



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

**“EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BUFADIENÓLIDOS EN LA
PLANTA HOJA DEL AIRE (*Bryophyllum pinnatum*)”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: DIEGO MARCELO RAMOS JARAMILLO
TUTORA: BqF. CECILIA TOAQUIZA

Riobamba – Ecuador

2017

©2017, DIEGO MARCELO RAMOS JARAMILLO

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el derecho de autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BUFADIENÓLIDOS EN LA PLANTA HOJA DEL AIRE (*Bryophyllum pinnatum*)” de responsabilidad del joven egresado Diego Marcelo Ramos Jaramillo, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

| | FIRMA | FECHA |
|--|--------------|--------------|
| BqF. Cecilia Toaquiza DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN | _____ | _____ |
| Dr. Carlos Espinoza MIEMBRO DEL TRIBUNAL | _____ | _____ |
| Dra. Susana Abdo MIEMBRO DEL TRIBUNAL | _____ | _____ |
| DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH | _____ | _____ |

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Diego Marcelo Ramos Jaramillo, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 15 de Marzo del 2017

DIEGO MARCELO RAMOS JARAMILLO
180375462-9

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis padres, hermanos que desde un inicio de la carrera con sus palabras y consejos hicieron posible conseguir un logro mas en mi vida.

Diego Ramos

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, por ser el lugar en el cual me forme académicamente durante todos estos años.

De la misma manera mi más sincero agradecimiento a la BqF. Cecilia Toaquiza y al Dr. Carlos Espinoza que durante la carrera transmitieron sus conocimientos y valioso apoyo en el asesoramiento de este trabajo de titulación.

A mi familia y a todas las personas que me brindaron su apoyo durante mi carrera académica.

Diego

INDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|----------------------------|
| % | Porcentaje |
| mg | Miligramos |
| gr | Gramos |
| Kg | Kilogramo |
| Sol. | Solución |
| Fig | Figura |
| pH | Potencial de Hidrogeno |
| °T | Temperatura |
| EtOH | Etanol |
| MeOH | Metanol |
| H ₂ SO ₄ | Ácido Sulfúrico |
| U.V | Ultravioleta |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| I.R | Infrarrojo |
| mL | Mililitro |
| °C | Grados Celsius |
| Rf | Factor de Retención |
| v/v | Relación volumen/volumen |

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|----------------------------------|-----|
| CERTIFICACIÓN..... | ii |
| DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD..... | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTO | v |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS..... | vi |
| TABLA DE CONTENIDO..... | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | ix |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | x |
| RESUMEN..... | xi |
| SUMARY | xii |

| | |
|--------------------|---|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
|--------------------|---|

CAPITULO I

| | |
|---|----|
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 3 |
| 1.1 Plantas medicinales..... | 3 |
| 1.1.1 <i>Planta del aire (Bryopyllum pinnatum)</i> | 4 |
| 1.1.1.1 <i>Clasificación Botánica</i> | 5 |
| 1.1.1.2 <i>Uso Tradicional</i> | 5 |
| 1.1.1.3 <i>Composición Química</i> | 7 |
| 1.1.1.4 <i>Bufadienólidos</i> | 7 |
| 1.2 Extractos Vegetales..... | 10 |
| 1.3 Métodos de Identificación | 10 |
| 1.3.1 <i>Tamizaje Fitoquímico</i> | 10 |
| 1.3.2 <i>Características Organolépticas</i> | 11 |
| 1.3.3 <i>Propiedades Físico Químicas de los vegetales</i> | 12 |
| 1.3.4 <i>Cromatografía</i> | 12 |
| 1.3.4.1 <i>Tipos de Cromatografía</i> | 13 |
| 1.3.4.2 <i>Cromatografía en Capa Fina</i> | 13 |
| 1.3.5 <i>Espectroscopía Infrarroja</i> | 15 |
| 1.3.6 <i>Espectrometría de Masas</i> | 16 |

CAPITULO II

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2 | MARCO METODOLÓGICO | 18 |
| 2.1 | Materiales, Equipos y Reactivos..... | 18 |
| 2.2 | Preparación de los extractos de la planta hoja del aire (bryopyllum pinnatum)..... | 19 |
| 2.3 | Evaluación de las propiedades físicas y químicas del extracto botánico | 20 |
| 2.4 | Tamizaje Fitoquímico..... | 21 |
| 2.5 | Análisis Cromatográfico Preliminar | 22 |
| 2.6 | Cromatografía en Capa Fina | 23 |
| 2.7 | Espectroscopia IR..... | 24 |

CAPITULO III

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 25 |
| 3.1 | Tamizaje Fitoquímico..... | 25 |
| 3.2 | Cromatografía en Capa Fina | 27 |
| 3.3 | Espectro Infrarrojo | 29 |
| | CONCLUSIONES..... | 31 |
| | RECOMENDACIONES..... | 32 |

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 1-1 | <i>Bryopyllum pinnatum</i> | 4 |
| Figura 2-1 | Clasificación de los bufadienólidos | 8 |
| Figura 3-1 | Estructura de los Bufadienólidos | 9 |
| Figura 4-3 | Espectro infrarrojo de un glicósidos cardiotónico | 29 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Tabla 1-2 | Materiales, Equipos y Reactivos..... | 18 |
| Tabla 2-2 | Sistema de solventes utilizados en la cromatografía de capa fina..... | 23 |
| Tabla 3-3 | Tamizaje Fitoquímico preliminar del extracto metanólico de la planta hoja del aire (<i>Bryopyllum pinnatum</i>)..... | 25 |
| Tabla 4-3 | Parámetros organolépticos del extracto metanólico de la planta hoja del aire (<i>Bryopyllum pinnatum</i>)..... | 26 |
| Tabla 5-3 | Parámetros físicos-químicos del extracto metanólico de la planta hoja del aire (<i>Bryopyllum pinnatum</i>)..... | 27 |
| Tabla 6-3 | Sistema de solventes utilizado en la cromatografía con resultados negativos..... | 27 |
| Tabla 7-3 | Sistema de solvente Tolueno/Metanol..... | 28 |

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue la extracción e identificación de bufadienólidos en la planta hoja del aire (*Bryopyllum pinnatum*), el estudio se realizó en el laboratorio de productos naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, la materia vegetal fue recolectada en la parroquia Zumba de la provincia de Zamora Chinchipe e identificada en el herbario de la ESPOCH, se obtuvieron tres tipos de extractos, metanólico, etanólico y acuoso a partir de 1 Kg de materia vegetal seca por maceración, se concentró por medio de un equipo de rotavapor hasta eliminación del solvente, consiguiéndose tres muestras de consistencia líquida en las cuales se realizó un tamizaje fitoquímico; se eligió al extracto metanólico para los análisis organolépticos, físicos químicos, cromatográfico preliminar, cromatografía en capa fina (CCF), y análisis en espectroscopia infrarrojo (IR). Los resultados del tamizaje fitoquímico fueron positivos para todos los ensayos. Según el análisis organoléptico fue un líquido de consistencia y de color verde oscuro con olor característico a hierba seca, y una densidad de 0.851 g/mL. La cromatografía en capa fina del extracto metanólico corrida con Tolueno/Metanol (3:1) proporcionó franjas de manchas coloreadas separadas unas de otras debido a que el Tolueno al ser un solvente polar y el metanol apolar ayudan a una fácil elución de la muestra, se utilizó digoxina estándar para evidenciar la franja que contenía los glicósidos cardiotónicos dando un Rf de 0.8, con ayuda del espectro infrarrojo se denotó la presencia de grupos funcionales presentes en los bufadienólidos, pero no se obtuvo un análisis de identificación, debido a que no se contó con el equipo apropiado para dicha prueba, se recomienda la utilización del equipo de espectro de masas para la identificación adecuada de este tipo de compuestos, debido a que por el momento no se cuenta con este instrumento en las instalaciones donde se realizó la investigación.

PALABRAS CLAVE: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <FITOQUÍMICA>, <HOJA DEL AIRE (*Bryopyllum pinnatum*)>, <EXTRACTO METANÓLICO> <CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)>, <ESPECTROSCOPIA INFRARROJA>

SUMMARY

The objective of the reasearch was the extraction and identification of bufadienolide in the plant leaf of the air (*Bryopyllum pinnatum*), the study was realized in the laboratory of natural products of the Polytechnic School of Chimborazo, the vegetal matter was collected in the parish Zumba Chinchipe province and identified in the herbarium of ESPOCH, three types of extracts, methanolic, ethanolic and aqueous, were obtained from 1 Kg of dry plant matter by maceration, it concentrated by means of rotavapor equipment until elimination of the solvent, obtaining three samples of liquid consistency in which a phytochemical screening was carried out; the methanolic extract was chosen for organoleptic, chemical physical, preliminary chromatographic, thin layer chromatography (TLC), and infrared (IR)spectroscopy analysis. Phytochemical screening results were positive for all trials. According to the organoleptic analysis was a liquid of consistency and of dark green color with characteristic smell to dry herb, and a density of 0.851 g/mL. Thin layer chromatography of the methanol extract run with Toluene/Methanol (3:1) provided colored bands separated from each other because Toluene being a polar solvent and methane apolar help to an easy elution of the sample, standard digoxin was used to evidence the fringe containing the cardiotoxic glycosides giving an Rf of 0.8, with the help of the infrared spectrum, the presence of functional groups present in the bufadienolide was denoted, but was not obtained an identification analysis, due to the lack of appropriate equipment for such a test, the use of mass spectrum equipment is recommended for the adequate identification of this type of compounds, because at the moment this instrument is not available in the facilities where the research was carried out.

KEYWORDS: <ENGINEERING TECHNOLOGY AND SCIENCES>, <PHYTOCHEMICAL>, <AIR SHEET LEAF (*Bryopyllum pinnatum*)>, <METHANOLIC EXTRACT>, <FINE COAT CROMATOGRAPHY (CCF)>, <INFRARED SPECTROSCOPY>

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Kalanchoe*, se ha utilizado en forma de infusión a partir de las hojas secas para el tratamiento de distintas dolencias, así también, en forma de comprimidos que tratan diferentes afecciones, acerca de la especie *Bryopyllum pinnatum* no se tiene información del uso en cuanto a la elaboración de fitomedicamentos.

El estudio de plantas en nuestro país no es muy amplio a pesar de tener una gran diversidad de flora, es muy poco lo que se conoce sobre la situación del país con relación al comercio de plantas medicinales y sus productos, así como la importancia de esta actividad y problemática a nivel nacional, regional y global (Buitrón, 1990, p.2).

En Ecuador al igual que en otros países de América la planta hoja del aire (*Bryopyllum pinnatum*) ha tenido múltiples beneficios en cuanto a la medicina ancestral debido a que gran parte de la población la ha utilizado en extracto puro o en infusión para tratar problemas de salud tales como reumatismo, inflamaciones, hipertensión, cólicos y diarreas, enfermedades psicológicas como la esquizofrenia, crisis de pánico y miedos, infecciones, quemaduras o heridas.

La identificación de bufadienólidos en la planta del aire en el Ecuador aún no se ha realizado pero existen estudios en otros países en los cuales se reporta la presencia de estos compuestos en el vegetal. Es por esto la necesidad de poder encontrar nuevas alternativas en el uso de esta planta que tiene compuestos que puedan ser usados en la elaboración de fármacos, además que, por esta razón es imperativo la investigación o estudio de esta especie para que en nuestro país existan alternativas en cuanto a los distintos usos, aplicaciones, y tomando en cuenta la diversidad de flora existen muy pocos estudios a base de nuestras plantas nativas.

En estudios previos se han aislado 15 bufadienólidos de los cuales 8 no han sido reportados previamente en la literatura científica, esto se lo realizó a partir de raíces de *Kalanchoe daigremontiana* utilizando como método de purificación la columna cromatográfica sobre sílica gel C18 de fase inversa y también HPLC (Cromatografía Líquida de alta Resolución), se realizó la elucidación estructural de los compuestos aislados con el uso de la rotación óptica, IR (Espectroscopia Infrarrojo), UV (Espectroscopia ultravioleta), ESI –MS (ionización por electro-spray-espectro de masas) y RMN (Resonancia magnética nuclear) (Moniuszko-Szajwaj et al.

2016). Además, 4 tipo de bufadienólidos fueron aislados a partir de *Bryopyllum daigremontianum* en percolación con etanol, utilizando HPLC en RP-18, para la identificación y pureza de estos metabolitos fueron determinados mediante Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.(Oufir et al. 2015).

Por ello es imperativo que se empiece a realizar investigaciones en las cuales se tenga más alternativas de usos de principios activos que las plantas de cada región nos proporcionen, lo que conlleva a que se pueda mejorar la calidad de vida de la población en cumplimiento del objetivo 3 del Plan Nacional del Buen Vivir.

El desconocimiento acerca del uso adecuado de las plantas, ha dado lugar a la subutilización de principios activos, este estudio permitirá proponer el reconocimiento de bufadienólidos que pudiese contener la planta, contribuyendo con un estudio, el mismo que conlleve a mantener un buen manejo de la misma, evitando así problemas relacionados con el uso inadecuado de la planta.

La presente investigación tiene como objetivo la extracción e identificación de bufadienólidos, a partir de la obtención de los extractos metanólico, etanólico, y acuoso de la planta *Bryopyllum pinnatum*, posteriormente, por medio de un tamizaje fitoquímico se pretende identificar la presencia de metabolitos secundarios, con la cromatografía en capa fina se aspira identificar y aislar glicósidos cardiotónicos grupo químico en los que se encuentran los bufadienólidos, para proporcionar información con alternativas de separación de estos compuestos, lo cual beneficiara a todas las personas que utilizan la misma, este estudio servirá como un punto de partida para que la investigación de esta planta se lo siga realizando debido a que posee diversas propiedades en cuanto a su uso.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Plantas medicinales

Son todos aquellos vegetales que producen sustancias llamadas principios activos, los cuales a su vez desempeñan una determinada acción farmacológica, ya sea beneficiosa o a su vez perjudicial sobre un organismo vivo. Su uso primordial es la utilidad que se le da como droga o medicamento para combatir una enfermedad fija o a su vez restablecer la salud perdida (Fernando 1987, p.).

Se calcula que de las 260.000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10% se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran recogidas dentro de 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 medicinales puede variar sensiblemente de este porcentaje, ya que ni siquiera se conoce la totalidad de la flora.

El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos. Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (como alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, etc.). Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos (azúcar más un compuesto sin azúcar), que pueden ser glucósidos, galactósidos, etc. El primer heterósido que se descubrió fue la salicina. Otros componentes activos de las plantas son alcaloides, lípidos, gomas, mucílagos, principios amargos, taninos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas.

Al no ser consideradas como fármacos, no tienen un control de calidad y de seguridad como éstos. Hoy en día, la Food and Drug Administration (FDA) mantiene los productos a base de plantas y vitaminas como suplementos dietéticos clasificados como alimentos (Voces García et al., 2002: p.50).

Las plantas medicinales y los productos obtenidos a base de estas, han sido utilizados desde la antigüedad en la medicina tradicional y ahora son cada vez más valiosos como materia prima en la preparación de medicamentos modernos, para la industria tanto farmacéutica como herbal, cuyo mercado, igualmente importante, sigue una tendencia hacia un aumento significativo (Buitrón 1990, p.1).

1.1.1. Planta del aire (*Bryopyllum pinnatum*)

Bryopyllum pinnatum (Lamark) Oaken (syn. *Kalanchoe pinnata* (Lamark) Persoon), synonym: *Bryopyllum calycinum* (Salisbury), pertenece a la familia de las *Crassulaceae*, y es conocida por tener varios nombres: planta de la vida, planta del aire, planta del amor, hoja del milagro (Fürer 2014, p.16).

El nombre viene *Bryophyllum* de "Broto 'y' hoja ", la planta, que se clasifica como una mala hierba es notoria por su potencial de crecimiento. Poco después de que una hoja cae al suelo, unas pequeñas plantas se desarrollan a partir del margen de la hoja.

Es una planta ornamental, de aproximadamente 1-1,5 m de altura, hojas suculentas, 10-20 hojas en la planta, Las flores son de 5 cm de largo, de color rojizo púrpura, crecen en climas caliente y húmedo, alrededor de los lugares de residencia, a lo largo de los lados de la carretera, granjas y campos, como se muestra en la Figura 1-1. Son ampliamente utilizados en popular la medicina de su región indígena (Kamboj y Saluja, 2010: p.254).



Figura 1-1. *Bryopyllum pinnatum*

Fuente: BOTANICA ONLINE, SANTERIA PRODUCTOS

La especie *Bryophyllum pinnatum* se conoce desde hace 200 años en Europa y se menciona por primera el tiempo en 1786 en la " Enciclopedia méthodique". El naturalista francés Jean-Baptiste Lamarck (1744-1829) ha llamado la planta analgésico, cicatrización de heridas y refrescante (Wächter et al., 2011: p.74).

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Syn *Bryophyllum pinnatum*; familia de las Crassulaceae) es una planta muy popular utilizado en la medicina tradicional en muchas regiones templadas del mundo y particularmente en América del Sur (El Abdellaoui et al., 2010: p.1329).

1.1.1.1. Clasificación Botánica

Nombres comunes: Hierba bruja, colombiana, prodigiosa, inmortal, flor de aire, hierba de aire y hoja bruja.

Clasificación taxonómica:

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Myrothamnanae Takht.
- Orden: Saxifragales Bercht. & J. Presl.
- Familia: Crassulaceae J. St.-Hil.
- Género: *Kalanchoe* Adans.
- Especie: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Persoon2 (Muñoz, 2014, p.3).

1.1.1.2. Uso Tradicional

Tradicionalmente, las hojas de esta planta se han utilizado para el tratamiento de dolencias y heridas, es hemostático entre las propiedades curativas tenemos antibióticas, antifúngicas, antiúlcera, antiinflamatorio, analgésico, antihipertensivo, potente anti- histamina y la actividad anti-

alérgica, trastornos de la piel, etc. Poseen actividades farmacológicas tales como inmunomodulador, depresor del Sistema Nervio Central, protector gastrointestinal, antiviral, insecticida, relajante muscular y sedante (Kamboj y Saluja, 2013: p.2).

Sus usos en la medicina popular han sido tan diversas como sus nombres y aplicaciones incluidas como un agente antimicrobiano, antifúngicos, antiprotozoarios, antiulceroso, antiinflamatorio, analgésico, sedante, relajante muscular, antihipertensivo y antialérgico (Schuler et al., 2012: p.948).

En Nigeria y en otros países de África Occidental , las hojas carnosas son con frecuencia utilizado como un remedio herbal para una variedad de trastornos humanos, incluyendo: hipertensión, diabetes mellitus, contusiones, heridas, forúnculos, abscesos, picaduras de insectos, artritis, reumatismo, dolores, dolores de cabeza, dolores en el cuerpo y las articulaciones (Cabrera et al., 2011: p.52).

No conviene usar la planta de forma continuada por largos periodos de tiempo debido a cierta acción inmunosupresora. Su composición incluye compuestos como los bufadienólidos que son glucósidos cardíacos, por lo que en pacientes afectados por cardiopatías hay que consultar con el médico.

La investigación clínica efectuada sobre las kalanchoe indica que puede haber toxicidad si se abusa de la planta y señala que hasta dosis de 5 gramos de planta por kilo de peso no hay toxicidad (esto equivale a unos 350 gramos de hoja para una persona de 70 kilos, que es una dosis de cuatro a siete veces superior a la aconsejada).Es muy importante la actitud mental del enfermo a la hora de hacer el tratamiento, cada cual según su aptitud pero siempre deberíamos hacernos conscientes de que estamos utilizando un ser vivo, que tiene una parte física pero también una energía sutil que no vemos.

B. pinnatum es utilizado en etnomedicina para el tratamiento de dolor de oído, quemaduras, abscesos, úlceras, picaduras de insectos, diarrea y litiasis (Chopra et al, 1956; Agoha, 1974; Ofokansi et al., 2005 citados en Okwu y Josiah 2006).

1.1.1.3. *Composición Química*

Entre los componentes activos presentes en esta planta se encuentran fenoles, flavonoides y ácidos como: fumárico, acético, isocítrico, málico, cítrico, láctico, oxálico y succínico. Presenta un alto contenido de calcio y cloro. Contiene además *b*-sitosterol, mucílago, briofilina, polisacáridos, taninos, y minerales como aluminio, hierro, magnesio, manganeso, cobre y silicio (Cabrera et al., 2011: p.52).

Muestra la presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos, carotenoides, glucósidos, sitosterol, antocianinas, ácido málico, quininas, tocoferol, las lectinas, cumarinas y bufadienólidos (Afzal et al., 2012: p.853).

Posee un número de compuestos activos, incluyendo alcaloides, triterpenos, lípidos, flavonoides, glucósidos, bufadienólidos, fenoles y ácidos orgánicos que ya han sido aisladas a partir de la planta (Afzal et al., 2012: p.144).

Los flavonoides, polifenoles, y triterpenoides han sido identificados a partir de las hojas de *B. pinnatum* (Ojewole, 2005). Quecetin - 3 - α -L- rhu - β - D - Xil; un flavonoide (Cao et al., 2005), Bryophyllin B, un potente citotóxico como bufadienólidos (Yamagishi et al., 1989) y ácido málico (Sutton et al., 1972) fueron aisladas de las hojas de *B. pinnatum* (Mudi, S.Y y Ibrahim 2008: p.43).

La planta es rica tanto en macro y micro elementos, vitaminas, calcio, fósforo, ácido ascórbico, inulina (Okwu y Josiah, 2006) y otros compuestos como saponina, flavonoides, antraquinonas, xantonas, bryophyllin A y B (Iwu, 1993) (Cam et al., 2007: p.339).

1.1.1.4. *Bufadienólidos*

Los glicósidos cardiotónicos comprenden una gran familia de compuestos derivados de la naturaleza que muestran una diversidad química-estructural considerable, comparten la característica de tener un núcleo esteroidal con un anillo de lactona insaturada en la posición 17 y una porción de azúcar para la posición 3.

Se ha demostrado que la lactona con el esteroide son las partes que generan un efecto biológico y por lo tanto reciben el nombre de farmacóforo. La naturaleza del resto de lactonas se encarga de

caracterizar el subgrupo de glicósidos en cardenólidos o bufadienólidos (o bufanólidos). (Ilboudo et al., 2016)

La eficacia de estas sustancias ya era conocida por los antiguos egipcios, que utilizaban la cebolla albarrana, los bufadienólidos que estaban contenidos en las plantas eran utilizados en el tratamiento de enfermedades del corazón. Scillaren A uno de los principales glucósidos de esta fuente, fue el primer bufadienólido (Krenn y Kopp, 1998: p.1).

Los bufadienólidos se clasifican como se muestra a continuación en la Figura 2-1.

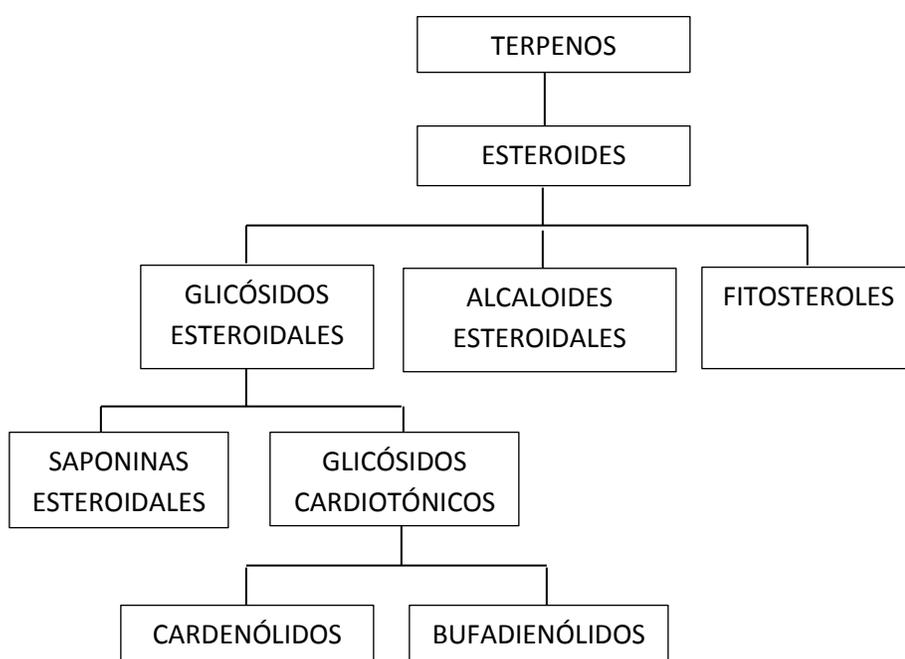


Figura 2-1 Clasificación de los bufadienólidos

Realizado por: Ramos, Diego. 2017

Los terpenos tienen una estructura general C_nH_{2n-4} , con dobles enlaces los mismos que están formados por cadenas orgánicas, que forman compuestos con particularidad, a su vez determinan los distintos efectos medicinales en las plantas que poseen este tipo de compuestos.

Los esteroides son compuestos que están formados por 17 átomos de carbonos unidos entre sí, a su vez dicha estructura puede verse alterada cuando se adicionan diferentes grupos funcionales o también cadenas hidrocarbonadas.

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias que en sus estructura presentan un grupo esteroideo, una parte glicosídica, un anillo gama-lactona o delta-lactona, este tipo de sustancias se utilizan como medicamento para tratar problemas del corazón.

Los Bufadienólidos son de C-24, esteroides que tienen un anillo 2- pirona vinculado en C- 17 (β - orientado) y una fusión *cis* tanto para el anillo A / B y el anillo C / D de las uniones, y una fusión *trans* por la unión A / B . Por lo general, se caracterizan por la presencia de un grupo hidroxilo 14 - β (Perera Córdova et al., 2016: p.4).

Son esteroides C-24; su rasgo estructural característico es un anillo de seis miembros lactona doblemente insaturados con un grupo 2- pirona unido en la posición C- 17 β del núcleo perhydrophenanthrene (Rathour y Kaur, 2013: p.20).

Estructura homogénea, consta de una genina esteroídica de tipo cardenólido (en C23) o bufadienólido (en C24) y una parte osídica, generalmente oligosídica (Bruneton, 2001, p.723), como se muestra en la Figura 3-1.

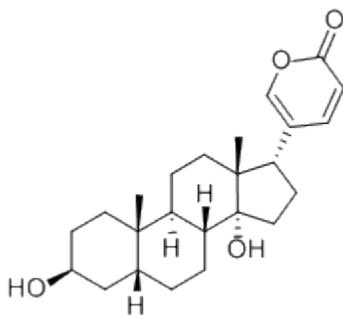


Figura 3-1 Estructura de los Bufadienólidos
Fuente: Chemical Book

Se sabe que tienen las siguientes actividades biológicas: inotrópico positivo, y efecto sobre el sistema nervioso central, anestésicos locales, sedante, y citotóxica. La actividad citotóxica de una serie de bufadienólidos de origen natural se ha estudiado a través de la determinación de su actividad antitumoral hacia varias líneas de células, incluyendo las células KB, carcinoma de pulmón humano A- 549, carcinoma de próstata y la línea celular de tumor gástrico (Moniuszko-Szajwaj et al., 2016: p. 1).

Muestran también un uso citotóxico / antiproliferativo, actividades contra hematopoyésis humana, páncreas, nasofarynx, pulmón, próstata, colon, mama, hígado, gástrico, melanoma, y las células de

cáncer renal. Actúan como anestésico, antiviral contra VIH, antibacteriano también antiparasitario e insecticida (Cunha-Filho et al., 2010 p.340).

1.2. Extractos Vegetales

Los extractos vegetales son aquellos que de una u otra manera permiten utilizar las sustancias activas presentes en cada una de las partes del vegetal, por medio de procesos físicos tales como la destilación, percolación, filtración, precipitación, molienda, etc., con ayuda de un solvente el mismo que puede ser agua, alcohol, aceites, solventes orgánicos etc.

Los principales inconvenientes de un extracto son:

- Los principios activos pueden ser diferentes compuestos, con estructuras químicas casi idénticas.
- El extracto puede tener una actividad mayor que el principio activo aislado y purificado.
- La matriz del extracto puede tener efectos técnicos inesperados: mayor estabilidad, mayor actividad, mayor tolerancia.

Según la OMS el 25% de los fármacos comercializados actualmente son de origen vegetal y un 25% contiene principios vegetales modificados químicamente (Zapata, 2002, p.3).

1.3. Métodos de Identificación

1.3.1. Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico es la etapa inicial en lo referente a la fitoquímica, la misma que permite precisar de una manera cualitativa los principales grupos químicos que se encuentran presentes en una determinada planta, y que consiste en aplicar distintos reactivos que den coloración, este tipo de prueba constituye una orientación para esclarecer el tipo de grupo químico presente. (N. Sharapin, 2000)

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico

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 fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

Entre las principales tenemos:

Ensayo de Liberman

Para determinar la presencia de triterpenos y esteroides, se realiza a través de la prueba de Liebermann - Burchard, ya que ambos tipos de compuestos tienen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Ensayo de Baljet

Este ensayo, posibilita reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en especial a las cumarinas, aunque también otros compuestos láctonicos pueden dar positivo esta prueba. En estas condiciones se considera la presencia de este tipo de compuestos por la presencia de un precipitado y también de una coloración (Trichilia et al., 2009: p. 196).

Ensayo de Molish

Reacción de furfural e hidroximetil-furfural con α -naftol, da lugar a derivados que presentan una coloración que tiende a púrpura. Es una prueba común para azúcares (Díaz et al., 2011: p. 2).

1.3.2. Características Organolépticas

Aquellas características que una persona puede distinguir utilizando cada uno de los sentidos sensoriales (oído, vista, gusto, tacto, olfato), son denominadas características organolépticas, y se puede aplicar a distintos productos que necesiten un ensayo o prueba.

1.3.3. Propiedades Físico Químicas de los vegetales

Son los distintos ensayos que se realizan sobre una muestra pulverizada o un extracto vegetal, son pruebas ya sean cualitativas (para reconocer sustancias) o cuantitativas (para conocer su concentración en la que se encuentran), que permiten identificar la composición de distintas sustancias presentes, principios activos, etc. (Universidad Politecnica de Madrid, 2014, p.114)

1.3.4. Cromatografía

La cromatografía es esencialmente un medio físico de separación de compuestos presentes en una muestra y se distribuyen entre 2 fases, una inerte que viene a ser la fase estacionaria, y otra móvil la misma que fluye a través de la primera (Tobergte y Curtis, 2013: p. 3).

La palabra cromatografía significa gráfica de colores y fue diseñada por Michael Tswett en el 1903. Tswett llevó a cabo una extracción de una mezcla de pigmentos de hojas verdes y luego pasó éste extracto a través de un tubo de vidrio empacado con carbonato de calcio; de esta forma logró separar los pigmentos presentes en las hojas.

Actualmente cromatografía es el nombre que se le da a un grupo de técnicas utilizadas en la determinación de la identidad de sustancias, en la separación de componentes de las mezclas y en la purificación de compuestos. Esta técnica es muy efectiva y por lo tanto se utiliza tanto a nivel de investigación como a nivel industrial.

Este método puede variar de técnica en técnica, pero siempre se basa en el mismo principio: Todos los sistemas de cromatografía contienen una fase estacionaria y una fase móvil.

En una cromatografía tenemos:

Retención. Este es el efecto que se produce sobre los componentes de la fase estacionaria, la misma que puede ser un líquido o su a su vez un sólido unido a un soporte sólido.

Desplazamiento. Es el efecto que actúa sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, el mismo puede ser un gas o un líquido.

El fenómeno de corrido en los que intervienen los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, arrastrados por la fase móvil, tiene el nombre de elución (Abbott et al., 1973: p.1).

La rapidez con que viaja una sustancia a través de un sistema de cromatografía depende directamente de la interacción relativa entre las sustancias y las fases móvil y estacionaria. En el caso de una mezcla, si cada componente interacciona diferente con la fase móvil y la fase estacionaria, cada uno de ellos se moverá diferente.

1.3.4.1. Tipos de Cromatografía

Por la naturaleza de sus fases

Atendiendo al proceso químico-físico que va a protagonizar el proceso de separación:

Con base en la naturaleza del soporte en el que se aloja la fase estacionaria:

Cromatografía plana: Cromatografía en papel, Cromatografía en capa fina (TLC)

Cromatografía en columna: Cromatografía de gases (GC), Cromatografía líquida (LC)

(cromatografía líquido – líquido, cromatografía sólido – líquido)(Tsvet, 1903, p.1).

1.3.4.2. Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía en capa fina (CCF) por sus siglas en inglés (TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla. Permite determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras, realizar el seguimiento de una reacción (Marlina et al., 2013: p.1).

En la cromatografía en capa fina, se utiliza una placa recubierta con el adsorbente (*fase estacionaria*) en forma de una capa delgada, de espesor constante, adherida sobre un soporte rígido, que puede ser una placa de vidrio, aluminio o poliéster. Hay adsorbentes que contienen un indicador de fluorescencia para facilitar la identificación de muestras. Si no se usa indicador y los componentes no son coloridos, se requerirán otras técnicas de revelado.

El eluyente (*fase móvil*) ascenderá por capilaridad por la placa y arrastrará los componentes en forma diferenciada a lo largo de ésta, produciendo “manchas” de los componentes. El grado de elución de las sustancias dependerá tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado.

En la cromatografía en capa fina se suele utilizar el gel de sílice, también conocido como Silicagel, es un producto absorbente que puede diferenciar la adsorción de diferentes moléculas, actuando como un adsorbente selectivo en procesos de cromatografía, tanto en columna como en placa fina.

El gel de sílice está catalogado como el de mayor capacidad de absorción de los que se conocen actualmente, y bajo diferentes métodos de fabricación, se pueden conseguir diferentes tipos de gel de sílice con diversas estructuras de poro, pudiendo llegar a absorber hasta un 40% de su propio peso en agua, por lo que es usado también para reducir la humedad en espacios cerrados.

La CCF presenta una serie de ventajas al compararla con cromatografías alternas, como en el caso de la cromatografía en papel, como las siguientes:

- Una mayor resolución, obteniéndose por lo general manchas más pequeñas y mejor separadas unas de las otras.
- Una mayor velocidad de separación y elución.
- Pueden utilizarse diversos materiales como soportes y solventes orgánicos.
- Los compuestos pueden ser fácilmente visibles y detectados, la recuperación es muy sencilla (Novo et al., 2010: p.4).

La relación que hay entre las distancias recorridas por el eluyente (fase móvil) y el soluto desde el punto de aplicación de la muestra en la placa se conoce como R_f , y tiene un valor constante para cada uno de los compuestos presentes.

Para calcular el R_f de un compuesto presente en una muestra se aplica la siguiente expresión:

R_f = distancia recorrida por la muestra (compuesto) / distancia recorrida por el eluyente (fase móvil)(Marlina et al., 2013: p.2).

1.3.5. Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopia vibracional fue una de las primeras técnicas espectroscópicas que encontró un uso extendido, en particular la espectroscopia de absorción infrarroja (IR) que recibe su nombre de la región del espectro electromagnético implicada. La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre $12800-10\text{ cm}^{-1}$.

Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): $12800-4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000-400\text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400-10\text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales (Serrano, 2009, p.2).

Prácticamente todos los compuestos moleculares pueden manifestar una serie de bandas de absorción (eficacia en espectroscopia).

Cada banda corresponde con un movimiento de vibración de un enlace en concreto dentro de la molécula: el conjunto constituye la huella dactilar del compuesto. La eficacia de la espectroscopia de infrarrojo se basa en que cada compuesto tiene un comportamiento único frente a un haz de infrarrojos. (Master, 2012, p.2)

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

1. 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.
2. Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia.
3. Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos.
4. A partir de los espectros se pueden inferir las estructuras moleculares. Para ello se requiere un modelo en el cual basar los cálculos.

5. 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.
6. 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.
7. El tiempo necesario para obtener y almacenar un espectro infrarrojo es del orden de minutos.

1.3.6. Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas se utiliza para la determinación de estructuras orgánicas basándose en una técnica de estudio cualitativo, puede ser utilizada acoplándola a otro tipo de espectrofotometría o a su vez por si sola.

Está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, se separan de acuerdo a su masa, su carga y al final se detectan utilizando un dispositivo adecuado.

Es una técnica micro analítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas.

En la Espectrometría de masas la muestra es ionizada (y por tanto destruida) usando diversos procedimientos para ello. De todos ellos el más usual y/o utilizado es la técnica denominada de Impacto Electrónico consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad. Mediante este proceso, la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (moléculas o fragmentos cargados) son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y conducido a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos.

Cada compuesto es único, y cada uno de los compuestos se ionizará y fragmentará de una determinada manera, y en este principio se basa la espectrometría de masas para identificar cada analito

Con la espectrometría de masas somos capaces de proporcionar información acerca de la:

- Composición elemental de las muestras: de esta se encarga la espectrometría de masas atómico.
- Composición de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas.
- Composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas.
- Estructura y composición de superficies sólidas.
- Relaciones isotópicas de átomos en las muestras.

La espectrometría de masas puede brindar una gran cantidad de información en consecuencia con los diferentes compuestos determinados (Fleurence et al., 1999: pp.2-3).

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Materiales, Equipos y Reactivos

Para la extracción e identificación de bufadienólidos en la planta hoja del aire se tomó en consideración los siguientes equipos, materiales y reactivos como se indican en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2 Materiales, Equipos y Reactivos

| EQUIPOS | MATERIALES | REACTIVOS |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Balanza analítica | Vasos de precipitación (100, | Etanol |
| Estufa con circulación de aire | 250, 500 mL) | Metanol |
| Equipo de destilación | Balón esmerilado de 1000 mL | Reactivo de Molish |
| Refractómetro | Pipetas (5,10, 25, 50, 100 mL) | Reactivo de Baljet |
| pHmetro | Probeta 50 mL | Reactivo de Kedde |
| Reverbero | Refrigerante | Tolueno |
| Sorbona | Reverbero | Acetato de etilo |
| Cámara de teléfono celular | Mangueras | Hexano |
| Rotavapor | Pinzas universales | Cloroformo |
| | Pera de succión | Ácido sulfúrico-vainillina |
| | Tubos de ensayo | |
| | Capilares | |
| | Piseta | |
| | Papel aluminio | |
| | Cuba de vidrio | |
| | Placas cromatográficas | |
| | Frascos de vidrio ámbar | |
| | Guantes descartables | |

Realizado por: Ramos, Diego. 2017

Para la elaboración de los extractos etanólico, metanólico y acuoso se recolectó alrededor de 1 Kg de hojas de la planta *Bryopyllum pinnatum* en la parroquia Zumba de la Provincia de Zamora Chinchipe, en Abril 2016, el lavado de las mismas se realizó con hipoclorito de sodio al 0.5% para la eliminación de bacterias, hongos e impurezas que puedan alterar el secado normal, posteriormente se llevó a enjuague hasta eliminación del cloro.

Se secaron las hojas al ambiente por 1 día, luego se colocó en la estufa de circulación de aire para el secado correspondiente a una temperatura de 50°C durante 3 días. Luego se prepara los extractos como se detalla a continuación.

2.2. Preparación de los extractos de la planta hoja del aire (*Bryopyllum pinnatum*)

Una vez que se secó el material vegetal, se trituraron las hojas en pedazos pequeños y se añadió metanol, etanol al 96% y agua hasta que el mismo cubra las hojas (250mL) de cada disolvente, se dejaron macerar en un recipiente de vidrio por 72 horas en un sitio oscuro, para la obtención de los macerados etanólico, metanólico y acuoso.

Proceso de destilación: Es un proceso que permite la separación de componentes de una muestra tomando en consideración el punto de ebullición y la presión de vapor. Se coloca el macerado etanólico y acuoso de la planta junto a pequeños pedazos de piedrecillas y vidrios que sirven como puntos de ebullición en un balón esmerilado de 1000mL, por proceso de destilación aproximadamente unas 2 horas se obtiene el concentrado del mismo por la eliminación del etanol y el agua.

El concentrado se llevó a refrigeración para la precipitación de las clorofilas por el tiempo de 24 horas. Se filtra la muestra en papel filtro para la eliminación total de estas, y se conserva a temperatura ambiente de 18 a 20°C.

Proceso de obtención del extracto por rotavapor: El rotavapor es un equipo destinado a evaporar solventes acuosos y solventes orgánicos en muestras maceradas. Se coloca en un balón esmerilado de 500 mL el extracto metanólico y a una temperatura de 60°C se procede a la eliminación del solvente durante 15 minutos.

Dicho concentrado se llevó a refrigeración durante 24 horas para la eliminación de clorofilas, posteriormente se procede al filtrado en papel filtro, se obtuvo el concentrado metanólico, y se conserva a temperatura ambiente entre 18 y 20°C.

2.3. Evaluación de las propiedades físicas y químicas del extracto botánico

Para la evaluación de las propiedades físicas y químicas del extracto botánico se consideró las siguientes pruebas.

Determinación de los Requisitos Organolépticos

Se toma en cuenta los siguientes requerimientos los cuales indiquen determinadas cualidades en el extracto, entre estos tenemos:

Aspecto: Se coloca una cantidad representativa en un tubo de ensayo la misma que permita visualizar a contra luz la presencia ya sea de turbidez o de algún determinado precipitado.

Color: Se coloca una cantidad de muestra en un tubo de ensayo y a contra luz se observa tanto el color y la transparencia que presenta el extracto.

Olor: Se utiliza un pedazo de papel filtro el mismo que se introduce en el extracto a analizar, se deja secar por un minuto y se percibe el olor que se encuentra en el papel.

Sabor: Se coloca una cantidad pequeña en el borde la mano utilizando una pipeta, se lleva a la boca y se procede a identificar el sabor.

Determinación de los Requisitos Físicos

Como principal parámetro para la determinación de un requisito físico del extracto de *B. pinnatum* se tomó en consideración la densidad como se detalla a continuación:

Densidad: Se lo expresa relacionando la masa y el volumen, utilizando un picnómetro vacío y completamente seco, se lleva a pesado y se representa como (M), luego al mismo picnómetro se le

añade agua destilada y se pesa (M_1), posteriormente en el mismo se adiciona el extracto a analizar y se pesa (M_2).

La densidad se calcula utilizando la siguiente fórmula.

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

Índice de refracción: Está relacionado entre la velocidad de la luz con la velocidad de la sustancia de análisis, la prueba se la realiza para verificar la pureza de los aceites esenciales, el ensayo se lo realiza en un refractómetro utilizando agua destilada para calibrar al equipo, posteriormente se añade unas 2 gotas del extracto a analizar y se procede a la lectura del valor correspondiente.

pH: Se toma 25 mL del extracto metanólico en un vaso de precipitación y se procede a la lectura del mismo con la ayuda de un pHmetro digital previamente.

2.4. Tamizaje Fitoquímico

Se utilizó para la identificación de Glucósidos Cardiotónicos, en la cual se añade 3mL de extracto en 3 tubos de ensayo diferentes y se coloca a cada uno el reactivo respectivo, los mismos que al visualizar ya sea el color o un precipitado dará positivo o negativo para las diferentes pruebas colorimétricas y que se lleva a cabo utilizando las siguientes pruebas como se indica a continuación.

Prueba de Baljet

Se añadió 3 mL de cada uno de los extractos a un tubo de ensayo y se añade unas gotas del reactivo de baljet, siendo la prueba positiva en caso de que de una coloración anaranjada o rojo oscura.

Prueba de Kedde

Se añadió 3 mL de cada uno de los extractos a un tubo de ensayo y se agregó unas gotas del reactivo de Kedde previamente preparado, siendo la prueba positiva la presencia de coloración azul, violeta, rosa.

Reactivo de Kedde

Para la preparación del reactivo de Kedde se tomaron en consideración las siguientes sustancias y soluciones como se muestra a continuación:

Sol. A: ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2 % en metanol.

Sol. B: KOH al 5,7 % en agua.

Utilizando las soluciones previamente preparadas se procedió a utilizar la siguiente técnica para la obtención del reactivo:

Se mezclan cantidades iguales de las soluciones A y B del reactivo y se añade una punta de espátula de la muestra a ensayar. Los cardenólidos y sus agliconas dan color azulado, rosa hasta violeta.

Prueba de Liberman-Butchard

Se añadió 3 mL de cada uno de los extractos a un tubo de ensayo y se adicionan unas gotas del reactivo, dando positivo la presencia de una coloración o cambio de color.

Prueba de Molish

Se añade e 2 a 3 gotas del reactivo de Molish a 3 mL de cada uno los extractos, da positivo la presencia de un anillo rojo o violeta en la interface.

2.5. Análisis Cromatográfico Preliminar

Para el análisis cromatográfico del extracto se realizó un ensayo previo que permitió evidenciar la solubilidad de los compuestos frente a distintos solventes y tomarlo como un punto de partido para realizar las demás cromatografías cambiando las polaridades. Se lo realizó utilizando una placa de sílica gel de 1 cm de ancho y 5 cm de largo en el mismo que se colocó un pequeño volumen del extracto concentrado con la ayuda de un capilar a 1cm de la base de la placa y se dejó correr en un sistema de solventes que permita evidenciar la separación de los compuestos presentes.

2.6. Cromatografía en Capa Fina

Permite separar de una manera rápida y sencilla los diferentes compuestos presentes en determinada materia vegetal.

Se colocó con un capilar una pequeña cantidad de muestra de concentrado metanólico de la planta a 1cm de la base de la placa. Utilizando el sistema de solventes apropiados se deja saturar la cámara de vidrio, se coloca la placa y se deja correr para separar los compuestos presentes utilizando diferentes solventes orgánicos como se muestra en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2. Sistemas de solventes utilizados en la cromatografía de capa fina

| SOLVENTE | CONCENTRACIÓN |
|-------------------------------------|--|
| Metanol/Agua | (0.4:0.6), (1:1) |
| Metanol/Acetato de etilo | (0.5:1.5), (1:1.5), (0.75:1.5), (1:1) |
| Cloroformo/Metanol | (0.5:0.5), (1:0.5), (0.5:1.5), (2:0.5), (0.5:1), (1.5:0.1) |
| Cloroformo/Agua | (0.5:0.5), (1:1) |
| Cloroformo/Metanol/Agua | (0.5:1:0.5) |
| Cloroformo/Metanol/Acetato de etilo | (0.5:1:1), (0.5:1:0.5) |
| Hexano/Metanol | (1:1) |
| Cloroformo/Hexano | (1:1) |
| Hexano/Acetato de etilo | (1:1) |
| Tolueno/Acetato de etilo | (9.3:0.7) |
| Tolueno/Metanol | (3:1) |

Realizado por: Ramos D, 2017

2.7. Espectroscopia IR

De acuerdo a la cromografía, el estándar eluyó junto a la muestra presentando un R_f de 0.8 lo que llevó a que se tomara la franja pura y se aislara para que de esta manera poder llevar al equipo y continuar con la lectura de este.

Se colocó la muestra a analizar en estado sólido en el lente del equipo previamente encendido y limpio, se obtuvo el espectro para luego realizar el análisis de los grupos funcionales presentes.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Tamizaje Fitoquímico

Los datos que se muestran a continuación son producto de la investigación de la planta *Bryopyllum pinnatum*, teniendo como fin la identificación de bufadienólidos.

Se identificaron los principales grupos químicos presentes en los extractos de la planta mediante las reacciones indicadas en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3 Tamizaje Fitoquímico preliminar del extracto metanólico de la planta hoja del aire (*Bryopyllum pinnatum*)

| ENSAYO | ETANÓLICO | METANÓLICO | ACUOSO |
|--|-----------|------------|--------|
| EXTRACTO | | | |
| MOLISH | +++ | +++ | ++ |
| BALJET | ++ | ++ | + |
| LIBERMAN BUTCHARD | ++ | ++ | + |
| KEDDE | +++ | +++ | - |
| (+) Prueba positiva (-) Prueba negativa (++), (+++) Intensidad de coloración | | | |

Realizado por: Ramos, Diego. 2017

De acuerdo con la tabla 3-3 se observó que el extracto etanólico y metanólico presentaron las mismas características en cuanto a las pruebas utilizadas en el tamizaje fitoquímico dando positivo para todas estas, al contrario con lo que sucede en el extracto acuoso que da positivo para todas las pruebas excepto para Kedde que es para glicósidos cardiotónicos.

Se tomó como punto de partida el tipo de coloración, la intensidad del color, la formación de precipitado, de acuerdo a esto tanto el extracto etanólico como metanólico presentaron las mejores características, es decir para Molish, presentaron una coloración con anillo rojizo bien acentuado que da positivo para la reacción, en cuanto al extracto acuoso la prueba fue positiva pero el color rojizo fue más débil, para la prueba de Baljet, dio una coloración anaranjada oscura, y leve en el extracto acuoso, para la prueba de Liberman Butchard, se presentó un cambio de coloración en todos los extractos aunque ligeramente se observó este cambio en el extracto acuoso, para el ensayo de Kedde solamente dio positivo para los extractos etanólico y metanólico con una coloración rojiza, los mismos que se compararon con el trabajo de investigación “Hierba de la bruja (*Kalanchoe pinnata*)” (Muñoz 2014), presentando solamente variabilidad en la tonalidad de coloración para cada una de las pruebas.

Tabla 4-3 Parámetros organolépticos del extracto metanólico de la planta (*Bryophyllum pinnatum*)

| PARÁMETRO | CARACTERÍSTICAS |
|------------------|------------------------|
| Aspecto | Líquido límpido |
| Color | Verde claro |
| Olor | Hierba característico |
| Sabor | Ligeramente amargo |

Realizado por: Ramos, Diego. 2017

Según la Tabla 4-3 entre las características organolépticas que tenía el extracto metanólico era líquido límpido, esto se debió a que en dicho extracto se precipitaron las clorofilas llevando a refrigeración y se filtró el extracto para conseguir un aspecto de esta manera, además tanto el color como el olor fueron característicos, es decir, al ser un extracto de una planta las propiedades de ella no van a cambiar, en cuanto al sabor debido al contenido de metanol, compuestos químicos y al tiempo de maceración se percibe un sabor ligeramente amargo.

Tabla 5-3 Parámetros físicos-químicos del extracto metanólico de la planta (*Bryopyllum pinnatum*)

| PARÁMETRO | CARACTERÍSTICAS |
|----------------------|-----------------|
| Densidad | 0.851 g/mL |
| Índice de Refracción | 1.36-1.38 |
| pH | 5.0 |
| % Metanol | 96% |

Realizado por: Ramos, Diego. 2017

La tabla 5-3 muestra los parámetros físicos y químicos que presentó el extracto metanólico los mismos que al comparar con el trabajo de investigación “Hierba de la bruja (*Kalanchoe pinnata*)” (Muñoz 2014), los parámetros no presentan una variabilidad considerable en cada uno de estos parámetros al relacionar unos con otros dando a entender que estos se encuentran dentro de las similitudes de esta investigación.

3.2 Cromatografía en Capa Fina

Se realizaron diferentes sistemas de solventes a diferentes proporciones v/v para poder separar los compuestos presentes en la planta, obteniéndose resultados negativos como se observa en la Tabla 6-3.

Tabla 6-3 Sistema de solventes utilizado en la cromatografía con resultados negativos

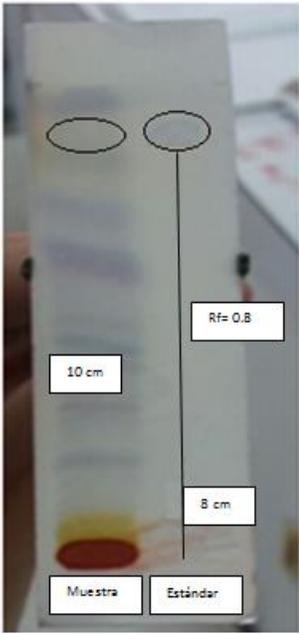
| SOLVENTE | CARACTERÍSTICA |
|--------------------------|--|
| Metanol/Agua | La muestra emigra casi en su totalidad junto con el solvente |
| Metanol/Acetato de etilo | La muestra corre en vela no existe separación |
| Cloroformo/Metanol | Existe ligera separación pero no en su totalidad |
| Cloroformo/Agua | La muestra no eluye el solvente no es el adecuado |

| | |
|-------------------------------------|---|
| Cloroformo/Metanol/Agua | La muestra no eluye el solvente no es el adecuado |
| Cloroformo/Metanol/Acetato de etilo | La muestra eluye pero no existe separación |
| Hexano/Metanol | La muestra corre pero no hay separación |
| Cloroformo/Hexano | No existe elución de la muestra |
| Hexano/Acetato de etilo | La muestra presenta un corrido en vela |

Realizado por: Ramos, Diego. 2017

El mejor sistema de solventes y revelador para la cromatografía en capa fina se muestra a continuación en la Tabla 7-3

Tabla 7-3 Sistema de solvente Tolueno/Metanol

| SOLVENTE | CONCENTRACIÓN | REVELADOR | FIGURA |
|-----------------|---------------|----------------------------|---|
| Tolueno/Metanol | 3:1 | Ácido sulfúrico/vainillina |  |

Realizado por: Ramos, Diego. 2017

Según la tabla 7-3 se observa que mejor resultado tuvo el sistema de solvente Tolueno/Metanol a una concentración (3:1) dando mejor resultado en cuanto a la separación de compuestos presentes.

En comparación con otros sistemas de solventes debido a que esta presenta eficacia porque la muestra a eluido desde el punto de aplicación hasta la llegada del solvente, tiene eficiencia porque existe separación entre un compuesto y otro, esto se denota por las diferentes coloraciones que presenta, y por último presentó buena resolución porque cada compuesto presente en la planta se encuentra separado uno de otro en pequeñas bandas que hace factible su identificación y a su vez su purificación.

Al eluir la muestra junto al estándar de digoxina en la misma placa, la elución se la realizó hasta 10 cm de altura desde el punto de aplicación, el estándar eluyó 8cm dando un Rf de 0.8 que comparando con Clarke's 2011(Analysis of drugs and poisons) nos da un Rf de 0.85, esta variación se pudo haber dado debido a la pureza de los solventes, con lo que se indica que a una distancia de 1 cm de altura en la muestra, se encuentra la franja característica que contiene glicósidos cardiotónicos en la muestra.

3.3. Espectro Infrarrojo

Mediante Espectrofotometría infrarroja de la muestra, se identificaron 5 picos en la zona del IR medio como se observa en la Figura 4-3

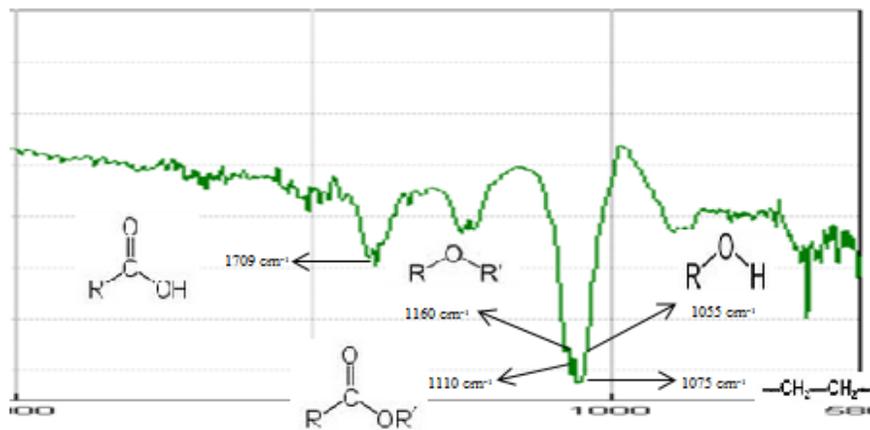


Figura 4-3 Espectro infrarrojo de la banda aislada mediante cromatografía en capa fina correspondiente a un glicósido cardiotónico.

Realizado por: Ramos, Diego. 2017

A partir del análisis de IR de la muestra, presenta picos que revelan los grupos funcionales, de esta manera se observan picos a 1075 cm^{-1} que corresponde a una cadena entre carbono y carbono, 1709

cm^{-1} a un ácido carboxílico, 1055 cm^{-1} , 1160 cm^{-1} y 1110 cm^{-1} a alcoholes, éteres, ésteres ácidos carboxílicos, anhídridos de enlaces carbono de alcanos.

Los picos en esta zona corresponden a grupos funcionales característicos de los glicósidos cardiotónicos, dentro de este grupo químico se encuentran los bufadienólidos, de acuerdo a su estructura como se observa en la estructura, de la Figura 3-1.

Al tener estos datos del espectro de infrarrojo y comparándolos con los datos presentes en Clarkes 2011 (Analysis of drugs and poisons) nos da la presencia de un glucósido cardiotónico presente en la muestra analizada, como se muestra en el anexo 5.

Los datos obtenidos de la cromatografía en capa fina con un $R_f = 0.8$ y de los grupos funcionales analizados mediante espectrofotometría infrarroja, se puede mencionar que de acuerdo a estas características posiblemente se tenga la presencia de un bufadienólido en la muestra analizada.

CONCLUSIONES

1. A partir de 1 kg de muestra vegetal seca de (*Bryopyllum pinnatum*), se obtuvo 50 mL de concentrado metanólico, etanólico y acuoso mediante métodos maceración, destilación y reflujo.
2. En el tamizaje fitoquímico de los tres diferentes tipos de extractos, se obtuvo mejor resultado en el extracto metanólico, debido los ensayos dieron positivo para las pruebas de Molish, Baljet, Liberman Butchard y Kedde.
3. En el análisis cromatográfico en capa fina el sistema de solventes Tolueno/Metanol en proporción (3:1), demostró buena eficacia, eficiencia y resolución, utilizando el estándar de digoxina se identificó la franja que contenía los glicósidos cardiotónicos debido a que este presentó un Rf de 0.8.
4. Con ayuda del espectrofotómetro infrarrojo se evidenciaron los grupos funcionales presentes en la muestra dando así presencia de picos correspondientes a ácido carboxílico, alcoholes, éteres, ésteres, anhídridos de los enlaces carbono-carbono de grupos alcano.
5. El análisis comprobatorio de los bufadienólidos en la muestra no se lo pudo realizar debido a que no se contaba con el equipamiento adecuado para la realización de este estudio, quedando como punto de continuación la identificación de este tipo de compuestos.

RECOMENDACIONES

1. Se sugiere mantener las normas de bioseguridad en el laboratorio, debido a que se trabaja con solventes y también reactivos que pueden causar alguna determinada lesión o daño en el cuerpo.
2. Continuar con el estudio del vegetal porque además del compuesto estudiado debe presentar una gran variedad de otro tipo de metabolitos.
3. Utilizar el material y equipos apropiados para evitar la contaminación tanto del extracto como de los reactivos a utilizar.
4. Utilizar la tabla de polaridades de solventes para tener una mejor elución de la muestra en la placa cromatográfica.
5. Gestionar convenios con otras instituciones que puedan ayudar con la utilización de equipos que no existen en los laboratorios, para que de esta manera se puedan obtener datos y resultados mejores acerca de este tipo de compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

ABBOTT, David.; ANDREWS, Alhambra.; "Introducción a la cromatografía" [en línea], 1973, [Consulta 13 Noviembre 2016].

Disponible en: <https://www.iberlibro.com/INTRODUCCION-CROMATOGRAFIA-David-Abbott-Andrews-Alhambra/9121126024/bd>

AFZAL, Muhammad.; GUPTA, Gaurav.; et al. "Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from Bryophyllum pinnatum". *Fitoterapia* [en línea], 2012, vol. 83(5), pp. 853-858. ISSN 0367326X. [Consulta 12 Noviembre 2016].

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.03.013>.

AFZAL, Muhammad.; KAZMI, Imran.; et al. "Review Article Bryophyllum pinnatum: A review". *International Journal of Research in Biological Sciences* [en línea], 2012, vol. 2(4), pp. 143-149. [Consulta 12 Noviembre 2016]. ISSN 2249 – 9687.

Disponible

en:

https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiZwJHk7cTRAhUFSCYKHatyBxsQFggeMAA&url=https%3A%2F%2Furpjournals.com%2Ftocjnls%2F27_12v2i4_3.pdf&usq=AFQjCNHfXwFChrLHOt_MWkPjnKes_wjC5A&sig2=ERunjmlzFOh3FiYwMiY8KQ.

AKINSULIRE, Odunayo.; AIBINU, Ibukun.; et al. "In Vitro Antimicrobial Activity of Crude Extracts From Plants Bryophyllum pinnatum and Kalanchoe crenata". *Research Paper* [en línea], 2007, (Nigeria) vol. 4, pp. 338-334. [Consulta 16 Noviembre 2016].

Disponible en: <http://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/31227>.

BRUNETON, Jean. *Fitoquímica Plantas medicinales* [en línea]. En: S.. ACRIBIA (ed.),2. S.l.: s.n., pp. 723-724. 2001. [Consulta 20 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://propanona.blogspot.com/2014/08/farmacognosia-fitoquimica-plantas.html>.

BUITRÓN, Xavier. "Uso y comercio de plantas medicinales". *Situación actual y aspectos importantes para su conservación, TRAFICC. Pág* [en línea], 1990, (Ecuador) vol. 101, pp. 1-97. [Consulta 20 Noviembre 2016].

Disponible

en:

[https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=12&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjMz8PNxpHNAhXEOyYKHd-5CikQFghRMAs&url=http://institutoesculapio.edu.ec/index.php/estudiantes/acceso-a-biblioteca/doc_download/10-plantas-medicinales-ecuador&usg=.](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=12&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjMz8PNxpHNAhXEOyYKHd-5CikQFghRMAs&url=http://institutoesculapio.edu.ec/index.php/estudiantes/acceso-a-biblioteca/doc_download/10-plantas-medicinales-ecuador&usg=)

CABRERA, Dailé.; SÁNCHEZ, Yarima.; et al. "Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de extractos de *Bryophyllum pinnata*". *Química Viva* [en línea], 2011, vol. 1(10), pp. 1666-7948. [Consulta 20 Diciembre 2016].

Disponible en: www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v10n1/cabrera.pdf.

CUNHA-FILHO, Geraldino.; RESCK, Inés.; et al. "Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion". *Toxicon* [en línea], 2010, vol. 56(3), pp. 339-348. ISSN 00410101. [Consulta 25 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.021>.

DÍAZ, Nieves.; JORRÍN, Jesús.; BÁRCENA, José. "Determinación cualitativa de azúcares". [en línea], 2011, [Consulta 20 Diciembre 2016].

Disponible en:
<https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiHkO7l88TRAhXMMSYKHcyEDhIQFggYMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.uco.es%2Fdptos%2Fbioquimica-biol-mol%2Fpdfs%2F20%2520REACCIONES%2520COLOREADAS%2520DE%2520AZ%25C3%259ACARES>.

EL ABDELLAOUI, Saida.; DESTANDAU, Emilie.; et al. "Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: Extraction, purification, and identification". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [en línea], 2010, vol. 398(3), pp. 1329-1338. [Consulta 13 Octubre 2016].

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714893>.

FLEURENCE, Juan.; FAYAZ, María.; et al. "Espectrometría de Masas". *Trends Food Sci Tech.* [en línea], 1999. [Consulta 28 Diciembre 2016].

Disponible en:
http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf.

ILBOUDO, Sidb.; SOMBI, Issa.; et al. "Facteurs influence ant le refus de consulter au centre de sant dans la region rurale Ouest du Burkina Faso". *Sante Publique*[en línea], 2016, vol. 28(3), pp. 391-397. ISSN 09953914. [Consulta 18 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://phcogj.com/content/microscopical-and-preliminary-phytochemical-studies-aerial-part-leaves-and-stem-bryophyllum->.

KAMBOJ, Anjo.; SALUJA, Ajay. "Development of validated HPTLC method for quantification of stigmaterol from leaf and stem of *Bryophyllum pinnatum*". *Arabian Journal of Chemistry* [en línea], 2013, pp. 2-7. ISSN 18785352. [Consulta 12 Octubre 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.006>.

KAMBOJ, Anjo.; SALUJA, Ajay. "Microscopical and Preliminary Phytochemical Studies on Aerial Part (Leaves and Stem) of *Bryophyllum Pinnotum Kurz*". *Pharmacognosy Journal* [en línea], 2010, (India) vol. 2(2), pp. 254-259. ISSN 09753575. [Consulta 18 Diciembre 2016]. Disponible en: <http://phcogj.com/content/microscopical-and-preliminary-phytochemical-studies-aerial-part-leaves-and-stem-bryophyllum->.

KRENN, Liselotte.; KOPP, Brigitte. "Bufadienolides from animal and plant sources". *Phytochemistry* [en línea], 1998, (Austria) vol. 48(1), pp. 1-29. ISSN 00319422. [Consulta 19 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942297004263>.

MARLINA, Gita.; ISYANTO, Puji.; et al. "Cromatografia en placa fina". [en línea], 2013. [Consulta 20 Diciembre 2016].

Disponible en: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi7yo6iqcXRAhVCSyYKHQ3XA-MQFggYMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.uam.es%2Fdocencia%2Fjppid%2Fdocumentos%2Fpracticas%2Factuales%2Fguion-p6.pdf&usg=AFQjCNGmG0x5-HyepbfpUpY1N>.

MASTER, XVII. "Técnicas Espectroscopicas". [en línea], 2012. [Consulta 22 Diciembre 2016].

Disponible en: https://www.google.com.ec/?hl=es&gws_rd=cr&ei=ylyMVI70CMGhNvW6hIgB#q=espectroscopia+infrarroja+fundamento&hl=es&start=20&*.

MONIUSZKO-SZAJWAJ, Barbara.; PECIO, Lucasz.; et al. "New bufadienolides isolated from the roots of *Kalanchoe daigremontiana* (crassulaceae)". *Molecules* [en línea], 2016, (Polonia) vol. 21(3), pp. 1-13. ISSN 14203049. [Consulta 21 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/3/243/htm>.

MUDI, S.; IBRAHIM, H. "Activity of *Bryophyllum Pinnatum* S . Kurz Extracts on Respiratory Tract Pathogenic Bacteria". *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences* [en línea], 2008, vol. 1(1), pp. 43-48. [Consulta 22 Diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.ajol.info/index.php/bajopas/article/view/57512>.

MUÑOZ, F. "Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado". S.l.: s.n. ISBN 847114624X. 1987. [Consulta 20 Diciembre 2016].

Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1431710>

MUÑOZ, Paola. "Hierba de bruja *Kalanchoe pinnata*". [en línea], 2014 . [Consulta 14 Octubre 2016].

Disponible en: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjtsnmpMXRAhXJbiYKHWdABPUQFggYMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.biocomercolombia.com%2Fdocs%2Fbiocomercio_andino%2FComponente%25201%2FMonografias%2FMonografia%2520Kalan.

NOVO, Jesús.; NIEVES, Maria.; et al. "En Capa Fina Y Detección Mediante Reacción Con Ninhidrina". [en línea], 2010 .[Consulta 14 Diciembre 2016].

Disponible en: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjO8OL3sMXRAhXE6CYKHcjHANYQFggYMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.uco.es%2Fdptos%2Fbioquimica-biol%2Fpdfs%2F11%2520CROMATOGRF%25C3%258DA%2520DE%2520CAPA%2520FI%2520NA%2520DE>.

OKWU, D.; JOSIAH, C. "Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants". *African Journal of Biotechnology* [en línea], 2006, (Nigeria) vol. 5(4), pp. 357-361. ISSN 16845315. DOI 10.1093/aob/mcn125. [Consulta 16 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://www.academicjournals.org/AJB>.

OUFIR, Mouhssin.; SEILER, Christina.; et al. "Quantification of Bufadienolides in Bryophyllum pinnatum Leaves and Manufactured Products by UHPLC-ESIMS/MS". *Planta Medica* [en línea], 2015, vol. 81(12/13), pp. 1190-1197. ISSN 0032-0943. [Consulta 17 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1546126>.

PEREIRA, Sonia.; VEGA, Dalia.; et al. "Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico , etéreo y acuoso de las hojas de la Resumen Phytochemical screening to the alcoholics , watery and ethereal extracts of Trichilia hirta L" . *QuimicaViva* [en línea], 2009, (Cuba) vol 3, pp. 192-199. [Consulta 20 Diciembre 2016].

Disponible en: www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v8n3/pereiracabrera.pdf.

PERERA, Wilmer.; LEITÃO, Suzana.; et al. "Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophyryne fustiger* (Bufonidae): Inhibition of human kidney Na⁺/K⁺-ATPase activity". *Toxicon* [en línea], 2016, vol. 110, pp. 1-34. ISSN 18793150. [Consulta 17 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.015>.

RATHOUR, Aarti.; KAUR, Mandeep."BUFADIENOLIDES AND THEIR MEDICINAL UTILITY: A REVIEW". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [en línea], 2013, vol. 5(4), pp. 20-27. [Consulta 22 Diciembre 2016].

Disponible en: www.ijppsjournal.com/Vol5Issue4/7570.pdf.

SCHULER, V.; SUTER, K.; et al."Bryophyllum pinnatum inhibits detrusor contractility in porcine bladder strips - A pharmacological study towards a new treatment option of overactive bladder". *Phytomedicine* [en línea], 2012, vol. 19(10), pp. 947-951. ISSN 09447113. [Consulta 14 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.05.003>.

SERRANO, José. "INSTRUMENTACIÓN Y MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO". [en línea], 2009 .[Consulta 28 Diciembre 2016].

Disponible

en:

<https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0ahUKEwirwZOY3sfRAhXKOCYKHfYZA24QFgg9MAY&url=http%3A%2F%2Fwww>

.upct.es%2F~minaees%2Fespectroscopia_infrarroja.pdf&usg=AFQjCNFNDjWIT6k6KFR7DdNjsEPozhFLg&sig2=IoYPw.

SHARAPIN, N. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos - Google Libros*. 1. Colombia: 2000. [Consulta 20 Diciembre 2016].

Disponible en:
https://books.google.com.ec/books/about/Fundamentos_de_tecnolog%C3%ADa_de_productos.html?id=XH2HzSIJPywC

TOBERGTE, David.; CURTIS, Shirley. "CONCEPTOS FUNDAMENTALES DE CROMATOGRAFÍA". *Journal of Chemical Information and Modeling* [en línea], 2013. [Consulta 20 Diciembre 2016].

Disponible en:
https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwialOTE-sTRAhWC6iYKHWUXBg8QFggYMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.mncn.csic.es%2Fdocs%2Frepositorio%2Fes_ES%2Finvestigacion%2F cromatografia%2Fprincipios_de_cromatografia.pdf

TSVET, Mijail. "Tipos de cromatografía". [en línea], 2011. [Consulta 21 Diciembre 2016].

Disponible en:
https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi01_vL5ZHNahXFNx4KHY87DL0QFghBMAc&url=http://blog.utp.edu.co/docenciaedwin/files/2014/09/TIPOS-CROMATOGRAFÍA.pdf&usg=AFQjCNHBXI_2ETsPIH14b7tIXieXJrnuAg&sig2=

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID. "Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales". [en línea], 2014. [Consulta 20 Diciembre 2016]. Disponible en:

<https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwivjvOzxMDSA hVE5yYKHXGyBdYQFggYMAA&url=http%3A%2F%2Focw.upm.es%2Fingenieria-agroforestal%2Fuso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales%2Fcontenidos%2Fmaterial-de-clase%2Ftema12.pdf&usg=AFQjCNEDKsOMDNCJU-auNrba15uusJ6VNA&bvm=bv.148747831,d.eWE>

VOCES, D.; DÍAZ, C.; et al. "Uso de plantas medicinales en el tratamiento de la ansiedad y la depresión". *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria* [en línea], 2002, (España) vol. 9(1), pp. 50-56. ISSN 11342072. [Consulta 22 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1134207202755308>.

WÄCHTER, R.; BRENNEISEN, R.; et al. "Leaf press juice from *Bryophyllum pinnatum* (Lamarck) Oken induces myometrial relaxation". *Phytomedicine* [en línea], 2011, (Suiza) vol. 19(1), pp. 74-82. ISSN 09447113. [Consulta 20 Diciembre 2016].

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.032>.

ZAPATA, José. " Vegetales ¿ Qué es un extracto ?" [en línea], 2002. [Consulta 28 Diciembre 2016].

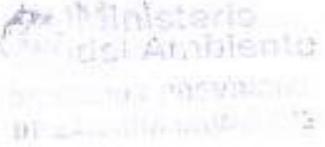
Disponible

en:

https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjmh7L7tsDSAhWINSYKHYP8AdQQFghCMAc&url=http%3A%2F%2Fwww.ub.edu%2Fcentrepatents%2Fpdf%2Fdoc_dilluns_CP%2Fpardo_patentesextractosplantas.pdf&usg=AFQjCNH2-53F3bUCtITE4SmZHs7C4lSKGQ&bvm=bv.148747831,d.eWE.

ANEXOS

Anexo 1. Permiso por parte del Ministerio de ambiente para la utilización de planta hoja del aire (*Bryophyllum pinnatum*)

| | |
|--|--|
|  <p>Ministerio del Ambiente</p> |  <p>PERUANO NACIONAL DE LA REPUBLICA DEL ECUADOR</p> |
| <p>Oficio Nro. MAE-DPAZCH-2017-0134-O Zamora, 01 de febrero de 2017</p> | |
| <p>Asunto: SOLICITA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA</p> | |
| <p>Señor Diego Marcelo Ramos Jaramillo Tesisista ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO En su Despacho</p> | |
| <p>De mi consideración:</p> | |
| <p>En respuesta al Documento No. S/N, en donde se pone a conocimiento y solicitan permiso de investigación para el proyecto denominado "Extracción e identificación de bufadienólidos en la planta hoja del aire (<i>Bryophyllum pinnatum</i>) por métodos cromatográficos" en la provincia de Zamora Chinchipe, cantón Chinchipe parroquia Zumbra, a cargo del Egd. Diego Marcelo Ramos Jaramillo con CI No. 1803754629, estudiante de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo,</p> | |
| <p>Con este antecedente me permito informar que una vez revisado el proyecto de investigación, el mismo cumple con las especificaciones determinadas en la normativa ambiental vigente, en este contexto adjunto al presente se servirá encontrar la Autorización de Investigación Científica, además solicito realizar las gestiones necesarias para cumplir con las obligaciones y observaciones estipuladas en la presente Autorización de Investigación Científica,</p> | |
| <p>Con sentimientos de distinguida consideración,</p> | |
| <p>Atentamente, </p> |  <p>Ministerio del Ambiente Provincia de Zamora Chinchipe Oficina Provincial de Ambiente</p> |
| <p>Mgs. Byron Pineda González González DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE ZAMORA CHINCHIPE</p> | |
| <p>Referencia: - MAE-DPAZCH-2017-0191-E</p> | |

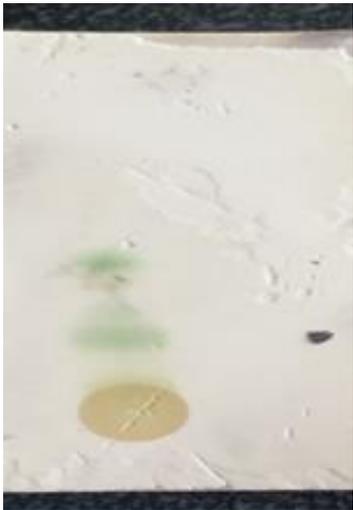
Anexo 2. Concentrado de la muestra por medio del equipo de destilación y reflujo

| | |
|---|--|
|  |  |
| Obtención del concentrado etanólico por método de destilación | Obtención del concentrado metanólico por método de reflujo |

Anexo 3. Tamizaje Fitoquímico de los extractos metanólico, etanólico y acuoso

| | | |
|---|--|---|
|  |  |  |
| Ensayo de Kedde | Ensayo de Baljet | Ensayo de Liberman-Butchard |

Anexo 4. Elución cromatográfica del extracto metanólico utilizando distintos sistemas de solventes a diferentes concentraciones

| | |
|--|--|
|  |  |
| Elución de una placa cromatográfica | |
|  |  |
| Cromatografía en capa fina utilizando Tolueno/Acetato de etilo (9.3:0.7) como solvente | Cromatografía en capa fina utilizando Tolueno/Acetato de etilo (1:1) como solvente |



Cromatografía en capa fina utilizando Tolueno/Metanol(1:1) como solvente



Cromatografía en capa fina utilizando Hexano/Acetato de etilo (1:1) como solvente



Cromatografía en capa fina utilizando Cloroformo/Metanol (0.5:1.5) como solvente



Cromatografía en capa fina utilizando Cloroformo/Metanol/Acetato de etilo (0.5:1.0:1.0) como solvente

| | |
|---|---|
|  |  |
| <p>Cromatografía en capa fina utilizando Hexano/Metanol (1.0:1.0) como solvente</p> | <p>Cromatografía en capa fina utilizando Tolueno/Acetato de etilo (9.3:0.5) como solvente</p> |

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>Cromatografía en capa fina utilizando Metanol/Agua (0.4:0.6) como solvente</p> | <p>Cromatografía en capa fina utilizando Metanol/Acetato de etilo(1.0:1.5) como solvente</p> |



Cromatografía en capa fina utilizando Tolueno/Metanol (3:1) como solvente y H_2SO_4 vainillina como revelador



Cromatografía en capa fina utilizando Tolueno/Metanol (3:1) como solvente sin revelar



Cromatografía en capa fina utilizando Cloroformo/Metanol/Agua (0.5:1.0:0.5) como solvente

Anexo 5. Espectro IR de un glicósidos cardiotónico Clarks, 2011 (Analysis of drugs and poisons)

