



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 06 de Noviembre de 2019

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad: Neiva Huila

El (Los) suscrito(s):

Juan Sebastián Garzón Preciado

con C.C. No. 1075544866

Cristian David Camacho Rodríguez

con C.C. No. 1075303232

Dagoberto Manuel Hernández Longas

con C.C. No. 1004147793

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado Aislamiento e Identificación de algunos Metabolitos Secundarios de la *Vitis tilifolia* (Agraz) y su evaluación de Toxicidad sobre *Artemia salina*.

Presentado y aprobado en el año 2019 como requisito para optar al título de

Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores” , los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

El Autor/Estudiante: Juan Sebastián Garzón P.

El Autor/Estudiante: Cristian David Camacho R

Firma:

Firma:

El Autor/Estudiante: Dagoberto Manuel Hernández L.

Firma:



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Aislamiento e Identificación de algunos Metabolitos Secundarios de la *Vitis tilifolia* (Agraz) y su evaluación de Toxicidad sobre *Artemia salina*

AUTOR O AUTORES:

| Primero y Segundo Apellido | Primero y Segundo Nombre |
|----------------------------|--------------------------|
| Garzón Preciado | Juan Sebastián |
| Camacho Rodríguez | Cristian David |
| Hernández Longas | Dagoberto Manuel |

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

| Primero y Segundo Apellido | Primero y Segundo Nombre |
|----------------------------|--------------------------|
| | |

ASESOR (ES):

| Primero y Segundo Apellido | Primero y Segundo Nombre |
|----------------------------|--------------------------|
| Castañeda Gómez | Jhon Fredy |

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

FACULTAD: Educación

PROGRAMA O POSGRADO: Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

CIUDAD: Neiva-Huila

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2019

NÚMERO DE PÁGINAS: 134

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas Fotografías Grabaciones en discos ___ Ilustraciones en general Grabados ___ Láminas ___
Litografías ___ Mapas Música impresa ___ Planos ___ Retratos ___ Sin ilustraciones ___ Tablas o Cuadros

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:



MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*): Meritoria

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

| | <u>Español</u> | <u>Inglés</u> |
|----|--------------------------------|----------------------------------|
| 1. | <u>Espectroscopia Uv</u> | <u>Uv Spectroscopy</u> |
| 2. | <u>Fruto</u> | <u>Fruit</u> |
| 3. | <u>Agraz</u> | <u>Agraz</u> |
| 4. | <u>Extracto Vegetal</u> | <u>Plant extract</u> |
| 5. | <u>Cromatografía capa fina</u> | <u>Thin layer chromatography</u> |
| 6. | <u>Fracciones</u> | <u>Fractions</u> |
| 7. | <u>Flavonoides</u> | <u>Flavonoids</u> |
| 8. | <u>Alcaloides</u> | <u>Alkaloids</u> |
| 9. | <u>Terpenos</u> | <u>Terpenes</u> |

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

El género *Vitis* presenta un alto porcentaje de antioxidantes de gran beneficio para el hombre. Muchas especies de este género son empleadas para el tratamiento contra el Cáncer y el Parkinson. La especie *Vitis tiliifolia* es una planta silvestre, más conocida como "Agraz" que crece en el municipio de Neiva (Huila). Las condiciones ambientales de la región hacen que la reproducción de esta planta sea óptima en la Cuenca principal del Rio la Ceibas. Teniendo en cuenta que un alto porcentaje de la población huilense hace uso de la planta, en especial del fruto, para remedios y bebidas que buscan el mejoramiento del sistema inmunológico, se propone en el presente proyecto identificar algunos metabolitos presentes en la *Vitis tiliifolia* (Agraz), mediante pruebas cualitativas de tubo de ensayo con reactivos específicos y, a través, de la cromatografía en capa fina, así como su posterior estudio toxicológico con *Artemia salina*. Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se llevaron a cabo una serie de etapas metodológicas, tales como: Colecta del material vegetal, macerado y obtención del zumo, separación y obtención de extractos vegetales,



determinación de los metabolitos en el laboratorio mediante pruebas cualitativas, aislamiento y purificación de las fracciones por cromatografía de capa fina, identificación por espectroscopía UV y puntos de fusión y una prueba de actividad biológica de los extractos con *Artemia salina*. Como resultado de estas etapas se obtuvieron tres extractos vegetales del Agraz con hexano, cloroformo y butanol. En el extracto butanólico se identificaron alcaloides, terpenos y taninos; mientras que en el extracto clorofórmico se determinó la presencia de cumarinas, terpenos y/o esteroides y alcaloides; entre tanto, que en el extracto hexánico se identificaron flavonoides, principalmente.

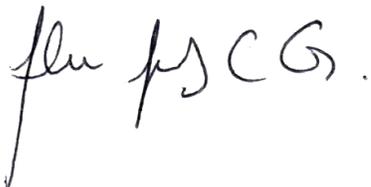
ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

The genus *Vitis* has a high percentage of antioxidants of great benefit to human being. Many species of this genus are used for the treatment against Cancer and Parkinson's. The species *Vitis tiliifolia* is a wild plant, better known as "Agraz" that grows in the municipality of Neiva (Huila). The environmental conditions of the region make the reproduction of this plant optimal in the main basin of the Rio la Ceibas. Taking into account that a high percentage of the Huilense population makes use of the plant, especially the fruit, for remedies and drinks that seek to improve the immune system, it is proposed in this project to identify some metabolites present in *Vitis tiliifolia* (Agraz), through qualitative test tube tests with specific reagents and through thin layer chromatography, as well as its subsequent toxicological study with *Artemia salina*. To comply with the objectives set, a series of methodological stages were carried out, such as: Collection of plant material, macerated and obtaining of juice, separation and obtaining of plant extracts, determination of metabolites in the laboratory through qualitative tests, isolation and purification of the fractions by thin layer chromatography, identification by UV spectroscopy and melting points and a test of biological activity of the extracts with *Artemia salina*. As a result of these stages, three vegetable extracts of Agraz were obtained with hexane, chloroform and butanol. In the butanolic extract alkaloids, terpenes and tannins were identified; while in the chloroform extract the presence of coumarins, terpenes and / or steroids and alkaloids was determined; Meanwhile, flavonoids were mainly identified in the hexane extract.



APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Jhon Fredy Castañeda Gómez

Firma: 

Nombre Jurado: Orlando Mosquera Villareal

Firma: 

Nombre Jurado: Jonathan Padilla Doval

Firma: 



Aislamiento e Identificación de algunos Metabolitos Secundarios de la *Vitis tiliifolia* (Agraz) y su Evaluación de Toxicidad sobre *Artemia salina*

Cristian David Camacho Rodríguez

Juan Sebastián Garzón Preciado

Dagoberto Manuel Hernández Longas

Universidad Surcolombiana

Facultad de Educación

Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Neiva-Huila

2019

Aislamiento e Identificación de algunos Metabolitos Secundarios de la *Vitis tiliifolia* (Agraz) y su Evaluación de Toxicidad sobre *Artemia salina*

Presentado por:

Cristian David Camacho Rodríguez

Juan Sebastián Garzón Preciado

Dagoberto Manuel Hernández Longas

**Trabajo de grado para optar al título de
Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología.**

Director:

Jhon Fredy Castañeda Gómez, Ph.D

**Universidad Surcolombiana
Facultad de Educación
Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología
Neiva-Huila
2019**

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a Dios por habernos acompañado y guiado a lo largo de la carrera, Él se encargó de que este logro se hubiera cumplido y de que todo se diera a su debido tiempo.

Al director de tesis Jhon Fredy Castañeda Gómez por el apoyo brindado, compañía y credibilidad en la realización del trabajo de grado presente; de igual manera darle nuestros sinceros agradecimientos a la coordinación del laboratorio de química de ciencias básicas de la Universidad Surcolombiana, a cargo de la licenciada Yeimis Yohana Montealegre Figueroa y de sus auxiliares de laboratorio: Mayra y Lina Segura, por brindarnos el espacio para trabajar en los laboratorios a lo largo del proyecto de grado.

A los docentes de la Licenciatura Alfonso Morelo de la Osa e Hilda del Carmen Dueñas Gómez, por brindarnos a partir de sus investigaciones y conocimientos la idea principal y la especie vegetal con la que se trabajó en este proyecto, al destacarnos la importancia del agraz para la región Huilense; y también agradecer a los pobladores de la Reserva de la Cuenca del Río las Ceibas por permitirnos entrar al lugar y coleccionar la especie vegetal, gracias doña María Merly por su hospitalidad.

A los estudiantes de la licenciatura y amigos Briand André y Aldemar Morales Loaiza por la ayuda y asesoramiento brindados en varias pruebas realizadas en este proyecto, por su acompañamiento y dedicación para instruirnos en ellas.

A los evaluadores Orlando Mosquera y Jonathan Padilla, quienes a partir de la lectura de este documento sugirieron múltiples correcciones con el fin de mejorarlo y por su asesoría a través de comentarios al respecto.

Finalmente, a los jurados, a nuestras familias y demás personas que estuvieron pendientes de este proyecto, quienes fueron un apoyo constante para la realización de este.

Resumen

El género *Vitis* presenta un alto porcentaje de antioxidantes de gran beneficio para el hombre. También, se le confiere un alto contenido de hierro, vitamina C, sodio y calcio. Muchas especies de este género son empleadas para el tratamiento contra el Cáncer y el Parkinson. La especie *Vitis tiliifolia* es una planta silvestre, más conocida como “Agraz” que crece en el municipio de Neiva (Huila). Las condiciones ambientales de la región hacen que la reproducción de esta planta sea óptima en la Cuenca principal del Rio la Ceibas. Teniendo en cuenta que un alto porcentaje de la población huilense hace uso de la planta, en especial del fruto, para remedios y bebidas que buscan el mejoramiento del sistema inmunológico, se propone en el presente proyecto identificar algunos metabolitos presentes en la *Vitis tiliifolia* (Agraz), mediante pruebas cualitativas de tubo de ensayo con reactivos específicos y, a través, de la cromatografía en capa fina, así como su posterior estudio toxicológico con *Artemia salina*. Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se llevaron a cabo una serie de etapas metodológicas, tales como: Colecta del material vegetal, macerado y obtención del zumo, separación y obtención de extractos vegetales, determinación de los metabolitos en el laboratorio mediante pruebas cualitativas, aislamiento y purificación de las fracciones por cromatografía de capa fina, identificación por espectroscopía UV y puntos de fusión y una prueba de actividad biológica de los extractos con *Artemia salina*. Como resultado de estas etapas se obtuvieron tres extractos vegetales del Agraz con hexano, cloroformo y butanol. En el extracto butanólico se identificaron alcaloides, terpenos y taninos; mientras que en el extracto clorofórmico se determinó la presencia de cumarinas, terpenos y/o esteroides y alcaloides; entre tanto, que en el extracto hexánico se identificaron flavonoides, principalmente. Los extractos fueron purificados mediante cromatografía de columna, identificándose el tipo de metabolito para tres compuestos aislados. Con respecto a la evaluación de Toxicidad de los extractos con *Artemia salina*, se encontró que estos presentan inocuidad moderada, estableciéndose baja toxicidad para los tres extractos. En esta investigación se pudo contribuir al conocimiento de la composición química del Agraz. Adicionalmente, el estudio sobre la toxicidad de esta especie con el Crustáceo *Artemia salina*, permitió determinar la baja toxicidad de los extractos preparados frente a los nauplios, después de 24 horas de exposición a las muestras. Por lo tanto, se puede concluir que la especie *Vitis tiliifolia* usada de manera tradicional, es rica en compuestos aromáticos fenólicos, los cuales podrían ser los responsables de modular el sistema inmunológico. Se recomienda realizar pruebas en proyectos futuros para demostrar la relación de la estructura con la actividad. Cabe mencionar que la especie vegetal se colectó con permiso de los dueños de la reserva, esta es una planta que posee un estado no evaluado en cuanto a su categoría de conservación, y por último, el presente proyecto no genera conflictos de intereses en cuanto al tema de investigación con otros proyectos relacionados o con otros semilleros de investigación .

PALABRAS CLAVE: Espectroscopía Uv, fruto, Agraz, Extracto vegetal, Cromatografía en capa fina, Fracciones, Flavonoides, Alcaloides, Terpenos, Concentración Letal Media (Cl₅₀).

Abstract

The genus *Vitis* has a high percentage of antioxidants of great benefit to human being. Also, it is conferred a high content of iron, vitamin C, Sodium and Calcium. Many species of this genus are used for the treatment against Cancer and Parkinson's. The species *Vitis tiliifolia* is a wild plant, better known as "Agraz" that grows in the municipality of Neiva (Huila). The environmental conditions of the region make the reproduction of this plant optimal in the main basin of the Rio la Ceibas. Taking into account that a high percentage of the Huilense population makes use of the plant, especially the fruit, for remedies and drinks that seek to improve the immune system, it is proposed in this project to identify some metabolites present in *Vitis tiliifolia* (Agraz), through qualitative test tube tests with specific reagents and through thin layer chromatography, as well as its subsequent toxicological study with *Artemia salina*. To comply with the objectives set, a series of methodological stages were carried out, such as: Collection of plant material, macerated and obtaining of juice, separation and obtaining of plant extracts, determination of metabolites in the laboratory through qualitative tests, isolation and purification of the fractions by thin layer chromatography, identification by UV spectroscopy and melting points and a test of biological activity of the extracts with *Artemia salina*. As a result of these stages, three vegetable extracts of Agraz were obtained with hexane, chloroform and butanol. In the butanolic extract alkaloids, terpenes and tannins were identified; while in the chloroform extract the presence of coumarins, terpenes and / or steroids and alkaloids was determined; Meanwhile, flavonoids were mainly identified in the hexane extract. The extracts were purified by column chromatography, identifying the type of metabolite for three isolated compounds. Regarding the evaluation of Toxicity of extracts with *Artemia salina*, they were found to have moderate safety, establishing low toxicity for the three extracts. In this investigation it was possible to contribute to the knowledge of the chemical composition of Agraz. Additionally, the study on the toxicity of this species with Crustacean *Artemia salina*, allowed to determine the low toxicity of the extracts prepared against nauplii, after 24 hours of exposure to the samples. Therefore, it can be concluded that the species *Vitis tiliifolia* used in a traditional way is rich in phenolic aromatic compounds, which could be responsible for modulating the immune system. It is recommended to perform tests on future projects to demonstrate the relationship of the structure with the activity. It is worth mentioning that the plant species was collected with the permission of the owners of the reserve, this is a plant that has an unassessed status in terms of its conservation category, and finally, this project does not generate conflicts of interest regarding the Research topic with other related projects or with other seedlings of investigation.

KEY WORDS: Uv spectroscopy, fruit, Agraz, Plant extract, Thin layer chromatography, fractions, flavonoids, alkaloids and terpenes, medium lethal concentration (LC₅₀) (

Tabla de Contenidos

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 13 |
| 2. Objetivos | 15 |
| 2.1 General | 15 |
| 2.2 Específicos | 15 |
| 3. Planteamiento del problema..... | 16 |
| 4. Justificación | 17 |
| 5. Marco Teórico..... | 18 |
| 5.1 Taxonomía y Descripción de la Especie <i>Vitis Tiliifolia</i> | 18 |
| Taxonomía | 19 |
| 5.2 Hábitat y Distribución del agraz | 19 |
| 5.3 Etnobotánica del agraz | 20 |
| Usos Alimenticios:..... | 20 |
| Uso Medicinal:..... | 21 |
| 5.4 Metabolitos secundarios de las plantas | 21 |
| Tipos de Metabolitos Secundarios:..... | 22 |
| 5.5 Espectroscopia: UV-Visible..... | 41 |
| 5.6 Cromatografía en Capa delgada o fina (TLC): | 43 |
| 5.7 Remedio herbolario..... | 44 |
| 5.8 Extracto vegetal | 45 |
| 5.9 Ensayos biológicos de citotoxicidad..... | 45 |
| Determinación de la toxicidad con <i>Artemia salina</i> : | 45 |
| 5.10 Aceites esenciales | 46 |
| Aislamiento de aceites esenciales: | 48 |
| 6. Antecedentes | 50 |
| 7. Metodología | 51 |
| 7.1 Diseño metodológico | 51 |
| 7.2 Colecta y preparación del material vegetal: Fase de Campo | 51 |
| 7.3 Macerado del zumo y obtención de los extractos vegetales | 52 |
| 7.4 Pruebas cualitativas para la identificación de los metabolitos secundarios | 54 |
| Pruebas para identificación de aminoácidos: | 54 |
| Pruebas para identificación de flavonoides: | 55 |
| Pruebas para la identificación de polifenoles y taninos: | 56 |
| Pruebas para la identificación de cumarinas: | 56 |
| Pruebas para la identificación de terpenos y/o esteroides:..... | 57 |
| Pruebas para la identificación de alcaloides: | 57 |
| Prueba para la identificación de lignanos (fenilpropanoides):..... | 58 |
| 7.5 Fraccionamiento cromatográfico de los extractos. | 58 |
| 7.6 Identificación de los metabolitos por espectroscopía Uv-Visible..... | 61 |
| 7.7 Determinación del punto de fusión de algunos compuestos aislados | 62 |
| 7.8 Evaluación biológica de los extractos: Prueba de toxicidad con <i>Artemia salina</i> | 63 |
| Eclosión de los huevos de <i>Artemia salina</i> | 63 |
| Preparación de las soluciones: | 64 |

| | |
|--|-----|
| Montaje de los quintuplicados: | 65 |
| Adición de las soluciones en las cajas: | 66 |
| 7.9 Análisis estadístico para la determinación de la concentración letal media: | 66 |
| 7.10 Obtención del aceite esencial de la semilla del Agraz | 70 |
| Hidrodestilación Simple (HD) | 70 |
| 7.11 Aspectos bioéticos | 71 |
| 8. Resultados | 72 |
| 8.1 Tamizaje preliminar para la identificación de metabolitos secundarios | 72 |
| Prueba para flavonoides | 72 |
| Prueba para polifenoles y taninos: | 72 |
| Prueba para cumarinas | 73 |
| Prueba para terpenos y esteroides | 74 |
| Pruebas para alcaloides | 75 |
| Prueba para identificación de saponinas | 77 |
| Prueba para lignanos (fenilpropanoides) | 77 |
| 8.2 Identificación y fraccionamiento de los metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de los extractos. | 79 |
| Revelador de alcaloides con yodo..... | 81 |
| Revelador Lieberman-Burchard para terpenos. | 81 |
| Revelador de amoniaco para flavonoides | 81 |
| Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina del extracto hexánico | 82 |
| Identificación de los metabolitos por cromatografía en capa fina preparativa revelados al UV en el extracto butanólico. | 82 |
| Identificación de los metabolitos por cromatografía de capa delgada revelados al UV en el extracto clorofórmico..... | 83 |
| 8.3 Fraccionamiento cromatográfico y espectroscopia UV | 85 |
| Extracto hexánico: | 85 |
| Extracto clorofórmico: | 89 |
| Extracto butanólico: | 93 |
| 8.4 Determinación de la Citotoxicidad de los extractos con <i>Artemia salina</i> | 96 |
| 9. Discusión..... | 99 |
| 9.1 Tamizaje preliminar para la identificación de metabolitos secundarios | 99 |
| Prueba para flavonoides | 99 |
| Prueba para polifenoles y taninos: | 100 |
| Prueba para cumarinas | 101 |
| Prueba para terpenos y esteroides | 101 |
| Pruebas para alcaloides | 104 |
| Prueba para lignanos (fenilpropanoides) | 108 |
| 9.2 Identificación y fraccionamiento de los metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de los extractos. | 109 |
| Revelador de alcaloides con yodo..... | 109 |
| Revelador Lieberman-Burchard para terpenos. | 109 |
| Revelador de amoniaco para flavonoides | 109 |

| | |
|--|-----|
| Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina del extracto hexánico | 110 |
| Identificación de los metabolitos por cromatografía en capa fina preparativa revelados al UV en el extracto butanólico. | 110 |
| Identificación de los metabolitos por cromatografía de capa delgada revelados al UV en el extracto clorofórmico..... | 111 |
| 9.3 Fraccionamiento cromatográfico y espectroscopia UV | 112 |
| Extracto hexánico: | 112 |
| Extracto clorofórmico: | 113 |
| Extracto butanólico: | 114 |
| 9. Conclusiones | 116 |
| 10. Recomendaciones | 118 |
| 11. Referencias..... | 120 |
| Anexos | 128 |
| Anexo 1: Tablas de datos prueba de toxicidad con <i>Artemia salina</i> para los extractos de <i>Vitis tiliifolia</i> | 128 |
| Anexo 2: Regresión y obtención de la CL ₅₀ usando Microsoft Excell para la prueba de toxicidad con <i>Artemia salina</i> en los extractos de <i>Vitis tiliifolia</i> | 131 |
| Regresión lineal para el Extracto butanólico | 131 |
| Obtención de la CL ₅₀ para el extracto butanólico | 131 |
| Regresión lineal para el Extracto Clorofórmico | 132 |
| Obtención de la CL ₅₀ para el extracto Clorofórmico | 133 |
| Regresión lineal para el Extracto Hexánico..... | 133 |
| Obtención de la CL ₅₀ para el extracto Hexánico..... | 134 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie <i>Vitis tiliifolia</i> | 19 |
| Tabla 2. Clasificación de los terpenos según, (Wallach, 1887) | 23 |
| Tabla 3. Clasificación de los compuestos fenólicos, basado en la cantidad de átomos de Carbono. Modificado de (Harborne, 1990) | 29 |
| Tabla 4. Clasificación de toxicidad según (CYTED, 2014). | 46 |
| Tabla 5. Estado actual del conocimiento | 50 |
| Tabla 6. Tabla de transformación de Probit | 68 |
| Tabla 7. Pruebas cualitativas para los tres extractos..... | 79 |
| Tabla 8. Reactivos de identificación de metabolitos secundarios | 81 |
| Tabla 9. Tipos de metabolitos identificados según los picos de absorción de los espectros UV-Vis..... | 96 |
| Tabla 10. % de Mortalidad para cada extracto con respecto a la concentración de extracto de <i>V. tiliifolia</i> | 97 |
| Tabla 11. Datos obtenidos de la concentración y el % de mortalidad del extracto. | 98 |
| Tabla 12. Toxicidad de los Extractos según los criterios de CYTED..... | 99 |

Lista de Gráficas

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. Porcentaje de mortalidad de <i>A. salina</i> en función de la concentración de los extractos de <i>V. tiliifolia</i> . .. | 97 |
| Gráfica 2. Relación lineal entre el valor Probit en función de los Logaritmos de las concentraciones de los extractos de <i>V. tiliifolia</i> | 98 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Detalle de la planta (hojas y tallo) (A) y fruto inmaduro (B) de <i>Vitis tiliifolia</i> Modificado de (Conabio, 2018)..... | 19 |
| Figura 2. Diversidad de Terpenos. Modificado de (Murillo, et al., 2008) | 24 |
| Figura 3. Bioformación de terpenos (Marcano, et al., 2002). | 25 |
| Figura 4. Estructura de una saponina típica de las semillas de la digital. Tomado de (Castro, 2015). | 27 |
| Figura 5. Tipos de saponinas según su estructura. Modificado de (Murillo, et al., 2008) | 27 |
| Figura 6. Rutas para la formación de compuestos fenólicos, señalados en azul. Modificado de (Almaraz, et al., 2006)..... | 28 |
| Figura 7. Ejemplo de estructura de tanino hidrolizable (A) y de tanino condensado (B). Modificado de (Alvarez, 2016)..... | 30 |
| Figura 8. Estructura de la α -benzopirona, o cumarina sencilla. Tomado de (Castro, 2015)..... | 31 |
| Figura 9. Lactonización del ácido Curámico. Modificado de (Santizo, 2004)..... | 31 |
| Figura 10. Ejemplos de cumarinas con sus estructuras. Tomado de (Dominguez X. , 1985)..... | 32 |
| Figura 11. Grupos de lignanos según su estructura. Tomado de (Dominguez X. , 1985)..... | 33 |
| Figura 12. Estructura básica de los flavonoides. Cadena de tres carbonos abiertos (a) o anillo central heterocíclico (γ -pironas) (b). Tomado de (Martínez, 2005)..... | 34 |
| Figura 13. Interconversión de algunos flavonoides. flavonona (a) aurona (b), chalcona (c), flavona (d), flavonol (e), flavonol (f), leucoantocianidina (g), antocianidina (h), catequina (i), isoflavona (j) y neoflavona (k). Tomado de (Dominguez X. , 1985)..... | 35 |
| Figura 14. Estructura de algunos Alcaloides representativos. Tomado de (Dominguez X. , 1985)..... | 36 |
| Figura 15. Aspectos biogenéticos para la clasificación de los alcaloides. Tomado de (Silva, 2014) | 38 |
| Figura 16. Estructura General de un aminoácido. Tomado de (Wade, 2011) | 40 |
| Figura 17. Espectrofotómetro y su composición. Tomado de (Gavira, 2012)..... | 42 |
| Figura 18. Espectros de absorción de tres pigmentos fotosintéticos cloroplastídicos. Tomado de (Díaz, et al., 2016)..... | 43 |
| Figura 19. Montaje básico de la Cromatografía en Capa fina Preparativa. Tomado de (Castaños, 2015)..... | 43 |
| Figura 20. Montaje de TLC (A); visualización de manchas con revelador (B) y visualización de manchas con lámpara de Uv (C). Fotos de los autores. | 44 |
| Figura 21. Principales compuestos obtenidos y sus estructuras heterogéneas, del aceite esencial del romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) Tomado de (Dominguez X. , 1985) | 48 |
| Figura 22. Destilación por arrastre de vapor para la obtención de aceites esenciales. Tomado de (Girbes, et al., 2008)..... | 49 |
| Figura 23. Colecta del fruto de <i>Vitis tiliifolia</i> en la cuenca del rio las ceibas | 52 |
| Figura 24. Maceración del fruto y filtración del zumo..... | 52 |
| Figura 25. Mezclado del zumo del Agrad con el disolvente orgánico (Hexano, Cloroformo y Butanol) | 53 |
| Figura 26. Rotaevaporación de los extractos Figura 27. Extracto vegetal seco (Butanol)..... | 54 |
| Figura 28. Placa de cromatografía en capa fina con el extracto clorofórmico (A) y Butanólico (B)..... | 59 |
| Figura 29. Montaje para la cromatografía en capa fina. Extracto clorofórmico (A) y butánolico (B)..... | 59 |
| Figura 30. Placas cromatográficas reveladas al UV para marcar cada franja. Extracto clorofórmico (A), extracto hexánico (B) y extracto butanólico (C) | 60 |
| Figura 31. Fracciones cromatográficas de cada extracto subrayadas en lápiz e identificadas. Extracto clorofórmico (A), extracto hexánico (B) y extracto butanólico (C)..... | 60 |
| Figura 32. Filtrado de la sílica gel Figura 33. Compuestos aislados..... | 61 |
| Figura 34. Equipo UV/VIS, serie 502508121003, modelo Perkin Elmer Lambda 35 del laboratorio de Química de la Universidad Surcolombiana. Tomada de (Giraldo, et al., 2019) | 62 |
| Figura 35. Montaje con el tubo de Thielle para la determinación del punto de fusión. | 63 |
| Figura 36. Montaje para la eclosión de los huevos de <i>Artemia salina</i> | 64 |
| Figura 37. Preparación de cada solución del extracto a diferentes concentraciones por ppm. | 65 |
| Figura 38. Montaje con los quintuplicados para cada concentración de extracto. (a) Ubicación y rotulado de las Cajas de Petri (b) Inserción de los Nauplios de <i>Artemia salina</i> en cada caja de Petri..... | 66 |
| Figura 39. Conteo para la determinación de la mortalidad de <i>Artemia salina</i> | 66 |

| | |
|---|-----|
| Figura 40. Modelo de tabla de datos empleado para el análisis estadístico de la evaluación biológica con <i>Artemia salina</i> . | 67 |
| Figura 41. Tabla de datos modelo para obtener el log en base 10 de la concentración y el Probit. | 68 |
| Figura 42. Modelo de la regresión lineal obtenida para el análisis estadístico. | 69 |
| Figura 43. Tabla modelo y Cálculos para obtener la X de la ecuación de la recta | 70 |
| Figura 44. Obtención de la CL50 a partir del antilogaritmo del valor de X calculado. | 70 |
| Figura 45. Montaje para la hidrodestilación simple de las semillas de la <i>Vitis tiliifolia</i> . | 71 |
| Figura 46. Prueba de Shinoda para Flavonoides. A) Extracto hexánico, B) extracto clorofórmico, C) extracto butanólico. | 72 |
| Figura 47. Prueba de Cloruro Férrico. A) Extracto hexánico B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico. | 73 |
| Figura 48. Prueba de precipitación y coloración con NaOH. A) Tira con extracto clorofórmico. B) Tira con extracto hexánico y C) tira con extracto butanólico. | 74 |
| Figura 49. Prueba De Salkowski. A) Extracto hexánico, B) Extracto clorofórmico y C) Extracto butanólico. | 74 |
| Figura 50. Prueba de Lieberman-Burchard. A) Extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico. | 75 |
| Figura 51. Prueba de Zlatskis. A) Extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico. | 75 |
| Figura 52. Prueba de Drangendorf. A) Extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico. | 76 |
| Figura 53. Prueba de Mayer. A) Extracto hexánico B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico. | 76 |
| Figura 54. Prueba de Wagner. A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico. | 77 |
| Figura 55. Prueba de Saponinas. A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico. | 77 |
| Figura 56. Prueba de Arnow. A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto Butanólico. | 78 |
| Figura 57. Perfil cromatográfico del extracto hexánico revelado al UV -360nm. | 82 |
| Figura 58. Perfil cromatográfico en el extracto butanólico en comparación de las fracciones obtenidas al UV 360 nm. | 83 |
| Figura 59. Perfil Cromatográfico en el extracto clorofórmico al ser revelados en UV 360 nm. | 84 |
| Figura 60. Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico. Selección de las franjas (A y C), franjas en el UV a 360nm (B) y franjas al UV en 340 nm (D). | 86 |
| Figura 61. Comparación de las fracciones obtenidas en el UV 360nm (B) con los perfiles cromatográficos para el revelador y UV de alcaloides (A) y para el revelador y UV en flavonoides 2C). | 86 |
| Figura 62. Espectro UV-vis de la muestra Hex1 | 87 |
| Figura 63. Espectro UV-Vis para la muestra hex2 | 88 |
| Figura 64. Espectro UV-Vis para la muestra hex3 | 89 |
| Figura 65. Espectro UV-Vis para la muestra hex4 | 89 |
| Figura 66. Fraccionamiento cromatográfico del extracto clorofórmico. Selección de las franjas (A), franjas al UV en 340 nm (B). | 90 |
| Figura 67. Comparación de las fracciones obtenidas en el UV 340nm (B) perfiles cromatográficos con el revelador y al UV para flavonoides (A) con el revelador y al UV para alcaloides (C). | 91 |
| Figura 68. Espectro Uv-Vis de la muestra 1 Cl | 91 |
| Figura 69. Espectro UV-vis de la muestra 2Cl | 92 |
| Figura 70. Espectro Uv-Vis de la muestra 3Cl con sus principales bandas señaladas. | 93 |
| Figura 71. Fraccionamiento cromatográfico del Extracto Butanólico. Delineación de las franjas (A) y franjas al UV a 360 nm (B). | 93 |
| Figura 72. Espectro Uv-vis de la muestra 1But. | 94 |
| Figura 73. Espectro Uv-vi de la muestra 3But. | 95 |
| Figura 74. Espectro UV-Vis de la muestra 4 But. | 95 |
| Figura 75. Reacción de la Prueba de Shinoda (Durango, 2014). | 100 |
| Figura 76. Reacción de la Prueba de Cloruro Férrico (Durango, 2014). | 101 |
| Figura 77. Reacción de la prueba de NaOH (Baca I., et al., 2015). | 101 |
| Figura 78. Reacción de la Prueba de Salkowski para esteroides (Durango, 2014). | 102 |
| Figura 79. Reacción de la Prueba de Lieberman-Burchard (Durango, 2014). | 103 |
| Figura 80. Reacción de Zlatskis (Martinez R. , 2014). | 104 |
| Figura 81. Reacción de Drangendorf para determinación de alcaloides mediante la formación de un precipitado naranja. (Rodriguez, et al., 2012). | 105 |

| | |
|---|-----|
| Figura 82. <i>Reacción de precipitación con reactivo de Mayer. (Rodríguez, et al., 2012)</i> | 106 |
| Figura 83. <i>Reacción de Wagner. (Rodríguez, et al., 2012)</i> | 107 |
| Figura 84. <i>Reacción de espuma para saponinas. (Rodríguez, et al., 2012)</i> | 108 |
| Figura 85. <i>Espectro teórico de los protoberberinos (A), un tipo de alcaloides (Arango G. , 2008), comparado con el espectro práctico obtenido de la muestra 1 cloroformo (B)</i> | 113 |
| Figura 86. <i>Espectros UV-visibles de algunos taninos condensados (A); y espectro UV-Vis de Mangiferina, un tipo de tanino presente en Anredera vesicaria. Tomado de (Isaza, et al., 2007) y (Forero, et al., 2016) respectivamente)</i> | 114 |
| Figura 87. <i>Espectro Uv-vi de un triterpeno aislado del rizoma de Anredera vesicaria. Tomada de (De la cruz, et al., 2016)</i> | 115 |

1. Introducción

En los últimos años se ha podido evidenciar un crecimiento demográfico de las ciudades y los países tanto de América Latina como de Asia, trayendo consigo, un sin número de enfermedades nefastas para el ser humano, que poco a poco han ido disminuyendo la calidad de vida de las personas. En cuanto al cáncer, según registros de la (OMS, 2018), alrededor de un tercio de las muertes por esta enfermedad se debe a principales factores de riesgo conductuales y dietéticos, índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras y falta de actividad física, etc. Los remedios herbolarios, han sido una herramienta principal para el cuidado de la salud, es por este motivo que desde hace muchísimo tiempo las poblaciones de diversos lugares han utilizado a las plantas teniendo en cuenta su poder curativo para contrarrestar y curar las enfermedades que los han aquejado. Numerosas plantas tienen un amplio estudio etnobotánico por sus usos medicinales, así como se presentan estudios fitoquímicos que permiten la identificación de los principios activos producidos por las especies, esto con el fin, de buscar la relación entre las estructuras con cierta propiedad biológica.

Dentro del género *Vitis*, se estiman alrededor de 60 especies a nivel mundial las cuales son en su gran mayoría de tipo silvestre (Franco, *et al.*, 2008). Las especies *Vitis vinífera* y *Vitis labrusca* son las que tienen mayor uso comercial e industrial, especialmente para la fabricación de vino. Recientemente se ha suscitado un creciente interés en estudiar los metabolitos secundarios que posee esta bebida, especialmente de los polifenoles (Matus, *et al.*, 2006), clasifican a los compuestos fenólicos presentes en los vinos en no flavonoides y flavonoides, los no flavonoides abarcan los ácidos fenólicos y los estilbenos como el resveratrol; por su parte dentro de los flavonoides se encuentran las antocianinas, flavonoles, proantocianidinas (taninos) y catequinas; los cuales tienen propiedades antioxidantes y efectos benéficos sobre la salud

humana, sin estudios científicos demostrables. Por este motivo se propone en esta investigación el estudio fitoquímico del Agraz (*Vitis tiliifolia*) y su evaluación toxicológica, teniendo en cuenta que esta planta y en especial su fruto, es utilizada por su potencial para equilibrar el funcionamiento del sistema inmunológico. Actualmente, esta especie posee un amplio conocimiento etnobotánico, sin embargo, son muy pocos los estudios que se han realizado sobre la composición química de la planta, en especial del fruto. Siendo el agraz una planta silvestre y debido a su uso por los pobladores del departamento del Huila, Municipio de Neiva, sin ningún soporte científico, se plantea en este proyecto determinar la presencia de los metabolitos secundarios por pruebas cualitativas de tubo de ensayo y por cromatografía en capa fina de los extractos, la separación de los principios activos por fraccionamiento cromatográfico y la identificación de algunas estructuras por espectroscopia UV y puntos de fusión. Adicionalmente, se realizó un estudio de los extractos sobre *Artemia salina*, para determinar el potencial toxico de esta especie.

2. Objetivos

2.1 General

- Identificar los metabolitos secundarios de la especie *Vitis tiliifolia* (Agraz) mediante pruebas cualitativas y evaluar la toxicidad de los extractos con *Artemia salina*.

2.2 Específicos

- Evidenciar la presencia de algunos metabolitos secundarios de la especie vegetal *Vitis tiliifolia* utilizando pruebas cualitativas.

- Aislar algunos compuestos mediante la técnica de cromatografía en capa fina preparativa

- Reconocer el tipo de metabolito secundario por medio de la técnica de espectroscopia ultravioleta y el punto de fusión

- Estimar la Toxicidad de los extractos mediante la prueba de viabilidad con crustáceos de *Artemia salina*.

3. Planteamiento del problema

El agraz o mortiño es una planta muy poco conocida a nivel científico en el departamento del Huila, sin embargo, es muy utilizada por los habitantes de la región debido a sus propiedades nutricionales y funcionales; la mayor parte de su uso es con fines alimenticios y medicinales. En la literatura científica, se reportan algunos metabolitos secundarios presentes en el agraz o especies de este género, como: polifenoles, flavonoides, antocianinas, flavonoles, e isoflavonas, la vitamina C y la vitamina E, entre otros (Franco, *et al.*, 2016). Los usos etnobotánicos de esta especie se deben a su potencial para modular el sistema inmunológico. Debido a la poca información científica confirmatoria de estas propiedades medicinales relacionadas con la *Vitis tiliifolia*, este trabajo se enfoca en el aislamiento y la identificación de los metabolitos secundarios y su evaluación de toxicidad, para así dar evidencia científica de esta especie empleada en la medicina tradicional.

Por lo anterior, surge la siguiente pregunta problema:

¿Qué tipo de metabolitos secundarios se encuentran presentes en la planta *Vitis tiliifolia* y cuál es el potencial toxico de los extractos frente a los crustáceos de *Artemia salina*?

4. Justificación

La *Vitis tiliifolia* es una planta que se encuentra en la cuenca del Rio Las Ceibas, dicha planta es silvestre, considerada como un alimento promisorio por su funcionalidad y gran contenido de antocianinas, antioxidantes y vitaminas, aunque es un fruto altamente perecedero que pierde rápidamente su calidad comercial y nutricional.

Esta especie pertenece a la familia *Vitaceae*, la de las uvas, los cuales tienen estudios fitoquímicos que se encuentran publicados en la literatura científica, siendo los metabolitos más principales: flavonoles, antocianinas, entre otros (Franco, *et al.*, 2016)

Con el objetivo de contribuir a la diversidad química de esta especie y por lo tanto del género *Vitis* del cual no se han hecho muchos estudios fitoquímicos, se llevó a cabo en este proyecto el aislamiento, y la identificación de los metabolitos secundarios, mediante pruebas cualitativas. Adicionalmente, se realizó la evaluación biológica de los extractos contra los crustáceos de *Artemia salina*, como una prueba que permite predecir el potencial anticancerígeno, antipalúdico o antihelmíntico de una muestra. El estudio sobre las sustancias químicas y el potencial toxicológico del Agradaz permitirá obtener información científica relevante sobre esta especie, como una planta empleada tradicionalmente por los huilenses. A nivel institucional, esta investigación abre la línea sobre estudios químicos de frutos usados en la medicina tradicional de nuestra región, que puede ser explorada para otros productos naturales, cuyos estudios pueden llevarse a cabo principalmente en nuestro grupo de investigación “Grupo Químico de Investigación y desarrollo ambiental (QIDEA)” y en el “Semillero de Química de la Universidad Surcolombiana (SIQUS)”.

5. Marco Teórico

5.1 Taxonomía y Descripción de la Especie *Vitis Tiliifolia*.

El género *Vitis* contiene unas 60 especies de plantas de las que su fruto, la uva, tiene una importancia magnánima desde la antigüedad. Sin duda alguna, la especie de vid más importante comercialmente es *Vitis vinifera*, que representa más del 90% de la producción a nivel global (Collins, 2016). El agraz (*Vitis tiliifolia*) es una planta nativa de Colombia que se encuentra entre los 40-1900 msnm en departamentos como Antioquia, Caquetá, Chocó, Huila, Magdalena, Putumayo y Santander (Bernal, *et al.*, 2015).

El agraz es una liana de hábito trepadora, presenta un tallo redondo y tortuoso, ligeramente torcido, de 5-6 cm de diámetro, con nudos presentes, poco evidentes y prominentes, ubicados lateralmente y alternados. Entrenudos de 7-15 cm de largo. Corteza fisurada, de aspecto escamoso, con fisuras de 5-10 mm, crestas corchosas, de color café. Presenta hojas simples de color verde de unos 7 a 16 cm de largo, cordiformes (en forma de corazón), con 3 lóbulos, haz glabro y envés densamente peloso, blanco, con margen dentado-lobado (Figura 1.a). Este bejuco posee unas ramitas delgadas llamadas zarcillos de forma bífida, con las cuales se enreda en otras plantas. Florece de abril a mayo, fructifica de julio a agosto. Las flores son de color verde, muy pequeñas. El fruto es redondo de unos 4 a 6 mm de diámetro, cuando jóvenes verdes (Figura 1.b) y cuando maduros de color rojo oscuro a morado. En ciertas regiones, la planta florece y fructifica durante todo el año o en el mes de junio. Esta planta es común en ambientes naturales y perturbados (Galindo, 2019).



Figura 1. Detalle de la planta (hojas y tallo) (A) y fruto inmaduro (B) de *Vitis tiliifolia* Modificado de (Conabio, 2018)

Taxonomía

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *Vitis tiliifolia*

| | |
|--------------------|-------------------|
| Reino | Plantae |
| Phylum | Magnoliophyta. |
| Clase | Magnoliopsida. |
| Orden | Vitales |
| Familia | Vitaceae |
| Género | <i>Vitis</i> |
| Epíteto específico | <i>Tiliifolia</i> |

5.2 Hábitat y Distribución del agraz

Según (Chízmar, 2009), el agraz es una planta nativa que crece en los bosques secos, bosques húmedos a muy húmedos, en elevaciones de 100-1300 m. Se distribuye geográficamente desde el Sur de México y las Antillas, hasta Colombia; también se puede encontrar frecuentemente en el dosel, en los bordes de los claros, y a lo largo del margen de los lagos y los ríos. Las Flores y frutas se presentan durante todo el año, principalmente durante las estaciones lluviosas secas y tempranas (Croat, 1978).

Se encuentra como elemento frecuente del bosque mesófilo de montaña, de los encinares y pinares más húmedos, así como del bosque tropical subcaducifolio y en ocasiones del tropical caducifolio (Rzedowski, *et al.*, 2005). En Colombia su zona biogeográfica se encuentra en los

Andes, Llanura del Caribe, Pacífico, Sierra Nevada de Santa Marta, Valle del Magdalena (Bernal, *et al.*, 2015).

5.3 Etnobotánica del agraz

Vitis tiliifolia, es utilizado en los países donde se encuentra básicamente para el aprovechamiento de su fruto, y según el país y región recibe diferentes denominaciones, como, por ejemplo: Uva Cimarrona en El Salvador, Miona Negra y Uva Silvestre en Nicaragua y Agrá o Bejuco de Agua en Costa Rica (Chízmar, 2009), algunos otros nombre son: Bejuco de uva, Guía de uva, Tsururen (lengua purépecha), uva, Uva Silvestre, Bejuco de Cazadores, Parra, Parra Broncadora, Parra Silvestre y Uvilla Cimarrona (Rzedowski, *et al.*, 2005).

En el caso de nuestro país recibe el nombre de Agraz en departamentos como Chocó y Huila, y otros como Uva de monte, Uva Cimarrona, Uva de Playa, Uva Silvestre, Parra de Monte, fuente y Bejuco de Agua (Bernal, *et al.*, 2011).

La planta posee dos usos principales uno a nivel alimenticio y otro medicinal.

Usos Alimenticios:

El fruto se utiliza para hacer vinagres y vinos, según (Galindo, 2019) “el fruto es comestible, y con él se elabora por fermentación un vino artesanal, que en la región de Los Tuxtlas al sur de México es conocido como "Vino de Chochogo" y en la región de Alvarado, Veracruz. Simplemente como "Agraz" o "Vino de Agraz", de muy agradable sabor y aroma” siendo comercializado a nivel local y en regiones cercanas. De acuerdo con (Gúzman, 1976) el fruto de la uva silvestre (*Vitis tiliifolia*) es una baya, es refrescante y diurética en limonada, si el fruto no se puede comer sirve para realizar vinagre, además por ser silvestre los viajeros la utilizan como fuente de agua en el caso de no haber ríos cercanos, debido a que la base de los

bejucos almacena agua fresca, cristalina y abundante. Por eso en los países de Centro América se llama a la uva silvestre, la planta del viajero.

Uso Medicinal:

Se reporta el jugo de la fruta como uso medicinal para los riñones, por su parte el agua obtenida del tallo es reportada como diurética y eficaz como remedio para enfermedades venéreas (Standley, 1938). Por su parte, (Gúzman, 1976) expresa que la savia es eficaz contra las afecciones hepáticas; además combate la erisipela (erupciones en la piel) (Del Amo, 1979).

También se reportan usos medicinales en fitoterapia animal: la savia y los frutos sirven para el tratamiento del timpanismo en ganado bovino y diarreas en terneros, para el tratamiento de cataratas oculares y disentería en bovinos y a nivel medicinal en humanos es utilizada contra la diarrea y problemas en los riñones (Rodríguez, *et al.*, 2005).

A pesar de su potencial económico y medicinal, y de ser una planta promisoría, aún faltan varios estudios que nos permitan identificar exactamente que sustancias ayudan directamente a prevenir cada enfermedad y su aplicación.

5.4 Metabolitos secundarios de las plantas

Son los compuestos químicos sintetizados por las plantas que no son esenciales en ellas, por lo tanto, su ausencia no es letal para el organismo, lo que si sucede con los metabolitos primarios. Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, estos metabolitos no son necesarios para todas las plantas. Como consecuencia práctica, estos compuestos pueden ser utilizados en estudios taxonómicos (quimiosistemática). Un ejemplo clásico son las antocianinas y betalainas, las cuales no se ven conjuntamente en una

misma especie vegetal. Los metabolitos secundarios vegetales presentan un gran valor desde el punto de vista social y económico (González M. , 2011).

Tipos de Metabolitos Secundarios:

Según (Neyoy, 2002) los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, con base en sus orígenes biosintéticos: **Los Terpenoides**, son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato o "5-carbono isopentenil difosfato") que se forman en la vía del ácido mevalónico; es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica que están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias, unos pocos, como los que forman los aceites esenciales, están restringidos a solo algunas plantas; los **Compuestos fenólicos**, como los fenilpropanoides y sus derivados, son más de 8.000 compuestos, están formados o bien por la vía del ácido shikímico o bien por la vía del malonato/acetato, y, por último, encontramos los **Compuestos nitrogenados o alcaloides**, de los cuales existen alrededor de 12000 , contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos y poseen una gran diversidad de estructuras químicas, son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, y la estriocina.

Terpenoides:

También llamados isoprenoides o más conocidos como terpenos son un grupo de productos naturales que incluyen todas aquellas sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico (AMV) y que origina el isopentenil pirofosfato (Porter, *et al.*, 1981), (Wallach, 1887) propuso la clasificación de este grupo de compuestos atendiendo al número de átomos de

carbono de estos (Tabla 2). Actualmente esa clasificación es reconocida a nivel mundial y seguida por cuantos trabajan con terpenoides.

Tabla 2. Clasificación de los terpenos según, (Wallach, 1887)

| Grupo | N° de átomos de Carbono | N° de Unidades de isopreno |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Hemiterpenos | 5 | 1 |
| Monoterpenos | 10 | 2 |
| Sesquiterpenos | 15 | 3 |
| Diterpenos | 20 | 4 |
| Sesteterpenos | 25 | 5 |
| Triterpenos | 30 | 6 |
| Tetraterpenos | 40 | 8 |
| Politerpenos | 5n | n |

La unidad estructural básica de los terpenoides es el isopreno, constituido por cinco átomos de carbono. Su unión sucesiva da lugar a los distintos tipos de terpenos conocidos (Figura 2). De esta forma, los compuestos con una sola unidad de isopreno se conocen como hemiterpenos (C5), mientras los monoterpenos están constituidos por dos unidades de isopreno (C10), los sesquiterpenos de tres (C15) y así sucesivamente. Aunque según la biosíntesis de los metabolitos, el verdadero precursor de los terpenos es el ácido mevalónico, el cual proviene del acetil coenzima A (Figura 3) (Murillo, *et al.*, 2008). Atendiendo al origen del enlace que se produce en la formación de compuestos de diez o más átomos de carbono, se habla de terpenos “regulares” y terpenos “irregulares” (Palá, 2002).

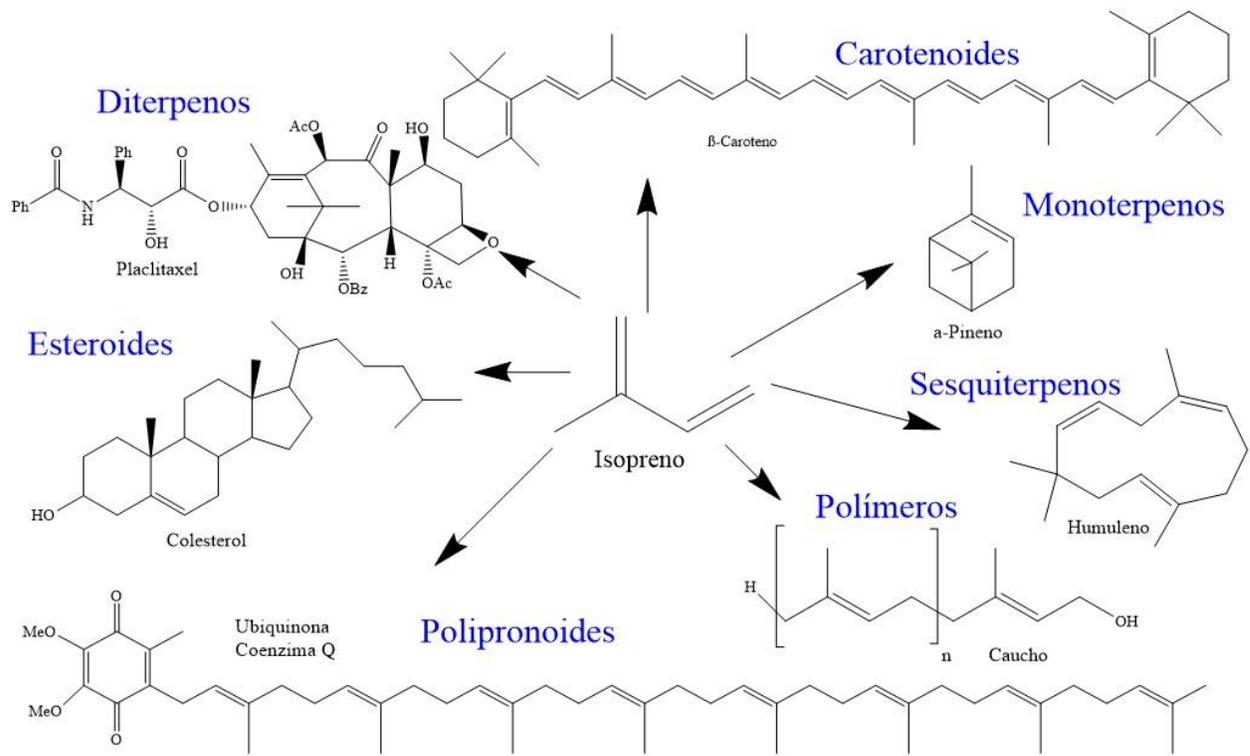


Figura 2. Diversidad de Terpenos. Modificado de (Murillo, et al., 2008)

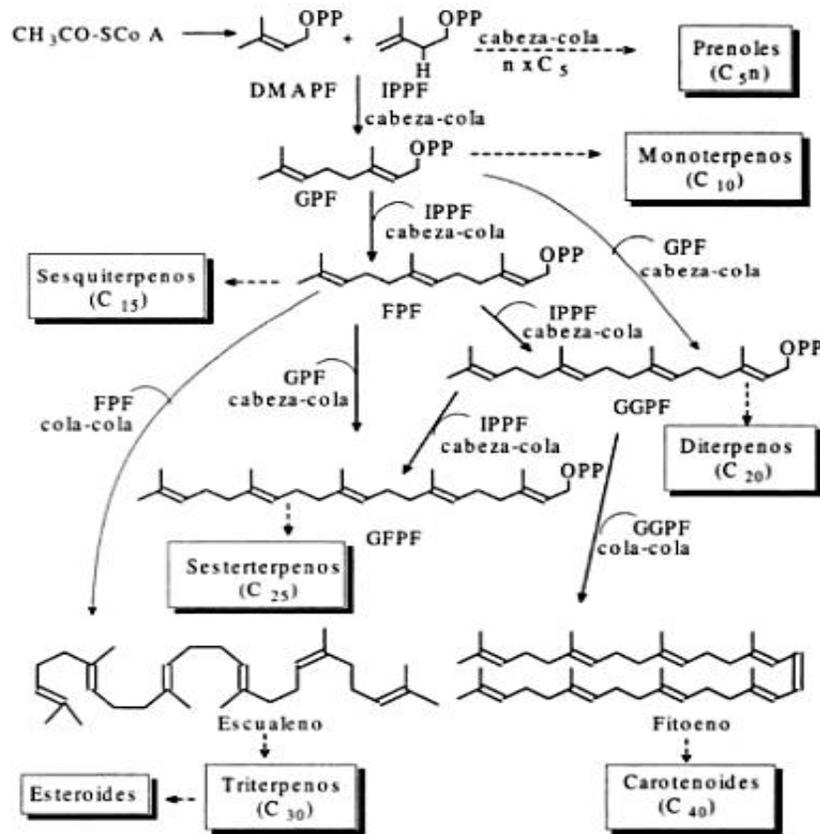


Figura 3. Bioformación de terpenos (Marcano, et al., 2002).

Según (Ochoa, et al., 2018), los triterpenos son terpenos con seis unidades de isopreno, que pueden ser tetracíclicos o pentacíclicos con grupos hidroxilo, cetona, aldehído o ácido carboxílico (Lock, 2001). Los esteroides son derivados de triterpenos con una estructura tetracíclica que consta de tres anillos de seis miembros y un anillo de cinco miembros todos fusionados (Ege, 1998). Las estructuras que presentan un grupo alcohol en los esteroides son conocidas como esterol, en plantas se encuentran: el estigmasterol y el sitosterol que hacen parte de las membranas celulares y realizando funciones protectoras frente a insectos como la ecdisona, otros esteroides como los limonoides son los principios amargos de los cítricos que actúan como antiherbívoro (García, et al., 2009).

Farmacológicamente los triterpenoides y esteroides han sido estudiados por su actividad citotóxica, actividad antimicrobiana, anticonceptiva y antiinflamatoria (Pergaud, *et al.*, 2013).

Según (Murillo, *et al.*, 2008) dentro de las pruebas cualitativas que se pueden usar para el reconocimiento en el laboratorio de estos metabolitos encontramos:

Reacción de Lieberman-Burchard: Sirve para demostrar la presencia de colesterol o triterpenos, es específica para esteroides con insaturación en los anillos A, B o C; los cambios de color se pueden interpretar dependiendo de la coloración final, si vira a azul o verde es un esteroide, si se forma un color rojo, rosado o violeta es un triterpeno y una coloración amarilla pálido indica la presencia de un esteroide o triterpeno saturado.

Reacción de Salwoski: Su fundamento es la formación de derivados de los esteroides, cuando se tratan con ácidos, se considera positivo si se da la formación de colores rojo o amarillo, el colesterol da color rojo. Si en la interfase se forma color azul, verde o violeta es característico de carotenoides, lo que sirve para distinguirlos de otros pigmentos como las antocianinas.

Reacción de Zlatskis: Comprueba la presencia del colesterol al dar una tonalidad roja.

Saponinas: Según (Murillo, *et al.*, 2008), son compuestos naturales caracterizados desde el punto de vista estructural por presentar enlaces glucosídicos y/o éster, que puede ser neutra o ácida, entre una parte no glucosídica denominada aglicón o genina poco polar, insoluble en agua y restos glucosídicos (Figura 4).

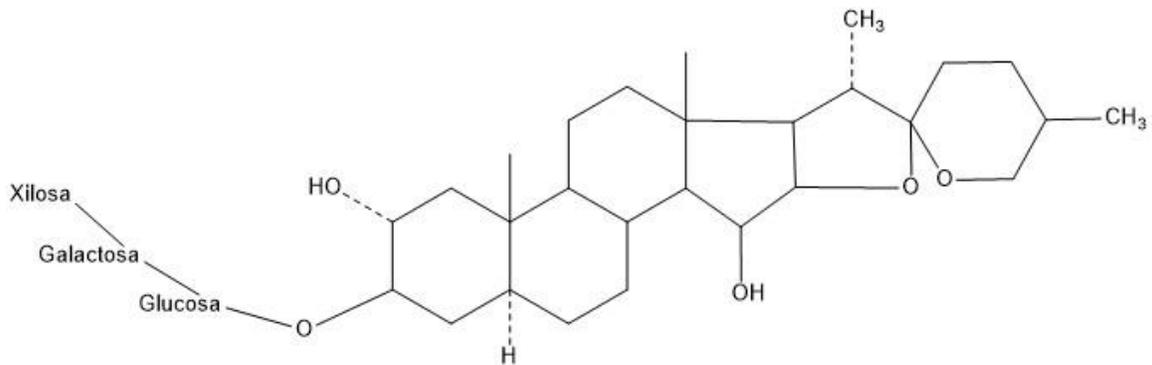


Figura 4. Estructura de una saponina típica de las semillas de la digital. Tomado de (Castro, 2015).

Según (Castro, 2015), la naturaleza de las geninas pueden clasificarse en triterpénicas y esteroidales (Figura 5), ambas están unidas por uno o varios azúcares por el hidroxilo del carbono 3; las Triterpénicas proceden de la ruta del ácido mevalónico; no son tan frecuentes en las plantas, se estudian desde el punto de vista químico, y se han aislado compuestos con actividad antiviral; son responsables de las acciones terapéuticas (*Panax ginseng*) (Otsuka, *et al.*, 1977). Por su parte, las Esteroidales se biosintetizan por la ruta del ácido mevalónico; están ampliamente distribuidas en las plantas, tienen importancia porque son el punto de la síntesis química (Marker, *et al.*, 1947), el 80% de hormonas son esteroidales, el 10% de los medicamentos poseen este tipo de hormonas [(Sanabria, 1983); (López, 2007)].

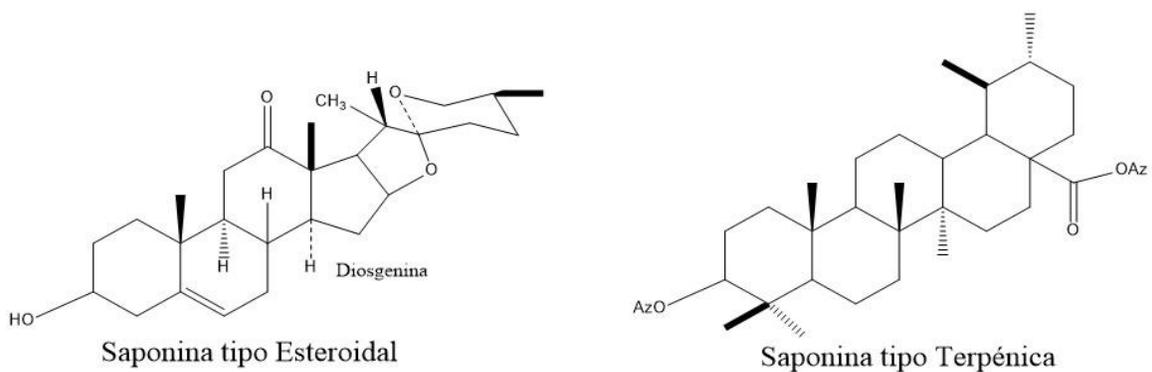


Figura 5. Tipos de saponinas según su estructura. Modificado de (Murillo, *et al.*, 2008)

Pruebas para identificar las saponinas: Una forma de reconocer a las saponinas es mediante la *Prueba de espuma*, su fundamento radica en las propiedades tensoactivas de estos

metabolitos, que cuando están disueltas en agua y al agitarse vigorosamente, producen espuma, persistente hasta por 30 minutos (Castro, 2015).

Compuestos fenólicos y sus derivados:

Como se mencionó anteriormente, son aquellos originados por dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico, que conduce según (Murillo, *et al.*, 2008) mediante la síntesis de aminoácidos aromáticos (Fenilalanina, tirosina), a los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y derivados, taninos cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano) y la ruta de los poliacetatos por la cual se originan *quinonas, xantonas, orcinoles*, algunas se originan a través de rutas mixtas que combinan las dos, es el caso por ejemplo de los *flavonoides* (Figura 6 y Tabla 3).

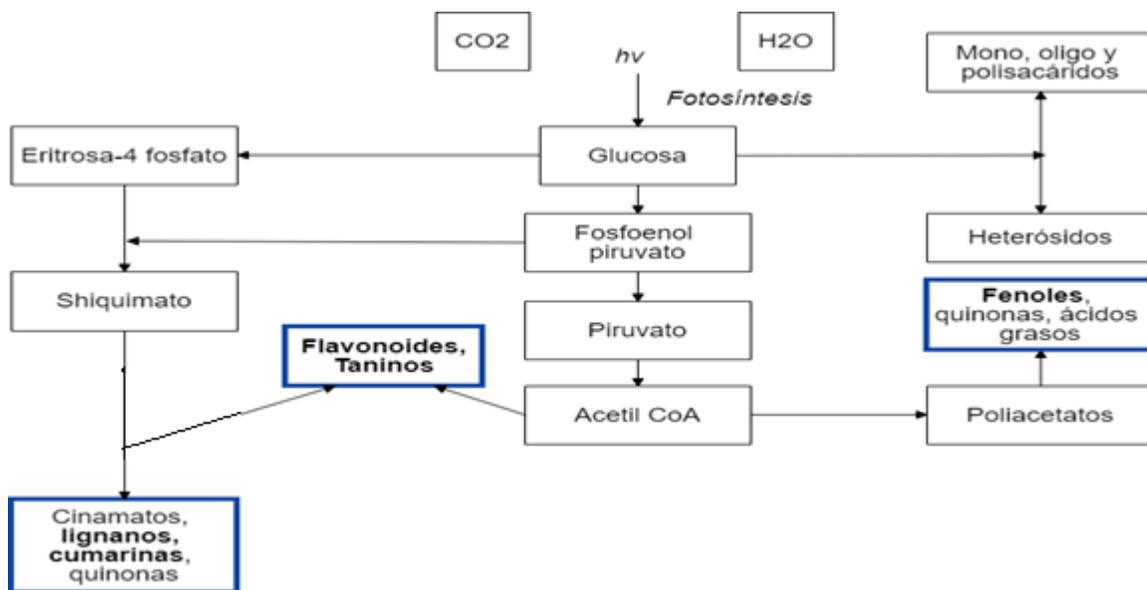


Figura 6. Rutas para la formación de compuestos fenólicos, señalados en azul. Modificado de (Almaraz, *et al.*, 2006).

Tabla 3. Clasificación de los compuestos fenólicos, basado en la cantidad de átomos de Carbono. Modificado de (Harborne, 1990)

| Número de átomos | Esqueleto carbonado básico | Clases |
|------------------|---|---|
| 6 | C ₆ | Fenoles simples y Benzoquinonas |
| 7 | C ₆ -C ₁ | Ácidos fenólicos |
| 8 | C ₆ -C ₂ | Acetofenonas y Ácidos fenilacéticos |
| 9 | C ₆ -C ₃ | Ácidos hidroxicinámicos, fenilpropanoides, Cumarinas, Isocumarinas y Cromonas |
| 10 | C ₆ -C ₄ | Naftoquinonas |
| 13 | C ₆ -C ₁ -C ₆ | Xantonas |
| 14 | C ₆ -C ₂ -C ₆ | Estilbenos y Antraquinonas |
| 15 | C ₆ -C ₃ -C ₆ | Flavonoides e Isoflavonoides |
| 18 | (C ₆ -C ₃) | Lignanos y Neolignanos |
| 30 | (C ₆ -C ₃) _n | Biflavonoides |
| N | (C ₆) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n | Ligninas, Melaninas de catecol y Flavolanos |

Taninos:

Según (Santizo, 2004) los taninos son polifenoles hidrosolubles, que se utilizan desde la antigüedad por sus propiedades curtientes y antisépticas, ya que estos presentan la propiedad de precipitar las macromoléculas como las proteínas. Se trata de compuestos hidrosolubles, dando a veces disoluciones coloidales en agua, solubles también en alcohol y en acetona e insolubles en disolventes orgánicos apolares. Dentro de los vegetales los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides, proteínas y pentosas.

Clásicamente se han distinguido dos tipos de taninos (Figura 7), los hidrolizables o gálicos, aquellos que por tratamiento con ácido o por enzimas, se separan en la aglicona (ácidos gálico y elágico, o sus derivados) y los azúcares; y los condensados o catéquicos, aquellos que por tratamiento con ácido no se degradan, polimerizan aún más, convirtiéndose en masas amorfas

insolubles conocidas como *lobafenos*, polímeros derivados de 3-hidroxi- y 3,4-dihidroxi-flavanos (Marcano, *et al.*, 2002).

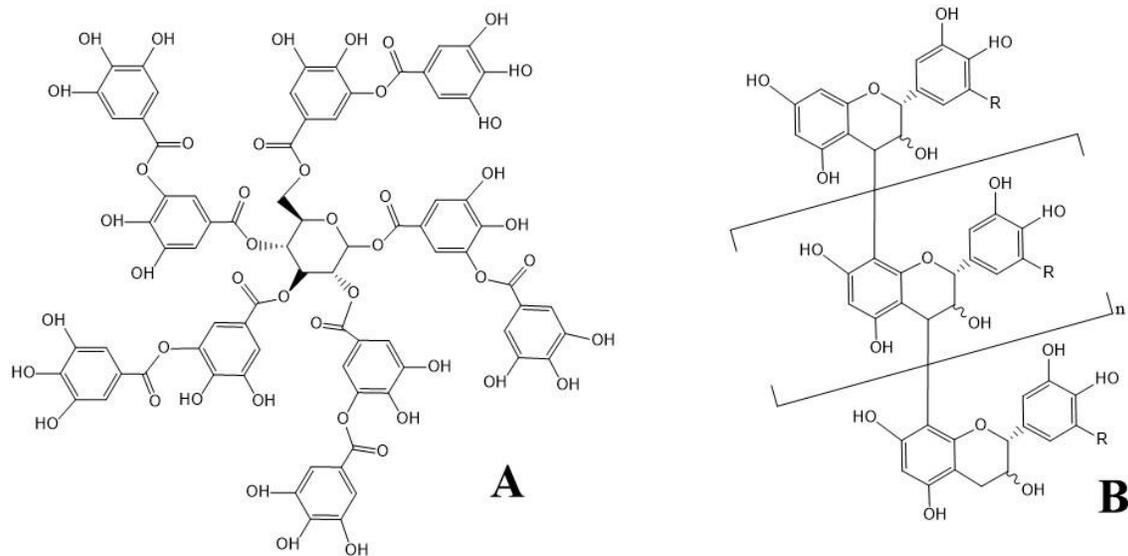


Figura 7. Ejemplo de estructura de tanino hidrolizable (A) y de tanino condensado (B). Modificado de (Alvarez, 2016)

Según (Murillo, *et al.*, 2008) dentro de las pruebas cualitativas que se pueden usar para el reconocimiento en el laboratorio de estos metabolitos se encuentran:

Prueba del Cloruro Férrico: Sirve para indicar la presencia de polifenoles y en especial taninos con base en la coloración, si ocurre un cambio en el color a azul, o negro azulado indica que es un tanino hidrolizable; por su parte si el cambio es de color a verde, azul verdoso, o con precipitado pardo verdoso hay taninos de tipo condensados, si no hay coloración no hay presencia de taninos.

Diferenciación entre taninos condensados e hidrolizables: A partir de la precipitación o filtración del compuesto con los reactivos se identifica cuál es condensado y cual hidrolizable, el primero es completamente precipitado, mientras que el segundo lo es parcialmente, pero al filtrar el liquido, este se obtiene sin color.

Cumarinas:

Las cumarinas son sustancias derivadas de la α -benzopirona (Figura 8), formadas en las plantas a partir del ácido cinámico (Brown, 1963). Según (Santizo, 2004) se originan por lactonización del ácido *cis*-*O*-hidroxicinámico o ácido cumarínico (Figura 9).

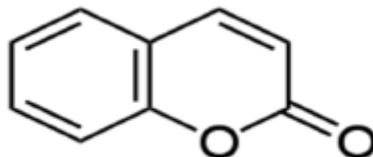


Figura 8. Estructura de la α -benzopirona, o cumarina sencilla. Tomado de (Castro, 2015)

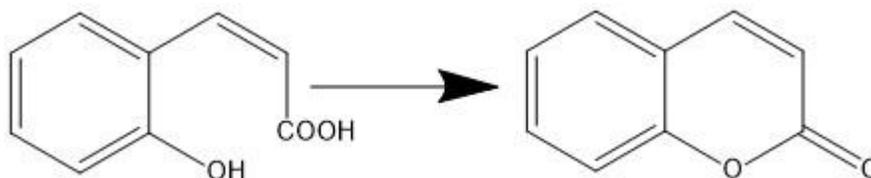


Figura 9. Lactonización del ácido Curámico. Modificado de (Santizo, 2004)

(Castro, 2015) expresa que una cumarina es un compuesto sencillo y en las plantas poseen sustituyentes derivados de hidroxilados (umbeliferona), metoxilados y prenilados (suberosina, xantelitina), furanocumarinas (psolareno) y una gran variedad de compuestos (Figura 10); están ampliamente distribuidas en las plantas, logrando identificar cerca de 1500 en más de 800 especies [(Sanabria, 1983); (López, 2007); (Ávalos, *et al.*, 2009)]

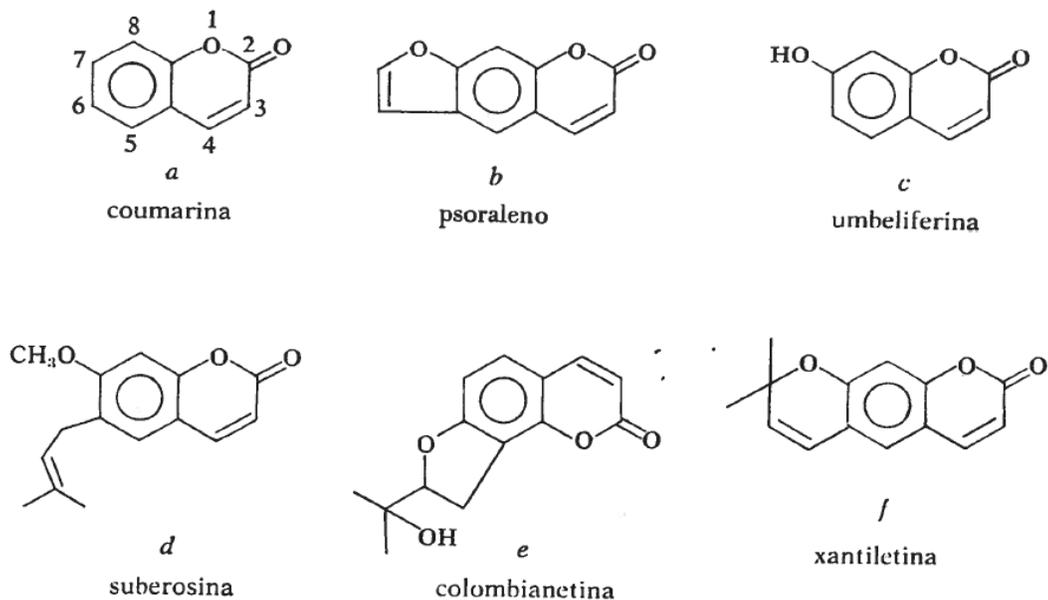


Figura 10. Ejemplos de cumarinas con sus estructuras. Tomado de (Dominguez X. , 1985)

Por su parte, según (Soine, 1964) tienen importancia biológica como agentes fotosensibilizantes de la piel, por su acción anticoagulante, sedante, vasodilatadora, antihelmíntica, antibacteriana, antifúngica; y, (Murillo, *et al.*, 2008) dice que también tienen un efecto sobre el sistema vascular tanto en territorio arterial como venoso, además deprimen la síntesis hepática de los factores esenciales para la coagulación sanguínea dependientes de la vitamina K, usándose como rodenticidas. Según (Murillo, *et al.*, 2008) dentro de las pruebas cualitativas que se pueden usar para el reconocimiento en el laboratorio de estos metabolitos se encuentran:

Reacción de precipitación y coloración: Teniendo en cuenta que las cumarinas son lactonas, a través de la disolución en soluciones alcalinas se pueden identificar mediante la presencia de una coloración amarilla al UV.

Lignanos:

Según (Dominguez X. , 1985) los lignanos pueden considerarse como dímeros oxigenados del fenilpropano (C₆-C₃) cuyo esqueleto básico origina tres grandes grupos de lignanos: a) asociación paralela, b) asociación antiparalela, c) asociación pseudoparalela. (Figura 11)

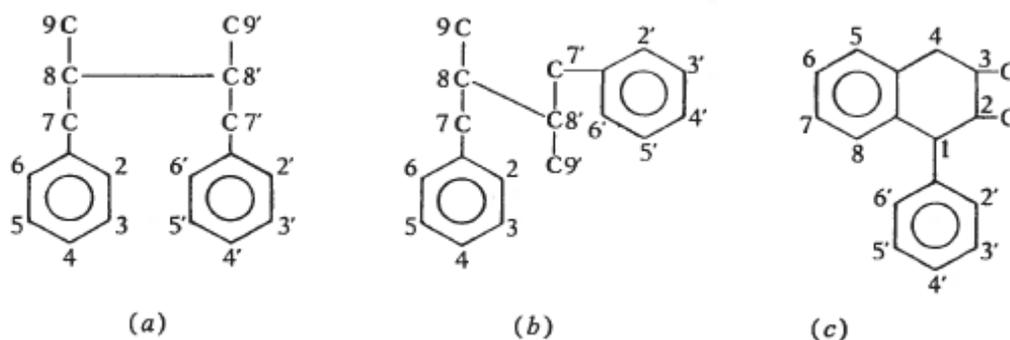


Figura 11. Grupos de lignanos según su estructura. Tomado de (Dominguez X. , 1985)

Se conocen poco más de 60 lignanos, todos aislados de las fanerógamas; muchos se han obtenido como glicósidos y se han aislado en todos los órganos vegetales, algunos son tóxicos y otros inocuos, todos son ópticamente activos.

Como provienen de los fenilpropanos, los cuales son derivados biosintéticamente del ácido Shiquímico, y son constituyentes principales de algunos aceites esenciales, tales como el clavo, canela, anís, etc. (Murillo, *et al.*, 2008), las pruebas para su identificación son las mismas que para los fenilpropanos.

Reacciones de precipitación y coloración: Se fundamenta en el reactivo de Arnow, el cual en presencia de fenilpropanoides presenta una coloración naranja y después al ser expuesto a un reactivo básico genera un rosado púrpura.

Flavonoides:

Los flavonoides son pigmentos naturales **no nitrogenados** presentes en los vegetales, comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos. Los flavonoides hacen parte de los metabolitos secundarios de algunas plantas y se sintetizan a partir de una ruta

biosintética mixta, en este caso particular son provenientes de la ruta del ácido shikímico (porción cinamoílo) y la ruta de los policétidos (porción benzoílo) (Luengo, 2002). Estos compuestos le confieren colores amarillos, naranja, rojo, violeta y azul a muchas flores, hojas y frutos; con el fin de proteger a la planta frente a los rayos solares dañinos y también filtran algunas radiaciones para que con ayuda de la clorofila puedan ser útiles en el proceso de la fotosíntesis (Monedero, 2015).

Según (Martínez, 2005) la estructura química de estos compuestos consta de dos anillos aromáticos (bencénicos), unidos a través de una cadena de tres carbonos que puede encontrarse como un anillo central heterocíclico (γ -pironas) que es el más común, o también con la cadena de tres carbonos abierta (Chalcona), $C_6-C_3-C_6$ (difenílpropano) (Figura 12).

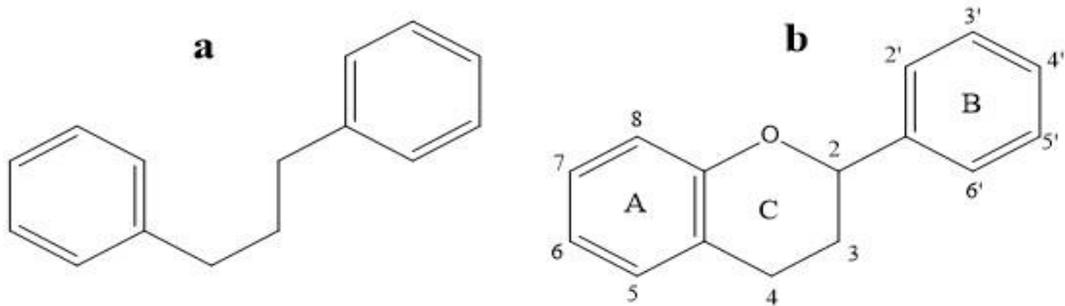


Figura 12. Estructura básica de los flavonoides. Cadena de tres carbonos abiertos (a) o anillo central heterocíclico (γ -pironas) (b). Tomado de (Martínez, 2005)

Según (Murillo, *et al.*, 2008) existen trece subclases de flavonoides con un total de más de 5000 compuestos, diez de ellos derivados del ácido Shiquímico y tres del acetato, algunas de estas subclases son: flavonas, flavanonas, Flavonoles, leucoantocianos, antocianos, chalconas, uronas, catequinas, isoflavonas, neoflavonas y flavanonoles (Figura 13).

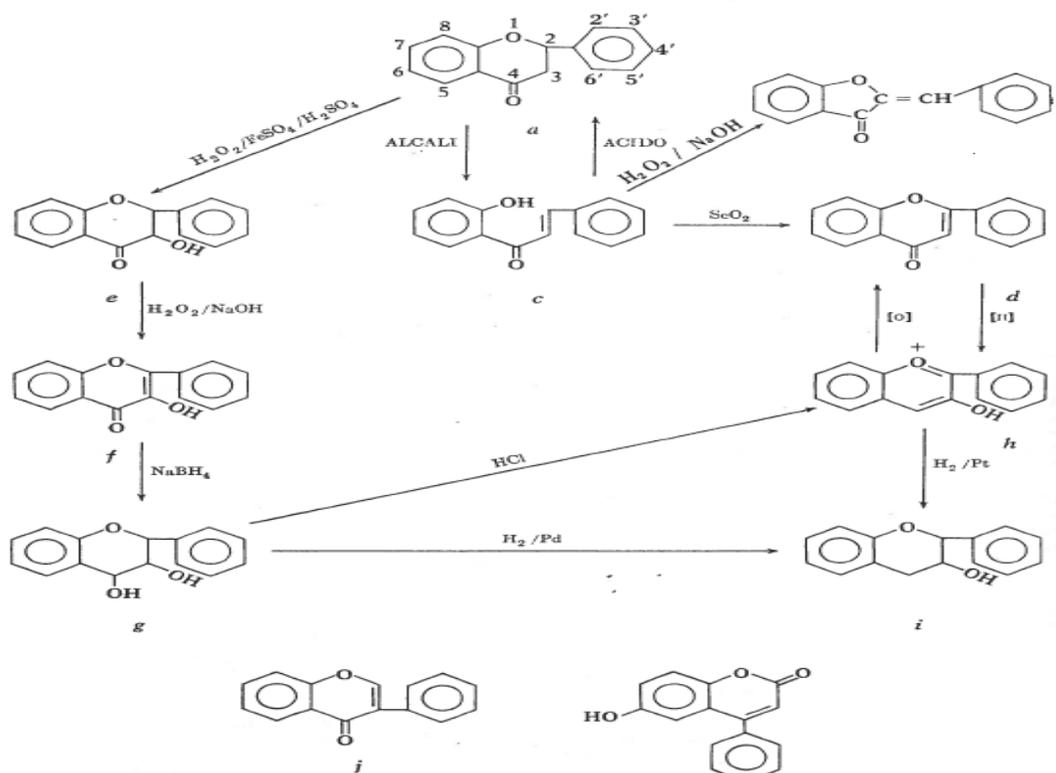


Figura 13. Interconversión de algunos flavonoides. flavonona (a) aurona (b), chalcona (c), flavona (d), flavonol (e), flavonol (f), leucoantocianidina (g), antocianidina (h), catequina (i), isoflavona (j) y neoflavona (k). Tomado de (Dominguez X. , 1985)

(Murillo, *et al.*, 2008) dice que los flavonoides no son considerados como vitaminas, sin embargo, protegen la salud: limitan la acción de los radicales libres (oxidantes) reduciendo el riesgo de cáncer y enfermedades cardíacas, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la Vitamina C, refuerzan los vasos sanguíneos y bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración muscular. Para identificarlos existen diversas pruebas que estos autores definen a continuación:

A) Prueba de Shinoda: Este se utiliza para flavonoides que contengan en su estructura un núcleo benzopirona como las flavonas, flavonoles, flavanonas, xantonas, etc., producen coloraciones rojizas, rosadas, violetas o anaranjadas. Las isoflavonas, chalconas y auronas no dan coloración.

B) Ensayo con Zn/HCl: El procedimiento es similar a la prueba de Shinoda, aquí solo los flavonoles producen coloraciones rojo-violetas. Mientras que las flavanonas y flavanoles no producen color o producen coloraciones rosadas débiles.

C) Vapores de Amoniaco: Los flavonoides impregnados con vapores de amoniaco en placas finas preparativas dan una coloración amarilla-ocre.

Compuestos nitrogenados o Alcaloides:

Se llaman alcaloides (de *álcali* (base) y- oide) a aquellos metabolitos secundarios de las plantas, generalmente, a partir de aminoácidos. Un alcaloide es, un compuesto químico que posee un nitrógeno heterocíclico procedente del metabolismo de aminoácidos; de proceder de otra vía, se define como pseudoalcaloide; Son básicos, excepto colchicina (Figura 14).

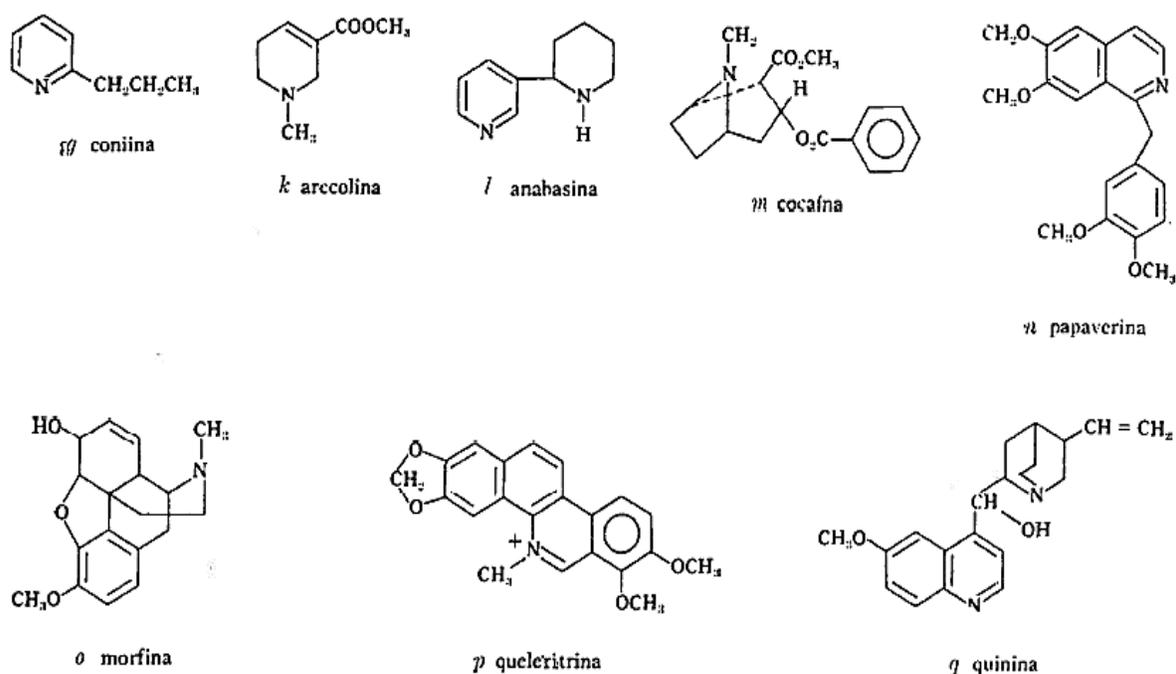


Figura 14. Estructura de algunos Alcaloides representativos. Tomado de (Dominguez X. , 1985)

No existe una definición exacta para los alcaloides, pero según (Silva, 2014) se pueden considerar como un “compuesto orgánico de origen natural (corrientemente vegetal),

nitrogenado, derivados generalmente de aminoácidos, más o menos básicos, de distribución restringida con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación”. Son una familia de más de 15000 metabolitos secundarios, se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina. Existen 4 tipos de alcaloides (Figura 15): *Alcaloides verdaderos* aquellos que tienen siempre un nitrógeno heterocíclico, son de carácter básico y existen en la naturaleza normalmente en estado de sal, biológicamente son formados a partir de aminoácidos y poseen una significativa actividad farmacológica; *Protoalcaloides*, que son aminas simples (colchicina y efedrina) con nitrógeno extracíclico, de carácter básico y son productos del metabolismo de los aminoácidos; *Pseudoalcaloides*, presentan las características de los alcaloides verdaderos, tienen un anillo heterocíclico con N, pero no derivan de aminoácidos y los *Alcaloides imperfectos*, son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides (Arango J. , 2002).

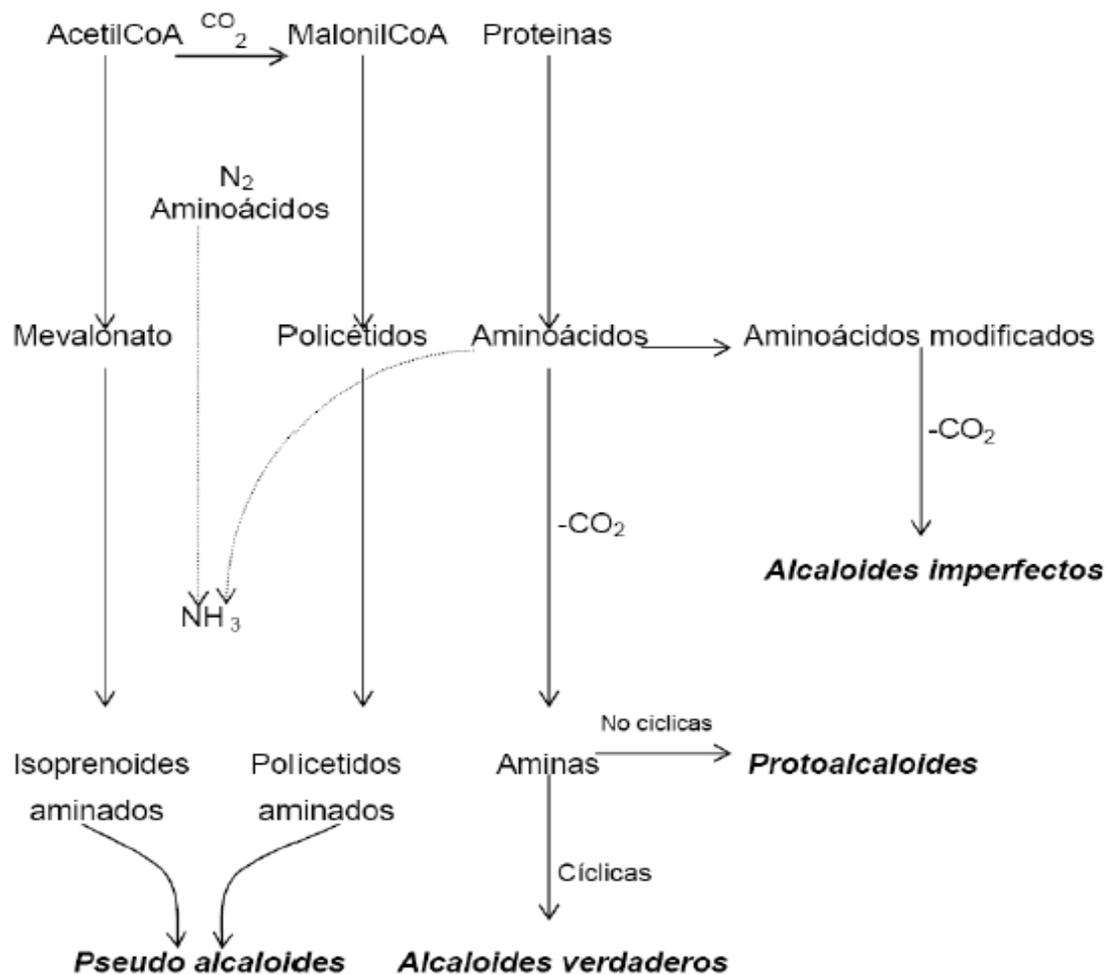


Figura 15. Aspectos biogénicos para la clasificación de los alcaloides. Tomado de (Silva, 2014)

Los alcaloides son el grupo más importante de sustancias de interés terapéutico, se encuentran en plantas superiores, en más de 100 familias de fanerógamas, en menor proporción en criptógamas, microorganismos (ergotamina) y animales: peces, sapos (bufotenina); (Silva, 2014); a pesar de su distinta estructura, poseen propiedades fisiológicas y toxicológicas que se ejercen fundamentalmente sobre el SNC, este tipo de propiedades, dio lugar a las primeras investigaciones, siendo los alcaloides las primeras sustancias estudiadas. También tienen acción en el sistema inmunológico al ser precursores de aminoácidos.

Según [(Murillo, *et al.*, 2008); (Silva, 2014)] las pruebas cualitativas que se pueden usar para el reconocimiento en el laboratorio de estos metabolitos están basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos) de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno, formando así precipitados, las principales son:

Reacción de Dragendorff: Forma precipitado por medio del bismuto, la presencia de alcaloides se detecta por la coloración naranja-rojiza.

Reacción de Mayer: Utiliza yodo y mercurio, los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol.

Reacción de Wagner: Forma precipitado a partir de Yodo, el cual da color café con la mayor parte de los alcaloides.

Los vapores de Yodo son reveladores importantes de la presencia de alcaloides en muestras de cromatografía con estos metabolitos, se evidencian por coloraciones amarillas y verdes.

Aminoácidos:

Son los compuestos orgánicos conformados por un grupo amino y un ácido carboxílico (Figura 16), son las bases estructurales de las proteínas, son la base de todo proceso vital ya que son absolutamente necesarios en todos los procesos metabólicos, son metabolitos primarios. Sus funciones más importantes son: el transporte óptimo de nutrientes y la optimización del almacenamiento de todos los nutrientes (es decir, agua, grasas, carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas). La mayoría de las enfermedades de la sociedad actual son debidas a nuestro estilo de vida, tales como: obesidad, colesterol, diabetes, insomnio, disfunción eréctil o la artritis. Todas ellas son atribuibles a trastornos metabólicos básicos y lo mismo ocurre con la pérdida de cabello o las arrugas profundas, enfermedades y trastornos que los aminoácidos ayudan a tratar (Harvest, *et al.*, 2019). Los aminoácidos influyen en las funciones de órganos,

glándulas, tendones o arterias. Son esenciales en la curación de heridas y reparación de tejidos, especialmente músculos, huesos, piel y cabello, así como en la eliminación de los impactos negativos que se asocian a trastornos metabólicos de todo tipo (Pereira, 2018).

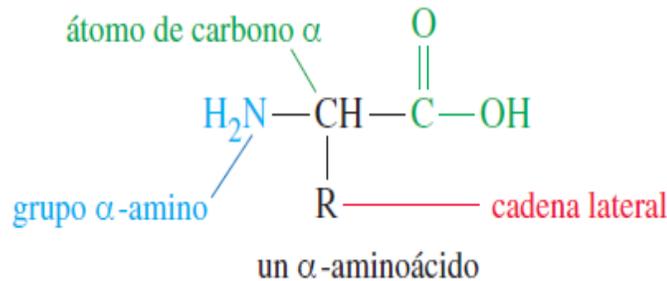


Figura 16. Estructura General de un aminoácido. Tomado de (Wade, 2011)

Los aminoácidos dan todas las reacciones típicas de los compuestos que contienen grupos aminos y carboxilo, según (Plummer, 1981) algunas de las reacciones para identificar los aminoácidos son:

Reacción de Ninhidrina: La Ninhidrina es un agente oxidante poderoso, dando como resultado una coloración purpura, esto se debe a que la Ninhidrina reacciona con el grupo alfa-amino libre de los aminoácidos, el color violeta-azuloso identifica un grupo amino primario.

Reacción Xantoproteica: La reacción da positiva para aquellos aminoácidos que tengan un núcleo aromático, debido a la formación de nitroderivados de color amarillo.

Reacción ácido glioxílico: Esta prueba es exclusiva para el triptófano al presentar un grupo glioxílico que reacciona con el ácido sulfúrico dando una coloración púrpura.

Reacción de nitroprusiato: Según en esta prueba el nitroprusiato reacciona con el exceso de amoniaco con grupos -SH dando derivados de color rojo.

Reacción de Sakaguchi: En esta prueba se determina la presencia de grupos guanidínicos en los aminoácidos.

Cabe destacar que la Ninhidrina es el revelador por excelencia de los aminoácidos, por tal motivo se puede usar en la cromatografía para identificar estos compuestos.

5.5 Espectroscopia: UV-Visible

La espectroscopia es un método de análisis que permite conocer la composición cuantitativa y cualitativa de una muestra. Según (Barneto, 2017) la espectroscopia consiste en la adsorción de radiación electromagnética por parte de las moléculas a analizar. Dichas moléculas absorben la radiación electromagnética en paquetes discretos de energías o también denominados cuantos. El mecanismo de absorción se produce solamente cuando la radiación que incide en la sustancia proporciona el cuanto de energía suficiente. La energía absorbida por la muestra incita un movimiento mecánico o electrónico en las moléculas, proceso que se denomina excitación. La energía radiante exhibe características ondulatorias. Las radiaciones aparentemente tan distintas, tienen en común ser electromagnéticas que viajan a la velocidad de la luz y solamente difieren unas de otras en su frecuencia o longitud de onda.

Según (Díaz, *et al.*, 2016) la espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro (Figura 17), en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma, la región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta, mientras que la región visible corresponde a los espectros que vemos cotidianamente, los colores y van desde los 390 a 780 nm.

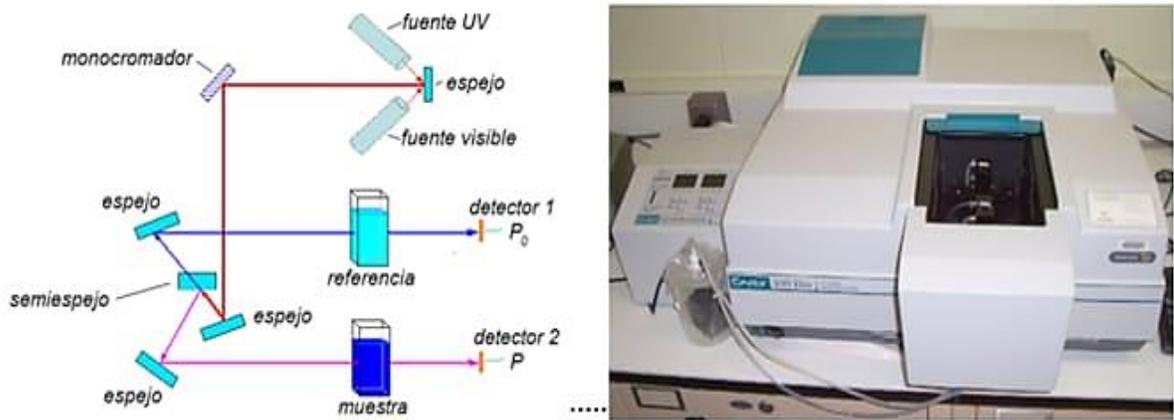


Figura 17. Espectrofotómetro y su composición. Tomado de (Gavira, 2012).

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica la cantidad de luz absorbida (ϵ) a diferentes valores de λ . A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta la mayor absorbancia ($\lambda_{\text{máx}}$). Dicho λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto. El espectro de absorción de un cromóforo depende, fundamentalmente, de la estructura química de la molécula (Figura 18).

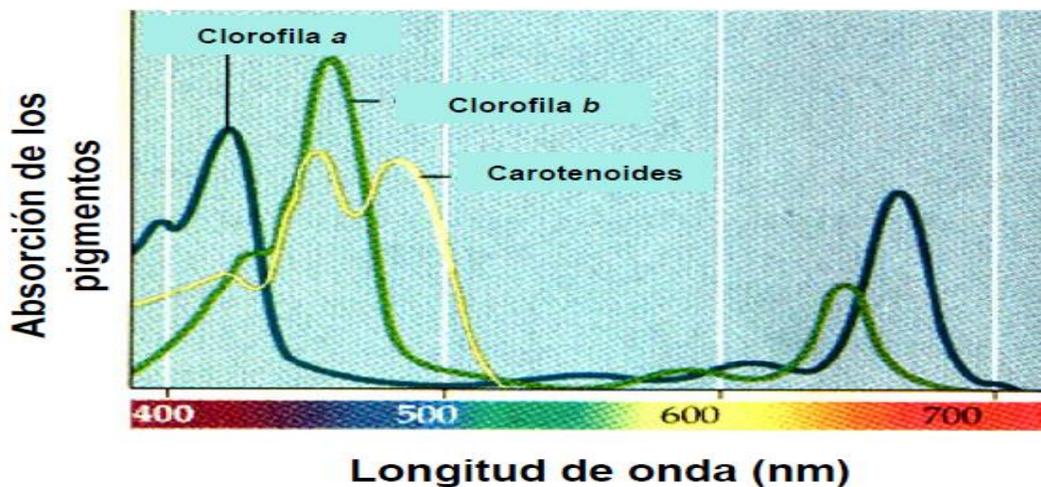


Figura 18. Espectros de absorción de tres pigmentos fotosintéticos cloroplastídicos. Tomado de (Díaz, et al., 2016)

5.6 Cromatografía en Capa delgada o fina (TLC):

Es un método analítico para la caracterización de metabolitos en las plantas, de forma general, consiste en pasar una fase móvil, a través de una fase estacionaria fija sólida (Figura 19), donde la fase móvil es el efecto de desplazamiento ejercido sobre los componentes de la mezcla que contiene el compuesto deseado en el disolvente, en este caso es un líquido; y la fase estacionaria se debe al efecto de retención producido sobre los componentes de la mezcla, aquí es sólida y es la sílica gel, esta se encarga de retrasar el paso de los componentes de la muestra, las cuales la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en el tiempo (Angurell, *et al.*, 2009)

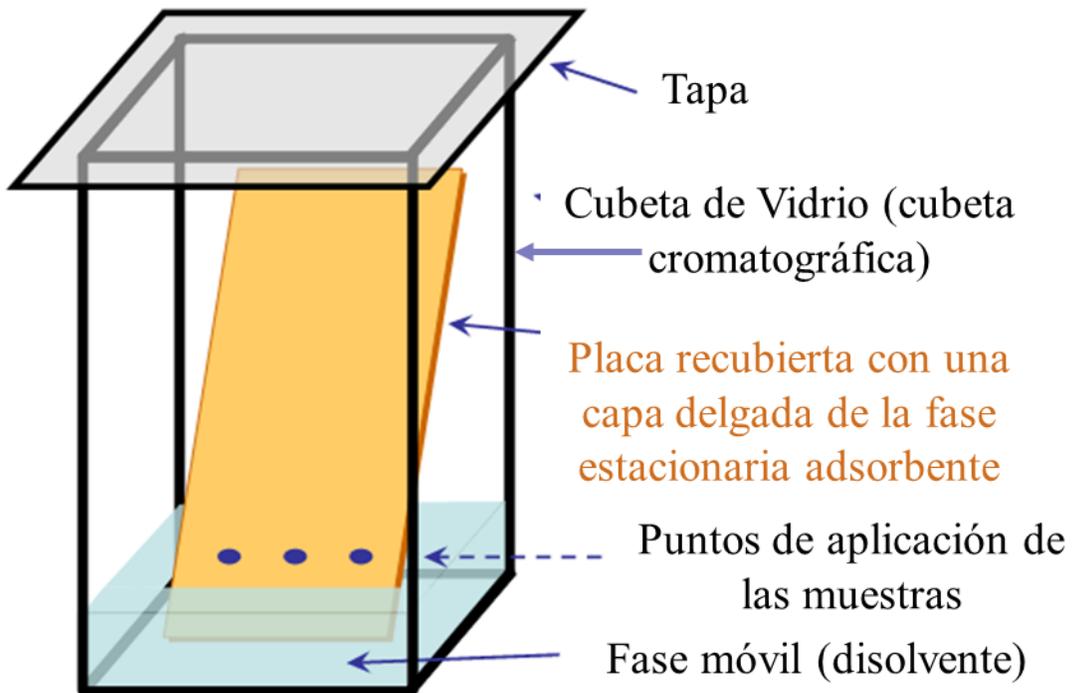


Figura 19. Montaje básico de la Cromatografía en Capa fina Preparativa. Tomado de (Castaños, 2015)

La TLC Se desarrolla más rápidamente, proporciona mejores separaciones y se puede elegir entre diferentes adsorbentes; debido a su simplicidad y velocidad, se utiliza a menudo para

monitorear las reacciones químicas y también para el análisis cualitativo de los productos de una reacción, puesto que permite conocer de manera rápida y sencilla cuántos componentes hay en una mezcla. En principio, los componentes se diferenciarán en solubilidad y en la fuerza de su adsorción, de forma que unos componentes se desplazarán más que otros (Castro, 2015).

Según (Castro, 2015) en el caso de los metabolitos, si los compuestos son coloreados se pueden observar las manchas a simple vista, si no es así, hay varios métodos para visualizar las manchas correspondientes a cada componente de la mezcla: (1) utilizar luz ultravioleta (UV 254nm o UV 366nm) para observar la placa; (2) utilizar reveladores, por ejemplo, vapores de yodo que es un reactivo inespecífico; (3) emplear reactivos específicos para desarrollar coloración en las manchas. Esto se puede hacer sumergiendo la placa en una disolución que los contenga o en forma de aerosol (Figura 20) (Angurell, *et al.*, 2009).

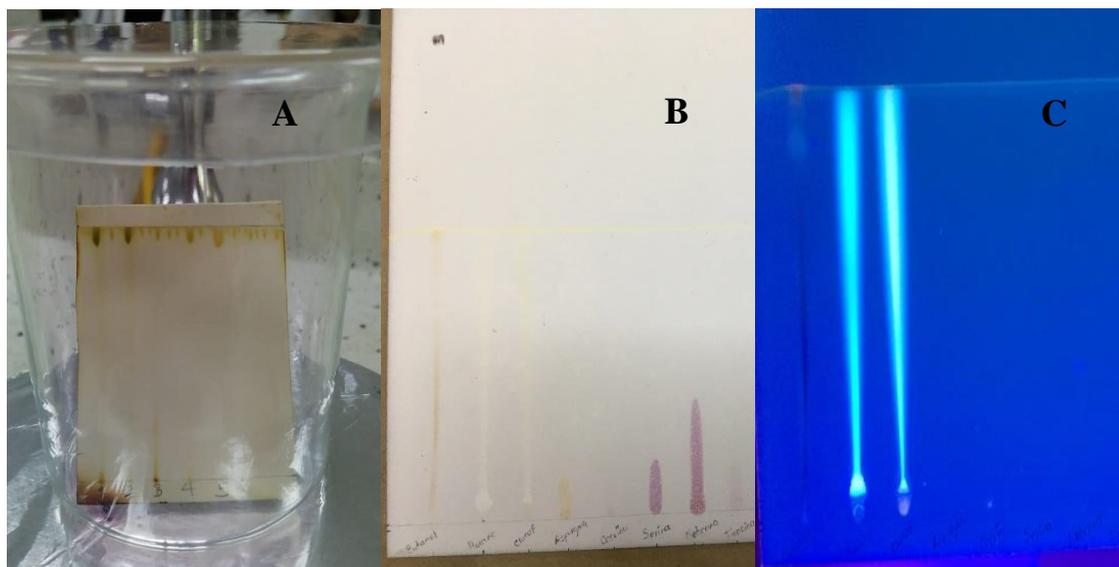


Figura 20. Montaje de TLC (A); visualización de manchas con revelador (B) y visualización de manchas con lámpara de Uv (C). Fotos de los autores.

5.7 Remedio herbolario

Es aquel remedio preparado de plantas medicinales, o sus partes, individuales o combinadas, y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por

conocimiento popular o tradicional el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad. Son de la cultura popular y muchas veces consiste en el jugo del fruto de una planta o demás subproductos obtenidas de esta, su eficacia es considerada con base en el conocimiento popular de las plantas (Cofretis, 2017).

5.8 Extracto vegetal

Es el producto líquido que se obtiene a partir de las plantas o partes de ellas (ejemplo los frutos, el tallo u hojas) con varios procedimientos y con varios solventes (Martinez, 2016).

5.9 Ensayos biológicos de citotoxicidad

Según (Castro, 2015) la actividad biológica es la capacidad inherente de una sustancia, como un fármaco, toxina, producto químico, producto biológico, extracto vegetal, de alterar las funciones químicas y o fisiológicas de un microorganismo, o un organismo. Esta capacidad no sólo está relacionada con la naturaleza física o química de la sustancia, sino también con su concentración y con la duración de la exposición. Por su parte, la citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado y por lo tanto medido.

En este sentido, según (Morales, 2019) los ensayos biológicos proporcionan de acuerdo con su objetividad metodológica la confirmación o la derogación de los potenciales atribuidos a las plantas, incluso de su carácter citotóxico; a continuación, se detallará un ensayo biológico basado en la determinación de la toxicidad con *Artemia salina*.

Determinación de la toxicidad con *Artemia salina*:

Según (Robles, *et al.*, 1982), en 1982 (Meyer, *et al.*, 1982) propusieron el uso de larvas de *Artemia salina* (crustáceo pequeño de aguas salobres) como organismo de prueba en un

bioensayo general para evaluar la citotoxicidad de sustancias vegetales. Esto se basa en la premisa de que los compuestos bioactivos son tóxicos a altas dosis y que la letalidad en un organismo simple puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos [(McLaughlin, *et al.*, 1988); (Abreu-Payrol, *et al.*, 2001); (Parra, *et al.*, 2001); (Kanegusuku, *et al.*, 2002)]. Se ha reportado correlación positiva entre la toxicidad en *A. salina* y la citotoxicidad en células de carcinoma nasofaríngeo humano (McLaughlin, *et al.*, 1988) y en diferentes líneas celulares de tumores humanos (Carballo, *et al.*, 2002).

Según (Morales, 2019), la utilización de *A. salina* es un bioensayo que permite la determinación del efecto letal de la muestra a analizar, en nauplios del crustáceo, prediciendo así la capacidad de producir muerte en células, insectos, entre otros efectos farmacológicos. Por lo anterior, ha sido necesario definir cualitativa y cuantitativamente la concentración letal media que permita identificar la toxicidad de una muestra, teniendo en cuenta esto, es decir la dosis que produce la muerte a la mitad de la población. El Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, CYTED ha establecido estos parámetros en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de toxicidad según (CYTED, 2014).

| Tipo | Descripción | CL ₅₀ (ppm) |
|------|-------------------------|------------------------|
| I | Extremadamente tóxico | 1-10 |
| II | Altamente Tóxico | 10-100 |
| III | Moderadamente Tóxico | 100-500 |
| IV | Ligeramente tóxico | 500-1000 |
| V | Prácticamente No Tóxico | 1000-1500 |
| VI | Relativamente Inocuo | >1500 |

5.10 Aceites esenciales

Según (Santizo, 2004), los aceites esenciales son compuestos de varias sustancias orgánicas volátiles o aromáticas, que pueden estar constituidos por alcoholes, cetonas, éteres aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas.

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos) compuestos aromáticos; fenilpropanos; monoterpenos y sesquiterpenos; estos dos últimos derivan biogenéticamente del ácido mevalónico (Dominguez X. , 1985). En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos que poseen compuestos azufrados y nitrogenados que les dan un olor relativamente desagradable; los aceites pueden estar asociados formando mezclas con otros productos naturales como es el caso de las resinas y productos relacionados. Son compuestos muy heterogéneos y se pueden encontrar desde uno a más de 30 según la especie vegetal estudiada (Figura 21).

Según (Santizo, 2004) las plantas con aceites esenciales se ubican principalmente en las familias de las labiadas y las umbelíferas. Las propiedades curativas son variadas y abundantes. Por lo general, poseen propiedades sedantes, antiespasmódicas y desinfectantes. Dado que son compuestos volátiles, son eliminados por las vías respiratorias y actúan como expectorantes. Algunas plantas poseen aceites esenciales que aumentan la diuresis (Caléndula) y otras poseen efectos antihistamínicos (Manzanilla). Útiles en perfumería, farmacia y en preparación de determinados alimentos. Previenen las caries y actúan como agentes antiulcerativos. Inhiben los procesos inflamatorios por supresión de la actividad de ciertas enzimas.

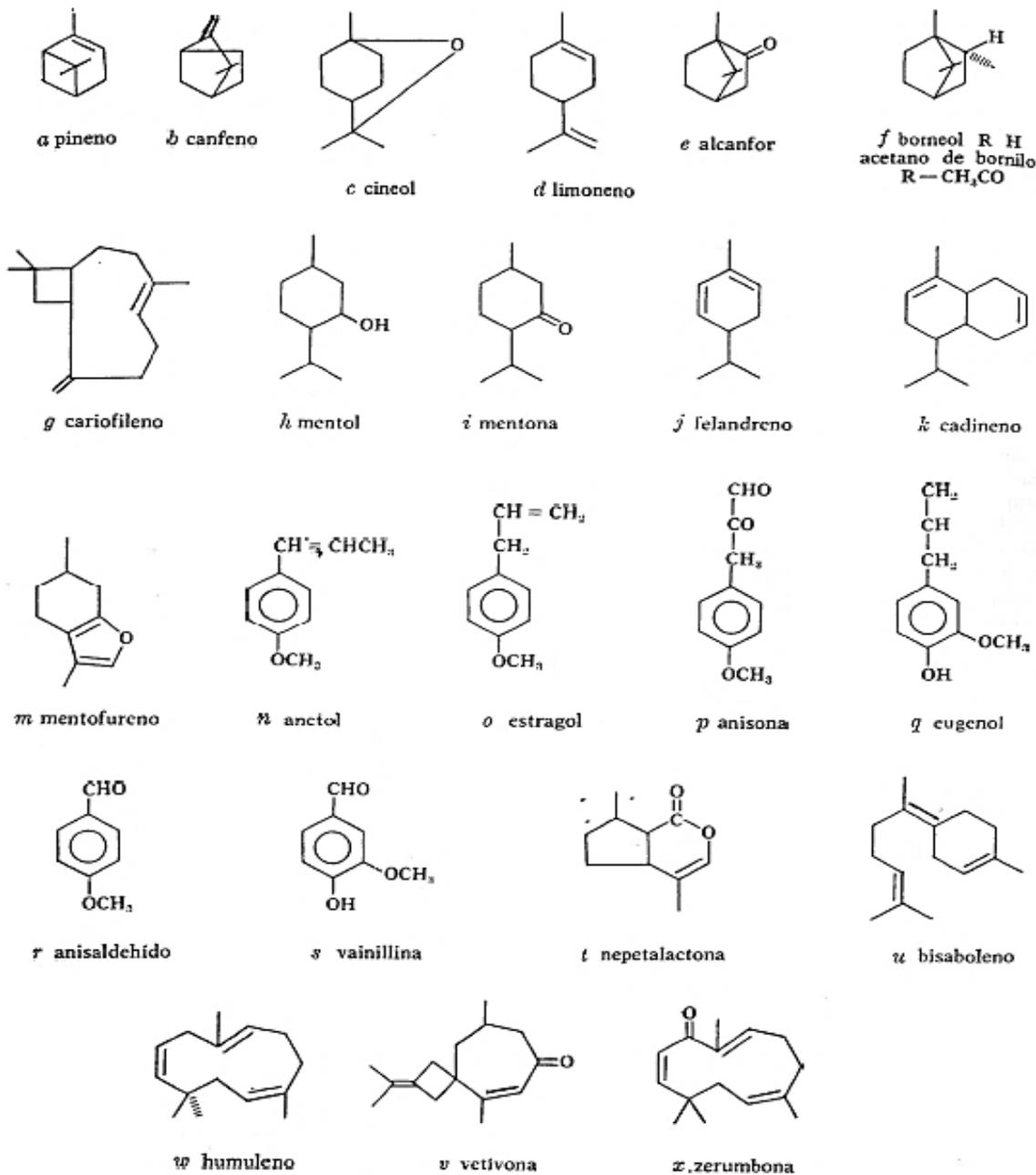


Figura 21. Principales compuestos obtenidos y sus estructuras heterogéneas, del aceite esencial del romero (*Rosmarinus officinalis*) Tomado de (Dominguez X. , 1985)

Aislamiento de aceites esenciales:

El más antiguo y sencillo método para obtener aceites esenciales es la *destilación por arrastre con vapor* (Figura 22), literalmente el vapor de agua extrae y arrastra a las sustancias

evaporadas a una trampa de frío (refrigerante) para que se condensen. El destilado líquido se recoge en un matraz.



Figura 22. Destilación por arrastre de vapor para la obtención de aceites esenciales. Tomado de (Girbes, et al., 2008)

Con base en lo planteado por (Ríos, et al., 2018), otro método para la extracción de aceites esenciales es la *Hidrodestilación simple*, para (Cerpa, 2007) cuando la materia vegetal está en contacto con el agua generadora de vapor se le denomina hidrodestilación, este vapor penetra los tejidos de la planta y disuelve partes de los aceites esenciales que se encuentran en algunas glándulas contenedoras, luego esta sustancia disuelta se distribuye por las membranas de las células permitiendo que se vaporicen los aceites esenciales desde la superficie, de esta manera, se cumple todo un ciclo hasta que se remueven aquellos que están contenidos en esas estructuras (pelos glandulares) de la planta donde se encuentran estos metabolitos (Torres, 2011).

“El enflorado” es un tipo diferente de aislamiento de aceites, en el que se hace uso de grasas; o mediante el uso de disolventes orgánicos, también está el uso por expresión (Usando aceite de limón) (Dominguez X. , 1985).

6. Antecedentes

Tabla 5. Estado actual del conocimiento

| Titulo e investigador | Objetivo | Metodología | Resultados |
|---|--|---|---|
| Caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto de Agraz (AVILA, ET AL., 2007) | <p>Evaluar las características fisicoquímicas y organolépticas del agraz, siendo una especie promisoría con poca información.</p> <p>Determinar las variaciones de las frutas secas y almacenadas.</p> | <p>Se recolecto la fruta y se realizaron mediciones como peso y diámetro.</p> <p>Se midieron variables como solidos solubles totales (refractómetro), acidez total titulable y ácidos orgánicos por medio de cromatografía liquida de alta resolución.</p> | <p>Se encontró que en el diámetro no hubo gran diferencia contrario a el análisis con HPLC en donde los ácidos orgánicos con mayor presencia fue el ácido aspártico seguido del ácido málico, además en el análisis sensorial, se identificó que los frutos frescos obtuvieron una buena aceptación tanto en apariencia, aroma, sabor y en textura, mientras que los almacenados durante 9 días aún calificaron en aroma y sabor.</p> |
| Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos del Agraz y su posible efecto citototóxico <i>in vitro</i> en células leucémicas oci aml3 y molt4. (GONZÁLEZ, ET AL., 2011). | <p>Evaluación de la capacidad antioxidante y posibles efectos citotóxicos de extractos de Agraz.</p> | <p>Se realizaron cuatro extracciones de antioxidantes; metanol, metanol-agua destilada, agua destilada y Jugo. Todos los extractos fueron rotaevaporados y finalmente liofilizados. La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó por medio del método del catión radical ABTS+ (etilbenzotiazolina-6-sulfónico) desarrollado por Re <i>et al</i>, 1993,1999 y por el método DPPH de Brand-Williams <i>et al</i>, 1995. Para los extractos de Agraz-Metanol, Agraz Metanol-Agua y Agraz-Agua se mezclaron diferentes volúmenes de ABTS o DPPH junto con diferentes volúmenes del extracto completando 1mL por mezcla en cada celda espectrofotométrica a la que se le midió su absorbancia cada minuto durante 30 minutos consecutivos.</p> | <p>Se determinó una capacidad antioxidante en la extracción con metanol al 95% de $63, \pm 3,3$ ppmTEAC/ml al minuto 30 y en el jugo de $64,4 \pm 3,2$ ppm TEAC/ml al minuto 30. También se determinó una disminución de la proliferación de células OCI AML-3 del 24,4% y de las MOLT 4 del 23,0% con agraz MeOH y el 98,8% con doxorubicina.</p> |

7. Metodología

7.1 Diseño metodológico

El presente proyecto de investigación se desarrolló mediante un enfoque experimental mixto (Amaya, 2007).

Para poder cumplir con los objetivos, se realizó un diseño metodológico que consistió en una serie de etapas sucesivas: Muestreo y recolección de la planta (Fase de campo), extracción e identificación de los metabolitos en el laboratorio y predicción de las propiedades citotóxicas de los extractos empleando la prueba de viabilidad con nauplios de *Artemia salina*.

7.2 Colecta y preparación del material vegetal: Fase de Campo

El 15 de abril de 2018 se realizó la visita en horas de la mañana a la cuenca del río las Ceibas ubicada en el municipio de Neiva (Huila), allí la especie vegetal se identificó y colectó teniendo en cuenta el criterio botánico de la profesora Hilda del Carmen Dueñas, Bióloga y profesora de la Universidad Surcolombiana, tomando solamente el ramillete con sus respectivos frutos (Figura 23). Posteriormente, se llevó a cabo la separación del fruto, escogiendo los que estuvieran en mejores condiciones.

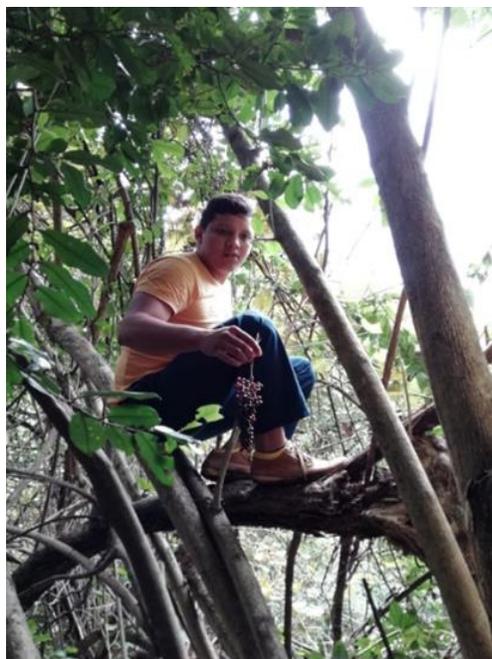


Figura 23. Colecta del fruto de Vitis tiliifolia en la cuenca del rio las ceibas

7.3 Macerado del zumo y obtención de los extractos vegetales

El fruto se maceró con un mortero obteniendo así el zumo, este contenido se vertió en un beaker de 500 mL filtrándose al vacío, a través de un papel marca Whatman dentro de un embudo de porcelana (Figura 24).



Figura 24. Maceración del fruto y filtración del zumo

Una vez obtenido el zumo mediante filtración, se procedió a realizar la extracción líquido-líquido por medio de un embudo de decantación, en el que se mezcló el zumo con el hexano como disolvente orgánico. Después, la fase orgánica fue separada y el zumo fue extraído con cloroformo y después con metanol, obteniéndose así tres mezclas, cada una con su correspondiente disolvente (Figura 25). Los disolventes que se emplearon fueron seleccionados debido a la diferencia de polaridades que presentan, lo que garantiza la extracción de la mayoría de los metabolitos secundarios.



Figura 25. Mezclado del zumo del Agraz con el disolvente orgánico (Hexano, Cloroformo y Butanol)

Cada extracto obtenido con el disolvente se guardó en un beaker; y posteriormente fue concentrado mediante rotaevaporación (Figura 26), de esta forma se recuperó parte del solvente y se obtuvo el extracto seco, el cual se guardó en un vial para cada caso (Figura 27).



Figura 26. Rotaevaporación de los extractos



Figura 27. Extracto vegetal seco (Butanol)

7.4 Pruebas cualitativas para la identificación de los metabolitos secundarios

Inicialmente se llevó a cabo el análisis para la identificación de aminoácidos en cada uno de los extractos, por lo tanto, se realizaron diferentes pruebas para la determinación de estos, después se continuó con los demás metabolitos que correspondieron a flavonoides, polifenoles y taninos, cumarinas, terpenos y/o esteroides, alcaloides, saponinas y lignanos (fenilpropanoides). A continuación, se describe el procedimiento para cada caso:

Pruebas para identificación de aminoácidos:

a) Reacción Xantoproteica: Se adicionó 0,5 mL de cada extracto en tubos de ensayo y posteriormente se le agregó a cada uno 0,5 mL de ácido nítrico, dejándose enfriar y observando el cambio de coloración a amarillo; luego se añadió suficiente NaOH a 10 M, hasta que se notara nuevamente un cambio de color.

b) Reacción del ácido glioxílico: Se adicionaron 0,5 mL de cada extracto en tubos de ensayo de 10 mL y luego a cada uno, se le agregaron 0,5 mL de ácido acético, por último, se añadió por las paredes del tubo 0,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Se observó si la coloración era morada.

c) Reacción del Nitroprusiato: Se trasvasaron 0,5 mL de cada extracto en tubos de ensayo de 10 mL, agregándole a cada tubo 0,1 mL de nitroprusiato y 0,1 mL de amoníaco concentrado, observando así la coloración morada.

d) Reacción de Sakaguchi: se adicionó 1 mL de cada extracto en los tubos de ensayo, luego se agregaron 0,5 mL de solución de NaOH 10 M y 3 gotas de naftol, se observa el cambio de coloración a rojo.

e) Reacción del Nitroprusiato: A 1 mL del extracto en un tubo de ensayo se le ajustó el pH a la neutralidad (Con un pH-metro se identificó el pH del extracto, en caso de que fuera ácido, se le agregó NaOH y en caso de que fuera básico se agregó HCl) luego se le adicionó 5 gotas de Ninhidrina, dejándose hervir por dos minutos y observando la coloración morada.

f) Cromatografía en capa fina preparativa con revelador: Después de realizadas las pruebas, se tomó cada extracto en un capilar y se colocó en una placa fina preparativa con todos los aminoácidos presentes en el laboratorio usados como estándares de referencia y como fase móvil el etanol, se dejó un tiempo para el arrastre de cada compuesto y se comparó el corrimiento de los extractos y los aminoácidos, luego se dejó secar la placa y se colocó en la lámpara de UV para la detección de grupos cromóforos en los extractos. Posteriormente y con un atomizador se le agregó el revelador de Ninhidrina característico para identificar aminoácidos, observándose así la presencia o ausencia de estos metabolitos.

Pruebas para identificación de flavonoides:

a) Prueba de Shinoda: A 0,5 mL del extracto se le añadió una o dos limaduras de Mg y gota a gota HCl hasta que terminara el desprendimiento de hidrógeno, se observó por 10 minutos el cambio de color.

b) Ensayo con Zn/HCl: A 0,5 mL del extracto se le añadió Zn en polvo y HCl gota a gota; después se observó el cambio de color.

c) Vapores de amoníaco: Por medio de la cromatografía de capa fina preparativa, se tomó cada extracto con un capilar y se colocó en la placa, la fase móvil fue una mezcla de acetona y hexano en proporción 1:1, se observó el corrimiento y luego se analizó la placa en la cámara de Uv para la detección de metabolitos a 366 nm. Después se pasó la placa por vapores de amoníaco, la placa estuvo en un beaker tapada mientras que los vapores del amoníaco ascendían por acción del calor de la estufa a una temperatura cercana a los 80°C.

Pruebas para la identificación de polifenoles y taninos:

a) Prueba del cloruro férrico: Se colocó 1 mL de muestra en un matraz y se adicionaron 1,5 mL de solución de ferrocianuro de potasio 0,004M, se agitó fuertemente y luego se añadió 0,5 mL de Solución de Cloruro Férrico 0,008 M en HCl con la misma concentración. Se observó el cambio de coloración.

b) Diferenciación entre taninos condensados e hidrolizables: A 0,5mL del extracto colocado en tubo de ensayo, se le mezclaron 0,5 mL de etanol, luego se agitó y agregó 0,5mL de solución de sulfato de magnesio al 30% p/v. Se observó la precipitación del extracto y en caso de que no fuera notable, se filtró por medio de un papel filtro, vertiendo el contenido en un beaker para observar la decoloración.

Pruebas para la identificación de cumarinas:

a) Reacción de precipitación y coloración: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto, luego se tapó y se colocó un papel filtro impregnado en solución diluida de NaOH, llevándose a baño maría a 100°C por algunos minutos. Después de 5 minutos se removió el papel filtro y

se examinó bajo luz UV, observando la fluorescencia amarilla característica de este metabolito.

Pruebas para la identificación de terpenos y/o esteroides:

a) Reacción de Lieberman-Burchard: Se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo disolviéndolo según el solvente base, luego se adicionaron de 3 a 4 gotas de cloroformo; y se añadieron gotas de anhídrido acético seguidos por una gota de H₂SO₄ concentrado, observándose la coloración.

b) Reacción de Salkowski: 0,5 mL del extracto en un tubo de ensayo se mezclaron con 1 mL de Cloroformo, luego se dejó resbalar 1 mL de H₂SO₄ al 85 %v/v con mucho cuidado por las paredes del tubo.

c) Reacción de Zlatkis: En un vidrio de reloj se adicionaron 0,2 mL del extracto con una gota de ácido acético glacial, una gota de cloruro férrico y una gota de H₂SO₄ concentrado. Se observó la coloración.

d) Cromatografía en capa fina preparativa: Los extractos se colocaron por medio de un capilar en la placa fina y se utilizó como fase móvil una mezcla de acetato de etilo y acetona en proporción 1:1. Posteriormente, la placa fue revelada con el reactivo de Liebermann por medio de un atomizador, el cual fue preparado de la siguiente forma, 3 mL de cloroformo con 0,5mL de anhídrido acético y 2 gotas de H₂SO₄; después de aplicado se observó la diversidad de colores en la placa.

Pruebas para la identificación de alcaloides:

a) Reactivo de Dragendorff: Se colocó 0,5 mL del extracto en un vidrio de reloj y luego se agregaron 3 gotas del reactivo, se observó la formación de precipitado.

b) Reactivo de Mayer: Se colocó 0,5 mL del extracto en un vidrio de reloj y luego se agregó 3 gotas del reactivo, se observó la formación de precipitado.

c) Reactivo de Wagner: Se colocó 0,5 mL del extracto en un vidrio de reloj y luego se agregaron 3 gotas del reactivo, se observó la formación de precipitado.

d) Cromatografía en capa fina: Los extractos se colocaron por medio de un capilar en la placa fina y se utilizó como fase móvil una mezcla de hexano, cloroformo y metanol en proporción 1:1:1. Posteriormente, la placa se reveló con lámpara UV y con vapores de yodo.

Prueba para la identificación de saponinas:

Prueba de la espuma: Se tomó 0,5 mL del extracto en un tubo de ensayo, y se le añadieron 4,5 mL de agua caliente. Luego se tomó 1 mL de esta solución en otro tubo de ensayo más pequeño y se agitó vigorosamente por 30 segundos, dejándolo en reposo por 15 minutos. Después de este tiempo se observó la espuma sobrenadante.

Prueba para la identificación de lignanos (fenilpropanoides):

Reacción de precipitación: Se colocó 0,5 mL del extracto en un vidrio reloj, luego se le adicionó 1 mL de HCl 0,5 N y después 2 mL del reactivo de Arnou. Después se agregó 1 mL de solución acuosa de NaOH al 2N, observando la coloración.

7.5 Fraccionamiento cromatográfico de los extractos.

Con el fin de aislar algunos compuestos del extracto hexánico, clorofórmico o butanólico se hizo uso de la cromatografía de capa fina preparativa. Por lo tanto, a cada una de las placas cromatográficas, se les trazó una línea en la parte inferior a 5 mm del borde y en la línea trazada se aplicó de forma continua el extracto usando un capilar (Figura 28).

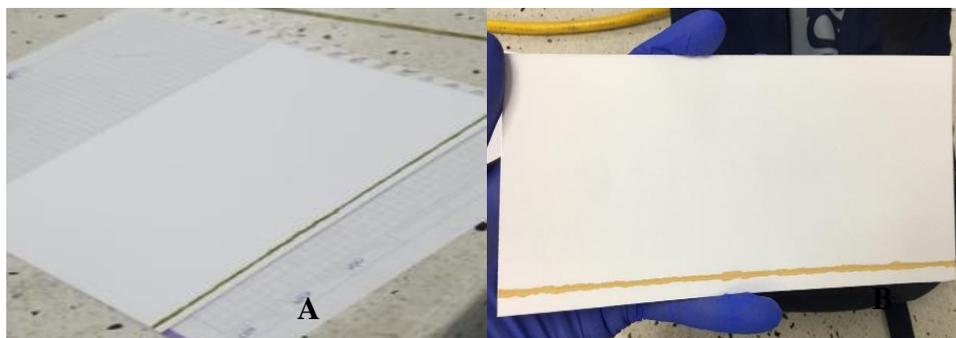


Figura 28. Placa de cromatografía en capa fina con el extracto clorofórmico (A) y Butanólico (B)

Luego cada placa se colocó en un beaker con su respectiva fase móvil, así para los extractos hexánico y clorofórmico se empleó butanol; mientras que para el extracto butanólico se empleó una mezcla de acetato de etilo y acetona en proporción 1:1(Figura 29). Después, las placas se dejaron impregnar hasta el frente del disolvente.

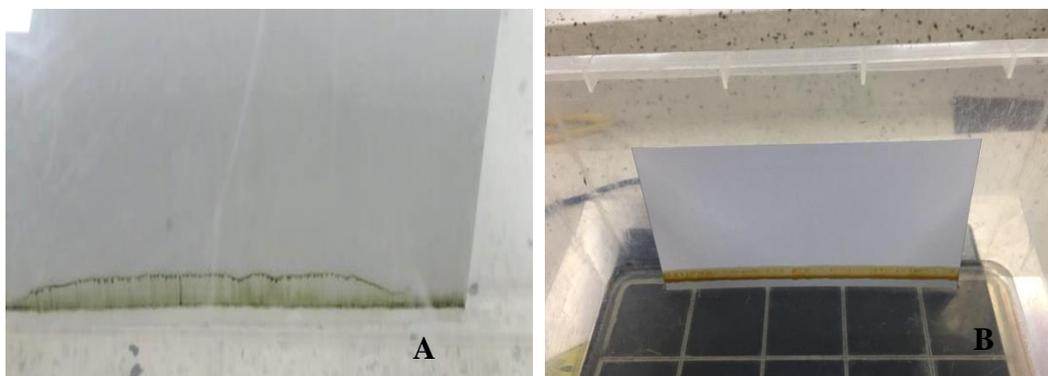


Figura 29. Montaje para la cromatografía en capa fina. Extracto clorofórmico (A) y butanólico (B)

Con el fin de poder identificar cada franja correspondiente a una fracción, se colocó la placa una vez seca en la lampara de UV (Figura 30), luego, se delineó cada franja con lápiz (Figura 31).

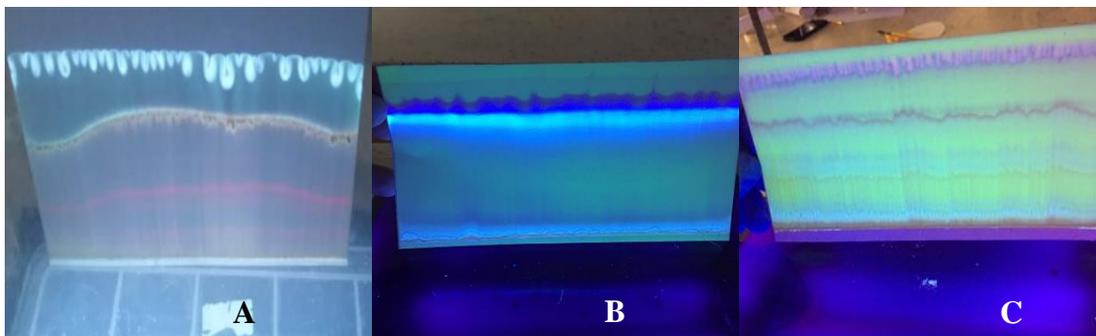


Figura 30. Placas cromatográficas reveladas al UV para marcar cada franja. Extracto clorofórmico (A), extracto hexánico (B) y extracto butanólico (C)

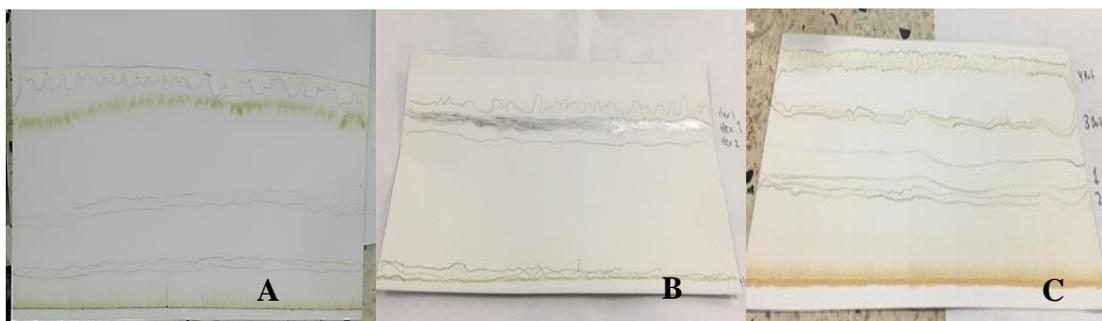


Figura 31. Fracciones cromatográficas de cada extracto subrayadas en lápiz e identificadas. Extracto clorofórmico (A), extracto hexánico (B) y extracto butanólico (C)

Una vez señaladas las fracciones, estas se rasparon con microespátulas, el contenido (sílica gel con muestra) fue puesto en un papel Whattman N. 2 y lavado con disolvente, así: para el extracto hexánico y butanólico se empleó metanol, mientras que para el extracto clorofórmico se empleó cloroformo (Figura 32), se hicieron varios lavados para asegurar que no quedara el compuesto en la sílica gel. Los filtrados fueron trasvasados a viales de 8 mL que fueron previamente lavados, secados y maseados, y la eliminación del disolvente se realizó mediante evaporación en una plancha a una temperatura inferior a 50°C durante un día o más (Figura 33), logrando así purificar el compuesto, los viales una vez secos con el componente se pesaron para obtener la cantidad de la fracción separada.

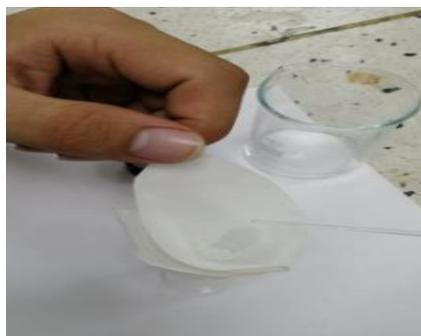


Figura 32. Filtrado de la sílica gel

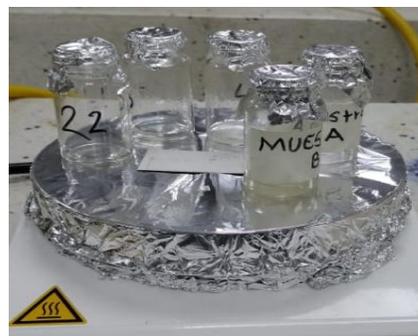


Figura 33. Compuestos aislados

7.6 Identificación de los metabolitos por espectroscopía Uv-Visible

Con el fin de obtener los espectros ultravioleta de los componentes aislados en la cromatografía para ayudar a su identificación, se procedió a realizar la siguiente fase gracias al equipo de UV/VIS modelo Perkin Elmer Lambda 35, serie 502508121003 (Figura 34), ubicado en el laboratorio de química de la Universidad Surcolombiana.

Este procedimiento se realizó de la siguiente forma:

1. Debido a la poca cantidad de muestra obtenida en cada vial, el contenido se volvió a disolver con el compuesto orgánico en el cuál fue lavado, para el caso de los compuestos aislados del extracto clorofórmico se usó este mismo, para el caso de los componentes del extracto hexánico y butanólico fue el metanol.
2. Se encendió el computador portátil con el software para el análisis de los espectros y el espectrofotómetro, programa denominado Perkin Elmer Lambda 35
3. Se seleccionó la opción “Scan” para encontrar la longitud de onda donde ocurre la máxima absorbancia y, se acoplaron las longitudes de onda entre 190 nm y 1000 nm, luego se encendieron las lámparas UV al elegir la opción “instrument”
4. Después, se definió el “blanco” en el espectro, motivo por el cual se escogió el disolvente (es decir, metanol o cloroformo), el cual se colocó en las celdas de cuarzo, esta celda fue insertada en el equipo, y mientras tanto, en el portátil se escogió la opción Autozero y luego OK

en el aviso de dar blanco, de esta forma, el equipo realizó una alícuota del disolvente, con el fin de que no interfiriera con el componente a identificar.

5. Con el blanco definido, se sacó esta celda y en su lugar se colocó una con el componente a analizar, luego se le dio en la opción “Start” al equipo para que realizara el espectro Uv, este procedimiento se hizo para cada muestra a identificar y de esta forma se obtuvieron los espectros de cada una.



Figura 34. Equipo UV/VIS, serie 502508121003, modelo Perkin Elmer Lambda 35 del laboratorio de Química de la Universidad Surcolombiana. Tomada de (Giraldo, et al., 2019)

7.7 Determinación del punto de fusión de algunos compuestos aislados

Para el caso de las muestras que tuvieron una mayor cantidad de compuesto, se procedió a identificar el punto de fusión usando el tubo de Thielle. El montaje consistió en tomar un tubo de Thielle con glicerina conectado a un soporte universal, este tubo se tapó con un corcho el cual tenía una perforación para ingresar el termómetro y el capilar con la muestra a analizar. El brazo del tubo fue calentado por un mechero, graduando la llama y su temperatura mediante la perilla de este instrumento, y el punto de fusión fue registrado para cada muestra (Figura 35).

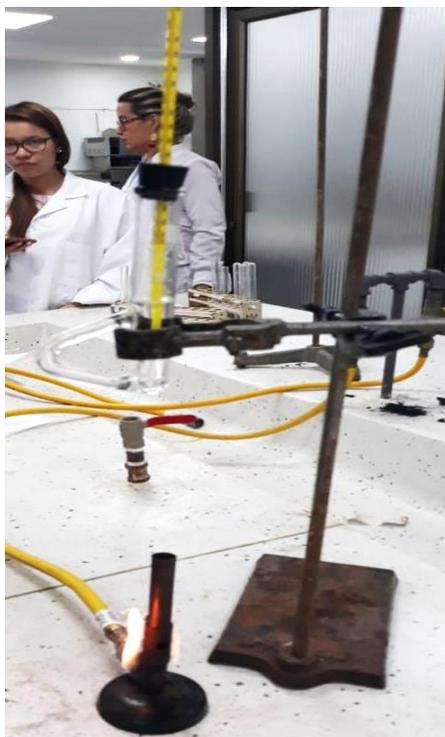


Figura 35. Montaje con el tubo de Thielle para la determinación del punto de fusión.

7.8 Evaluación biológica de los extractos: Prueba de toxicidad con *Artemia salina*

Con el fin de analizar los efectos adversos que pueden tener el uso de las especies vegetales, se procedió a realizar la evaluación biológica de los extractos usando crustáceos de *Artemia salina* como una prueba que permite determinar el potencial de una muestra como citotóxica, antihelmíntica o antipalúdica. El procedimiento que se empleó fue el siguiente:

Eclosión de los huevos de *Artemia salina*

En una solución al 3 %p/v de sal marina en 1 L de agua marca cristal, se colocó 1 g de huevos de *Artemia salina*, que fueron oxigenados permanentemente por medio de un aireador e iluminados por un periodo de 24 horas con una lámpara de luz blanca (Figura 36).



Figura 36. Montaje para la eclosión de los huevos de Artemia salina.

Preparación de las soluciones:

Inicialmente se preparó 50 mL de una solución de DMSO al 5 %v/v. Luego, se prepararon 25 mL de cada extracto a 200, 500 y 1000 ppm, que fueron disueltos en la solución de DMSO al 5 %v/v, de esta forma se obtuvieron todas las preparaciones necesarias (Figura 37).



Figura 37. Preparación de cada solución del extracto a diferentes concentraciones por ppm.

Montaje de los quintuplicados:

Para poder realizar la evaluación biológica de los extractos, de la mejor manera posible, se dispuso para cada extracto y concentración 5 cajas de Petri, las cuales se lavaron, esterilizaron y rotularon previamente colocándolas sobre el mesón; destinando también 5 cajas para el control (Figura 38a); después, en cada una de ellas se colocaron 10 nauplios de la *Artemia salina* usando una pipeta Pasteur (Figura 38 b).

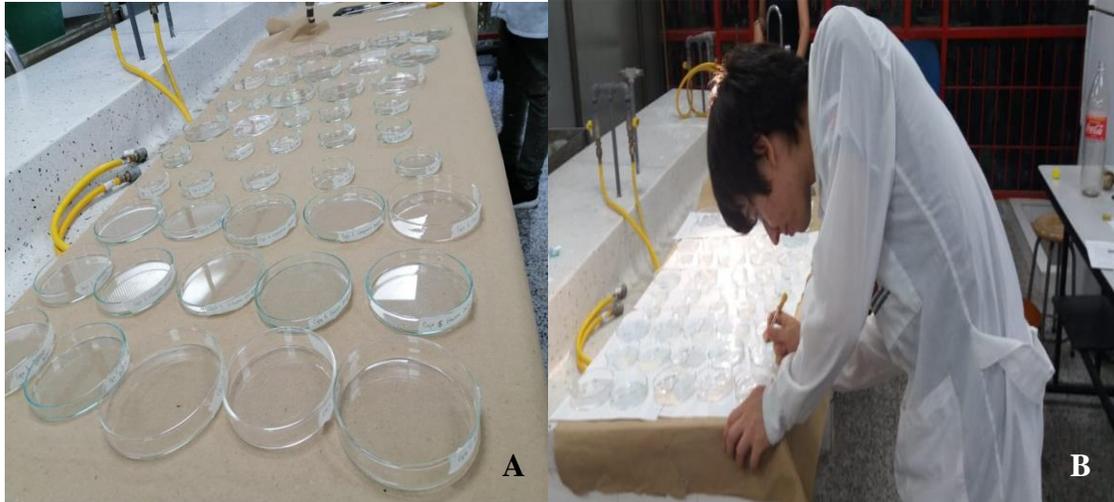


Figura 38. Montaje con los quintuplicados para cada concentración de extracto. (a) Ubicación y rotulado de las Cajas de Petri (b) Inserción de los Nauplios de *Artemia salina* en cada caja de Petri.

Adición de las soluciones en las cajas:

A cada caja de Petri se le adicionaron los 5 mL de las soluciones de cada extracto, para el control sólo se agregó el medio DMSO al 5 % v/v; durante la evaluación, se registró el número de nauplios muertos cada 10 minutos dentro de la primera hora, luego a las 12, 18, y 24 horas (Figura 39 y Anexo 1).



Figura 39. Conteo para la determinación de la mortalidad de *Artemia salina*

7.9 Análisis estadístico para la determinación de la concentración letal media:

La Concentración Letal Media (CL₅₀) se calculó mediante un análisis estadístico utilizando el programa Microsoft Office Excell, como primer paso se procedió a registrar en un modelo de tabla de datos (Figura 40) el número de nauplios muertos de *Artemia salina* en cada caja de Petri.

| Tiempo (H) | T ₀ | T ₁ (0,1) | T ₂ (0,2) | T ₃ (0,3) | T ₄ (0,4) | T ₅ (0,5) | T ₆ (1) | T ₇ (2) | % mortalidad | Promedio de crustaceos por concentración |
|---------------------------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------|--|
| □ ppm E. butanólico | NT | NM | NM | NM | NM | NM | NM | NM | NM | |
| 200 | | | | | | | | | | 0% |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| 500 | | | | | | | | | | 0% |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| 1000 | | | | | | | | | | 0% |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

Figura 40. Modelo de tabla de datos empleado para el análisis estadístico de la evaluación biológica con *Artemia salina*.

En el modelo de tabla de datos (Figura 40) se aprecia la concentración de cada extracto y el tiempo, el cual fue tomado de la siguiente manera: el tiempo inicial (T₀), y después cada 15 minutos durante la primera hora (T₁, T₂, T₃ y T₄), luego el tiempo a las 12 horas (T₅), 18 horas (T₆), y 24 horas (T₇) para cada caja de Petri y cada concentración, escribiendo en las celdas el número de individuos muertos de *Artemia salina* para cada una de ellas.

Una vez registrados los valores, se calculó el porcentaje de muerte para cada caja de Petri y se calculó el promedio general por concentración del extracto (variables % de mortalidad y promedio de crustáceos por concentración respectivamente). Después, se realizó una nueva tabla de datos en la que se calculó el logaritmo en base 10 de la concentración y también se transformó

el porcentaje de muerte promedio de la concentración a Probit, teniendo en cuenta la tabla de transformación de Probit (Tabla 6). El modelo de tabla utilizado se muestra en la figura 41, y los valores para el Probit según el % de muerte se muestra en la tabla 6.

| Tipo de Extracto | Concentración [] (ppm) | log 10 (CONCENTRACIÓN) | %MUERTE | PROBIT |
|------------------|-------------------------|------------------------|---------|--------|
| | | =Log10([] (ppm)) | | |
| | | | | |
| | | | | |

Figura 41. Tabla de datos modelo para obtener el log en base 10 de la concentración y el Probit.

Tabla 6. Tabla de transformación de Probit

| % | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 0 | - | 2,67 | 2,95 | 3,12 | 3,25 | 3,36 | 3,45 | 3,52 | 3,59 | 3,66 |
| 10 | 3,72 | 3,77 | 3,82 | 3,87 | 3,92 | 3,96 | 4,01 | 4,05 | 4,08 | 4,12 |
| 20 | 4,16 | 4,19 | 4,23 | 4,26 | 4,29 | 4,33 | 4,36 | 4,39 | 4,42 | 4,45 |
| 30 | 4,48 | 4,50 | 4,53 | 4,56 | 4,59 | 4,61 | 4,64 | 4,67 | 4,69 | 4,72 |
| 40 | 4,75 | 4,77 | 4,80 | 4,82 | 4,85 | 4,87 | 4,90 | 4,92 | 4,95 | 4,97 |
| 50 | 5,00 | 5,03 | 5,05 | 5,08 | 5,10 | 5,13 | 5,15 | 5,18 | 5,20 | 5,23 |
| 60 | 5,25 | 5,28 | 5,31 | 5,33 | 5,36 | 5,39 | 5,41 | 5,44 | 5,47 | 5,50 |
| 70 | 5,52 | 5,55 | 5,58 | 5,61 | 5,64 | 5,67 | 5,71 | 5,74 | 5,77 | 5,81 |
| 80 | 5,84 | 5,88 | 5,92 | 5,95 | 5,99 | 6,04 | 6,08 | 6,13 | 6,18 | 6,23 |
| 90 | 6,28 | 6,34 | 6,41 | 6,48 | 6,55 | 6,64 | 6,75 | 6,88 | 7,05 | 7,33 |

Una vez completada la tabla de datos mostrada en la figura 41, se procedió a realizar el análisis de regresión, para lo cual se utilizó la opción Análisis de datos disponible en la pestaña datos de Excell, se escogió la opción *Regresión*, y se determinaron los rangos Y y X de entrada, siendo el rango Y los resultados obtenidos del Probit y el rango X el Logaritmo en base 10 de la

concentración, al dar en aceptar se arroja un esquema de la regresión, del cual se muestra un modelo en la figura 42.

| | | | | | | | | |
|---|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Resumen | | | | | | | | |
| <i>Estadísticas de la regresión</i> | | | | | | | | |
| Coeficiente de correlación múltiple | | | | | | | | |
| Coeficiente de determinación R ² | | | | | | | | |
| R ² ajustado | | | | | | | | |
| Error típico | | | | | | | | |
| Observaciones | | | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | | | |
| | Grados de lib | Suma de cua | Promedio de | F | Valor crítico de F | | | |
| Regresión | | | | | | | | |
| Residuos | | | | | | | | |
| Total | | | | | | | | |
| | <i>Coeficientes</i> | <i>Error típico</i> | <i>Estadístico t</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Inferior 95%</i> | <i>Superior 95%</i> | <i>Inferior 95,0%</i> | <i>Superior 95,0%</i> |
| Intercepción | | | | | | | | |
| Variable X 1 | | | | | | | | |

Figura 42. Modelo de la regresión lineal obtenida para el análisis estadístico.

De la figura 42, los valores que son necesarios para obtener la Concentración Letal Media (CL50), son los señalados en amarillo correspondientes al coeficiente de Intercepción y a la Variable X 1, estos valores sirvieron para establecer una nueva tabla modelo (Figura 43), sustituyéndose a su vez en la ecuación de la recta lineal ($y=ax+ b$) donde $a=$ Variable X1 y $b=$ Intercepción (Figura 43), también se tuvo en cuenta que, para obtener la Concentración Letal Media era necesario transformar 50 a Probit usando la tabla de transformación de Probit (Tabla 6), esta valor corresponde a “y” en la ecuación de la recta, de esta forma se despejó la variable x (Figura 43).

| | |
|--|--|
| Intercepción | |
| Variable X 1 | |
| | |
| $Y=ax+b$ | |
| Probit de 50=(Variable X1) x+(Intercepción) | |
| $5=(Variable X1)x+(Intercepción)$ | |
| $5-(Intercepción)=(Variable X1) x$ | |
| $[5-(Intercepción)]/(Variable X1)=x$ | |
| $X=[5-(Intercepción)]/(Variable X1)$ | |
| $X = \frac{5-(Intercepción)}{(Variable X1)}$ | |
| | |
| X= | |

Figura 43. Tabla modelo y Cálculos para obtener la X de la ecuación de la recta

Una vez obtenido este valor, la CL₅₀ se calculó realizando el antilogaritmo del valor obtenido en X (Figura 44). De esta forma se obtuvo la regresión lineal entre el porcentaje de mortalidad de *A. salina* frente a las concentraciones de los extractos y los blancos a las 24 horas de exposición; y el valor final de la CL₅₀ obtenido para cada extracto, se comparó con la clasificación de toxicidad según (CYTED, 2014).

| | |
|-----------------|--------------------|
| LC50=antilog x | =10 ^(x) |
| LcC50=antilog x | |
| LC50= | |

Figura 44. Obtención de la CL50 a partir del antilogaritmo del valor de X calculado.

7.10 Obtención del aceite esencial de la semilla del Agraz

Hidrodestilación Simple (HD)

Para la extracción del aceite esencial de la semilla de *Vitis tiliifolia*, se emplearon 50 g de semillas y 1L de agua destilada. Luego se armó el montaje de destilación sencilla indicado en la Figura 40. La mezcla se destiló por una hora y el agua se repuso en algunas ocasiones para evitar la sequedad del material. El hidrolato fue recogido en una probeta para medir la cantidad

obtenida, posteriormente se realizó la extracción líquido-líquido con diclorometano (2x50 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron con MgSO₄, luego se filtraron y finalmente el disolvente se rotaevaporó.



Figura 45. Montaje para la hidroddestilación simple de las semillas de la Vitis tiliifolia.

7.11 Aspectos bioéticos

En primer lugar, la especie vegetal estudiada, la *Vitis tiliifolia*, se colectó con permiso de los dueños del predio en donde se encontraba en estado silvestre acompañada de varias plantas; cabe resaltar que la colecta fue en la reserva natural de la cuenca del río las Ceibas del municipio de Neiva.

El proyecto en gestión no genera conflictos de intereses en cuanto al tema de investigación y sus objetivos, debido a que no hay personas ni semilleros que se pronuncien por su autoría.

El agraz es una especie nativa de nuestra región y según (Bernal, *et al.*, 2015) su estado de conservación es No Evaluado.

Y, por último, para los nauplios de *Artemia salina* se siguen los protocolos especificados por (Meyer, *et al.*, 1982) en cuanto al manejo de estos organismos.

8. Resultados

8.1 Tamizaje preliminar para la identificación de metabolitos secundarios

Prueba para flavonoides

Realizado el ensayo para determinar la presencia de flavonoides en los extractos: hexánico clorofórmico y butanólico, se encontró que la reacción entre los tres extractos vegetales con el HCl y el Mg no mostró la formación de tonalidades rosa, roja, violeta o naranja como los colores característicos que permiten dar evidencia de la presencia de flavonoides en las muestras. Por tal motivo, se determinó la ausencia de esta clase de metabolitos en el Agraz (Figura 46). A pesar de la formación de cúmulos o de la decoloración, la prueba no es definitiva para flavonoides, porque las flavonas y flavonoides con la prueba de Zn debe de tornarse a un color rosado débil y esto no se evidenció .

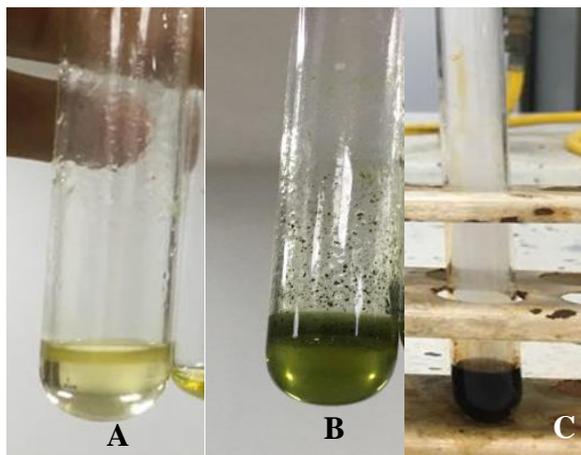


Figura 46. Prueba de Shinoda para Flavonoides. A) Extracto hexánico, B) extracto clorofórmico, C) extracto butanólico.

Prueba para polifenoles y taninos:

De acuerdo con los resultados obtenidos durante los ensayos con los extractos hexánico, butanólico y clorofórmico para la identificación de polifenoles y taninos, a través de la prueba con el cloruro férrico, se encontró lo siguiente: para el extracto hexánico no se observó ninguna

coloración amarilla o verde como indicador que permite determinar la presencia de estos metabolitos en la muestra, en contraste, con los extractos clorofórmico y butanólico que si mostraron la presencia de polifenoles o taninos. En cuanto a, la diferenciación entre taninos condensados e hidrolizables se encontró que no hubo ninguna formación de precipitado para el extracto clorofórmico; pero si para el extracto butanólico (Figura 47).

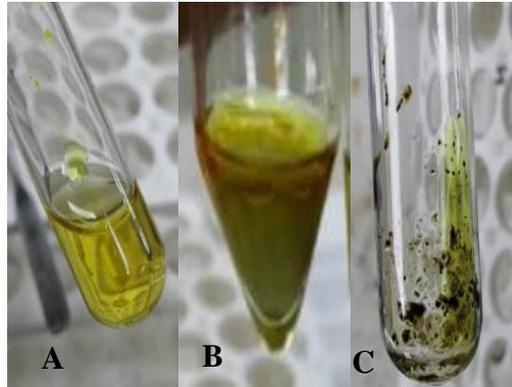


Figura 477. Prueba de Cloruro Férrico. A) Extracto hexánico B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico.

Prueba para cumarinas

De acuerdo con los resultados obtenidos durante los ensayos, se observaron coloraciones amarillas y verdosas en las tiras impregnadas con los extractos hexánico y clorofórmico al revelarse al UV (340-360 nm), mientras que no se evidenció color para el extracto butanólico (Figura 48).

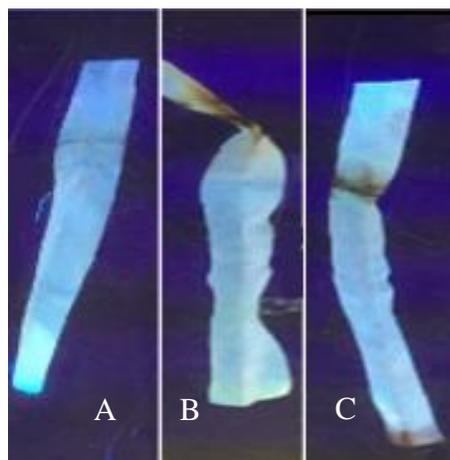


Figura 48. Prueba de precipitación y coloración con NaOH. A) Tira con extracto clorofórmico. B) Tira con extracto hexánico y C) tira con extracto butanólico.

Prueba para terpenos y esteroides

Prueba de Salkowski:

Al realizar las pruebas con los extractos hexánico, butanólico y clorofórmico, se observaron coloraciones amarillas en los tres extractos y una interfaz de color rojizo, lo que indica resultados positivos para terpenoides y esteroides (Figura 49).

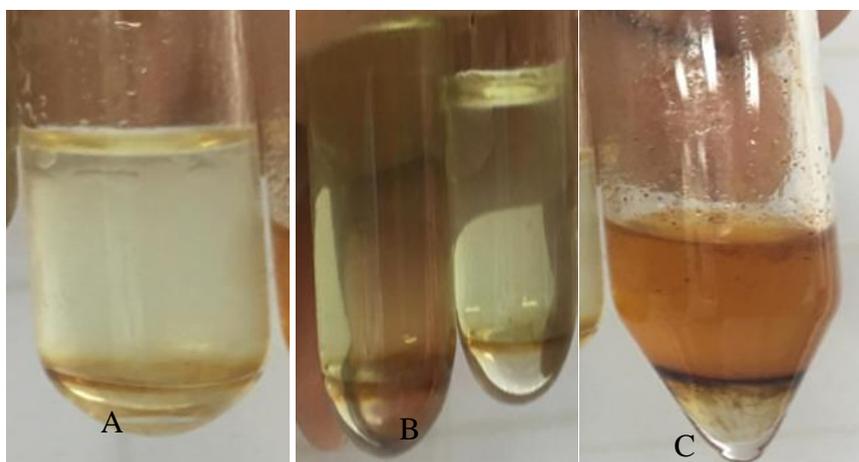


Figura 49. Prueba De Salkowski. A) Extracto hexánico, B) Extracto clorofórmico y C) Extracto butanólico.

Prueba de Lieberman-Burchard

En la figura 50 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de Lieberman-Burchard. Realizada la prueba con los tres extractos se encontró que el extracto hexánico mostró un cambio de color a amarillo, para el extracto butanólico un color rojo oscuro y para el extracto clorofórmico tomo un color de verde oscuro, indicando así presencia de compuestos esteroidales y/o triterpenos principalmente en los extractos más polares.

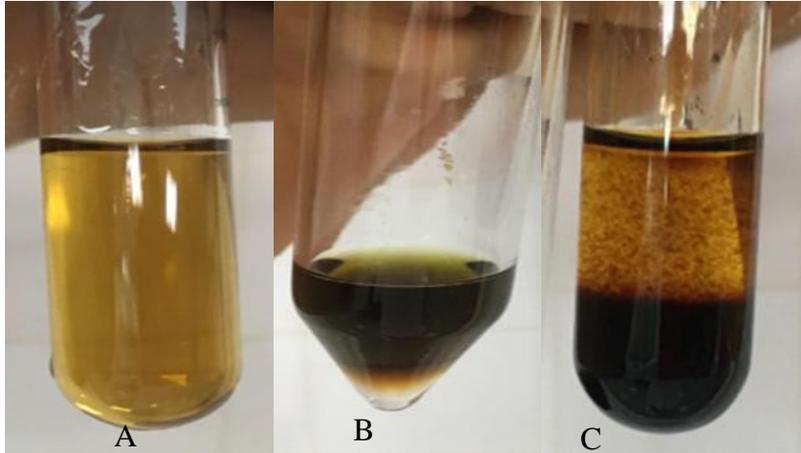


Figura 50. Prueba de Liebermann-Burchard. A) Extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico.

Prueba de Zlatskis.

Para el ensayo se observó que para los extractos hexánico, butanólico mostraron un color amarillo, mientras que el extracto clorofórmico formó una coloración rojiza, por lo que la prueba para la presencia de colesterol en el Agraz es positiva (Figura 51).

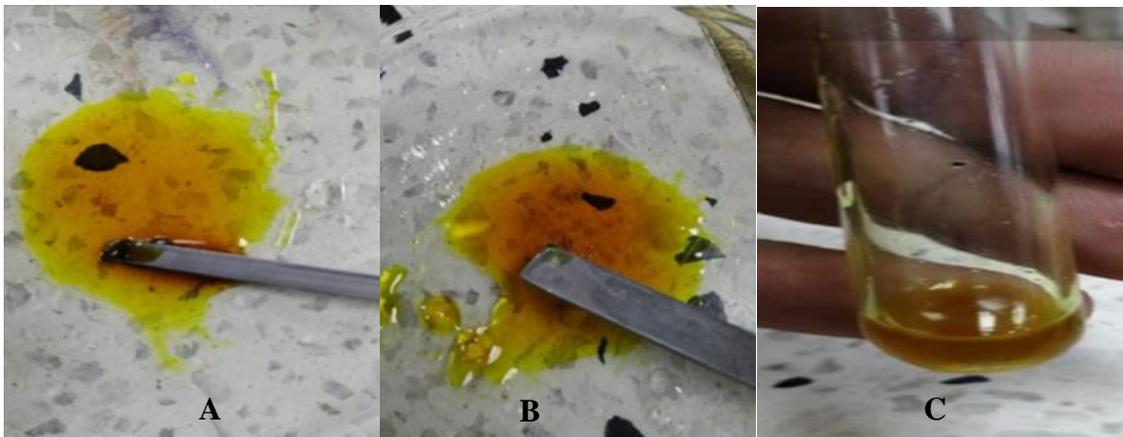


Figura 51. Prueba de Zlatskis. A) Extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico.

Pruebas para alcaloides

Reactivo de Drangendorf

Realizada la prueba para alcaloides se encontró que para los tres extractos hexánico, butanólico y clorofórmico, se observó una coloración naranja, por lo cual resulta positiva en este caso, indicando la presencia de alcaloides (Figura 52).



Figura 52. Prueba de Drangendorf. A) Extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico.

Reactivo de Mayer

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos, se observaron que para los tres extractos hexánico, butanólico y clorofórmico se formó un precipitado de color blanco, lo que indica una reacción positiva para alcaloides en el Agraz (Figura 53).

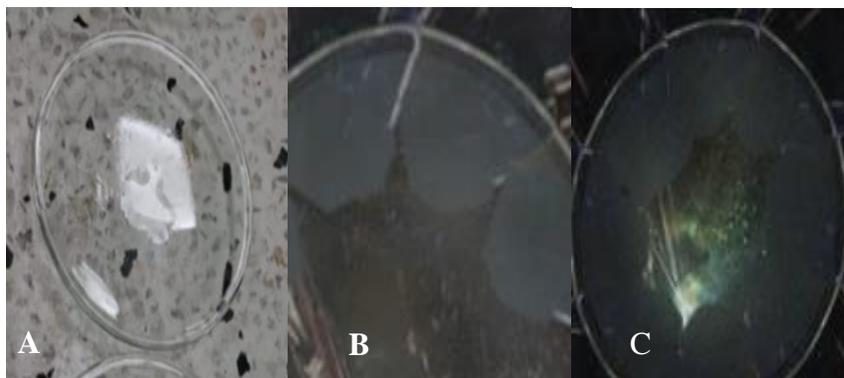


Figura 53. Prueba de Mayer. A) Extracto hexánico B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico.

Reactivo de Wagner

En los ensayos para los extractos hexánico y butanólico se presentó un precipitado de color café, indicando prueba positiva para alcaloides; en contraste con el extracto clorofórmico que se formó un color amarillo, lo que indica que para este ensayo la prueba es negativa (Figura 54).

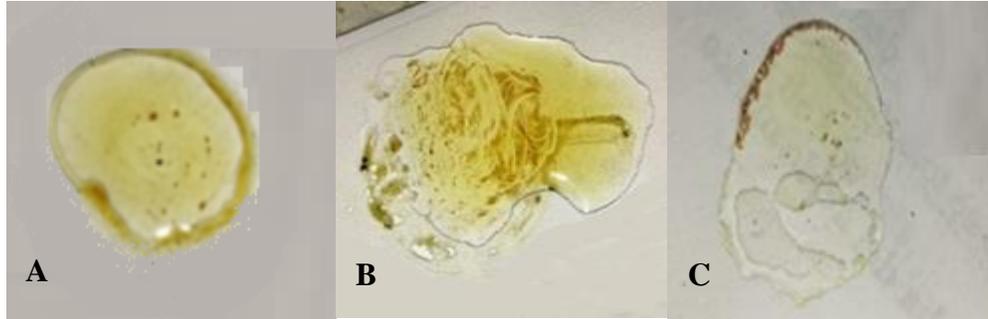


Figura 54. Prueba de Wagner. A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico.

Prueba para identificación de saponinas

De acuerdo con los resultados para la prueba de saponinas con los tres extractos, se observó que no hubo producción de espuma, indicando la ausencia de este tipo de metabolitos en el Agraz, de manera presuntiva (Figura 55).

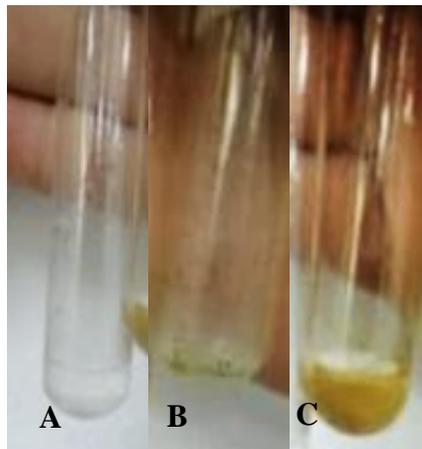


Figura 55. Prueba de Saponinas. A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto butanólico.

Prueba para lignanos (fenilpropanoides)

Para nuestros tres ensayos con respecto a la prueba de lignanos, se observaron colores amarillo, rojo e incoloro, lo que nos indica que no hay presencia de fenilpropanoides (Figura 56).

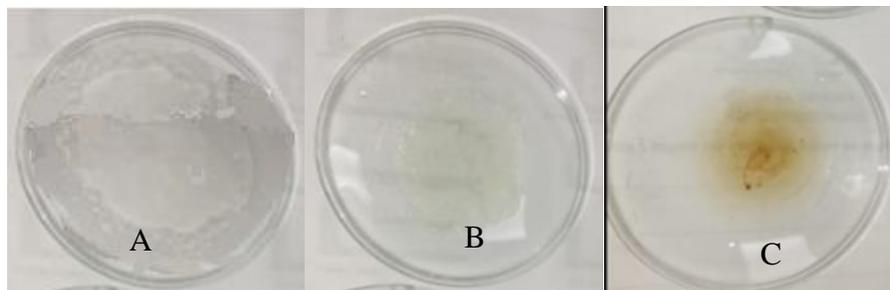


Figura 56. Prueba de Arnow. A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico y C) extracto Butanólico.

Al término de las pruebas cualitativas para determinar la presencia de metabolitos secundarios en los tres extractos de la *Vitis tiliifolia*, los ensayos indicaron la presencia de alcaloides, terpenos y/o esteroides, cumarinas, polifenoles y/o taninos (Tabla 7) en donde se observó, que en los diferentes extractos la presencia de metabolitos variaba de acuerdo a su abundancia y escasez, estos criterios se pudieron determinar gracias a la intensidad con la que se expresaba la coloración que determinaba la positividad de la prueba.

Tabla 7. Pruebas cualitativas para los tres extractos

| Tipo de Metabolito | Prueba | Extracto | Resultado | |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------|------------------|-----|
| Flavonoides | Shinoda | Hexano | + | |
| | | Butanol | +++ | |
| | | Cloroformo | + | |
| | Prueba con zinc | Hexano | - | |
| | | Butanol | - | |
| | | Cloroformo | - | |
| Polifenoles y Taninos | Cloruro Férrico | Hexano | - | |
| | | Butanol | +++ | |
| | | Clorofórmico | - | |
| Cumarinas | Precipitación y coloración. | Hexano | ++ | |
| | | Butanol | - | |
| | | Cloroformo | ++ | |
| Terpenos y Esteroides | Lieberman-Burchard | Hexano | +++ | |
| | | Butanol | - | |
| | | Cloroformo | ++ | |
| | Salkowski | Hexano | +++ | |
| | | Butanol | +++ | |
| | | Cloroformo | + | |
| | Zlatskis | Hexano | +++ | |
| | | Butanol | + | |
| | | Cloroformo | +++ | |
| | Alcaloides | Drangendorf | Hexano | ++ |
| | | | Butanol | +++ |
| | | | Cloroformo | ++ |
| Mayer | | Hexano | + | |
| | | Butanol | +++ | |
| | | Cloroformo | + | |
| Wagner | | Hexano | + | |
| | | Butanol | +++ | |
| | | Cloroformo | - | |
| Saponinas | Espumas | Hexano | - | |
| | | Butanol | - | |
| | | Cloroformo | - | |
| Lignanós | Precipitación y Coloración. | Hexano | - | |
| | | Butanol | - | |
| | | Cloroformo | - | |

8.2 Identificación y fraccionamiento de los metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de los extractos.

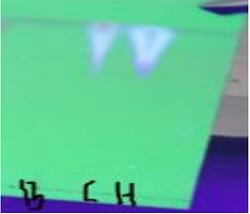
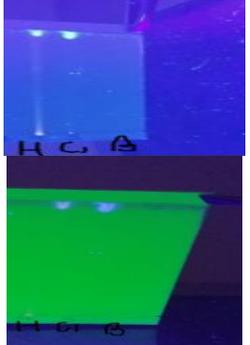
Al término de las pruebas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios, se hizo uso de la cromatografía en capa fina, una técnica muy utilizada para separar e identificar cualitativamente compuestos químicos; con esta técnica, además, se pueden encontrar

compuestos químicos de igual polaridad de acuerdo con el coeficiente de retención (Rf), lo cual no se evidenció en este proyecto. Los extractos se fraccionaron por cromatografía en capa fina utilizando como fases móviles diferentes mezclas de disolventes, haciendo uso de ensayos previos por cromatografía en capa fina revelados con radiación UV para identificar los metabolitos secundarios de cada extracto con la ayuda también de un revelador químico (Tabla 8).

La presencia de compuestos químicos de naturaleza polifenólica (flavonoides, taninos y cumarinas), terpenos y ciertos tipos de alcaloides es importante y relevante para la investigación ya que han demostrado tener efectos positivos para tratar enfermedades crónicas, razón por la cual, los extractos con mayor presencia y abundancia de estos metabolitos fueron hexánico y butanólico. Al terminar el fraccionamiento de los extractos por cromatografía en capa fina preparativa, se obtuvieron 11 fracciones que fueron eluidas con mezclas de disolventes como: acetato de etilo-acetona 1:1.

Para poder elegir la fase móvil que se utilizó para el corrimiento de la placa, fue necesario el empleo de distintas mezclas de disolventes de diferente polaridad. Las placas se asperjaron con reactivos específicos de identificación de metabolitos secundarios (Tabla 8) y por espectroscopia UV a 340-360 nm.

Tabla 8. Reactivos de identificación de metabolitos secundarios

| Metabolito Secundario | Reactivo de identificación | Prueba Positiva | Placa revelada al UV |
|-----------------------|----------------------------|---|--|
| Alcaloides | Vapores de Yodo | Color Violeta |  |
| Terpenos y Esteroides | Lieberman-Burchard | Color Azul-Verdosa y para moléculas más insaturadas color rojo. |  |
| Flavonoides | Vapores Amoniaco | Azul-violáceo |  |

Revelador de alcaloides con yodo

Los alcaloides observados en la placa con vapores de yodo para el extracto hexánico y clorofórmico presentaron cambios de coloración violeta.

Revelador Lieberman-Burchard para terpenos.

Los terpenos observados en la placa asperjada con el revelador de Lieberman-Burchard para el extracto butanólico y hexánico, presentaron cambios de color a rojo o azul en la placa cromatográfica.

Revelador de amoniaco para flavonoides

Para confirmar la ausencia de flavonoides en el Agraz, se realizó la cromatografía de capa delgada con los extractos que se revelaron con vapores de amoniaco. Para el extracto

clorofórmico y butanólico se presentaron manchas de coloración intensa de azul a violeta al UV, indicando muy posiblemente la presencia de flavonoides en las muestras.

Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina del extracto hexánico

La presencia de una sola mancha en la placa indica la existencia de un solo compuesto en los extractos evaluados, por tal razón, se procedió a realizar la separación de los compuestos de cada extracto, a través de la cromatografía de capa delgada a nivel preparativo, el cual consiste en aplicar la muestra en la fase estacionaria para luego ser eluida con un disolvente orgánico (fase móvil). Las franjas fueron reconocidas mediante radiación UV, las cuales fueron raspadas para separar las sustancias de interés para su posterior identificación (Tabla 8).

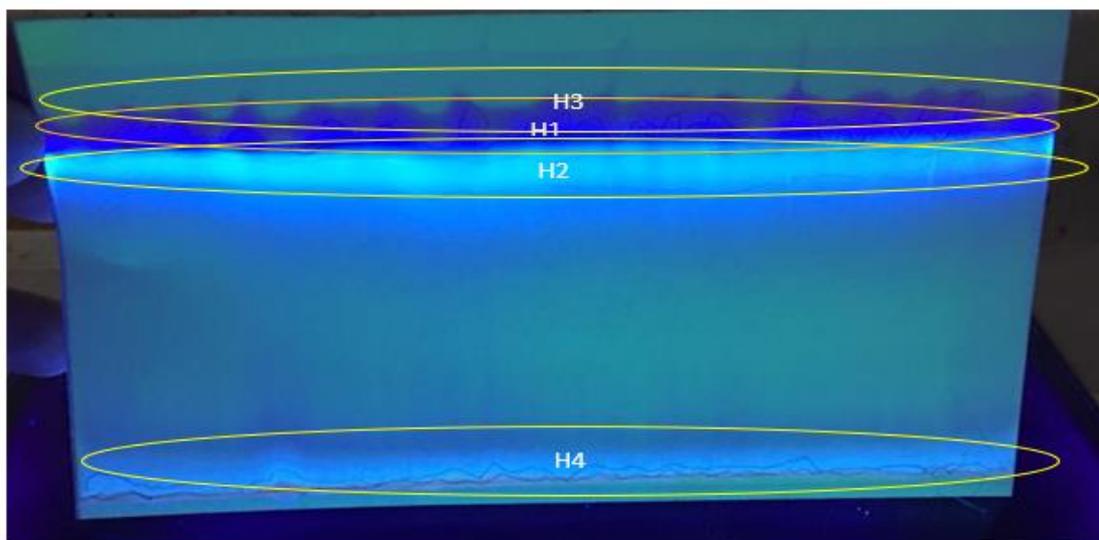


Figura 57. Perfil cromatográfico del extracto hexánico revelado al UV -360nm.

La cromatografía en capa fina preparativa mostró cuatro fracciones, la fracción H3 presentó una franja de color morado, la fracción H1 una coloración azul oscuro intenso, la fracción H2 presentó una coloración amarilla y la fracción H4 un color azul claro intenso (Figura 57).

Identificación de los metabolitos por cromatografía en capa fina preparativa revelados al UV en el extracto butanólico.

Para el extracto butanólico el perfil cromatográfico de capa delgada, mostró cuatro fracciones, la fracción B1 y B2 mostraron una coloración azul claro intenso, la fracción B3 una coloración café o negro y la fracción B4 mostró una coloración morado-violeta (Figura 58). Al comparar las fracciones reveladas al UV con aquellas placas reveladas con los reactivos específicos, se evidenció que la zona teñida de morado puede corresponder a las fracciones B3 enmarcada con azul para terpenos en el Uv.

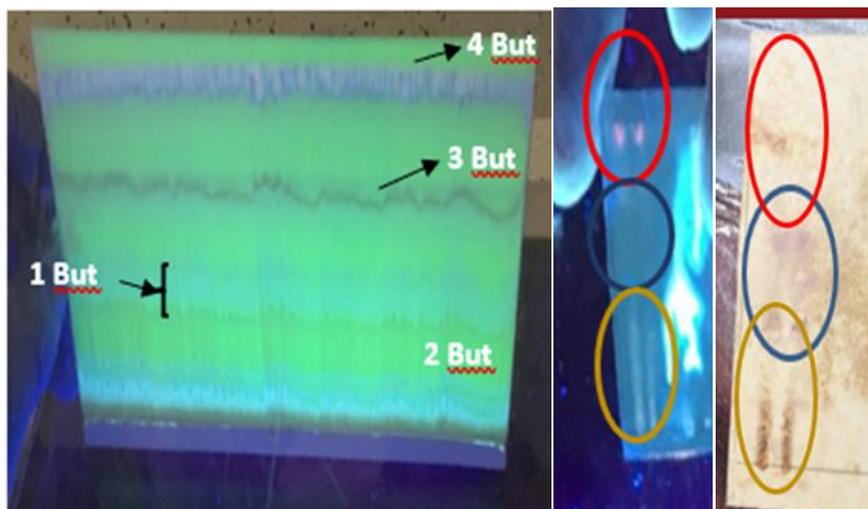


Figura 58. Perfil cromatográfico en el extracto butanólico en comparación de las fracciones obtenidas al UV 360 nm

Identificación de los metabolitos por cromatografía de capa delgada revelados al UV en el extracto clorofórmico.

Al realizar el corrimiento de la placa cromatográfica se obtuvo un perfil cromatográfico con 3 fracciones. La fracción C11 mostró un color café, la fracción C12 una coloración roja-anaranjada y la fracción C13 un color azul violáceo (Figura 59)

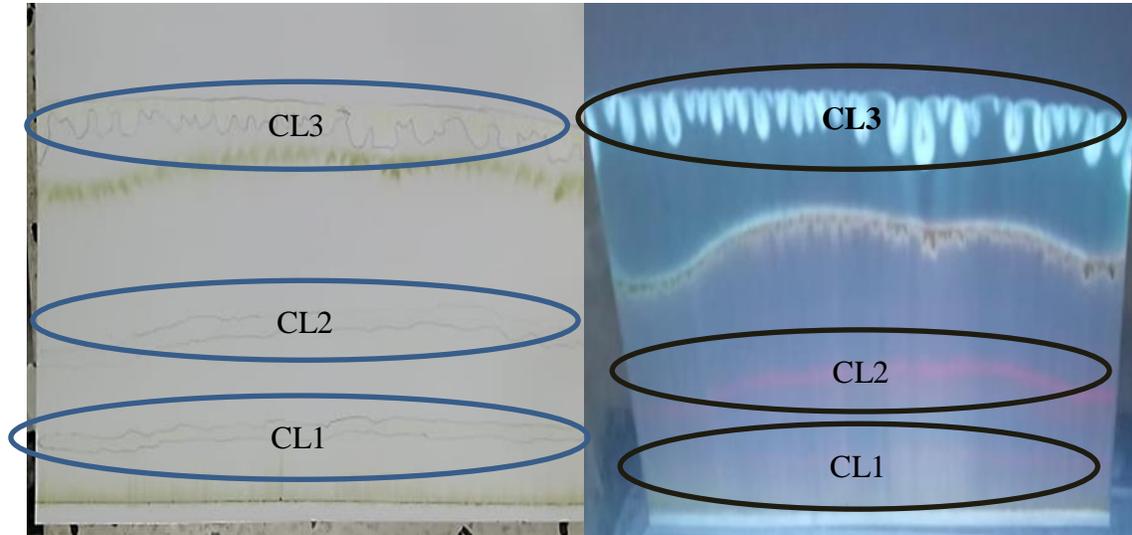


Figura 59. Perfil Cromatográfico en el extracto clorofórmico al ser revelados en UV 360 nm.

El análisis fitoquímico de los extractos del Agraz por cromatografía de capa delgada indica la presencia de metabolitos secundarios como terpenos de tipo lactonas sesquiterpénicas, flavonoides de tipo flavonas, chalconas, catequinas y alcaloides de tipo ergotramina y baldina. Aunque no es confirmatorio la presencia de estos metabolitos en los extractos del Agraz, se procedió a realizar la identificación por espectrofotometría UV-vis ya que las pruebas cualitativas y análisis fitoquímico en cromatografía en capa delgada son pruebas presuntivas para la determinación de sustancias de origen natural. Por tal razón, se recomienda trabajar en conjunto con espectrofotometría UV-Vis y cromatografía en capa delgada para el estudio confirmatorio de estos metabolitos. Cabe resaltar que la familia Vitácea no se caracteriza por la presencia de alcaloides y que además este es el primer estudio fitoquímico realizado a la especie vegetal *Vitis tiliifolia*, sin embargo, las tres pruebas realizadas en este estudio dieron resultados positivos, aunque con formación de precipitados en muy baja cantidad.

8.3 Fraccionamiento cromatográfico y espectroscopia UV

Luego de tener identificados los metabolitos, a través de, las pruebas cualitativas y del perfil cromatográfico (usando reveladores y lámpara de Uv), se procedió con base en estos resultados a separar las fracciones de cada extracto, obteniéndose en total 11 fracciones, las cuales fueron:

Extracto hexánico:

Como se observó en la Tabla 7, en el extracto hexánico se obtuvo presencia de terpenos, flavonoides y alcaloides; al realizar el fraccionamiento cromatográfico se obtuvieron 4 franjas cromatográficas resaltadas en la figura 60A y 60C, estas se muestran en la figura 60B al UV de 360nm y al Uv de 340 nm (figura 60D).

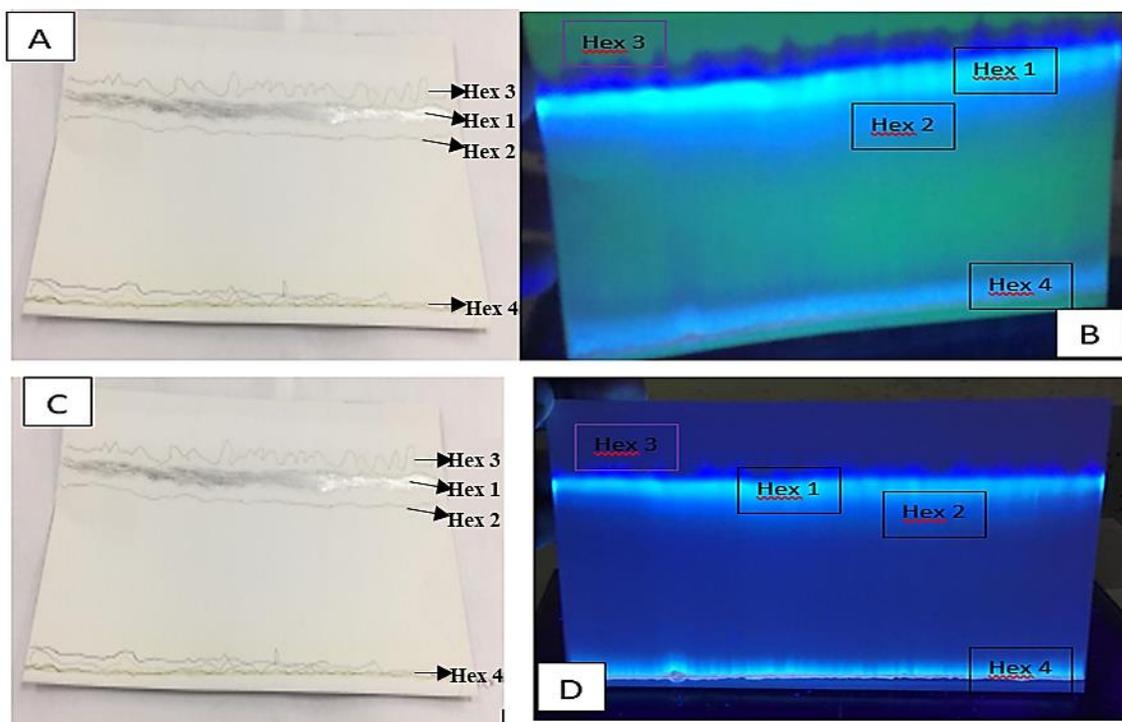


Figura 60. Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico. Selección de las franjas (A y C), franjas en el UV a 360nm (B) y franjas al UV en 340 nm (D)

Al compararse las placas reveladas al UV y con reactivos específicos (Figura 61), se evidencia que las fracciones marcadas como Hex1, Hex2 y Hex3 probablemente están relacionadas con Flavonoides o alcaloides aromáticos.

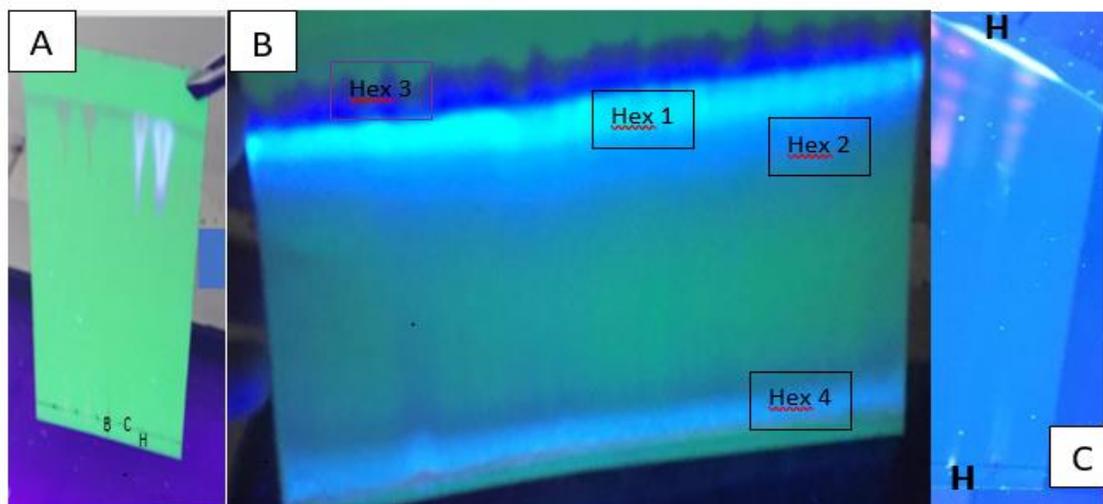


Figura 61. Comparación de las fracciones obtenidas en el UV 360nm (B) con los perfiles cromatográficos para el revelador y UV de alcaloides (A) y para el revelador y UV en flavonoides (C).

Luego se obtuvo el espectro UV-Vis para cada fracción, encontrándose perfiles con picos máximos de absorción característicos de ciertos metabolitos secundarios. Para el caso de los compuestos obtenidos del extracto hexánico (Figura 62), (Figura 63), (Figura 64) y Figura 65, se encontró lo siguiente:

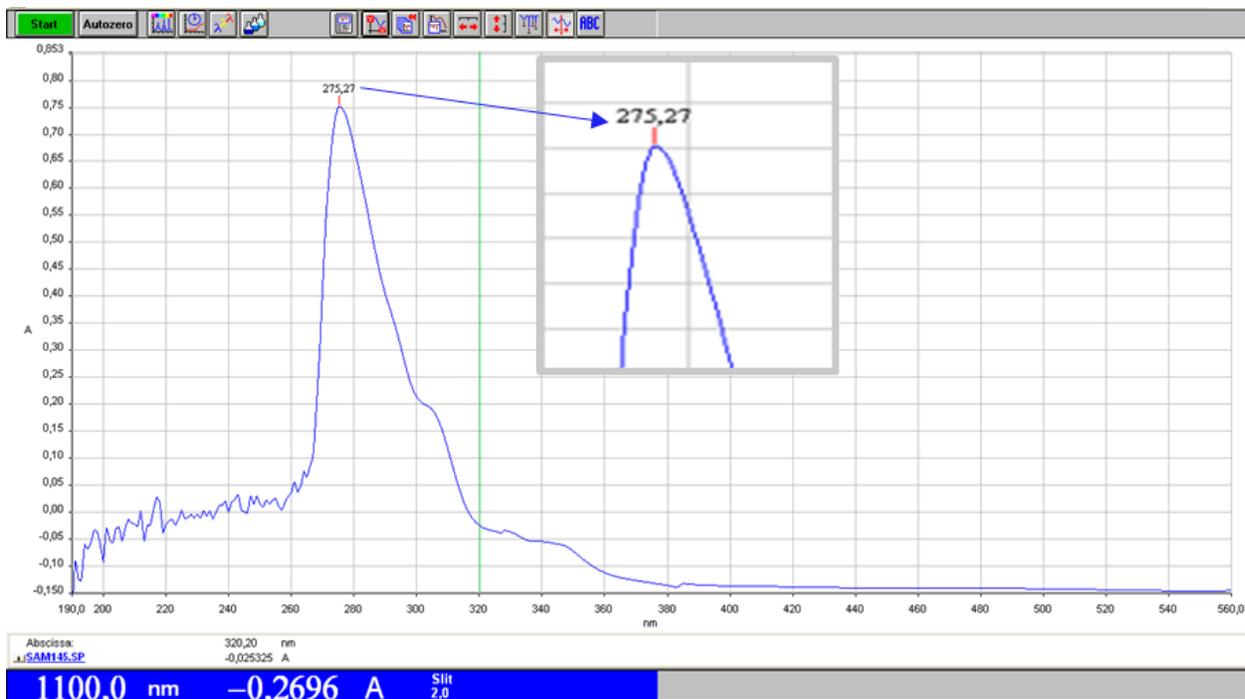


Figura 62. Espectro UV-vis de la muestra Hex1

En el espectro UV para la muestra Hex1 (Figura 62) se identifica un pico máximo de absorción entre los 275 nm con un subpico a los 315 nm, el cuál es característico de flavanonas y flavanonoles, confirmándose así las pruebas cualitativas descritas en la Tabla 7.

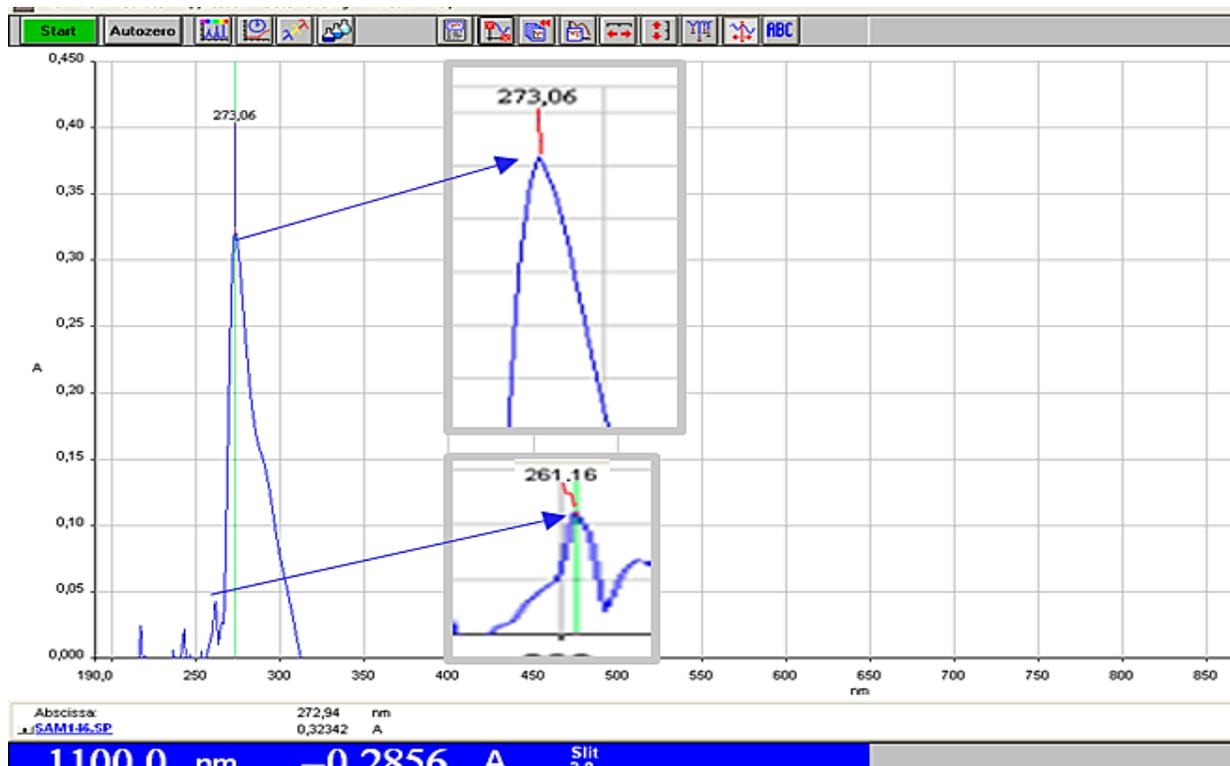


Figura 63. Espectro UV-Vis para la muestra hex2

En el espectro UV-Vis para la fracción Hex2 (Figura 63) se identifica un pico máximo de absorción entre los 270 nm con un subpico notable a los 261 nm, el cuál es característico de flavanonas o isoflavonas, confirmandose así la prueba por cromatografía en capa fina.

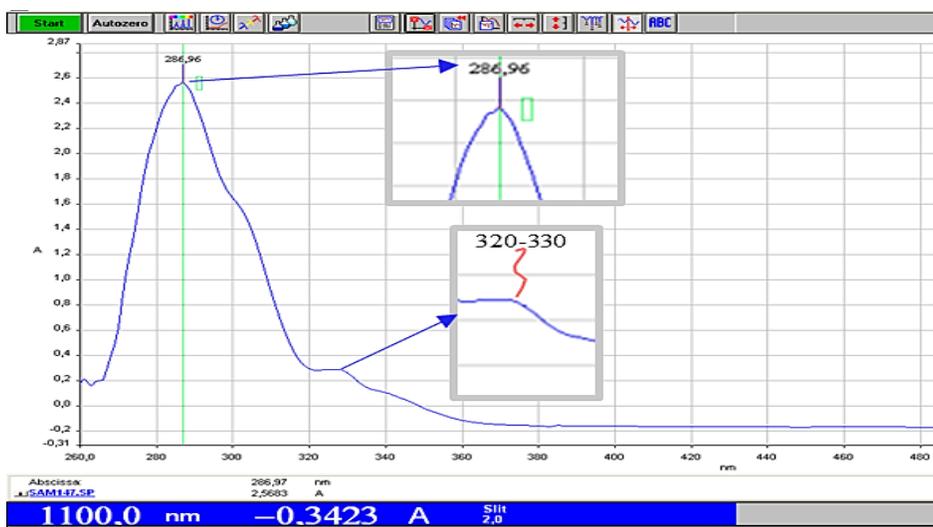


Figura 64. Espectro UV-Vis para la muestra hex3

El espectro UV-Vis para la muestra hex3, mostró (Figura 64) un pico de absorción máxima a 286,97 nm y uno de menor intensidad entre los 320-330 nm, como señales características de flavonoides tipo leucoantocianidina.



Figura 65. Espectro UV-Vis para la muestra hex4

El espectro UV-Vis de la muestra Hex4 (Figura 65) mostró un pico máximo a 275,93nm y otro de menor intensidad a 262 nm, como bandas de absorción características de flavanonas o isoflavonas.

Extracto clorofórmico:

Como se observa en la Tabla 7, en el extracto clorofórmico se identificaron flavonoides, alcaloides, esteroides y cumarinas por pruebas colorimétricas y por cromatografía en capa fina. Para el aislamiento de los compuestos de mayor absorbancia por radiación UV, se hizo empleo de la cromatografía en capa fina a nivel preparativo, por lo tanto, se obtuvieron 3 franjas identificadas al UV a 340 nm (Figura 66B).

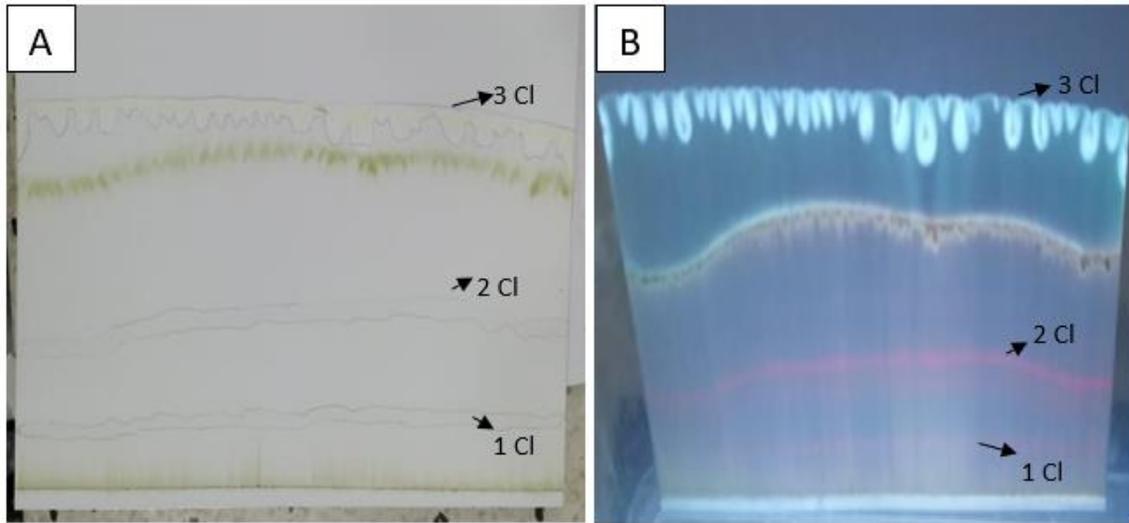


Figura 66. Fraccionamiento cromatográfico del extracto cloroformico. Selección de las franjas (A), franjas al UV en 340 nm (B)

Se compararon las franjas reveladas al UV (1Cl, 2Cl, 3Cl) con las placas reveladas con los reactivos específicos (Figura 67) evidenciándose que la zona marcada como 3Cl podría corresponder a un flavonoide o alcaloide y no a una cumarina, ya que estas presentan fluorescencia amarilla al UV. Los registros de las fracciones separadas del extracto cloroformico por espectroscopia UV (Figuras 68, 69 y 70) permitieron precisar lo siguiente:

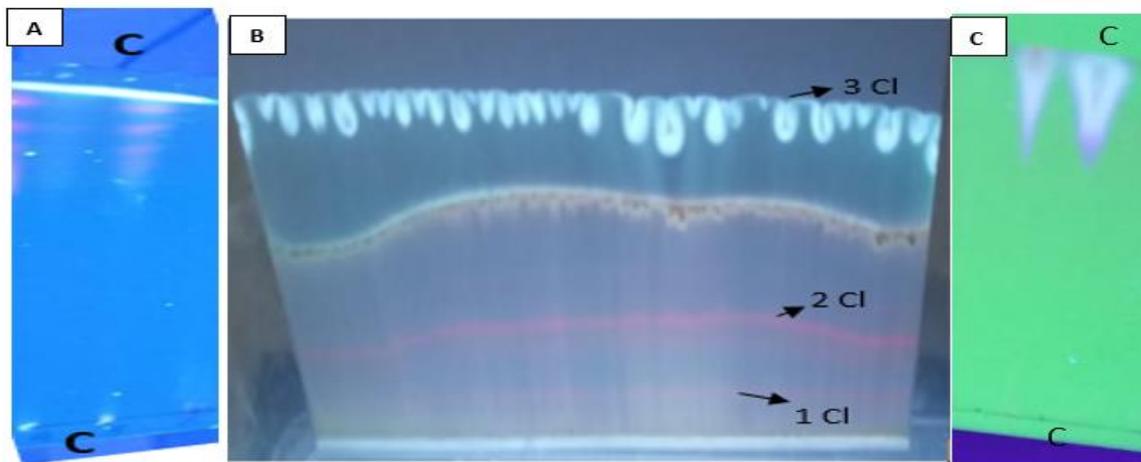


Figura 67. Comparación de las fracciones obtenidas en el UV 340nm (B) perfiles cromatográficos con el revelador y al UV para flavonoides (A) con el revelador y al UV para alcaloides (C).

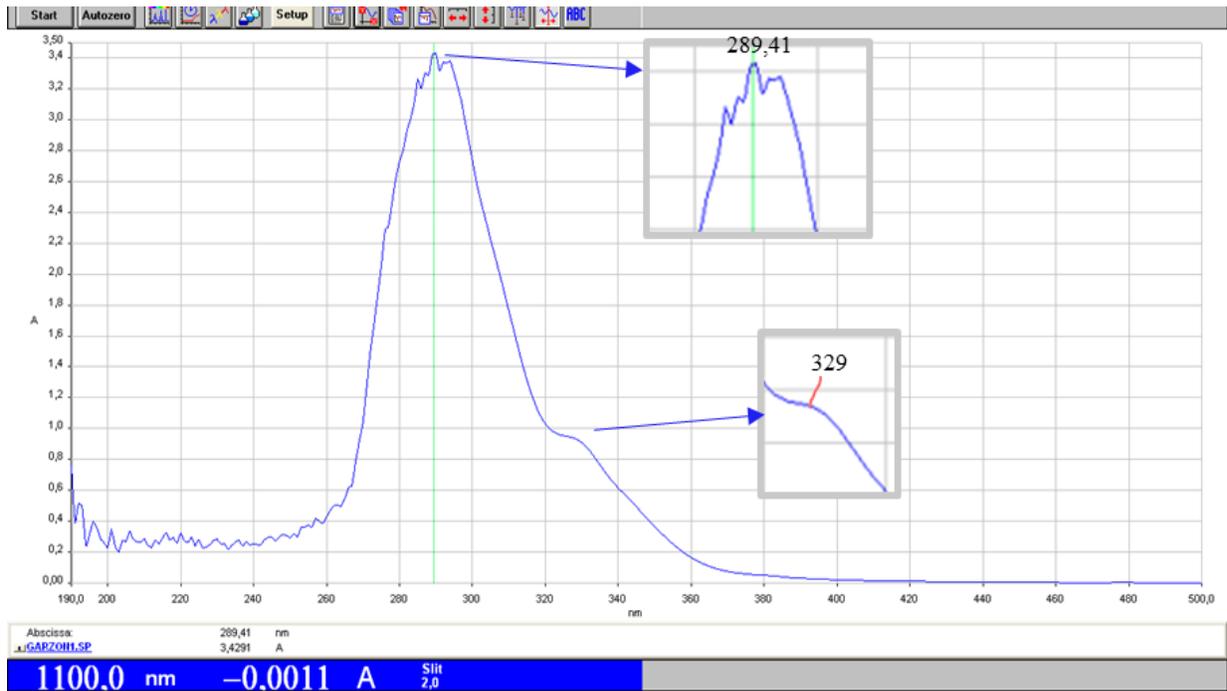


Figura 68. Espectro Uv-Vis de la muestra 1 Cl

En el espectro UV-Vis de la muestra 1Cl se observa un pico máximo en 289,41 nm acompañado de otro en 290 nm; y un pico de menor intensidad a 329 nm (Figura 68) característico de alcaloides de tipo protoberberina.

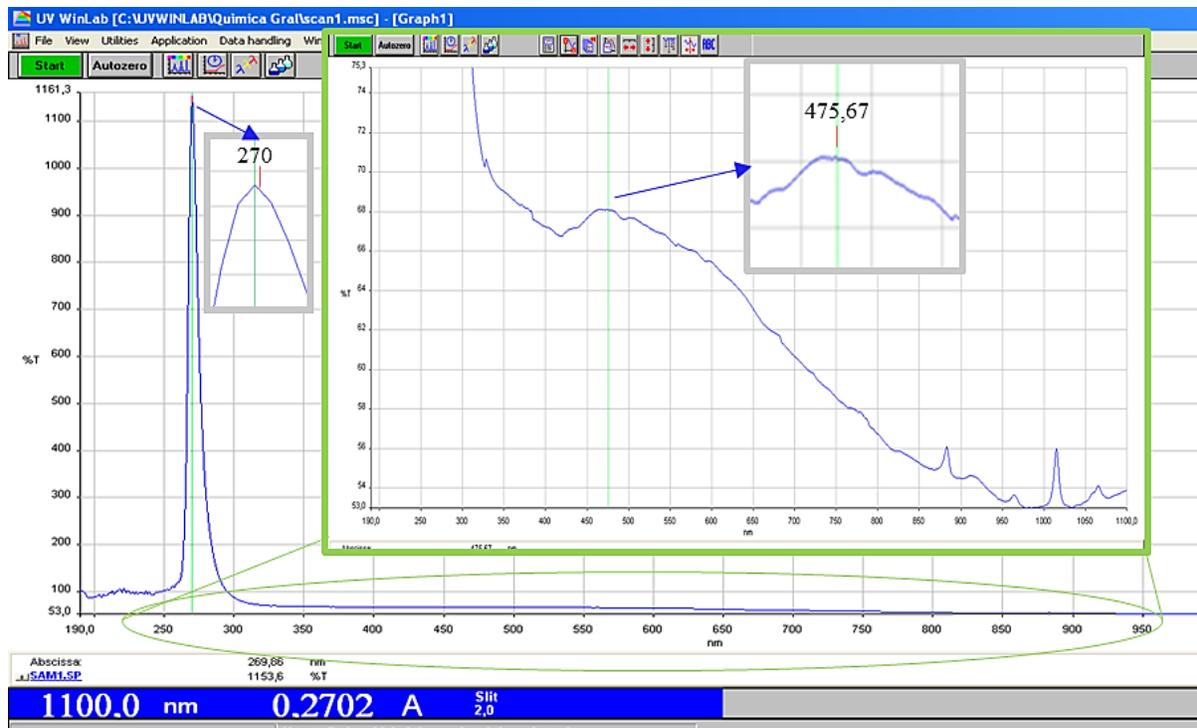


Figura 69. Espectro UV-vis de la muestra 2Cl

En el espectro (Figura 69) UV-Vis de la muestra 2Cl, se evidencia un pico máximo en 270 nm y un pico de menor intensidad a 475,67 nm, correspondientes a flavonas y biflavonas.

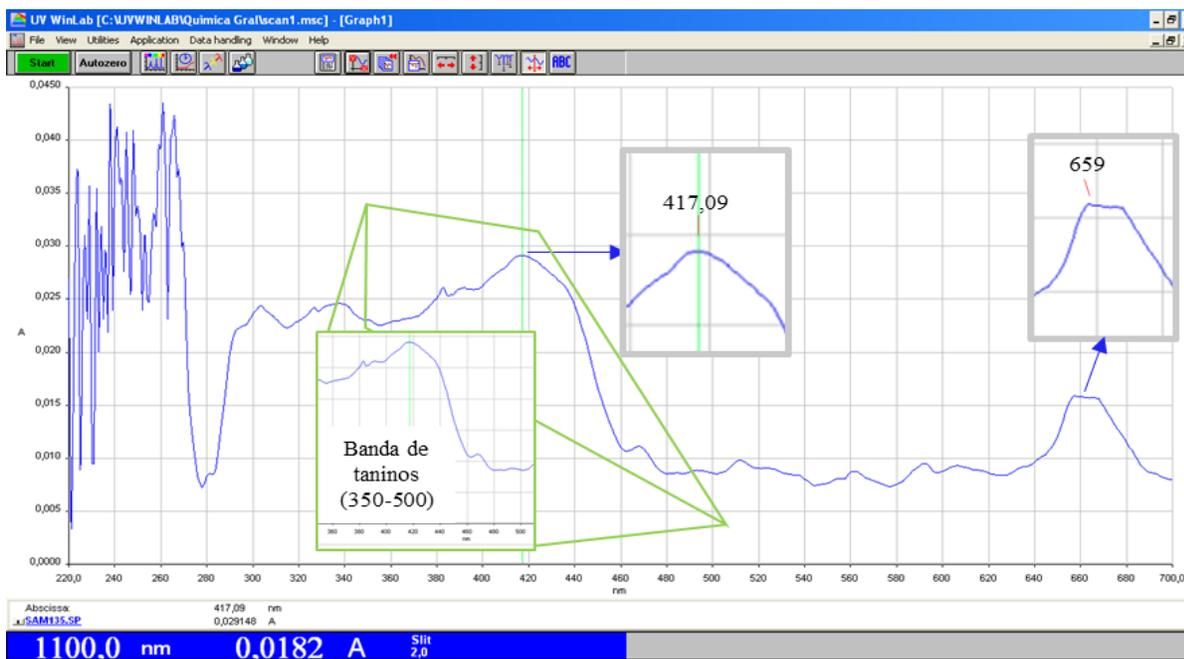


Figura 70. Espectro Uv-Vis de la muestra 3Cl con sus principales bandas señaladas.

En la Figura 70 se muestra el espectro de absorción UV-Vis de la muestra 3Cl, donde se observa una banda de absorción máxima a 417,09 nm, otra banda de absorción entre los 640-680 nm y un pico casi no notable entre los 300- 1000 nm. En este caso particular, el espectro muestra señales características de taninos, los cuales presentan bandas de absorción entre los 350-500 nm, de carácter continuo.

Extracto butanólico:

Como se observa en la Tabla 7, las pruebas cualitativas de tubo de ensayo y por cromatografía en capa fina, permitieron determinar la presencia de alcaloides, taninos y terpenos en el extracto butanólico. Los metabolitos que fueron identificados con la radiación UV-Vis se separaron mediante la técnica de cromatografía en capa fina a nivel preparativo. Para este fin, se obtuvieron 4 franjas cromatográficas (1But, 2But, 3But y 4But) las cuales fueron identificadas a 360 nm (Figura 71A y 71B).

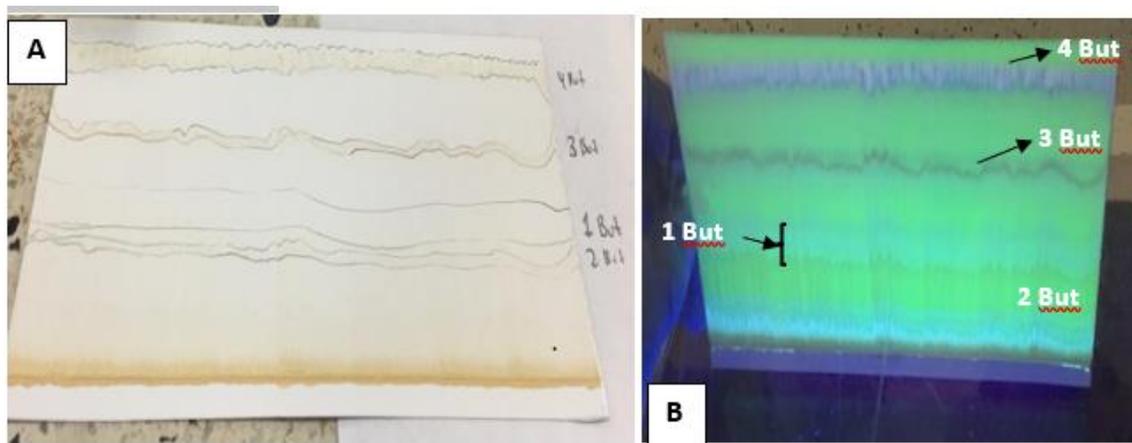


Figura 71. Fraccionamiento cromatográfico del Extracto Butanólico. Delineación de las franjas (A) y franjas al UV a 360 nm (B)

Los compuestos obtenidos de cada franja fueron identificados mediante espectroscopia UV-Vis. El espectro de la muestra 1But (Figura 72) muestra un pico máximo de absorción a los

288 nm, un pico entre 300 – 350 nm y otro entre 350 nm y 400 nm. Este espectro muestra señales características a las presentadas en un espectro de un triterpeno.

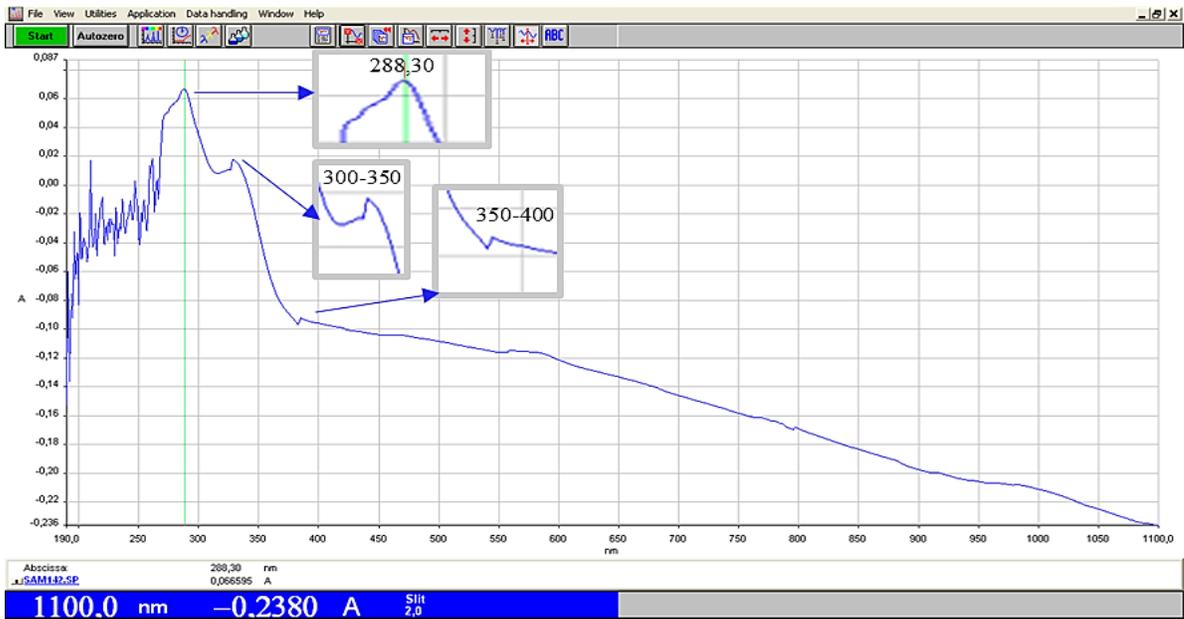


Figura 72. Espectro Uv-vis de la muestra 1But.

En el espectro UV-Vis de la muestra 3But (Figura 73) se identificó un pico máximo de absorción a los 286,90 nm, otro pico entre 320 – 340 nm y otro entre 380 nm - 400 nm. Estas absorciones son similares a las que se presentan en el espectro figura 74, como señales características de alcaloides tipo isoquinolinicos, en especial las protoberberinas, los cuales, según (Arango G. , 2008) tienen espectros ultravioletas relativamente complejos, por encima y debajo de los 300 nm.

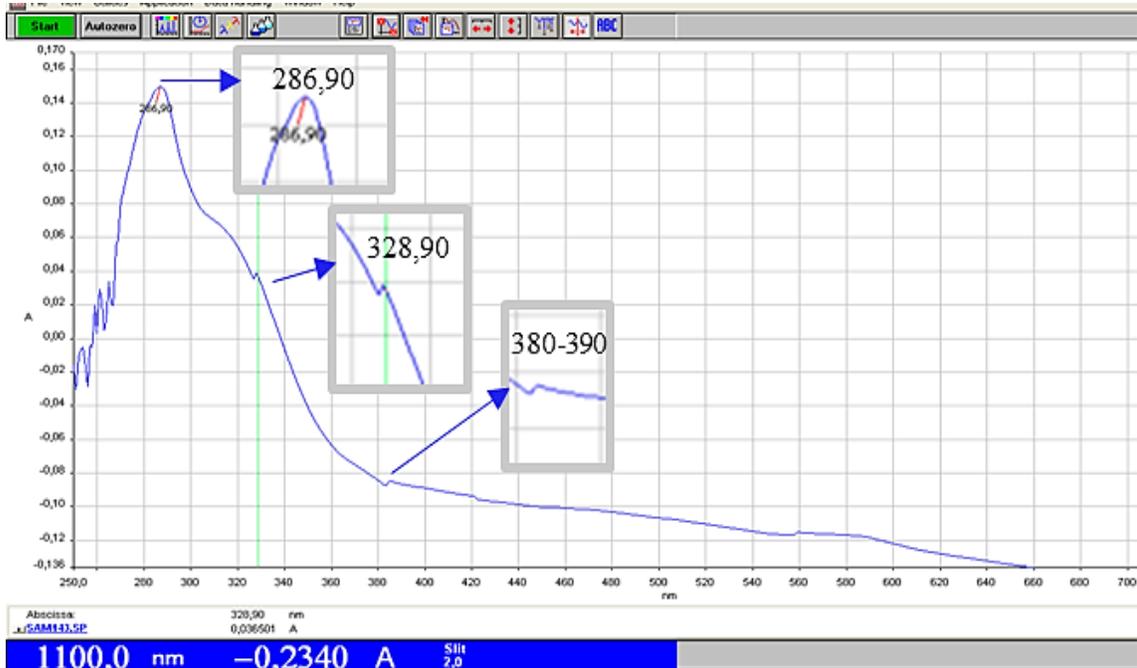


Figura 73. Espectro Uv-vi de la muestra 3But.

En el espectro de la muestra 4But (Figura 74) se identifica un pico máximo de absorción entre los 285,99 nm, un subpico entre 300 – 350 nm y otro entre 350 nm y 400 nm, como señales características de alcaloides tipo isoquinolinicos.



Figura 74. Espectro UV-Vis de la muestra 4 But.

Los resultados obtenidos del fraccionamiento cromatográfico se resumen en la Tabla 9, donde se describen los tipos de metabolitos identificados según el espectro UV-vis de cada muestra obtenida de los tres extractos de la *Vitis tiliifolia*, los cuales se describen a continuación.

Tabla 9. Tipos de metabolitos identificados según los picos de absorción de los espectros UV-Vis

| Extracto | Fracción | Picos de Absorción | Tipo de Metabolito |
|---------------------|--|--|---|
| Hexánico | Hex 1 | Máx= 275 nm / subpico= 315 nm | Flavanonas y Flavanoles |
| | Hex 2 | Máx= 270 nm/ subpico=261 nm | Flavanonas Isoflavonas |
| | Hex 3 | Máx=268,97 nm/ Subpico= 320-330 nm | Leucoantocianidina |
| | Hex 4 | Máx=275,93 nm / Subpico=262 nm | Flavanonas Isoflavonas |
| Clorofórmico | Cl 1. Pt Fusión 265-292 | Máx= 289,41 nm Subpico= 329 nm | Alcaloide isoquinolinico (protoberberinas) |
| | Cl 2 | Máx= 270 nm Subpico= 475, 67 nm | Flavonas y Biflavonas |
| | Cl 3 Pt fusión 170-180 | Máx= 417,09 nm, con gran cubrimiento entre 300-420 nm Banda= 640-680 nm | Taninos |
| Butanólico | 1 but Pt fusión 162-190 | Máx= 288 nm Subpico 1 = 300-350 nm Subpico 2= 350-400 nm | Triterpeno |
| | 2 but | No hay espectro | |
| | 3 but | Máx= 268,9 nm Subpico 1= 320-340 Subpico 2= 380-400 | Alcaloide isoquinolinico (protoberberinas) |
| | 4 but | Máx= 285,99 nm Subpico=220-250 Subpico 2= 350-400 nm | Alcaloide isoquinolinico (protoberberinas) |

8.4 Determinación de la Citotoxicidad de los extractos con *Artemia salina*.

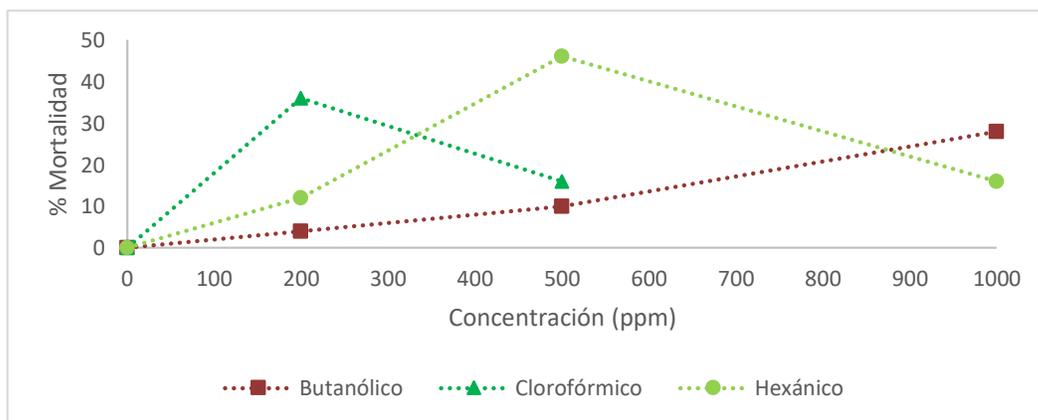
Para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de los extractos hexánico, clorofórmico y butanólico de *V. tiliifolia* frente a *A. salina*, se empleó el análisis Probit por medio de Excell, teniendo en cuenta que las pruebas se realizaron por quintuplicado para cada una de las concentraciones del extracto (Anexo 1). En la tabla 10 se evidencian los resultados

obtenidos en cuanto al % de mortalidad de los crustáceos con respecto a la concentración del extracto.

Tabla 10. % de Mortalidad para cada extracto con respecto a la concentración de extracto de *V. tiliifolia*

| Extracto | Concentración (ppm) | % Mortalidad |
|--------------|---------------------|--------------|
| Butanólico | 200 | 4 |
| | 500 | 10 |
| | 1000 | 28 |
| Hexánico | 200 | 36 |
| | 500 | 16 |
| | 1000 | 16 |
| Clorofórmico | 200 | 12 |
| | 500 | 46 |
| | 1000 | 16 |

Para el extracto Butanólico se obtuvieron los porcentajes de 4%, 10% y 28% a 200, 500 y 1000 ppm, respectivamente. Para el extracto clorofórmico, se obtuvieron los porcentajes de 36% (200 ppm) y 16% (500 ppm) y para el extracto hexánico de 12% (200 ppm), 46% (500 ppm) y 16% (1000 ppm). Los valores más altos de porcentaje de mortalidad fueron el del extracto clorofórmico a 200ppm y el Hexánico a 500 ppm. En la gráfica 1 se presenta la relación lineal entre el porcentaje de mortalidad de *A. salina* frente a las concentraciones de los extractos de *V. tiliifolia* a las 24 horas de exposición.

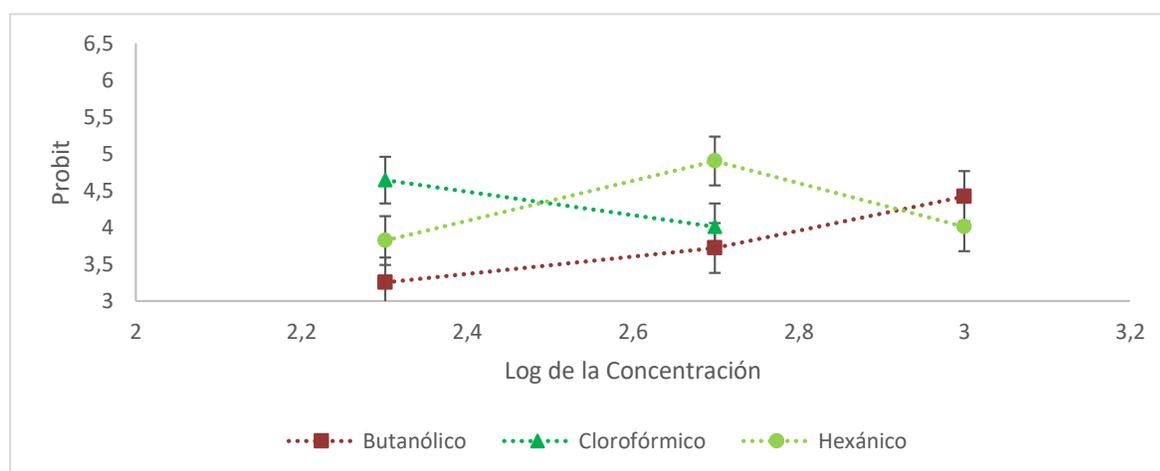


Gráfica 1. Porcentaje de mortalidad de *A. salina* en función de la concentración de los extractos de *V. tiliifolia*.

De igual manera, por medio de los datos obtenidos fue posible determinar el logaritmo de las concentraciones y el respectivo Probit según el porcentaje de mortalidad, construyendo la tabla 11; gracias a este análisis se originó la gráfica que relaciona el número Probit conseguido frente al logaritmo de las concentraciones, tal como se evidencia en la Gráfica 2. Según (Castañeda, *et al.*, 2018) cada relación lineal obtenida genera su respectiva ecuación de la recta, así, se destaca lo planteado por (Molina, *et al.*, 2010) donde por medio de las pendientes de las rectas generadas, se resuelve la ecuación para $y=0,5$ (CL_{50}) y cuyo resultado se aplica el respectivo antilogaritmo, de esta manera se obtiene las concentraciones letales medias para los tres extractos evaluados mediante el empleo de Microsoft Excell (Anexo 2).

Tabla 11. Datos obtenidos de la concentración y el % de mortalidad del extracto.

| Extracto | Concentración (ppm) | Log 10 (Concentración) | % Promedio Muerte | Probit |
|---------------------|---------------------|------------------------|-------------------|--------|
| Butanólico | 200 | 2,30103 | 4 | 3,25 |
| | 500 | 2,69897 | 10 | 3,72 |
| | 1000 | 3 | 28 | 4,42 |
| Clorofórmico | 200 | 2,30103 | 36 | 4,64 |
| | 500 | 2,69897 | 16 | 4,01 |
| Hexánico | 200 | 2,30103 | 12 | 3,82 |
| | 500 | 2,69897 | 46 | 4,90 |
| | 1000 | 3 | 16 | 4,01 |



Gráfica 2. Relación lineal entre el valor Probit en función de los Logaritmos de las concentraciones de los extractos de *V. tiliifolia*

Con base en la regresión realizada con los datos de la tabla 11, y los cálculos aplicados según (Molina, *et al.*, 2010) se ilustran en la tabla 12 los datos registrados de la Concentración Letal media (CL₅₀), para los tres extractos analizados, contrastándolos también con el índice de Toxicidad para productos biológicos de la CYTED. Con base en estos resultados se evidencia la Inocuidad relativa del extracto Hexánico y Butanólico, pero toxicidad moderada para el extracto clorofórmico, esto es debido a que la concentración letal media para el extracto clorofórmico está entre los 100 a 500 ppm y la de los extractos Butanólico y Hexánico es mayor a los 1500 ppm. (CL₅₀ >1500_{ppm}).

Tabla 12. Toxicidad de los Extractos según los criterios de CYTED

| Extracto | CL ₅₀ (ppm) | Grado de Toxicidad |
|--------------|---------------------------|----------------------|
| Hexánico | 35481,3 | Relativamente Inocuo |
| Clorofórmico | 120,2 | Moderadamente Tóxico |
| Butanólico | 2511,9 | Relativamente Inocuo |

Por lo tanto, se puede concluir que los extractos del fruto de la planta *Vitis tiliifolia* presentan baja toxicidad frente a los nauplios de *Artemia salina*, mostrando ser un producto natural inocuo frente a los crustáceos. Se recomienda, que los extractos sean evaluados frente a organismos de mayor complejidad para determinar el grado de toxicidad del Agrad y fortalecer los hallazgos sobre la bioseguridad de esta especie como medicinal.

9. Discusión

9.1 Tamizaje preliminar para la identificación de metabolitos secundarios

Prueba para flavonoides

Teniendo en cuenta el ensayo para determinar la presencia de flavonoides en los extractos: hexánico clorofórmico y butanólico (Figura 46), se encontró una prueba no confirmativa para estos; los flavonoides son metabolitos secundarios polifenólicos que tienen en su estructura un grupo acetona que normalmente en pruebas colorimétricas dan una coloración amarilla, de ahí

proviene su nombre. Así mismo, para su identificación se requiere de la realización de la prueba Shinoda, que consiste en una prueba específica para flavonoides, dado que este tipo de compuestos reaccionan en presencia de HCl. Por tal razón, el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de la benzopirona reacciona con el Mg^{+2} induciendo la formación de dienos, los cuales determinan la creación del ion flavilio (molécula que expresa el color rojizo característico de esta reacción) (Figura 75) (Montealegre P., 2011).

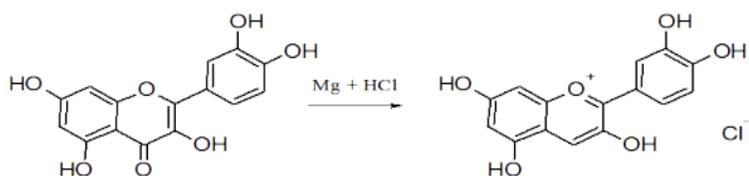


Figura 75. Reacción de la Prueba de Shinoda (Durango, 2014).

Prueba para polifenoles y taninos:

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la prueba de taninos (Figura 47), los taninos son metabolitos secundarios polifenólicos con masa relativamente elevada y se hidrolizan por la acción de los ácidos, bases o enzimas en un azúcar, por lo que se pueden clasificar dependiendo del ácido utilizado, galo taninos (ácido gálico) y elagitaninos (ácido elagico). Se conoce que no precipitan con soluciones de bromo y que al reaccionar con $FeCl_3$ dan una coloración azul. La prueba de cloruro férrico es útil para reconocer fenoles, los taninos reaccionan con el cloruro férrico (Figura 76) causando un cambio de coloración azul (para taninos derivados del ácido gálico) o verde (para taninos derivados del ácido protocatequico) (Pinzon M., 2011).

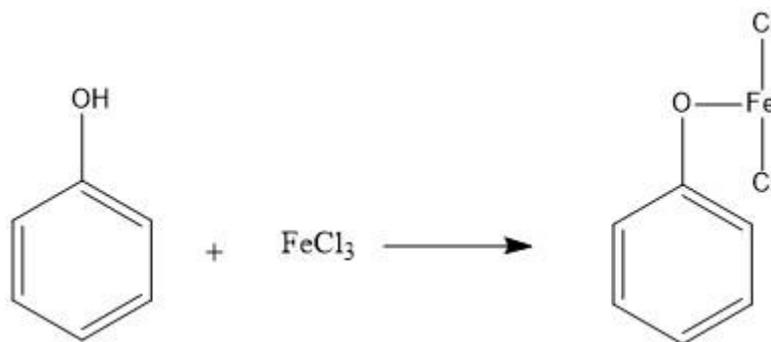


Figura 76. Reacción de la Prueba de Cloruro Férrico (Durango, 2014).

Prueba para cumarinas

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 48, las cumarinas son compuestos los cuales contienen en su estructura química lactonas y furanos, gracias a la presencia de estos últimos se puede determinar este tipo de metabolitos mediante la prueba de precipitación y coloración, o mediante la reacción de NaOH que detecta también las cumarinas, dado que, las lactonas que componen este tipo de metabolitos, se pueden disolver en medios alcalinos (Figura 77) y de esta forma, exhiben una fuerte fluorescencia azul o verde al ser irradiado con luz ultravioleta, propiedad que se aprovecha para su detección (Carvajal R., *et al.*, 2009).

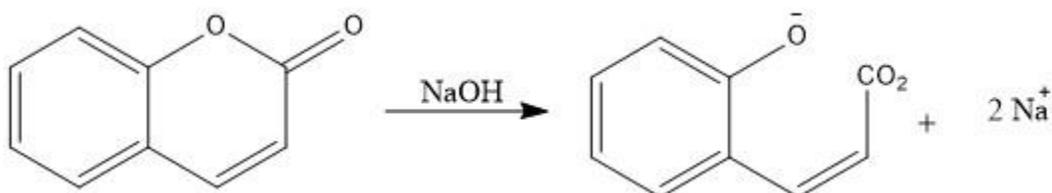


Figura 77. Reacción de la prueba de NaOH (Baca I., *et al.*, 2015).

Prueba para terpenos y esteroides

La reacción de Salkowski cuyos resultados para nuestros extractos se muestran en la figura 49, es una prueba general para identificar esteroides, terpenoides y compuestos con estructuras similares. La reacción consiste en la pérdida del grupo OH que se encuentra sustituyendo el C₃ del anillo adyacente. La pérdida del hidroxilo da paso a la formación de dienos causando un cambio de coloración amarilla o roja. Por otro lado, las moléculas que en su estructura química

tienen un hidroxilo como sustituyente en el C₃ también pueden ser identificadas por este método, dado que el color característico es debido a la formación de dienos que se da al perder el grupo OH. Si el compuesto es una molécula cíclica con bastantes insaturaciones el color de la reacción podría virar a rojo (Figura 78) (Pinzon M., 2011).

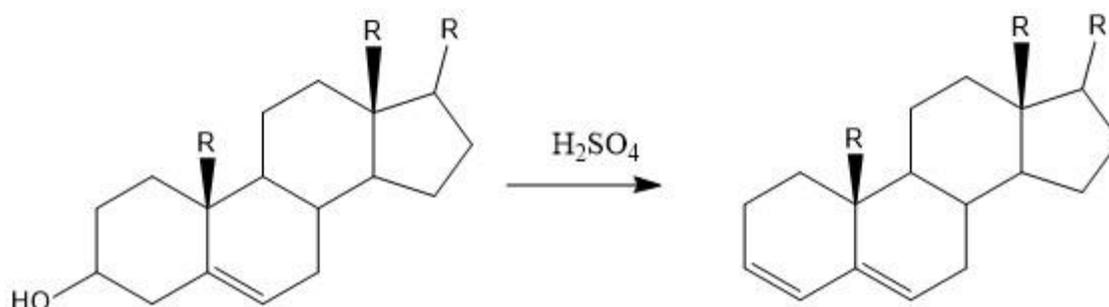


Figura 78. Reacción de la Prueba de Salkowski para esteroides (Durango, 2014).

La prueba de Lieberman-Burchard es una prueba cualitativa que permite identificar compuestos esteroidales, triterpenoides y compuestos con estructuras químicas similares, los resultados para los extractos del agraz están en la figura 50. Aunque su reacción es similar a la del ensayo de Salkowski, esta prueba es mucho más específica dado que en la reacción de Lieberman-Burchard (Anhídrido acético + H₂SO₄) el anhídrido acético crea un complejo con el grupo OH del C₃ aumentando la insaturación del anillo adyacente al hidroxilo. La coloración que expresa el complejo es azul-verdosa, pero, en presencia de moléculas más insaturadas, la prueba desarrolla una coloración roja, tal como sucede con el ergosterol (Figura 79).

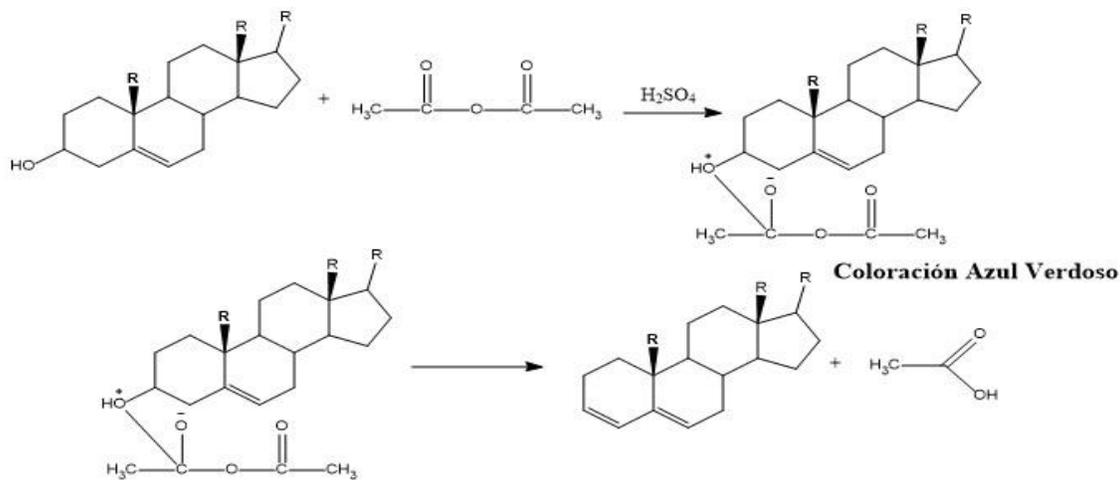


Figura 79. Reacción de la Prueba de Liebermann-Burchard (Durango, 2014).

La prueba de reacción de Zlatkis, Zak y Boyle en la presencia de ácido acético y ácido sulfúrico conduce a la protonación del grupo OH- del colesterol y posterior deshidratación, para dar el ion carbonio 3,5-colestadieno por lo que la coloración de esta prueba para determinar la presencia de colesterol es roja (Figura 80) (Martinez R. , 2014); esto se evidenció en las coloraciones obtenidas con los tres extractos del agraz (figura 51)

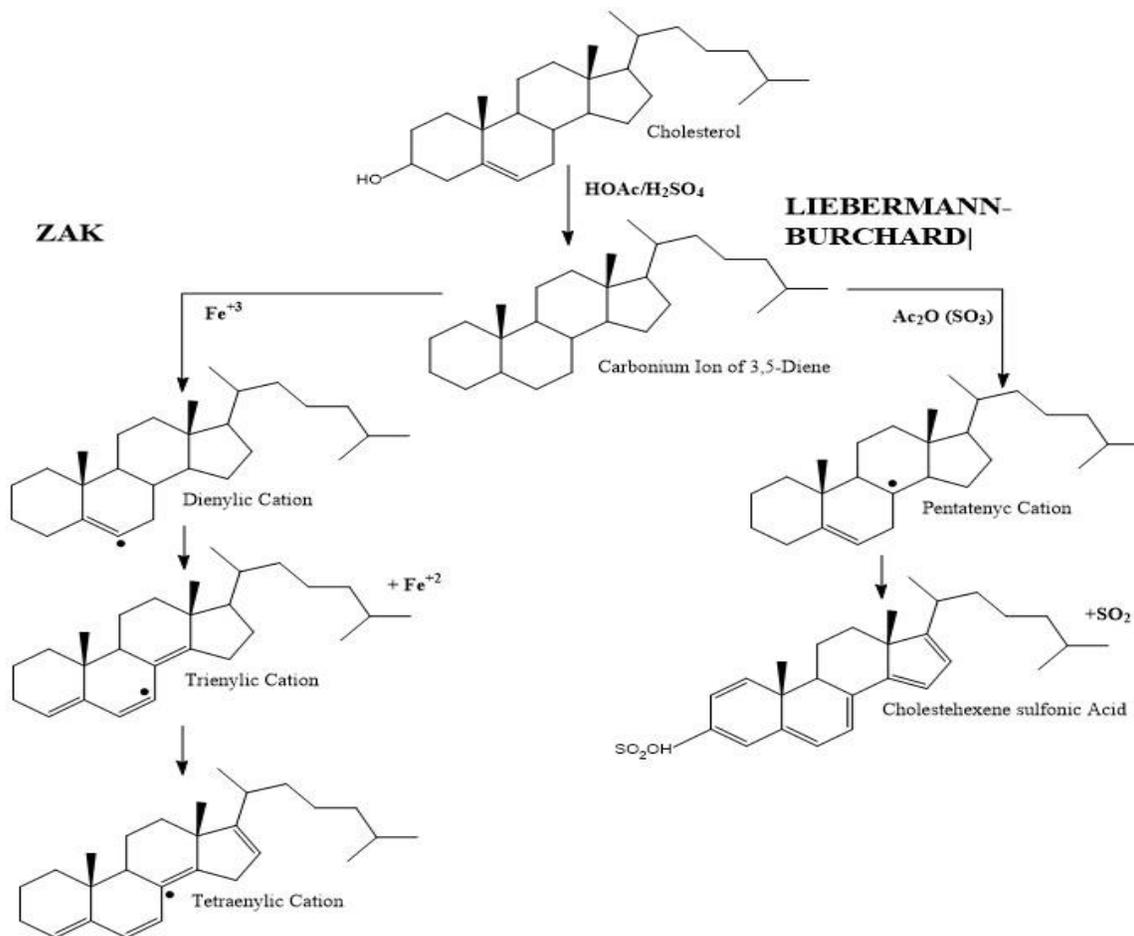


Figura 80. Reacción de Zlatskis (Martinez R. , 2014).

Pruebas para alcaloides

Los alcaloides son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de aminoácidos y se encuentran en las plantas superiores de un ácido orgánico; el análisis es basado en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (Prueba de Mayer) y yoduro de bismuto (Prueba de Drangendorf). Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoniac, ante estos reactivos (Reactivo de Mayer); muchos alcaloides presentes en un material vegetal forman con el bismuto, yoduros dobles insolubles de formula $\text{Bi}_3\text{B HI}$ (Barrera, *et al.*, 2014).

La prueba con el reactivo de Dragendorff se realiza para determinar los alcaloides presentes en los extractos, a través de, la formación de un precipitado naranja, este reactivo contiene yoduro de bismuto potásico, donde al reaccionar el $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ con el ácido clorhídrico y con yoduro de potasio, forma complejos de color naranja, tal como se muestra en la Figura 81, y como se obtuvo en la figura 52.

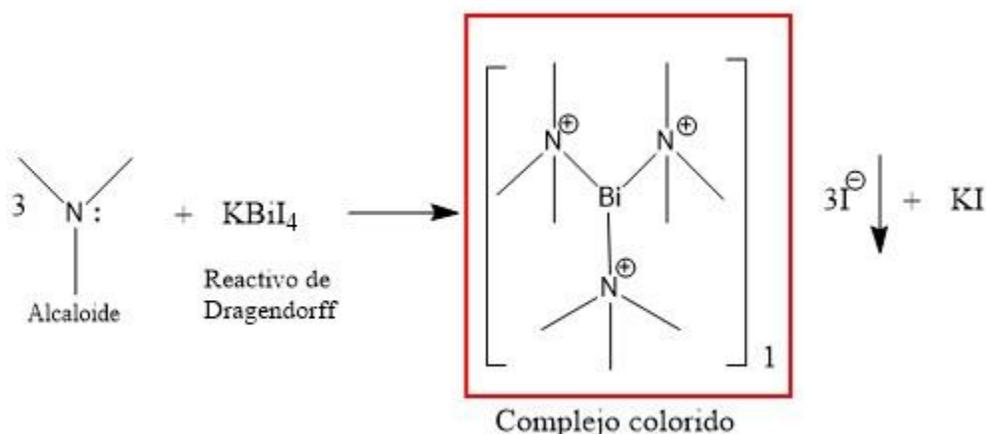


Figura 81. Reacción de Dragendorff para determinación de alcaloides mediante la formación de un precipitado naranja. (Rodríguez, et al., 2012).

El reactivo de Mayer precipita la mayoría de los alcaloides en medio ácido favoreciendo la formación de precipitados cristalinos de color blanco, el cual es soluble en exceso de iones de yoduro dando la formación de un anión complejo incoloro (Figura 82) (Ochoa, et al., 2018), los resultados de los extractos del agraz se evidencian en la Figura 53.

REACCIÓN DE MAYER (Para identificar Alcaloides)

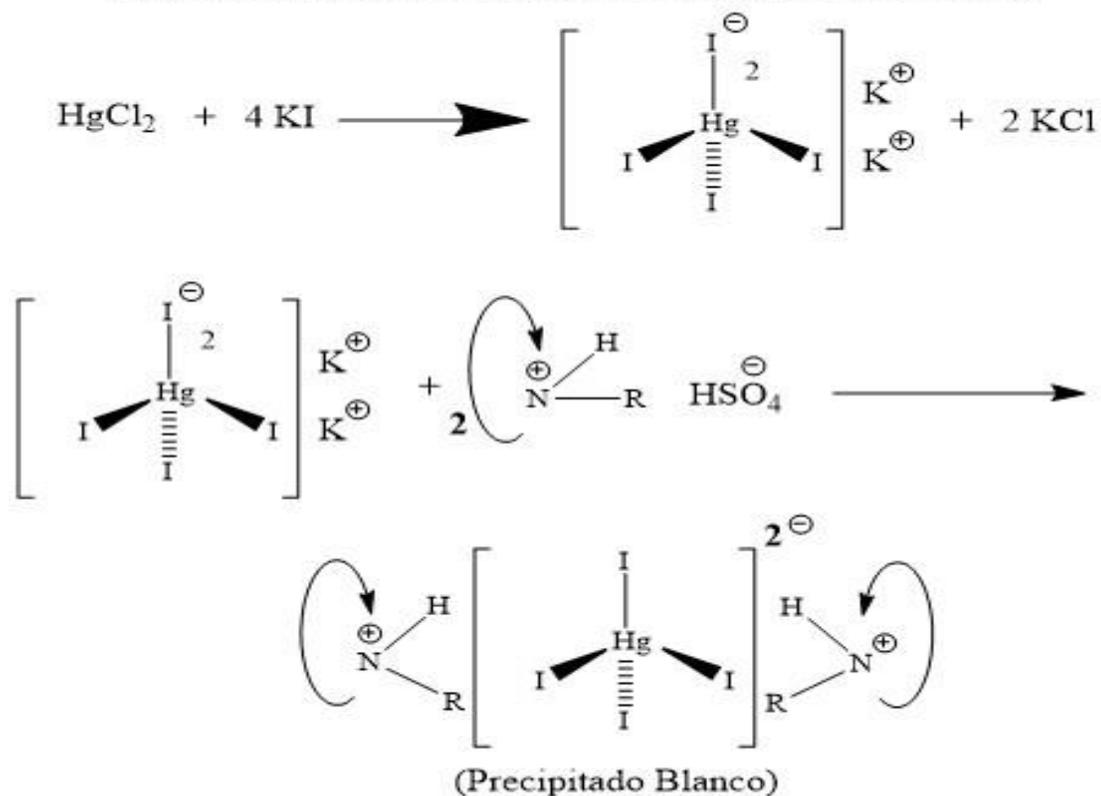


Figura 82. Reacción de precipitación con reactivo de Mayer. (Rodríguez, et al., 2012)

En la reacción de Wagner, se forma un complejo de triyoduro (I_3^-), esto debido a que el yodo (I_2), se comporta como un ácido de Lewis frente al yoduro (I^-), entonces se produce una interacción de $\text{I}_2\text{-I}^-$, en algunos casos se puede formar pentayoduro (I_5^-) y/o heptayoduro (I_7^-), esto depende de la concentración de I_2 respecto al I^- . El anión triyoduro es el que atrae de manera electrostática al alcaloide protonado. Este reactivo es muy sensible y da con los alcaloides, precipitados que varían del color café claro al rojo o pardo oscuro (Figura 83) (Carranza V., et al., 2009), los resultados con los extractos del agraz se evidencian en la figura 54.

REACCIÓN DE WAGNER (Para identificar Alcaloides)

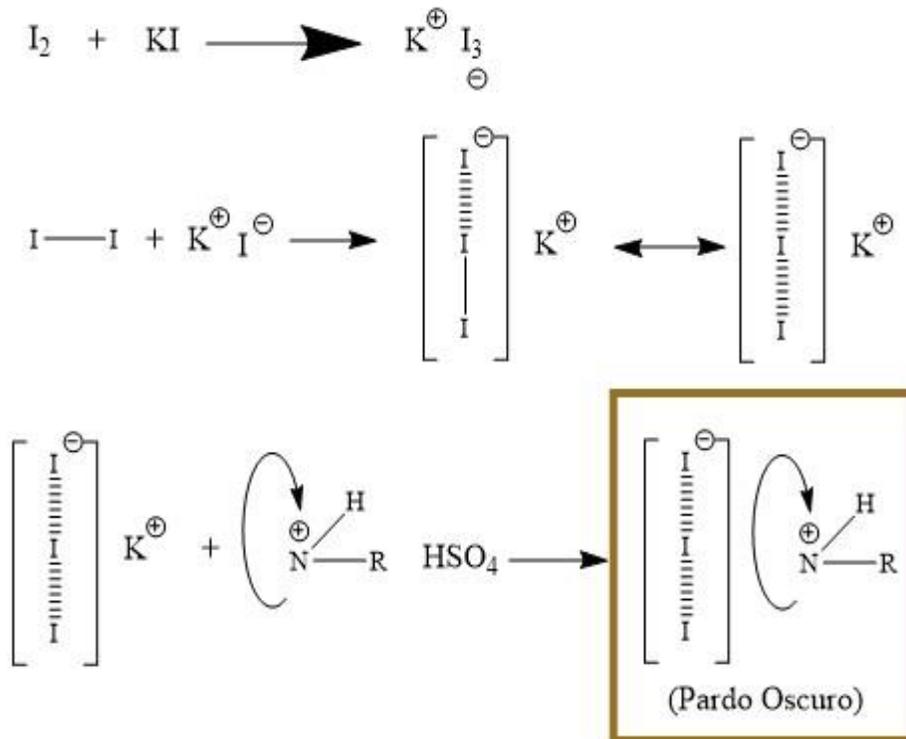


Figura 83. Reacción de Wagner. (Rodríguez, et al., 2012)

Prueba para identificación de saponinas:

A pesar del resultado negativo de la presencia de saponinas en los extractos del agraz (Figura 55), estas son glicósidos esteroidales con un núcleo espirostando, sus estructuras están formadas por una parte glucocídica (Azúcar) y una parte no glucocídica (aglicona) denominada sapogenina. Las unidades de azúcar tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos, además disminuyen la tensión superficial del agua, son por lo tanto tensoactivos naturales (Figura 84) (Carranza V., et al., 2009).

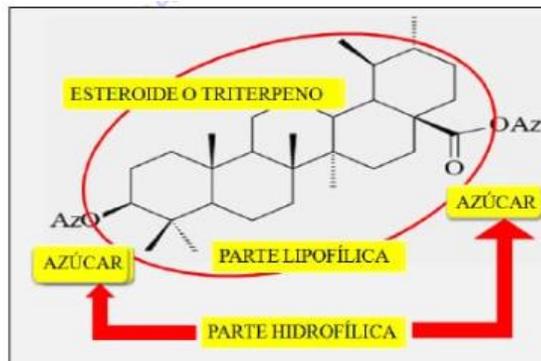


Figura 84. Reacción de espuma para saponinas. (Rodríguez, *et al.*, 2012)

Prueba para lignanos (fenilpropanoides)

Para determinar la presencia de fenilpropanoides se utilizó el reactivo de Arnou, validada por la farmacopea europea, que valora los derivados ortodihidroxicinámicos. El reactivo de Arnou, en presencia de fenilpropanoides, presenta una coloración naranja, y tras la adición de la sosa, se genera un color rosado púrpura, coloración que no se evidenció en los extractos del agraz (Figura 56).

Teniendo en cuenta la Tabla 7 referente a las pruebas colorimétricas, se observó que la composición polifenólica (flavonoides, taninos, cumarinas), terpenos y alcaloides son los que predominan más que el resto de los metabolitos estudiados. A estos compuestos se les ha atribuido infinidad de propiedades, entre ellas como antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos, antifúngicos, entre otros (Middleton, *et al.*, 2000). Por otra parte, se determinó la presencia de terpenos con mayor intensidad en los extractos, estos compuestos poseen diversas propiedades benéficas, como la capacidad para mejorar la función hepática, capacidad para estimular la excreción de ácidos biliares, así como la actividad antimicrobiana, actividad antitumoral, y actividad antiinflamatoria (Lopez, *et al.*, 2012). Ahora cabe resaltar que, según (Lemaire, *et al.*, 1999) los alcaloides oxindólicos pentacíclicos son capaces de inducir la liberación del factor regulador de la proliferación de los linfocitos en células endoteliales

humanas. Parece ser que los alcaloides oxindólicos tetracíclicos actúan sobre el sistema nervioso central, mientras que los pentacíclicos lo hacen sobre el sistema inmunológico; de esta manera, podemos decir que, los alcaloides a pesar de presentar distintas estructuras poseen propiedades fisiológicas que pueden dividirse en dos fundamentalmente, la primera es la acción que tiene sobre el sistema nervioso central como anestésicos evitando el dolor, lo que puede ser tóxico para el ser humano después de abusar de estas y la segunda es que ayuda al sistema inmunológico ayudando a la síntesis de aminoácidos.

9.2 Identificación y fraccionamiento de los metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina de los extractos.

Con base en los resultados mostrados en la tabla 8, cabe mencionar los reactivos utilizados para identificar cada metabolito teniendo en cuenta sus coloraciones características.

Revelador de alcaloides con yodo

(Murillo, *et al.*, 2008) aconseja usar los vapores de yodo en la cromatografía de capa fina para la identificación de alcaloides, los cuales toman una tonalidad de color naranja-marrón característico también de la prueba de Drangendorff

Revelador Lieberman-Burchard para terpenos.

(Murillo, *et al.*, 2008) aconseja usar este revelador para detectar la presencia de terpenos, los cuales presentan manchas de diversos colores (verdes, rojos, rosados, azules, amarillos, etc) en la placa cromatográfica.

Revelador de amoníaco para flavonoides

(Cartaya, *et al.*, 2001) especifica que la localización de los flavonoides en CCF es la misma que en papel: los platos pueden revelarse a la luz ultravioleta (366 nm) con la presencia o ausencia de vapores de amoníaco, las cuales intensifican las coloraciones que pueden ser diversas.

Identificación de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina del extracto

hexánico

Las fracciones cromatográficas para el extracto hexánico se muestran en la figura 57, con base en esto y según (Dominguez X. , 1985), las sesquiterpenolactonas poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono que teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno, y al utilizar como fase móvil mezcla de éter etílico- cloroformo y ácido sulfúrico, al revelarse en rayos UV se observarán colores rojo, verde y negro; contrastando con nuestro perfil cromatográfico la fracción H3 al ser revelada al UV es positivo para terpenos de tipo sesquiterpenolactonas. La fracción H1, H2 y H4 son positivas para flavonoides de tipo catequina y flavononas ya que según (Dominguez X. , 1985), al exponer la placa cromatográfica con luz ultravioleta las flavonas se ven amarillas y las catequinas azul claro; hay que mencionar además que los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado $C_8-C_3-C_5$ y que existen 900 flavonoides naturales que se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libre o como glicósidos; estos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas.

Identificación de los metabolitos por cromatografía en capa fina preparativa revelados al UV en el extracto butanólico.

Para comprender mejor los resultados obtenidos en la figura 58 para el extracto butanólico, según (Dominguez X. , 1985), los terpenos de tipo sesquiterpenolactonas al revelarse en rayos UV se observarán con colores rojo, verde y negro; de acuerdo con esto, la fracción B3 al tener una coloración negra al Uv es positivo para este tipo de metabolito, confirmada en la placa con revelador (Tabla 8).

De igual manera la fracción B1 y B2 mostraron una coloración azul claro intenso, teniendo en cuenta a (Murillo, et al., 2008), esta coloración muy probablemente pertenece a flavonoides de tipo catequina (Dominguez X. , 1985), lo que sucede también con las fracciones H1 y H4 del

extracto hexánico como se mencionó anteriormente. Por último, cabe mencionar que la fracción B4 tomó una coloración de rosa-morado-violeta, lo que muy probablemente pertenece a un alcaloide de tipo Boldina, ya que según (Dominguez X. , 1985) los alcaloides tienen una fluorescencia en el ultravioleta con una longitud de onda de 365 nm, de color azul-violáceo o violeta para ergometrina, dihidroergotamina, ergotamina, ergometrina entre otros, y violeta para boltina; lo que da positivo la fracción B4 para alcaloides. En relación a los alcaloides, estos constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas con acción fisiológica más o menos intensa sobre los seres vivos, los alcaloides aparecen en muy diversas familias de plantas, en las dicotiledóneas se han obtenido unos 3600 alcaloides distribuidos en 24 familias, sin embargo, debemos tener en cuenta que hay muchas familias en las que no se han buscado alcaloides y su estudio puede modificar su catalogación, como ha ocurrido recientemente en orquidáceas, litráceas y elaeocarpaceas, entre otras (Guirado, *et al.*, 2008).

Identificación de los metabolitos por cromatografía de capa delgada revelados al UV en el extracto clorofórmico.

Según (Dominguez X. , 1985) aunque la mayoría de los flavonoides poseen color, cuando están depositados en capa delgada en cantidades de microgramos son casi incoloros, sin embargo, en la luz ultravioleta con longitud de 300 nm puede mostrar manchas amarillo-verdoso de flavonoles, cafés de flavonas, cafés o negros de antocianinas, y fluorescencia amarilla o naranja rojo para chalconas. Estos resultados permiten determinar que el extracto clorofórmico dio positivo para flavonoides de tipo flavonas y chalconas para la fracción CL1 y CL2, respectivamente (Figura 59). Ahora bien, para la fracción CL3 con base en su coloración al UV, muy probablemente según (Dominguez X. , 1985), pertenece a un alcaloide de tipo I como ergometrina, dihidroergotamina, ergometrinina, ergocristinina, cefalina, entre otros, ya que su fluorescencia en el ultravioleta es azul-violáceo.

Teniendo en cuenta el análisis fitoquímico y los resultados de las placas cromatográficas de los tres extractos, (Guirado, *et al.*, 2008) hallaron en 32 especies y 23 cultivares de distintas especies una gran variedad de compuestos de tipo terpenico y aromático; los metabolitos predominantes principalmente en el fruto fueron: benzenoides, flavonoides (cianidinas, epicatequina y proantocianidina) y fenilpropanoides. Además, la distribución geográfica de los estudios indica que el elevado número de especies autóctonas de Latinoamérica no se ha investigado. Estudios realizados por (Carranza, *et al.*, 2016) demuestran el contenido nutricional de otras especies de la familia Vitácea, como un alimento que suministra al organismo grandes cantidades de antioxidantes, que ayudan a eliminar los radicales libres, lo que se traduce en la prevención de enfermedades como el cáncer; además el contenido fenólico en ese estudio invita hacer de este fruto un alimento básico de consumo.

9.3 Fraccionamiento cromatográfico y espectroscopia UV

Extracto hexánico:

Para las fracciones obtenidas del extracto hexánico que fueron identificadas mediante espectroscopia UV-Vis (Figura 62, 63, 64 y 65) se logra determinar que las bandas de absorción en los espectros son características de flavonoides (Arango G. , 2008), en contraste con los espectros observados en la literatura científica para alcaloides, donde las bandas de absorción presentadas en nuestros espectros no son características de esta clase de metabolitos, ya que estos dependen de su estructura, naturaleza, número, tipo y posición de los sustituyentes; en forma general, los alcaloides que tienen átomos con electrones solitarios, dobles o triples enlaces aislados (grupos cromóforos) absorben con cierta intensidad en la región de 150 a 200 nm (ultravioleta lejano); aunque cabe mencionar que esto depende del medio químico, y de los grupos funcionales, los cuales hacen que se corran hacia el UV cercano y el visible.

Extracto clorofórmico:

En las fracciones del extracto clorofórmico, se encontró que el espectro de la fracción C11 (Figura 68) es muy similar a los espectros generados por alcaloides de tipo isoquinoleicos, en especial, las protoberberinas, las cuales, según (Arango G. , 2008) tienen espectros ultravioletas relativamente complejos, por encima y debajo de los 300 nm, un ejemplo del espectro de un alcaloide de tipo protoberberina y su comparación con el obtenido, se muestra en la Figura 85

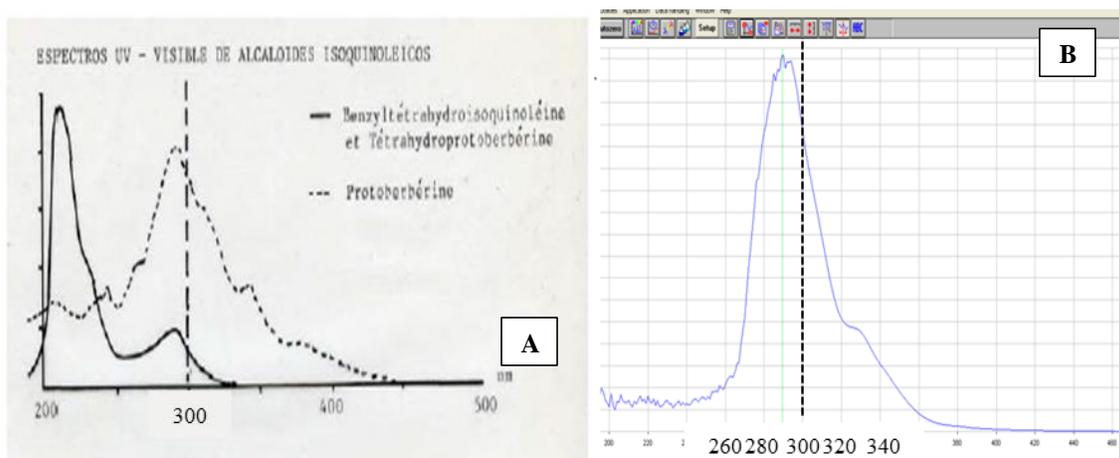
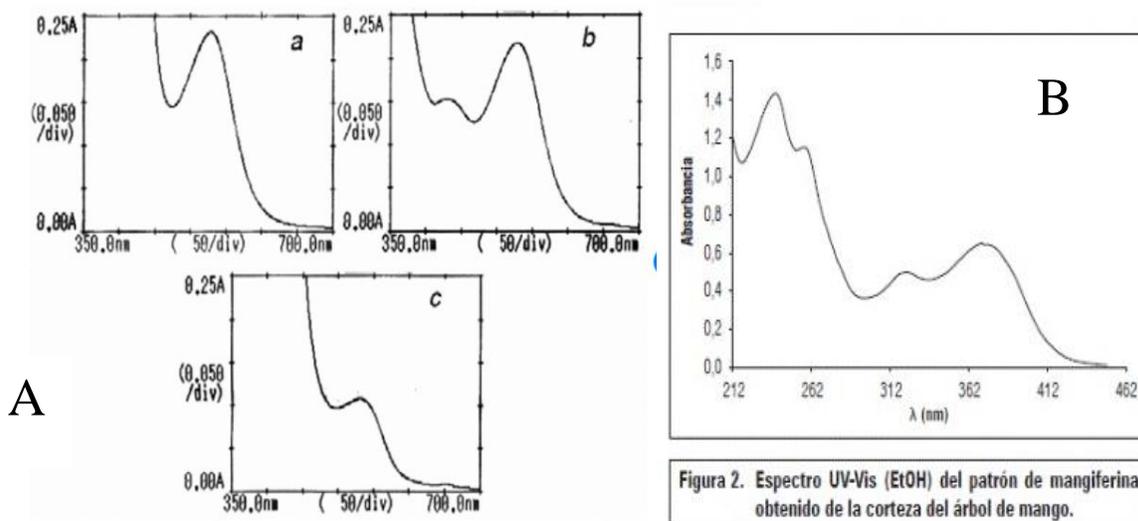


Figura 8585. Espectro teórico de los protoberberinos (A), un tipo de alcaloides (Arango G. , 2008), comparado con el espectro práctico obtenido de la muestra 1 cloroformo (B).

Con respecto al espectro de la fracción C12 (figura 69), según (Dominguez X. , 1985) este tipo de absorciones corresponden a flavonas y biflavonas, las cuales tienen una banda de absorción máxima que va desde los 250-270 nm y un subpico ausente entre 450 y 500 nm.



Comparación entre los espectros UV-vis de mezclas de reacción para taninos condensados en M. coronata.

Figura 2. Espectro UV-Vis (EtOH) del patrón de mangiferina obtenido de la corteza del árbol de mango.

Figura 866. Espectros UV-visibles de algunos taninos condensados (A); y espectro UV-Vis de Mangiferina, un tipo de tanino presente en *Anredera vesicaria*. Tomado de (Isaza, et al., 2007) y (Forero, et al., 2016) respectivamente)

El espectro mostrado en la figura 86, muestra una banda continua con diversos subpicos entre los 300 a 400 nm , la de la muestra C13 (Figura 70) posee un espectro similar, lo que puede significar presencia de este tipo de metabolito; aunque las pruebas cualitativas identificaron presencia negativa de estos, por tal motivo se requiere una confirmación de este espectro por el gran ruido que presenta en la región inferior a los 250 nm (Figura 70), el espectro obtenido en el laboratorio es más cercano o aproximado a la que muestra la Figura 86.B, por las longitudes de onda características lo cual ayuda a suponer que puede ser un tanino de este tipo o un compuesto similar.

Extracto butanólico:

Con respecto a los espectros de las fracciones del extracto butanólico, se evidencian triterpenos para la fracción 1But (Figura 72), el espectro teórico similar se evidencia en la figura 87.

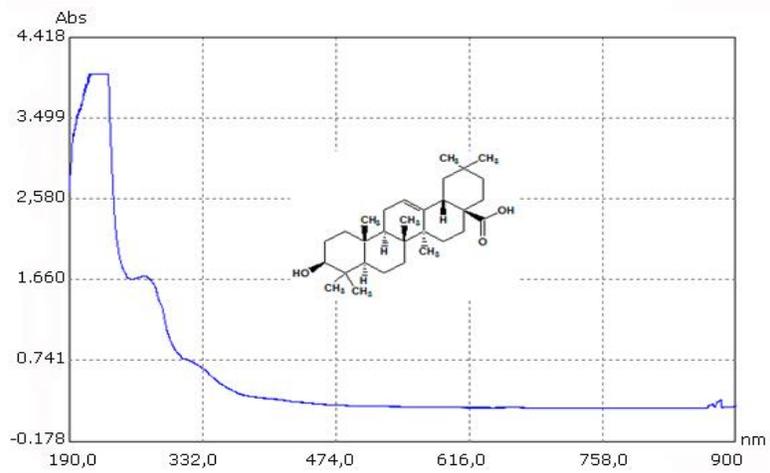


Figura 877. Espectro Uv-vi de un triterpeno aislado del rizoma de *Anredera vesicaria*. Tomada de (De la cruz, et al., 2016)

9. Conclusiones

El análisis fitoquímico mediante pruebas cualitativas y la cromatografía en capa fina, permitió determinar la presencia de sustancias tales como: terpenos, taninos, flavonoides, alcaloides y compuestos esteroidales en los extractos de la *Vitis tiliifolia*. Por lo tanto, el fruto del Agrad se compone de una variedad de compuestos, principalmente aromáticos que podrían ser los responsables de las acciones terapéuticas de esta especie, que ha sido usada de manera tradicional por los pobladores del departamento del Huila.

La técnica de cromatografía en capa fina a nivel preparativo fue efectiva para la separación de cuatro sustancias del extracto hexánico, tres del extracto clorofórmico y cuatro del extracto butanólico que fueron identificados mediante radiación UV y con reactivos específicos. Para aquellas sustancias que se obtuvieron en cantidad apreciable se determinó su punto de fusión.

Mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis se identificó la naturaleza de los compuestos aislados por comparación con espectros teóricos de diversas sustancias que se encuentran en la literatura científica. Por lo tanto, del extracto hexánico se reconocieron flavonoides de tipo flavanonas, flavonoles, isoflavonas y leucoantocianinas, en contraste con el extracto clorofórmico, donde se encontraron alcaloides tipo isoquinolinicos, flavonas, biflavonas y taninos. En el extracto butanólico se identificaron triterpenos y alcaloides isoquinolinicos.

Se determinó la concentración letal media (CL₅₀) para cada extracto de la *Vitis tiliifolia* con los crustáceos de *Artemia salina*. Por lo tanto, para el extracto hexánico se encontró un valor de 35481,3 ppm, mientras que para el extracto clorofórmico fue de 120,2 ppm y 2511 ppm para el extracto butanólico. Estos resultados permiten determinar el bajo potencial tóxico de los frutos del agrad frente a los nauplios, después de 24 horas de exposición a 200, 500 y 1000 ppm de los

extractos hexánico y butanólico y una moderada toxicidad para el extracto clorofórmico. Se sugiere realizar estudios en organismos más complejos para identificar el grado de toxicidad del agraz y la bioseguridad de esta especie como alimento y medicamento.

10. Recomendaciones

Por la gran variedad de compuestos encontrados en los extractos del fruto de la *Vitis tiliifolia*, se hace necesario realizar investigaciones más detalladas para confirmar la identidad química de cada componente presente en esta especie, los cuales fueron identificados a través de la cromatografía en capa fina (aislando 11 fracciones) y las pruebas cualitativas, esto se puede fortalecer mediante la técnica de HPLC, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, que permiten una identificación plena del metabolito secundario y muestran su estructura específica; de esta forma, una vez obtenida la identidad del compuesto, se recomienda realizar pruebas que demuestren a nivel medicinal la relación de los compuestos químicos purificados con la actividad en el organismo, teniendo en cuenta que poseen un bajo potencial tóxico para el ser humano.

Con base en lo anterior, es necesario también realizar estudios en organismos más complejos para identificar el grado de toxicidad del agraz, fortaleciendo la bioseguridad de esta especie como alimento y medicamento, además de reforzar la evaluación biológica de *Artemia salina* con el extracto de cloroformo porque la baja cantidad de este no permitió realizar completamente la evaluación de toxicidad, además de que el cloroformo en sí, tiene potencial tóxico por sus propiedades químicas y fisiológicas.

Debido al impacto de esta investigación al usar especies silvestres con capacidades etnobotánicas, esta investigación puede ser utilizada como una guía práctica para la realización de otros tamizajes fitoquímicos en plantas nativas de nuestro departamento, en vista de que se organizó la información en aspectos metodológicos, materiales y equipos utilizados, además del aporte mediante la evaluación tóxica de los extractos obtenidos con *Artemia salina*.

Se recomienda que, en futuros estudios, se realicen otras pruebas cualitativas para descartar o evidenciar la presencia de otros metabolitos secundarios, además de ampliar la búsqueda en las propiedades farmacológicas de los compuestos encontrados, relacionándolos con su estructura química, fundamentalmente.

Por último, es importante divulgar la información obtenida de este estudio para contribuir a promover la evaluación preliminar de metabolitos secundarios en plantas nativas, motivando también a estudiantes de nuestra licenciatura y región a contribuir a la diversidad química de las especies vegetales de nuestro departamento, teniendo en cuenta obviamente las recomendaciones anteriores.

11. Referencias

- Abreu-Payrol, J., Miranda-Martínez, M., G., T.-C., & Castillo-García, O. (2001). Actividad farmacológica preliminar del fruto de Bromelia pinguin L. (piña de ratón). *Revista Cubana de Farmacología*, 56-60.
- Almaraz, N., Ávila, J. A., Delgado, E. A., Naranjo, N., & Herrera, J. (2006). *El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto*.
- Alvarez, R. (6 de Marzo de 2016). *Slideshare: Ruta del ácido Shikímico*. Obtenido de <https://www.slideshare.net/xiuhts/farma-3-59142867>
- Amaya, R. (2007). *La investigación en la práctica educativa: Guía metodológica de investigación para el diagnóstico y evaluación en los centros docentes*. Madrid: Ministerio de Educación y Ciencia y CIDE.
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinarés, I., Llor, N., Muñoz, D., . . . Velasco, D. (2009). *Operaciones básicas en el laboratorio de química*. Barcelona, España: Universidad de Barcelona.
- Arango, G. (2008). *ALCALOIDES Y COMPUESTOS NITROGENADOS*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Arango, J. (2002). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. (U. Complutense, Editor) Retrieved from Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Reduca (Biología): http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf.
- Avila, G., Cuspoca, J., & Quicazan, M. (2007). caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto del Agradz.
- Baca I., A., Lujan S., E., & Meraz R., M. (2015, Agosto 4). *academia.edu*. Retrieved from academia.edu: https://www.academia.edu/9104401/FORMACION_DE_CUMARINAS_OBTENIDAS_DE_7-HIDROXI-4-METILCUMARINA
- Barneto, A. (2017). *Espectroscopia*. Valencia: Universitat de Valencia.
- Barrera, C. A., & Barrera J, L. C. (2014). *caracterizacion química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie raputia heptaphylla (rutaceae)*. BOGOTA: UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA.

- Bernal, R., Galeano, G., Rodríguez, Á., & Sarmiento, H. y. (2011). *Nombres Comunes de Las Plantas de Colombia*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Bernal, R., Gradstein, S., & Celis, M. (2015). *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. (U. N. Colombia, Editor) Retrieved from Instituto de Ciencias Naturales: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Brown, S. (1963). *Recent studies on the formation of natural coumarins*. Lloydia.
- Carballo, J., Hernández-Inda, Z., Pérez, P., & García-Grávalos, M. (2002). A comparison between two brine shrimp assay to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 17-25.
- Carranza V., D., & Huayanay V., J. (2009). *Determinacion De Metabolitos Secundarios Del Tallo De Croton alnifolius L.* Trujillo: Universidad Nacional De Trujillo.
- Carranza, J., V., B., & J., C. (2016). Capacidad antioxidante y contenidos fenolicos de uva blanca vitis vinifera sin semilla. *Investigacion y desarrollo en ciencia y tecnologia de alimentos*, 13.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5-14.
- Carvajal R., L., & Uribe Y., H. S. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupata (STRYCHNOS SHULTESIANA KRUKOFF). *REVISTA COLOMBIANA FORESTAL*, 168.
- Castañeda, J., Morales, A., & Valderrama, Y. (2018). *Analisis fitoquimico preliminar del helecho Eupodium pittieri empleado para el crecimiento del vello facial en Acevedo (Huila) y su evaluación de Toxicidad sobre Artemia salina*. Neiva: Universidad Surcolombiana.
- Castaños, E. (2015). *Lidia con la química*. Obtenido de Cromatografía en capa fina: lidiakonlaquimica.wordpress.com
- Castro, M. (2015). *Caracterización DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL CITOTÓXICO DE Iresine spiculigera Seubert (AMARANTHACEAE)*. Facultad de Ciencias Ambientales. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Cerpa, C. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y Caracterización*. Universidad de Valladolid.
- Chízar, C. (2009). *Plantas Comestibles de Centroamerica* (Primera ed.). Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad (INBIO).

- Cofretis, R. (2017). *Herbolaria y remedios naturales: Uso de Productos herbolarios en México*. Obtenido de <http://revistacofepris.salud.gob.mx/inter/2016/1/bienestar.html>
- Collins. (07 de Julio de 2016). *BioEnciclopedia*. Obtenido de Vid: <http://www.bioenciclopedia.com/vid/>
- Conabio. (2018). Fotos de *Vitis tiliifolia*. *Banco de imágenes de Conabio*. México.
- Croat, T. (1978). *Flora de la isla barro colorado*. Panamá: Instituto de Investigación tropical Smithsonian.
- CYTED. (2014). *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*. Obtenido de <http://www.cyted.org>
- D Armas, H. T., Rodriguez, F., & Salazar, J. (2013). Estudio fitoquímico preliminar y bioactividad de la planta melochia villosa proveniente del Estado Amazonas, Venezuela. *SciELO*, 23.
- De la cruz, M., Torres, e., Morales, J., Hermosilla, R., & Hernández, R. (2016). Identificación de metabolitos secundarios de Anredera vesicaria (Yuca hiedra). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2).
- Del Amo, S. (1979). *Plantas Medicinales del Estado de Veracruz*. México: INIREB.
- Díaz, N., & et-al. (2016). *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Córdoba, Argentina: Campus Universitario de Rabanales.
- Dominguez, X. (1985). Investigación Fitoquímica. En X. A. Dominguez, *Investigación Fitoquímica* (pág. 285). Mexico: Limusa.
- Dominguez, X. (1985). *Métodos de investigación fitoquímica*. Ciudad de México: Limusa.
- Durango, D. A. (3 de JUNIO de 2014). Evaluación De La Actividad Citotóxica de Los Extractos De Las Plantas *Annona muricata*, *Annona cherimola* y *Physalis peruviana* En La Línea Celular MCF-7 De Adenocarcinoma de Seno. Bogotá, Cundinamarca, Colombia.
- Ege, S. (1998). *Química orgánica: estructura y reactividad* (Vol. II). Reverté.
- Forero, F., & Pulido, A. (2016). Extracción, purificación y cuantificación de mangiferina en la corteza de algunos cultivares de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 52-56.
- Franco, O., Cruz-Castillo, J., Cortés-Sánchez, A., & Rodríguez-Landero, A. (2008). Localización y usos de vides silvestres (*Vitis* spp.) en el estado de Puebla, México. *Ra Ximhai*, 4(1), 151-165.

- Franco, T., & Celis, M. (2016). EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y ANTIOXIDANTES DE PRODUCTOS DERIVADOS DEL FRUTO AGRAZ (VACCINIUM MERIDIONALE SWARTZ). *REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y ALIMENTARIAS*, 184-193.
- Galindo. (2019). *Bejuco blanco*. Retrieved from Vida: plantas: <http://www.naturalista.mx/taxa/286649-Vitis-tiliifolia>
- García, A., & Carril, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. madrid: Reduca (Biología).
- Gavira, J. (2012). *Espectrofotometría UV-Visible (II): El espectrofotómetro*. España.
- Giraldo, R., & Osorio, K. (2019). *Estudio Fitoquímico Preliminar de la Especie Begonia erythrophylla*. Neiva, Huila: Universidad Surcolombiana.
- Girbes, T., & Jimenez, P. (2008). *Terpenos y Esteroides*.
- González, M. (2011). *La guía de Química. Obtenido de Metabolitos Secundarios de las Plantas*. Obtenido de <https://quimica.laguia2000.com/reacciones-quimicas/metabolitos-secundarios-de-las-plantas>
- González, M., & Sequeda, L. (2011). Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos del Agraz y su posible efecto citototóxico in vitro en células leucémicas oci aml3 y molt4.
- Guirado, O., Abreu, A., Cuellar, A., & Prieto, S. (2008). Fitoquímica del Genero Vaccinium Ericaceae. *SciELO*, 13.
- Gúzman, J. (1976). *Especies útiles de la Flora Salvadoreña* (Vol. Tomo I). San Salvador, El Salvador: Ministerio de Educación el Salvador.
- Harborne, J. (1990). *General procedure and measurement of total phenolics*. In: *Methods in plant biochemistry I*. U.S.A: Academic Press.
- Harvest, & Von, M. (2019, Julio). *Aminoacido.eu*. Retrieved from Los aminoácidos y sus funciones: <https://www.aminoacido.eu/aplicaciones/>
- Isaza, J., Veloza, L., Ramírez, L., & Guevara, C. (2007). ESTIMACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE TANINOS HIDROLIZABLES Y CONDENSADOS EN PLANTAS MELASTOMATÁCEAS. *Scientia Et Technic*, 261-266.
- Kanegusuku, M., Benassi, J., Pedrosa, R., Yunes, R., Cechinel-Filho, V., Azevedo-Maia, A., . . . Niero, R. (2002). Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Zeitschrift für Naturforschung*, 272-276.

- Lemaire, I., Assinewe, V., & Cano, P. (1999). Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Una de Gato). *Ethnopharmacol*, 109.
- Lock, O. (2001). Aislamiento y caracterización de un triterpenoide a partir de la gentianella thyrsoides hooker FABRIS. *Revista Peruana de Química e ingeniería química*, 30-35.
- López, E. (2007). *Estudio fitoquímico y Aproximación genética en especies de la sección PLINTHINE del Género Arenaria (Caryophyllaceae)*. Granada: Universidad de Granada.
- Lopez, N., M., M., & Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutricion Clinica y Dietetica Hospitalaria.*, 81-91.
- Luengo, T. (2002). *Flavonoides*. OFFARM.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas: Consejo de Desarrollo científico y Humanístico, U.C.V.
- Marker, R., & López, J. (1947). *Steroidal sapogenins No. 167 Pregnene derivatives from nalogenin*. J. Am. Chem. Soc.
- Martínez. (2005). *Flavonoides*. Medellín.
- Martinez. (2016, diciembre 3). *Alimentacion Sana*. Retrieved from Alimentacion Sana: <http://www.sanopordentro.com/mandar-articulo>
- Martinez, R. (2014, octubre 3). *Relacion estructura-funcion en la interaccion entre proteínas G y bicapas lipidicas*. Retrieved from Relacion estructura-funcion en la interaccion entre proteínas G y bicapas lipidicas.: file:///C:/Users/marcos/Downloads/Alvarez_Martinez_Rafael.pdf
- Matus, M., Rodríguez, J., & Ocvirk, M. (2006). RALEO DE RACIMOS EN VITIS VINIFERA CV. MALBEC EFECTO SOBRE LOS COMPONENTES DEL RENDIMIENTO Y LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE LAS BAYAS. *Rev. FCA UNcuyo*, 105-112.
- McLaughlin, J., Rogers, L., & Anderson, J. (1988). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information journal*(32), 513-524.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putman, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 31-34.

- Middleton, E. J., Kandaswami, C., & Theoharides, T. (2000). Los efectos de los flavonoides sobre las células mamarias: implicaciones de inflamación, enfermedades cardíacas y cáncer. *Pharmacological Reviews*, 673-751.
- Molina, L., & Melo, S. (2010). Importancia del método estadístico para el cálculo de la CE50 y CE95 de algunos isotiocianatos evaluados contra *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Revista Agronomía Colombiana*, 28(2), 235-244.
- Monedero, J. (2015). *IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOIDES POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN MELAZAS RESIDUALES DE UN INGENIO AZUCARERO*. Cali: Universidad ICESI.
- Montealegre P., C. (2011). Etnobotánica preliminar del Espingo en la medicina tradicional indígena Inga, pruebas fitoquímicas y evaluación de la actividad antimicrobiana. *Universidad Javeriana*, 34.
- Morales, A. (2019). *Ensayos Biológicos*. Neiva.
- Murillo, E., Mendez, J., & Uasapud, D. (2008). *Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios y caracterización de una droga cruda*. Ibagué: Universidad del Tolima.
- Neyoy, C. (23 de Noviembre de 2002). *Apuntes de Fisiología Vegetal. Obtenido de Principales Metabolitos Secundarios*. Obtenido de <http://fisiolvegetal.blogspot.com.co/2012/11/principales-metabolitos-secundarios.html>
- Ochoa, L. S., & Sarmiento, A. J. (2018). *Estudio Fitoquímica de la Especie Vegetal Buguetia glutinosa(L.f.) DC.(Melastomataceae) y Evaluación de su Actividad Biológica*. Bogotá: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA.
- OMS. (12 de Septiembre de 2018). *Organización Mundial de la Salud. Obtenido de Cáncer*: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Otsuka, H., Morita, Y., Ogiara, Y., & S., S. (1977). *The evaluation of ginseng and its congeners by droplet counter-current chromatography (D.C.C)*. *Planta Medica*.
- Palá, J. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "ERYNGIUM" L, en la Península Ibérica*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Parra, L., Silva, A., & Guerra, I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and estimate of medium lethal dose (LD50 value) in mice to determine acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*.(8), 395-400.

- Pereira, U. T. (Abril de 2018). *Universidad Tecnológica de Pereira*. Obtenido de Biología Celular y Molecular:
<http://blog.utp.edu.co/biologiacycelularymolecular/files/2018/04/sintesis-de-proteinas-actual.pptx>.
- Pergaud, L., & Kuete, V. (2013). *Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa*. Newnes: Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry.
- Pinzon M., C. (12 de Noviembre de 2011). Etbotanica Preliminar del Espingo en la Medicina Tradicional Indigena INGA, Pruebas fitoquímicas y Evaluación de La Actividad Antimicrobiana. Bogotá, Cundinamarca, Colombia.
- Plummer, D. (1981). *Bioquímica Práctica*. Bogotá: Mc Graw-Hill.
- Porter, J. W., & Spurgeon, S. L. (1981). *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* (Vol. I). New York: Wiley-Interscience Publication.
- Ríos, S., & Rojas, B. (2018). *Estudio Comparativo de los Aceites Esenciales de dos Especies de Passifloras del Departamento del Huila*. Neiva: Universidad Surcolombiana.
- Robles, M. A., Aguilar, J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J., Guerrero-Medina, P., . . . Del-Toro, C. (1982). IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE TEMPISQUE (*Sideroxylum capiri* PITTIER). *Biotecnia*. Retrieved from <http://biotecnia.unison.mx>
- Rodríguez, A., Nilder, M., & Guevara, E. (2012). Identificación Preliminar de Flitoconstituyentes en la inflorescencia de *Bejaria aestuans*. *Universidad Nacional de Trujillo*, 56.
- Rodríguez, O., Torrez, E., & Valenzuela, R. (2005). *Plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades*. Estelí, Nicaragua: Universidad Católica Agropecuaria del Trópico Seco. Retrieved from <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Rodriguez2005Etnobotanica.pdf>
- Rzedowski, J., & Calderón, G. (2005). *FLORA DEL BAJÍO Y DE REGIONES ADYACENTES, Fascículo 131*. Michoacán: Instituto de Ecología, A.C.
- Sanabria, A. (1983). *Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la valuación de 40 plantas de la familia Compositae*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad.
- Santizo, I. (2004). *Identificación de familias de metabolitos secundarios en Myrica cerifera*. Guatemala: Universidad de San Carlo de Guatemala.

- Silva, Y. (2014). *Chemistry of natural products*. Coahuila: Autonomous University of Coahuila.
- Soine, T. (1964). *Naturally Occurring Coumarins and Related Physiological Activities*. J Pharm Sci.
- Standley, P. (1938). *Flora de Costa Rica*. Obtenido de Museo de Campo de Historia Natural:
<http://www.archive.org/>
- Torres, L. A. (2011). *Estudio de la Hidrodestilación del aceite esencial de Lippia alba (Mill). En un destilador a escala pilotp*. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
- Wade, L. (2011). *Química Organica* (Septima ed., Vol. 2). Mexico, Mexico: Pearson Educacion.
- Wallach, O. (1887). Zur kenntnis der terpepe und ätherischen öle. *Liebigs Annalen der chemie*, 1-54.

Anexos

Anexo 1:

Tablas

| de datos | Tiempo (H) | T ₀ | T ₁ (0,1) | T ₂ (0,2) | T ₃ (0,3) | T ₄ (0,4) | T ₅ (0,5) | T ₆ (1) | T ₇ (2) | % Mortalidad |
|---|------------------------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| prueba | □ ppm E. butanólico | NT | NM | NM | NM | NM | NM | NM | NM | NM |
| toxicidad <i>Artemia</i> | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| extractos <i>Vitis</i> <i>tilifolia.</i> | 500 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 10% |
| | | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | 1000 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 5 | 6 | 60% |
| | | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 4 | 5 | 5 | 50% |
| | | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 20% |

de
con
salina
de

| Tiempo (H) | T ₀ | T ₁ (0,1) | T ₂ (0,2) | T ₃ (0,3) | T ₄ (0,4) | T ₅ (0,5) | T ₆ (1) | T ₇ (2) | % mortalidad |
|-----------------------------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| Tiempo (H) | T ₀ | T ₁ (0,1) | T ₂ (0,2) | T ₃ (0,3) | T ₄ (0,4) | T ₅ (0,5) | T ₆ (1) | T ₇ (2) | % mortalidad |
| □ ppm E. cloroformico | NT | NM | NM | NM | NM | NM | NM | NM | NM |
| 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 | 50% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 6 | 60% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 4 | 40% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 20% |
| 500 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 30% |
| | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 30% |
| | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |

| □ ppm E. hexanico | NT | NM |
|----------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
| 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 40% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 20% |
| 500 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 10 | 10 | 100% |
| | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 6 | 7 | 70% |
| | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 5 | 5 | 50% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 10% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| 1000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 20% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 30% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 10% |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 20% |

Anexo 2: Regresión y obtención de la CL50 usando Microsoft Excell para la prueba de toxicidad con *Artemia salina* en los extractos de *Vitis tiliifolia*.

Regresión lineal para el Extracto butanólico

| | | | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|--|----------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Resumen | | | | | | | | |
| <i>Estadísticas de la regresión</i> | | | | | | | | |
| Coefficiente d | 0,98145431 | | | | | | | |
| Coefficiente d | 0,96325257 | | | | | | | |
| R^2 ajustado | 0,92650513 | | | | | | | |
| Error típico | 0,15961131 | | | | | | | |
| Observaciones | 3 | | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | | | |
| | | <i>Grados de libertad de cuadrado de los cua</i> | | <i>F</i> | <i>Valor crítico de F</i> | | | |
| Regresión | 1 | 0,6677909 | 0,6677909 | 26,2127854 | 0,12279766 | | | |
| Residuos | 1 | 0,02547577 | 0,02547577 | | | | | |
| Total | 2 | 0,69326667 | | | | | | |
| | <i>Coefficientes</i> | <i>Error típico</i> | <i>Estadístico t</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Inferior 95%</i> | <i>Superior 95%</i> | <i>Inferior 95,0%</i> | <i>superior 95,0%</i> |
| Intercepción | -0,5983292 | 0,86335613 | -0,6930271 | 0,61418878 | -11,568309 | 10,3716505 | -11,568309 | 10,3716505 |
| Variable X 1 | 1,64812346 | 0,32190903 | 5,11984232 | 0,12279766 | -2,4421185 | 5,73836546 | -2,4421185 | 5,73836546 |

Obtención de la CL₅₀ para el extracto butanólico

| | |
|-------------------|--------------------|
| Intercepción | -0,5983292 |
| Variable X 1 | 1,6481235 |
| Y=ax+b | =10 ^{3,4} |
| Y=1,65x+(-0,60) | |
| 5=1,65x-0,60 | |
| 5+0,60=1,65x | |
| 5,60/1,65=x | |
| X=3,39 | |
| LC50=antilog x | |
| LcC50=antilog 3,4 | |
| LC50=2511,88643 | |

Regresión lineal para el Extracto Clorofórmico

| | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|--|
| Resumen | | | | | | | | | |
| <i>Estadísticas de la regresión</i> | | | | | | | | | |
| Coefficiente d | 1 | | | | | | | | |
| Coefficiente d | 1 | | | | | | | | |
| R ² ajustado | 65535 | | | | | | | | |
| Error típico | 0 | | | | | | | | |
| Observaciones | 2 | | | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | | | | |
| | | <i>Grados de libertad</i> | <i>de cuadrado de los cua</i> | <i>F</i> | <i>valor crítico de F</i> | | | | |
| Regresión | 1 | 0,19845 | 0,19845 | #¡NUM! | #¡NUM! | | | | |
| Residuos | 0 | 0 | 65535 | | | | | | |
| Total | 1 | 0,19845 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | <i>Coefficientes</i> | <i>Error típico</i> | <i>Estadístico t</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Inferior 95%</i> | <i>Superior 95%</i> | <i>Inferior 95,0%</i> | <i>uperior 95,0%</i> | |
| Intercepción | 8,28288301 | 0 | 65535 | #¡NUM! | 8,28288301 | 8,28288301 | 8,28288301 | 8,28288301 | |
| Variable X 1 | -1,5831532 | 0 | 65535 | #¡NUM! | -1,5831532 | -1,5831532 | -1,5831532 | -1,5831532 | |

Obtención de la CL₅₀ para el extracto Clorofórmico

| | |
|--------------------|---------------------|
| Intercepción | 8,282883 |
| Variable X 1 | -1,5831532 |
| Y=ax+b | =10 ^{2,08} |
| Y=-1,58x+(8,28) | 120,22644 |
| 5=-1,58x+8,28 | |
| 5-8,28=-1,58x | |
| (-3,28)/-1,58=x | |
| X=2,0759 | |
| LC50=antilog x | |
| LcC50=antilog 2,08 | |
| LC50=120,22 | |

Regresión lineal para el Extracto Hexánico

| | | | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|--|----------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Resumen | | | | | | | | |
| <i>Estadísticas de la regresión</i> | | | | | | | | |
| Coefficiente d | 0,24294406 | | | | | | | |
| Coefficiente d | 0,05902182 | | | | | | | |
| R ² ajustado | -0,8819564 | | | | | | | |
| Error típico | 0,79096462 | | | | | | | |
| Observaciones | 3 | | | | | | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | | | |
| | | <i>Grados de libertad de cuadrado de los cua</i> | | <i>F</i> | <i>Valor crítico de F</i> | | | |
| Regresión | 1 | 0,03924164 | 0,03924164 | 0,0627239 | 0,8437737 | | | |
| Residuos | 1 | 0,62562503 | 0,62562503 | | | | | |
| Total | 2 | 0,66486667 | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | <i>Coefficientes</i> | <i>Error típico</i> | <i>Estadístico t</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Inferior 95%</i> | <i>Superior 95%</i> | <i>Inferior 95,0%</i> | <i>Superior 95,0%</i> |
| Intercepción | 3,17793553 | 4,27841958 | 0,74278258 | 0,59328531 | -51,18454 | 57,5404107 | -51,18454 | 57,5404107 |
| Variable X 1 | 0,39952418 | 1,59524191 | 0,25044739 | 0,8437737 | -19,869946 | 20,6689945 | -19,869946 | 20,6689945 |

Obtención de la CL₅₀ para el extracto Hexánico

| | |
|--------------------|---------------------|
| Intercepción | 3,1779355 |
| Variable X 1 | 0,3995242 |
| | |
| Y=ax+b | =10 ^{4,55} |
| Y=0,40x+(3,18) | |
| 5=0,40x+3,18 | |
| 5-3,18=0,40x | |
| 1,82/0,40=x | |
| X=4,55 | |
| LC50=antilog x | |
| | |
| LcC50=antilog 4,55 | |
| LC50=35481,34 | |