

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA.
UNAN-LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
ESCUELA DE FARMACIA.



MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN
QUÍMICA-FARMACIA.

DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA
HOJA SECA DE LA ESPECIE VEGETAL *CORDIA INERMIS* MEDIANTE
TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

INVESTIGACIÓN PRESENTADA POR:

BR. DOLORES CANDELARIA CANALES PEÑA.

BR. LUZ MARINA CARAZO LUNA.

BR. JESSENIA DEL SOCORRO CENTENO GARCÍA.

TUTOR:

MSC. FERNANDO EMILIO BACA ESCOTO.

LEÓN, AGOSTO, 2011.

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

Dedicatoria

A Dios que es nuestro padre celestial y que nos ha dotado de sabiduría y disciplina para poder realizar con éxito nuestro trabajo.

A nuestros padres que son los que han hecho todo lo posible a través de su sacrificio, empeño, y mucha dedicación para que pudiéramos salir adelante en busca de nuestro propósito como es la de ser profesionales.

A nuestros profesores porque de esta manera estamos haciendo que ellos cosechen lo que han sembrado; profesores que durante nuestra trayectoria se esforzaron para hacer de nosotros mejores estudiantes a los cuales hemos respondido poniendo en alto su excelencia académica.

Agradecimientos

A Dios por permitirnos llegar hasta este momento tan importante de nuestras vidas y lograr otra meta más en nuestra carrera.

A nuestros padres por su cariño, comprensión y apoyo sin condiciones ni medida. Gracias por guiarnos sobre el camino de la educación. Creemos ahora entender porque nos obligaban a terminar las tarea antes de salir a jugar, y muchas cosas más que no terminaríamos de mencionar.

A nuestro tutor de manera especial y sincera al Msc. Fernando Emilio Baca E. por aceptar ser tutor de esta monografía y estar bajo su dirección el desarrollo de la misma. Su apoyo y confianza no solo ha sido importante en el desarrollo de nuestro trabajo, sino también en nuestra formación como profesionales.

A cada uno de los maestros que participaron en nuestro desarrollo profesional durante la carrera, sin su ayuda y conocimientos no estaríamos en donde nos encontramos ahora.

A nuestras amigas que pronto serán profesionales, por todo su cariño y paciencia, por confiar y creer en nosotras, por ser como hermanas en estos cinco años de universidad y sobre todo por su valiosa amistad.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hacemos extensivo nuestros más sinceros agradecimientos.

Resumen

Se ha investigado la presencia de metabolitos secundarios en las hojas secas de la *Cordia inerrmis* planta utilizada empíricamente por su acción en problemas de bazo, hígado, manchas en la cara y hepatitis por medio de una marcha fitoquímica y un método cualitativo: reacción de coloración y precipitación, para la determinación de los constituyentes químicos. Fitoquímicamente se determinó la presencia de metabolitos secundarios como ácidos grasos, en la fracción A del extracto etéreo, esteroides y triterpenos en la fracción B del extracto etéreo respectivamente. En el extracto alcohólico se aisló únicamente agentes reductores, mientras que en el extracto acuoso se determinó la presencia de saponinas, mucilagos, emodinas, esteroides/triterpenos y agentes reductores.

El estudio realizado, concluye, en que los constituyentes químicos determinados en la especie estudiada, son de importancia significativa y puede tener una implicancia en el uso empírico de la planta por parte de la población de la isla de Ometepe.

Contenido	Pág.
<u>Capítulo I</u>	
1.1 Introducción	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Hipótesis	5
1.4 Objetivos	6
<u>Capítulo II</u>	
2 Marco Teórico	7
2.1 Clasificación taxonómica de la planta	7
2.2.1 Descripción botánica de las Boraginaceae	8
2.2.2 Descripción botánica de la <i>Cordia</i> .	8
2.2.3 Géneros representativos de <i>Cordia</i> en Nicaragua	9
2.2.3 Actividad biológica de la <i>Cordia inermis</i>	9
2.3.1 Composición química de la <i>Cordia inermis</i>	10
2.4 Clasificación de las plantas medicinales	10
2.5. Obtención de la droga	11
2.5.2 Recolección de las hoja	11
2.6 Secado del material vegetal	12
3. Tamizaje fitoquímico	12
3.1 Marcha Fitoquímica preliminar	12
3.2.1 Técnicas y Métodos de extracción	13
4. Métodos de extracción	14
4.1 Extracción por Soxhlet	15
4.1.1 Preparación de la muestra	15
4.1.2 Colocación del solvente	16
4.1.3 Solventes a utilizados	16
4.1.4 Calentamiento	18
4.1.5 Operaciones de extracción	18
4.2 Arrastre de vapor	19
4.3 Extracción por reflujo	21
5. Técnicas cromatografías	21
5.1 Cromatografía	21
5.2. Cromatografía en papel	22
5.3 Cromatografía en capa fina	23
6. Determinación de metabolitos secundarios	24
6.1 Alcaloides	24

6.2 Esteroles /Triterpenos	25
6.3 Taninos	26
6.8 Ácidos grasos	30

Capítulo III

7. Material y Método	32
7.1.1 Variable y Operacionalización de variable	33
7.2. Procedimiento de la marcha sistémica	34
8. Materiales	38
8.1. Equipo utilizado	38
8.2. Cristalería Utilizada	38
9. Preparación de reactivos reveladores	38
10. Caracterización Taxonómica.	39

Capítulo IV

11. Resultados	40
12. Análisis de los resultados	43
13. Conclusiones	46
14. Recomendaciones	47
Referencias Bibliografía	48
Anexos	50
Esquemas de trabajo	
Imágenes	

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados del análisis del extracto etéreo	40
Tabla 2. Resultados del análisis del extracto etanólico	41
Tabla 3. Resultados del análisis del extracto acuoso	42

Índice de figuras

Fig.1 Cartucho usado en la extracción por Soxhlet	15
Fig.2 Extracción con Soxhlet	19
Fig.3 Extracción por arrastre con vapor	21
Fig.4 Cromatografía ascendente y descendente	23

Abreviaturas

DPPH: 2,2 difenil 1-picrylhydrazyl.

P.A: Principio activo.

UV: Ultravioleta.

IR: Infrarrojo.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

EM: Espectrometría de masa.

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

1. Introducción

Nicaragua cuenta con una inmensa, y aún poco estudiada y aprovechada, diversidad de especies vegetales. Esto ha despertado el interés científico en la investigación fitoquímica con fines farmacoterapéuticos.

En la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades, separar principios activos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios. Análisis de esta naturaleza deben ser realizados como una acción multidisciplinaria, con la intervención de botánicos, químicos, farmacólogos, farmacognostas, entre otros.

Por otro lado, el aislamiento y conocimiento estructural de compuestos de plantas, podría dar a lugar a diseñar reacciones para producir derivados semisintéticos; así por ejemplo el uso de la diosgenina, como materia inicial para la síntesis de la mayoría de hormonas esteroidales, usada corrientemente en la medicina; o dar pautas para la síntesis de compuestos similares, como el caso de la cocaína, que sirvió como compuesto modelo para la producción de procaína y otros anestésicos locales. Es entonces de gran importancia aislar los principios activos de las plantas; y su localización y obtención en las diferentes partes de las mismas, o en los diferentes extractos, debe ser motivo de ensayos biológicos adecuados.

Un gran porcentaje de los principios activos de las plantas en general está comprendido dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios; que son compuestos químicos de estructuras relativamente compleja, de distribución más

Determinación de constituyentes químicos de la *Cordia inermis* mediante tamizaje fitoquímico.

restringida y son más característica de fuentes botánicas específicas, que los llamados metabolitos primarios; éstos están universalmente distribuidos y participan en la actividad celular de todo ser viviente.¹

En esta investigación, se determina la composición química de los metabolitos secundarios presentes en hojas secas de *Cordia inermis*, usando como métodos extractivos Soxhlet y extracción por reflujo; caracterizando los componentes secundarios presentes en las hojas.

La comparación de 5 métodos de tamizaje demostró que el método descrito por CIULEI, y adaptado en el laboratorio de Fitoquímica del centro Pluridisciplinario de investigaciones Químicas, Biológicas y Agrícolas de la Universidad Estatal de Campinas – UNICAMP, ofrece mayor reproducibilidad, siendo de fácil ejecución².

Siguiendo el método descrito por CIULEI, en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León, se determinaron los constituyentes químicos presentes en las hojas de *Cissus verticillata* L. por medio de un Screening fitoquímico en el año 2004; éste reveló la presencia de cumarinas, taninos catéquicos, flavonoides en forma de antocianinas, alcaloides, triterpenos y esteroides, ácidos grasos, carotenoides, compuestos reductores, antracenosidos y polisacáridos.³

La especie vegetal *Cordia inermis* seleccionada para el presente estudio, se evaluó previamente con el ensayo de antioxidante, realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN –León, en el año 2009; comprobando que la especie

¹ De Ugaz. Olga Lock. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Cap. IV (pp. 41-42). Pontificia universidad católica de Perú

² Sharapin, N., Machado, R., L. y Pinzón S., R. Fundamentos de tecnología de productos fitoquímicos. (2000). CYTED (Organization). Subprograma de Química Fina Farmacéutica, Convenio Andrés Bello (Organization). pp.198.

³ Martínez, E., A., L. Y Sandoval, E., J., C. (2004). Determinación de constituyentes químicos en las hojas de *Cissus verticillata* L. por medio de un screening fitoquímico. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, Nicaragua.

Determinación de constituyentes químicos de la *Cordia inermis* mediante tamizaje fitoquímico.

vegetal posee actividad antioxidante en el radical libre DPPH, con un porcentaje de 53.96%.

El presente estudio pretende dar a conocer los constituyentes químicos presentes en la especie vegetal *Cordia inermis*, nombre común: Achopaste/Cuajantita, familia: Boraginaceae género: *Cordia*, especie: *Cordia inermis*, debido a que las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de sus enfermedades.

Consideramos de importancia hacer este estudio ya que aún no existe bibliografías que indique que esta planta le han sido aislado sus constituyentes químicos, lo que nos confirma que esta especie no ha sido objeto de estudio por parte de los investigadores; de esta manera se pretende contribuir con base científica a futuros estudios y servir de referencias a otros investigadores, así como también hacer énfasis en la importancia del aislamiento de cabeza de series y el conocimiento estructural de compuestos químicos de plantas, y a través de la fragmentación de los extractos poder realizar pruebas de identificación para conocer los metabolitos presentes que podrían tener una acción farmacológica en el organismo humano, lo que podría dar lugar a la elaboración de productos farmacéuticos de origen vegetal.

Cabe destacar que esta investigación ésta dirigida a la identificación cualitativa propiamente de compuestos químicos de planta y no a la determinación estructural de los mismos.

1.1PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA:

¿Cuáles son los constituyentes químicos presentes en hojas secas de la especie vegetal *Cordia inermis*, usada por los pobladores de Bangle, isla de Ometepe?

1.2. HIPÓTESIS

La *Cordia inermis* es una especie vegetal que contiene mucílagos, ácidos grasos, agentes reductores, taninos gálicos, saponinas, y esteroides al igual que las otras especies de la misma familia de las Boraginaceae.

1.3 OBJETIVOS

❖ Objetivo general.

Determinar los tipos de metabolitos secundarios presente en las hojas secas de la especie vegetal *Cordia inermis*, recolectada en la isla de Ometepe en el periodo del mes de septiembre 2010.

❖ Objetivos específicos

1. Obtener fracciones y subfracciones de los diferentes extractos de la *Cordia inermis*.
2. Identificar los diferentes compuestos químicos de las especie *Cordia inermis*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Clasificación taxonómica de la planta.

La clasificación taxonómica de la planta objeto de estudio es la siguiente:

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Asteriadae
ORDEN	Lamiales
FAMILIA	Boraginaceae
ESPECIE	<i>Inermis</i>
GÉNERO	<i>Cordia</i>

2.2 Generalidades de la Boraginaceae.

La familia Boraginaceae comprende aproximadamente 200 géneros y más de 2000 especies entre las que se encuentran hierbas, plantas trepadoras, arbustos y árboles.

Las Boraginaceae pueden ser árboles, arbustos, hierbas o raramente trepadoras, frecuentemente con pelos ásperos.⁴

⁴ Klinger, R., C., J. (Diciembre 2004). Estudio ecológico, silvícola y usos del laurel rojo (*Cordia gerascanthus* L.) En bosques Latiofoliados de Honduras. Proyecto de grado para optar título de licenciatura. Universidad Zamorano, Honduras.

Determinación de constituyentes químicos de la *Cordia inermis* mediante tamizaje fitoquímico.

En Nicaragua se conocen 8 géneros y 57 especies; siendo el género *Cordia* con más especies con un total de 24 especies diferentes. Entre los géneros con mayor importancia se encuentran:

- *Bourreria*.
- *Cordia*.
- *Ehretia*, *Tournefortia*.
- *Heliotropium*.⁵

2.2.1 Descripción botánica de la familia.

BORAGINACEAE

Árboles, arbustos, sufrútices o hierbas. Hojas alternas o agrupadas en el extremo de las ramitas, a veces, escabras, simples, enteras o dentadas. Cimas espigas escopioideas. Flores heteroclamídeas, gamopétalas, 5-meras, isostémonas, actinomorfas, hypoginas, hermafroditas. Estilo terminal o ginobásico, bi- o tetrafido, más raramente entero. Núculas 4-2, o drupa con el cáliz encerrando la parte basal.

2.2.2 Descripción botánica de la *Cordia*.

Árboles, arbustos o sufrútices. Hojas alternas y/o agrupadas en el extremo de las ramitas y casi opuestas, dentadas (frecuentemente los sufrútices) o enteras (frecuentemente los árboles). Cimas terminales a veces escopioideas de flores bien distintas o agrupadas en glomérulos, más raramente espigas escopioideas o inflorescencias de flores grandes. Corola actinomorfa, 5 (-n) méra, campanulada o tubulosa, sin escamas. Filamentos largos. Estilo terminal tetrafido. Drupa sin o con cáliz concrecente con la parte basal (a veces corola persistente).⁶

⁵ Germosén, R.L. (1998). Farmacopea vegetal caribeña. Edit. universitaria. León, Nicaragua.

⁶ Boraginaceae. Extraído [01 noviembre]. Disponible en: <http://www.ville-g.ch/cjb/fdp/claves/pdf/bora.pdf>.

2.2.3 Géneros representativos de la *Cordia* en Nicaragua.

- *C. alliodora* “Laurel”
- *C. bicolor* “Muñeco”
- *C. collococca* “Muñeco”
- *C. dentata* “Tigüilote”
- *C. gerascanthus*, “Laurel macho”
- *C. inermis* “Achopaste/Cuajantita”
- *C. sebestena* “Sebestán”
- *C. truncatifolia* “Tigüilote macho”⁷

El género *Cordia* proporciona madera de colores marrones con rayas negruzcas e irregulares, que aportan a ésta aspectos aceitosos o cerosos. Su albura es de color amarillento. La densidad de la madera es alta y se utiliza para fabricar muebles y artesanías.⁸

2.3 Actividad biológica de la *Cordia inermis*:

Achopaste/Cuajantita

Se distribuye de México a Costa Rica y en las Antillas. Sus hojas maceradas en limón se toman en caso de pujo o problemas de riñones; maceradas en agua y sal, se toman en ayunas en caso de calenturas, problemas de bazo, hígado, manchas en la cara y hepatitis. Es conocida también como “Cuajantita”, fue utilizada en tiempo de colonia en la preparación del indigo (añil, conocidas como tintas).⁹

⁷ Germosén, R., L. (1998). Farmacopea vegetal caribeña. Edit. universitaria. León, Nicaragua

⁸ Centro para la Investigación de la Anatomía de la Madera (en línea). Consultado el 01 de julio de 2004. Disponible en http://www2.fpl.fs.fed.us/TechSheets/Chudnoff/TropAmerican/pdf_files/cordia1new.pdf

⁹ Germosén, R., L. (1998). Farmacopea vegetal caribeña. Edit. universitaria. León, Nicaragua

2.3.1 Composición química de la *Cordia inermis*:

Debido a que no existen estudios realizados que determinen los constituyentes químicos de la *Cordia inermis*, consideramos necesario hacer mención de los constituyentes químicos que han sido encontrados en el duramen del tallo de otra especie, de la *Cordia alliodora*¹⁰ en donde se han detectado componentes quinoideos cordiaacromos A, B y C; policíclicos alioquinol C, cordiaaquinol C y cordiol A; bencenoides aliadorol y cordallinol; el monoterpeno aliadorín, y el componente heterocíclico de oxígeno cordiacromeno A. De las hojas se han aislado varios derivados oxo-hidroxiados del ácido oleanenoico.

Además se encuentran otras investigaciones dirigidas al estudio del efecto hipoglucemiante de *Cordia alliodora* (nogal cafetero) en ratones tratados con aloxano, y correlacionar los metabolitos secundarios encontrados con la bioactividad, y la caracterización química del follaje, corteza y madera de *Cordia collococca* L. (ateje). De manera que existen estudios similares del mismo género *Cordia*, pero diferentes a la especie *inermis*.

La planta es de uso muy antiguo que coincide con los actuales en sus aplicaciones medicinales específicas. Desafortunadamente no existen estudios farmacológicos que convaliden estos usos.

2.4 Clasificación de las plantas medicinales:

Generalmente las plantas con propiedades medicinales pueden clasificarse según su origen en:

- Indígenas: Cuando crecen en el lugar de origen.
- Naturalizadas o aclimatadas: Las que se han introducido a un lugar procedente de otros países.

¹⁰Ruiz y Pavón. (2009). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Aguadentillo. *Cordia alliodora*. Extraído el 21 de septiembre del 2010 desde <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx.com>.

- Exóticas: Las que proceden de otros países.

2.5 Obtención de la droga de origen vegetal:

2.5.1 Conocimientos básicos para la obtención de la droga:

- Conocer la especie botánica de la que se trata y posibles especie con la que se puede confundir.
- Conocer el órgano que constituye la droga.
- Conocer su habita.
- Saber el momento en que se debe efectuar la recolección de la droga
 - Periodo del ciclo vital
 - Momento del día.

2.5.2 Recolección de las hojas:

Momento en que se debe recolectar la droga:

Como norma general la droga se recoge en el momento con mayor cantidad de principio activa (p.a.). Se debe recolectar en tiempo seco, salvo la corteza, que se suelen arrancar mejor en época de lluvias. El momento del día es por la mañana cuando ha desaparecido el rocío.

Las hojas y las sumidades foliáceas y floridas deben recogerse cuando la fotosíntesis es más activa, lo que generalmente ocurre en la época de floración, antes de la maduración de los frutos y semillas.

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje fitoquímico.

La recolección de las drogas provenientes de plantas cultivadas asegura una fuente natural valiosa para la obtención de productos de calidad, lo que no siempre se logra en el caso de las drogas extraídas de plantas silvestres.¹¹

2.6. Secado del material vegetal.

La operación del secado, se debe llevar a cabo en un ambiente seco aplicando desecación por calor, siendo este el más utilizado. Tiene la ventaja de que se puede controlar los dos factores que afectan una buena desecación: la temperatura y la ventilación. Se tiene que asegurar una eliminación rápida de la humedad, sin alterar el principio activo. Si la temperatura es elevada, se produce una evaporación rápida superficial y se forma una costra que impide que la desecación progrese; y la ventilación asegura que el aire permanezca en contacto con la droga hasta que se satura la humedad.

3. Tamizaje fitoquímico:

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas iniciales, de las primeras etapas, que comprenden del análisis fitoquímico, y se realiza con el fin de separar los compuestos químicos que se encuentran en la planta, para luego ser identificado por medio de técnicas cromatográficas.

3.1 Marcha fitoquímica preliminar.

Se han desarrollado una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos, basados en la extracción de éstos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración.

¹¹ Fitoterapia. [2006], Primer congreso iberoamericano de fitoterapia. Vol.6. Suplemento

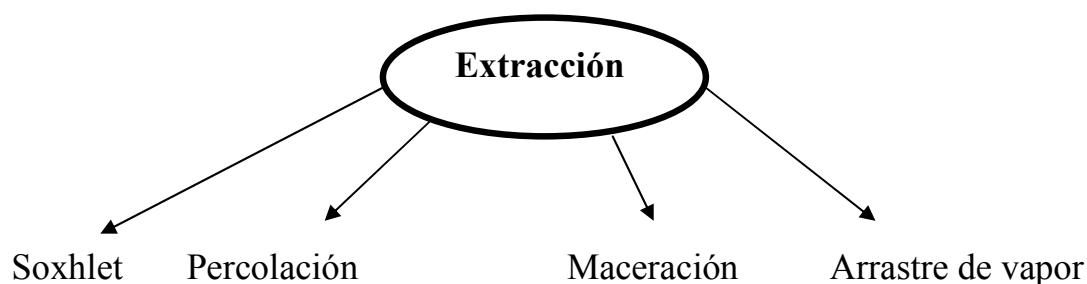
3.2 Análisis fitoquímico:

El análisis fitoquímico tiene como objetivo determinar 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).

Los análisis fitoquímico deben comprender las siguientes etapas.

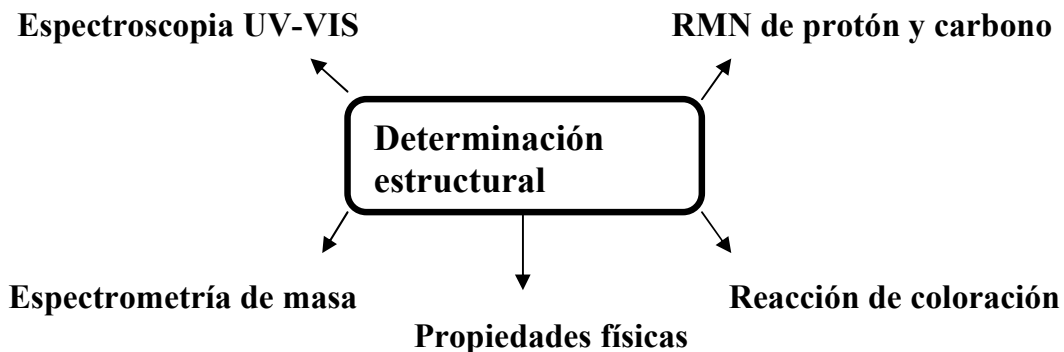
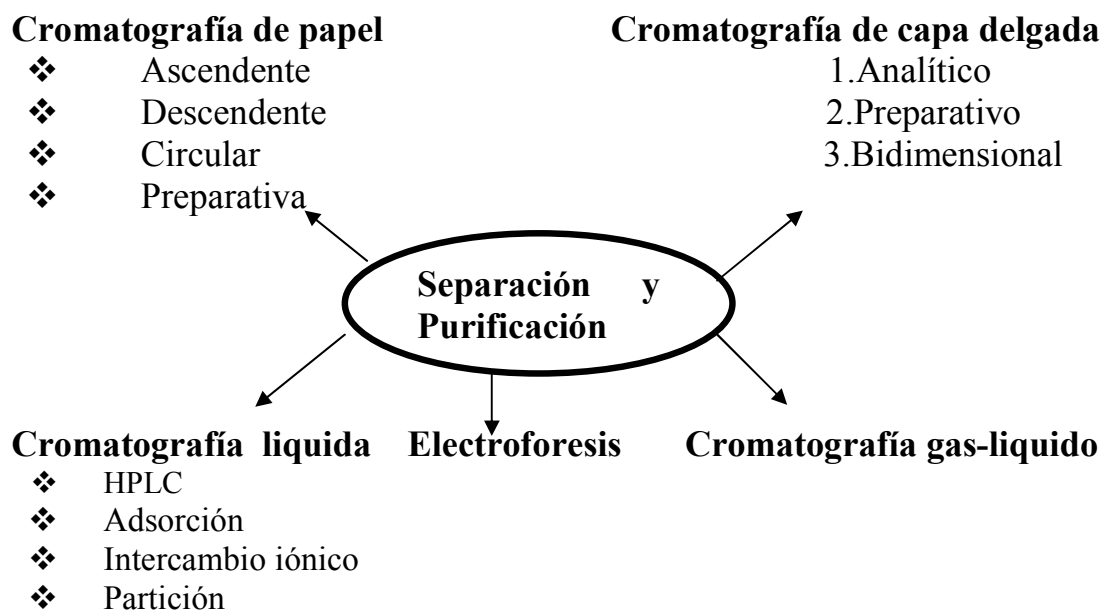
- a. Recolección y clasificación botánica de la especie en estudio.
- b. Extracción, separación, y purificación de los constituyentes químicos de interés.
- c. Determinación estructural.
- d. Ensayos analíticos y químicos (Biológicos farmacológicos).¹²

3.2.1. Técnicas y métodos para el análisis fitoquímico¹³:



¹²De Ugaz O. Análisis fitoquímico y metabolismos secundarios. Cap. IV. pág. 42. [En línea]. Consultado el [8 de febrero 2011]. Disponible en: <http://www.bysde.paho.org/texcom/manuales Mec/fitoterapia/cap4.pdf>

¹³ De Ugaz O. Análisis fitoquímico y metabolismos secundarios. Cap. IV. pág. 42. [En línea]. Consultado el [8 de febrero 2011]. Disponible en: <http://www.bysde.paho.org/texcom/manuales Mec/fitoterapia/cap4.pdf>



4. Métodos de extracción:

La extracción es una de las operaciones básicas del laboratorio. Se define como la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible.

4.1 Extracción por Soxhlet:

4.1.1 Preparación de la muestra:

La operación comienza por la preparación de la muestra, ésta debe ser dividida en fragmentos de mayor a menor tamaño en molino de cuchillas. Con esta muestra así preparada se carga el cartucho de extracción.

Cartuchos de extracción:

Este cartucho consiste en un recipiente cilíndrico con base semiesférica, para que apoye perfectamente en la base del equipo extractor y lograr además que sea más resistente. Los materiales de que están hechos, los más utilizados son el algodón prensado y la porcelana porosa.

La cantidad de muestra se condiciona de acuerdo al tamaño del cartucho y al tamaño del extractor.



Figura 1. Cartuchos de algodón usados para colocar la muestra de material vegetal.

4.1.2 Colocación del solvente:

La cantidad de solvente debe ser la necesaria para que, al ascender al cartucho y antes de que se haga la sifonada, no quede seco el balón inferior y evitar de esta manera, que la muestra se seque y se queme. También se evita que cuando caiga el líquido de la sifonada sobre el vidrio recalentado, se pueda producir una explosión de los vapores con el consiguiente riesgo de accidente.

Si la cantidad de solvente por agregar no está estipulada en la norma, se carga el cartucho con el solvente desde arriba, lentamente, para que vaya cubriendo el cartucho y luego produzca el rechupe; esta es la cantidad mínima. Dado que durante la operación hay pérdida del solvente por evaporación y además debe quedar una cantidad mínima en el balón, para que no haya demasiada concentración del extracto, hay que agregar por lo menos una cantidad semejante en exceso.

4.1.3 Solventes a utilizar:

Si se sigue una norma o técnica obviamente que el solvente estará indicado; pero con frecuencia, particularmente en los laboratorios de investigación, se suelen realizar extracciones no normalizadas. Por eso es conveniente saber el rango de estas sustancias que se pueden utilizar en el extractor Soxhlet. La experiencia que se posee es que hay una temperatura máxima y mínima de ebullición en la que el equipo funciona adecuadamente.

Otra característica importante en cuanto al tipo de solventes es que los de carácter no polar suelen tener alguna dificultad en sifonar puesto que no mojan el vidrio. Ello es frecuente con los derivados clorados, como el diclorometano y el cloroformo, y los hidrocarburos superiores al hexano. En los casos en que se utiliza mezcla de solventes, como en la extracción de la madera, es imprescindible trabajar con mezclas azeotrópicas porque de otra manera la extracción sería heterogénea en cuanto a la composición del

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje fitoquímico.

solvente. En el caso citado se utiliza dos partes de benceno y una de etanol que es prácticamente la del azeótropo, 67,6% y 32, 4% respectivamente.

En la tabla se expone una lista, no exhaustiva, de los solventes más comunes utilizados en las extracciones con Soxhlet.

SOLVENTES	PUNTO DE EBULLICIÓN (C⁰)
Éter	35
Diclorometano	40
Éter de Petróleo	35-50
Cloroformo	62
Metanol	65
Etanol-benceno	65
Hexano	69
Etanol-Tolueno	73
Acetato de etilo	77
Etanol	78
Benceno	80
Ciclohexano	81
Acido Fórmico	101
Tolueno	111

Núñez.C., E. [2008].Extracción con equipo Soxhlet. [En línea]Consultado: [12, diciembre, 2010]. Disponible en: <http://www.ceninez.com.ar>.

4.1.4 Calentamiento:

Con alguna frecuencia sucede que al comienzo de la evaporación el solvente se sobrecalienta y posteriormente produce una evaporación explosiva que hace que gran cantidad de vapores lleguen al refrigerante que no da abasto en la condensación.

4.1.5 Operación de extracción:

Una vez que el equipo está armado, abierta el agua del refrigerante, cargado el cartucho con muestra e introducido el solvente, sólo resta encender el calentador y comenzar la operación. Una vez alcanzada la temperatura de ebullición del solvente, éste comienza a evaporarse luego, de que calienten las paredes del equipo, comienza a condensar en el refrigerante y a caer en forma de gotas sobre el cartucho.

La primera operación es totalmente atípica y no debe contabilizarse en el recuento que se hace para regular la velocidad de extracción, como suelen pedir las normas. A medida que el condensado va cayendo sobre el cartucho, éste comienza a escurrir por la parte inferior del mismo llenando el recipiente de extracción, hasta que llega al nivel de la bajada del sifón y rechupa, con todo el material disuelto, hacia el balón inferior. El tope del sifón está por encima del cartucho, para asegurar que siempre el material a extraer quede embebido en el solvente.¹⁴

¹⁴ Núñez.C., E. [2008].Extracción con equipo Soxhlet. [En línea]Consultado: [12 diciembre 2010]. Disponible en : <http://www.cenunez.com.ar>

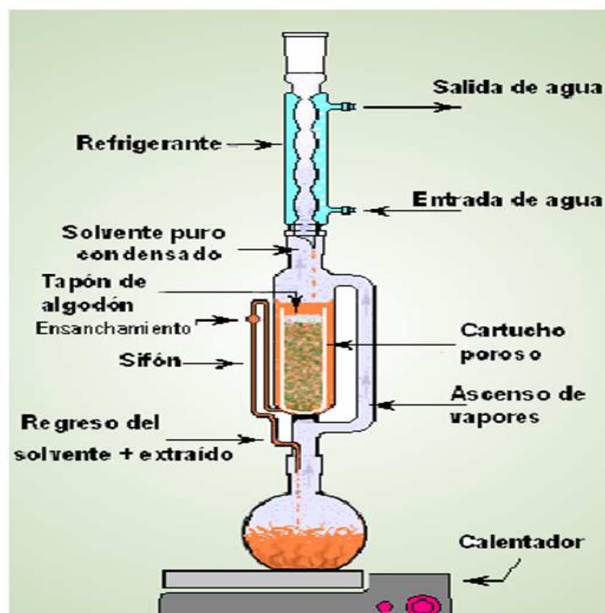


Figura 2. Extracción con Soxhlet en el momento en el que se produce el sifonamiento del solvente. Núñez. C., E. [2008]. Extracción con equipo Soxhlet. [En línea] Consultado: [12, diciembre, 2010]. Disponible en: <http://www.ceninez.com.ar>.

4.2 Arrastre de vapor¹⁵:

La destilación por arrastre con vapor es una técnica usada para separar sustancias orgánicas, insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas; la destilación por arrastre con vapor se lleva a cabo generalmente con la mezcla de un líquido (agua la más común, pero no único) y otra sustancia (sólido o líquido).

Cuando se tienen mezclas de líquidos que no son miscibles entre sí, se tiene un tipo de destilación que sigue la ley de Dalton sobre las presiones parciales; como resultado de este

¹⁵ Destilación. Modificado y consultado [8 febrero 2011] Disponible en: <http://www.Wikipedia.org/wiki/Destilación>.

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje fitoquímico.

comportamiento, y cuando uno de los componentes es agua, al trabajar a presión atmosférica, se puede separar un componente de mayor punto de ebullición que el del agua, a una temperatura menor a 100°.

Debido a lo anterior, con esta técnica se pueden separar sustancias inmiscibles en agua y que se descomponen a su temperatura de ebullición o cerca de ella, por lo que se emplea con frecuencia para separar aceites esenciales naturales, que están constituidos químicamente por terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, etc.) y fenilpropanoides. Además se usa para compuestos que son volátiles, y por lo tanto arrastrables por vapor de agua, que se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas (té limón, menta, canela, cáscaras de naranja o limón, anís, pimienta, etc).

Cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, generado fuera del equipo principal, (por ejemplo en un matraz adecuado), esta técnica recibe el nombre de “destilación por arrastre con vapor”, propiamente dicha.

También se puede usar el llamado “método directo”, en el que el material está en contacto íntimo con el agua generadora del vapor. En este caso, se ponen en el mismo recipiente el agua y el material a extraer, se calientan a ebullición y el aceite extraído es arrastrado junto con el vapor de agua hacia un condensador, que enfría la mezcla, la cual es separada posteriormente para obtener el producto deseado (como se observa en la figura 2).

Una variante de esta última técnica es la llamada “hidrodestilación”, en la que se coloca una trampa al final del refrigerante, la cual va separando el aceite del agua condensada, con lo cual se mejora y se facilita el aislamiento del aceite esencial. También puede montarse como un reflujo, con una trampa de Clevenger, para separar aceites más ligeros que el agua.



Figura 3. Extracción por arrastre con vapor.

4.3 Extracción por reflujo:¹⁶

Es una técnica para extraer y preservar los compuestos esenciales en las especies vegetales; está formado por un condensador que se usa para condensar y retener los compuestos volátiles. Durante el reflujo, la evaporización de la mezcla que se hierve es seguida por la condensación de estos vapores sobre las paredes interiores de un condensador, éste se refrigera con el agua que fluye por una camisa envolvente a su alrededor.

Esta técnica permite retener los compuestos aromáticos volátiles, como aceites esenciales. Algunas veces el reflujo no puede ayudar con la desnaturalización de ciertos compuestos sensibles al calor y a al recalentamiento.

5. Técnicas Cromatográficas.

5.1 Cromatografía:

Según IUPAC, define la cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes, para ser separados, se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es

¹⁶ Destilación. Modificado y consultado [8 febrero 2011] Disponible en <http://www.wikipedia.org/wiki/Destilación>.

Determinación de constituyentes químicos de la *Cordia inermis* mediante tamizaje fitoquímico.

estacionaria, mientras que la otra, fase móvil, se mueve en una dirección definida. Según el estado físico de la fase móvil, se puede hacer una clasificación de la cromatografía así:

- cromatografía líquida (LC)
- cromatografía de gases (GC).

5.2 Cromatografía en papel

La cromatografía en papel es un proceso muy utilizado en los laboratorios para realizar análisis cualitativos ya que, pese a no ser una técnica potente, la fase estacionaria está constituida simplemente por una tira de papel de filtro. La muestra se deposita en un extremo colocando pequeñas gotas de la disolución y evaporando el disolvente, Luego el disolvente empleado como fase móvil se hace ascender por capilaridad. La separación se realiza en función de la afinidad de los solutos con las dos fases, las más solubles en agua se quedarán cerca del punto donde se aplicó la muestra, y las menos solubles en agua, y más solubles en el disolvente, llegarán más lejos. Las sustancias separadas se identifican mediante diversos procedimientos físicos o químico.

La cromatografía en papel es una técnica utilizada para análisis inorgánico cualitativo, permite llevar a cabo la separación e identificación de iones, trabajando con cantidades mínimas de sustancia. Pertenece al tipo de “Cromatografía de partición”, se fundamenta en que las sustancias problemas, pueden tener diferentes coeficientes de reparto en dos disolventes de inmiscibilidad limitada; uno permanece fijo en la superficie del papel “fase estacionaria” generalmente en agua, el otro la fase móvil constituida generalmente por una mezcla de disolventes parcialmente miscibles en ella. Hay varios tipos de cromatografía, la ascendente (papel hacia arriba), descendente (papel invertido), radial, y de separación de zonas y sectores.

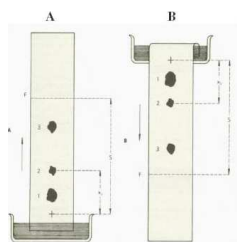


Figura 4. A) Representa la cromatografía ascendente, y, la B) cromatografía descendente.

5.3 Cromatografía en capa fina:

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa uniforme de un adsorbente, mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues, un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el disolvente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.¹⁷

¹⁷ Morante. Z., S. Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de proceso de síntesis simétrica. (2007).

6. Determinación de los principales metabolitos secundarios de planta:

6.1 Alcaloides:

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases de vegetales nitrogenadas, con acción fisiológica más o menos intensa sobre los animales. Hay unos cuantos alcaloides de nitrógeno amínico que son neutros, como la colchicina, recinina, rutacarpina. Sin considerar la cafeína, y la teobromina, las bases puricas y pirimidicas están excluidas del grupo de los alcaloides por carecer de acción farmacológica notables.

La mayoría de los alcaloides son sólidos incoloros, aunque algunos como la conona, y la nicotina son líquidos, otros amarillos como la berberina, o rojos como la queliretrina. La mayoría de los alcaloides se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos. En ciertas plantas puede haber un ácido especial asociado a los alcaloides; así, el ácido quinico está unido a los alcaloides de la quinina.

Aislamiento: La propiedad química más característica de los alcaloides es su basicidad (excepto, recinina, colchicina). Por lo que los métodos para aislarlos, purificarlos e identificarlos por lo general se aprovechan por su basicidad. Aunque muchos alcaloides pueden extraerse con disolventes neutros, como alcoholes y cloroformo, soluciones de ácidos en agua, con lo que se separan los alcaloides y sus sales.

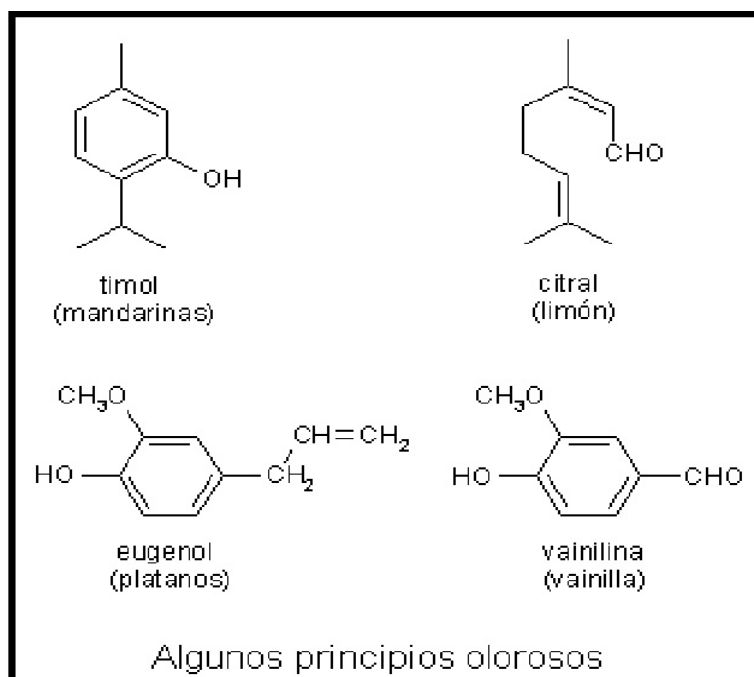
Reacción de coloración: Las soluciones de varios ácidos de metales pesados, como la sílico-tungstico, cloroplatínico, fosfomolibdico, forman precipitados con la mayoría de los alcaloides, igualmente el mercuri-yoduro de potasio (Reactivo de Mayer). Los anteriores soluciones, preparada en condiciones específicas, forman parte de los llamados reactivos de alcaloides, aunque los precipitados también pueden ser causados por proteínas, betaínas, purinas, y cumarinas, y algunos polifenoles. Como la ausencia de precipitados es indicativa de que no hay alcaloides, se usan reactivos como prueba presuntiva de su presencia.

6.2 Esteroides y triterpenoides:

Los esteroides son alcoholes sólidos con C_{27} a C_{29} , de origen animal. (Colesterol) aunque reportado en algas rojas coprosterol o vegetal (fitosteroides B sitosterol), ergosterol, estigmasterol, cuyo esqueleto fundamental corresponde al ciclohexanoperhidrofenantreno, común en todos los esteroides una cadena lateral en la que se puede insertar radicales metilos o etilo, particularmente en C-24. Se localizan en la plantas de forma libre, como ésteres o como glicósidos.

Aislamiento: Los extractos con disolvente son polares como el éter de petróleo, bisulfuro de carbono, cloroformo, éter etílico, contienen esteroides y sus ésteres junto con otros lípidos, carotenoides y lecitina. Para separarlos se saponifica este extracto y luego se sacan de la solución con un solvente no polar. Posteriormente se separan del insaponificable por cristalización fraccionada, cromatografía o precipitación con digitonina.

Reacciones de coloración: No hay reacciones verdaderamente específicas para esteroides y metilesteroides, ya que otro tipo de sustancia tales como glicósidos cardiotónicos, esteroalcaloides y di y triterpenos, saponinas; también las dan por contener detalles estructurales comunes o análogos.

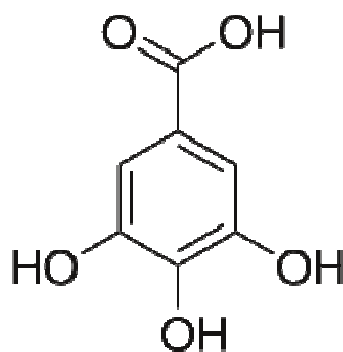
Determinación de constituyentes químicos de la *Cordia inermis* mediante tamizaje

Ejemplos de estructuras de terpenos.¹⁸

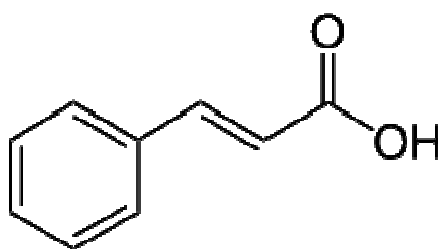
6.3 Taninos:

Estos polifenoles tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas. Por esta razón, la prueba más empleada para la detección de este grupo de metabolitos secundarios emplea el reactivo FeCl₃ a los extractos etanólico y acuoso, el cual produce una coloración verde, azules o negras tras la adición de dicho reactivo.

¹⁸ Trease y Evans. Farmacognosia. Ácidos grasos. 13a edición. Pág. 331.



Acido gálico

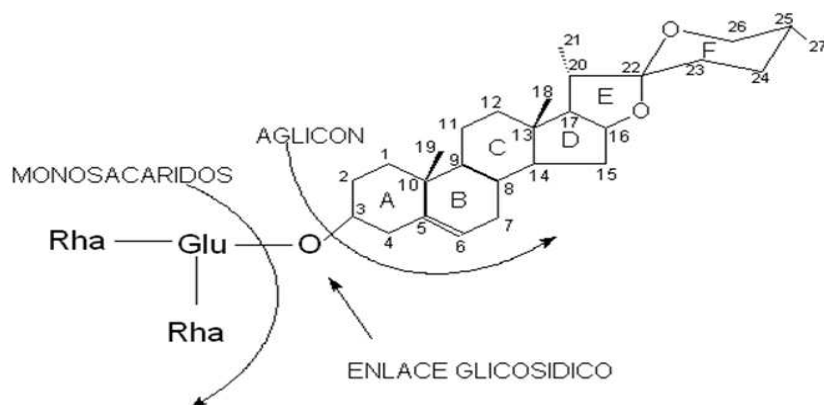


Acido cinámico

6.4 Saponinas:

Se le da el nombre de saponinas (del latín: Sapon = jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta: por lo tanto, al sacudir sus soluciones, se forman una espuma abundante, y relativamente estable.

Aislamiento: Las saponinas son sustancias muy polares y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molécula.



Estructura básica de las Saponinas.

6.5 Agentes reductores:

Son azúcares reductores todos los monosacáridos y muchos disacáridos (monolactona, celobiosa, y gentobiosa) entre los disacáridos (sacarosa, trealosa).

Los monosacáridos y la mayoría de los disacáridos poseen poder reductor, que deben al grupo carbonilo que tienen en su molécula. Este carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de una reacción redox llevada a cabo entre ellos y el sulfato de Cobre (II). Las soluciones de esta sal tienen color azul. Tras la reacción con el glúcido reductor se forma óxido de Cobre (I) de color rojo. De este modo, el cambio de color indica que se ha producido la citada reacción y que, por lo tanto, el glúcido presente es reductor.

6.6 Almidón:

El almidón es un polisacárido vegetal constituido por dos polímeros: la amilosa y amilopeptina. La amilosa está constituida de largas cadenas lineales de glucosa unidas en enlace glicosídico alfa. Estas cadenas no poseen un tamaño determinado sino que pueden variar desde unos miles de unidades de glucosa hasta un millón. Por otro lado, la

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje fitoquímico.

amilopeptina posee, al igual que la amilosa, cadenas lineales de glucosa unidas en enlace alfa 1,4 pero además posee una gran cantidad de ramificaciones, las cuales se presentan cada 24 a 30 residuos de glucosa y en enlace glicosídico alfa 1,6.

Reacción de coloración: La amilosa se colorea de azul en presencia de yodo no debido a una reacción química sino a una reacción física mediante la adsorción o fijación de yodo en la superficie de la molécula de amilosa, lo cual sólo ocurre en frío. Como reactivo se usa una solución denominada lugol que contiene yodo y yoduro potásico. Como los polisacáridos no tienen poder reductor, la reacción de Fehling da negativa.

La aparición de una coloración azul indica la presencia del almidón y una coloración roja, indica el glucógeno o eritrodextrina.¹⁹

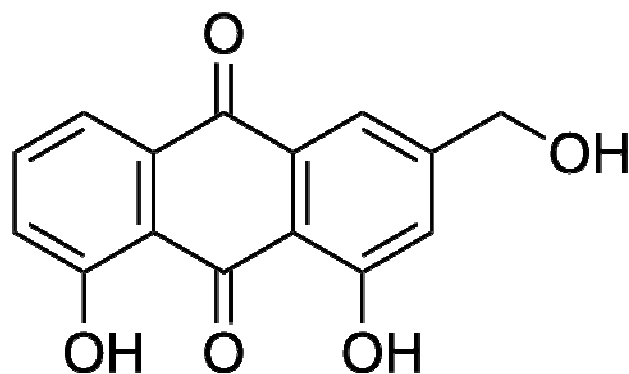
6.7 Emodinas:

Los derivados antraquinónicos suelen ser compuestos de color rojo-anaranjado, que en ocasiones pueden observarse in situ, (como ocurre en los radios medulares del ruibarbo y cascara sagrada). Por lo general son solubles en agua caliente o alcohol diluido. El ensayo de Borntraiger suele emplearse para su detección. La droga pulverizada se macera con un disolvente orgánico no miscible (se recomienda el éter), se filtra y se añade hidróxido amónico o sosa cáustica en disolución acuosa, apareciendo en la capa acuosa, tras agitación, un color rosa, rojo o violado, que indica la presencia de derivados antraquinónicos libres. Si solo existen heterósidos, el ensayo debe modificarse; hidrolizando previamente con solución alcohólica de hidróxido potásico o ácido 2M. Si se añade un álcali a las drogas pulverizadas o a cortes, el color rojo producido sirve para

¹⁹ Domínguez, X. (1973). Métodos de investigación Fitoquímica. Pág.: 130-132. Ed.AID (agencia para el desarrollo internacional, México Buenos Aires).Monterrey, México.

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje

localizar en los tejidos los derivados antraquinónicos (en los radios medulares de la corteza de cáscara sagrada).²⁰



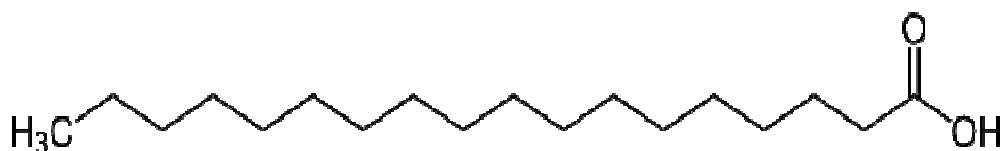
Antroquinonas

Estructura de Emodinas.

6.8 Ácidos grasos:

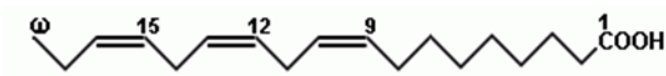
Un ácido graso es una biomolécula orgánica de naturaleza lipídica formada por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de número par de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble. Al átomo de su extremo le quedan libres tres enlaces que son ocupados por átomos de hidrógeno (H₃C-). Los demás átomos tienen libres dos enlaces, que son ocupados igualmente por átomos de hidrógeno (-CH₂-CH₂-CH₂-).

En general (aunque a veces no), podemos escribir un ácido graso genérico como R-COOH, en donde R es la cadena hidrocarbonada que identifica al ácido en particular.

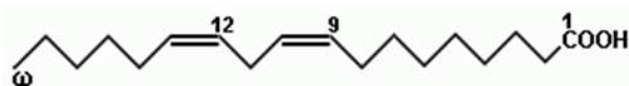


Acido Esteárico

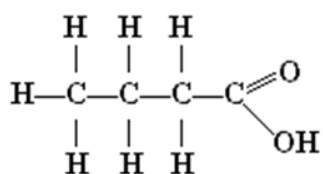
²⁰ Trease y Evans. Farmacognosia. emodinas. 13a edición.



Ácido alfa-Linolénico



Ácido Linoléico



Ácido Butírico

21

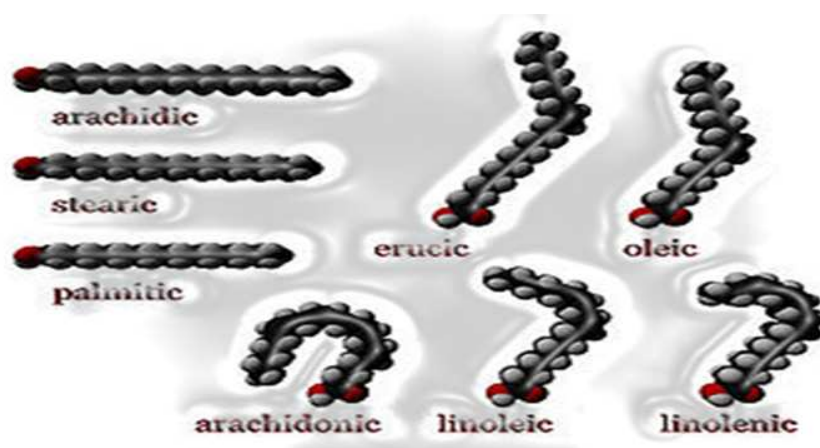


Figura 5. Ejemplos de Ácidos grasos. [wikipedia.org/wiki/Ácido_graso](http://www.wikipedia.org/wiki/Ácido_graso).

²¹ Ácidos grasos. consultado [01 junio 2011]. Disponible en http://www.wikipedia.org/wiki/Ácido_graso.
 Aceites y grasas. Consultado [01 junio 2011]. Disponible en <http://www.scientificpsychic.com/fitness/aceites-grasas.html>

7. MATERIAL Y MÉTODO

Método:

Tipo de estudio: Experimental de corte transversal, realizado en periodo de septiembre 2010 – Enero 2011.

Área de estudio:

El área de estudio del presente trabajo experimental, es el departamento de la facultad de Ciencias Químicas, específicamente el laboratorio ubicado en el área de farmacognosia, unidad de productos naturales, departamento de farmacia industrial.

Universo:

Nuestro universo de estudio son las especies pertenecientes al género *Cordia*.

Muestra:

200 gr hojas de la especie vegetal *Cordia inermis*.

Unidad de análisis:

Se trata de determinar los constituyentes químicos presentes en las hojas secas de la especie *Cordia inermis*.

Tipo de muestreo:

Aleatorio simple.

Criterio de selección:

1. Como unidad de análisis se tomó una muestra de hojas secas de la especie vegetal *Cordia inermis*, para determinar los compuestos químicos.
2. No se tomaron como muestras otras partes de la planta tales, como: el tallo, flores y frutos debido a que estas no son de interés para nuestro estudio.

7.1. Variable y Operacionalización de las variables:

- Extracto etéreo, alcohólico y acuoso.
- Concentración.
- Tamizaje fitoquímico.
- Constituyentes químicos.
- Reactivos colorimétricos y precipitantes.

Variable	Definición	Medición	Indicador
Extracto etéreo	Consiste en someter la muestra exenta de agua (deshidratada) a un proceso de extracción continua (o método de Soxhlet) utilizando como extractante éter etílico.	Presencia de principios activos.	Coloración y precipitación característica.
Extracto alcohólico	Consiste en someter una determinada muestra exenta de agua a un proceso de extracción con Soxhlet con el volumen adecuado de etanol (alcohol etílico) de 70°.	Presencia de principios activos.	Coloración y precipitación característica.
Extracto acuoso	Preparación en agua de la sustancia de una planta que contiene la porción biológica activa sin el residuo celular.	Presencia de principios activos.	Coloración y precipitación característica.

7.2. Procedimiento de la marcha sistémica:

Se extrae la droga seca y molida, utilizando un soxhlet. El residuo se seca y se extrae, en soxhelt, con alcohol. Finalmente, la droga se extrae con agua, bajo reflujo. los extractos etéreo, alcohólico y acuoso se someten a una secuencia de pruebas químicas.

Extracto etéreo:

El extracto obtenido se concentra hasta un volumen final de 200 ml y se divide en dos alícuotas, una de 20 ml y la otra de 180ml.

1. Separar 20 ml, evaporar hasta sequedad y disolver el residuo en 20 ml de alcohol. Fracción A.
2. Concentrarlos 80 ml restantes a 50 ml. Fracción B.

Pruebas realizadas en la Fracción A:

- 10 ml. Evaporar hasta que este completamente seco.
- Destilar con arrastre de vapor con éter (2X20 ml) TLC-Hexano/éter8:2.
- 40ml. Adicionar 10ml KOH 0.5M refluja por dos horas y luego se adiciona 20ml de agua. Evaporar el etanol y extraer 3x10ml con éter.

Fase etérea:

- Tomar alícuota de 15ml y agregar reactivo de Liebermann-Buchard (+) = Esteroles y Triterpenos.

Fase acuosa:

- Acidificar (pH 3-4) y extraer 2x10ml éter.
- Evaporar hasta que este completamente seco. Formación de residuos con cristales (+) = ácidos grasos.

Pruebas efectuadas en la fracción B.

- Concentrar hasta 50 ml.
- 10 ml. Evaporar resolver residuo en 3ml de HCl al 2%. Dividir en 3 porciones: a) control; b) Mayer; c) Ac. Silico-Túnsigtico. Precipitación en b) y c) indica presencia (+) para alcaloides.
- 5 ml. Evaporar. Disolver residuo en 2ml de MeOH caliente. Adicionar limaduras de magnesio+ 1 ml de HCl concentrado. Después de 10 min. Se presenta la coloración rojiza. (+) Aglicona de flavonoides.
- 5 ml. Evaporar. Disolver el residuo en 1 ml de agua hirviendo. Aplicar, con un capilar, 2 manchas de papel filtro. Aplicar, en una de las manchas, 1 gota KOH 0.5 M. Observar fluorescencia a 366nm. (+) Cumainas.
- 5 ml. Evaporar. Disolver el residuo en 1ml de CHCl₃. Adicionar el reactivo de Liebermann- Buchard. Anillo verde. Interface color marrón. (+) Triterpenos /esteroles.
- 5 ml. Evaporar. Disolver residuo en 1 ml de NH₄OH 25 %. Coloración roja. (+) Emodinas.

Extracto Alcohólico.

- Concentrar a 200ml. Dividir en dos alícuotas de 100ml.
- Concentrar una de ellas a 30 ml- Fracción E₁.
- Concentrar la otra alícuota a 50 ml- Fracción E₂.

Pruebas realizadas con la Fracción E1.

- 5 ml + 2ml de agua.
- 5 gotas de solución de FeCl₃.
- Color azul: Taninos gálicos.
- Color verde: Taninos catèquicos.

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje

- 5 ml + 2 ml de agua + 2 ml de r. de Fehling. Reflujo por 30 minutos.

Precipitado rojo ladrillo: (+) compuestos reductores.

- 20 ml. Evaporar. Disolver e residuo en 20 ml de HCl 10%. Retirar 3 ml.

Muestra 1.

Alcalinizar los 17 ml de restantes hasta pH 9.

Extraer con 3x 10 ml de éter.

Evaporar la fracción etérea.

Disolver el residuo en 3 ml de HCl 10%.

Muestra 2.

Dividir 1 y 2 en tres tubos de ensayo cada una a) control; b) R. Mayer; c) Ac. Silicotúngstico.

Precipitación en los tubos b) y c) indica presencia (+) para Alcaloides.

Pruebas realizadas en la fracción E2.

- 50 ml de extracto. Adicionar 20 ml HCL20%. Colocar el reflujo por 20 minutos. Adicionar 20 ml de agua. Evaporar hasta 30 ml. Extraer 3 X 20 ml éter. Separar la fase etérea de acuosa.

Fase acuosa acida:

- Presenta color rojizo. Elevar PH A 9-10. Coloración verde-castaño o azul. (+)= antocianinas.

Fase etérea- 60ml. Concentrar a 30ml.

-5 ml. Concentrar a 1ml. Aplicar 2 manchas en el papel filtro. Sobre una de las manchas aplicar una gota de KOH. Observar utilizando luz UV a 366nm. Fluorescencia (+) = cumarinas.

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje fitoquímico.

- 5 ml evaporar. Disolver residuo en 3ml NH₄ OH 25% coloración roja. (+) Antracénosidos.
- 10 ml evaporar. Disolver residuo en MeOH 50%. Disolver limaduras de Mg y 1ml HCL. Esperar 10min. Coloración roja. (+) Flavonoides.
- 10 ml evaporar. R. Lieberman- Buchard (+) Esteroles/Triterpenos.

Extracto acuoso

- 200 ml. Dividir en dos alícuotas de 100ml. Una de las alícuotas se utiliza en las pruebas abajo citadas (fracción AQ1). A la segunda alícuota se le adiciona 20ml de ácido clorhídrico concentrado y se calienta hasta alcanzar su punto de ebullición, bajo reflujo, durante 30 min (fracción AQ2)

Pruebas realizadas en la fracción AQ1.

- 5ml +3ml H₂O 2 gotas R. Lugol coloración azul (+) almidón
- 5ml. Evaporar hasta sequedad +5 gotas H₂SO₄ concentrado +3-4 gotas de timol. (+) Polisacáridos
- 5ml +10ml acetona 2 gotas hematoxilina agitar y filtrar. Precipitado violeta: (+) mucilagos.
- 5ml +45ml H₂O. Agitar 10min. Espuma persistente por 20min. (+) Saponinas.
- 5ml +1ml sol. Fehling reflujo 30min. Precipitado color ladrillo (+) compuestos reductores.
- 3ml+2ml H₂O.adicionar 3-4 gotas FeCl₃ coloración azul. (+) Taninos gálicos coloración verde (+) taninos catèquicos.
- 30ml +NH₄OH hasta PH 9. Extraer 3x30 ml éter. Evaporar hasta sequedad. Disolver residuo en 10ml HCL 10%. Disolver en 3 tubos de ensayo: a) control; b) R. Mayer, c) ácido Sillico – Tungstico. Precipitación en los tubos b) y c) (+) alcaloides.

Pruebas realizadas con la fracción AQ2

En esta fracción se realizan las mismas pruebas descritas para la fracción A2

8. Materiales

8.1 Equipo en el tamizaje fitoquímico:

- Sistema de extracción Soxhlet.
- Sistema de extracción por reflujo.
- Horno.
- Balanza analítica (Santorius TE2145018350137).
- Rota evaporador.
- Cocina de plato.
- Bomba de vacío.

8.2 Cristalería:

- Tubo de ensayo de vidrio Pyrex.
- Balones de 50 ml y 100 ml Pyrex.
- Embudo separador de 250 ml y 500 ml Pyrex.
- Beakers de 100 ml, 250 ml y 1000 ml Pyrex.
- Probeta de 50 ml y 100 ml Pyrex.
- Pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml Pyrex.
- Espátula y agitador de vidrio.

9. Preparación de reactivos químicos reveladores.

❖ Reactivo de Meyer:

Disolver 1.35g de cloruro de mercurio en 60ml de agua (1), disolver 7g de yoduro de potasio en 20ml de agua (2), mezclar la parte 1y 2, agitar y filtrar.

❖ Reactivo de Fehling:

Preparar una solución A que debe tener 34.65g de cloruro de mercurio en 500ml de agua, preparar solución B, debe tener 173g de bitartrato sódico sodio de potasio y 125 g de hidróxido de potasio en 500ml de agua y luego mezclar cantidades iguales de ambas soluciones.

❖ Reactivo Liebermann –Burchard:

Mezclar un 1 ml de cloroformo y 1 ml de anhídrido acético y 3-4 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Determinación de constituyentes químicos de la *Cordia inermis* mediante tamizaje fitoquímico.

- ❖ **Ácido sálico túnsgtico al 20% p/v:**
Disolver 10g de ácido sálico túnsgtico en 50ml de agua.
- ❖ **Reactivo de Lugol:**
Mezclar 1 g de yodo con 2 g de yoduro de potasio, disolver en 300 ml de agua y guardar en botella oscura.
- ❖ **Hidróxido de potasio 5N:**
Disolver 2.8g de KOH en 100ml de agua, agitar hasta homogeneidad.
- ❖ **Timol:**
Disolver 0.1 g de Timol en 100 ml de alcohol.

10. Caracterización taxonómica:

La especie vegetal *Cordia inermis* seleccionada, se evaluó previamente con el ensayo de antioxidante realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN –León en el año 2009; comprobando que la especie vegetal posee actividad antioxidante.

11.Resultados

En la Tablas (1,2 y 3) se presentan los resultados obtenidos luego de hacer el análisis fitoquímico preliminar de las hojas secas de la especie vegetal de *Cordia inermis*.

Tabla 1. Análisis de hojas de Achopaste/Cuajantita (*Cordia inermis*).

Resultado del análisis fitoquímico preliminar de las hojas secas de *Cordia inermis*.

<u>Extracto etéreo</u>			
Metabolitos	Prueba	Resultado	
Ácidos grasos	Fracción A	Formación de cristales	
	Extracto acuoso		
	Fase acuosa		+++
	Fase etérea		-
	Extracto etéreo		-
Esteroles y triterpenos	Fracción B	Liebermann –Burchard	+++
Aglicona de Flavonoides	Fracción B	Limadura de Mg	-
Alcaloides	Fracción B	Mayer	-
		Sillico-tungstico	-
Cumarinas	Fracción B	KOH	-
Emodinas	Fracción B	NH ₄ OH	-
Carotenoides	Fracción B	Carr-price *	*

Leyenda:

(+++) Presencia abundante.

(-) No detectado.

(*) No se realizó.

Tabla 2. Análisis de hojas de Achopaste/Cuajantita (*Cordia inermis*).

Resultado del análisis fitoquímico preliminar de las hojas secas de *Cordia inermis*.

<u>Extracto alcohólico</u>			
Metabolitos		Pruebas	Resultados
Taninos gálicos	Fracción E ₁	FeCl ₃	-
Taninos catéquicos	Fracción E ₁	FeCl ₃	-
Agentes reductores	Fracción E ₁	Fehlling	+++
Alcaloides	Fracción E ₁	R. Mayer	-
		R. silico-tunstico	-
Antracenosidos	Fracción E ₂	NH ₄ OH	-
Cumarinas	Fracción E ₂	KOH	-
Flavonoides	Fracción E ₂	Limaduras de Mg	-
Esteroles y triperpenos	Fracción E ₂	R. Liebermann –Burchard	-

Leyenda:

(+++) Presencia abundante.

(-) No detectado.

Determinación de constituyentes químicos de la *Cordia inermis* mediante tamizaje fitoquímico.

Tabla 3. Análisis de hojas de Achopaste/Cuajantita (*Cordia inermis*).

Resultado del análisis fitoquímico preliminar de las hojas secas de *Cordia inermis*.

<u>Extracto acuoso</u>			
Metabolitos	Pruebas		Resultados
Taninos gálico y catéquicos	Fracción A ₁	FeCl	-
Polisacáridos	Fracción A ₁	Etimol	-
Mucilagos	Fracción A ₁	Hematoxilina	+++
Saponinas	Fracción A ₁	Agua	+++
Almidón	Fase etérea de la fracción A ₁	Lugol y KI	-
Taninos gálicos y catéquicos	Fracción A ₂	FeCl ₃	-
Alcaloides	Fracción A ₂	R.Mayer	-
		Ac. Sillico-Túnsztico	-
Agentes reductores	Fracción A ₂	Fehling	+++
Aglicona de Flavonoides	Fase etérea de la fracción A ₂	Limadura de magnesio	-
Alcaloides	Fase etérea de la Fracción A ₂	Mayer	-
		Ac. Sílico-Túnsztico	-
Esteroles y/o Triterpenos.	Fase etérea de la Fracción A ₂	Liebermann –Burchard	+++
Cumarinas	Fase etérea de la fracción A ₂	KOH	-
Emodinas		NH ₄ OH	+++

Legenda: (+++) Presencia abundante, (-) No detectado.

12. Análisis de los resultados:

La metodología seguida para este análisis fue previamente descrita por Domínguez (1973), para observar la detección de los metabolitos secundarios generalmente relacionados con actividades biológicas de las plantas.

De los resultados consignados en la Tabla 1, en relación a los hojas evaluadas de la especie *Cordia inermis*, la presencia de ácidos grasos, fue el compuesto químico que se notó únicamente en la fase acuosa del extracto éter en donde se formaron cristales, también en el estudio se logró identificar esteroides y/o terpenoides con la prueba comúnmente usada del reactivo de Liebermann-Burchard que consiste en (mezcla de 1ml de anhídrido acético, 1ml de cloroformo, enfriado, y unas gotas de H₂SO₄). Una porción de este reactivo se pone en contacto con la sustancia o su solución clorofórmica. Se considera resultado positivo si bajo estas condiciones aparecen manchas en cualquier tonalidad del rojo, azul o verde. etc., los que combinan con el tiempo; la prueba es positiva. El orden y el tiempo de aparición tiene cierto valor diagnóstico; así una coloración amarilla después de 15 minutos parece corresponder a C-14 metilo y a una Δ^7 - insaturación.

La prueba es positiva con esteroides que contienen 2 enlaces dobles conjugado, que los que puedan formar por 1 ó 2 deshidrataciones con isomerización, o con isomerización

Según lo observado, en el análisis la aglicona de flavonoides, emodinas, alcaloides y cumarinas, no se observaron en este extracto puesto que en ninguno de los fraccionamientos etéreos se observaron manchas según la pruebas de identificación.

Respecto a los resultados de la tabla 2 del extracto etanólico, la presencia de agentes reductores se contempló mediante una reducción positiva del reactivo de Fehling que consistió en que a una solución caliente del extracto etanólico se le añadió gota a gota, una mezcla de partes iguales de la solución fehling, su reducción apareció acerca del punto de ebullición y se apreció un precipitado rojo-ladrillo de óxido cuproso. El ensayo con

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje fitoquímico.

Fehling se funda en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído. Éste se oxida a ácido y reduce la sal de cobre (II) en medio alcalino a óxido de cobre (I), que forma un precipitado de color rojo. Un aspecto importante de esta reacción es que la forma aldehído puede detectarse fácilmente aunque exista en muy pequeña cantidad. Si un azúcar reduce el licor de Fehling a óxido de cobre (I) rojo, se dice que es un azúcar reductor. Al reaccionar con monosacáridos, se torna verdoso; si lo hace con disacáridos, toma el color del ladrillo.

Por otra parte la presencia de taninos, alcaloides, antracénósidos, cumarinas, flavonoides y esteroides y/o Triterpenos no fueron posible detectarse debido a que ninguno produjo manchas en su identificación.

En cuanto a la detección de metabolitos secundarios en la tabla 3 del extracto acuoso, la presencia de saponinas, se identificó con la prueba de espuma que consistió que a 1 ml del extracto se la agrego 2 ml de agua hirviendo y se agito por 20 minutos, en esta prueba se disminuye la tensión superficial y se observó la formación de espuma considerable y de forma estable. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente saponina, que consiste en un núcleo esteroide o triterpénico; esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensioactivos. Aprovechando esta propiedad, la prueba más empleada en la detección de saponinas es la de formación de espuma.

Además se detectaron esteroides y/o triperpenos mediante la prueba de Liebermann-Burchard, el fuerte cambio de coloración verde indica una posible concentración alta en la hojas, además se aseguró la presencia agentes reductores por una reducción de fehling en la que demuestra que se encuentran en esta especie, y por su alto contenido de precipitado rojo se cree que su concentración en hojas es alta; además se dio la presencia de emodinas, dicha prueba consistió en añadir 1 ml hidróxido amónico al 25 % al extracto seco, apareciendo en la capa acuosa, tras agitación, un color rosa, rojo o violado, que indica la presencia de derivados antraquinónicos libres. Si solo existen heterósidos, el ensayo debe

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje fitoquímico.

modificarse; hidrolizando previamente con solución alcohólica de hidróxido potásico o ácido 2M.

También se detectaron mucílagos en el que se evidenció con la aparición de la coloración violeta tras la adición de hematoxilina. Grupos como los taninos gálicos y catèquicos, polisacáridos, almidón, alcaloides, aglicona de flavonoides y cumarinas no fueron detectados en este extracto.

De esta manera se han detectado importantes metabolitos que se supone que podrían servir para la elaboración de productos fitoquímicos.

13. Conclusión

Con esta investigación se concluye que la identificación fitoquímica efectuada sobre la muestra de hojas de la especie vegetal *Cordia inermis*, se evidenció principalmente la presencia de los siguiente metabolitos : agentes reductores , esteroles y/o terpenoides, ácidos grasos, mucílagos, saponinas y emodinas, sin embargo en la identificación no se demostró resultados positivos para los demás metabolitos tales como; taninos gálicos o catéquicos, Aglicona de Flavonoides, alcaloides, cumarinas, almidón, polisacáridos, carotenoides en ninguno de los extractos fraccionados de dicho estudio. Por lo tanto este estudio permitirá seguir realizando futuras investigaciones sobre los posibles metabolitos con actividad biológica.

14. Recomendaciones:

- Realizar el tamizaje fitoquímico para las demás partes de la Achopaste/ Cuajantita (tallo, flores, frutos y semilla), ya que esta en sus hojas demostró que tiene muchas metabolitos secundarios de importancia farmacéuticas e industriales que aún no han sido explotados, que pueden servir para la elaboración de formas farmacéuticas .
- Aplicar a la misma especie un bioensayo dirigido, a fin de conocer con profundidad la actividad Bilógicos farmacológicos de sus compuestos químicos, y así tener la certeza de las posibles enfermedades que se podrían tratar.
- Desarrollar una futura investigación dirigida a la cuantificación y determinación estructural de los metabolitos encontrados en dicho estudio, para que se determine la concentración de cada uno de ellos en las hojas de la planta.
- Esta investigación puede ser utilizada como una guía práctica para la realización de otros tamizajes fitoquímicos en plantas que se observe potencial en su aprovechamiento medicinal.

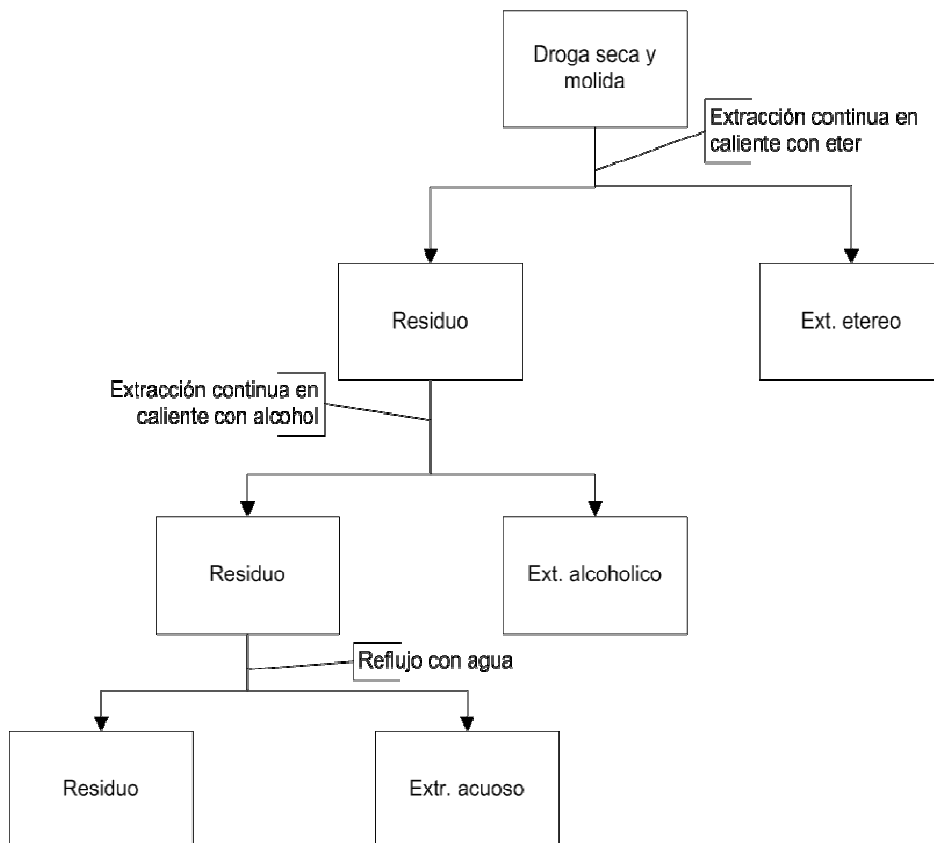
Referencia Bibliográfica:

1. De Ugaz, Olga Lock. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Cap. IV (pp. 41-42). Pontificia universidad católica de Perú.
2. Sharapin, N., Machado, R., L., y Pinzón S., R. Fundamentos de tecnología de productos fitoquímicos. (2000). CYTED (Organización). Subprograma de Química Fina Farmacéutica, Convenio Andrés Bello (Organización). pp.198.
3. Martínez, E., A., L. Y Sandoval, E., J., C. (2004). Determinación de constituyentes químicos en las hojas de *Cissus verticillata* L. por medio de un screening fitoquímico. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, Nicaragua.
4. Klinger, R., C., J. (Diciembre 2004). Estudio ecológico, silvícola y usos del laurel rojo (*Cordia gerascanthus* L.) En bosques Latiofoliados de Honduras. Proyecto de grado para optar título de licenciatura. Universidad Zamorano, Honduras.
5. Germosén, R., L. (1998). Farmacopea vegetal caribeña. Edit. universitaria. León, Nicaragua.
6. Boraginaceae. Extraído [01 noviembre]. Disponible en: <http://www.ville-g.ch/cjb/fdp/claves/pdf/bora.pdf>.
7. Germosén, R., L. (1998). Farmacopea vegetal caribeña. Edit. universitaria. León, Nicaragua.
8. Centro para la Investigación de la Anatomía de la Madera (en línea). Consultado el 01 de julio de 2004. Disponible en http://www2.fpl.fs.fed.us/TechSheets/Chudnoff/TropAmerican/pdf_files/cordia1new.pdf.
9. Germosén, R., L. (1998). Farmacopea vegetal caribeña. Edit. universitaria. León, Nicaragua.
10. Ruiz y Pavón. (2009). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Aguardientillo. *Cordia alliodora*. Extraído el 21 de septiembre del 2010 desde <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mex.com>.
11. Fitoterapia. [2006], Primer congreso iberoamericano de fitoterapia. Vol.6. Suplemento.

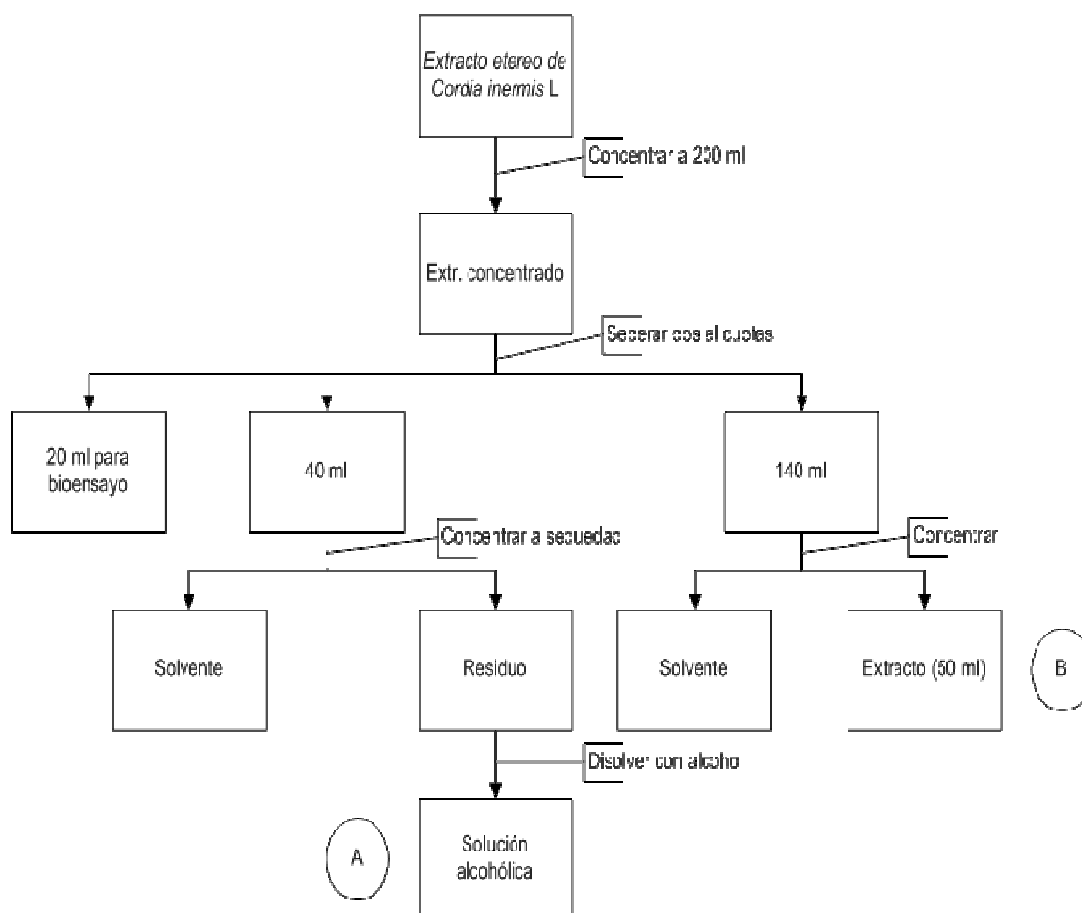
- 12,13. De Ugaz O. Análisis fitoquímico y metabolismos secundarios. Cap. IV. pág. 42. [En línea]. Consultado el [8 de febrero 2011]. Disponible en: [http://www.bysde.paho.org/texcom/manuales Mec/fitoterapia/cap4.pdf](http://www.bysde.paho.org/texcom/manuales/Mec/fitoterapia/cap4.pdf)
14. Núñez.C., E. [2008]. Extracción con equipo Soxhlet. [En línea] Consultado: [12 diciembre 2010]. Disponible en: <http://www.cenunez.com.ar>
- 15,16 Destilación. Modificado y consultado [8 febrero 2011] Disponible en: <http://www.Wikipedia.Org/wiki/Destilación>.
17. Morante. Z., S. Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de proceso de síntesis simétrica. (2007).
18. Domínguez, X. (1973). Métodos de investigación Fitoquímica. Pág.81-88,111-115,139-142.149-153,211-218.Ed.AID (agencia para el desarrollo internacional, México Buenos Aires).Monterrey, México.
19. Trease y Evans. Farmacognosia.Emodinas. 13a edición.
20. Ácidos grasos. Consultado [01 junio 2011]. Disponible en [http // www.wikipedia.org/wiki/Ácido_graso](http://www.wikipedia.org/wiki/Ácido_graso). Aceites y grasas. Consultado [01 junio2011]. Disponible en [http // www.scientificpsychic.com/fitness_aceites-grasas.html](http://www.scientificpsychic.com/fitness_aceites-grasas.html).
21. Trease y Evans. Farmacognosia. Ácidos grasos. 13a edición. Pág. 331. Varro E. Tyler. Farmacognosia. Taninos gálicos. Pág. 93 y 173.

ANEXOS

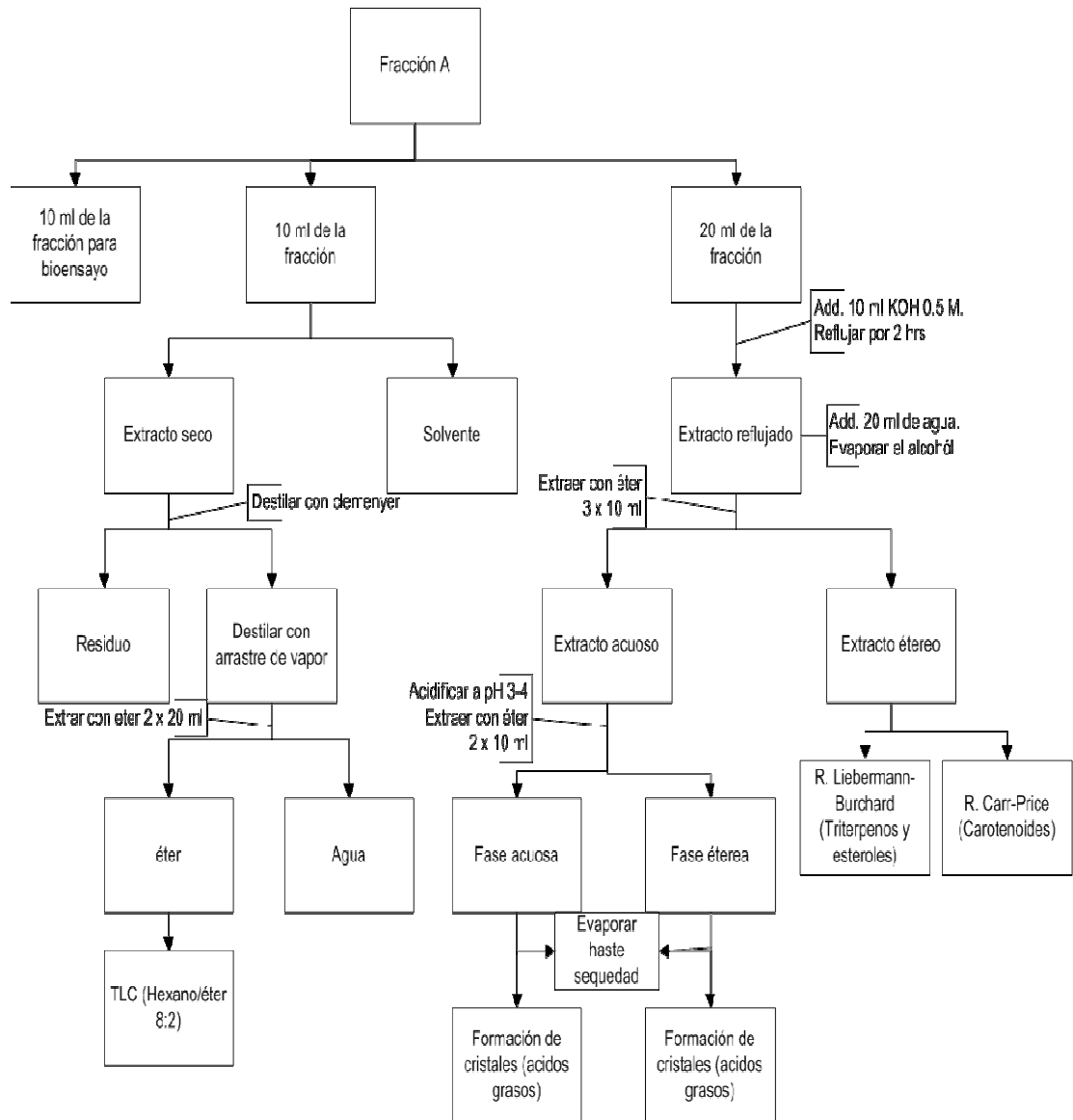
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS



FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETereo



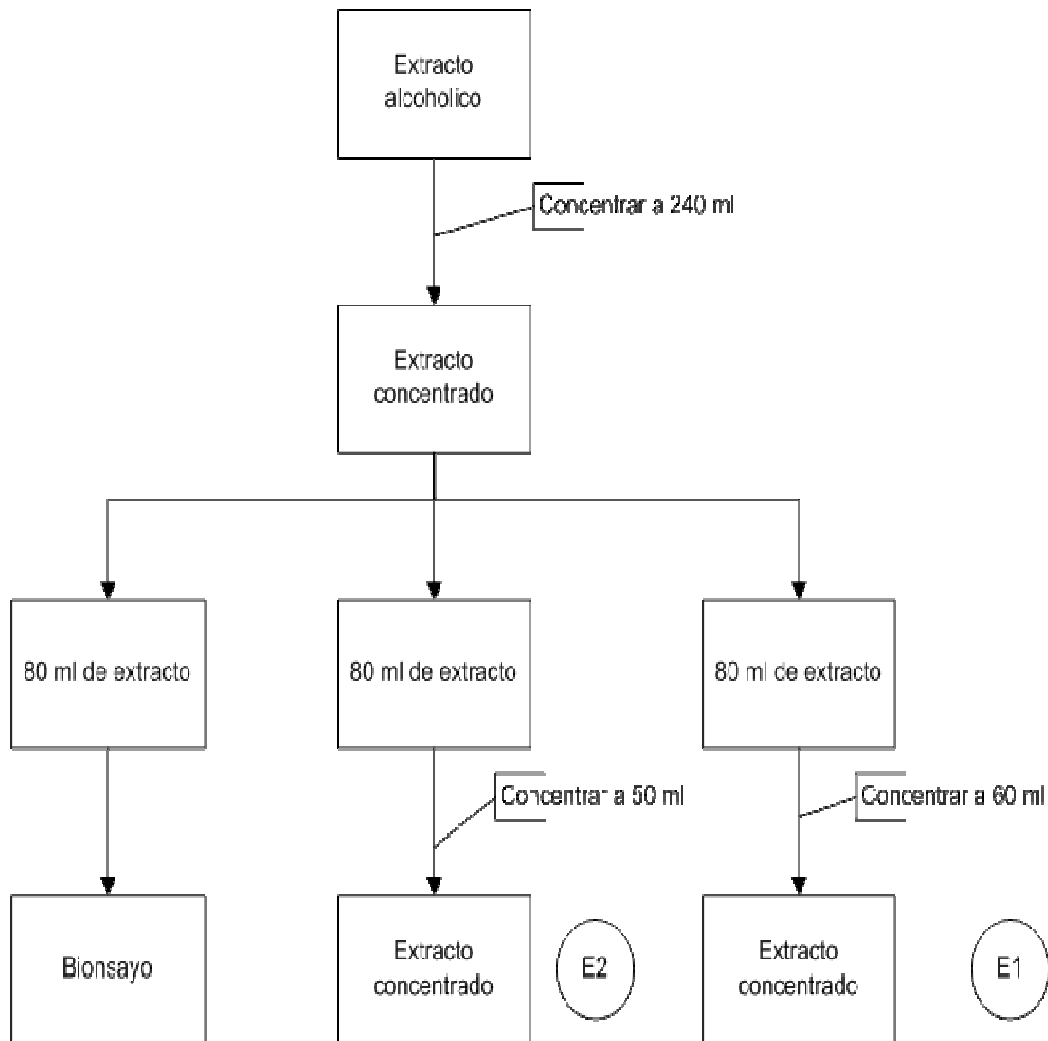
CONTINUACION DEL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETereo



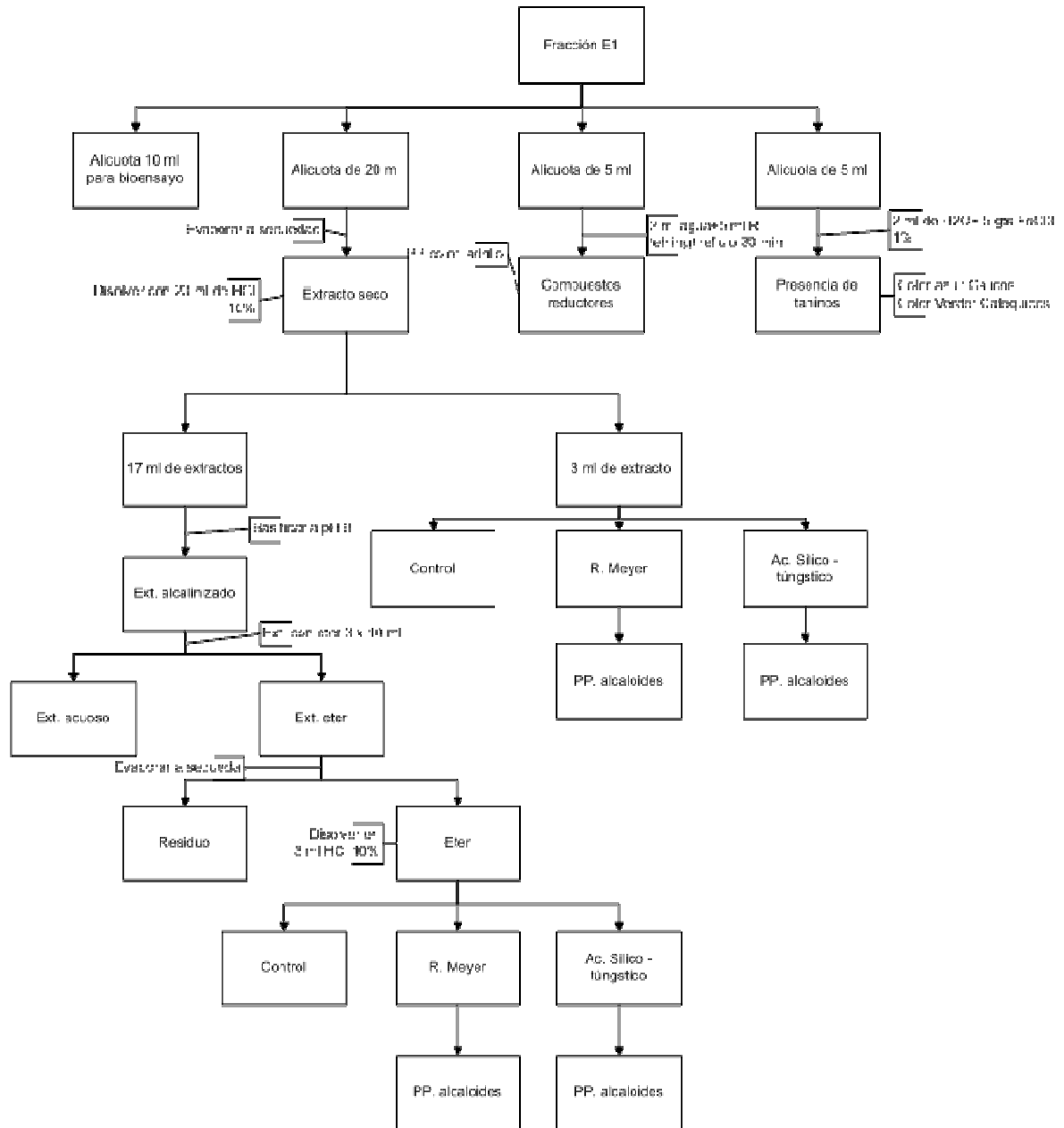
CONTINUACION DEL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETereo



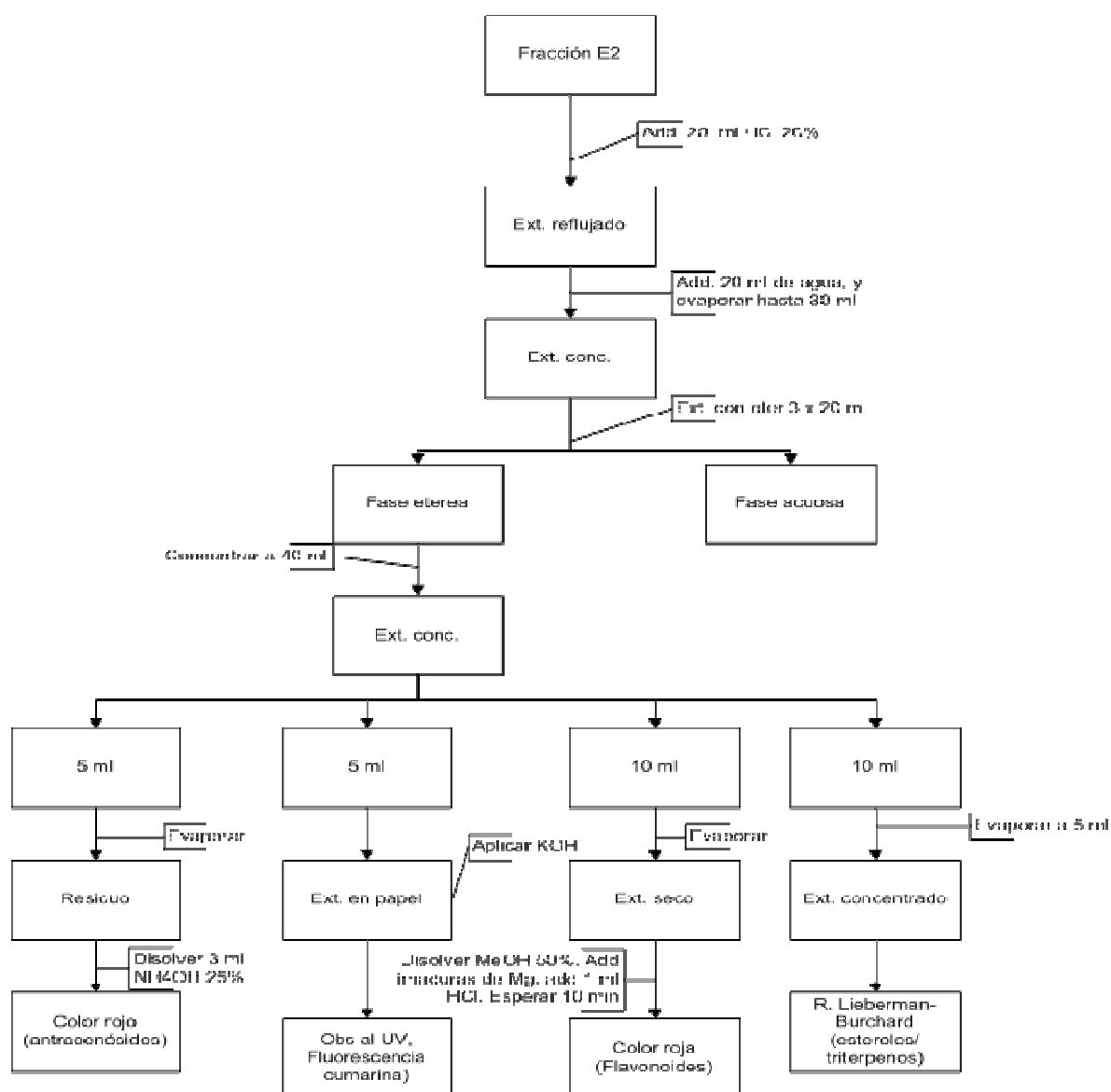
FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO



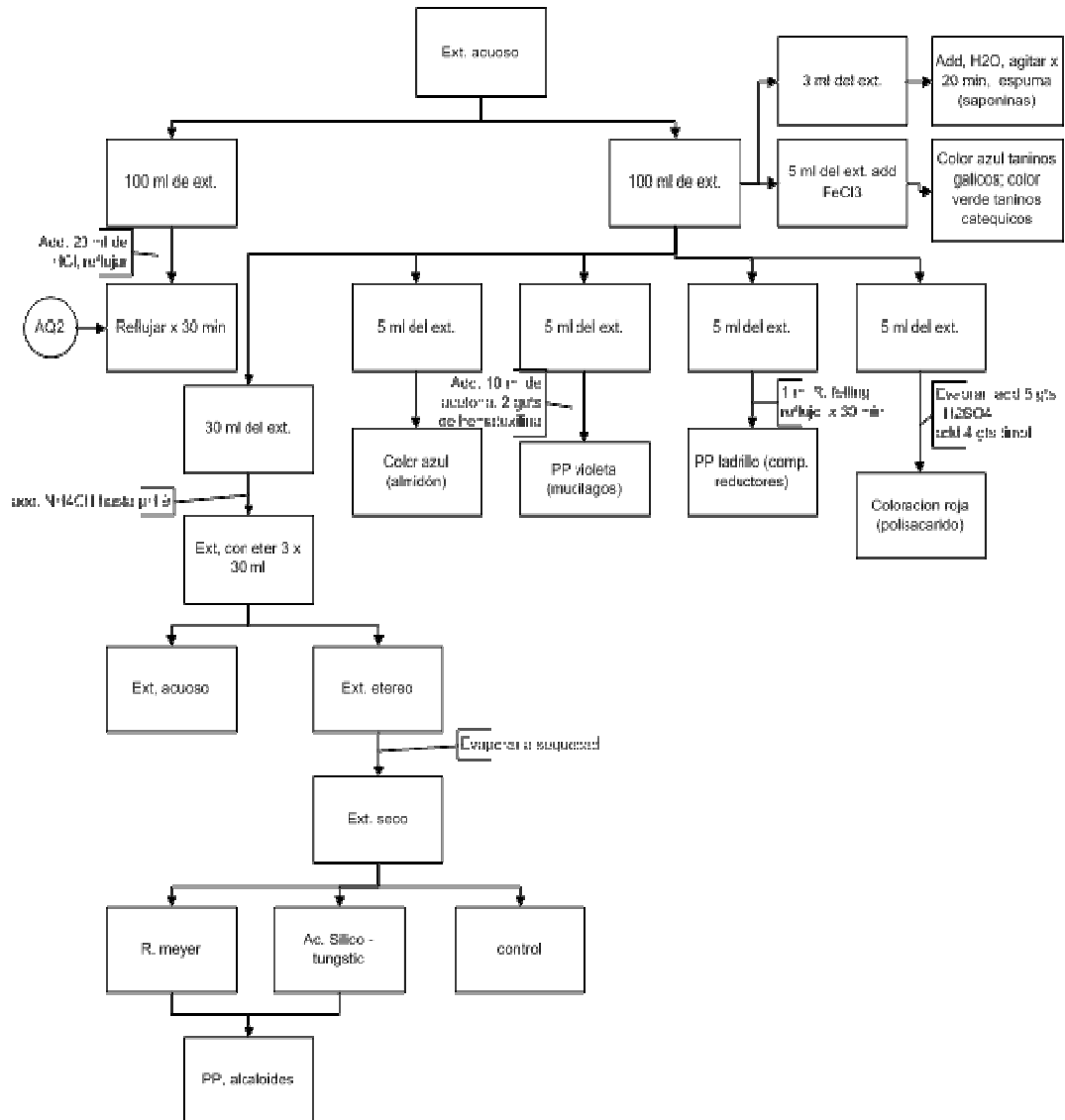
CONTINUACION DEL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO



CONTINUACION DEL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO



FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO



Imágenes



Fotografía 1. Hojas frescas de *Cordia inermis* "Achopaste/Cuajantita", recolectada en isla de Ometepe.

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje

A)



B)



Fotografía 2. Demuestra el proceso de obtención de los extractos crudos con Soxhlet. A. Extracción continua en caliente con éter. B. Extracción continua en caliente con alcohol.



Fotografía 3. Demuestra el proceso de obtención del extracto crudo acuoso con reflujos de agua.

A)



B)



Fotografía 4. A. Demuestra el resultado positivo de esteroides y triterpenos en el extracto etéreo, B. precipitado rojo ladrillo presencia de agentes reductores en el extracto etanólico y acuoso.

A)



B)



Fotografía 5. A. Comparación de 2 tubos, Rojo afirma la presencia de emodinas y el verde es el extracto etéreo de control, B. Demuestra el resultado positivo de emodinas (Coloración rojiza).

Determinación de constituyentes químicos de la Cordia inermis mediante tamizaje fitoquímico.

A)



B)



Fotografía 6. A y B demuestran el resultado del análisis fitoquímico, arrojando un resultado positivo de mucilagos en el extracto acuoso (color violeta).