

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR DEL FRUTO DE LA ESPECIE
VEGETAL *Cyphomandra betacea* (TOMATE DE PALO) E
IDENTIFICACION DE ALCALOIDES ESTEROIDALES

TRABAJO DE GRADUACION PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

PRESENTADO POR:

RAQUEL ALEJANDRA MORALES ALVARADO

MAURICIO ARNOLDO ROMERO VALDES

FEBRERO 2009

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL:

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO:

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA:

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL:

Licda. Maria Concepcion Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE TOXICOLOGIA Y QUIMICA LEGAL:

Licda. Maria Luisa Ortiz de Lopez

**ASESORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES:**

MSc. Sonia Maricela Lemus Martinez

DOCENTE DIRECTOR:

Lic. Guillermo Antonio Castillo Ruiz

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial queremos agradecer a:

MSc. ARMANDO NELSON GENOVEZ LEONOR, por habernos otorgado el presente tema de investigación

Lic. GUILLERMO ANTONIO CASTILLO RUIZ, nuestro docente director por haber tomado nuestro trabajo de graduación como suyo, por todas las horas de esfuerzo, trabajo y dedicación que nos brindó, por sus palabras, atenciones por todo su apoyo y por su infinita paciencia

Licdas: ODETTE RAUDA, MARIA LUISA ORTIZ DE LOPEZ Y MARICELA LEMUS, coordinadora general de trabajos de graduación y asesoras de área respectivamente, por sus consejos y correcciones en pro de mejorar el trabajo de investigación

MSc NOHEMY ELIZABETH VENTURA CENTENO, directora de la escuela de Biología y curadora del Herbario de la Universidad de El Salvador, por habernos colaborado con la identificación taxonómica de la especie vegetal.

LIC. ARTURO ALFONSO GARCIA MAZZINI, jefe de almacenes y bodega.

SR. ALEXANDER SIGUENZA, laboratorista de análisis bromatológico y toxicología por ayudarnos con reactivos, en la preparación de estos, con equipo y también por ayudarnos con las placas cromatográficas, su ayuda fue un pilar fundamental para terminar la parte experimental no ¡miles de gracias Alex!

A DON JAIME PASCUAL de orgánica, DON LUIS ALONSO de química general, DON VICTOR de farmacoquímica y DON TOÑITO de control de calidad, muchísimas gracias por colaborarnos tanto

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO por la fuerza que me regalas día a día. Por ser mi padre, mi amigo, mi guía y el pilar donde siempre me he apoyado.

A MIS PAPAS: DAVID Y LILIAN viejos, no sería absolutamente nada si no los tuviera a ustedes, gracias por tanto amor y sacrificio, apoyo y por todos los consejos que siempre me han dado. Los Amo, pero sobre todo los admiro muchísimo. Gracias.

A MIS HERMANAS: GLENDA Y NANCY: por ser mis amigas y apoyarme, pero sobre todo por escucharme y entenderme.

A MI HIJO DIEGO, porque eres la pieza que me faltaba. Eres el motor de mi vida....

A MIS TIOS: ALIRIO Y SONIA, LORENA Y ORLANDO, CARLOS E IMELDA Y TIA AIDA por regalarme valiosos consejos, por estar siempre pendientes de mi y de la carrera y por animarme a salir adelante.

A MIS PRIMOS KATHYA Y MARCOS por ser mis hermanos, por su apoyo y cariño

A DAVID, JAHIR, ROXANA, JESUS, NATA, HUGO, SYLVIA, ANDREA Y JENNY, por brindarme su amistad, apoyo y cariño, por estar ahí siempre que los necesito. Los quiero.

Raquel Alejandra Morales Alvarado

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO Y SU HIJO JESUCRISTO.

Por ser mi guía y darme sabiduría, iluminando mi camino y estudio, por que nunca me han dejado solo, gracias por toda tu bondad infinita.

A MI MADRE

Virgilia Irma Valdés, por ser mi atalaya en esta tierra, por su incondicional amor, por sus sabios consejos sobre como enfrentar los retos de la vida, por su ejemplo de perseverancia, humildad, y paciencia.

A MIS HERMANAS Y SU FAMILIA

Alma Romero, esposo e hijos; Nora cristina, Coralia del Carmen, por su colaboración, apoyo incondicional y espiritual.

A MI ESPOSA E HIJOS

Magdalena de Romero, Valeria Romero Cortez, y Alejandro Romero, pues son los amores de mi vida, mis inspiraciones y mis bendiciones.

Mauricio Arnoldo Romero Valdés

ÍNDICE

CONTENIDO	No DE PAGINA
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 Introducción	xix
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	
2.1 Objetivo general	
2.2 Objetivos específicos	
CAPITULO III	
3.0 Marco teórico	
3.1 Monografía de <i>Cyphomandra betacea</i>	24
3.2 Alcaloides	31
3.3 Clasificación de alcaloides	33
3.4 Alcaloides esteroidales	34
3.5 Taninos	35
3.6 Flavonoides	36
3.7 Glicósidos saponinicos	38
3.8 Glicósidos Cardiotonicos	39
3.9 Sesquiterpenlactonas	40
3.10 Cromatografía	40

3.11 Aspectos Históricos	42
3.12 Clasificación	43
3.13 Fundamento teórico Cromatografía en capa fina	43
3.14 Historia	44
3.15 Proceso de adsorción	45
3.16 Ventajas de Cromatografía capa fina	45
3.17 Adsorbentes	46
3.17.1. sílica gel	46
3.17.2. Alumina	47
3.18 Preparación de placas	48
3.19 Aplicación de las muestras	48
3.20 Elección del eluyente	49
3.21 Aplicación de la muestra	51
3.22 Desarrollo de la placa	51
3.23 Etapas de la cromatografía en capa fina	57
CAPITULO IV	
4.0 Diseño metodológico	64
4.1 Tipo de estudio	64
4.2 Metodología	64
4.2.1 Investigación bibliográfica	64
4.2.2 Investigación de campo	65
4.2.3 Investigación de laboratorio	65
4.2.3.1 Maceración	66

4.2.3.1.1 Maceración Acuosa	66
4.2.3.1.2 Maceración Alcohólica	66
4.2.4 Reflujo	67
4.2.4.1 Reflujo Acuoso	67
4.2.4.2 Reflujo Alcohólico	67
4.2.5 Pruebas Químicas	67
4.2.5.1 Pruebas colorimétricas en tubo de ensayo	67
4.2.5.2 Pruebas colorimétricas en placa	71
CAPITULO V	
5.0 Resultados e interpretación de resultados	77
CAPITULO VI	
6.0 Conclusiones	87
CAPITULO VII	
7.0 Recomendaciones	89
Bibliografía	
Anexos	

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°	No DE PAGINA
1 Tiempo de maceración y apariencia de los Extractos	78
2 Pruebas de caracterización en tubo de ensayo para los metabolitos secundarios en extracto alcohólico	79
3 Pruebas de caracterización en tubo de ensayo para los metabolitos secundarios en extracto acuoso	80
4 Identificación en placa de los metabolitos secundarios de <i>Cyphomandra betacea</i> (tomate de palo) en extracto alcohólico y acuoso	83

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Clasificación botánica de *Cyphomandra betacea*.
- 2 Carta de MSc. Nohemy Ventura
- 3 Materiales, equipo y reactivos
- 4 Preparación de reactivos
- 5 Fotografías del trabajo realizado en el Laboratorio
- 6 Diagrama del proceso de trabajo realizado en el laboratorio

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG N°	No DE PAGINA
1 Árbol, Flor y fruto de <i>Cyphomandra betacea</i>	24
2 Países que producen <i>Cyphomandra betacea</i>	28
3 Estructura base de alcaloides esteroidales	35
4 Estructura base de Taninos	36
5 Estructura base de los flavonoides	37
6 Estructura de glicósidos saponinicos	38
7 Estructuras base de Glicósidos cardiotonicos	39
8 Estructura de sesquiterpenlactonas	40
9 Preparación de la placa cromatográfica	57
10 Marcado de la placa cromatográfica, previo a la Inyección	57
11 Inyección de las muestras	59
12 Colocación de la placa dentro de la cámara cromatográfica	59
13 Ascenso del solvente sobre la superficie de la Placa	60
14 Ascenso de la fase móvil por el adsorbente	60
15 Secado de la placa cromatográfica	62

ABREVIATURAS:

m: metro

cm: centímetro

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

m.m: milímetros

mL: mililitros

min: minutos

HPLC: (high performance liquid chromatography) cromatografía líquida de alta resolución

TLC: (thin layer chromatography). Cromatografía de capa delgada

pH: índice de los hidrógenos u oxhidrilos presentes en una sustancia y que permite medir la acidez o alcalinidad de esta.

I.U.P.A.C.: Unión Internacional de Química pura y aplicada

μl: micro litros

μg: micro gramos

°C : grados celcius.

UV: ultravioleta

RESUMEN

RESUMEN.

La especie vegetal en estudio, *Cyphomandra betacea* es una especie no muy común en la flora salvadoreña, pero al encontrar condiciones favorables crece en el volcán Ilimatepec del departamento de Santa Ana. La etapa de recolección se llevó a cabo en los cantones Buenos Aires y Palo de Campana de este sector de igual forma se contó con la identificación taxonómica de la especie en estudio, la cual fue facilitada por la MSc. Nohemy Elizabeth Ventura Centeno Curadora del herbario de la Universidad de El Salvador.

Se preparó la especie vegetal y se sometió a maceración y reflujo con alcohol de 90° y agua, obteniéndose así dos extractos: uno alcohólico y uno acuoso. A los extractos obtenidos se les realizó pruebas colorimétricas en tubo, para identificar la presencia de taninos, glicósidos saponinicos, glicósidos cardiotónicos, flavonoides, sesquiterpenlactonas, así como pruebas preliminares de identificación para alcaloides con los reactivos de Dragendorff, Mandelin y Marquis y de alcaloides esteroidales con el reactivo de Liebermann. A su vez se realizó un análisis por cromatografía capa fina para cada metabolito y para alcaloides esteroidales, utilizando los respectivos reactivos reveladores, los cuales proporcionaron manchas características. Al igual que para los alcaloides esteroidales se lograron establecer Rf experimentales.

Podemos decir entonces, basándonos en los resultados experimentales de las pruebas colorimétricas en tubo, y de la técnica de cromatografía en capa

fin a que en el extracto alcohólico de la especie vegetal **Cyphomandra betacea** se encuentran presentes: taninos, saponinas, flavonoides, alcaloides esteroidales y que en el extracto acuoso no se encuentra la presencia de glicósidos cardiotónicos.

Con esta investigación se pretende aportar un estudio preliminar el cual permita promover y desarrollar más proyectos de investigación sobre este fruto, para tener bases de datos que permitan en un momento dado usar esta planta para beneficio de la salud de la población.

Capitulo I
INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Desde los tiempos más antiguos, el hombre se ha valido de la naturaleza, para satisfacer sus necesidades, utilizando de manera especial, las plantas como alimento y como cura a muchas de sus enfermedades.

En la actualidad se conocen muchos principios activos procedentes del reino vegetal. Sin embargo todavía existen muchas otras especies que poseen valor medicinal aun no estudiadas.

Los profesionales del área de la salud; estamos obligados a buscar y desarrollar alternativas viables para las necesidades de salud que la población presenta y para las enfermedades que evolucionan día a día. Es por esta razón que enfatizamos la relevancia de este trabajo de investigación, porque una de estas especies aun no estudiada por completo, es la ***Cyphomandra betacea***, mejor conocida como tomate de palo, la cual es prácticamente desconocida en el país pero utilizada de manera casera en países de Sur América.

La información bibliográfica obtenida en diferentes referencias internacionales señala las propiedades farmacológicas que esta planta posee, las cuales justifican su selección como objeto de estudio, para lo cual someteremos a la especie a diferentes etapas como: identificación botánica, en dicha etapa se optó por visitar el volcán de Santa Ana, específicamente el cantón Buenos Aires

y Palo Campana, ya que basándonos en referencias bibliográficas sabemos que este lugar reúne las condiciones de altura, temperatura y tipo de suelo necesarios para el desarrollo favorable de la planta; una vez realizada la primera etapa, se procede a la recolección, en la cual tomamos la parte de la planta de mayor interés para el estudio (el fruto maduro) se seca y se traslada al laboratorio en donde se somete a maceración con alcohol al 90% y agua, con el objetivo de encontrar en ella alcaloides esteroidales, taninos, glicósidos saponinicos, glicósidos cardiotónicos, flavonoides, sesquiterpenlactonas y su posterior identificación en placa y en tubo por medio de sus respectivos reactivos.

Capitulo II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar estudio fitoquímico e identificación de alcaloides esteroidales por cromatografía de capa fina del fruto de *Cyphomandra betacea* (Tomate de palo).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Identificar y Tratar el Fruto maduro de la especie vegetal a estudiar, *Cyphomandra betacea* (Tomate de palo).

2.2.2 Extraer los metabolitos secundarios y los alcaloides esferoidales del fruto maduro por medio de maceración y reflujo con agua y alcohol de 90°.

2.2.3 Realizar pruebas fotoquímicas, en tubo y en placa para determinar metabolitos secundarios y alcaloides esteroidales por medio de reacciones específicas.

2.2.4 Determinar los RF experimentales de los metabolitos secundarios obtenidos de la especie vegetal.

Capitulo III

MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Monografía botánica de *Cyphomandra betacea* (12,14)

¡Error! No se pueden crear objetos modificando códigos de campo.

Fig. N° 1 Árbol, Flor y fruto de *Cyphomandra betacea*

Cyphomandra betacea es la especie útil más importante del género, compuesto por cerca de 50 especies, perteneciente a la familia Solanaceae

Familia: Solanáceas

Sinónimos: *Solanum betaceum* Cav., *Cyphomandra crassicaulis*

Nombres comunes: Árbol de los tomates, Tamarillo, aunque recibe otros nombres, tales como "tomate cimarrón, tomate extranjero, granadilla y contragallinazo" en Centroamérica, "berenjena y tomate de palo" en México, tomate de monte, tomate silvestre, pepino de monte y gallinazo panga" en

Colombia y Perú, "chilto, sima, tomate de lima" en Bolivia, "tomate chimango, tomateiro da serra" en Brasil y "Tamarillo" en Nueva Zelanda, país en donde ha sido introducido.

Descripción. : Arbusto arbóreo o arbolito de 3-4 m de altura con tronco corto, frágil, algo torcido a veces. Corteza grisácea. Follaje perenne, aunque en zonas con frío invernal, lo pierde bastante y se hielan las hojas. Hojas alternas, enteras, en los extremos de las ramas, con pecíolo robusto de 4-8

cm. de longitud. Limbo de 15-30 cm. de longitud, con forma ovalada, acuminado, de color verde oscuro, un poco áspero al tacto. Las hojas jóvenes con fina pubescencia en ambas caras. La nerviación es marcada y sobresaliente. Las flores son pequeñas, de 1.3-1.5 cm. de diámetro, de color blanco-rosáceo, dispuestas en pequeños racimos terminales. Tienen 5 pétalos y 5 estambres amarillos. Florece en Mayo-Junio. Fruto en baya ovoide de 4-6 cm. de longitud, con largo pedúnculo en el que persiste el cáliz de la flor. Piel lisa de color rojo anaranjado en la madurez, con estrías de color más claro. Pulpa jugosa, algo ácida, con numerosas semillas. Recuerda un tomate del tipo denominado de "pera".

Etimología: *Cyphomandra*, palabra derivada del griego y que alude a la forma de las anteras de la flor. *Betacea*, proviene de Beta=Acelga, quizás por sus hojas anchas a la manera de las de las acelgas.

Información etnobotánica y etnomédica. Conocido en la Región Andina desde la época Prehispánica. Algunas especies relacionadas se usan como vermífugas. La decocción de las hojas de *C. crassifolia* es empleada por los indígenas Mitu para la eliminación de los parásitos intestinales. Los Kofanes del Putumayo también creen que las hojas son vermífugas. Los usos medicinales de *C. betacea* en Colombia y Ecuador están relacionados con las afecciones de garganta y gripe. El fruto o las hojas, previamente calentadas o soasadas, se aplican en forma tópica contra la inflamación de amígdalas o anginas especialmente. Para la gripe, se debe consumir el fruto fresco en ayunas. Se sabe que el fruto posee alto contenido de ácido ascórbico. Otra

propiedad atribuida es como remedio de problemas hepáticos en Jamaica y Bolivia.

Composición química y propiedades farmacológicas. En el género *Cyphomandra* se ha reportado la existencia de nicotina y de alcaloides. En las semillas de *C. betacea* se han separado esteroides con ácidos grasos, varios alcaloides en las raíces y derivados de flavonoides; también están presentes taninos y tetraterpenos. El tomate de árbol se cultiva por sus frutos, que constituyen un buen recurso alimenticio; son fuente de pro vitamina A (caroteno 150-Unidades internacionales por 100 g), vitamina B6, B₁, niacina,²⁷ y fósforo, contiene 1% de almidón, vitamina C (25 mg por 100 g), vitamina E y hierro. Su contenido de carbohidratos es bajo y la fruta proporciona aproximadamente 40 calorías, además es considerado en fruto terapia como una de las frutas que fortalecen el cerebro, contribuye a curar migrañas y cefaleas severas, la obesidad, la hipertensión y la rinitis. Está contraindicado si se presentan las diferentes enfermedades: alergias de la piel, tensión baja y urticaria.

Acción. Se considera que tiene varias propiedades medicinales. Estimulante, anticolesteromiente, antiinflamatorio,

Principales indicaciones. Hipercolesterolemia, trastornos cardiovasculares, antiinflamatorio.

Parte utilizada. Hojas, fruto

Forma de preparación. Decocción de las hojas, el consumo del fruto maduro puede ser crudo, cocido como vegetal, en sopas, salsas, ensaladas, como fruta en dulce, mermeladas, jugos, entre otros, el fruto fresco en ayunas es de gran ayuda contra la gripe, el fruto maduro se calienta y se aplica en forma tópica contra la inflamación de las amígdalas.

Este fruto es también conocido con el nombre de tomate de árbol (por su parecido con el tomate), tomate francés o cifomandra y pertenece, al igual que la patata o el tomate, a la familia de las Solanáceas, que incluye unas 2.300 especies de plantas americanas productoras de alcaloides, de ellas sólo se cultivan unas treinta.

ORIGEN Y VARIEDADES (7)

Procede de Suramérica, concretamente de los Andes peruanos. Se cultiva en zonas tropicales altas: Brasil, Colombia y Sudáfrica. Hoy día son países productores Colombia, Brasil, Nueva Zelanda, Kenia, Sudáfrica, California, India

y Sri Lanka. Existen tres variedades que se diferencian por el color de su piel: rojo, naranja (más dulces y con semillas tiernas y de menor tamaño que el resto) y amarillo.



Fig. No 2: Países que producen *Cyphomandra betacea*

Las variedades más comercializadas son: **Tomate común**, de forma alargada, color morado y anaranjado; **Tomate redondo**, colombiano, de color anaranjado o rojizo; **Tomate mora**, de Nueva Zelanda, forma oblonga y de color morado. El sabor de la fruta difiere en su mezcla de sabor dulce y agrio según la variedad.

Este fruto está disponible durante todo el año en el mercado español.

PROPIEDADES NUTRITIVAS ⁽⁸⁾

Su componente mayoritario es el agua. Es un fruto de moderado valor calórico, a expensas de su aporte de hidratos de carbono. Destaca su contenido de pro vitamina A y C, de acción antioxidante, y en menor proporción contiene otras vitaminas del grupo B, como la B6 o piridoxina, necesaria para el buen funcionamiento del sistema nervioso. Su contenido de fibra soluble, (pectina) es alto; mejora el tránsito intestinal. La vitamina C interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones. La pro vitamina A o beta caroteno se transforma en vitamina A en nuestro organismo conforme éste lo necesita. La vitamina A es esencial

para la visión, el buen estado de la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico. Ambas vitaminas, cumplen además una función antioxidante.

Por su sabor y apariencia, combina con otros alimentos que lo enriquecen en matices y nutrientes, por lo que lo pueden consumir los niños, los jóvenes, los adultos, los deportistas, las mujeres embarazadas o madres lactantes y las personas mayores.

Por su aporte de pro vitamina A y vitamina C, su consumo es adecuado para quienes tienen un mayor riesgo de sufrir carencias de dichas vitaminas: personas que no toleran los cítricos, el pimiento u otros vegetales, que son fuente casi exclusiva de vitamina C en nuestra alimentación; para quienes deben llevar a cabo una dieta baja en grasa y por tanto con un contenido escaso de vitamina A o para personas cuyas necesidades nutritivas están aumentadas. Algunas de estas situaciones son: periodos de crecimiento, embarazo y lactancia materna. Así mismo, el tabaco, el abuso del alcohol, el empleo de ciertos medicamentos, situaciones de estrés y las defensas disminuidas, la actividad física intensa, el cáncer y el Sida, las pérdidas digestivas y las enfermedades inflamatorias crónicas que disminuyen el aprovechamiento y producen mala absorción de nutrientes. Las vitaminas A y C, como antioxidantes, contribuyen a reducir el riesgo de múltiples enfermedades, entre ellas, las cardiovasculares, las degenerativas e incluso el cáncer. Además, debido a que la vitamina C aumenta la absorción del hierro de los alimentos, se aconseja en caso de anemia

ferropénica, acompañando a los alimentos ricos en hierro o a los suplementos de este mineral ya que esto acelera la recuperación. Su contenido de fibra le confiere propiedades laxantes. La fibra previene o mejora el estreñimiento, contribuye a reducir las tasas de colesterol en sangre y al buen control de la glucemia en la persona que tiene diabetes. Ejerce un efecto saciante, lo que beneficia a las personas que llevan a cabo una dieta para perder peso.

CONSUMO. ⁽⁸⁾

El tomate de árbol es una fruta muy versátil en cuanto a variedad de preparaciones; además, su utilización es fácil porque sus semillas son comestibles. La cáscara se quita fácilmente en agua hirviendo. Es una fruta de consumo tradicional en la sierra ecuatoriana, preparada especialmente en jugo y en conserva con almíbar. Adicionalmente, es un excelente complemento para ensaladas de frutas, y es deliciosa cuando es preparada en helados, jaleas, mermeladas y una variedad de dulces; se utiliza también en platos de carnes con sabores combinados.

ECOLOGIA ⁽⁹⁾

Temperatura: 15 a 18 grados centígrados; altura: 1800 - 2600 m.s.n.m.; precipitación: 600 - 1500 mm / año; textura: se desarrollan en una amplia gama de suelos; lo hace en forma más eficiente en los terrenos de textura franca y ricos en materia orgánica; pH: Neutro

SIEMBRA ⁽⁹⁾

Se ponen las semillas en agua por una noche.

Después sembrar en una mezcla de arena y tierra buena para sembrar, tapar la maceta con cristal o plástico transparente y poner en un lugar caliente y con sombra

Germinación entre 3-4 semanas

Trasplantar las plantas pequeñas cuando tengan su primer par de hojas verdaderas en macetas individuales con una tierra fértil y permeable.

Adaptarla al sol y mantenerla mojada, abonar con un abono líquido ligero.

En el invierno no mantener bajo de 5°C.

3.2 ALCALOIDES ⁽¹²⁾ HISTORIA: En este importante grupo de compuestos se incluyen principios activos dotados de actividades marcadas y/o de toxicidad. La palabra alcaloide fue utilizada por primera vez en el primer cuarto del siglo XIX (1819) para designar algunos compuestos activos que se encontraban en los vegetales y que poseían carácter básico. Mas tarde, en (1910) se definieron los alcaloides, en un sentido amplio, como compuestos básicos, nitrogenados, de origen vegetal o animal.

A lo largo de la primera mitad del siglo XIX se aislaron numerosos alcaloides. En 1805 se separó el primero, la morfina de *Papaver somniferum*. Posteriormente y por citar alguno mas, aislaron la estricnina en 1817, la quinina en 1820 y la codeína en 1832. El primer alcaloide que se consiguió sintetizar fue la codeína en 1886, después se fueron sintetizando

muchos más, aunque en algunos casos su síntesis es complicada y cara y en otros casos no ha sido aún posible realizarla.

Por otra parte, no debemos olvidar que los primeros pasos de la farmacología experimental se iniciaron con el estudio de alcaloides.

En la actualidad se conocen más de 5000 alcaloides, restringidos a un número corto de familias botánicas y se continúa investigando en la búsqueda de nuevos compuestos pertenecientes a este grupo. Su distribución es abundante en Angiospermas, especialmente Dicotiledóneas, siendo familias particularmente ricas en ellos: Apocynaceae, Asteraceae, Loganiaceae, Papaveraceae, Rubiaceae, Ranunculáceas, Solanaceae, etc.

GENERALIDADES:

Desde el punto de vista químico, todos los alcaloides son compuestos nitrogenados, estando en la mayoría de los casos el nitrógeno heterocíclico y en algunas ocasiones formando parte de una cadena abierta. Están constituidos además por carbono e hidrógeno, muchos llevan oxígeno, lo que les confiere una serie de propiedades físicas (sólida, cristalizable), y raramente suelen contener azufre. Algunos autores hacen una diferenciación entre alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides.

Los primeros serían compuestos de origen vegetal, con nitrógeno heterocíclico, con carácter básico y siempre procedentes de aminoácidos. Los protoalcaloides son aminas simples, con nitrógeno no heterocíclico, también

con carácter básico y formados biogenéticamente a partir de aminoácidos y los pseudoalcaloides tendrían las propiedades de los alcaloides pero su biosíntesis no sería a partir de aminoácidos. Esta diferencia entre los alcaloides no es compartida por muchos autores ya que excluye auténticos alcaloides como son la efedrina, colchicina o cafeína, por citar algunos de interés

3.3 CLASIFICACIÓN DE ALCALOIDES ⁽¹²⁾

Su clasificación es compleja pudiéndose acometer desde distintos puntos de vista. En el momento actual parece ser la clasificación biogenética la de elección, es decir, según su origen o formación en el vegetal. Esta clasificación está bastante relacionada, en la mayoría de los casos, con la clasificación química que venía siendo la utilizada en tiempos anteriores.

Así, puesto que una gran parte de los alcaloides derivan de unos pocos aminoácidos, bien de cadena abierta o aromática, la clasificación puede realizarse de la siguiente forma:

- Alcaloides derivados de ornitina y lisina: tropánicos, pirrolizidínicos, piperidínicos y quinolizidínicos.
- Alcaloides derivados del ácido nicotínico.
- Alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina: feniletilamínicos e isoquinoleínicos.
- Alcaloides derivados del triptófano: indólicos y quinoleínicos.
- Alcaloides derivados de la histidina: imidazólicos

- Alcaloides derivados del ácido antranílico.
- Alcaloides derivados del metabolismo terpénico: diterpénicos y esteroídicos.
- Otros alcaloides: bases xánticas

3.4 ALCALOIDES ESTEROIDALES: ⁽¹³⁾

Diversas plantas de la familia de las solanáceas, especialmente las del género ***Solanum***, son conocidas como fuentes de sustancias estructuralmente muy relacionadas con las saponinas esteroides y son los alcaloides esteroidales, por ejemplo la tomatadina.

Estas sustancias poseen características tanto de esteroides (dan ensayos positivos con el reactivo de Liebermann-Burchard) y como alcaloides (dan ensayos positivos como el de Dragendorff).

Gran variedad de especies vegetales acumulan alcaloides esteroidales basado sobre un C₂₇ de la estructura del colesterol ejemplo la solasodina, este es considerado como análogo nitrogenado de las saponinas esteroidales; así como las sapogeninas, este grupo de alcaloides son derivados del colesterol con apropiadas modificaciones de la cadena lateral, una variante en la vía del colesterol es la ciclación de la cadena lateral, que puede ser originada en la solasodina, la cual contiene un sistema de anillos condensados con nitrógeno por un puente- cabeza.

Entre los diferentes usos de estos alcaloides están: actividad contra varias bacterias y hongos, afecciones de la garganta, erisipela, inflamaciones, artritis.

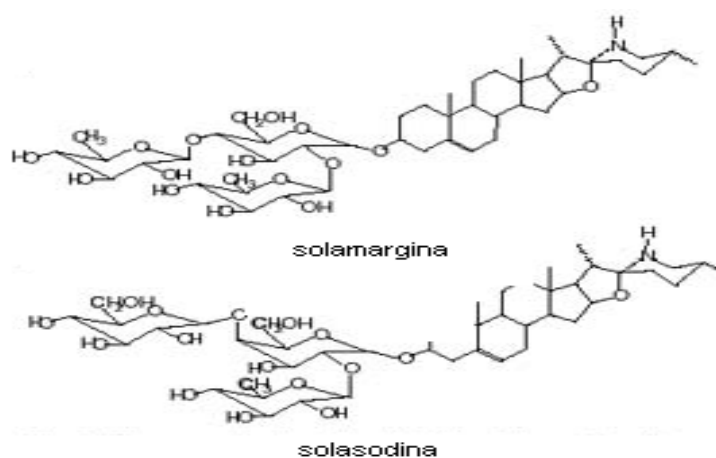


FIG N° 3: Estructuras de alcaloides esteroidales

3.5 TANINOS ⁽¹⁵⁾

Los taninos son compuestos polifenólicos muy astringentes de gusto amargo que se dividen en hidrolizables y condensados. Industrialmente se han utilizado por su propiedad de curtir pieles, al eliminar el agua de las fibras musculares; la importancia de los taninos en el mundo vegetal es su capacidad para proteger las plantas contra las heridas que sufren y el hecho de que las protegen de los ataques exteriores, los taninos proporcionan a las plantas medicinales las siguientes propiedades: curación de heridas y cuidado de la piel puesto que cumplen la función cicatrizante al acelerar la curación de heridas y hemostáticas al detener el sangrado, la cicatrización se produce por la formación de costras al unirse las proteínas con los taninos y crear un medio seco que impide el desarrollo de las bacterias al constreñir

los vasos sanguíneos ayudando a la coagulación de la sangre, contribuyen en el tratamiento de hemorroides, curación de úlceras de la boca, detención de diarreas por su acción astringente, como antioxidante por su capacidad para eliminar los radicales libres previniendo las apariciones de enfermedades degenerativas.

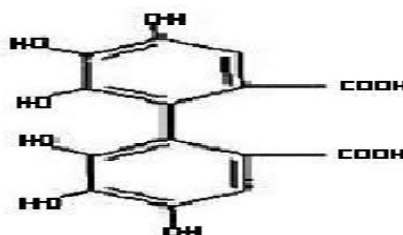


FIG N° 4: Estructura de taninos

3.6 FLAVONOIDES. (11, 16)

Flavonoide (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuya estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, este puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en 6

clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles los flavandioles, las antocianinas y los taninos condensados, más una séptima clase, las auronas, tenidas en cuenta por algunos autores por estar presentes en una cantidad considerable de plantas.

Los flavonoides consumidos por el hombre lo protegen del daño de los oxidantes, como los rayos UV (cuya cantidad aumenta en verano); la polución ambiental (minerales tóxicos como el plomo y mercurio; algunas sustancias químicas presentes en los alimentos (colorantes, conservantes, etc.). Como el organismo humano no tiene la capacidad de sintetizar estas las obtiene a través de los alimentos que ingiere. Sus efectos en los humanos pueden clasificarse en: propiedades anticancerosas, propiedades cardiotónicas, protección del estómago, antiinflamatorio, analgésico.

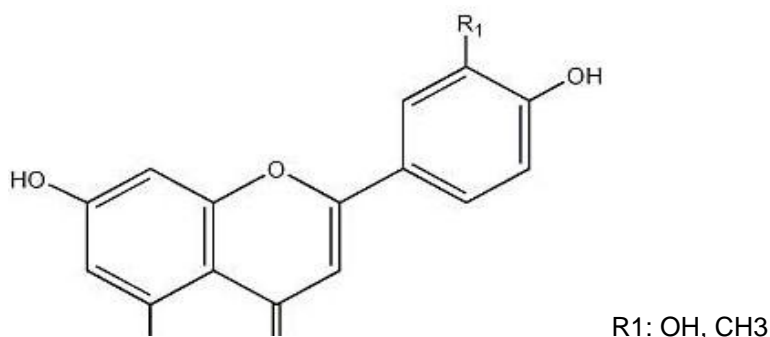


FIG N° 5 Estructura base de los flavonoides

3.7 GLICOSIDOS SAPONINICOS ⁽³⁾

Los glicósidos saponinicos presentan unión entre la cadena azucarada y la genina mediante un enlace en el carbono 3 del núcleo fundamental, ya sea

esteroidal o triterpenico y son caracterizados principalmente por sus propiedades tensioactivas. Se disuelven en agua formando soluciones espumantes, aumentan la permeabilidad de las paredes celulares y destruyen los hematíes por hemólisis. A la parte no azucarada o genina se le denomina sapogenina.

Los azúcares que constituyen los Glucósidos saponinicos son:

Glucosa, Arabinosa, Ramnosa, Xilosa.

Entre sus propiedades se encuentran: disminuyen la tensión superficial del agua formando espuma, forman soluciones coloidales, tienen poder hemolítico, disminuyen la absorción del colesterol, pueden usarse como expectorante o diurético, son tóxicos para animales de sangre fría, poseen propiedades antimicrobianas y antifúngicas

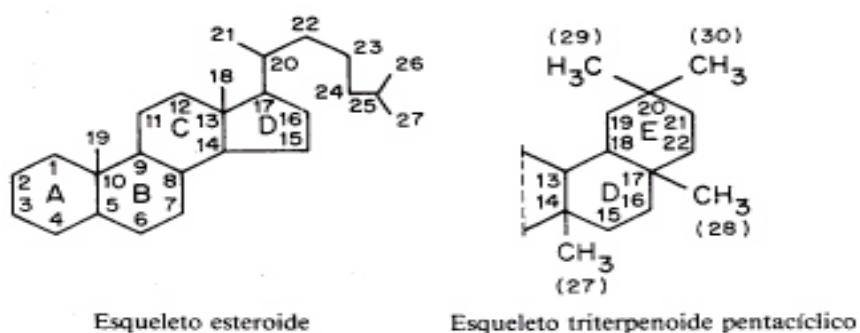


FIG.6 Estructura de Glicósidos saponinicos

3.8 GLICOSIDOS CARDIOTÓNICOS (3)

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias amargas derivadas de los esteroides que actúan sobre el corazón, estos se pueden clasificar en:

- Cardenólidos
- Bufadienólidos

Para que un glicósido cardiotónico cumpla con su función la genina debe cumplir las siguientes características:

- Poseer un anillo lactónico alfa insaturado unido en el carbono 17
- Un hidroxilo orientado en forma beta en carbono 3 y 14
- Unión cis entre los anillos c y d

Entre sus usos farmacológicos se tienen: insuficiencia cardiaca aguda o crónica, control de arritmia cardiaca.

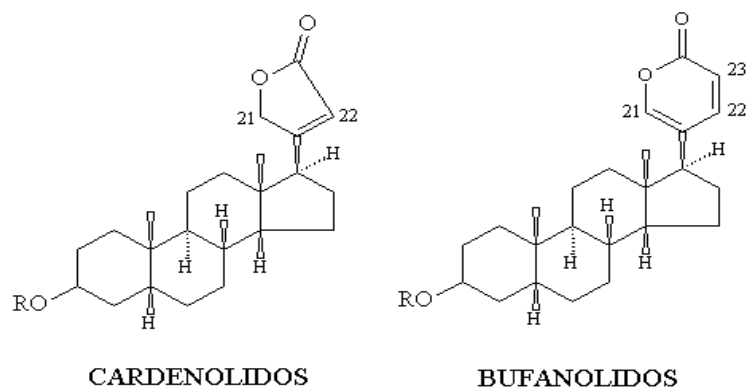


FIG N°7: Estructuras base de Glicósidos cardiotónicos

3.9 SESQUITERPENLACTONAS ⁽³⁾

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen una clase de productos naturales biogénicamente derivados del ácido mevalónico formado por condensación cabeza - cola de tres unidades de piro fosfatos de isoprenilo y ciclizaciones posteriores producen anillos insaturados cis o trans.

Su actividad antineoplásica y propiedades citotóxicas y anti tumorales han sido su particular importancia. Ha sido demostrado que toda gamma-lactonas sesquiterpénicas con insaturación α - β en carbono 11 y 13 posee dichas propiedades

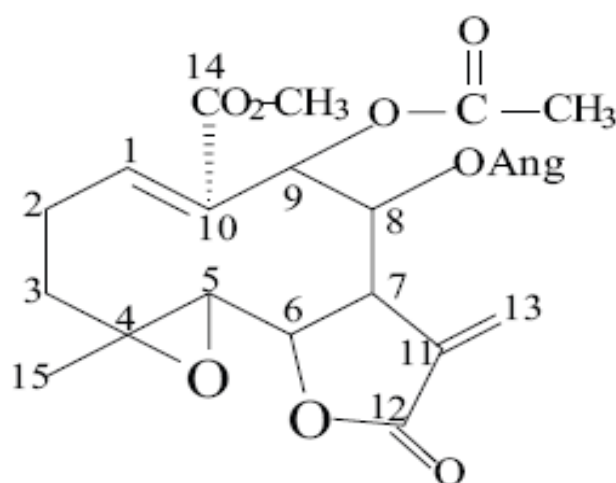


FIG. No. 8: Estructura de sesquiterpenlactonas

3.10 CROMATOGRAFÍA (11, 17)

El botánico ruso Mikhail Tswett (Mikhail Semenovich Tsvett, 1872-1919) también conocido por su nombre latinizado, Tiselius - empleó por primera vez en 1906 el término "cromatografía" (que proviene del griego chroma y

graphein que significan a su vez respectivamente "color" y "escribir"), el la definió como:

Método en el cual los componentes de una mezcla son separados en una columna adsorbente dentro de un sistema fluyente.

Recientemente la I.U.P.A.C define la cromatografía de forma más amplia como: Método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil.

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película, etc.

Se utiliza el término general de lecho para definir las distintas formas en que puede encontrarse la fase estacionaria. Las separaciones cromatográficas se consiguen mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre la fase fija y la fase móvil. La separación entre dos sustancias empieza cuando una es retenida más fuertemente por la fase estacionaria que la otra, que tiende a desplazarse más rápidamente en la fase móvil. Las retenciones mencionadas pueden tener su origen en dos fenómenos de interacción que se dan entre las dos fases y que pueden ser:

1.-La adsorción, que es la retención de una especie química por parte de los puntos activos de la superficie de un sólido quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial.

2.- La absorción, que es la retención de una especie química por parte de una masa, y debido a la tendencia que esta tiene a formar mezcla con la primera, absorción pura, o a reaccionar químicamente con la misma, absorción con reacción química, considerando ambas como un fenómeno másico y no superficial.

3.11 ASPECTOS HISTÓRICOS:

Aunque procesos parecidos ocurren en la naturaleza cuando disoluciones pasan a través de arcilla, rocas, etc. la cromatografía como tal adquiere importancia cuando en 1850 el químico F.F.Runge, que trabajaba con tintas, descubrió que los cationes orgánicos se separaban por migración cuando se depositaba una disolución que los contenía sobre un material poroso, como papel.

En 1906 el botánico ruso Tswett utilizó la cromatografía en columna para separar extractos vegetales coloreados, y a este proceso le dio el nombre de cromatografía. Pero el mayor desarrollo se produce en 1930 con Lederer cuando consigue separar los colorantes de la yema de huevo. Posteriormente los químicos Khun, Kamer y Ruzucca desarrollan la

cromatografía en el campo de la química orgánica e inorgánica, y obtienen el premio Nóbel por sus trabajos en 1937, 1938, 1939 respectivamente.

A partir de 1940 los métodos cromatográficos adquieren extensión mundial de forma que en 1940 Tiselius divide los métodos cromatográficos en cromatografía por análisis frontal, desarrollo por elusión y desarrollo por desplazamiento, obtuvo el premio Nóbel por sus trabajos en 1948.

Al mismo tiempo la cromatografía se aplicaba en el campo de la bioquímica, y así Martín consigue separar algunos aminoácidos acetilados.

3.12 CLASIFICACIÓN:

La cromatografía se clasifica de la siguiente manera:

Cromatografía en papel, Cromatografía capa fina, Cromatografía en columna, Cromatografía de gases, Cromatografía líquida (HPLC)

3.13 FUNDAMENTO TEÓRICO CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA:

La Cromatografía, es una técnica de análisis químico utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas. Esta técnica depende del principio de adsorción selectiva. Por ejemplo, se separó los pigmentos de las plantas (clorofila) vertiendo extracto de hojas verdes en éter de petróleo sobre una columna de carbonato de calcio en polvo en el interior de una probeta. A medida que la solución va filtrándose por la columna, cada componente de la

mezcla precipita a diferente velocidad, quedando la columna marcada por bandas horizontales de colores, denominadas cromatogramas. Cada banda corresponde a un pigmento diferente. La cromatografía en capa fina, o más comúnmente TLC (thin layer chromatography, en inglés), técnica capaz de separar los componentes de una muestra entre dos fases.

Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente, un disolvente) y a una fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser papel o gel de sílice). Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación.

3.14 HISTORIA: ⁽¹⁷⁾

El botánico ruso Mikhail Tswett estableció las ventajas de la cromatografía y fue el primero en utilizar este término. Es recordado como el Padre de la Cromatografía. Ismailov y Scraiber utilizaron láminas de vidrio para colocar capas muy delgadas de alúmina y luego aplicaron extractos vegetales, dando así la primera forma de Cromatografía de Capa Fina. Egon Stahl (1956) dió el nombre de Cromatografía de Capa Fina. Estandarizó los procedimientos, equipos y adsorbentes dando un auge a la técnica simple, a bajo costo y eficiente.

3.15 PROCESO DE ADSORCIÓN: (17,19)

La muestra aplicada en la capa es adsorbida en la superficie del material por la acción de fuerzas electrostáticas (fuerzas de Van der Waals, puentes de Hidrógeno, efectos inductivos, etc.). Luego, cuando la capa es expuesta a un flujo por acción capilar, se inicia una competencia de enlaces entre los sitios activos del adsorbente y la sustancia con el solvente. Polaridad de los compuestos orgánicos en orden creciente:

Hidrocarburos < olefinas < fluor < cloro < nitro < aldehído

< Ester < alcohol < cetonas < aminas < ácidos < amidas

3.16 VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA: (19)

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa,) ya que el uso que precisa es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos.

3.17 ADSORBENTES: ⁽¹⁹⁾

Al realizar la elección del adsorbente se debe tener en cuenta el tamaño de las partículas del adsorbente, cuanto más finamente dividido esté mayor será su adhesión al soporte, aunque también se le puede añadir un adherente (yeso). Algunos de los adsorbentes más utilizados son:

- Celulosa
- Almidón
- Azucares
- Gel de sílice (silica gel)
- Óxido de aluminio (alúmina)
- Carbón activo (carbón en polvo)
- Kieselguhr

tres primeros se utilizan para extraer componentes poli funcionales de plantas y animales.

3.17.1 SILICA GEL:

El gel de sílice o ácido silícico es uno de los más utilizados, es débilmente ácido, su pH oscila entre 4-5. Con lo cual no se deberá utilizar con sustancias que se corrompan con los ácidos. Los geles de sílice normales suelen contener impurezas de hierro y/o aluminio, este factor también se debe tener

en cuenta respecto al uso de componentes. El tamaño del grano suele ser de 10 a 40 micras (μ) y el tamaño de poro varía de 20 a 150Å.

Generalmente lleva incorporado un agente aglomerante, yeso (sulfato de cálcico semihidratado), para proporcionar firmeza al adsorbente. También han sido incorporados dos indicadores del ultravioleta, juntos o por separados (amarillo y/o verde), en diversos tipos de gel de sílice.

Se trata de un adsorbente polar, pero puede ser tratado con hidrocarburos para neutralizar los grupos -OH, de forma que se haga apto para separar componentes lipófilos (esteroides, ácidos grasos, ceras, vitaminas liposolubles, etc.). A este proceso se le denomina cromatografía de fase reversa (silanizado).

3.17.2 ALÚMINA:

La alúmina u óxido de aluminio es un adsorbente ligeramente básico debido a que en el proceso de extracción de la alúmina a partir de la bauxita quedan algunas moléculas de hidróxido de aluminio adheridas a la alúmina, dándole a ésta un carácter básico. No consigue un desarrollo tan alto de la sustancia depositada como el gel de sílice.

La alúmina puede ser tratada químicamente para conseguir alúminas ácidas, básicas y neutras. Puede contener aglomerantes y/o indicadores ultravioletas. Es un adsorbente de carácter polar, de tal forma que retendrá con mayor avidez a los componentes polares.

3.18 PREPARACIÓN DE PLACAS: ⁽⁴⁾ Las placas empleadas comúnmente son de vidrio y de las dimensiones apropiadas al uso al que serán destinadas. Estas placas se pueden adquirir ya preparadas, es decir recubiertas con la capa de adsorbente (gel de sílice o alúmina) que se vaya a emplear o pueden prepararse en el laboratorio de la manera que se describe a continuación: Se requiere un dispositivo para extender sobre las placas una capa uniforme del material con el que se van a recubrir. Se prepara una suspensión del material de recubrimiento de acuerdo a las indicaciones del fabricante y utilizando el dispositivo indicado se distribuye esta suspensión sobre las placas, las cuales deben estar limpias y secas. El grosor de la capa varía de 0.25 – 0.30 mm. Las placas se dejan secar al aire y se calientan a 105° C antes de utilizarse. Deben conservarse protegidas de la humedad

3.19 APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS: ⁽¹⁹⁾

Los productos a examinar se disolverán, cuando sea posible, en un disolvente orgánico no polar que tenga un punto de ebullición lo suficientemente bajo para que se evapore después de la aplicación. Sin embargo a menudo se necesitan disolventes polares; la mezcla cloroformo: metanol (1:1) es efectiva. Frecuentemente se emplean disoluciones al 1%, de manera que al aplicar 2 μ l resulta en la carga 20 μ g de producto sólido. Muchos reactivos de revelado llegan a detectar 0.1 μ g de material; por esto con esta carga puede llegarse a observar un 5% de impurezas.

Existen una gran variedad de micro pipetas y micro jeringuillas para realizar el proceso de siembra de la muestra a analizar. También pueden usarse tubos capilares. El proceso de siembra se realiza tocando con la punta del capilar (micro pipeta, jeringuilla, etc.) sobre la placa preparada. Dejando una distancia al borde inferior de un centímetro aproximadamente. El punto de aplicación de la muestra se denomina toque.

Una vez colocado el toque se deja secar para evaporar el disolvente, de forma que en la placa solo quedará la muestra a analizar.

3.20 ELECCIÓN DEL ELUYENTE ⁽¹⁹⁾

La elección del eluyente dependerá lógicamente del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo.

Principales eluyentes en orden creciente de polaridad:

Eter de petróleo.

Eter de dietílico.

Ciclohexano.

Acetato de etilo.

Tetracloruro de Carbono.*

Piridina.

Benceno.*

Etanol.

Cloroformo.*

Metanol.

Diclorometano

Acido Acetico

(*Compuesto Cancerígenos)

En la elección del eluyente influyen varios factores:

- Costo.
- Pureza.
- No utilizar mezclas de eluyentes (reproducibilidad).
- No utilizar compuestos muy volátiles.
- Evitar que contengan trazas de metales (catalizadores).

La elección del eluyente se realiza de forma empírica. Hay que estudiar la polaridad del componente y probar con eluyentes cada vez menos polares.

a) Toque de la muestra sin aplicar ningún eluyente.

b) Aplicando un eluyente poco polar.

c) Aplicando un eluyente más polar.

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

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

3.21 APLICACIÓN DE LA MUESTRA ⁽¹⁹⁾

La muestra se aplica en la placa según el objetivo: Analítica ó Preparativa en:

- Banda

- Punto ó Mancha

3.22 DESARROLLO DE LA PLACA:

Es un proceso mediante el cual los metabolitos son transportados a través de la fase estacionaria por la fase móvil.

CÁMARAS PARA DESARROLLO

Existen dos tipos de cámaras:

- Normal
- Doble Compartimiento

DESARROLLO DE LA CROMATOGRAFÍA

El desarrollo de los cromatogramas en capa fina se realiza normalmente por el método ascendente, esto es, al permitir que un eluyente ascienda por una placa casi en vertical, por la acción de la capilaridad. La cromatografía se realiza en una cámara. Para conseguir la máxima saturación posible de la atmósfera de la cámara, las paredes se tapizan con papel impregnado del eluyente. A veces pueden obtenerse separaciones mejores sin poner papeles en las paredes, cosa que no debe olvidarse.

Generalmente el eluyente se introduce en la cámara una hora antes del desarrollo, para permitir la saturación de la atmósfera. El tiempo de desarrollo, por lo general, no llega a los 30 minutos. El tiempo de una cromatografía cualitativa suele ser de un par de minutos, mientras que el tiempo de una cromatografía preparativa puede llegar a un par de horas.

Las placas pueden desarrollarse durante un tiempo prefijado, o hasta que se alcance una línea dibujada a una distancia fija desde el origen. Esto se hace para estandarizar los valores de R_f . Frecuentemente esta distancia es de 10

cm.; parece ser la más conveniente para medir valores de R_f Después del desarrollo, las placas pueden secarse rápidamente con una corriente de aire caliente.

La mejor posición de desarrollo para un componente es el punto medio entre el origen y el frente del eluyente, ya que permite separar las impurezas que se desplazan con mayor y menor velocidad. El frente del eluyente nunca debe llegar a tocar el borde de la placa.

Si la placa se estropea por acción del aire o de la luz, se secará en una cámara que contenga un gas inerte o aislada de la luz.

LOCALIZACIÓN DE SUSTANCIAS ⁽¹⁹⁾ : Si los compuestos separados no son coloreados es necesario revelar la posición de dichos compuestos, para ello existen dos tipos de métodos:

- 1) Métodos químicos.
- 2) Métodos físicos.

1) MÉTODOS QUÍMICOS

Consisten en realizar una reacción química entre un reactivo revelador y los componentes separados, para ello se pulveriza la placa con los reactivos reveladores con la ayuda de un pulverizador de vidrio y una pera de goma, o mediante un dispositivo que proporcione aire comprimido.

Es preferible pulverizar con las placas en posición horizontal. Si el reactivo revelador es peligroso o muy corrosivo, la pulverización deberá realizarse en una vitrina de gases bien ventilada.

La pulverización se realizará poco a poco. En cromatografía en capa fina no puede realizarse el bañado del cromatograma (en cromatografía en papel sí).

Generalmente se utiliza como reactivo revelador yodo, el cual forma complejos coloreados con los componentes orgánicos (con tonos amarillo-marrón), pero las manchas desaparecen con el tiempo con lo que es conveniente señalar las manchas aparecidas.

Otro reactivo revelador bastante utilizado es el ácido sulfúrico, que reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas negras.

El tamaño de las manchas no está relacionado con la cantidad de componente separado.

Además de los reveladores generales, existen otros específicos como:

- 2,4 - dinitrofenilhidracina (para aldehídos y cetonas).
- Verde de bromocresol (para ácidos carboxílicos).
- Paradimetil aminobenzaldehído (para aminas).
- Ninhidrina (para aminoácidos).

2) MÉTODOS FÍSICOS.

El más común consiste en añadir al adsorbente un indicador fluorescente. De tal forma que al colocar la placa bajo una lámpara ultravioleta, y dependiendo del indicador y de la longitud de onda, aparecen manchas fluorescentes en las zonas en las que hay componentes, o en otros casos aparece toda la placa fluorescente excepto donde hay componentes.

Algunos compuestos poseen cierta fluorescencia (aunque no es normal) con lo que pueden ser detectados directamente en una lámpara de ultravioleta.

CONSTANTES R_F Y R_X ⁽¹⁹⁾ La constante R_f (Ratio of Front) es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente. Se define como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto desde el origen}}{\text{Distancia recorrida por el frente de la fase móvil}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el centro de la mancha, los cálculos se simplifican si el denominador es 10. Para que los R_f sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (Espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de R_f que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un R_f entre 0.65 y 0.7.

EVALUACIÓN DE UN CROMATOGRAMA DE CAPA FINA

1) Análisis Cualitativo

- Medida de Rf

- Comparación Visual de Color/Intensidad

- Propiedades UV/IR/MS/NMR

2) Análisis Cuantitativo:

a) Semi-cuantitativo: Comparación visual del diámetro y la intensidad del color

de la mancha contra una serie de manchas patrones de concentración conocida

b) Cuantitativa

- Indirecta

- Directa

c) Densitometría

d) Medida de Transmisión. Medida de luz transmitida a través de la

medida de Emisión. Medida de luz reflejada desde la sustancia

e) Espectrofotometría

f) Fluorescencia

3.23 ETAPAS DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Primera etapa: Aplicación de las muestras a analizar.

La primera precaución que hay que tener en el manejo de la placa es la de procurar no tocar con los dedos la capa de celulosa. La placa fina se coge siempre por los bordes de la misma.



FIG. Nº 9 Preparación de la placa cromatográfica

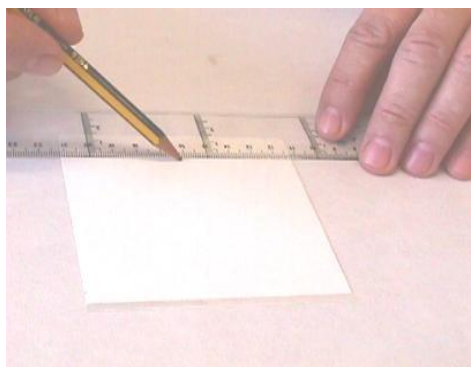


FIG. Nº10 Marcado de la placa cromatográfica, previo a la inyección

Se coloca la placa encima de la mesa, y con un lápiz se traza una línea muy dedil a unos 1,5 cm. del borde inferior de la placa, procurando dar lo mínimo posible la capa de celulosa.

En la línea se señalan débilmente cinco puntos, distribuidos equitativamente a lo ancho de la placa.

En cada punto de ellos se aplica cada uno de las muestras problema. La aplicación se realiza mediante la micro pipeta de 10 ml.

La segunda precaución a considerar es la de no contaminar las disoluciones de la muestra problema. Para ello, se utiliza una punta de pipeta amarilla para cada uno de las soluciones a aplicar. Se coloca la punta correspondiente en la micro pipeta, se introduce la punta en el tubo de muestra y se succiona adecuadamente, siguiendo las normas de manejo de las micro pipetas.

Se aplica en la placa una gota de la muestra, procurando que se extienda lo menos posible y no dañe la capa. Se seca a continuación con el secador de aire. Se aplica una segunda gota y se vuelve a secar, las gotas deben estar completamente secas para evitar el daño a la placa; además se debe evitar el contacto de la pipeta con la placa al momento de aplicar la muestra esto propiciaría daño al recorrido del solvente.

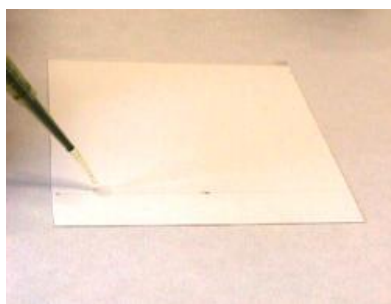


FIG N° 11 Inyección de la muestra

Una vez realizada la aplicación de cada muestra es importante que se deje cada punta de pipeta amarilla en el tubo correspondiente y que se anote en el cuaderno de laboratorio las posiciones en las que se ha colocado cada muestra problema.

Segunda etapa: Elusión de las muestras.

La cromatografía se realiza en la cubeta o cámara de desarrollo. La cubeta contiene un volumen de fase móvil, cuya altura de líquido debe de estar siempre por debajo de la línea de aplicación de las muestras.

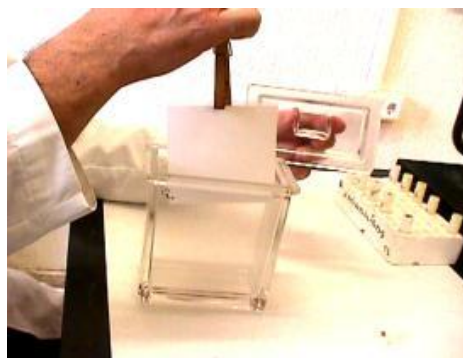


FIG N° 12: Colocación de la placa dentro de la cámara cromatográfica



FIG N° 13: Ascenso del solvente sobre la superficie de la placa

La técnica de elución que se va a utilizar para la realización de la cromatografía es la ascendente, puesto que la fase móvil asciende por capilaridad por los poros e intersticios de la celulosa

La placa que contiene las muestras se introduce en la cubeta. Se coloca la tapa de la cubeta y se espera que la fase móvil ascienda por la capa hasta que alcance una altura de hasta unos 2-3 cm. del extremo opuesto a la parte sumergida. Una vez realizada la elución, se abre la tapa de la cubeta y se saca la placa.

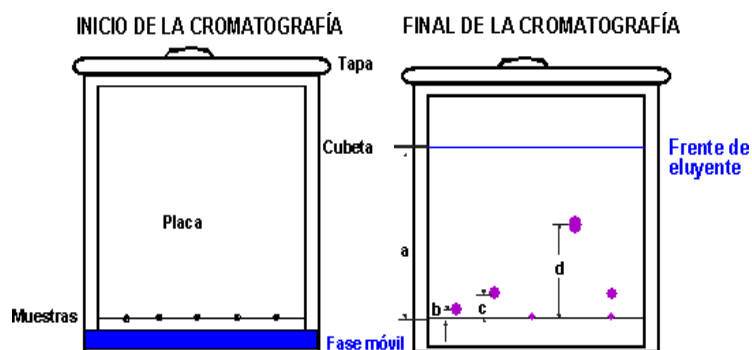


FIG N° 14: Ascenso de la fase móvil por el adsorbente

Tercera etapa: Secado y visualización de alcaloides

Inmediatamente que se ha sacado la placa, con el lápiz se marca en un borde el nivel alcanzado. Se introduce en la estufa durante unos 5 min. para que se seque. A continuación, mediante unas pinzas de madera se sumerge en la cubeta que contiene la solución reveladora. Una vez que toda la placa se ha impregnado, se saca inmediatamente de la cubeta, dejando que escurra el exceso de solución, y se vuelve a introducir en la estufa durante 3 min. para que se realice la reacción de color.

Una vez realizada la cromatografía, hay que identificar el compuesto, medimos con una regla la distancia recorrida por la fase móvil y de igual forma la distancia recorrida por la mancha una vez teniendo estos datos se determina el factor reparto (R_f) que no es mas que la relación de la distancia recorrida por la mancha sobre la recorrida por el solvente.



FIG N° 15: Secado de la placa cromatografica

Capitulo IV
DISEÑO METODOLOGICO

4. 0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO:

Retrospectivo: Puesto que parte de algo ya existente

Prospectivo: Puesto que a partir de lo existente, se propone lo que se investiga para ser utilizado en el futuro.

Experimental: Porque parte de la investigación se llevó a cabo en los laboratorios.

4.2 METODOLOGIA:

La metodología se desarrolló en tres etapas:

4.2.1 Investigación Bibliográfica

4.2.2 Investigación de campo

4.2.3 Investigación de Laboratorio

4.2.1 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA:

La investigación bibliográfica se realizó en:

- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca del Jardín Botánico del Plan de la Laguna.
- Internet

4.2.2 INVESTIGACION DE CAMPO

Se llevó a cabo, partiendo de la visita a diferentes instituciones (como el plan de la Laguna) en las cuales se recogió información sobre ***Cyphomandra betacea*** (tomate de palo); igualmente comprendió la recolección del fruto de dicha planta para lo cual se visitó el cantón Buenos Aires y Palo de Campana del volcán de Santa Ana, lugares de mayor producción de la planta. También comprende la clasificación taxonómica y la identificación de la especie vegetal ***Cyphomandra betacea***, realizada por la Bióloga docente de Licenciatura en Biología de la Universidad de El Salvador, MSc. Nohemy Ventura y la posterior entrega de esta clasificación a la biblioteca del Jardín Botánico del Plan de la Laguna, donde la especie también es desconocida.

UNIVERSO: Plantas de la familia de las Solanáceas.

MUESTRA: Fruto maduro de ***Cyphomandra betacea*** (Tomate de Palo).

PERIODO DE RECOLECCION: Abril a Junio de 2007

Para ver la ubicación del sitio de recolección (ver anexo N° 5 figura N° 30)

4.2.3 INVESTIGACION DE LABORATORIO ⁽³⁾

Tratamiento previo al análisis de la muestra:

Los frutos maduros de la planta ***Cyphomandra betacea*** (tomate de palo), se sometieron a un proceso de limpieza, con una solución de hipoclorito de sodio al 10%, con el propósito de eliminar cualquier contaminante que pudiera interferir con el análisis. Posteriormente el fruto se sometió a secado,

para lo cual se cortó en rodajas con un cuchillo de acero inoxidable, las rodajas se prensaron y se expusieron al sol durante dos semanas.

Para ver fruto seco (ver anexo N° 5 figura N° 16)

4.2.3.1 Maceración:

Se realizaron dos maceraciones de acuerdo a la solubilidad de los metabolitos que se deseaban analizar del fruto *Cyphomandra betacea* (tomate de palo), una maceración acuosa para los metabolitos Cardiotónicos y una maceración alcohólica para saponinas, flavonoides, taninos, alcaloides esteroidales y sesquiterpenlactonas

4.2.3.1.1 Maceración Acuosa:

En un balón volumétrico de fondo plano de 500 mL se coloca 50 g de fruto seco y se agregan 200 mL de agua destilada, se tapa con un corcho y se deja macerar por tres días en la oscuridad. La maceración acuosa la realizamos para obtener los Glicósidos Cardiotónicos

4.2.3.1.2 Maceración Alcohólica:

Se pesaron 150 g de fruto seco y se colocaron en un balón volumétrico de fondo plano de 1000 mL, se agregó 500 mL de alcohol etílico de 90° y se tapó con un corcho, dejando el balón en la oscuridad por 7 días. En esta maceración obtuvimos el extracto en el cual estarían presentes: Glicósidos saponinicos, Taninos, Flavonoides y Alcaloides.

Para ver maceración (ver anexo N° 5 figura N° 17)

4.2.4 Reflujo:

Luego se procede al reflujo, para obtener la máxima concentración de los metabolitos a estudiar: para lo cual montamos dos aparatos uno para maceración alcohólica y otro para la maceración acuosa.

Para ver aparato de reflujo (ver anexo N° 5 figura N° 18.)

4.2.4.1 Reflujo Acuoso:

Se somete a reflujo la maceración acuosa por 2 horas a 100°C se filtra y se concentra el extracto, el cual está listo para efectuar las pruebas de caracterización en tubo de ensayo y en placa cromatográfica para glicósidos cardiotónicos.

4.2.4.2 Reflujo Alcohólico:

Después de siete días se realiza el reflujo alcohólico, manteniendo una temperatura de 80°C, y luego de 2 horas se filtra el extracto y se concentra, luego se procede a dividirlo en seis partes iguales, para efectuar las pruebas de caracterización en tubo de ensayo y en placa cromatográfica, de Saponinas, Taninos, Flavonoides, Alcaloides, Alcaloides esteroideos y Sesquiterpenlactonas.

4.2.5 Pruebas Químicas:

4.2.5.1 Pruebas colorimétricas en tubo de ensayo:

- Identificación de glicósidos saponinicos:

Prueba de Liebermann – Burchard: A 10 mL del extracto alcohólico concentrado, agregar 5 mL de H₂SO₄ diluido. Hervir cuidadosamente por 10 minutos. Enfriar y colocar en un embudo de separación, adicionar 20 mL de

cloroformo y agitar. Separar el extracto clorofórmico y concentrar hasta 2 mL. Colocar en un tubo de ensayo y añadir 1 mL de Anhídrido Acético y 6 gotas de H_2SO_4 concentrado por las paredes del tubo.

Prueba de Salkowski:

Tomar 3 mL de extracto alcohólico concentrado y agregar 10 gotas de H_2SO_4 concentrado, gota a gota por las paredes del tubo.

NOTA: para realizar esta prueba se necesita un baño de hielo.

Prueba de la Espuma:

En un tubo de ensayo colocar 1 g de fruto pulverizado y 5 mL de agua agitar por 30 segundos y reposar. Si la espuma mide 3 cm., arriba de la superficie del líquido. Indica posible presencia de saponinas.

- Identificación de flavonoides:

Prueba de Shinoda:

Al concentrado del extracto alcohólico, agregar una laminilla de magnesio metálico, y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado. Observar la coloración

Prueba de color con álcali:

Pesar 5 g de fruto fresco, colocarlo en un beaker con 50 mL de agua destilada y calentar en baño de vapor por 10 minutos, filtre y concentre hasta 10 mL. Colocar 5 mL de este extracto concentrado y añadir 1 mL de NaOH al 10%.

- Identificación de Glicósidos Cardiotónicos:

Prueba de Legal: Llevar a sequedad 1 o 2 mL de extracto acuoso, y agregar 2 – 3 gotas de piridina, 1 -2 gotas de nitrato de sodio 0.5% y 1-3 gotas

de Hidróxido de sodio 2N. Una coloración roja indica que la prueba es positiva.

Prueba de Keller Killiani:

Colocar 2 mL de extracto acuoso en un tubo de ensayo y evaporar a sequedad en baño maría, disolver el residuo en 2 mL del reactivo de Keller (Acido acético glacial, conteniendo trazas de tricloruro de hierro) y añadir cuidadosamente el reactivo de Killiani.

Prueba de Kedde:

Colocar 2 mL de extracto acuoso en un tubo de ensayo y evaporar en baño maría. Disolver el residuo en 2 mL de alcohol y agregar 1 mL de una solución alcohólica de NaOH diluido y 2 mL de acido 3, 5-dinitrobenzoico en etanol al 2%.

Prueba de Liebermann – Burchard:

A 2 mL de extracto acuoso, agregar 1 mL de cloroformo y agitar suavemente, añadir 1 mL de anhídrido acético y 3 gotas de H_2SO_4 concentrado, mezclar y observar el color.

- **Identificación de Taninos:** Prueba de Tricloruro de hierro: A 2 mL de extracto alcohólico, agregar 5 gotas de solución de tricloruro de hierro observar coloración.

Prueba de sub acetato de plomo:

A 2 mL de extracto alcohólico, agregar 1 mL de solución de subacetato de plomo, observar la evidencia de la reacción.

Prueba de la gelatina:

A 2 mL de extracto alcohólico, agregar 2 mL de solución de gelatina, observar la formación de un precipitado.

- Identificación de Sesquiterpenlactonas:

Para estas pruebas se realiza una extracción con cloroformo para separar las sesquiterpenlactonas presentes en el extracto alcohólico concentrado.

Prueba de Legal:

A 1 o 2 mL de extracto clorofórmico, llevarla a sequedad, agregar 5 gotas de piridina, 5 gotas de solución de nitro prusiato de sodio 0.5% y 5 gotas de NaOH 2N.

Prueba de Baljet:

Se añade 3 - 4 gotas del reactivo formado por mezcla de volúmenes iguales de solución A (1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol) y solución B (10g de NaOH en 100 mL) a 5 mL de extracto clorofórmico. Se espera una coloración anaranjada o roja oscura.

- Identificación de Alcaloides y Alcaloides esteroidales:

Prueba de Dragendorff:

Agregar al extracto alcohólico 3 gotas de ácido clorhídrico 2 M, añadir 2 – 3 mL del reactivo de Dragendorff y diluir a 10 mL con agua.

Prueba de Mandelin:

Colocar 3 – 4 gotas de extracto alcohólico en una cápsula de porcelana y añadir una gota del reactivo de mandelin. Observar la coloración.

Prueba de Marquis: Colocar 3- 4 gotas del extracto alcohólico en una cápsula de porcelana y añadir 1 gota del reactivo de marquis. Observar el color.

Prueba de Liebermann – Burchard:

Para esta prueba se acidifico parte del extracto alcohólico con el propósito de formar sales del alcaloide para separar los alcaloides de los otros metabolitos, para evitar falsos positivos ya que también la dan las saponinas, posteriormente se alcaliniza para solubilizar los alcaloides presentes.

A 10 mL del extracto alcohólico alcalinizado agregar 5 mL de H₂SO₄ diluido. Hervir cuidadosamente por 10 minutos. Enfriar y colocar en un embudo de separación, adicionar 20 mL de cloroformo y agitar. Separar el extracto clorofórmico y concentrar hasta 2 mL. Colocar en un tubo de ensayo y añadir 1 mL de Anhídrido Acético y 6 gotas de H₂SO₄ concentrado por las paredes del tubo.

Para ver preparación de reactivos (ver anexo N° 4)

4.2.5.2 Pruebas colorimetricas en placa

Identificación de glicósidos saponinicos utilizando vainillina como revelador:

Muestra: Extracto alcohólico concentrado de *Cyphomandra betacea*

Fase Móvil: Cloroformo- metanol – agua (26: 20: 4)

Revelador: vainillina (1:20 p/v)

Procedimiento:

Medir 2 cm. de altura de la base de la placa y 2 cm. abajo del borde superior, procurando no dañar la sílice.

Inyectar una alícuota de la muestra obtenida por reflujo y ya concentrado, en la base de la placa, a la altura señalada. Aplicar de manera continua,

esperando que la aplicación anterior este completamente seca antes de inyectar de nuevo.

Colocar la fase móvil cloroformo – metanol- agua (26:20:4) dentro de la cámara cromatográfica y esperar la saturación de la cámara cromatográfica.

Introducir la placa en posición vertical, dentro de la cámara cromatográfica, tapar y dejar correr.

Cuando el frente del solvente ha llegado hasta la marca del borde superior de la placa, sacarla y marcar con un lápiz la distancia recorrida.

Secar la placa y proceder a esprayar la placa con el revelador Vainillina en H_2SO_4 concentrado.

Identificación de flavonoides, utilizando amoniaco como revelador

Muestra: extracto alcohólico concentrado de *Cyphomandra betacea*

Fase móvil: acetato de etilo – ácido fórmico – ácido acético glacial – agua (10:11:1:27)

Revelador: amoniaco

Procedimiento:

Medir 2 cm. de altura de la base de la placa y 2 cm. abajo del borde superior, procurando no dañar la sílice.

Inyectar una alícuota de la muestra obtenida por reflujo ya concentrado, en la base de la placa, a la altura señalada. Aplicar de manera continua, esperando que la aplicación anterior este completamente seca antes de inyectar de nuevo.

Colocar la fase móvil acetato de etilo – ácido fórmico – ácido acético glacial – agua (10: 11: 1:27) dentro de la cámara cromatográfica y esperar la saturación de la cámara cromatográfica.

Introducir la placa en posición vertical, dentro de la cámara cromatográfica, tapar y dejar correr.

Cuando el frente del solvente ha llegado hasta la marca del borde superior de la placa, sacarla y marcar con un lápiz la distancia recorrida. Secar la placa y proceder a esprayar la placa con amoníaco.

Identificación de Glicósidos Cardiotónicos, utilizando el reactivo de Kedde como revelador:

Muestra: Extracto acuoso concentrado de *Cyphomandra betacea*

Fase móvil: Acetato de etilo – metanol – agua (25:5:4)

Revelador: Reactivo de Kedde.

Procedimiento:

Medir 2 cm. de altura de la base de la placa y 2 cm. Abajo del borde superior.

Inyectar una alícuota de la muestra obtenida por reflujo ya concentrado, en la base de la placa, a la altura señalada. Aplicar de manera continua, esperando que la aplicación anterior este completamente seca antes de inyectar de nuevo. Colocar la fase móvil acetato de etilo – metanol – agua (25:5:4) dentro de la cámara cromatográfica y esperar la saturación de la cámara cromatográfica.

Introducir la placa en posición vertical, dentro de la cámara cromatográfica, tapar, dejar correr

Cuando el frente del solvente ha llegado hasta la marca del borde superior de la placa, sacarla y marcar con un lápiz la distancia recorrida. Secar la placa y proceder a esprayar la placa con el reactivo de Kedde.

Identificación de Sesquiterpenlactonas, utilizando ácido Sulfúrico concentrado:

Muestra: Extracto clorofórmico de *Cyphomandra betacea*

Fase Móvil: Cloroformo – Acetona (40:10)

Revelador: Ácido Sulfúrico concentrado. (H₂SO₄)

Procedimiento:

Medir 2 cm. de altura de la base de la placa y 2 cm. abajo del borde superior.

Inyectar una alícuota de la muestra obtenida por reflujo ya concentrado, en la base de la placa, a la altura señalada. Aplicar de manera continua, esperando que la aplicación anterior este completamente seca antes de inyectar de nuevo.

Colocar la fase móvil cloroformo – acetona (40:10) dentro de la cámara cromatográfica y esperar la saturación de la cámara cromatográfica.

Introducir la placa en posición vertical, dentro de la cámara cromatográfica, tapar, dejar correr.

Cuando el frente del solvente ha llegado hasta la marca del borde superior de la placa, sacarla y marcar con un lápiz la distancia recorrida. Secar la

placa y proceder a esprayar la placa con el ácido sulfúrico, si es preciso aplicar calor a la placa.

Identificación de Alcaloides esteroidales, utilizando el reactivo de Liebermann como revelador. (2)

Muestra: extracto alcohólico concentrado de *Cyphomandra betacea*

Fase móvil: Benceno – Etanol (45:5)

Revelador: Reactivo de Liebermann

Procedimiento

Medir 2 cm. de altura de la base de la placa y 2cm. abajo del borde superior
Inyectar una alícuota de la muestra obtenida por reflujo ya concentrado, en la base de la placa, a la altura señalada. Aplicar de manera continua, esperando que la aplicación anterior este completamente seca antes de inyectar de nuevo.

Colocar la fase móvil dentro de la cámara cromatográfica y esperar la saturación de la cámara cromatográfica.

Introducir la placa en posición vertical, dentro de la cámara cromatográfica, tapar y dejar correr

Cuando el frente del solvente ha llegado hasta la marca del borde superior de la placa, sacarla y marcar con un lápiz la distancia recorrida. Secar la placa y proceder a esprayar la placa con el reactivo de Liebermann.

Capitulo V

RESULTADOS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

La especie vegetal ***Cyphomandra betacea***, (tomate de palo) pertenece a la familia de las solanáceas, arbolito de 3 a 4 metros de altura con tronco corto frágil, corteza grisácea, follaje perenne y presenta fruto en baya, de forma ovoide, cuya longitud oscila entre 4 – 6 cm. Su piel es lisa y de color anaranjado en la madurez, aunque también, puede ser rojo o morado. Posee además pulpa bastante jugosa, de sabor levemente ácido, con muchas semillas. Posee pedúnculo largo en el cual también sobresale el cáliz de la flor.

La identificación y clasificación botánica de ***Cyphomandra betacea*** (tomate de palo) fue realizada por la Bióloga MSc. Nohemy Ventura Centeno directora de la escuela de biología de la Universidad de El Salvador, donde hizo constar la clasificación, identificación y taxonomía de la especie en estudio (ver anexo N° 1 y 2).

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Genero: *Cyphomandra*

Especie: *Cyphomandra betacea*

Cuadro N° 1. Tiempo de maceración y apariencia de los extractos.

Extracto	Tiempo de Maceración	Color	Apariencia
Acuoso	3 días	Café - naranja	Oscura
Alcohólico	7 días	Café	Traslucida

Al realizar la extracción por maceración, se obtienen dos extractos, las diferencias entre ellos son notorias, empezando por el tiempo de maceración el cual, fue menor para la maceración acuosa, esto se realizó con el propósito de evitar la proliferación de hongos en el extracto.

Posteriormente a la extracción por maceración se utilizó la técnica de reflujo, para los extractos macerados acuoso y alcohólico, con el fin de obtener mayor concentración de los metabolitos que estén presentes en el fruto después del proceso de macerado, luego del proceso de reflujo se procedió a concentrar los extractos obtenidos por medio de evaporización, una vez obtenidos los extractos concentrados se procedió a la realización de las pruebas de identificación tanto en tubo de ensayo como en placa cromatográfica. Para ver el proceso de extracción (ver anexo N° 5 de la figura N° 16 a la N° 18)

Cuadro Nº 2. Pruebas de caracterización en tubo de ensayo para los metabolitos secundarios en extracto alcohólico

Metabolito	Prueba	Coloración	Resultado
Glicósidos Saponinicos	Salkowski	Anillo oscuro en el fondo del tubo	Positivo
	Liebermann-Burchard	Anillo violeta en el fondo del tubo	Positivo
	Espuma	Espuma Ligera	Positivo
Flavonoides	Shinoda	Oscurecimiento del extracto	Positivo
	Color con álcali	Amarilla	Positivo
Taninos	Tricloruro de hierro	Verde	Positivo
	Subacetato de plomo	Precipitado gris	Positivo
	Gelatina al 10%	Precipitado gris	Positivo
Sesquiterpenlactonas	Legal	Amarillo	Positivo
	Baljet	Rojo-naranja oscuro	Positivo
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado naranja	Positivo
	Marquis	Café	Positivo
	Mandelin	Café	Positivo
Alcaloides Esteroidales	Liebermann Burchard	Anillo violeta	Positivo

Cuadro N° 3. Prueba de caracterización en tubo de ensayo para los metabolitos secundarios en extracto acuoso.

Metabolito	Prueba	Coloración	Resultado
Glicósidos Cardiotónicos	Legal	No hay cambio	Negativo
	Keller Killiani	No hay cambio	Negativo
	Kedde	No hay cambio	Negativo
	Liebermann Burchard	No hay cambio	Negativo

La presencia de un anillo oscuro en la prueba de Salkowski, la formación de un anillo violeta en la prueba de Liebermann – Burchard y la formación de una espuma ligera infieren la presencia de saponinas del tipo esteroidal:

La presencia de flavonoides se confirma ya que la prueba de Shinoda y la prueba de color con álcali, son pruebas específicas para flavonoides, en la primera prueba, hay un cambio de color del extracto, a café oscuro, dando un resultado positivo, ya que todos los flavonoides con el núcleo benzopirona, (flavonas, flavonoles flavononas) reaccionan, luego esto se confirma con la prueba de álcali, la cual puede dar diferentes coloraciones que dependen del tipo de flavonoides que se encuentren presentes, en este caso, el color que se evidenció fue amarillo, por lo tanto podemos decir que tenemos la presencia de flavonas y flavonoles.

Para ver resultados de pruebas para flavonoides (anexo N° 5 figura N° 20.)

La presencia de taninos en el fruto *Cyphomandra betacea* (tomate de palo) también es notoria, podemos decir entonces que tenemos presentes taninos hidrolizables, en los cuales su grupo funcional es un fenol; debido a esto presenta una coloración verde frente al tricloruro de hierro. También se observa la formación de precipitados con gelatina y sub acetato de plomo, lo cual confirma la presencia de taninos.

Para ver resultados de pruebas para taninos (ver anexo N° 5 figura N° 21)

La presencia de sesquiterpenlactonas se comprobó mediante la realización de la prueba de Legal, la cual nos ayuda a identificar lactonas insaturadas y también por la prueba de Baljet, en la cual se observa un cambio de color de la solución, dando un resultado positivo para dichos metabolitos.

Para ver resultados de pruebas para sesquiterpenlactonas (ver anexo N° 5 figura N° 22.)

También se realizaron pruebas para alcaloides, las generales para identificarlos, como la prueba de Dragendorff en la cual se obtiene la formación de un precipitado de color naranja, el cual nos indica la formación de sales de las bases de los alcaloides, como sabemos, los alcaloides son compuestos que poseen en su estructura nitrógeno, dicho nitrógeno podría ser primario o secundario. Los nitrógenos terciarios no reaccionan con el reactivo de Dragendorff. Posiblemente este nitrógeno sea heterocíclico.

El reactivo de Mandelin, nos identifica alcaloides que contienen en su estructura base oxígeno, provocando un cambio de color al mezclar la muestra con el reactivo.

El reactivo de Liebermann Burchard es específico para alcaloides esteroidales, recordemos que los alcaloides esteroidales poseen como estructura base al ciclo pentano perhidrofenantreno, el cual reacciona formando un anillo violeta.

Para ver resultados de pruebas para alcaloides (ver anexo N° 5 figuras N° 23, N° 24 y N° 25.)

Ausencia total de glicósidos cardiotónicos en el extracto acuoso, debido a que todas las pruebas dieron resultados negativos, no se evidenció algún cambio de color o formación de precipitado.

Cuadro N° 4: Identificación en placa de los metabolitos secundarios de

Cyphomandra betacea (tomate de palo) en extracto
alcohólico y acuoso

Muestra	Metabolito	Revelador	Fase móvil	Coloración de manchas	Distancia recorrida por el solvente (en cm.)	Distancia recorrida por la muestra (en cm.)	Valor de Rf experimental
2 µl de extracto alcohólico	Saponinas	Vainillina + Ácido sulfúrico	Cloroformo Metanol Agua (26:20:4)	Azul	15.0	9.9	0.66
	Flavonoides	Amoniaco	Acetato de etilo Ácido fórmico Ácido acético Agua (10:11:1:27)	Café	15.0	9.0	0.6
	Alcaloides esteroideos	Reactivo de Liebermann	Benceno Etanol (45:5)	Violeta	15.0	11.7	0.78
	Sesquiterpen-lactonas	Ácido sulfúrico concentrado	Cloroformo Acetona (40:10)	Gris	14.8	13.1	0.94
2 µl del extracto acuoso	Glicósidos Cardiotónicos	Reactivo de Kedde	Acetato de Etilo Metanol Agua (41:5:4)	No se observan	-----	-----	-----

-----: No se observa resultado.

La identificación de los diferentes metabolitos secundarios se realizó por medio de la cromatografía de capa fina, la cual nos permite además de separar, identificar los compuestos de interés del extracto alcohólico crudo. Basado en la solubilidad y en la polaridad de los solventes y en los principios de retención (por parte de la fase estacionaria) y al efecto de elusión (llevado a cabo por el solvente), se pudo desarrollar el cromatograma

permitiendo así la identificación de los metabolitos, para poder tener una referencia de la ubicación de cada una de las manchas obtenidas se utilizó el aparato de luz ultravioleta una vez ubicadas las manchas se dibujaron en papel por si se dañaban las placas por el uso de los reveladores drásticos.

Para ver el desarrollo del cromatograma (ver anexo N° 5 figura N°26.)

Luego por la acción de los reactivos reveladores se lograron observar las manchas coloreadas, así se tiene que para la identificación de glicósidos saponinicos utilizamos el revelador vainillina en acido sulfúrico (1:20) y la fase móvil cloroformo – metanol - agua (26:20:4) en la cual se apreció una mancha de color azul.

Para ver resultado (ver anexo N° 5 figura 27.)

Para la identificación de flavonoides se empleó amoniaco, como revelador y acetato de etilo – acido fórmico – ácido acético glacial – agua (10: 11: 1:27) como fase móvil, permitiendo apreciar una mancha de color amarillo.

Para ver resultado (ver anexo N° 5 figura N° 28.)

Para la identificación de Sesquiterpenlactonas se empleó Acido Sulfúrico concentrado como revelador y como fase móvil se utilizó cloroformo – acetona, (40:10) observándose manchas grises.

Para alcaloides esteroidales se utilizó el reactivo de Liebermann Burchard como revelador y como fase móvil se utilizó Benceno - etanol (45:5) pudiendo apreciar una mancha de color violeta.

Para ver resultado (ver anexo N° 5 figura N°.29)

Luego de haber obtenido las manchas, se midió la distancia recorrida por la mancha y la distancia recorrida por el solvente, para poder determinar los R_f . Los R_f presentados son experimentales, ya que no contamos con patrones de comparación.

Capitulo VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La identificación taxonómica realizada por la profesional MSc.Nohemy Ventura fue fundamental, ya que no se contaba con antecedentes que identificaran anteriormente esta especie.
2. La especie presenta : Glicósidos saponinicos, Flavonoides, Taninos, Sesquiterpenlactonas y Alcaloides Esteroidales lo cual fue confirmado por las reacciones químicas de cada uno de ellos.
3. No existe presencia de Glicósidos Cardiotónicos en el extracto acuoso de la especie vegetal ***Cyphomandra betacea***, (tomate de palo) ya que todas las pruebas realizadas tanto en tubo de ensayo como en cromatografía de capa fina resultaron negativas.
4. Se confirma la presencia de alcaloides esteroidales en el extracto alcohólico por medio de la prueba con el reactivo de Liebermann Burchard , el cual reacciona con el ciclopentanoperhidrofenantreno formando un anillo de color violeta
5. En la cromatografía de capa fina, la fase móvil es muy importante para lograr la separación de los metabolitos.

Capitulo VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. A la Universidad de El Salvador gestionar la adquisición de nuevos equipos como el espectrofotómetro de masas para realizar estudios más profundos a la especie vegetal ***Cyphomandra betacea*** (tomate de palo) y a otras especies no estudiadas.
2. Que la Facultad de Química y Farmacia, a través del área de farmacognosia desarrolle proyectos de investigación en pro de descubrir nuevos principios activos de interés farmacéutico.
3. Realizar estudios de toxicidad al fruto de ***Cyphomandra betacea*** (tomate de palo), debido a que los resultados en la determinación de alcaloides fueron positivos.
4. Separar cada metabolito secundario presente en el fruto de ***Cyphomandra betacea*** (tomate de palo) por Cromatografía en columna para utilizarlo como estándar de trabajo.
5. Prolongar el tiempo de maceración alcohólica para evitar el empleo de calor ya que puede haber una posible degradación de los activos.
6. Realizar pruebas de extracción con diferentes mezclas de solventes de acuerdo a su polaridad para obtener un mayor rendimiento de los metabolitos

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bruneton J. 1991 Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia, Editorial Acrivia S.A. España p.2531-2948
- 2) Domínguez X. 1973 Métodos de Investigación Fitoquímica. 1º edición. México. Editorial Limusa
- 3) Facultad de Química y Farmacia. 2004. Manual de prácticas de laboratorio de la cátedra de Farmacognosia.
- 4) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7º edición, tomo I. Mexico 2000.
- 5) Moffat A. Osselton D. , Widdop B. 2004. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and post mortem material. Third edition volumen 1 y 2
- 6) The United States Pharmacopeial Convention, Inc. The United States Pharmacopeia. Twenty-seventh Revision. USA. 2004.
- 7) Trease y Evans. 1991. Farmacognosia. 13º edición. México. Mc Graw Hill interamericana, parte 6 página 692.

- 8)** Sánchez I. La agricultura andina, cultivos andinos (en línea) Cajamarca Perú. Universidad Nacional de Cajamarca. Consultado 29 agosto 2007. Disponible en: Cultivos Andinos FAO. www.rlc.fao.org.
- 9)** Rizzo P. 2001, Nuevos productos exportables: tomate de árbol (en línea),.Ecuador. Servicio de información Agropecuaria. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Consultado 20 de agosto 2007 .
- 10)** Reyes R. (Instituto de Ecología, Xalapa, México) y Sanabria O. (Universidad del Cauca, Popayán, Colombia).1993. Etnobotánica (En línea). Consultado 20 agosto 2007. Disponible en: www.ibiologia.unam.mx.
- 11)** <http://es.wikipedia.org/wiki/flavonoide>.
- 12)**http://mail.fq.edu.uy/~planta/Cursos/material/alcaloides%202005_fyb.pdf
- 13)** <http://www.ibiologia.unam.mx/jardin/gela/page13.html>

14) [www. Ergonomista. com. / fitoterapia/taninos htm.](http://www.Ergonomista.com/fitoterapia/taninos.htm)

15) [http//es.wipipedia.org/wiki/flavonoide](http://es.wikipedia.org/wiki/flavonoide)

16) [http://es.wikipedia.org/wiki/cromatograf%c3%ada.](http://es.wikipedia.org/wiki/cromatograf%c3%ada)

17) [www. Hondurassilvestre.com](http://www.Hondurassilvestre.com)

18) [www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/capa -fina.](http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/capa-fina)

19) [www.arbolesornamentales.com/cyphomandra betacea](http://www.arbolesornamentales.com/cyphomandra-betacea)

ANEXOS

ANEXO N° 1

Información tomada de Especies Promisorias en El Salvador (Inédito) elaborada por MSc. 1
Nohemy Elizabeth Ventura Centeno
Profesora Investigadora
Directora Escuela de Biología
Otorgado para trabajo de grado FFQy FF

Ubicación Taxonómica, Descripción Botánica, usos de *Cyphomandra betacea*

Familia: Solanaceae

Nombre Científico: *Cyphomandra betacea* (Cav.)
Sendt.

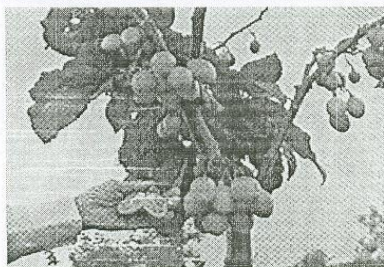
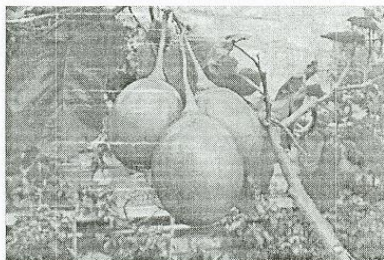
Sinónimos: *Solanum betaceum* Cav.,
Cyphomandra crassicaulis (Ortega)Kuntze

Nombre común: árbol de los tomates, árbol del tomate, tomate arbóreo del Perú, tamarillo, tamarillos, tomate de árbol, tomates de árbol
Árbol de los tomates.

Etimología: *Cyphomandra*, palabra derivada del griego y que alude a la forma de las anteras de la flor. *Betacea*, proviene de Beta=Acelga, quizás por sus hojas anchas a la manera de las de las acelgas.

Lugar de origen: Región andina de Perú y Argentina.

Distribución: Esta especie se encuentra en huertos familiares desde el norte de la Argentina hasta el sureste de México y en las Aníllas. Son países productores Colombia, Brasil, Nueva Zelanda, Kenia, Sudáfrica, California (EE.UU.), India, Sri Lanka.



Ecología: Crece en climas de bosque húmedo montano con temperaturas entre los 13° y 24° C, con pluviosidad de 600 a 1.500 mm anuales. Planta delicada al frío y a los vientos, por lo que debe cultivarse en zonas costeras y resguardado, prefiere suelos fértiles y abonados. Sensible a las sequías

Descripción Botánica: Arbusto arbóreo o arbolito de 3-4 m de altura con tronco corto, frágil, algo torcido a veces. Corteza grisácea. Follaje perenne, aunque en zonas con frío invernal, lo pierde bastante y se hielan las hojas. Hojas alternas, enteras, en los extremos de las ramas, con peciolo robusto de 4-8 cm de longitud. Limbo de 15-30 cm de longitud, con forma ovalada, acuminado, de color verde oscuro, un poco áspero al tacto. Las hojas jóvenes con fina pubescencia en ambas caras. La nerviación es marcada y sobresaliente. Las flores son pequeñas, de 1.3-1.5 cm de diámetro, de color blanco-rosáceo, dispuestas en pequeños racimos terminales. Tienen 5 pétalos y 5 estambres amarillos. Florece en Mayo-Junio. Fruto en baya ovoide de 4-6 cm de longitud, con largo pedúnculo en el que persiste el cáliz de la flor. Piel lisa de color rojo anaranjado en la madurez, con estrias de color más claro. Pulpa jugosa, algo ácida, con numerosas semillas de color granate intenso. Recuerda un tomate del tipo denominado de "pera". Existen variedades de tomate de árbol amarillas naranja y frutas rojas.

Cultivo: Se multiplica por semillas, que germinan con mucha facilidad. Planta algo delicada al frío y a los vientos, por lo que debe cultivarse en zonas costeras y resguardado. Prefiere suelos fértiles y abonados. Necesita humedad, no resistiendo las sequías. Presenta crecimiento muy rápido, dando frutos a los dos años de su cultivo.

Usos Etnobotánicos: Por su sabor agrídulce, los frutos son comestibles, pudiendo comerse crudos o guisados. En El Salvador, se cultiva como sombra en cafetales y como curiosidad. En Colombia y Ecuador, los usos medicinales están relacionados con las afecciones de garganta y gripe; y se prepara como jugo o bebida refrescante macerada o licuada en agua o leche. El



Información tomada de Especies Promisorias en El Salvador (Inédito) elaborada por MSc. 2
Nohemy Elizabeth Ventura Centeno
Profesora Investigadora
Directora Escuela de Biología
Otorgado para trabajo de grado FFQY FF

fruto o las hojas, previamente calentadas o soasadas, de aplican en forma tópica contra la inflamación de amígdalas o anginas especialmente. En Nueva Zelanda se utiliza como verdura en ensaladas y platillos salados cocidos o incorporado a postres.

Propagación: Se multiplica por semillas, que germinan con mucha facilidad con temperaturas superiores a 20°C. La germinación usualmente toma 20 días. Anualmente se podan sus ramas y tronco para obtener un crecimiento vigoroso.

Enfermedades: causadas por hongos, tales como manchas foliares por *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria* sp. y *Cercospora* sp.; antracnosis o pudrición del fruto por *C. gloeosporioides* y posiblemente por *Colletotrichum acutatum*, Oidio o Ceniza por *Oidium* sp. y la muerte de plantas asociada a *Pythium* sp. y *Phytophthora* sp.

Bibliografía Consultada:

- Morton, J. 1987. Tree Tomato. p. 437-440. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL.
- Hewett, E.W. 1993. New horticultural crops in New Zealand. p. 57-64. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), New crops. Wiley, New York.
- Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective. 1994. J.E. Hernándo Bermejo and J. León (eds.). Plant Production and Protection Series No. 26. FAO, Rome, Italy. p. 181-191.
- Bohs, L. 1989. Ethnobotany of the genus *Cyphomandra*. *Econ. Bot.*, 43: 143-163.
- Brücher, H. 1968. Las reservas genéticas de América del Sur para la selección de plantas cultivadas. *Theor. Appl. Genet.*, 38: 9-12.
- Burge, G.K. 1982. Pepinos: fruit set. *NZ Commercial Grower*, 37: 33.
- Cárdenas, M. 1969. *Manual de las plantas económicas de Bolivia*. Cochabamba, Bolivia, Imprenta Icthus.
- Correll, D.S. 1962. *The potato and its wild relatives. Section Tuberarium of Genus Solanum*. Renner, Texas Research Foundation.
- Heiser, C. 1964. Origin and variability of the pepino (*Solanum muricatum*): a preliminary report. *Baileya*, 12.
- Hermann, M. 1988. *Beiträge zur Oekologie der Frucht Ertragshidung von Solanum muricatum*. Berlin, Technical University.
- Holdridge, L.R. 1947. Determination of world plant formations from simple climatic data. *Science*, 105(2727): 367-368.
- León, J. 1964. Plantas alimenticias andinas. *IICA Boletín técnico*, 6.
- León J. 1968. *Fundamentos botánicos de los cultivos subtropicales*. San José, Costa Rica, IICA, OEA.
- National Research Council. 1989. *Lost crops of the Incas. Little known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation*. Washington, DC, National Academy Press.
- McBride, J.F. 1962. Solanaceae. In *Flora of Peru*, Vol. XIII, Part V-B No I. Field Museum of Natural History.
- Parodi, J. 1959. *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería*, Vol I. Buenos Aires, ACME.
- Pulgar Vidal, J. 1987. *Geografía del Perú: las ocho regiones naturales*. Lima, PEISA.
- Purseglove, J.W. 1968-1969. *Tropical crops: dicotyledons*. London, Longman.
- Rodríguez, R. & Peña Segura, J.O. 1984. *Flora de los Andes*. Departamento Nacional de Planificación. Colombia, Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los ríos Bogota, Ulbaté y Suárez.
- Sociedad Protectora de la Naturaleza. 1988. *Plaza San Francisco—Jardín Botánico de la Flora Nativa*. Cuzco, Peru.
- Soukup, J. SDB. 1970. *Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana*. Colegio Salesiano, Lima.
- Storey, W.B. 1976. Papaya. *Carica papaya* (Caricaceae). In N.W. Simmonds, ed. *Evolution of crop plants*, p. 21 -24. London, Longman.
- Weberbauer, A. 1945. *El mundo vegetal de los Andes peruanos*. Lima, Ministry of Agriculture.



Nohemy E. Ventura Centeno
01/04/08
3:25 pm

ANEXO Nº 2



Ciudad Universitaria, 11 de Agosto de 2008.

Lic. ODETTE RAUDA ACEVEDO
Coordinadora General de Trabajos de Graduación
Facultad de Química y Farmacia
Presente

Estimada Lic. Rauda:

Por medio de la presente hago constar que he participado en la Asesoría requerida por los estudiantes Raquel Alejandra Morales Alvarado con carné No.MA-99082 y Mauricio Arnoldo Romero Valdes RV-98027 con el objetivo de Identificar taxonómicamente y a la vez proporcionar toda la información requerida por los bachilleres, tal como se plasmó en el documento impreso y entregado a ellos por mi persona.

Esta actividad fue realizada en el Herbario de la Universidad de El Salvador (ITIC) durante el período comprendido del mes de Septiembre de 2007 al mes de Abril de 2008, información requerida para su trabajo de graduación denominado: "Estudio fotoquímico preliminar del fruto de la especie vegetal *Cyphomandra betacea* e identificación de alcaloides esféricos".

Y para los usos que los bachilleres antes mencionados estimen conveniente, se les extiende la presente a los once días del mes de Agosto del dos mil ocho.

M. Sc. Nohemy Elizabeth Ventura Centeno
Directora de la Escuela de Biología
Curadora Herbario de la Universidad
de El Salvador



ANEXO Nº 3

REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPO

Acido sulfúrico concentrado

Cloroformo

Metanol

Acido sulfúrico al 5%

Vainillina- H_2SO_4 5%

Nitro prusiato de sodio 0.5%

Hidróxido de sodio 2.0 N

Solución de NaOH 1.0 N

Reactivo de Keller

Anhídrido acético

Acetato de etilo

Acido 3,5-dinitrobenzoico en etanol 2%.

Reactivo de kedde

Amoniaco

Alcohol al 80%

Acido formico

Acido acético glacial

NaOH 10%

Tricloruro de hierro

Subacetato de plomo
Dicromato de potasio
Solución de Gelatina
Agua de Bromo
Reactivo de Mandelin
Reactivo de Marquis
Reactivo de Dragendorff
HCl 1.0 N
Acetona
Acetato de plomo trihidratado
Sulfato de sodio anhidro
NaOH 2.0 N
Piridina

MATERIAL

Agitadores
Balones esmerilados de 1000 mL y 500 mL
Refrigerantes
Beaker de 250 mL
Beaker de 100 mL
Probeta de 100 mL
Probeta de 50 mL
Tubos de ensayo
Capsulas de porcelana

Pinzas de sostén

Pinzas de extensión

Mangueras

Mallas de asbesto

EQUIPO

Balanza analítica

Hot plate.

Estufa

ANEXO N° 4

PREPARACION DE REACTIVOS (5,6)

REACTIVO DE MANDELIN:

Disolver 1 g de vanadato de amonio en 1.5 mL de agua y llevar a 100 mL con acido sulfúrico.

REACTIVO DE MARQUIS:

Mezclar cuidadosamente 100 mL de acido sulfúrico concentrado con 1 mL de solución de formaldehído 40% v/v.

REACTIVO DE LIEBERMAN':

Añadir 1 g de nitrito de sodio o potasio en 10 mL de acido sulfúrico, con enfriamiento y agitación hasta que los vapores cafés, aparezcan.

REACTIVO DE DRAGENDORFF:

Disolver 1 g de subnitrito de bismuto en 3 mL de HCl 10 M
Calentar. Diluir hasta 20 mL con agua y disolver 1 g de yoduro de potasio en la mezcla. Si se separa triyoduro de bismuto negro, añadir acido clorhídrico 2 M y más yoduro de potasio hasta disolverlo.

VAINILLINA:

Disolver 1 g de vainillina en 20 mL de H₂SO₄ concentrado

ANEXO Nº 5



FIG N°16: Fruto seco de *Cyphomandra betacea*



FIG N°17: Maceración alcohólica del fruto seco de *Cyphomandra betacea*



FIG N°18: Reflujo de los extractos

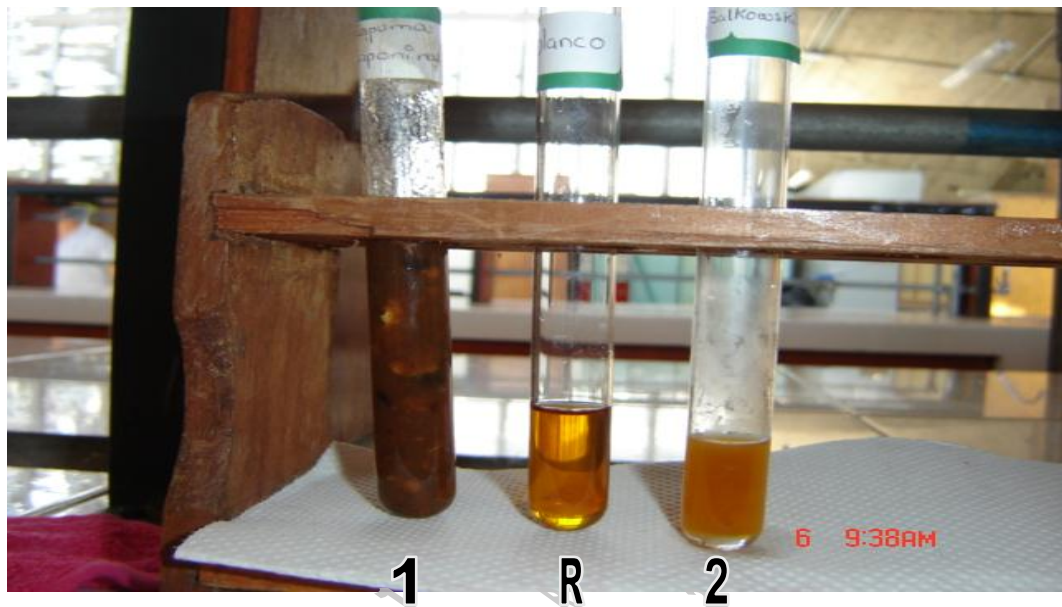


FIG N°19: Resultados de pruebas cualitativas para saponinas: prueba de la espuma (1), Referencia (R) y Salkowski (2)

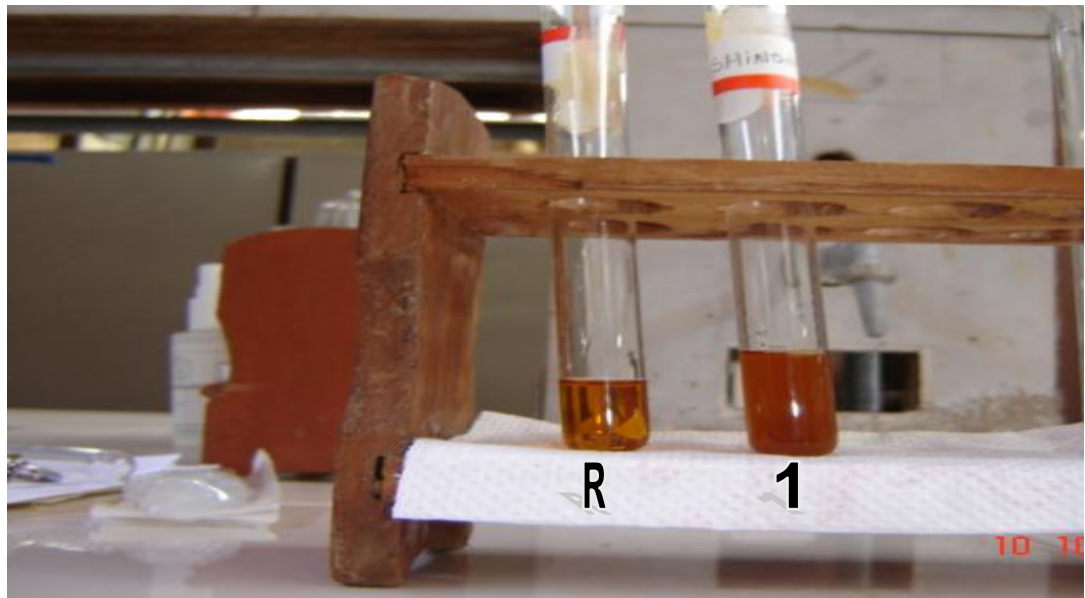


FIG Nº20 : Resultados de la prueba de Shinoda para flavonoides (1) y Referencia (R)

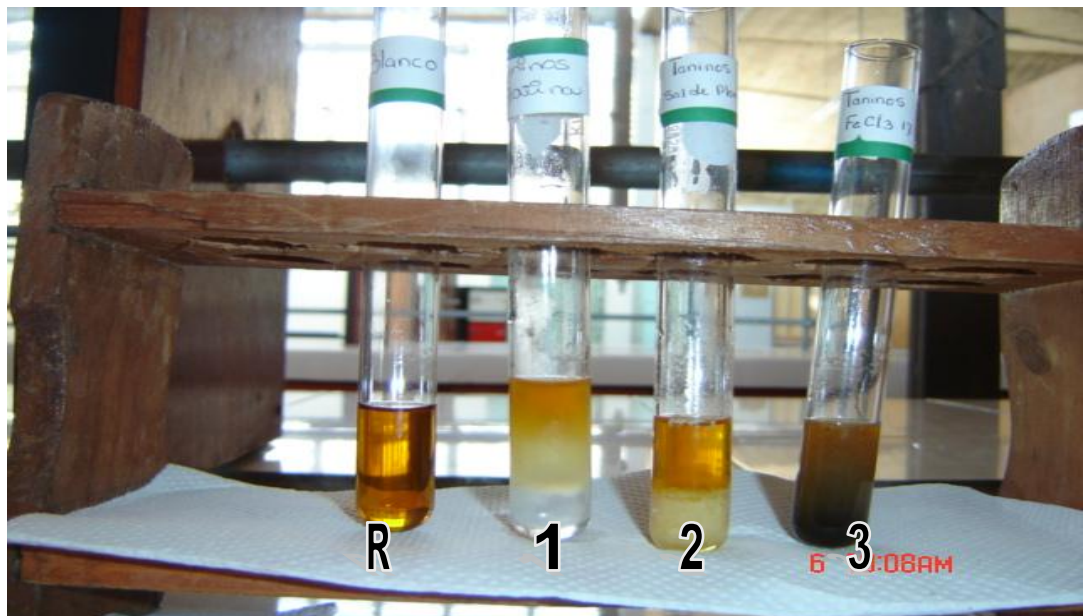


FIG Nº 21: Resultados de pruebas de identificación de taninos Referencia (R), Gelatina (1), Acetato de plomo (2) tricloruro de hierro (3)

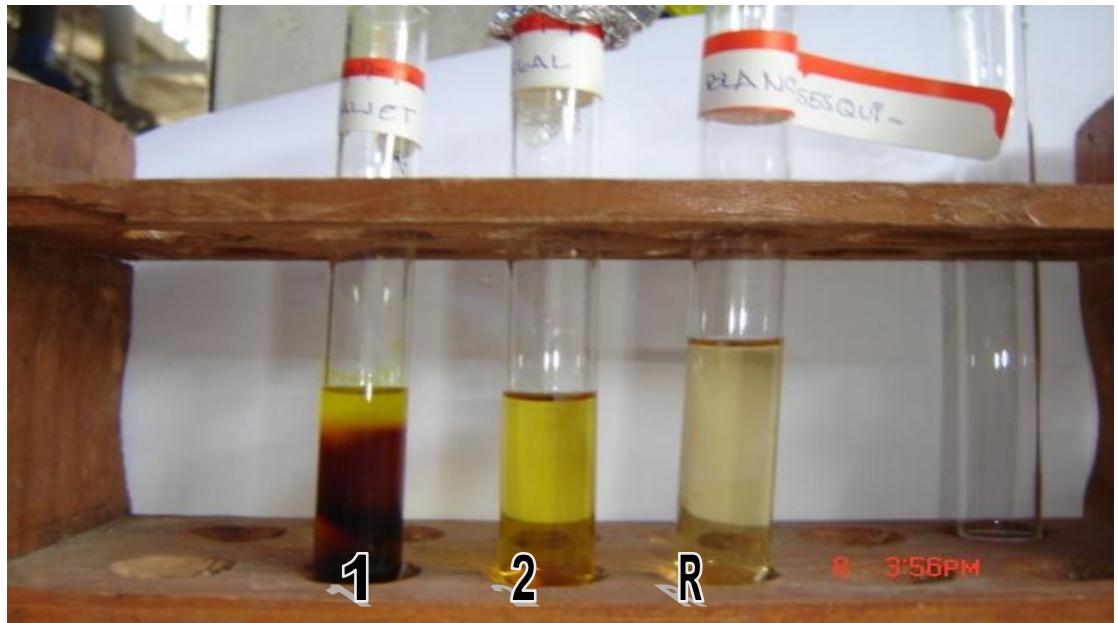


FIG N° 22: Resultados de pruebas de identificación de sesquiterpenolactonas: Baljet (1), Legal (2) y Referencia (R)

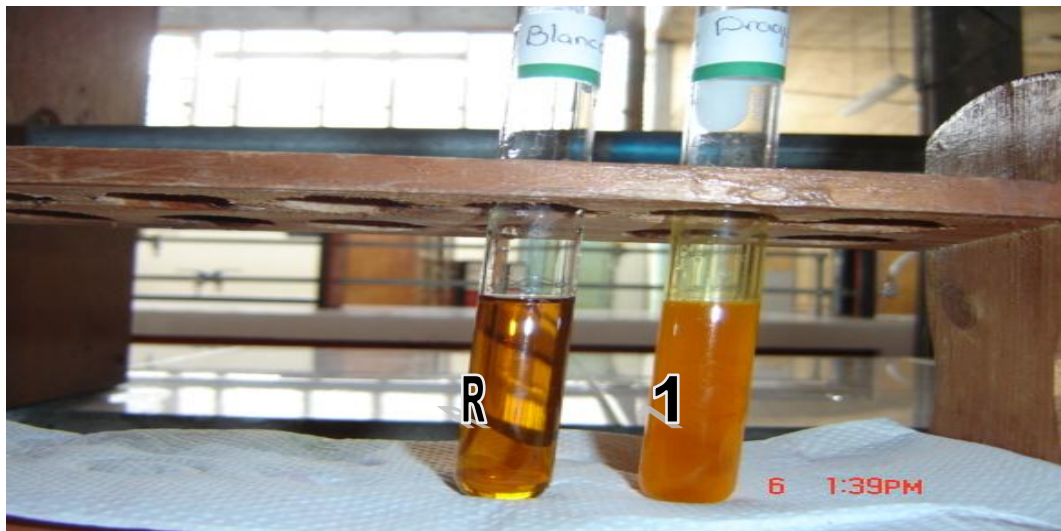


FIG N° 23: Prueba para alcaloides Referencia (R) y Dragendorff (1)

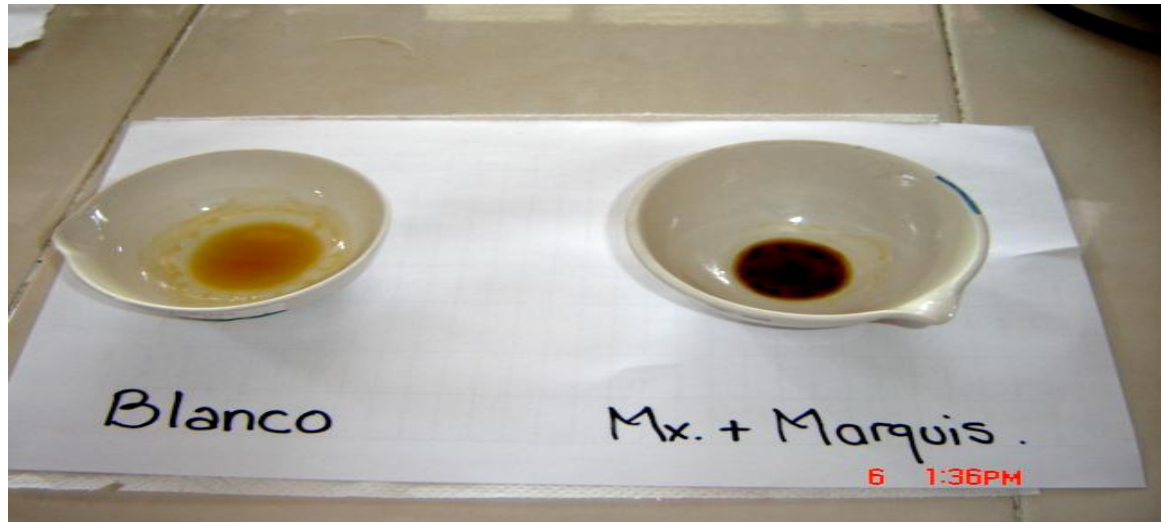


FIG N°24: Resultados de pruebas para alcaloides: Marquis en el extracto alcohólico

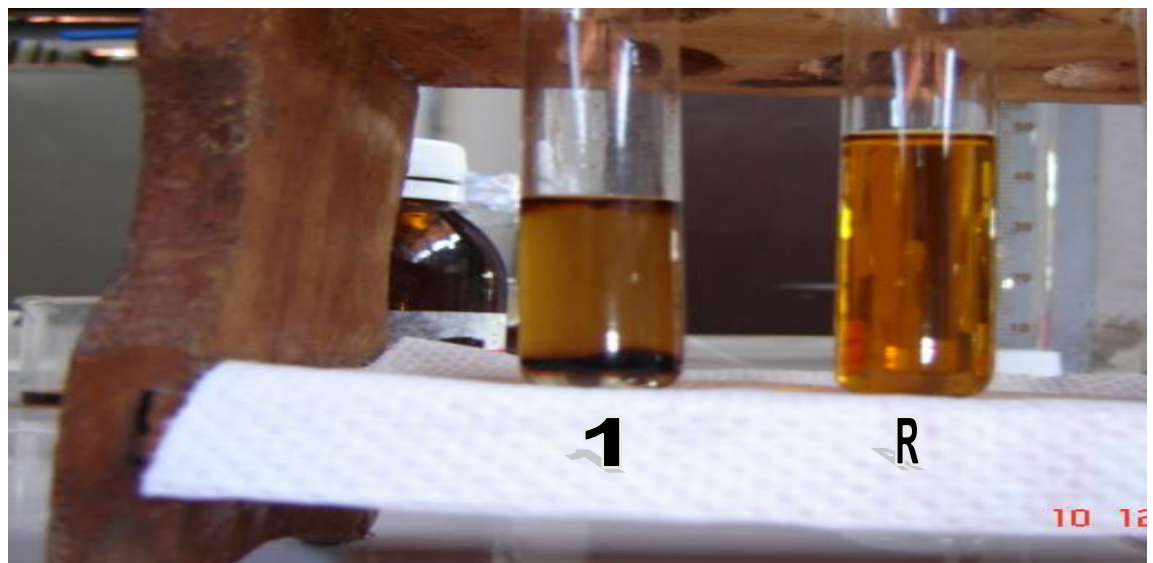


FIG N° 25 : Resultados de la prueba de Liebermann Buchard (1) y Referencia (R)



FIG N° 26: Desarrollo del cromatograma para flavonoides

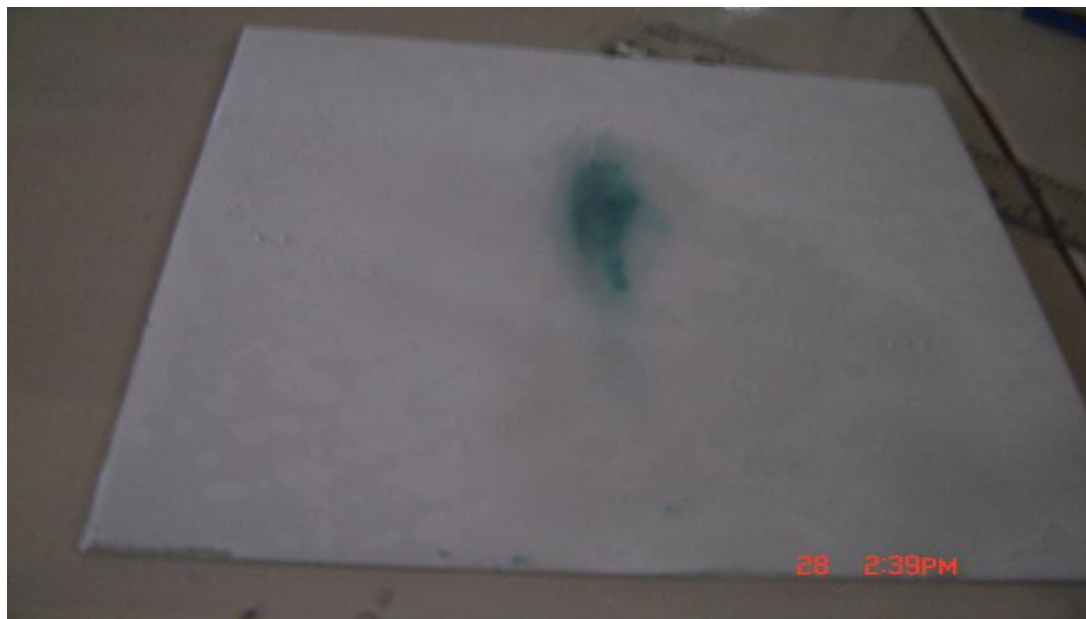


FIG N°27: Localización de Saponinas en la placa cromatográficas

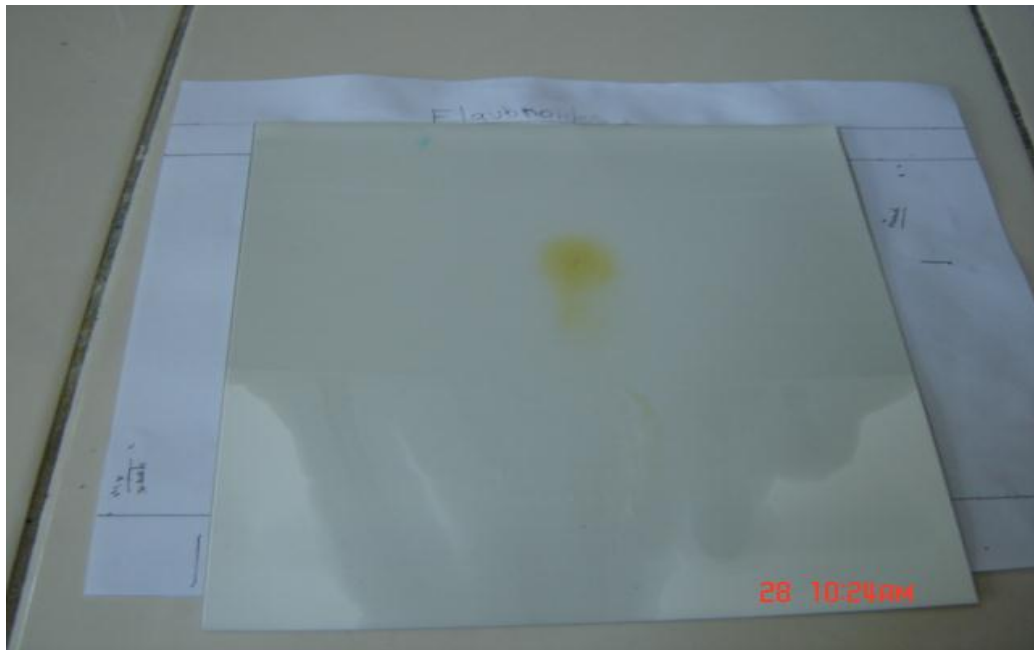


FIG N°28: Localizacion de flavonoides en la placa cromatográfica.



FIG N°29: Localización de alcaloides esteroidales en placa cromatográfica (muestra de extracto alcohólico)

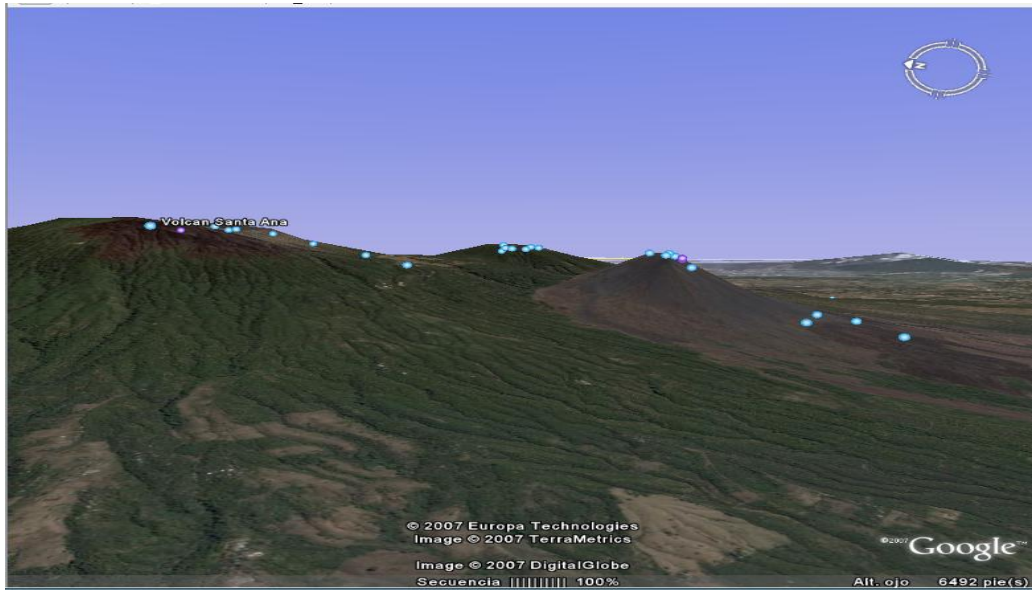
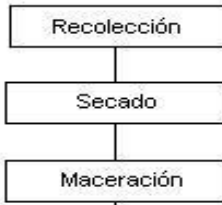


FIG N° 30: Volcán Ilamatepec, Santa Ana

ANEXO Nº 6



- 1- Alcohol de 90° por 7 días
- 2- Agua por 3 días

