



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

**“EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA PLANTA ESCAMA DE
PESCADO (*Drymaria ovata*)”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado de:

BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTOR: OCAÑA CAISA MAYRA ALEXANDRA

TUTOR: DR. CARLOS ESPINOZA

Riobamba-Ecuador

2015

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación de investigación certifica la: **“EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA PLANTA ESCAMA DE PESCADO (*Drymaria ovata*)”** de responsabilidad de la Señorita Mayra Alexandra Ocaña Caisa, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizado su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Carlos Espinoza
**TUTOR DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Fausto Contero
MIEMBRO DE TRIBUNAL

BQF: Cecilia Toaquiza
MIEMBRO DE TRIBUNAL

NOTA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN ESCRITO

Yo, **Mayra Alexandra Ocaña** Caisa, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

MAYRA ALEXANDRA OCAÑA CAISA

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por permitirme seguir viviendo y permitirme compartir mis sueños y triunfos con las personas que amo.

Agradezco con mucho amor a Emilio, a mis padres Neri y Maruja, a toda mi familia quienes me han apoyado a lo largo de mi carrera. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica, por su excelente formación académica. Quiero agradecer a la Universidad Nacional de Chimborazo, Laboratorio Agroindustrial, por la apertura a sus instalaciones.

Gracias a mi director de trabajo de titulación Dr. Carlos Espinoza, miembro del tribunal BQF. Fausto Contero por su colaboración en el desarrollo de este trabajo de investigación. Un agradecimiento fraterno a la Dra. Cumanda Játiva por compartir sus conocimientos científicos y técnicos en el transcurso de mi carrera y en el desarrollo de esta investigación.

Mayra

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo va dedicado A mi esposo Emilio Verdezoto a mis padres Neri y Maruja, por ser las personas más importantes en mi vida y las que siempre han estado de forma incondicional en todo el transcurso de mi carrera y de mi vida.

Gracias a Emilio a quien amo mucho, por enseñarme a soñar y cumplir con mis metas, a ser un mejor ser humano. A mis padres por ser un ejemplo a seguir y supieron guiarme por el camino de la vida, por el orgullo que sienten por mí, fue lo que me impulso a llegar al final.

A toda mi familia que supo de una u otra forma apoyarme.

Mayra

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
EtOAc	Acetato de Etilo
H.Ac	Ácido acético glacial
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
NH ₃	Amoníaco
BuOH	Butanol
CHCl ₃	Cloroformo
TLC	Cromatografía en capa fina
TLCP	Cromatografía Capa Fina Preparativa
EtOH	Etanol
ETOH	Extracto Etanólico
NaOH	Hidróxido de Sodio
Λ	Longitud de onda
mg	Miligramos
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno
Ce(SO ₄)	Sulfato de Cerio
UV	Ultravioleta
IR	Infrarrojo

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT.....	¡E
rror! Marcador no definido.	
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	3
1. Marco teórico.....	4
1.1. Plantas medicinales	4
1.2. Metabolitos primarios.....	4
1.3. Metabolitos secundarios	5
1.4. Escama de Pescado (<i>Drymaria ovata</i>).....	7
1.4.1. Taxonomía	7
1.4.2. Origen y distribución geográfica	8
1.4.3. Descripción botánica.....	8
1.4.4. Formas de utilización.....	9
1.5. Recolección, muestreo, transporte y conservación del material vegetal para su procesamiento.....	10
1.5.1. Recolección del material vegetal	10
1.5.2. Muestreo	10
1.5.3. Métodos de extracción	11
1.6. Análisis fitoquímico	13
1.6.1. Tamizaje Fitoquímico	13
1.6.2. Reacciones de identificación.....	13
1.7. Definición de cromatografía	15
1.7.1. Cromatografía en capa fina.....	16
1.7.2. Cromatografía en capa fina preparativa.....	16
1.7.3. Cromatografía bidimensional.....	17
1.7.4. Cromatografía en columna.....	18
1.7.5. Elusión en columna	19

1.7.6.	Solventes utilizados para la elución	19
1.7.7.	Solventes orgánicos	20
1.7.8.	Factor de selectividad	21
1.8.	<i>Análisis espectrofotométrico</i>	22
1.8.1.	Espectrometría	22
1.8.2.	Luz ultravioleta	23
1.9.	Rf	25
1.10.	Infrarrojo.....	25
1.10.1.	Posibilidades de estructuras similares	27
1.11.	Antecedentes de investigación.....	28
2.	METODOLOGÍA	30
2.1.	Lugar de la investigación.....	30
2.2.	Obtención del vegetal	30
2.3.	Materiales, equipos y reactivos	30
2.4.	Factores de estudio	32
2.5.	Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	32
2.6.	Metodología de la preparación de muestra de extracción, purificación e identificación de metabolitos secundarios	32
2.6.1.	Preparación del extracto.....	32
2.6.2.	Elaboración del diagrama de flujo de la preparación del extracto y sub-extracto de Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>)	33
2.6.3.	Preparación de sub-extractos	34
2.6.2.2.	Elaboración del diagrama de flujo de tratamiento del sub-extracto de Butanólico	35
2.7.	Determinación del rendimiento de extracto y sub-extractos.	36
2.8.	Propiedades químicas	37
2.8.1.	Ensayo de espuma (Saponinas).....	37
2.8.2.	Ensayo de Benedict (Taninos)	38
2.8.3.	Ensayo de Shinoda (Flavonoides)	38
2.8.4.	Ensayo de Dragendorff (Alcaloides).....	38

2.8.5.	Ensayo de Rosenthaler (Terpenos).....	38
2.8.6.	Ensayo de Bortrager (Quinonas).....	38
2.9.	Análisis cromatográfico del extracto total y Sub-extracto.....	39
2.10.	Métodos físico-químicos aplicados al análisis de extractos.	36
2.10.1.	Determinación de las características organolépticas	36
2.10.2.	Determinación del pH.....	37
2.10.3.	Resultado de la determinación de las propiedades físicas del extracto	47
2.11.	Extracto total	39
2.12.	Análisis cromatográfico del extracto y sub-extractos.....	39
2.13.	Separación del sub-subextracto de acetato de etilo por cromatografía en columna	40
2.13.1.	Fraccionamiento en columna C.1 del sub-extracto de Acetato de Etilo	40
2.13.2.	Cromatografías de las fracciones obtenidas de la Columna del Sub- subextracto de Acetato de Etilo.	41
2.14.	Separación por cromatografía en Columna C. 2 de la unión de las fracciones 5, 6, 7 del Subextracto de Acetato de etilo	41
2.14.2.	Cromatografía preparativa de la fracciones 8, 9.....	42
2.15.	Columna C. 3 de la unión de las fracciones 11, 12 y 13 de la columna C. 1.....	42
2.16.	Tratamiento del sub-extracto Tolueno-Acetato de etilo (9:1), Columna C. 4	43
2.17.	Cromatografía de las fracciones obtenidas de la columna C. 4 del sub-extracto Tolueno-Acetato de etilo (9:1)	43
2.18.	Tratamiento del sub-extracto Butanólico.....	44
2.18.1.	Fraccionamiento del subextracto butanólico en la columna C. 7	45
2.18.2.	Fraccionamiento de la columna C.7	45
2.18.3.	Cromatografía de las fracciones de la columna N. 7	45
2.21.	Infrarrojo	46
3.	Resultados y discusión de resultados.....	47
3.1.	Cromatográficas del extracto y subextracto	48
3.1.1.	Placas cromatográficas del extracto y subextracto	48
3.1.3.	Placas cromatográficas en capa fina del subextracto de acetato de etilo	49

3.1.6.	Columna C. 3 de la unión de las fracciones 10, 11, 12 y 13 de la columna C. 1	52
3.1.7.	Cromatografía de las fracciones obtenidas de la columna N. 4 del sub-extracto Tolueno-Acetato de etilo (9:1)	53
3.1.8.	Fracciones de la columna C. 7	55
3.1.9.	Columna C.8 de la fracción 4 de la columna C. 7 fase Clorofórmica.....	70
3.1.10.	Columna C. 9 de las fracciones 2, 3 de la columna C. 7	71
	CONCLUSIONES	65
	RECOMENDACIONES.....	66
	REFENCIAS BIBLIOGRAFICA.....	67
	ANEXOS.....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Taxonomía de <i>Drymaria ovata</i>	7
Tabla 2-1:	Solventes utilizados para la elución.....	19
Tabla 3-1:	Solventes orgánicos	20
Tabla 4-2:	Materiales a utilizar en la investigación	30
Tabla 5-2:	Fraccionamiento en columna C.1 del sub-extracto de acetato de etilo de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	41
Tabla 6-2:	Fracciones de la columna C. 2 del sub-extracto de Acetato de Etilo de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	42
Tabla 7-2:	Fracciones de la columna C. 3 de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	42
Tabla 8-2:	Fracciones de la columna C. 4 Del sub-extracto Tolueno-Acetato de etilo (9:1) de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	43
Tabla 9-2:	Fracciones de la columna C. 7 de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	45
Tabla 11-3:	Determinación del peso en concentración de extractos.....	47
Tabla 12-3:	Características físicas del extracto etanólico de Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	47
Tabla 13-3:	Característica del extracto etanólico de Escama de pescado (<i>Drymariaovata</i>)	48
Tabla 14-3:	Fracciones de la columna C.1 de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	58
Tabla 15-3:	Unión Fracciones 4, 5, 6 y 7 en la columna C. 2 de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	58
Tabla 16-3:	Purificación de las fracciones 11, 12, 13 de la columna C. 1 en la columna C. 3 de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	59
Tabla 17-3:	Fracciones de la columna C. 4 de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	60
Tabla 18-3:	Fracciones del sub-extracto butanólico en la columna C. 7 de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	60
Tabla 19-3:	Determinación de IR de los compuestos puros de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	61
Tabla 20-3	Determinación de IR de la planta Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	62
Tabla 22-3:	Determinación de IR.....	63

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.1:	Planta de escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).....	7
Imagen 2-1:	Elución en columna	19
Imagen 3-1:	Luz ultravioleta.....	23
Imagen 4-1:	Aplicación de leyes de Woodward-Fieser	24
Imagen 5-1:	Aplicación de leyes de Woodward-Fieser	25
Imagen 6.1:	Infrarrojo	27
Imagen 8.2.	Mapa de la ubicación del vegetal en la parroquia San Andrés	30
Imagen 9-2:	Diagrama de flujo de la preparación del extracto y subextracto de Escama de pescado (<i>Drymaria ovata</i>).	33
Imagen 10-2:	Elaboración del diagrama de flujo de la preparación sub-extracto de Butanólico	35
Imagen 7.1:	Posibles estructuras	63

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 2-2:	Sub-extracto Butanólico	36
Fotografía 3-2:	Tamizaje fitoquímico.....	38
Fotografía 4-2:	Cromatografía en columna del	40
Fotografía 5.3:	Cromatografía del subextracto de tolueno	49
Fotografía 6.3:	Cromatografía del subextracto de AtOAc.....	49
Fotografía 7.3:	Cromatografía del subextracto butanólico	49
Fotografía 8-3:	Cromatografía de las fracciones N. 1-6	50
Fotografía 9-3:	Cromatografía del subextracto de Acetato de Etilo.....	50
Fotografía 10-3:	Cromatografía de las fracciones N. 1-5	51
Fotografía 11-3:	Cromatografía de las fracciones N. 8, 9 en mezcla.....	52
Fotografía 12-3:	Recuperación de las manchas amarillas y moradas de las fracciones N. 8, 9 en mezcla	52
Fotografía 13-3:	Cromatografía de las fracciones N. 1-6	52
Fotografía 14-3:	Cromatografía de las fracciones N.7-12	52
Fotografía 15-3:	Cromatografía de las fracciones N.8, 12, 10.....	52
Fotografía 16-2:	Cromatografía de las fracciones N. 1-7	53
Fotografía 17-2:	Cromatografía de las fracciones N.8-13	53
Fotografía 18-2:	Placa preparativa de las fracciones N. 1-7	53
Fotografía19-3:	Placa bidimensional de la fracción 1	54
Fotografía 20-3:	Cromatografía de la C. 4 de la fracción 4, 5, 6,7, 8, 10, 11	54
Fotografía 21-3:	Cromatografía de la C. 4 de la fracción 1, 2 de las franjas 1, 2, 3 y 4	54
Fotografía 22-3:	Cromatografía del sub-extracto butanólico.....	55
Fotografía 23-3:	Cromatografía del sub-extracto butanólico de f: 1-8	55
Fotografía 27-2:	Cromatografía de las fracciones N. 1-6	70
Fotografía 28-2:	Cromatografía de las fracciones N. 6, 7.....	70
Fotografía 29-2:	Cromatografía de las fracciones N. 1-5	71
Fotografía 30-2:	Cromatografía de las fracciones N. 1, 2, 3 y 6.....	71

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo realizar la EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS <SECUNDARIOS> DE LA PLANTA ESCAMA DE PESCADO (<*Drymaria ovata*>)", se realizó en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias, para lo cual, se realizó la identificación botánica en el herbario de la ESPOCH, se realizó un extracto etanólico del vegetal por maceración y eliminación del solvente obteniéndose un líquido al que se determinó las propiedades físicas, los grupos fitoquímicos por reacciones de coloración, un primer fraccionamiento con tolueno, acetato de etilo y butanol. Los mismos que se determinan TLC, con diferentes solventes como hexano: acetato de etilo 70:30 y revela con Rosenthaler, acetato de etilo: ácido fórmico, ácido acético: agua 100:11:11:26 y revela con Sulfato de Cerio para flavonoides. La presencia de manchas redondeadas y coloreadas determinó la presencia de compuestos, los mismos que se purificaron en <Cromatografías> de columna y capa fina dependiendo de la complejidad y del número de manchas. Una vez purificadas se determinan los valores de IR.

La caracterización fitoquímica dio como resultados positivos Terpenos (saponinas prueba de espuma), fenoles pirogálicos (con cloruro férrico azul), flavonoides (con Shinoda rojo ladrillo) y alcaloides (con Dragendorff precipitado anaranjado \pm).

La <Cromatografía> de capa del sub-extracto de tolueno presenta clorofilas, en acetato de etilo dio terpenos en mayor cantidad. En la <Cromatografía> del sub-extracto de acetato de etilo, se determinó que hay tres compuestos a purificar del sub-extracto butanólico purificado se aisló el compuesto III.

Los espectros infrarrojos se determinó la presencia de los siguientes grupos orgánicos posibles saponinas esteroidales, un terpeno que puedes ser una saponina con anillo éter-cíclico, un isonitrilo o un CH alifático, una γ -lactona o un ciclo-alqueno, en virtud a que no se puede aislar completamente el compuesto.

Se sugiere el estudio fitoquímico con mayor cantidad de extracto en cefadex que separa los metabolitos por pesos moleculares.

Palabras claves: *Drymaria ovata*, cromatografía y metabolitos secundarios.

ABSTRACT

This search has like the aim to perform THE EXTRACTION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF <SECONDARY> METABOLITE (<*Drymaria ovata*>) PLANT, it was carried out in the laboratory of Photochemistry in the Faculty of Science, the botanical identification was carried out in the herbarium of the ESPOCH an ethanol plant extract was performed by maceration and solvent removal to give a liquid to which the physical properties are determined by photochemical reactions coloring groups, a first fractionation with toluene, ethyl acetate and butanol. TCL (Thin-Layer Chromatography) are determined with different solvents like hexane: ethyl acetate 70:30 reveals with Rosenthales, ethyl acetate: formic acid, acetic acid: water 100: 11: 11: 26 and developed with cerium sulfate to flavonoids. The presence of colored spots rounded and determined the presence of compounds there of which were purified by column< chromatography> and thin layer depending on the complexity and the number of spots. Once purified the work of IR are determined.

Photochemical characterization led to positive results terpenes (saponins foam test), pyrogallol phenols (blue ferric chloride), flavonoids (with Shinoda red brick) and alkaloids (with Dragendorff precipitated orange \pm).

<Chromatography>sub-layer present chlorophylls toluene extract in ethyl acetate gave terpenes in greater quantity. <Chromatography> on sub-ethyl acetate extract, it was determined that three compounds purify the butanol sub- purified extract Compound III was isolated.

Infrared spectra for the presence of the following possible saponins spheroidal clusters is determined in terpene can be a saponin and a lactone ring cyclic ether, an isonitrile or an aliphatic CH, or an alkene cycle, not by virtue of it can completely isolate the compound.

It is suggested the photochemical study with a better quantity of extract of cefadex which separates the molecular weight metabolites.

Key words: *Drymaria ovata*, Chromatography, secondary metabolism.

INTRODUCCIÓN

La OMS definió a la medicina tradicional como la suma de conocimientos teóricos y prácticos comprensibles o no, utilizado con el propósito de prevenir o curar desordenes físicos, psíquicos, y sociales basándose únicamente en la experiencia y la observación transmitida de generación en generación en forma oral o escrita.

<http://www.beisa.dk/...Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>

Drymaria ovata es un género perteneciente a la familia *Caryophyllaceae*, y forma parte de la medicina tradicional utilizada para tratar diversas afecciones. También conocida como guarmipoleo o escama de pescado, se conoce que es utilizado para malestar estomacal, bronquitis, espasmo e inflamación. Se reporta su uso como alimento y medicina, por tanto forma parte de las plantas de uso ancestral.

<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>

Escama de pescado (*Drymaria ovata*), es una planta herbácea de poca altura, las hojas son opuestas y con forma de riñón. Tienen flores blancas y los frutos son cápsulas secas con numerosas semillas. Es una hierba anual o perenne, a menudo ramificados, con raíces primarias delgadas y alargadas, sus tallos: extensos a erecto, sencillo o ramificados proximales o largos, cilíndricos. Sus hojas son contrarias o que aparecen verticiladas.

<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>

A pesar de no contar con un estudio fitoquímico de esta planta, existen investigaciones en las cuales se ha utilizado el extracto etanólico con fines antimicóticos para *Candida albicans* ATCC 10231 con buen resultado en los estudios realizados por Rea L. (2013). También se ha demostrado actividad hipoglucemiante en ratas inducidas a diabetes demostrado en el estudio realizado por Reyes M. (2013).

Revisada la información bibliográfica existente no se encontró estudios fitoquímicos, ni qué metabolitos secundarios están presentes razón por la cual fue indispensable el estudio de la composición química por lo menos en grupos fitoquímicos y como pueden ser separados y purificados.

Generalmente se prepara un extracto etanólico obtenido por maceración de este vegetal posteriormente se realiza un tamizaje fitoquímico, que es la base para determinar los grupos fitoquímicos presentes.

Se planteó como objetivo realizar la extracción, purificación e identificación de los metabolitos secundarios de la planta escama de pescado (*Drymaria ovata*) con fines de aporte a una técnica

de análisis químico, identificación taxonómica de Escama de pescado del Ecuador, preparar los extractos y sub-extractos, extraer y purificar los metabolitos secundarios de los extractos y sub-extractos obtenidos, por procesos físicos cromatográficos y se realizó la posible identificación de los metabolitos secundarios encontrados por métodos cromatográficos, espectroscópicos, IR y UV.

OBJETIVOS

Objetivo general

“Extraer, purificar e identificar los metabolitos secundarios de la planta escama de pescado (*Drymaria ovata*)”

Objetivos específicos

1. Obtener un extracto y sub-extractos estandarizados de *Drymaria ovata*
2. Caracterizar y purificar sub-extractos de *Drymaria ovata* por columna cromatográfica, cromatografía de capa fina preparativa y cristalización.
3. Identificar y cuantificar metabolitos secundarios a través de métodos espectroscópicos, IR, UV.

CAPÍTULO I

1. Marco teórico

1.1. Plantas medicinales

Son todas aquellas plantas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general.

Se calcula en unas 260.000 las especies de plantas que se conocen en la actualidad, de las que el 10% se pueden considerar plantas medicinales, es decir, se encuentran recogidas en los tratados médicos de fitoterapia, modernos y de épocas pasadas, por presentar algún uso.

Evidentemente, sobre todo en las regiones ecuatoriales, la proporción de especies de plantas medicinales puede variar sensiblemente de este porcentaje, ya que ni siquiera se conoce la totalidad de la flora.

<http://www.beisa.dk/...Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>

Las plantas medicinales recorren prácticamente toda la nomenclatura botánica desde las plantas herbáceas como la hierba buena hasta los árboles como el aguacate y el mango, encontrándose las sustancias con efectos terapéuticos en todas las partes de la planta.²⁶ En Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes. La medicina popular se practica principalmente por habitantes de zonas rurales, pero también por ciudadanos de toda clase social. Se pueden encontrar gran variedad de plantas con usos medicinales que se expenden en mercados de la Sierra, Costa y Amazonía.

http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php?option=com_content&view=article&id=28:drymaria-ovata&catid=15&Itemid=109.

1.2. Metabolitos primarios

Una de las características de los seres vivos es la presencia de actividad metabólica. El metabolismo no es nada más que el conjunto de reacciones químicas que ocurren al interior de las células. En el caso de las células vegetales, el metabolismo acostumbra a ser dividido en primario y secundario.

Se entiende por metabolismo primario al conjunto de procesos metabólicos que desempeñan una función esencial en el vegetal, tal como la fotosíntesis, la respiración y el transporte de solutos. Los compuestos involucrados en el metabolismo primario poseen una distribución universal en las plantas.

Ese es el caso de los aminoácidos, de los nucleótidos, de los lípidos, carbohidratos y de la clorofila.

www.botanical-online.com/col/manapuya17.htm

1.3. Metabolitos secundarios

En contrapartida el metabolismo secundario origina compuestos que no poseen una distribución universal, pues no son necesarios para todas las plantas.

Como consecuencia práctica, estos compuestos pueden ser utilizados en estudios taxonómicos (quimiosistemática). Un ejemplo clásico son las antocianinas y batalainas, las cuales no se ven conjuntamente en una misma especie vegetal. Las batalainas son restringidas a diez familias de plantas, pertenecientes al orden de las *Caryophyllales* que consecuentemente no poseen antocianinas.

www.botanical-online.com/col/manapuya19.htm

Más allá que el metabolismo secundario no siempre sea necesario para que una planta complete su ciclo de vida, el desempeña un papel importante en la interacción de las plantas con el medio ambiente.

Un gran porcentaje de los principios activos de las plantas está comprendido dentro de los llamados Productos naturales o Metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja y de distribución más restringida y más característica de fuentes botánicas específicas, que los llamados metabolitos primarios; estos están universalmente distribuidos y participan en la actividad celular de todo ser viviente. De los primeros, Productos naturales o Metabolitos secundarios, podemos decir que son indispensables en las plantas que ocurren; no intervienen o quizás, mejor dicho, no se ha descubierto aun una función metabólica en la cual ellos intervienen; son considerados artículos de lujo en la planta.

www.botanical-online.com/col/manapuya19.htm

En este contexto, los metabolitos secundarios vegetales presentan un gran valor desde el punto de vista social y económico.

Del total de medicamentos aprobados entre el 83 al 94, el 6% eran obtenidos directamente de especies vegetales y ese número continuó creciendo hasta los días de hoy.

Desde el punto de vista económico se puede mencionar los alcaloides indólicos terpenoidicos vincristina (utilizado en el tratamiento de la leucemia) y vinblastina (usado en la terapia de corio-carcinoma y en la enfermedad de Hodgkins).

www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf

Como estimación, cerca de 110.000 compuestos han sido identificados hasta el presente, siendo que de este total los terpenoides constituyen el mayor grupo (33.000 compuestos), seguidos por los alcaloides (16.000 compuestos).

Anualmente 4.000 nuevos compuestos de origen vegetal han sido relatados con una tendencia al crecimiento para este valor.

Como característica general, tales compuestos muestran un padrón de aparición restringido en algunos grupos taxonómicos, no siendo considerados esenciales para el metabolismo basal de la célula vegetal, donde surge la denominación de metabolitos secundarios.

www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf

En el ámbito de la interacción planta/ambiente (efecto atractivo/repulsivo a microorganismos, insectos, vertebrados, plantas, etc.), desempeñan un importante papel, garantizando la supervivencia de las especies en el ecosistema.

Adicionalmente, metabolitos secundarios son utilizados en escala industrial para la producción de insecticidas, colorantes, saborizantes, aromatizantes y medicamentos.

Con respecto del alto valor económico de algunos de estos biofármacos, bajos niveles de productividad han sido usualmente encontrados en los sistemas de producción agrícola convencionales, ocurriendo por una serie de motivos.

Este hecho genera la necesidad de desarrollar sistemas alternativos de producción y en este contexto el cultivo de células y tejidos vegetales ha sido considerado como un sistema de alto potencial para la superación de este problema; más allá que se presentan algunas dificultades a su viabilidad económica que aún no han sido superadas.

www.botanical-online.com/col/manapuya19.htm

En función de esto, diversas estrategias han sido empleadas objetivando aumentar los valores de productividad de compuestos bioactivos en sistemas de cultivo de células y tejidos vegetales incluyendo la manipulación epigenética la elucidación de vías biosintéticas y la aplicación de técnicas de biología molecular, según un abordaje de ingeniería de vías metabólicas.

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

www.botanical-online.com/col/manapuya19.htm

1.4. Escama de Pescado (*Drymaria ovata*)



Imagen 1.1: Planta de escama de pescado (*Drymaria ovata*).
Fuente: Cerón Martínez (2006)

1.4.1. Taxonomía

Tabla 1-1. Taxonomía de *Drymaria ovata*

REINO	Plantae
FILO	Angiospermae
CLASE	Dicotiledónea
ORDEN	Caryophyllales
FAMILIA	Caryophyllaceae
GENERO	<i>Drymaria</i>
ESPECIE	<i>Drymaria ovata</i>

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Fuente: <https://science.mnhn.fr/taxon/.../drymaria/ovata?lang.>

Nombres comunes: Escama de pescado, guarmipoleo.

1.4.2. *Origen y distribución geográfica*

Esta especie está ampliamente distribuida en Venezuela Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina. En nuestro país se encuentra en la zona andina desde los 2000 hasta los 4000 msnm.

www.beisa.dk/Publications/.../Capitulo%2018.pd

1.4.3. *Descripción botánica*

Drymaria ovata. Son plantas herbáceas caducas o perennes, de poca altura, delicadas y laxas. Las hojas son opuestas y con forma de riñón. Tienen flores blancas y los frutos son cápsulas secas con numerosas semillas.

Hierba anual o perenne, a menudo ramificados, raíces primarias delgadas y alargadas.

Tallos: extensas a erecto, sencillo o ramificado proximal o largo, cilíndricos.

Hojas: contrarias o que aparecen verticiladas, estípulas 2 por nodo, simples o divididas en segmentos, subuladas a filiformes, hoja 1-5-nervada, linear a lanceoladas, espatuladas, ovadas, reniforme u orbiculares, no suculentas, ápice redondeado a acuminado. Inflorescencias terminales o axilares abierto, bracteadas cimas o umbeliforme racimos o flores solitarias, axilares; brácteas emparejado, escarioso o central parte herbácea. Pedicelos: erectos a difundir o reflexos.

www.beisa.dk/Publications/.../Capitulo%2018.pd

Flores: periantio y androceo hipogyno; 5 sépalos, claros, blancos, lanceoladas a oblongo orbiculares, ovadas, herbáceo, los márgenes blancos de purpura, acuminadas escariosos, ápice a redondeadas, con capucha o no; pétalos (3 – 5), a veces ausente, blanco, garra estrecho, disminuyendo distalmente o con oblongas o expandidos, sésiles o cortas con garras.

www.scielo.org.co/pdf/cal/v35n2/v35n2a10

Tronco: Aurículas ápice ausente, hoja dividida en 2 o 4 lóbulos; nectarios en la base de filamentos opuestos sépalos, estambres 5; filamentos separados o connados brevemente proximal; estilos 3, 2 veces, marcan proximalmente por 2 de longitud, rara vez casi distinta (*D. cordata*), filiformes, de 0.1-0.3 mm, glabro proximalmente; estigmas 3, 2 veces, lineal a lo largo adaxial superficies de estilos (o ramas).

Cápsulas elipsoides a globosos, abriendo por (2 – 3) extendiendo a recurvadas válvulas; carpóforo ausentes.

www.scielo.org.co/pdf/cal/v35n2/v35n2a10

Semillas 3-25, bronceado, marrón rojizo, marrón oscuro, negro o transparente (blanco embrión visible), de herradura, concha de caracol, o en forma de lágrima, comprimido lateralmente, por lo menos en cierta medida, tuberculada, marginal ala ausente, apéndice ausente.

www.scielo.org.co/pdf/cal/v35n2/v35n2a10

1.4.4. Formas de utilización

Se reporta uso como alimento y medicina. Existe un reporte sobre sus propiedades contra tos y otro contra varias bacterias. Se propone que es una buena cobertura en café, debido a su hábito bajo. Es probable que se use como forraje, pero no se encontraron referencias.

Drymaria ovata se utilizan como una planta medicinal para tratar afecciones estomacales, bronquitis, espasmos e inflamaciones.

Según las reacciones de tamizaje fitoquímico éste vegetal contiene saponinas, taninos, flavonoides, quinonas, lactonas (cumarinas); siendo su marcador químico los fenoles.

<https://science.mnhn.fr/taxon/.../drymaria/ovata?lang...>

1.4.4.1. Usos en Medicina Tradicional

Para prevenir y curar la enfermedad del mal de ojo de los animales bovinos.

1.4.4.2. Composición química

Saponinas

Las saponinas son un grupo de glucósidos oleosos, los cuales son solubles en agua produciendo espumosis cuando las soluciones son agitadas.

<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>

Flavonoides

Flavonoide (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de

compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua.

<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>

1.5. Recolección, muestreo, transporte y conservación del material vegetal para su procesamiento.

1.5.1. *Recolección del material vegetal*

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

- ✓ Recolectarse en lugares alejados de fuentes de contaminación
- ✓ Asegurarse de la especie con la que se va a trabajar sea la misma.

1.5.2. *Muestreo*

Obtener una muestra representativa, para realizar el análisis y determinar los niveles de los diversos componentes de la materia vegetal.

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

[www.mat.uson.mx/Material/el**muestreo**.pdf](http://www.mat.uson.mx/Material/elmuestreo.pdf)

1.5.2.1. Fragmentación

Es un proceso mecánico donde se reducen sustancias sólidas a porciones menores o partículas. Se basa en aumentar la superficie de contacto de un solvente adecuado con el material a extraer para facilitar la mejor y mayor disolución de principios activos.

[es.thefreedictionary.com/**fragmentación**](http://es.thefreedictionary.com/fragmentación)

1.5.2.2. Transporte y conservación

Para el transporte y almacén, la muestra se mantendrá en las condiciones más parecidas a las de campo.

1.5.2.3. Limpieza y descontaminación

Al tratarse de plantas silvestres para no alterar los ciclos normales de hábitat, crecimiento y reproducción, no recoger plantas jóvenes, o escasas, en el caso de hierbas estacionales aprovechar su presencia, no recolectar de sitios contaminados o con presencia de emanaciones tóxicas de los caños de escape, basureros, filos de carreteros.

El vegetal recolectado está sucio, Cáceres (1996) recomienda lavar con agua caliente, enseguida desinfectar con hipoclorito de sodio o de calcio para reducir la carga bacteriana, sin embargo es un oxidante existiendo el riesgo de oxidar los metabolitos secundarios.

La recolección es mejor realizar en la mañana o la tarde que son de menor proceso clorofiliano.

fsknttraining.org/.../FSKN_06_Cleaning-and-Disinfection-Traducción.pdf...

1.5.2.4. Conservación de las características

La buena conservación del material vegetal para estudios fitoquímicos garantiza un buen resultado en las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas del vegetal. Según Sharapin (2000) la pérdida de los principios activos involucra:

www.bioenciclopedia.com/conservacion/

- ✓ Degradación por procesos metabólicos.
- ✓ Hidrolisis de los compuestos.
- ✓ Descomposición por la luz.
- ✓ Descomposición enzimática.
- ✓ Degradación de las sustancias termolábiles por el calor.
- ✓ Volatilización de los aceites esenciales y
- ✓ Contaminación por hongos y bacterias.

1.5.3. Métodos de extracción

Para lograr una concentración adecuada de los principios activos contenidos en las plantas y que su acción sea más efectiva es necesario realizar diversos procedimientos mediante los cuales sean extraídos aquellos con solventes adecuados que se seleccionan de acuerdo a la solubilidad y la estabilidad que posean las sustancias beneficiosas.

Los métodos de extracción permiten obtener los productos en formas farmacéuticas adecuadas para su administración oral o externa de acuerdo al lugar de acción que se recomiende.

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

Estas preparaciones son conocidas como: decocciones, infusiones, extractos fluidos, densos o secos (según su contenido de líquidos) y las tinturas. Son conocidas también como preparados galénicos, en honor a Claudio Galeno precursor de la preparación de medicamentos a partir de los vegetales.

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

1.5.3.1. Extracción

Son formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y plásticas o sólidas y pulverulenta, preparadas con soluciones extractivas, obtenidas por agotamiento de drogas vegetales o animales con solventes apropiados, mediante la evaporación de todo o casi todo el solvente y el ajuste de las masas o los polvos residuales a las normas prescritas.

www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_fona.html

1.5.3.2. Maceración

El vegetal seco y molido, o fresco troceado o licuado con el solvente de extracción se pone en contacto con alcohol potable 96% en un recipiente de cierre perfecto a temperatura ambiente. Se deben realizar agitaciones frecuentes a lo largo de la maceración.

Como norma se macera la droga por tres días con agitación frecuente y protegido de la luz solar. La maceración es útil cuando los principios son fácilmente solubles en frío y cuando la acción de la temperatura los altera.

Lo más recomendable es iniciar la extracción con hexano o con éter de petróleo para separar los lípidos (esteroles, carotenoides, clorofilas, etc.) este proceso se conoce como desengrasado, luego se extraer con etanol o metanol al 95%.

conceptodefinicion.de/maceracion/

1.5.3.3. Maceración en frío

Consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la menor cantidad de líquido posible, sólo lo suficiente como para cubrir totalmente lo que se desea macerar.

Esto se hace por un lapso más o menos largo, dependiendo de lo que se vaya a macerar.

La ventaja de la maceración en frío consiste en que de usarse solo agua se logran extraer todas las propiedades de lo que se macera, es decir, toda su esencia sin alterarla en lo más mínimo.

http://moheweb.galeon.com/vino_dicc02.htm

1.6. Análisis fitoquímico

El análisis fitoquímico determina los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, por ejemplo en las plantas medicinales, aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, de separación y purificación y de determinación estructural (UV, IR, RMN, EM).

http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2575.pdf

1.6.1. Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2575.pdf

1.6.2. Reacciones de identificación

1.6.2.1. Ensayo de Espuma

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

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

<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0831.1982.pdf>

1.6.2.2. Ensayo de Benedict

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

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

<https://sites.google.com/site/bioquia9/reaccion-de-benedict>

1.6.2.3. Ensayo de Shinoda

Permite reconocer la presencia de flavonoides en el extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de HCl concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

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

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

cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020150698/1020150698_02.pdf

1.6.2.4. Ensayo de Borntrager

Es útil para detectar la presencia de quinonas.

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

Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.(4) El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) , o rojo para lo cual se reporta (+++).

cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020150698/1020150698_02.pdf

1.6.2.5. Ensayo de Dragendorff

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

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

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

cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020150698/1020150698_02.pdf

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

1.7. Definición de cromatografía

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

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

1.7.1. Cromatografía en capa fina

En la cromatografía en capa fina (CCF) la fase estacionaria consiste en una capa delgada de un adsorbente (como por ejemplo gel de sílice, alúmina o celulosa) depositada sobre un soporte plano como una placa de vidrio, o una lámina de aluminio o de plástico.

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

La CCF es una técnica analítica y tiene como objetivo el análisis de una mezcla de componentes.

El proceso es similar a la cromatografía de papel con la ventaja de que se desarrolla más rápidamente, proporciona mejores separaciones y se puede elegir entre diferentes adsorbente. La CCF es una técnica estándar en el laboratorio de química orgánica. Debido a su simplicidad y velocidad, la CCF se utiliza a menudo para monitorizar las reacciones químicas y también para el análisis cualitativo de los productos de una reacción, puesto que permite conocer de manera rápida y sencilla cuántos componentes hay en una mezcla.

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

1.7.2. Cromatografía en capa fina preparativa

La cromatografía preparativa comprende un amplio campo de aplicaciones, desde el aislamiento de 1 µg. de muestra para identificación espectroscópica hasta el aislamiento de un compuesto puro de una mezcla de 100 g.

La cromatografía preparativa se diferencia de la técnica básica en muchos aspectos, desde la preparación de la papilla. Ésta debe hacerse con menos agua que de ordinario. Una papilla más espesa ayuda a estabilizar el grosor de las placas que se precisa para una carga de mayor magnitud. El espesor óptimo oscila desde un mínimo de 1 mm. Hasta un máximo de 2 mm.

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

www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/bidimensional

La siembra de la muestra se realiza mediante la ayuda de una jeringuilla o tubo capilar. La siembra se realiza a lo largo de una línea recta (existen en el mercado diversos utensilios para evitar torcerse). Si al terminar la primera siembra todavía queda muestra, se seca la primera siembra y se aplica la segunda, intentando que ésta quede sobre la anterior, para así conseguir que el frente sea lo más estrecho posible. La siembra debe realizarse a lo ancho de la placa.

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

www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/bidimensional

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

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

www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/bidimensional

1.7.3. Cromatografía bidimensional

Una cromatografía bidimensional en placa. En esta técnica se coloca la mezcla a separar sobre la placa, luego de secar, ese borde del papel se sumerge en una mezcla de solventes que contiene componentes acuosos y orgánicos. Además el papel debe estar en contacto con los vapores del solvente en equilibrio. El solvente moja al papel por capilaridad debido a su naturaleza fibrosa. El componente acuoso del solvente se une a la celulosa del papel y forma con éste una fase estacionaria de tipo gel.

www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/bidimensional

El componente orgánico del solvente continúa migrando, lo que constituye la fase móvil. Las velocidades de migración de las distintas sustancias que se quieren separar están gobernadas por sus solubilidad es relativas en la fase estacionaria polar y la fase móvil no polar. En un solo paso

del proceso de separación cada soluto se distribuye entre ambas fases de acuerdo con su coeficiente de partición, una constante de equilibrio.

www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/bidimensional

$$K_1 = \frac{\text{concentración en fase estacionaria}}{\text{concentración en fase móvil}}$$

1.7.4. Cromatografía en columna

La cromatografía en columna utiliza una columna de vidrio vertical que se llena con un soporte sólido adsorbente (fase estacionaria: los más utilizados son gel de sílice (SiO₂) y alúmina (Al₂O₃)). La muestra que se quiere separar se deposita en la parte superior de este soporte. El resto de la columna se llena con el eluyente (disolvente que constituye la fase móvil) que, por efecto de la gravedad, hace mover la muestra a través de la columna. Se establece un equilibrio entre el soluto adsorbido en la fase estacionaria y el disolvente eluyente que fluye por la columna.

www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html

Debido a que cada uno de los componentes de una mezcla establecerá interacciones diferentes con la fase estacionaria y la móvil, serán transportados a diferentes velocidades y se conseguirá su separación. Así, de manera similar a otros tipos de cromatografía, las diferencias en las velocidades de desplazamiento a través del medio sólido se corresponden con diferencias en los tiempos de elución por la parte inferior de la columna para cada uno de los componentes de la muestra original, que se recogerán en fracciones diferentes.

www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html

La polaridad del eluyente afecta las velocidades relativas con las que los diferentes componentes de la mezcla se mueven en la columna. Los disolventes polares compiten más eficientemente con las moléculas polares de una mezcla por los lugares polares del adsorbente. Por lo tanto, un disolvente polar desplazará las moléculas, incluyendo las más polares, rápidamente a través de la columna. Si el disolvente es muy polar la elución será muy rápida y generalmente habrá poca separación de los componentes de la mezcla. Si por el contrario el disolvente es muy apolar, no eluirán los compuestos de la columna.

www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html

Por lo tanto, la elección del eluyente es crucial para el éxito de la cromatografía en columna. A menudo se utiliza un gradiente creciente de polaridad para la elución. La CCF se utiliza para determinar y elegir el sistema solvente adecuado para cada separación.

www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.htm

1.7.5. *Elución en columna*

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 término se aplica también a la extracción de anticuerpos o trazadores radiactivos de los eritrocitos.

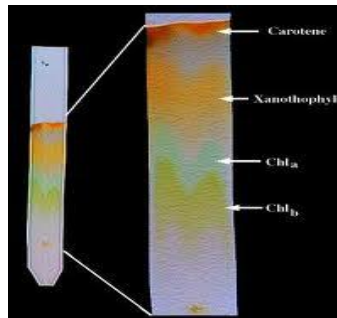


Imagen 2-1: Elución en columna
Fuente: Graciela Escandar (2009)

1.7.6. *Solventes utilizados para la elución*

La elección del eluyente depende del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo. Un método que se emplea para la selección del eluyente es una cromatografía en capa fina con distintos disolventes y unas muestras patrón.

www.quiminet.com/.../seleccion-y-uso-de-solventes-en-cromatografia-hp...

Tabla 2-1. Solventes utilizados para la elución

ELUYENTES EN ORDEN CRECIENTE DE POLARIDAD
Éter dietílico
Ciclohexano
Acetato de etilo
Tetracloruro de carbono
Benceno
Etanol
Cloroformo
Metanol

Diclorometano
Agua
Ácido acético

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Al aplicar en primer lugar eluyentes poco polares, podemos seguir utilizando la misma placa para aplicar otro eluyente más polar, hasta dar con el más apropiado.

Otra técnica para realizar la elección del eluyente consiste en sembrar varias muestras distanciadas suficientemente, y aplicar con un tubo capilar distintos eluyentes sobre el centro de cada muestra. Esto permite desarrollar cada eluyente radialmente por capilaridad, de forma que se aprecie el eluyente con el cual la separación se realiza de una manera más eficaz.

1.7.7. *Solventes orgánicos*

Considerando que la medicina tradicional las infusiones y decocciones se realizan en agua hirviendo pero, no se puede guardar soluciones acuosas que contienen mínimas cantidades e metabolitos secundarios, entonces es necesario utilizar solventes orgánicos que extraigan del vegetal la mayor cantidad posible de metabolitos secundarios, eliminar el solvente y tener los metabolitos concentrados. (Játiva)

Algunas características de los solventes están dada por el poder de penetración al interior de la célula por osmosis, hinchamiento celular y explosión celular.

Al seleccionar un solvente se debe tener en cuenta su polaridad y las características de las sustancias a extraer, el poder de extraerlas.

Los solventes considerados en la serie elutròpica de Lichrosolv están ordenadas en orden de polaridad de la siguiente manera:

electrofilos.blogspot.com/2009/04/solventes-organicos_7777.html

Tabla 3-1. Solventes orgánicos

Solvente	Solvente
n-Heptano	n-Butanol
n-Hexano	Acetonitrilo
Ciclo hexano	2-Propanol
Isooctano	Acetato de etilo
1,1,2 trifluoro etano	Etanol
Tetracloruro de carbono	1,4 dioxano
Tolueno	Tetrahidrofurano

Cloroformo	Metanol
Dicloro etano	Agua
Diclorometano	

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Fuente: electrofilos.blogspot.com/2009/04/solventes-organicos_7777.html

Generalmente cuando el vegetal para estudio es fresco, como solvente se utiliza solvente puro, el más utilizado es el etanol o el agua se tiene como inconveniente la presencia de saponinas que se emulsifica al fraccionar dicho extracto con éter de petróleo, el mismo que puede romperse por centrifugación.

1.7.8. Factor de selectividad

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

rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf

Entonces el factor de selectividad de una columna para dos especies A y B se definen como: $\alpha = K_A / K_B$

Donde K_B es el factor de capacidad del compuesto B, que es el más retenido y K_A es el factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido.

rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf

1.7.8.1. Eficiencia de una columna

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

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

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

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

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

Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = L/H$$

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

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

1.7.8.2. Resolución de la columna

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

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

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

1.8. Análisis espectrofotométrico

1.8.1. Espectrometría

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

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

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

1.8.2. Luz ultravioleta

Lámpara fluorescente de luz ultravioleta. La radiación ultravioleta no es visible; sin embargo, muchas de las lámparas ultravioletas emiten marginalmente parte de su luz en la zona adyacente del espectro visible, con lo que se observan de un color violeta.

Se denomina **radiación ultravioleta** o radiación **UV** a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 400 nm (4×10^{-7} m) y los 15 nm ($1,5 \times 10^{-8}$ m). Su nombre proviene que su rango empieza desde longitudes de onda más cortas de lo que los humanos identificamos como el color violeta. Esta radiación es parte integrante de los rayos solares y produce varios efectos en la salud.



Imagen 3-1: Luz ultravioleta
Fuente: Ecuared (29 de octubre de 2015)

1.8.2.1. Reglas de Woodward – Fieser

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

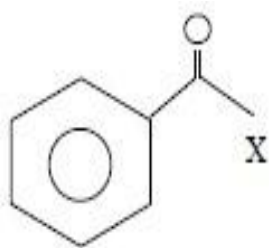
Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula.

La absorción UV-Visible no es, sin embargo, una prueba específica para ningún determinado, la naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos así como las variaciones en anchura de la hendidura (ancho de banda efectivo) en el espectrofotómetro.

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

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

Sistema Básico:



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

	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>
<i>Alquilo, cicloalquilo</i>	3	3	10
<i>-Cl</i>	0	0	10
<i>-Br</i>	2	2	15
<i>-OH, OR</i>	7	7	25
<i>-O⁺</i>	11	20	78
<i>-NH₂</i>	13	13	58
<i>-NMe₂</i>	20	20	85
<i>-NHCOMe</i>	20	20	45

Imagen 4-1: Aplicación de leyes de Woodward-Fieser
Fuente: Ecuared (29 de octubre de 2015)



Imagen 5-1: Aplicación de leyes de Woodward-Fieser
Fuente: Ecuared (29 de octubre de 2015)

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

1.9. Rf

Rf es el registro y se define como la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación / distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.

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

El valor de Rf depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de absorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación, etc.). Tiene una reproducibilidad de +/- 20%, por lo que es mejor correr duplicados de la misma placa. (7)

1.10. Infrarrojo

La espectroscopia infrarroja tiene casi 125 años de existencia. El primer espectro de vibraciones moleculares fue observado en 1881 por Abney y Festing, quienes prepararon emulsiones

fotográficas sensibles al infrarrojo cercano y fotografiaron el espectro de absorción de 48 líquidos orgánicos. Encontraron bandas características en estos espectros, las cuales asociaron con la presencia de hidrógeno en las moléculas estudiadas.

En 1892, Julius obtuvo el espectro infrarrojo de 20 compuestos orgánicos, encontrando que todos los compuestos que contienen metilo (CH₃) exhiben una banda de absorción de 3.45 μm y llegó a la conclusión de que la absorción de ‘ondas caloríficas’ se debe a movimientos intramoleculares; en otras palabras, la estructura interna de la molécula determina el tipo de absorción. También encontró que el efecto no es ‘aditivo’; es decir, que no se puede predecir el espectro de absorción de un compuesto a partir del conocimiento de los espectros de los átomos constituyentes.

Los espectrómetros infrarrojos son herramientas importantes para observar espectros vibracionales. Las características más relevantes de esta espectroscopia son las siguientes.

- ✓ Si dos moléculas están constituidas por átomos distintos, o tienen distinta distribución isotópica, o configuración, o se encuentran en ambientes distintos, los espectros infrarrojos serán distintos.
- ✓ Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia.
- ✓ Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos.
- ✓ A partir de los espectros se pueden inferir las estructuras moleculares. Para ello se requiere un modelo en el cual basar los cálculos.
- ✓ Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla, son generalmente proporcionales a las concentraciones de las componentes individuales. Por lo tanto, es posible determinar la concentración de una sustancia y realizar análisis de muestras con varias componentes.

- ✓ Es posible, mediante el uso de dispositivos experimentales adecuados, obtener espectros infrarrojos sin alteración de la muestra, lo que constituye a esta espectroscopía como una herramienta de análisis no destructiva.
- ✓ El tiempo necesario para obtener y almacenar un espectro infrarrojo es del orden de minutos.

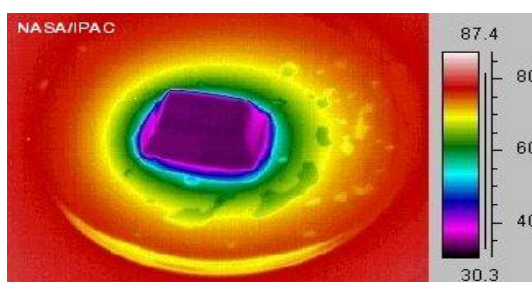


Imagen 6.1: Infrarrojo
Fuente: NASA (2012)

Las saponinas y sapogeninas conocidos como glucósidos furostenales los que tienen un esqueleto de furostanol.

Los compuestos aislados no poseen OH libres por cuanto no hay señales de las bandas características entre $3400 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ pero pueden estar esterificados, de lo cual se encuentra las bandas de $1095 - 1070 \text{ cm}^{-1}$ que son bandas medias y puntiagudas para los ésteres.

Los compuestos triterpenoides y esteroides en general muestran IR de $3650 - 3590 \text{ cm}^{-1}$ y a 1055 cm^{-1} correspondientes a OH secundarios, señales a $2960 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a estiramientos $-C - H -$ y flexiones $-CH_2 -$ a $1385 - 1380 \text{ cm}^{-1}$ y a $1370 - 1365 \text{ cm}^{-1}$ de gem-dimetil.

Los ácidos triterpencarboxílicos en los que el grupo $CO_2 H$ está rodeado de grupos voluminosos como el ácido oleanólico se encuentran como monómeros y absorben $1678 - 1690 \text{ cm}^{-1}$.

1.10.1. Posibilidades de estructuras similares

Saponinas esteroidales: son compuestos que poseen una estructura compleja formada por un núcleo esteroideal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Actividades biológicas tales como su acción antimicótica, antiviral, anticancer, hipolesterolémica, hipoglicémica, antitrombótica, diurética, antiinflamatoria y molusquicida. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen las sapogeninas esteroidales, de gran interés para la industria farmacéutica por ser precursores en la síntesis de hormonas y corticoides.

farmacia.udea.edu.co/~ff/saponinasp.pdf

Gamma lactona: Una **lactona** es un compuesto orgánico del tipo éster cíclico.¹ Se forma como producto de la condensación de un grupo alcohol con un grupo ácido carboxílico en una misma molécula. Las estructuras más estables de las lactonas son las que poseen anillos con 5 (gama-lactonas) y 6 miembros (delta-lactonas), por razón de la menor tensión en los ángulos del compuesto. Las gama-lactonas son tan estables que en la presencia de ácidos diluidos a temperatura ambiente, éstos de inmediato sufren esterificación espontánea y ciclización sobre la lactona. Las beta-lactonas existen en la química orgánica, pero tienen que ser preparados por métodos especiales.

<http://www.quimicaorganica.org/acidos-carboxilicos/432-sintesis-de-lactonas.html>

1.11. Antecedentes de investigación

Drymaria ovata conocida vulgarmente como escama de pescado, no consta en plantas útiles del Ecuador. (Ríos, M. 2013).

En la describe como guarmipoleo y la utiliza para malestar estomacal, bronquitis, espasmo e inflamación. (Carlos E. Cerón Martínez, 2006.)

Rea L. (2013) ^[2] en su tesis de actividad antimicótica determina que tiene actividad sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, tanto el extracto etanólico como los subextractos etéreo y clorofórmico. Reyes, M. (2013) en su tesis “actividad hipoglucemiante de los extractos *Drymaria ovata*, *Senna macrophylla*, *Tagetes filifolia* Lag”, en ratas con hiperglucemia inducida comprueba que el extracto de *Drymaria ovata*.

El extracto alcohólico es un líquido turbio, pegajoso, de olor dulce, amarillo y sabor picante, pH ácido 5.05, la densidad es 1,114 g/ml e índice de refracción 1,354 superior a la del agua. Según las reacciones de tamizaje fotoquímico éste vegetal contiene saponinas, taninos, flavonoides, quinonas, lactonas (cumarinas); siendo su marcador químico los fenoles. Se inicia con 144,5 mg/dl de glucemia inducida, se administró 2,1 ml del extracto con las características antes indicadas y a los 300 minutos baja a 79 mg/dl con relación al control positivo que en el mismo tiempo inició con 160,5 mg/dl y finalizó con 88 mg/dl.

Un estudio de *Stevia reubadiana* Vertoni realizada en la ESPE determina que *Drymaria ovata* Humb. Ext Schult. Es una planta herbácea considerada como mala hierba presente en el cultivo de la *Stevia*.

Por los datos encontrados en información bibliográfica de la *Drymaria Ovata*, es un vegetal con actividad antimicótica para *Cándida albicans* que es característico de afección genital femenina

frecuente, y como hipoglucemiante razón por la cual es necesario estudiar la composición química para continuar los estudios y determinar si es el fitocomplejo el responsable de esta actividad.

CAPITULO III

2. METODOLOGÍA

2.1. Lugar de la investigación

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

2.2. Obtención del vegetal

Escama de pescado (*Drymaria ovata*) se adquirió en la ciudad de Riobamba, Parroquia de San Andrés.

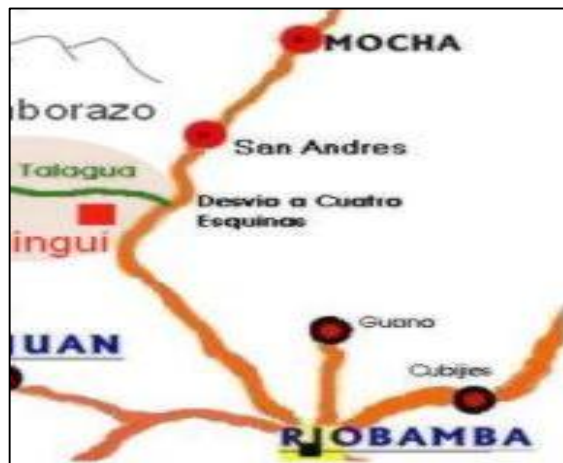


Imagen 8.2. Mapa de la ubicación del vegetal en la parroquia San Andrés
Fuente: Federación de Organizaciones Indígenas de la Faldas del Chimborazo (FOCIFCH).

2.3. Materiales, equipos y reactivos

Tabla 4-2: Materiales a utilizar en la investigación

TIPO	DETALLE
Materia prima y/o muestras	<i>Drymaria ovata</i>
Equipos	Balanza analítica IR Estufa de circulación de aire Memmert Rotavapor Buchi R 110

	<p>Desecador</p> <p>Reverbero</p> <p>Bomba de vacío Vacum Pressure Pump 115 VAC -60 Hz</p> <p>Centrifuga Dynac CA</p> <p>Refrigerador</p> <p>Sorbona</p> <p>Cámara digital</p> <p>Espectrofotómetro UV 1603 Shimadzu</p> <p>Atomizador (Equipo de revelado cromatográfico)</p>
Materiales de laboratorio	<p>Vaso de precipitación 100 ml</p> <p>Balón esmerilado de 250 ml</p> <p>Capilares</p> <p>Cuba de vidrio</p> <p>Embudo de filtración</p> <p>Embudo de separación de 250 ml</p> <p>Probetas de 10, 20 mL.</p> <p>Frascos de vidrio</p> <p>Pera de succión</p> <p>Botellas de vidrio de color ámbar</p> <p>Gradillas para tubos de ensayo</p> <p>Guantes descartables</p> <p>Papel aluminio</p> <p>Columnas para cromatografía</p> <p>Placas cromatográficas de ...</p> <p>Pipetas</p> <p>Piseta</p>
Reactivos	<p>Acetato de etilo</p> <p>Cloroformo</p> <p>Butanol</p> <p>Metanol</p> <p>Etanol</p> <p>Hexano</p> <p>Agua destilada</p> <p>Cloruro férrico</p> <p>Ácido sulfúrico vainillina</p> <p>Alcohol</p>

Vapores de Yodo

Acetona

Sulfato de Cerio

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

2.4. Factores de estudio

Factores de estudio de la investigación:

- ✓ Identificación taxonómica de la Escama de pescado (*Drymaria ovata*).
- ✓ Eliminación de impurezas, lavado del vegetal.
- ✓ Preparación del extracto etanólico de las hojas, tallos, flores y raíces de la escama de pescado.
- ✓ Determinar propiedades físicas y químicas del extracto etanólico.
- ✓ Fraccionamiento en sub-extractos.
- ✓ Cromatografía preliminar de sub-extractos.
- ✓ Fraccionamiento del extracto (total) en sub-extractos (Acetato de etilo y butanólico).
- ✓ Condiciones de separación de los metabolitos secundarios presentes en la solución Etanólica.
- ✓ Análisis de UV de los metabolitos presentes en los sub-extractos.

2.5. Comprobación taxonómica e identificación botánica

Se tomaron muestras completas de la especie de Escama de pescado y se llevaron al herbario de la ESPOCH, su curador, el Ing. Jorge Caranqui, quien certificó el ejemplar se trata de (*Drymaria ovata*), una especie introducida de Colombia.

2.6. Metodología de la preparación de muestra de extracción, purificación e identificación de metabolitos secundarios

Los procesos que se realizan en la ejecución del trabajo de titulación desde la recolección de la materia prima hasta la determinación de los grupos fitoquímicos por métodos espectroscópicos constan en la metodología.

2.6.1. Preparación del extracto

El extracto etanólico de la Escama de pescado (*Drymaria ovata*) fue extraído por método de maceración estática a temperatura ambiente, filtrado, concentrado de la fase Etanólica.

Procedimiento:

- ✓ Recolección del vegetal completo y en floración en fundas plásticas
- ✓ Identificación de vegetal Escama de pescado (*Drymaria ovata*) de forma física y taxonómica.
- ✓ Eliminar partículas contaminantes y lavar.
- ✓ Trocear el vegetal (hojas, tallo, flores y raíces).
- ✓ Al triturado añadir etanol potable al 96% hasta que lo cubra
- ✓ Dejar reposar por 72 horas, con agitaciones diarias.
- ✓ Filtrar, eliminar el vegetal, la fase Etanólica concentrar, eliminación de las clorofilas por decantación y dejar en refrigeración a 4° C por 24 horas.
- ✓ Al extracto claro determinar las propiedades físicas y químicas.
- ✓ Recoger en recipiente previamente pesado para determinar el rendimiento.

2.6.2. Elaboración del diagrama de flujo de la preparación del extracto y sub-extracto de Escama de pescado (*Drymaria ovata*)

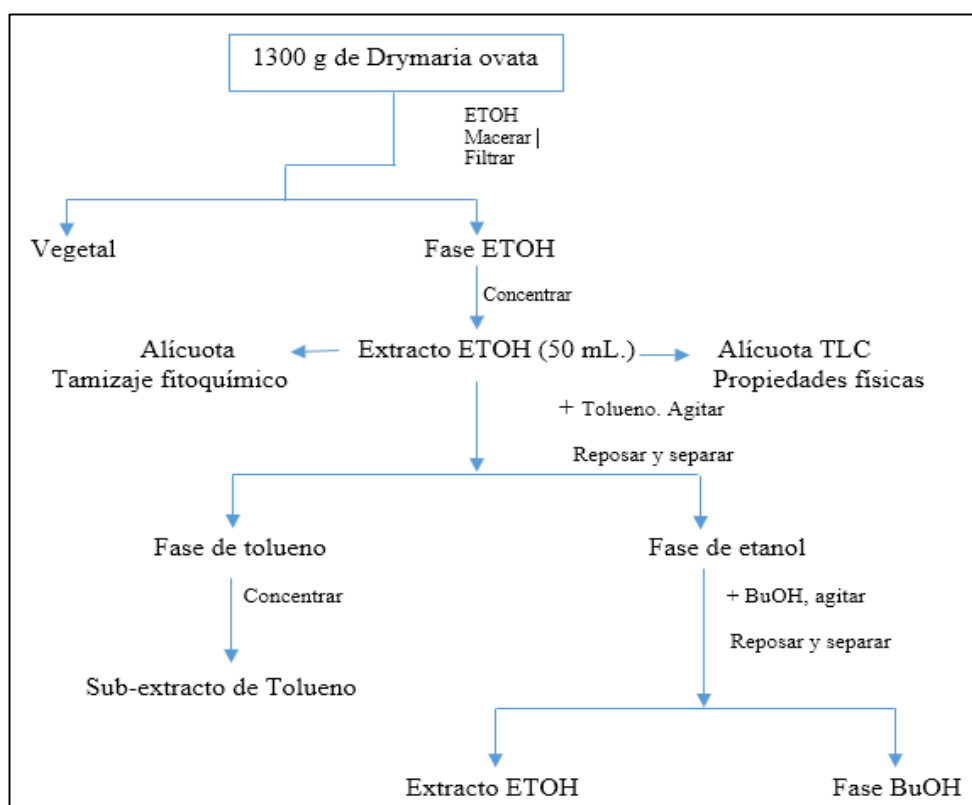


Imagen 9-2: Diagrama de flujo de la preparación del extracto y subextracto de Escama de pescado (*Drymaria ovata*).
Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

2.6.3. *Preparación de sub-extractos*

Aprovechar la inmiscibilidad de los solventes tolueno, acetato de etilo y butanol con el extracto etanólico de *Drymaria ovata* para fragmentar en sub-extractos.

2.6.2.1. *Subextracto de tolueno.*

- ✓ El extracto etanólico, pasar a un embudo de separación.
- ✓ Agregar por la boca del embudo tolueno: acetato de etilo 90:10 un volumen correspondiente a 1/3 del extracto, agitar y dejar en reposo.
- ✓ La fase de tolueno es más densa y se ubica en la parte inferior del embudo de separación
- ✓ Separar la de tolueno: acetato de etilo 90:10 por el vástago y recoger en Erlenmeyer
- ✓ A la solución alcohólica del embudo de separación agregar de tolueno: acetato de etilo 90:10 repetir el proceso hasta tener la fase de tolueno: acetato de etilo 90:10 etilo incolora.
- ✓ Evaporar el solvente, el residuo corresponde al subextracto.

2.6.2.1. *Sub-extracto de Acetato de Etilo*

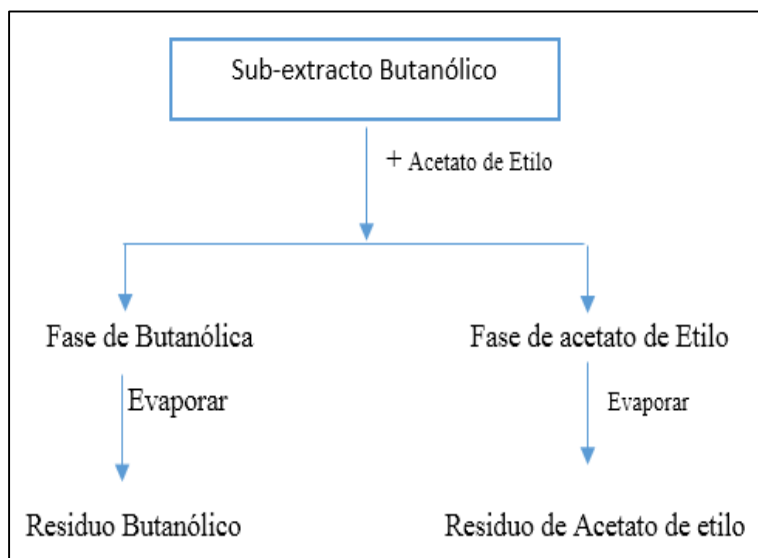
- ✓ A la fase Etanólica del embudo de separación agregar acetato de etilo.
- ✓ Colocar acetato de etilo, agitar y dejar en reposo.
- ✓ El acetato de etilo por ser más liviano se ubica en la fase superior del embudo de separación, separar por el vástago la fase Etanólica, y por boca del embudo el acetato de etilo en un Erlenmeyer.
- ✓ Separar la solución alcohólica de la solución de acetato de etilo repetir el proceso hasta tener la fase de acetato de etilo incolora.



Fotografía 1-2: Sub-extracto Etanólico

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

2.6.2.2. Elaboración del diagrama de flujo de tratamiento del sub-extracto de Butanólico



Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

Imagen 10-2: Elaboración del diagrama de flujo de la preparación sub-extracto de Butanólico

2.6.2.2. Sub-extracto butanólico

A la solución del extracto etanólico anterior, pasar a un embudo de separación.

Agregar butanol al embudo de separación, agitar por varios minutos dejar en reposo.

Separar de la solución Butanólica (fase superior) en capsula de porcelana, la solución Etanólica

(Fase inferior) repetir el proceso hasta tener la fase Butanólica incolora, repetir este proceso varias veces.

Evaporar el butanol, el residuo corresponde al subextracto butanólico.



Fotografía 2-2: Sub-extracto Butanólico
Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

2.7. Determinación del rendimiento de extracto y sub-extractos.

El rendimiento de extracto y los sub-extractos se realiza por gravimetría por diferencia de peso del recipiente recolector vacío y recipiente con el residuo de la evaporación.

2.8. Métodos físico-químicos aplicados al análisis de extractos.

2.8.1. *Determinación de las de las propiedades físicas del extracto etanólico de Drymaria ovata*

Determinación del aspecto: En un tubo de ensayo se determinó su transparencia y la presencia de partículas o de fases.

Determinación de olor: Se percibió y determino el olor que tenía.

Determinación del sabor. Se tomó un alícuota en un vaso de precipitación se probó por medio del sentido del gusto.

Determinación del color: En un vaso de precipitación se colocó extracto y se observó el color.

2.8.2. *Determinación del pH*

El pH es por un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógenos.

Se calcula mediante la ecuación:

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

$$a [\text{H}^+] = \text{actividad de los iones hidrógeno}$$

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

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

2.9. **Propiedades químicas**

Todos los vegetales poseen metabolitos primarios y secundarios, el motivo de este análisis es conocer los grupos fitoquímicos que están clasificados en terpenos, derivados fenólicos y alcaloides que es posible con el tamizaje fitoquímico basado en reacciones analíticas de coloración o formación de precipitados con reactivos generales y específicos.

Los reactivos generales indican presencia o ausencia de los grandes grupos ya indicados por ejemplo fenoles con cloruro férrico, terpenos con Rosenthaler, alcaloides con Dragendorff.

Las reacciones específicas son selectivas para subgrupos de compuestos como saponinas en los terpenos, flavonoides en los derivados fenólicos, etc.

2.9.1. *Ensayo de espuma (Saponinas)*

En 1 mL de extracto etanólico añadir de 4 a 5 mL. De agua destilada, agitar la mezcla y si produce espuma y se mantiene por 3 minutos se entiende por positiva.

2.9.2. *Ensayo de Benedict (Taninos)*

En 1 mL de extracto etanólico adicionar de 2 a 3 gotas de FeCl_3 , dando una coloración verde azulado lo cual indica una reacción positiva.

2.9.3. *Ensayo de Shinoda (Flavonoides)*

Añadir limaduras de magnesio seguido de 2 gotas de HCl , a la alícuota (1mL) de extracto alcohólico, dando una coloración rojo ladrillo indicando una reacción positiva.

2.9.4. *Ensayo de Dragendorff (Alcaloides)*

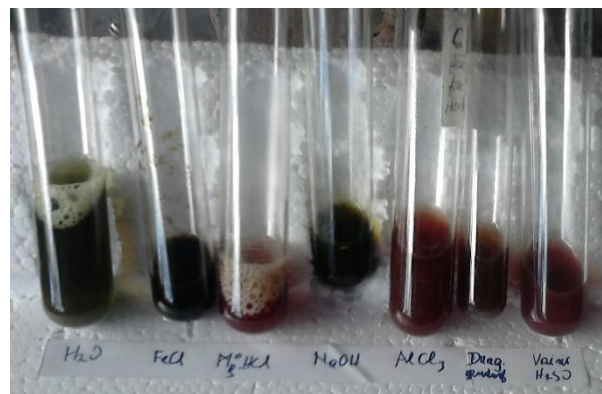
En 1 mL de extracto etanólico adicionamos 1 gota de HCl diluido y 1 gota del reactivo Dragendorff que al reaccionar, da un precipitado de coloración parda.

2.9.5. *Ensayo de Rosenthaler (Terpenos)*

Añadir vainillina ácido sulfúrico a 1 mL de extracto etanólico, si se colorea de rojo ladrillo es una reacción positiva.

2.9.6. *Ensayo de Borntrager (Quinonas)*

En 1 mL de extracto añadir gotas de NaOH al 5%, si da coloración rosada, anaranjada o violeta se entiende como positivo.



Fotografía 3-2: Tamizaje fitoquímico
Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

2.10. Análisis cromatográfico del extracto total y Sub-extracto

Para comprobar la presencia de metabolitos secundarios que están presentes en la determinación del tamizaje fitoquímico, se realiza cromatografía de capa fina del extracto y subextracto, utilizando los solventes de acuerdo a la escala de polaridad (el menos polar al más polar), mezclas de solventes conocidas para terpenos como tolueno: acetato de etilo 97:3, para flavonoides acetato de etilo: ácido acético glacial: ácido fórmico: agua 100:11:11:26, butanol ácido acético agua 5:4:1, etanol: amoníaco 99:1.

El uso de reactivos cromogénicos como Rosenthaler (vainillina: ácido sulfúrico) para terpenos con coloraciones de rosado a violeta, Yodo para insaturaciones con color anaranjado, sulfato de cerio para flavonoides con diversidad de colores desde rosado, violeta rojizo, rojo ladrillo, y Dragendorff para alcaloides con colores anaranjados.

2.11. Extracto total

En el extracto total sedimentaron las clorofilas y el sobrenadante de 50 mL de solución de color pardo que se dejó en reposo. Concentrar en la cápsula de porcelana a sequedad posteriormente recuperar con etanol y pasar a tubos de ensayo.

Dejar la interfase de acetato de etilo y butanol que queda en la cápsula de porcelana.

2.12. Análisis cromatográfico del extracto y sub-extractos

Se realiza una cromatografía de capa fina de los sub-extractos de Tolueno, Acetato de etilo y Butanol, colocando los tres sub-extractos en placa cromatográficas de fase estacionaria de silica gel y como solventes de corrido se utilizaron Cloroformo, acetato de etilo 97:3; Hexano, Acetato de etilo 20:15, Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua 100:11:11:26.(ver fotografía 6-2).

Se realiza cromatografía en capa fina para verificar la presencia de metabolitos secundarios, para esto se utiliza solventes de menor a mayor polaridad, la cromatografía (6-2) que se corrió en hexano, acetato de etilo 20:15 presenta manchas separadas desde el punto de aplicación al frente del solvente, esto demuestra eficacia, lo que permite aplicar una columna cromatográfica para la separación de las fracciones. (Tabla 8-2, Fotografía 8-2)

2.13. Separación del sub-subextracto de acetato de etilo por cromatografía en columna

- Los 0,6048 g de subextracto de acetato de etilo, separar en columna utilizando como solvente de acuerdo a la escala de polaridad.
- Concentrar el sub-extracto de acetato de etilo a sequedad y luego obtener el peso en gramos.
- Agregar el solvente de corrido el menos polar. (Ver fotografía 4)



Fotografía 4-2: Cromatografía en columna del Sub-extracto de Acetato de Etilo
Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

2.13.1. Fraccionamiento en columna C.1 del sub-extracto de Acetato de Etilo

Escoger una columna de vidrio, limpiarla, empacar con hexano y silica gel de columna, dejando 5 cm de distancia libre entre el borde y la fase estacionaria. Eluir el solvente hexano hasta observar la superficie de la silica.

Al sub-extracto de acetato de etilo agregar 2g de silica de columna y homogenizar con una espátula, pasar sobre la superficie de la columna, agregar el solvente hasta humedecer la muestra y finalmente eluir con hexano, acetato de etilo, metanol, amoníaco puro y en mezcla aumentando progresivamente la polaridad, en volumen de 30 ml aproximadamente, en el caso de presencia de bandas coloreadas hasta descenso de la misma.

Se obtuvieron 13 fracciones de la columna del sub-extracto de Acetato de Etilo, utilizando los solventes de acuerdo a su polaridad.

La eliminación del solvente se realiza en forma individual y a presión reducida, pasando los residuos a viales que permiten facilidad de manejo, y visualizar las características físicas de cada una.

La comprobación del fraccionamiento en columna se determina por aplicación de cromatografía de capa fina usando como fase estacionaria silica gel, solvente de corrido de menor polaridad que el solvente de elución. En el caso de no presentar resolución cambiar el solvente de corrido por otro de polaridad similar. Si las manchas se desplazan igual que el solvente, es necesario bajar la polaridad del solvente de corrido y se obtuvieron 13 fracciones que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5-2: Fraccionamiento en columna C.1 del sub-extracto de acetato de etilo de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN
Hexano	100
Hexano, acetato de etilo	50:50
Acetato de etilo	100
Metanol: acetato de etilo	3:40
Metano: acetato de etilo	50:50
Metanol	100
Metanol, amoníaco	30:1

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

2.13.2. Cromatografías de las 13 fracciones obtenidas de la Columna del Sub- subextracto de Acetato de Etilo.

Se realizó una columna de silica gel como fase estacionaria añadida hexano se inició con la adición de 0,6048 g de extracto de acetato de etilo y separado en orden de polaridad con hexano acetato de etilo, en metanol puro y en mezclas. (Ver fotografía 3-3).

2.14. Separación por cromatografía de la Columna C. 2 de la unión de las fracciones 5, 6, 7 del Sub-extracto de Acetato de etilo

Se armó una columna con 8g de silica gel humectada con Hexano, en la fase superior una vez eluido todo el hexano se coloca las fracciones 5, 6 y 7 unidas, mezcladas con silica gel se comienza la elución con hexano, se aumenta la polaridad con Acetato de etilo hasta llegar a metanol puro y en mezclas, obteniéndose fracciones.

Se realiza la fragmentación en cromatografía de capa fina, de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 y se corren con Tolueno -Acetato de etilo, en la segunda cromatografía de capa fina se aplicaron las fracciones 6, 8, 9, 10, 11 utilizando como solvente de corrido Hexano, Acetato de etilo 70:30 y revelando con Ácido sulfúrico vainillina H₂SO₄. (Ver fotografía 10-3)

Tabla 6-2: Fracciones de la columna C. 2 del sub-extracto de Acetato de Etilo de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN
Hexano	100
Hexano: acetato de etilo	90:10
Hexano:Acetato de etilo	70:30
Hexano:Acetato de etilo	50:50
Acetato de etilo:metanol	70:30
Metanol, acetato de etilo	50:50
Metanol	100

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

2.14.1. Cromatografía preparativa de la fracciones 3, 4 y 8, 9 de la columna C. 2

Se corta cada una de las franjas para poder de esta forma recuperar los compuestos presentes. Para verificar la pureza se corren en las mismas condiciones (Hexano, acetato de Etilo (3,5:1,5) y revelado con vainillina H₂SO₄) de separación para realizar una nueva cromatografía.

La cromatografía de la verificación de las bandas de las placas preparativas C2 franja 1, se observa una mancha redonda y separada, presenta un R_f de 0,32 por lo que se pueden asumir como compuestos puros. (Ver fotografía 11, 12-3)

2.15. Columna C. 3 de la unión de las fracciones 10, 11, 12 de la columna C. 2

De la cromatografía en columna se obtuvieron 13 fracciones.

Tabla 7-2: Fracciones de la columna C. 3 de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN
Acetato de etilo	100
Metanol, acetato de etilo	10:30

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

La presencia de manchas de color pardo que se encuentran en el tercio superior de la placa, se corrió en Hexano, Acetato de etilo (70:30) y se reveló con Sulfato de Cerio, las manchas son iguales esto permite unir las fracciones 2, 3 y 4, para su posterior cromatografía y verificar si están puras. (Ver fotografía 13-3)

Las fracciones 7, 8 y 9, 10 que se corrió en Metanol, Acetato de etilo (5,5:1) y reveló con Vainillina H₂SO₄, se unen por que presentan el mismo compuesto. (Ver fotografía 14-3)

En la cromatografía de las fracciones 8, 12, 10 se aplicó el solvente Acetato de etilo, Metanol (6:0,2) y se reveló con Vainillina H₂SO₄, la fracción N. 8 presenta una mancha en la parte inferior de color pardo y una mancha de color rosado en la parte superior de la placa al igual que la fracción 10, la fracción 12 presenta 6 manchas por lo que se encuentra en mezcla. (Ver fotografía 15-3)

2.16. Tratamiento del sub-extracto Tolueno-Acetato de etilo (9:1), Columna C. 4

Sub-extracto Tolueno-Acetato de etilo concentrado en capsula de porcelana pasado a columna y diluido con Tolueno-Acetato de etilo (9:1) se obtuvieron 11 fracciones.

Tabla 8-2: Fracciones de la columna C. 4 Del sub-extracto Tolueno-Acetato de etilo (9:1) de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN
Tolueno-Acetato de etilo (9:1)	9:1
Hexano, acetato de etilo	20:10
Hexano, acetato de etilo	50:50
Acetato de etilo	100
Metanol	100

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

2.17. Cromatografía de las fracciones obtenidas de la columna C. 4 del sub-extracto Tolueno-Acetato de etilo (9:1)

Unir las fracciones 1, 2 que presentan manchas de color rosado, las fracciones 3, 4 y 5 así como las fracciones 6 y 7 que presentan manchas de color pardo las mismas que presentan resolución; se corrió en Hexano, acetato de etilo (40:10) y se reveló con Vainillina H₂SO₄. (Ver fotografía 16-3)

La fracción 7 presenta una sola mancha redonda y de color amarillo en la parte inferior de la placa por lo que se puede decir que se trata de un compuesto puro, mientras que la fracción N. 8

realizar una cromatografía en placa preparativa; las fracciones 10 y 11 unimos debido a que presentan las mismas manchas se utilizó Acetato de etilo, Metanol (20:7) y revelo con Sulfato de Cerio. (Ver fotografía 17-3)

Se preparó una placa preparativa de la fracción 1 que presenta 4 franjas que hay que separar para recuperar las compuestos presentes que pueden ser puros se corrió con Hexano, Acetato de etilo (80:20) y revelo con Vainillina H₂SO₄. (Ver fotografía 18-3)

Placa bidimensional de la fracción 1 para tener las fracciones para poder obtener los compuestos presentes para esta placa se utilizo Hexano, Acetato de etilo (12:3) y se revelo con Sulfatato de Cerio. (Ver fotografia 19-3)

Cromatografia de la C. 4 de la fraccion 4, 5, 6,7, 8, 10, 11 que se revelaron con Sulfato de Ceriolas mismas que se corrieron con Acetato de etilo, Metanol (6:0,2), obteniendo mezclas de compuestos por lo que hay que usar otro solvente. (Ver fotografía 20-3)

Cromatografia de la C. 4 de la fraccion 1, 2 de las franjas 1, 2, 3 y 4 se presentan manchas redondas de color rosado, morado y azul lo cual indica que tienen los mismos compuestos, se utilizo como solvente Tolueno-Acetato de etilo (9:1) y como revelador Vainillina H₂SO₄. (Ver fotografía 21-3)

Cromatografia de la C. 4 de la fraccion 1, 2 de las franjas 1, 2, 3 y 4 y 8 se utilizo Tolueno-Acetato de etilo (9:1) para revelar Vainillina H₂SO₄, presentando manchas en mezcla y de color rosado. (Ver fotografía 21-3)

2.18. Tratamiento del sub-extracto Butanólico

El sub-extracto butanólico se separó:

Solventes: Acetato, Metanol (19:1)

Saponinas: Cloroformo, ácido acético glacial, metanol y agua 60:32:12:8

Flavonoides: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial y agua 100:11:11:26

Flavonoides: Acetato de etilo, metanol 19:1

En las cromatográficas del subextracto butanólico observamos que el desplazamiento del solvente de corrido no presente eficacia, eficiencia pero si presenta resolución.

2.18.1. Fraccionamiento del sub-extracto butanólico en la columna C. 7

Se realiza una columna del sub-extracto butanólico, utilizando solventes de polaridad adecuada para separar las fracciones.

2.18.2. Fraccionamiento de la columna C.7

Tabla 9-2: Fracciones de la columna C. 7 de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN
Hexano	100
Hexano, Acetato de etilo	80:20

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

2.18.3. Cromatografía de las fracciones de la columna N. 7

Añadimos cloroformo, metanol 90:10 y dejamos en reposo para ver si cristalizaban, pero presentaron dos fases en las fracciones 1-7, posteriormente añadimos metanol al 100% y dejamos en reposo. (Ver fotografía 22-3)

Unimos las fracciones 2 y 3 por que presentan los mismos compuestos que se encuentran en la parte superior de la placa, la fracción 4 corremos en otro solvente de mayor polaridad, la fracción N. 6 la dejamos ahí y la fracción N. 5 se recupera las manchas de color negro debido a que se encuentra en mayor cantidad y la fracción 7 se elimina porque no hay compuestos; se corrió con Acetato de etilo, metanol 6:0,2 y se revelo con Sulfato de cerio. (Ver fotografía 23-3)

2.19. Columna C. 8 de la fracción 4 de la columna C. 7 fase Clorofórmica

Se utilizaron solvente de acuerdo a la tabla de polaridad para la obtención de las fracciones.

Tabla 10-2: Fracciones de la columna C. 8

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN	FRACCIÓN
Hexano, Acetato de etilo	14:6	1, 2, 3, 4
Acetato de etilo	100	5
Metanol	100	6

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

En la cromatografía 8 las fracciones 1-6 se corrieron con Acetato de etilo y se revelaron con Sulfato de Cerio, la fracción 4 presenta una sola mancha de color negro en la parte superior de la placa con Rf: 0,80 por lo que se presume de un compuesto puro, la fracción 1 presenta dos

manchas una de color rosado y otra de color pardo claro con Rf: 0,72 para la primera mancha y con un Rf: 0,98 para la segunda mancha. Estas manchas presentan una buena eficacia y resolución. (Ver fotografías 24-3)

2.20. Infrarrojo

De acuerdo al tamizaje fitoquímico el grupo de las saponinas dan reacción representativa, conociendo que hay dos grupos de saponinas triterpénica y esteroidales es posible aplicar la determinación IR que dan bandas representativas y características de este grupo las mismas.

Las fracciones: C. 7-f 2; C. 7- f 4, C. 8-f 4; C. 7-f 1, 2; C. 9.f 6 y C. 7-f 1, 2, C. 9-f 5; C. 7- f 1, 2, C. 9-f 3; C. 8-f 2; C. 11.f 7; C. 7-f 1; C. 7-f 4; C. 10.f 1 y C. 7-f 8, C. 1-f 2 y C. 7-f 4; C. 10-f 2

Procedimiento

- ✓ Los compuestos puros deben estar en estado sólido.
- ✓ El equipo de IR debe estar prendido y limpio.
- ✓ De cada fracción debe tomarse una muestra para colocar en el IR, y proceder a la lectura.
- ✓ Limpiar con alcohol el lente del IR después de cada muestra.

CAPITULO III

3. Resultados y discusión de resultados

3.1. Extracto y sub-extractos

El rendimiento de extracto y los sub-extractos se realiza por gravimetría por diferencia de peso del recipiente recolector vacío y recipiente con el residuo de la evaporación.

Tabla 11-3: Determinación del peso en concentración de extractos

Extracto	W ₁ Balón vacío	W ₂ Balón vacío + Muestra	% de Muestra
Sub-ext. Acetato de etilo	107,1094 g	107,7142 g	0,6048 g
Sub-ext. Butanólico	107,8139 g	108,0452 g	0,2313 g

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

3.2. Resultado de la determinación de las propiedades físicas del extracto etanólico Escama de pescado (*Drymaria ovata*)

La determinación de las propiedades físicas del extracto etanólico de *Drymaria ovata* se realizó mediante diferentes métodos como se puede ver en la tabla.

Tabla 12-3. Características físicas del extracto etanólico de Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

PARAMETRO	CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS	MÉTODO
Aspecto	Líquido	Visual
Olor	Inodoro	Olfato
Sabor	Insípido	Gusto
Color	Verde oscuro	Visual
pH	7.25	Potenciómetro

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

3.3. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó utilizando pruebas de identificación como se puede ver en la siguiente tabla.

Tabla 13-3. Característica del extracto etanólico de Escama de pescado (*Drymariaovata*)

PRUEBA	TIPO DE COMPUESTO	<i>Drymaria ovata</i>	CARACTERISTICAS DE COLOR
ESPUMA	Saponinas	++	Verde oscuro
FeCl ₃	Fenoles	+++	Azul verdoso
SHINODA	Flavonoides	++	Rojo ladrillo
BORNRAGER	Quinonas	-	Verde oscuro
AlCl ₃	Flavonoides	+	Rojo ladrillo
ROSENTER	Terpenos	+	Rojo ladrillo
DRAGENDORFF	Alcaloides	+ -	Verde

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Ausencia: (-)

Presencia: (+)

Moderada: (++)

Abundante: (+++)


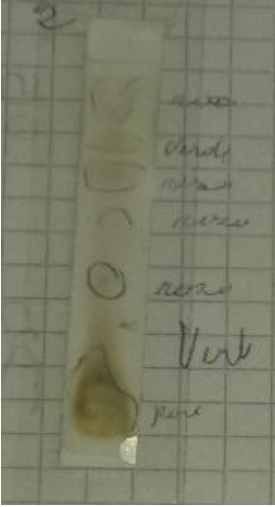

Observándose que se encuentran en mayor cantidad los compuestos fenólicos, seguido de saponinas y flavonoides y terpenos como alcaloides dando falso positivo.

3.4. Cromatográficas del extracto y subextracto

Las placas cromatográficas del extracto y sub-extracto se corrieron con solventes de acuerdo a la escala de polaridad.

3.4.1. Placas cromatográficas del extracto y subextracto

<p>Muestra: Subextracto de Tolueno Placa de Silica gel Solvente de corrido: Hexano, AtOAc (20:15) Revelador: Vainillina H₂SO₄</p>	<p>Muestra: Subextracto de AtOAc Placa de Silica gel Solvente de corrido: EtOAc (100 %) Revelador: Vainillina H₂SO₄</p>	<p>Muestra: Subextracto butanólico Placa de Silica gel Solvente de corrido: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético y agua 100:11:11:26 Revelador: Sulfato de Cerio</p>
--	--	---

		
<p>Fotografía 5.3: Cromatografía del subextracto de tolueno</p>	<p>Fotografía 6.3: Cromatografía del subextracto de AtOAc</p>	<p>Fotografía 7.3: Cromatografía del subextracto butanólico</p>

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

Se determinó la presencia de metabolitos secundarios realizando cromatografías de capa fina de los sub-extractos de Tolueno, Acetato de etilo y Butanol, colocando los tres sub-extractos en placa cromatográficas de fase estacionaria de silica gel y como solventes de corrido se utilizaron, Acetato de etilo y Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua 100:11:11:26.

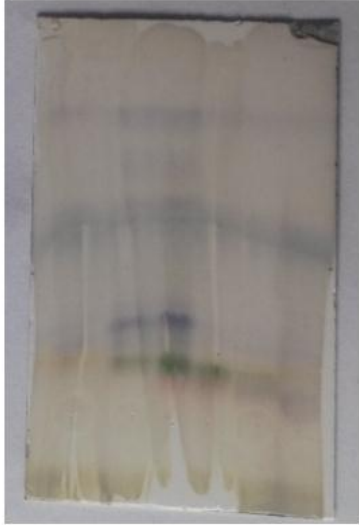

Con el solvente Tolueno-Acetato de etilo 97:3, en el subextracto de Tolueno se presenta únicamente clorofilas de color verde en el tercio inferior de la placa, por lo cual se elimina este sub-extracto.

El sub-extracto de Acetato de etilo presenta dos manchas verdes en el tercio superior y manchas de color rosa en el tercio medio, finalmente en el punto de aplicación, tres manchas sobrepuestas de color pardo, al ser reveladas con vainillina H_2SO_4 lo cual demuestra que en este sub-extracto está presente metabolitos secundarios de tipo terpenicos por que se colorean con el reactivo de Rosenthaler, y será el que separe en columna para obtener los respectivos metabolitos.

La placa de los tres sub-extractos corridos en acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua en una relación: 100:11:11:26 y revelada con sulfato de serio característico para los compuestos flavonoides dan manchas amarillas.

3.4.2. Placas cromatográficas en capa fina del subextracto de acetato de etilo

Cromatografía del sub-extracto de Acetato de Etilo de las fracciones 1-13

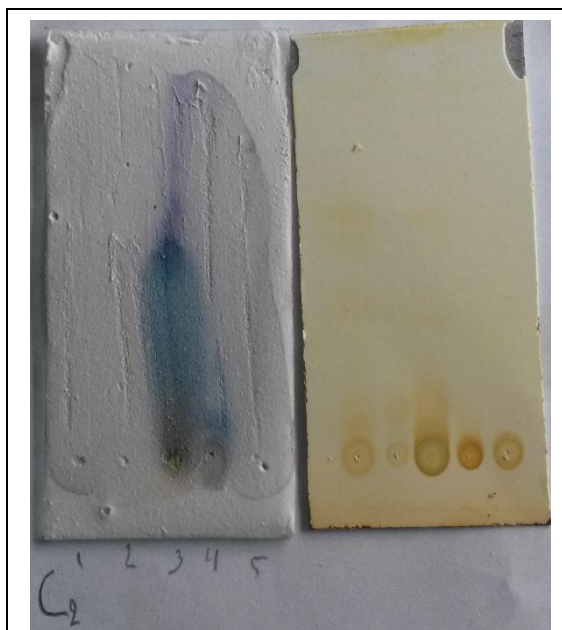
	
<p>Fotografía 8-3: Cromatografía de las fracciones N. 1-6</p>	<p>Fotografía 9-3: Cromatografía del subextracto de Acetato de Etilo</p>
<p>Numero de fracción: 1, 2, 3, 4, 5, 6</p>	<p>Numero de fracción: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13</p>
<p>Solvente de corrido: Hexano</p>	<p>Solvente de corrido: Hexano</p>
<p>Revelador: Vainillina H₂SO₄</p>	<p>Revelador: Sulfato de Cerio</p>
<p>Fase estacionaria: Silica gel</p>	<p>Fase estacionaria: Silica gel</p>

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Las cromatografías de cada una de las fracciones indican que en la fracción 1 una vez revelados con vainillina H₂SO₄ en el tercio inferior hay una mancha anaranjada y azul en el tercio medio una mancha celeste, en las fracciones 2, 3, 4, 5, presentan manchas verdes y azules en el tercio inferior, manchas de color celeste, en el tercio medio hay manchas celestes y en el tercio superior sin llegar al frente del solvente, las fracciones 4 y 5 presentan manchas verdes en el tercio inferior y manchas celestes en el tercio medio, la fracción 6 presenta solo la mancha celeste en el tercio medio; la fracción 7 presenta dos manchas de color rosado una en el tercio inferior y una en el tercio superior, la fracción 8 presenta mancha anaranjada en el punto de aplicación dos manchas rosadas en tercio inferior y una mancha rosada pequeña en el tercio medio.

Las fracciones 10 y 11 presentan la mancha anaranjada en el punto de aplicación mancha separada de mayor tamaño en el tercio inferior y superior, la fracción 13 presenta la mancha anaranjada en el punto de aplicación y la mancha rosada en el tercio superior al mismo nivel que la fracción 7.

3.4.3. Purificación de la unión de las fracciones 5, 6, 7 en la columna C. 2



Fotografía 10-3: Cromatografía de las fracciones N. 1-5



Solvente: Hexano puro

Revelador: Vainillina H₂SO₄

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

Se realizó la fragmentación en cromatografía de capa fina, en la primera placa se aplicaron las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 en la fracción 3 se observó una mancha alargada en la base y otra en el tercio medio igualmente alargada, al correrse en Tolueno -Acetato de etilo, en la segunda cromatografía de capa fina se aplicaron las fracciones 6, 8, 9, 10, 11 utilizando como solvente de corrido Hexano, Acetato de etilo 70:30 y revelando con Ácido sulfúrico vainillina H₂SO₄, se observó la presencia de clorofilas en el tercio inferior en las fracciones 6-9 y una mancha en forma de ocho de color rosado y violeta en el tercio superior, en la fracción 10 y 11 se tiene una solo la mancha de color rosado y violeta.



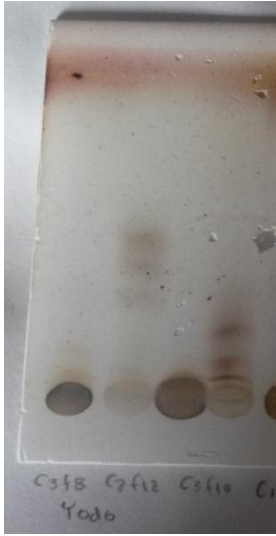
3.4.4. *Cromatografía preparativa de la mezcla de las fracciones 3, 4 y 8, 9 de la columna C. 2*

	
Fotografía 11-3: Cromatografía de las fracciones N. 8, 9 en mezcla	Fotografía 12-3: Recuperación de las manchas amarillas y moradas de las fracciones N. 8, 9 en mezcla
Fracción: 8, 9	Fracción: 8, 9
Solvente: Hexano, acetato de Etilo (3,5:1,5)	Solvente: Hexano
Revelador: Vainillina H ₂ SO ₄	Revelador: Vainillina H ₂ SO ₄

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

3.4.5. *Columna C. 3 de la unión de las fracciones 10, 11, 12 y 13 de la columna C. 1*

Cromatografías de las fracciones de la Columna N. 3

		
Fotografía 13-3: Cromatografía de las fracciones N. 1-6	Fotografía 14-3: Cromatografía de las fracciones N.7-12	Fotografía 15-3: Cromatografía de las fracciones N.8, 12, 10
Solvente: Hexano, Acetato de etilo (70:30)	Solvente: Metanol, Acetato de etilo (55:10)	Solvente: Acetato de etilo, Metanol (6:0,2)
Revelador: Sulfato de Cerio	Revelador: Vainillina H ₂ SO ₄	Revelador: Vainillina H ₂ SO ₄




Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)


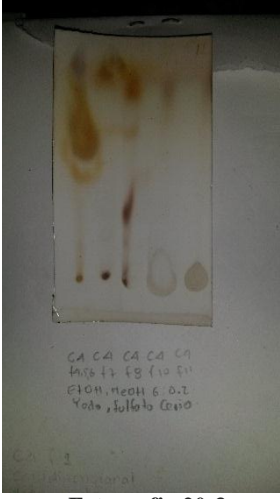

Todas las fracciones de 1-6 se han corrido en Hexano, Acetato de etilo 70:30 las fracciones de 7-11 en Acetato de etilo, Metanol 55:10.

En la fracción 2 se encuentran dos compuestos de color violeta en el tercio superior. Las fracciones 7, 8 presentan manchas de color violeta en el punto de aplicación al igual que la fracción 10 con una mancha color amarilla y una mancha de color violeta. Se unen las fracciones 2 y 3 así como las fracciones 7 y 8 y se deja sola la fracción 10. Estas se encuentran en pequeñas cantidades por lo que no permite purificarlos.

3.4.6. Cromatografía de las fracciones obtenidas de la columna N. 4 del sub-extracto Tolueno-Acetato de etilo (9:1)

Cromatografías de las fracciones de la Columna C. 4

 <p>1 2 3 4 5 6 7</p>	 <p>8 9 10 11 12 13</p>	 <p>1 2 3 4 5 6 7</p>
<p>Fotografía 16-2: Cromatografía de las fracciones N. 1-7</p>	<p>Fotografía 17-2: Cromatografía de las fracciones N.8-13</p>	<p>Fotografía 18-2: Placa preparativa de las fracciones N. 1-7</p>
<p>Solvente: Hexano, acetato de etilo (40:10)</p>	<p>Solvente: Acetato de etilo, Metanol (20:70)</p>	<p>Solvente: Hexano, Acetato de etilo (80:20)</p>
<p>Revelador: Vainillina H₂SO₄</p>	<p>Revelador: Sulfato de Cerio</p>	<p>Revelador: Vainillina H₂SO₄</p>

		
<p>Fotografía 19-3: Placa bidimensional de la fracción 1</p>	<p>Fotografía 20-3: Cromatografía de la C. 4 de la fracción 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11</p>	<p>Fotografía 21-3: Cromatografía de la C. 4 de la fracción 1, 2 de las franjas 1, 2, 3 y 4</p>
<p>Solvente: Hexano, Acetato de etilo (12:30)</p>	<p>Solvente: Acetato de etilo, Metanol (60:2)</p>	<p>Solvente: Tolueno-Acetato de etilo (90:10)</p>
<p>Revelador: Sulfato de Cerio</p>	<p>Revelador: Sulfato de Cerio</p>	<p>Revelador: Vainillina H₂SO₄</p>

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

En la cromatografía de las fracciones 1- 6 corridas con hexano, acetato de etilo 40:20 revelado con Vainillina H₂SO₄ presenta una mancha de color pardo en la fracción 6. Las fracciones de la 7-13 corridas con acetato de etilo-metanol 20:70 y revelado con sulfato de cerio presenta en la fracción 12 y 13 manchas de color pardo claro

La cromatografía de capa fina preparativa corrida en Hexano, Acetato de etilo 80:20 y revelado con Vainillina H₂SO₄ indica que las clorofilas se encuentran en gran cantidad distribuidos en los dos tercios inferiores.

Se realizó una placa preparativa bidimensional que se corrió con Hexano, Acetato de etilo 80:20 y se revelo con Vainillina H₂SO₄ dándonos como resultado cuatro franjas, una inferior de color pardo claro, una franja media 1 de color blanco, una franja Media 2 de color verde claro y una franja superior de color verde oscuro.

3.4.7. Fracciones de la columna C. 7

Cromatografía de fracciones de la columna C. 7

<p>Fotografía 22-3: Cromatografía del sub-extracto butanólico</p>	<p>Fotografía 23-3: Cromatografía del sub-extracto butanólico de f: 1-8</p>
<p>Solvente: Metanol</p>	<p>Solvente: Acetato de etilo, Metanol 6:0,2</p>
<p>Revelador: Yodo</p>	<p>Revelador: Sulfato de Cerio</p>

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

Se realizó una cromatografía de capa fina de la fracción 1-7 corridos con Acetato de etilo, Metanol 60:2, revelados con Sulfato de Cerio; observándose en la fracción 1 una mancha violeta con el frente del solvente, en la fracción 3 un compuesto mayoritario con el frente del solvente de color violeta y compuestos en mínima cantidad en el resto de la placa.

Se recuperó los compuestos que se presentan como manchas grandes de color violeta en el tercio superior de las fracciones 2, 3 y 4, 5, 7.

La fracción 4 de la columna 7 del fraccionamiento del sub-extracto butanólico se fragmenta en la columna C. 8.

La cromatografía en capa fina de las fracciones de la columna 8 corrido en Acetato de etilo y revela con Sulfato de Cerio en la fracción 3 presenta una mancha en forma de ocho de color violeta lo cual nos indica que se encuentra en mezcla y la fracción 4 tienen un compuesto violeta y amarillo con el frente del solvente.

3.4.8. Columna C.8 de la fracción 4 de la columna C. 7 fase Clorofórmica

Cromatografía de fracciones de la columna N. 8



Fotografía 24-3: Cromatografía de las fracciones 4

Solvente: Acetato de etilo

Revelador: Sulfato de Cerio

Rf: f 1: 0,72 y 0,98

f 4: 0,80

Elaborado por: Mayra Ocaña

En la cromatografía 8 las fracciones 1-6 se corrieron con Acetato de etilo y se revelaron con Sulfato de Cerio, la fracción N. 4 presenta una sola mancha de color negro en la parte superior de la placa con Rf: 0,80 por lo que se presume de un compuesto puro, la fracción N. 1 presenta dos manchas una de color rosado y otra de color pardo claro con Rf: 0,72 para la primera mancha y con un Rf: 0,98 para la segunda mancha. Estas manchas presentan una buena eficacia y resolución.

3.5. Extracción

Se realizó la eliminación del solvente por evaporación en reverbero eléctrico permite tener residuos resinosos que evitan la fermentación y desarrollo de microorganismos como hongos. En este caso las sustancias son pardo verdosas en el caso del Tolueno, pardas claras en el caso del Acetato de etilo y pardo rojizo en el caso del extracto Butanólico. Se determinó que dan

positivo los resultados para terpenos y flavonoides se procedieron a extraer con solventes por inmiscibilidad.

3.6. Cromatografía preliminar

Para verificar la existencia de los metabolitos se tiene como referencia la presencia de manchas verdosas en el caso de clorofilas, amarilla en el caso de carotenos y es necesario agregar un reactivo de coloración y calentar a 105°C para verificar la presencia de otros tipos de compuestos

Así tenemos que en el sub-extracto de Tolueno existen clorofilas y una manchas de color pardo en el punto de aplicaciones se corre con Hexano: Acetato de etilo 20:15 mientras que en el sub-extracto de Acetato de etilo existe la formación de manchas redondeadas distribuidas desde el punto de aplicación al frente del solvente en la que existe una de clorofila en el tercio superior y una vez revelada con vainillina H₂SO₄ las mancha verde se mantiene mientras que la otras presenta tonalidad rosada a pardo, e indica que este sub-extracto contiene el mayor número de metabolitos secundarios.

El sub-extracto butanólico no se desplaza del punto de aplicación.

Los tres sub-extractos aplicados en una placa de silica gel en base de aluminio y corridas en un solvente característico de flavonoides como es: el acetato de etilo, ácido fórmico 100:11:26 y revelado con sulfato de Cerio presenta manchas en vela en el tercio superior del subextracto butanólico mientras que en los otros dos subextracto no se presentan manchas lo cual indica que los derivados fenólicos se purificaran del subextracto butanólico.

3.7. Separación en columna (C1)

Por la similitud de las manchas en color y R_f se unen las fracciones 1, 2 y 3 para posterior purificación del mismo modo se unen las fracciones 4 y 5 que contienen una mancha de color verde y una de color celeste, la fracción 6 se deja sola por contener un solo metabolito de color celeste. Las fracciones 1, 8 y 9 se dejan en el mismo vial mientras que se unen las fracciones 10, 11, 12 y 13.

Las fracciones 1, 2 y 3 presentan un alto contenido de clorofila y pequeña cantidad de metabolitos diferente a esta por lo cual se dejan en reposo con metanol y hexano para separar las clorofilas en la fase de hexano, en el metanol se tiene el compuesto I.

La unión de las fracciones 4, 5, 6 y 7 se purificarán el metabolito de color celeste y eliminará las fracciones que contengan clorofila, las fracciones 11, 12 y 13 contienen pequeñas cantidades de metabolitos posiblemente terpenicos que será necesario unir para purificar en columna.

Tabla 14-3: Fracciones de la columna C.1 de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN	FRACCIÓN
Hexano	100	1,2,3,4,5
Hexano, acetato de etilo	50:50	6
Acetato de etilo	100	7
Metanol, acetato de etilo	3:40	8
Metanol, acetato de etilo	50:50	9, 10, 11
Metanol	100	12
Metanol, amoniac	30:1	13

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

3.8. Purificación de las fracciones 4, 5, 6, 7 en la columna C. 2

Se observó ausencia de metabolitos secundarios en las fracciones 1, 2 en la fracción 3 se encuentra un metabolito en mayor cantidad que deberá unirse a la fracción 4 que tiene en mínima cantidad los metabolitos. Las fracciones 5, 6, 7 se unieron. Las fracciones 8, 9 se unen y la fracción 11 se deja sola

A la fracción 3 se le deja en el mismo recipiente esperando a que cristalice, mientras que la fracción 9 por tener mayor cantidad de metabolitos en el punto de aplicación y con manchas separados se realizará una cromatografía de capa fina preparativa.

Tabla 15-3: Unión Fracciones 4, 5, 6 y 7 en la columna C. 2 de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN	FRACCIÓN
Hexano	100	1,2,3,4,5, 6
Hexano, acetato de etilo	90:10	7
Hexano, acetato de etilo	70:30	8,9
Hexano, acetato de etilo	50:50	10
Metanol	100	11

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

3.8.1. Cromatografía de capa fina preparativa (TLPC) de la fracción 3, 4 y 8, 9 de la columna C. 2

Se realizó una cromatografía preparativa de la franja inferior de la fracción 8 de la columna C. 2 y se obtuvo una sola mancha, Compuesto II

3.8.2. Purificación de las fracciones 11, 12, 13 de la columna C. 2

En la fracción 2 se encuentran dos compuestos de color violeta en el tercio superior y depende de la cantidad para purificarse en micro-columna.

Las fracciones 7, 8 presentan manchas de color violeta en el punto de aplicación al igual que la fracción 10 con una mancha color amarilla y en el borde una mancha de color violeta. Se unen las fracciones 2 y 3 así como las fracciones 7 y 8 y se deja sola la fracción 10. Estas se encuentran en pequeñas cantidades por lo que no permite purificarlas.

Tabla 16-3: Purificación de las fracciones 11, 12, 13 de la columna C. 1 en la columna C. 3 de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN	FRACCIÓN
Hexano	100	1
acetato de etilo	100	2, 3, 4
acetato de etilo, metanol	80:20	5
acetato de etilo	50:50	6, 7

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

3.9. Purificación del Sub-extracto de Tolueno-Acetato de etilo

Realizada la placa bidimensional se recuperan los compuestos mayoritarios presentes en la fracción 1 en las otras fracciones se encuentran metabolitos en mínima cantidad.

Purificación de la fracción 1 de la columna C. 4

Al realizar una placa preparativa bidimensional que se corrió con Hexano, Acetato de etilo 80:20 y se reveló con Vainillina H₂SO₄ dándonos como resultado cuatro franjas, una inferior de color pardo claro, una franja media 1 de color blanco, una franja Media 2 de color verde claro y una franja superior de color verde oscuro a las mismas que se les añadió metanol y se agitó,

posteriormente se deja en reposo y luego se pasa a tubos de ensayo para centrifugar, después de centrifugar se separó el líquido de la silica gel. La fase líquida se concentra y se corre con Tolueno–Acetato de etilo y se revela con Vainillina H₂SO₄.

Tabla 17-3: Fracciones de la columna C. 4 de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN	FRACCIÓN
Tolueno-Acetato de etilo (9:1)	9:1	1, 2,
Hexano, acetato de etilo	20:10	3
Hexano, acetato de etilo	50:50	4, 5
Acetato de etilo	100	6, 7
Metanol	100	8, 9, 10, 11, 12, 13

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

3.9.1. Purificación de la fracción 1 de la columna C. 4 en placa preparativa

En la fracción 1 presenta 4 manchas grandes separadas por lo cual se realizó una placa preparativa corrido en hexano- acetato de etilo 80:20 para luego cortar las franjas y eluir las franjas en un vial con etanol, se recuperó el solvente y se evaporó y se probó en capa fina la presencia de los componentes de cada franja.

3.9.2. Purificación del sub-extracto butanólico en la columna C. 7

Se realizó la comprobación de los metabolitos presentes en el sub-extracto butanólico en cromatografía de capa fina en el cual se utilizó como solventes de corrido Acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua 100:11:11:26, Acetato de etilo, Metanol 19:1, Cloroformo, ácido acético, metanol, agua 60:32:12:8 observándose buenos resultados con tres manchas prominentes en el tercio superior con el primer solvente.

La fragmentación de este sub-extracto se realizó en columna de silica gel C. 7 de la siguiente manera:

Tabla 18-3: Fracciones del sub-extracto butanólico en la columna C. 7 de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

SOLVENTE	CONCENTRACIÓN	FRACCIÓN
Hexano	100	1, 2
Hexano, Acetato de etilo	80:20	3,4, 5, 6, 7, 8, 9

Elaborado por: Mayra Ocaña (2015)

La comprobación de la presencia de metabolitos se realizó en cromatografía de capa fina de la fracción 1-7 corridos con Acetato de etilo, Metanol 60:20, revelados con Sulfato de Cerio; observándose en la fracción 1 una mancha violeta con el frente del solvente, en la fracción 3 un compuesto mayoritario con el frente del solvente de color violeta y compuestos en mínima cantidad en el resto de la placa.

Se recuperó los compuestos que se presentó como manchas grandes de color violeta en el tercio superior de las fracciones 2, 3 y 4, 5, 7.

3.10. Determinación del IR

Se determinó el IR de los compuestos que se piensan que están puros cromatográficamente, se realizó la lectura del IR en la que se presentan bandas entre 2924-601 cm^{-1} que pueden presentar diferentes compuestos.

3.10.1. Resultado de las fracciones C. 7-f 2; C. 7- f 4, C. 8-f 4 y C. 7-f 1, 2; C, 9,f 6

Tabla 19-3: Determinación de IR de los compuestos puros de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

C. 7 – f2	C. 7- f 4, C. 8-f 4	C. 7-f 1, 2; C, 9,f 6
1726	1726	1738
1601	1578	1455
1578	1465	1376
1513	1379	1242
1462	1268	1161
1379	1120	826
1272	1071	700
1122	1039	
1071	900	
1039	742	
893	703	
742	626	
703		
626		

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Permitió el proceso cromatográfico comprobar si fracciones de diferentes columnas corresponden a un determinado compuesto llegando a determinar que C.7 – f1, 2; C. 9 – f6 (anexo 4) es similar a C. 7 – f4; C. 8 – f4 (anexo 6) y a C. 7 – f2 (anexo 3) en metanol caracterizados por una banda fuerte puntiaguda de 1726-1738 cm^{-1} que puede ser de un éster, amida o lactonas, como en las pruebas de tamizaje fitoquímico da reacción positiva de espuma para saponinas esteroidal sin OH libre; además en el compuesto de las fracciones C. 7 – f2

(anexo 3) y C. 7 – f4; C. 8 – f4 (anexo 6) hay una banda característica de 1601 cm⁻¹ correspondiente a una instauración alifática característica en las saponinas triterpénica y esteroidales, las bandas representativas de estos compuestos se encuentran entre 1272-1242 cm⁻¹ característicos de OH o amina unidas a cadenas alifáticas.

Las bandas de 1000-560 cm⁻¹ están mezcladas entre anchas y bandas medias puntiagudas que corresponden a cadenas alifáticas.

3.10.2. Resultado de las fracciones C. 7-f 1, 2, C. 9-f 5; C. 7-f 1, 2, C. 9-f 3; C. 8-f 2; C. 11.f 7; C. 7-f 1; C. 7-f 4; C. 10.f 1

Tabla 20-3: Determinación de IR de la planta Escama de pescado (*Drymaria ovata*).

C. 7-f 1, 2, C. 9-f 5	C. 7-f 1, 2, C. 9-f 3	C. 8-f 2; C. 11.f 7	C. 7-f 1	C. 7-f 4; C. 10.f 1
1731	1733	1728	1729	1731
1509	1509	1236	1234	1507
1236	1234	1087	1087	1234
1090	1085	886	886	1087
889	889	669	669	886
669	719	603	603	715
629	669			666
603	603			631
				601

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Se determinó que el segundo grupo de espectros C. 7-f 1, 2, C. 9-f 5 (anexo 7); C. 7-f 1, 2, C. 9-f 3 (anexo 11); C. 8-f 2; C. 11.f 7 (anexo 10); C. 7-f 1 (anexo 9); C. 7-f 4; C. 10.f 1 (anexo 12) tienen la característica de ser compuestos solubles en cloroformo y presentan el IR a 1728-1236-1234-1087 y 886 cm⁻¹ como bandas pequeñas redondeadas características de derivados de nitrógeno terciario, pese a que es un información no muy explícita pero nos demuestra que en 1725 cm⁻¹ corresponde a las bandas de flexión de acetatos y también la banda de 1234 cm⁻¹ que está dentro del rango 1250-1200 cm⁻¹ corroboran de la función éster; que corresponden a un terpeno que puede ser una saponina con anillo éter-cíclico.

3.10.3. Resultado de la fracción C. 7-f 8, C. 1-f 2

Tabla 21-3: Determinación de IR

C. 7-f 8, C. 1-f 2
2924
2356
1725
1090

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Se observó que la fracción C. 7-f 8, C. 1-f 2(anexo 8) tiene bandas pequeñas alrededor de 2924 cm^{-1} correspondiente a bandas de flexión CH_3 , CH_2 y CH , las bandas de 2356 cm^{-1} en la revisión bibliográfica corresponde a un iso-nitrilo, los de 1725 cm^{-1} que puede ser una gama-lactonas y cetona cíclica, en la banda 892 cm^{-1} corresponde a CH alifáticos de bandas de deformación.

3.10.4. Resultado de la fracción C. 7-f4; C. 10-f 2

Tabla 22-3: Determinación de IR

C. 7-f4; C. 10-f 2	
	1724
	1652
	1565
	1511
	1497
	1406
	1280
	1194
	1177
	1023
	921
	833

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Se observó en la fracción C. 7-f4; C. 10-f 2 (anexo 5) en la banda 1724 cm^{-1} que puede ser una gama-lactonas y en la banda 1652 que puede ser un ciclo-alqueno,

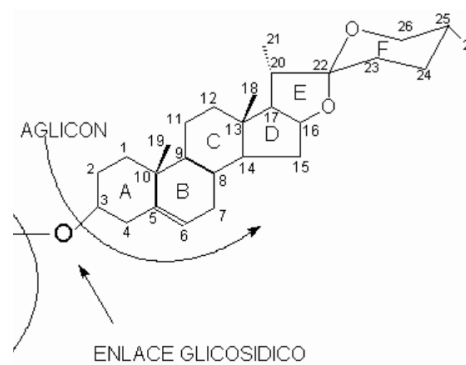


Imagen 7.1: Posibles estructuras
Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

Saponina esteroideal (1): aglicón en las saponinas esteroidales (sapogenina) presenta el esqueleto tetracíclico característico de este tipo de compuestos, denominado gonano (ciclopentanoperhidrofenantreno) en el caso de ser saturado.

La característica estructural fundamental de estas sapogeninas radica es la presencia de dos anillos adicionales que se originan a partir del C-17 del esqueleto base y están contenidos respectivamente en dos planos perpendiculares entre sí.

CONCLUSIONES

1. A partir de 1300 g de *Drymaria ovata*, se logró extraer por maceración 50 mL de extracto, de aspecto líquido, que presenta un color verde oscuro, inodoro e insípido, con un pH de 7,25. Los sub-extractos se prepararon por extracciones sucesivas con solventes de acuerdo a su polaridad e inmiscibilidad. Con Acetato de etilo se obtuvieron 0,6048 g y con butanol 0,2313 g.
2. En el tamizaje fitoquímico da positivo a terpenos, fenoles pirogálicos, flavonoides y alcaloides.
3. La cromatografía de capa fina preliminar de los sub-extractos de tolueno corrido en hexano acetato de etilo 20:15 y revelado con vainillina H₂SO₄ presenta clorofilas. El acetato de etilo presenta resolución con manchas verdosas de clorofila, rosadas de terpenos en mayor cantidad en el punto de aplicación, teniendo mejor eficacia, eficiencia y resolución. El sub-extracto butanólico da manchas al correr con acetato de etilo: ácido acético glacial: ácido fórmico: agua 100:11:11:26 y se revela con sulfato de cerio.
4. El subextracto de acetato de etilo se fraccionó en la columna C. 1 según tabla 14-3, se unen las fracciones 3, 4 y 8, 9 y se determina que hay tres compuestos a purificar, se aisló el compuesto mayoritario. Se realizó la cromatografía de las bandas de las placas preparativas C. 2, franja 1, se observa una mancha redonda y separada, presenta un R_f de 0,32 por lo que se pueden asumir como compuestos puros.
5. Del subextracto butanólico purificado en la columna C7 se obtuvo 9 fracciones, la fracción 4 se re-purifican en la columna 8 y se aísla el compuesto III.
6. Los espectros infrarrojos determinan la presencia de los siguientes grupos orgánicos, IR de la fracción C. 7-f4, C.8-f4 de 1726 – 1268 – 1120 - 1071 y 742 cm⁻¹ posibles saponinas esteroideal, la fracción C. 7-f 4; C. 10-f 1 de 1234 – 1087 y 886 cm⁻¹ que posiblemente es un terpeno que puede ser una saponina con anillo éter-cíclico. La fracción C. 7-f 8; C. 11-f 2 de 2356 – 892 cm⁻¹ que puede ser un iso-nitrilo o un CH alifático. La fracción C. 7-f 4; C. 10.f 2 de 1724 – 1652 cm⁻¹ representativos de una posible gama-lactona o un ciclo-alqueno y los otros valores no se puede determinar ningún posible anillo debido a que no hay suficiente información.

RECOMENDACIONES

1. Se sugiere realizar convenios con otras instituciones que tengan equipos de alta tecnología como espectroscopia de masas para un mejor desarrollo del trabajo de investigación, realizando estudios más avanzados como determinar las estructuras de los vegetales a estudiar y así poder publicar.
2. El trabajo se debe realizar por lo menos con 3g de extracto libre de clorofila para poder tener un mejor rendimiento del mismo.
3. Determinar la estructura de los metabolitos secundarios por espectroscopia de masas por lo cual los compuestos son foto-lábiles y se degradan con facilidad.
4. Se debe utilizar solventes de acuerdo a la tabla de polaridad para obtener resultado correctos,
5. Utilizar las adecuadas medidas de seguridad al manipular los reactivos, solvente, ácidos para evitar contaminación en los extractos e intoxicaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

1. **ROBERT M. SILVERSTEIN, G. CLYTON BOSSTER Y TERENCE C. MORRIL.** *Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos.* 1^{era} ed. Mexico: enero de 1980 pp. 77-89.
2. **RICARDO STRADI, ELISABETTA ROSS.** *Guía del curso de métodos físicos en química orgánica.* Vol. 1. Infrarrojo. pp.73.
3. **OLGA LOCK DE UGAZ.** *Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales.* Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da ed. Junio 1994 pp. 239-240.
4. **CUMANDÁ JATIVA.** *Texto Básico de Farmacognosia.* Editorial CDR. Riobamba–Ecuador. 2004 Pp. 97.
5. **RIOS, M. MICHAEL J. KOZIOI, HENRICK Y GABRIELA GRANDA.** *Plantas Útiles del Ecuador.* herbario AAU, Universidad de Aarhus, Dinamarca. The Exotic Blends Company, Quito, Ecuador
6. **ACOSTA M.,** *Vademécum de Plantas Medicinales del Ecuador.* Quito-Ecuador. FESO-Abya-Yala. 1992 pp. 45-50.
7. **BRUNETON, J.** *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales.* 2^a. ed. Barcelona-España. Alambra. 2001 pp. 1094.
8. **PAMPLONA, J.** *Salud por las plantas medicinales.* 1ra. ed. Madrid –España. Editorial Safeliz. 2006 pp. 36.
9. **ADRIANA PAOLA LEMA AUCACAMA.** *Separación y Posible identificación de metabolitos secundarios de la Jacaranda (Jacaranda mimosifolia) con fines de aporte a una técnica de análisis químico.* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2013 pp. 20-50.
10. **JOHN MARCOS QUISPILLO MOYOTA.** *Separación, purificación y posible identificación de metabolitos secundarios del Escobillón rojo (Callistemon spiciosus).* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2013 pp. 45-52.
11. **DRYMARIA OVATA, HUMB. & BOMP. EX SCHULT:** [1 diciembre 2015]
Disponible en web:
<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>
12. **EXTRACTOS ALCOHÓLICOS:** :[3 diciembre 2015] Disponible en web:
<http://www.laboratorio.takiwasi.org/esp/extract.php>

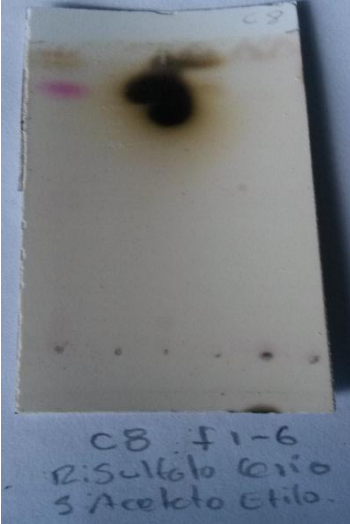
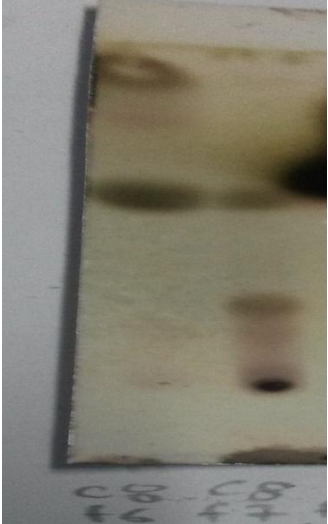
- 13. PLANTAS MEDICINALES DE LOS ANDES ECUATORIANOS - BEISA:** [3 diciembre 2015] Disponible en web: <http://www.beisa.dk/...Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>
- 14. PROPIEDADES. FITOQUÍMICA:** [8 diciembre 2015] Disponible en web: <https://sites.google.com/...elaeaceae/erythroxyllum-sp>
- 15. FITOQUÍMICA. FITOTERAPIA. FITOECONOMIA.** Injúria. Comentários. *Drymaria cordata* - Cordão-de-sapo · *Paronychia brasiliana* · *Silene gallica* - Alfinetes-da-terra: [8 diciembre 2015]. Disponible en web: <http://www.laboratorio.takiwasi.org/esp/extract.php>
- 16. CRISTALIZACIÓN LA GUÍA DE QUÍMICA:** [12 diciembre 2015]. Disponible en: <chttp://quimica.laguia2000.com/general/cristalizacion#ixzz36Gwr203v>
- 17. TEMAS DE FARMACOGNOSIA-PLANTAS MEDICINALES:** [17 diciembre 2015]. Disponible en web: <http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/glucosidos/saponinas/>
- 18. THE FREE DICTIONARY:** [18 diciembre 2015]. Disponible en web: <http://es.thefreedictionary.com/humedad>
- 19. DETERMINACIÓN DE CENIZAS.** 12 de diciembre de 2006: [20 diciembre 2015]. Disponible en web: <http://avibert.blogspot.com/2010/12/determinacion-de-cenizas-totales-o.html>
- 20. TP-LABORATORIO QUÍMICO:** [21 diciembre 2015]. Disponible en web: <https://www.tplaboratorioquimico.com/quimica-general/las-propiedades-de-la-materia/densidad.html>
- 21. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA:** [4 enero 2016]. Disponible en web: <http://es.slideshare.net/yerga/cromatografia-de-capa-fina>
- 22. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN:** [8 enero 2016]. Disponible en web: <https://books.google.com.ec/books?id=uHNdHS8JXFIC&pg=PA32&lpg=PA32&dq>
- 23. PLANTAS NATIVAS DE LA HOYA DE QUITO:** [13 enero 2016]. Disponible en web: http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php?option=com_content&view=article&id=28:drymaria-ovata&catid=15&Itemid=109.
- 24. CONSTANTE DE DISTRIBUCIÓN: Cromatografía.** [4 enero 2016]. Disponible en: http://www.Constantedistribución.net/pageID_0597340.html
- 25. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.** [18 enero 2016]. Disponible en: http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_tipus.html

26. CAMACHO BRAVO. DULCE ARGELIA. Separación e identificación de aminoácidos de jugos de frutos por cromatografía bidimensional en capa fina. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 5^{ta} ed. [18 enero 2016]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/210306664/cromatografia-bidimensional-pdf#scribd>

ANEXOS

1. Columna C.8 de la fracción 4 de la columna C. 7 fase Clorofórmica

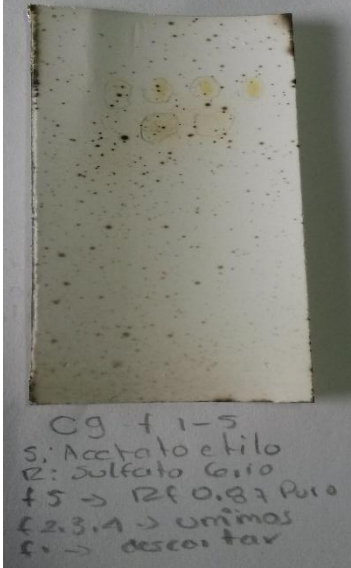
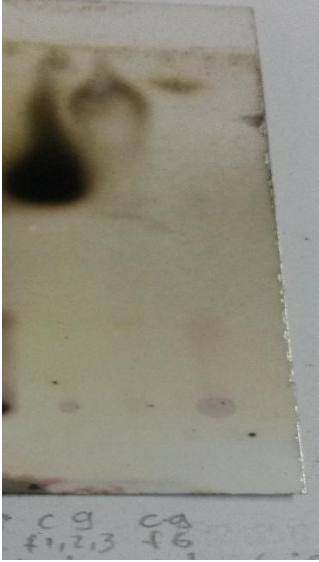
Cromatografía de fracciones de la columna N. 8

	
Fotografía 27-2: Cromatografía de las fracciones N. 1-6	Fotografía 28-2: Cromatografía de las fracciones N. 6, 7
Solvente: Acetato de etilo	Solvente: Acetato de etilo, Metanol 6:0,2
Revelador: Sulfato de Cerio	Revelador: Sulfato de Cerio
Rf: f 1: 0,72 y 0,98 f 4: 0,80	

Elaborado por: Mayra Ocaña

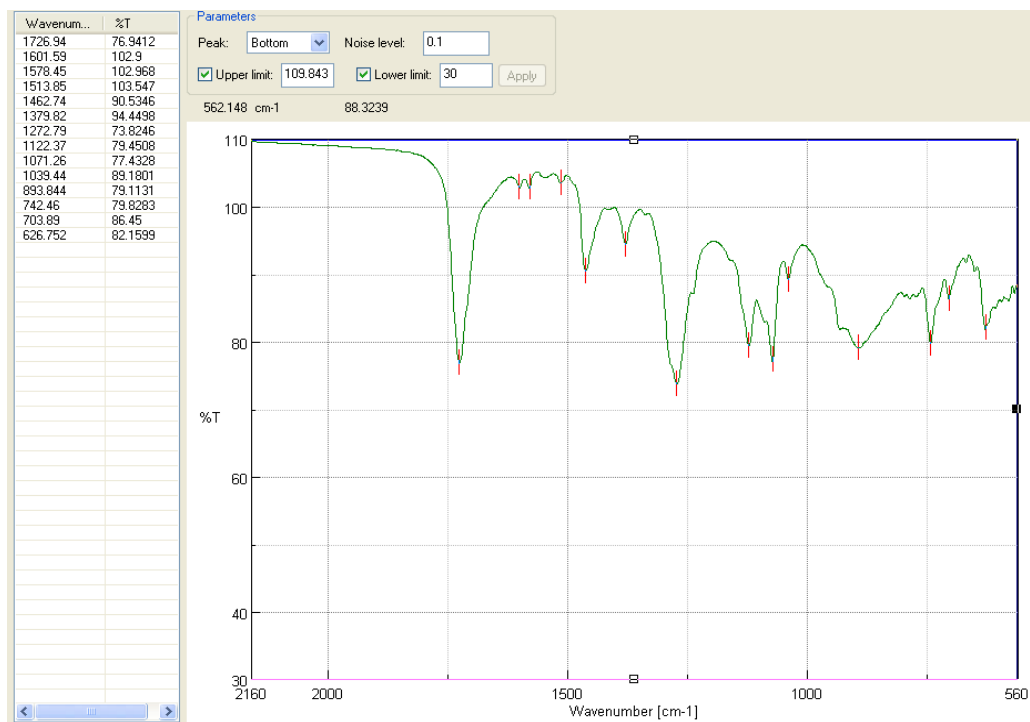
2. Columna C. 9 de las fracciones 2, 3 de la columna C. 7

Cromatografía de fracciones de la columna N. 9

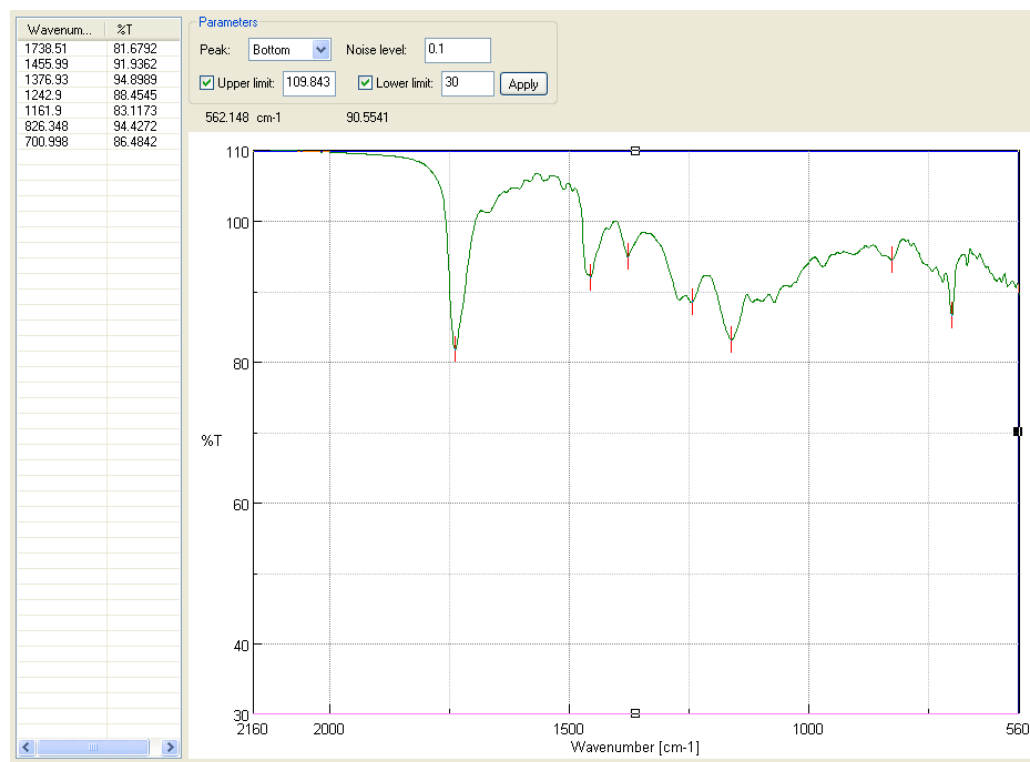
 <p>Fotografía 29-2: Cromatografía de las fracciones N. 1-5</p>	 <p>Fotografía 30-2: Cromatografía de las fracciones N. 1, 2, 3 y 6</p>
<p>Solvente: Acetato de etilo</p>	<p>Solvente: Acetato de etilo, Metanol 6:0,2</p>
<p>Revelador: Sulfato de Cerio</p>	<p>Revelador: Sulfato de Cerio</p>
<p>Rf: f 5: 0,87</p>	

Elaborado por: Mayra Ocaña (2016)

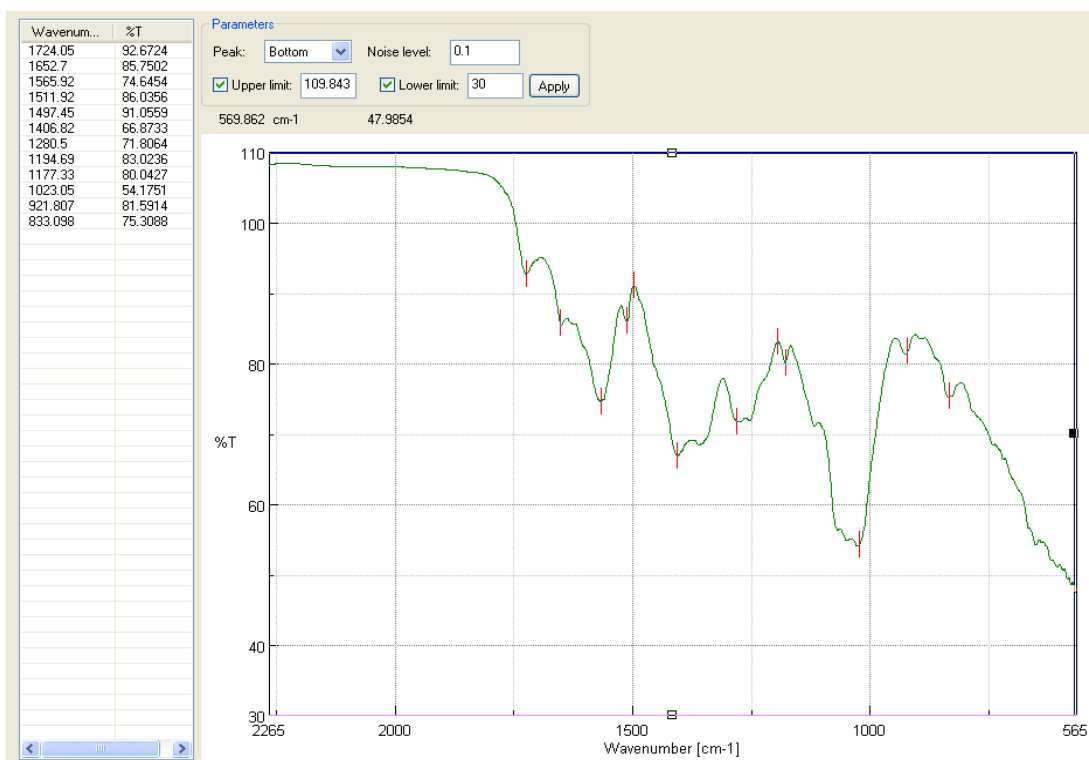
3. C: 7 – f: 2 MeOH



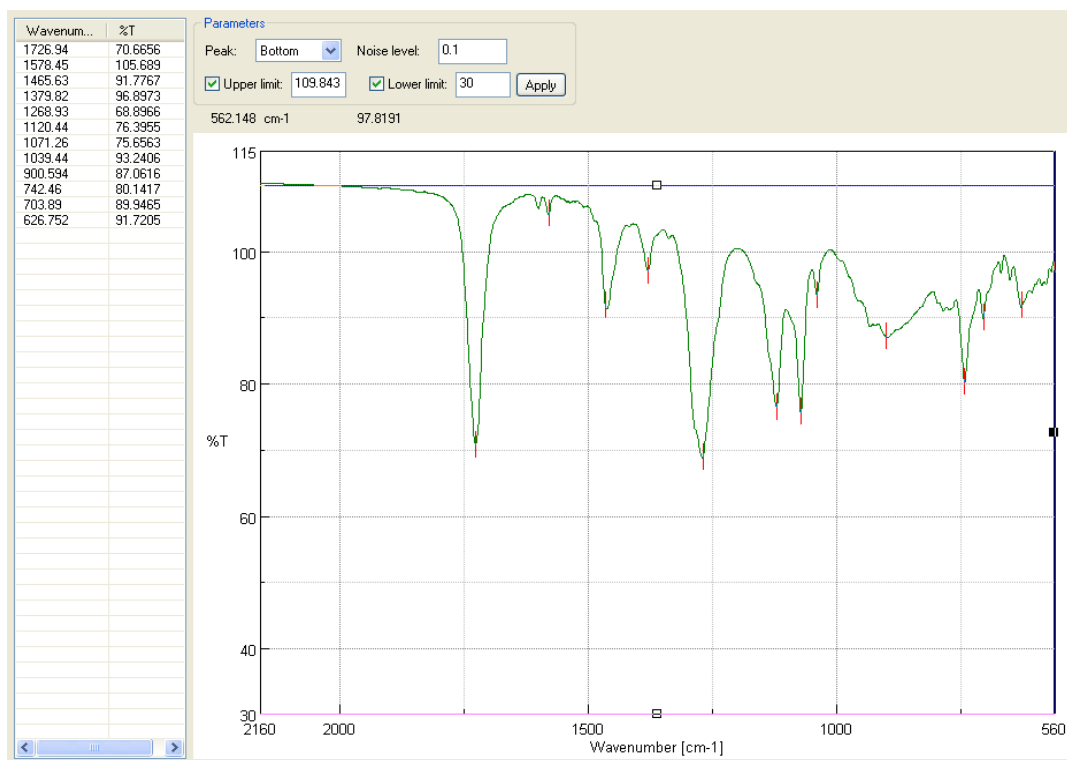
4. C: 7 – f: 1, 2; C: 9 – f: 6



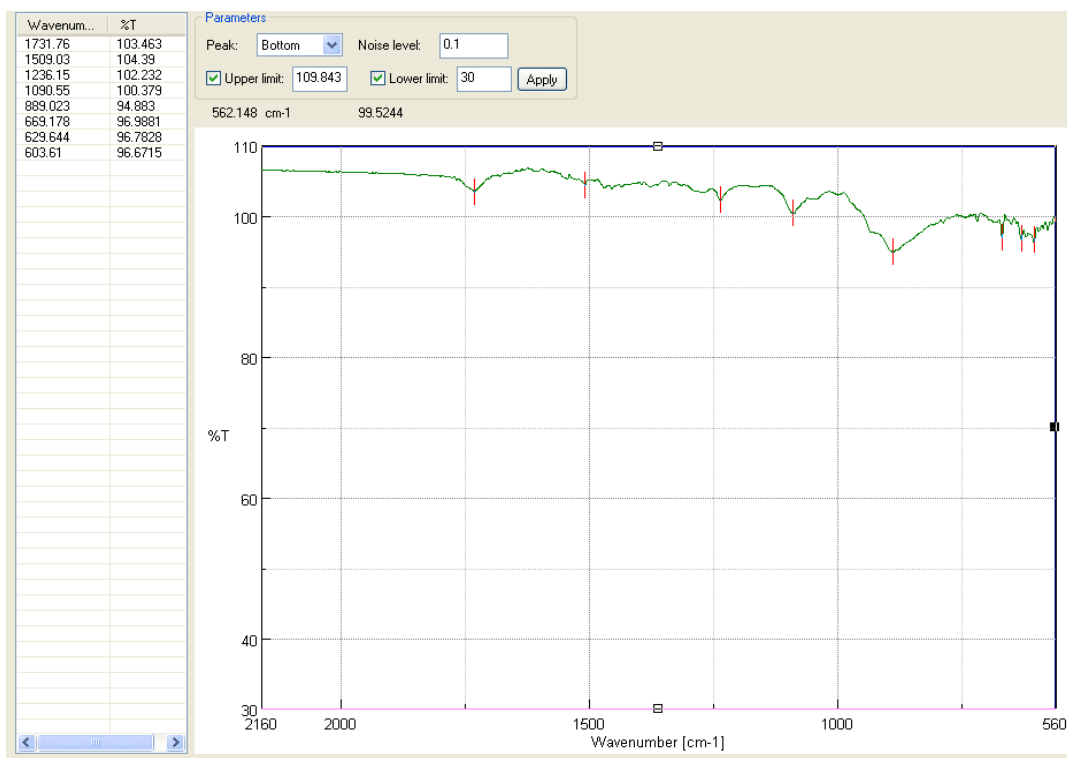
5. C: 7 – f: 4; C: 10 – f: 2 MeOH



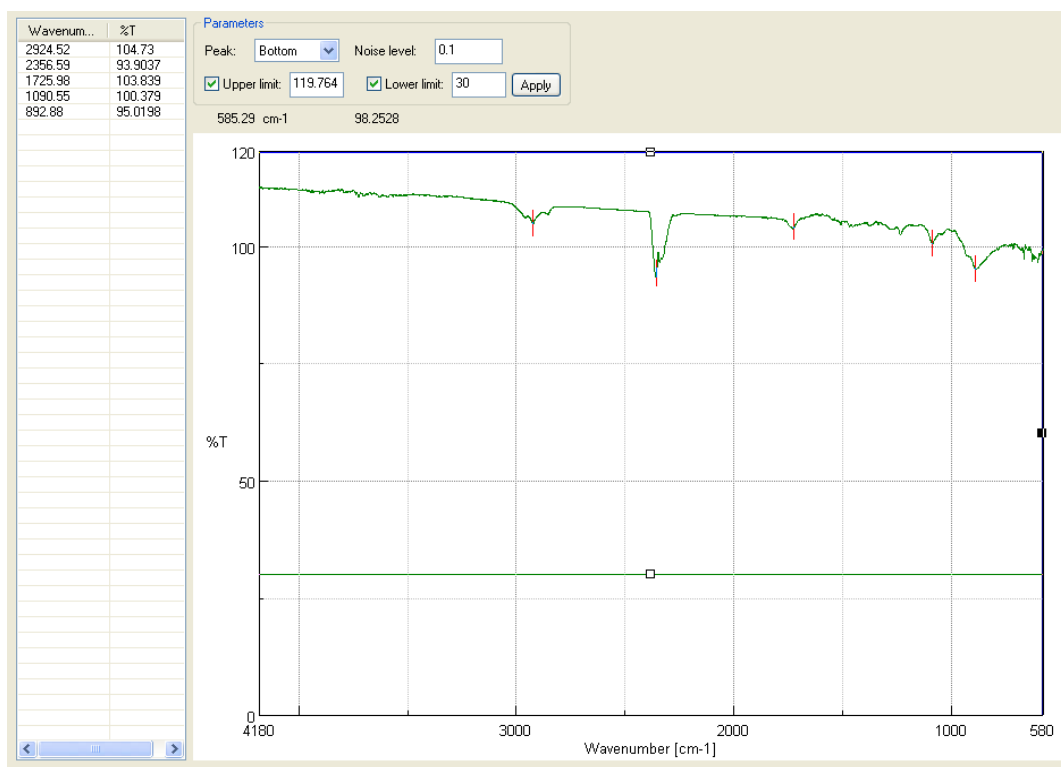
6. C: 7 – f: 4; C: 8 – f: 4 BuOH



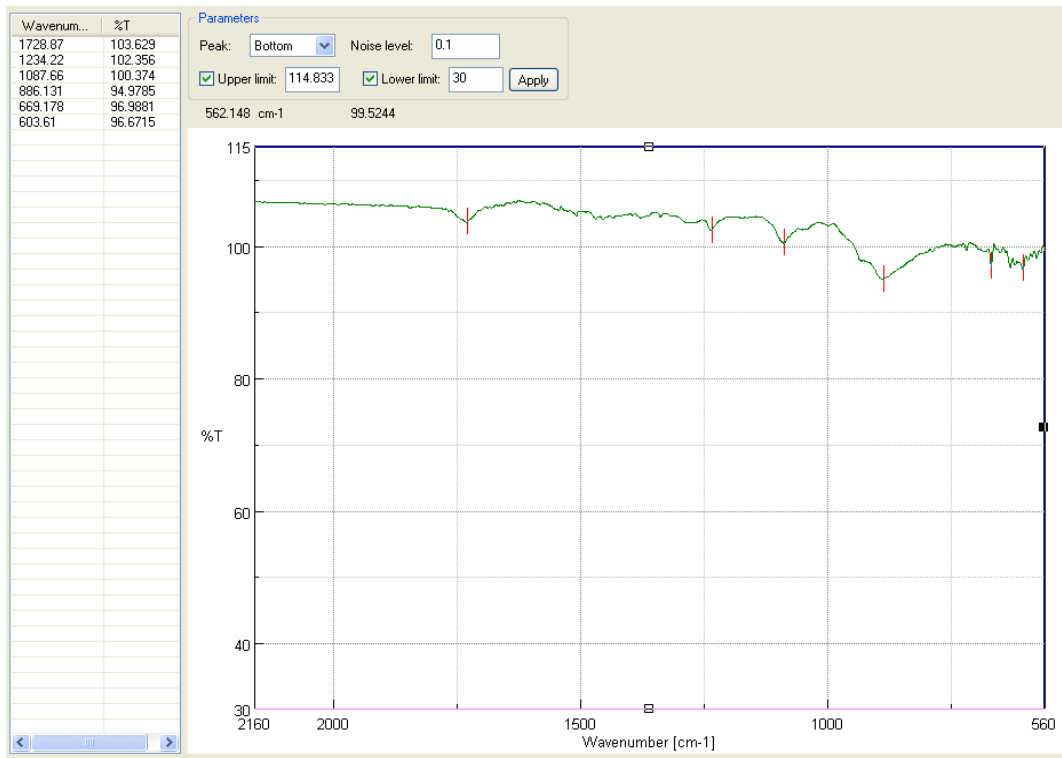
7. C: 7 – f: 1, 2; C: 9-f: 5 CL3CH



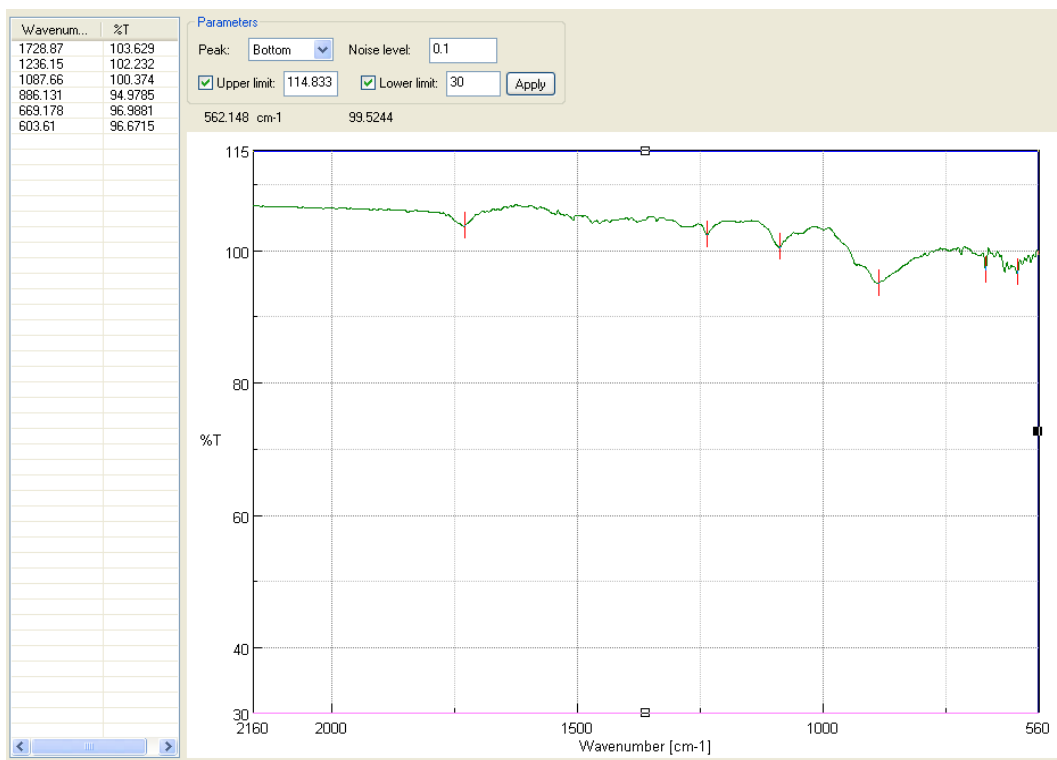
8. C: 7 – f: 8; C: 11 – f: 2 BuOH



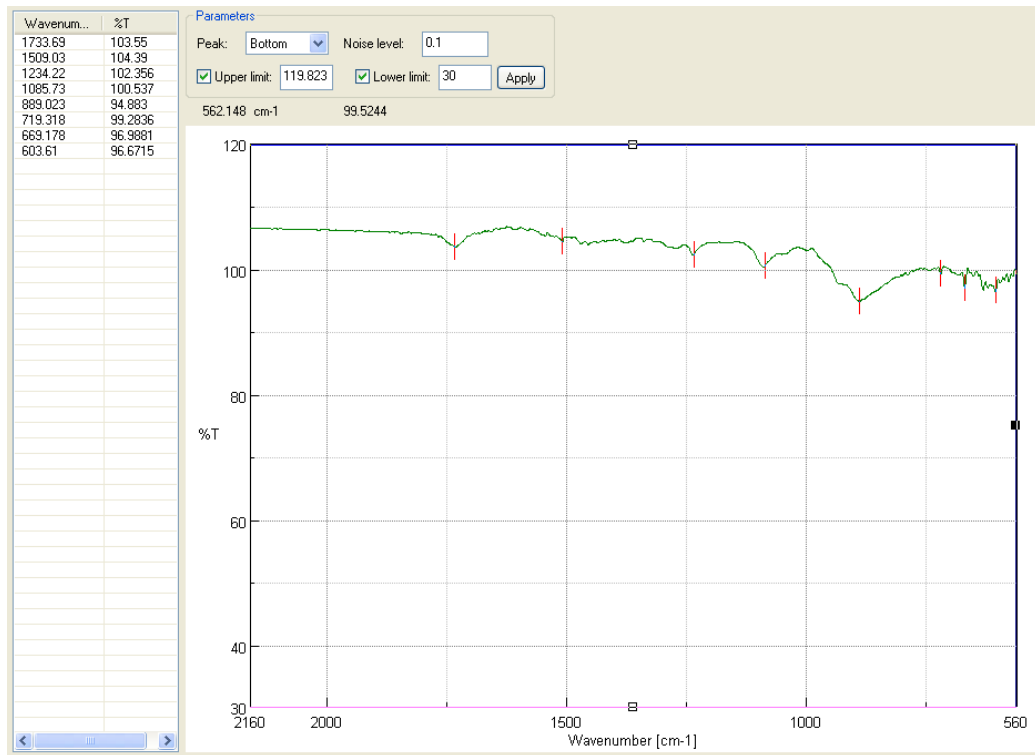
9. C: 7- f: 1; Sub. BuOH



10. C: 8 – f: 2; C: 11 – f: 7 CL3CH



11. C: 7 – f: 1, 2; C: 9 – f: 3 CL2CH



12. C: 7 – f: 4; C: 10 – f: 1 CL3CH

