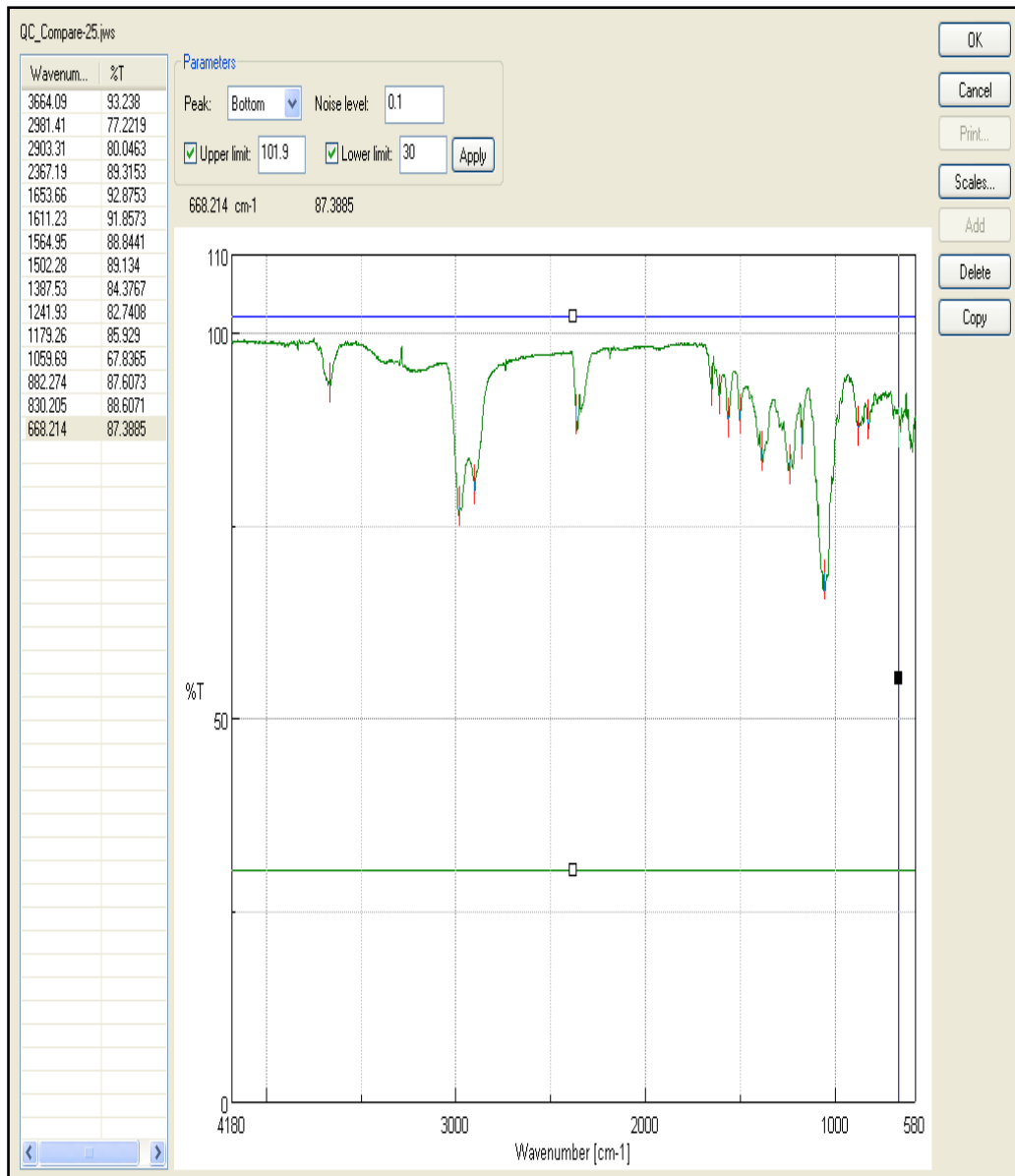
Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015.

### Compuesto III.



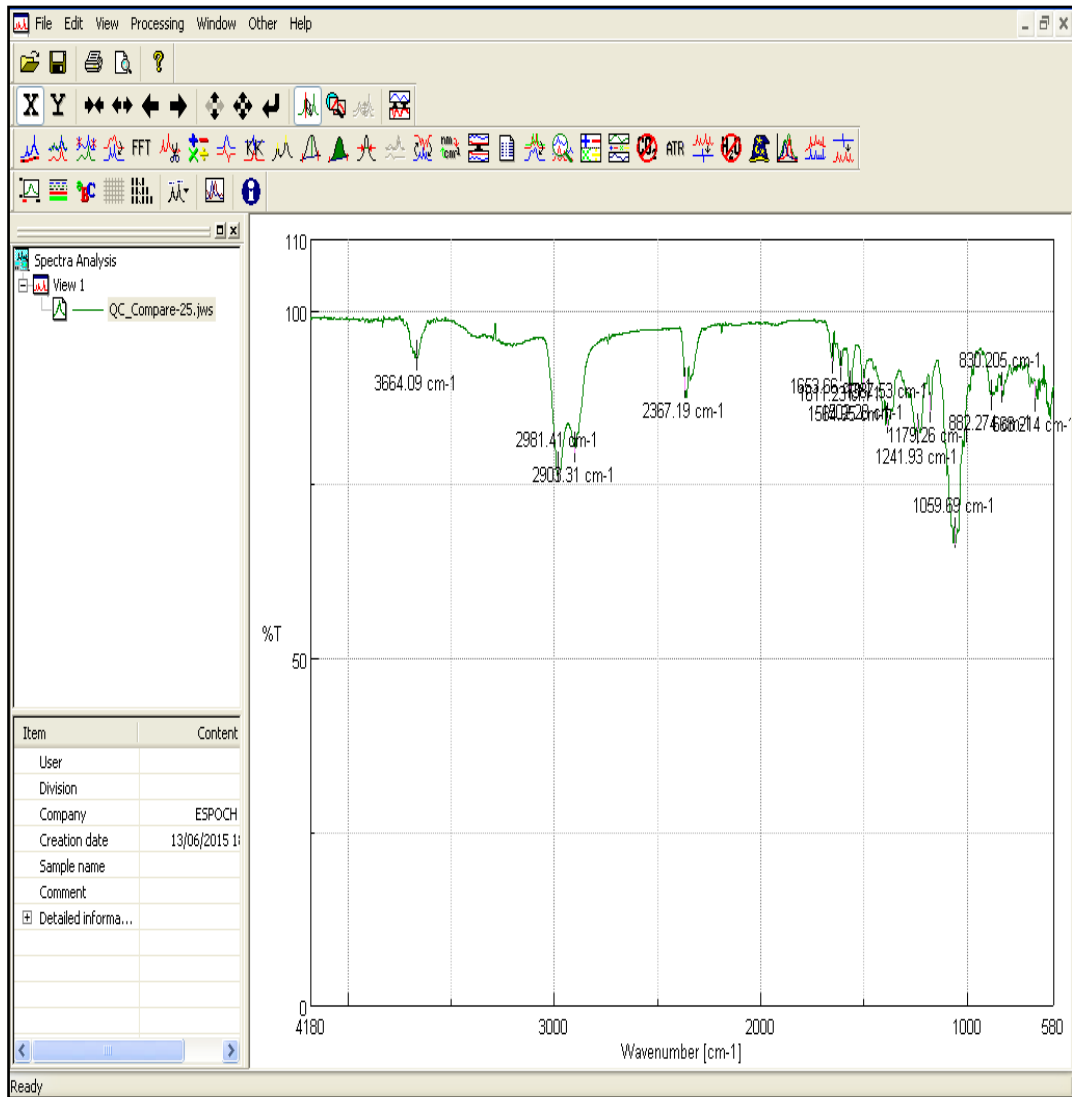
Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015.

## Compuesto IV.



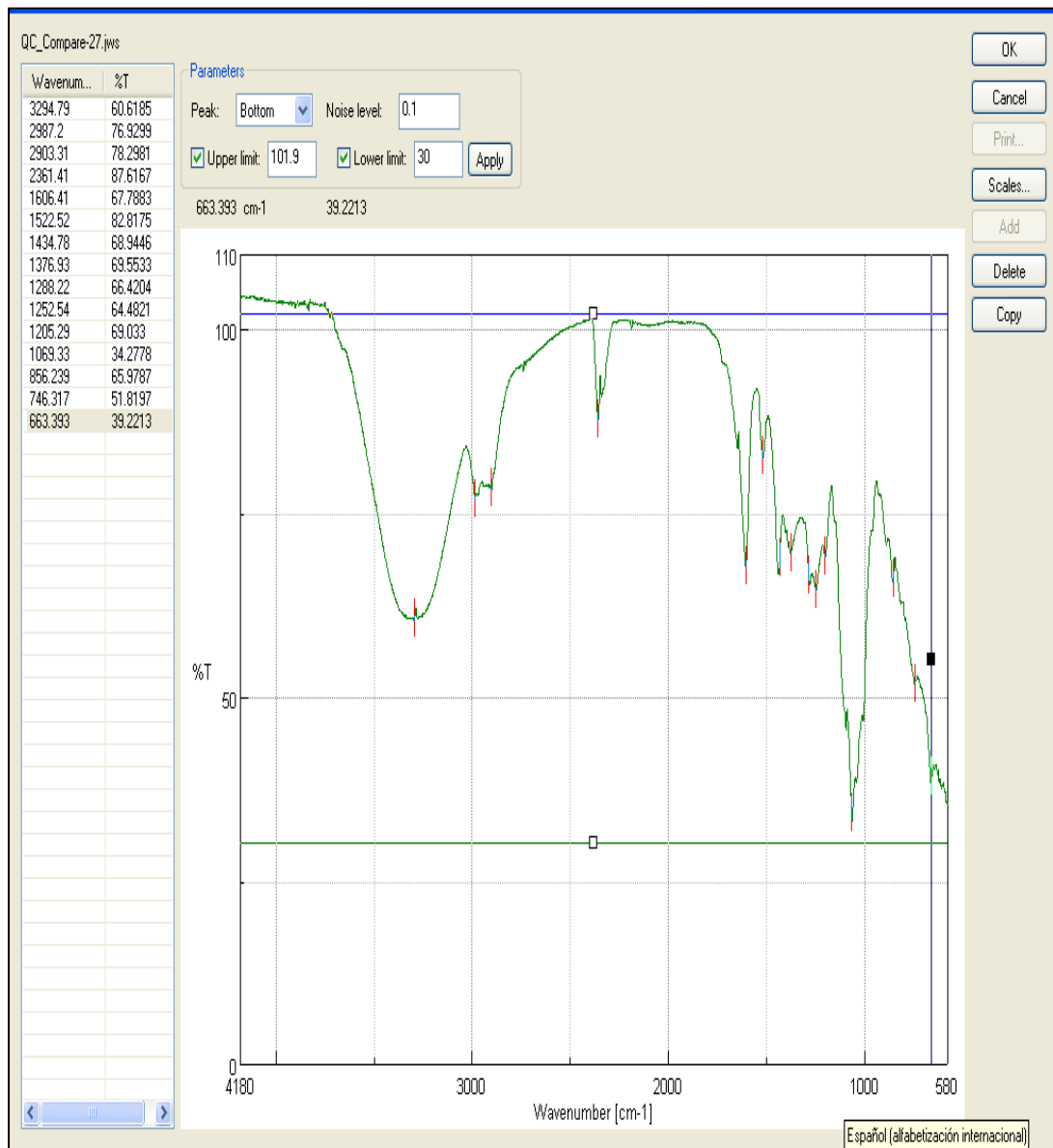
Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015.

## Compuesto IV.



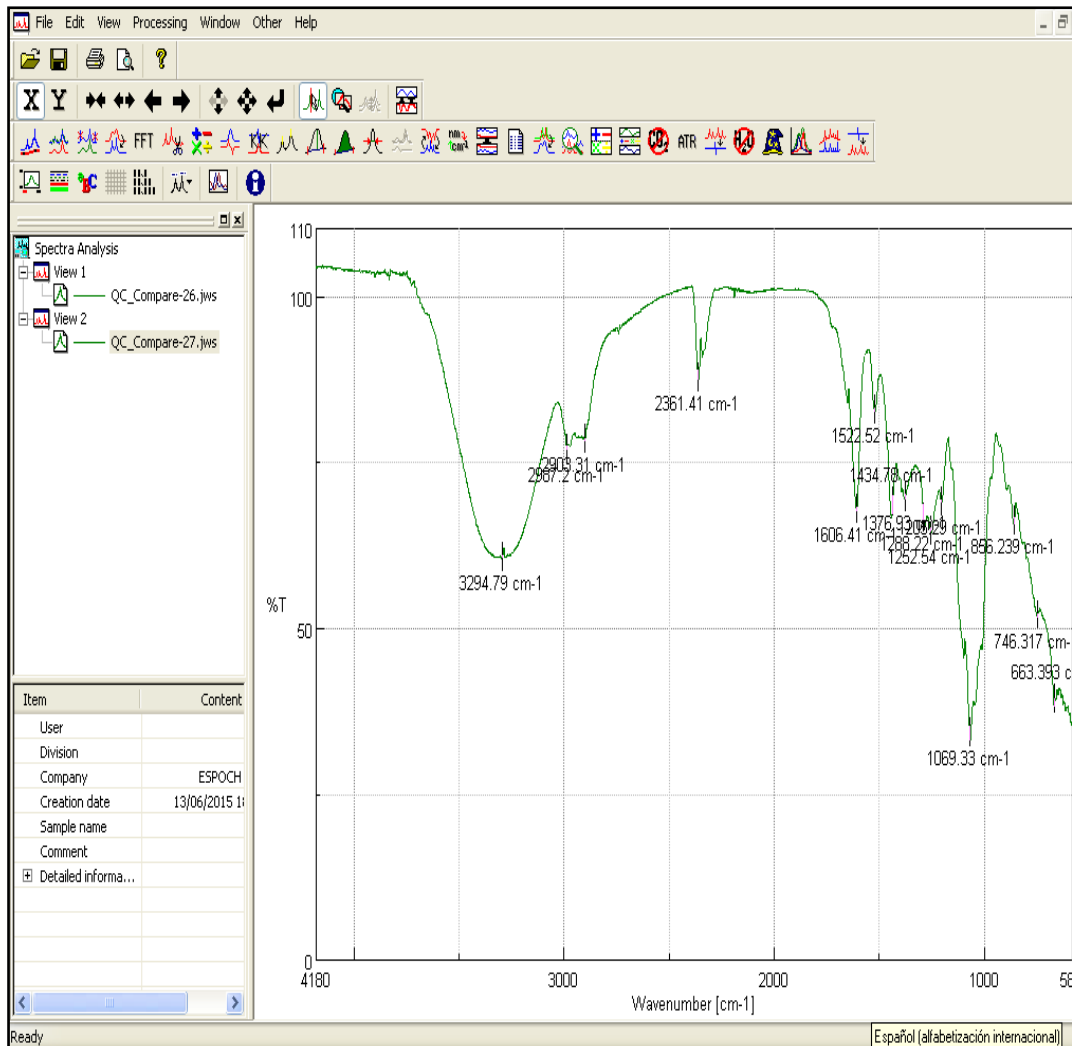
Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015

## Compuesto V.



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015.

## Compuesto V.



Realizado por: SALAZAR, Alexis. 2015.