

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES,
SAPOGENINAS ESTEROIDALES EN EXTRACTOS DE TRES PLANTAS
MESOAMERICANAS *LIPPIA GRAVEOLENS* (ORÉGANO), *PASSIFLORA*
EDULIS (MARACUYÁ) Y *SMILAX DOMINGENSIS* (ZARZAPARRILLA).

Claudia Mariela Teleguario Sicaján

Química Farmacéutica

Guatemala, agosto 2008

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES,
SAPOGENINAS ESTEROIDALES EN EXTRACTOS DE TRES PLANTAS
MESOAMERICANAS *LIPPIA GRAVEOLENS* (ORÉGANO), *PASSIFLORA
EDULIS* (MARACUYÁ) Y *SMILAX DOMINGENSIS* (ZARZAPARRILLA).

Informe de tesis

Presentado por

Claudia Mariela Teleguario Sicaján

Para optar el título de
Química Farmacéutica

Guatemala, agosto 2008

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Anibal Rodrigo Sevillanos Cambroner	Vocal V

DEDICATORIA

A Ser Supremo:

Porque me ha permitido tener esta transitoria vida y ser mi salvador.

A mis padres:

Que este triunfo sea la recompensa a sus múltiples sacrificios, por inculcar en mí valores morales y espirituales, por sus sabios consejos, fortalezas en los momentos cruciales de mi vida y porque nunca perdieron las esperanzas en mí, todo lo que he logrado y lograré, va dedicado a ustedes. Los amo.

A mi hermana Waleska:

Por estar siempre a mi lado y por ser parte de mi vida. Te aprecio.

A mis maestros:

Por su sabiduría, comprensión y compartir sus experiencias y conocimientos que me ayudaron a crecer intelectualmente.

A mis amigas (o):

Por su amistad y apoyo especialmente Claudia Figueroa, Ana Gómez y Víctor Polanco.

AGRADECIMIENTOS

A Ser Supremo:

Por el regalo de la vida y darme todas las bendiciones.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia:

Por haberme formado profesionalmente y para dedicarme al servicio de la humanidad. Y expreso mi sincero reconocimiento por abrirme las puertas y la oportunidad de engrandecer intelectualmente.

A mis maestros:

Por sus enseñanzas, amistad y creer en mí, especialmente Licda. Waleska Argueta, Licda. Gloria Navas, Licda. Beatriz Medinilla, Licda. Flor de María Lara, Licda. Hada Alvarado, Lic. Pablo Oliva y Lic. Armando. Que Dios los bendiga.

A mis asesores y revisora:

Que me apoyaron a realizar mi trabajo de tesis y compartir sus sabidurías.

A Laboratorio de Investigación de Productos Naturales:

Por permitirme realizar mi trabajo de tesis y enriquecerme de experiencias.

ÍNDICE

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	5
3. Antecedentes.....	6
4. Justificación.....	29
5. Objetivos.....	30
6. Materiales y Métodos.....	31
7. Resultados	41
8. Discusión de Resultados.....	43
9. Conclusiones.....	46
10.Recomendaciones.....	47
11.Referencias.....	48
12.Anexos.....	52

1. RESUMEN

El presente trabajo se centró en el estudio de tres especies diferentes plantas: *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano), *Passiflora edulis* Sims. (maracuyá) y *Smilax domingensis* Willd. (zarzaparrilla), determinando las concentraciones de saponinas y flavonoides, dichos metabolitos secundarios son de gran interés en las industrias y en la medicina.

Las saponinas tipo esteroide (saponina esteroideal) revisten importancia debido al empleo como materia prima en la fabricación de hormonas esteroidales, vitamina D, detergentes y otros relacionados. Los flavonoides son pigmentos vegetales que tienen una amplia gama de actividades biológicas. Estudios más recientes concernientes a acciones antivirales, antiinflamatorios, antioxidantes, etc., han hecho que los flavonoides sean tomados como un grupo de compuestos interesantes con actividad biológica.

Con relación a los aspectos mencionados, se crea la necesidad de investigar el contenido de saponinas esteroidales y flavonoides presentes en las hojas de la *L. graveolens*, *P. edulis* y rizoma de *S. domingensis*.

Para ello se procedió a preparar extractos etanólicos para su posterior análisis, tanto fitoquímico como en la cuantificación mediante espectrofotometría en la región visible. En el análisis fitoquímico de saponinas las muestras de *S. domingensis* presentaron el mismo Rf que el estándar de Saponina, *P. edulis* y *L. graveolens* presentaron valores Rf cercanos al estándar de saponinas, donde todas mostraron coloración violeta. Así como la presencia de bandas de color rojo que coincide con los estándares de saponinas tipo esteroides de β -sitosterol y el estigmasterol para las dos últimas especies mencionadas.

Para el análisis fitoquímico de flavonoides, las tres especies presentaron bandas similares a los estándares de flavonoides. Seguidamente se procedió llevar al análisis espectrofotométrico para la cuantificación de flavonoides y saponinas.

El método utilizado para la cuantificación de sapogenina fue el propuesto por Baccou, J.C. que se expresan mediante la ecuación de la curva de calibración del estándar de sapogenina esteroideal (diosgenina), y para los flavonoides el método utilizado fue para flavonoides totales expresados en quercetina, según la Farmacopea Brasileña, los resultados obtenidos confirman la presencia de sapogeninas esteroidales y flavonoides en la composición química de las tres especies.

De acuerdo a los resultados de los porcentajes de sapogeninas esteroidales y flavonoides respectivamente fueron: *L. graveolens* 1.36 % y 2.4343 %, *P. edulis* fue 0.7059 % y 0.2675 %, y *S. domingensis* 1.63 % y 0.0871 %.

2. INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo el ser humano, por la misma necesidad de supervivencia, ha recurrido al uso y provecho de las plantas, poco a poco se han ido descubriendo las propiedades curativas de las mismas. En la actualidad, el uso de las plantas medicinales ha cobrado importancia; los estudiosos han dedicado tiempo y esfuerzo para conocer y profundizar el valor curativo que representan.

Guatemala por su posición geográfica, se caracteriza por la gran diversidad de plantas con las que cuenta y desde la época precolombina sus habitantes han aprovechado y siguen aprovechando en los momentos actuales, todos estos recursos naturales, como una alternativa para prevenir y curar sus enfermedades. Aparte de ser naturales, son económicos, fáciles de obtener y de preparar.

Estas ventajas han contribuido a que el aprovechamiento de estos recursos hoy sea un tema de interés nacional. Por tales razones el estudio de las especies vegetales con actividad terapéutica es indispensable, siendo en este caso objeto de interés *Lippia graveolens* (Orégano mexicano), *Passiflora edulis* (maracuyá) y *Smilax domingensis* (zarzaparilla), plantas nativas de Mesoamérica.

Es por ello que es importante identificar y cuantificar los marcadores químicos de éstas especies por el interés medicinal. Una vez detectada la presencia de saponinas y flavonoides, por métodos cromatográficos en capa fina (CCF). Se procedió a análisis cuantitativo mediante espectrofotometría visible (vis).

3. ANTECEDENTES

3.1 Nombre científico: *Lippia graveolens* H.B.K.

3.1.1 Familia : Verbenácea

3.1.2 Sinónimos:

Goniostachyum graveolens Small; *Lantana originoides* Mart & Gal; *L. berlandeirei* Schauer in Dc. (1,2)

3.1.3 Nombres comunes:

Orégano, orégano mexicano, orégano de cerro, orégano del monte, orégano de la tierra, mejorana, salvia, hierba dulce, xaak-ché, xakilché. (2, 3,4)

3.1.4 Hábitat: y Distribución geográfica

L. graveolens se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas, en partes planas, húmedas o secas, a elevaciones bajas, de aproximadamente 300 a 400msnm. En Guatemala es reportado en los departamentos de El Progreso, Zacapa y el Petén. Y también existe en California, Sur de Texas y Centroamérica. (1, 2, 3,5)

3.1.5 Descripción botánica:

Arbusto delgado que puede llegar a medir hasta 2m de alto, ramas con pubescencia cortante pilosa. Están provistas de tricomas cortos. Hojas en peciolo 5-10mm de largo, oblongas y elípticas de 2-4cm de largo, obtusas o redondas en el ápice, sucordadas a la base, densamente pilosas. La hoja en el haz (cara superior) está provista de una cubierta densa de pelos suaves, y en el envés (cara inferior) hay muchas glándulas y muchos pelos. Los márgenes de las hojas son finamente cerradas. Las inflorescencias, espigas subglobosas, están en las axilas de las hojas. Las flores pequeñas son blancas, subglobosas a oblongas de 4-12mm de largo, brácteas

ovadolanceoladas, agudas; cáliz de 1-2mm de largo, glandular; corola blanca de 3-6mm de largo. (2, 3, 5, 6,7,)

3.1.6 Usos etnomédicos

La decocción o infusión de hojas del orégano, se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales y respiratorias, hidropesía, ictericia, amenorrea, dismenorrea y reumatismo. La decocción en leche se usa para tratar asma y bronquitis; un jarabe de las hojas secas se usa para tratar diabetes, disentería, catarro y resfríos.

Por sus propiedades desinfectantes la decocción se utiliza tópicamente para quemaduras, cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta, en baños se usa para fortalecer niños debilitados, combatir la gripe y para aliviar el prurito y la sarna; en cataplasma para madurar abscesos, calmar neuralgias y aliviar induraciones, cáncer y tumores; en fricciones y baños se usa como calmante. La planta fresca macerada en aceite se aplica a los dolores reumáticos. (3, 6,8)

Se le atribuye propiedad antitusiva, antidiarreica, broncodilatadora, antioxidante, antiséptica, aromática, calmante, carminativa, cicatrizante, desinflamante, diaforética, digestiva, diurética, emenagoga, espasmolítica, estimulante, expectorante, pectoral, sudorífica y tónica. (3, 6,8)

3.1.7 Composición química

Las hojas de *L. graveolens* contienen: aceite esencial (1.8%), glicósidos saponínicos, flavononas (pinocembrina, naringenina), lapachenol, icterogenina, taninos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales. La corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos. (1,3)

El contenido de carvacrol y timol del aceite esencial varía considerablemente: de 40.1 – 60.6% de timol y de 3.1 – 21.2% de carvacrol, el rendimiento del aceite depende de la estación y las condiciones climáticas. (9,10)

3.1.8 Toxicología

Los extractos acuosos y etanólico de hojas de *L. graveolens* (500ppm) presentan cierta toxicidad dosis-dependiente contra peces del género *Mollinesia*. Su administración durante embarazo está contraindicada, ya que puede producir aborto. El lapachenol tiene actividad carcinógena y podría explicar cierta actividad antifertilidad atribuida. La Dosis Letal (DL) del carvacrol por vía oral en conejos es 100mg/Kg. (3)

3.1.9 Estudios fitoquímicos

Existe una marcada diferencia del contenido de aceite esencial entre tallos y hojas. Las hojas secas presentan un contenido cuarenta veces mayor que los tallos. Pero también hay mucha diferencia en la composición del aceite: en tallos hay más sesquiterpenos, pero al mismo tiempo disminuye el número de monoterpenos. El contenido del componente de sabor, carvacrol, es igual en hojas y tallos, mientras el contenido de timol es muy reducido en los tallos. (2,11)

3.2 Nombre científico: *Passiflora edulis* Sims.

3.2.1 Familia : Passifloraceae

3.2.2 Sinonimias

Passiflora diadem Vell., *P. idocarina* Barb. Rodrig., *P. middletoniana* Paston., *P. pallidiflora* Bert., *P. pircroderma* Barb. Rodrig., *P. pomífera*. M. Roemer., *P. rigidula* Jacq., *P. rubricautis* Jacq., *P. vernicosa* Barb. Rodríguez, *P. verrucifera* Lindl. (5, 15, 20, 26, 48)

3.2.3 Nombres comunes

Granadilla, maracuyá, flor de la pasión o fruta de la pasión, granadilla silvestre, granadina, maracuyá violeta, maracuyá común, granadilla hawaina, gairendel, grenadina, cálala, maracuja roxo, maracujá, pasión fruit pulple, pasión fruit yellow, passion flower, purple granadilla. (12, 13, 14, 15, 16)

3.2.4 Hábitat y distribución geográfica

Planta nativa desde Brasil hasta norte de Argentina; además se cultiva por sus frutos o por su ornamental; es raramente cultivada en Guatemala, y tal vez es naturalizada ocasionalmente. (12, 13, 14, 15,16)

3.2.5 Descripción botánica

Planta herbácea, glabra o raramente pilosa, estípulas lineares de 1cm de largo, enteras o ligeramente glandulares, enruladas, peciolas de 4cm de largo, biglandulares en el ápice, las glándulas no pediculadas o corto estipuladas; hojas de 5 a 11cm de largo y de 4 a 10cm de ancho, son trilobuladas debajo de la mitad, los lóbulos son de 2 a 4cm de ancho, son trilobuladas debajo de la mitad, los lóbulos son de 2 a 4cm de ancho, agudos o acuminados, hojas redondeadas o ligeramente acorazonadas en la base, cerradas, de poco grosor; pedúnculos robustos de 6cm de largo o más, cortos; brácteas ovadas de 2 a 2.5cm largo, 1 a 1.5cm de ancho, obtusas o agudas, pronunciadamente serradas, dentadas, en forma de peine o casi laceradas, sin embargo son glandulares en los márgenes; flores de 7cm de ancho; sépalos oblongos, de 3 a 3.5cm de largo y 1cm de ancho, corniculados, de color verde en la parte externa y blanco en el interior, pétalos oblongos de 2.5 a 3cm de largo, obtusos, blancos; filamentos de la corona se presentan en series de 4 a 5, las dos series exteriores son filiformes o ligeramente liguliformes de 1.5 a 2.5cm de largo, color blanco o púrpura en la base; ovario ovoide o globular, con finos vellos suaves y tupidos, o glabro en algunos casos. Fruto ovoide o globular, de 4 a 5cm de largo, de color amarillo, amarillo verdes o púrpura, semillas ovaladas, de 5 a 6mm de largo y 3 a 4mm de ancho con retículas diminutas. (12, 13, 14, 16,17)

3.2.6 Usos etnomédicos

Oralmente se usa en tratamiento de bronquitis, asma. Externamente se aplica en inflamaciones hemorroidales.

La hoja fresca se usa para el tratamiento de la hipertensión anterior o para inducir diuresis. Las hojas en decocción son útiles como febrífugo. Las hojas se preparan en infusión como relajante y sedante.

El extracto acuoso de las partes aéreas se toma para tratamiento de tétanos, epilepsia, en casos de insomnio, neurosis cardiaca, para regular la presión sanguínea.

La planta entera se toma en decocción para anemia. También es útil como antitusivo, antidiarreico, emético, antipalúdico.

El fruto se usa para problemas estomacales y tumores intestinales por vía oral y en homeopatía como remedio aplicado sobre el oído.

El jugo del fruto se toma como bebida refrescante y el fruto es comestible. (12, 13, 14, 17,19)

3.2.7 Composición Química

Es rica en glicósidos, flavonósidos, passicapsina y passibiflorina, glucósidos cianogénicos, vixentina, isovitexina, kampferol, crisina, quercetina, neohisperidina y otros, su concentración en hojas y flores alcanza entre 1.5-2.1% dependiendo de la época de recolección. También contiene varios derivados de fenol como 4-hidroxi- β -ionol, vomifoliol y dehidrovomifoliol, linalol y α -terpenol y otros.

Los alcaloides reportados son harmano, harmina, harmalina, y harmalol presentándose la mayor concentración en las hojas. (17,20)

3.2.8 Toxicología

Por lo general la pasiflora es muy bien tolerada, pero a dosis muy altas pueden provocar náuseas y vómitos (por su sabor amargo), cefaleas, taquicardia, disminución del tiempo de reacción frente a estímulos externos, pudiendo dar convulsiones y paro respiratorio. No se observa toxicidad aguda después de una administración intraperitoneal en ratones de extractos de pasiflora en dosis mayores

de 500mg/Kg. y 900mg/Kg. de peso, temperatura rectal, coordinación motora, comparado con los patrones. Así también un estudio realizado con ratas blancas a las que se administró un extracto en dosis equivalentes el consumo diario de un adulto humano durante 15, 30, 90 días mostró ausencia de cambios significativos en cuando a peso, peso hepático y cerebral, volumen de líquido corporal y comida ingerida. (20,21)

3.2.9 Estudios fitoquímicos: Investigación en hojas y planta entera

Según la literatura y la base de datos NAPRALERT, la especie del género que ha sido mayor objeto de estudio es *P. edulis*. Los estudios de esta especie inician en 1968, cuando Staylor y Farlane investigaron la biosíntesis y metabolismo del harmano.

En 1975 Lutomski y Malek detectaron el flavonoide rutina y los alcaloides harmano, harmina y harmol, tanto en tallo como en hoja; reportaron la presencia de harmano en hoja y tallo de *P. edulis* variedad flavicarpa. También descubrieron la presencia de saponinas triterpenoides en partes aéreas de la planta Bombardelli reportó la presencia de pasiflorina. (16)

Andreeti dilucidó en 1977 la estructura molecular de la pasiflorina extraída de la planta entera.

A principios de la década de los ochenta, Koch descubrió una cumarina, la umbeliferona, también identificó los flavonides neohesperidina, ácido cafeico y ácido clorogénico en las partes aéreas de la planta.

Hacia 1981, en la Universidad de San Carlos de Guatemala, Herrera como pionero del país en investigación sobre pasifloras, reveló en sus análisis macro y semimicro que *P. edulis* tiene alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, esteroides insaturados, flavonoides, taninos, polifenoles y glicósidos cianogenéticos en hojas, tallos y raíz. Arbeláez en su obra titulada "Shamanismo, Medicina y Botánica" de 1983 reporta que *P. edulis* contiene los alcaloides elynodavina, ergometina, y clanoclavina. (16)

Arbain en 1989 realizó un tamizaje fitoquímico mostrando ausencia de alcaloides. Mareck descubre en 1990 los flavonoides, luteolina, chinovósido y fucósido de luteolina.

En 1996 Chassagne identificó y cuantificó en las hojas el glicósido cianogénico prunasina. Durante 1997 Moraes identifica los flavonoides rutina y orientina.

En dos estudios realizados por aparte en el año 2000 Yoshikawa demostró la existencia de siete nuevos cicloartanos triterpenoides: los ácidos pasiflóicos A, B, C, D, E, F, G, y once saponinas relacionadas: los ciclopasifósidos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X y XI en hojas y tallos. ⁽¹⁶⁾

3.3 Nombre científico: *Smilax domingensis* Willd.

3.3.1 Familia: Smilacaceae

3.3.2 Sinonimias

Smilax caudata Lundell.; *S. lundei* Killip & Morton.; *S. lanceolata* Aul & Linneo.; *S. microscola* Robinson Killip & Morton. ⁽²²⁾

3.3.3 Nombres comunes

Zarzaparrilla, tietie, china-root, zarza y corona de cristo, bejuco de la vida, cocolmeca, cuculmeca, diente de chucho. ⁽²²⁾

3.3.4 Hábitat y distribución geográfica

Crece en bosques o matorrales húmedos, desde cerca del nivel de mar hasta los 1200msnm; se ha descrito en Alta Verapaz, Escuintla, Izabal, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa. ^(22,23)

3.2.5 Descripción botánica

Glabras completamente, tallos teretes, escasamente armados en la parte inferior con aguijones robustos recurvados inerves en la parte superior. Hojas 6-15cm por 1.5-10cm, 1.4-6 veces más larga que ancha, ovadas, lanceoladas-ovadas o lanceoladas, cartáceas, inermes, nervios desde la base, las nervaduras primarias

prominentes en el envés, no impresas en el haz, el par exterior submarginal, las nervaduras secundarias conspicuas, algo prominente, reticuladas, el ápice brevemente acuminado o brevicuspidado, la base aguda, el margen entero, peciolo 0.5-2cm. Umbelas estaminadas solitarias, pedúnculo 1-5mm, más corto que el peciolo subyacente (22, 24)

3.2.6 Usos etnomédicos

Se usa por vía oral para el tratamiento de anemia, afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, inapetencia), hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre, y venéreas, hepatitis, reumatismo y tumores. Se aplica tópicamente para tratar afecciones dermatomucosas (alergias, eczema, líquen plano, tinea, psoriasis). (22,25)

3.2.7 Composición química

El tamizaje fitoquímico indica la presencia de alcaloides, aceites esenciales, esteroides insaturados, glucósidos esteroidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocianidinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas. Se han aislado agliconas esteroidales (parillina, sarsasapogenina, smilagenina). (7,24)

3.2.8 Toxicología

La decocción tiene una Dosis Letal media (DL₅₀) por vía oral en ratones mayores de 80g/kg. La administración aguda del extracto no tiene efectos tóxicos en ratones. La crónica no produce síntomas, ni cambios sanguíneos. (22)

3.3 Extracción de materias primas vegetales:

El primer paso para la extracción de materias primas vegetales es la selección del solvente dependiendo del propósito al que se destine. Se puede obtener un extracto que contenga la mayor parte de los constituyentes químicos con determinadas características utilizando un

solvente más selectivo, de menor polaridad como por ejemplo el hexano que extrae solo compuestos apolares.

Los solventes más usados en las industrias de productos fitoterapéuticos son el agua, el etanol, la glicerina, propilenglicol y mezclas de estos líquidos. En la industria de aislamiento de productos naturales puros, se utilizan hidrocarburos clorados, alcoholes, ésteres, éteres, cetonas y aceites.

En el proceso de elección de un solvente determinado deben considerarse aspectos como la selectividad, facilidad de manipulación, precio, seguridad ambiental y sobre todo la toxicidad del solvente. En el caso del aislamiento de productos naturales puros, pueden usarse solventes orgánicos o mezclas azeotrópicas.

Las variables que interfieren en el proceso de extracción, independiente de la escala de producción o del tipo de producto final son: estado de división de la droga, agitación temperatura, pH, naturaleza del solvente y el tiempo de extracción. (26)

3.3.1 Estado de división de la droga:

Cuanto menor sea el tamaño de partícula mayor será la eficiencia del proceso, debido a que existe mayor área de contacto entre la planta y el solvente. Sin embargo, partículas muy finas dificultan el proceso de percolación, pues se procesan de compactación y formación de falsas vías. (26)

3.3.2 Preparación de extracto para selección fitoquímica:

3.3.2.1 Generalidades

Prácticamente todos los constituyentes de plantas de interés en selección fitoquímica tienen cierta solubilidad en etanol o metanol al 80%, los cuales pueden ser usados en este experimento. El extracto puede ser utilizado directamente en ciertas pruebas de selección fitoquímica, mientras que en otros el solvente debe ser previamente removido para los efectos de ejecutar la prueba. En otras pruebas podrá utilizarse el material vegetal seco. (26)

3.3.2.2 Caracterización química

Para la caracterización química de especímenes botánicos se preparan extractos, los cuales son mezclas complejas de varios constituyentes fitoquímicos. Para la gran mayoría de extractos botánicos, se puede decir que no se conoce con certeza cuál de los componentes es el responsable del efecto farmacológico reportado. Para el material vegetal que posee una monografía, ciertos constituyentes químicos son elegidos y se describen ensayos cuantitativos para evaluar su contenido. La elección de tales componentes, generalmente conocidos como marcadores, está basada en ciertas consideraciones. (27)

El cribado fitoquímico tiene como objetivo general la determinación cualitativa de los principales grupos químicos presentes en el material vegetal y que por lo general son los responsables de la actividad farmacológica. Estos ensayos son simples y pueden utilizarse de forma general para la caracterización de extractos obtenidos de material vegetal pero no son ensayos cuantitativos, por lo tanto, no indica por sí solos la calidad del material vegetal. (27) Actualmente, los siguientes tipos de marcadores son especificados en las monografías y pueden ser identificados en la materia prima. (27)

3.3.2.3 Sustancias activas

Son constituyentes que tienen actividad clínica probada. El contenido mínimo o rango para los principios activos es especificado usualmente en la monografía individual. (27)

3.3.2.4 Marcadores activos

Son compuestos que tienen actividad farmacológica conocida y contribuyen en cierto grado a la eficacia. Sin embargo, la eficacia clínica para estos constituyentes puede no estar demostrada. Un contenido mínimo o rango de marcadores activos es especificado usualmente en la monografía individual. (27)

3.3.2.5 Marcadores analíticos

Cuando los principios activos ni los marcadores activos son definidos, otros constituyentes son utilizados para la determinación cuantitativa. Estos marcadores ayudan en la identificación del material. Manteniendo un contenido mínimo o rango específico de los marcadores analíticos podemos llevar a cabo la estandarización del extracto vegetal. (27)

3.3.3 Ensayo fisicoquímico

3.3.3.1 Métodos cualitativos: tiene como finalidad detectar e identificar las diferentes sustancias que componen la droga. (26)

3.3.3.2 Métodos cuantitativos: cuya finalidad es cuantificar, es determinar en que proporción se encuentran dichas sustancias en la droga. En dichos ensayos es conveniente disponer de drogas patrón y principios activos patrón que sirvan de referencia para comparar la droga investigada. (26)

3.3.3.3 Descripción de la técnica de Cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc.) distribuido uniformemente sobre una placa de vidrio o de aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente va a migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separado por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después que ha ocurrido, se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz

Ultravioleta (UV) o luz visible (Vis), o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.

Esta técnica se debe a las múltiples ventajas que ella ofrece, entre las cuales podemos citar: su fácil comprensión y rápida ejecución, la versatilidad, su reproducibilidad y el bajo costo. El proceso de separación esta fundamentado principalmente en una serie de etapas o equilibrios de absorción-desorción. Otros tipos de cromatografía, como la de reparto o la de intercambio iónico pueden tener lugar cuando se utilizan fases estacionarias apropiadas.

En el mercado se encuentran placas cromatográficas prefabricadas a un precio relativamente elevado, las cuales no necesitan de la fase preparatoria y son más homogéneas y uniformes, facilitando de esta manera una mejor separación y haciendo más reproducibles los valores de R_f (factor de retención). El factor de retención es la medida de migración de una sustancia determinada en un solvente dado.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente.}}$$

Los siguientes factores causan variaciones en el valor del R_f no permitiendo que sea un valor absoluto: las variaciones de temperatura del medio ambiente, el grado de pureza de los disolventes utilizados y las variaciones de homogeneidad de las diferentes placas de capa fina. Debido a estos factores el uso de una sustancia de referencia para garantizar la identificación, es muy importante, principalmente cuando se trata de extractos de plantas. Así como la técnica de aplicación de la muestra, la elusión, el revelado y la observación de los resultados. Escoger el eluyente apropiado, es de gran importancia para la buena separación de las sustancias. Este debe ser seleccionado en función de la fase

estacionaria empleada y en función de la naturaleza de las sustancias que van a ser separadas. (28)

3.3.3.4 Identificación por CCF.

La cromatografía en capa fina es un método simple, eficiente y no necesita un equipo sofisticado para su ejecución. Este método sirve para identificar las drogas vegetales, sus extractos y tinturas e igualmente para que en una formulación farmacéutica sea posible identificar la presencia de una droga o de sus extractos.

Estas sustancias denominadas marcadores (o marcadores positivos), son seleccionadas entre los compuestos característicos de la planta. El uso de ellas debe limitarse solamente a la identificación del material vegetal, de los extractos y de las tinturas. Los marcadores pueden servir, igualmente, para identificar la presencia de la droga en una formulación farmacéutica. Cuando los marcadores no son las sustancias responsables de la acción farmacológica de la droga, no deben ser utilizadas para las determinaciones cuantitativas. La presencia de manchas o bandas coloreadas con el mismo R_f de las sustancias de referencia en el cromatograma de la muestra, no es suficientemente para identificar la droga. La existencia de otras manchas o bandas coloreadas debe ser anotada, así como su posición de las sustancias de referencia utilizadas. El uso de sustancias de referencia que no son constituyentes de las plantas es de utilidad para determinar la ocurrencia de falsificaciones (marcadores negativos). (28)

3.3.3.5 Descripción de la técnica e identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en espectrofotometría.

La espectrofotometría es un método de análisis óptico para investigaciones biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución.

La espectrofotometría de absorción es la medida de la absorción o emisión de energía radiante, la energía que incide sobre una

muestra es una radiación monocromática (de una sola longitud de onda), este instrumento se utiliza para cuantificar de una especie absorbente, en esta práctica, se realizó la medida de dos colores azul y rojo para determinar la absorbancia por medio de la transmitancia. La ventaja de este instrumento es tener amplia intervalo de longitud de onda,

Cuando el rayo de luz llega a la cubeta óptica lleva el 100% de su energía. A medida que penetra en la sustancia, puede ir perdiendo su potencia en función de tres variables: el grado de concentración de la sustancia, la longitud del medio absorbente o sea la distancia que el rayo debe recorrer y la longitud de onda o color del rayo que se está usando, porque si la sustancia que está estudiándose tiene un color determinado, se comporta diferente frente a los diferentes colores de luz que se puedan hacer pasar a través de ella.

El tubo blanco se prepara para no interferir en las próximas lecturas de absorbancia, ya que no contiene otras sustancias a examinar por lo que se utiliza agua destilada y reactivos de acetato de etilo y ácido sulfúrico como blanco.

Toda sustancia puede absorber energía radiante, como el vidrio y agua. La absorción depende de la estructura de las moléculas y características.

Estos valores se utilizan para elaborar una gráfica de absorbancia versus concentración, en donde por regresión lineal se sabe la pendiente y el intercepto, los cuales son valores constantes que se aplican en la ecuación $x = \frac{y - a}{b}$ para encontrar una concentración desconocida. (29)

3.3.3.6 Análisis espectroscópico

Para la valoración de las drogas se utilizan en la actualidad una serie de técnicas espectroscópicas, las vibraciones electromagnéticas utilizadas en el análisis espectroscópico pueden clasificarse aproximadamente por la longitud de onda en UV, espectro visible, infrarrojo cercano e infrarrojo. El análisis

espectroscópico se funda en la capacidad de ciertas moléculas de absorber vibraciones a longitud de onda específicas. Así la cadena lateral butenólicas y algunos heterósidos cardíacos es causa de una fuerte absorción a 215-220nm; los dobles enlaces conjugados del licopeno (un pigmento del tomate y otros frutos) dan un máximo de absorción de la luz a una longitud de onda de 470nm. Dando así un color rojo, y el grupo C=O de las cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres origina una fuerte absorción en el infrarrojo aproximadamente a 5.7-6.1 μ m. En las regiones ultravioleta y visible, el espectro de absorción característico de una molécula es producido por cambios en los niveles de energía electrónica, asociados con varios grupos cromóforos de la molécula. Estos cambios suponen la absorción de cantidades relativamente grandes de energía (en quanta exactos), que van también acompañados de cambios en la energía de vibración y de rotación en la molécula. El resultado es un espectro de absorción en bandas sin picos marcados. En comparación, el espectro de absorción de una molécula en la región del infrarrojo es mucho más complejo, debido a que aquí las energías producidas demasiados pequeñas para provocar cambios electrónicos, pero lo suficientemente grandes para producir numerosos cambios de energía vibratoria y rotatoria. Cada uno de estos cambios va unido a una longitud de onda característica, el espectro muestra una estructura mucho más fina que en la región visible o ultravioleta. El espectro infrarrojo de una molécula puede dividirse en la región de las "huellas digitales" que es característica de la molécula en examen, pero en la cual es difícil asignar picos a las vibraciones específicas, el resto del espectro, en el cual pueden reconocerse muchos grupos funcionales.

Si la luz de una determinada longitud de onda pasa a través de una solución de una sustancia, la transmisión es $(T) = I/I_0$ donde I_0 es la medida de la luz que llega al detector (una célula fotoeléctrica) cuando en el trayecto luminoso no existe más que disolvente, e I

es la luz que llega al detector cuando se examina una solución de la sustancia a investigar. (29)

3.4 Saponinas

Las saponinas son glicósidos (combinación de azúcares y agliconas o sapogeninas) que están presentes en gran diversidad de plantas y se caracterizan por su capacidad para formar espuma en soluciones acuosas. Existen dos clases de saponinas: las de tipo esteroidal, generalmente triterpenos tetracíclicos, y las de tipo triterpenoides pentacíclicos, estas últimas conocidas comúnmente como saponinas triterpenoides. (8,30)

Las sapogeninas inyectadas en la sangre muestran un efecto hemolítico aún en diluciones de 1:50,000 o más. Por ingestión éstos compuestos son relativamente inofensivos a los animales de sangre caliente. Son muy tóxicas para los animales de sangre fría por su efecto en reducir la tensión superficial, por lo que son utilizados como venenos para peces. En cambio las sapogeninas son inactivas fisiológicamente, ó mucho menos activas que saponinas de que forman parte. (8,31)

Otra característica de las saponinas es su capacidad para formar compuestos estables con la adición de fenoles, mercaptanos y alcoholes superiores, tales como el colesterol y otros 3β -hidroxiesteroides. Esta propiedad es aprovechada para aislar la saponina y para purificar el esteroide. (8)

Las saponinas tripterpénicas poseen comúnmente el anillo de oleano y con menor frecuencia el sistema de ursano o damarano. Son las más abundantes en la naturaleza. (32)

Las saponinas esteroidales están constituidas principalmente por derivados del espirostanol y furostanol. Aunque las moléculas de azúcar incluyen mayormente glucosa, ramnosa, xilosa y arabinosa (30,34), éstos se enlazan a grupos hidroxilo en el átomo de carbono 3, dando un oligoglicósido con una estructura ramificada. Con el aumento molecular de los azúcares en los glicósidos del espirostanol, sus características de hemólisis, veneno para peces y precipitación con el colesterol aumentan también. (19)

Las saponinas tipo furostanol son 26-o-glucosídicos, y las moléculas glucosídicas se liberan fácilmente por acción de las enzimas, un hidroxilo en posición 26 toma lugar por reacciones de deshidratación en posición 22 dando lugar a un espirostanol. Así, el furostanol actúa como precursor en la biosíntesis de los glicósidos espirostánicos y se considera su prototipo ⁽³⁰⁾. Los glicósidos del furostanol muestran una de las características de las saponinas, exhiben un color rojo con el reactivo de Ehrlich. ⁽¹⁹⁾

Se sabe que los glicósidos del espirostanol inducen hemólisis, hemoaglutinación, acción antibacteriana y son venenosos para los moluscos y peces, por lo tanto, una hipótesis se tiene que la función de las saponinas en las plantas es actuar como defensa contra las bacterias y virus que atacan a las plantas. Así, el furostanol cambia inmediatamente a espirostanol, por la ayuda de enzimas específicas, proporcionando una acción antibacteriana. ⁽¹⁹⁾

3.4.1 Saponinas Triterpénicas

Las saponinas triterpenoides de importancia comercial se obtienen de las cortezas de quillay o palo de jabón (*Quillaja saponaria* Molina.), del fruto del jaboncillo y del jugo y la raíz de jabonera. Aunque la mayoría de las sapogeninas triterpenoides se obtienen de las saponinas correspondientes por hidrólisis ácida, existen algunas en estado libre, como por ejemplo el ácido ursólico, $C_{30}H_{48}O_3$, los ácidos elemólicos y el ácido boswélico. ⁽¹⁸⁾

Las saponinas triterpenoides se emplean en la fabricación de ladrillo acústico, placas, películas y papeles fotográficos, cerámica, extinguidores de incendios del tipo de espuma y pastas dentríficas; también sirve para producir espuma en bebidas (refrescos y cervezas), en champúes, jabones líquidos y preparados cosméticos y en emulsificación de aceites para pulverizar en árboles frutales. También se utilizan para la determinación del oxígeno en la sangre. Las sapogeninas de las saponinas triterpenoides no tienen aplicaciones comerciales. ⁽¹⁹⁾

3.4.2 Saponinas Esteroidales

Estas se caracterizan por poseer un esqueleto del tipo colestano ⁽³³⁾. Las más numerosas son pertenecientes al grupo de las β -amirina que salvo algunas excepciones, poseen grupos funcionales, solos o acompañados por funciones aldehídos, lactosas y comúnmente por ácidos carboxílicos. ⁽³³⁾

Las saponinas esteroidales se encuentran íntimamente relacionadas con los glicósidos cardíacos y con los glicoalcaloides esteroidales, pues todos ellos contienen un núcleo esteroidal así como un azúcar y todos poseen la propiedad de formar espuma al ser agitados con agua. Además, este tipo de saponinas también forma compuestos moleculares insolubles. Con toda clase de esteroides y esteroides, poseen una fuerte acción hemolítica y se les utiliza como venenos para los peces. ⁽⁸⁾

Hasta hace poco estaba limitada la aplicación práctica de las saponinas al uso de los extractos crudos en calidad de detergentes, agentes espumantes y venenos para los peces; pero en un estudio de la estructura de la sapogenina ha originado su empleo como materias primas para la fabricación de hormonas esteroidales. ⁽¹⁸⁾

Los vegetales que contienen saponinas se han utilizado profusamente en muchas partes del mundo por sus propiedades detergentes. En Europa la raíz de *Saponaria officinalis* L. y en América del sur, la corteza de *Quillaja saponaria*. En México y América Central destacan la *Dioscorea belizensis* y más recientemente los rizomas del Género *Smilax* sp. ^(31,34)

Las saponinas esteroidales están presentes en familias de las monocotiledóneas, especialmente en Dioscoreaceas (*Dioscorea* sp.), Amaryllidaceae (*Agave* sp.) y Liliaceae (*Yucca* y *Trillium* sp.) Aunque también se ha reportado en Scrofulaceae. Entre las dicotiledoneas, la presencia de diosgenina en la *Alholva* (Leguminosas) y alcaloides esteroidales en *Solanum* (Solanaceae), poseen importancia potencial. Algunas especies de *Strophanthus* y *Digitalis* contienen tanto saponinas esteroidales como heterósidos cardíacos. ⁽³⁴⁾

Entre las saponinas de origen vegetal, la más usadas es la diosgenina, obtenida por primera vez en 1936 de *Dioscorea tocoro* L. debido a su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides, diuréticos, vitamina D y heterósidos cardíacos.

Por otra parte, la importancia de las saponinas también la da el consumo de materias primas empleadas en la elaboración de esteroides. En 1968 se empleó un millón de kilogramos de materias primas, de las cuales 86% fueron productos naturales de origen vegetal, 6% de origen animal y 8% tuvieron como origen la síntesis total.

Así se sabe que la conversión de las saponinas esteroidales. En esteroides útiles fue posible cuando Russel Marker, en 1940, descubrió el procedimiento para degradar la cadena lateral de la sarsapogenina para obtener acetato de pregnenolona. (34)

3.4.3 Extracción

Las saponinas tienen elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro es difícil. Son hidrolizados por ácidos, dando una genina (sapogenina) y diversos azúcares. Actualmente se conoce que las saponinas son sustancias muy polares, y es posible extraerse en caliente o en frío con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Los materiales lipoides presentes en éstos extractos se separan con benceno. Al concentrar la solución alcohólica se separan las saponinas y después se cristalizan en mezclas de alcohol-agua. Para obtener sapogeninas se pueden hidrolizar las saponinas con sus enzimas naturales, con enzimas de origen microbiológico o hidrolizarlas con ácidos. Después se extraen con benceno, éter de petróleo o acetona y se recrystalizan. (32, 34,35)

3.4.4 Identificación y Cuantificación de saponinas

La identificación de saponinas se determina mediante pruebas de espuma y de hemólisis, mediante CCF usando como revelador reactivos específicos, que producen coloración. La técnica más

utilizada es la cromatografía CCF, en la que se utiliza mezclas de disolventes: cloroformo, metanol y agua.

El método para la cuantificación de sapogeninas propuesto por Baccou et.al, en 1977, se basa en reacciones de coloración con anisaldehído, ácido sulfúrico y acetato de etilo. (34, 35,)

Esta determinación puede realizarse directamente y no permite la interferencia de azúcares, esteroides, ácidos grasos y otros aceites vegetales, ya que las saponinas tienen las mismas propiedades colorimétricas ya sea que se encuentran en forma libre, enlazadas a azúcares, esterificadas con ácido acético o mono o polihidroxiladas.

La sensibilidad del método es especialmente buena, ya que la formación del cromóforo (complejo coloreado), puede ser detectado sin dificultad, utilizando una longitud de onda a 430nm. Compuestos como el colesterol, lanosterol, cortisol y cortisona no muestran interferencias y ningún tipo de absorción. (34)

La estructura de los productos coloreados aún no se ha dilucidado, sin embargo se cree que son los anillos E y F los que toman parte en reacciones de condensación. El ácido sulfúrico causa la hidrólisis de las saponinas, y las sapogeninas formadas reaccionan inmediatamente con el ácido sulfúrico, acetato de etilo y anisaldehído, formando un complejo coloreado responsable del espectro de absorción. (34,36)

3.5 Flavonoides

Los flavonoides, uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales, conocidos algunas veces como antioxantinas, aparecen frecuentemente revisados bajo diferentes aspectos en la literatura científica, especialmente en los últimos 30 años.

Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y en etanol, su carácter fenólico y su

intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basada inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; esto, seguido por un examen cromatográfico directamente del extracto y/o del extracto hidrolizado. La separación puede hacerse por procedimientos cromatográfico, y la identificación de los componentes individuales por comparaciones cromatográficas y espectroscópicas con compuestos estándar o con la literatura. (37)

Muchos productos vegetales, en especial pigmentos y colores (el nombre flavano viene del latín *flavus*, amarillo) son derivados polihidroxilados de las estructuras básicas. Usualmente se encuentran en las plantas en forma de glucósidos y pueden ocurrir en todas las partes de la planta. (38)

Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas (21). Los flavonoides también están universalmente presentes en la cutícula de la hoja y células epidérmicas donde ellos aseguran protección contra el efecto de la radiación ultravioleta. (27)

La acción farmacológica es también extensa y variada, son bien conocidas sus actividades contra la fragilidad capilar (bioflavonoides del género *Citrus*: rutina y derivados), dilatadoras de las coronarias (proantocianidinas de *Crataegus*, *Arnica* y *Gingko*), espasmolítica (glicósidos de apigenina), antihepatóxica (silimarina de *Silybum*), colerética, estrógeno y diurética. La actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de isoflavonas, como las de algunas especies de *Lupinus*. (37)

En cuanto a la estructura, se conocen como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C₆-C₃-C₆, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres

carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. (37)

Cada uno de las clases de flavonoides que existen, suelen encontrarse bajo la forma de glicósidos con un o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos.

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos; en muchos casos, debido a la complejidad de la mezcla es más frecuente el estudio de estos compuestos bajo la forma de agliconas para lo cual los extractos deben hidrolizarse previamente. Se hallan en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y la auronas. Al año 1990 se conocen alrededor de 3000 flavonoides, entre ellos 450 flavonoles, 300 flavonas, 150 isoflavonas, 60 chalconas, 20 auronas, etc. (37)

3.5.1 Extracción

Los disolventes empleados en la extracción de estos compuestos son muy variados y pueden ser desde muy polares como agua y etanol para glicósidos o agliconas muy hidroxiladas, hasta menos polares como éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas. Es recomendable emplear una sucesión de dos o más solventes, usualmente en el orden de lipofílico a hidrofílico; ejemplo: éter de petróleo, benceno, éter etílico, acetato de etilo, alcoholes y finalmente agua, aunque en este último caso se presenta la desventaja de su alto punto de ebullición y presión de vapor que dificultan luego el ser removido rápida y completamente del extracto; por otro lado, podrían ser extraído otros compuestos de alto peso molecular que usualmente interfieren en las subsiguientes etapas de purificación del flavonoide.

3.5.2 Identificación y cuantificación de flavonoides

Los flavonoides pueden detectarse en una cromatografía en capa delgada por el color que desarrollan en el espectro Visible (Vis) o en Ultravioleta (UV); debido a la relación que existen entre los colores y la posible estructura del flavonoide.

El espectro de absorción en el UV-Vis del compuesto aislado es útil para determinar el tipo y la cantidad de flavonoide.

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en los rangos de 240-285nm y 300-550nm. La variación de estos rangos depende del modelo de hidroxilación y del grado de sustitución de los hidroxilos. (37)

La reacción de flavonoides con sales metálicas como el cloruro de aluminio actúa como excelente catalizador para la reacción de cloración.

La reacción de un o-hidroxialdehído aromático con un aldehído o una cetona en presencia de ácido da un derivado benzopirano llamado sal de benzopirilio. Un probable intermedio en la reacción es el hemiacetal cíclico, que es una pseudobase como la que se encuentra en equilibrio con hidróxido de oxonio.(38) La metenamina también denominada hexametilentetramina, cuya estructura es un anillo cíclico, es utilizada para catalizar las reacciones de resinas de fenol-formaldehído. (30)

4. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país que posee una gran variedad de especies de plantas medicinales y los habitantes sobre todo en el área rural, aprovechan los recursos de la flora, a los que les atribuyen propiedades medicinales. Los productos naturales han sido la principal fuente de agentes terapéuticos de la humanidad durante siglos, constituyendo su uso una costumbre muy importante en las raíces culturales de los pueblos indígenas. Este tipo de productos representa el 50% de las drogas de uso clínico en países desarrollados; en Guatemala, especialmente en el área rural, representan casi la única alternativa terapéutica.

El estudio de las plantas medicinales ha ganado importancia. Los países en vías de desarrollo han enfocado sus investigaciones principalmente en la obtención de medicamentos a partir de los diferentes compuestos extraídos de plantas medicinales autóctonas que no han sido estudiadas. Por lo tanto es valiosa la aplicación de la metodología para la cuantificación de sapogeninas y flavonoides mediante espectrofotometría visible y la caracterización por el método de CCF.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos Generales

- 5.1.1 Caracterizar los marcadores químicos de tres especies por métodos cromatográficos.
- 5.1.2 Cuantificar el porcentaje de sapogeninas esteroidales y flavonoides totales mediante espectrofotometría en la región visible.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1 Caracterizar las sapogeninas esteroidales presentes en las tres especies vegetales por técnicas macro, semimicro y cromatografía en capa fina (CCF).
- 5.2.2 Caracterizar los flavonoides presentes en las tres especies vegetales por técnicas macro, semimicro y cromatografía en capa fina (CCF).
- 5.2.3 Cuantificar sapogeninas esteroidales en hojas de *Lippia graveolens* y *Passiflora edulis*, y en rizomas de *Smilax domingensis*.
- 5.2.4 Cuantificar flavonoides totales en hojas de *Lippia graveolens* y *Passiflora edulis*, y en rizomas de *Smilax domingensis*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Universo

6.1.1 Población: adquiridas por el Laboratorio Farmaya.

Especie	Procedencia	No. de herbario
Hojas de <i>L. graveolens</i>	Alameda, Chimaltenango.	456
Hojas de <i>P. edulis</i>	Cacaotal, Suchitepequez.	892
Rizoma de <i>S. domingensis</i>	Samayac, Suchitepequez.	662

6.1.2 Muestra

Extractos etanólicos de las hojas de *L. graveolens*, *P. edulis* y rizoma del *S. domingensis*.

6.2 Medios

6.2.1 Recursos humanos

Autora: Claudia Mariela Teleguario Sicaján

Asesora: Licda. Sully Cruz

Coasesor: Lic. Armando Cáceres.

Revisora: Licda. Beatriz Medinilla

6.2.2 Fuentes de financiamiento

Proyecto: Determinación fitoquímica y de actividad antifúngica de cultivares de *Solanum americanum* Miller y caracterización de preparaciones para la industria fitofarmacéutica, DIGI.

6.2.3 Recursos materiales, equipo y reactivos

- ✓ Balones volumétricos de 25 ml
- ✓ Balones volumétricos de 100 ml
- ✓ Balones volumétricos de 50 ml
- ✓ Beacker de 100 ml
- ✓ Agitadores de vidrio.
- ✓ Probetas de 50 ml
- ✓ Pipetas volumétricas de 2 ml
- ✓ Pipetas volumétricas de 1 ml

- ✓ Frascos color ámbar de 100 ml
- ✓ Frascos color ámbar de 25 ml
- ✓ Percolador
- ✓ Estufa eléctrica
- ✓ Baño de maría
- ✓ Campana de extracción de vapores
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Rotavapor Buch V-200
- ✓ Espectrofotómetro Agilent 8453 UV-Visible
- ✓ Estándar de saponinas y flavonoides.
- ✓ Manta eléctrica
- ✓ Reflujo
- ✓ Soxhlet
- ✓ Bomba de vacío
- ✓ Termómetro
- ✓ Kitazato
- ✓ Manguera de vacío
- ✓ Etanol 40 %
- ✓ Etanol al 50 %.
- ✓ Etanol al 95°
- ✓ Etanol al 70 %
- ✓ Ácido sulfúrico al 10 %
- ✓ Ácido sulfúrico concentrado
- ✓ Anisaldehído
- ✓ Acetona
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Acido acético SR en metanol
- ✓ Cloruro de aluminio SR
- ✓ Acetato de etilo
- ✓ Solución acuosa de metenamina SR
- ✓ Agua destilada
- ✓ Hielo
- ✓ Embudo
- ✓ Papel filtro.

6.3 Procedimiento: ⁽³⁹⁾

6.3.1 Obtención de muestras:

6.3.2 Revisión bibliográfica

6.3.3 Preparación de los extractos por percolación.

6.3.3.1 Llenado de percolador

Colocar en la punta del percolador un pedazo de algodón adecuado, de manera que sirva de filtro. Cortar un pedazo de papel filtro de forma circular y colocarlo cubriendo el fondo del percolador.

Tapar la punta del percolador con un tapón plástico

Agregar la tercera parte de la cantidad pesada de materia vegetal seca y cubrir con etanol (con el mejor porcentaje de concentración de cada especie).

Verificar que no queden burbujas y si las hay, hace presión una espátula para desaparecerlas.

Agregar el resto de material vegetal seco y cubrir nuevamente con etanol, repetir el paso anterior.

Rotular el percolador con el nombre científico de la planta, nombre común, fecha y peso. Dejar reposar por 12-24 horas para que reaccione.

Retirar el tapón plástico y dejar gotear hasta que salga todo el disolvente.

Pasar el disolvente del percolador al balón del rotavapor para concentrar.

Recibir el disolvente destilado y volver a agregar al percolador hasta cubrir, dejar reposar esta operación se repite dos veces.

6.3.4 Concentración en rotavapor. ⁽³⁹⁾

6.3.4.1 Encender el baño de maría y llevar a temperatura a 45 ± 5 °C

Engrasar todas las bocas esmeriladas y armar el rotavapor según el instructivo específico.

Conectar la bomba de vacío y el rotavapor e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a consistencia semisólida.

Verter el extracto concentrado en una caja de petri de vidrio debidamente tarada y rotulada.

Colocar en una desecadora.

Calcular el rendimiento del extracto

Cuando el extracto tenga consistencia sólida, pasar a viales debidamente tarados y rotulados y guardar a 4°C.

6.3.5 Identificación de saponinas mediante tamizaje fitoquímico. (40)

6.3.5.1 Identificación de saponinas por prueba de espuma:

Tubo 1: 100 mg de material vegetal pulverizado y seco

Tubo 2: 2 ml de control de saponinas (0.5 %).

Tubo 3: 2 ml de agua

Adicionar a cada tubo 10ml de agua destilada.

Calentar en baño de maría (60 °C) durante 30 minutos.

Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 40 segundos.

Dejar reposar los tubos durante 30 minutos.

Observar la formación de capa de espuma.

Si una capa de espuma es mayor de 3 cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

6.3.5.2 Identificación de saponinas por CCF. (40)

Pesar 1 g del extracto.

Extraer con 10 ml de etanol al 70 %

Calentar durante 10 minutos.

Filtrar la solución del extracto

Proceder a aplicar 20 µl de la solución del extracto filtrado en una cromatoplaque de silicagel 60 F₂₅₄.

Preparar estándar de saponinas, β-sitosterol, estigmasterol, ergosterol y sarsapogenina al 0.1 por ciento en metanol (10 µl).

Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (32-25-5)

Detección con reactivo revelador: vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas y amarillentas.

6.3.5.3 Cuantificación de sapogeninas esteroidales mediante espectrofotometría visible. ^(32,36)

- a) Pesar exactamente 0.2500 g de extracto vegetal
- b) Añadir 50 ml de etanol 95°
- c) Agitar y calentar en baño maría a 60 °C por 20 minutos
- d) Luego filtrar
- e) Transferir una alícuota de 4 ml a un beacker de 50 ml
- f) Evaporar a sequedad en baño maría.
- g) Enfriar a temperatura ambiente
- h) Añadir 2 ml de acetato de etilo
- i) Añadir 1 ml de reactivo A
- j) Añadir 1ml de reactivo B
- k) Agitar y calentar a 60 °C en baño maría durante 20 minutos
- l) Enfriar a temperatura ambiente.
- m) Leer a una absorbancia a 430 nm.
- n) Utilizando blanco: mezcla de 2 ml de acetato de etilo, 1 ml de reactivo A y 1 ml de reactivo B.

El estándar utilizado fue la Diosgenina, con la concentración de 0.85 mg/ml, en el anexo de la tabla 6 se muestran las concentraciones de la curva de calibración.

Reactivo A: 0.5 ml de anisaldehído + 99.5 ml de acetato de etilo

Reactivo B: ácido sulfúrico concentrado en acetato de etilo para llegar al 50 %

6.3.5.4 Identificación de flavonoides mediante ensayo macro y semimicro. (40)

Extraer 1.5 g de extracto vegetal con 10 ml de etanol o metanol al 80 %.

Filtrar y concentrar.

Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15 ml de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora.

Disolver el residuo en 30 ml de metanol al 80 %

Filtrar y dividir en 7 tubos:

Tubo 1: agregar 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado

Tubo 2: agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 % (p/v)

Tubo 3: agregar 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 10 gotas de ácido clorhídrico.

Tubo 5: agregar álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: agregar solución de ácido bórico en anhídrido acético

Tubo 7: testigo.

Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavononoles (rojo a magenta), flavononas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

6.3.5.5 Identificación por CCF. ⁽⁴⁰⁾

Extraer 0.5 g de extracto vegetal con 5 ml de metanol por 5 minutos en baño maría a 60 °C.

Filtrar la solución y aplicar sobre cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄

Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05 por ciento en metanol (10 µl) de quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido.

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (50:5.5:5.5:13.5)

Detección:

Sin tratamiento químico: UV 254 nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensa en UV-365 nm

Solución 1: metanólica al 1 % de difenilboriloxietilamina (NP)

Solución 2: solución etanólica al 5 % de polietilenglicol 4000 (PEG).

Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas.

6.3.5.6 Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría visible ⁽⁴¹⁾

Solución madre:

Pesar exactamente 0.4 g de droga pulverizada.

Colocar la muestra en balón de fondo redondo de 100ml.

Añadir 1 ml de solución acuosa de metenamina SR, 20ml de acetona y 2 ml de ácido clorhídrico.

Calentar en baño de María, bajo reflujo durante 30 minutos.

Filtrar la mezcla con algodón en un balón volumétrico de 100 ml.

El residuo de la droga regresar al balón de fondo redondo y adicionar 20 ml de acetona.

Calentar hasta ebullición bajo reflujo durante 10 minutos, filtrar con algodón nuevamente para el balón volumétrico de 100 ml.

Repetir la operación nuevamente colocando el residuo de la droga y el algodón hacia el balón de fondo redondo, adicionar 20 ml de acetona y calentar bajo reflujo, durante 10 minutos.

Filtrar en el mismo balón volumétrico de 100 ml. Después de enfriar a temperatura ambiente, ajustar a un volumen hasta 100 ml con acetona.

En un embudo de separación, tratar 20 ml de esta solución con 20 ml de agua y extraer con 15 ml de acetato de etilo repitiendo tres veces, con porciones de 10 ml de acetato de etilo.

Reunir las fases de acetato de etilo y lavarlas pasando por un embudo de separación 2 porciones de 50 ml de agua, transferir y seguir por fases de acetato de etilo hacia el balón volumétrico de 50 ml completando el volumen con acetato de etilo.

Solución muestra:

Transferir 10 ml de solución madre en un balón volumétrico de 25 ml.

Adicionar 1 ml de reactivo de cloruro de aluminio solución de referencia (SR) y completar el volumen con solución metanólica de ácido acético solución de referencia (SR).

Solución blanco:

Transferir 10 ml de solución madre en un balón volumétrico de 25 ml y completar el volumen con una solución metanólica de ácido acético solución de referencia (SR).

Medir la absorbancia de la solución muestra a 425 nm (v.2.14-3) 30 minutos después de su preparación, utilizando la solución blanco para ajuste de cero. Calcular el contenido del flavonoides totales, según la ecuación

$$Q = \frac{A * 62500}{500 * m * (100 - Pd)}$$

En donde:

A = absorbancia medida

m = peso de la droga (g)

Pd = determinación de agua (%)

El resultado se expresa en porcentaje (p/p) de flavonoides calculados como quercetina (C₁₅H₁₀O₇).

6.4 Diseño de investigación

Se basa en una investigación descriptiva y experimental

6.4.1 Diseño de muestreo: Se seleccionaron tres muestras para el estudio adquiridas por el laboratorio de Farmaya.

6.4.2 Variables independientes:

Presencia de sapogeninas esteroidales y flavonoides y la cuantificación de éstas mismas.

6.4.3 Análisis de Resultados:

Se determinó el porcentaje de rendimiento, se identificó y cuantificó sapogeninas por medio de la ecuación de la curva de calibración y para los flavonoides por medio de una fórmula calculado como quercetina.

7. RESULTADOS

7.1 Rendimiento de extractos de las plantas en estudio

Se observa la cantidad de extracto obtenido en gramos y el porcentaje de rendimiento de cada uno. *L. graveolens* obtuvo mejor porcentaje de rendimiento.

Cuadro 1. Porcentaje de rendimiento

Especie	Peso (g)	Extracto (g)	Porcentaje de rendimiento
<i>P. edulis</i>	115.8	21.3	18.4%
<i>L. graveolens</i>	137.2	42.6	31.05%
<i>S. domingensis</i>	125.2	23.4	18.7%

7.2 Ensayos de caracterización fitoquímica de las especies

Se realizaron tres repeticiones para cada especie para la presencia de espuma, se observó abundante espuma en *L. graveolens* y *S. domingensis*.

Cuadro 2. Prueba de espuma

Especies	Primera prueba	Segunda prueba	Tercera prueba
<i>P. edulis</i>	+	+	+
<i>L. graveolens</i>	+	++	++
<i>S. domingensis</i>	++	++	++

+ = poco

++ = abundante

7.3 Prueba cualitativa en cromatografía en capa fina de saponinas

En la identificación de saponinas todas las muestras presentaron Rf similares a las del estándar de sapogenina esteroidal, por lo que se confirma presencia de sapogeninas esteroidales. Las primeras dos presentaron más bandas que la última.

Cuadro 3. Análisis cromatográfico

Especies	Coloración	Valor Rf	No. de bandas
<i>P. edulis</i>	violeta	a. 0.33	4
	amarillo	b. 0.52	
	rojo	c. 0.83	
	rojo	d. 0.94	
<i>L. graveolens</i>	violeta	a. 0.33	4
	amarillo	b. 0.52	
	rojo	c. 0.77	
	rojo	d. 0.94	
<i>S. domingensis</i>	violeta	a. 0.29	3
	amarillo	b. 0.52	
	rojo	c. 0.91	

Estándares	Coloración	Valor Rf	No. de bandas
Saponina de Quillaja	violeta	a. 0.29	3
	amarillo	b. 0.52	
	rojo	c. 0.90	
Estigmasterol	Rojo	0.97	1
β -sitosterol	Rojo	0.97	1
Sarsasapogenina	Naranja	0.97	1
Ergosterol	Violeta	0.97	1

Fase móvil: cloroformo – metanol – agua (16:12.5:2.5); Revelador: vainillina – ácido sulfúrico.

7.4 Cuantificación de saponinas esteroidales mediante análisis espectrofotométrico

Se realizaron tres repeticiones para cada especie, en esta tabla se observa las concentraciones del promedio de las repeticiones con su respectivas desviación estándar a la longitud de onda de 430 nm.

Cuadro 4. Porcentaje de saponinas

Especie	concentraciones (%) y desviación estándar
<i>P. edulis</i>	0.7059 \pm 0.01142
<i>L. graveolens</i>	1.36 \pm 0.1220
<i>S. domingensis</i>	1.63 \pm 0.00577

λ max = longitud de onda de máxima absorción fue 430nm

7.5 Prueba cualitativa de flavonoides

En la determinación de flavonoides todas las muestras mostraron cambios de coloración y turbidez por lo que se puede afirmar que contiene flavonoides.

Cuadro 6. Ensayo macro y semimicro

Especies	Ácido sulfúrico concentrado	FeCl ₃ 10 %	HCl concentrado	Mg + HCl
<i>P. edulis</i>	+	+	+	+
<i>L. graveolens</i>	++	+	+	+
<i>S. domingensis</i>	++	+	+	+

Especies	Hidróxido acuoso	Ácido bórico	Testigo
<i>P. edulis</i>	+	+	-
<i>L. graveolens</i>	+	+	-
<i>S. domingensis</i>	+	+	-

(+) = se considera cuando hay precipitación, turbidez o cambio de coloración.

7.6 Cromatografía en capa fina de flavonoides

En la identificación de flavonoides todas las muestras mostraron presencia de estos metabolitos con bandas del mismo color como los estándares utilizados.

Cuadro 7. Análisis cromatográfico

Especies	Coloración	Valor Rf	No. de bandas
<i>P. edulis</i>	azul-celeste	a. 0.22	3
	naranja	b. 0.74	
	naranja	c. 0.98	
<i>L. graveolens</i>	naranja	a. 0.22	3
		b. 0.61	
		c. 0.99	
<i>S. domigensis</i>	azul-celeste	0.20	4
		0.72	
		0.90	
	naranja	0.99	

Estándares	coloración	Valor Rf	No. de bandas
Quercetina	naranja	0.99	1
Ácido Clorogénico	azul – celeste	0.18	2
		0.64	
Hiperósido	naranja	0.88	1
Rutina	amarillo	0.54	1

Fase móvil: acetato de etilo – ácido fórmico – ácido acético glacial – agua (33.3:3.6:3.6:9) todo bajo luz UV a 365m. Revelador: NP/PEG.

7.7 Cuantificación de flavonoides totales mediante análisis espectrofotométrico.

Se realizaron tres repeticiones para cada especie, en esta tabla se observa el promedio de las repeticiones con su respectivo desviación estándar a la longitud de onda de 425 nm.

Cuadro 8. Porcentajes de flavonoides

Especies	Concentraciones (%)
<i>P. edulis</i>	0.2675 ± 0.0255
<i>L. graveolens</i>	2.4343 ± 0.2285
<i>S. domnigensis</i>	0.0871 ± 0.00763

Se evaluaron los porcentajes de humedad, para las tres especies, ya que en la fórmula incluye el porcentaje de humedad. (Ver anexos).

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se analizaron tres especies diferentes para la caracterización fitoquímica y cuantificación de sapogenina esteroidal y flavonoides mediante el uso de CCF y espectrofotometría de la región visible.

Para la preparación de extractos de las tres especies se utilizó etanol, para la selección del mejor disolvente se realizaron pruebas de sólidos totales a diferentes concentraciones determinando que la mejor concentración para *P. edulis* es 50% con un porcentaje de rendimiento de 18.4%; mientras que *L. graveolens* y *S. domingensis* fueron de 70% y 95% respectivamente, éstas dos últimas especies ya se tenían la información sobre las concentraciones para la mejor extracción y los porcentajes de rendimiento fueron 31.05% y 18.7% respectivamente.

En el análisis fitoquímico de los extractos se identificaron metabolitos secundarios como las sapogeninas esteroidales y flavonoides, también se utilizaron estándares para comparar los posibles metabolitos presentes en las plantas.

En la identificación semimicro de saponinas, de la prueba de espuma, los extractos de las tres especies presentan espuma, para *L. graveolens* y *S. domingensis*, mostraron abundante espuma, mientras que *P. edulis* mostró escasa espuma, esta formación de espuma se debe a la desintegración o hidrólisis de cadenas glicosídicas y la propiedad tensoactiva de las sapogeninas. ⁽³⁴⁾ Luego de mostrar la presencia de sapogeninas, se procedió a un análisis cromatográfico en capa fina, para la identificación de sus metabolitos. Ver anexo (tabla 1). Se utilizaron como referencias los estándares de saponina de *Quillaja*, ergosterol, β -sitosterol, estigmasterol y sarsasapogenina, el estándar de saponina *Quillaja* presentó tres bandas: un $R_f = 0.29$ de coloración violeta, un $R_f = 0.52$ de color amarillo y un $R_f = 0.90$ de color rojo, la muestra que presentó el valor de 0.29, fue para *S. domingensis*, y para *P. edulis* y *L. graveolens* presentaron un valor $R_f = 0.33$ que fue muy cercana al estándar de saponina de *Quillaja*, todas las muestras mostraron

bandas de coloración violeta. También se presentaron bandas de coloración roja para las tres especies: *P. edulis* Rf = 0.83 y 0.94; *S. domingensis* con Rf = 0.91 y *L. graveolens* con Rf = 0.77 y 0.94 lo que significa que presentan en su composición química: estigmasterol y β -sitosterol cuyo valor Rf fueron 0.97.

Así como se detectaron bandas de color amarillo con valor Rf = 0.52 para las tres especies y el estándar de saponina *Quillaja*. El total de número de bandas para las especie de *P. edulis* y *L. graveolens* fueron cuatro y para *S. domingensis* fueron tres.

De acuerdo a la metodología propuesta por Baccou, para la cuantificación de sapogenina esteroidal. Se prepararon las muestras como indica la metodología, se agregaron reactivos específicos de manera que presentara color, es decir debe poseer grupos cromóforos para ser detectados en la región visible del espectro.

Previo a la lectura de las muestras se hizo un barrido del estándar de sapogenina esteroidal (diosgenina) indicada por el método, a la longitud de onda de 430nm. Se realizó la curva de calibración para determinar las concentraciones de las muestras.

Los resultados obtenidos de sapogeninas por espectrofotometría para la especie de *L. graveolens*, el promedio de las tres repeticiones fue: 1.36 % (desviación estándar 0.1220), así como para la especie de *P. edulis* el promedio fue 0.7059 % (desviación estándar 0.01142).

En cuanto al *S. domingensis* el porcentaje promedio fue de 1.63 % (desviación estándar 0.00577).

Todos los resultados fueron interpretados por medio de la ecuación realizada por las curvas de calibración. Ver anexo (tablas 3-6)

Para la identificación de flavonoides mediante las pruebas macro y semimicro, de una muestra se dividieron en siete tubos y se observaron cambio de coloración, con diferentes reactivos para cada tubo, esto es con el fin de evaluar las reacciones frente a testigo (sin tratamiento). Luego de confirmar la presencia de flavonoides se procedió al análisis por cromatografía en capa fina se utilizaron estándares de, ácido clorogénico, hiperósido, rutina y quercetina.

Dentro de la composición química de las tres especies estudiadas se identifican flavonoides como quercetina ya que presentaron bandas de coloración naranja. Y para las especies *P. edulis* y *S. domigensis*, presentaron manchas de coloración naranja lo que indica la presencia de hiperósido, también mostraron color azul – celeste que indica la presencia de ácido clorogénico. (Ver tabla 2).

En el análisis cuantitativo de flavonoides, el porcentaje promedio de las tres repeticiones para la especie *L. graveolens* fue de 2.4343 % (desviación estándar 0.2285) esto indica que dicha especie es una fuente rica de flavonoides, pudiendo ser empleada como materia para aportar estudios de actividades biológicas.

La presencia de flavonoides totales para *P. edulis* el porcentaje promedio de las tres repeticiones fue 0.2675 % (desviación estándar 0.0255) de su contenido, así como el *S. domingensis* presentó un promedio de 0.0871 % (desviación estándar 0.00763).

Los resultados obtenidos de los flavonoides totales son expresados en porcentaje (p/p) calculados como quercetina y con una longitud de onda de 425 nm (ver tabla 7-9).

9. CONCLUSIONES

1. Se identificaron saponinas esteroidales en las tres especies estudiadas mediante pruebas de caracterización fitoquímica y análisis espectrofométricos.
2. En el ensayo fitoquímico, la prueba de espuma fue abundante para la especie *S. domingensis* y los valores Rf resultaron valores cercanos al estándar de saponina de las tres muestras mediante cromatografía en capa fina.
3. En el análisis cuantitativo, *S. domingensis* presentó mayor porcentaje de saponinas esteroidales (1.63%), seguido de *L. graveolens* (1.36%) y *P. edulis* (0.7059%).
4. Se identificaron flavonoides en las tres especies estudiadas, que se detectaron quercetina; *P. edulis* y *S. domingensis* mostraron ácido clorogénico e hiperósido en su composición química mediante cromatografía en capa fina.
5. El porcentaje de flavonoides presentes en *L. graveolens* fue mayor (2.4343%), lo que indica que es una fuente rica de flavonoides que puede ser de gran interés para las industrias y posteriores estudios biológicos.
6. El rizoma de la especie de *S. domingensis* presentó el menor porcentaje de flavonoides (0.0871%), mientras que *P. edulis* el porcentaje fue 0.2675%.

10. RECOMENDACIONES

1. Validar los métodos de la cuantificación de flavonoides totales y saponinas totales mediante espectrofotometría de la región visible a las condiciones de laboratorio.
2. Realizar los mismos estudios a estas especies investigadas, pero a diferentes condiciones climáticas, época de recolección y ubicación geográfica.
3. Realizar estudios a la especie *L. graveolens*, que es una fuente rica de flavonoides para evaluar su actividad biológica.
4. Aislar y elucidar la estructura química de los flavonoides y saponinas presentes en las especies.

11. REFERENCIAS

1. Pascual, M. et.al. 2001. Lippia tradicional uses, Chemistry and Pharmacology a review. Journal of Ethnopharmacology. 76:1-214.
2. Standley. P. et.al. 1970. Flora of Guatemala. Fieldana Botany Vol. 24 part IX. N1.2 Museum of Natural History. Chicago USA.
3. Cáceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala Editorial Universidad de San Carlos de Guatemala pp. 349-351.
4. Gupta, M. 1975. Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santa Fe de Bogotá. DC. Colombia.
5. Hoose, P. Lagos-witte 1989. Manual Popular de 50 Plantas Medicinales de Honduras pp. 134.
6. Hoose. P et.al 1995. Plantas Medicinales Comunes en Honduras. Litografía López, S. pp. 555.
7. Maffroli, A. 1987. El uso de algunas plantas medicinales de costa Rica. Trejos Hnos. San José. Costa Rica pp.60.
8. Kirk, R. 1962. Enciclopedia de Tecnología Química. Editorial Unión Tipográfica Hispano-americana. México Vol 9, 12 y 15 pp. 179-187.
9. Goenther, E. 1949. Individual Essential Oils of the Plants Families Retacea and Labiatae. Van Nostraband Company, Inc New York. Volume three pp 535-540
10. Lawrence, B. 1984. The Botanical and Chemical Aspects of Oregano.
11. Velásquez, R. 2003. Determinación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia graveolens* H.BK. (orégano) por Cromatografía de gases. Tesis de graduación Químico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. pp. 20
12. Barret, B. 1994. Medicinal Plant Nicaragua's Atlantic COAST economic Botany 48: 8-20
13. Herrera, J. 1981. Recopilación Botánica y Análisis Químico Cualitativo de Algunas especies de plantas consideradas Medicinalmente en Guatemala. Tesis de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. pp. 10.

14. León, J. 1987. Botánica de los Cultivos Trópicos. 2ª edición, Costa Rica. Jerruci. Editorial IICA. Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura. pp.495.
15. Mejía, K 1995 Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonia Peruana, Perú, Agencia Española de Cooperación Internacional AECI, Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana IIAP pp.249.
16. Ventura, M. 2003. Equiparación Fitoquímica entre cuatro especies Pasifloraceae medicinalmente en Guatemala. Tesis de Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. pp. 6,7,8.
17. Arbelaez, C. *et.al.* 1983. Medicina, Shamanismo y Botánica. Colombia Fundación de Comunidades Colombianas (FUNCO) pp156.
18. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). 1993. Manual de Técnica de Investigación, Bogotá. Colombia. Proyecto X-1. s/p.
19. Nohara, T. 1989. Analysis of Sterols and other Biologically Significant Steroids. Academic Press INC. USA. pp. 119-131.
20. Roca, C. 2005 Evaluación comparativa de la acción sedante e hipnótica de un elixir fitoterapéutico y la combinación de las plantas originales. Tesis de Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. pp. 9,10.
21. Alonso, J. 1998. Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas. Ediciones SRL Argentina.
22. De la Cruz, B. 2005. Caracterización de Cinco Extractos de Plantas Medicinales Nativas de Guatemala, Validadas Científicamente. Tesis de Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. pp. 10-11.
23. Martínez, J. *et.al.* 2000. Fundamentos de agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas. 1ª edición. Santa Fé de Bogotá, Colombia. Editorial Álvaro Campo Cabal.
24. Robles, G. 1998. Plantas Medicinales del Género *Smilax* en Centro América Costa Rica. Turrialba CYTED – CATIE.
25. Morton, J. 1981 Atlas of Medicinal Plants of Middle American. Springfield, Charles C. Thomas 1420 pp.

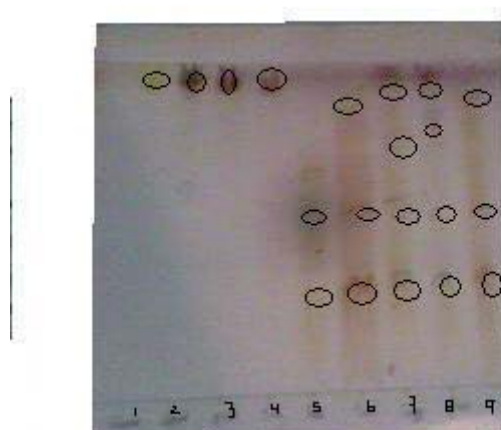
26. Sharapin, N. et.al 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Publicación del Convenio Andrés Bello, CAB, y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, CYTED. Colombia. pp. 35-45.
27. Solis, P. et.al. Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos. Organización de los Estados Americanos. pp. 47, 48.
28. Planter. 1989. Obtención y Aprovechamiento de de Extractos vegetales de la flora Salvadoreña. Universidad de San Salvador. San Salvador pp.619.
29. Douglas, A. 1989. Fundamental of Analytical Chemistry. 4ª edición, Sander Collage Publishing.
30. The Merk Index. 1983. 10ª edición Merck & Co. INC, USA. Pp. 8392, 8218, 8230.
31. Evans, T. 1991. Farmacognosia. 13ª edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. México. pp. 519-525
32. Medinilla. B. 1993. Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas. pp. 8-9
33. Silva, M. 1992. Química de los Triterpenos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D.C.
34. Temaj, Sandra. 1995. Cuantificación de Saponinas esteroidales en hojas y rizomas de *Smilax lundellii* (zarzaparrilla). Tesis de Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. pp. 15, 16, 21.
35. Santa, C. 1987. Manual de Selección Fitoquímica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala pp.43-51.
36. Baccou, J. 1977. Spectrophotometer Method for the Determination of Total Steroidal Sapogenin Analyst. 102:458-465.
37. Lock, O. 1997. Colorantes Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. pp. 71-83.

38. Noller, C. 1966. Química Orgánica. 3ª edición. Editorial Interamericana, S.A. México. pp. 175.
39. Molina, R. 2005. determinación de la actividad biocida del extracto etanólico y sus fracciones (hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa) de hojas de *Cornutia pyramidata* (jorobté). Tesis de Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. pp. 23, 24.
40. Manual de Operaciones. 2005. Tamizaje Fitoquímico. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. pp. 3,5
41. Enriquez, E. Comunicación personal. Brasil.
42. Morataya, M. 2006 Caracterización farmacopeica de 4 plantas aromáticas nativas de Guatemala: *Ocinum micranthum*, *Lippia graveolens*, *Lippia alba*, *Lippia chiapensis*. Tesis de Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. pp. 30.
43. Naciones Unidas. 1993 Centroamérica: La producción de Medicamentos Fitoterapéuticos y de Materias Primas Agrícolas para la Industria farmacéutica. Comisión económica para América Latina y el Caribe – CEPAL- 93-7-102 pp.150.

12. ANEXOS

12.1 Gráficas de cromatografía en capa fina.

Tabla. 1 Cromatografía de saponinas esteroideal y estigmasterol.



Analitos con el Rf respectivamente:

1.Sarsasapogenina, (0.97) 2.ergosterol, (0.97) 3.β-sitosterol, (0.97) 4.estigmasterol, (0.97)
5.saponina *Quillaja*,(0.29) 6.*S.domingensis*,(0.29) 7.*L. graveolens*,(0.33) 8. *P.edulis*,(0.33) 9.
S.domingensis (0.29).

Tabla. 2 Cromatografía de flavonoides



Analitos con Rf respectivamente:

1.Quercetina (0.99), 2.Rutina (0.54), 3.ácido clorogénico ((0.18), 4.Hiperósido (0.88),
5.*S.domingensis* (0.72), 6.*P.edulis* (0.22), 7.*L. graveolens* (0.61).

12.2 Análisis cuantitativo de sapogenina esteroideal

Tabla. 3

A. Datos detallados de la cuantificación de sapogeninas esteroideas a la longitud de onda de 430 nm

Especie	Peso (mg)	Abs	Resultados (%)
<i>P. edulis</i>	250.2	0.14919	0.7210
	249.0	0.14465	0.7032
	248.9	0.14199	0.6934

Tabla. 4

A. Datos detallados de la cuantificación de sapogeninas esteroideas a la longitud de onda de 430 nm

Especie	Peso (mg)	Abs	Resultados (%)
<i>L. graveolens</i>	250.0	0.076299	1.53
	249.5	0.064167	1.30
	248.1	0.06088	1.25

Tabla. 5 Datos detallados de la cuantificación de sapogeninas esteroideas a la longitud de onda de 430nm

Especie	Peso (mg)	Abs	Resultados(%)
<i>S. domingensis</i>	125.3	0.17076	1.64
	125.1	0.16898	1.63
	125.2	0.16953	1.63

λ = longitud de onda 430nm

Std de Diosgenina:

Tabla 6. Concentración de la solución madre: 0.085g/100ml = 0.85mg/ml
Ecuación lineal del estándar: $Y = 0.0859x - 0.0672$ $R^2 = 0.9647$

Diluciones ml/ml	Concentración (mg/ml)	Abs.
5/25	0.17000	0.033147
10/25	0.34000	0.095932
15/25	0.51000	0.16484
20/25	0.68000	0.29660

12.3 Análisis de cuantificación de flavonoides totales

Tabla. 7 Datos detallados a la longitud de onda de 425 nm

<i>Pasiflora edulis</i>	Peso (g)	Absorbancia	Porcentaje (p/p)
1. lectura	0.4000	0.050297	0.2526%
2. lectura	0.4493	0.0586767	0.2624%
3. lectura	0.4304	0.061594	0.2876%

Tabla. 8 datos detallados a la longitud de onda de 425 nm

<i>L. graveolens</i>	Peso (g)	Absorbancia	Porcentaje (p/p)
1. lectura	0.4165	0.585766	2.2423%
2. lectura	0.4160	0.601437	2.3051%
3. lectura	0.4155	0.718060	2.7554%

Tabla. 8 datos detallados a longitud de onda de 425 nm

<i>S. domingensis</i>	Peso (mg)	Absorbancia	Porcentaje (p/p)
1. lectura	0.4001	0.0279450	0.0971%
2. lectura	0.4000	0.0246089	0.0856%
3. lectura	0.4000	0.0225966	0.0786%

12.4 Porcentaje de humedad

Tabla. 9

Especie	% humedad en promedio
<i>P. edulis</i> (extracto blando)	37.8
<i>L. graveolens</i> (extracto blando)	21.6
<i>S. domingensis</i> (extracto seco)	10.16

12.5 La obtención de resultados se expresó mediante la fórmula:

$$Q = \frac{A * 62500}{500 * m * (100 - Pd)}$$

En donde:

A = absorbancia medida

m = peso de la droga (g)

Pd = determinación de agua (%)

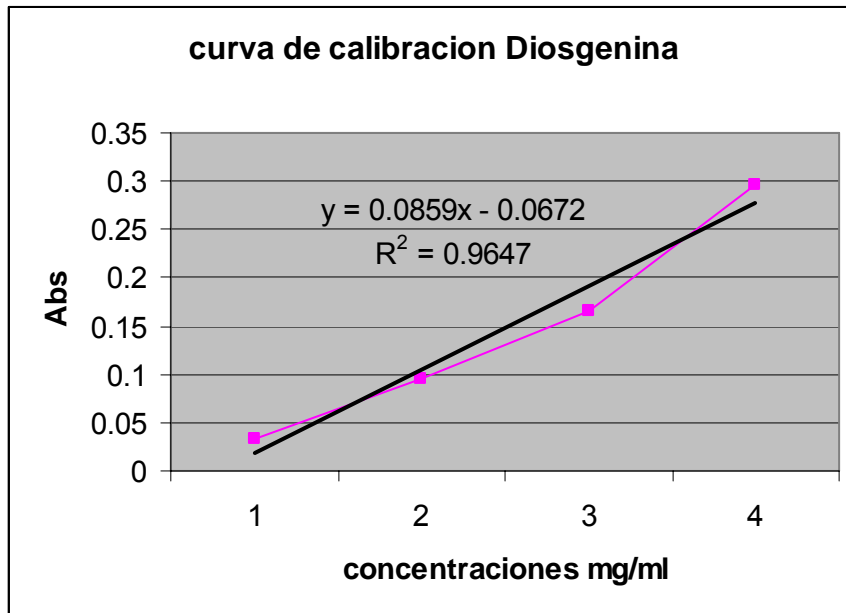


Figura. 1 a *Lippia graveolens* H.B.K



Figura 1. b



Figura 2. *Passiflora edulis* Sims



Figura 3. rizomas de *S. domingensis*

