

METODOLOGÍA CIENTÍFICA PARA EL ESTUDIO DE PLANTAS MEDICINALES

**María Julia Verde-Star, Sergio García-González,
Catalina Rivas-Morales**

Laboratorio Química Analítica y Productos Naturales, Facultad de Ciencias
Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
maria.verdest@uanl.edu.mx, sergio_uanl@hotmail.com,
catalina.rivasmr@uanl.edu.mx

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.335>

Verde-Star, M.J., García-González, S., & Rivas-Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 1-40.

Resumen

El estudio científico de las plantas tóxicas, medicinales y aún las que hasta ahora no han sido utilizadas con fines terapéuticos, buscando encontrar actividad biológica en sus extractos, aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes y más aún encontrar el o los principios activos, es el objetivo principal de la Fitoquímica.

Más del 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados (Amin et al., 2009). Cabe mencionar que tan sólo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos.

Se resalta la importancia de la quimiotaxonomía y se describen las técnicas de colecta, identificación y preparación del material vegetal, las técnicas de extracción así como los análisis preliminares de los extractos, determinar su actividad biológica: antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, antiurolítica, antihipercolesterémica, antidiabética, nefroprotectora y la actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales; encontrar la concentración mínima del extracto activo y determinar la estructura del o de los compuestos activos, mediante pruebas químicas y espectroscopía.

Una información muy importante es la que proporciona la herbolaria tradicional, pues describe los usos terapéuticos que a nivel empírico se atribuye a las plantas.

El estudio de las plantas en las últimas décadas, ha permitido encontrar nuevas moléculas con posibilidad de actuar como nuevos fármacos.

Palabras clave

Técnicas fitoquímicas, manejo de extractos vegetales, extractos de plantas medicinales.

1.1. Introducción

Desde hace miles de años, cuando el hombre fue encontrando curas o paliativos para las enfermedades que le aquejan en hojas, raíces, cortezas, semillas, frutos o flores de plantas silvestres, además de dar inicio a lo que se conoce como herbolaria o medicina tradicional herbolaria, se empezó a establecer una relación empírica entre el tipo de planta y la actividad biológica atribuida a cada una, distinguiendo una planta de otra solo por las características externas más notorias y por su aroma, ya que aún no se establecía lo que hoy se conoce como taxonomía vegetal.

Del conocimiento empírico de los beneficios del uso de plantas para fines terapéuticos, surgen los primeros fármacos sintéticos, como ejemplo: la aspirina, su estructura y síntesis fue inspirada en los componentes de la corteza del sauce blanco *Salix alba*, de la misma manera se ha procedido para copiar estructuras de origen natural en laboratorios farmacéuticos y aplicar estos productos a fines terapéuticos (Butler, 2004; Lambert, Srivastava & Vietmeyer, 1997; Mishra & Tiwari, 2011).

A partir del conocimiento etnobotánico y herbolario se iniciaron las investigaciones para conocer los principios activos presentes en las plantas más conocidas y esto dio origen a la rama de la Ciencia que es la Fitoquímica.

Una diferencia importante entre el reino vegetal y el animal es la capacidad de las plantas y los hongos para producir sustancias que no le son esenciales para sobrevivir, la determinación de la presencia de estas sustancias, su análisis y la búsqueda de su actividad biológica constituyen el objetivo de la Fitoquímica (Sarker, Latif & Gray, 2005; Valencia-Ortiz, 1995).

A medida que crece el conocimiento y número de plantas conocidas como medicinales se ha sistematizado la relación planta-actividad pues el conocimiento taxonómico permitió distinguir algas, bacterias, hongos, briofitas, pteridofitas, gimnospermas, angiospermas y clasificar familias, géneros y especies. Todo este conocimiento permite el surgimiento de la quimiotaxonomía, es decir la relación entre la familia de plantas y el tipo de componentes químicos presentes en estas; o en algunos casos género-tipo de compuestos, pudiendo servir como una guía en el estudio fitoquímico de las plantas.

Metabolitos primarios y secundarios. En principio, los metabolitos primarios y los secundarios no se pueden diferenciar en base a su estructura química, molécula precursora u orígenes biosintéticos. En ausencia de una distinción válida entre ambos tipos de metabolitos en base a su estructura o bioquímica, se tiene en cuenta su función, de modo que se dice que son metabolitos primarios aquellos que participan en la nutrición y procesos metabólicos esenciales para la planta, mientras que metabolitos secundarios son los que permitan interacciones ecológicas de la planta con su entorno (Dewick, 2002; Maplestone, Stone & Williams, 1992).

Los metabolitos primarios presentes en los vegetales son: carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, aminas, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, los que a su vez producen metabolitos secundarios, que son sustancias que no participan de forma directa en el crecimiento o desarrollo, es decir, sustancias que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno, ya sea como mecanismo de defensa contra predadores o como materia de almacenamiento. (DerMarderosian & Beutler, 2002; Dias, Urban & Roessner, 2012)

Los animales superiores raramente producen metabolitos secundarios y salvo algunas excepciones solo se les encuentra en insectos y algunos otros invertebrados.

Es decir, algunos metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies y cumplen una función ecológica específica, como por ejemplo atraer a los insectos para transferirles el polen, o a animales para que éstos consuman sus frutos y así poder diseminar sus semillas; también pueden actuar como pesticidas naturales de defensa contra herbívoros o microorganismos patógenos, incluso como agentes alelopáticos (sustancias que permiten la competencia entre especies vegetales), también se pueden sintetizar metabolitos secundarios en respuesta a daño en algún tejido de la planta, así como contra la luz UV y otros agentes físicos agresivos, incluso actuar como señales para la comunicación entre plantas con microorganismos simbiotes (Colegate & Molyneux, 2007).

Quimiotaxonomía: Se llama así a la relación que guarda una planta, en cuanto a su clasificación taxonómica y los metabolitos secundarios que contiene. Por ejemplo la relación: Papaveráceas: alcaloides, permite establecer la hipótesis que las plantas pertenecientes a la familia Papaveraceae contienen alcaloides.

Familias de metabolitos secundarios.- Aunque hay alguna discrepancia en la clasificación de estas familias, la más general contiene a los Terpenoides, Esteroles, Compuestos fenólicos- Flavonoides, Cumarinas, Quinonas, Lignanos, Glicósidos cianógenicos, Glicósidos cardiotónicos, Iridoides, Alcaloides, Saponinas. Sesquiterpenlactonas, principalmente (Valencia-Ortiz, 1995).

A través de la existencia de la humanidad sobre la Tierra, una de sus preocupaciones ha sido mantener la salud, la aparición de nuevas enfermedades ha motivado al hombre, a lo largo de siglos, a buscar una solución o un paliativo para estos males y ha sido a través del ensayo con plantas. Sin embargo hasta hace relativamente pocos años empezó el estudio científico de las plantas y sus componentes químicos con propiedades medicinales o sus actividades biológicas, que es el objetivo de este capítulo.

Para el estudio de las plantas medicinales, la metodología a seguir, comprende las siguientes etapas:

- Estudios Etnobotánico y Etnofarmacológico basados en investigación bibliográfica exhaustiva, para conocimiento del uso tradicional y los efectos de las plantas dotadas con propiedades medicinales.
- Estudio de Actividad Biológica: Comprobación científica del uso terapéutico por ensayos que involucran evaluación *in vitro* o *in vivo*.
- Estudio Fitoquímico: por medio de un ensayo biodirigido, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta a partir del cual puede orientarse el fraccionamiento de los extractos.
- Estudios de Toxicidad y Citotoxicidad: evaluación sobre organismos ó células del posible efecto tóxico de los extractos de plantas.
- Desarrollo de un producto fitoterapéutico: Formular con los extractos o compuestos activos un fitofármaco para su evaluación clínica.

Después del estudio etnofarmacológico de la planta a estudiar y considerando la quimitaxonomía de la misma, se lleva a cabo el estudio de la actividad biológica, este comprende las siguientes etapas: 1) Ubicar geográficamente la planta y colectarla, 2) Clasificarla botánicamente por expertos obteniendo

su número de registro, 3) Limpiar las impurezas visibles (tierra insectos, etc) y secar a la sombra, para su molienda y obtención de los extractos (Domínguez, 1988).

1.2. Metodología

1.2.1. *Preparación de extractos*

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de: raíz, hojas, flores, tallos, de acuerdo a los antecedentes encontrados, de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible. Los métodos extractivos más empleados son: A) Maceración: frío o en calor, B) Lixiviación, C) Soxhlet y D) Arrastre por vapor de agua.

1.2.1.1. *Extracción por Maceración*

Este es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso el material vegetal se corta en pequeños trozos o molido, fresco o seco se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o eter de petróleo), cloroformo y finalmente metanol o etanol en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 d cada extracción, Otra opción es obtenerlo en una forma directa agregando una mezcla de solventes: metanol: cloroformo: hexano en la proporción 7:2:1, obteniendo un extracto en forma directa (Bonatti, 1991).

1.2.1.2. *Extracción por Lixiviación*

En este método de extracción se produce el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido, este proceso se utiliza industrialmente para preparar elixires; el material vegetal fresco se coloca en un recipiente a



Figura 1. Rotavapor

temperatura ambiente, durante 3 d, con acetona o algún otro solvente o mezcla de solventes, sin ser necesario cortar en trozos dicho material. Después de este tiempo se decanta y se evapora la acetona en un rotavapor (Figura 1), (se puede emplear otro solvente o agua) (Walton & Brown, 1999).

1.2.1.3. Extracción por Soxhlet

Este es un proceso de extracción continua de un material sólido que contiene algunos de los compuestos deseados, se coloca dentro de un dedal de papel fil-

tro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet (Figura 2), donde se hace pasar el solvente, este ciclo puede repetirse muchas veces, durante horas o días.

Para la extracción del material vegetal se puede dividir en: Parte aérea (flores, fruto, semillas, hojas, tallo) y raíz, el estudio fitoquímico puede ser de la planta completa ó una de sus partes para un análisis específico.

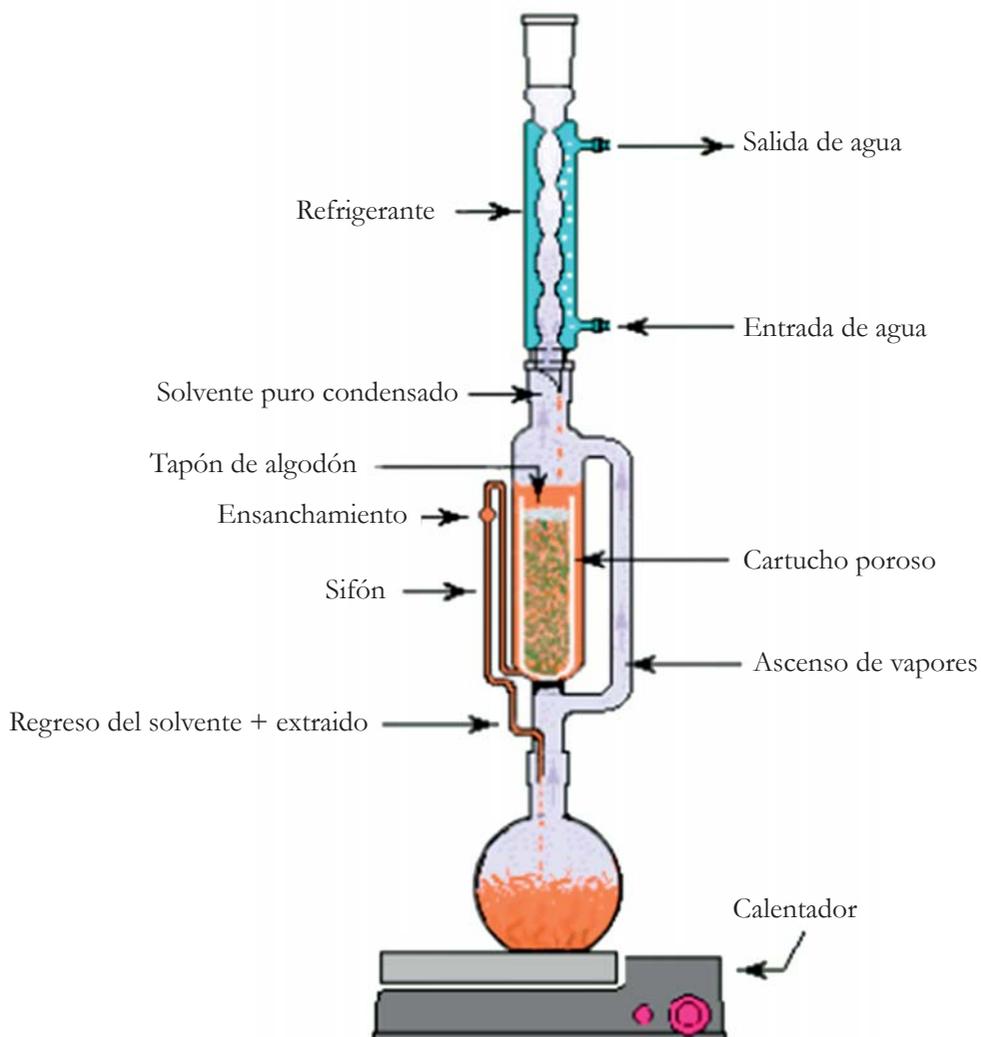


Figura 2. Equipo Soxhlet

La planta seca y molida se coloca en un Soxhlet (Figura 2) con éter de petróleo o hexano durante 7 d a una temperatura de 20°- 30° C. Al término de éste tiempo, observar si hay un precipitado, en caso de tenerlo, filtrar inmediatamente, evaporar el filtrado y con el mismo solvente recuperado seguir lavando el precipitado, evaporando nuevamente los filtrados para recuperar y guardar el solvente.

Los extractos que se obtienen respectivamente se recomienda concentrarlos en un rotavapor (Figura 1) para la recuperación del solvente que puede volver a ser utilizado.

Se puede llevar a cabo una extracción directa con metanol donde se coloca el material vegetal seco y molido en un soxhlet y directamente se le añade el metanol refluendo durante 7 d, al término de este tiempo, dejar enfriar el extracto y observar si se forma algún precipitado para filtrar o decantar según sea el caso.

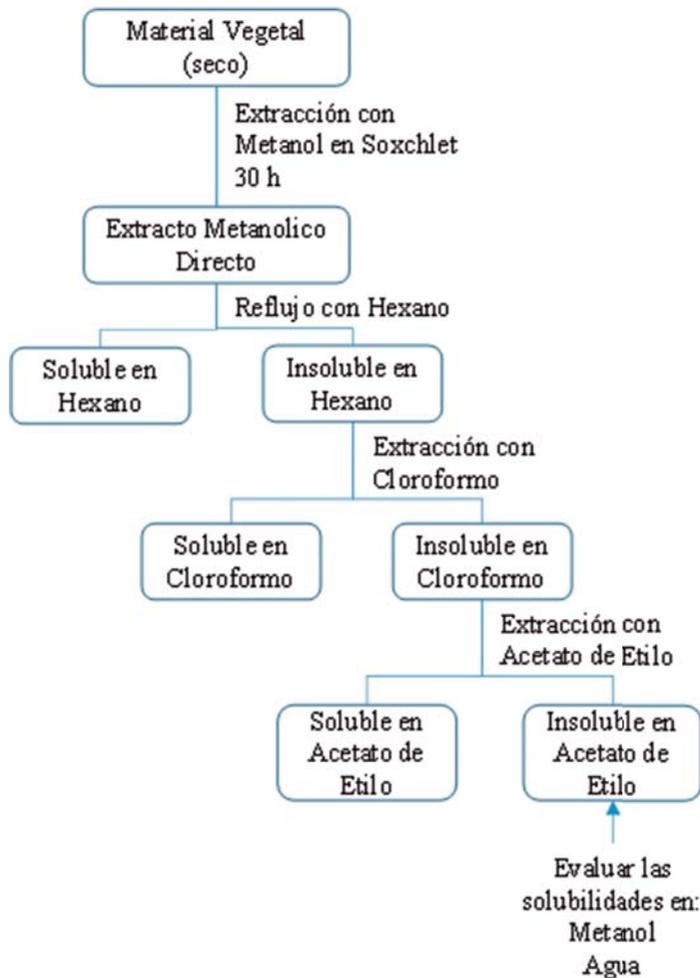
El extracto metanólico sin precipitado, se evapora en el rotavapor a sequedad para refluir con hexano, (15 a 20 mL de hexano por gramo de extracto), durante 2 h y dejar enfriar para separar lo soluble e insoluble en hexano; lo insoluble en hexano se refluja con cloroformo (15 a 20 mL de cloroformo por gramo de extracto), durante 2 h, dejar enfriar y separar lo soluble e insoluble en cloroformo.

La parte insoluble en cloroformo se refluja con acetato de etilo (15 a 20 mL de acetato de etilo por gramo de extracto), durante 2 h, se deja enfriar y se separa lo soluble e insoluble en acetato de etilo.

En los extractos solubles en Hexano, Cloroformo y Acetato de etilo así también como el insoluble después de la extracción con acetato de etilo, se pueden realizar bioensayos para evaluar alguna actividad biológica en las muestras e iniciar la separación de los principios activos. (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010).

En resumen el diagrama de la extracción con metanol en forma directa sería la siguiente:

Diagrama de Flujo: Extracción del material vegetal con metanol en forma directa



1.2.1.4. Arrastre por vapor

Se utiliza principalmente para aceites esenciales (Figuras 3, 4 y 5). Los aceites esenciales (AE) contienen compuestos orgánicos volátiles o aromáticos, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Se les extrae preferentemente por arrastre de vapor (Figura 5) mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica.

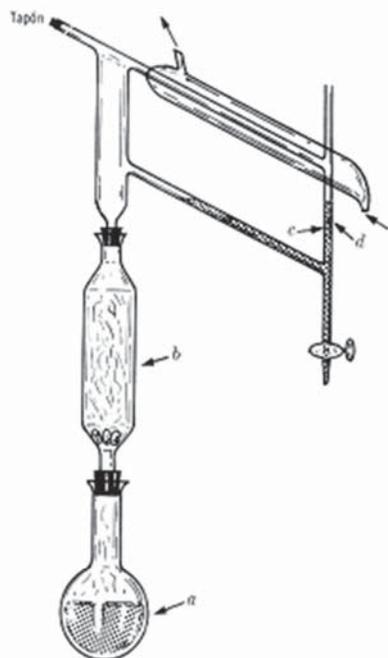


Figura 3. Aparato de destilación continua por arrastre con vapor



Figura 4. Extractor líquido-líquido

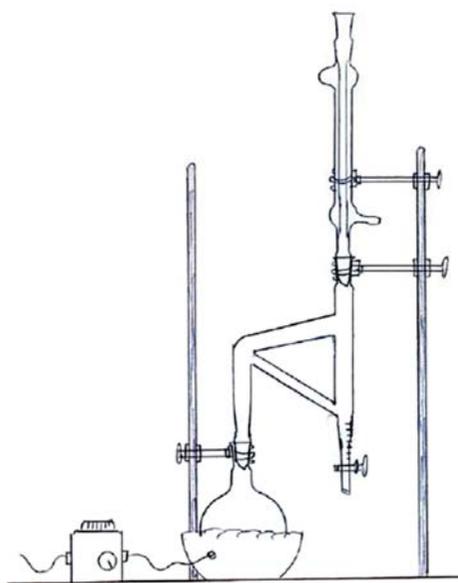


Figura 5. Hidrodestilación con trampa de Clevenger

Los aceites esenciales poseen propiedades medicinales muy diversas tales como: sedantes, antiespasmódicas y desinfectantes. Dado que son compuestos volátiles, son asimilados por las vías respiratorias y actúan como expectorantes. Las plantas con aceites esenciales se ubican principalmente en las familias de las Labiadas y las Umbelíferas.

Al líquido acuoso que quedó del arrastre por vapor se le hace la extracción con cloroformo en un aparato líquido-líquido (Figura 4), durante 5 d a una temperatura de 30°- 40°C, al término de éste tiempo, el extracto clorofórmico se evapora en el rotavapor y se monta en una columna para separación cromatográfica.

Otro modelo de aparato de arrastre por vapor aparece en la Figura 5.

En cada uno de los extractos obtenidos: hexánicos, etéreos, cloroformicos, metanólicos, etanólicos, de acetato de etilo, acuosos etc, se deben realizar las diferentes pruebas de actividad biológica para realizar un estudio biodirigido y efectuar el aislamiento e identificación del compuesto bioactivo o bien desde otro punto de vista, trabajar cada uno de los extractos para el aislamiento de estructuras químicas nuevas.

1.2.2. Separación e identificación de metabolitos secundarios

1.2.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica rápida y sencilla, que permite separar una mezcla de compuestos, determinar el grado de pureza y realizar el seguimiento de una reacción química.

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de vidrio o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente de 0.1 mm de espesor (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente (SiO_2 y Al_2O_3).

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como frente de retención (Rf), y tiene un valor constante para cada compuesto en condiciones cromatográficas específicas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.).

Para calcular el Rf, la distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha y se aplica la siguiente ecuación:

$$R_f = \text{distancia recorrida por el compuesto (X)} / \text{distancia recorrida por el eluyente (Y)} \quad (1)$$

Ecuación 1. Cálculo del frente de retención (Rf)

Eluentes: Para elegir los eluentes que se utilizaran en la cromatografía, es necesario conocer la polaridad de los disolventes, en fitoquímica se utilizan los eluentes de menor a mayor polaridad, como se indica en la Tabla 1.

Por ejemplo: Si queremos eluir una cromatografía en capa fina (Figura 5 A, B y C) de una muestra de extracto o fracción diluida de una columna cromatográfica o un insoluble o precipitado del material vegetal en estudio, etc. Primero se solubiliza una pequeña cantidad de muestra en el disolvente adecuado y con un capilar aplicar la muestra aproximadamente a 1 cm de distancia del inicio en la placa cromatográfica, dejar secar y colocarla en un recipiente de

	Disolvente	Punto de Ebullición (°C)	Densidad (g/mL)
P	Eter de Petroleo	35- 60	0.640
O	Hexano	69	0.659
L	Benceno	80	0.874
A	Cloroformo	61	1.492
R	Acetato de etilo	77	0.902
I	Acetona	56	0.791
D	Etanol	78	0.785
A	Metanol	65	0.791
D	Agua	100	1.000

Tabla 1. Propiedades de disolventes más utilizados en fitoquímica

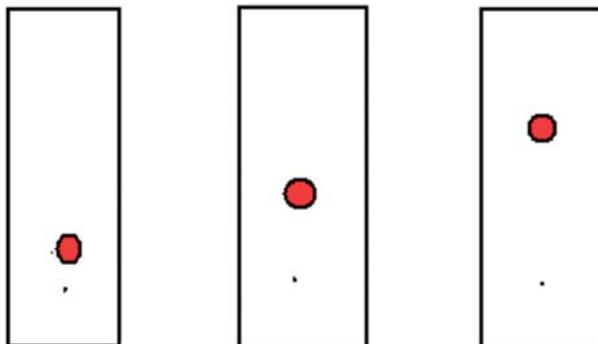


Figura 6. Corrimiento en una cromatografía en capa fina con diferentes sistemas de elusión

vidrio donde se tenga el eluyente: benceno:acetona 9:1 por ejemplo si la placa cromatográfica es de 5×10 cm utilizar un recipiente de vidrio de 250 mL con una tapa (caja de petri o vidrio de reloj) y agregar un volumen de 10 mL del eluyente, en este caso sería: 9 mL de benceno (B) y 1 mL de acetona (A), (a medio cm por terminar de eluir se sacar la placa y se seca) observar a la luz ultravioleta y revelar con cloruro de cobalto (posteriormente se describen los diferentes reveladores) si la muestra se desplazó como en la Figura 6A y se quiere desplazar más como la Figura 6 B se utilizará otra mezcla de eluyente por ejemplo benceno 8 mL–acetona 2 mL es decir B:A 8:2 y para desplazarse más, como en la Figura 6 C utilizar el sistema de eluentes B:A 7:3 y así sucesivamente hasta llegar a 5:5.

Si observamos que la muestra en la CCF no se desplazó, entonces se utiliza otro sistema de disolventes: cloroformo-metanol 9:1 y para desplazar más la muestra, utilizaríamos la misma relación de disolventes mencionados anteriormente. En caso de que la muestra no se desplace del punto de aplicación en la cromatoplaça, se utilizará un tercer sistema de eluentes, se propone Butanol-ácido acético-agua, primero en la proporción 7:2:1 si se requiere mayor polaridad se aumentaría el volumen de agua y se disminuye la proporción del ácido acético: 7:1:2 y así sucesivamente.

A continuación se muestra en la Tabla 2 otras mezclas de disolventes pero es muy importante «ensayar con diferentes proporciones» con los tres tipos de sistemas anteriores. En la Tabla 2 se muestran las relaciones indicadas que son volumen/volumen (V/V). (Paech & Tracey, 2012).

Relación de disolventes	V/V	Relación de disolventes	V/V
1 Eter de petróleo	10	18 Benceno-metanol	9:1
2 Ciclohexano	10	19 Cloroformo-acetona	85:15
3 Benceno	10	20 Benceno-éter etílico	4:6
4 Diclorometano	10	21 Benceno-acetato de etilo	1:1
5 Benceno-cloroformo	1:1	22 Cloroformo-éter etílico	6:4
6 Cloroformo	10	23 Ciclohexano-acetato de etilo	2:8
7 Ciclohexano-acetato de etilo	8:2	24 Cloroformo-metanol	95:5
8 Cloroformo-acetona	95:5	25 Cloroformo-acetona	7:3
9 Benceno-acetona	9:1	26 Benceno-acetato de etilo	3:7
10 Benceno-acetato de etilo	8:2	27 Acetato de etilo	10
11 Cloroformo-éter etílico	9:1	28 Acetato de etilo-metanol	99:1
12 Benceno –metanol	9:1	29 Benceno-acetona	1:1
13 Benceno-éter etílico	6:4	30 Cloroformo-metanol	9:1
14 Ciclohexano-acetato de etilo	1:1	31 Acetona	10
15 Cloroformo-éter etílico	8:2	32 Etanol	10
16 Benceno-acetona	8:2	33 Metanol	10
17 Cloroformo-metanol	9:1	34 H ₂ O + CH ₃ -COOH + HCL	30:10:3

Tabla 2. Relación de disolventes (V/V) utilizados en cromatografía en capa fina

1.2.2.1.1. Reveladores

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). El indicador absorbe la luz UV y emite luz visible. En el caso de compuestos que no absorben luz UV, para la visualización del cromatograma se requiere utilizar un agente revelador. Este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos produciendo compuestos coloridos.

- CLORURO DE COBALTO (Revelador general): A 800 mL de agua destilada se le agrega 20 g de CoCl₂ y 100 mL de ácido sulfúrico concentrado, añadiéndolo por las paredes del matraz poco a poco, aforando a 1 L con agua destilada.

- DRAGENDORFF MODIFICADO, (alcaloides): Solución A; se disuelven 0.85 g de subnitrato de bismuto (o nitrato de bismuto), en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua.

Solución B; se disuelve 8.0 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada.

Cuando se va a usar, se mezclan: 5 mL de solución A y 5 mL de solución B, se le añade 20 mL de ácido acético glacial, aforando la solución con agua destilada a 100 mL.

- EHRLICH (compuestos con anillo furánico): 30 mg de paradimetilaminobenzaldehído se disuelven en 20 mL de etanol, Con este reactivo se revela la cromatografía y se coloca en una camarita con cloruro de hidrógeno unos minutos y los componentes que contengan el anillo furánico, las manchas se pueden colorear de morado, azul o violeta.
- POLIOLES: 200 mg de vainillina se disuelven en 50 mL de etanol y al momento en que se vaya a usar se mezcla con una solución al 3% de ácido perclórico (HClO_4) en agua, con esto se rocía la placa cromatográfica y a los 3 o 4 min que se deja secar aparecen las manchas de color azul pálido cambia a rosa y de color lila cambia a azul gris. En la Rhamnosa cambia de rojo a amarillo; en la Fructosa cambia de verde a gris.

Pueden interferir compuestos endólicos, también pueden dar coloración el ácido malónico y otros compuestos.

- MARQUIS (alcaloides): se hace una mezcla de ácido sulfúrico–formaldehído en una proporción de 10:1.
- QUINONAS: 100 mg de azul de metileno se disuelven en 20 mL de etanol, medio mililitro de ácido acético y 100 mg de Zinc en polvo.

Sacudir en frasco cerrado y rociar la cromatografía con esa solución, en los primeros minutos aparecen manchas coloridas que indican la presencia de quinonas.

- SESQUITERPENLACTONAS: A una solución metanólica saturada con hidroxilamina, se le añade ácido clorhídrico mezclado con hidróxido de sodio

2 N (1:1), con esto se rocía la cromatoplaca y luego con un segundo reactivo, el cual se prepara, mezclando una solución de cloruro férrico (FeCl_3) al 1% en metanol con ácido clorhídrico 2 N en una proporción (1:1).

- **AZÚCARES:** Se mezcla 0.93 g de anilina con 1.66 g de ácido o-ftálico ó anhídrido ftálico en 100 mL de butanol saturado con agua.

El cromatograma rociado se calienta a 110° C, los eluentes recomendados para la cromatografía, son; Isopropanol–acético–agua, en una proporción de 3:1:1 ó bien butanol–acético-agua 7:2:1.

- **ACEITES ESCENCIALES:** Se disuelve 30 mg de vainillina en 3 mL de etanol agregando 3 mL de agua y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- **FLAVONOIDES (sales de diazonio):** 100 mg de para nitro anilina se disuelven en 15 mL de agua destilada añadiendo 3 mL de ácido clorhídrico y al momento que se vaya a emplear se le añade 80 mg de nitrito de sodio (para el ácido norhidroguayarático, NADG, la mancha aparece roja ó naranja rojizo)
- **GRUPO CARBONILO:** Se disuelven 3 g de 2,4-dinitrofenilhidracina en 30 mL de ácido fosfórico al 85%, calentar para acelerar la disolución, diluir la mezcla con 19.8 mL de etanol al 95%, finalmente filtrar la solución.

Otra preparación es la siguiente: 100 mg de 2, 4- dinitrofenilhidracina se le añade 10 mL de etanol más 3 mL de ácido clorhídrico, aforando a 100 mL con agua destilada.

- **REACTIVO DE KELLER – KILLIANI (glicósidos cardiotónicos):** Se prepara la solución A; 0.1 g de ácido 3, 5 – dinitrobenzoico se disuelven en 10 mL de metanol, solución B; 0.5 g de hidróxido de potasio se disuelve con 10 mL de metanol.

Primero sé rocía la cromatografía con la solución A y luego con la solución B

En un tubo de ensaye colocamos un poco de digoxina disuelta en un ml de metanol y añadimos 3 gotas de solución A y luego 3 gotas de solución B observaremos una coloración rojiza (García-González, 1992).

1.2.2.2. *Cromatografía en Columna*

La cromatografía en columna es un método utilizado para la separación y purificación, de diferentes compuestos orgánicos que se encuentren en estado sólido o líquido. La fase estacionaria utilizada, es decir, el absorbente, se coloca en el interior de una columna de vidrio, con terminación en una llave de paso (Figura 7). La fase estacionaria se impregna con el eluyente o fase móvil; en seguida la muestra que nos interesa separar, la colocamos en la parte superior de la fase estacionaria y se hace pasar la fase móvil, se empieza a eluir la columna con hexano o éter de petróleo.

Los compuestos que se encuentran disueltos en la fase móvil, poco a poco saldrán de la columna cromatográfica, y se recogen en fracciones. Las fracciones menos polares serán las primeras en salir de la columna, las sustancias más polares, quedan retenidas por más tiempo en el absorbente, y a menudo es necesario el uso de diferentes disolventes con la finalidad de incrementar su polaridad para que sean arrastradas por estos.

El tiempo que se necesita para hacer fluir un compuesto por la columna, se conoce con el nombre de tiempo de retención; éste es característico de cada compuesto (absorbente, disolvente, presión, diámetro de la columna utilizada, etc).

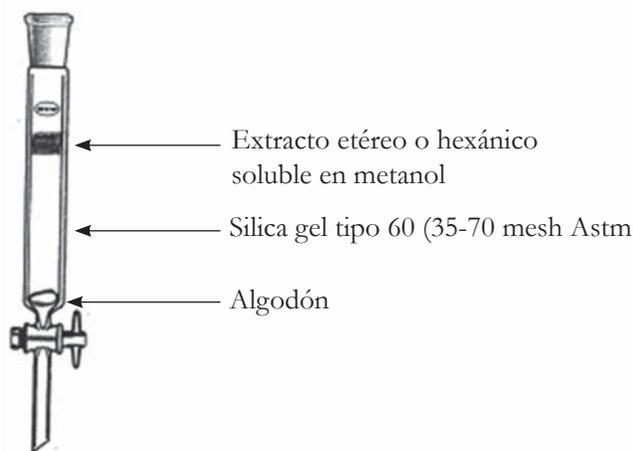


Figura 7. Montaje de una columna cromatográfica

Dependiendo del solvente que se utilizó en la extracción de la muestra se continuará en el proceso de separación de los compuestos, por ejemplo si fué realizada con:

- Hexano: Primero evaporar y luego reflujar con metanol durante 2 h, separar el insoluble y el soluble, el cual se evapora para montarlo en la columna cromatográfica.
- Cloroformo: Primero evaporar el solvente y el extracto obtenido se puede montar directamente en la columna.
- Acetona: Primero evaporar el solvente y el extracto obtenido, se puede montar directamente en la columna.
- Metanol: Primero evaporar el disolvente, se refluja con cloroformo, durante 2 h, el soluble en cloroformo se montará en columna eluyendo primero con hexano después con hexano-cloroformo 9:1 después 8:2, así sucesivamente hasta llegar a 5:5 para cambiar a cloroformo–metanol 9:1 después 8:2 hasta llegar a 5:5 para eluir finalmente con metanol.

La parte insoluble en cloroformo se puede montar directamente en la columna cromatográfica y empezar a eluir con cloroformo-metanol 9:1 después con 8:2 y así sucesivamente hasta llegar a solo metanol.

Nota: Los eluentes a utilizar en cromatografía en columna se seleccionaran de aquellos con mejor resolución en cromatografía en capa fina.

El extracto hexánico o etéreo una vez concentrado en el rotavapor sé refluja con metanol una hora (15 mL de metanol por cada gramo de extracto), se deja enfriar, se separa el insoluble, se pesa, si es posible determinar el punto de fusión y correr una cromatografía en capa fina, muy probablemente en el insoluble sé obtendrán las grasas e hidrocarburos, después de secar el insoluble y lavarlo con acetona para tratar de purificarlo, medir de nuevo el punto de fusión, por lo general los hidrocarburos tienen un punto de fusión menor de 70°C.

Para correr una cromatografía en capa delgada, de éste precipitado o insoluble en metanol, se empieza a usar como eluyente, benceno ó bien benceno-hexano 9.5:0.5,...9:1,..., 8.5:1.5,..., 8:2,... hasta llegar a usar solamente hexano.

De la partición soluble en metanol se evapora a sequedad, se pesa y se corre una cromatografía en capa fina, utilizando como eluyente benceno, benceno-acetona 9.5:0.5,..., 9:1..., aumentando la polaridad para incrementar la relación de frentes (Rf) de los componentes del extracto.

De la partición soluble en metanol se toman 4 ó 5 g mezclando con un poco de la misma sílica gel (35-70 mesh Astm), que se usará para la columna cromatográfica.

Se empieza a eluir la columna con hexano o éter de petróleo y recolectar fracciones de 125 mL; después evaporar cada una de las fracciones en el rotavapor y guardar el solvente

Por lo general el metanol y la acetona se utilizan para precipitar las fracciones de hexano o éter de petróleo y conforme se eluye la columna, se utilizarán disolventes de precipitación cada vez de menor polaridad y en ocasiones mezcla de ellos.

Cuando la fracción que se está recogiendo de la columna tenga color muy claro y transparente, evaporar y pesar el residuo, si es menor de 5 mg se sugiere obtener otras 4 fracciones y observar de nuevo, si ahora queda menor cantidad en el vaso, cambiar de eluyente en la columna, pero si en la cromatoplaça se observa solo una mancha con algo de impurezas, obtener mas fracciones con el mismo eluyente, hasta que deje de aparecer la mancha en la cromatografía.

Se puede seguir el progreso de separación de una cromatografía en columna, obteniendo secuencialmente volúmenes pequeños de eluatos en tubos o frascos etiquetándolos e indicar la composición de cada fracción, estas se analizan por cromatografía en capa fina (observar con luz UV y reveladas con CoCl_2). Las fracciones, con cromatografías en placa semejantes, se reúnen, se elimina el disolvente y se identifican los componentes por métodos espectroscópicos

Las primeras fracciones obtenidas, generalmente precipitan con metanol o acetona, otros disolventes que pueden utilizarse para la precipitación y cristalización de sus fracciones son, en orden de polaridad creciente: éter de petróleo o hexano, éter isopropílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo, metanol, usando éstos disolventes en forma individual o combinada (Walton & Brown, 1999).

Nota: Al terminar de eluir la columna con metanol, se deja secar y en la misma se puede volver a montar el extracto soluble en metanol de la misma planta, esto se puede realizar de 3 a 4 veces con el mismo rendimiento.

Para la purificación de los compuestos obtenidos se utiliza la cristalización y los criterios a seguir considerando que puede realizarse con disolventes puros o mezclas de ellos siempre y cuando se cumpla con lo siguiente requisitos:

- Muy soluble a alta temperatura
- Impurezas mas solubles en frío que el soluto
- Disolvente volátil, para eliminarse fácilmente de los cristales
- No reaccione con el soluto

1.2.3. Técnicas dirigidas para la obtención de compuestos

Establecido por Domínguez (1988), con modificaciones de García-González (1992) en el aislamiento de metabolitos secundarios específicos.

1.2.3.1. Alcaloides

Estos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas nitrogenadas. Aunque estrictamente se considera que los alcaloides deben tener al menos un átomo de nitrógeno heterocíclico, el nitrógeno puede formar parte de una amina primaria (RNH_2), de una amina secundaria (R_2NH) o de una amina terciaria (R_3N), excepcionalmente pueden encontrarse formando parte de una amina cuaternaria. La mayoría de los alcaloides se encuentran en forma de sales de ácidos orgánicos; en otros puede haber un ácido especial asociado a los alcaloides; y otros se encuentran en forma de glucósidos o de ésteres de ácidos orgánicos. Se disuelven con dificultad en agua, pero reaccionan con los ácidos para formar sales muy solubles. Son producidos y almacenados por cualquier parte de la planta. Los alcaloides ejercen una importante estimulación del sistema nervioso central y autónomo. Algunos actúan como estimulantes otros como inhibidores. También pueden modificar la contractilidad de las paredes de los vasos sanguíneos.

Si el extracto etanólico donde se encuentran los alcaloides contiene clorofila, ésta se puede eliminar por el siguiente método:

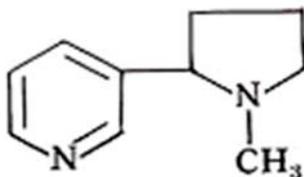


Figura 8. Nicotina

El extracto se acidula con HCl al 10% y después neutralizar con NH_4OH , posteriormente se hace una extracción con cloroformo y finalmente lavar con agua destilada, la extracción clorofórmica se concentra e inmediatamente se corre una cromatografía en capa fina y se cristaliza.

Otra técnica para separar alcaloides, en donde interfiere la clorofila es: refluja el extracto con 20 mL de NaHCO_3 (bicarbonato de sodio) al 5%, después se extrae con éter isopropílico para obtener una parte soluble y una insoluble que es una suspensión, se filtra y el residuo se recrystaliza, se filtra con 10 mg de carbón activado y correr una cromatografía en capa fina, evaporar y recrystalizar con metanol.

Por ejemplo para la obtención de nicotina (Figura 8), a 20 g de Picadura de troja, (tabaco), se le añade 50 mL de NaOH al 10% más 400 mL de agua destilada, por arrastre con vapor, para obtener el aceite de la nicotina.

1.2.3.2. Sesquiterpenlactonas

Estas poseen un esqueleto de 15 átomos de carbono (3 fragmentos de isopreno). Para la obtención de sesquiterpenlactonas (partenina Figura 9) a partir de *Parthenium hysterophorus*, se deja macerar con acetona, en un recipiente, durante 3 días, concentrar el extracto, extraer con cloroformo para eliminar el agua de la planta fresca, por último concentrar, no a sequedad, colocando el extracto en un vaso de precipitado y observar la formación de agujas de la partenina con un punto de fusión de 160°C , se corre una en cromatografía en capa fina y se revela con cloruro de cobalto, se observa el color amarillo, con el eluyente benceno-acetona 8:2.

Si la recolección de la planta se realiza en Septiembre e inicio de Octubre se obtiene mayor cantidad de partenina.

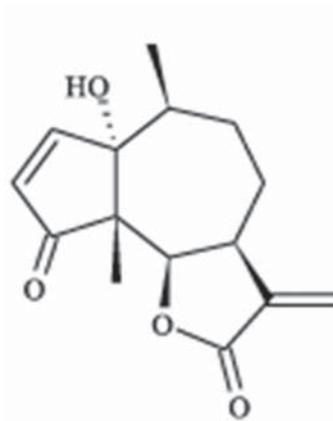


Figura 9. Partenina

Se evalúa el efecto herbicida que puede tener la partenina y su derivado, el epóxido, el cual se prepara de la siguiente forma:

A 100 mg de partenina se le añaden 2 mL de ácido acético más 3 mL de H_2O_2 al 30%, si llega a precipitar, añadirle ácido acético hasta disolver, después se vierte en agua destilada para después hacer la extracción con cloroformo.

El material que se extrajo con cloroformo, se lava con bicarbonato de sodio, se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora el cloroformo, apareciendo los cristales del epóxido.

La mancha obtenida en cromatografía en capa fina en benceno-acetona 9:1 del epóxido y revelada con cloruro de cobalto es de color amarilla (después de calentar) con un R_f de 0.38.

1.2.3.3. Saponinas

• MÉTODO INDIRECTO

A partir de *Agave lechuguilla* (Guiche), se hace una extracción en soxhlet con metanol a una temperatura de 30-40°C, se evapora el extracto metanólico y se agrega H_2SO_4 2 N, se refluxa durante 3 h a una temperatura de 50°C, se filtra el precipitado y se lava con agua destilada.

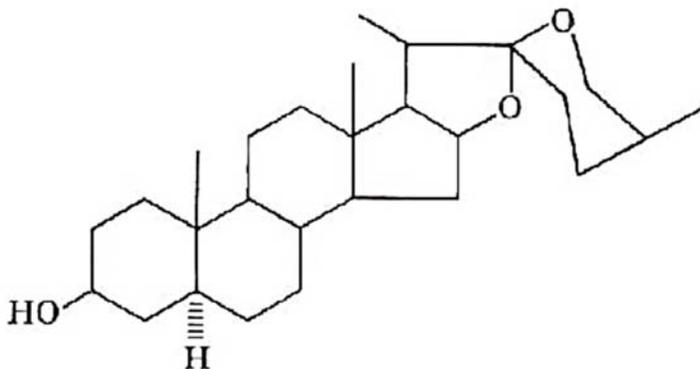


Figura 10. Esmilagenina

El precipitado se monta en el extractor soxhlet con hexano, el extracto se evapora, quedando un sólido que será esmilagenina (Figura 10), el cual se purifica al lavarlo con éter isopropílico.

- MÉTODO DIRECTO

A partir de *Agave lechuguilla* (Guiche), extraer en soxhlet, con agua destilada, durante 3 d. El líquido acuoso, se le agrega H_2SO_4 hasta convertirlo en 2 N, se refluxa por 3 h y dejar reposar, filtrar y repetir los pasos del método indirecto, a partir del lavado y filtrado.

Nota: Al filtrado acidulado se le puede añadir $CaCO_3$ para neutralizar y filtrar, liofilizando el filtrado se obtiene el azúcar

1.2.3.4. Lignanós

Estos compuestos son dímeros oxigenados del fenilpropano, se pueden obtener a partir de 80 g de hojas de *Larrea divaricata* (gobernadora) se colocan en un soxhlet y se refluxa con agua destilada durante 3 días, al término de éste tiempo se liofiliza el extracto acuoso el cual se extrae en un soxhlet con metanol durante otros 3 días.

El extracto metanólico se refluxa con hexano durante 3 h y lo insoluble en hexano se monta en una columna empacada con sílica gel tipo 60 (35–70 mesh Astm).

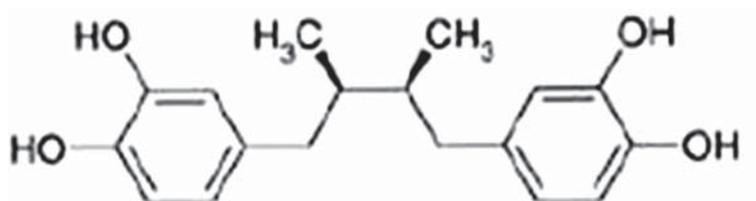


Figura 11. *Ácido nordihidroguayarético*

Otra técnica es macerar la planta en metanol-ácido clorhídrico en proporción 3:1 durante 5 d, al término de este tiempo filtrar y evaporar el filtrado casi a sequedad, añadir agua destilada para hacer una precipitación, se filtra y se lava con agua destilada para quitar el exceso de ácido, el filtrado se guarda o se descarta y al precipitado realizarle una cromatografía en capa fina, utilizando como fase móvil cloroformo-metanol 8:2 o 7:3 y se compara con ácido nordihidroguayarético (NDGA) Figura 11, revelando con sales de diazonio (mancha color rojiza) posteriormente se monta una columna con dicho extracto.

La columna se empieza a eluir con cloroformo, después con cloroformo-metanol 9:1,....8:2,....7/3,...etc. hasta solo metanol, el NDGA se obtiene entre las fracciones de cloroformo-metanol 8:2 y 7:3 éste compuesto se cristaliza, según el Merck Index, con ácido acético.

1.2.4. *Métodos de identificación*

Los compuestos puros se someten a diversas pruebas para elucidar su estructura (Lewis, Bernstein, Duncan & Sleigh, 2005; Schroeder & Gronquist, 2006; Urban & Separovic, s. f.; Wolfender, Ndjoko & Hostettmann, 2003), a partir de la siguiente metodología:

Métodos Físicos

- Punto de fusión
- Rotación Óptica
- Difracción de Rayos X

Métodos Espectroscópicos

- Ultravioleta
- Resonancia Magnética Nuclear
- Infrarrojo
- Espectro de Masas

Métodos químicos

- Pruebas coloridas

Prueba de Ignición.- Se utiliza para diferenciar un compuesto orgánico de uno inorgánico; se coloca una pequeña cantidad de muestra (1-2 mg) en un aza de platino y se lleva directamente a la flama de un mechero, si arde dejando cenizas como residuo, el compuesto es inorgánico.

1.2.4.1. Pruebas coloridas (García-González, 1992; Harborne, 1998)

1.2.4.1.1. Insaturaciones

- Prueba de tetranitrometano (TNM). Se disuelve 1 mg de la muestra en cloroformo y se agregan 2 mL de disolución de tetranitrometano en cloroformo, la aparición de un color amarillo indica la presencia de un doble enlace no terminal; ciclopropanos y compuestos aromáticos dan positiva ésta prueba.
- Prueba de bromo en cloroformo.- Se disuelve 1-2 mg de la muestra en 1 mL de cloroformo y se agrega gota a gota esta solución al 2%; la prueba es positiva, si se observa una decoloración de la solución.
- Prueba de permanganato de potasio.- Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se añade gota a gota una solución de permanganato de potasio al 2% en agua; la prueba es positiva si se observa decoloración o formación de un precipitado café de dióxido de manganeso.

1.2.4.1.2. Grupo carboxilo

Prueba de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Se agregan unas gotas de la solución de bicarbonato de sodio al 10% en agua a la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua o etanol. La prueba es positiva si se observa el desprendimiento de burbujas de anhídrido carbónico.

1.2.4.1.3. Grupo carbonilo

Prueba de la 2, 4-dinitrofenilhidrazina (100 mg de 2,4, DFNH + 10 mL de ETOH + 3 mL de HCl aforar a 100 mL con agua destilada) y se añaden unas gotas de este reactivo a la muestra disuelta en etanol, la formación de un precipitado amarillo, rojo o naranja indica la presencia de un grupo carbonilo.

1.2.4.1.4. Oxhidrilos fenólicos (Taninos)

Prueba de cloruro férrico. Se disuelve la muestra (1-2 mg) en 1 ml de etanol, añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5% en etanol; la coloración verde oscura o negra es prueba positiva.

1.2.4.1.5. Esteroles y triterpenos

Prueba de Liebermann-Burchard. El reactivo se prepara mezclando un mL de anhídrido acético más un mL de cloroformo y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una gota del reactivo se le añade a la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de cloroformo o sin disolver, la aparición de un color azul o morado, es prueba positiva para esteroles y color rojizo para triterpenos, en el lapso de una horas, particularmente los insaturados.

1.2.4.1.6. Saponinas

En un tubo de ensaye se coloca la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua, se sacude y se forma una espuma abundante, si ésta permanece por 1 h, la prueba se considera positiva.

1.2.4.1.7. Carbohidratos

Prueba de la Antrona. En un tubo de ensaye se colocan 1-2 mg de la muestra disuelta en agua, después se deja resbalar por las paredes del tubo una solución reciente de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado; la prueba es positiva si en la interface aparece un anillo azul-verdoso o violeta.

1.2.4.1.8. Cumarinas

Como las Cumarinas son lactonas, se pueden disolver en soluciones alcalinas acuosas o alcohólicas con aparición de una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular.

La presencia de un grupo furano se puede determinar mediante la prueba de Ehrlich. (Reveladores)

La mayoría de las Cumarinas, en cromatografía en capa delgada, tienen fluorescencia azul cuando se observa a la luz UV y cuando se revelan con cloruro de cobalto, después de calentar la placa, se colorea de amarillo o verde.

Se disuelven 1-2 mg de la muestra en una solución de hidróxido de sodio al 10% en agua; si aparece una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular, la prueba es positiva.

1.2.4.1.9. Sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet.- Se utilizan 2 soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse. La solución A se prepara pesando 1 g de ácido pícrico y disolviéndolo en 100 mL de etanol; para la solución B se pesan 10 g de hidróxido de sodio, disolviéndolos en 100 mL de agua. Para la prueba se ponen 3 a 4 mg de compuesto de prueba, añadiendo 3 a 4 gotas del reactivo, siendo positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura.

Una gota de solución etanólica o etérea del compuesto se coloca en un tubo de 4 × 50 mm o en un micro crisol, se añade una gota de una solución

metanólica 2 N de hidróxido de potasio. La mezcla se calienta con un micro mechero durante 1-2 minutos. Enseguida se enfría, se acidula con ácido clorhídrico 0.5 N y se añade una gota de cloruro férrico al 1%; se observa la coloración violácea, si el resultado es negativo, conviene diluir un poco y repetir la observación. La santonina da un color rosa violeta y la alantolactona violeta obscuro. Las Cumarinas, otras lactonas y en general los ésteres, dan positiva esta prueba.

Los simarubolidanos y Limonoides también pueden dar positivas las pruebas anteriores porque son lactonas

1.2.4.1.10. Furanocumarinas

Reactivo de Ehrlich.- Se utiliza una solución al 1.5% de p-dimetilaminobenzaldehído en etanol. Esta solución se utiliza como agente revelador sobre las placas cromatográficas con la muestra. Esta placa se introduce en una cámara conteniendo atmósfera de cloruro de hidrógeno. Una coloración violeta es indicativa para el anillo furánico.

1.2.4.1.11. Aromaticidad

El reactivo se prepara en forma reciente, añadiendo una gota de formalina (37-40% de formaldehído) a 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, colocándolo en un tubo de ensaye y por las paredes del tubo se agrega la muestra disuelta en un disolvente no aromático.

La formación de un anillo coloreado en la interfase que va de un color rojo carmín, hasta el negro, indica que la prueba es positiva.

1.2.4.1.12. Nitritos (NO_2^-)

Se disuelve en agua, un poco de sulfato ferroso y el compuesto, pasando por las paredes del tubo unas gotas de ácido sulfúrico concentrado, la prueba es positiva cuando se forma un anillo de color café obscuro.

1.2.4.1.13. Cloruros

Se disuelve 1 mg de nitrato de plata en agua bidestilada y añadir una gota de ésta solución a la muestra disuelta en agua bidestilada, la prueba para cloruros es positiva, cuando aparece un precipitado blanco lechoso.

1.2.4.1.14. Halógenos

Belstein. Se moja el alambre de cobre en ácido nítrico o ácido sulfúrico, se pasa por la flama de un mechero, después se toma la muestra y la dirigimos a la flama; el cloro da una coloración verde y el bromo de color azul

1.2.4.1.15. Cianuros

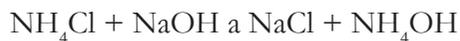
Primero se hace la solución para impregnar el papel filtro para la determinación de cianuros.

Solución: 200 mg de ácido pícrico, más 5 mL de etanol se le añade 5 mL de hidróxido de sodio 1 N (5 gr de NaOH en 125 mL de agua destilada), con ésta solución se impregna el papel filtro, dejando secar, el cual quedará con una coloración amarilla.

En un recipiente cerrado y transparente se pone un poco de material vegetal a analizar con un poco de agua y se deja el papel filtro adentro sin que se moje, el cambio de color de amarillo a rojo, es indicativo para cianuros.

1.2.4.1.16. Sal de cloruro de amonio (NH_4Cl)

Agregar hidróxido de sodio y tapar con papel pH idrión y observar los cambios;



1.2.4.1.17. Alcaloides

- Reactivo de Mayer. Se disuelven 1.36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua y 5 g. de yoduro de potasio en 10 mL de agua. Se juntan las dos soluciones y sé afora

a 100 mL. El reactivo solo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluidos. La solución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

- Reactivo de Scheibler. (Ácido Fosfotúngstico). Se disuelven en 50 mL de agua 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico. La solución se acidula con ácido nítrico. El reactivo forma precipitados amorfos al mezclarse con soluciones de alcaloides en H_2SO_4 diluido. El precipitado es soluble en exceso de reactivo o en etanol.
- Reactivo de Marquis. Se agregan 5 gotas de formol al 40% a la muestra que se va analizar añadir 5 mL de H_2SO_4 concentrado, la heroína y la morfina dan en forma inmediata una coloración rojo púrpura y luego pasa a coloración violeta y finalmente a coloración azul

1.2.4.1.18. Flavonoides

Prueba de Shinoda. Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol agregando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de magnesio; si la solución se torna de color rojo intenso, la prueba es positiva, otro color naranja, verde o azul pueden estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

Cuando no hay interferencia de pigmentos no flavonoides, el material vegetal se puede ensayar directamente; por ejemplo, Si los pétalos blancos de una flor se ponen amarillos en presencia de vapores de amoniaco, deben contener flavonas y/o flavonoles. Las chalconas y las auronas viran de amarillo a rojo. Los pétalos que contienen antocianinas viran a rojo intenso en presencia de amoniaco.

El pentacloruro de antimonio en tetracloruro de carbono, produce colores característicos con los flavonoides (prueba de Marini-Bettolo). Las chalconas forman precipitados rojo obscuro o violeta y las flavonas, precipitados amarillo o naranja.

Las flavonas y flavonoles se disuelven en ácido sulfúrico concentrado y originan soluciones fuertemente amarillas. Las flavanonas dan colores anaranjados o guinda a rojo azulado.

Los flavonoides-3, 4 (leucoantocianidinas) y catequinas se han localizado al hervir el material vegetal con ácido clorhídrico 2 N. Las primeras dan un color rojo y las últimas un color café-amarillento. La presencia de las antocianidinas formadas se confirma extrayéndolas con alcohol amílico, y se pueden identificar por cromatografía en papel.

Los flavonoides con dos hidroxilos orto o para entre sí, forman espejo de plata cuando se mezclan (5-10 mg) en solución etanólica (1-2 mL) con tres gotas de nitrato de plata al 12% en agua. Si después de agitar 15 min no se forma el espejo, se puede calentar 1 min y observar.

1.2.4.1.19. Iridoides

Trocitos de material se colocan en un tubo con 5 mL de HCl/H₂O al 1%, después de 3 a 6 h se decanta 0.1 mL del macerado a otro tubo que contenga 1 mL de reactivo de Trim-Hill, luego se calienta el tubo por muy corto tiempo, muchos iridoides dan colores azul, rojo o violáceo.

Preparación del reactivo de Trim-Hill; consiste en mezclar 10 mL de ácido acético más 1 mL de CuSO₄ · 5 H₂O al 2% en agua y 0.5 mL de HCl concentrado.

1.2.4.1.20. Quinonas

Las quinonas tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrados y con ácido sulfúrico, lo que puede usarse para identificarlas.

La presencia de naftaquinonas y antraquinonas se puede identificar con la reacción de Bornträger, en la cual se hierve durante 10 min, un poco de material con hidróxido de potasio al 2-5%. Se enfría la solución, se acidula y se extrae con benceno. La capa de benceno se separa y se sacude con un poco de la solución de hidróxido de potasio. Si la fase del benceno se decolora y la alcalina se pone roja, hay quinonas.

Una solución de quinona se decolora al agregar una solución al 5% de hidrosulfito de sodio y se regenera el color al añadir unas gotas de agua oxigenada al 30%.

Muchas p-benzoquinonas y algunas 1, 4 naftaquinonas dan coloraciones azules o violeta con cianoacetato de etilo, amoniaco y también con una gota de una solución etanólica al 0.2% de p-nitro fenil acetonitrilo y una gota de NaOH 0.1 N.

Las soluciones bencénicas de las 1, 4-naftaquinonas son amarillas, coloreando de rojo las soluciones alcalinas.

Las soluciones bencénicas de las 1, 2-naftaquinonas son rojas y pasan a la solución alcalina con un color azul violáceo.

Las naftaquinonas que carecen del grupo $(OH)^-$ en el carbón 2, dan colores azules a rojo con el o-aminotiofenol en metanol seguido por una gota de ácido clorhídrico concentrado. Si hay $(OH)^-$ no reaccionan con éste reactivo pero dan colores similares al tratarse con o-fenilendiamina.

Las hidroxiantraquinonas dan colores diferentes al calentarse 5 min con una solución metanólica al 0.5% de acetato de magnesio.

La presencia de naftaquinonas y antraquinonas se puede determinar hirviendo 10 min un poco del material con KOH al 2-5%. Se enfría la solución; se acidula y se extrae con benceno. La capa de benceno se separa y se sacude con un poco de la solución de KOH, si la fase de benceno se decolora y la alcalina se pone roja, es prueba positiva para quinonas.

Cuando hay derivados de Antrona, la fase alcalina puede quedar amarillenta con una fluorescencia verde, para que cambie a tono rojizo se le añade un poco de peróxido de hidrógeno al 3-6%

1.2.4.1.21. Glicósidos cardiotónicos y azúcares

Glucósidos: Los glucósidos o heterósidos son compuestos que están formados por 2 partes: una es un carbohidrato (ejem: glucosa) y la otra de no-azúcar o aglucona o genina. El enlace entre ambas es hidrolizable y debe romperse para que se active el compuesto; esta ruptura es catalizada por fermentos que contiene la misma planta. Los glucósidos son clasificados de acuerdo a las características estructurales de la aglicona:

- Raymond.- Se disuelven 1-2 mg de glucósido en 5-8 gotas de etanol al 50%. Después se agregan 1-2 gotas de una solución al 1% de *m*-dinitrobenceno en etanol y enseguida se añaden 2-3 gotas de una solución al 20% de NaOH en agua. Se forma un color violeta o azul.
- Legal 1-2 mg de cardenólidos o aglicona se disuelven en 2-3 gotas de piridina. Después se añaden, una gota de solución reciente al 5% de nitroprusiato de sodio en agua 1-3 gotas de NaOH 2N, es positiva se aparece un color rojo intenso.
- Tollens.- En un tubo de ensayo pequeño y bien limpio se disuelven 5-10 mg de glucósido en 5-8 gotas de piridina y se le añaden 4-6 gotas de reactivo de Tollens muy reciente. (Se mezclan 0.5 mL de AgNO_3 al 10% y 0.5 mL de NaOH al 10%; después se añade gota a gota hidróxido de amonio hasta redisolución del precipitado.) Este reactivo debe descomponerse antes de una hora, pues se forman nitruros explosivos. Si hay reductores precipita o forma un espejo sobre el tubo.
- Keller-Kiliani- Para glucósidos con 2-desoxiazúcares o para estos azúcares. Se disuelven 0.1-0.2 mg del glucósido en 1 mL de una mezcla reciente de 1 mL de sulfato-férrico al 5% y 99 mL de ácido acético glacial. Después se agregan 1-2 gotas de ácido sulfúrico. Si la prueba es positiva en 1-2 min aparece un color azul.

1.2.4.2. *Algunos datos espectroscópicos característicos de compuestos*

En la Tabla 3 se muestran algunas señales características de compuestos presentes en las plantas. (Domínguez, 1988; Silverstein M, Webster X & Kiemle J, 2005; Wade Jr, 2004).

Metabolitos	Ultravioleta (nm)	Infrarrojo (cm ⁻¹)	Resonancia magnética nuclear (ppm)
Flavonoides	200–270	3,300- 3.140	
Flavanonas	250–300	1,660-1650	
Flavonas y Flavonoles	330–335	1,660-1,650	
Leuconantocinidinas y Catequinas	280		
Chalconas y auronas	370–410		
Isoflavonas	250–290	1,660-1,650	
Antocianinas	500–530	3,200-3,100	
Sesquiterpenlactonas			
saturadas	< 200	1770	CH ₃ (13) 1.14 (d)
α, β insaturadas	205–225	1750	CH ₂ (13) 6.29(d) y 5.57 (d)
eudesmanolidos	214-230		
Cumarinas	278 y 310	1,715-1,745 1,130-	C- 3 y 4 dobles
benzo- α- pirona	278	1,160	5.93-6.46 y 7.65-8.03
cromonas	240–250	1,625-1,640	C-5, singulete 7.30
pirano	266 y 348		C-5 y C-8 singulete
furano	240-290 y 342		7.26-7.30 y 6.65 -6.70
Lignanos	230-240 y 230-240	3,600-3400 (OH) 2,950-2,800 (CH) 1,775 (Lactona) 1,738 (Ester)	6.20-6.80 (Aro) 6.5 (OH fenólicos) 5.90-5.94 (metilendioxi)
Esteroles	283 (dieno homoanular)	3,650-3,590 y 1,055 (OH) 2,960-2850 y 1,485- 1,445 (CH)	3.0-1.0 (CH ₃ y CH ₂)
Saponinas y sapogeninas	205-210 insaturados	3,600-3,300 (OH) 2,980-2850 (C-H)	3.3-3.8 (CHO) 5.2-5.6 (insaturaciones)
Quinonas		1,695 a 1,650,	6.40-6.50
benzoquinonas	240-290 (fuerte) 380-400 (debil)	1,640 a 1,595 (dicarbonilo insaturado)	
naftaquinonas	240-290 y 400-500		
antraquinonas	240-300, 300-350 y 400-500		

Continúa

Continuación

Metabolitos	Ultravioleta (nm)	Infrarrojo (cm ⁻¹)	Resonancia magnético nuclear (ppm)
Limonoides, meliacinas y simaroubalidanos	207-210 230-240 214 (α , β insaturadas)	1688-1690 (CO) 3,470-3,530 (OH)	
Glucósidos cardiotónicos	217 y 260-290 (butenólidos) 300 (pentenolidos)	3460-3200 y 1050- 980 (OH) 2980-2850 (CH) 1760-1740 (butenolidos) 1725-1715 (cardenolidos)	0.70-0.90 (C 18 y C 19) 4.80-5.05 y 4.70-4.78 (C21) 5.80-6.10 (C22) 6.20-6.50, 4.60- 4.80 y 5.70-5.90 (cardenolidos)
Alcaloides		3700-3200 y 1780- 1620 (OH e imino) 1600,1550 y 1500 (Aro) 900-800 (metoxilos, metilendioxi o furano	7.0-8.0 (aro) 7.2-9.2 (heteroero) 6.0 y 4 (metilendioxi y metoxilo)

Tabla 3. Señales espectroscópicas características de algunos compuestos

1.3. Conclusión

Los métodos que se han mencionado en este capítulo, extracción, separación e identificación de los diferentes metabolitos secundarios contenidos en las plantas nos sirven para tener una base científica de los compuestos químicos y su posible actividad biológica. En la extracción es importante establecer el método a seguir tomando en cuenta la forma de extracción (frio, caliente), la polaridad de los solventes utilizados; en la separación de las fracciones de los extractos contribuye el sistema de eluyentes utilizado tanto en cromatografía en capa fina como en columna para asegurar la pureza de los compuestos obtenidos; el tamizaje fito-

químico es una herramienta que nos orienta para la separación y purificación de los compuestos y por medio de un estudio biodirigido determinar la actividad biológica e identificar por métodos espectroscópicos el compuesto bioactivo, validando científicamente su uso en la medicina tradicional; esta información aportaría conocimiento para la biosíntesis o precursores de los principios activos encontrados, para su posterior uso como un fitomedicamento.

Referencias

- Bonatti, A. (1991). Formulation of plant extracts into dosage form. En R. O. B. Wijesekera (Ed.), *The Medicinal Plant Industry* (pp. 106-107). London: CRC Press.
- Butler, M.S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. En *Journal of Natural Products* (Vol. 67, pp. 2141-2153). <http://doi.org/10.1021/np040106y>
- Colegate, S. M., & Molyneux, R.J. (2007). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination, Second Edition*. CRC Press.
- DerMarderosian, A., & Beutler, J.A. (2002). *The review of natural products: the most complete source of natural product information*. Facts and Comparisons.
- Dewick, P.M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Dias, D.A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*. <http://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Domínguez, X.A. (1988). *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa.
- García-González, S. (1992). *Estudio Químico de Cnidocolus urens*. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.
- Harborne, A.J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science & Business Media.

- Lambert, J., Srivastava, J., & Vietmeyer, N. (1997). *Medicinal Plants: Rescuing a Global Heritage*. World Bank. <http://dx.doi.org/10.1596/0-8213-3856-0>
- Lewis, R.J., Bernstein, M.A., Duncan, S.J., & Sleigh, C.J. (2005). A comparison of capillary-scale LC-NMR with alternative techniques: spectroscopic and practical considerations. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(9), 783-789. <http://doi.org/10.1002/mrc.1614>
- Luque de Castro, M.D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography, A*, 1217(16), 2383-2389. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
- Maplestone, R.A., Stone, M.J., & Williams, D. H. (1992). The evolutionary role of secondary metabolites--a review. *Gene*, 115(1-2), 151-157. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90553-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(92)90553-2)
- Mishra, B.B., & Tiwari, V.K. (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 4769-4807. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.057>
- Paech, K., & Tracey, M.V. (2012). *Modern Methods of Plant Analysis/Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. Springer Berlin Heidelberg.
- Sarker, S.D., Latif, Z., & Gray, A.I. (2005). *Natural Products Isolation*. Humana Press. <http://dx.doi.org/10.1385/1592599559>
- Schroeder, F.C., & Gronquist, M. (2006). Extending the scope of NMR spectroscopy with microcoil probes. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45(43), 7122-7131. <http://doi.org/10.1002/anie.200601789>
- Silverstein M,R., Webster X,F., & Kiemle J,D. (2005). Spectrometric Identification of Organic Compounds. *Organic Chemistry*. [http://doi.org/10.1016/0022-2860\(76\)87024-X](http://doi.org/10.1016/0022-2860(76)87024-X)
- Urban, S., & Separovic, F. (s. f.). Developments in Hyphenated Spectroscopic Methods in Natural Product Profiling. *Frontiers in Drug Design & Discovery*.
- Valencia-Ortiz, C. (1995). *Fundamentos de Fitoquímica*. México DF.: Trillas.

- Wade Jr, L. (2004). Espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas. En Pearson Educacion (Ed.), *Química Orgánica* (5.ª ed., p. 490 ss). Madrid.
- Walton, N.J., & Brown, D.E. (1999). *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products*. Imperial College Press. <http://dx.doi.org/10.1142/3203>
- Wolfender, J.-L., Ndjoko, K., & Hostettmann, K. (2003). Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectrometry: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 437-455. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00303-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00303-0)