

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



IDENTIFICACION DE ESTEROIDES EN *Asclepias curassavica* (Señorita
viborana), *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia ahouai* (Huevos de gato) y
Thevetia peruviana (Chilca).

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
EVELIN YANIRA CASTILLO VILLALTA
MIRNA ELIZABETH CORDOVA RAMOS

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUÍMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

LIC. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

DIRECCIÓN DE PROCESO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

TRIBUNAL CALIFICADOR

**COORDINADORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

Lic. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

**COORDINADORA DE AREA DE INDUSTRIA FARMACEUTICA, COSMETICA
Y VETERINARIOS**

Lic. Mercedes Rossana Brito Mendoza

DOCENTE ASESORA

Lic. Rina Antonieta Toledo Mendoza

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que me fuera posible alcanzar este triunfo.

La realización de esta tesis no habría sido posible sin la valiosa ayuda de mi Docentes Asesor Licda. Rina Toledo, mis sinceros agradecimientos no solo por la confianza que nos brindo durante este trabajo, sino que también por su paciencia, comprensión, por brindarme su amistad, su invaluable orientación, consejos y sugerencias y ser el promotor de la realización de esta tesis.

Al tribunal calificador, Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez, Licda. Mercedes Rossana Brito Mendoza y Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, que siempre nos hicieron aportes y sugerencias para la mejora de la tesis.

Por último, la realización de esta Tesis tampoco hubiera sido posible sin el constante apoyo de mi compañera de Tesis, mis hermanos, mis amigos, la fortaleza que me da mi Padre, y mi Madre que siempre me han dado la fuerza para seguir adelante.

A todos ellos Gracias.

Evelin Yanira Castillo Villalta

DEDICATORIA

A mis padres, por su cariño, su paciencia, su dedicación para ayudarme a ser una persona mejor; por siempre apoyar y motivarme para seguir adelante, porque siempre han creído en mí y a lo largo de la carrera siempre han estado conmigo. En especial sus cuidados los que me llevaron hasta donde estoy ahora.

A mis hermanos que siempre me han apoyado.

Evelin Yanira Castillo Villalta

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco de todo corazón a mi Dios por siempre dirigir mis pasos y ayudarme a culminar mi carrera.

Este trabajo de graduación no sería hoy en día una realidad sin la ayuda desinteresada y el trabajo de muchas personas, a las que deseo agradecer sinceramente su colaboración. Entre esas personas esta mi docente asesor Licda. Rina Toledo a quien le agradezco mucho por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella y mi compañera, de compartir sus conocimientos científicos y su amistad. También agradezco al tribunal calificador y a la coordinadora de trabajos de graduación Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez, Licda. Mercedes Rossana Brito Mendoza y Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo por ser objetivas en sus evaluaciones, por su tiempo y dedicación en el desarrollo y culminación del presente trabajo.

A mis padres por su esfuerzo, apoyo, comprensión y dedicación en todo momento en la realización del trabajo de graduación. Le agradezco a Dios por darme la oportunidad de finalizar junto con mi compañera de tesis este trabajo del cual tenemos muchas experiencias que no olvidaremos y que serán de utilidad en el ambiente laboral.

A la Licda. Katya Leyton por su constante apoyo y consejos en toda esta etapa de mi vida. Y a todos los que no alcanzo a mencionar, que de una u otra manera colaboraron en esta investigación. Mis más sinceros agradecimientos.

Mirna Elizabeth Córdova Ramos

DEDICATORIA

A Dios por permitirme seguir adelante y haber terminado esta etapa de mi vida.

A mi madre querida, Mirna de Córdova quien me ha apoyado desde el inicio de la carrera hasta la culminación del trabajo de graduación con sus oraciones y amor incondicional. Como también a mi padre Oscar Córdova por sus constantes consejos y el apoyo incondicional que me ha dado.

A mis hermanos por su respeto cariño y motivación para seguir adelante pues siempre han estado ahí conmigo a lo largo de la carrera.

A una docente en especial la Licda. Katya Leyton por siempre apoyarme y motivarme a seguir adelante porque siempre ha creído en mí en todo momento.

Mirna Elizabeth Córdova Ramos

INDICE

	Pág
Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xvii
Capitulo II	
2.0 Objetivos	20
Capitulo III	
3.0 Marco Teórico	22
3.1 Productos naturales como fuente de nuevos fármacos	22
3.2 Generalidades de Esteroides	29
3.2.1 Nomenclatura	30
3.3 Generalidades de Fitoesteroles	32
3.4 Generalidades de Glicósidos saponínicos	33
3.4.1 Ensayos de Reconocimiento	36
3.5 Generalidades de Glicósidos cardiotónicos	37
3.5.1 Ensayos de Reconocimiento	41
3.6 Monografías de las Especies Vegetales	42
3.6.1 Generalidades de Thevetia ahouai	42
3.6.2 Generalidades de Thevetia peruviana	44
3.6.3 Generalidades de Calotropis procera	47
3.6.4 Generalidades de Asclepias curassavica	50
3.7 Generalidades de Cromatografía en Capa Fina	53
3.8 Generalidades de la actividad supresora de apetito	59

Capitulo V	
5.0 Resultados	85
Capitulo VI	
6.0 Conclusiones	104
Capitulo VII	
7.0 Recomendaciones	107
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Carta de autenticación del material vegetal extendida por un botánico experto
2. Cartas de autenticación de las especies vegetales extendidas por un botánico experto de trabajos anteriores
3. Preparación de reactivos usados en esta investigación
4. Monografía de progesterona

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág.
1. Clasificación según la sustitución de la posición 17 y el número de carbonos	31
2. Serie Eluotrópica de solventes	55
3. Órganos utilizados de las muestras vegetales	64
4. Codificación de los órganos de las muestras vegetales.	68
5. Código y peso de las muestras molidas	69
6. Selección de los órganos de cada planta	85
7. Codificación de los órganos de las muestras vegetales	87
8. Resultados de las Características físicas de los extractos.	89
9. Resultado de la prueba de Esteroides según USP34 modificada	100

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág.
1 Evaluación Farmacognóstica de un producto natural	26
2 Núcleo base de esteroides: Ciclopentano-perhidrofenantreno	29
3 Estructura de una sapogenina esteroidal	33
4 Biogénesis Glicósidos Saponínicos	34
4 Biogénesis Glicósidos Saponínicos (cont.)	35
5 Características estructurales de los glicósidos cardiotónicos.	38
6 Clasificación de los glicósidos cardiotónicos de acuerdo al anillo lactónico.	38
7 Biogénesis de Glicósidos Cardiotónicos	39
7 Biogénesis de Glicósidos Cardiotónicos (cont.)	40
8 a) Hojas, b) Flores y c) Frutos de <i>Thevetia ahouai</i>	43
9 a) Árbol, b) Flores y c) Frutos de <i>Thevetia peruviana</i>	45
10 Flor de <i>Thevetia peruviana</i> a) variedad Alba y b) variedad Aurantiaca	46
11 a) Frutos, b) Semillas) Árbol y d) Flores de <i>Calotropis procera</i>	49

12	a) Árbol, b) Flores, c) Fruto y d) Semilla de <i>Asclepias curassavica</i>	52
13	Cromatoplasmas eluidas	56
14	Obtención de los Extractos de las muestra	70
15	Marcha Analítica Fraccionamiento por partición líquido-líquido de las muestras de semilla de <i>Calotropis procera</i> (Matacoyote), <i>Thevetia peruviana</i> (Chilca) y <i>Thevetia ahouai</i> (Huevos de gato)	73
16	Marcha analítica de identificación de anillo esteroidal	74
17	Marcha analítica de confirmación de ausencia de anillo lactónico	75
18	Esquema de trabajo de Prueba de Identificación de Esteroides según USP 34 Modificada.	80
18	Esquema de trabajo de Prueba de Identificación de Esteroides según USP 34 Modificada (cont.).	81
19	Esquema de trabajo	82
19	Esquema de trabajo (cont.).	83
20	Proceso de tratamiento previo realizado a los órganos de las muestras vegetales	86
21	A) Proceso de extracción en Soxhlet	88
	B) Extracto fluido de <i>Thevetia ahouai</i> hojas	
	C) Extracto seco de <i>Thevetia ahouai</i> hojas	
22	Resultados positivos de la Prueba de Liebermann – Burchard en los extractos de hojas, epicarpos, semilla y raíz de <i>Calotropis procera</i> , hojas, epicarpos y semilla de <i>Thevetia ahouai</i> y hojas de <i>Asclepias curassavica</i> .	90
23	Resultados positivos de la Prueba de Liebermann – Burchard en los extractos de hojas, epicarpos y semilla de <i>Thevetia peruviana</i> .	91
24	Resultados positivos de la Prueba de Salkowski en los extractos de epicarpos y semilla de <i>Thevetia ahouai</i> y epicarpos y semilla de <i>Thevetia peruviana</i> .	91
25	Resultados positivos de la Prueba de Salkowski en los extractos de	92

semilla y raíz de <i>Calotropis procera</i> .	
26	Cromatografía en Capa Fina de las fracciones etanólicas y <i>n</i> -Hexánica del extracto de <i>Thevetia ahouai</i> Semilla. 93
27	Estructuras químicas de Progesterona y Pregnano 94
28	Resultado de la identificación del anillo esteroidal 95
29	Estructuras químicas de Glicósidos cardiotónicos y saponínicos 96
30	Resultado de la identificación del anillo lactónico 97
31	Cromatografía de identificación del anillo esteroidal. 98
32	Cromatografía de identificación del anillo lactónico. 98
33	Proceso de formación de color rosado fuerte en la prueba de esteroides según USP 34 modificada. 101
34	Carta de autenticación de la especie vegetal por un botánico experto
35	Carta de autenticación de la especie vegetal por un botánico experto
36	Estructura química de progesterona
37	Espectro ultravioleta de progesterona
38	Espectro infrarrojo de progesterona

RESUMEN

Con el término “esteroides” se denomina a un grupo de sustancias que poseen desde el punto de vista estructural un sistema tetracíclico (núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno) que consta de tres anillos de seis y uno de cinco miembros en una disposición determinada. Los esteroides se encuentran tanto en el reino animal como vegetal y en muchos microorganismos.

Los pregnanos son esteroides de 21 carbonos que al igual que todos los esteroides poseen el núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno el cual tiene una cadena lineal de 2 carbonos en la posición 17. Estos compuestos son de importancia farmacológica porque antes solamente tenían actividad como hormonas sexuales específicamente del grupo de los progestágenos (ej. La progesterona) pero hoy en día se les ha determinado que poseen actividad supresora del apetito. Tomando en cuenta dichos antecedentes, se realizó el presente trabajo, cuyo objetivo principal es identificar esteroides en cuatro especies vegetales, las cuales son: *Asclepias curassavica* (Señorita viborana), *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia ahouai* (Huevos de gato) y *Thevetia peruviana* (Chilca) de las familia Asclepiadaceae y de la familia Apocinaceae.

Las especies vegetales en estudio se identificaron botánicamente con la ayuda de un botánico experto del Jardín Botánico La Laguna. La selección de cada uno de los órganos de las plantas se debió a la investigación bibliográfica desarrollada. Posteriormente fueron recolectados cada uno de los órganos que servirían como muestras y fueron llevadas al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, en donde fueron sometidas a extracción en Soxhlet utilizando diclorometano como solvente extractor. A continuación, se realizaron las pruebas químicas de Salkowski y Liebermann-Burchard, como también las Cromatografías en capa fina, una para la identificación del anillo esteroidal utilizando como revelador Vainillina-Ácido Sulfúrico 5% y la otra para la identificación del anillo lactónico utilizando el reactivo revelador de Kedde, de

las cuales las pruebas químicas resultaron positivas y Mediante la comparación de ambas cromatografías se pudo llegar a definir aquellas manchas que corresponden a esteroides. Por último, se realizó la prueba de esteroides según USP 34, la cual fue modificada para adecuarla al estudio de las especies vegetales. El total de fracciones analizadas fue de 31 fracciones y todas las pruebas dieron resultados positivos lo cual confirma los resultados obtenidos en la comparación de los cromatogramas, además se comprobó la presencia de esteroides en todos los órganos de las especies en estudio. Por lo cual, se recomienda que se continúe en próximas investigaciones con los estudios de cada uno de los órganos de las especies vegetales sobre todo en aquellos que se observó la presencia de esteroides en mayor intensidad de color en la reacción química de la prueba de esteroides de la Farmacopea de los Estados Unidos número treinta y cuatro (USP 34) modificada.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Los esteroides son un grupo de sustancias que poseen el núcleo del Ciclopentano – perhidrofenantreno, y se encuentran tanto en el reino animal como vegetal y en muchos microorganismos. Comprenden un buen número de compuestos de gran importancia química, biológica y médica, como son: colesterol (que es el esteroide más abundante y accesible), ácidos biliares, hormonas sexuales, corticoesteroides, vitamina D y un conjunto de esteroides vegetales que incluyen: fitoesteroles, glicósidos saponínicos y glicósidos cardiotónicos.

En este trabajo se estudiarán sólo el grupo de los esteroides vegetales porque poseen muchas actividades farmacológicas que son importantes para la industria farmacéutica y la investigación fitoquímica entre otros.

Los pregnanos son compuestos intermediarios de la ruta biogénica de fitoesteroles, glicósidos saponínicos y glicósidos cardiotónicos. Estos metabolitos hoy en día son de gran interés porque hay estudios que los relacionan con la actividad supresora del apetito. Por lo tanto, este trabajo estará orientado a la posibilidad de identificar dichos compuestos en las especies vegetales en estudio por medio de cromatografía en capa fina usando como testigo progesterona por la similitud estructural que poseen entre sí, además se utilizaran reveladores específicos y pruebas químicas de identificación general y específica; se estudiaran 4 especies de plantas que son *Asclepias curassavica* (Señorita viborana), *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia ahouai* (Huevos de gato) y *Thevetia peruviana* (Chilca). Con los resultados obtenidos se espera que sean utilizados para estudios posteriores de investigación sobre la actividad supresora del apetito, de esta forma se estará contribuyendo a la búsqueda de nuevas especies vegetales y compuestos que tengan una actividad supresora del apetito que ayudará en gran medida a la salud de las personas que padecen obesidad.

El presente estudio se realizará en el laboratorio de Investigación en productos naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, en los meses de julio a diciembre del año 2014.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar esteroides en *Asclepias curassavica* (Señorita viborana), *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia ahouai* (Huevos de gato), *Thevetia peruviana* (Chilca).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Identificar botánicamente las especies vegetales en estudio con la colaboración de un botánico experto de la Asociación Jardín Botánico La Laguna.
- 2.2.2 Obtener los extractos diclorometánicos de los diferentes órganos de las especies vegetales en estudio.
- 2.2.3 Comprobar la presencia de esteroides por la técnica de cromatografía en capa fina en los extractos de las especies en estudio.
- 2.2.4 Utilizar una solución clorofórmica de progesterona como testigo de la presencia de esteroides en los extractos.
- 2.2.5 Verificar la ausencia del grupo lactónico mediante el análisis de las Cromatografías en Capa Fina de los extractos.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE NUEVOS FÁRMACOS

La naturaleza, y sobre todo las plantas, han contribuido enormemente desde la antigüedad a la medicina. En Mesopotamia se utilizaban alrededor del año 2600 antes de Cristo unas 1000 sustancias derivadas de plantas, y en el papiro de Ebers, escrito en el año 1500 antes de Cristo, se mencionan alrededor de 700. Datos semejantes podemos encontrar en China e India. Los griegos y los romanos racionalizaron el uso de estas drogas, destacando entre ellos Dioscórides y Galeno. Estos conocimientos se preservaron por los árabes en los siglos V---XII y, posteriormente han continuado jugando un importante papel en la salud humana, sobre todo en el tratamiento del cáncer.

Hoy en día casi nada es al azar o por razones del destino, ya que el desarrollo de un producto natural es un proceso largo y costoso y sobre todo sistemático y monitoreado, cuyo objeto es demostrar que el producto natural, reúne los requisitos de eficacia, seguridad y calidad exigidos para su comercialización y administración al ser humano, obteniéndose la actividad terapéutica deseada en la patología a la cual está destinado el producto natural.

Los productos naturales son metabolitos secundarios de plantas, hongos, y organismos marinos que se originaron en estos seres vivos para defenderse de diversos agentes externos. Como consecuencia de ser el resultado de una selección a lo largo de la evolución de las especies, los productos naturales poseen actividades biológicas, por lo que se han utilizado en terapéutica o tomado como modelo para realizar modificaciones estructurales específicas y generar nuevos fármacos.

Para poder formular un producto natural se deben seguir los siguientes pasos:

- I. Revisión bibliográfica
- II. Selección e Identificación del material vegetal
- III. Recolección, Secado y Molido del material vegetal
- IV. Extracción del material vegetal
- V. Separación y Elucidación estructural
- VI. Investigación de Actividades biológicas
- VII. Formulación de producto natural

I. Revisión bibliográfica

En esta primera etapa, se debe tomar en cuenta todos los estudios o investigaciones que se encuentren tanto sobre la planta (clasificación botánica, composición química, etc.), así como de las actividades biológicas que se hayan realizado de las plantas en estudio o de otras.

II. Selección e Identificación del material vegetal

Los criterios para la selección de las plantas son los siguientes:

- Por sus usos tradicionales como en la diabetes, artritis, entre otras patologías.
- Por su composición química, como glicósidos cardiotónicos, flavonoides, entre otros.
- Por su familia botánica como solanaceae, compositae, asclepiadaceae, entre otras familias.
- La búsqueda de una actividad biológica concreta, por ejemplo actividad analgésica, antiinflamatoria, anticancerígena, entre otras.
- Organismos marinos y especies vegetales tóxicas ejemplos erizos de mar, nux-vómica, otros.

- Basada en combinación de criterios ejemplo de ello es por su composición química y actividad biológica.

Todos estos criterios nos ayudan a seleccionar las plantas que se quieren investigar. De los cuales también se debe elegir los órganos de las plantas que se estudiarán, los cuales pueden ser: hojas, corteza, raíz, frutos, flores y exudado.

El material vegetal para su previa identificación se deberá llevar a un jardín botánico para que un botánico experto, identifique la planta y la certifique para asegurar que es la planta que se necesita. Se debe tomar en cuenta que el material vegetal al llevarlo al jardín botánico debe cumplir ciertas características:

- Debe ser una muestra representativa.
- Debe estar fresco al momento de llevarlo.

III. Recolección, Secado y Molido del material vegetal

Después de tener la identificación de la planta, se podrá recolectar y eso se realizará en los lugares donde la planta crece por ser su hábitat, ya que cumple con los requisitos que la planta necesita para poder crecer. Se debe recordar que al momento de ir a recolectar se tiene que llevar equipo de protección por si la planta es tóxica o no se sabe si es tóxica.

Las plantas después de recolectarlas, se colocan en bandejas que contengan papel filtro o papel craft. Hay varios métodos de secado los cuales son: al aire libre, en la estufa u horno pero se debe controlar la temperatura, otro método sería secarlo al aire libre pero se colocan directamente al sol; estos son algunos métodos que se utilizan más frecuentemente en el área de farmacognosia pero pueden haber otros. Para elegir un método de secado se debe tener el cuidado de no quemar la planta ya que se puede modificar los componentes químicos de ella. Otro cuidado que se debe tomar es que las áreas de secado deben

mantenerse protegidas de insectos, roedores, pájaros y otras plagas, de los animales de granja y domésticos.

Las plantas ya secas, se llevan a moler, pero a veces hay muestras cuyos órganos pueden ser triturados con el mortero y el pistilo para poder reducirlos o porque puede haber pérdida de este en el molino.

IV. Extracción

Existen varias posibilidades para la obtención de principios activos a partir de la droga, entre los cuales tenemos:

1. Métodos extractivos a partir de la droga.
2. Métodos hemisintéticos o semisintéticos.
3. Métodos biotecnológicos

Pero de los tres métodos el que comúnmente se utiliza en el área de productos naturales es el método extractivo de la droga, los cuales pueden ser por extracción mecánica o por extracción con disolvente. (20)

V. Separación y Elucidación estructural

En la investigación fitoquímica principalmente se utilizan métodos de separación, fundamentalmente cromatográficos, y métodos de elucidación estructural, principalmente espectroscópicos. (15)

De los métodos cromatográficos el que más se emplea en el laboratorio de productos naturales es la cromatografía en capa fina por ser de fácil utilización.

VI. Investigación de Actividades biológicas

En estos ensayos se debe buscar la metodología adecuada de cada uno de ellos.

VII. Formulación de un producto natural

En esta última parte, se formula el producto natural con los excipientes adecuados, así como elegir el recipiente en el cual se almacenaría para

después comercializarlo. El producto natural debe ser efectivo, eficiente y seguro.

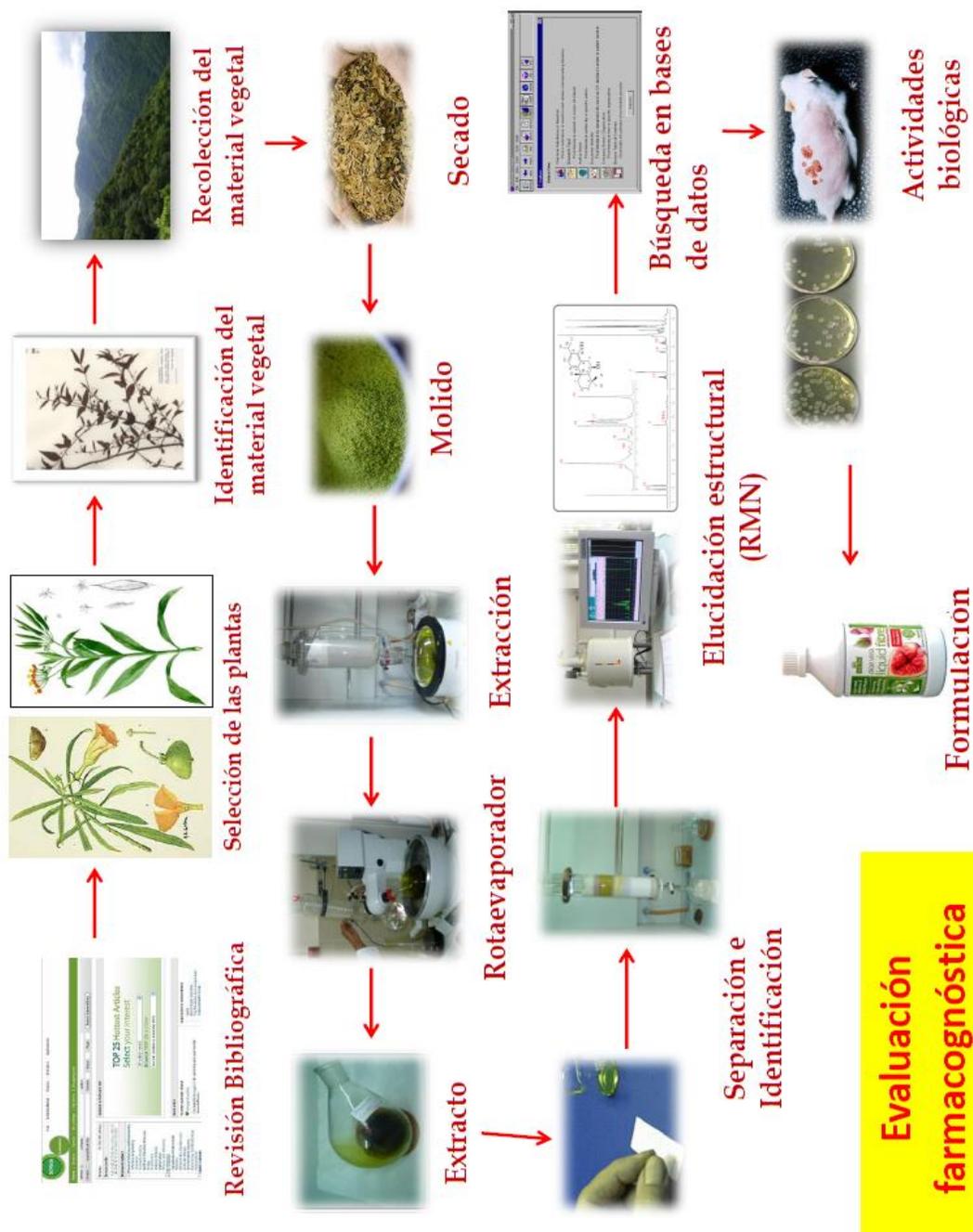


Figura N° 1 Evaluación Farmacognóstica de un producto natural

Después de formular el producto natural es necesario realizar las pruebas preclínicas, los estudios clínicos y la inscripción o registro para que se pueda comercializar el producto natural.

VIII. Pruebas Preclínicas

Los estudios pre-clínicos se realizan en animales y modelos fisiológicos en el laboratorio, analizando las propiedades físico-químicas y el comportamiento del producto natural *in vivo* e *in vitro*. El propósito primario sigue siendo la evaluación de la actividad biológica. En esta etapa, los productos naturales se ensayan en dos o más especies de animales, debido a que una droga puede afectarlas en forma diferente. Estos estudios pre-clínicos evalúan un gran rango de parámetros del producto natural, e incluyen estabilidad, niveles plasmáticos, tisulares y propiedades farmacocinéticas. Se realizan estudios de toxicidad aguda y crónica y sobre el efecto en la reproducción y su progenia. Basado en los resultados de esta etapa, se evalúa el desarrollo de formulaciones para estudios clínicos y se proponen evaluaciones farmacológicas más extensas. Sólo 1 de 1.000 productos naturales avanza a la siguiente etapa, que comprende a los estudios clínicos en seres humanos. Si estos complejos estudios preliminares son prometedores, normalmente el propietario solicita la patente del producto natural. En este momento se decide si se solicita un permiso al FDA (en EEUU) o EMEA (Europa) para desarrollar la droga y comenzar con los estudios en seres humanos, solicitando el correspondiente IND (Nuevo Fármaco Experimental).

La clave del éxito es que los productos naturales poseen ciertas propiedades favorables: actividad biológica y solubilidad adecuada, capacidad para atravesar barreras críticas, razonable estabilidad metabólica y seguridad en su administración al hombre.

IX. Estudios Clínicos

Es necesario que antes de comercializar un producto natural éste sea probado en humanos. Esto se hace en tres fases consecutivas en diferentes grupos poblacionales con la finalidad de asegurar la bondad del producto natural. Para comenzar cada una de estas fases se debe solicitar la autorización a las Autoridades Regulatorias correspondientes presentándose los resultados de la fase anterior.

a) Estudios Clínicos Fase I

En las pruebas de fase I, los investigadores ponen a prueba un producto natural o tratamiento experimental por primera vez en humanos, usando un pequeño grupo de participantes en la investigación (generalmente de 20 a 80 personas) para poner a prueba la seguridad del tratamiento, para empezar a entender cómo el tratamiento afecta el cuerpo, para encontrar un nivel de dosis seguro y para identificar los efectos secundarios.

b) Estudios Clínicos Fase II

Es aquella en la que por primera vez se administra el producto natural a pacientes. Se administra a un grupo relativamente homogéneo de entre 100 y 200 individuos que se dividen en dos grupos cuyos resultados posteriormente serán comparados (a doble ciego). A un grupo se le suministra el producto natural y al otro bien el mejor medicamento del mercado contra la patología o un placebo (grupo control).

c) Estudios Clínicos Fase III

Los ensayos clínicos en Fase III tienen como objetivos fundamentales evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento experimental intentando reproducir las condiciones de uso habituales y considerando las alternativas terapéuticas disponibles en la indicación estudiada. Se realizan en una muestra de pacientes más amplia que en la Fase II que sea representativa de la población general a la que iría destinada la intervención terapéutica.

X. Inscripción o Registro

El paso siguiente para introducir un producto natural en el mercado es presentar una solicitud a la autoridad regulatoria de salud de un país a fin de obtener la aprobación para comercializar el medicamento nuevo. Este paso se conoce como registro.

El resultado de los estudios de la *Fase Clínica III* proporciona la base para la aprobación. Una vez que el registro ha sido presentado en la Administración correspondiente, la revisión y aprobación, en su caso, supone unos dos o tres años.

XI. Farmacovigilancia

Una vez que se obtiene la aprobación para vender un producto natural, inicia la fase 4. Estos son los denominados estudios clínicos fase 4; que se realizan en el momento de comercialización.

Esto constituye la vigilancia de la seguridad del producto natural en las condiciones reales de uso en grandes cantidades de pacientes.

3.2 GENERALIDADES DE ESTEROIDES

Con el término “esteroides” se denomina a un grupo de sustancias que poseen desde el punto de vista estructural un sistema tetracíclico (núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno) que consta de tres anillos de seis y uno de cinco en una disposición determinada. (Ver figura n°2) Y estos a la vez pueden o no presentar una cadena lateral en C-17. (13) (19)

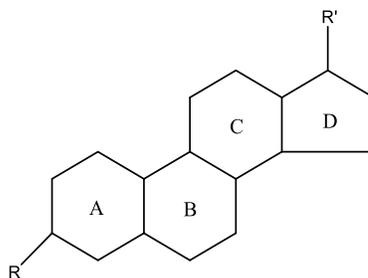


Figura N° 2 Núcleo base de esteroides: Ciclopentano – perhidrofenantreno (13)

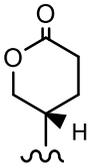
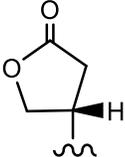
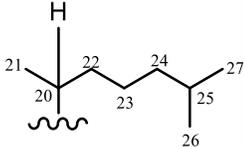
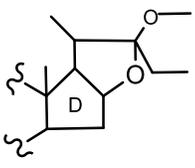
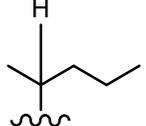
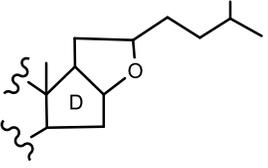
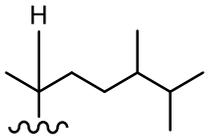
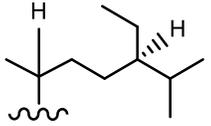
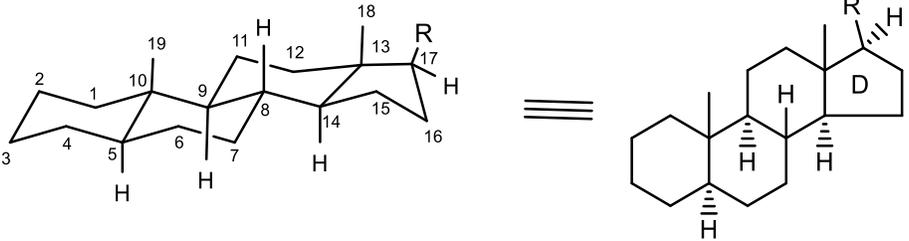
Los estudios químicos de esteroides comenzaron en 1903 y se dedicaron a la determinación de la estructura del colesterol, el esteroide más conocido, el cual había sido aislado en 1812 por Chevreul, a partir de la grasa animal. En 1932 se conocía la estructura planar correcta del núcleo tetracíclico, gracias a los trabajos de Windaus (en ácidos biliares) y de Wieland (en colesterol). Aunque la configuración relativa de los centros quirales de algunos esqueletos claves, fue establecida a finales de 1940, la determinación de la configuración absoluta del colesterol fue solo posible después de conocer la del gliceraldehído, en 1952. En 1929 y 1935 se aislaron y elucidaron las estructuras de las hormonas sexuales (Ruzicka y Butenandt) y Kendall, Reichstein y Wintersteiner, avanzaron estudios sobre corticoides entre 1935 y 1938.

Los métodos cromatográficos, la síntesis orgánica, incluyendo síntesis totales de productos naturales complejos, fueron impulsados por Woodward y Robinson sobre estructuras esteroideas, así como el análisis conformacional desarrollado por Barton.

3.2.1 Nomenclatura

Las reglas de nomenclatura para los esteroides fueron establecidas por la IUPAC en 1971 y comprenden tanto los compuestos naturales como los sintéticos. Al igual que para otros terpenoides ellas tratan de simplificar y uniformar las denominaciones y utilizar en lo posible, los nombres comunes más primitivos que permitan la rápida interrelación de estructuras con las ya conocidas. (19)

Cuadro N°1. Clasificación según la sustitución de la posición 17 y el número de carbonos. (19)

R	Esqueleto	R	Esqueleto
H	Androstano		Bufanolido
C ₂ H ₅	Pregnano		Cardenólido
	Colestano		Espirostano
	Colano		Furostano
	Ergostano		
	Estigmastano		
			

En la actualidad, la mayoría de los esteroides producidos por la industria farmacéutica se obtienen por hemisíntesis a partir de sustancias de origen natural, debido a los inconvenientes que plantea el proceso de síntesis total (en razón de su complejidad por las diferentes variaciones espaciales del

propio núcleo). Para ello se parte de precursores de origen vegetal o animal que se modifican estructuralmente para obtener los productos deseados.

Los pregnanos son esteroides de 21 carbonos que al igual que todos los esteroides poseen el núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno que tiene una cadena lineal de 2 carbonos en la posición 17. Estos compuestos son de importancia farmacológica porque antes solamente tenían actividad como hormonas sexuales específicamente del grupo de los progestágenos (ej. La progesterona) pero hoy en día se les ha encontrado que poseen actividad supresora del apetito.

Los esteroides se encuentran tanto en el reino animal como vegetal y en muchos microorganismos. Estos comprenden un buen número de compuestos de gran importancia química, biológica y médica, como son colesterol (esteroide más abundante y accesible), ácidos biliares, hormonas sexuales, corticoesteroides, vitamina D y un conjunto de esteroides vegetales: fitosteroles, saponinas y glicósidos cardiotónicos.

La actividad biológica observada en estos compuestos depende de los grupos funcionales unidos al núcleo esteroidal y su estereoquímica, así como la estereoquímica de la fusión de los anillos. En todos los esteroides naturales la unión B/C es *trans*, la C/D (salvo en glicósidos cardiotónicos) también es *trans* y la variación está en la fusión A/B que puede ser *trans* o *cis*. (13)(25)

3.3 GENERALIDADES DE FITOSTEROLES

Los fitosteroles junto con los lípidos constituyen las biomembranas de plantas, hongos y algas y afectan a la permeabilidad de las mismas. Se distinguen estructuralmente del colesterol (esterol animal) por tener uno o dos carbonos en la cadena lateral unidos al C₂₄.

Ejemplos de ellos en las plantas están: el sitoesterol, el campesterol, el estigmasterol.

Otro ejemplo es el ergosterol que se encuentra en los hongos y levaduras. (13)

3.4 GENERALIDADES DE GLICOSIDOS SAPONINICOS

Se llaman saponinas a un grupo de sustancias glicosídicas que se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene. La formación de la espuma es debido a que disminuyen la tensión superficial del agua, son por lo tanto tensioactivos naturales. (17) También poseen propiedades hemolíticas en la sangre y si se inyectan al torrente sanguíneo son tóxicas. (29)

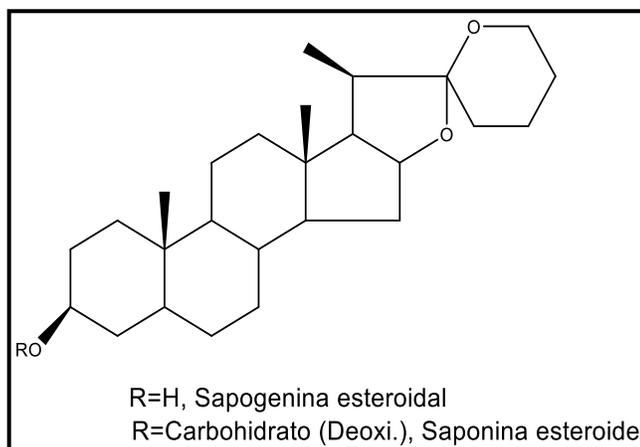


Figura N° 3 Estructura de una sapogenina esteroidal (22)

Las saponinas son estructuras formadas por una parte glicosada (azúcar) y una parte no glicosada (aglicón denominada "sapogenina"). (17) La sapogenina puede ser de tipo esteroidal (C₂₇) o triterpenoidal (C₃₀). (19)

Estos compuestos tienen elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro brinda ciertas dificultades. Como heterósidos que son sufren hidrolisis que puede ser acida, microbiológica o enzimática; dando una sapogenina y diversos azúcares. (29)

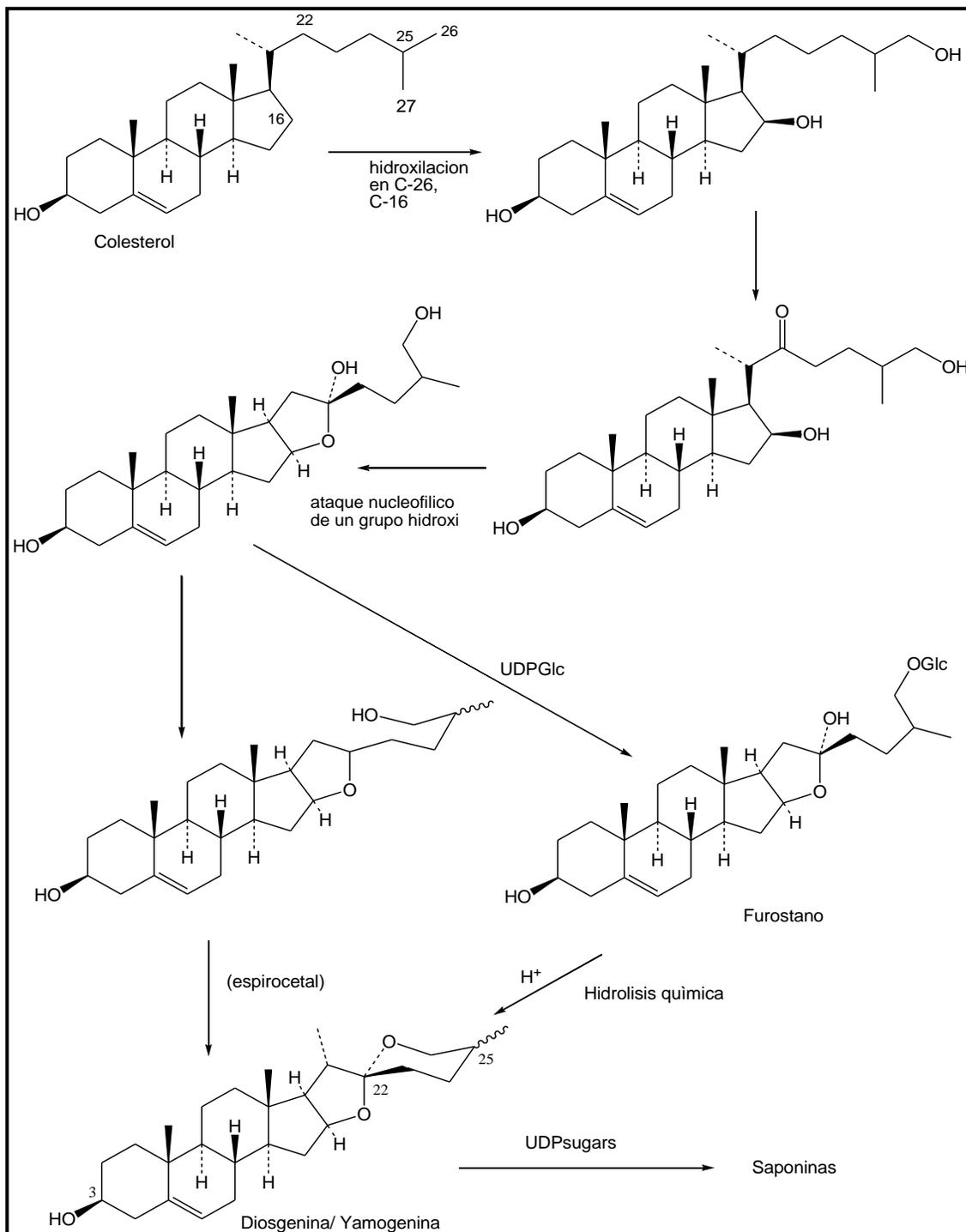


Figura N° 4 Biogénesis Glicósidos Saponínicos (cont.) (8)

3.4.1 Ensayos de reconocimiento

Las saponinas se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos preliminares mediante los ensayos de la espuma, hemólisis de glóbulos rojos, Liebermann-Burchard, Salkowski y ensayos para identificar la azúcar del glicósido. (22)

– Ensayo de la Espuma

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas, porque existen otras sustancias que pueden formar también espuma.

– Ensayo de Hemólisis

Este ensayo es más confiable que el de la espuma. A una suspensión de glóbulos rojos en solución salina diluida, se añade una solución de la muestra que se presume que es o que contiene saponinas. Si los glóbulos rojos se rompen, lisan o hemolizan, se asume que la prueba es positiva. Este ensayo puede realizarse en tubo de ensayo o en cajas de Petri con agar-sangre o en cajas de Petri con gelatina-sangre. Cuando la muestra contiene taninos, deben eliminarse antes de realizar la prueba ya que la interfieren. Esto se logra por tratamiento repetido de la muestra con óxido de magnesio, el cual forma complejos insolubles con los taninos, por lo cual es fácil eliminarlos por filtración.

Este ensayo, junto con el de la espuma, cuando ambos resultan positivos en una muestra vegetal (extracto, fracción o sustancia pura) permiten establecer que la muestra es o contiene saponinas. La sola prueba de espuma positiva no es concluyente para determinar la presencia de saponinas.

– **Ensayo de Liebermann – Burchard**

Por la porción esteroidea o triterpénica que poseen las saponinas, este ensayo puede confirmar su presencia por ejemplo en extractos vegetales.

– **Ensayos para identificar el azúcar del glicósido**

La presencia de azúcares unidos a la sapogenina o aglicón puede reconocerse fácilmente mediante ensayos como el de Molisch, el de la Antrona, etc., o mediante análisis por cromatografía en papel, utilizando azúcares de referencia.

(22)

3.5 GENERALIDADES DE GLICOSIDOS CARDIOTONICOS

Se conocen como Glicósidos cardiotónicos a un grupo de esteroides de 23 o 24 carbonos unidos a una azúcar que normalmente se encuentra en la posición 3.

(13)

Estos compuestos que se dan tanto en plantas como en las secreciones de la piel de las ranas y sapos, son muy conocidos por sus propiedades venenosas y por tener la capacidad de modular el funcionamiento del corazón actuando directamente sobre la contractilidad del músculo cardiaco (miocardio) y sobre la circulación aurícula – ventrículo. (13) (17)

Su acción terapéutica depende tanto del tipo y número de unidades de azúcar como de la estructura del aglicón, que posee una lactona α , β insaturada en posición 17. La estereoquímica es así mismo muy importante para la actividad biológica. (13)

Son necesarias ciertas características estructurales para que los glicósidos cardiotónicos posean actividad sobre el músculo cardiaco (ver Figura N°5) las cuales son:

- Grupo OH en posición β en C-14.
- Unión *cis* entre los anillos A y B y entre los anillos C y D.

- Unión *trans* entre los anillos B y C.
- Una lactona α, β insaturada en el C-17 β .
- Un residuo azucarado sobre el OH β de C-3. (17) (20)

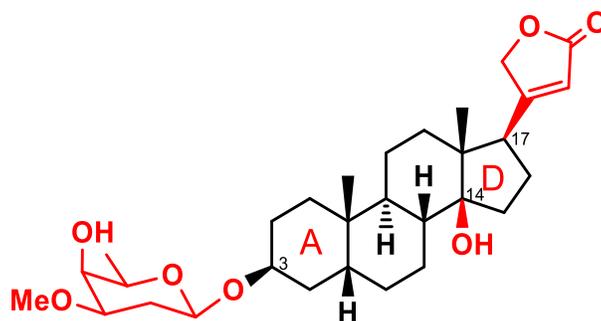


Figura N°5. Características estructurales de los glicósidos cardiotónicos. (20)

Estos se clasifican en dos categorías dependiendo del anillo lactónico en sus agliconas (ver Figura N°6):

- Cardenólidos: posee una lactona de cinco miembros.
- Bufadienólidos: posee una lactona de seis miembros. (19)

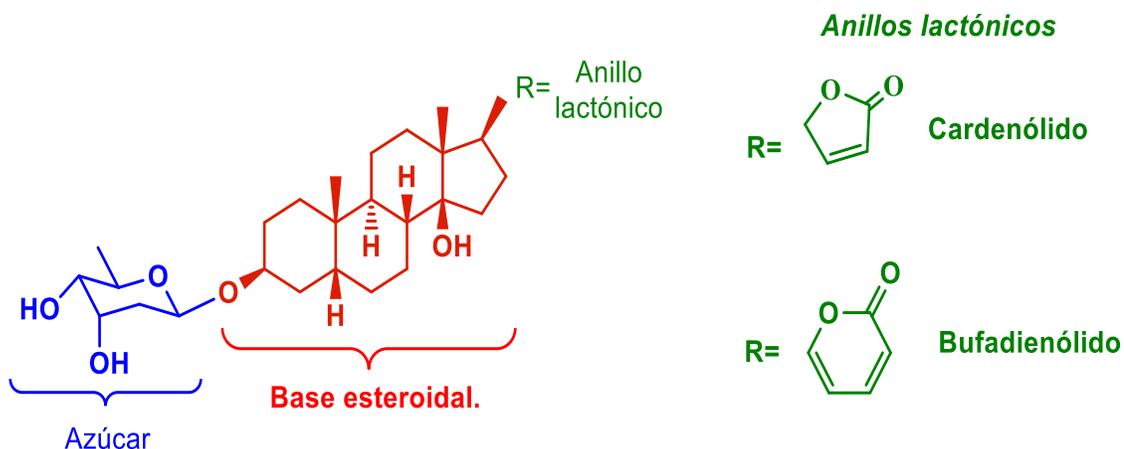


Figura N°6. Clasificación de los glicósidos cardiotónicos de acuerdo al anillo lactónico. (20)

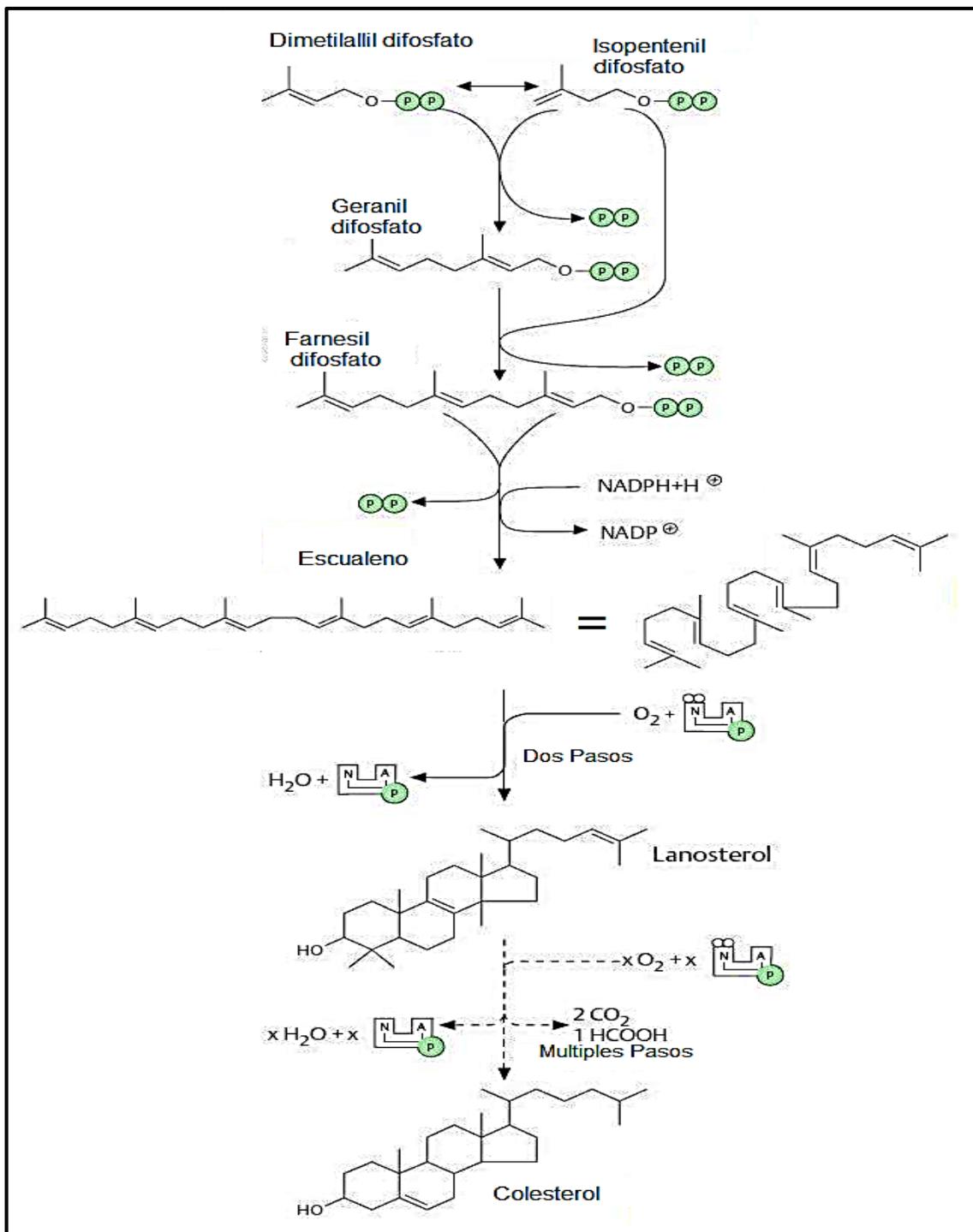


Figura N°7. Biogénesis de Glicósidos Cardiotónicos

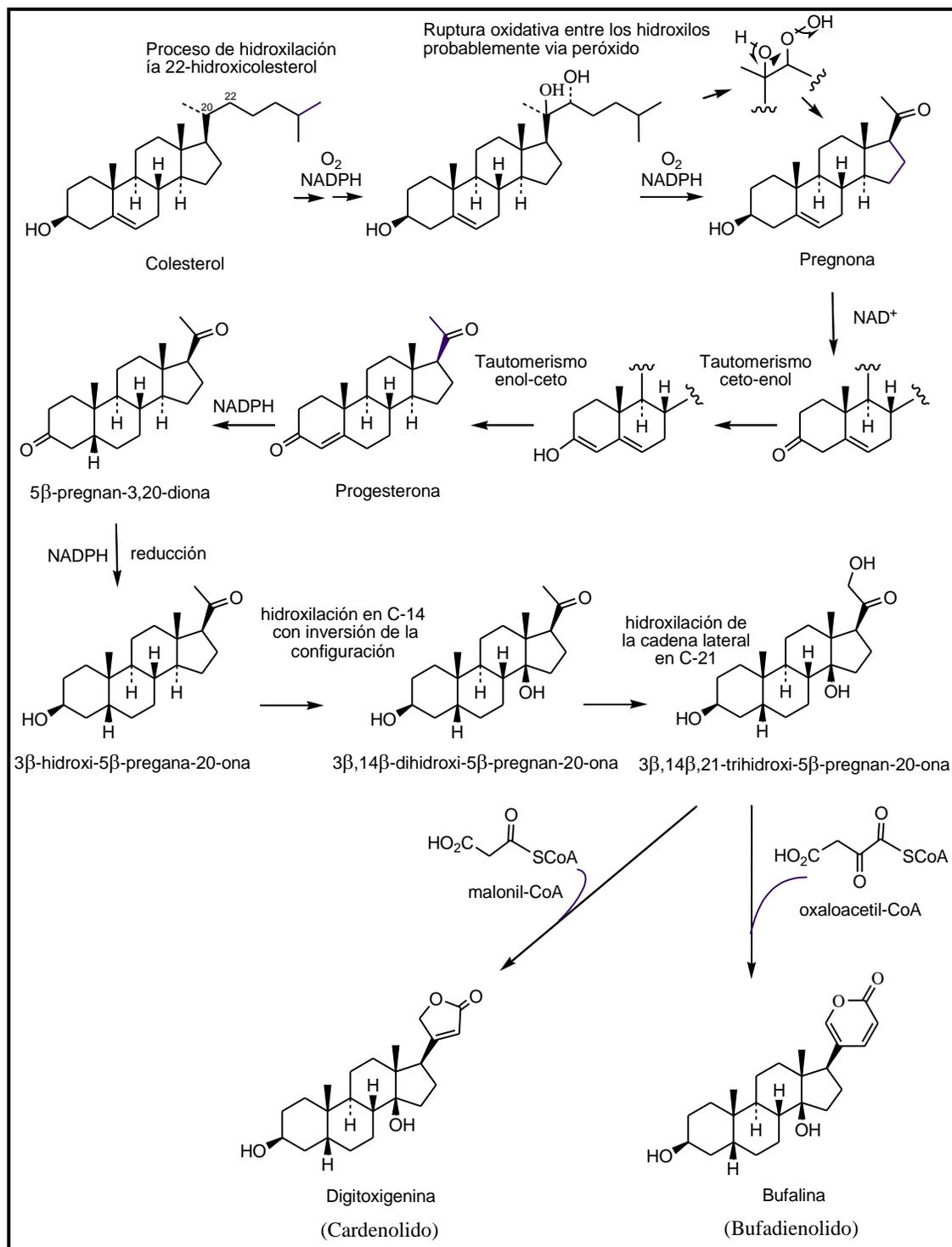


Figura N° 7. Biogénesis de Glicósidos Cardiotónicos (cont.) (8)

3.5.1 Ensayo de identificación

Para la caracterización de los heterósidos cardiotónicos hay una serie de reacciones para determinar la identificación de los azúcares, del anillo esteroideal o del anillo lactónico.

Reacciones coloreadas: permiten identificar los heterósidos cardiotónicos

- **Identificación de los azúcares**

Hay dos tipos de reacciones, las generales, destinadas a detectar la presencia de azúcar, y las específicas de determinados azúcares, como los 2 – desoxiazúcares, que responden a la reacción de Keller – Kiliani (ácido acético, ácido sulfúrico y tricloruro de hierro). Puede observarse un anillo pardo en la interface y una coloración azul – verdosa en la capa acética. Los dos desoxiazúcares también dan positivo en la reacción con el reactivo xantidrol (ácido acético, ácido clorhídrico y xantidrol) produciendo una coloración roja al calentarlo al baño maría.

- **Identificación del núcleo esteroideal**

Son reacciones inespecíficas, es decir, son positivas tanto para los cardenólidos como para los bufanólidos. Destaca la reacción de Lieberman – Burchard (ácido sulfúrico y anhídrido acético) en la que se forma dobles enlaces y se observan coloraciones que van del rojo al rosado. También se pueden utilizar reactivos como el tricloruro de antimonio (reactivo de Carr – Price).

- **Identificación del anillo lactónico**

Hay varias reacciones que permiten detectar los anillos lactónico de cinco miembros, es decir, positivas para los cardenólidos como por ejemplo las reacciones de Baljet (ácido pícrico/hidróxido de sodio), Kedde (ácido 3,5 – dinitrobenzoico/hidróxido de sodio) y Raymond (m – dinitrobenceno). Todos estos reactivos son derivados nitrados del benceno que, en medio básico,

causan la abertura del anillo lactónico y producen una coloración en la interface.

(21)

3.6 MONOGRAFÍAS DE LAS ESPECIES VEGETALES

3.6.1 GENERALIDADES DE *Thevetia ahouai*.

Nombre común: Huevo de gato, Cojón de tigre, Cojón de costa de hojas largas.

Nombre científico: *Thevetia ahouai*.

Familia: Apocynaceae.

Descripción: Arbusto de 2 a 8 m de altura y de 5 a 10 cm de diámetro. Copa irregular y con follaje disperso. Tronco ramificado a baja altura o partir de la base. Corteza exterior blanca o grisácea. Ramas terminales de color verde. El desprendimiento de cualquier parte de la planta produce el flujo de un exudado lechoso. Hojas simples y alternas, concentradas al final de las ramas, de 6 a 25 cm de largo y de 3 a 7 cm de ancho, oblanceoladas, con ápice acuminado, bordes enteros y base cuneada. Pecíolos de 0.3 a 0.6 cm de largo, generalmente con glándulas escamiformes en la base. Inflorescencias en cimas terminales. Flores de color amarillo pálido (ver. Figura 8). Frutos en bayas globosas de 3 a 4 cm de diámetro, verdes, tornándose rojos al madurar (Ver Figura 8).



a)



b)



c)

Figura N° 8. a) Hojas, b) Flores y c) Frutos de *Thevetia ahouai*

Localización: se han reportado especímenes en América Central, México, Sur América y Asia. La especie crece a bajas elevaciones, en climas secos o húmedos, en bosques pantanosos o inundables, a veces a orillas de caminos y carreteras.

Fenología: Florece y fructifica durante todo el año, principalmente a inicios de la estación lluviosa.

Usos Etnobotánicos: presentan cierta actividad antiinflamatoria y antifúngica contra *Fusarium oxysporum*.

Composición química: se ha reportado el aislamiento de: thevetiogenina, 3-O-D-gentiobiosil-(1-4)- α -L-rhamnopiranosido, thevetiogenina 3-O- β -D-glucopiranosil-(1-4)- α -L-rhamnopiranosido, digitoxigenina 3-O- β -D-glucopiranosil-(1-4)- α -L-acofriopiranosido y digitoxigenina 3-O- β -D-glucopiranosil-(1-4)-2"-O-acetil- α -L thevetopiranosido, neriifolina, 3'-O-methilevomonosido y 2'-acetil neriifolina. (4)

3.6.2 GENERALIDADES DE *Thevetia peruviana*

Nombre común: Chilca, Chilindrón, Covadonga, Covalonga, Codo de fraile, Chira, Naranja amarillo, Yoyote, Caballón, Campanilla muerta, Pepa de cruz, Lengua de gato, Yellow oleander.

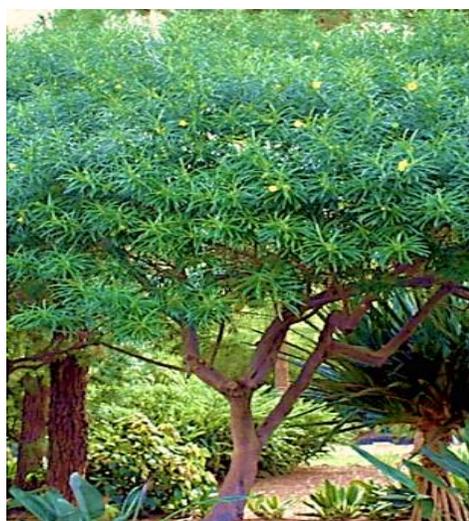
Nombre científico: *Thevetia peruviana*.

Familia: Apocynaceae.

Historia y curiosidades: El nombre científico, *Thevetia peruviana*, está formado por el nombre de género *Thevetia*, dedicado al botánico y misionero francés André Thévet (1502-1590), y el término latino *peruviana*, "peruana, del Perú". Algunas culturas nativas americanas usan las semillas secas para hacer collares y amuletos para atraer la buena suerte.

Descripción botánica: Arbusto de hasta 2–10 metros de altura, hojas simples, alternas, 1-nervias, lineales, de 7 a 15 cm de longitud, y de 5 a 10 mm de ancho, casi sésiles, color verde brillante, y lustrosa en la cara superior, más bien mate en la inferior, nervio central prominente y la nervación lateral oscura (ver Figura N°9). Flor con 5 cáliz partido multiglandularmente en la base, los segmentos de 7 mm de largo, lanceolado-oavados y acuminados (ver Figura N°9). Corola amarilla de 7 cm de largo, funeliforme, con el tubo más corto que

el limbo, cilindro en la parte inferior, portando escamas con pelos, en la parte superior, expandido abruptamente en un cuello campanulado, y 5 anchos lóbulos sinistrorsos. Estambres insertos con las escamas en el extremo superior del tubo, saco de antenas no apendiculares. Disco nulo. Ovario 2-lobado, 2-locular, estilo filiforme, estigma discoideo, su pequeña punta 2-lobada, 2 óvulos en cada cavidad del ovario. Fruto, una drupa triangular comprimida de 3-4 cm de ancho con 2 cm de largo, y de 1 a 1.5 cm de grosor, casi truncada, la carne delgada, el endocarpio óseo, 2-locular. Semilla con una testa gruesa y sin endospermo, verdes al madurar, cambiando luego a negro o morado (ver Figura N°9). (4)



a)



b)



c)

Figura N° 9. a) Árbol, b) Flores y c) Frutos de *Thevetia peruviana*

Cultivo y Usos: se multiplica por semillas. Es planta de rápido crecimiento y muy resistente a condiciones adversas. Se suele cultivar mas como arbusto que como arbolito. Su látex y sus semillas son venenosas. Las semillas contienen glucósidos que actúan como estimulantes cardiacos. Aunque es utilizada en medicina popular localmente, su empleo es muy peligroso. Se cultivan, además de la forma típica de flor amarilla, las variedades “**Alba**” de flor blanca (ver Figura N°10) y “**Aurantiaca**”, de flor anaranjada (ver Figura N°10). (27)



Figura N° 10. Flor de *Thevetia peruviana* a) variedad Alba y b) variedad Aurantiaca

Fenología: Flores y frutos observados de Febrero a Junio. (6)

Localización: Se localiza en América Central, México, la Florida, las Antillas Mayores, algunas de las menores, Sur América y Sur África.

Usos Etnobotánicos: Febrífugos, catártico, emético, antiartrítico, para conciliar el sueño, pérdida de peso; el látex se utiliza para el tratamiento de la sordera, la sarna, las úlceras, dolores de muela, tumores y hemorroides.

Toxicidad: Toda la planta es tóxica para el hombre, los animales y ciertos insectos. La inhalación, ingestión o contacto con las mucosas, con la savia o extractos de la planta puede causar muchas reacciones adversas. En este

sentido diversos autores han referido irritación de las mucosas, eritema bucal, náuseas, vómitos, salivación profusa, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, alteraciones mentales, disturbios visuales, midriasis, neuritis periférica y síntomas cardiovasculares (bloqueo sinusal y auriculo-ventricular), como resultado de la ingestión.

Composición química: contiene glicósidos cardiotónicos como: thevetina A, thevetina B, thevetoxina, peruvosido, ruvosido, neriifolina, thevefolina, cerberina, peruvosido 2'- monoacetato, acetilthevetina B, teveneriina, cerberosido, glucoperuvosido, thevebiosido, acetilneriifolina, perusitina, acetilthevetina B, acetilthevebiosido B y el diacetato de la nerifolina. (4)

3.6.3 GENERALIDADES DE *Calotropis procera*. (19)

Nombre común: Huevos de toro, Matacoyote, Algodón de seda, Algodón de playa y Huevos de chucho.

Nombre Científico: *Calotropis procera*.

Familia: Asclepiadaceae.

Origen y distribución: Es originaria de Asia y África. En el norte de África este árbol es común, llegando a formar bosquetes claros en el Sahara occidental, central y meridional. En el Valle del Sous aparecen dispersos por las partes más secas al sur del río. Actualmente se encuentra naturalizada en las islas del Caribe y áreas tropicales de América. En El Salvador se encuentra ampliamente distribuida en la zona costera y otras de clima árido. Como por ejemplo, en los Departamentos de Ahuachapán, Morazán y La libertad.

Descripción botánica: Es un pequeño árbol perennifolio, hermafrodita de hasta 4-6 m de altura, con porte erguido. Copa más o menos redondeada, tronco bien definido, recto a un poco tortuoso, con característica corteza suberosa agrietada que recuerda a la del alcornoque, pero de color blanco.

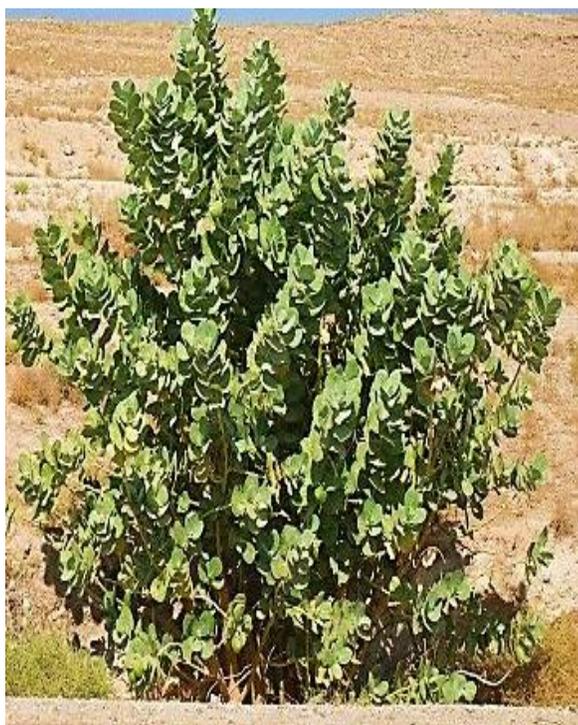
Ramas extendidas erguidas, las viejas cubiertas con la corteza suberosa blanquecina, las más jóvenes verdosas, cubiertas de un denso tomento de pelos blancos. Hojas opuestas, sencillas grandes oval-elípticas, con ápice más o menos redondeado o agudo, generalmente acuminado y base más o menos anchamente redondeada, con el margen entero; planas, jóvenes son cubiertas de un tomento algodonoso, luego glabrescentes, de color verde intenso por el haz, con nerviación muy marcada, pubescente – puberulentas y verdoso – blanquecinas por el envés, sésiles, un poco amplexicaules, o con un pecíolo muy corto (ver Figura N°11). Inflorescencia en densas cimas axilares al final de las ramas con flores de 2-3 cm. de diámetro, con pedicelos pubescentes, blanquecinos, de unos 2 cm. de largo (ver Figura N°11). Cáliz dividido hasta la base con 5 pétalos oval-trianguares que se abren perpendicularmente, por fuera blanquecinos, por dentro con base y márgenes blanquecinos y parte media y superior purpúrea. Disco nectarífero pentagonal, blanquecino-amarillento, de sus lados nacen 5 estambres más o menos purpúreos. Fruto grande subglobuloso (ver Figura N°11), floración generalmente después de las lluvias. Fructificación 1 o 2 meses después de la floración, pudiendo verse ejemplares con flores y frutos casi maduros al mismo tiempo (ver Figura N°11).



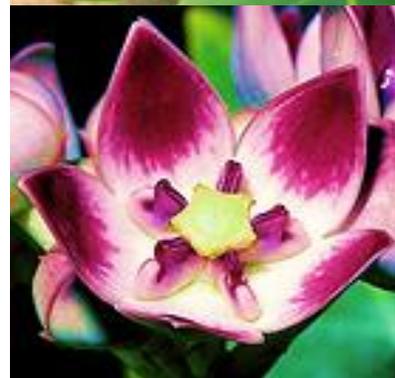
a)



b)



c)



d)

Figura N°11. a) Frutos, b) Semillas) Árbol y d) Flores de *Calotropis procera*

Hábitat: Llanuras pedregosas o limoso-arenosas, en ambiente desértico y especialmente en depresiones de ríos.

Usos Etnobotánicos: La corteza de la raíz en polvo se utiliza para tratar la disentería. Tiene un efecto similar a la de la raíz de ipecacuana. En la medicina popular de la India y de África, la corteza se utiliza para tratar la epilepsia, la histeria, los calambres, el cáncer, las verrugas, la lepra, la elefantiasis, gusanos, fiebre, gota y mordeduras de serpientes. En particular, el jugo lechoso se utiliza contra forúnculos, úlceras, inflamaciones y el reumatismo. En África, se utiliza para tratar el dolor de muelas, sífilis, trastornos digestivos y la diarrea. El humo (humos) de la corteza se utiliza para la tos y el asma y como sudorífico.

Composición Química: Estudios fitoquímicos han demostrado que dentro de los compuestos que posee la *C. procera*, se encuentran: flavonoides, polifenoles, triterpenos, esteroides y glicósidos cardiotónicos. Dentro de los terpenos aislados se encuentran: calotropterpenil, un norditerpenil ester y dos triterpenos pentacíclicos: acetato de calotropursenilo y acetato de calotropfriedenilo. Además se encuentran presentes los glicósidos cardiotónicos: calotropina, calactina, uscharidina, uscharina, calotoxina, uzarigenina, proceragenina, voruscharina, siriogenina, procerocido, calotropagenina y un artefacto derivado de calotropagenina. (20)

3.6.4 GENERALIDADES DE *Asclepias curassavica*

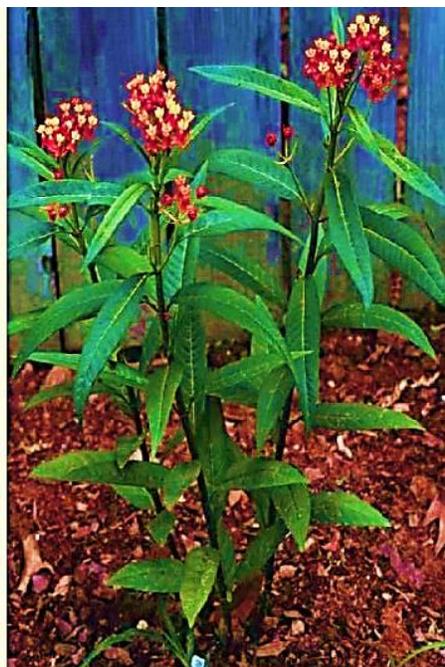
Nombre Común: Adelfilla, burladora, calderona, cancerillo, cerillo, chilillo, chilillo venenoso, cinco llagas, cojón de gato, cominos rústicos, contrayerba, cresta de gallo, flor de tigre, hierba de la culebra, hierba del sapo, hierba María, hoja delgada, la señorita, Pablito, pericón, ponchilhuite, ponchiuis, revienta muelas, rompe muelas, saca espinas, salvilla, San Pablillo, Santa Rosa, señorita, soldaditos, soldadillo, solimán, venenillo, vevenillo, víbora, viborona.

Nombre Común: *Asclepias curassavica*.

Familia: Asclepiadaceae.

Origen y distribución: Hábitat: Es originaria de Sudamérica. Habita en climas cálido, semicálido, seco y templado desde el nivel del mar y hasta 700m y de los 1000 hasta los 1900 msnm. Observada en terrenos baldíos, cerca de casas o a orillas de caminos y riachuelos, asociada a borde de manglar, bosques tropicales caducifolio, y perennifolio, en matorral xerófilo, pastizal inducido, bosques mesófilo de montaña.

Descripción Botánica: Es una hierba que mide de 50 cm a 1.60 m de altura (ver Figura N°12). Sus tallos tienen abundante jugo lechoso. Las hojas opuestas y a veces 3 verticiladas, peciolo corto; lanceoladas de 6 a 13 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, otras oblongo – lanceoladas, en el envés presentan color verde pálido. Las flores pequeñas están agrupadas y salen de un mismo punto formando inflorescencias que parecen sombrillas; son de color amarillento y rojo-naranja muy llamativas; cuando están en botón son de color rojo y cuando abren los pétalos se doblan hacia abajo quedando los estambres arriba, con la apariencia de que la flor está volteada (ver Figura N°12). EL fruto es un folículo verde miden de 5 a 7cm de largo, ahusado, glabro o ligeramente pubescente con numerosas semillas ovaladas, comprimidas lateralmente color claro con vilano sedoso, largo y brillante (ver Figura N°12). (30)



a)



b)



c)



d)

Figura N° 12. a) Árbol, b) Flores, c) Fruto y d) Semilla de *Asclepias curassavica*

Fenología: Flores observadas todo el año. Frutos observados en Enero, Febrero, de Junio a Julio y en Octubre.

Usos Populares: Las raíces y los extractos de la planta entera tienen propiedades antihemorrágicas, antitumorales, astringentes, cardiotónicas, catárticas, depurativas, eméticas, febrífugas, fungicidas, hemostáticas, insecticidas, laxantes, vermífugas y vulnerarias; éstos se han empleado para tratar el cáncer, cefaleas, escabies, fiebre, gonorrea, hemorroides, lepra, leucorrea, tuberculosis y verrugas. La savia puede causar dermatitis en individuos de piel sensible. (5)

Composición química:

Dos tipos de componentes químicos se han detectado en esta planta, alcaloides y glicósidos cardiotónicos del tipo cardenólidos. De estos últimos la asclepina, la curassavicina, la calactina y la calotropina se han identificado en la planta completa (los dos últimos también en las hojas), además de tres alcaloides derivados de la 2 metoxi-pirazina.

De las hojas se han aislado los cardenólidos ascurogenina, calotropagenina, clepogenina, coroglancigenina, corotoxigenina, curasavogenina y uzarigenina. De las hojas y el látex la calotoxina, uscaradina y uscarina y solamente en el látex, cakotropagenina y voruscarina, también cardenólidos. (30)

3.7 GENERALIDADES DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La cromatografía en capa fina es un método simple, eficiente y que no necesita de un equipo sofisticado para su ejecución. La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues, un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la

extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

Para la realización de la cromatografía en capa fina se debe tomar en cuenta:

– **Aplicación de las muestras**

Los productos a examinar se disuelven, 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 μL resulta en la carga 20 μg de producto sólido. Muchos reactivos de revelado llegan a detectar 0.1 μg de material; por esto con esta carga puede llegarse a observar un 5% de impurezas.

Se usan tubos capilares y el proceso de siembra se realiza tocando con la punta del capilar (micropipeta, 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.

– **Elección del eluyente**

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

El siguiente cuadro (ver cuadro N°2) muestra los diferentes eluyentes mas utilizados en cromatografía de capa fina de acuerdo a la polaridad del solvente a utilizar en orden creciente (de menor a mayor).

Cuadro N°2. Serie Eluotrópica de solventes

Orden de polaridad 	No polar	n – pentano
	n- hexano	
	Iso – octano	
	Ciclohexano	
	Ciclopentano	
	Tetracloruro de carbono	
	Éter isopropilico	
	Tolueno	
	Benceno	
	Cloroformo	
	Diclorometano	
	Metil Iso – butil cetona	
	Tetrahidrofurano	
	Éter dietílico	
	Acetona	
	Acetato de etilo	
	Acetato de metilo	
	Alcohol amílico	
	Anilina	
	Acetonitrilo	
Piridina		
1 – propanol		
2 – propanol		
Etanol		
Metanol		
Acido acético		
Polar	Agua	

En la elección del eluyente influyen varios factores:

- Precio.
- 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 (ver Figura N°13).

- a) Toque de la muestra sin aplicar ningún eluyente.
- b) Aplicando un eluyente poco polar (si la muestra es polar).
- c) Aplicando un eluyente más polar (si la muestra es polar).

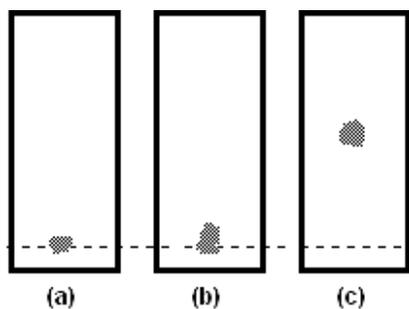


Figura N° 13. Cromatoplasmas eluidas

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.

– **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 cubeta. 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. 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 *RF*. Frecuentemente esta distancia es de 10 cm.; parece ser la más conveniente para medir valores de *RF*. 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 aislado de la luz.

– **Revelado de componentes químicos**

Si los compuestos separados no son coloreados es necesario revelar la posición de dichos compuestos, para ello existen dos tipos de métodos:

- **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.

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 por 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 estos reveladores generales, existen otros específicos:

- a) 2,4 - dinitrofenilhidracina (para aldehídos y cetonas).
- b) Verde de bromocresol (para ácidos carboxílicos).
- c) Paradimetilaminobenzaldehído (para aminas).
- d) Ninhidrina (para aminoácidos).
- e) Kedde (para lactona insaturada)

- **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.

La cromatografía en capa fina sirve para identificar los componentes de extractos vegetales y tinturas e igualmente para que en una formulación farmacéutica sea posible identificar la presencia de los componentes en los extractos vegetales. Cuando los principios activos de una droga no son conocidos, la identificación de la droga puede ser realizada a través de la determinación de sustancias características de la planta en cuestión, aunque no tengan actividad farmacológica. Estas sustancias denominadas marcadores (o marcadores positivos), son seleccionadas entre los compuestos característicos de la planta. El uso de ellas debe limitarse solamente a la identificación de los componentes de los extractos vegetales y de las tinturas.

Las farmacopeas están incrementando la utilización de la cromatografía en capa fina (CCF) o TLC como un medio para asegurar la identidad y pureza. Basta mencionar aquí que el valor R_f (factor de migración de una determinada sustancia en un solvente dado, es igual a la distancia recorrida por la sustancia dividida entre la distancia recorrida por el frente del solvente) de un compuesto, determinada bajo condiciones específicas, es característica y puede ser usada como una ayuda a su identidad. ⁽¹⁹⁾

3.8 GENERALIDADES DE LA ACTIVIDAD SUPRESORA DE APETITO

La obesidad del adulto se ha incrementado significativamente en los últimos tiempos. Por ejemplo, los informes recientes estiman que alrededor del 64 por ciento de los estadounidenses tienen sobrepeso. Informes similares sugieren que la mala alimentación y la inactividad están a punto de convertirse en la principal causa evitable de muerte entre los estadounidenses. Por lo tanto, obesidad y trastornos relacionados con la obesidad como la diabetes tipo II,

hipercolesterolemia, y/o síndrome metabólico (también conocido como síndrome X) son problemas significativos para las sociedades modernas.

El síndrome metabólico no es una enfermedad en sí, sino más bien la presencia colectiva en un individuo de los factores de riesgo como la obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, hipertensión arterial, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, condiciones proinflamatorias y condiciones protrombóticas. Cuando uno o más (en particular, tres o más) de estos factores de riesgo está presente, el individuo tiene un mayor riesgo de una variedad de estados de enfermedad incluyendo la diabetes, enfermedades del corazón, y / o un derrame cerebral. Las personas que tienen el síndrome metabólico también son susceptibles a otras enfermedades como el síndrome de ovario poliquístico, hígado graso, cálculos biliares de colesterol, asma, trastornos del sueño, y algunas formas de cáncer. La mayoría de los profesionales consideran que la reducción de peso sea una "terapia" primaria para el tratamiento del síndrome metabólico. La reducción de peso también se considera para ser una terapia eficaz para el tratamiento de la obesidad y trastornos relacionados con la obesidad incluyendo, pero no limitado a, la diabetes y la hipercolesterolemia tipo II.

Por lo tanto, el apetito es una importante vía de reglamentación que puede ser dirigido a tratar la obesidad y los trastornos relacionados con la obesidad. Varias formulaciones capaces de suprimir el apetito están disponibles comercialmente. Muchas de estas formulaciones supresoras del apetito contienen una mezcla de efedra y cafeína.

Aunque las formulaciones supresoras del apetito que contienen estas mezclas son eficaces, poseen efectos secundarios potencialmente peligrosos que están asociados con la administración de la efedra, sobre todo cuando su uso se combina con estimulantes como la cafeína. En vista de los efectos secundarios potencialmente peligrosos antes mencionados, la Food and Drug Administration

de EE.UU. prohibió la venta de suplementos dietéticos que contienen efedra. Por lo tanto, se necesitan formulaciones supresoras del apetito que sean más seguras ⁽¹⁶⁾. Por tal razón se han realizado estudios en plantas como la *Hoodia sp* que ha tenido un gran impacto en el mundo porque contiene compuestos que presentan una actividad supresora del apetito muy eficiente, sin hacer mucho daño a los seres humanos a las dosis adecuadas. El control del apetito presenta un nuevo objetivo emocionante en la obesidad y otras enfermedades como el síndrome metabólico. Enfoques farmacéuticos están todavía en sus primeras etapas. Los glucósidos pregnano en *Hoodia* ejercen supresión del apetito tales efectos a través de la señalización hipotalámica mejorada, pero esta planta corre el riesgo de extinción. ⁽²⁷⁾ Por ello, estudiamos cuatro plantas que pueden contener estos compuestos y se obtengan resultados parecidos a los observados en *Hoodia sp* para así tener formulaciones supresoras del apetito que sean más seguras.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

La presente investigación se puede catalogar como:

Estudio retrospectivo: porque se utilizó información de trabajos anteriores sobre estas plantas medicinales para seguir desarrollando investigaciones.

Estudio prospectivo: porque a través del tiempo se estudiaron varias variables y sus resultados se utilizarán para nuevos trabajos de investigación.

Estudio experimental: ya que el desarrollo del trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador

Además es **hipotético-deductivo** ya que a partir de la información retomada de las referencias bibliográficas, permite formular la siguiente hipótesis:

- Los once extractos diclorometánicos de los órganos de las especies *Asclepias curassavica* (Señorita viborana), *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia ahouai* (Huevos de gato), *Thevetia peruviana* (Chilca) poseen compuestos esteroideos.

La metodología del presente estudio se dividió en tres etapas:

- 1) Investigación bibliográfica
- 2) Investigación de campo
- 3) Parte Experimental

4.1.1 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

- Se realizaron consultas de libros, trabajos de graduación, manuales etc. en la biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El

Salvador. Biblioteca de Química y Farmacia-Biología en la Universidad Alberto Masferrer.

- Revistas científicas, Ej: Pharmaceutical Society of Japan, Journal of Ethnopharmacology, Journal of Nutrition and Metabolism, entre otras.
- Libros, enciclopedias en el Herbario del Jardín Botánico La Laguna.
- Internet: páginas web como trópico.com

4.1.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO.

4.1.2.1 Universo: Plantas medicinales que contienen compuestos esteroideos.

4.1.2.2 Muestras: Se seleccionaron cuatro plantas pertenecientes a dos familias botánicas, tal como se detalla a continuación:

- Dos especies botánicas de la familia Asclepiadaceae que son: *Asclepias curassavica* (Señorita Viborana) y *Calotropis procera* (Matacoyote).
- Dos especies botánicas de la familia Apocinaceae que son: *Thevetia ahouai* (Huevos de gato) y *Thevetia peruviana* (Chilca).

- Muestras Vegetales

Los órganos vegetales con los cuales se realizó el trabajo son:

Cuadro N°3. Órganos utilizados de las muestras vegetales

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Especie vegetal Órganos </div>	Raíz	Hojas	Fruto (Epicarpo)	Semillas
<i>Asclepias curassavica</i> (Señorita viborana)		X		
<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	X	X	X	X
<i>Thevetia ahouai</i> (Huevos de gato)		X	X	X
<i>Thevetia peruviana</i> (Chilca)		X	X	X

- **Identificación de las muestras vegetales:** De las especies botánicas en estudio, fueron identificadas en trabajos de graduación anteriores (ver anexo N°2): *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia ahouai* (Huevos de gato) y *Thevetia peruviana* (Chilca) en el Jardín Botánico La Laguna con ayuda del Botánico experto del lugar. Para completar esta información de identidades botánicas fueron llevadas también muestras de Señorita viborana al Jardín Botánico La Laguna.

- **Recolección de muestras**

La recolección de los frutos y hojas de *Thevetia ahouai* (Huevos de gato) y *Thevetia peruviana* (Chilca) se realizó en:

- *Thevetia ahouai* (Huevos de gato), en Jardín de la Universidad de El Salvador, en salida de la Facultad de Ciencias y Humanidades frente a Administración Nacional De Acueductos y Alcantarillados (ANDA), San Salvador, El Salvador.
- *Thevetia peruviana* (Chilca), en Jardín de la Universidad de El Salvador, frente al edificio del Programa de Jóvenes Talento, San Salvador, El Salvador.

Para *Calotropis procera* (Matacoyote), la recolección de los frutos, hojas y raíz se realizó en:

- La raíz, en el Kilómetro 40.5 Playa el Majahual puerto de La Libertad, La Libertad, El Salvador.
- Las hojas y frutos, en el Kilómetro 44 carretera a Zacatecoluca, El Salvador.

La recolección de las hojas de *Asclepias curassavica* (Señorita viborana) se realizó en:

- Colonia Santa María pasaje 19 San Martin, San Salvador, El Salvador.

Tomando en cuenta que las diferentes plantas recolectadas contienen látex, se utilizó equipo de protección ya que podía producir alergias u otras reacciones adversas.

4.1.3 PARTE EXPERIMENTAL.

4.1.3.1 Preparación previa, secado y mólido de las muestras vegetales

- **Raíz de *Calotropis procera*** (Matacoyote) fraccionar en pedazos pequeños para facilitar el secado, después de secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días, separar la corteza de la médula, ya que esta es la que se utilizó para este estudio; por último, se molió y se pesó.
- **Hojas de *Calotropis procera*** (Matacoyote) se limpiaron con un paño para eliminar cualquier contaminante, después se colocaron a secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días y por último, se molieron y se pesaron.
- **Frutos de *Calotropis procera*** (Matacoyote) se limpiaron con un paño, posteriormente separar el epicarpo y la semilla; los epicarpes se cortaron en pequeñas fracciones para que el secado fuese mejor. A las semillas se les eliminó el vilano sedoso que poseían y se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días, luego se molieron y se pesaron.
- **Hojas de *Asclepias curassavica*** (Señorita Viborana) se limpiaron con un paño para eliminar cualquier contaminante, después se colocaron a secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días y por último, se molieron y se pesaron.
- **Hojas de *Thevetia ahouai*** (Huevos de gato) y ***Thevetia peruviana*** (Chilca) se les realizó el mismo tratamiento que las hojas de ***Asclepias curassavica*** (Señorita Viborana).

- **Frutos de *Thevetia ahouai*** (Huevos de gato) y *Thevetia peruviana* (Chilca) se les realizó el siguiente proceso:

Para *Thevetia ahouai* (Huevos de gato):

- a) Separar los epicarpes y mesocarpo del endocarpo.
- b) Eliminar el mesocarpo de color blanco de los epicarpes de color rojo con ayuda de una microespátula.
- c) Eliminar el mesocarpo con ayuda de una microespátula para dejar libre las semillas.
- d) En los casos de los epicarpes, fraccionar en pedazos pequeños para así obtener un mejor secado del material vegetal, después de secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días, se molieron y se pesaron.

Para *Thevetia peruviana* (Chilca):

- a) Separar los epicarpes y mesocarpo del endocarpo.
- b) Eliminar con ayuda de un martillo mediante golpecitos el endocarpo de las semillas.
- c) En los casos de los epicarpes, fraccionar en pedazos pequeños para así obtener un mejor secado del material vegetal, después de secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días, se molieron y se pesaron.

Las semillas de las dos especies se colocaron a secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días, luego se trituraron y pesaron.

Para un mejor manejo de las muestras en la investigación, se codificaron según el siguiente cuadro:

Cuadro N° 4. Codificación de los órganos de las muestras vegetales.

N°	Planta	Órgano	Código asignado
1	<i>Thevetia peruviana</i> (Chilca)	Hojas	TpH
2	<i>Thevetia peruviana</i> (Chilca)	Epicarpos	TpE
3	<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	Hojas	CpH
4	<i>Thevetia ahouai</i> (Huevos de gato)	Hojas	TaH
5	<i>Thevetia ahouai</i> (Huevos de gato)	Semillas (Almendras)	TaA
6	<i>Thevetia peruviana</i> (Chilca)	Semillas (Almendras)	TpA
7	<i>Asclepias curassavica</i> (Señorita viborana)	Hojas	AcH
8	<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	Epicarpos	CpE
9	<i>Thevetia ahouai</i> (Huevos de gato)	Epicarpos	TaE
10	<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	Semillas	CpS
11	<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	Raíz	CpR

4.1.3.2. Obtención de los extracto Diclorometánicos

Cada una de las muestras molidas, once en total fueron sometidos a un proceso de extracción en Soxhlet, utilizando de cada muestra molida la cantidad que se presenta en el cuadro N°3. El volumen utilizado de disolvente fue aproximadamente entre 340 mL a 750 mL según la cantidad de muestra y sus características específicas.

Cuadro N°5. Código y peso de las muestras molidas

N°	Código asignado	Peso de muestras molidas (g)
1	TpH	31.8
2	TpE	47.0
3	CpH	25.8
4	TaH	21.4
5	TaA	39.9
6	TpA	56.1
7	AcH	29.9
8	CpE	35.2
9	TaE	15.0
10	CpS	41.5
11	CpR	40.1

Se realizó la extracción durante 13 horas aproximadamente y luego se concentró el extracto en rotaevaporador hasta llegar a un volumen final de 100 mL según el esquema siguiente:

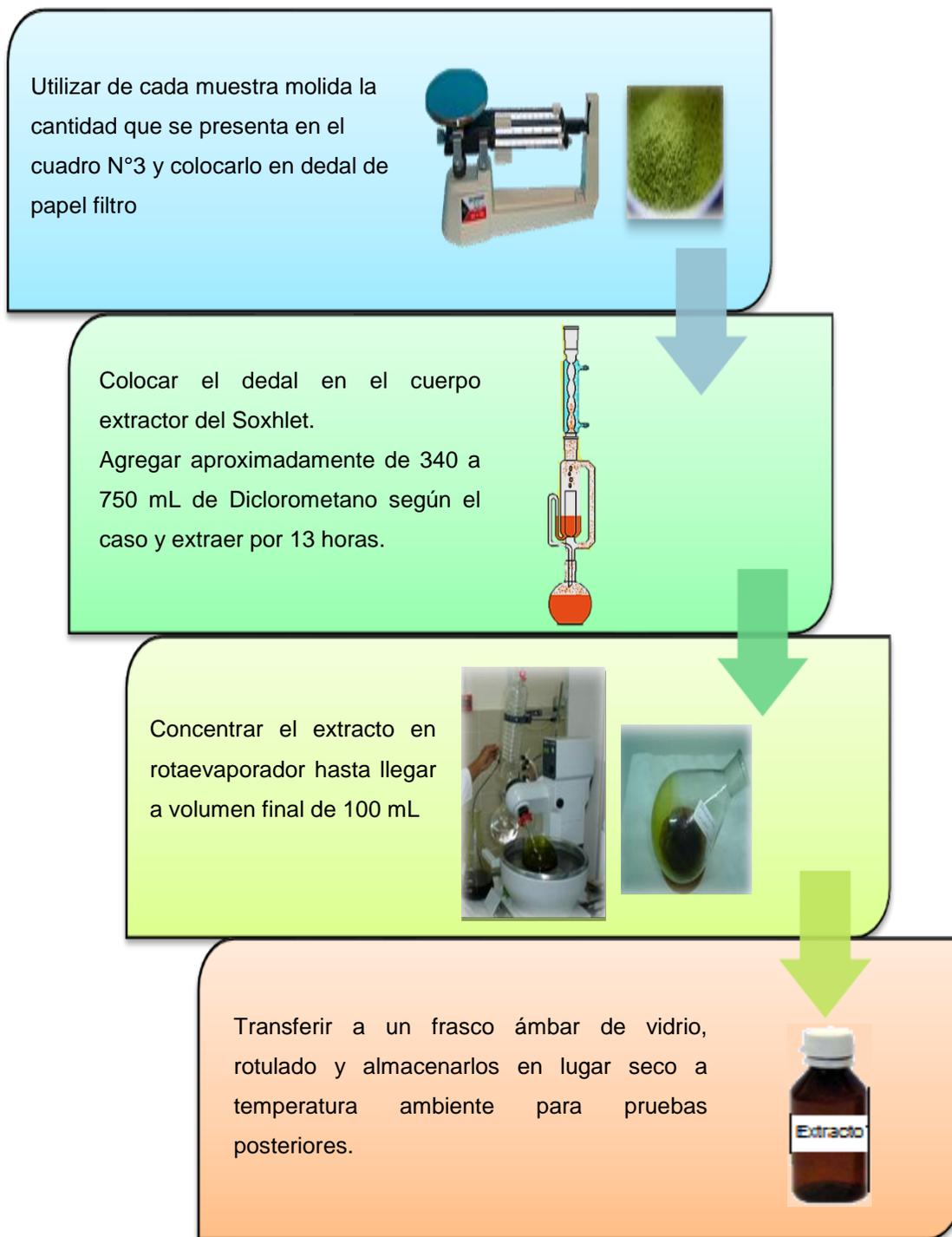


Figura N°14. Obtención de los Extractos de las muestra

4.1.3.3 Identificación de glicósidos saponínicos en los 11 extractos, mediante las pruebas químicas:

- Prueba de Salkowski

Tomar 3 mL de extracto agregarlo a un tubo de ensayo limpio y colocarlo en baño de hielo, luego agregar gota a gota de 5 a 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado, por las paredes del tubo (no agitar) y observar la formación de un anillo coloreado

- Prueba de Liebermann-Burchard

Tomar 20 mL del extracto agregarlo en un beaker de 50 mL y efectuar la hidrólisis añadiendo 10 mL de ácido sulfúrico 10%, calentar cuidadosamente por 20 minutos dentro de una cámara de extracción de gases empleando un baño María; si el extracto tiende a formar grumos agregar una pequeña cantidad de agua destilada, enfriar y colocar en un embudo de separación, extraer con 15 mL de cloroformo agregado por las paredes del embudo y luego recolectar la capa clorofórmica en un recipiente. Repetir este procedimiento con otros 15 mL de cloroformo, y reunir las capas clorofórmicas. Agitar la ampolla de separación adecuadamente y con precaución para evitar la formación de emulsiones; y si aun así se formara emulsión, aplicar las técnicas para rompimiento de ésta. Agregar sulfato de sodio anhidro a las capas clorofórmicas y luego filtrar en papel filtro.

Concentrar la fase clorofórmica hasta 5 mL en baño de maría dentro de la cámara de extracción de gases. Tomar 2 mL del extracto concentrado y agregarlo en un tubo de ensayo limpio y seco. Colocar el tubo en un baño de hielo y luego añadir 1 mL de anhídrido acético, cuidadosamente sin agitar y por las paredes del tubo agregar gota a gota ácido sulfúrico concentrado hasta formación de un anillo. Observe el color del anillo formado.

4.1.3.4 Preparación de muestras previo al análisis de Cromatografía en Capa Fina

- Colocar 10.0 mL del extracto en un vial
- Concentrar en baño María hasta 2.0 mL.
- Dejar enfriar y proceder a la cromatografía.

4.1.3.5 Preparación de testigo para Cromatografía en Capa Fina (Progesterona) Ver anexo N° 4 (Monografía).

- Pesar 0.1 g de Progesterona
- Disolver con 1.0 mL de Cloroformo.
- Proceder a la cromatografía.

4.1.3.6 Fraccionamiento por partición líquido – líquido de las muestras de semilla de *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia peruviana* (Chilca) y *Thevetia ahouai* (Huevos de gato).

Pesar 0.5 g en un beaker de 100 mL de extracto oleoso de cada una de las semillas de las especies vegetales, agregar 50 mL de etanol 90° y disolver completamente haciendo uso de sonicador. Luego transferir a una ampolla de separación y añadir 50 mL de *n* – Hexano. Agitar la ampolla de separación adecuadamente y con precaución para evitar la formación de emulsiones, colectar ambas fases en beakers previamente rotulados. Concentrar ambas fases hasta 5 mL en baño de maría dentro de la cámara de extracción de gases. Luego desarrollar la cromatografía en capa fina.

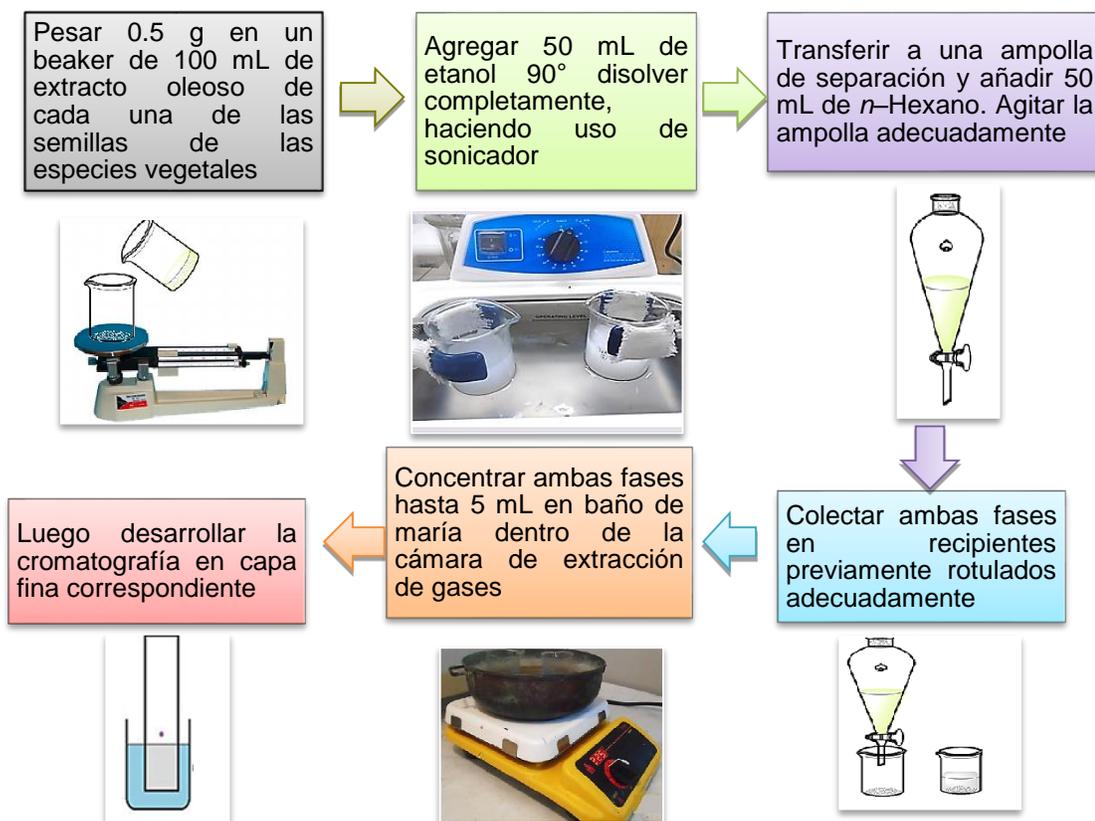


Figura N° 15. Marcha Analítica Fraccionamiento por partición líquido-líquido de las muestras de semilla de *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia peruviana* (Chilca) y *Thevetia ahouai* (Huevos de gato).

4.1.3.7 Identificación de anillo esteroidal mediante Cromatografía de Capa Fina, en los 11 extractos.

- **Fase estacionaria:** Sílica gel GF₂₅₄ Merck, folios de aluminio 20 x 20 cm.
- **Fase móvil:** Tolueno – *n*-Hexano – Etanol 90° (4:4:2).⁽¹⁴⁾
- **Muestra:** 8 extractos diclorometánicos y 3 fracciones etanólicas de semilla.
- **Testigo:** Solución clorofórmica de Progesterona.
- **Revelador:** Vainillina – Ácido Sulfúrico al 5% (ver anexo N°3).⁽¹⁸⁾
- **Evidencia positiva:** Manchas de color Amarillo, café - amarillo, violeta, azul - violeta, azul y café.⁽³⁶⁾

- Procedimiento:

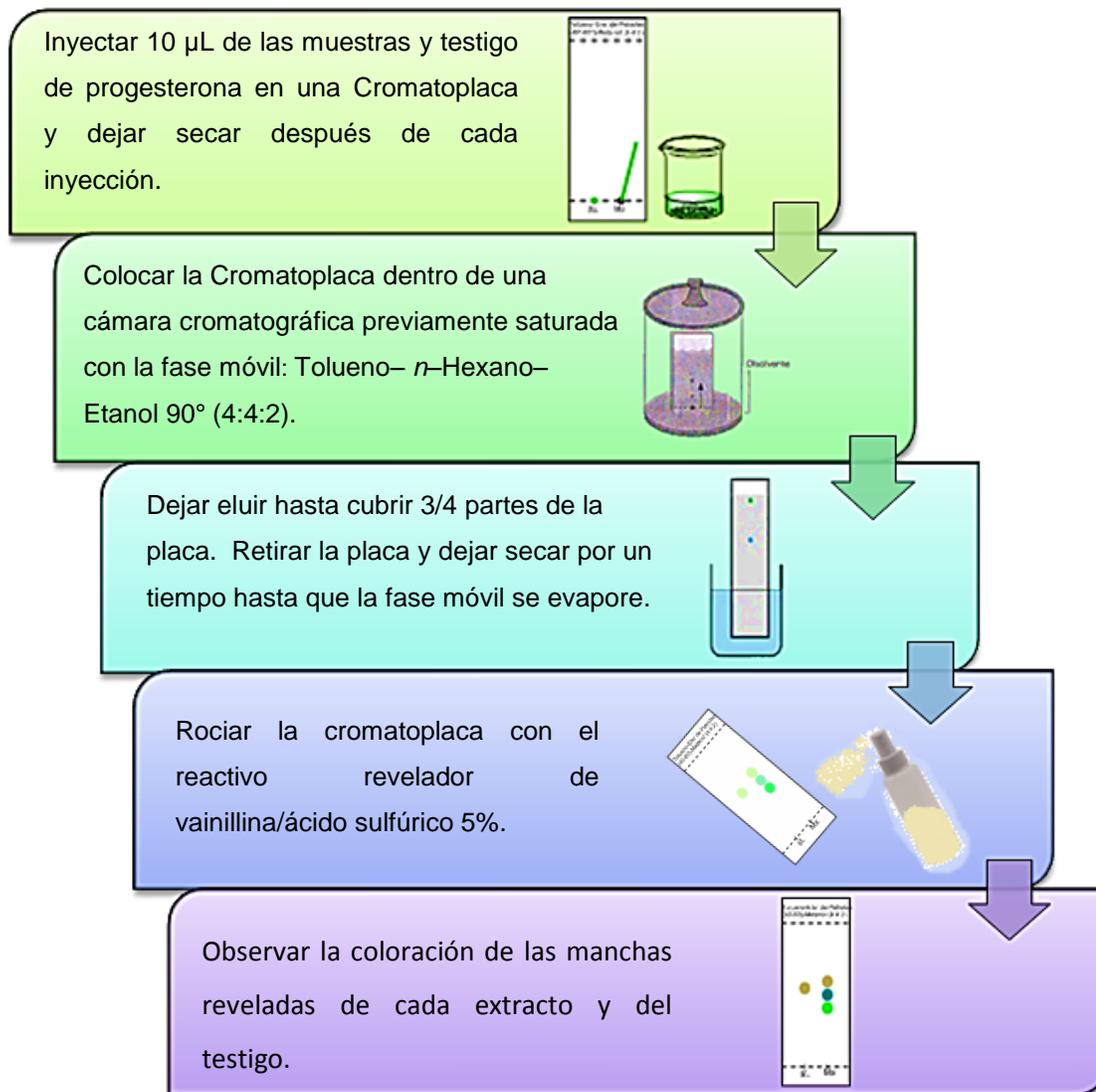


Figura N° 16. Marcha analítica de Identificación de anillo esteroideal

4.1.3.8 Confirmación de la ausencia de anillo lactónico mediante Cromatografía de Capa Fina, en los 11 extractos.

- **Fase estacionaria:** Sílica gel GF₂₅₄ Merck, folios de aluminio 20 x 20 cm.
- **Fase móvil:** Tolueno – *n*-Hexano – Etanol 90° (4:4:2). (14)

- **Muestras:** Ocho extractos diclorometánicos y tres fracciones etanólicas de semilla.
- **Revelador:** Reactivo Kedde A y Kedde B (ver anexo N°3) (18)
- **Evidencia:** Manchas de color violeta o moradas.
- **Procedimiento:**

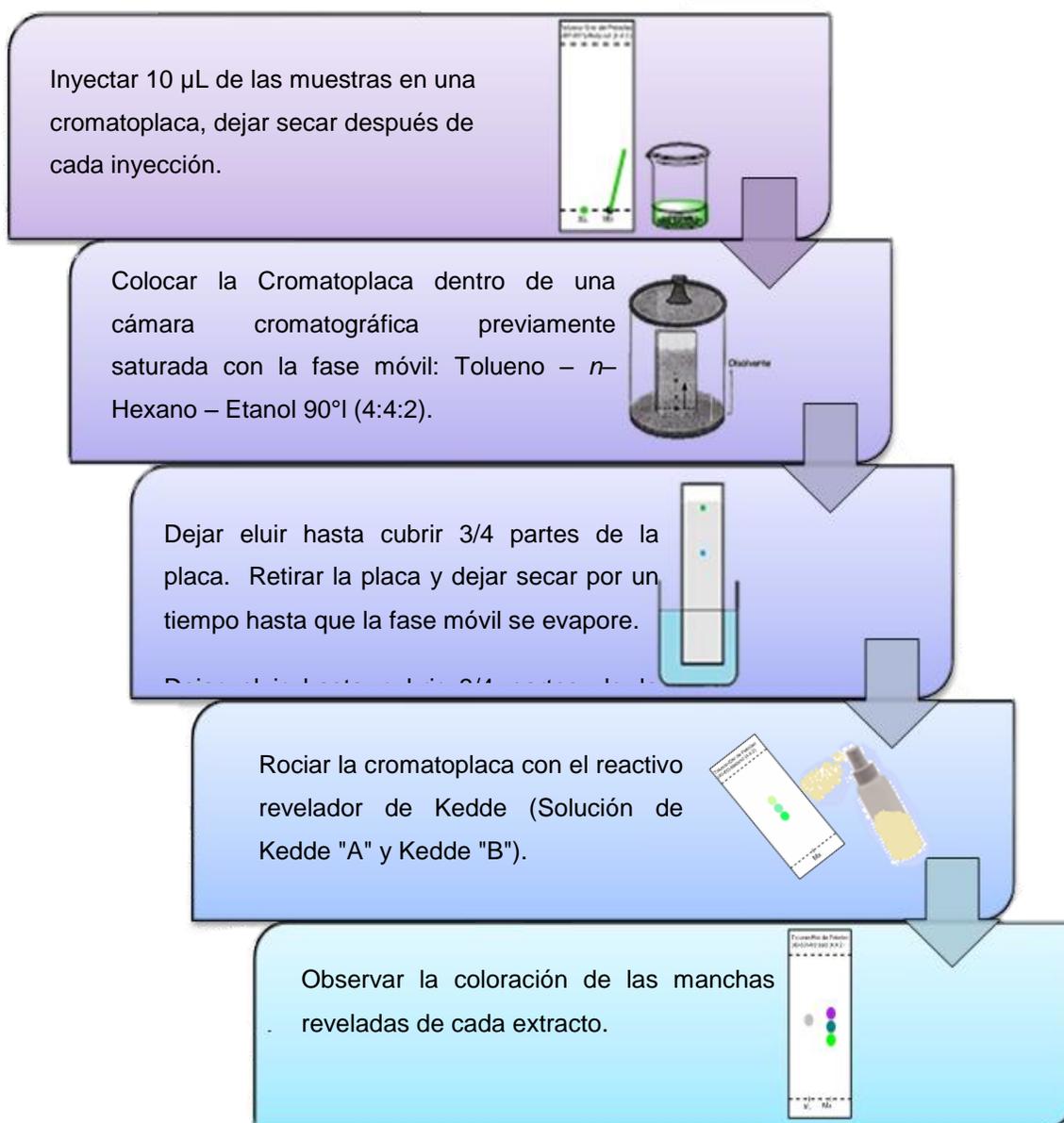


Figura N° 17. Marcha analítica de confirmación de ausencia de anillo lactónico

4.1.3.9 Prueba de Identificación de Esteroides según USP 34

El procedimiento ha sido tomado del apartado <511> “valoración de un esteroide aislado” de la USP 34 el cual menciona:

- **Preparación de la placa:** preparar una suspensión espesa con 30 g de gel de sílice para cromatografía y una sustancia fluorescente adecuada agregando gradualmente aproximadamente 65 mL de una mezcla de agua y alcohol (5:1), y mezclando. Transferir la suspensión espesa a una placa limpia de 20 cm x 20 cm, extender hasta obtener una capa uniforme de 250 μm de espesor y dejar que se seque a temperatura ambiente durante 15 minutos. Calentar la placa a 105° durante 1 hora y almacenar en un desecador.

- **Preparación estándar:** disolver en una mezcla de volúmenes iguales de cloroformo y alcohol con una cantidad adecuada del estándar de referencia USP especificado en la monografía individual.

- **Preparación de valoración:** preparar según se indica en la monografía individual.

- **Procedimiento:** dividir el área de la placa cromatográfica en tres secciones iguales y usar las secciones izquierda y derecha para la preparación de valoración y la preparación estándar, respectivamente, y la sección central para el blanco. Aplicar 200 μL de la preparación de valoración y 200 μL de la preparación estándar en franjas alejadas en 2.5 cm del borde inferior de la sección correspondiente de la placa.
Secar la solución a medida que se aplica con ayuda de una corriente de aire. Usando el disolvente especificado en la monografía individual, desarrollar el cromatograma en una cámara adecuada, previamente

equilibrada y con recubrimiento interno de papel absorbente, hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido 15 cm por encima de las franjas iniciales.

Retirar la placa, evaporar el disolvente y localizar la banda principal ocupada por la preparación estándar observándola bajo luz UV. Marcar esta banda, además de las bandas correspondientes en la preparación de valoración y en las secciones del blanco de la placa.

Quitar el gel de sílice a cada banda por separado, ya sea raspando sobre papel satinado o usando un dispositivo adecuado recolector por vacío y transferirlo a un tubo de centrifuga de 50 mL con tapón de vidrio. Agregar 25 mL de alcohol a cada tubo y agitar durante no menos de 2 minutos. Centrifugar los tubos durante 5 minutos, pipetear 20 mL del sobrenadante de cada tubo y transferir a un matraz Erlenmeyer de 50 mL con tapón de vidrio, agregar 2 mL de una solución preparada por disolución de 50 mg de azul de Tetrazolio en 10 mL de metanol y mezclar.

(Esta parte es del apartado <351> titulado “Valoración de Esteroides”) Agregar después a cada matraz 2 mL de una mezcla de alcohol e hidróxido de Tetrametilamonio SR (9:1), mezclar y dejar en reposo en la oscuridad durante 90 minutos. Después de los 90 minutos ver la coloración formada. ⁽³⁴⁾

- **Prueba de Identificación de Esteroides modificada**

A partir del procedimiento de la USP 34, se realizaron algunos cambios para adecuarlo al ensayo de esteroides en especies vegetales el procedimiento que se realizó en el laboratorio fue el siguiente:

- **Preparación del estándar**

Por tratarse de una muestra pura se realizó un procedimiento diferente que se detalla a continuación:

- a) Pesar aproximadamente 10 mg de progesterona

- b) Disolver con 5 mL de metanol
- c) Transferir a un tubo de ensayo limpio y seco
- d) Agregar 2 mL de solución de azul de Tetrazolio (ver anexo N° 2) y mezclar
- e) Añadir 2 mL de mezcla de Etanol 90°–Hidróxido de Tetrametilamonio (9:1) (ver anexo N° 2)
- f) Tapar y dejar en reposo en la oscuridad por 2 horas
- g) Observar una coloración rosado fuerte como resultado positivo.

- **Preparación de muestras**

- a) Pesar 15 mg de cada extracto vegetal*
- b) Disolverlo en 1 mL de Diclorometano.

*Nota: los 15 mg reportados es la cantidad máxima permisible aplicada en forma de banda a una cromatoplaque de 20 x 20 cm para el análisis cromatográfico.

- **Condiciones para realizar la Cromatografía en Capa Fina**

- **Fase estacionaria:** Sílica gel G/UV₂₅₄, folios de POLYGRAM 20 x 20 cm.
- **Muestra:** preparadas anteriormente.
- **Aplicación de las muestras:** en forma de banda.
- **Fase móvil:** Tolueno – *n*-Hexano – Etanol 90° (4:4:2).⁽¹⁴⁾
- **Revelador:** Vainillina – Ácido Sulfúrico al 5% (ver anexo N°3).⁽¹⁸⁾
- **Testigo:** Solución clorofórmica de Progesterona.
- **Evidencia positiva:** Manchas de color Amarillo, café - amarillo, violeta, azul - violeta, azul y café⁽³⁶⁾.
- **Procedimiento:**
 - a) Marcar y codificar cada una de las Cromatoplaqueas de 20 x 20 cm.

- b) Aplicar con mucho cuidado y homogéneamente en forma de banda, la muestra, dejar secar y seguir aplicando hasta totalizar 1 mL de muestra preparada anteriormente.
- c) Eluir la cromatoplaca hasta la marca señalada (aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes).
- d) Dejar secar y observar en la cámara de luz ultravioleta a 254 nm.
- e) De la placa eluida, cortar un segmento de 1 cm de ancho para ser revelada.
- f) Utilizar este segmento para comparar y definir las manchas que corresponden a esteroides y poder marcarlas en la cromatoplaca eluida.
- g) Raspar con ayuda de una microespátula, cada mancha marcada en la cromatoplaca sobre papel satinado.
- h) Transferir ésta Sílica a un filtro Buchner al cual se ha agregado unos 2 g de Sílica gel 60 para cromatografía en columna previamente.
- i) Agregar aproximadamente 50 mL de acetato de etilo y dejar filtrar.
- j) Recoger el filtrado en un Erlenmeyer y luego evaporar el solvente hasta sequedad.
- k) Redisolver el residuo con 10 mL de metanol y agitar.
- l) Medir 5 mL de esta solución y transferir a un tubo de ensayo limpio y seco.
- m) Agregar al tubo 2 mL de una solución de 50 mg de azul de Tetrazolio en 10 mL de metanol, mezclar.
- n) Añadir 2 mL de una mezcla de Etanol 90° - Hidróxido de Tetrametilamonio S. R. (9:1), mezclar.
- o) Tapar y dejar en reposo por unas 19 horas en total aproximadamente.

p) Observar una coloración rosado fuerte como resultado positivo



Figura N° 18. Esquema de trabajo de Prueba de Identificación de Esteroides según USP 34 Modificada.



Figura N°18. Esquema de trabajo de Prueba de Identificación de Esteroides según USP 34 Modificada (cont.).

4.1.3.10 Marcha analítica de metodología desarrollada

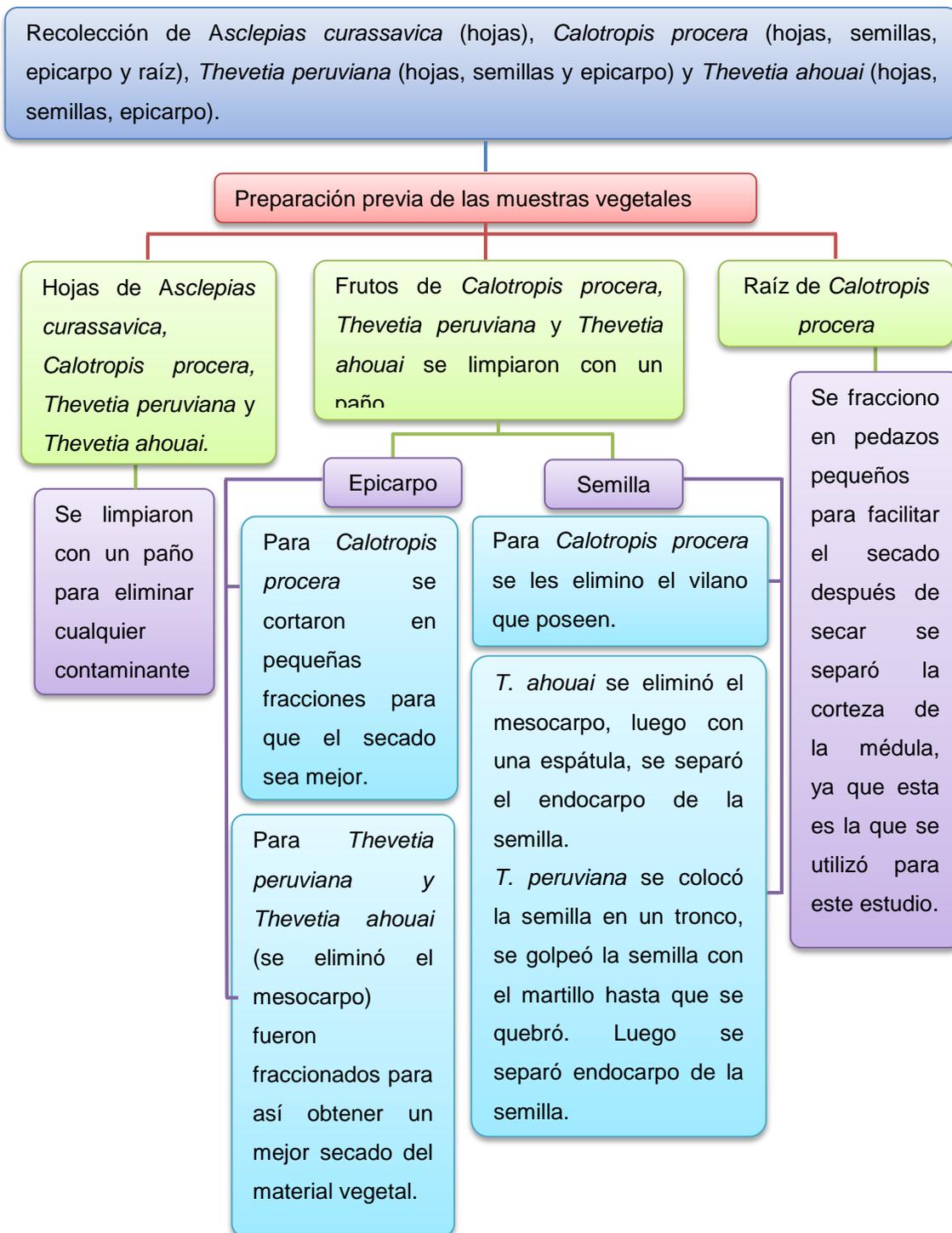


Figura N°19. Esquema de trabajo

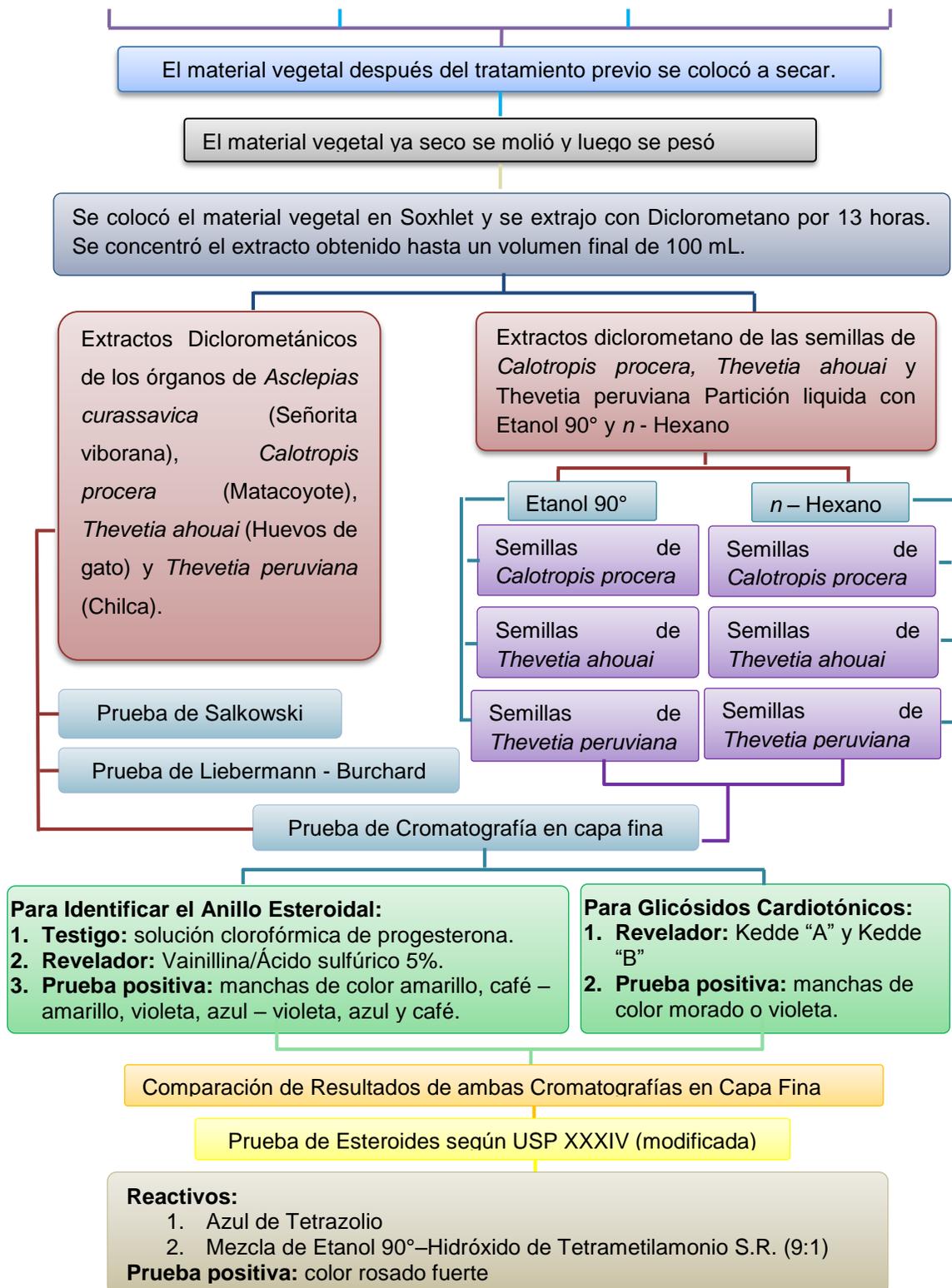


Figura N°19. Esquema de trabajo (cont.).

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para dar cumplimiento al primer objetivo, fueron llevadas muestras de la Señorita viborana al Jardín Botánico La Laguna con la ayuda de un botánico experto fue identificada como *Asclepias curassavica* (ver anexo N°1), ya que en trabajos de graduación anteriores ya habían sido identificadas las siguientes especies vegetales en estudio: *Calotropis procera*, *Thevetia ahouai* y *Thevetia peruviana*. (Ver anexo N° 2).

Posteriormente fueron recolectados cada uno de los órganos de la planta que servirían como muestras, esta selección se debió a la investigación bibliográfica desarrollada anteriormente, en donde se encontró, por un lado que en dichos órganos, la planta acumula este tipo de metabolitos secundarios y en otros casos se seleccionó porque no se encontró ninguna información. El cuadro N° 6 resume esta selección.

Cuadro N° 6 Selección de los órganos de cada planta:

Especie vegetal Órganos	Raíz	Hojas	Fruto (Epicarpo)	Semillas
<i>Asclepias curassavica</i> (Señorita Viborana)		X		
<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	X	X	X	X
<i>Thevetia ahouai</i> (Huevos de Gato)		X	X	X
<i>Thevetia peruviana</i> (Chilca)		X	X	X

Luego de la recolección, las plantas fueron llevadas al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, en donde fueron sometidas a una preparación previa que consistió en fraccionamiento, secado y molido tal como se describe en el diseño metodológico y en la figura N° 20 Siguiente:



A Separación del epicarpo de las semillas de *Calotropis procera* y fraccionamiento.



B Eliminación del vilano de las semillas de *Calotropis procera*



C Separación del mesocarpo de las semillas de *Thevetia peruviana*



D Separación del mesocarpo de las semillas de *Thevetia ahouai*

Figura N° 20. Proceso de tratamiento previo realizado a los órganos de las muestras vegetales

Para mayor facilidad de trabajo y análisis, las muestras fueron codificadas de la siguiente manera:

Cuadro N° 7 Codificación de los órganos de las muestras vegetales

N°	Código asignado	Planta	Órgano
1	TpH	<i>Thevetia peruviana</i> (Chilca)	Hojas
2	TpE	<i>Thevetia peruviana</i> (Chilca)	Epicarpos
3	CpH	<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	Hojas
4	TaH	<i>Thevetia ahouai</i> (Huevos de gato)	Hojas
5	TaA	<i>Thevetia ahouai</i> (Huevos de gato)	Semillas (Almendras)
6	TpA	<i>Thevetia peruviana</i> (Chilca)	Semillas (Almendras)
7	AcH	<i>Asclepias curassavica</i> (Señorita Viborana)	Hojas
8	CpE	<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	Epicarpos
9	TaE	<i>Thevetia ahouai</i> (Huevos de gato)	Epicarpos
10	CpS	<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	Semillas
11	CpR	<i>Calotropis procera</i> (Matacoyote)	Raíz

Las 11 muestras resultantes fueron sometidas a proceso de extracción en Soxhlet utilizando diclorometano como solvente extractor. Posteriormente, los extractos fueron concentrados hasta un volumen final de 100 mL, el cual se guardó en un frasco ámbar, en lugar seco y a temperatura ambiente.

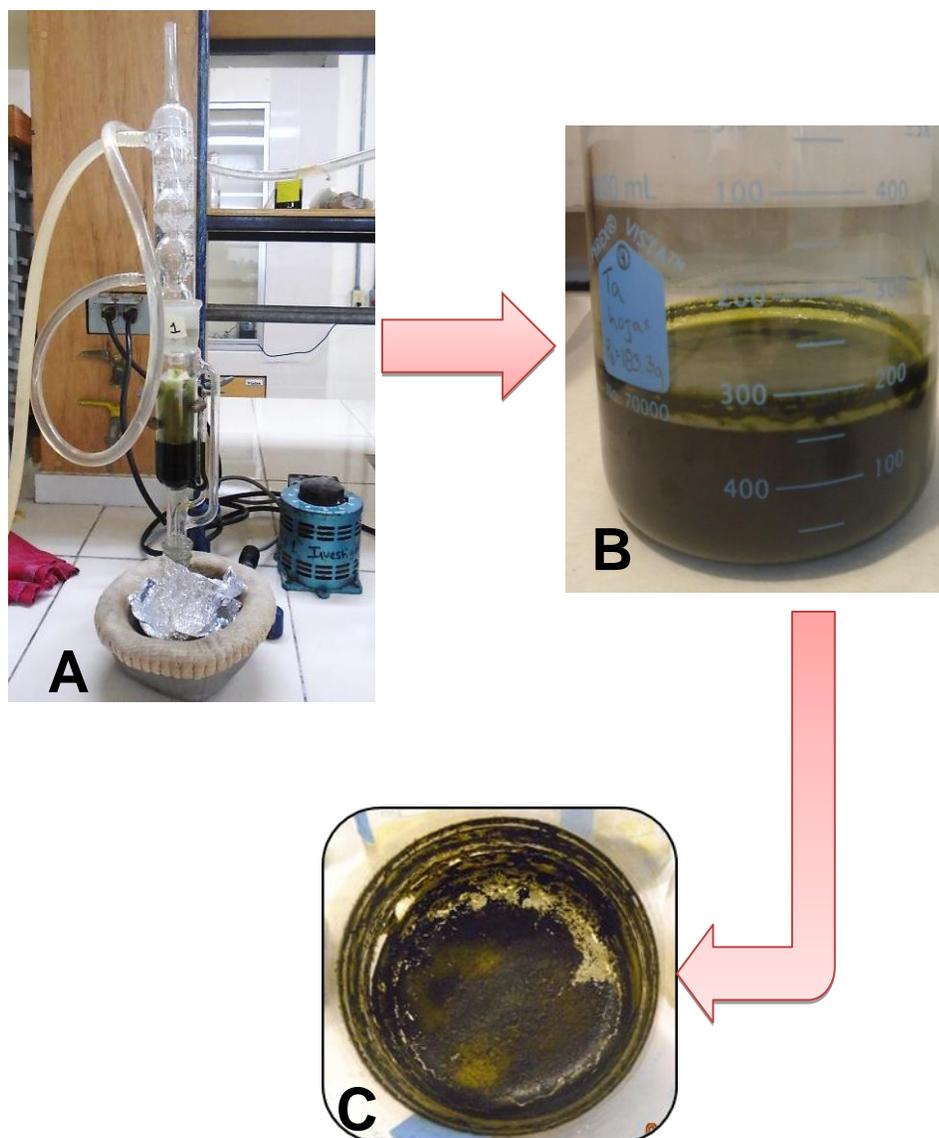


Figura N° 21. A) Proceso de extracción en Soxhlet
B) Extracto fluido de *Thevetia ahouai* hojas
C) Extracto seco de *Thevetia ahouai* hojas

Cuadro N° 8. Resultados de las Características físicas de los extractos.

Código de planta	Extracto	Consistencia del extracto al secar	Color del extracto
TpH	Extracto diclorometánico de <i>Thevetia peruviana</i> hojas	Sólido Viscoso y Resinoso	Verde oscuro
TpE	Extracto diclorometánico de <i>Thevetia peruviana</i> epicarpes	Sólido Viscoso y Resinoso	Verde oscuro
TpA	Extracto diclorometánico de <i>Thevetia peruviana</i> semillas	Líquido viscoso	Amarillo oscuro
TaH	Extracto diclorometánico de <i>Thevetia ahouai</i> hojas	Sólido Viscoso y Resinoso	Verde oscuro
TaE	Extracto diclorometánico de <i>Thevetia ahouai</i> epicarpes	Sólido Resinoso	Amarillo claro
TaA	Extracto diclorometánico de <i>Thevetia ahouai</i> semillas	Líquido viscoso	Amarillo pálido
AcH	Extracto diclorometánico de <i>Asclepias curassavica</i> hojas	Sólido Viscoso y Resinoso	Verde oscuro
CpH	Extracto diclorometánico de <i>Calotropis procera</i> hojas	Sólido Viscoso y Resinoso	Verde oscuro
CpE	Extracto diclorometánico de <i>Calotropis procera</i> epicarpes	Sólido Resinoso	Verde claro
CpS	Extracto diclorometánico de <i>Calotropis procera</i> semillas	Líquido viscoso	Amarillo oscuro
CpR	Extracto diclorometánico de <i>Calotropis procera</i> raíz	Sólido Viscoso y Resinoso	Café claro

Según se observa en el cuadro N° 8 la mayor parte de los extractos presentan un color verde oscuro, especialmente el de hojas. La consistencia de la mayoría fue sólida – viscosa y muchos de apariencia resinosa debido a su composición química total y al disolvente de extracción.

Estas características son importantes para saber la forma de prepararlas para realizar las pruebas químicas.

5.1 Resultado de la pruebas de Liebermann – Burchard y Salkowski



Figura N° 22. Resultados positivos de la Prueba de Liebermann – Burchard en los extractos de hojas, epicarpes, semilla y raíz de *Calotropis procera*, hojas, epicarpes y semilla de *Thevetia ahouai* y hojas de *Asclepias curassavica*.

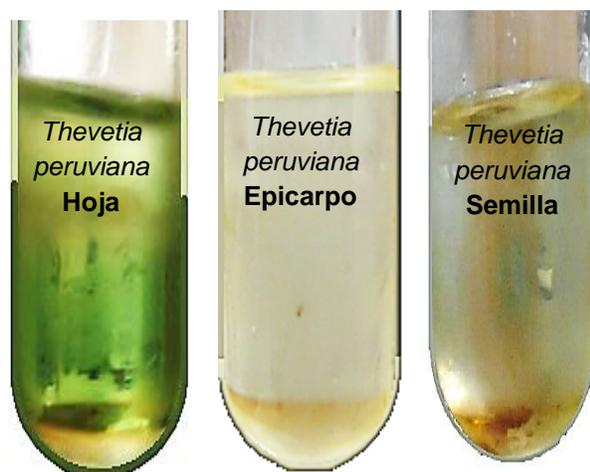


Figura N° 23. Resultados positivos de la Prueba de Liebermann – Burchard en los extractos de hojas, epicarpós y semilla de *Thevetia peruviana*.

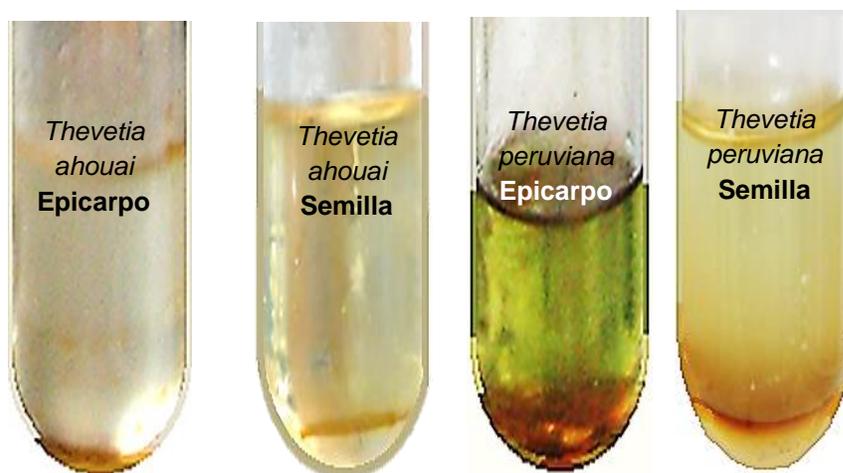


Figura N° 24. Resultados positivos de la Prueba de Salkowski en los extractos de epicarpós y semilla de *Thevetia ahouai* y epicarpós y semilla de *Thevetia peruviana*.

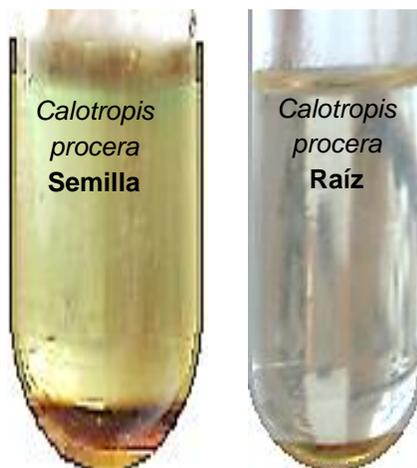


Figura N° 25. Resultados positivos de la Prueba de Salkowski en los extractos de semilla y raíz de *Calotropis procera*.

En las figuras N° 22, 23, 24 y 25 se muestran los resultados de las pruebas químicas de Liebermann – Burchard y Salkowski. Tanto los glicósidos saponínicos como los glicósidos cardiotónicos son metabolitos secundarios que poseen el anillo esteroidal dentro de su estructura y la forma de identificarlos es mediante las pruebas de Salkowski y Liebermann – Burchard las cuales fueron realizadas a las once muestras de extractos obteniendo anillos de color rojo en todas las muestras indicando un resultado positivo. En el caso de las hojas por ser extractos de colores oscuros no es posible a través de imágenes observar claramente la prueba de Salkowski y la formación del anillo de color rojo que se obtuvo. Estas pruebas fueron ensayos preliminares para garantizar la presencia del anillo esteroidal.

De los once extractos, tres corresponden a semillas de *Calotropis procera*, *Thevetia ahouai* y *Thevetia peruviana* (códigos CpS, TaA y TpA) y al observar las características de estos extractos se muestran como oleosos – resinosos, razón por la cual al realizar la Cromatografía en Capa Fina no era posible observar con definición las manchas separadas, sobre todo las que eluían al final de la cromatoplaca por lo cual no podían ser analizadas, esto motivó a realizar un fraccionamiento por partición líquido – líquido de los tres extractos

diclorometánicos de semillas para fraccionarlo en dos partes con disolventes de polaridades diferentes: compuestos solubles en etanol 90° y en *n* – Hexano, de esta manera fue posible realizar el análisis de Cromatografía en Capa Fina y observar una mejor separación ya que en la fracción *n* – Hexano quedaron los componentes lipídicos que eran mayoritarios y no permitían que la separación de componentes fuera adecuada (Ver Figura N° 26). Esto ocasionó además nueva codificación de los extractos: TaA que cambio a TaS, TpA cambio a TpS y CpS que quedo como tal, las fracciones etanólicas resultantes fueron las que se utilizaron para realizar las Cromatografías en Capa Fina.

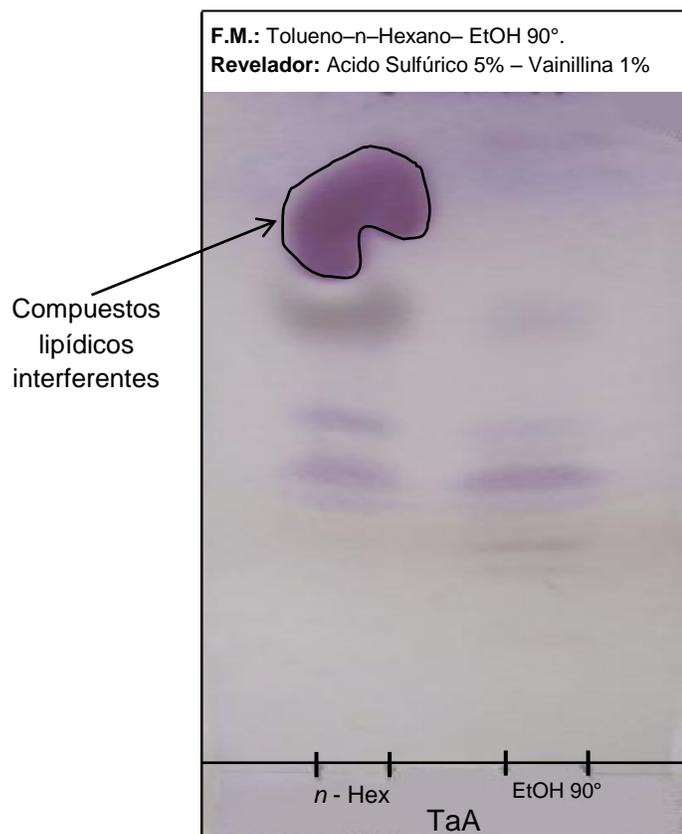


Figura N° 26. Cromatografía en Capa Fina de las fracciones etanólicas y *n*-Hexánicas del extracto de *Thevetia ahouai* Semilla.

5.2 Resultados de la Identificación del anillo esteroidal por Cromatografía en Capa Fina

Para tener una mejor definición del resultado positivo se utilizó en el desarrollo del análisis, una solución de Progesterona como testigo ya que estructuralmente ésta deriva de los esteroides y posee similitud con la estructura de los pregnanos ver figura N° 27.

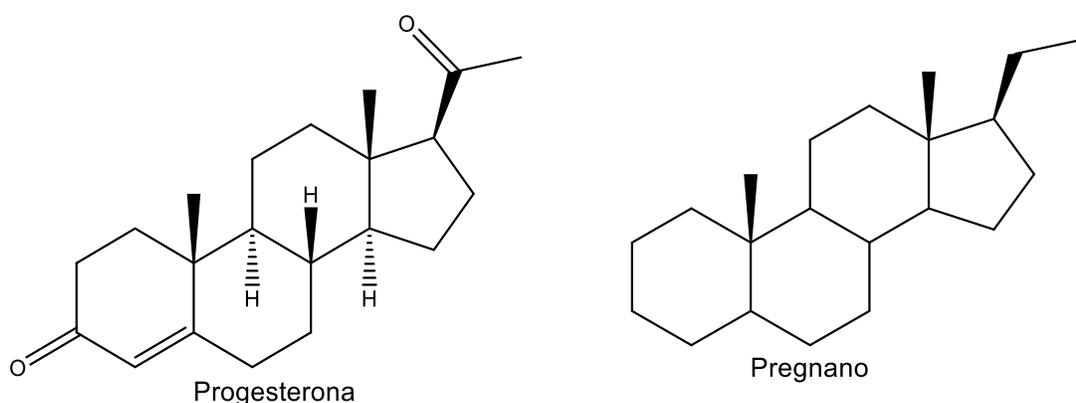


Figura N° 27. Estructuras químicas de Progesterona y Pregnano

La identificación del anillo esteroidal se realizó aplicando el método de Cromatografía en Capa Fina, debido a que ésta permite, la separación de la mezcla en sus componentes, dependiendo de la polaridad de la fase móvil que se utilice. El reactivo revelador específico fue Vainillina – Ácido Sulfúrico 5 % el cual presenta evidencia positiva al observar que las manchas se tornan de colores amarillo – café – violeta y azul. (35)

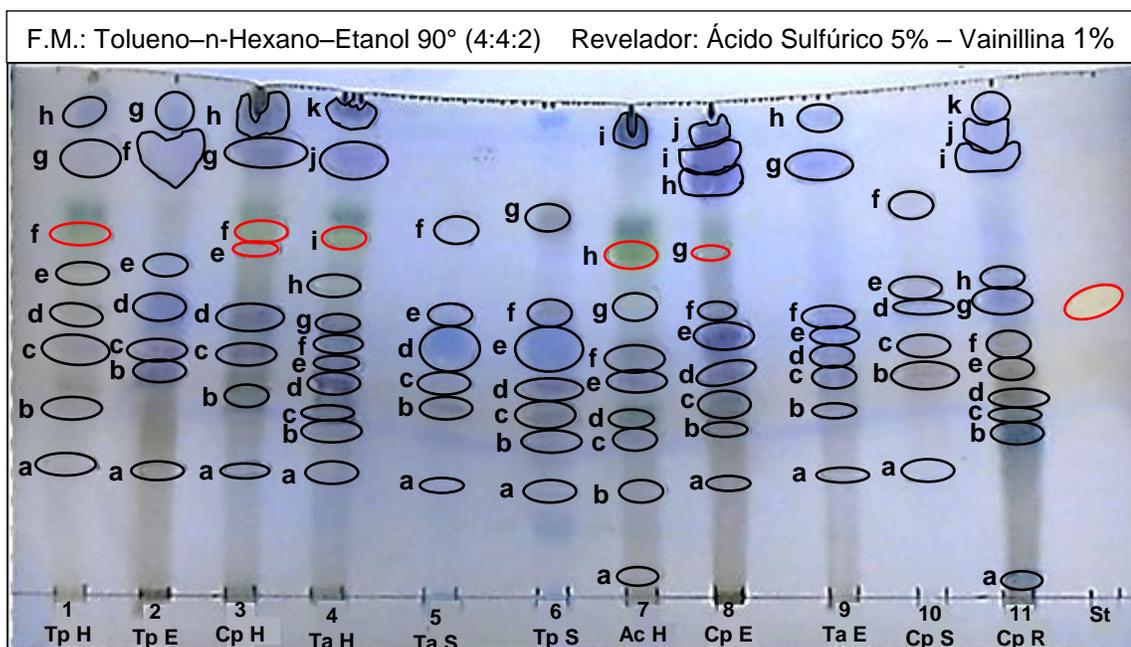


Figura N° 28. Resultado de la identificación del anillo esteroidal

En la figura N°28 se observa la separación de los diversos componentes en donde se puede comprobar que la fase móvil utilizada resultó ser adecuada, ya que hubo una separación buena y claramente visible de muchos componentes, con respecto al reactivo revelador este define bien los colores de la evidencia positiva en todos los extractos.

La mancha “f” del extracto de *Thevetia peruviana* hojas, la “e” y “f” del extracto de *Calotropis procera* hoja, la “i” del extracto de *Thevetia ahouai* hojas, la “h” del extracto de *Asclepias curassavica* hojas y la “g” del extracto de *Calotropis procera* epicarpo , se observan de color amarillo igual que la progesterona pero eluyen a distancias diferentes a ésta (Rf diferentes) sin embargo por la similitud en color se puede decir que dichos componentes también presenten similitud a la estructura de la progesterona y a los pregnanos.

Todas las manchas que aparecen en la imagen encerradas en óvalos, posiblemente son compuestos que poseen anillo esteroidal, es decir que en los once extractos existen componentes con anillo esteroidal.

5.3 Resultados de la identificación del anillo lactónico por Cromatografía en Capa Fina

Los glicósidos cardiotónicos al igual que los glicósidos saponínicos poseen en su estructura molecular el anillo esteroidal, pero además poseen un grupo lactónico que les confiere actividad terapéutica.

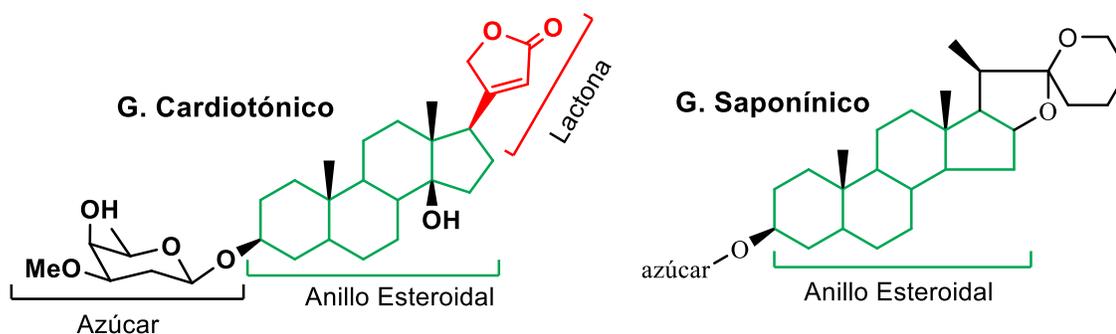


Figura N° 29. Estructuras químicas de Glicósidos cardiotónicos y saponínicos

Como el objetivo del trabajo es identificar los esteroides, se realizó una cromatografía en capa fina para determinar que los componentes identificados en el cromatograma de la figura N° 28 realmente sean esteroides y no glicósidos cardiotónicos, por lo cual al revelar con el reactivo de Kedde "A" y Kedde "B", todas aquellas manchas que se colorearon de morado indican que poseen la lactona $\alpha - \beta$ insaturada de los glicósidos cardiotónicos.



Figura N° 30. Resultado de la identificación del anillo lactónico

En la figura N° 30 se observan las manchas coloreadas de morado en las cuales se identifica la presencia del anillo lactónico. La mayoría de estas manchas están cercanas al punto de aplicación debido a que los glicósidos cardiotónicos son polares.

5.4 Comparación de la Cromatoplaqa de Identificación del Anillo Esteroidal con la Cromatoplaqa de Identificación del Anillo Lactónico

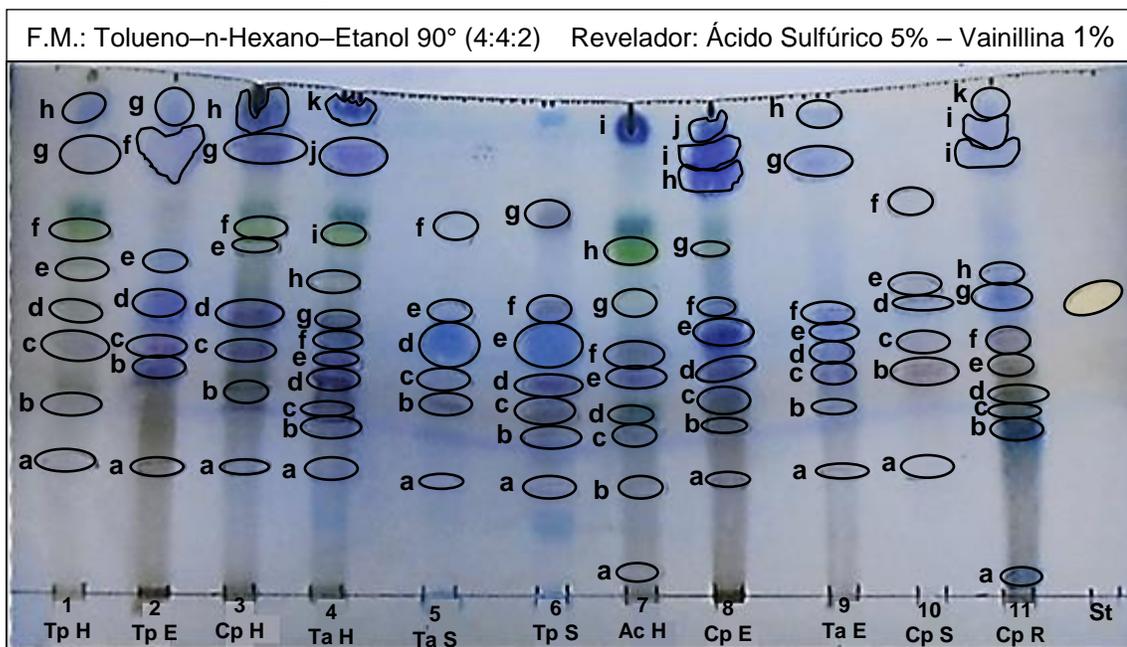


Figura N° 31. Cromatografía de identificación del anillo esteroidal.

Al comparar ambas cromatoplaqas se puede observar cuales son respectivamente las manchas que corresponden a esteroides

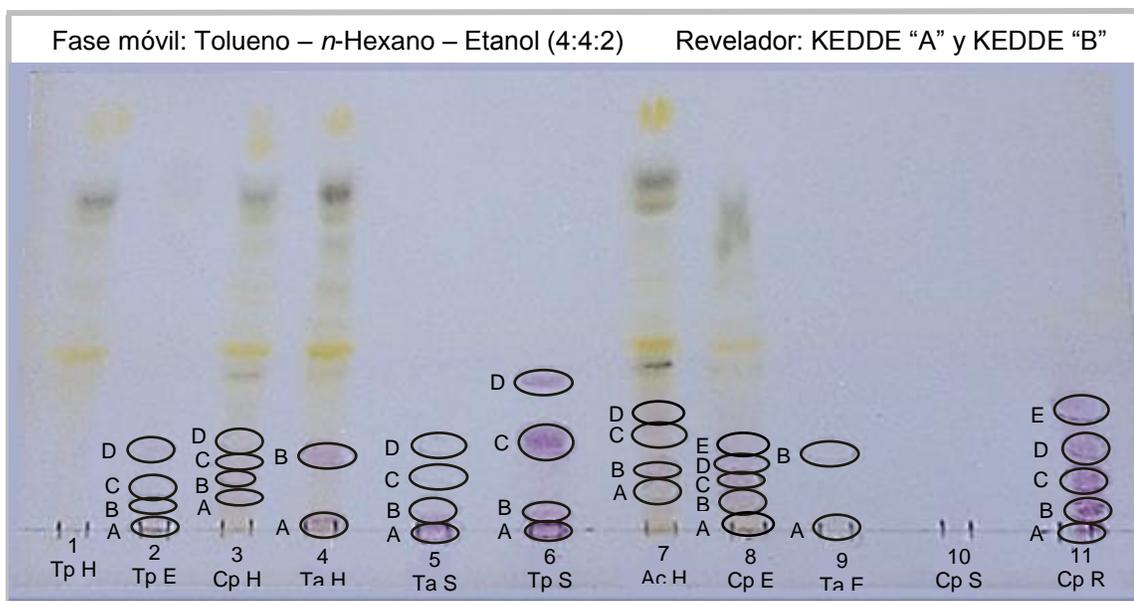


Figura N° 32. Cromatografía de identificación del anillo lactónico.

El objetivo de comparar ambos Cromatogramas es porque en la figura N° 31 se presentan aquellas manchas que identifican el anillo esteroidal y en la figura N° 32 se identifica el anillo lactónico que corresponde a glicósidos cardiotónicos entonces al eliminar las manchas moradas del cromatograma de la figura N° 32 de las del cromatograma figura N° 31 quedarían solamente las manchas que pertenecen a esteroides y el resultado es el siguiente:

- 1 TpH : De la mancha “a” hasta la “h” se consideran esteroides.
- 2 TpE : De la mancha “a” hasta la “g” se consideran esteroides.
- 3 CpH : De la mancha “a” hasta la “h” se consideran esteroides.
- 4 TaH : De la mancha “a” hasta la “k” se consideran esteroides.
- 5 TaS : De la mancha “a” hasta la “f” se consideran esteroides.
- 6 TpS : Las mancha “a, b” son cardiotónicos desde la “c” hasta la “g” se consideran esteroides.
- 7 AcH : Las mancha “a, b” son cardiotónicos desde la “c” hasta la “i” se consideran esteroides.
- 8 CpE : De la mancha “a” hasta la “j” se consideran esteroides.
- 9 TaE : De la mancha “a” hasta la “h” se consideran esteroides.
- 10 CpS : De la mancha “a” hasta la “f” se consideran esteroides.
- 11 CpR : La mancha “a” es cardiotónico y desde la “b” hasta la “k” se considera esteroides.

5.5 Resultados de la prueba de identificación de esteroides según USP 34

Al procedimiento presentado por la USP se le realizaron varios cambios para adecuarlo al estudio de las especies vegetales tal como se presenta en la metodología.

Cuadro N° 9. Resultado de la prueba de Esteroides según USP 34 modificada

Código de Extracto	Manchas	Fracción	Resultado de prueba
TpH	c, d	1	Color rosa fuerte
	f	2	
	g, h	3	
TpE	a, b, c	1	Color rosa fuerte
	d, e	2	
	g, h	3	
CpH	b, c	1	Color rosa fuerte
	d	2	
	g, h	3	
TaH	b, c	1	Color rosa fuerte
	i	2	
	j, k	3	
TaS	b, c, d, e	1	Color rosa fuerte
	f	2	
TpS	d, e, f	1	Color rosa fuerte
	g	2	
AcH	e, f	1	Color rosa fuerte
	g, h	2	
	i	3	
CpE	e, f	1	Color rosa fuerte
	g	2	
	h, i, j	3	
TaE	b	1	Color rosa fuerte
	c, d	2	
	e, f	3	
CpS	a	1	Color rosa fuerte
	b, c	2	
	d, e	3	
CpR	e, f	1	Color rosa fuerte
	g, h	2	
	i, j, k	3	

Debido a la enorme cantidad de manchas separadas en cada muestra, fueron tomadas algunas al azar y unidas para desarrollar el análisis, tal como se muestra en el cuadro N° 9 en algunos casos se sumaron dos o tres manchas ya que el análisis es cualitativo y solo determina esteroides en general.

Se analizaron en total 31 fracciones, como se observa en el cuadro, dando todos resultados positivos con la formación de un color rosado a rosado fuerte lo cual confirma los resultados obtenidos en la comparación de los cromatogramas de la figura N° 31 y N° 32.

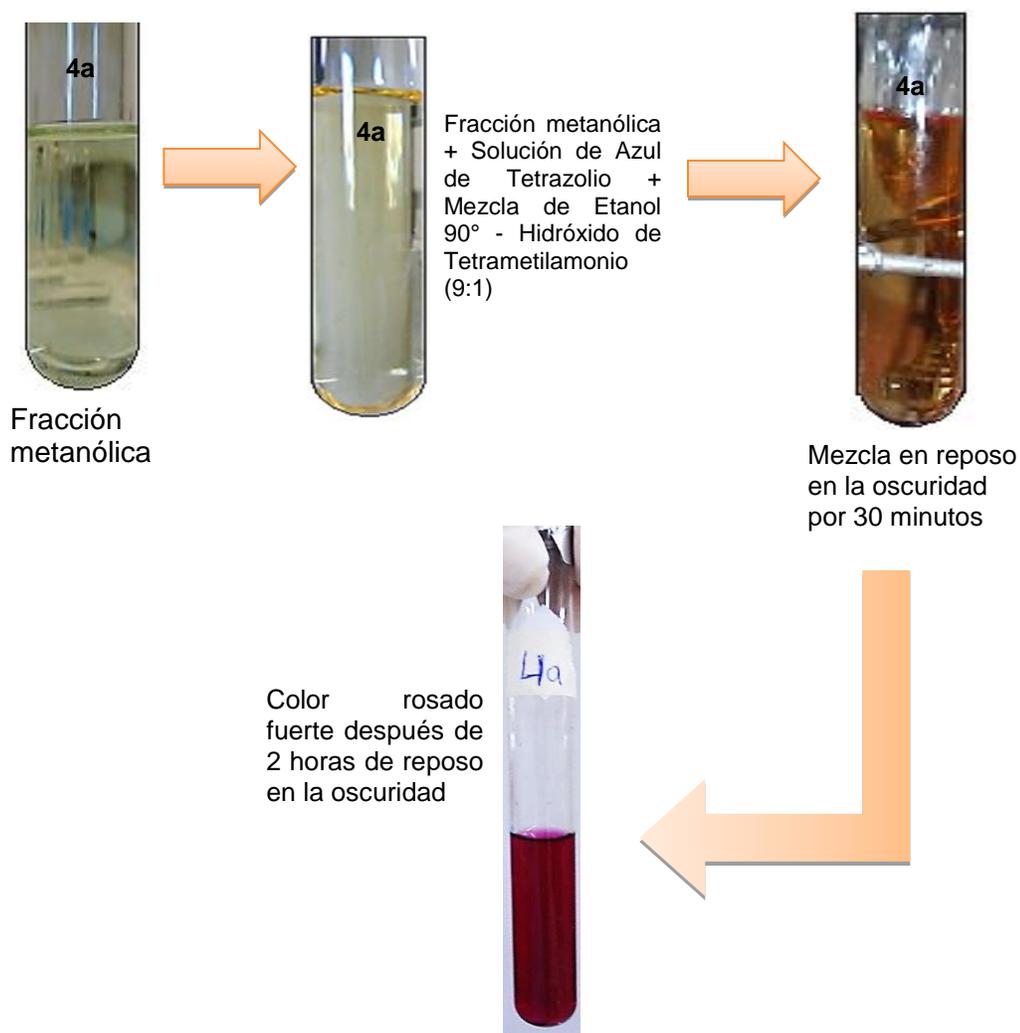


Figura N° 33. Proceso de formación de color rosado fuerte en la prueba de esteroides según USP 34 modificada.

De los once órganos analizados la raíz de *Calotropis procera* no se ha estudiado ni encontrado ninguna referencia sobre la identificación de esteroides, el resto de órganos si ya existen antecedentes pero solamente de la identificación de glicósidos cardiotónicos.

Los resultados obtenidos de la identificación de esteroides es importante ya que estos metabolitos poseen actividad biológica de interés farmacéutico y además porque los pregnanos son compuestos intermediarios en la biogénesis y formación de los esteroides; como se menciona anteriormente el interés de los pregnanos radica en que existen estudios científicos que los relacionan con la actividad supresora del apetito en este sentido, los resultados obtenidos son de mucha importancia para la continuidad de esta investigación y que posteriormente en otro trabajo puedan identificarse con el auxilio de una sustancia testigo de un pregnano conocido y aislado, los que puedan contener los extractos que se investigaron en este trabajo.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La selección de los órganos de las plantas estudiadas, se debió a la investigación bibliográfica realizada previamente pero en el caso de *Calotropis procera* (Matacoyote) se estudió la raíz debido a que no se encontró ninguna información que mencionara que contenía compuestos esteroideos.
2. Los resultados positivos de las pruebas de Lieberman-Burchard y Salkowski en los extractos de las especies vegetales estudiadas, garantizaron la presencia preliminar de esteroides por el anillo rojo específico formado.
3. Debido a que los extractos de las semillas de *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia ahouai* (Huevos de gato) y *Thevetia peruviana* (Chilca) (códigos CpS, TaA y TpA) mostraron características oleosas – resinosas, por lo que se realizó una partición líquido-líquido de estos tres extractos para lograr de esta manera una mejor separación de los componentes.
4. Para la identificación del anillo esteroidal por Cromatografía en Capa Fina se utilizó como testigo una solución de progesterona debido a la similitud en la estructura con los pregnanos y esteroides, lo cual ayudó a confirmar la presencia de compuestos esteroideos en los extractos diclorometánicos.
5. Se pudo comprobar que la fase móvil utilizada en la Cromatografía en Capa Fina para la identificación del anillo esteroidal permitió una buena separación y definición de manchas.

6. La mancha “f” del extracto de *Thevetia peruviana* (Chilca) hojas, la “e” y “f” del extracto de *Calotropis procera* (Matacoyote) hoja, la “i” del extracto de *Thevetia ahouai* (Huevos de gato) hojas, la “h” del extracto de *Asclepias curassavica* (Señorita viborana) hojas y la “g” del extracto de *Calotropis procera* (Matacoyote) epicarpo, en la Cromatografía en Capa Fina de identificación del anillo esteroidal se observaron de color amarillo al igual que la progesterona (pero que eluyeron a distancias diferentes) lo que podría indicar la similitud con la estructura de la progesterona.
7. Luego de comparar las Cromatografías en Capa Fina para identificar el anillo esteroidal y glicósidos cardiotónicos y eliminar las manchas reveladas con Kedde que aparecen de color morado (glicósidos cardiotónicos) se logró identificar aquellas manchas que corresponden a esteroides presentes en los extractos.
8. Se realizó la prueba de esteroides dada por la Farmacopea de los Estados Unidos numero treinta y cuatro (USP 34), a las treinta y un fracciones resultantes de los extractos, para confirmar que los compuestos seleccionados se trataban verdaderamente de esteroides.
9. Según la información bibliográfica y los resultados obtenidos, las especies vegetales en estudio contienen en su composición química glicósidos cardiotónicos lo cual hacen que estas especies sean toxicas para el consumo humano.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Efectuar a las semillas de *Calotropis procera* (Matacoyote), *Thevetia ahouai* (Huevos de gato) y *Thevetia peruviana* (Chilca) extracciones previas con éter de petróleo para desengrasar el material vegetal y eliminar con ello sustancias interferentes para el análisis y posteriormente extraer con diclorometano.
2. Se sugiere que en próximos trabajos de investigación se continúe con el estudio de la raíz de *Calotropis procera* (Matacoyote), ya que en las referencias bibliográficas consultadas no se reporta que entre sus componentes contenga esteroides, sin embargo en los resultados de esta investigación estos dieron positivos.
3. Utilizar la metodología de cromatografía en capa fina para trabajos de investigación en cuyos objetivos esté el de identificar metabolitos secundarios de especies vegetales ya que es factible de realizar y reproducible.
4. Para próximos trabajos de investigación de las especies vegetales utilizadas en este estudio, realizar el secado del material vegetal a temperatura ambiente y al aire libre sin exponerlas al sol directamente
5. Que se continúe en próximas investigaciones con los estudios de cada uno de los órganos de estas especies vegetales sobre todo en aquellos que se observó la presencia de esteroides con mayor intensidad de color en la reacción química de la prueba de esteroides de la Farmacopea de los Estados Unidos número treinta y cuatro (USP 34) modificada.

6. Retomar del presente trabajo de investigación, el procedimiento modificado de la prueba de identificación de esteroides del apartado <511> de la USP 34 para poder identificar esteroides en otras especies vegetales que se desee verificar o comprobar la presencia de esteroides.

7. Realizar un estudio riesgo/beneficio para la determinación de los niveles de toxicidad en los extractos de las especies vegetales en estudio, para que de esta manera se compruebe si es un beneficio para el ser humano y poder así continuar con el estudio de cada especie vegetal.

Bibliografía

1. Anaya Lang, Ana Luisa. (2003). *Ecología Química*. México, DF: Plaza y Valdés, SA de CV. Páginas 53-59. Disponible en: <http://books.google.com.sv/books?hl=es&id=H6j8zaDYSYEC&q=esteroides#v=snippet&q=esteroides&f=false> Fecha: 15-04-2014.
2. Blum, Andreas, Christine Loerz, Hans-Joerg Martin, Claudia A. Staab-Weijnitz, Edmund Maser. (2012). Momordica charantia extract, a herbal remedy for type 2 diabetes, contains a specific 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 128, 51– 55
3. Cox, Arthur G and Samit Shah 2011,, PHARMACOGNOSY OF THE HERBAL MEDICINE Hoodia gordonii (HOODIA), A TRADITIONAL APPETITE SUPPRESSANT, Cox A G et al. / *Pharmacie Globale (IJCP)* 7 (10)
4. Campos Paniagua, José Arnoldo. (2009). Determinación de la actividad anticancerígena in vitro de los glicósidos cardiotónicos de los frutos de *Thevetia ahouia* (cojón de costa de hojas largas) y *Thevetia peruviana* (chilca) familia Apocynaceae. Trabajo de Graduación para optar al grado de Licenciado en Química y Farmacia. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, Centroamérica.
5. Castro E. Florula Digital, LA SELVA OET. 2013. Disponible en: http://sura.ots.ac.cr/local/florula4/find_sp2.php?customer=Asclepias+curassavica&busca=Buscar#. Fecha: 16 – 07 – 2014.

6. Castro E. Florula Digital, LA SELVA OET. 2013. Disponible en: http://sura.ots.ac.cr/local/florula4/find_sp2.php?customer=Thevetia+peruviana&busca=Buscar#. Fecha: 16 – 07 – 2014.
7. Defilo M., Bernardo A. (Ed.) (1984). *Farmacología Médica*. Santo Domingo: Amigo del Hogar. Páginas: 61-64. Disponible en: http://books.google.com.sv/books?hl=es&id=_cRppHzL_6lC&q=cardiotonicos#v=snippet&q=cardiotonicos&f=false Fecha: 20 – 04 – 2014.
8. Dewick, Paul M. (2009). *“Medicinal Natural Product”*. Reino Unido: John Wiley & Sons Ltd. Páginas: 261 – 267.
9. Facultad de Química y Farmacia; Cátedra de Farmacognosia. *Manual de Farmacognosia*. (2014). Páginas: 34 – 35.
10. Fanie R. van Heerden, R. Marthinus Horak, Vinesh J. Maharaj, Robert Vleggaar, Jeremiah V. Senabe, Philip J. Gunning. (2007). An appetite suppressant from Hoodia species, *Phytochemistry* 68, 2545–2553.
11. Fumiko ABE and Tatsuo YAMAUCHI (2000), Pregnane Glycosides from the Roots of *Asclepias tuberosa*, *Chem. Pharm. Bull.* 48(7), 1017—1022.
12. Gil Ruiz, Pilar (2002). *Productos Naturales*. España: Universidad Pública de Navarra. Páginas: 145 – 159.
13. Heerden, F.R. van. (2008). *Hoodia gordonii*: supresor del apetito natural, *ELSEVIER Journal of Ethnopharmacology* 119, 434–437.
14. Heftmann, Erich (1976). *Cromatography of Steroids*. Volumen 8. Ámsterdam, Holanda: Elsevier Scientific Publishing Company. Páginas: 18 – 19.

15. Ilya Raskin, Manalapan, NJ (US); Joseph M. O'Neal, III, Glendora, NJ (Us), inventores (2007); APPETITE-SUPPRESSING COMPOSITIONS AND METHODS; Patente Estadounidense US 7,265,101 B2.
16. Kuklinski, Claudia (2000). *Farmacognosia "Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona, España: Ediciones Omega. Páginas 146 – 162.
17. Lock, Olga (1994). *Investigación Fitoquímica*. (2ª Ed). España: Pontificia Universidad Católica del Perú. Páginas 72 – 84.
18. Marcano, Deana y Hasegawa, Masahisa (2002). *Fitoquímica Orgánica*. (2º ed.). Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Páginas 339 – 368.
19. Martínez Bonilla, Jorge Denis; Romero Arévalo, Miriam Jeannette. (2011). Identificación, Cuantificación y Determinación de la actividad citotóxica de los glicósidos cardiotónicos procedentes de los frutos, semillas y flores de *Calotropis procera* (matacoyote) de la familia de las Asclepiadaceae. Trabajo de Graduación para optar al grado de Licenciado(a) en Química y Farmacia. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, Centroamérica.
20. Martínez Martínez, Alejandro. *Esteroides Cardiotónicos*. Medellín: Universidad de Antioquia. Abril de 2002.
21. Martínez Martínez, Alejandro. *Saponinas Esteroides*. Medellín: Universidad de Antioquia. Junio de 2001.

22. Moffat, A.C.; Osselton, M.D.; Widdop, B. (2004). *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in the Pharmaceuticals Body Fluids and Post Mortem Materials* (2 volúmenes, 3 ed.). London: The Pharmaceuticals Society of Great Britain. Department of Pharmaceutical Sciences. Páginas: 1485 – 1486.
23. Praveen U Sanganalmath, Yogaraje Gowda C V, Gowtham M D, Nayak V G, Mohan B M. Rapid detection of residues of cardenolides of nerium oleander (Linn.) by High-Performance Thin-layer Chromatography (HPTLC) in Autopsied samples. Karnataka, India: Forensic Science Laboratory, Bangalore-560 068.
24. Quer, Font P. (1993). Diccionario de Botánica (2 tomos). España, Barcelona: Editorial Labor, S.A.
25. Romo de Vivar, Alfonso (Ed.) (2006). *Química de la Flora Mexicana*. México, Distrito Federal: Universidad Nacional Autónoma de México. Páginas: 145–148. Disponible en: <http://books.google.com/sv/books?hl=es&id=2rZKFmqYfSIC&q=esteroides#v=snippet&q=esteroides&f=false>. Fecha: 30 – 05 – 2014.
26. SA Bhawani, O Sulaiman, R Hashim and MN Mohamad Ibrahim (2010), Thin-Layer Chromatographic Analysis of Steroids: A Review, *Trop J Pharm Res*, 9 (3), 301 – 313.
27. Sánchez de Lorenzo – Cáceres, José Manuel. Árboles ornamentales. Disponible en: <http://arbolesornamentales.es/Thevetia%20peruviana>. Fecha: 16 – 07 – 2014.
28. Sánchez, Sara Leticia. (2014). Investigación de la Adulteración y Falsificación en Capsulas de ***Calea urticifolia*** (Juanislama), Comercializadas en 7 Mercados del Área Metropolitana de San

Salvador. Trabajo de Graduación para optar al grado de Licenciado(a) en Química y Farmacia. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, Centroamérica.

29. Soundararajan Kamalakkannan, Ramaswamy Rajendran, Ramasamy V. Venkatesh, Paul Clayton, and Mohammad A. Akbarsha (2010), Antiobesogenic and Antiatherosclerotic Properties of Caralluma fimbriata Extract, *Journal of Nutrition and Metabolism* Volume 2010, Article ID 285301, 6 pages doi:10.1155/2010/285301. *Trop J Pharm Res*, 9 (3), 301.
30. Takeru, Higuchi; Einar, Brochmann-Hanssen. (1961). *Pharmaceutical Analysis*. New York: Interscience Publishers. Páginas: 72-73.
31. Trease, George Edward; Evans, William Charles (1991). *Farmacognosia* (13^o ed.). México: Interamericana McGraw Hill. Páginas: 519-532.
32. United States Pharmacopeial Convention, Inc. *The United States Pharmacopeial Thirty – four Revision. USP 34. The National Formulary. Twenty – nine Edition. NF 29*, U.S.A., January 2011.
33. Universidad Nacional Autónoma de México. (2014, Julio 16) Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [On line]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>.
34. Wagner H, Blatt S., Zgainski E.M. Plant Drug Analysis a thin layer chromatography Atlas (1984) Berlin Heidelberg New York Tokyo. Páginas: 299-301.

35. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/fernandez_a_le/capitulo2.pdf. *Capítulo II antecedentes/ métodos generales de extracción y purificación*. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/fernandez_a_le/capitulo2.pdf.
36. <http://www.definicionabc.com/tecnologia/invencion.php>. Definición ABC (diccionario). Disponible en: <http://www.definicionabc.com/tecnologia/invencion.php>. Fecha: 02 – 07 – 2015.

GLOSARIO ⁽²⁴⁾

1. **Acuminada:** terminada en una punta.
2. **Ahusado:** de forma que recuerda a un huso, fusiforme como son las células de buen número de diminutas algas.
3. **Amplexicaules:** aplicase a las hojas, brácteas, etc., que abrazan el tallo.
4. **Cuneada:** aplicase a hojas que en la parte inferior, tiene bordes rectos y convergentes, sin tomar en cuenta de la porción apical de la lámina.
5. **Discoideo:** como discoide. Semejante a un disco, como los capítulos de las compuestas radiadas que tiene las lígulas muy diminutas o totalmente abortadas.
6. **Filiforme:** de forma de hebra, delgado y sutil como una fibrilla de lino, como los segmentos de la hoja del eneldo y del hinojo.
7. **Follaje:** conjunto de hojas de los árboles y otras plantas.
8. **Glabrescente:** aplíquese a los órganos casi sin vello.
9. **Glabro:** desprovisto absolutamente de pelo o vello.
10. **Invención ⁽¹⁶⁾:** es la creación de un objeto, producto, teoría o proceso que implica siempre la alteración de determinada materia o materiales. Como es sabido, la capacidad inventiva es casi exclusivamente humana y salvo contados casos, en la naturaleza sólo el hombre ha desarrollado la posibilidad de tomar elementos de ella para transformarlos en compuestos de mayor complejidad y utilidad.
11. **Lanceoladas:** aplicase a los órganos laminares angostamente elípticos y apuntados en ambos extremos, como hojas, brácteas, pétalos, etc.
12. **Lígulas:** dícese así porque semejas una lengüecita.

- 13. Lobado:** dividido en gajos o lobos, en porciones no demasiado profundas y más o menos redondeadas, tanto si trata de órganos laminares como macizos.
- 14. Nectarífero:** dicese de lo que tiene néctar o lo segrega.
- 15. Oblongo:** adjetivo más largo que ancho, o excesivamente largo.
- 16. Pecíolo:** pezón o rabillo que une la lamina de la hoja a la base foliar o al tallo. Su forma, en general es rolliza y por lo común un poco acanalada superiormente.
- 17. Perennifolio:** así se designan los árboles y arbustos verdes todo el año, como las encinas, los laureles, los pinos, las araucarias, etc.
- 18. Pubescentes – puberulentas:** dicese de cualquier órgano vegetal cubierto de pelo fino y suave.
- 19. Sésiles:** una hoja sésil es la que está desprovista de pecíolo.
- 20. Sinistrorsos:** que gira hacia la izquierda.
- 21. Verticilada:** dicese de las hojas, ramitas, flores, etc., dispuestas en verticilo.
- 22. Verticilo:** conjunto de hojas que nacen de un mismo nivel del tallo.
- 23. Vilano:** dicese que deriva del latino *Villus*, m. limbo del cáliz, en un fruto procedente de ovario ínfero de muy diversas plantas ejemplo los sauces y chopos, los tarayes, muchas enoteráceas y asclepiadáceas, etc., transformado en pelos simple o plumosos, en cerdas a veces muy rígidas, en escamas, o convertirlo en una coronita.

ANEXOS

ANEXO N° 1

**CARTA DE AUTENTICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL EXTENDIDA
POR UN BOTÁNICO EXPERTO**



Antiguo Cuscatlán, 2 de Diciembre de 2014

A quien interese

Por medio de la presente nota hago constar que, Mirna Elizabeth Córdova Ramos y Evelin Yanira Castillo Villalta, estudiantes de Carrera de Licenciatura en Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador, se hicieron presente al herbario de nuestra institución con una muestra botánica conocida comúnmente como "señorita", realizando la respectiva revisión y comparación con ejemplares de herbario se logró determinar como: *Asclepias curassavica* L. (ASCLEPIADACEAE)

Y para lo que las interesadas estimen conveniente se extiende la presente.

Atte.

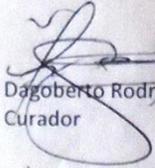

Dagoberto Rodríguez Delcid
Curador



Figura N° 34. Carta de autenticación de la especie vegetal por un botánico experto

ANEXO N° 2
CARTAS DE AUTENTICACIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES
EXTENDIDAS POR UN BOTÁNICO EXPERTO DE TRABAJOS
ANTERIORES

1. *Thevetia ahouai* (Huevos de gato):
Referencia de herbario (Jardín Botánico La Laguna): E. Sandoval
27.1.1.1997 (MS – 00350) (B, INB, LAGU).
2. *Thevetia peruviana* (Chilca):
Referencia de herbario (Jardín Botánico La Laguna): J. Flores SN (JBL –
00526) (LAGU, MO).
3. *Calotropis procera* (Matacoyote): Carta de autenticación

Asociación Jardín Botánico La Laguna



Antiguo Cuscatlán, lunes 8 de febrero de 2010

A quien interese:

Por este medio se hace constar que los alumnos Miriam Romero Arévalo y Jorge Denis Martínez se hicieron presente a las instalaciones de nuestro herbario solicitando la confirmación en la identificación de una especie arbustiva. Después de revisar la muestra se confirma que pertenece a la especie *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton de la familia Esclepiadaceae.

Y para los usos que los interesados estimen convenientes, se extiende esta carta de confirmación.

Lic. Jorge Alberto Monterrosa Salomón
Sección Técnica Científica
Herbario LAGU
Curador



Figura N° 35 Carta de autenticación de la especie vegetal por un botánico experto

ANEXO N° 3

PREPARACIÓN DE REACTIVOS USADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN

1. Reactivo Revelador de Vainillina – Ácido Sulfúrico al 5%.

- **Ácido sulfúrico al 5%:**

Medir 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, transferir a un balón volumétrico de 100 mL y aforar con etanol 90°.

- **Vainillina al 1%:**

Pesar 1 g de vainillina, disolver con etanol 90° y transferir a un balón de 100 mL, aforar y homogenizar. (Cubrir balón con papel de aluminio, porque la vainillina se descompone por la luz).

Aspersar con solución “A” y luego con solución “B”, calentar en estufa por 5–10 minutos a 110°C.

2. Reactivo Revelador de Kedde.

- **Kedde A:** Disolver 2.0 g de ácido 3,5-dinitrobenzoico en 100 mL de metanol.

- **Kedde B:** Disolver 5.7 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua.

3. Preparación de solución de azul de Tetrazolio

- Pesar 50 mg de azul de Tetrazolio en un beaker de 50 mL en balanza analítica.

- Disolver con 10 mL de Metanol

- Agitar hasta disolución completa (al momento de comenzar a agitar la solución se observa turbia pero después dos minutos de agitación constante se observa una solución translúcida de color amarillo).

4. Preparación de mezcla de Etanol 90° - Hidróxido de Tetrametilamonio (9:1)

- Medir 9 mL de Etanol 90° transferir a un beaker de 100 mL.

- Añadir 1 mL de hidróxido de Tetrametilamonio, mezclar (solución translúcida incolora).

ANEXO N°4

MONOGRAFÍA DE PROGESTERONA

La progesterona será utilizada como testigo para desarrollar la Cromatografía en Capa Fina.

Sinónimos: Hormona del cuerpo lúteo; Hormona luteínica; Luteína; Pregnediona; Progestina.

Nombres Propios: Crinone; Cutifitol; Cyclogest; Esolut; Estima; Evapause; Gesterol; Gestone; Lugesteron; Progeffik; Progenar; Progestan; Progestasert; Progestilin; Progestogel; Progestol; Progestosol; Prolidon; Proluton; Prometrium; Prontogest; Utrogest; Utrogestan.

Pregn-4-ene-3, 20-dione

$C_{21}H_{30}O_2 = 314.5$

CAS – 57-83-0

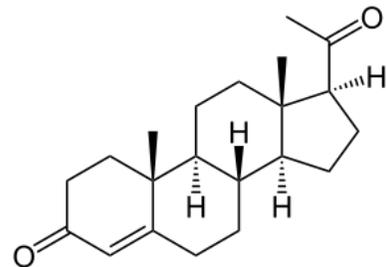


Figura N° 36. Estructura química de progesterona

Apariencia: Cristales incoloros o polvo cristalino blanco o ligeramente amarillento blanco.

Punto de fusión: Hay dos formas, uno sabe que la α - forma se funde a 127° a 131° y el otro, conocido como β - progesterona, a unos 121° .

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua; soluble 1 parte en 8 partes de etanol. 1 parte en menos de 1 parte de cloroformo, y 1 parte en 16 partes de éter.

Ensayos para identificar la progesterona.

- a. **Prueba de color:** Naphtol-ácido sulfúrico – café/amarillo; ácido sulfúrico – amarillo (fluorescencia verde bajo luz UV).
- b. **Cromatografía de Capa Fina:** Sistema TB – Rf 36; Sistema TE – Rf 79; Sistema TF – Rf 56; Sistema TP – Rf 81; Sistema TQ – Rf 20; Sistema

TR – Rf 99; Sistema TS – Rf 95; Sistema TAE – Rf 89; sistema TAJ – Rf 76; Sistema TAK – Rf 68; Sistema TAL – Rf 95; Sistema TAM – Rf 97.

- c. **Cromatografía de gases:** Sistema GA – RI 2793.
- d. **Cromatografía líquida de alta eficacia:** Sistema HX – Rf 672; Sistema HY – RI 698; Sistema HAA – Tiempo de Retención 23.8 min.
- e. **Espectro Ultravioleta:** alcohol deshidratado – 240 nm ($A^{1}_{1}=540^{a}$)

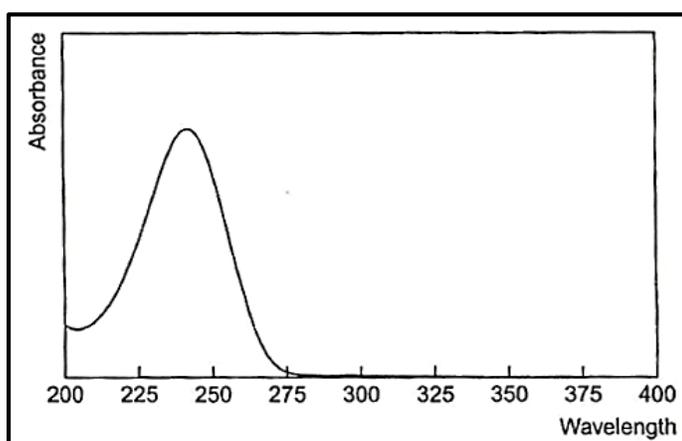


Figura N° 37. Espectro ultravioleta de progesterona

- f. **Espectro infrarrojo:** pico principal a número de onda 1662, 1614, 1700, 872, 1209, 1232 cm^{-1} .

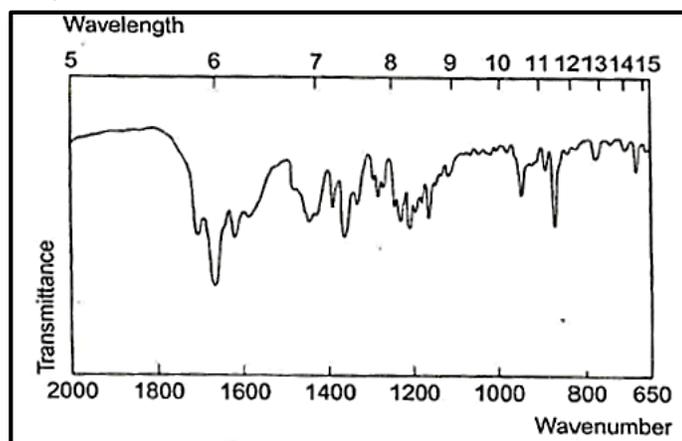


Figura N° 38. Espectro infrarrojo de progesterona

- g. **Espectro de masas:** Iones Principales son m/z 124, 43, 314, 79, 91, 229, 272, 105. (23)