

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA.
UNAN-LEÓN.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS Y DROGAS.



**DETERMINAR LOS CONSTITUYENTES QUÍMICOS EN LA HOJA
DE LA *Cissus verticillata* L. POR MEDIO DE UN SCREENING
FITOQUÍMICO.**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO(A)
QUÍMICO-FARMACEUTICO.**

AUTORES

**BR. JUAN CARLOS ESPINOZA SANDOVAL
BR. ADRIANA LISSETH ESPINOZA MARTÍNEZ**

**TUTOR
MsC. FERNANDO BACA**

LEÓN, NICARAGUA.

OPINIÓN DEL TUTOR.

El presente trabajo de investigación es un esfuerzo científico más, del área de Farmacognosia. Es de importancia científica porque se estudia una especie en donde no existen estudios fitoquímico, lo que hace de mayor importancia ya que los resultados obtenidos servirán de base para otros estudios más avanzados de la especie, ocupando un espacio en el campo investigativo.

Los aspectos científicos que proporciona este trabajo permite que reúna los requisitos de monografía. Además, el esfuerzo realizado por los autores debe servir de modelo para otros trabajos que se realicen en esta área de investigación.

MsC. Fernando Baca.
Profesor Titular de Farmacognosia.
Facultad de Ciencias Químicas.
UNAN-León.

AGRADECIMIENTOS.

A:

MsC. Fernando Baca:

Tutor de nuestro trabajo monográfico, por guiarnos y brindarnos sus conocimientos.

Lic. Sonia Ruiz de León:

Por facilitarnos el uso de sus computadoras.

DEDICATORIA.

A DIOS:

Por darme la sabiduría y guiarme en el camino de mi vida.

A MIS PADRES:

Iván Alberto Espinoza y Mirna Sandoval Valladares.

Por haberme traído al mundo; por darme siempre su amor, apoyo y consejo para seguir siempre por el buen camino y llegar hacer un profesional, cumpliendo así otra etapa de mi vida.

A MIS ABUELOS:

Juan Sandoval Parajon.

Porque antes de que Dios se lo llevara me regalaba siempre sus consejos ayudándome a resolver mis problemas y estaba siempre a mi lado y lo sigue haciendo.

Isolina Valladares.

Por querer siempre ayudarme.

A MIS TIOS:

Porque siempre me ayudan y me dan entusiasmo por seguir siempre adelante.

A MIS HERMANAS:

Porque llenan de alegría la casa.

A MI NOVIA:

Por darme todo su amor y estar a mi lado en los momentos felices y tristes de mi vida.

Juan Carlos Espinoza Sandoval.

DEDICATORIA.

A DIOS Y MARÍA SANTÍSIMA:

Por haberme dado fuerzas y ánimo por salir adelante.

A MIS PADRINOS:

Porque sin su amor y apoyo no hubiera triunfado.

A MI MAMÁ:

Por todos los esfuerzos que tuvo que hacer para sacarme siempre adelante.

A LA Dra. MARÍA HAYDEE NAVAS:

Por su gran ayuda y apoyo en este gran trayecto.

A TODOS MIS AMIGOS:

Por estar siempre conmigo y contar con su amor y cariño.

Adriana Lisseth Espinoza Martínez.

DETERMINAR LOS CONSTITUYENTES QUÍMICOS EN LA HOJA DE LA
Cissus verticillata L. POR MEDIO DE UN SCREENING FITOQUÍMICO.

Adriana L. Espinoza M. , Juan Carlos Espinoza S.

**Sección de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Químicas de la
UNAN-LEÓN.**

León, Nicaragua, C.A.

RESUMEN

La *Cissus verticillata* L. es una especie vegetal muy usada por parte de la población en el tratamiento de un sinnúmero de patologías; a pesar de su alto uso, el investigador no se ha visto motivado en realizar un estudio en la especie. Debido a la carencia de estudios de investigación sobre la *Cissus verticillata* L., la pobreza por parte de la población y los usos etnomédicos de la especie; consideramos emprender un Screening fitoquímico en la hoja de la *Cissus verticillata* L.

El presente estudio de tipo experimental fue realizado en el laboratorio de Farmacognosia del Departamento de análisis de medicamentos y drogas de la FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS. La muestra en estudio forma parte de la familia **Vitaceae**, tomando como unidad de análisis la hoja de la especie, por estar presente la mayoría de los constituyentes de la especie. Una vez seleccionada la unidad de análisis se procedió a la recolección e identificación de la especie, secado, trituración y por último la realización del Screening fitoquímico.

Los constituyentes químicos identificados en la hoja de la *Cissus verticillata* L., fueron: Triterpenos/Esteroles, Ácidos grasos, Alcaloides, Carotenoides, Cumarinas, Taninos catéquicos, Compuestos reductores, Antracénosidos, Antocianinas y Polisacáridos; agrupados todos ellos en los extractos etéreo, alcohólico y acuoso.

Los constituyentes químicos identificados (ya mencionados anteriormente), fueron todos aquellos que se encuentran en la familia **Vitaceae**, comprobando que la composición química de las especies de la familia **Vitaceae**; no varían cualitativamente.

Los Ácidos grasos y Flavonoides son constituyentes químicos que se informan por primera vez en la hoja de las especies de la familia **Vitaceae**. Para la realización de un Screening se usan solventes de diferentes polaridades para obtener extractos con la mayor cantidad de constituyentes químicos.

ÍNDICE.

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 CASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	4
3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	4
3.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	4
3.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	7
3.5 USOS ETNOMÉDICOS.....	7
3.6 TÉCNICAS MÁS GENERALES EN UN ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....	8
3.7 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN.....	9
3.8 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS.....	10
3.9 EXTRACCIÓN POR SOXHLET	11
3.10 DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR.....	11
3.11 EXTRACCIÓN POR REFLUJO.....	12
3.12 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	13
3.13 CARACTERÍSTICAS MÁS IMPORTANTES DE UN CROMATOGRAMA.....	13
3.14 SELECCIÓN DE ADSORBENTES Y ELUYENTES	14

3.15 PREPARACIÓN DE LAS CAPAS SEPARADAS.....	16
3.16 COLOCACIÓN DE PLACAS DE VIDRIO Y PREPARACIÓN DEL EXTENDEDOR.....	16
3.17 PREPARACIÓN DE LA MASA A EXTENDER.....	16
3.18 RECUBRIMIENTO DE LA PLACA	17
3.19 TRATAMIENTO DE LAS PLACAS DESPUÉS DEL RECUBRIMIENTO.....	17
3.20 ADSORBENTES DE USO COMERCIAL PARA LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.....	17
3.21 REACTIVOS DE COMPROBACIÓN.....	18
3.22 VALORACIÓN CUALITATIVA.....	19
3.23 VALORACIÓN CUANTITATIVA.....	19
3.24 SCREENING FITOQUÍMICO.....	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5. MATERIAL Y MÉTODO	22
5.1 PARTE EXPERIMENTAL.....	24
6. RESULTADOS.....	33
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	35
8. CONCLUSIÓN.....	38
9. RECOMENDACIÓN.....	39
10. BIBLIOGRAFÍA.....	40
11. ANEXOS.....	42

1. INTRODUCCIÓN.

La *Cissus verticillata* L. es una especie vegetal muy usada por parte de la población en el tratamiento de un sinnúmero de patologías como: abscesos y afecciones ganglionares, forúnculos, tos, tumores, etc. A pesar que la planta es muy usada por la población, el investigador no se ha visto motivado en realizar un estudio de la especie.⁷

Las plantas medicinales y no medicinales utilizadas como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias naturales puras representan un área en franca expansión.⁹

El reino vegetal es el más dominante y esencial del medio ambiente donde se desenvuelve el hombre, está compuesto por un gran número de familias botánicas y estas a su vez poseen una gran cantidad de especies; todas estas especies vegetales están compuestas en su interior por constituyentes químicos que ayudan no solamente a las funciones metabólicas, de crecimiento y protección de las plantas; sino que también se usan con diferentes fines etnomédicos por parte de la población.¹¹

En la actualidad se ha hecho una regresión en el uso de medicamentos de origen natural, debido a la actividad biológica de las plantas, así como la pobreza por parte de la población y los altos precios de los medicamentos sintéticos; obligando al investigador hacer estudios más profundos en las especies vegetales, siendo uno de estos estudios el screening fitoquímico.⁶

El screening fitoquímico es una de las etapas iniciales del análisis fitoquímico, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de ahí orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés; los resultados del screening fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico.⁹

En todo screening fitoquímico se hace uso de reacciones de coloración o precipitación y de cromatografía de capa delgada (C.C.D.), que nos ayudan a la identificación de los compuestos presentes en las plantas.⁹

Debido a la carencia de estudios de investigación sobre la *Cissus verticillata* L. y los usos etnomédicos de la planta, consideramos necesario emprender un screening fitoquímico sobre la especie en estudio, donde los resultados obtenidos constituyen únicamente una orientación de los principales usos por parte de la población; además nos dará a conocer la presencia de nuevos constituyentes químicos que no han sido mencionados en ninguna de las especies perteneciente a la familia **Vitaceae**, si los hay.

2. OBJETIVOS.

Objetivo General:

Determinar los constituyentes químicos en la hoja de la *Cissus verticillata* L. por medio de un Screening fitoquímico.

Objetivos específicos:

1. Realizar un Screening fitoquímico en la hoja de la *Cissus verticillata* L. haciendo uso de reacciones de coloración o precipitación y cromatografía de capa delgada.
2. Comparar la composición química de la *Cissus verticillata* L. Con otras especies de la familia **Vitaceae**.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PLANTA.

REINO	VEGETAL
FILUM	MAGNOLIPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDO
ORDEN	RHAMNALES
FAMILIA	VITACEAE
GENERO	CISSUS
ESPECIE	VERTICILLATA

La *Cissus verticillata* L. nombre científico de la planta comúnmente conocida como: Bejuco caro, Lyann mol, pico de mano, Yedra, etc.; encontrada en diferentes países del mundo, es usada con diversos fines etnomédicos por contener una variedad de compuestos químicos.⁷

3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

La *Cissus verticillata* L. es una planta trepadora con las siguientes características:⁴

Glabra con zarcillo, ramas articuladas, hojas simples, de oblongas a aovadas de 5 a 15 cm de largo, con el margen dentado setoso; con cimas ramificadas, con flores pequeñas, amarillo-verdosas, blancas o púrpuras, fruto en forma de baya ovoide o globosa, de color negro de 8 a 10 mm.

3.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA.

La *Cissus verticillata* L. es una especie de la familia **Vitaceae** que ha sido muy poco estudiada, por lo que decidimos tomar como referencia a la *Cissus sicyoides* perteneciente a la misma familia y que ha sido más estudiada.

En estudios realizados en la *Cissus sicyoides* se comprobó la existencia de los siguientes compuestos químicos:⁷

- 5, 6,7-tetrahidroxicumarina en la parte aérea de la planta.
- 5-beta xilopiranosido (Cumarina) en la parte aérea de la planta.
- Daucoesterol (Esteroides) en la parte aérea de la planta.
- Cianidina (Flavonoides) en el fruto.
- Cianidina-O-arabinósido (Flavonoides) en el fruto.
- Cianidina -3-ramnósidos (Flavonoides) en el fruto.

Todas estas sustancias encontradas en esta especie se pueden separar e identificar usando reactivos colorimétricos y aplicando cromatografía de capa fina y de alta presión.

Las Cumarinas: son derivados lactónicos del ácido o-hidroxicinámico, pertenecen al grupo de las fenilpropanoides, que es un grupo largo de productos naturales derivados de la fenilalanina y tirosina o en casos especiales del ácido shikimico. Es muy rara encontrarla en forma de glucósidos; no obstante, se conocen algunos derivados hidroxilados.³

La presencia de grupos hidroxilos les da la propiedad de poseer un efecto bacteriostático. Las Cumarinas son sustancias fluorescentes a luz ultravioleta, comúnmente fotosensibles, carecen de polaridad adecuada y son solubles en soluciones acuosas o alcohólicas de hidróxido de sodio.³

Los Flavonoides: son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆. Se encuentran ampliamente distribuidos, tanto libres como glicósidos; estos últimos contribuyen a darle color a las hojas, frutos y flores.¹¹

Los flavonoides presentan todos los matices de solubilidad, desde totalmente solubles en agua hasta insolubles en ella; pero solubles en éter etílico (agliconas muy eterificadas) pasando por los solubles en etanol (agliconas). Son insolubles en éter de petróleo por lo que permite desengrasar un material antes de extraerlo.¹¹

Todos los flavonoides en etanol tienen una banda de absorción más o menos intensa, a 200-270 nm.¹¹

Los Esteroides: tienen un esqueleto similar al ciclopentano perhidrofenantreno y una cadena lateral en la que pueden insertarse radicales metilo o etilo, particularmente en C₂₄.³

Son alcoholes sólidos con C₂₇ a C₂₉ átomos de origen animal o vegetal, se pueden encontrar en forma libre, como esteres o como glicósidos; absorben en el ultravioleta a una longitud de onda entre 200-300 nm.³

Dentro de la familia **Vitaceae** encontramos una gran variedad de especies, además de las dos ya antes mencionadas, siendo la más representativa la uva (la vid) cuyo nombre científico es *Vitis vitifera*.

Analizando la familia **Vitaceae** teniendo en cuenta la gran variedad de subespecies de uvas, los compuestos activos pueden variar sobretodo en la fórmula cuantitativa que en la cualitativa. Entre los componentes principales destacan los taninos que son los responsables de darle el color característico.

Los diferentes componentes de esta familia los podemos clasificar de la siguiente manera:

- Flavonoides: especialmente en frutos y hojas.
- Taninos condensados, Procianidina, Antocianidinas: abundan en las semillas y hollejos especialmente, aunque se pueden encontrar en las hojas y raíces.
- Ácidos orgánicos
- Vitaminas
- Compuestos nitrogenados: en los frutos.
- Ácidos volátiles.
- Ceras, Lípidos, etc.

3.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

El extracto acuoso de hojas posee una fuerte actividad de estimulación sobre el útero aislado de rata, la preparación provoca depresión del sistema nervioso central, efectos anticonvulsivo y actividad antibacteriana.⁷

En un estudio orientado a detectar posibles efectos farmacológicos que justificaron la efectividad de la administración de la decocción de hojas frescas (20g en 100 ml de agua) en el tratamiento de infecciones respiratorias, se constató que el preparado no mostró actividad antiserotonínica.⁷

El extracto etanólico de hojas posee una ligera actividad antibacteriana sobre *Cándida albicans*.⁷

3.5 USOS ETNOMÉDICOS.⁷

- (a) Abscesos y afecciones ganglionares: hoja pasada por el fuego en aplicación local.
- (b) Forúnculos: hoja machacada en aplicación local.
- (c) Extracto acuoso para: enfermedades hepáticas, renales, gripe por vía oral.
- (d) Infusiones orales como: antihipertensivo, antidiabético.
- (e) Decocciones orales para: tos, tumores secos.
- (f) Externamente la hoja se usa para fracturas.

Todos estos usos son de la planta seca y entera. No se conoce contraindicación, ni hay recomendación particular en cuanto a la forma de uso o de preparación.⁷

3.6 TÉCNICAS MÁS GENERALES EN UN ANÁLISIS FITOQUÍMICO.

1) De extracción: Soxhlet, percolación, maceración, arrastre por vapor. etc. ⁶

2) Separación y purificación: ⁶

A) Cromatografía de papel ----- * Ascendente
* Descendente
* Circular
* Preparativa

b) Cromatografía de capa delgada ----- * Analítico.
* Preparativo.
* Bidimensional.

C) Cromatografía líquida-----* cromatografía líquida de
alta resolución
* Adsorción
* Intercambio iónico.
* Partición.

D) Cromatografía gas- líquido.

E) Electrofóresis.

3) Determinación estructural: ⁶
Espectroscopía UV y VIS.

RMN de protón y carbono.

Espectrometría de masa.

Reacción de coloración y precipitación.

Propiedades físicas.

En estudios preliminares se pueden utilizar muestras de 1 a 1000g y orientarse a localizar cuál y cuantitativamente uno y varios principios activos. Los métodos pueden ser: ⁶

A) Histológicos: Observación del comportamiento de cortes de tejidos frente a ciertos reactivos que formen colores, precipitados, etc.

B) Químicos.

C) Físico-químicos.

D) Biológicos: Ver el efecto de extractos sobre cultivos de microorganismos, grupos de ratones, embriones, órganos aislados y tejidos, etc.

En la práctica es ventajoso utilizar varios de estos métodos procurando que no falte el biológico.

Para asegurar la reproducibilidad en una determinación cualitativa de principios activos se recomienda indicar si el material vegetal está fresco o seco, que cantidad de este se extrajo, el peso de extracto obtenido y el volumen de la solución de las que se tomaron, las alícuotas para las pruebas y la composición exacta de los reactivos empleados.

Entre menor es el número de sustancia que dan positiva la prueba y son más parecidas, mayor es la especificidad y la sensibilidad de esta prueba la que se caracteriza por los valores de sus límites de identificación (mínima cantidad de sustancia determinable bajo las condiciones de las pruebas y su límite de concentración, máxima dilución del compuesto en que todavía la prueba es positiva).

3.7 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN.

Extracción:

Es la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen, por lo menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente (extracto) y el residuo. Al embeber la droga con el líquido de extracción se disuelven primero las sustancias a las que el disolvente puede

llegar sin obstáculos. Al triturar la droga se destruyen varias células donde el grado de finura creciente favorece la disolución.¹⁴

El procedimiento químico clásico para obtener constituyentes orgánico a partir de tejidos de plantas secas (semillas, raíces, tallos, corteza, raíz etc.), es la extracción continua del material molido con una serie de solventes que pueden ser desde muy polares como el agua y etanol hasta menos polares como el éter y cloroformo.¹¹

Para aislamiento y elucidación estructural de las moléculas bioactivas se usan diferentes técnicas químicas, entre estas están la filtración, la extracción selectiva, la partición, el intercambio iónico, adsorción, filtración en gel, cromatografía y cristalización.

Para el análisis fitoquímico preliminar se usan técnicas macro y micrométricas en tubo o capa fina y para el análisis fitoquímico definitivo y elucidación estructural; se usan técnicas de cromatografía en papel, capa fina o columna, HPLC, cromatografía de gases, espectros IR, Análisis de espectroscopía de masas, técnicas de refracción pero en todos los casos se recomienda un fraccionamiento bioguiado.⁶

En términos generales un análisis fitoquímico debe comprender 4 etapas bien definidas:⁶

- 1) Recolección y clasificación botánica de la especie en estudio.
- 2) Extracción, separación y purificación de constituyentes químicos.
- 3) Determinación estructural.
- 4) Ensayos Biológicos y farmacológicos.

3.8 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS.

Los extractos de drogas, animales o vegetales, plantas o trozos de plantas pertenecen a las formas farmacéuticas más antiguas. La extracción propiamente dicha envuelve la separación de porciones biológicamente activas de los componentes inertes o inactivos, a partir de la utilización de un solvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado.¹⁴

En cada extracción se obtiene un complejo sistema de sustancias activas que puede contener sustancias lastres de diferente procedencia, por lo que son líquidos, semisólidos o polvos, relativamente impuros. Dependiendo del proceso utilizado y del grado de concentración de los extractivos, se encuentran preparaciones conocidas como: decocciones, infusiones, extractos fluidos, tinturas, extractos semisólidos y extractos en polvo.

3.9 EXTRACCIÓN POR SOXHLET.¹⁵

Aparato de extracción semicontinua, pues una de las fases, el sustrato se agrega solo al principio mientras que el solvente de extracción cumple un ciclo de extracción y purificación continua. La purificación se realiza en forma paralela por destilación del solvente, de manera que el sustrato siempre está en contacto con el solvente puro. Se utiliza cuando es necesaria una extracción exhaustiva de la droga.

Es útil en escala de laboratorio a pesar de que la extracción no tenga una alta eficiencia, pues la regeneración del solvente se realiza automáticamente evitando excesivos manipuleos.

La extracción con soxhlet consiste básicamente en el lavado sucesivo de una mezcla sólida con un determinado solvente, que va “lavando o extrayendo” de la mezcla, los componentes mas solubles en él. Mediante el lavado sucesivo de una mezcla, se pueden extraer de ella componentes cuya solubilidad en el solvente extractante es muy baja, debido al efecto acumulado de las múltiples extracciones. Un equipo especialmente diseñado para realizar extracciones a partir de mezclas sólidas diversas, es el soxhlet, instrumento ingenioso de amplia utilidad en fitoquímica.

3.10 DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR.¹³

Muchos compuestos orgánicos se descomponen a temperaturas por encima de los 230 °C. Un método de separar este tipo de sustancias, evitando la descomposición, es la destilación por arrastre con vapor. La destilación por arrastre con vapor se lleva a cabo, generalmente con una mezcla de agua (¡disolvente más común, pero no único!) y una sustancia (sólido ó líquido) insoluble o parcialmente soluble en este disolvente, que posee además un alto punto de ebullición. La ventaja de esta técnica radica en la destilación de la mezcla a la temperatura del componente de menor punto de ebullición

(para el caso de mezclas con agua <100 °C).

La destilación es el proceso de separación de uno o más líquidos, en función de sus diferencias de puntos de ebullición. En la destilación se calienta lentamente una mezcla líquida, hasta cuando el líquido más volátil comienza a separarse en forma de vapor. La masa evaporada se recibe entonces sobre una superficie fría en donde se condensa nuevamente a su forma líquida y se recoge, libre ya, de los demás componentes de la mezcla. Por este método se pueden separar mezclas de diversos líquidos, siempre y cuando las diferencias en puntos de ebullición sean apreciables, aproximadamente 5 °C.

Existen diversas técnicas de destilación de las cuales las más conocidas son la destilación fraccionada, la destilación a baja presión y la destilación por arrastre con vapor. Esta última, es quizá el principal método de obtención de los “aceites esenciales”, fragancias naturales muy apreciadas que se encuentran en las plantas, tales como el mentol, el eucaliptol, el eugenol, la vainillina, etc.

Cabe mencionar que un compuesto de punto de ebullición bajo se considera “volátil” en relación con los otros componentes de puntos de ebullición mayor. Los compuestos con una presión de vapor baja tendrán puntos de ebullición altos y los que tengan una presión de vapor alta tendrán puntos de ebullición bajos. En la Destilación por Arrastre con Vapor se hace pasar una corriente de vapor a través de la mezcla de reacción y los componentes que son solubles en el vapor son separados. Entre las sustancias que se pueden separar por esta técnica se pueden citar los Aceites Esenciales.

3.11 EXTRACCIÓN POR REFLUJO.¹²

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

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

3.12 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (BASES).

Se denomina cromatografía a un procedimiento, en el cual una solución de sustancia a separar se desplaza en una dirección predeterminada por una disposición de aparatos, por medio de una materia sólida, insoluble, inorgánica u orgánica, más o menos finamente repartida, siendo retenidos los componente en medida individualmente distinta.⁸

Como mecanismos fundamentales han de tenerse en cuenta el reparto entre las dos fases líquidas, así como la unión reversible de las combinaciones que se desplazan a la superficie del adsorbente. Si en el último caso se trata principalmente de interacciones superficiales físicas, se habla de cromatografía de adsorción (Tswett). En caso de la cromatografía por intercambio iónico, se llega a la formación reversible de auténticas heteropolares combinaciones químicas, entre la combinación que se desplaza y el adsorbente.

3.13 CARACTERÍSTICAS MÁS IMPORTANTES DE UN CROMATOGRAMA.³

Cada adsorbente solo puede adsorber cantidades limitadas. En general, ya la existencia de muy pocos lugares ocupados en la superficie del adsorbente, supone una notable disminución de la fuerza de adsorción, porque los sitios más activos son ocupados en primer lugar.

También con pequeñas cantidades de sustancias se obtienen cromatogramas cuyas manchas aparecen alargadas en la dirección a la línea de origen. Esta formación de cola es naturalmente tanto menor, cuanto menos sustancia se ha aplicado sobre la mancha de origen, es decir, los isothermas se van aproximando cada vez más al comportamiento lineal ideal.

En general las diversas zonas de sustancias están separadas por zonas vacías (análisis de elusión). Si el eluyente contiene una sustancia capaz de ser adsorbida con mayor intensidad que las sustancias a separar, y si éstas además son semejantes químicamente y en su afinidad con respecto al adsorbente (por Ej. los miembros de una serie homóloga),

entonces los componente del sistema rivalizan por los mismos lugares de adsorción de tal forma que las zonas de sustancias en cromatograma se suceden sin dejar zonas vacías.

3.14 SELECCIÓN DE ADSORBENTES Y ELUYENTES. ¹⁰

En la cromatografía tenemos un sistema de tres componentes como mínimo: adsorbente, medio de elusión y compuesto cromatografiado. El comportamiento cromatográfico depende tanto del adsorbente como del medio de elusión.

Entre ciertos límites, se puede predecir qué adsorbentes y medios de elusión son apropiados para la cromatografía de una determinada sustancia. Mientras que el número de adsorbentes disponibles es relativamente limitado, existen normalmente más medios de elusión apropiados. Generalmente, en caso de una sustancia determinada, para un adsorbente fuerte (activo) se requiere el correspondiente disolvente de fuerte poder de elusión y viceversa. Por este motivo, se han clasificado tanto los adsorbentes como los eluyentes a las respectivas acciones eluyentes.

a) Adsorbentes: se emplean como adsorbentes casi sin excepción óxidos, óxidos hidratados o sales. Las sustancias adsorbidas (adsorbatos) son combinaciones polares o polarizables, están ligadas a la superficie del adsorbente por medio de fuerzas electrostática las cuales también son responsables de la cohesión de la red cristalina. Aquí las tensiones reticulares actúan en parte hacia fuera; los Centros activos de adsorción son, por lo tanto, aristas, secciones de roturas, ángulos y lugares defectuosos de la superficie, en los que los iones están más o menos al descubierto. Con esto se hace comprensible el paralelismo entre la actividad de adsorción y la escala de dureza, que representa una medida de la magnitud de las fuerzas reticulares.

La actividad de adsorción de la adsorbentes cromatográficamente más empleados, es muy diferente al contenido de agua, que posee un significado decisivo, ya que las moléculas de agua fácilmente absorbibles bloquean los puntos activos de la superficie.

b) Eluyentes: Como la velocidad de desplazamiento de una combinación en un adsorbente dado, depende del medio de elusión empleado, se pueden obtener series con poder de elusión creciente llamadas series eluótropas.

Las mezclas de dos o tres disolventes de polaridad distintas, muchas veces dan separaciones mucho mejores que con eluyentes químicamente uniformes.

Estos eluyentes de varios componentes, se pueden ordenar también en series eluótropas. Así aumenta por ejemplo, con bastante regularidad la acción eluyente en la serie: éter de petróleo, mezclas de éter de petróleo con cantidades crecientes (10, 20, 50 %) de benceno; benceno, mezclas de benceno con cantidades crecientes (2, 5, 10, 20 %) de etanol.

c) Comportamiento cromatográfico de adsorción y constitución Química: Si las sustancias a separar poseen en la adsorción con un disolvente no acuoso poca afinidad por los adsorbentes hidrófilos usuales, entonces se trabajará con un adsorbente fuerte y eluyentes débiles.

Por el contrario, se emplearan adsorbentes débiles y eluyentes fuertes cuando la afinidad de adsorción de las combinaciones es grande. Las características químico constitucionales influyen en la fuerza de unión por adsorción; los principios en que se rige esto se indican a continuación:

- Hidrocarburos saturados son poco o nada adsorbibles, la introducción de enlaces dobles aumenta la afinidad de adsorción, tanto más, cuanto mayor es su número y más todavía si están conjugado, enlaces dobles conjugados aumentan la facultad de polarización de las moléculas y la fuerza de la unión adsortiva a la superficie de los adsorbentes hidrófilos.

- Si se introducen grupos funcionales a un hidrocarburo, aumentando generalmente la afinidad de adsorción, pudiéndose observar la siguiente serie de adsorción descendente: $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCOCH}_3$, $-\text{COCH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{H}$, $-\text{Cl}$.

- Si varios sustituyentes están presentes en una misma molécula, sólo con muy poca aproximación se comportan aditivamente con respecto a su influencia sobre la afinidad de adsorción.

3.15 PREPARACIÓN DE LAS CAPAS SEPARADAS.

Las capas finas se pueden preparar de muchas maneras, lo más corriente es hasta ahora el empleo de extendedores de capa finas; aunque también se puede hacer: sumergiendo la placa de vidrio en la suspensión del soporte, asperjando, o vertiendo la suspensión.⁶

3.16 COLOCACIÓN DE PLACAS DE VIDRIO Y PREPARACIÓN DEL EXTENDEDOR. ³

Hay que limpiar cuidadosamente la placas, las cuales deben quedar exentas de grasa; para esto se cepillan las placas esmeradamente con un limpiador o se coloca durante unas horas en ácido sulfocrónico, detergentes, etc.

No es recomendable enjuagar con los disolventes orgánicos usuales (metanol, acetona, etc.) ya que estos contienen grasa y con ellos según la experiencia propia con capa de celulosas, pueden mermarse considerablemente los resultados cromatográficos.

La plantilla de trabajo de material plástico, de una longitud aproximada de 110 centímetros, se coloca sobre la mesa del laboratorio de forma que su listón de tope corto sobre puesto queda a la derecha. Sobre la plantilla se colocan cinco placas de vidrio del mismo espesor de 20 x 20 centímetros (empleándose más placas si estas son más estrechas) . Para que no resbalen sobre la plantilla se podrá fijar por adhesión mediante una gota de agua.

A la derecha e izquierda la serie de placas estará en cuadrada por dos placas de 5 x 20 centímetros (placa inicial y final). El extendedor se coloca, abierto hacia arriba, sobre la placa inicial estrecha de la izquierda, llevándola desde allí hacia a la derecha en el sentido de la flecha roja grabada en la cara superior del aparato hasta la placa final de la derecha.

3.17 PREPARACIÓN DE LA MASA A EXTENDER. ³

La preparación de la masa se explica tomando como ejemplo el adsorbente hasta ahora más frecuentemente empleado, el sílica G. 25 g de sílica G se mezclan uniformemente con 50 ml de agua destilada, removiendo en un mortero o agitando fuertemente (30 a 45 seg.) en un matraz erlenmeyer (200 a 250 ml). La suspensión, bastante fluida, se endurece en pocos

minutos a causa de su contenido en yeso. Por esto hay que llenar el extendedor inmediatamente, habiendo graduado anteriormente el espesor de capa deseado.

3.18 RECUBRIMIENTO DE LAS PLACAS.³

Después de introducida la masa fluida en el aparato, se hace girar la palanca 180° hacia la izquierda, de tal forma que se vea claramente en la flecha roja la abertura necesaria para la admisión del aire. Se espera hasta que la masa asuma y se comienza entonces el recubrimiento. Para esto lo mejor es situarse frente a la planta media de la plantilla, sujetar al extendedor con ambas manos y desplazarlo sin hacer mucha presión sobre las placas hasta llegar a la placa final.

3.19 TRATAMIENTO DE LAS PLACAS DESPUÉS DEL RECUBRIMIENTO.¹

Secado: Las placas se dejan en reposo hasta que su superficie es completamente opaca (unos 10 min.). Después lo mejor es dejar secar al aire durante la noche.

Activación: Se introducen las placas en un armario de secado. El tiempo de calentamiento y la temperatura depende de la actividad que se desee lograr en la capa. Un calentamiento a 105 °C durante 30 minutos.

Conservación: Como el aire húmedo desactiva las placas activas, se deben conservar en un medio secador (gel azul, óxido de aluminio activo, cloruro cálcico, etc.) en un desecador.

3.20 ADSORBENTE DE USO COMERCIAL PARA LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.¹

*Sílicagel: Se ha venido usando con mayor frecuencia la Sílicagel G que contiene un 13 % de yeso. El tamaño de sus granos es de 5 a 25 micras, para la elaboración de capas muy finas se tamiza el producto con tamiz de malla 200.

*El Sílicagel G contiene iones metálicos de hierro. Una capa de soporte, libre de hierro, se obtiene desarrollando previamente la placa cubierta y secada al aire con metanol / ácido clorhídrico concentrado (9:1). El hierro se desplaza con el frente del eluyente hacia el borde superior de la placa, después de lo cual la placa se seca nuevamente y se activa.

*El Sílicagel H no contiene yeso ni aglutinantes orgánicos, igual que el Sílicagel G el Sílicagel H posee un tamaño medio de granulación (5 a 25 micras). Las capas de Sílicagel H poseen una buena estabilidad, los tiempos recorridos en comparación a los de Sílicagel G son algo superiores.

*Capas de Sílicagel modificada: Para la separación de combinaciones ácidas, son apropiadas capas Sílicagel G que se han elaborado con ácido oxálico 0,5 N , en vez de agua y con adición de ácido sulfúrico como medio de suspensión, para 35 g de Sílicagel G se emplea cloroformo / metanol (7:3, hasta 100 ml) adicionando 2.5 volumen de ácido sulfúrico.

*Oxido de aluminio: apropiado para separaciones de terpenos, alcaloides, esteroides, combinaciones alicíclicas, alifáticas y aromáticas.

*Kieselgur.

*Silicato magnésico o silicato cálcico.

*Hidroxiapatito.

*Celulosa.

*Poliamida.

*Sephadex.

3.21 REACTIVOS DE COMPROBACIÓN. ⁹

- Reactivo de Carr-Price para identificar Carotenoides.
- Reactivo de Mayer para identificar Alcaloides.
- Ácido Sílico-túngstico para identificar Alcaloides.
- Reactivo de Liebermann-Burchard para identificar Triterpenos y Esteroles.
- Reactivo de Fehling para identificar Compuestos Reductores.

- Reactivo de Lugol para identificar Almidón.
- Reactivo Timol para identificar Polisacáridos.

3.22 VALORACIÓN CUALITATIVA. ¹

- Calidad de los adsorbentes.
- Grado de actividad de la capa, húmeda del aire.
- Espesor de la capa, elaboración.
- Calidad del eluyente.
- Saturación de la cámara separadora.
- R_f
- Cantidad de sustancia.
- Temperatura.

3.23 VALORACIÓN CUANTITATIVA. ¹

- Tamaño de las manchas.
- Método de dilución.
- Fotometría.
- Determinación después de la elusión.
- Determinación por calcinación

3.24 SCREENING FITOQUÍMICO.

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

En el Screening fitoquímico se usan solventes polares o apolares, según las propiedades físicas y químicas de la muestra, para separar y obtener alcaloides, taninos, flavonoides, cianinas, etc.

Un ejemplo muy claro del screening fitoquímico es el de este trabajo investigativo, donde se usa éter de petróleo y alcohol por soxhlet y luego agua bajo reflujo, para poder ir separando cada uno de los compuestos químicos que contiene la planta.

Como resultado final de este screening fitoquímico se obtienen los siguientes compuestos: TERPENOS Y SUSTANCIAS NEUTRAS, ALCALOIDES, TANINOS, FENOLES, ACIDOS CARBOXÍLICOS, ENTRE OTRAS.

4. HIPÓTESIS.

La *Cissus verticillata* L. es una especie vegetal que contiene Cumarinas, Flavonoides, Taninos; al igual que las otras especies de la familia **Vitaceae**.

5. MATERIAL Y MÉTODO.

TIPO DE ESTUDIO: Es un estudio experimental realizado en el período de agosto 2003-febrero 2004.

ÁREA DE ESTUDIO: El área de estudio de nuestro trabajo, es el departamento de análisis de medicamentos y drogas, área de Farmacognosia de la facultad de ciencias químicas.

UNIVERSO: Nuestro universo de estudio son todas las especies que forman parte de la familia **Vitaceae**.

MUESTRA: *Cissus verticillata* L.

UNIDAD DE ANÁLISIS: Hojas de la especie en estudio.

TIPO DE MUESTREO: Muestreo aleatorio simple.

REPRESENTATIVIDAD DE LA MUESTRA: Es una planta que se encuentra en Nicaragua y que es muy usada por la población, se puede encontrar en toda la región del pacífico.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

- a) Se tomó esta muestra, ya que la *Cissus verticillata* L.; es una especie poco estudiada y por tener un alto uso etnomédico por parte de la población.
- b) Como unidad de análisis se tomaron las hojas, ya que es ahí donde están reunidos la mayoría de los compuestos químicos de la especie.

VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

Nuestras variables de estudios son:

- Extracto
- Concentración
- Screening fitoquímico
- Constituyentes químicos
- Técnicas cromatográficas
- Reactivos colorimétricos y precipitantes

Variable	Definición	Medición	indicador
Screening fitoquímico	Determina cualitativamente la presencia o ausencia de los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta.	Presencia o ausencia de colores o precipitados.	Positivo o negativo
Técnicas cromatográficas	Técnicas de separación y cuantificación de constituyentes químicos.	Distancia de arrastre recorrida, medida en cm o mm.	Distancia de arrastre de la mancha (R_f).

5.1 PARTE EXPERIMENTAL.

Equipo utilizado:

- Molino eléctrico (ver anexo 2)
- Sistema de extracción Soxhlet (ver anexo 3)
- Sistema de extracción por Reflujo (ver anexo 3)
- Equipo de Destilación de arrastre con vapor (ver anexo 3)
- Mecheros Bushner (ver anexo 3)

Cristalería:

- Tubos de ensayos de vidrio Pyrex
- Balones de 50 ml y 100 ml marca Pyrex
- Embudo separador de 100 ml marca Pyrex
- Beakers de 100 ml, 250 ml y 1000 ml marca Pyrex
- Probeta de 50 ml y 100 ml marca Pyrex
- Espátula y agitador de vidrio
- Termómetro
- Pipeta de 1 ml, 5 ml y 10 ml marca Pyrex

Reactivos y solventes utilizados:

REACTIVOS Y SOLVENTES		
NOMBRE	GRADO	MARCA
Éter de petróleo	Grado reactivo	Fisher Scientific
Hexano	Grado reactivo	Merck
Hidróxido de potasio	Grado reactivo	Merck
Etanol	Grado reactivo	Merck
Cloroformo	Grado reactivo	Fisher Scientific
Anhídrido acético	Grado reactivo	Merck
Ácido sulfúrico	Grado reactivo	J.T Baker
Tricloruro de antimonio	Grado reactivo	Merck
Ácido clorhídrico	Grado HPLC	Fisher Scientific
Ácido Sílico-Túngstico	Grado reactivo	Merck
Metanol	Grado reactivo	J.T Baker
Limaduras de Magnesio	Grado reactivo	Merck
Hidroxido de amonio	Grado reactivo	Merck
Cloruro mercuríco	Grado reactivo	Merck
Cloruro férrico	Grado reactivo	Merck
Yoduro de potasio	Grado reactivo	Merck
Timol	Grado reactivo	Merck
Agua	Grado reactivo	
Sulfato cúprico	Grado reactivo	Merck
Bitartrato de sodio y potasio	Grado reactivo	Fisher Scientific
Yodo	Grado reactivo	Merck
Acetona	Grado reactivo	Merck
Hematoxilina	Grado reactivo	J.T Baker

Reactivos reveladores:

- Reactivo de Carr-Price: Solución saturada de tricloruro de antimonio III en cloroformo.
- Reactivo de Mayer: Disolver 1.35g de cloruro mercúrico en 60 ml de agua, disolver 7g de yoduro de potasio en 20 ml de agua, mezclar, agitar y filtrar.
- Ácido Sílico-Túngstico: Solución al 20% p/v en agua.
- Reactivo de Liebermann-Burchard: Mezclar 1 ml de cloroformo y 1 ml de anhídrido acético y 3-4 gotas de ácido sulfúrico concentrado.
- Reactivo de Lugol: Mezclar 1g de yodo con 2g de yoduro de potasio, disolver en 300 ml de agua y almacenar en botella oscura.
- Timol: 0.1g de Timol en 100 ml de alcohol.

Recolección e identificación de la especie en estudio:

El material vegetal fue recolectado en las inmediaciones del antiguo Hospital San Vicente, en la primera semana del mes de Agosto del año 2003; posteriormente la parte de la planta colectada fue llevada al Herbario Miguel Ramírez Gollena de la UNAN-León, para su clasificación e identificación.

Trituración:

Las hojas de la *Cissus verticillata* L. una vez que lograron estar totalmente secas, se trituraron con un molino eléctrico.

Material vegetal utilizado:

La planta en estudio, de donde se obtuvo el material vegetal (hoja) para esta investigación es la *Cissus verticillata* L. conocida comúnmente como bejuco caro.

Screening fitoquímico: (ver esquema en anexos 1)

Se realiza una extracción con éter en Soxhlet y se concentra hasta un volumen de 200 ml, se divide en dos fracciones A y B, de 20 ml y 180 ml respectivamente, realizándose a cada una de ellas las siguientes pruebas.

Fracción A : Los 20 ml se concentran hasta sequedad y se disuelve el residuo en 20 ml de alcohol, dividiéndose en dos fracciones A₁ y A₂ de volúmenes iguales.

Fracción A₁: 10 ml, se evaporan hasta sequedad destilando luego con arrastre de vapor y extrayendo con éter (2ml de extracto en 20ml de éter), aplicando luego cromatografía de capa delgada, usando como fase móvil Hexano/Eter (8:2) y fase estacionaria Sílica gel; evaluándose según la corrida, el tipo de mancha y el R_f.

Fracción A₂: 10 ml, se adicionan 10 ml de Hidróxido de potasio 0.5 M y 20 ml de agua, calentando para evaporar el etanol y extraer con éter (3ml de extracto en 10ml de éter), separando el éter de los demás componentes y dividiéndolo en tubos de ensayos en volúmenes iguales, evaluándose de la siguiente manera.

Tubo 1: Adicionar 5 ml de Reactivo de Liebermann-Burchard.

Resultado esperado: Coloración verde oscura, indica la presencia de Triterpenos y Esteroles.

Tubo 2: Adicionar Reactivo de Carr-Price.

Resultado esperado: Coloración verde oscura, indica la presencia de Carotenoides.

La fase acuosa sobrante se acidificó hasta pH 3-4 y se extrajo con éter (2:10), evaporando hasta sequedad.

Resultado esperado: Formación de residuos con cristales, indica la presencia de ácidos grasos.

Fracción B: 180 ml, se concentra hasta un volumen de 50 ml y se divide en seis fracciones.

Fracción B₁: 10 ml, se evaporan hasta sequedad y disolver en 3 ml de ácido clorhídrico al 2%, dividiéndose en volúmenes iguales en tres tubos de ensayos.

Tubo 1: control

Tubo 2: R. De Mayer

Tubo 3: Ac. Sílico-Túngstico

Resultado esperado: Formación de precipitado en los tubos 2 y 3, indicando la presencia de alcaloides.

Fracción B₂: 5 ml, se evaporan hasta sequedad y se adiciona cloroformo y gotas de R. De Carr-Price.

Resultado esperado: Coloración verde oscura, indica la presencia de Carotenoides.

Fracción B₃: 5 ml, se evapora hasta sequedad y se disuelve en 2 ml de metanol caliente, adicionando luego limaduras de magnesio y 1 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Resultado esperado: Después de 10 minutos se presenta una coloración rojiza, indicando la presencia de agliconas de Flavonoides.

Fracción B₄: 5 ml, se evaporan hasta sequedad y se disuelve en 1 ml de agua hirviendo y se aplica con un capilar dos manchas en papel filtro, aplicando en una de las manchas una gota de Hidróxido de potasio 0.5 M.

Resultado esperado: Fluorescencia a 366 nm, indica la presencia de Cumarinas.

Fracción B₅: 5 ml, se evapora hasta sequedad y se disuelve en 1 ml de Cloroformo, adicionando el R. Liebermann-Burchard.

Resultado esperado: Formación de un anillo verde con una interfase color marrón, indica la presencia de Triterpenos y Esteroles.

Fracción B₆: 5 ml, se evapora hasta sequedad y se disuelve en 1 ml de Hidróxido de amonio al 25%.

Resultado esperado: Coloración roja, determina la presencia de Emodinas.

Una vez hechas las pruebas de la fracción A y B, se procede a realizar una Reextracción en Soxhlet con Etanol, donde el volumen obtenido se concentra hasta 200 ml y se divide en dos fracciones E₁ y E₂ de 100 ml cada una.

Fracción E₁: Se concentra hasta 30 ml y se divide en tres fracciones.

Fracción E_{1,1}: 5 ml, se adiciona 2 ml de agua y 5 gotas de solución de Cloruro férrico al 1%.

Resultado esperado: Coloración azul indica la presencia de Taninos gálicos y una coloración verde indica la presencia de Taninos catéquicos.

Fracción E_{1,2}: 5 ml, se adiciona 2 ml de agua y 5 ml de R. Fehling al 1%, dejando en reflujo por 30 minutos.

Resultado esperado: Precipitado color ladrillo, indica la presencia de Compuestos reductores.

Fracción E_{1,3}: 20 ml, se evaporan hasta sequedad y se disuelve en 20 ml de ácido clorhídrico al 10%, retirando 3 ml.

Muestra 1: Se alcalinizan los 17 ml restantes hasta pH 9 y se extrae con éter (3ml de extracto en 10ml de éter), evaporando la fracción etérea y se disuelve en 3 ml de ácido clorhídrico al 10%.

Muestra 2: Dividir las muestras 1 y 2 en tres tubos de ensayos.

Tubo 1: Control

Tubo 2: R. De Mayer

Tubo 3: Ac. Sílico-Túngstico

Resultado esperado: Precipitación en los tubos 2 y 3, indica la presencia de Alcaloides.

Fracción E₂: Se concentra hasta un volumen de 50 ml, adicionándole 20 ml de ácido clorhídrico al 20% y se coloca en reflujo por 30 minutos; luego se adicionan 20 ml de agua y se evapora hasta un volumen de 30 ml. Se extrae con éter (3ml de extracto en 20ml de éter) separando la fase etérea de la fase acuosa, la fase etérea se concentra a un volumen de 30 ml.

Fracción E_{2,1}: 5 ml, se concentra hasta 1 ml y se aplican dos manchas en papel filtro, aplicando sobre una de las manchas una gota de Hidróxido de potasio 0.5 M.

Resultado esperado: Fluorescencia a 366 nm, indica la presencia de Cumarinas.

Fracción E_{2,2}: 5 ml, se evapora hasta sequedad y se disuelve en 1 ml de Hidróxido de amonio al 25%.

Resultado esperado: Coloración roja, determina la presencia de Antracénosidos.

Fracción E_{2,3}: 10 ml, se evapora hasta sequedad y se disuelve en Metanol al 50%, se adiciona limaduras de Magnesio y 1 ml de ácido clorhídrico.

Resultado esperado: Des pues de 10 minutos aparece una coloración roja, indicando la presencia de Flavonoides.

Fracción E_{2,4}: 10 ml, se evapora hasta sequedad y se adiciona el R. Liebermann-Burchard.

Resultado esperado: Coloración verde oscura, indica la presencia de Triterpenos y Esteroles.

Fracción E_{2,5}: La fase acuosa ácida presenta coloración rojiza, por lo que se eleva el pH a 9-10.

Resultado esperado: Coloración verde-castaño o azul indica la presencia de Antocianinas.

Una vez hechos los ensayos en los extractos anteriores se procede a realizar una extracción por Reflujo con agua, donde el volumen obtenido se concentra a 200 ml y se divide en dos fracciones AQ₁ y AQ₂, de 100 ml cada una.

Fracción AQ₁: Se divide en siete fracciones.

Fracción AQ_{1,1}: 5 ml, se adicionan 3 ml de agua y dos gotas de R. Lugol.

Resultado esperado: Coloración azul, indica la presencia de almidón.

Fracción AQ_{1,2}: 5 ml, se evapora hasta sequedad y se adicionan 5 gotas de ácido sulfúrico y 3-4 gotas de Timol.

Resultado esperado: Coloración rojiza, indica la presencia de Polisacáridos.

Fracción AQ_{1,3}: 5 ml, se adiciona 10 ml de Acetona y 2 gotas de Hematoxilina, se agita y se filtra.

Resultado esperado: Precipitado color violeta indica la presencia de Mucílagos.

Fracción AQ_{1,4}: 5 ml, se adiciona 45 ml de agua y se agita por 10 minutos.

Resultado esperado: Espuma persistente por 20 minutos indica la presencia de Saponinas.

Fracción AQ_{1,5}: 5 ml, se adiciona 1 ml de R. de Fehling y se deja en Reflujo por 30 minutos.

Resultado esperado: Precipitado color ladrillo, indica la presencia de Compuestos reductores.

Fracción AQ_{1,6}: 3 ml, se adiciona 2 ml de agua y 3-4 gotas de Cloruro férrico.

Resultado esperado: Coloración azul indica la presencia de Taninos gálicos y una coloración verde indica la presencia de Taninos catéquicos.

Fracción AQ_{1,7}: 30 ml, se adiciona Hidróxido de amonio hasta pH 9, se extrae con éter (3ml de extracto en 30ml de éter) y se evapora hasta sequedad. Se disuelve el residuo en 10 ml de ácido clorhídrico al 10%, dividiendo en tres tubos de ensayos.

Tubo 1: Control

Tubo 2: R. De Mayer

Tubo 3: Ac. Sílico-Túngstico

Resultado esperado: Precipitación en los tubos 2 y 3, indica la presencia de Alcaloides.

Fracción AQ₂: En esta fracción se realizan las mismas pruebas descritas para la fracción A.

6. RESULTADOS.

El Screening fitoquímico en la *Cissus verticillata* L. fue realizado en el departamento de control de calidad de medicamentos, en la sección de Farmacognosia.

El Screening se realizó a partir de tres diferentes extractos (etéreo, alcohólico y acuoso), a los cuales se les realizaron diferentes técnicas de identificación de constituyentes químicos presentes en la especie en estudio.

Los resultados obtenidos en el screening fitoquímico fueron agrupados según el extracto (etéreo, alcohólico y acuoso), observando los constituyentes químicos que contiene la *Cissus verticillata* L. identificando los siguientes.

TABLA 1. Constituyentes químicos identificados en la *Cissus verticillata* L.

Tipo de extracto	Constituyente químico	Resultado
I) Extracto etéreo.		
- Fracción A (20 ml)		
Fracción A ₁ -----	Triterpenos/Esteroles	----- (-) negativo.
	Carotenoides	-----(-) negativo.
	Ácidos grasos	-----(-) negativo
.		
Fracción A ₂ -----	Triterpenos/Esteroles	-----(+) positivo.
	Carotenoides	-----(-) negativo.
	Ácidos grasos	-----(+) positivo.

- Fracción B (50 ml)		
Fracción B ₁ -----	Alcaloides	-----(+) positivo.
Ácida.		
Fracción B ₂ -----	Carotenoides	-----(+) positivo.
Fracción B ₃ -----	Agliconas de flavonoides	----- (-) negativo
Fracción B ₄ -----	Cumarinas	----- (+) positivo
Fracción B ₅ -----	Triterpenos/Esteroles	-----(+) positivo
Fracción B ₆ -----	Emodinas	-----(-) negativo

Screening Fitoquímico en la *Cissus verticillata* L.

II) Extracto alcohólico

- Fracción E1 (30 ml)
 - Fracción E_{1,1} ----- Taninos gálicos o catéquicos ----- (-) negativo
 - Fracción E_{1,2} ----- Compuestos reductores ----- (+) positivo
 - Fracción E_{1,3} ----- Alcaloides ----- (+) positivo
- Fracción E2 (50 ml)
 - Fracción E_{2,1} ----- Cumarinas ----- (-) negativo
 - Fracción E_{2,2} ----- Antracenósidos ----- (+) positivo
 - Fracción E_{2,3} ----- Flavonoides ----- (-) negativo
 - Fracción E_{2,4} ----- Triterpenos/ Esteroles ----- (-) negativo
 - Fracción E_{2,5} ----- Antocianinas ----- (+) positivo

III) Extracto acuoso.

- Fracción AQ₁ (100 ml)
 - Fracción AQ_{1,1} ----- Almidón ----- (-) negativo
 - Fracción AQ_{1,2} ----- Polisacáridos ----- (+) positivo
 - Fracción AQ_{1,3} ----- Mucílagos ----- (-) negativo
 - Fracción AQ_{1,4} ----- Saponinas ----- (-) negativo
 - Fracción AQ_{1,5} ----- Compuestos reductores ----- (+) positivo
 - Fracción AQ_{1,6} ----- Taninos catéquicos ----- (+) positivo
 - Fracción AQ_{1,7} ----- Alcaloides ----- (+) positivo
 - Fracción AQ₂ (100 ml)
 - Triterpenos/Esteroles ----- (-) negativo
 - Carotenoides ----- (-) negativo
 - Ácidos grasos ----- (-) negativo
-

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Analizando cada uno de los extractos obtenidos en el Screening fitoquímico sobre la *Cissus verticillata* L. se pudo determinar la presencia de constituyentes químicos, ya mencionados anteriormente.

En nuestro estudio se demostró la presencia de: Triterpenos/Esteroles, Ácidos grasos, Alcaloides, Carotenoides, Cumarinas, Taninos catéquicos, Compuestos reductores, Antracénósidos, Antocianinas y Polisacáridos; como se esperaba en el Screening; ya que la presencia de estos compuestos depende de sus propiedades físico-químicas, polaridad de los solventes, temperatura y pH.

- 1. Triterpenos/Esteroles:** La presencia de estos compuestos se identificó en las fracciones A₂ y B₅, por la aparición de un anillo de color verde en la parte superior con una interfase color marrón, comprobando su solubilidad en éter y compuestos orgánicos de baja polaridad, al contrario en la fracción AQ₂ no se identificó por usar un solvente polar.
- 2. Carotenoides:** La identificación de estos constituyentes se efectuó en la fracción B₂ por la aparición de una coloración verde oscuro y por su solubilidad en compuestos orgánicos de baja polaridad. En la fracción A₂ y AQ₂ no se identificó por no haber cambio de coloración, comprobando su insolubilidad en soluciones ácidas o alcalinas y por usar solvente de alta polaridad.
- 3. Ácidos grasos:** La presencia de ácidos grasos en la fracción A₂ se debe en primer lugar a la formación de cristales y a su solubilidad en compuestos apolares y en soluciones ácidas; al contrario de la fracción A₁ donde el pH fue alcalino y AQ₂ donde el solvente usado fue el agua.
- 4. Alcaloides:** La positividad de estos constituyentes en la fracción B₁ se debe a la formación de precipitados al realizar un pretratamiento con soluciones alcalinas para liberarlos de sus sales y formar los precipitados, obteniendo así bases libres de alcaloides. En las fracciones E_{1,3} y AQ_{1,7} se obtienen alcaloides en forma de bases libres, debido a la formación de precipitados al realizar un pretratamiento con ácido clorhídrico y a su insolubilidad en solventes polares.

5. **Agliconas de flavonoides:** La presencia de estos compuestos en la especie no se identificó tanto en la fracción B₃ como en la E_{2,3}; por su insolubilidad en solventes apolares y al no presentar una coloración rojiza.
6. **Cumarinas:** Se identificó la presencia de estos constituyentes en las fracciones B₄ por su solubilidad en solventes apolares, en la E_{2,1} por ser solubles en soluciones alcohólicas de hidróxido de potasio (KOH), presentándose fluorescencia a una longitud de onda de 366 nm.
7. **Emodinas:** La especie en estudio no contiene este tipo de constituyentes, ya que no fueron identificados, al no aparecer una coloración rojiza.
8. **Taninos catéquicos:** Se presentan en la fracción AQ_{1,6} por la aparición de una coloración verde que se presentó y por su solubilidad en agua. En la fracción E_{1,1} no se comprobó la existencia debido a que estos compuestos son insolubles en alcohol y al no presentarse la coloración verde.
9. **Compuestos reductores:** Se identificó la presencia de estos constituyentes en la fracciones E_{1,2} y AQ_{1,5} debido a la formación de un precipitado color ladrillo al llevarse acabo una reacción de oxidación utilizando Cobre II complejado con ácido tartárico (R. Fehling).
10. **Antracenósidos:** La existencia de estos constituyentes en la fracción E_{2,2}, se debe a la coloración rojiza presentada en medio alcalino.
11. **Antocianinas:** La presencia de estos compuestos en la fracción E_{2,5} se demostró por la aparición de una coloración castaño en medio alcalino; demostrando que estos compuestos no solamente se encuentran en el fruto sino que también en las hojas de la especie.
12. **Almidón:** No se identificó la presencia de almidón en la especie al no aparecer una coloración azul en la prueba de Lugol.
13. **Polisacáridos:** Se identificaron en la fracción AQ_{1,2} por la aparición de una coloración rojiza al acidificar el residuo y al llevarse acabo la reacción con timol.

14. Saponinas: No se identificaron en la especie, al no producirse en la fracción AQ_{1,4} espuma persistente en agua, que es la característica de dichos constituyentes.

15. Mucílagos: No se comprobó la presencia de estos compuestos al no formarse un precipitado violeta después de realizada la prueba respectiva.

Al comparar la composición química de la *Cissus verticillata* L. Con otras especies de la misma familia como lo son la *Cissus sicyoides* y la *Vitis vitifera* se comprobó que las especies poseen una composición química cualitativamente igual, diferenciándose en su composición cuantitativa; además se puede comprobar por el reciente estudio hecho sobre la *Cissus sicyoides* realizado en el INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE LA HABANA, donde se demostró la presencia de: Taninos, Compuestos reductores, Triterpenos/Esteroles, Ácidos grasos y Flavonoides.¹⁶

8. CONCLUSIÓN.

- En el screening fitoquímico realizado en la hoja de la *Cissus verticillata* L. se hizo uso de reacciones de coloración y precipitación, en combinación con la cromatografía de capa delgada revelando la presencia de los siguientes constituyentes: **Cumarinas, Taninos catéquicos, Flavonoides en forma de antocianinas**; comprobándose además la existencia de otros constituyentes como: **Alcaloides, Triterpenos/Esteroles, Ácidos grasos, Carotenoides, Compuestos reductores, Antracénósidos y polisacáridos.**
- Al comparar la composición química de la *Cissus verticillata* L. Con otras especies de la familia **Vitaceae** se comprobó que la composición química de las especies es semejante cualitativamente.
- Los Ácidos grasos y Flavonoides son constituyentes químicos que se informan por primera vez tanto en la hoja de la *Cissus verticillata* L. como en la hoja de la *Cissus sicyoides*, lo cual se comprueba en el reciente estudio realizado en el INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE LA HABANA.¹⁶
- Se usaron solventes polares como el etanol y el agua, para obtener extractos cuya composición química contiene la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta y solventes apolares para obtener un extracto con una composición química que contiene constituyentes químicos con determinadas características, como ser solubles en solventes apolares.
- Se utilizaron diferentes técnicas de separación de constituyentes químicos como:
 - a. Soxhlet, técnica de separación semicontinua, que nos permitió realizar una extracción exhaustiva de los constituyentes químicos presentes en la *Cissus verticillata* L.
 - b. El reflujo y arrastre con vapor para evitar la pérdida de constituyentes volátiles presentes en la *Cissus verticillata* L. y así extraerlos de la misma.

9. RECOMENDACIONES.

1. En todo proceso de extracción se deben de considerar los siguientes factores: el estado de división de la droga, la agitación, la temperatura, el pH, la naturaleza del solvente y el tiempo de extracción.
2. Que en estudios posteriores se aíslen y caractericen los constituyentes químicos presentes en los diferentes extractos.
3. Demostrar los usos farmacológicos de la *Cissus verticillata* L. por medio de los ensayos biológicos y farmacológicos.
4. Los farmacéuticos debemos de realizar estudios más profundos en especies botánicas, para determinar la composición química y actividad biológica de las mismas y de esta manera contribuir aún más en el mejoramiento de la salud de la población.

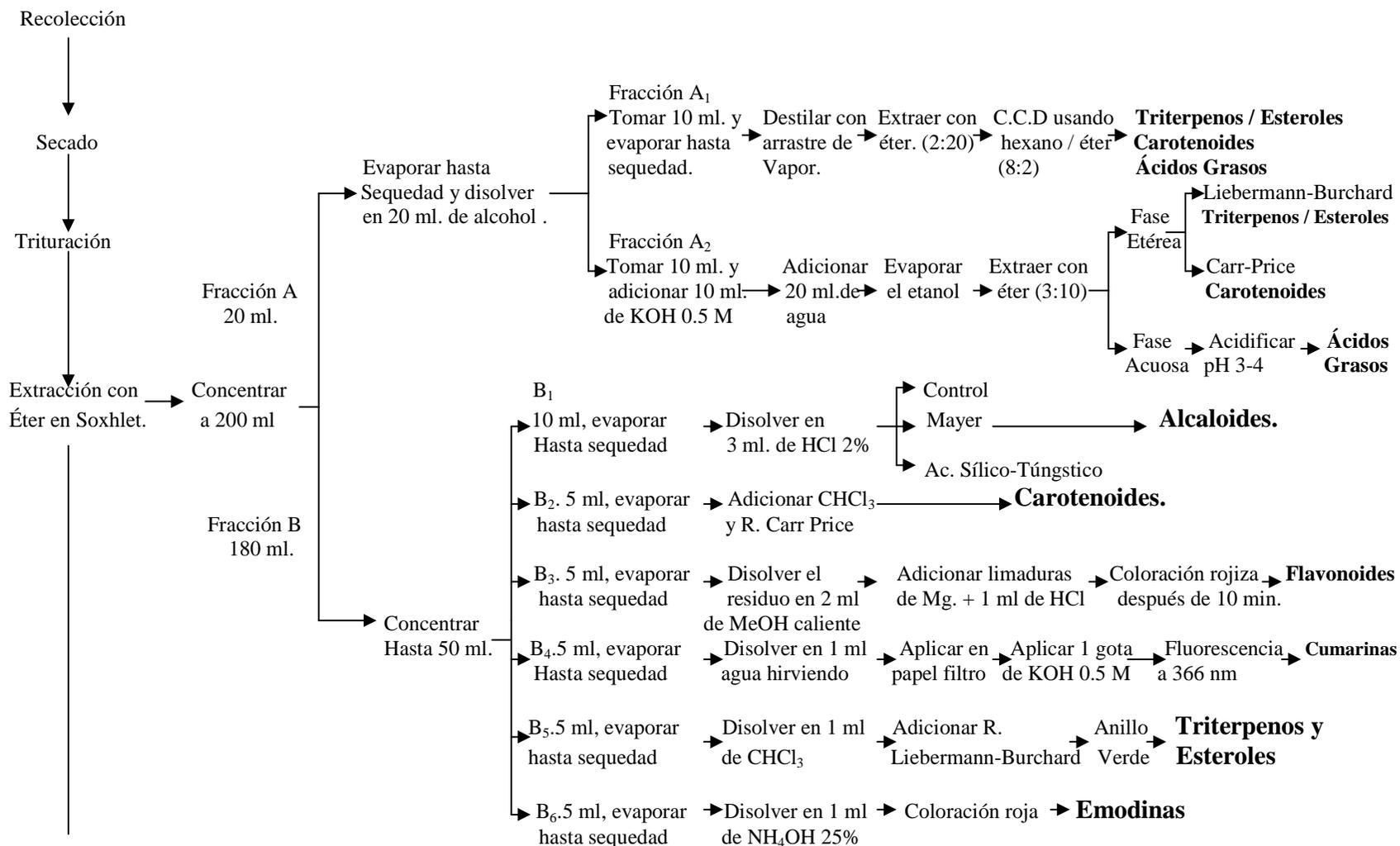
10. BIBIOGRAFÍA.

1. Braithwaite, A.. Cromatographic Methods. Quinta Edición. London. Blackie Academic and professional. 1996. Pág 117-125.
2. Browning, D. R.. Cromatografía. Primera edición. Barcelona, España. Toray-Masson S.A. 1971. Pág 14-15.
3. Evans, William Charles. (et. al). Farmacognosia. Treceava edición. México, D.F. Interamericana, McGraw-Hill. 1991. Pág. 337-340, 410-420, 448-450.
4. Farmacopea Vegetal Caribeña. Germosén-Robineau, L. (et. al). León, Nicaragua. Editorial Universitaria. 1998. Pág. 89-91.
5. Lederer, Michael. ed. Cromatographic reviews: Progress in Cromatography, electrophoresis and related methods. Primera Edición. Amsterdam. Elseiver S.A. 1962. Pág 544-922.
6. Muñoz Márquez, Cuauhtémoc. Métodos de separación. Primera edición. México. Editorial LIMUSA.1981. Pág 42-51.
7. Napralert profile. Internet. 06 de abril del 2003.
8. Randerath, Kurt. Cromatografía de capa fina. Primera edición. Bilbao, España. Urmo. 1978. Pág 23-26,33.
9. Sharapin, N. Fundamento de tecnología de productos fitoterapeuticos. Primera edición. Santa Fé de Bogotá, Colombia. Cytel. Marzo, 2000. Pág. 198-203.
10. Smith, Ivor. Cromatographic and Electrophoretic techniques. Segunda Edición. New York. Intersciencie. 1963. Pág 42-48.
11. Tyler, Varro E. (et. Al). Farmacognosia. Segunda edición. Argentina. Librería el Ateneo editorial. 1979. Pág. 82, 89-93, 170-171.

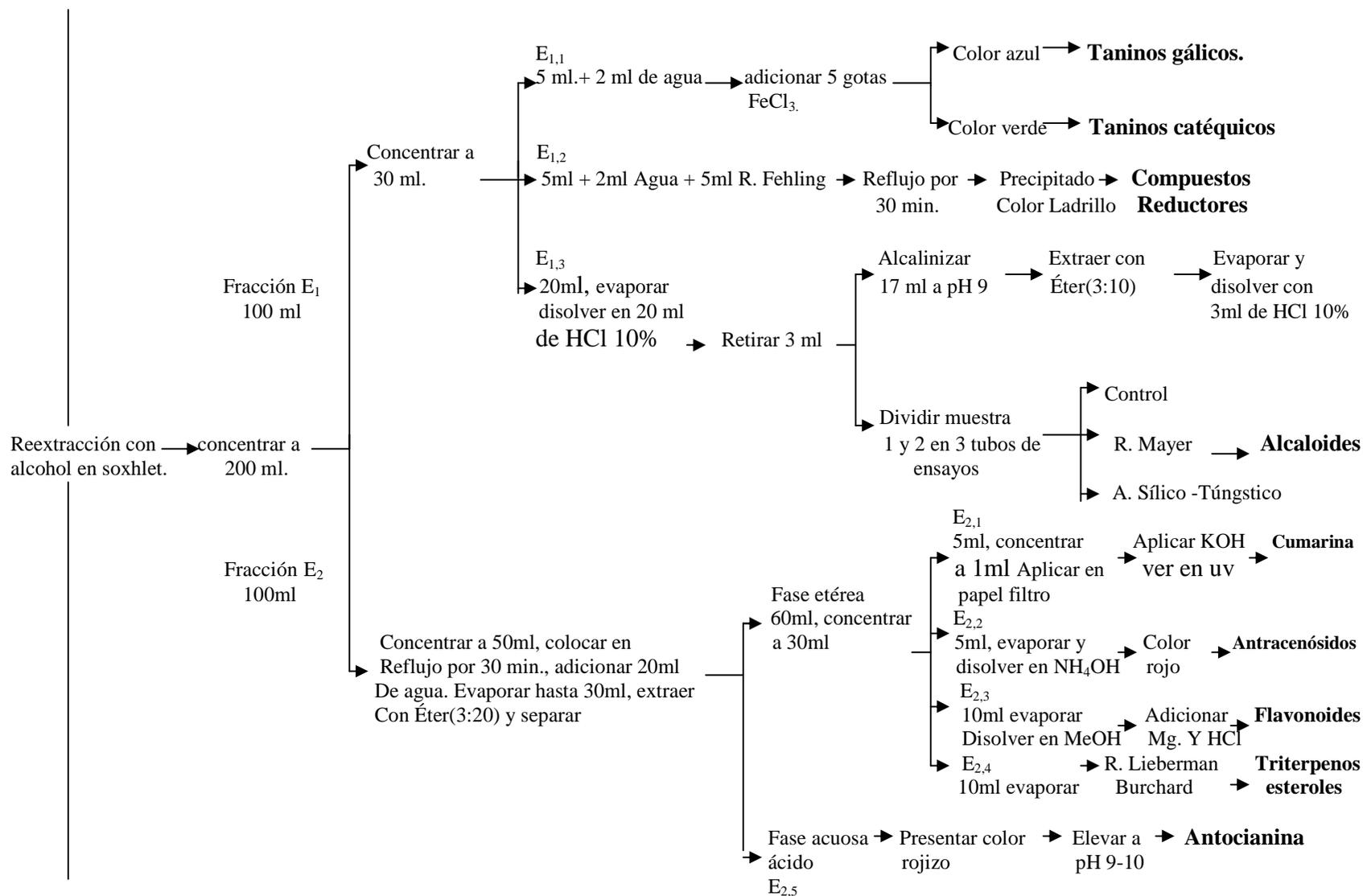
12. Dominic, N. Técnica de condensación.
<http://www.members.fortunecity.es/biota/condensación/condensación>
13. Pérez, Lamoreux. Laboratorio de Química orgánica. UCR/2003.
<http://www.equi.ucr.ac.cr/glamor/243/2003/pdf/06arrastre.pdf>
14. Facultad de química de la Universidad Nacional Autónoma de México.
Preparación de extractos.
<http://www.ur.mx/cursos/diva/química/escobed/separa.htm>
15. Laboratorio de química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Curso de separación química.
<http://www.bilbo.edu.uv/planta/pdf/farmacognosiaPE80/preparaciónextractos.pdf>
16. Scull Lizama, Ramón. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides*
http://www.infomed.sld.cu/revistas/far/vol34_2_00/far06200.pdf

ANEXOS

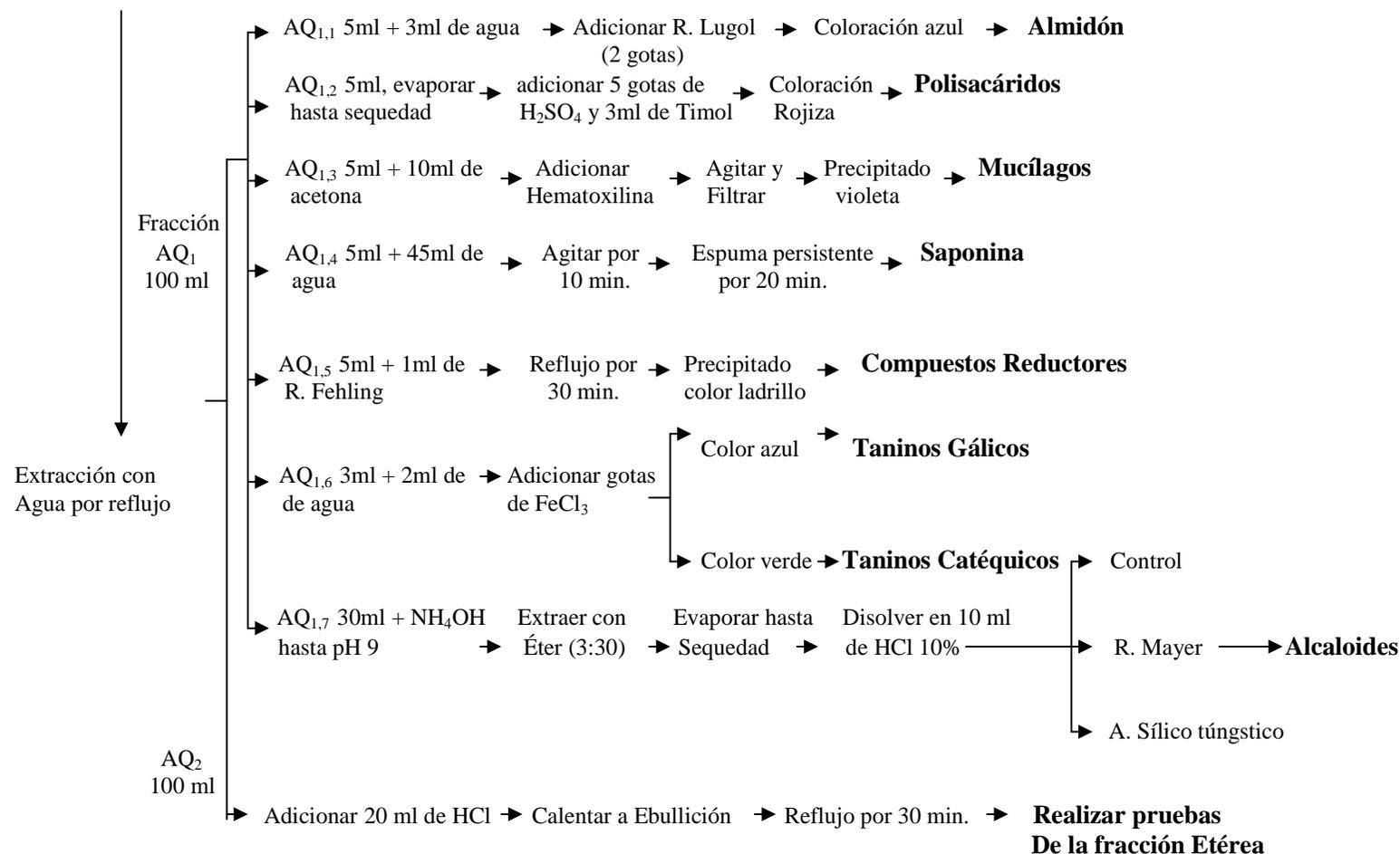
1. ESQUEMA DE TRABAJO. ⁹



Screening Fitoquímico en la *Cissus verticillata* L.



Screening Fitoquímico en la *Cissus verticillata* L.



EQUIPO UTILIZADO.

2. Molino eléctrico.

Marca: Thomas Wiley.

Modelo: N° 4 Motor Has Automatic Reset Thermal Protection.

Origen: Philadelphia, USA.

3. Equipos utilizados para las diferentes técnicas de extracción.

DESCRIPCIÓN

CANT.

Equipo Soxhlet con cámara de extracción y refrigerante para agua.



Refrigerante

3



Pinzas de 3 dedos con nuez

9



Screening Fitoquímico en la *Cissus verticillata* L.

Balón de 500 ml (fondo plano si
Se usa parrilla)

2



Canasta de calentamiento con conexión
o parrilla con agitación.

3



Matraz Erlenmeyer de 1 litro

2



Screening Fitoquímico en la *Cissus verticillata* L.

Matraz Erlenmeyer de 50 ml.

2



Probeta graduada de
5, 10 y 25ml.

3



Conexión de tubo de vidrio con dos tapones
bihoradados.

1



Screening Fitoquímico en la *Cissus verticillata* L.

Capilares

2



Anillo de hierro

2



Mechero Bushner

2



Screening Fitoquímico en la *Cissus verticillata* L.

Espátula

1



Vaso de precipitado de 50, 100 y 250 ml
(Beakers)

3



Recipiente de peltre

3

