



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

**“SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS DE LA HIEDRA (*Hedera helix*) DE ECUADOR CON FINES DE
APORTE A UNA TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN”**

TESIS DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR:

ELVIRA LUCÍA ERAZO PROAÑO

**RIOBAMBA – ECUADOR
2013**

DEDICATORIA

Esta investigación va dedicado a Dios, a mis queridos padres Enrique y María por brindarme siempre su apoyo y comprensión; ellos han sido el pilar fundamental en cada minuto de mi existencia y gracias a ellos pude culminar esta etapa de mi vida., a mis hermanos en especial a Jenifer que siempre supo brindarme su apoyo para seguir adelante y vencer cada obstáculo que se cruzó en mi camino.

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a mi Dios por darme salud y sabiduría para seguir labrando cada escalón de mi vida.

A mis queridos padres, quienes han sido la base de mi éxito estudiantil y mi formación como ser humano.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia por contribuir a mi formación profesional.

A las instituciones que me permitieron realizar las prácticas para fortalecer mis conocimientos.

A la Dra. Cumandá Játiva al M.Sc. Simón Moreano por su valiosa colaboración y asesoramiento en la elaboración del presente trabajo de tesis.

A todas las personas que me ayudaron de una u otra manera, no me queda más que decirles mil gracias.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA HIEDRA (*Hedera helix*) DE ECUADOR CON FINES DE APOORTE A UNA TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN**”, de responsabilidad de la señorita egresada Elvira Lucía Erazo Proaño, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez Luna DECANO DE LA FACULTAD	_____	_____
Dr. Iván ramos DIRECTOR DE ESCUELA	_____	_____
Dra. Cumandá Játiva DIRECTOR(A) DE TESIS	_____	_____
M.Sc. Simón Moreano MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Dra. Ana Albuja MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Tc. Carlos Rodríguez DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	_____	_____

NOTA DE TESIS ESCRITA _____

Yo, Elvira Lucía Erazo Proaño, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

ELVIRA LUCÍA ERAZO PROAÑO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
EtoAc	Acetato de etilo
H.Ac	Ácido acético glacial
HCl	Ácido Clorhídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
NH ₃	Amoníaco
Bu(OH)	Butanol
Cl ₃ CH	Cloroformo
CCF	Cromatografía Capa Fina
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución.
CCFP	Cromatografía en Capa Fina Preparativa
EtOH	Etanol
ExEtOH	Extracto Etanólico
g	Gramos
NaOH	Hidróxido de sodio
λ	Longitud de onda
Me(OH)	Metanol
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
%	Porcentaje
KMnO ₄	Permanganato de potasio
pH	Potencial de hidrógeno
CeSO ₄	Sulfato de cerio
UV	Ultravioleta

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE ANEXOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEORICO	1
1.1	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	1
1.1.1	Origen.....	1
1.1.2	Clasificación botánica.....	2
1.1.3	Descripción botánica.....	2
1.1.4	Composición química de (<i>Hedera helix</i>).....	3
1.1.5	Usos medicinales.....	5
1.1.6	Toxicidad.....	6
1.2	Extractos vegetales.....	6
1.2.1	Métodos de extracción.....	6
1.2.2	Clasificación de los extractos vegetales.....	7
1.2.3	Obtención de extractos botánicos.....	7
1.3	Metabolitos secundarios.....	8
1.3.1	Principales tipos de metabolitos secundarios en planta.....	9
1.3.2	Tamizaje fitoquímico.....	9
1.4	Cromatografía.....	11
1.4.1	Parámetro cromatográficos.....	12
1.4.2	Tipos de cromatografía	13
1.4.2.1	Cromatografía en capa fina.....	13
1.4.2.2	Constantes R _f y R _x	14
1.4.2.3	Cromatografía en placa preparativa	15
1.4.2.4	Cromatografía en columna.....	15
1.4.2.5	Cromatografía líquida de alta resolución.....	16

1.5	ESPECTROSCOPIA.....	17
1.6	ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA Y VISIBLE.....	19
1.7	REGLAS DE WOODWARD –FIESER.....	19
1.8	CÁLCULOS PARA ENCONTRAR LA POSIBLE ESTRUCTURA USANDO LAS LONGITUDES DE ONDA OBTENIDAS EN EL ESPECTRÓMETRO UV-VISIBLE.....	21
1.9	CUANTIFICACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS POR PERMANGANOMETRÍA PERMANGANATO DE POTASIO COMO VALORANTE.....	26
1.9.1	ESTANDARIZACIÓN CON OXALATO DE SODIO (Na ₂ C ₂ O ₄).....	27
2.	PARTE EXPERIMENTAL	28
2.1	LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	28
2.2	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	28
2.2.1	Materiales de laboratorio.....	28
2.2.2	Equipos.....	29
2.2.3	Reactivos.....	29
2.3	FACTORES DE ESTUDIO	29
2.4	COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA.....	30
2.5	RECOLECCIÓN Y MUESTREO.....	30
2.6	PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y SUBEXTRACTOS.....	30
2.6.1	Extracto etanólico.....	30
2.7	PROPIEDADES FÍSICA.....	31
2.7.1	Determinación de los requisitos organolépticos.....	31
2.7.2	Determinación de la densidad relativa.....	31
2.7.3	Determinación del índice de refracción.....	32
2.7.4	Determinación del pH.....	33
2.8	TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA SOLUCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	34
2.8.1	Ensayo de espuma (Saponinas).....	34
2.8.2	Ensayo de Wagner (Alcaloides).....	34
2.8.3	Ensayo de Mayer (Alcaloides).....	35
2.8.4	Ensayo de Liberman-Buchard (Esteroles/Esteroides).....	35

2.8.5	Ensayo de Benedict (Taninos).....	35
2.8.6	Ensayo de Shinoda (Flavonoides).....	36
2.8.7	Ensayo de Baljet (Cumarinas).....	36
2.8.8	Ensayo de catequinas.....	36
2.9	PREPARACIÓN DE SUB EXTRACTOS.....	37
2.9.1	Sub extracto etéreo.....	37
2.9.2	Sub extracto butanólico	37
2.10	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS.....	37
2.10.1	Cromatografía del extracto total.....	38
2.10.2	Cromatografía del extracto y sub extracto.....	39
2.10.3	Separación de metabolitos secundarios del sub extracto etéreo.....	39
2.10.4	Separación de metabolitos secundarios a través de cromatografía en columna del sub extracto toluénico Ia.....	39
2.10.5	Separación y purificación de los metabolitos del extractos etanólico (II).....	40
2.10.6	Separación por cromatografía en columna del extracto etanólico (II).....	41
2.10.7	Cromatografías de las fracciones obtenidas de la columna del extracto etanólico (II).....	41
2.10.8	Placas preparativas de las fracciones obtenidas de la columna del extracto etanólico (II).....	42
2.10.9	Separación y purificación de metabolitos del sub extracto butanólico (III).....	42
2.10.10	Separación por cromatográfica en columna del sub extracto butanólico (III).....	43
2.10.11	Fracción obtenidas por cromatografía en columna del sub extracto butanólico (III).....	43
2.10.12	Placas preparativas de las fracciones obtenidas de la columna de sub extracto butanólico (III).....	44
2.11	SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC (CRISTALES).....	45
2.11.1	Preparación de muestra de cristales	46
2.11.2	Procedimientos en CLAR.....	46
2.11.3	Parámetro usados en el CLAR.....	46
2.11.4	Recolección de las fracciones se toma en cuenta los tiempos de retención	46
2.11.5	Cromatografía en capa fina fracciones recolectadas en CLAR.....	47

2.11.6	Placa cromatográfica del extracto total y de sub extractos.....	48
2.11.7	Cromatografía del sub extractos etéreo y toluénico.....	48
2.11.8	Cromatografías de las fracciones obtenidas de la columna del sub extracto toluénico (Ia).....	49
2.11.9	Fracciones del micro columna del extracto toluénico Ia#3 –Ia10.....	50
2.11.10	Placas preparativas de las fracciones de la micro columna del sub extracto toluénico.....	51
2.11.11	Cromatografía en capa fina del extracto etanólico (II).....	52
2.11.12	Cromatografías en columna del extracto etanólico (II).....	53
2.11.13	Placas preparativas de las fracciones de la columna del extracto etanólico (II).....	54
2.11.14	Cromatografía en capa fina del sub extracto butanólico (III).....	55
2.11.15	Fracciones obtenidas en cromatografía en columna del extracto butanólico.....	56
2.11.16	Placas preparativas de las fracciones de la columna del sub extracto butanólico (III).....	58
2.11.17	Separación de flavonoides por cromatografía líquida de alta resolución CLAR (cristales).....	60
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
3.1	CONTROL DE CALIDAD.....	61
3.2	PREPARACIÓN DEL EXTRACTO.....	61
3.3	ANÁLISIS QUÍMICO.....	62
3.4	ANÁLISIS FÍSICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HIEDRA.....	62
3.5	CUANTIFICACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS POR PERMANGANOMETRÍA.....	63
3.6	SEPARACIÓN CROMATOGRAFÍA DE EXTRACTOS Y SUBEXTRACTOS.....	64
3.6.1	Cromatografía en capa fina del extracto total.....	64
3.6.2	Cromatografía en capa fina del extracto y sub extracto.....	64
3.6.3	Cromatografía en capa fina del extracto etéreo.....	64
3.6.4	Separación por cromatografía en columna sub extracto toluénico Ib.....	66
3.6.5	Cromatografía de la micro columna de la unión de las fracciones 8 hasta la 11 del sub extracto toluénico.....	66
3.6.6	Placas preparativas de las fracciones de la micro columna del sub extracto toluénico.....	66
3.7	CROMATOGRAFÍAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO (II).....	67

3.7.1	Análisis cromatográfico de fracciones en columna del extracto etanólico.....	68
3.8	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (III)	69
3.8.1	Cromatografía en columna del sub extracto butanólico.....	69
3.9	SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC (CRISTALES)	72
4.	CONCLUSIONES	73
5.	RECOMENDACIONES	75
6.	RESUMEN	76
7.	BIBLIOGRAFÍA	78
8.	ANEXOS	86

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Valores de absorción para flavonoide, cumarinas y terpenos.....	19
TABLA No. 2	Materiales.....	28
TABLA No. 3	Equipos.....	29
TABLA No. 4	Reactivos.....	29
TABLA No. 5	Determinación de la propiedades físicas del extracto.....	34
TABLA No. 6	Determinación del % en peso en concentración de extractos.....	37
TABLA No. 7	Tiempos de retención.....	47
TABLA No. 8	Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la hiedra (<i>hedera helix</i>).....	62
TABLA No. 9	Parámetros físicos y químicos.....	63

ÍNDICES DE CUADROS

CUADRO No. 1	Valores de las longitudes de onda teórico y práctico de la hesperidina de las fracciones #3 al a #7.....	65
CUADRO No. 2	Valores de las longitudes de onda teórico y práctico de la crisina de la fracción #b3... ..	67
CUADRO No. 3	Valores de las longitudes de onda teórico y práctico de la esculetina fracción b8.....	67
CUADRO No. 4	Valores de las longitudes de onda teórico y práctico de la esculetina de las fracciones 12 y 14.....	68
CUADRO No. 5	Valores teórico y práctico de la quercetina de la unión de fracciones de la #6 a la #10.....	69
CUADRO No. 6	Valores de las longitudes de onda teórico y práctico de la crisina de la unión de fracciones #6 a la #10.....	70
CUADRO No. 7	Valores de las longitudes de onda teórico y práctico para una cumarina de la fracción #5.....	71
CUADRO No. 8	Valores de las longitudes de onda teórico y práctico de la esculetina de la fracción # 14.....	71
CUADRO No. 9	Valores de las longitudes de onda teórico y práctico de la gipsogenina de la fracción # 15.....	72

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO No. 1	Hojas de hiedra (<i>hedera helix</i>).....	1
GRAFICO No. 2	Principales metabolitos de la Hiedra.....	4
GRAFICO No. 3	Cálculo del Rf.....	14
GRAFICO No. 4	Cromatografía en columna.....	16
GRAFICO No. 5	Valores que se dan según la estructura al aplicar las reglas de Woodward-Fieser.....	20
GRAFICO No. 6	Preparación de extractos de hiedra (<i>Hereda helix</i>).....	38

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Preparación de extractos.....	86
ANEXO No. 2	Tamizaje fitoquímico, (cristales) extracto etanólico (II).....	86
ANEXO No. 3	Micro columna y columna cromatografía.....	87
ANEXO No. 4	Cromatografía líquida de alta eficacia.....	87
ANEXO No. 5	Titulación de taninos pirocatécolicos.....	87
ANEXO No. 6	Espectro del sub extracto toluénico.....	88
ANEXO No.7	Espectrograma del extracto etanólico.....	90
ANEXO No.8	Espectrograma del sub extracto butanólico.....	91
ANEXO No.9	Espectro de la cromatografía líquida de alta eficacia.....	92

ÍNDICE DE PLACAS

PLACA # 1	Extracto etanólico.....	48
PLACA # 2	Sub extracto etanólico, etéreo, toluénico, butanólico.....	48
PLACA # 3	Sub extracto etéreo.....	48
PLACA # 4	Sub extracto toluénico.....	48
PLACA # 5	Sub extracto toluénico fracciones #3, #5 y #6.....	49
PLACA # 6	Sub extracto toluénico fracciones #8, #11, #14 y #16.....	49
PLACA # 7	Sub extracto toluénico fracciones #17, #18, #19 y #20.....	49
PLACA # 8	Fracciones del micro columna del extracto toluénico Ia#3, Ia10.....	50
PLACA # 9	Placas preparativas de las fracciones de la micro columna del sub extracto toluénico fracción #a3.....	51
PLACA # 10	Placas preparativas verificación de las fracciones #3.....	51
PLACA # 11	Placas preparativas de las fracciones de la micro columna del sub extracto toluénico fracción #a8.....	51
PLACA # 12	Placas preparativas verificación de las fracciones #a8.....	51
PLACA # 13	Cromatografía en capa fina del extracto etanólico (II).....	52
PLACA # 14	Cromatografía en columna de la fracción #1 a #4.....	53
PLACA # 15	Cromatografía en columna de la fracción #6, #8, #10.....	53
PLACA # 16	Cromatografía en columna de la fracción #11 a #14.....	53
PLACA # 17	Cromatografía en columna de la fracción #12, #13, #14.....	53
PLACA # 18	Placas preparativas de las fracciones de la micro columna del sub extracto etanólico fracción #6 a #10.....	54
PLACA # 19	Placas preparativas verificación de las fracciones #6 a #10.....	54
PLACA # 20	Cromatografía en capa fina del sub extracto butanólico fracción #1.....	55
PLACA # 21	Cromatografía en columna del sub extracto butanólico fracciones de #1 a la #9.....	56
PLACA # 22	Cromatografía en columna del sub extracto butanólico fracciones de #5.....	56
PLACA # 23	Cromatografía en columna del sub extracto butanólico fracciones de #10 a la #12.....	56
PLACA # 24	Cromatografía en columna del sub extracto butanólico fracciones de #13.....	57

PLACA # 25	Cromatografía en columna del sub extracto butanólico fracciones de #14.....	57
PLACA # 26	Cromatografía en columna del sub extracto butanólico fracciones de #15, # 16.....	57
PLACA # 27	Placa preparativa del sub extracto butanólico de la fracción #6 a la #9.....	58
PLACA # 28	Verificación de la fracción #6 a la #9.....	58
PLACA # 29	Placa preparativa del sub extracto butanólico de la fracción #5.....	58
PLACA # 30	Verificación de la fracción #5.....	58
PLACA # 31	Placa preparativa del sub extracto butanólico de la fracción #14.....	59
PLACA # 32	Verificación de la fracción #14.....	59
PLACA # 33	Placa preparativa del sub extracto butanólico de la fracción #15.....	59
PLACA # 34	Verificación de la fracción #15.....	59
PLACA # 35	Placa preparativa del sub extracto butanólico de la fracción #16.....	60
PLACA # 36	Verificación de la fracción #16.....	60
PLACA # 37	Cromatografía líquida de alta resolución.....	61
PLACA # 38	Cromatografía en capa fina de fracciones de la #1 a la #7 de CLAR	61

INTRODUCCION

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso útil para el ser humano para la curación de sus enfermedades, esto se debe a la presencia de metabolitos secundarios; un gran número de ellos han sido estudiados, comprobando su actividad farmacológica. La dosificación con pruebas in vitro y en la aplicación in vivo replica en el escalamiento productivo.

Aún en muchos lugares del mundo la medicina tradicional sigue haciendo contribuciones en la práctica de la medicina actual con excelentes resultados. Es frecuente el uso de las plantas o de sus principios activos en la terapéutica. La identificación del valor curativo de las plantas ha provenido generalmente de la información proporcionada por quienes han hecho uso de la medicina tradicional, que igualmente ha sido la fuente para la investigación Fitoquímica.

Se conoce que la industria farmacéutica ecuatoriana para la elaboración de jarabes, comprimidos se provee del vegetal (*Hedera helix*) en polvo o en extracto importado desde España. Para ello este estudio, tiene como propósito verificar si la Hiedra de nuestro país tienen los mismos principios activos que la Hiedra de España.

Los metabolitos que le dan la actividad biológica a la Hiedra, son las saponinas como α -hederina y el hederacósico C. Uno de los propósitos es comprobar la presencia de saponinas (α -hederina y el hederacósico C) y establecer la metodología para su identificación a través de por propiedades físicas, químicas y espectroscópicas.

La *Hedera Helix* que se utilizó para este estudio se obtuvo en el barrio las Retamas de la Provincia de Chimborazo Ciudad de Riobamba, luego se realizó la identificación taxonómica de la especie en el herbario de la ESPOCH.

Se plantean los siguientes objetivos: Identificar, separar, purificar con pruebas cualitativas los metabolitos secundarios del *Hedera helix*. Preparar el extracto y sub extracto para identificar los grupos fitoquímicos por reacciones de decoloración a través de las propiedades físico químicas. Separar y comparar por cromatografía de capa fina los metabolitos secundarios y obtener la posible estructura de los mismos en base a sus espectros UV.

Según el tamizaje fitoquímico se verificó la presencia de flavonoides, cumarinas saponinas y taninos pirocatécolicos, los mismos que se pudieron comprobar al realizar la cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, placa preparativa y CLAR. Según este estudio no existen los hederacósidos que le dan la actividad expectorante de la Hedera del Ecuador.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

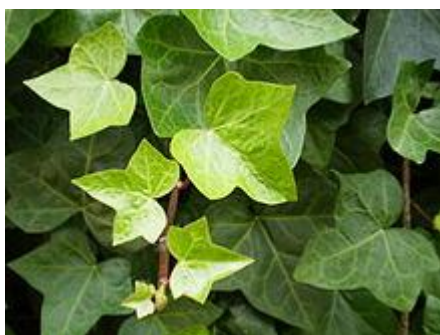


GRÁFICO #N° .1. HOJAS DE HIEDRA (*Hedera helix*) (38)

1.1.1 ORIGEN

La (*Hedera helix*) es originaria de Europa, estando ampliamente distribuida en Asia (desde la India hasta Japón) y norte de África. Crece en zonas húmedas de bosques, barrancos, en rocas, troncos de árboles, paredes o en el suelo, desde el nivel del mar hasta unos 1700 metros de altitud. Se ha introducido en numerosos lugares del resto del mundo (29, 36).

La familia Araliaceae consta de unos 60 géneros y 750 especies, principalmente tropicales. En el Ecuador están representados 5 géneros; introducida y cultivada como planta ornamental se encuentra la hiedra (*Hedera helix L.*). Dos géneros nativos con representantes arbóreos se encuentran en los bosques andinos (13).

Según el herbario de la ESPOCH en nuestro país esta planta fue introducida como planta ornamental.

1.1.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Nombre común: Hiedra

Nombre científico: *Hedera helix*

Familia: Araliáceae

Género: Asteridae

Clase: Magnoliopsida

El nombre científico: *Hedera* proviene del latín *haerere*, que significa estar adosado, gracias a la propiedad que tiene la planta de adherirse a las paredes, árboles y otros soportes (7).

1.1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Planta de hasta 30 m, trepadora, perenne, que forma amplias alfombras o trepa por soportes, tiene tallos vegetativos o estériles y tallos reproductivos, presentan raíces adventicias que salen de unos pequeños discos situados en los extremos de ramas estériles especializadas, las cortezas exudan un resina gomosa (34)

Las hojas poseen dos tipos de ramas, unas fértiles y otras estériles, que se distinguen fácilmente por la forma de sus hojas. Las hojas estériles son lobuladas con tres o cinco lóbulos y un nervio central que llega al extremo de cada uno de ellos; las hojas fértiles son ovaladas con un solo nervio central, y no pueden trepar tanto.

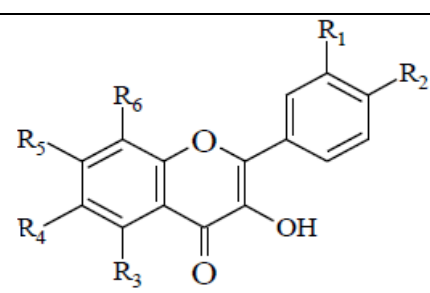
Las flores son hermafroditas y se reúnen en inflorescencia de tipo umbela, con 12 a 20 flores solitarias o agrupadas en una panícula racimosa. El cáliz tiene sépalos pequeños y deltados y la corola 5 pétalos de 3 a 5 mm, son de color verde amarillentos. La aparición de las flores de color amarillo verdoso se produce en agosto, septiembre y octubre, obviamente solo en las ramas fértiles (34, 37).

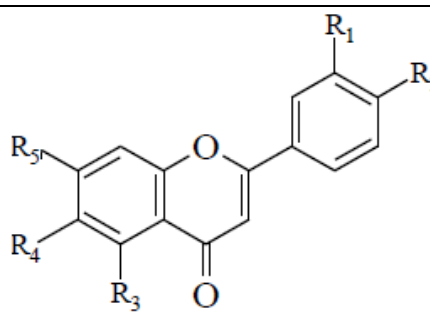
La hiedra es resistente al frío, tolera la cal y prefiere un ambiente húmedo; en los climas cálidos es preferible mantener el suelo húmedo durante los primeros años. En los meses de estío hay que suministrar mucho fertilizante y mojar las hojas con frecuencia. Después del trasplante necesita riego y soporte. La poda se realiza en marzo o julio (45).

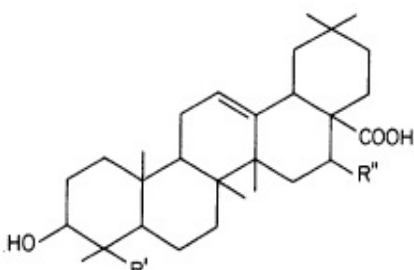
1.1.4 Composición química de (*Hedera helix*)

La *Hedera helix* contiene: saponósidos triterpénicos (2 a 6 %): heterocidos dihederagenina (hederacósido C, alfa-hederina), heterosidos del ácido oleanólico (hederacósido B y β -hederina), heterosidos de flavonoles (rutina, kaempferol -3-rutinósido, flavonoles (quercetina). Cumarina (esculetina) trazas de emetina (alcaloide); poliacetilenos, falcarinona, falcarinol, esteroides, ácido cafeico y clorogénico, hidrocarburos sesquiterpénicos (germacreno, β -elemeno, elixina) (11, 8).

Según estudios realizados en la Hiedra americana de Lima-Perú, en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina en la *Hedera helix*, se encuentran los siguientes compuestos flavonoides kaempferol, rutina, Apigenina, hesperidina, quercetina, crisina, 5, 7, 3, 4-tetrahidroxi-6,4'-dimetoxi flavonol y 4'-hidroxi-5,7-dimetoxi flavonona (26, 3)

Flavonoles		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
	Quercetina	OH	OH	OH	OH	OH	-
	Canferol	-	OH	H	-	OH	-

Flavonas		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
	Crisina	-	-	OH	-	OH
	Apigenina	-	OH	OH	-	OH
	Hesperidina	OH	OH	OH	-	OH

Triterpeno de saponina		R ₁	R ₂
	Gipsogenina	CHO	H

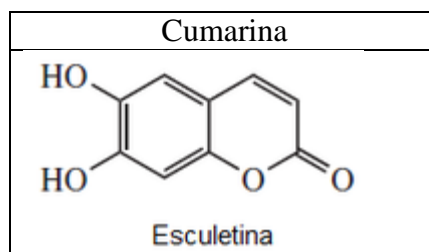


GRAFICO N°. 2. PRINCIPALES METABOLITOS DE LA HIEDRA (26, 25).

1.1.5 Usos medicinales

La hiedra dentro de la medicina tradicional; se recomienda para el asma de los niños, bronquitis, tos, especialmente contra la tos ferina y antibacteriano inespecífico. Por su contenido de yodo, se le utiliza contra la hiperfunción de las glándulas tiroideas, se recomienda en escrofulosis y en los catarros de las mucosas.

En medicina oriental, la Hiedra es usada para el tratamiento del asma, bronquitis, tos y como congestión nasal (12).

Usos de la hiedra: decocción, infusión, cataplasma y compresas contra dolores reumáticos

- Se usa como mucolíticas y expectorante, acción atribuida a los saponósidos y probablemente a la D emetina
- Los saponósidos presentan *in vivo* una acción anti fúngica, anti bacterial, antihelmíntica y anti protozoaria.
- La falcarinona y el farcarinol tienen acción antimicótica.
- El farcarinol ha mostrado efectos antibacterianos, analgésicos y sedantes.
- El extracto hidroalcohólico del tallo de la hiedra, tradicionalmente considerado expectorante previene *in vivo* el bronco espasmo inducido por acetilcolina (la alfa- hederina fue la principal responsable de esta acción).

Los extractos de hiedra se utilizan frecuentemente en cosmética en forma de crema, geles, lociones, champús, preparados “anticelulíticos “revitalizadores cutáneos” (3).

La recolección y secado de las hojas se lo hace en cualquier época, antes de que ocurra el florecimiento; se las lava y se las deja que sequen a la sombra en lugares ventilados o con calor artificial a menos de 40°C (7).

1.1.6 Toxicidad.

El fruto de la hiedra es venenoso, ya que es portador de una sustancia hemolítica que destruye los glóbulos rojos, dando lugar a diarreas con sangre, catarsis, alteraciones nerviosas y palidez; por tanto, nunca debe administrarse por vía oral.

La hederina, es uno de los componentes de la hidra; que es el que causa la toxicidad, por lo que su empleo debe evitarse, y solo bajo estricta prescripción facultativa -sin sobrepasar en ningún caso la dosis indicada por el médico y debe administrarse por vía oral (8).

1.2 EXTRACTOS VEGETALES

Se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con diferentes solventes.

1.2.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica; dentro de ésta, los métodos de extracción por maceración y la percolación o lixiviación son los más utilizados (7).

1.- Maceración: El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta el agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto.

2.- Percolación o lixiviación: El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente de forma tal que el solvente cubra la capa de sólido

en el tanque percolador. El solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto (11).

1.2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Dependiendo del grado de concentración de los extractivos, los extractos pueden clasificarse en:

- Extractos fluidos o líquidos
- Extractos semisólidos o blandos
- Extractos secos

1.2.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS BOTÁNICOS

Es importante establecer los parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto medicinal. Por ejemplo:

- **Naturaleza química de la materia prima** vegetal: conocer las características del metabolito o compuesto químico a extraer.
- **Selección del solvente:** definir la selectividad del solvente a emplear, el solvente óptimo será el que logre extraer con un mayor rendimiento del compuesto de interés.
- **Relación sólido-líquido:** la proporción más conveniente de trabajo será aquella con la que se alcance el mayor rendimiento de extracción.
- **Tamaño de partícula del sólido:** de la forma y dimensión de los sólidos depende en gran medida el éxito de la lixiviación, a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto entre la droga y el disolvente, y por lo tanto, mayor acceso de los principios activos al medio líquido
- **Temperatura:** el aumento de la temperatura favorece la extracción, hay que prestar especial atención cuando la sustancia de interés es termolábil o el

menstruo es volátil, además, temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar cantidades excesivas de solutos indeseables.

- **Velocidad de agitación y tiempo de extracción:** los valores óptimos de estos parámetros serán aquellos que logren extraer un mayor rendimiento del producto. A mayor tiempo de contacto, mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones.
- **Viscosidad del medio:** no deben seleccionarse solventes de viscosidad relativamente alta.

El extracto vegetal obtenido se debe caracterizar en base a: las sustancias activas y marcadores, densidad, solventes residuales, sólidos totales, pH, control microbiológico y volumen total.

1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los principios activos de las plantas están comprendidos dentro de los llamados Productos Naturales o Metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución más restringida de fuentes botánicas específicas, que los metabolitos primarios (12).

Los metabolitos de las plantas es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales (3).

Los metabolitos secundarios (en la mayoría de los casos) no parecen ser necesarios para la supervivencia de las plantas, pero pueden suponer una ventaja competitiva considerable.

Los metabolitos secundarios además poseen otras características, como son:

- No tener funciones metabólicas directas aparentes.
- Ser importantes para la supervivencia e interacción con el entorno.
- Presentar diferente distribución en el reino vegetal.
- No ser clasificados como secundarios basándose en su estructura, ruta biogénica o tipo de distribución (40).

1.3.1. PRINCIPALES TIPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o no de nitrógeno en su composición; los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides (o isoprenoides), los fenilpropanoides (o compuestos fenólicos) y los alcaloides (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura). Los terpenoides derivan del isopentenil difosfato (IPP) y se conocen unos 25.000. Los alcaloides contienen uno o más átomos de nitrógeno y se derivan principalmente de aminoácidos, de ellos se conocen unos 12.000. Mientras que los aproximadamente 8.000 fenilpropanoides provienen de las llamadas vías biosintéticas del shikimato o del malato/acetato (20).

1.3.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico “screening” fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímico, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta, y a partir de allí, orientar la extracción y/o fabricación de los extractos para el aislamiento de los compuestos de mayor interés (36).

El tamizaje fitoquímico se realiza con el objetivo de determinar la presencia de determinados metabolitos secundarios, en dependencia de sus características estructurales y solubilidad de cada uno de ellos, que permitan su identificación en uno u otro solvente (agua, alcohol y éter), (37).

Se han desarrollaron los siguientes ensayos:

- **El ensayo de Sudán III:** permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos, respectivamente.
- **El ensayo de Mayer y el de Wagner:** permiten identificar alcaloides, se procede de la forma descrita para el ensayo de Dragendorff, hasta obtener la solución ácida. Si al añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer o Wagner respectivamente, se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de este tipo de metabolito.

En el caso de alcaloides cuaternarios y/o aminoácidos libres, estos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia debe observarse la aparición de turbidez definida o precipitado coposo en todos los casos, ya que la aparición de opalescencia puede dar un resultado falso, pues puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

- **El ensayo de Baljet:** permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos que pueden dar también positivo este ensayo. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado.
- **Ensayo de Borntrager:** Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo. Para la identificación de quinonas.
- **Ensayo de Liebermann – Burchard:** debido a que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Para identificar triterpenos y/o esteroides

- **Ensayo de Ninhidrina:** Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo. Para identificar aminoácidos libres o de aminas
- **Ensayo de Shinoda:** El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos. Permite reconocer la presencia de flavonoides
- **Ensayo de Antocianidinas:** permite identificar en los extractos la existencia en estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amílica es indicativa de un ensayo positivo
La presencia de estructuras tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa, que aumenta la densidad del agua donde se extrae, denota la presencia de mucílagos.
- **El ensayo de espuma:** permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénicas.
- **Ensayo de Fehling:** este se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo. Para reconocer la presencia de azúcares
- **Ensayo de Resina** permite identificársete tipo de compuestos y se considera positivo cuando aparece un precipitado (11, 46).

1.4 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla bajo la influencia de dos efectos contrapuestos.

- a) **Retención.** Efecto producido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- b) **Desplazamiento.** Efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil, recibe el nombre de elución. La mezcla a

separar se deposita sobre la fase estacionaria, mientras que la fase móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a diferente velocidad, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. Las dos fases se eligen de forma que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. (48).

1.4.1 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

- a) **Eficiencia.**- Para definir la eficacia se utiliza el concepto de plato teórico, y se define éste como la sección teórico-transversal en la cual se realiza el equilibrio de partición durante el flujo de fase móvil. Cuanto mayor es el número de platos teórico (N) mayor será la eficiencia de la columna.

El número de platos teóricos mide la capacidad de la columna para separar los componentes, no la retención de los mismos. La eficiencia o el número de platos se puede observar directamente a partir del cromatograma, observando la agudeza de los picos (19).

La velocidad de la fase móvil influye en la eficiencia del sistema cromatográfico, ya que si la velocidad es pequeña los componentes tendrán más tiempo para que se pueda realizar el equilibrio de reparto, por lo que el número de platos será mayor y la altura de los platos menor (31).

- b) **Eficacia.**- Número de platos teóricos que mide la altura equivalente para comparar columnas de diferente longitud, dependen de las características de la columna como la velocidad de la fase móvil.

c) **Resolución (R o Rs).**- Es el parámetro que expresa el grado de separación que se puede obtener en un sistema cromatográfico para dos componentes dados. Relaciona la capacidad separadora de un sistema cromatográfico para dos componentes

Si el valor de la resolución está próximo a 0,7 se obtendrá una mala resolución quedando los picos solapados, de forma que se distinguen únicamente las crestas, pero no la base, y si el valor de la resolución está próximo a 1,5 se obtendrán unos picos bien delimitados por lo que se obtendrá una buena resolución (30).

1.4.2. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA.

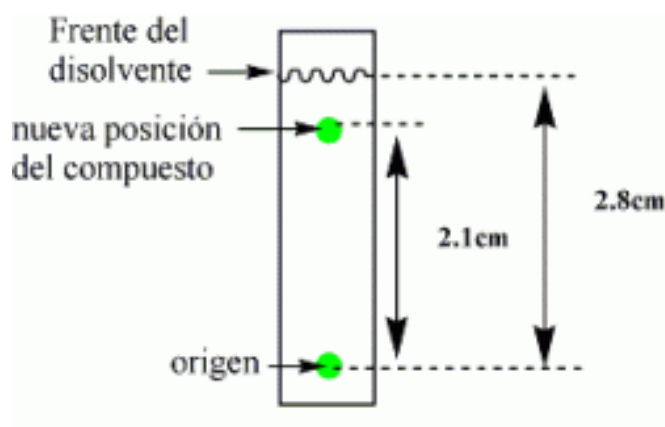
Dentro de las diferentes clasificaciones de las cromatografías, se puede referir aquella que considera la distribución de la fase estacionaria teniéndose entonces la cromatografía en superficie plana dentro de la cual se encuentra la cromatografía en papel, de capa fina y cromatografía en columna con sus diferentes particularidades esta es la clásica, baja presión o de gases.

1.4.2.1. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. La placa cromatográfica consiste en una fase estacionaria polar (sílica gel). El eluyente debe ser un compuesto líquido apolar, generalmente orgánico, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares (9, 32).

La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil, que asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo

que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa esta se saca y se visualiza (9).



$$Rf = \frac{2.1}{2.8} = 0.75$$

GRÁFICO N.º. 3 CÁLCULO EL RF (31).

1.4.2.2 Constantes Rf y Rx

La constante Rf (factor de retención). Es la manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa y mide la retención de un componente. Se define como: la distancia recorrida por el compuesto, que se mide generalmente desde el centro de la mancha original hasta donde se ha desplazado, sobre la distancia del frente del disolvente o fase estacionaria. Para que los Rf sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (Espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de Rf que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un Rf entre 0.65 y 0.7.

Fórmula para calcular los Rf:

$$Rf = \frac{\text{Distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación (a)}}{\text{Distancia recorre el disolvente hasta el frente del eluyente (b)}} \quad (14)$$

Para averiguar si dos compuestos son iguales, se colocan los dos sobre una misma placa y se desarrollan con varios eluyentes. Una vez desarrollados se calculan los Rf y si son

distintos, puede deducirse con toda seguridad que no se trataba del mismo compuesto. Por el contrario si los R_f son iguales los compuestos pueden ser los mismos (6).

Si se sospecha que dos compuestos son muy parecidos se eluyen sobre la misma placa con el mismo eluyente u otros de mediana polaridad, hasta apreciar una separación mínima. Se pueden utilizar reveladores químicos (vapores de yodo, vapores de amoníaco, $CeSO_4$, H_2SO_4 /vainillina), también se puede utilizar reveladores físicos (indicador fluorescente para observar en la lámpara ultravioleta.)

1.4.2.3. Cromatografía en placa preparativa.

La cromatografía preparativa se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio. Se utiliza para la separación y aislamiento de los componentes de una mezcla en cantidades comprendidas entre 100-200 mg.

En la superficie del adsorbente (gel de sílice), mediante una pipeta Pasteur, se traza una línea continua con la muestra disuelta y se introduce la placa en posición vertical en una cubeta. Durante la elución debe permanecer tapada para evitar la evaporación del disolvente, y para que todo el ambiente sea semejante. Una vez que se han separado los productos que componen la muestra, se marca con una cuchilla el contorno del compuesto a aislar y con ayuda de una espátula se desprende del soporte de vidrio el gel de sílice con el compuesto adsorbido. Una vez transferido a un erlenmeyer se añade un disolvente en el cual sea soluble el producto, se filtra el gel de sílice y una vez eliminado el disolvente tenemos el producto puro (30).

1.4.2.4 Cromatografía en columna.

Es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánico a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina con una placa porosa que impide su paso y en un estrechamiento con una llave.

La mezcla se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria mientras que la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones, los más polares quedan más retenidos y para que salgan generalmente hace falta aumentar la polaridad del disolvente. El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna se llama tiempo de retención.

El adsorbente más utilizado para cromatografía de columna es gel de sílice, aunque también se puede emplear alúmina y florisil. La elución de la cromatografía puede realizarse por simple gravedad a la que se denomina cromatografía clásica en columna (8, 30).

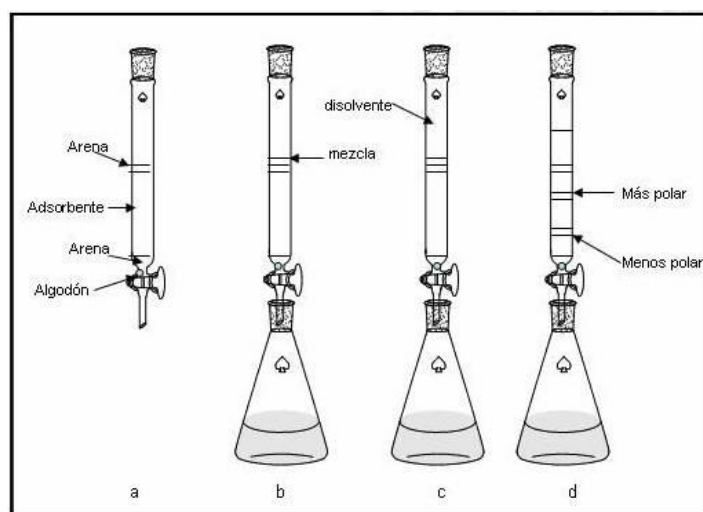


GRAFICO N°.4 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA (14)

1.4.2.5 Cromatografía líquida de alta resolución

La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando durante toda la separación se utiliza siempre el mismo solvente, se denomina cromatografía isocrática, sin embargo es normal realizar un gradiente de composición del solvente a lo largo de la cromatografía para mejorar la eficiencia y acortar la duración del proceso. Cuando se trata de una mezcla de disolventes se denomina cromatografía o gradiente en estos casos, puede programarse la bomba para que tome solventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado. Estos gradientes de solventes también son realizados en forma automática por las bombas.

La bomba envía al solvente a través de caños de diámetro pequeño, generalmente de acero inoxidable, hacia la válvula inyectora. Esta consiste en una válvula de seis vías que permite introducir en el flujo de solvente, la muestra contenida en un aro de volumen calibrado. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector. Este produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia y esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico denominado cromatograma de intensidad de los picos en función del tiempo (10).

Etapas del análisis de una muestra en la cromatografía líquida de alta resolución

En lo que respecta a la optimización de las condiciones experimentales, en este caso es posible realizar ensayos preliminares orientativos utilizando cromatografía en capa delgada con la misma fase fija que contiene la columna.

Por otra parte es necesario tener en cuenta que dado que se utilizan altas presiones, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir los caños y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y que produzcan inestabilidad en la señal del detector.

Para evitar las obstrucciones, los solventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0,45 a 0,22 μm . Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasadores de solvente por vacío o por burbujeo con He y, en el caso de no contar con los mismos, se deben desgasar los solventes por medio de ultrasonido o agitación bajo vacío antes de utilizarlos como fase móvil (5).

1.5 ESPECTROSCOPIA

La espectroscopia surgió con el estudio de la interacción entre la radiación y la materia. En un principio se refería al uso de la luz visible dispersada según su longitud de onda. Más tarde el concepto se amplió para comprender cualquier medida en función de la

longitud de onda o de frecuencia. Por tanto, la espectroscopia puede referirse a interacciones con partículas de radiación a una respuesta a una frecuencia variante, (ν). Una extensión de alcance de la definición añadió la energía (E) como variable al establecer la relación $E = h\nu$ para los fotones. Un gráfico de la respuesta como función de la longitud de onda que se conoce como espectro (17).

Que es una longitud de onda es la distancia entre los picos adyacentes y puede ser medida en metros, cm, micrómetros (μm), y nanómetros (nm).

Frecuencia es el número de ondas o ciclos que pasan por un punto preestablecido en el espacio en una unidad de tiempo, sus unidades están dadas en Hertz (S^{-1}) que son ciclos por segundo.

La luminiscencia es un proceso de relajación, este ocurre debido a la emisión de luz por una sustancia determinada cuando un electrón regresa a su estado original después de haber sido excitado y libera una energía como un fotón.

Principio físico de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra a la absorción de radiación ultravioleta- visible por una sustancia, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. Los límites de longitud de onda para la zona UV-visible comprenden aproximadamente entre 190 a 800 nm.

La radiación UV-visible cuando es absorbida por los electrones de valencia, estos son promovidos a estado excitado de mayor energía. Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diferentes orbitales. Algunos grupos funcionales que poseen enlaces dobles o electrones no compartidos, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV.

Cuando un haz de radiación UV-visible atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la Intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I .

La fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). En la práctica, se utiliza también la absorbancia (A) en lugar de transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la

especie absorbente según la ley de Lambert-Beer: $A = \epsilon \cdot I \cdot c$ (ϵ : coeficiente de absorptividad molar, I : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente) (4).

1.6 ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

Esta es una herramienta importante para estudiar equilibrios químicos y cinéticos. En estos experimentos se seleccionan las longitudes de onda adecuadas para seguir el curso de uno o más reactivos, productos de una especie intermedia.

La espectrometría UV y visible es de gran utilidad para el análisis cuantitativo. Las principales características de este método son: su amplia aplicación en sistemas orgánicos, inorgánicos y bioquímicos; el UV tiene sensibilidad razonable, sus límites de detección son relativamente altos, su selectividad moderada a alta, su exactitud y precisión razonables (los errores relativos son de 1 a 3 % y, con técnica especial, pueden reducirse a unas décimas de porcentaje), así como su rapidez y conveniencia (22, 39).

TABLA N°. 1 VALORES DE ABSORCIÓN PARA FLAVONOIDE, CUMARINAS Y TERPENOS

TIPO DE METABOLITO	LONGITUDES DE ONDA nm
FLAVONOIDES	236-260-275
FLAVONAS	232-279-314
TERPENOS Compuestos insaturados	λ max 222-250
Compuestos aromáticos	λ max 250-270
COUMARINAS	λ max 230 y 279

FUENTE: OLGA LOOK.1995.ANALISIS FITOQUIMICO

1.7 REGLAS DE WOODWARD-FIESER

El análisis estructural a partir de espectros electrónicos es bastante impreciso puesto que aporta muy poca información debido a su relativa simplicidad. El estudio de espectros de un elevado número de moléculas ha permitido establecer correlaciones entre estructuras y posición de los máximos de absorción. Las más conocidas son las reglas de Woodward-Fieser y Scott, referidas a compuestos carbonílicos insaturados, dienos, o esteroides. A


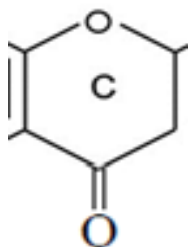
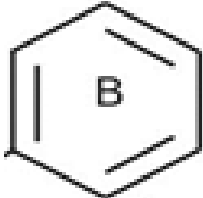
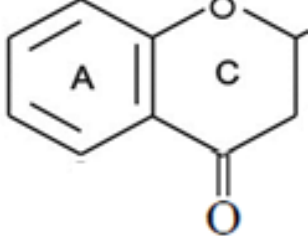
partir de tablas en que se recogen, en forma de incrementos, diversos factores y particularidades de estructura, se puede predecir la posición de la banda de absorción $\pi \rightarrow \pi^*$ de estos sistemas conjugados. La concordancia entre los valores conjugados y las posiciones experimentales es elevada.

Un cromóforo es un grupo funcional de compuestos orgánicos (cetonas, aminas, derivados nitrados etc.) responsables de la absorción en la región UV-Visible.

Cromóforos aislados: para una serie de moléculas que poseen el mismo cromóforo, tanto la posición como la intensidad de las bandas de absorción se mantienen sensiblemente constantes. Cuando una molécula posee varios cromóforos aislados, es decir, separados por al menos dos enlaces simples, se observa la superposición de los efectos individuales.

Cromóforos de sistemas conjugados: cuando los cromóforos se encuentran próximos, al espectro de absorción se desplaza hacia mayores longitudes de onda (efecto batocrómico) con aumento de la intensidad de absorción (efecto hiperacrómico).

Un caso particular es el de estructuras orgánicas que incluyen varios cromóforos insaturados separados entre ellos por un enlace simple. El espectro de estos sistemas conjugados está fuertemente perturbado con relación a la superposición simple de efectos producidos por los cromóforos aislados. Cuanto mayor es el número de átomos de carbono sobre el que se extiende el sistema conjugado, la distancia entre el nivel de los orbitales frontera disminuye (17).

			
$\lambda = 180\text{nm}$	$\lambda = 304\text{nm}$	$\lambda = 230\text{nm}$	$\lambda = 246\text{nm}$

Graficó N°.5 VALORES QUE SE DAN SEGÚN LA ESTRUCTURA AL APLICAR LAS REGLAS DE WOODWARD-FIESER

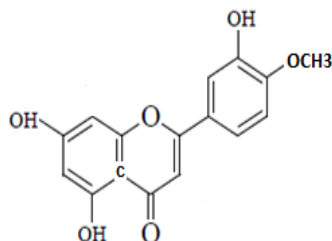
Incrementos por sustituyente de anillo aromático:

	Orto = 7
Sustituyentes OH en posición	Meta = 12
	Para = 25
Extensión de la conj O=C	5
Residuo de anillo	3

1.8 CÁLCULOS PARA ENCONTRAR LA POSIBLE ESTRUCTURA USANDO LAS λ OBTENIDAS EN EL ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE

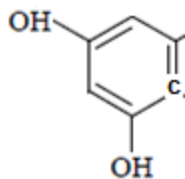
FLAVONOIDES (Hesperidina)

Compuesto #1



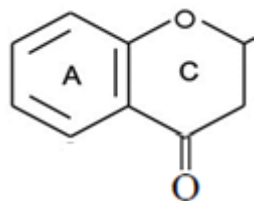
- Longitud de onda practicas: 237-270-274

$$237-180= 57$$



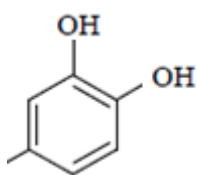
Valor base	180
Residuo de anillo	3
Ex. Conj. C=O x2	10
OH orto	7
OH meta	12
OH para	25
Total	237nm

$$270-246=24$$



Valor base	246
Residuo de anillo	3
Ex. Conj. C=O	5
OH meta	12
Total	266nm

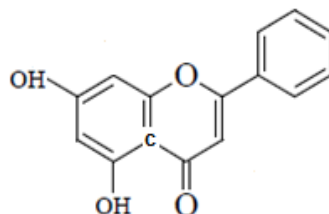
$$274-230=44$$



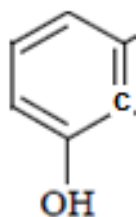
Valor base	230
OH meta	12
OCH3 para	25
Ex. Conj C=O	5
Total	272nm

FLAVONONAS (Crisina)

Compuesto # 2

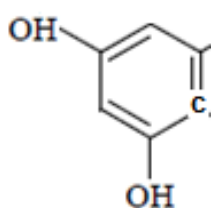


- Longitud de onda practicas: 205nm -223nm- 275nm
205nm - 180nm = 25



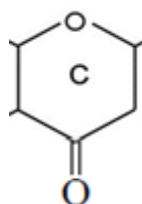
Valor base	180
OH para	25
Total	225nm

$$223\text{nm} - 180\text{nm} = 40$$



Valor base	180
Residuo de anillo	3
Ex. Conj. C=O	5
OH orto	7
OH para	25
Total	220nm

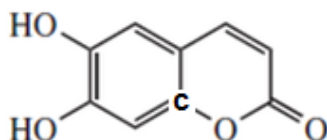
$$275\text{nm} - 246\text{nm} = 29$$



Valor base	246
OH orto	7
OH para	25
Total	278nm

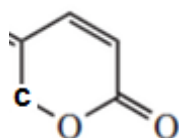
CUMARINA (esculetina)

Compuesto #3



- Longitud de onda practica : 202nm - 281nm

$$281\text{nm} - 230 = 54$$

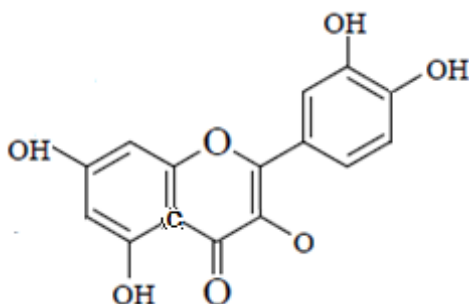


Valor base	230
------------	-----

Residuo de anillo	3
Ex. Conj. C=O x2	10
OH meta	12
OH para	25
Total	280nm

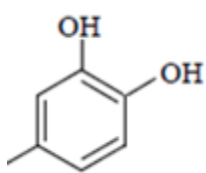
FLAVONOIDE (Quercetina)

Compuesto # 4



- Longitud de onda: 283nm - 296nm - 316nm

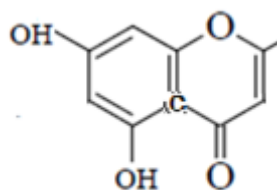
283nm - 230nm = 53



Valor base	230
Ex. Conj. C=O x 2	10
OH meta	12
OH para	25
Total	277nm

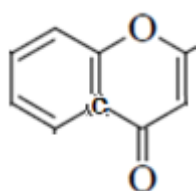
296nm - 246nm = 50

Valor base	246
Residuo de anillo	3



Ex. Conj. C=O x 2	10
OH meta	12
OH para	25
Residuo de anillo	3
Total	291nm

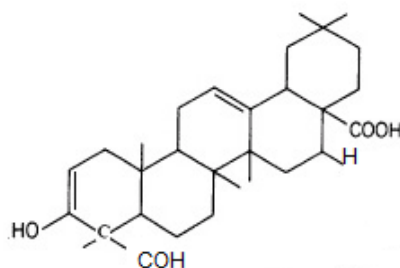
316nm – 304nm = 12



Valor base	246
Residuo de anillo	3
Ex. Conj. C=O	5
Total	312nm

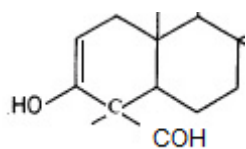
TERPENO (gipsogenina)

Compuesto #5



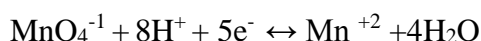
- Longitud de onda 223nm

223nm – 215nm = 12



Valor base	215
OH	12
Total	227nm

1.9 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS POR PERMANGANOMETRÍA PERMANGANATO DE POTASIO COMO VALORANTE



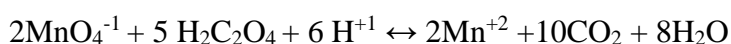
- Las soluciones de KMnO_4 son de color tan intenso que una sola gota de solución 0,02 N da color perceptible a 100 ml de agua
- El KMnO_4 es su propio indicador.
- El KMnO_4 es inestable, es capaz de oxidar espontáneamente al agua, además del hecho de que la materia orgánica lo reduce.
$$4 \text{MnO}_4^- + 2 \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 4 \text{MnO}_2 + 3 \text{O}_2 + 4 \text{HO}^-$$
- La velocidad de esta reacción es muy lenta, está catalizada por luz, calor, ácidos, bases, sales de Mn^{++} y por el propio MnO_2 . Por lo tanto, todo el MnO_2 deberá ser eliminado.
- Antes de estandarizar la solución, deberá dejarse que transcurra la reacción del KMnO_4 con la materia orgánica del agua (calentando para acelerar la reacción de descomposición y dejando en reposo para que coagule el MnO_2 inicialmente coloidal); luego se separará de la solución el MnO_2 por filtración a través de un tapón de asbesto en un crisol o en un embudo Buchner con filtro de lana de vidrio o a través de un embudo filtrante de vidrio sinterizado, pero nunca por papel de filtro, que puede ser causa de más descomposición del KMnO_4 .
- Las soluciones de KMnO_4 deben permanecer en frascos oscuros, mantenerse lejos de la luz o contaminación de polvo.
- Las soluciones de KMnO_4 de concentraciones mayores a 0,02 N, cuando se preparan y conservan como se acaba de describir, son estables durante muchos meses.

Preparación de permanganato de potasio 0.01N

$$\frac{0.01 \text{ eq KMnO}_4}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ mol KMnO}_4}{5 \text{ eq}} \times \frac{158.03 \text{ g KMnO}_4}{1 \text{ mol}} \times 1 \text{ L} = 0.316 \text{ gKMnO}_4$$

1.9.1 ESTANDARIZACIÓN CON OXALATO DE SODIO (Na₂C₂O₄)

Se dispone de este reactivo comercialmente en estado muy puro, se disuelve en medio ácido sulfúrico, formándose ácido oxálico no disociado.



El mecanismo por el cual transcurre esta reacción es extraordinariamente complicado, y sólo se obtienen resultados analíticos reproducibles y estequiométricos cuando se satisfacen ciertas condiciones empíricas:

- Debe valorarse a unos 70 °C para favorecer la velocidad de reacción. A medida que avanza la reacción, el valorante reacciona cada vez con mayor rapidez, hasta que la reacción se vuelve prácticamente instantánea, constituyendo un proceso auto catalítico, en el cual uno de los productos de la reacción funciona como un catalizador, se forman complejos de oxalato de Mn(III).

Preparación de la solución de Na₂C₂O₄:

$$\text{PM} = 133.9 \text{ g/mol Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

$$\text{masa} = \frac{\text{PM}}{2}$$

$$\text{masa} = \frac{133.9 \text{ g/mol}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}}{2} = 66.96 \text{ Eq}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}$$

$$\# \text{Eq}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4} = 66.96$$

$$\# \text{meq}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4} = 0.06696$$

$$\# \text{Eq}_{\text{KMnO}_4} = \# \text{Eq}_{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}$$

$$N_A \times V_A \times \text{meq}_B = \text{g B}$$

$$0.01 \times 26 \times 0.06696 = \text{g B Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

$$\text{g B} = 0.017 \text{ g Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$$

CAPÍTULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

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

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1. MATERIALES DE LABORATORIO

TABLA N°.2 MATERIALES

Mechero	Varilla de agitación
Gradilla	Viales
Tubos de ensayo	Soporte universal
Pipetas paster	Micro columna
Erlenmeyer	Espátula
Embudo de separación	Frascos ámbar
Vasos de precipitación	Bureta 25ml
Columna cromatográfica	Placas cromatográficas
Pinza universal	Cuba de vidrio
Pera de succión	Papel aluminio
Trípode	Algodón
Capilares	

2.2.2. EQUIPOS

TABLA N°. 3 EQUIPOS

Centrífuga (Dynac CA)	Espectrofotómetro (UV)1603 Shimadzu
Balanza analítica (Boeco Germany)	Aspersor
Estufa de circulación de aire (Memmert)	Computadora (hp)
Rotavapor (Bushi R 110)	Cámara digital (Olimpus)
Peachimetro (Hanna bench SP-PH211)	Cámara UV (Chromato-VUE model cc-20)
Sorbona	Refrigerador (Indurama)
Bomba de vacío (Vacum Pressure pump 115VAC-60Hz)	

2.2.3 REACTIVOS

TABLA N°. 4 REACTIVOS

Agua destilada	Metanol
Acetona	Índigo de carmín
Acetato de etilo	Hexano
Amoniaco	Permanganato de potasio
Ácido acético	Ácido Sulfúrico
Ácido fórmico	Ácido clorhídrico concentrado
Acetonitrilo	Sulfato de cerio
Butanol	Ácido fosfórico
Cloroformo	Reactivo de Dragendorff
Etanol	Reactivo de Wagner
Reactivo de Mayer	Reactivo de rosentaler
Silica Gel	

2.3 FACTORES DE ESTUDIO

- Comprobación taxonómica e identificación Botánica de Hiedra (*hedera helix*, se identificó la planta completa de la especie a estudiar y se llevó al herbario de la ESPOCH.

- Obtención de materia prima, selección, lavado y secado.
- Preparación del extracto alcohólico de todo el vegetal (hojas, tallos, flores, y frutos).
- Fraccionamiento del extracto (total) en subextractos (Etéreo, Butanólico)
- Selección de diferentes solventes para separar los metabolitos secundarios presentes en solución alcohólica.
- Determinación de metabolitos secundarios (Flavonoides, terpenoides, cumarinas) en la Hiedra (*Hedera helix*) a través del análisis espectrofotométrico.
- Separación de flavonoides y cumarinas en HPLC.

2.4 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Se llevó la planta en estudio Hiedra al Herbario de la ESPOCH, con la ayuda del Ing. Jorge Caranqui se pudo identificar a la familia a la que pertenece (Araliaceae) y su nombre científico *Hedera helix*.

2.5 RECOLECCIÓN Y MUESTREO

- Se recolectó el vegetal con hojas, flores, tallos y frutos de la (*Hedera helix*) en la ciudad de Riobamba, Ciudadela las Retamas el 06 de octubre del 2012.
- Se limpiaron todas las partes de la planta y se lavaron con abundante agua.
- Se dejó escurrir y secar al sol aproximadamente por una hora.
- Se cortó en pedazos pequeños.
- Se sometió a un proceso de secado en una estufa a 35 ° C por 1hora.
- Se trituro el vegetal, el cual está apto para la maceración.

2.6. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y SUBEXTRACTOS

2.6.1. EXTRACTO ETANÓLICO

Se pesó 2 kilos de vegetal y se colocó en un recipiente de vidrio con 3.5 litros de etanol al 96%, se dejó macerar por 9 días, protegidos de la luz y el calor, se filtró y se concentró a 1/8 de volumen hasta obtener el extracto etanólico.

En el extracto etanólico se realizó el tamizaje Fitoquímico y las propiedades físicas. Para obtener los subextractos se toma una alícuota del extracto etanólico.

2.7 PROPIEDADES FÍSICAS

2.7.1. DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS

Determinación de olor: Se introdujo una tira de papel filtro de 1 x 10 cm en el extracto EtOH, se percibió y se determinó su olor característico.

Determinación del color: se colocó el extracto EtOH en un tubo de ensayo y se observó su color.

Determinación del aspecto: En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de extracto EtOH y a contraluz se determinó su aspecto.

2.7.2. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

La densidad es la relación entre la masa y el volumen de la sustancia a ensayar a 25°C con respecto a la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

Materiales y reactivos:

- Picnómetro de al menos 10 ml de capacidad.
- Balanza analítica (Boeco Germany)

Procedimiento:

- Pesar el picnómetro vacío y seco y llenar con la porción de ensayo, mantener a temperatura de 25°C (+ 1°C) durante 15 min, y ajustar el líquido al nivel empleado; si es preciso, con una tira de papel quitar el exceso y secar exteriormente el picnómetro.

- Se pesa el picnómetro con la muestra, se repite la operación con agua destilada a 25°C y después vaciar el picnómetro.(10)

Expresión de resultados.

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

$$densidad = \frac{masa}{volumen}$$

2.7.3. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia (seno i), de la luz y el seno del ángulo de refracción (seno r), cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio

Viene dada por la siguiente ecuación:

$$n = \frac{\text{Sen } i}{\text{Sen } r}$$

En la práctica los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de luz incidente.

Materiales y reactivos:

- Refractómetro (Abbe)
- Varilla de vidrio

Procedimiento:

Se coloca sobre el prisma de medición del refractómetro, una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga canos agudos, se ajusta el equipo seleccionado la zona del espectro visible que aparece en línea límite del campo visual,

moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de muestra sobre el prisma de la medición, se cierra el termo prisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

Expresión de resultados, se hacen tres lecturas y se calcula el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0.002.

Si las determinaciones no se efectúan a la temperatura de referencia se emplea la siguiente fórmula:

$$n_D^{25} = n_d + 0.00044 (t-25)$$

Dónde:

n_D^{25} : Índice de refracción

n_D^t : Valor leído en la escala de temperatura t.

t: valor de temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044: factor de corrección por grados Celsius.

2.7.4. DETERMINACIÓN DEL pH

La acidez o la alcalinidad de soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrogeno, pH. El pH es un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógeno. se calcula teóricamente mediante la siguiente ecuación:

$$pH = - \log a_{H^+}$$

Dónde:

a_{H^+} : Actividad de los iones hidrógeno

En la práctica la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un peachímetro, ya sea digital o analógico. Esta lectura se da en función de la

diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador de membranas de vidrio y electrodo de referencia ya sea de pH=7.4 o 10 de acuerdo a las exigencias del peachímetro (11).

TABLA N°. 5 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL EXTRACTO

PARAMETROS	RESULTADOS	MÉTODO
Aspecto	Pegajoso	Visual
Color	Pardo verdusco	Visual
Olor	Fermentado	Olfato
Sabor	Dulce	Gusto
Densidad	1.0441	Picnometría
Índice de Refracción	1.362	Refractometría
pH	4.60	Potenciometría
°Brix	19.4	Refractómetro ABEE

2.8 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA SOLUCIÓN DE LOS EXTRACTOS

El tamizaje Fitoquímico es el inicio para la determinación cualitativa de los principales metabolitos secundarios presentes en un vegetal (hiedra), y de esta se parte para realizar la extracción, separación y purificación de los grupos de mayor interés.

2.8.1 ENSAYO DE ESPUMA (SAPONINAS)

Colocar 1ml de extracto. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye su volumen cinco veces en agua y se agita la mezcla fuertemente la formación de espuma sobre la fase acuosa cuando perdura al menos tres minutos es positiva.

2.8.2 ENSAYO DE WAGNER (ALCALOIDES)

En un tubo de ensayo colocar 1ml de extracto EtOH disolver en 1ml de HCl al 1% en agua. A esta solución se le adiciona 2 a 3 gotas del reactivo de Wagner y se reporta los resultados:

- Opalescencia (+)

- Turbidez definida (++)
- Precipitado (+++)

2.8.3 ENSAYO DE MAYER (ALCALOIDES)

En un tubo de ensayo colocar 1ml de extracto EtOH, disolver en 1ml de HCl al 1% en agua. A esta solución se le adiciona 2 a 3 gotas del reactivo de Mayer y se reporta los resultados de igual forma

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

2.8.4 ENSAYO DE LIBERMAN-BUCHARD (ESTEROLES/ ESTEROIDES)

Este ensayo permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, en ambos tipos de productos debe poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

En un tubo de ensayo colocar 1ml de extracto EtOH. Para ello si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño maría y el residuo disolverse en 1ml de cloroformo. Se adiciona 1ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo se deja resbalar 2-3 gotas de H₂SO₄ concentrado sin agitar. Un ensayo positivo da un cambio rápido de coloración.

- Rosado-azul muy rápido.
- Verde intenso-visible aunque rápido
- Verde oscuro-negro-final de la reacción

2.8.5 ENSAYO DE BENEDICT (TANINOS)

Este ensayo permite reconocer en un extracto la presencia de taninos y compuestos fenólicos. En un tubo de ensayo colocar 1ml de extracto EtOH más 2-3 gotas de FeCl₃

Se considera positiva la prueba cuando hay coloración:

- Rojo vino para compuestos fenólicos libres.
- Verde intenso para taninos pirocatéquicos
- Azul para taninos pirogalotánicos.

2.8.6 ENSAYO DE SHINODA (FLAVONOIDES)

Permite determinar la presencia de flavonoides. En un tubo de ensayo se coloca una alícuota de extracto, con la ayuda de una paleta se agrega una pequeña cantidad de limaduras de Mg y unas gotas de HCl concentrado.

La reacción se considera positiva cuando se presenta coloración amarilla, naranja, carmelita, rosada o rojo guinda; intensos en todos los casos.

2.8.7 ENSAYO DE BALJET (LACTONAS)

Para detectar la presencia de Cumarinas. Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento láctónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos láctónicos pueden dar positivo al ensayo.

Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1 ml de reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++, +++) respectivamente.

2.8.8 ENSAYO DE CATEQUINAS

Para ello, tomar de la solución alcohólica obtenida, una gota con la ayuda de un capilar y aplicar la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplicar solución de Carbonato de Sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica positiva la prueba.

2.9 PREPARACIÓN DE SUBEXTRACTOS

2.9.1 Sub extracto Etéreo

De la solución alcohólica coger una alícuota de 25 ml colocar en un embudo de separación y añadir un volumen igual de éter agitar por varios minutos y dejar reposar, separar la solución alcohólico (fase inferior bI₁) de la solución etérea (fase superior) repetir el proceso hasta cuando la fase etérea este transparente, trasvasar esta fase a un balón esmerilado previamente pesado eliminar el solvente dejar enfriar y pesar (bI₂).

2.9.2 Sub extracto Butanólico

A la fase alcohólica (I) agregar un volumen de butanol agitar por varios minutos y dejar reposar, separar la solución alcohólico (fase inferior) de la solución butanólica (fase superior) repetir el proceso hasta cuando la fase butanólico este transparente trasvasar está a un balón esmerilado previamente pesado concentrar y pesar (II).

TABLA N°. 6 DETERMINACIÓN DEL % EN PESO EN CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS

SUB EXTRACTOS	W1 BALÓN VACÍO	W2 BALÓN VACÍO + MUESTRA	%DE MUESTRA
Total	111.8037 g	118.3421 g	6.17%
Etéreo	111.7441 g	108.9787 g	1.70%
Butanólico	111.7422 g	108.4575 g	3.37%
Cristales	3.5868g	13.7913g	0.15%

2.10 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS

Con los resultados de tamizaje Fitoquímico se procedió a comprobar la existencia de metabolitos secundarios en el extracto etanólico y subextractos etéreo y butanólico, para lo cual se utilizaron placas de silicagel G_{F254}, solventes de corrido para la cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y cromatografía en placa preparativa.

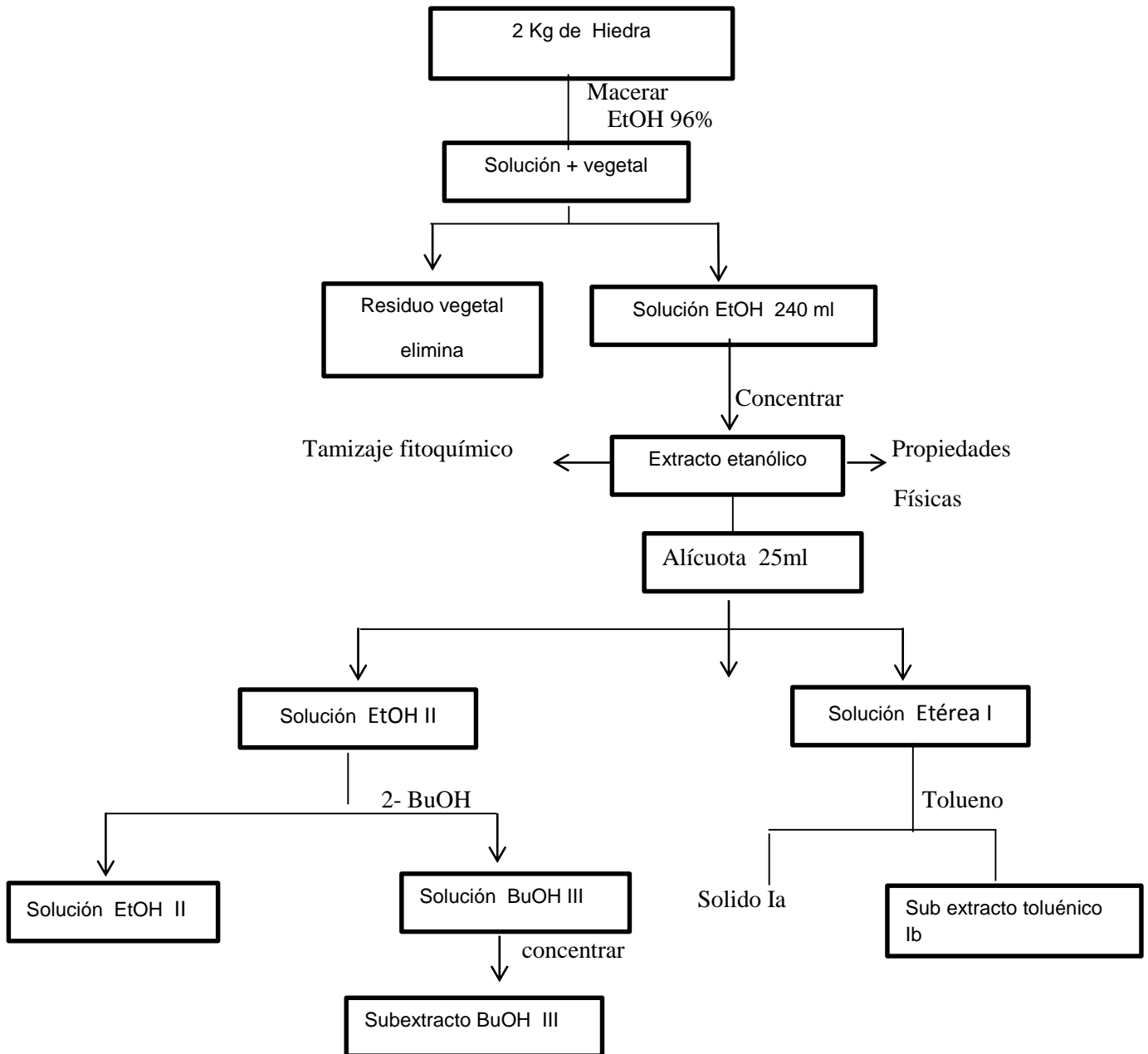


GRÁFICO N°. 6 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE HIEDRA (*Hedera helix*)

2.10.1 CROMATOGRAFÍA DEL EXTRACTO TOTAL

Se hizo una cromatografía en capa fina del extracto etanólico y se utilizó como solvente de corrido Cloroformo, Metanol, Agua (65:35:15) y se reveló con $Ce(SO_4)_2$; teniendo dos parámetros cromatográficos de eficiencia y eficacia, pero no tiene buena resolución (Placa #1).

2.10.2 CROMATOGRAFÍAS DEL EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS

Se preparó una cromatografía en capa fina del extracto y sub extractos para verificar la presencia de los metabolitos secundarios determinados en el tamizaje fitoquímico.

Se utilizó como solvente de corrido: Tolueno, Acetato de etilo (93:7) y se revelo con $Ce(SO_4)_2$, este solvente es adecuado para el subextracto etanólico ya que en capa fina da varias manchas por lo cual se considera que son complejos que necesitan fraccionarse. Para el subextracto etéreo, toluénico y butanólico se buscó otros solventes para la separación de los compuestos (Placa #2).

2.10.3 SEPARACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL SUBEXTRACTO ETÉREO

Se utilizó como solvente de corrido Tolueno, Acetato de etilo (93:7) y se revelo con $Ce(SO_4)_2$, no existió buena separación de los compuestos por lo que se aumentó la polaridad, pero tampoco se obtuvo buenos resultados por lo que se sometió a un fraccionamiento del subextracto etéreo, con un solvente más polar como el tolueno. (Placa # 3).

2.10.4 SEPARACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS A TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL SUBEXTRACTO TOLUÉNICO Ib.

Se utilizó como solvente de corrido Tolueno: Acetato de etilo (93:37) y se reveló con $CeSO_4$ y se obtuvo como resultado 20 fracciones.

Para las fracciones #3 a la #6 se usó como solvente de corrió Tolueno: Acetato de etilo (95:5) y como revelador $Ce(SO_4)_2$, presentando una sola mancha con un $R_f = 0.74$ en las tres fracciones. El análisis espectroscópico presentó las siguientes longitudes de onda: $\lambda = 237nm, 270nm$ y $274nm\lambda$ (Placa # 5).

Para las fracciones #8 a la #16 se usó como solvente de corrido: Tolueno: Acetato de etilo (95:5) y se reveló con vapores de yodo, la fracción #8 presentó un $R_f = 0.91$, la #11 un $R_f = 0.90$, la #14 con un $R_f = 0.70$ y la #16 con un $R_f = 0.72$ (Placa # 6).

Para las fracciones #17 a la #20 se corrió con Metanol: Ácido Acético (90:20) y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ en la #17 y #18 se obtuvo un $R_f = 0.72$, en las fracciones # 19 y #20 se obtuvo un $R_f = 0.74$.

Las fracciones Ia #8 hasta la Ia #10 se fraccionaron en una micro columna, de las que se obtuvieron 10 fracciones a las que se las llamó Ia1 hasta Ia10, se corrió con acetato de etilo y como revelador $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, de las fracciones Ia3 y Ia8 se hizo placa preparativa, de las fracciones Ia4, Ia5 se unieron y se obtuvo un $R_f = 0.50$, de las fracciones Ia6, Ia7 se unieron y se obtuvo un $R_f = 0.60$, de la fracción Ia9 se obtuvo un $R_f = 0.45$ y de la fracción Ia10 nos dio un $R_f = 0.58$ quedan en estas condiciones por tener buena separación (Placa #8).

En la placa preparativa de la fracción Ia3. Se usó como solvente de corrido acetato de etilo y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, se cortó cada una de las bandas para recuperar los metabolitos por extracción con metanol, se concentró y se obtuvieron soluciones transparentes. Para la verificación de compuestos se corrió con acetato de etilo y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, se presentaron tres bandas, la banda #1 con un $R_f = 0.56$, la banda #2 y #3 con un $R_f = 0.57$. En el análisis espectroscópico en la banda #2 se obtuvieron las siguientes longitudes de onda: λ_{max} 205nm, 223nm, 275nm (Placa #10).

En la placa preparativa de la fracción Ia8, se corrió con acetato de etilo y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, se cortó cada una de las bandas para recuperar los metabolitos por extracción con metanol, al concentrar se obtuvieron soluciones transparentes. Para la verificación de compuestos se usó como solvente de corrido acetato de etilo y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, presenta dos bandas la #1 con un $R_f = 0.63$, la banda #2 con un $R_f = 0.23$. En el análisis espectroscópico, se obtuvo las $\lambda = 204\text{nm}$, 281nm en la banda #2 (Placa #12).

2.10.5 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO (II)

En el extracto etanólico total cristalizaron sólidos redondos de color amarillo, solubles en metanol, ácido acético; se utilizó como fase estacionaria una placa de TLC de sílica gel y se corrió con Acetato de etilo: Ácido acético: Ácido Fórmico: Agua (100:11:11:26) y se

reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, obteniendo una separación de manchas que cumplieron con los parámetros de eficiencia, eficacia y resolución por lo que se hizo un fraccionamiento por medio de cromatografía en columna.

2.10.6 SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL EXTRACTO ETANÓLICO (II)

- La cantidad del extracto etanólico (II) es 0.75g permitiendo la separación en columna, usando los solventes de acuerdo a la escala de polaridad.
- Concentrar el extracto etanólico a sequedad.
- Por cada gramo de muestra pesar 20g de sílica gel y agregar en la columna Cromatográfica.
- Agregar el solvente de corrido de menor polaridad.

2.10.7 CROMATOGRAFÍAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA DEL EXTRACTO ETANÓLICO (II)

En la cromatografía en columna se obtuvo 15 fracciones; de la #1 a la #4 se usó como solvente de corrido butanol: Ácido Acético: agua (50:10:40) y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, los R_f del #1 = 0.77, R_f #2 = 0.88, R_f #3 = 0.76. La presencia de manchas redondeadas, separadas y distribuidas desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente de las fracciones #1 a la #3, nos dan la presencia de compuestos puros (Placa # 14).

Para las fracciones #6 a la #10 se usó como solvente de corrido: metanol y se observó en el UV una separación de manchas, dando como resultado para la fracción #1 un R_f = 0.33, 0.86, #2 R_f = 0.31, 0.86 y para la #3 un R_f = 0.33, 0.86. Como hubo buena separación de fracciones al observar en el ultravioleta, se realizó una placa preparativa uniendo las fracciones #6 a la #10 (Placa # 15).

Para las fracciones # 11 hasta la # 15 se usó como solvente de corrido Acetato de etilo: Ácido acético: Acido Fórmico: Agua (10:11:11:26) y como revelador $Ce(SO_4)_2$, presentando para la fracción #11 un $R_f = 0.51$ y para la #15 un $R_f = 0.77$, quedándose con este sistema de solventes por presentar buena separación; lo que no sucedió con las fracciones #12, #13 y #14 para las cuales se cambió de solventes (butanol saturado de agua), Placa # 16).

Las fracciones de la #12 hasta la #14 se corrió con butanol saturado de agua y se revelaron con $Ce(SO_4)_2$, presentando un $R_f = 0.64$ para las tres fracciones, obteniendo una buena separación de compuestos (Placa # 17).

2.10.8 PLACAS PREPARATIVAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA DEL EXTRACTO ETANÓLICO (II)

Placa preparativa de la unión de las fracciones #6 a la #10, se usó como solvente de corrido Butanol: Ácido acético: agua (50:10:20) y se revelo con $Ce(SO_4)_2$, obteniendo para la fracción #1 un $R_f = 0.71$, para la #2 un $R_f = 0.91$ y para la #3 un $R_f = 0.90$, leídos en el UV- visible nos dió para la banda 1 $\lambda = 214, 259, 266nm$, banda 2 UV λ_{max} 208nm, 226nm y 276nm, para la banda 3 UV λ_{max} 210nm, 226nm y 275nm (Placa #19).

2.10.9 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS DE SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (III)

Se usó como solvente de corrido acetona y se revelo con $CeSO_4$ obteniendo una buena separación, presentando 5 compuestos que cumplen con los parámetros de eficiencia, eficacia pero con deficiente resolución, por lo que se procedió a separar en columna (Placa #20).

2.10.10 SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (III).

- La cantidad del subextracto butanólico es 3.37g lo que permite separar en columna, utilizando solventes adecuados.
- Concentrar el subextracto butanólico a sequedad y luego obtener su peso en gramos.
- Por cada gramo de muestra pesar 20g de silica y agregar en la columna Cromatográfica.
- Agregar el sistema de solventes.

2.10.11 FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (III)

Se obtuvo 16 fracciones:

De la #1 hasta la # 9, se corrió con acetona y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, la fracción #1 queda con este solvente, por presentarse una sola mancha con un $R_f = 0.50$, la fracción #2, #3, #4 presentando un idéntico $R_f = 0.64$, por dicha condición se las unió. Para la fracción #5 se aumentó la polaridad por no tener eficacia, eficiencia y resolución, las fracciones #6, #7, #8, #9 se unieron y se hizo placa preparativa.

- La fracción #5 se corrió con BuOH saturado de H_2O y se reveló con $Ce(SO_4)_2$ presentando buena separación, por lo que se recomienda hacer placa preparativa.
- Las fracciones # 10, # 11 y # 12 se corrió con MeOH: Acetona (95:5) y se reveló con $CeSO_4$, presentado un $R_f = 0.63$ para todas las fracciones, las manchas fueron redondas e iguales por lo que se las unió, por tratarse del mismo compuesto.
- La fracción # 13 se corrió con MeOH: Acetona (95:5) y se reveló con NaOH/MeOH, obteniendo un $R_f = 0.49$, observado en el UV presento

fluorescencia y buena separación por lo que se queda en las mismas condiciones (Placa #24).

- Las fracciones #14 se corrió con Acetato de Etilo: diclorometano (10.50) y se revelo con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ tuvieron varias manchas por lo que se hizo placa preparativa para poder separar los diferentes metabolitos (Placa 25).
- Las fracciones #15 y #16 se corrió con MeOH: Acetona (95:5) y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, se hizo placa preparativa para separar los diferentes metabolitos (Placa #26).

2.10.12 PLACAS PREPARATIVAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA DE SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (III)

- Placa preparativa de la fracción # 5 se corrió con BuOH saturado de H_2O y se revelo con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. Para la verificación de compuestos se usó el mismo sistema de solventes y se obtuvo para la banda 1 un $R_f=0.40$, para la banda 1 dió un $R_f=0.80$. En el análisis espectroscópico en el UV, nos dio $\lambda = 202\text{nm}$ y 284nm (Placa # 30).
- Placa preparativa de la unión de las fracciones # 6 hasta #10, se corrió con BuOH saturado de H_2O y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ se corta cada una de las bandas para recuperar los metabolitos por extracción con metanol, se concentró y se obtuvo soluciones transparentes. Para la verificación de la pureza de los metabolitos aislados en placa preparativa se corrió en las mismas condiciones, obteniendo para la banda 1 un $R_f=0.71$. En el análisis espectroscópico en el UV, nos dio las siguientes longitudes de onda: 208nm , 251nm , 275nm (Placa # 28).
- Placa preparativa de la fracción # 14, se corrió con Acetato de Etilo: diclorometano (10.50) se revelo con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. Se corta cada una de las bandas para recuperar los metabolitos por extracción con metanol, se concentró y se tiene soluciones transparentes, obteniendo dos bandas. Para la verificación de los compuestos se hace una nueva cromatografía en las mismas condiciones. En la banda 1 dió $R_f=0.76$. En el análisis espectroscópico en el UV, nos dio las λ_{UV} λ_{max} 208nm y 278nm (Placa # 31).

- Placa preparativa de la fracción # 15, se corrió con MeOH: Acetona (95:5) y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, corta cada una de las bandas para así recuperar los metabolitos por extracción con metanol, se concentró y se obtuvo soluciones transparentes.

La banda 1 dio un $R_f = 0.82$, para la verificación de la fracción # 15 se utilizó las mismas condiciones, leídas en UV-visible se obtuvo la UV λ_{max} 223nm. (Placa #34).

2.11 SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC (cristales).

Procedimiento:

- Medir 5ml de extracto etanólico total, centrifugar y separar el líquido y sólido
- El sólido (cristales de color amarillo) se coloca en un tubo seco previamente presado.
- Los cristales se secan y se pesan.
- Preparación de fase móvil para HPLC
- Se utilizó como base para determinar la polaridad de la fase móvil del HPLC se usó las condiciones de la placa #35 y se calculó la constante dieléctrica.
- Se calcula la constante dieléctrica del solvente de corrido (Acetato de etilo: Ácido acético: Acido Fórmico: Agua (100:11:11:10)).

$$C_{\text{dieléctrica}} = \frac{cA \times \%A + cB \times \%B}{100}$$

$$c_{\text{dieléctrica}} = \frac{6.02 \times 10 + 6.15 \times 1.1 + 58 \times 1.1 + 78.3 \times 1}{13.2}$$

$$c_{\text{dieléctrica}} = 15.79$$

- Con el valor calculado (15.79) se hizo la relación y se preparó el solvente de corrido para HPLC: Aceto nitrilo: Ácido fosfórico 0.05 M encontrándose que

para esta polaridad da una relación de Aceto nitrilo (125ml): Ácido fosfórico (875ml), (placa #36).

- Filtración a través de membrana 0.45um (evitar el paso de impurezas).
- Desgasificación a través del ultrasonido (eliminar burbujas).

2.11.1 PREPARACIÓN DE MUESTRA DE CRISTALES

Se preparó con disoluciones de 100 ppm, donde se pesó 0.16 g de cristal y se aforó a 25 ml de fase móvil (Aceto nitrilo: Ácido fosfórico 0.0.5 M).

2.11.2. PROCEDIMIENTO EN HPLC

Para evitar la formación de burbujas, se deben desgasar la muestra por medio de ultrasonido por 5 min.

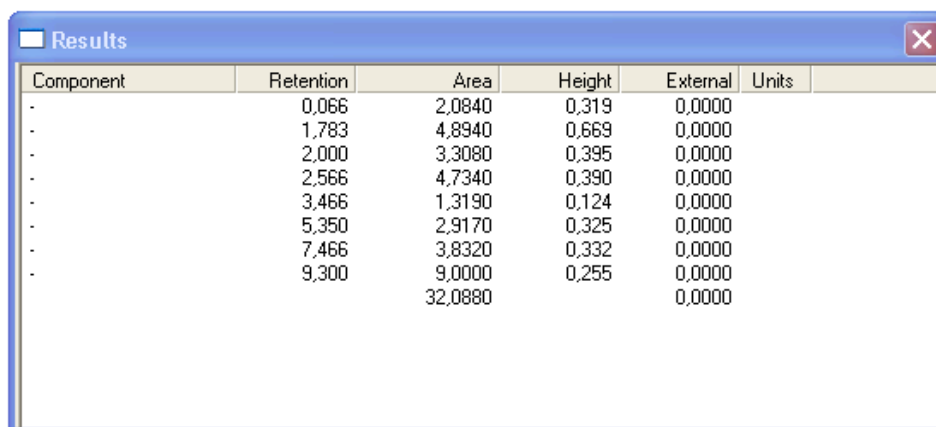
Para evitar las obstrucciones, las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0,45 mediante microfiltros.

2.11.3. PARÁMETROS USADOS EN EL HPLC

- Columna empleada: C 18
- Flujo de fase móvil: 1ml/min
- Detector y longitud de onda: 254nm
- Proceso cromatográfico

2.11.4 RECOLECCIÓN DE LAS FRACCIONES SE TOMA EN CUENTA LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN

TABLA N°. 7 TIEMPOS DE RETENCIÓN




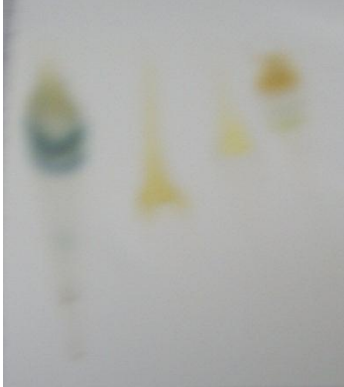
Component	Retention	Area	Height	External	Units
-	0,066	2,0840	0,319	0,0000	
-	1,783	4,8940	0,669	0,0000	
-	2,000	3,3080	0,395	0,0000	
-	2,566	4,7340	0,390	0,0000	
-	3,466	1,3190	0,124	0,0000	
-	5,350	2,9170	0,325	0,0000	
-	7,466	3,8320	0,332	0,0000	
-	9,300	9,0000	0,255	0,0000	
		32,0880		0,0000	

2.11.5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE FRACCIONES RECOLECTADAS EN HPLC


Al hacer correr en el espectrofotómetro de UV- visible nos damos cuenta que se trata de dos compuestos diferentes, en la fracción #1, #2, #3, #4, #5, presentan tres picos típicos de flavonoides y la fracción #6, #7 a otro flavonoide presenta 2 picos. (Placa # 38).


2.11.6 PLACA CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO TOTAL Y DE SUBEXTRACTOS

Placa # 1
Muestra: Extracto etanólico Solvente de recorrido: Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15) Solvente revelador: $Ce(SO_4)_2$





Placa # 2
Muestras: 1. Subextracto etanólico 2. Subextracto etéreo 2. Subextracto toluénico 3. Subextracto butanólico
Solvente de recorrido: Tolueno: Acetato de etilo (93:7) Solvente revelador: $Ce(SO_4)_2$


2.11.7 CROMATOGRÁFIA DEL SUBEXTRACTOS ETÉREO Y TOLUÉNICO

Placa # 3
Muestra: Extracto toluénico Solvente de recorrido: Tolueno: Acetato de etilo (93:7) Solvente revelador: $CeSO_4$

Rf #1=0.09 Rf #2=0.12 Rf #3=0.27 Rf #4=0.31

Placa # 4
Muestra: Extracto toluénico Subextracto toluénico Solvente de recorrido: Tolueno: Acetato de etilo (93:37) Solvente revelador: $Ce(SO_4)_2$

I _b #1 Rf= 0.32 #2 Rf=0.4 #3 Rf=0.66





2.11.8 CROMATOGRAFÍAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA DEL SUB EXTRACTO TOLUÉNICO (Ia)

Placa # 5	Placa # 6	Placa # 7
Muestra: Fracciones #3, #5 y #6	Muestra: Fracciones #8, #11, #14, #16	Muestra: Fracciones #17, #18, #19, #20
Placa de Oxido de Aluminio Solvente de recorrido: Tolueno: Acetato de etilo (95:5) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂	Placa de Oxido de Aluminio Solvente de recorrido: Tolueno: Acetato de etilo (95:5) Solvente revelador: Vapores de yodo	Placa de Oxido de Aluminio Solvente de recorrido: Metanol: Ácido Acético (90:2) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂
 <p style="text-align: center;">UNIR</p>		
Rf # 3= 0.74 Rf # 5= 0.74 Rf # 6= 0.74	Rf # 8= 0.91 Rf # 11= 0.90 Rf # 14= 0.70 Rf # 16= 0.72	Rf # 17 y #18 = 0.72 Rf # 19 y #20 = 0.74

**2.11.9 FRACCIONES DEL MICRO COLUMNA DEL EXTRACTO TOLUÉNICO
Ia#3 –Ia10**

Placa #8	
Muestra: Fracciones Ia#3 –Ia10	
Placa de Silicagel GF254 Solvente de recorrido: Acetato de etilo Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂	
	
Rf #3= 0.58 Rf #4, #5=0.50 Rf #6, #7= 0.60	Rf # 8 = 0.41 0.56 0.63 Rf #9=0.45 Rf #10=0.58





2.11.10 PLACAS PREPARATIVAS DE LAS FRACCIONES DE LA MICRO COLUMNA DEL SUBEXTRACTO TOLUÉNICO

Placa #9	Placa #10	Placa #11	Placa #12
Muestra: Fracción #a3		Muestra: Fracción a8	
Placa de Silicagel GF254 Solvente de recorrido: Acetato de etilo Solvente revelador: Vapores de yodo	Placa de Silicagel GF254 Solvente de recorrido: Acetato de etilo Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂	Placa de Silicagel GF254 Solvente de recorrido: Acetato de etilo Solvente revelador: Vapores de yodo	Placa de Silicagel GF254 Solvente de recorrido: Acetato de etilo Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂
			
Rf B1= 0.09 Rf B2= 0.72 Rf B3=0.90	Rf #1= 0.56 Rf #2= 0.57 Rf #3=0.57	Rf B1= 0.09 Rf B2= 0.58	Rf #1= 0.63 Rf #2= 0.23

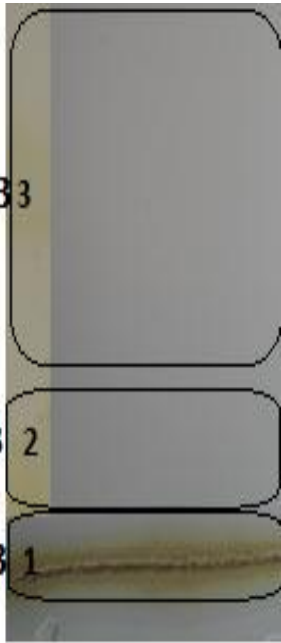

2.11.11 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANÓLICO II)

Placa #13
<p>Placa de Silicagel G_{F254} Muestra: Cristales del extracto EtOH total Solvente de corrido: Acetato de etilo: Ácido acético: Acido Fórmico: Agua (100:11:11:26) Solvente de revelado: Ce(SO₄)₂</p>
 <p>1</p>


**2.11.12 CROMATOGRAFÍAS EN COLUMNA DEL EXTRACTO ETANÓLICO
(II)**

Placa #14	Placa #15	Placa #16	Placa #17
Muestras: Fracciones #1, #2, #3, #4	Muestras: Fracciones #6, #8, #10	Muestras: Fracciones #11, #12, #13, #14	Muestras: Fracciones #12, #13, #14
Placa de Silicagel GF254 Solvente de corrido: BuOH: Ácido Acético: agua (50:10:40) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂	Placa de Silicagel GF254 Solvente de corrido: Butanol: Ácido acético: agua (50:10:20) Solvente revelador: Observe en UV	Placa de Silicagel GF254 Solvente de corrido: Butanol: Ácido acético: agua (50:10:20) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂	Placa de Silicagel GF254 Solvente de corrido: BuOH saturado H ₂ O Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂
			
Rf #1=0.77 Rf #2=0.88 Rf #3=0.76	Rf #6=0.33 0.86 Rf #8=0.31 0.86 Rf #10=0.33 0.86	Rf #11=0.51 Rf #15=0.77	Rf #12=0.64 Rf #13=0.64 Rf #14=0.64



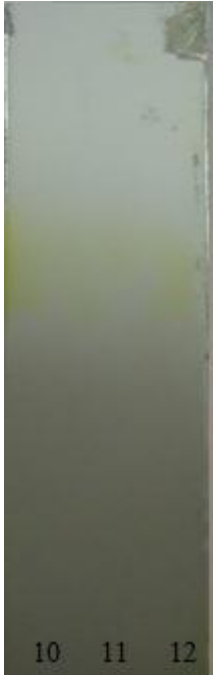
2.11.13 PLACAS PREPARATIVAS DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA DEL EXTRACTO ETANÓLICO (II)



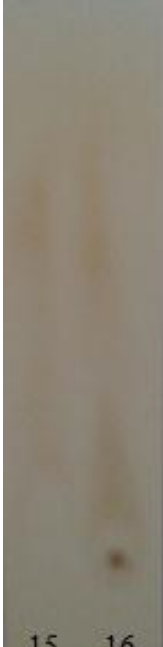
Placa #18	Placa #19
Muestras: Fracciones #6 hasta #10	Muestras: Fracciones #6 hasta #10
Placa de silicagel G_{F254} Solvente de recorrido: Butanol: Ácido acético: agua (50:10:20) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂	Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: Butanol: Ácido acético: agua (50:10:20) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂
	
RF #B1=0.05 RF #B2=0.17 RF #B3=0.53	RF #B1=0.71 RF #B2=0.80 RF #B3=0.81

2.11.14 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (III)

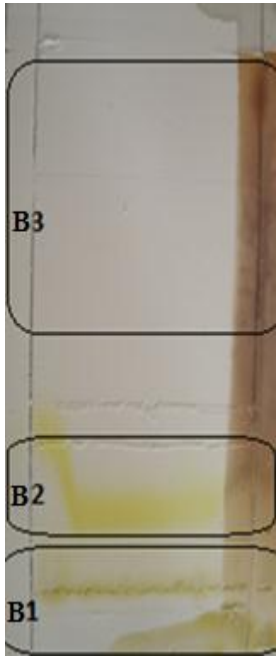



Placa # 20
Placa de silicagel G_{F254}
Muestras: subextracto toluénico
Solvente de corrido: Acetona
Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂

Rf #1=0.1 Rf #2=0.16 Rf #3=0.3 Rf #4=0.5 Rf #5=0.7





2.11.15 FRACCIONES OBTENIDAS EN CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL EXTRACTO BUTANÓLICO

Placa #21	Placa #22	Placa #23
Muestras: Fracciones #1 hasta #9	Muestras: Fracción # 5	Muestras: Fracciones #10 a #12
Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: Acetona Solvente revelador: Ce(SO₄)₂	Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: BuOH saturado de H₂O Solvente revelador: Ce(SO₄)₂	Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: MeOH: Acetona (95:5) Solvente revelador: Ce(SO₄)₂
		
Rf #1=0.5 Rf #2 a #4=0.64 Rf #5= 0.2 0.7 Rf #6 a #9=0.1 0.54	Rf #1=0.54 Rf #2=0.66	Rf #10= 0.63 Rf #11= 0.63 Rf #12= 0.63


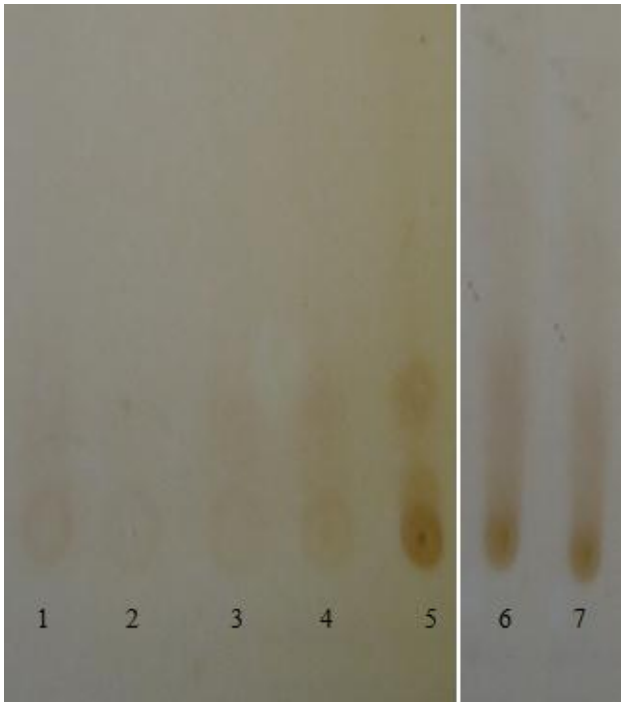
Placa #24	Placa #25	Placa #26	
Muestras: Fracción #13	Muestras: Fracción #14	Muestras: Fracciones #15, #16	
Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: MeOH: Acetona (95:5) Solvente revelador: NaOH/MeOH	Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: Acetato de Etilo: diclorometano (10.50:10) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂	Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: MeOH: Acetona (95:5) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂	
 <p style="text-align: center;">13</p>	 <p style="text-align: center;">14</p>	 <p style="text-align: center;">15 16</p>	
Rf #13=0.49	Rf #1=0.1 Rf #2=0.4 Rf #3=0.6	15 Rf #1=0.2 Rf #2=0.8	16 Rf #1=0.12 Rf #2=0.88

2.11.16 PLACAS PREPARATIVAS DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (III)

Placa #27	Placa #28	Placa #29	Placa #30
Muestras: Fracciones #6 a la #110	Muestras: Fracciones #6 a la #10	Muestras: Fracción #5	Muestras: Fracción #5
<p>Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: BuOH saturado de H₂O Solvente revelador: Ce(SO₄)₂</p>			
			
<p>Rf B1=0.05 Rf B2=0.25 Rf B3=0.76</p>	<p>Rf B1=0.64 Rf B2=0.71 Rf B3=0.65</p>	<p>Rf B1=0.06 Rf B2=0.45</p>	<p>Rf B1=0.40 Rf B2=0.80</p>

Placa #31	Placa #32	Placa #33	Placa #34
Muestras: Fracción #14	Muestras: Fracción #14	Muestras: Fracción #15	Muestras: Fracción #15
Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: Acetato de Etilo: diclorometano (10.50) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂		Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: MeOH: Acetona (95:5) Solvente revelador: Vainillina / H ₂ SO ₄	
			
Rf B1=0.05 Rf B2=0.52	Rf B1=0.66 Rf B2=0.66	Rf B1=0.05 Rf B2=0.21	Rf B1=0.82

2.11.17 SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CLAR (CRISTALES)

Placa #37	Placa #38
Muestras: Extracto etanólico Placa de silicagel G_{F254} Solvente de corrido: Acetato de etilo: Ácido acético: Acido Fórmico: Agua (10:11:11:1) Solvente revelador: Ce(SO ₄) ₂	Muestras: Fracciones #1 a la #7 Placa de silicagel G_{F254} Muestra: Cristales de Extracto etanólico total (HPLC) Solvente de corrido: Aceto- nitrilo. Ácido fosfórico 0.05M
	

CAPITULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CONTROL DE CALIDAD DEL VEGETAL

La identificación taxonómica de la Hiedra (*Hedera helix*) del Ecuador se realizó en el Herbario de la ESPOCH por el Ing. Jorge Caranqui; quien afirmó que es una planta introducida y cultivada como planta ornamental, originaria de Europa, pertenece a la familia Araliáceae, su nombre científico es *Hedera helix*. En nuestro país se encuentra tanto en la sierra, en la costa y en el oriente es adaptable a cualquier clima.

3.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

Se utilizó las hojas, flores, tallos (raíces adventicias) y frutos de Hiedra (*Hedera helix*) el cual se extrajo con etanol al 96% por maceración, se decantó y se concentró la solución hasta un octavo de volumen.

Los solventes que se utilizaron para la preparación de subextractos fueron elegidos en orden de polaridad, primero el tolueno, luego éter etílico y finalmente butanol. El tolueno generalmente extrae terpenos de baja polaridad (esteroles, parafinas). En el subextracto etéreo se extrae flavonoides metoxilados y terpenos (germacrenos, β -elemaleno, elixina). El extracto butanólico por ser un solvente más polar extrae sustancias como quercetina, canferol, fenoles hidroxilados y saponinas, triterpenos gipsogenina, cumarinas (esculetina).

El extracto etanólico total tiene un rendimiento en peso de 6.17g, el subextracto etéreo 1.70g, el subextracto toluénico 0.82g y el subextracto butanólico 3.37g.

3.3 ANÁLISIS QUÍMICO

Los resultados obtenidos en extracto de Hiedra (*Hedera helix*) se detallan en la tabla # 8. Con respecto a las reacciones de coloración o presencia de precipitados, aplicadas según las técnicas de tamizaje fitoquímico.

TABLA N°. 8 RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HIEDRA (*Hedera helix*).

ENSAYO	GRUPO FITOQUÍMICO	RESULTADO
Lieberman Buchard	Triterpenos y esteroles	Café obscuro (+)
Shinoda	Flavonoides	Amarillo (++)
Benedict	Taninos pirocatécolicos	Verde intenso (++)
Espuma	Saponinas	Espuma blanca (+)

(+) ó (++) CUANDO LA PRESENCIA DEL METABOLITO SECUNDARIO ES POCO O ESCASO

3.4 ANÁLISIS FÍSICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HIEDRA

Las pruebas fueron aplicadas al extracto alcohólico de la Hiedra, para este análisis se utilizó los órganos de los sentidos, la densidad por picnometría, el índice de refracción por refractometría y para el pH por potenciometría.

El extracto de la hiedra, es un líquido pardo verduzco, olor a fermentado, con sabor dulce puede ser por tener un alto contenido de azúcares y parte de este está en proceso de fermentación. La densidad es cercana al agua lo que indica que la mayoría de sus compuestos son solubles en esta.

La información bibliográfica indica la presencia de flavonoides y ácido clorogénico los cuales contienen fenoles y pueden ser responsables del pH ácido.

TABLA N°. 9 PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS

PARAMETROS	RESULTADOS	MÉTODO
Aspecto	Pegajoso (líquido)	Visual
Color	Pardo verduzco	Visual
Olor	Fermentado	Olfato
Sabor	Dulce	Gusto
Densidad	1.0441	Picnómetro
Índice de Refracción	1.362	Refractómetro (ABEE)
pH	4.60	Peachimetro (Hanna)

3.5 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS POR PERMANGANOMETRÍA

Procedimiento:

- En un erlenmeyer colocar 13 ml de extracto EtOH más 10ml de indicador índigo de carmín y 375 ml de agua destilada.
- Titular con KMnO_4 (0.01N) hasta obtener color amarillo.
- La muestra se tituló con 23ml de KMnO_4 de concentración 0.01 N valorado con $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.01 N.

Datos:

Muestra = 398ml extracto etanólico de la Hedera

Titulante = KMnO_4 0.01 N (valorado con $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 23ml

Dónde:

$$\#Eqqg_m = \#Eqqg_T$$

$$\#Eqqg_m = 0.01 \times 23\text{ml} \times \frac{1}{100\text{ml}}$$

$$\#Eqqg_m = 0.01 \times 2.3 \times 10^{-4} = 2.3 \times 10^{-4}$$

$$\#mEqg = 2.3 \times 10^{-4} \times 1000 = 0.23\text{mEqg}_m$$

Los mEqg de taninos pirocatécolicos del extracto de Hiedra es 0.23 en función al consumo de permanganato de potasio.

3.6 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE EXTRACTOS Y SUBEXTRACTOS

3.6.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE EXTRACTO TOTAL

Una forma de conocer la presencia de metabolitos secundarios es hacer una cromatografía del extracto total, para lo cual se utilizó como solvente de recorrido Cloroformo: Metanol: Agua (65:35:15) y se reveló con $Ce(SO_4)_2$. Este proceso no cumplió con todos los parámetros cromatográficos, falta eficacia y resolución por lo que se procedió a realizar un fraccionamiento líquido en orden de polaridad. (Placa # 1).

3.6.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO Y SUBEXTRACTOS

Se preparó una cromatografía en capa fina del extracto y subextractos para verificar la presencia de los metabolitos secundarios determinados en el tamizaje fitoquímico.

Se corrió con Tolueno, Acetato de etilo (93:7) y se reveló con $Ce(SO_4)_2$. Este solvente es adecuado para el subextracto etanólico ya que en capa fina da varias manchas. Para el subextracto etéreo, toluénico y butanólico se busca otros solventes para la separación de los compuestos (Placa #2).

3.6.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO ETÉREO

En la placa cromatográfica de subextracto etéreo, se hizo correr con distintos solventes y no se logró separar los compuestos, por lo que se hace un fraccionamiento de este subextracto con tolueno.

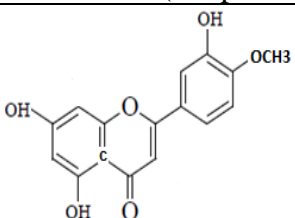
Se realizó una cromatografía en capa fina (CCF), de la fase clara (subextracto toluénico) Ia1 y la parda (sub-extracto etéreo) Ia2.

Para la cromatografía en capa fina de la fase clara Ia₁ y la fase parda Ia₂ se utilizó como solvente de corrido: Tolueno: Acetato de etilo (93:37) y como revelador Ce(SO₄)₂, dando buena separación de compuestos en Ia₁, presentando tres manchas redondeadas alargadas, lo que indica que la polaridad del solvente es adecuada. En cambio para Ia₂ no se trató los sólidos por estar en escasa cantidad (Placa #4).

3.6.4 SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL SUBEXTRACTO TOLUÉNICO Ia

Para la separación de las fracciones de la 3 hasta la 7, se utilizó como solvente de corrido Tolueno: Acetato de etilo (95:5) y se reveló con Ce(SO₄)₂. Presentando para las fracciones 3, 5 y 6 un R_f = 0.74. Por presentar manchas redondas de color amarillo característicos de los flavonoides y R_f similares, se unieron las fracciones de 1 a la 7 dando un precipitado de color blanco, del análisis espectroscópico se consiguió tres longitudes de onda con valores de UV λ_{max} 237 nm, 270 nm y 274 nm. Proporcionando una posible estructura química para flavonoide (la Hesperidina) (placa #5), como se indica en el cuadro 1.

CUADRO 1. VALORES DE LAS LONGITUDES DE ONDA TEÓRICO Y PRÁCTICO DE LA HESPERIDINA DE LAS FRACCIONES #3 AL A #7

ESTRUCTURA (Hesperidina)	TEÓRICO	PRACTICO
	236, 260, 275nm	237, 265, 274nm

FUENTE: ADAPTADO DE OLGA LOOK. 1995. ANALISIS FITOQUIMICO

Según las longitudes de onda encontradas en bibliografía y las calculadas, podemos confirmar que se trata un principio activo de la hiedra.

- La separación de las fracciones 8, 11, 14, y 16 se corrió con Tolueno: Acetato de etilo (95:5) y se reveló con vapores de yodo. Las fracciones 14 y 16 cumplieron con

los parámetros de eficiencia, eficacia y resolución; presentando, manchas redondas de color amarillo lo que nos indica la presencia de flavononas, los valores de la fracción 14 reportó un $R_f = 0.70$ y para la 16 un $R_f = 0.72$, respectivamente. Para las fracciones 8 el $R_f = 0.91$ y para la 11 el $R_f = 0.90$; sin embargo, por no presentar una buena separación posteriormente se hizo un fraccionamiento en micro columna (Placa # 6).

- Para las fracciones 17, 18, 19 y 20 se corrió con Metanol: Ácido Acético (90:20) y se reveló con $Ce(SO_4)_2$. Los resultados obtenidos para las fracciones 17 y 18 fueron $R_f = 0.72$. Las fracciones 19 y 20 alcanzaron un $R_f = 0.74$, presentaron una sola mancha redondeada de color amarillo y una buena resolución (Placa # 7).

3.6.5 CROMATOGRAFÍA DE LA MICRO COLUMNA DE LA UNIÓN DE LAS FRACCIONES 8 HASTA LA 11 DEL SUBEXTRACTO TOLUÉNICO.

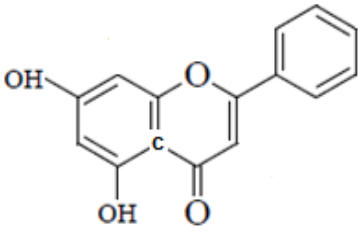
- En la micro columna, se obtuvo 10 fracciones de la Ia1 a la Ia10, se corrió con Acetato de etilo y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, dando para a3 un $R_f = 0.58$; a4 y a5 un $R_f = 0.5$; para a6 y a7 el $R_f = 0.60$; a9 $R_f = 0.45$, y a10 un $R_f = 0.58$.

De las fracciones b3 y b8 se realizaron placas preparativas con la finalidad de obtener un compuesto puro. Las fracciones b4 y b5 se unieron al igual que b6 y b7 para obtener manchas redondas y amarillas, lo que significa que el sistema de solvente fue el adecuado (Placa #8).

3.6.6 PLACAS PREPARATIVAS DE LAS FRACCIONES DE LA MICROCOLUMNA DEL SUBEXTRACTO TOLUÉNICO

La fracción a3 se corrió con Acetato de etilo y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, presentando tres bandas, la 1 con un $R_f = 0.56$, la 2 con un $R_f = 0.57$ y la 3 con un $R_f = 0.58$; Los valores obtenidos de los R_f s, junto con la forma redondeada de las manchas, nos indica la pureza cromatográfica de los compuestos, dando una posible estructura química para flavononas (la crisina) En la banda 2; (placa #10), como se muestra en el cuadro 2.

CUADRO 2. VALORES DE LAS LONGITUDES DE ONDA TEÓRICO Y PRÁCTICO DE LA CRISINA DE LA FRACCIÓN #a3

ESTRUCTURA (crisina)	BANDAS	TEÓRICO	PRACTICO
	1	236, 260, 275nm	208, 225, 275nm
	2	236, 260, 275nm	205, 223, 275nm
	3	236, 260, 275nm	210, 226, 275nm

FUENTE: ADAPTADO DE OLGA LOOK. 1995. ANALISIS FITOQUIMICO

Placa preparativa de la fracción a8, se corrió con Acetato de etilo y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, obteniendo como resultado tres bandas; la 1 con $R_f = 0.63$ de color rosado, la 2 con $R_f = 0.23$ de color amarillo, presentando pureza cromatográfica, según la espectroscopia UV-visible, reportó dos longitudes de onda, posible estructura para cumarinas en la banda 2; (Placa #12), como se presenta en el cuadro 3.

CUADRO 3. VALORES DE LAS LONGITUDES DE ONDA TEÓRICO Y PRÁCTICO DE LA ESCULETINA FRACCIÓN a8

ESTRUCTURA (esculetina)	BANDAS	TEÓRICO	PRACTICÓ
	1	230, 279nm	204, 284nm
	2	230, 279nm	202, 281nm

FUENTE: ADAPTADO DE OLGA LOOK. 1995. ANALISIS FITOQUIMICO

3.7 CROMATOGRAFÍAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO (II)

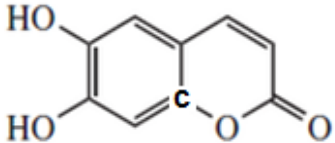
- Se utilizó el precipitado de color amarillo que se formó en el extracto etanólico, presentado cinco manchas multicolores sin resolución. Se fraccionó en columna de sílica gel, se eluyó con acetato de etilo las fracciones de la 1 a la 10. Las fracciones de la 11 a la 16 se corrió con Acetato de etilo, Ácido acético, Acido Fórmico y Agua (100:11:11:26).

3.7.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE FRACCIONES EN COLUMNA DEL EXTRACTO ETANÓLICO (II).

- Las fracciones de la 1 a la 4, se corrió en Butanol, Ácido Acético y agua (50:10:40) y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, proporcionando para la fracción 1 un $R_f = 0.77$, la 2 con un $R_f = 0.88$ y la 3 con un $R_f = 0.96$; todas las fracciones mostraron manchas redondeadas y compuestos más puros, no se corrió en el UV por no tener suficiente muestra (Placa #14).
- Para las fracciones 6, 8 y 10 se usó como solvente de recorrido el Butanol, Ácido acético y agua (50:10:20) y se observó en la cámara de UV la fluorescencia de color azul, lo que nos indica que en estas fracciones existen cumarinas. Las fracciones de la 6 a 10 se unieron y realizó una placa preparativa para la obtención de principios activos más purificados (Placa #15).
- Las fracciones de la 11 a la 16 se corrió con Acetato de etilo, Ácido acético, Acido Fórmico y Agua (100:11:11:26) y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, reportando para la fracción 11 un $R_f = 0.51$ y para la 15 un $R_f = 0.77$, las dos fracciones presentaron manchas de color amarilla redondeadas. Para las fracciones de la 12 a la 14 se corrieron con butanol saturado de H_2O y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, dando una posible estructura para un flavonoide.

Las fracciones 12 y 14 se corrió con Butanol saturado de H_2O y se reveló con $Ce(SO_4)_2$; los resultados fueron similares en las dos fracciones, dando un $R_f = 0.64$, se obtuvo una adecuada separación, presentando manchas amarillas redondeadas, por tratarse de un mismo compuesto se unieron dando una posible estructura para cumarina (Placa #17), como se exhibe en el cuadro 4.

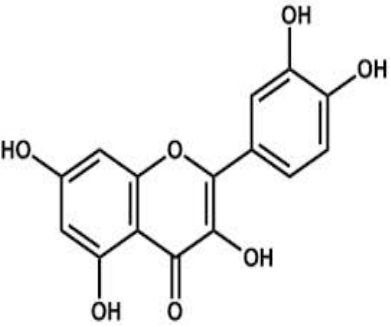
CUADRO 4. VALORES DE LAS LONGITUDES DE ONDA TEÓRICO Y PRÁCTICO DE LA ESCULETINA DE LAS FRACCIONES 12 Y 14

ESTRUCTURA (esculetina)	BANDAS	TEÓRICO	PRACTICÓ
	1	230, 279nm	202, 281nm
	2	230, 279nm	202, 225nm

FUENTE: ADAPTADO DE OLGA LOOK. 1995. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

- Placas preparativas de la unión de la 6 a la 10, se corrió con Butanol, Ácido acético y agua (50:10:20), se reveló con $Ce(SO_4)_2$ y se obtuvo cuatro bandas, la 2 registró un $R_f = 0.71$, la 3 un $R_f = 0.91$, y la fracción 4 un $R_f = 0.90$, presentaron manchas redondas de color amarillo por su grado de pureza. Al hacer el barrido en UV nos dio un espectro con tres picos, confirmándose la presencia de longitudes de onda típicos para flavonoides (flavona quercetina), que corresponde a la banda 1. (Placa 19), como se indica en el cuadro 5.

CUADRO 5. VALORES DE LAS LONGITUDES DE ONDA TEÓRICO Y PRÁCTICO DE LA QUERCETINA DE LA UNIÓN DE FRACCIONES #6 A LA #10

ESTRUCTURA (Quercetina)	BANDAS	TEÓRICO	PRACTICÓ
	1	232, 279, 314nm	283, 296, 316nm
	2	232, 279, 314nm	283, 296, 316nm
	3	232, 279, 314nm	214, 259, 358nm

FUENTE: ADAPTADO DE OLGA LOOK. 1995. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

3.8 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO (III)

El subextracto butanólico se corrió con acetona y se reveló con $Ce(SO_4)_2$. La consistencia del sub extracto fue resinosa parda; como resultado se obtuvo 5 compuestos que cumplen con los parámetros de eficiencia y eficacia, pero no se logró una buena resolución, por lo que se fraccionó en la columna de sílica gel.

3.8.1 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO

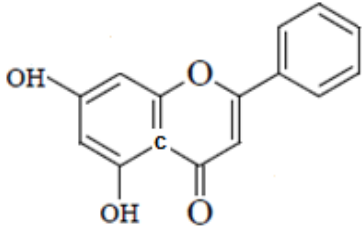
Se obtuvieron 16 fracciones:

- De la fracción de la 1 a la 9 se corrió con acetona y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, proporcionando como resultado en la fracción 1 un $R_f = 0.50$; de la fracción 2 a la 4

reportó un $R_f = 0.64$, se unió y quedó en estas condiciones; la fracción 5 alcanzó un $R_{f1} = 0.1$, $R_{f2} = 0.7$, se aumentó la polaridad del eluyente por no presentar una buena separación. Las fracciones de la 6 hasta la 10, se unió por presentar valores similares de $R_f = 0.1$ y $R_f = 0.54$ y se hizo una placa preparativa para purificar los principios activos.

- La placa preparativa de la unión de la 6 a la 10, se corrió con Butanol saturado de H_2O y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, dando como resultado tres fracciones la B1 con $R_f = 0.6$, la B2 con $R_f = 0.78$ y la B3 con $R_f = 0.64$, presentó buena separación, con manchas redondeadas de color amarillo. Vistas en UV- visible nos dan la presencia de tres picos característico de flavonoides, corresponde a la banda # 1. (Placa # 28), como se presenta en el cuadro 6.

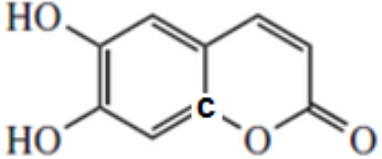
CUADRO 6. VALORES DE LAS LONGITUDES DE ONDA TEÓRICO Y PRÁCTICO DE LA CRISINA DE LAS FRACCIONES 6 A LA 10

ESTRUCTURA (crisina)	TEÓRICO	PRACTICÓ
	236, 260, 275nm	222, 254, 270nm
	236, 260, 275nm	208, 225, 275nm
	236, 260, 275nm	215, 230, 265nm

FUENTE: ADAPTADO DE OLGA LOOK. 1995. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

- La fracción 5 se corrió con Butanol saturado de H_2O , se reveló con $Ce(SO_4)_2$, dando como resultado para la 1 un $R_f = 0.54$, para el 2 $R_f = 0.66$, se hizo una placa preparativa de ésta operando en las mismas, se obtienen dos bandas, la 1 dio un $R_f = 0.40$ y la 2 un $R_f = 0.80$. Vistas al UV- visible presentaron dos bandas, dando una posible estructura para cumarina (Placa #30), como se muestra en el cuadro 7.

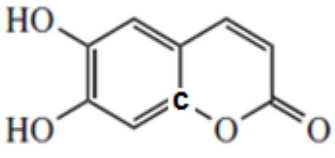
CUADRO 7. VALORES DE LAS LONGITUDES DE ONDA TEÓRICO Y PRÁCTICO PARA UNA CUMARINA DE LA FRACCIÓN #5

ESTRUCTURA (Esculetina)	BANDAS	TEÓRICO	PRACTICÓ
	1	230, 279nm	202, 284nm
	2	230, 279nm	212, 243nm

FUENTE: ADAPTADO DE OLGA LOOK. 1995. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

- Las fracciones de la 10 a la 13, se corrió con Metanol-Acetona (95:5), se reveló con $Ce(SO_4)_2$ presentando manchas de color amarillo similares para las muestras de la 10 a la 12 con similares $R_f = 0.63$; la 13 presentó fluorescencia de color rosado al observar en el UV de color rosado y con un $R_f = 0.49$.
- La fracción 14, se corrió con Acetato de Etilo y diclorometano (10:50) y se reveló con $Ce(SO_4)_2$, presentando separación de compuestos y para purificarlos se hicieron placa preparativa, dando para 1 un $R_f = 0.66$ y para 2 un $R_f = 0.66$. Recorridas en el UV-visible presentaron dos bandas. Correspondiendo a una posible estructura para cumarina según la banda #2, (Placa #32), como se demuestra en el cuadro 8.

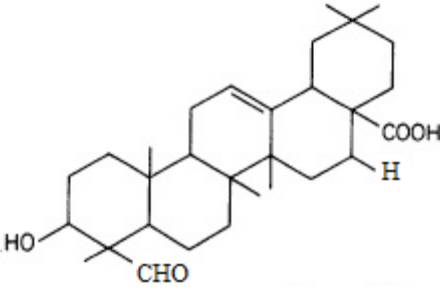
CUADRO 8. VALORES DE LAS LONGITUDES DE ONDA TEÓRICO Y PRÁCTICO DE LA FLAVONOIDE DE LA ESCULETINA DE LA FRACCIÓN #14

ESTRUCTURA (esculetina)	TEÓRICO	PRACTICÓ
	230nm, 279nm	208nm, 278nm
	230nm, 279nm	228nm, 278nm

FUENTE: ADAPTADO DE OLGA LOOK. 1995. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

- La fracción 15 se corrió con Metanol-Acetona (95:5) y como revelo con Vainillina- $Ce(SO_4)_2$, obteniendo una buena separación de manchas de estas se hicieron una placa preparativa en las mismas condiciones que las anteriores, dando como resultado un $R_f = 0.83$; leídas en el UV nos proporcionó una sola banda típica de terpenos (Placa #34), como se muestra en el cuadro 9.

CUADRO 9. VALORES DE LAS LONGITUDES DE ONDA TEÓRICO Y PRÁCTICO DE LA GIPSOGENINA DE LA FRACCIÓN # 15.

ESTRUCTURA (gipsogenina)	TEÓRICO	PRÁCTICO
	222nm	223nm

FUENTE: ADAPTADO DE OLGA LOOK. 1995. ANALISIS FITOQUIMICO

3.9 SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC (cristales).

- Las fracciones recolectadas del HPLC fueron 7 y se usó como solvente de corrido: Aceto-nitrilo-Ácido fosfórico de concentración 0.05M y se observó al UV unas manchas de color violeta.
- Al hacer correr en el espectrofotómetro de UV- visible nos damos cuenta que se trata de dos compuestos diferentes, en la fracción 1, 2, 3, 4 y la 5 presentaron tres picos típicos de un flavonoide (crisina) y la fracción 6 y 7, presentó una estructura de dos picos típicos de cumarina (gipsogenina).

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Se acepta la hipótesis al identificarse posiblemente quercetina, hesperidina, crisina, gipsogenina y esculetina por UV después de separar y purificar por métodos cromatográficos.
2. Se identificó taxonómicamente en el herbario de la ESPOCH a la Hiedra como (*Hedera helix*), familia Araliáceae.
3. Para la separación de los metabolitos secundarios de la hiedra se realizó de extracto etanólico preparado por maceración, y los subextractos etéreo, toluénico y butanólico por inmiscibilidad de los solventes.
4. El extracto etanólico es líquido, pardo verdusco, de sabor dulce, pegajoso. Con una densidad 1.044, Índice de refracción 1.36, pH 4.60. El tamizaje fitoquímico determino la presencia de: flavonoides, triterpenos (saponinas), cumarinas y taninos pirocatécolicos.
5. En el extracto etanólico cristalizó flavonoides que se separaron y purificaron en HPLC con ácido fosfórico y acetonitrilo 0.05 M (875ml: 125ml), en el UV posiblemente son crisina y esculetina.
6. El fraccionamiento del sub extracto toluénico en micro columna de sílica gel, en las fracciones 3 a 6 eluidas con Tolueno: Acetato de etilo (95:5), en TLC con el mismo solvente y revelados con sulfato de cerio, da $R_f = 0.74$, UV λ_{max} 237 nm, 265 nm y 274 nm, comparado con bibliografía puede ser hesperidina.

7. El fraccionamiento del sub extracto de tolueno del subextracto etéreo en la fracción Ia3 eluida con acetado de etilo, en TLC con el mismo solvente y revelado con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ Rfs: $\text{Rf}_1 = 0.50$; $\text{Rf}_2 = 0.57$ UV λ_{max} 205nm, 223nm y 275nm, posible crisina; y $\text{Rf}_3 = 0.58$ crisina. La fracción Ia8 da $\text{Rf} = 0.63$, UV λ_{max} 204nm, 284nm, comparada con bibliografía puede ser esculetina.

8. las fracciones 6 a la 10 de la columna cromatográfica del extracto etanólico corrida con Butanol: Ácido acético: agua (50:10:20) y revelada con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ obteniendo los Rfs: $\text{Rf}_1 = 0.71$, $\text{Rf}_2 = 0.91$, $\text{Rf}_3 = 0.90$, UV λ_{max} 283nm, 296nm y 316nm y según bibliografía posible quercetina.

9. El fraccionamiento del subextracto butanólico de las fracciones 6 a la 10 eluída con metanol y recorridas en Butanol saturado de agua se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. Presentan un $\text{Rf} = 0.66$ similar para las dos bandas, y UV λ_{max} 228nm, 278nm dando una posible estructura para esculetina.

La fracción #14 de la misma columna corrió con Acetato de Etilo y diclorometano (10:50) y revelada con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ dan tres manchas definidas que se separan en TLCP con el mismo solvente, dan Rf_1 UV λ_{max} 208nm, 225nm y 275nm posible crisina; $\text{Rf}_2 = 0.78$ y $\text{Rf}_3 = 0.64$.

La fracción #15 de la misma columna corrió con Metanol: acetona (95:5) revelada con vainillina/ H_2SO_4 , presenta $\text{RF}_1 = 0.54$ y un $\text{Rf}_2 = 0.66$, UV λ_{max} 202nm y 284nm, posible gipsogenina.

10. En la separación de flavonoides por HPLC se confirma la presencia de crisina en las fracciones 4; en el espectrofotómetro presento UV λ_{max} 283, 296, 316nm,, en cambio en la fracción 6 dio una estructura para esculetina con UV λ_{max} 202nm y 283nm.

11. En el extracto total se cuantificó taninos pirocatécolicos por permanganometría, dio un resultado de = 0.23 mlieq.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

- 1.** Respetar las normas de seguridad al trabajar en el laboratorio, utilizando: mascarilla, guantes, gorro, gafas de ser posible por los solventes son muy perjudiciales para nuestro organismo.
- 2.** Utilizar la Sorbona para revelar las placas, haciendo uso adecuado de los reveladores y evitando que estos se dispersen por el laboratorio.
- 3.** Utilizar por separado las partes de la planta para hacer los extractos y procedimiento que permitirá obtener metabolitos más puros.
- 4.** Usar un solo tipo de placas bien sea de silicagel GF254, o placas de óxido de aluminio para evitar confusiones en los resultados.
- 5.** Hacer un una aplicación de los metabolitos encontrados en la hiedra, en animales de experimentación.

CAPITULO VI

6. RESUMEN

El estudio de separación y caracterización de los metabolitos secundarios de la hiedra (*Hedera helix*) de Ecuador con fines de aporte a una técnica de identificación se realizó en los laboratorios de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

La metodología para la preparación de extracto fue por maceración, las químicas por reacciones de coloración. El fraccionamiento en columna, capa fina preparativa. La pureza cromatográfica CCF, y por espectroscopia UV; para la identificación de los compuestos con grupos cromóforos se usaron las reglas de Woodward-Fieser.

El extracto etanólico con densidad 1.044, Índice de refracción 1.36, pH 4.60, en el fraccionamiento del subextracto toluénico se identificó flavonoides, saponinas, terpenoides, lactonas y taninos pirocatécolicos.

La posible esculetina se encontró en la franja Ia3 corrida con acetato de etilo la fracción 6 a 9 de la columna del subextracto butanólico B2Rf=0.71.

La posible quercetina se obtiene de las fracciones 6 a 10 del fraccionamiento en columna del subextracto etanólico corrido con butanol ácido acético agua (50:10:20) con UV λ_{\max} 283, 296, 216nm.

De a fracción 15 de la columna del subextracto butanólico corrida con metanol:acetona (95:5) y en placa preparativa da Rf=0.83, λ_{\max} 223nm.

La crisina se obtuvo de la separación de flavonoides por HPLC en las fracciones de 1 a 5, una λ_{\max} 283, 296, 316nm y la cumarina en las fracciones 6,7 de la misma columna con λ_{\max} 202, 283nm.

El contenido de taninos pirocatécolicos en el extracto etanólico fue de 0.23meq.

SUMMARY

The study of separation and characterization of secondary metabolites of ivy (*Hedera helix*) of Ecuador for the purpose of contribution to identification technique was performed in the laboratory of Phytochemistry, Faculty of Sciences of the Polytechnic School of Chimborazo.

The methodology for the preparation of extract was maceration, chemicals for coloring reactions. The column fractionation, preparative thin layer. TLC chromatographic purity and UV spectroscopy, for the identification of compounds with chromophores were used Woodward rules Fieser.

The ethanol extract with 1.044 density, refractive index 1.36, pH 4.60, in the fractionation of toluene subextracto identified flavonoids, saponins, terpenoids, lactones and pirocatécolicos tannins.

The possible esculetin was found in the range Ia3 run with ethyl acetate fraction 6-9 of butanol subextracto column B2Rf = 0.71.

The possible quercetin is obtained from fractions 6-10 column fractionation of ethanolic subextracto run with butanol acetic acid water (50:10:20) with UV λ_{\max} 283.296, 216nm.

A fraction of column 15 run sunextracto butanol with methanol: acetone (95:5) and preparative plate gives Rf =0.83, UV λ_{\max} 223nm.

Chrysin was obtained from the HPLC separation of flavonoids in fractions 1 to 5, one UV λ_{\max} 283, 296, 316nm and fractions coumarin 6.7 in the same column with UV λ_{\max} 202, 283nm.

The tannin content in the ethanol extract pirocatécolicos was 0.23meq.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **ALFER, R.**, La Magia de la química., 1ª ed. México DF-México., 1995., Pp. 123-124
2. **AVILA, Z.**, Química Orgánica, Experimentos con un enfoque ecológico., 2ª ed., México DF-México., 2000., Pp.120-124.
3. **ALONSO,J.**, Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos., s.det., Buenos Aires-Argentina., Corpus editorial., 2004., Pp.564-567.
4. **DÍAZ, M.**, Compuestos Orgánicos, Espectroscopia, Iones.1ª ed. Washington-EE.UU., 1979., Pp.138.
5. **DICKSON, T.**, Introducción a la química., 16 a ed., México DF México., 1999., Pp.259.
6. **DOMINGUÉZ, A.**, cromatografía en Papel y Capa Delgada., 2ª ed., México DF-México., 1975., Pp.62-63.
7. **FLORES, R.**, Atlas de Plantas Medicinales y Curativas., 2ª ed., Madrid-

España., 1998., Pp. 90-94.

8. **FONNEGRA, R., Y OTROS.,** Plantas Medicinales Aprobadas En Colombia., 2ª ed., Bogotá-Colombia., Editorial Universidad de Antioquia., 1986., Pp.135-137.
9. **HARRIS, D.,** Análisis Química Cuantitativa., 2ª ed., México- DF- México., 1992., Pp.656.
10. **HARVEY, D.,** Química Analítica Moderna., 1ªed. Madrid-España., 2002., Pp. 402-404.
11. **JÁTIVA, C.,** Texto básico de Farmacognosia y Productos Naturales., Riobamba - Ecuador. Centro de documentación de Reproducción de Documentos de ESPOCH., 2000., Pp.56- 59, 40.
12. **LOCK, O.,** Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales., 2ª ed ., Lima- Perú., Universidad Católica Del Perú., 1994., Pp.41-42.
13. **LUNDSTROM, J., Y OTROS.,** The alkaloids B - Phenethylamines And Ephedrines of Plant Origen, Chemistry and Pharmacology., 2ª .ed., New York-Estados Unidos., 1989., Pp.77.
14. **MAULEÓN, M.,** Química Orgánica Experimental., Barcelona - España., Editorial reverté. S.A., 2007., Pp.90-94.

15. **MARCHAL, E.,** Revisión des Hédéracéesaméricaines. Descriptions de dix-huitespècesnouvellesetd'ungenreinédit. Bull. Acad. Roy. Sci., Belgique-Brucelas., 1979., Pp. 47- 70 - 95.
16. **MORALES, M.,** Fitoterapia Moderna y Medicina, Farmacólogo., Chile-Santiago de Chile., 2012., Pp.115-116.
17. **MORCILLO, J.,** Espectroscopia, Moléculas, Método Experimental. 2ª ed., Washington-EE.UU., 1981., Pp.80.
18. **ROVESSAR, F., Y OTROS.,** Análisis Químico Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas., 5ª ed. Madrid-España., 2003., Pp.142-145.
19. **RUBINSON, J., RUBINSON, K.,** Química Analítica Contemporánea. 1ª. ed., México- DF-México. 2000., Pp.411-412.
20. **TAIZ, L., Y OTROS.,** Fisiología Vegetal., 3ª ed., México-U.S.A Traducido del inglés por Sinover Associates., 2006., Pp.534.
21. **TREYBAL, R.,** Operaciones con Transferencia de masa., s.ed., Habana-Cuba., Editorial Revolucionaria., 1986., Pp. 789-810.
22. **WEST, S., Y OTROS.,** Química Analítica., 7ª ed., México-DF MÉXICO., 1997., Pp.619.

23. **ÁVALOS, A. PÉREZ, E.**, Reeduca Serie Fisiología Vegetal., Metabolitos secundarios de plantas. Madrid-España., s.edt., 2009., Pp.119-145
24. **CARMONA, R., Y OTROS.**, Revista. Cub. PlantMed., Optimización del proceso de obtención del extracto acuoso., s.edt., 2006., Pp. 26-27
25. **COSTA, J., Y OTROA.**, Revista de Química., Los flavonoides como compuestos biológicamente activos., 7ª ed., Lima-Perú., 1993., Pp.78-79-82.
26. **BONILLA, P.**, Flavonoides de *Ephedra americana* (pinco - pinco),, Facultad de Medicina., Instituto de investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales., Universidad Nacional Mayor de San Marcos Cusco- Perú., TESIS., 2001., Pp.75-76.

BIBLIOGRAFIA DE INTERNET

27. AGRONOMÍA

http://www.infoagro.com/flores/flores/trepadoras_jardinaria2.htm

2012-09-29

28. ARTÍCULOS DE FARMACOLOGÍA

http://deturno.com/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=58:ique-sonlosfitofarmacos&catid=42:onarticulo&Itemid=75

2012-09-24

29. BOTÁNICA DE PLANTAS MEDICINALES

<http://www.botanical-online.com/florhiedra.htm>

2012-09-02

30. CROMATOGRAFÍAS

<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografiaThin.htm#historia>

2013-01-10

31. CROMATOGRAFÍA

<http://www.uib.es/depart/dqu/dquo/pau/Cromatograf%92a/chrom10/chrom/GC/concept/>

2013-01-10

32. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_muntatge.html

2013-02-01

33. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

<http://www.asturnatura.com/especie/hedera-helix.html>

2012-09-20

34. ETNOBOTÁNICA

<http://www.encyclopediamedica.cl/index.php?sec=6&list=1&item=2493>

2012-09-20

35. EXTRACTOS VEGETALES.

<http://www.sanopordentro.com/extractos-vegetales.html>

2012-11-25

36. FITOQUÍMICA

<http://www.plantasmedicinalfarmacognosia.com/temas/introduccion-a-lafarmacognosia/fitoquimica/>

2012-09-29

37. FITOQUIMICA

<http://delamanoconvenezuela.com/2012/03/bima-disena-futuro-2/>

2012-09-20

38. HABITAD DE LA HIEDRA

<http://www.botanical-online.com/medicinalshiedra.htm>

2012-09-24

39. INFRA ROJO Y UV

http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16746/1/espectro_electromagnetico.pdf

2012-10-11

40. METABOLITOS SECUNDARIOS

http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf

2013-01-05

41. METABOLITOS SECUNDARIOS

http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_deplantas.pdf

2013-02-05

42. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.

[http://www.monografias.com/trabajos66/extractosplantas-](http://www.monografias.com/trabajos66/extractosplantas-medicinales/extractos-plantas-medicinales2.shtml)

[medicinales/extractos-plantas-medicinales2.shtml](http://www.monografias.com/trabajos66/extractosplantas-medicinales/extractos-plantas-medicinales2.shtml)

2012-11-25

43. PLANTAS ORNAMENTALES

[http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Fi-](http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Octubre_2011/IF_DECHECO%20EGUSQUIZA_FIP)

[nales_Investigacion/Octubre_2011/IF_DECHECO%20EGUSQUIZA_FIP](http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Octubre_2011/IF_DECHECO%20EGUSQUIZA_FIP)

[A/CAPITULO%20N%BA%2011.pdf](http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Octubre_2011/IF_DECHECO%20EGUSQUIZA_FIP)

2012-09-29

44. PLANTAS MEDICINALES MEDICAMENTOS

<http://www.diarioeltiempo.com.ve/V3Secciones/index.php?id=54892>

2012-09-20

45. TAXONOMÍA DE PLANTAS

http://www.comillas.es/archivos/GUIA_BOTANICA.pdf

2012-09-28

46. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE HEDERA HELIX

<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v8n3/pereiracabrera.pdf>

2013-03-11

47. TOXICIDAD DE LA HIEDRA

<http://www.infojardin.net/fichas/plantas-medicinales/hederahelix.htm>

2013-03-10

48. WHO.FITOQUIMICA.CROMATOGRAFIAHEDERA HÉLIX

<http://es.scribd.com/doc/102977826/23/Sapogeninas-esteroidales>

2012-09-29

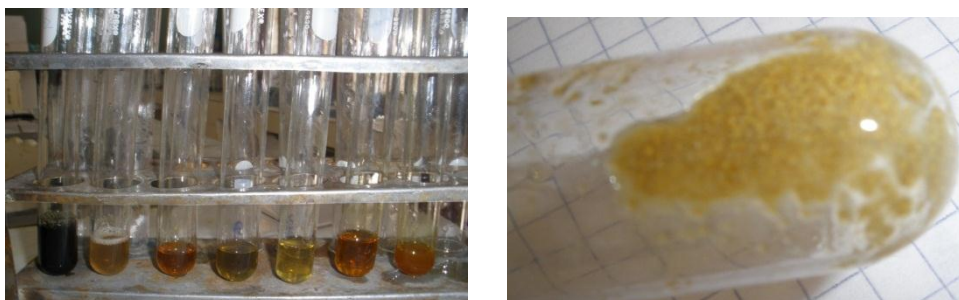
CAPITULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO N°. 1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS



ANEXO N°. 2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO, (CRISTALES) EXTRACTO ETANÓLICO (II)



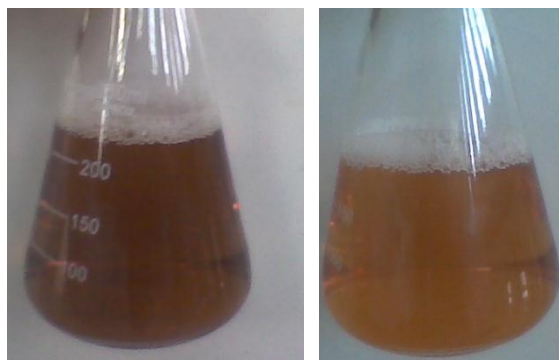
ANEXO N°. 3 MICRO COLUMNA Y COLUMNA CROMATOGRÁFICA



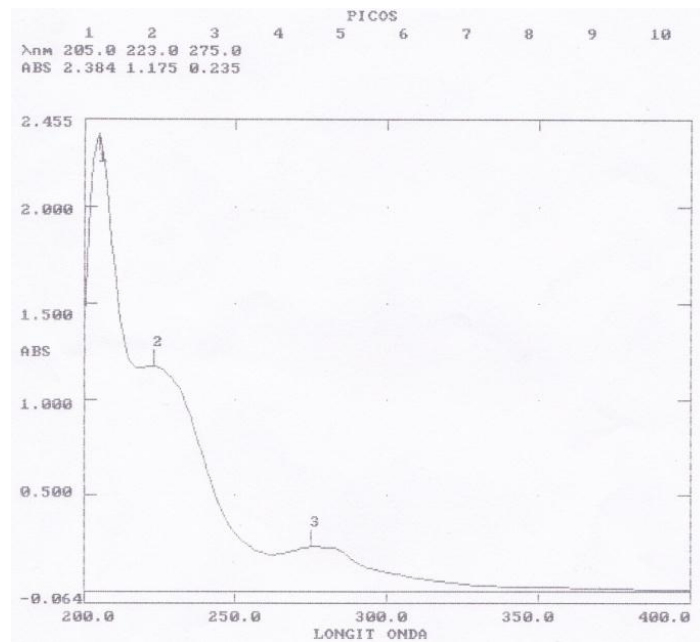
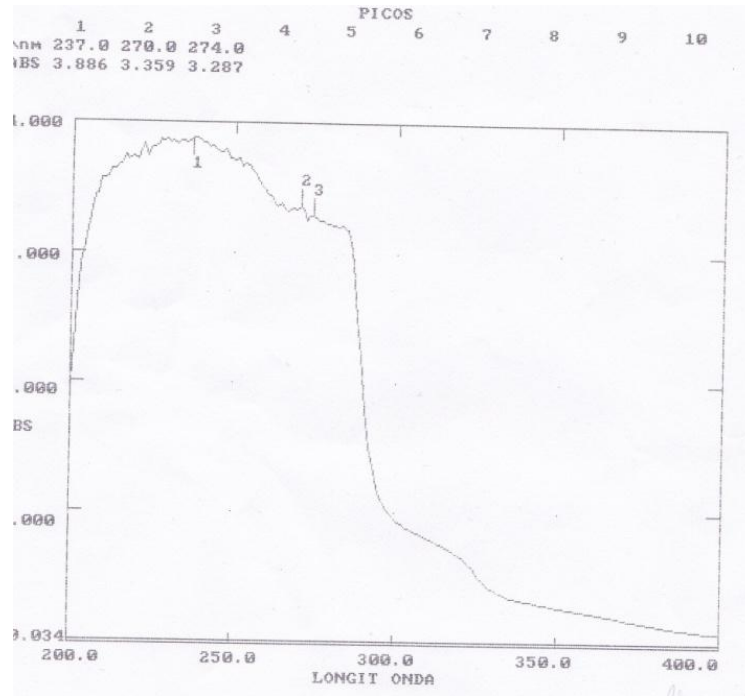
ANEXO N°. 4 CLAR

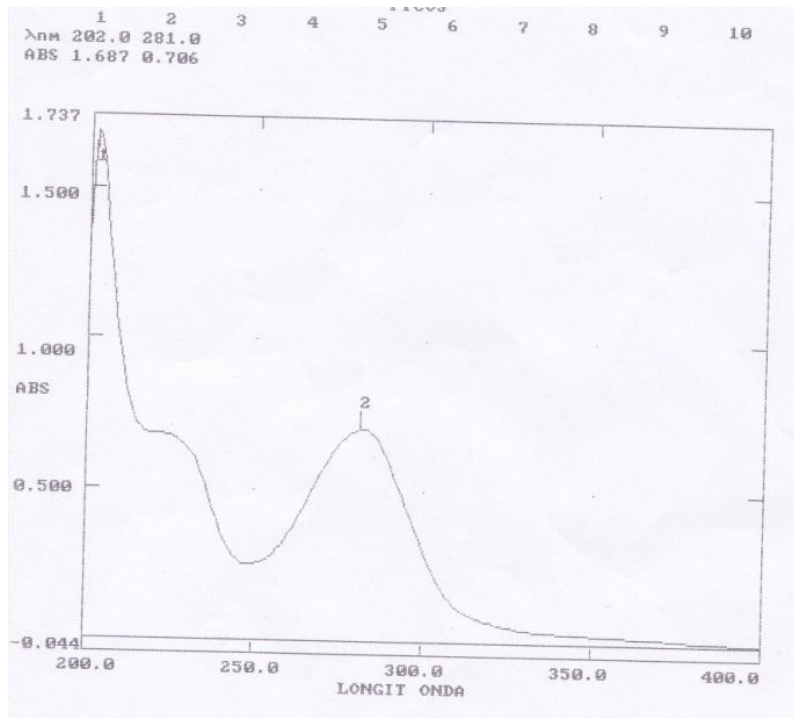


ANEXO N°. 5 TITULACIÓN DE TANINOS PIROCATÉCOLICOS

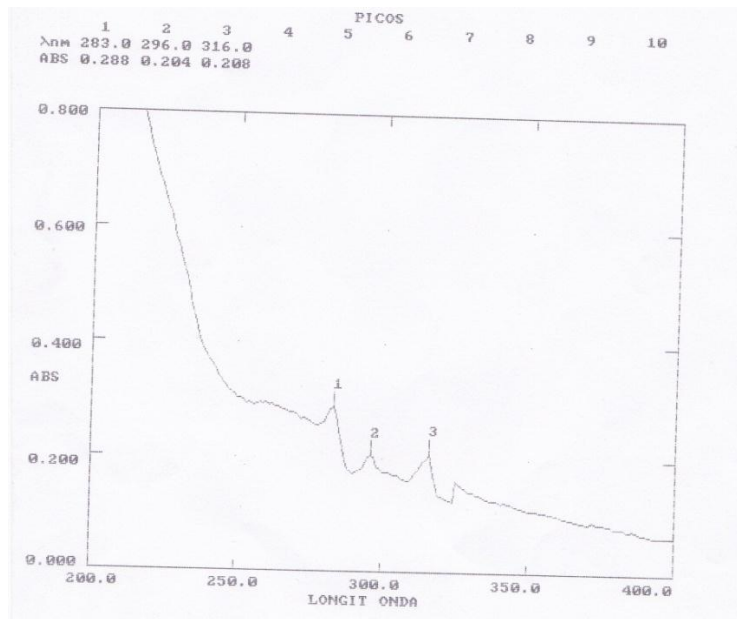
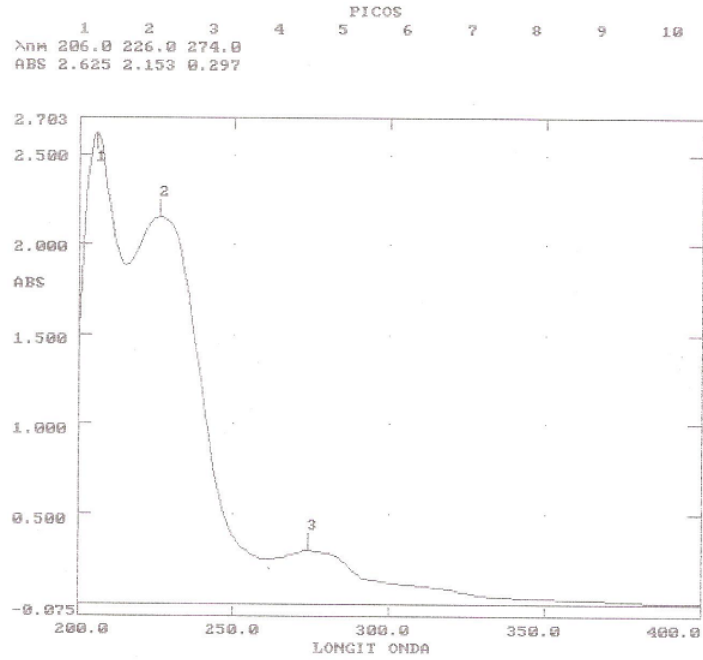


ANEXO N.º 6 ESPECTRO DEL SUBEXTRACTO TOLUÉNICO

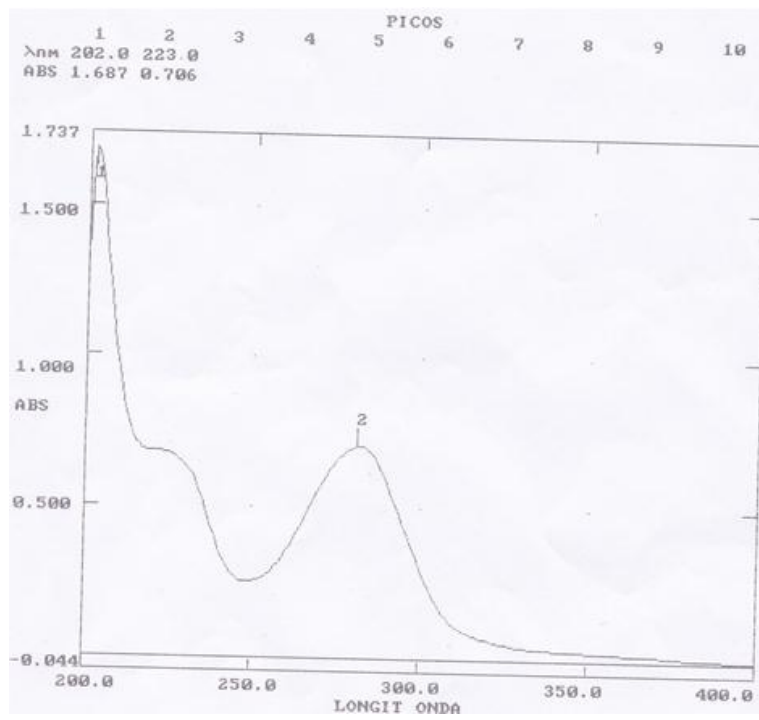
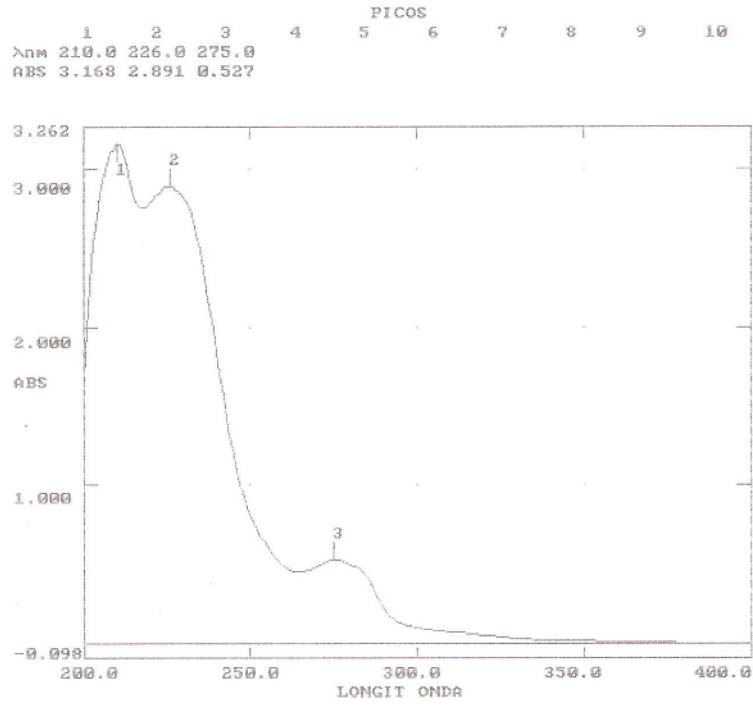




ANEXO N.º 7 ESPECTROGRAMA DEL EXTRACTO ETANÓLICO



ANEXOS N.º 8 ESPECTROGRAMA DEL SUBEXTRACTO BUTANÓLICO



ANEXO N°. 9 ESPECTRO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

