

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA SECUENCIA METODOLÓGICA  
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS  
ESPECIALIZADOS PRESENTES EN EXTRACTOS  
VEGETALES**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**NORMA IVONEE MORALES BARRERA**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. FRANCISCO JAVIER LUNA VÁZQUEZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2025**

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA SECUENCIA  
METODOLÓGICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
METABOLITOS ESPECIALIZADOS PRESENTES EN  
EXTRACTOS VEGETALES”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**NORMA IVONEE MORALES BARRERA**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. FRANCISCO JAVIER LUNA VÁZQUEZ**

**SINODALES**

**Dr. FRANCISCO JAVIER LUNA VAZQUEZ  
DIRECTOR**

**Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA  
SINODAL**

**Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH  
SINODAL**

**Dra. DAILENYS MARRERO MORFA  
SINODAL**

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	
CONTENIDO	PÁGINAS
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Metabolitos Especializados (ME)	2
II.1.1 Compuestos fenólicos	3
II.1.2 Terpenos	18
II.1.3. Alcaloides	28
II.1.4. Alcamidas	29
II.2 Métodos de identificación	30
II.2.1. Reacción de coloración	30
II.2.2. Cromatografía	31
III. OBJETIVOS	35
III.1. Objetivo general	35
III.2. Objetivos particulares	35
IV. METODOLOGÍA	36
IV.1. Materiales	36
IV.1.1. Reactivos empleados para la detección de ME	36
IV.1.2. Obtención de los extractos de trabajo	37
IV.1.3. Métodos de identificación	38
V. RESULTADOS Y DISCUSION	49
VI. CONCLUSIONES	78
VII. BIBLIOGRAFIA	80
VIII. ANEXO	88

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Clasificación de terpenos	19
2 Especies y estándares para la identificación de los metabolitos.	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras		Página
1	Ruta biosintética general de metabolitos secundarios	4
2	Biosíntesis de los compuestos fenólicos a partir de la vía del shikimato y fenilalanina.	5
3	Ácidos fenólicos provenientes del ácido benzoico	6
4	Síntesis de flavonoides a partir de p-coumatil CoA y Malonil CoA	8
5	Estructura básica de los flavonoides	9
6	Tanino hidrolizable, galotanino	11
7	Tanino condensado, procianidina	12
8	Estructura de aloína, antraquinona de la Aloe vera	15
9	Núcleo estructural básico de las cumarinas	16
10	Estructura de isopreno	18
11	Estructura de los iridoides	21
12	Principales grupos de lactonas sesquiterpénicas	23
13	Estructuras básicas de las saponinas.	25
14	Clasificación de los glicósidos cardíacos.	27
15	Identificación de fenoles por Folin-Ciocalteu	50
16	Identificación de fenoles en cromatografía en capa fina	51
17	Ensayo de Shinoda para identificación de flavonoides	52

18	Cromatografía en capa fina para flavonoides	53
19	Prueba colorimétrica de cloruro de hierro en taninos	54
20	Prueba colorimétrica para taninos hidrolizables	55
21	Prueba colorimétrica para taninos condensados	56
22	Prueba de Arnow para fenilpropanoides en el extracto de canela	57
23	Prueba de Arnow para los extractos de Anís	57
24	Cromatografía de fenilpropanoides	58
25	Prueba colorimétrica por la reacción de Borntrager	59
26	Cromatografía en capa fina de antraquinonas	60
27	Ensayo colorimétrico para cumarinas	61
28	Prueba de cumarinas en cromatografía en capa fina	61
29	Prueba colorimétrica de Liebermann - Burchard para terpenos	62
30	Prueba colorimétrica de Salkowski	63
31	Cromatografía en capa fina de triterpenos	64
32	Prueba colorimétrica de Baljet para lactonas sesquiterpénicas	65
33	Cromatografía de lactonas sesquiterpénicas	65
34	Prueba de espuma para saponinas	66
35	Cromatografía en capa fina para la identificación de saponinas	67
36	Ensayo colorimétrico de Baljet	68

37	Ensayo colorimétrico de Kedde	69
38	Ensayo colorimétrico de Keller - Kiliani	70
39	Ensayo colorimétrico de Salkowski	71
40	Ensayo colorimétrico de m-dinitrobenceno y NaOH	72
41	Ensayo colorimétrico de Liebermann - Burchard	72
42	Cromatografía para identificación de glicósidos cardiotónicos Baljet	73
43	Cromatografía para identificación de glicósidos cardiotónicos m-dinitrobenceno	74
44	Ensayo colorimétrico para alcaloides	75
45	Cromatografía en capa fina para alcaloides	76
46	Cromatografía de alcanoides	77



## **RESUMEN**

Los productos de origen vegetal han sido utilizados ampliamente a lo largo de la historia para el tratamiento de enfermedades o padecimientos, lo cual ha llevado a la búsqueda de los componentes que generan dichos efectos terapéuticos. Muchos de ellos han sido identificados dentro del extenso grupo de los metabolitos especializados (ME) en los cuales encontramos a los compuestos fenólicos tales como fenilpropanoides, flavonoides, antraquinonas o cumarinas; también puede mencionarse al grupo de los terpenos, en donde se incluyen lactonas sesquiterpénicas, iridoides, saponinas, glicósidos cardiacos entre otros; por último, tenemos a los alcaloides, de gran diversidad estructural. La presencia de estos compuestos va a depender de la familia, género o especie de la materia vegetal, por lo cual, para la identificación de los compuestos en los extractos vegetales se han propuesto diversas metodologías, las cuales se basan en reacciones colorimétricas de los núcleos estructurales de los ME con reactivos específicos. Otra estrategia para su identificación se basa en las diferentes técnicas cromatográficas, particularmente la cromatografía en capa fina. Sin embargo, las diferentes reacciones que se han propuestos para la identificación de los metabolitos no siempre resultan reproducibles en el análisis de los extractos de origen vegetal. o bien, son muchas las opciones que se presentan en la literatura para la identificación de algún metabolito en particular. Por lo que resulta relevante identificar, seleccionar y estandarizar aquellas pruebas para la identificación de metabolitos, que resulten accesibles y rápidas para un análisis presuntivo de la presencia de los diferentes tipos de compuestos en un extracto vegetal. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar las diferentes metodologías propuestas en la literatura, seleccionando aquéllas adecuadas para su implementación en un laboratorio de investigación donde se analicen extractos de origen vegetal.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Desde tiempos antiguos y en todas las culturas se han utilizado múltiples especies vegetales para tratar diversos padecimientos y enfermedades; las diferentes investigaciones para comprender los efectos terapéuticos condujeron a la búsqueda de los componentes responsables de dichos efectos, así como saber si son realmente beneficiosos para los seres humanos. La mayoría de los compuestos a los que se les puede atribuir los beneficios terapéuticos se encuentran dentro del grupo de los metabolitos especializados (ME); los cuales se caracterizan por participar en los mecanismos de adaptación, defensa y reproducción de los vegetales, a diferencia de los carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos nucleicos que forman parte de los procesos de crecimiento, nutrición y desarrollo de los organismos. Los ME forman un grupo heterogéneo de gran diversidad estructural entre los que encontramos a los compuestos fenólicos, como los fenilpropanoides, flavonoides, antraquinonas o cumarinas; también están los terpenos, en donde se incluyen lactonas sesquiterpénicas, iridoides, saponinas, glicósidos cardiacos y triterpenos, así como los alcaloides, cuya característica particular es la presencia de al menos un átomo de nitrógeno en su estructura. La presencia de estos compuestos va a depender de la familia, género o especie de la materia vegetal.

Los ME actúan como mediadores (aleloquímicos), interviniendo en las funciones de la planta o de los organismos con los que interacciona; en otras palabras, participan en las respuestas a innumerables estímulos. En consecuencia, la variación de las condiciones ambientales (incidencia de luz, precipitación y nutrientes) y de las interacciones bióticas (herbívora, ataque por microorganismos, competencia por el espacio en suelo, los nutrientes o la luz) influyen en la síntesis de estos compuestos. Sin embargo, muchos de estos metabolitos han sido utilizados por los seres humanos como colorantes, aromas, conservadores y antioxidantes, siendo en el área farmacéutica donde este tipo de metabolitos han tenido mayor aplicación en el desarrollo de moléculas bioactivas útiles en el tratamiento de diversas enfermedades. Por tanto, es importante determinar su estructura, modalidades para su control y extracción, así como su identificación en las muestras de índole vegetal, siendo

algunas alternativas para su identificación primaria los métodos colorimétricos, de reacción y la cromatografía en capa fina (CCF). Existen múltiples técnicas en la literatura para la identificación de los diversos tipos de metabolitos secundarios que no siempre resultan sencillas o asequibles, por lo que, el objetivo del presente trabajo fue realizar las diferentes metodologías propuestas en la literatura, seleccionando aquéllas adecuadas para su implementación en un laboratorio de investigación donde se analicen extractos de origen vegetal.

## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1 Metabolitos especializados (ME).**

Las plantas son una de las principales fuentes de obtención de compuestos bioactivos a partir de los cuales se han identificado y desarrollado alternativas para aplicaciones terapéuticas. Este tipo de compuestos que pueden presentar dicha actividad biológica se denominan metabolitos secundarios o especializados, debido a que no participan en los procesos de crecimiento, nutrición y desarrollo de los organismos como los carbohidratos, las grasas, las proteínas y los ácidos nucleicos. Estos metabolitos se presentan en las diferentes especies como un mecanismo de adaptación al medio ambiente, para defenderse de los depredadores o asegurar la reproducción. Por tanto, su producción no es común a todos los organismos y suelen ser característicos de determinada familia, género o incluso especies (Robles y col., 2016).

Su importancia en la investigación recae en que muchas sustancias de origen vegetal son utilizadas para tratar padecimientos de distintas índoles, por lo cual se busca saber qué es lo que causa tales efectos terapéuticos, así como saber si son realmente beneficiosos para los seres humanos. También se puede resaltar su importancia comercial o tecnológica, ya que muchos de estos compuestos se emplean como colorantes, aromas, antioxidantes, etc. Por lo cual, es importante determinar su estructura, cualidades de control y extracción, así como su identificación en las muestras de índole vegetal; para llegar a tales fines se necesitará de varios campos de estudio, entre los más destacados se encuentra la

fitoquímica que es la encargada de estudiar los metabolitos secundarios extraídos de plantas, teniendo un enfoque en la historia, el comercio, la distribución, geográfica, botánica, el cultivo, recolección, selección, preparación y preservación, así como también en la identificación, evaluación por todo tipo de métodos, la composición química y el análisis, la farmacología y el uso tradicional de los productos químicos con el propósito de mejorar la salud de hombres y animales (Marcano y Hasegawa, 2018).

Entre los principales grupos de metabolitos especializados se encuentran los compuestos fenólicos, dentro de los cuales encontramos los ácidos fenólicos, los fenilpropanoides, los flavonoides y compuestos derivados como las cumarinas y las antraquinonas (Robles y col., 2016). Por otro lado, los alcaloides son un grupo muy extenso de ME caracterizados por la presencia de al menos un átomo de nitrógeno en su estructura y amplia diversidad estructural. Los terpenos son estructuras provenientes del ácido mevalónico, dentro de los que se encuentran los monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos. Adicionalmente a estos grupos fundamentales también podemos sumar las betalainas, compuestos nitrogenados de naturaleza no alcaloidea, los sikimatos de cadena larga y las alcanidas, entre otros grupos (Marcano y Hasegawa, 2018). En la Figura 1 se puede visualizar de manera general las rutas metabólicas de los distintos metabolitos secundarios de importancia en el presente estudio, los cuales serán explicados a continuación.

### II.1.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se sintetizan a partir de dos rutas metabólicas, la ruta del shikimato de la cual se originan directamente los ácidos hidroxicinámicos y los fenilpropanoides (Figura 2); y la ruta del acetato, la cual produce fenoles simples y algunas quinonas (González, 2010). Tienen como características que abarca un gran número de sustancias que poseen un anillo aromático unido a uno o más sustituyentes hidroxilo. Los compuestos fenólicos suelen ser solubles en agua debido

a que mayormente se encuentran unidos a azúcares formando glicósidos y normalmente se encuentran en las vacuolas (Marcano y Hasegawa,2018).

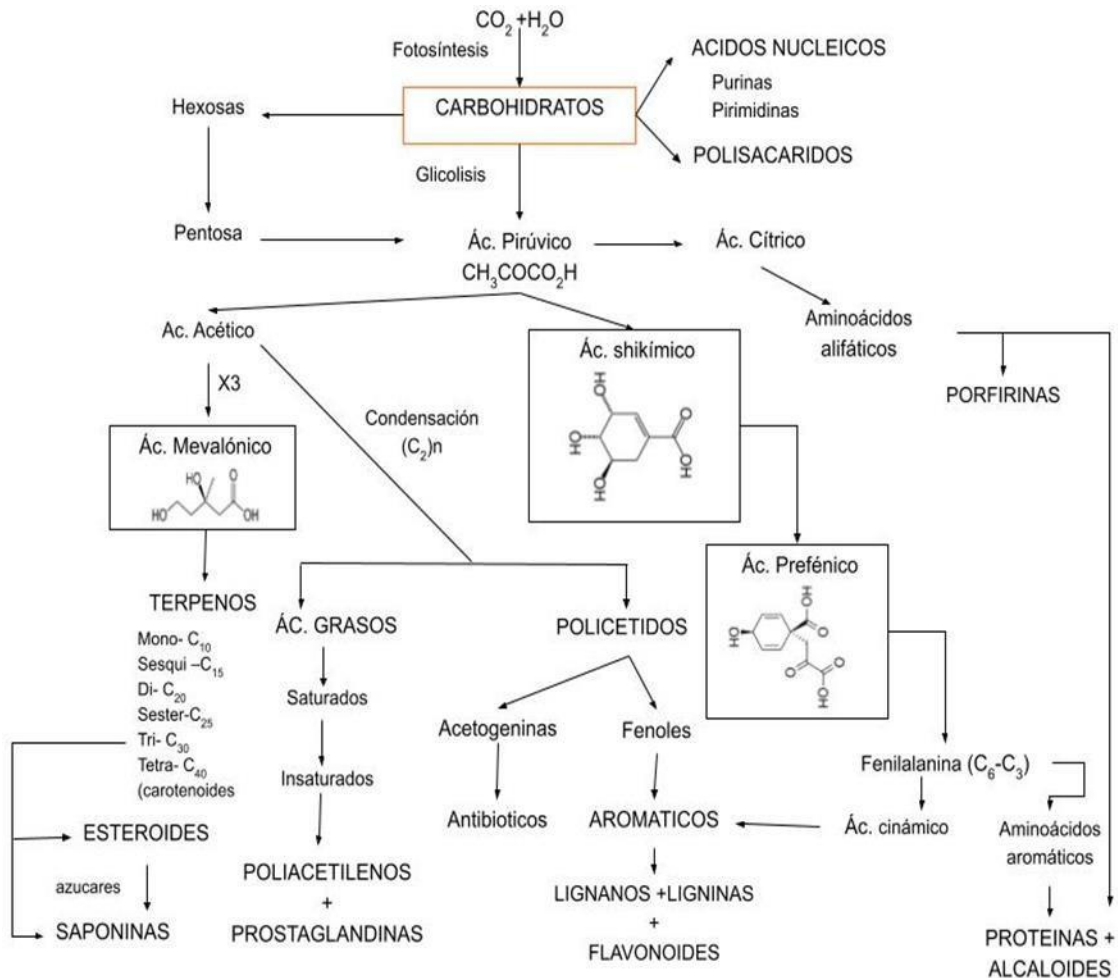


Figura 1. Ruta Biosintética general de metabolitos secundarios (Marcano y Hasegawa, 2018)

Estos compuestos se dividen en dos grupos: flavonoides y no flavonoides.

En los no flavonoides hay dos subgrupos:

- Fenoles no carboxílicos:  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_6\text{-C}_1$ ,  $\text{C}_6\text{-C}_3$ .

- Ácidos fenólicos: Derivados del ácido benzoico, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (Figura 3) y derivados del ácido cinámico C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>(fenilpropanoides).

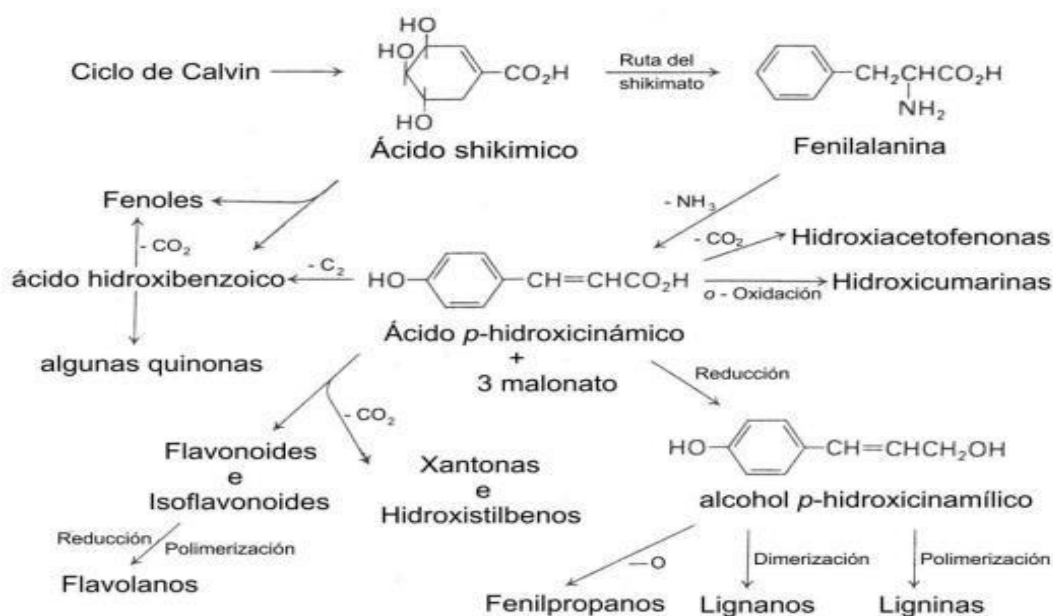


Figura 2. Biosíntesis de los compuestos fenólicos a partir de la vía del shikimato y fenilalanina (Hernández, 2014)

Los flavonoides están formados por 2 anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente tricarbonado con la estructura general C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, se subdividen en flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanoles, isoflavonas y antiocináninas (Figura 3) (Sun y Shahrajabian, 2023). Otros compuestos relacionados estructuralmente a los flavonoides son las chalconas, los estilbenos y los taninos condensados.

Cuando están puros, los fenoles simples son sólidos incoloros que generalmente se oxidan y se vuelven oscuros por el contacto con el aire. La solubilidad en agua aumenta de acuerdo al número de hidroxilos presentes y son solubles en disolventes orgánicos. También es recomendable que no haya un tratamiento prolongado con álcalis concentrada por cuestiones de oxidación (Sánchez, 2022).

La actividad fisiológica de los compuestos fenólicos en las plantas puede llegar a ser muy variada, entre ellas encontramos:

- La regulación de enzimas (indol-3-acético oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y en peroxidasa)
- Algunos son inhibidores de la germinación de semillas.
- Atractores de insectos para la polinización (Marcano y Hasegawa, 2018).

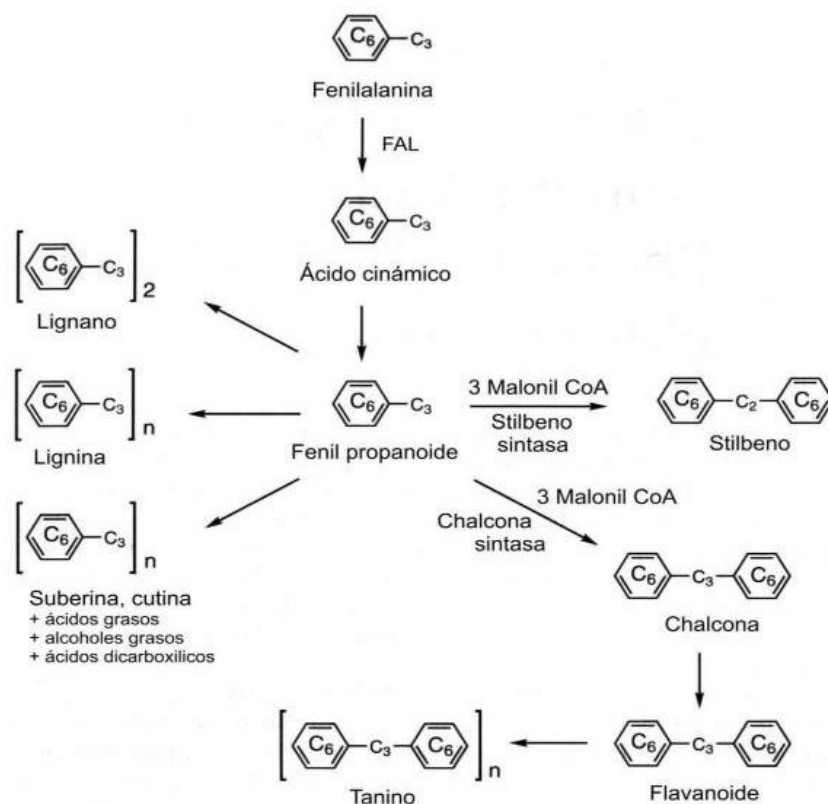


Figura 3. Formación de fenilpropanoides, estilbenos, lignanos, ligninas, suberinas, cutinas, flavonoides y taninos a partir de la fenilalanina. FAL: Fenilalanina amonio liasa (González, 2010)

En el caso del ser humano, los compuestos fenólicos son de gran importancia ya que interfieren con el proceso de oxidación al reaccionar con radicales libres, quelar metales catalíticos y capturar el oxígeno. Los radicales libres se forman en el organismo mediante la respiración aeróbica y existen en diferentes formas: como

anión superóxido, hidroxilos, peróxidos, y alcóxidos; los cuales son dañinos ya que pueden reaccionar con componentes celulares importantes como el ADN o las membranas. Esto puede causar un daño oxidativo que está estrechamente relacionado con el origen y desarrollo de enfermedades crónicas, como la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), enfermedades cardiovasculares, daño oxidativo al ADN, cáncer y alteración de la visión (Sun y Shahrajabian, 2023).

Este tipo de metabolitos se encuentran en la mayoría de las plantas siendo algunos ejemplos; rabo de gato, ginseng, ginkgo, eleuterococo, anamú, uva, eucalipto, pervinca, garra del diablo, mandarina, toronja, limón, naranja, romero, agrimonia, caléndula y avena (Hernández y Prieto, 1999).

#### II.1.1.1. Flavonoides

Los flavonoides se incluyen en la gran familia de compuestos fenólicos o polifenoles y comprenden más de 6000 estructuras diferentes. En las plantas, los flavonoides se derivan de dos rutas biosintéticas, el fenilpropanoide, que produce el esqueleto fenilpropanoide ( $C_6-C_3$ ), y el policétido que produce bloques para unidades poliméricas  $C_2$  (Díaz y col ,2021) (Figura 4).

Casi todos los flavonoides presentan una estructura  $C_6-C_3-C_6$  que contiene dos anillos de benceno, A y B, conectados por un anillo de heterociclo pireno (C) que contiene oxígeno (Figura 5). Tienen como característica que son sustancias sólidas cristalizadas de color blanco o amarillento (Sánchez, 2022).

Los flavonoides se pueden dividir en dos categorías principales según el grado de saturación del anillo heterocíclico central. Por ejemplo, las antocianidinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas presentan una insaturación  $C_2=C_3$ , mientras que las flavanonas, dihidroflavonoles y flavan-3-oles son ejemplos de flavonoides saturados. Además, en las plantas, los flavonoides se pueden encontrar en forma libre (agliconas) o ligados a azúcares (Marcano y Hasegawa, 2018). Los flavonoides glicosilados son los más comunes y las antocianinas glicosiladas se reconocen como una clase esencial de flavonoides (Días, 2021).



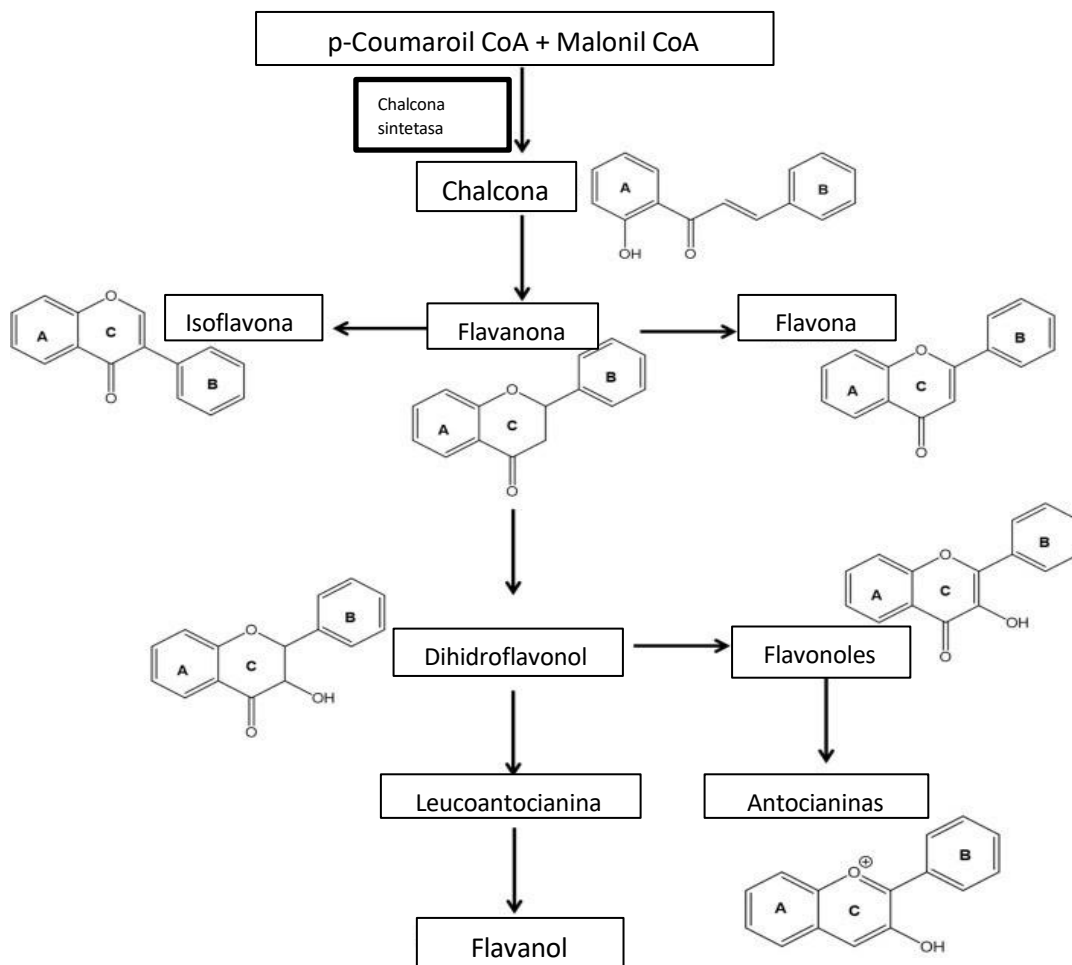


Figura 4. Síntesis de flavonoides a partir de p-coumaril CoA y malonil CoA (Díaz y col, 2021)

La solubilidad de los flavonoides varía dependiendo del disolvente; por lo cual se eligen según la polaridad de los flavonoides. Por ejemplo, las agliconas altamente alquiladas se extraen preferiblemente con acetato de etilo. Los solventes tóxicos, como el benceno y el cloroformo, no se recomiendan e incluso pueden prohibirse. Por otra parte, las agliconas más polares, como las hidroxiladas y los glucósidos, se extraen preferentemente con acetona, alcohol, agua o mezclas de estos disolventes (Días ,2021).

Los flavonoides están ampliamente distribuidos siendo *Rutaceae*, *Poligonaceae* y *Umbelliferae* las principales familias que los contienen. Abundan, sobre todo, en las

partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como hojas, frutos y flores, ya que la luz solar favorece su síntesis (Sánchez, 2022).

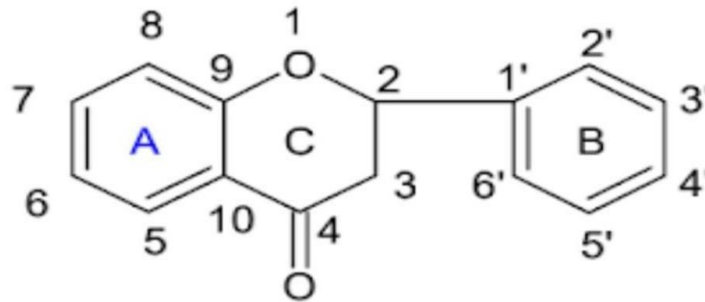


Figura 5. Estructura básica de los flavonoides (Díaz y col, 2021)

Los flavonoides son importantes para la planta, al igual que ocurre con la mayor parte de los ME, porque además de ser responsables de la coloración de muchas flores, frutos y hojas, intervienen en la polinización atrayendo a los insectos y tienen efecto protector frente a la luz ultravioleta, entre otras acciones (Sánchez, 2022).

La evidencia científica ha demostrado que los flavonoides inducen varios beneficios para la salud en humanos, y una dieta rica en estos compuestos puede ayudar a prevenir algunas enfermedades crónicas (Tenorio, 2016).

Entre las principales actividades biológicas se encuentran los mecanismos de acción antioxidante de los flavonoides que pueden ser:

- La eliminación directa de las especies reactivas de oxígeno (ROS).
- La inhibición de la formación de ROS a través de la quelación de elementos traza (p. ej., la quercetina tiene propiedades quelantes y estabilizadoras del hierro) o la inhibición de las enzimas que participan en la generación de radicales libres (p. ej., glutatión S -transferasa, monooxigenasa microsomal, succinoxidasa mitocondrial, NADH oxidasa y xantina oxidasa).

- Activación de las defensas antioxidantes (p. ej., regulación al alza de enzimas antioxidantes con capacidad de eliminación de radicales) (Tenorio, 2016).

Además de las propiedades antioxidantes, se describen muchas otras acciones de los flavonoides, como antiinflamatoria, anticancerígena, cardioprotectora, antimicrobiana y antiviral (Tenorio, 2016).

#### II.1.1.2 Taninos hidrolizables y condensados

Las plantas vasculares presentan una mezcla compleja de compuestos fenólicos y entre ellos se encuentran los flavonoides poliméricos de alto peso molecular de aproximadamente 500 a 20000 Da, que por hidrólisis producen antocianidinas y flavanoles. Siendo conocidas estas sustancias como proantocianidinas y forman parte de los llamados taninos condensados. Las proantocianidinas son responsables de un gran número de reacciones, por ejemplo, la precipitación de polisacáridos, alcaloides, proteínas y como parte de estas últimas, las enzimas de la saliva, lo que le infieren las características astringentes a los vegetales que los poseen, y que son atribuidas a los “taninos”. Por otro lado, tenemos a los taninos hidrolizables que debido a su núcleo glúcido son más susceptibles a hidrólisis en condiciones fisiológicas. Su clasificación se basa en su monómero base (ácido gálico, flavan-3-oles y fluroglucinol). El término tanino fue originalmente utilizado para describir ciertas sustancias orgánicas que servían para curtir pieles de animales, proceso conocido en inglés como “tanning” (Olivas, 2015).

Su función en las plantas no está clara, pero debido a su abundancia en tejidos jóvenes y en las heridas causadas en el tallo, particularmente aquéllas cerca del suelo, se cree que son utilizados por el vegetal como protección contra infecciones de hongos y parásitos (los árboles pobres en taninos se pudren rápidamente). Los taninos se extraen con agua ya que a pesar de su complejidad estructural son altamente oxigenados y/o presentan azúcares en su composición que le dan carácter hidrofílico (Marcano y Hasegawa, 2018).

Los taninos se clasifican en:

a) Hidrolizables (galotaninos y elagitaninos).

Están compuestos de ésteres de ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico) o el ácido elágico (4',5,5',6,6'-ácido hexahidroxidifénico -2,6,2',6'-dilactona) unidos a una unidad central de carbohidratos y su nombre hace referencia a su fácil capacidad para hidrolizarse en presencia de ácidos, bases o que separan la aglicona (ácidos gálico y elágico, o sus derivados) de los azúcares (Figura 6) (Olivas, 2015).

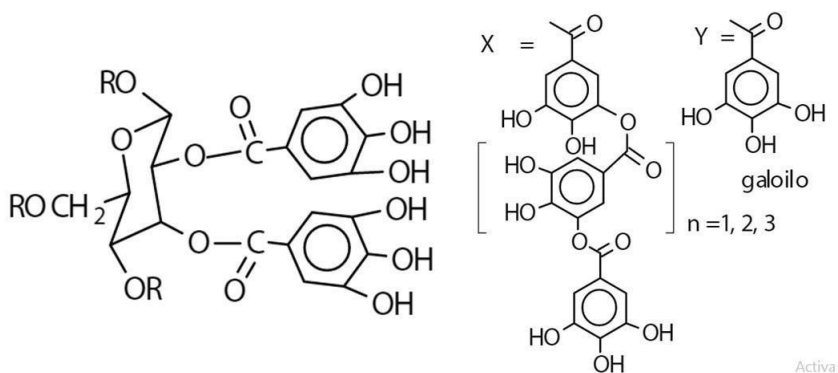


Figura 6. Tanino hidrolizable, galotanino. R= X o Y (Marcano y Hasegawa, 2018)

b) Condensados

Son el resultado de la polimerización de unidades de 3-hidroxi- y 3,4-dihidroxi flavanoles como la catequina, la epicatequina o la leucocianidina unidos mediante enlace C-C y carentes de un núcleo glucídico. Los tres grupos representativos de taninos condensados son las procianidinas, prodelphinidinas y profisetinidinas, cuya característica es que por tratamiento con ácido no se degradan, sino que polimerizan aún más, convirtiéndose en masas amorfas insolubles conocidas como flobafenos (Figura 7) (Olivas, 2015).

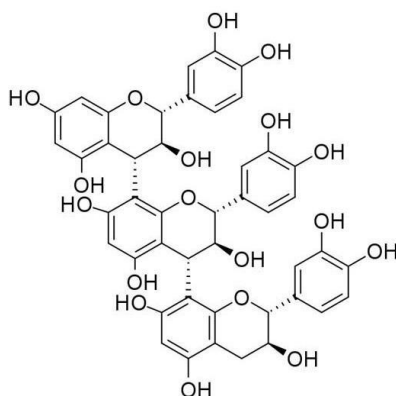


Figura 7. Tanino condensado, procianidina (Marcano y Hasegawa, 2018)

Se atribuyen a los taninos diversas actividades biológicas, tales como antibacterial, molusquicida, antihelmíntica, hepatoprotectora, antiviral, antitumoral, citotóxica e inhibidora enzimática, entre otras. La habilidad quelante con metales, la propiedad antioxidante y secuestrar radicales libres y la habilidad para formar complejos con macromoléculas como proteínas incluyendo enzimas y polisacáridos son los responsables de estos comportamientos (Montane, 2020).

La interacción con proteínas es una de las más importantes y se conoce que los taninos tienen mayor afinidad con las proteínas ricas en prolina y de conformación flexible (enzimas de la saliva, caseína, colágeno-gelatina; siendo la última abundante en la piel se aprovecha para curtir el cuero) pero no con las de estructuras rígidas secundarias y terciarias (Marcano y Hasegawa, 2018).

Algunas de las principales familias botánicas con importancia en la obtención de taninos son: *Leguminosae*, *Rosaceae*, *Polygonaceae*, *Fagaceae*, *Rhizophoraceae* y *Myrtaceae*. Algunos géneros como las acacias (*Acacia spp.*), los encinos (*Quercus spp.*) y algunos pinos (*Pinus spp.*) que habitan bosques de pino-encino o zonas de transición son importantes en la producción de estos productos (Muñoz, 2016).

### II.1.1.3 Fenilpropanoides

El grupo de los fenilpropanoides es el más abundante y comprende el mayor número de variaciones estructurales que van desde moléculas con esqueletos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> hasta polímeros, mientras que los derivados del ácido benzoico con esqueletos C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, son reducidos en número y es frecuente encontrarlos como parte de los sustituyentes (por ejemplo, ésteres o amidas) de otras estructuras. Los fenilpropanoides derivan del ácido shikímico e involucra la transformación de la fenilalanina al tioéster cumaril-CoA; las enzimas que catalizan los pasos individuales son fenilalanina amonioliasa (I), cinamato-4-hidroxilasa (II) y 4-cumarato-CoA ligasa (III) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Los fenilpropanoides simples comparten la estructura fundamental fenilpropanoide (Figura 3), portando una cadena lateral lineal de tres átomos de carbono que se encuentra unida al anillo fenilo constituido por seis carbonos. Los fenilpropanoides representan las unidades centrales que componen a prácticamente todos los compuestos fenólicos (Ávalos y Pérez, 2009).

Algunos ejemplos comprendidos dentro de este grupo corresponden a los ácidos: cinámico, p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Martinez y col, 2008), donde sus respectivos iones (cumarato, cafeato, ferulato y sinapato) reciben colectivamente el nombre de hidroxycinamatos y se acumulan frecuentemente en las plantas como derivados conjugados, manteniendo la estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Los principales tipos de conjugados son los ésteres y amidas. Los glicósidos aparecen menos frecuentemente. Ciertas formas insolubles de los hidroxycinamatos se presentan unidas a polímeros tales como cutinas y suberinas, ligninas o polisacáridos en las paredes celulares (Marcano y Hasegawa, 2018).

Los fenilpropanoides se encuentran en la mayoría de los tejidos vegetales donde sirven como componentes esenciales de varios polímeros estructurales y brindan protección contra la luz ultravioleta. Algunos fenilpropanoides son responsables del aroma de las plantas y son importantes en la industria cosmética (perfumes y

aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes); lo cual evidencia la importancia de los fenilpropanos. (Marcano y Hasegawa, 2018).

#### II.1.1.4 Antraquinonas

Las quinonas son pigmentos que se encuentran en las plantas ya sea en forma libre o combinadas con azúcares formando glicósidos. Las quinonas naturales varían en su color desde el amarillo pálido hasta el color casi negro. Son dicetonas insaturadas que por reducción se transforman en polifenoles, de los que por oxidación pueden regenerarse fácilmente las quinonas. Las quinonas son compuestos con capacidad de sistemas redox, por lo que son sustancias naturales muy reactivas biológicamente. Todas son coloridas y presentan el mismo cromóforo básico que es la benzoquinona, que consiste en dos grupos carbonilo conjugados con dos dobles ligaduras carbono-carbono (Marcano y Hasegawa, 2018).

Las quinonas se clasifican de acuerdo con su estructura en cuatro grupos, benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e isoprenoquinonas (Marcano y Hasegawa, 2018).

Las antraquinonas son el grupo más numeroso de quinonas, provienen de las rutas metabólicas del ácido shikímico y del malonil CoA; se encuentran en las plantas de las familias *Rubiaceae*, *Leguminosae*, *Lythraceae*, *Ranunculaceae*, *Rhamnaceae*, *Ericaceae*, *Polygonaceae*, *Escrofulariaceae*, *Saxifragaceae* y *Verbenaceae*. Se encuentran en especies como los aloes (*Aloe sp*) donde se encuentra la aloína (Figura 8) (Sánchez, 2009).

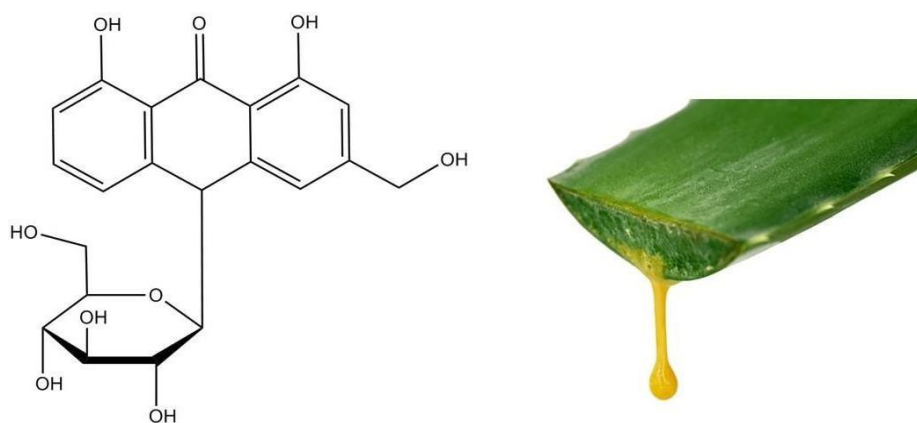


Figura 8. Estructura de la aloína, antraquinona de la *Aloe vera* (Valencia, 1995)

La mayoría de las antraquinonas contienen hidroxilos en los carbonos 1 y 2, frecuentemente están en forma de glucósidos que se hidrolizan durante el proceso de extracción. En algunas ocasiones el glucósido deriva de una forma de quinona reducida, la antrona y puede tener la molécula de azúcar unida al carbono 9, como la barbolaína de los Alpes, o bien, unido a un átomo de oxígeno como en los senósidos (Marcano y Hasegawa, 2018).

Las antraquinonas son solubles en agua caliente y en alcohol diluido (Ruiz, 2017).

Son utilizadas en el área de la medicina debido a sus propiedades laxantes, además, facilitan el tránsito intestinal y alivia el estreñimiento. También son utilizadas para algunos padecimientos dérmicos; por ejemplo, la antralina es usada para el tratamiento de la psoriasis. Algunas antraquinonas son también utilizadas como colorantes, como la alizarina (Ruiz, 2017).



### II.1.1.5 Cumarinas

Las cumarinas son sustancias fluorescentes altamente fotosensibles. La más abundante es la umbeliferona. Las cumarinas más simples e isocumarinas pueden encontrarse en forma libre o como glucósido. En ocasiones se forman durante los procesos de extracción debido a la hidrólisis del ácido gly-o-hidroxicinámico, e inmediata ciclización de lactona (Marcano y Hasegawa, 2018).

Las cumarinas más sencillas están presentes en todo el reino vegetal. Algunas más complejas se encuentran especialmente en las familias *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Apiaceae* y *Rutaceae*.

Estos compuestos presentan el siguiente núcleo estructural básico (Figura 9):

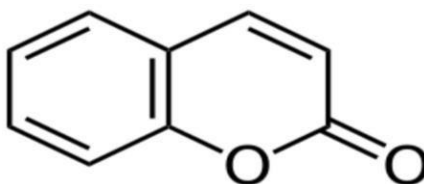


Figura 9. Núcleo estructural básico de las cumarinas (Avalos y Pérez, 2009).

Las cumarinas se consideran derivados de la lactona del ácido o-hidroxicinámico, una característica común en muchas cumarinas es la presencia de cadenas isoprenoides, frecuentes en una, dos, tres unidades, ligadas a un átomo de carbono del núcleo, a un átomo de oxígeno o ambos. Proviene de la ruta metabólica del ácido shikímico (Pérez, 2013).

Entre los productos naturales, las cumarinas son el mejor ejemplo de compuestos que presentan un gran número de modificaciones biogénicas de la unidad isoprenoide simple. Muchos autores las clasifican de acuerdo con los siguientes tipos de estructuras:

1. Cumarinas simples como la cumarina y sus derivados hidroxilados, alcoxlado, alquilados y sus glicósidos.
2. Furanocumarinas, pueden ser de tipo angular (angelicina) o lineal (psoraleno), con sustituyentes en una o ambas posiciones bencenoides restantes; incluyen a las dihidrofuranocumarinas
3. Piranocumarinas, análogos a los anillos de seis miembros
4. Cumarinas sustituidas en el anillo de pirano, como 4-hidroxycumarinas, 3-fenil y 3,4 -benzocumarinas (Sánchez, 2022).

Las cumarinas son solubles en soluciones acuosas o alcohólicas de hidróxido de sodio. Cuando se encuentran en forma de glicósidos, se pueden extraer con metanol o con etanol después de desengrasar la planta con éter de petróleo o con hexano; estos glicósidos se pueden hidrolizar por tratamiento con ácidos o enzimas (Sánchez, 2022).

Las cumarinas son parte del sistema de defensa de las plantas ya que muchas de éstas poseen actividad bactericida, fungicida y/o fungistática. Adicionalmente tienen actividad insecticida gracias a su toxicidad, o bien, mediante el rechazo que producen a su ingesta por tratarse de compuestos químicos supresores del apetito (Venancio-Rodriguez, 2021).

Tal y como ocurre con la mayoría de los productos naturales, se ha demostrado que, ciertas cumarinas, resultan ser también compuestos bioactivos con interesantes propiedades farmacológicas; por ejemplo, se han estudiado nuevos derivados de cumarinas como potenciales inhibidores de enzimas implicadas en enfermedades neurodegenerativas, como la monoaminooxidasa A (MAO-A), la beta secretasa (BACE 1) y la ciclooxigenasa (COX) .También a nivel cosmetológico son utilizadas para la realización de perfumes, jabones, cosméticos e inciensos debido a su acción foto protectora (Venancio - Rodriguez, 2021).

### II.1.2. Terpenos

En el reino de las plantas, se encuentran diversos ME llamados terpenos; todos tienen un origen biosintético común, están formados por la unión de dos o más unidades de isopreno (Figura 10), o bien, existen como una variación de esta misma unidad. Los terpenos son sintetizados a partir de dos vías diferentes del metabolismo primario, la vía del acetato/ácido mevalónico (MVA) y la vía del 2-C-metil-D-eritrol- 4-fosfato (MEP) (Marcano y Hasegawa, 2022).

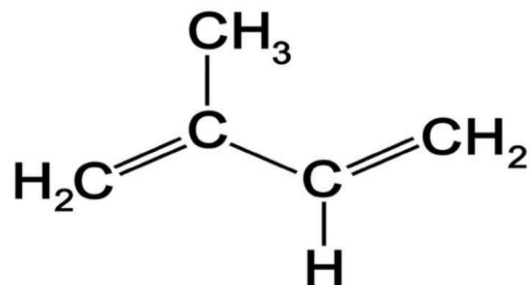


Figura 10. Estructura de isopreno (Marcano y Hasegawa, 2018)

La mayoría de isoprenoides o terpenos contienen átomos de carbono en número múltiplo de cinco, lo que da lugar a la clasificación mostrada en el Cuadro 1 (Marcano y Hasegawa, 2018).

En su mayoría los terpenos son alicíclicos y generalmente los que poseen anillos de ciclohexano están en forma de silla, aunque puede haber conformaciones geométricas diferentes según el sustituyente que tenga el anillo. Los terpenoides cíclicos pueden sufrir modificaciones estructurales durante los procesos de aislamiento y de separación por lo que es difícil determinar su estereoquímica original (Marcano y Hasegawa, 2018).

Los terpenoides se extraen de los tejidos vegetales con éter de petróleo o éter etílico con cloroformo; a menudo es difícil detectarlos a escala micro, porque todos, con excepción de los carotenoides, son incoloros y no hay un cromógeno universal para ellos.

Cuadro 1: Clasificación de Terpenos (Marcano y Hasegawa, 2018)

Clasificación de terpenos		
Nombre	Número de carbonos	Ejemplos
Monoterpenos	10(2x5)	aceites esenciales
Sesquiterpenos	15(3x5)	aceites esenciales
Diterpenos	20(4x5)	resinas ácidas, agentes antitumorales
Sesterpenos	25(5x5)	
Triterpenos	30(6x5)	saponinas
Tetraterpenos o carotenoides	40(8x5)	pigmentos
Politerpenos	(nx5)	hule

A los terpenoides se les han atribuido diversas funciones entre la que se pueden encontrar:

- Reguladores del crecimiento, dos de los principales son las abscisinas sesquiterpenoides y las giberelinas.
- Algunos monoterpenos y sesquiterpenos son atractores de insectos, mientras que otros poseen actividad antimicrobiana o insecticida (Marcano y Hasegawa, 2018).

Los terpenoides son liposolubles y se encuentran localizados en el citoplasma de las células vegetales. Los aceites esenciales (conformados en su mayoría por monoterpenos y sesquiterpenos) están en glándulas especiales en la superficie de las hojas, mientras que los carotenoides están asociados con los cloroplastos en las hojas y en los cromoplastos en los pétalos de las flores (Marcano y Hasegawa, 2018).

### II.1.2.1 Monoterpenos

Los monoterpenos o terpenos verdaderos ( $C_{10}H_{16}$ ) pueden dividirse en tres grupos: acíclicos como el geranil, monocíclicos como el limoneno o bicíclicos como el  $\alpha$  y el  $\beta$  pineno. Los monoterpenos pueden ser hidrocarburos no saturados o pueden tener grupos funcionales y ser alcoholes, aldehídos o cetonas.

Los monoterpenos se encuentran formando parte de los aceites esenciales o volátiles junto con algunos fenilpropanoides y sesquiterpenos. Este tipo de compuestos les confiere a los aceites sus propiedades lipofílicas, volátiles y aromáticas.

Los aceites esenciales se usan por sus diferentes propiedades; por ejemplo, el aceite de eucalipto tiene propiedades terapéuticas, el aceite de limón es un saborizante y en la industria de cosméticos se usan los aceites de geranio y de rosas (Marcano y Hasegawa, 2018).

#### II.1.2.1.1. Iridoides

Los iridoides son un grupo de monoterpenos que derivan del monoterpeno geraniol (Figura 11). Se agrupan en una serie de monoterpenos bicíclicos ( $C_{10}$ ) que presentan como estructura básica común un esqueleto de átomos de carbono, el 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano, denominado iridano. El núcleo iridano se encuentra frecuentemente fusionado con un heterociclo formado por seis átomos, de los cuales uno es oxígeno, y a este conjunto estructural se le denomina iridoide. Su denominación surge al haberse detectado por primera vez en las hormigas del género *Iridomirmex*. Los iridoides pueden encontrarse como estructuras abiertas, por escisión del enlace entre los carbonos 1 y 5 del esqueleto de iridano (secoiridoides), o cerradas (iridoides propiamente dichos). Generalmente aparecen en forma de heterósidos y mayoritariamente como glucósidos (Carreras y col, 2012).

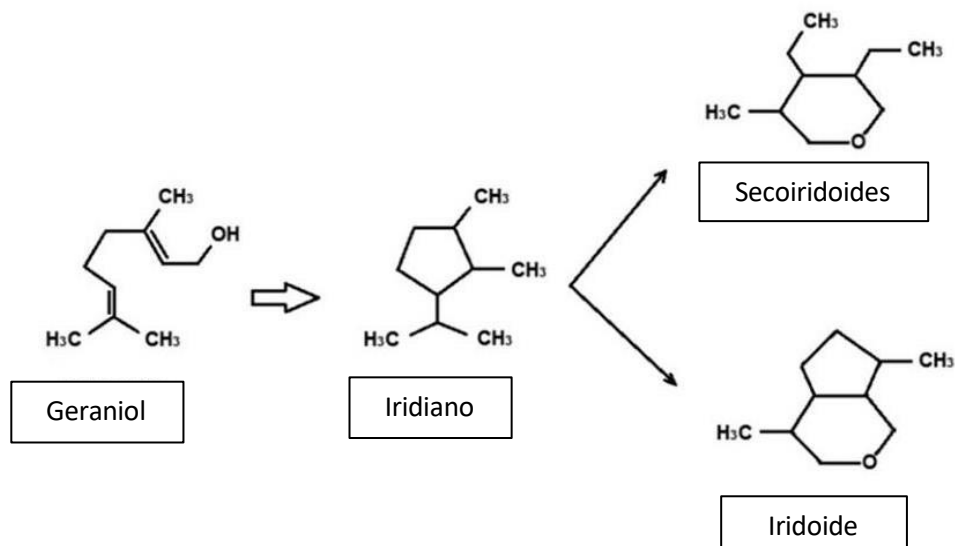


Figura 11. Estructura de los iridoides (Carreras y col, 2012)

En la biosíntesis de los iridoides, el compuesto de partida es el ácido mevalónico y aunque en las etapas iniciales parecen ser comunes a todas las estructuras, hay diferenciación en las etapas de ciclación que conducen al esqueleto de iridiano dando como resultado dos rutas principales. La primera, conduce desde el iridodial, vía iridotrial, hasta el ácido desoxilogánico que es el precursor de muchos iridoides y secoiridoides. Los compuestos de esta ruta se encuentran principalmente en los órdenes de las Cornales, Gentianales y la familia *Oleaceae*. La segunda ruta implica al 8-epi-irifofial, 8-epi-iridotrial y ácido 8-epi-desoxilogánico que son precursores de iridoides como: la aucubina y el catalpol, compuestos exclusivos de las familias del orden *Lamiales* y nunca en *Gentianales* u *Oleaceae* (Boluda y Terrero, 2013).

Entre sus propiedades beneficiosas, los iridoides presentan capacidad para mejorar la función hepática y capacidad para estimular la excreción de ácidos biliares, así como actividad antimicrobiana, antitumoral, antiviral y antiinflamatoria (Carreras y col, 2012).

Existen en la naturaleza algunas plantas con propiedades farmacológicas, que resultan útiles precisamente porque contienen principios activos de naturaleza iridoídica. Entre las más importantes, destacan el olivo, el harpagófito, la valeriana,

la genciana y el fresno, un árbol rico en iridoides que, como las anteriores plantas, se ha utilizado mucho en la medicina popular (Carreras y col, 2012).

#### II.1.2.2. Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son compuestos ( $C_{15}H_{24}$ ) derivados de tres moléculas de isopreno; y exhiben el punto de ebullición más alto de los aceites esenciales. Son compuestos no saturados, pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. Muchos de los sesquiterpenos monocíclicos tienen un esqueleto común, que varía en la localización de dobles ligaduras y grupos funcionales. Entre las estructuras monocíclicas se encuentran algunas que no parecen derivadas de unidades de isopreno, probablemente lo que ocurre es que ha habido modificaciones y reacciones de oxidación; algunas son lactonas amargas, también conocidas como lactonas sesquiterpénicas (Marcano y Hasegawa, 2018).

##### II.1.2.2.1. Lactonas sesquiterpénicas.

Una de las características de las lactonas sesquiterpénicas es que son moléculas de bajo peso molecular y comprenden más de 8000 compuestos. Se componen por un esqueleto de 15 carbonos, en su mayoría son cíclicas y se caracterizan por la presencia de una  $\gamma$ -lactona, generalmente unida a un grupo exometileno conjugado con el grupo carbonilo. La  $\gamma$ -lactona puede formar un anillo hacia C6 o C8. La estereoquímica de la lactonización puede ser tanto  $\alpha$  como  $\beta$ , ya que el anillo lactónico puede fusionarse con el resto de la estructura en la configuración trans o cis. La configuración más común es la trans y como norma el H7 está en  $\alpha$ . En algunos casos el metileno exocíclico está reducido como en la artemisinina, matricina, achillina y santonina o el doble enlace puede ser endocíclico. El sufijo “ólido” indica la presencia del grupo lactónico en la molécula (Martino y Sülsen, 2018).

Se clasifican en cuatro grandes grupos: germacranólidos, eudesmanólidos, guaianólidos y pseudoguaianólidos (Figura 12).

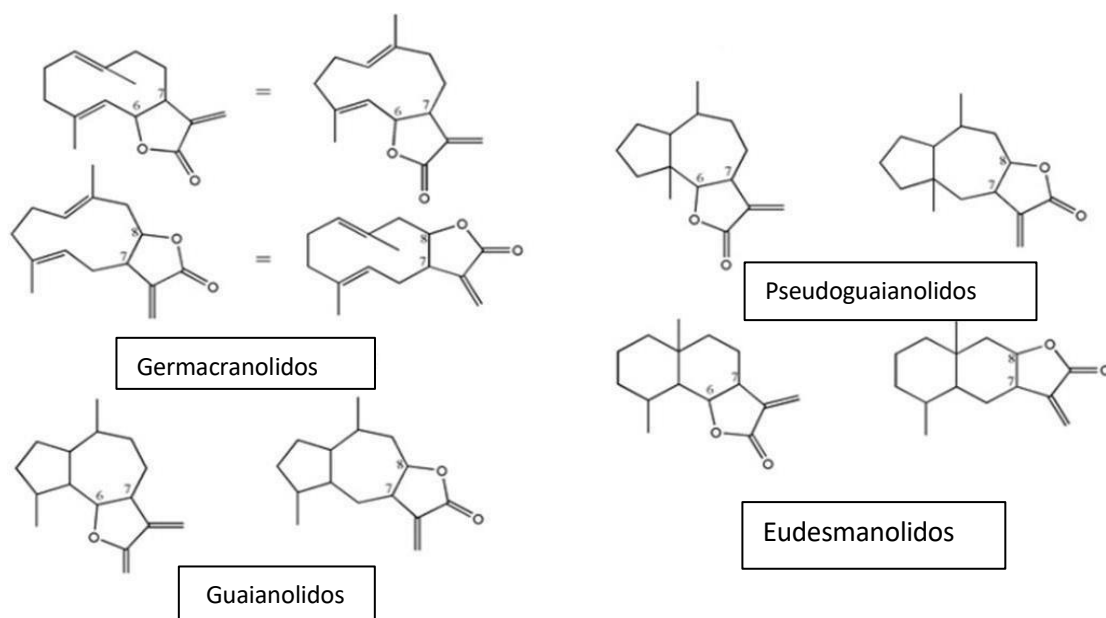


Figura 12. Principales grupos de lactonas sesquiterpenicas (Martino y Sülsen, 2018)

En su mayoría se encuentran en la familia *Asteraceae*, pero se han encontrado también representantes en las familias *Apiaceae*, *Magnoliaceae* y *Lauraceae*. Se encuentran mayormente en las hojas y cabezuelas florales de las plantas en un porcentaje variable que puede ir de 0.001 a 8 % de peso seco (Martino y Sülsen, 2018).

Fueron consideradas muy citotóxicas debido a que causan dermatitis al contacto con la planta que las presentan, pero posteriormente, estudios revelaron que poseía otras actividades biológicas como antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral, antiviral, antimalárica, antioxidante, antiulcerogénica, molusquicida, antihelmíntica, hepatoprotectora y con efectos sobre el sistema nervioso central y cardiovascular (Ruiz y Suarez, 2014). Las transformaciones químicas introducidas en su estructura han potenciado sus actividades biológicas y han disminuido sus efectos tóxicos. Como ejemplo de esto en la actualidad se usan en terapéutica los derivados de la artemisinina (artesunato y artemeter) para el tratamiento de la malaria, el dimetilamino partenólido y la mipsagargina ambas con efecto anticancerígeno (Martino y Sülsen, 2018).



### II.1.2.3. Diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ )

Los diterpenos son derivados de cuatro moléculas de isopreno. Debido a sus altos puntos de ebullición, generalmente no se encuentran en los aceites volátiles de las plantas, pero si en las resinas, los exudados (gomas) y las fracciones resinosas de alto punto de ebullición que quedan después de la destilación de aceites esenciales (Marcano y Hasegawa, 2018).

Entre los diterpenos que presentan valor farmacológico o comercial encontramos el esteviósido que se emplea como edulcorante, los ginkgólidos del Ginkgo biloba, empleado entre otros usos para la insuficiencia circulatoria cerebral, la forskolina con propiedades antihipertensivas y el taxol que es un anticancerígeno (Marcano y Hasegawa, 2018).

### II.1.2.4. Triterpenos

De acuerdo con la bibliografía se han encontrado más 4000 triterpenos basados en más de 40 estructuras de base. Son compuestos de 30 carbonos procedentes de la ciclación del 2,3-epóxido-dihidroescualeno o, más raramente, del mismo escualeno (Sánchez, 2022). Su distribución es variada en el reino vegetal y animal, particularmente en resinas, corcho y cutina de las plantas y en la materia insaponificable de muchos aceites como el de oliva (Marcano y Hasegawa, 2018).

Estos compuestos se encuentran en la naturaleza en forma de ésteres, glicósidos o en estado libre. Son sustancias incoloras, cristalinas de alto punto de ebullición y ópticamente activas. Son difíciles de caracterizar debido a su falta de reactividad química (Marcano y Hasegawa, 2018).

Los triterpenos pueden ser acíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos. Las estructuras cíclicas a veces son complejas y dentro de ellas puede haber estructuras de alcoholes, aldehídos o ácidos carboxílicos (Marcano y Hasegawa, 2018).

Los triterpenos se pueden dividir en cuatro grupos de compuestos: los triterpenos verdaderos, los esteroides, las saponinas y los glucósidos cardiacos; los dos últimos

grupos son esencialmente triterpenos o esteroides que comúnmente se encuentran en forma de glicósidos (Marcano y Hasegawa, 2018).

#### II.1.2.4.1. Saponinas

Las saponinas están conformadas por glicósidos de alcoholes tanto triterpenoide o esteroide con una cadena lateral espirocetal (Figura 13). Tienen características tensoactivas, son solubles en agua y etanol formando disoluciones espumosas y son insolubles en éter. Sus agliconas, llamadas saponinas, se obtienen por hidrólisis ácida o enzimática y sin los residuos de azúcar tienen la solubilidad característica de otros esteroides (Marcano y Hasegawa, 2018).

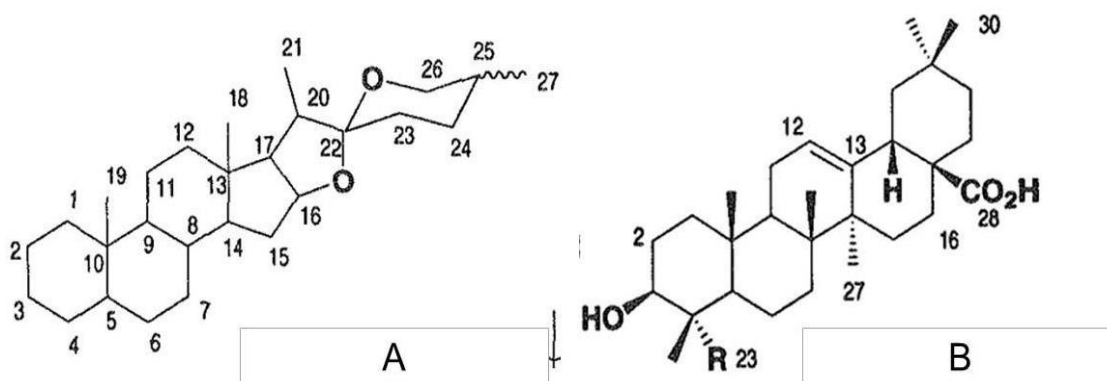


Figura 13. Estructura básica de las saponinas. A: +esteroidales, B: triterpénicas (Bruneton, 2001)

Las saponinas triterpenoides tienen como agliconas compuestos como el ácido oleanólico, que también puede encontrarse en forma libre sin estar unidos a molécula de azúcar; en algunos casos las agliconas solo se conocen como sapogeninas, es decir, no se han aislado las saponinas. Las saponinas de tipo oleanano son más comunes que las de tipo ursano y lupano. En ocasiones el patrón glicosídico de las saponinas es complejo, algunas tienen hasta cinco unidades de azúcares que generalmente se encuentran unidas al carbono 3 de la aglicona (Marcano y Hasegawa, 2018).

Las saponinas esteroides poseen un esqueleto de 27 átomos de carbono que consta habitualmente de seis ciclos: los dos ciclos E (furánico) y F (piránico) son, formalmente, consecuencia de una cetalización intramolecular que tiene lugar después de la oxidación en C-16, C-22 y C-26 de un precursor colestánico. Tienen diferentes aplicaciones en la preparación de detergentes no alcalinos, fármacos (en especies del género *Smilax*), agentes espumantes y venenos para peces, como por ejemplo el barbasco que macerado y lanzado a los ríos paraliza a los peces. Esto puede deberse a que inclusive en bajas concentraciones produce hemólisis de los glóbulos rojos y a su propiedad tensoactiva (Marcano y Hasegawa, 2018).

Las saponinas han sido utilizadas como materia prima para la síntesis de las hormonas esteroides. Se han investigado unas 6000 plantas que pertenecen a 208 familias y a 1397 géneros en busca de sapogeninas que puedan transformarse fácilmente en hormonas esteroides como la cortisona e hidrocortisona. (Marcano y Hasegawa, 2018).

Las saponinas esteroides se encuentran comúnmente en las familias *Liliaceae*, *Dioscoreaceae* y *Solanaceae*. En el caso de las saponinas triterpenoides se pueden encontrar en las *Umbelliferae*, *Leguminosae*, *Caryophyllaceae* y *Liliaceae*, entre otras familias (Marcano y Hasegawa, 2018).

#### II.1.2.4.2. Glicósidos cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos presentan como característica de tener un núcleo esteroidal con un anillo de lactona insaturada en la posición 17 y una porción de azúcar para la posición 3. Se ha demostrado que la lactona con el esteroide son las partes que generan un efecto biológico, debido a su eficacia y utilidad en enfermedades para el corazón. La naturaleza del resto de lactona se encarga de caracterizar el subgrupo de glicósidos en cardenólidos o bufadienólidos (o bufanólidos) (Manrique, 2015) (Figura 14).

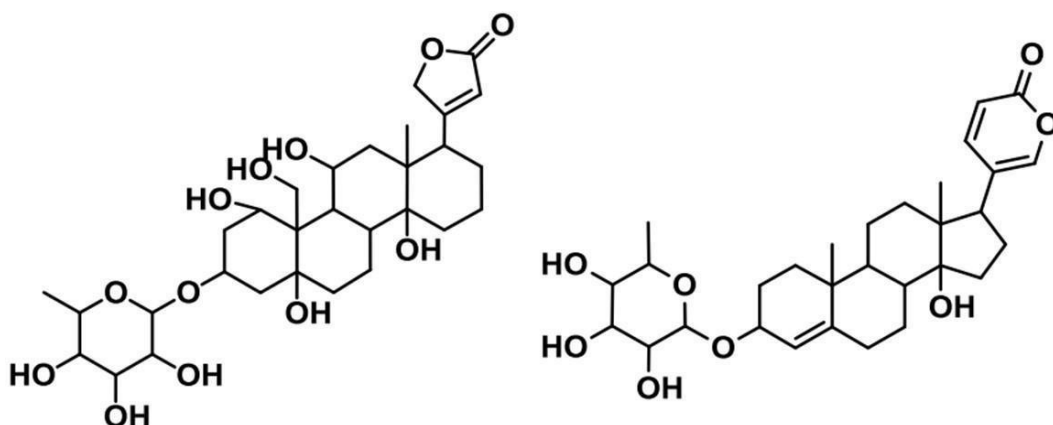


Figura 14. Clasificación de los glicósidos cardiacos. Cardenólidos (izq),  
bufadienólidos (der) (Manrique, 2015)

Entre los glicósidos cardiacos más frecuentes se encuentran los cardenólidos siendo de mayor importancia la digitoxina, digoxina, gitoxina y K-estrofantósido, cuyas geninas: digitoxigenina, digoxigenina, gitoxigenina y estrofantina, respectivamente, están unidas por C-3 con azúcares poco comunes, generalmente triosas, que incluyen desoxiazúcares, azúcares metilados, etc., además de glucosa y ramnosa (Marcano y Hasegawa, 2018).

Los cardenólidos son particularmente abundantes en la familia Apocynaceae (*Nerium Oleander*) y los bufadienólidos sólo se han encontrado en *Liliaceae* y *Ranunculaceae* (Manrique, 2015).

Su principal importancia recae en el área farmacéutica donde se utiliza para tratar afecciones del corazón ya que incrementa la fuerza y velocidad de las contracciones cardíacas, la denominada acción inotrópica positiva (Manrique, 2015).

#### II.1.2.5. Tetraterpenos

Los tetraterpenos son pigmentos carotenoides que son xantofilas que poseen uno o más átomos de oxígeno en su estructura y a los carotenos. Los carotenoides ( $C_{40}H_{56}$ ), aunque contienen más átomos de carbono, son estructuras más sencillas que los triterpenos. Generalmente asociados a las clorofilas; son solubles en las

grasas y están en las plantas en diferentes tipos de tejidos. Los tetraterpenoides nunca presentan grandes sistemas de anillos condensados. Pueden ser acíclicos, monocíclicos y bicíclicos (Marcano y Hasegawa, 2018).

### II.1.3 Alcaloides

Los alcaloides son considerados uno de los grupos más diverso y heterogéneo de los metabolitos secundarios en los seres vivos, donde se conocen aproximadamente entre 5000 y 15000 metabolitos; si bien la mayoría han sido aislados de plantas, se ha comprobado que otros organismos como insectos, invertebrados marinos, microorganismos y algunos animales también los sintetizan (Marcano y Hasegawa, 2018).

Los alcaloides son sólidos, cristalinos e incoloros, que reaccionan como componentes básicos; contienen uno o más átomos de nitrógeno que forman parte de un anillo y que poseen actividad farmacológica; esta definición es aceptable, pero hay excepciones (Avalos y Pérez, 2009):

1. En su mayoría son sustancias cristalinas, pero algunas forman precipitados amorfos y unos pocos son líquidos a temperatura ambiente como en el caso de la nicotina o la higrina. Además, los alcaloides sólidos tienen puntos de fusión característico; se descomponen al calentarse y no son destilables; la mayoría no tiene olor a temperatura ambiente y son de sabor amargo. Los alcaloides líquidos sí pueden destilarse sin descomponerse y son de sabor acre. h
2. Un reducido grupo de alcaloides en el estado de base libre o en forma de sales tiene color (berberina y sanguinarina).
3. Debido a la presencia del átomo de nitrógeno la mayoría de los alcaloides presentan reacciones alcalinas al tornasol y a otros indicadores; en estos casos, los alcaloides pueden protonarse en medio ácido.

Cuando se intenta aislar tales compuestos se debe tomar en cuenta que, en su forma iónica, son solubles en agua, mientras que si está libre son solubles en disolventes

orgánicos, esto dependerá de la molécula y su comportamiento. La basicidad hace que los alcaloides sean muy susceptibles a descomponerse, particularmente por la acción del calor y de la luz en presencia de oxígeno; el producto de esta reacción es un óxido de nitrógeno, compuesto muy importante en la biosíntesis (Sánchez, 2022).

Se han propuesto diferentes clasificaciones para los alcaloides; por ejemplo, en función de su origen se pueden clasificar en: a) alcaloides derivados de aminoácidos (derivados de ornitina/lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptófano, del ácido antranílico y del ácido nicotínico); b) derivados de bases xánticas; c) derivados de terpenoides; d) alcaloides policétidos (Marcano y Hasegawa, 2018).

En el área terapéutica los alcaloides generan una diversidad de respuestas biológicas como lo son el efecto analgésico, estimulante, relajante, aumento de la frecuencia cardíaca, disminución del tono intestinal, espasmolítico, bloqueador del impulso nervioso, esto debido a sus interacciones con neurotransmisores, actuando sobre el sistema nervioso central y sobre el sistema nervioso autónomo. Adicionalmente, también se han identificado alcaloides con efecto antitumoral y antiparasitario, entre otras acciones. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos, sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico debido a su acción sobre diversos órganos y sistemas (Avalos y Pérez, 2009).

#### II.1.4 Alcamidas

Las alcamidas son compuestos ampliamente distribuidos que abarcan cerca de 200 compuestos pudiéndose encontrar en 10 familias botánicas: *Aristolochiaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Convolvulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Menispermaceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae* y *Solanaceae*, donde este tipo de compuestos pueden estar distribuidos en toda la planta (Bortolini, 2018).

Las alcamidas están constituidas por la unión de un ácido graso de longitud de cadena mediana o larga (8 a 18 carbonos) generalmente alifática o lineal, con una amina proveniente de algún aminoácido que sufre la descarboxilación al momento de la condensación. Las amidas cuya cadena acídica es alifática, dependiendo del

tipo de enlaces insaturados que presentan, se pueden separar en dos grupos: las alcanidas olefinicas, con al menos una doble ligadura; y las alcanidas acetilénicas, con al menos una triple ligadura (García y col, 2004). Las alcanidas también pueden presentar anillos homo y heterocíclicos, como los observados en la familia *Piperaceae* (Meza ,2013).

Se han aislado algunas alcanidas de la familia *Asteraceae* por ejemplo la afinina o espilantol, aislada de *Heliopsis longipes* y de *Acmella oleraceae* o la pellitorina, aislada de *Anacyclus pyrethrum*. En la familia *Rutaceae* se han reportado alcanidas que se caracterizan por tener grupos hidroxilo, como el sanshool e hidroxisanshool, aisladas de especies del género *Zanthoxylum* (Ordoñez, 2018).

Entre las funciones de las alcanidas, se encuentran la regulación del crecimiento y desarrollo de una planta, actuando directamente sobre las células que las sintetizan o viajando a otros tejidos, por lo cual se denominan fitohormonas (Bortolini, 2018). A diversas alcanidas se les han atribuido actividad antimicrobiana y antifúngica principalmente (Meza, 2013); adicionalmente, también se ha demostrado acción vasodilatadora y antihipertensiva (Castro-Ruiz y col, 2017; Luz-Martínez y col., 2024).

## II.2 Métodos de identificación

En la literatura encontramos diversos métodos empleados para la identificación de los metabolitos secundarios, los cuales generalmente se basan en reacciones de estos metabolitos con un reactivo para dar una reacción colorida. Algunas de estas reacciones son generales para un grupo determinado de metabolitos y otras son más específicas para algunos compuestos muy cercanos estructuralmente. Otro grupo de metodologías empleadas en la identificación de los metabolitos presentes en una muestra son los métodos cromatográficos que ofrecen resultados más específicos que las reacciones colorimétricas (Giovanni, 2017).

### II.2.1. Reacciones de coloración

Actualmente existen diversas técnicas con mayor o menor grado de sofisticación para determinar la identidad química de los metabolitos presentes en un extracto; sin embargo, los ensayos fitoquímicos basados en reacciones de coloración aún constituyen una forma adecuada de realizar un análisis preliminar para conocer la composición cualitativa de una muestra, ya que son particularmente útiles cuando se estudian un número alto de extractos y permite la discriminación de aquellas especies que carezcan de potencial dada la presencia o ausencia de ciertos componentes (Aparacio, 2017).

Estas reacciones de coloración están basadas en la medición u observación del cambio de color durante la reacción de dos sustancias o más, donde suelen ser sensibles, reproducibles, de bajo costo y aunque en muchas ocasiones no son específicas para un tipo de metabolito dado, la información que generan suele ser valiosa para orientar los estudios posteriores (Álvarez, 2023).

### II.2.2. Cromatografía

La cromatografía puede definirse tal como lo dijo Keulemans en 1959 “Es el método físico de separación en donde los componentes a separar se distribuyen en dos fases una de las cuales constituye un lecho estacionario de gran desarrollo superficial y la otra un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario (fase móvil)” (Sgariglia y col, 2010).

Dos factores de gran influencia son:

- a) Retención: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- b) Desplazamiento: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.



Por lo tanto, a grandes rasgos la muestra a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la muestra a distintas velocidades, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas a ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original. La cromatografía se emplea para conocer y separar los componentes por su diferencia de polaridad y para su identificación (Sgariglia y col, 2010).

Existen distintos tipos de cromatografía las cual pueden clasificarse por

- Fase móvil y estacionaria

1. Cromatografía sólido-líquido: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un líquido.
  2. Cromatografía líquido-líquido: la fase estacionaria es un líquido anclado a un soporte sólido y la fase móvil es un líquido.
  3. Cromatografía líquido-gas: la fase estacionaria es un líquido no volátil impregnado en un sólido y la fase móvil es un gas.
  4. Cromatografía sólido-gas: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un gas.
- (Sgariglia y col, 2010)

- Mecanismo de separación

1. Cromatografía de adsorción: la separación se basa fundamentalmente en las distintas afinidades de adsorción de los componentes de las muestras hacia la superficie de un sólido activo.
2. Cromatografía de reparto: la separación se basa fundamentalmente en las diferencias de solubilidad de los componentes de la muestra en la fase estacionaria o en las diferencias de solubilidad de los componentes en la fase móvil y en la estacionaria.

3. Cromatografía de intercambio iónico: la separación se basa fundamentalmente en la distinta susceptibilidad para el intercambio de iones de los componentes de la muestra.

4. Cromatografía de exclusión: la separación se basa en los efectos de exclusión tales como diferencias en el tamaño de las moléculas o en su carga.

5. Cromatografía de afinidad: la separación se basa en una interacción biológica específica entre el analito y la fase.

6. Cromatografía en columna: la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo angosto y la fase móvil es forzada a pasar a través del tubo bajo presión o por gravedad.

7. Cromatografía de capa fina (CCF): la separación se basa en una capa de adsorbente de espesor uniforme que se deposita sobre una placa de vidrio, aluminio o plástico, recubierta en su mayoría de las veces en sílice gel (Sgariglia y col, 2010).

Esta última es una técnica analítica rápida y sencilla que permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto: Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.
- Comparar muestras: Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción: Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado (Sgariglia y col, 2010).

El procedimiento para realizar una CCF es depositar la muestra a analizar cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio. Posteriormente, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través

del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente (UAM, S/F).

Para la detección de resultados pueden visualizarse si la muestra tiene pigmentos, sin embargo, hay ocasiones en que las muestras son incoloras y en tales casos se opta por usar reveladores ya sean físicos (luz UV o calor) o químicos (sustancias químicas que reaccionan u oxidan los componentes de la muestra) (Sgariglia y col, 2010).

La literatura ofrece muchas y múltiples pruebas para la detección de los diferentes tipos de compuestos; por una parte, la realización de las pruebas no siempre es factible en las condiciones de operación en muchos laboratorios de investigación. Por lo que, es de gran utilidad tener una preselección de los ensayos a realizar para facilitar y agilizar el trabajo de investigación. En este punto, el presente trabajo pretende elegir ensayos específicos para identificar los diferentes metabolitos, estandarizar dichos ensayos para construir una marcha fitoquímica sencilla, de fácil realización y que ofrezca resultados confiables cuando se aplica a los extractos obtenidos de una planta en particular.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1. Objetivo General.**

Estandarizar la secuencia metodológica para la identificación de metabolitos especializados presentes en extractos vegetales.

#### **III.2. Objetivos particulares.**

- Establecer los extractos que deben elaborarse y los ensayos específicos que deben realizarse para llevar a cabo las pruebas de identificación de metabolitos.
- Llevar a cabo la estandarización de los ensayos de identificación de fenoles por la reacción de Folin-Ciocalteu, de flavonoides mediante la prueba de Shinoda, de taninos a través de la prueba del cloruro férrico, de fenilpropanoides a través del ensayo de Arnow, de cumarinas y antraquinonas mediante la reacción de Bornträger y de alcaloides mediante los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wager.
- Definir las condiciones para la identificación de compuestos terpénicos por los ensayos de Liebermann-Burchard (triterpenos y esteroides) y Baljet para lactonas sesquiterpénicas (triterpenos esteroides y glicósidos cardiotónicos).
- Establecer las condiciones adecuadas para llevar a cabo la identificación de fenoles, flavonoides, fenilpropanoides, cumarinas, antraquinonas, alcaloides y compuestos terpenoides mediante cromatografía en capa fina.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **IV.1. Materiales**

- Placas de sílica gel
- Cámara cromatográfica
- Material de vidrio (vasos de precipitado, pipetas, probetas, embudo, agitador, matraces volumétricos.)
- Papel filtro
- Balanza analítica y granataria
- Molino eléctrico o Mortero.
- Micro espátula
- Frascos ámbar
- Cámara de vis/UV
- Tubos de ensayo
- Gradilla

#### **IV.1.1. Reactivos empleados para la detección de ME**

- Reactivo de Folin- Ciocalteau

El reactivo de Folin-Ciocalteau utilizado en la identificación de compuestos fenólicos se obtuvo de manera comercial (Sigma-Aldrich).

- Sulfato cérico amoniacal

Pesar 12 g de sulfato cérico amoniacal y adicionarlos lentamente y con agitación constante sobre 350g de hielo; posteriormente adicionar 12.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y mantener la agitación. Una vez obtenida la solución, filtrar en algodón. se guarda en frasco color ámbar.

- Reactivo de Arnow

Se preparó disolviendo 10 g de nitrito de sodio, 10 g de molibdato de amonio en agua hasta 100 mL.

- Vainillina sulfúrica

Vainillina al 1% en etanol (solución 1) y ácido sulfúrico en etanol al 10% (solución 2). Las placas son asperjadas con la solución 1 e inmediatamente después con la solución 2

- Anisaldehído sulfúrico

0.5 mL de anisaldehído es mezclado con 10 mL de ácido acético glacial, seguido de 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico.

- Reactivo de Liebermann-Burchardt:

5 mL de anhídrido acético y 5 mL de ácido sulfúrico se agregan cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto en un baño de hielo.

- Reactivo de Baljet

Se mezclan volúmenes iguales de solución A (solución etanólica de ácido pícrico al 1%) y solución B (KOH al 5.7% en agua).

- Reactivo de Kedde

Se mezclan volúmenes iguales de solución A (ácido 3,5- dinitrobenzoico al 3% en etanol) y solución B (NaOH 2M en agua).

- Reactivo Dragendorff

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado con 20 mL de ácido nítrico (cuya densidad sea de 1.18 g/mL, al 30%). En otro matraz colocar 27.2g de yoduro de potasio con 50mL de agua. Mezclar las dos soluciones y dejarlas en reposos durante 24 horas. Decantar la solución (para separar residuos de cristales de nitrato de potasio) y aforar con agua a 100 mL.

- Reactivo de Mayer

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL, disolver 1.36 g de cloruro de mercurio con 60 mL de agua. En otro matraz de la misma capacidad, disolver en agua 5 g de yoduro de potasio. Mezclar las soluciones y aforar a 100 mL con agua destilada. El reactivo solo se agrega a soluciones previamente aciduladas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

- Reactivo de Wagner

En un matraz volumétrico de 100 mL, disolver 1.27g de yodo (resublimado) y 2 gotas de yoduro de potasio en 20 mL de agua; aforar la solución con 100 mL de agua destilada.

#### IV.1.2. Obtención de los extractos de trabajo

Los extractos se obtuvieron a partir de muestras secas de plantas adecuadas para la identificación de metabolitos secundarios específicos para comprobar su presencia y contrastar el resultado con los estándares correspondientes (controles positivos). Para la identificación de fenoles, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, saponinas, glucósidos cardíacos, alcaloides y alcaloides se prepararon extractos etanólicos en proporción 1:10 con el material vegetal. Se dejaron macerar por dos semanas, al término de las cuales se filtró el extracto obtenido y se eliminó el exceso de solvente con la ayuda de un rotaevaporador para concentrar los extractos.

Para la identificación de compuestos terpenoides se prepararon extractos de diclorometano, en proporción 1:10 con el material vegetal. Se dejaron macerar por dos semanas, al término de las cuales se filtró el extracto obtenido y se eliminó el exceso de solvente con la ayuda de un rotaevaporador para concentrar los extractos. Las especies a utilizar para la obtención de los extractos e identificar en ellos los diferentes metabolitos secundarios son los siguientes:

Cuadro 2. Especies y estándares para la identificación de los metabolitos

Metabolito	Planta	Área vegetal	Solvente	Estándar
Compuestos fenólicos	Romero ( <i>Rosmarinus officinales</i> ) y manzanilla ( <i>Matricaria Chamomilla</i> )	Hojas y Tallos	Etanol	Acido gálico
Flavonoides	Romero y manzanilla	Hojas y tallos	Etanol	Quercetina

Cuadro 2 (cont). Especies y estándares para la identificación de los metabolitos

Fenilpropanoides	Canela ( <i>Cinnamomum verum</i> ), Anis estrella ( <i>Illicium verum</i> ) y Anis ( <i>Pimpinella anisum</i> )	Tallo y semillas	Etanol	Cinamadehido
Taninos	Tejocote ( <i>Crataegus spp</i> ) y Canela ( <i>Cinnamomum verum</i> )	Hojas y tallos	Etanol	Catequina
Antraquinonas	Sábila ( <i>Aloe vera</i> )	Látex (liquido amarillo)	Etanol	Senosido A
Alcaloides	Chicalote ( <i>Argemone mexicana</i> )	Hojas	Etanol	Atropina
Glicósidos Cardiotónicos	Adelfa ( <i>Nerium oleander</i> )	Hojas	Etanol Diclorometano	Digoxina
Alcamidas	Chilcuague ( <i>Heliopsis longipes</i> )	Raíz	Etanol	Afinina
Saponinas	Arrayan salvaje ( <i>Ruscus aculeatus</i> )	Hojas	Etanol	Dioscina
Lactonas sesquiterpénicas	Estafiate ( <i>Artemisia ludoviciana</i> )	Hojas y tallos	Etanol y Diclorometano	Helenalina
Cumarinas	Lavanda ( <i>Lavandula spp</i> )	Flores, tallos y hojas	Etanol	Umbeliferona
Terpenos	Eucalipto ( <i>Eucalyptus sp</i> )	Hojas	Diclorometano	Limoneno Acido oleanólico

Los estándares a utilizar se prepararon una concentración del 10% p/v.



#### IV.1.3. Métodos de identificación

##### IV.1.3.1. Compuestos fenólicos.

- Ensayo colorimétrico (Reacción de Folin-Ciocalteu)

En un tubo de ensayo se adicionaron 1 mL del extracto etanólico a evaluar + 5 gotas del reactivo de Folin-Ciocalteu + 2 gotas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7.5%. En un segundo tubo (control negativo) se colocó sólo la mezcla de reactivos y se substituyó el volumen de extracto por etanol. Una coloración azul es indicativa presencia de polifenoles. En un tercer tubo se realizó la prueba con el estándar.

Interpretación de resultados:

Coloración amarilla: indica que no se detectaron fenoles.

Coloración verdosa: se detectaron fenoles en baja cantidad.

Coloración azul clara: se detectaron fenoles en cantidad moderada.

Coloración azul intensa: se detectaron fenoles en alta cantidad.

- Cromatografía en capa fina

Para esta prueba se utilizó como fase móvil acetato de etilo: metanol: agua (100:12.5:10). Se observó en la cámara luz UV a 254 y 365 nm. Posteriormente se reveló con  $\text{FeCl}_3$  al 10% (solución acuosa) con calentamiento por un lapso de 10 minutos. Se utilizó como control positivo una disolución de ácido gálico en etanol.

##### IV.1.3.2. Flavonoides

- Ensayo colorimétrico (Prueba de Shinoda)

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto etanólico y 0.2 g de limaduras o polvo de magnesio metálico. Se adicionó ácido clorhídrico concentrado gota a gota hasta que terminó el desprendimiento de hidrógeno. Se observó durante 10 minutos los cambios de color producidos.

Interpretación de resultados:

Coloraciones rosada, roja, violeta, anaranjada es positiva para sustancias que posean en su estructura el núcleo de la  $\gamma$ - benzopirona, tales como: flavonas,

flavonoles, flavanonas, flavanoles, xantonas; las isoflavonas, las chalconas y auronas no presentan coloración.

De manera general, las flavonas y flavonoles dan coloración de amarillo a rojo; los flavanoles, de rojo a magenta y las flavanonas rojo, magenta, violeta o azul.

- Cromatografía en capa fina

Se llevaron a cabo la cromatografía con la fase móvil acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (100:11:11: 26). Se observaron a la luz visible y a UV 365 nm, tanto antes como después de asperjar con cloruro de aluminio en metanol al 5%.

Se utilizó como control positivo la quercetina.

#### IV.1.3.3. Taninos hidrolizables y condensados.

En cinco tubos de ensayo se colocaron 0.5 mL del extracto etanólico y dos gotas de agua destilada.

Al primer tubo no se le agregó nada más; al segundo tubo se le añadió 1 gota de cloruro férrico al 10%, al tercer tubo 2 gotas y así sucesivamente hasta llegar al quinto tubo. La caracterización de taninos se hace de acuerdo con la coloración observada:

No hay cambio significativo de color: no se detecta presencia de taninos

El azul oscuro indica la presencia de taninos pirogálicos (hidrosolubles)

Verde oscuro indica la presencia de fenoles o taninos de tipo catecol (flavonoides y taninos condensados).

##### IV.1.3.3.1. Prueba para taninos hidrolizables

Se añadieron en un tubo de ensayo 0.5 mL del extracto y 0.5 mL de etanol, posteriormente se agregaron unos miligramos de nitrito de sodio y unas gotas de ácido acético, lo cual debe dar como resultado una coloración rosada que posteriormente pasa a café. Se utilizó como control positivo el ácido tánico.

##### IV.1.3.3.2. Prueba para taninos condensados

En un tubo de ensayo se colocaron 5 mL de extracto, se le añadieron 0.5 mL de ácido clorhídrico y 1 mL de formaldehído al 37%. La formación de un precipitado es indicativa de la presencia de taninos condensados o proantocianidinas.

#### IV.1.3.4. Fenilpropanoides.

- Ensayo colorimétrico (Prueba de Arnow)

Se colocaron 3 tubos de ensayo:

Al primero se añadió 1 mL de extracto etanólico a ensayar como control negativo.

En el segundo, 1 mL de extracto a ensayar más 2 mL de ácido clorhídrico al 0.5 N, luego se añadió 2 mL de solución acuosa de nitrito de sodio al 10% (reactivo de Arnow) y finalmente 2 mL de solución acuosa de hidróxido de sodio 2 N.

En el tercer tubo se adicionaron los reactivos sin la muestra.

Interpretación de resultados:

El reactivo de Arnow en presencia de fenilpropanoides, presenta coloración naranja y después de la adición de la sosa se genera un rosado púrpura.

- Cromatografía en capa fina

Fase móvil: tolueno: acetato de etilo (9:1) y se usó como revelador vainillina sulfúrica en etanol, seguido de calentamiento. Se usó como control positivo cinamaldehído.

Interpretación de resultados: los fenilpropanoides dan coloraciones rojizas, púrpuras, amarillas e incluso grises con este revelador; sin embargo, otros compuestos de tipo terpenoide también dan positivo frente a este revelador.

#### IV.1.3.5. Antraquinonas

- Ensayo colorimétrico (Reacción de Bornträger)

Se emplearon 5 mL de extracto etanólico para identificar antraquinonas glicosiladas, divididos en 2 tubos de ensayo.

En el primer tubo se agregó 1 mL de solución de hidróxido de sodio al 5% en agua y en el segundo tubo se adicionó 1 mL de solución de acetato de zinc al 0.5% en metanol. Se utilizó como control positivo la aloína.

Interpretación de resultados: la coloración roja en la fase acuosa indica la presencia de antraquinonas.

- Cromatografía en capa fina

Se realizaron 3 cromatografías con diferentes fases móviles.

1. Acetato de etilo: n-hexano (8:2)
2. Acetato de etilo: metanol: agua (100:17:13)
3. n-propanol: acetato de etilo: agua. (40:40:30).

Se observó a la luz UV-365 nm.

Interpretación de resultados: todas las antraquinonas dan fluorescencia amarilla o rojo-marrón.

Posteriormente se puede hacer reaccionar con hidróxido de sodio al 5%

Interpretación de resultados: las antraquinonas presentan coloración roja en el visible.

Antronas y antranos: amarillo en el visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm.

Se usó como estándar senósido A.

#### IV.1.3.6. Cumarinas

- Ensayo colorimétrico

En un tubo de ensayo se colocaron 2 mL del extracto etanólico de la planta y se tapó con papel de filtro impregnado en solución diluida de hidróxido de sodio, posteriormente se llevó a baño maría.

Se retiró el papel de filtro y se examinó bajo luz UV, siendo la fluorescencia amarilla indicativa de la presencia de cumarinas.

- Cromatografía en capa fina

Se realizó una cromatografía empleando una fase móvil de tolueno: éter (1:1, saturado con ácido acético al 10%). Para preparar la fase móvil se agitan, por 5 min, en un embudo de separación 50 ml de tolueno, 50 ml de éter y 50 ml de ácido acético al 10%. Se separan las capas y se utiliza la capa orgánica.

Interpretación de resultados: Se observa en la luz UV-365 nm y da una intensa fluorescencia: azul, marrón, o azul-verdosa.

Las zonas que muestren fluorescencia azul se intensifican asperjando con solución de hidróxido de potasio al 5% en etanol.

Se usó como control positivo umbeliferona.

#### IV.1.3.7. Terpenos

- Ensayo colorimétrico

1. Reacción de Liebermann-Burchard

Se tomó 1 mL del extracto de diclorometano y se colocó en una cápsula de porcelana, se llevó a sequedad para posteriormente volver a suspender con 6 gotas de cloroformo; se dividió en 2 tubos de ensayo con tapa. Se agregaron 2 gotas de anhídrido acético y 1 gota de ácido sulfúrico al primer tubo, dejando el segundo como control negativo.

Interpretación de resultados:

Una coloración azul o verde es indicativo de esteroides; roja, rosa o violeta de triterpenos y una coloración amarilla pálida de esteroides o triterpenos saturados.

2. Reacción de Salkowski

En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 mL del extracto de diclorometano o etanólico con 1 mL de cloroformo, posteriormente se adicionó, deslizando por las paredes del tubo, con sumo cuidado 1 mL de ácido sulfúrico al 85%.

Interpretación: La formación de colores amarillo o rojo se considera positivo para terpenos. La visualización de una coloración azul, verde o violeta en la interfase es característica de los carotenoides.

- Cromatografía en capa fina

La fase móvil empleada fue hexano: acetato de etilo 7:3. La placa se reveló con el reactivo de Lieberman Burchard para la identificación de triterpenos y esteroides, aunque también se puede tratar con anisaldehído-ácido sulfúrico para la identificación general de terpenos. Los monoterpenos usualmente generan coloraciones azul, verde, rojo y café al revelar con anisaldehído. La mayoría de los compuestos presentan fluorescencia a 365 nm.

Se utilizaron como controles positivos un monoterpeno (limoneno) y un triterpeno, el ácido oleanólico.

#### IV.1.3.8. Lactonas sesquiterpénicas.

Prueba de Baljet: se utilizaron dos soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de utilizarse. La solución A, contiene 1g de ácido pícrico en 100 mL de etanol y la solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para esta prueba se colocaron 3 a 5 mL de extracto y unas 3 a 4 gotas de reactivo, siendo positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura.

- Cromatografía en capa fina

Fase móvil: diclorometano-metanol-agua (87: 12: 1). Para revelar primero se asperjó con m-dinitrobenceno al 2% en etanol, se dejó secar y se asperjó por segunda vez con NaOH al 5% en etanol al 50%, por último, se llevó a la estufa (110 °C) por 6 minutos.

Interpretación: Si la lactona tiene en su estructura una  $\gamma$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada, se revelan manchas violetas con  $R_f$  alto ( $> 0.5$ ).

Se usó como estándar la helenalina.

#### IV. 1.3.9. Saponinas

- Prueba de la espuma

Se tomaron 1 mL de cada uno de los extractos etanólico y de diclorometano en tubos de ensayo separados, se añadieron 9 mL de agua a cada uno, se agitaron vigorosamente por 30 segundos y se dejaron en reposo durante 15 minutos.

La espuma sobrenadante indica la presencia de saponinas en la muestra.

La proporción de saponinas se mide de acuerdo a la altura de la espuma sobrenadante:

Altura de menos de 5 mm = no se detectan saponinas

Altura de 5-9 mm = contenido bajo

Altura de 10-14 mm = contenido moderado

Altura mayor de 15 mm = contenido alto

- Cromatografía en capa fina

Se utilizaron las siguientes fases móvil para la cromatografía:

1. Cloroformo: ácido acético: metanol: agua (32:16:6:4)
2. n-butanol: etanol: amoníaco concentrado (3.5:1:2.5)
3. Acetona: benceno (2.8:0.2)
4. Hexano: acetato de etilo (1:1)
5. Cloroformo: acetona (9:1)
6. BAW (butanol- ácido acético- agua) (4:1:1)

Se usó como revelador vainillina-ácido sulfúrico (coloración azul, azul violeta, rojo o amarillo-café) o anisaldehído-ácido sulfúrico (con coloraciones similares a las obtenidas con la vainillina), ambos reveladores son generales para compuestos terpenoides.

Como control positivo se utilizó dioscina

#### IV.1.3.10 Glicósidos cardiotónicos

Se empleó el extracto etanólico de la planta

- Ensayos colorimétricos

Se colocaron 6 tubos de ensayo con su respectiva muestra y se le añadieron los siguientes reactivos:

1. Al primer tubo 1 mL de reactivo de Baljet para obtener una coloración roja, naranja rojiza o violeta.
2. Al segundo 1 mL de reactivo de Kedde (volúmenes iguales de solución A: ácido 3,5- dinitrobenzoico al 2% en metanol y solución B: KOH 5.7 % en agua). Coloración rosa o azul-violeta visible indican cardenólidos, los bufadienólidos no reaccionan. El color se atenúa en pocos minutos.
3. Al tercero: 1 mL de solución al 1% de m-dinitrobenzoceno en etanol al 50% y enseguida se añadieron 2-3 gotas de solución de NaOH al 20% en agua (reactivo de Raymond-Marthoud) para identificar el anillo lactónico de los cardenólidos. Se producen coloraciones violeta o azul.

4. En el cuarto se realizó la reacción de Keller-Kiliani. (5 mL de ácido acético glacial, 1 gota de cloruro férrico al 5% en metanol y 1-2 gotas de ácido sulfúrico concentrado). En uno o dos minutos se observan coloraciones intensas.
5. En el quinto se llevó a cabo la reacción de Salkowski para identificar el núcleo esteroidal (0.5 mL del extracto se mezcla con 1 mL de cloroformo, dejando deslizar por las paredes del tubo con sumo cuidado 1 mL de ácido sulfúrico del 85%). La coloración amarilla-roja se toma como positiva.
6. En el sexto se utilizó la reacción de Liebermann–Burchard (1 mg de muestra, gotas de ácido acético + 3 ml anhídrido acético en ácido sulfúrico (50:1))

- Cromatografía en capa fina

Se realizaron dos cromatografías con las siguientes fases móviles.

1. Cloroformo: metanol: agua (65:35:10).
2. Acetato de etilo: metanol: agua. (100:13.5:10).

Para la revelación de resultados se emplearon reactivos específicos para el anillo  $\gamma$ -lactona (cardenólidos): reactivo de Baljet y reactivo de Raymond.

Se usó como estándar positivo digoxina.

#### IV.1.3.11 Alkaloides

- Ensayo colorimétrico.

A 5 mL del extracto etanólico de la planta, se adicionaron 5 mL de HCl (10%) y se calentó por 10 min. Posteriormente se enfrió, filtró y se dividió en tres tubos de ensayo a los que se agregaron unas gotas de los reactivos de reconocimiento: Dragendorff, Mayer o Wagner. Una leve turbidez o precipitado (rojo a naranja, blanco a crema y marrón, respectivamente) evidencia la posible presencia de los alcaloides.

Para tubos testigo se debe poner 1 mL de cada reactivo.

- Cromatografía de capa delgada (TLC)

Se empleó el extracto etanólico de la planta.

La fase móvil que se utilizó fue acetato de etilo: metanol: hidróxido de amonio (8.5:1:0.5) y se empleó como revelador el reactivo de Dragendorff.



Interpretación: manchas de color rojo a naranja se toma como positivo.

Se usó como estándar positivo atropina.

#### IV.1.3.12 Alcamidas

- Cromatografía en capa fina

Para esta cromatografía se utilizó como fase móvil hexano: acetato de etilo (2:1). Se usó como revelador anisaldehído-ácido sulfúrico con calentamiento en una parrilla de 5 a 10 min a 110 °C aproximadamente. Las monoenamidas dan coloración amarilla y las dienamidas dan coloración violeta.

Se empleó como estándar positivo la afinina.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### V.1. Compuestos fenólicos.

Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron los extractos etanólicos de las plantas romero (*Rosmarinus officinalis*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*), teniendo como referente que en sus hojas se han identificado compuestos fenólicos entre los que se encuentran ácidos fenólicos como el ácido gálico, cafeico o clorogénico y flavonoides tales como quercetina, catequina o apigenina (El Mihyaoui et al., 2022; Mena et al., 2016).

La reacción de identificación de fenoles con el reactivo de Folin Ciocalteu se fundamenta en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. Esto debido a que contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno y molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez y col, 2008).

Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 15, donde se puede observar la coloración azul intenso característica de la presencia abundante de fenoles en el tubo del control positivo (ácido gálico); respecto a las muestras de los extractos, la

coloración desarrollada es verde oscuro con cierta tonalidad azul que indicaría una cantidad de moderada a alta de fenoles en estas muestras.

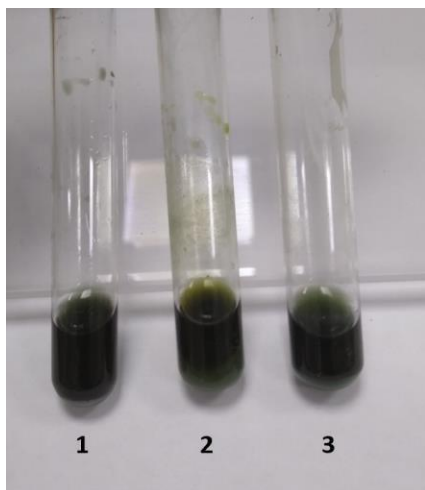


Figura 15. Identificación de fenoles por Folin-Ciocalteu. 1: estándar 2: extracto de manzanilla 3: extracto de romero

Para las pruebas cromatográficas se utilizó como fase móvil acetato de etilo: metanol: agua (100:12.5:10), se observó a la luz UV y posteriormente se reveló con cloruro férrico. Los fenoles se pueden indicar de forma presuntiva cuando se observa la placa bajo la luz ultravioleta y un poco más específicamente con el cloruro férrico

En la Figura 16 se puede observar las placas bajo la luz UV, en la A1 se presentan las manchas oscuras propias de compuestos insaturados a 254 nm, mientras que en la A2 se ve la fluorescencia a 365 nm característica de diversos compuestos fenólicos, tales como flavonoides. En la imagen B se puede visualizar a simple vista la presencia de compuestos fenólicos al hacer reaccionar la placa con cloruro de hierro, se logra apreciar la marca del estándar de un color azul oscuro y en los extractos evaluados coloraciones azul-violeta (Ochoa y Sarmiento, 2018).

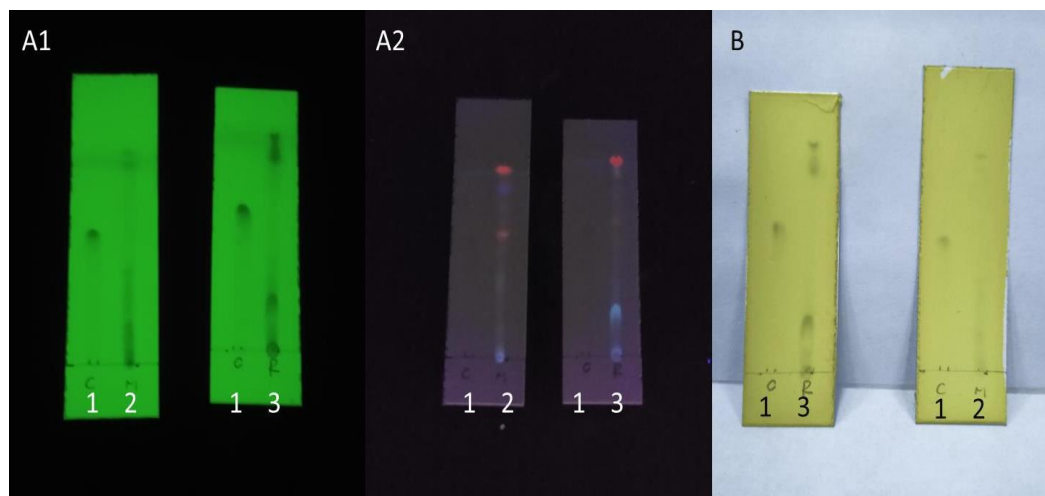


Figura 16. Identificación de fenoles en cromatografía en capa fina. Fase móvil acetato de etilo: metanol: agua (100:12.5:10). A1: bajo luz UV 254 nm. A2: bajo luz UV 365 nm. B: revelado con cloruro férrico. 1: control positivo 2: extracto de manzanilla. 3: extracto de romero

## V.2. Flavonoides.

El ensayo de Shinoda es una reacción de acomplejamiento del magnesio con los flavonoides en medio ácido, generando así un producto pigmentado que va de rojo anaranjado a violeta, en donde se consideró positiva la presencia de flavonoides si apareció una coloración de naranja a violeta (Cabrera, 2020).

Esta determinación se realizó nuevamente en los extractos etanólicos de manzanilla y de romero y se empleó quercetina como control positivo (López, 2013). En la Figura 17 se puede observar la coloración magenta del control positivo, mientras que los extractos de manzanilla y romero presentan coloración amarillo oscuro y naranja, la cual indica la presencia de flavonas y flavonoles de acuerdo a la interpretación de la técnica.

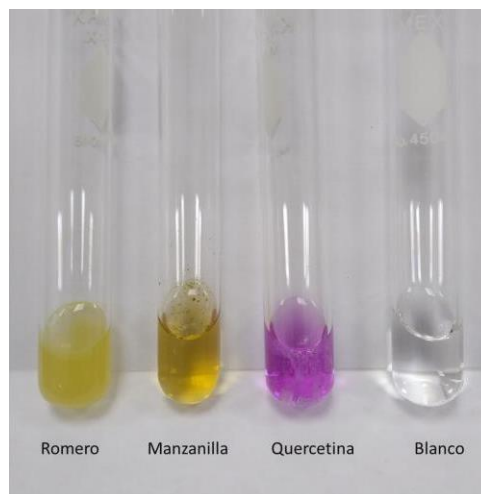


Figura 17. Ensayo de Shinoda para identificación de flavonoides. 1: romero, 2: manzanilla 3: quercetina (control positivo) 4: blanco

Respecto a los ensayos cromatográficos, en la Figura 18 podemos ver las placas bajo la luz UV antes y después del tratamiento con cloruro de aluminio para acentuar la fluorescencia de los compuestos presentes en los extractos.

En las placas tratadas con cloruro de aluminio (Figura 18B) se puede apreciar de mejor manera la presencia de flavonoides presentes en las muestras, así como también del estándar al ser expuesto a luz UV (365 nm), esto puede deberse a que el cloruro de aluminio interactúa con los grupos OH en los flavonoides, formando complejos de coordinación. Estos complejos alteran la absorción de luz visible y provocan el cambio de color, que se puede apreciar en luz UV (Rengifo, 2013).

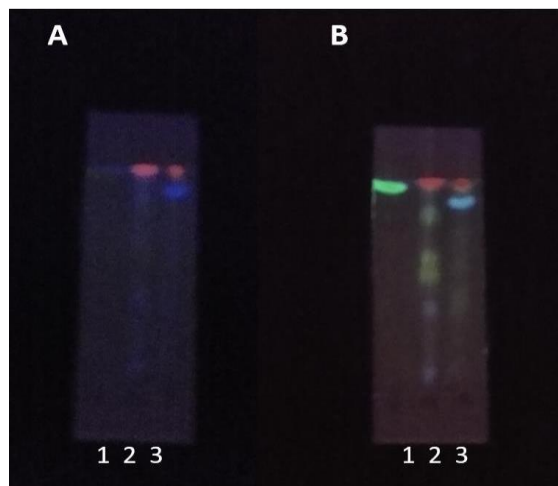


Figura 18. Cromatografía en capa fina. Fase móvil, acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26). A: antes del tratamiento con cloruro de aluminio. B: después del tratamiento con cloruro de aluminio. 1: control 2: manzanilla. 3: romero

### V.3. Taninos hidrolizables y condensados

En la evaluación de taninos se utilizaron dos fuentes vegetales que fueron el tejocote (*Crataegus spp*) (Cervantes y col, 2018) y la canela (*Cinnamomum verum*) (Ríos, 2023), en ambas especies se ha demostrado que se presenta una cantidad considerable de proantocianidinas, así como de ácido tánico, el cual se utilizó como control para dos de las tres pruebas llevadas a cabo.

Las muestras se sometieron a una prueba colorimétrica con cloruro de hierro el cual nos ayudó a identificar la presencia de taninos, esto debido a que los taninos son polifenoles que contienen múltiples grupos hidroxilo (-OH) en su estructura. Estos grupos pueden actuar como donadores de electrones, formando enlaces de coordinación con el catión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Barrera, 2014), lo que da lugar a complejos coloreados, como es el caso del estándar y la muestra de canela que cambiaron su coloración a una más oscura con tonalidades de color azul lo que puede confirmar la presencia de taninos hidrolizables (Figura 19). En el caso del tejocote, la coloración presentada fue verde oscuro, lo que significa que los taninos que están presentes son condensados.

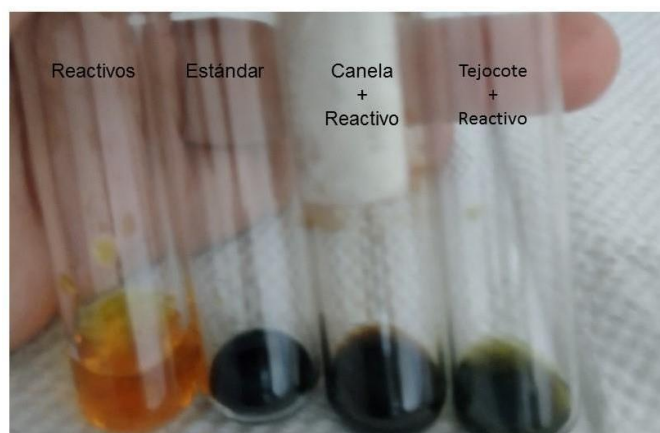


Figura 19. Prueba colorimétrica de cloruro de hierro para taninos

En el caso de la prueba de los taninos hidrolizables (Figura 20) la presencia de éstos es positiva cuando la coloración pasa a un tono amarillo o naranja, ya que el nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ), forma compuestos diazoicos o nitrosos, que generan los colores ya dichos (Isaza y col, 2007). En el caso del estándar queda comprobado que es un tanino de característica hidrolizable, por lo que podemos decir que la prueba funciona correctamente. En el caso de las muestras, la canela es la que tiene una mayor cantidad, esto tomando como referente el color rojo intenso que obtuvo. Para el tejocote, la reacción no es positiva lo que puede significar que éste no tiene taninos hidrolizables en cantidad significativa (Cervantes, 2018), o bien, tener varios componentes glicosilados lo cual pudiera influir en la reactividad química de la molécula, debido a que los grupos fenólicos al estar parcialmente bloqueados, reducirían la señal colorimétrica (Isaza y col, 2007).

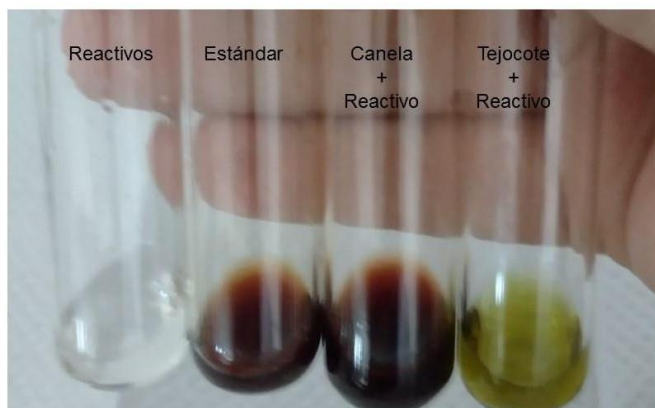


Figura 20. Prueba colorimétrica para taninos hidrolizables

La prueba colorimétrica para taninos condensados (Figura 21) se basa en una reacción de formación de precipitado de las procianidinas con formaldehído en medio ácido (Valenzuela y col., 2023).

En la figura 21 puede observarse que tanto para la muestra de canela como de tejocote se presenta la formación de un precipitado, que en el caso del estándar de catequina puede verse como turbidez y para los extractos se presentan como precipitados floculentos. Sin embargo, esta reacción se lleva a cabo con m-difenoles en general como la catequina y aunque es empleada para la cuantificación de taninos en general, no es una reacción específica para este tipo de taninos (Girón Morales, 2012).



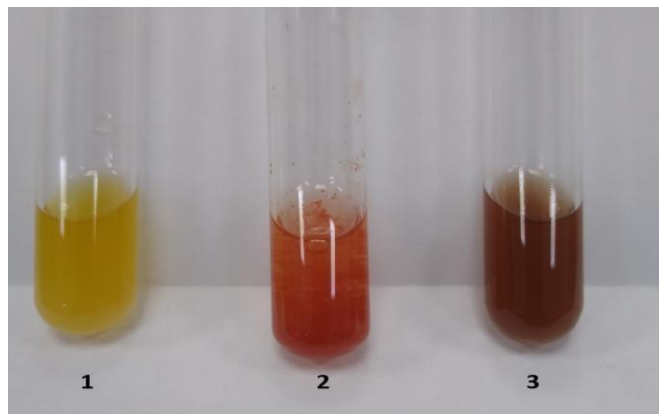


Figura 21. Prueba colorimétrica para taninos condensados. 1: control (catequina) 2: extracto de canela 3: extracto de tejocote

#### V.4. Fenilpropanoides

Para la determinación de fenilpropanoides se emplearon extractos de canela (*Cinnamomum verum*), anís estrellado (*Illicium verum*) y semilla de anís (*Pimpinella anisum*). La prueba de Arnow es un método colorimétrico utilizado para detectar compuestos derivados de los ácidos fenólicos C6C3, los que se denominan fenilpropanoides. La reacción emplea ácido clorhídrico y nitrito de sodio formando un complejo de una coloración característica después de añadir una base como NaOH (Salazar, 2017). En la Figura 22 se puede observar que el control positivo (cinamaldehído) y el extracto de canela son positivos para la prueba de Arnow. En la figura 23 se muestran los resultados de la prueba para las dos especies de anís, las cuales también fueron positivas, con coloraciones de diferente intensidad.

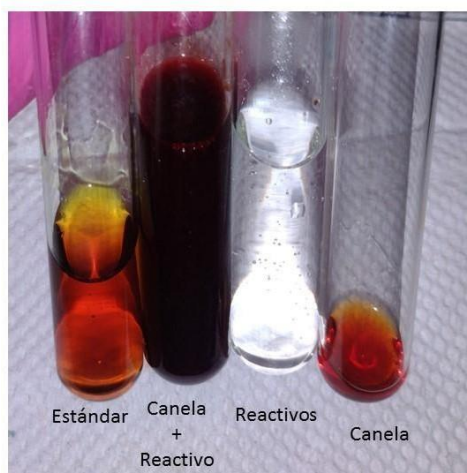


Figura 22: Prueba de Arnow para fenilpropanoides en el extracto de canela y con el control positivo (cinamaldehído)

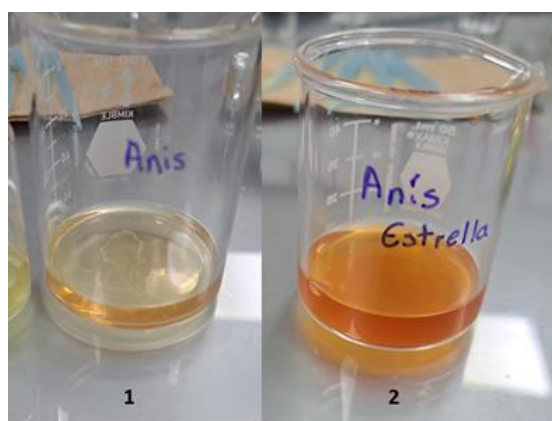


Figura 23. Prueba de Arnow para los extractos de 1: anís 2: anís estrella

La cromatografía en placa para la identificación de fenilpropanoides fue revelada con vainillina sulfúrica, revelador que es empleado comúnmente para la identificación de terpenoides y fenilpropanoides. En esta reacción, el ácido actúa como deshidratante y agente de oxidación, lo que ayuda a activar los compuestos fenólicos y otros grupos funcionales presentes en los compuestos orgánicos de la muestra; por su lado vainillina, que es un compuesto fenólico con un grupo aldehído, reacciona con los compuestos fenólicos de la muestra. En esta reacción, se forma una condensación entre los grupos fenólicos de los compuestos y el aldehído de la vainilla (Ochoa y

Sarmiento, 2018). En el caso de los fenilpropanoides reaccionan generando colores anaranjados, rojos o morados, tal como puede observarse en la Figura 24 para el control positivo y para el extracto evaluado.

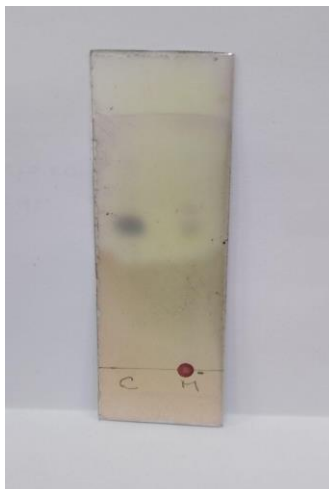


Figura 24. Cromatografía de fenilpropanoides. Fase móvil, tolueno: acetato de etilo (9:1) revelado con vainillina sulfúrica en etanol, seguido de calentamiento. Estándar (izquierda), muestra (derecha)

#### V.5. Antraquinonas

La reacción de Bornträger se fundamenta en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y posterior oxidación de las antranas y los antranoles hasta antraquinonas generando la formación de complejos de color rojo o amarillo (Ochoa y Sarmiento, 2018). En la Figura 25 se muestra que el estándar tuvo solo una ligera reacción ya que solo dio una pequeña turbulencia de color rojizo- naranja, en el caso de la muestra que fue la sábila (*Aloe vera*) podemos observar que es un positivo, por la coloración rojiza que tiene el pocillo. Se ha demostrado que el látex de la sábila posee una alta concentración de antraquinonas, siendo una de ellas la aloína la cual tiene propiedades laxantes y purgantes (Sánchez y Santa, 2009); en el caso del estándar se decidió usar el senósido A que también tiene las mismas propiedades y pertenece a las antraquinonas, sin embargo, debido a que ésta es una diantrona, la reacción es menos visible.



Figura 25. Prueba colorimétrica por la reacción de Borntränger, para la identificación de antraquinonas

En el caso de la cromatografía se utilizaron 3 fases móviles diferentes, donde posteriormente a la corrida se hizo un tratamiento a las placas con hidróxido de potasio etanólico al 5%, lo que dio como resultado lo mostrado en la figura 26. El hidróxido de potasio suele reaccionar con compuestos fenólicos o con antraquinonas hidroxiladas para desprotonar estos grupos, lo que cambia la estructura de la molécula y, por lo tanto, la forma en que interactúa con la luz, haciendo que la mancha sea visible en la placa (Navarro y col, 2012). Podemos ver que el estándar tiene presencia de antraquinona debido a la presencia de una franja de color rojiza. En el caso de la muestra a pesar de tener ciertas coloraciones rojizas prevalece el color amarillo que puede significar la presencia de antronas (la aloína principalmente) y antranoles.

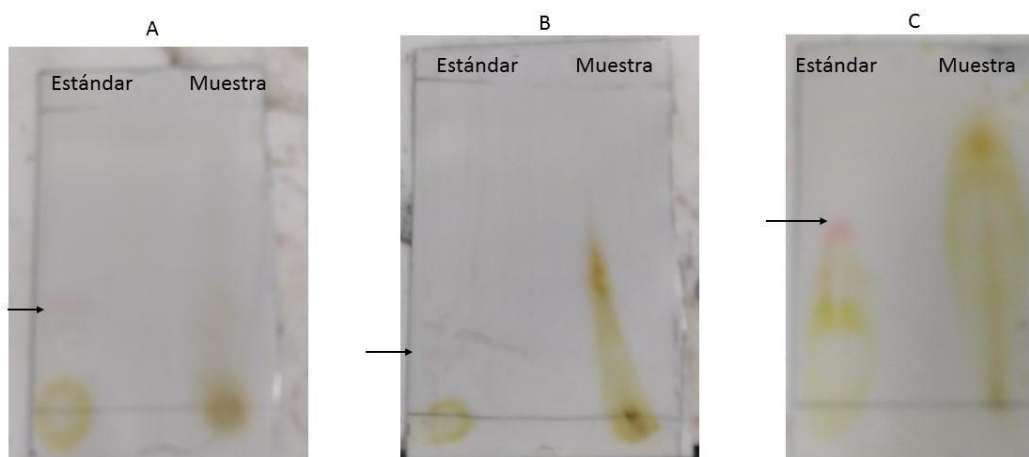


Figura 26. Cromatografía en capa fina de antraquinonas. A: acetato de etilo: n-hexano (8:2), B: acetato de etilo: metanol: agua (100:17:13) y C: n- Propanol: acetato de etilo: agua (40:40:30), después del tratamiento con hidróxido de sodio 5%

En relación a la fase móvil empleada, lo más recomendable sería que se utilizara la fase móvil de la figura 26C ya que debido a la separación los componentes se ven mejor.

#### V.6. Cumarinas

La lavanda (*Lavandula spp.*) es una planta que contiene cumarinas siendo una de ellas la umbeliferona, que para este ensayo fue utilizada como control positivo (López y col, 2013). Se realizó una prueba colorimétrica y una cromatografía donde ambas son evaluadas a la luz UV después de haber reaccionado con una base. La reacción se debe a que el medio alcalino provoca la ionización del grupo lactona (-CO-O- en el anillo de benzopirona) formando una sal de cumarina altamente soluble en agua. La estructura electrónica de la cumarina cambia, afectando la absorción de la luz visible, esto genera una coloración amarilla intensa o naranja, dependiendo del tipo de cumarina. Al ser expuestas a la luz UV darán fluorescencia de color azul, verde azul, amarillo o café. Esto dependerá de los grupos hidroxilo y metoxilo de las cumarinas presentes, así como de su grado de sustitución y estructura base (Herrera y col, 2017).

Las Figuras 27 y 28 nos muestran la presencia de cumarinas debido a la fluorescencia azul intensa, sin embargo, es importante resaltar que las cumarinas no hidroxiladas no pueden ser identificadas mediante estos ensayos (Herrera y col, 2017).

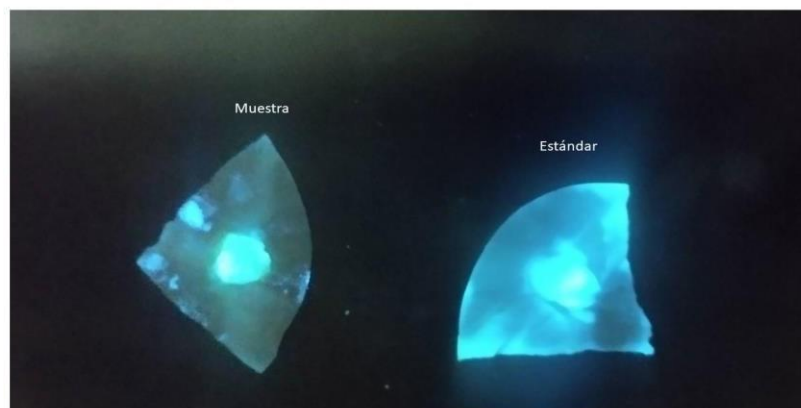


Figura 27: Ensayo colorimétrico para cumarinas.

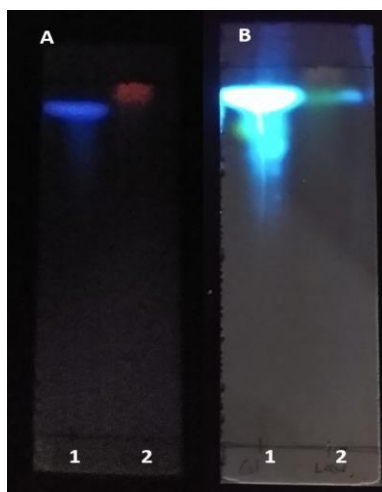


Figura 28. Prueba de cumarinas en cromatografía en capa fina. A: previo al asperjado con KOH al 5%. B: posterior al asperjado con KOH al 5%. 1: control de umbeliferona 2: muestra de lavanda

## V.7. Terpenos

La prueba colorimétrica de Liebermann-Burchard es una técnica para la identificación de algunos terpenos; sin embargo, la técnica no está enfocada en monoterpenos ya que el fundamento de la técnica es que los ácidos funcionan como agentes deshidratantes y oxidantes. Los terpenoides y esteroides presentan una estructura de anillos conjugados que, al ser oxidados, generan cromóforos responsables de los cambios de color y los monoterpenos no reaccionan porque carecen de las estructuras conjugadas (Cabrera, 2020). En el caso de las muestras podemos observar que el cambio de color es más evidente en el extracto de diclorometano debido a la mejor solubilidad que presentan los compuestos terpenoides en este solvente, donde se observa (Figura 29) la coloración azul presente en la muestra (Cerón, 2009). En el caso del estándar podemos ver un color rojizo pero debido a que el limoneno es un monoterpeno no debería de haber reaccionado por lo que esto puede justificarse a que pudo ser una oxidación parcial debido a los ácidos que generan compuestos intermediarios que hacen que de ese color rojizo o también por la formación de carbocationes debido a que el ácido sulfúrico puede protonar el doble enlace del limoneno, la última opción pudiera ser que el reactivo está contaminado, pero este es descartado debido a la forma de preservación que tienen los reactivos en el laboratorio (Bañuelos, y col, 2017).

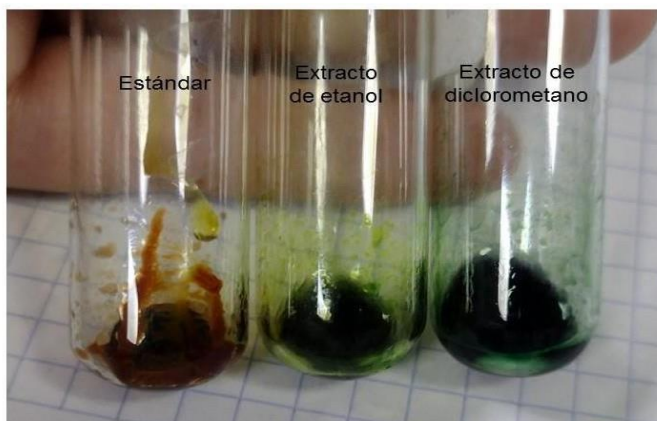


Figura 29. Prueba colorimétrica de Liebermann-Burchard para terpenos

La prueba de Salkowski se basa en la reacción química entre los terpenoides y el ácido sulfúrico concentrado, que actúa como un agente deshidratante y oxidante. Esta reacción provoca cambios estructurales en los terpenoides, lo que genera compuestos coloreados que permiten su detección visual (Bañuelos y col, 2017). En la Figura 30 se observa como el limoneno al ser monoterpreno reacciona positivamente dando un color rojizo en la interfaz, también en el extracto de diclorometano se ve un color amarillo, indicativo de una muestra positiva. En el caso de la muestra con etanol no se observa reacción positiva.



Figura 30. Prueba colorimétrica de Salkowski

Para la placa de cromatografía se utilizó el reactivo de Liebermann- Burchard, esto debido a que es un reactivo diseñado específicamente para detectar estructuras relacionadas con esteroides y triterpenos. En la Figura 31 podemos observar el extracto de diclorometano del eucalipto eluido con la fase móvil hexano: acetato de etilo 7:3, con un estándar de ácido oleanólico como control positivo, en vez del limoneno empleado en el ensayo anterior.



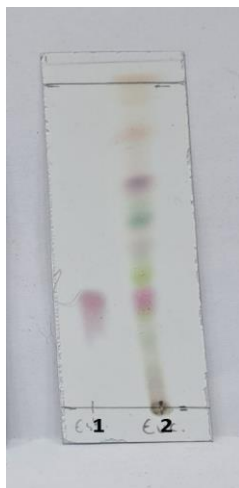


Figura 31. Cromatografía en capa fina para triterpenos. Fase móvil hexano: acetato de etilo (7:3). 1: estándar (ácido oleanólico) 2: extracto de diclorometano. Revelado con el reactivo de Liebermann-Burchard

#### V.8 Lactonas sesquiterpénicas.

Se ha encontrado que el estafiate (*Artemisia ludoviciana*) es una de las plantas que contiene ciertas lactonas sesquiterpénicas como pueden ser santolina, artemisina y helenalina (Zavala, 2019), siendo esta última el estándar que se utilizó. De acuerdo a la Figura 32 podemos observar que el extracto de diclorometano fue el que reaccionó de una manera positiva con la prueba colorimétrica de Baljet dando una coloración naranja-rojiza, al igual que con el estándar. Esto se debe a que, en la presencia de lactonas, el ácido sulfúrico puede inducir una reacción de deshidratación o la formación de productos reactivos que alteran la estructura del anillo de lactona, a veces creando estructuras más complejas. Este proceso puede involucrar la formación de cationes o interacciones con los anillos aromáticos de las lactonas, lo que lleva a la generación de nuevos compuestos de color (Silva y Villegas, 2023).

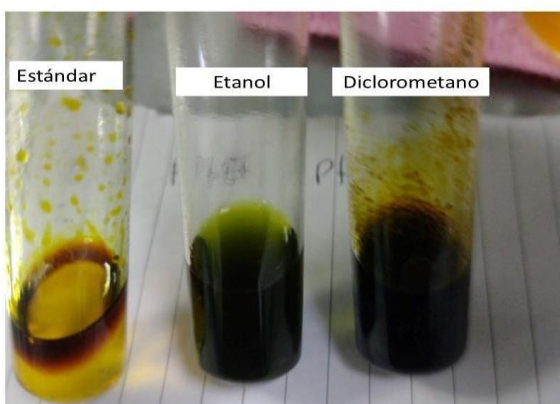


Figura 32. Prueba colorimétrica de Baljet para lactonas sesquiterpénicas

En el caso de la cromatografía, ésta se reveló con m-dinitrobenceno al 2% en etanol e NaOH al 5% en etanol al 50%; sin embargo, a pesar de ser usado en algunas bibliografías, de acuerdo a la Figura 33 podemos ver que la coloración púrpura desarrollada no es muy intensa tanto en el estándar como en el extracto de extracto con diclorometano.

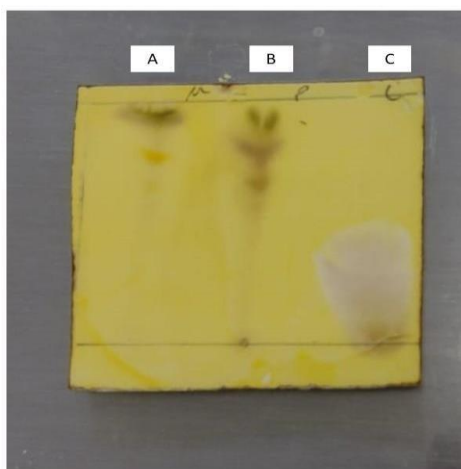


Figura 33. Cromatografía de lactonas sesquiterpénicas. A: extracto con etanol. B: extracto con diclorometano y C: estándar (helenalina). Fase móvil diclorometano: metanol: agua (87: 12:1)

## V.9 Saponinas

Las saponinas poseen una estructura donde una parte es hidrofóbica (no polar) y otra hidrofílica (polar) provocando que, en una solución acuosa en el momento de ser agitada, las moléculas de saponinas se orienten en la interfase aire-agua, reduciendo la tensión superficial del agua y atrapando burbujas de aire. Esto genera espuma estable porque las micelas de saponinas rodean las burbujas de aire, evitando que colapsen rápidamente (Ramos y Forero, 2016). Sabemos que la planta llamada arrayán salvaje (*Ruscus aculeatus*) contiene saponinas, siendo algunas de ellas los glicósidos de la ruscogenina y la neoruscogenina (Marsullo, Pizza, y Piacente, 2016), por lo cual el ensayo de la espuma para un extracto de esta planta debería tener una reacción notoria. Sin embargo, a pesar de que la espuma si duró los 15 minutos, no se muestra en bastante cantidad a diferencia del estándar (dioscina) cuyo contenido de espuma es notable (Figura 34). Algunas de las razones por las cuales la espuma no subió lo suficiente puede ser debido a la concentración de las saponinas, o bien debido a la interferencia de algunos otros componentes presentes en el extracto (Gongora y col, 2023).



Figura 34. Prueba de espuma para saponinas, en extracto de *Ruscus aculeatus* y estándar de dioscina

En la figura 35 se muestran varias placas reveladas con vainillina y ácido sulfúrico al 5%, en el cual podemos ver presente las saponinas debido a la coloración naranja y

amarilla del estándar; en este caso, la elección la fase móvil es importante para poder visualizar la presencia de los componentes en el extracto. El color que se presenta en la placa es debido a que se oxidan los grupos fenólicos de la vainillina, e interactúan con los grupos funcionales de las saponinas, como los azúcares y las agliconas (que pueden ser triterpenos o esteroides), resultando en un cambio de color (Gongora y col, 2023). Las fases móviles más aceptables en este caso serían la de acetona-benceno y cloroformo-acetona ya que los componentes están mejor distribuidos en la placa y la coloración es adecuada a las saponinas.

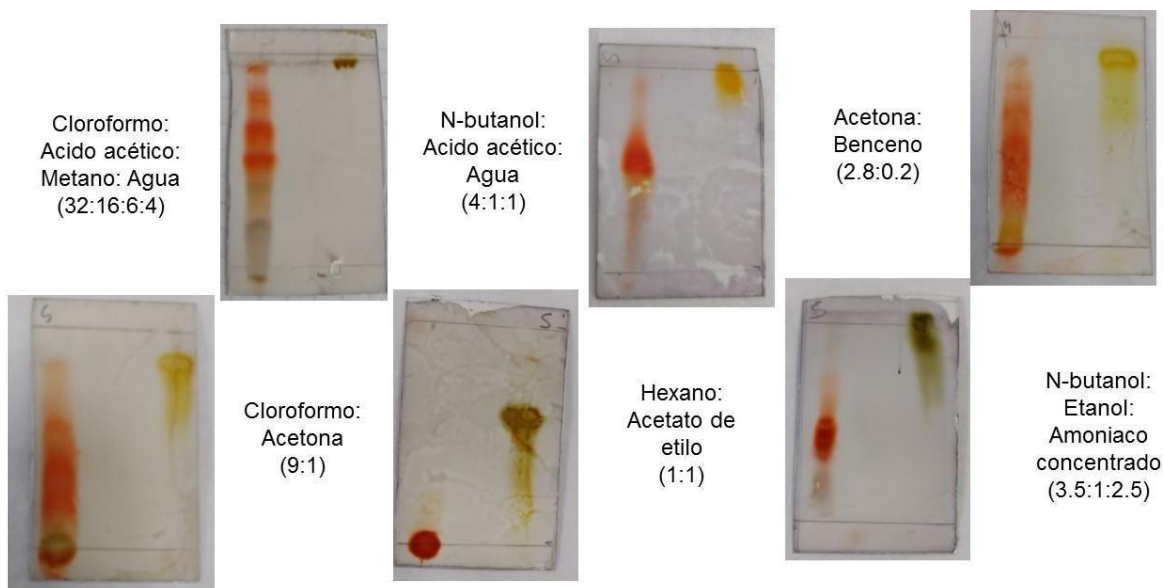


Figura 35. Cromatografía en capa fina para la identificación de saponinas

#### V.10 Glicósidos cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos están formados por un núcleo esteroide, una cadena de azúcares y un anillo lactónico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado en la posición 17 del núcleo esteroide. Este último es el importante para que se realice la reacción de Baljet, la cual consiste en dos pasos. Lo primero es la desprotonación del ácido pícrico con NaOH, lo cual aumenta su reactividad. Al contacto con el anillo lactónico, este sufre una adición

nucleofílica debido a la presencia de dobles enlaces conjugados, provocando un enlace covalente al sistema insaturado del anillo lactónico, formando un complejo de color rojo o anaranjado (Silva y Villegas, 2023). En la figura 36 podemos visualizar que en el caso de la muestra con diclorometano el color es mucho más notorio, lo cual es discordante con la bibliografía ya que para extracción en la mayoría de las ocasiones es preferible el etanol, pero esto puede deberse a que la estructura ha perdido sus azúcares (por hidrólisis ácida, enzimática o térmica (Martinez, 2020), también se tiene que considerar que la materia vegetal que se utilizó es la adelfa (*Nerium oleander*) que se caracteriza por producir glucósidos cardiotónicos con estructuras más lipofílicas (Manrique, 2015) lo cual justifica el hecho de que la concentración de glucósidos cardiotónicos sea más alta en el extracto con diclorometano.

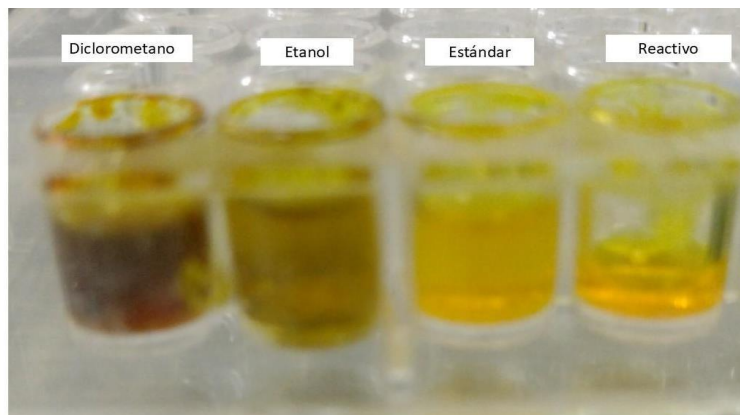


Figura 36. Ensayo colorimétrico de Baljet.

El ensayo de Kedde no reaccionó con ninguno de los extractos, basados en la literatura y tomando en cuenta las demás pruebas sabemos que sí se encuentran presentes los glicósidos cardiotónicos. Por lo tanto, la principal causa para que la reacción no se observe es que no se tienen las condiciones adecuadas para llevarse a cabo, principalmente debido a que el ácido 3,5 dinitrobenzoico mostraba ciertas impurezas lo cual podría ser la causa de que no reaccionara correctamente. En condiciones adecuadas del reactivo los glucósidos cardiotónicos, al liberarse de la parte glucídica en medio alcalino, permiten que el aglicón interactúe con el ácido 2,4-dinitrobenceno. La reacción entre el aglicón y el dinitrobenzoico produce un

compuesto complejo, el cual tiene la propiedad de exhibir un cambio de color que es visible a simple vista. Este cambio de color generalmente es rojo o anaranjado, y se debe a la formación de un complejo de adición entre los grupos reactivos del aglicón esteroidal y el reactivo dinitrobenzoico (Enriquez y Prieto, 2007).

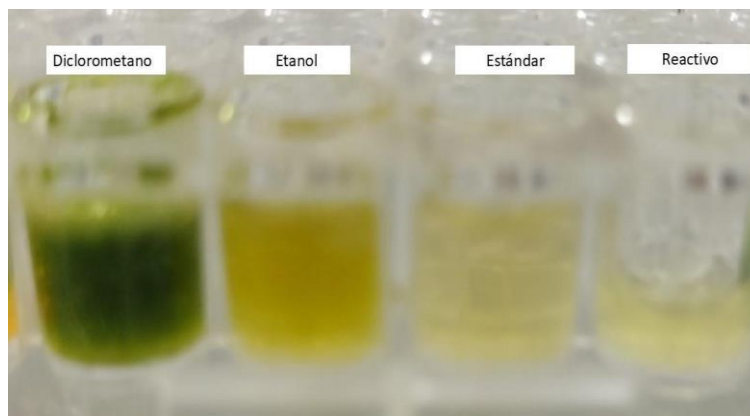


Figura 37. Ensayo colorimétrico de Kedde.

El ensayo de Keller-Kiliani se fundamenta en que el ácido acético glacial actúa como un solvente y crea un ambiente ácido. Los glicósidos cardiotónicos, que son moléculas complejas compuestas por una aglicona (parte no azucarada) unida a un glúcido (parte azucarada), se disuelven en este ambiente, permitiendo que la aglicona esté libre y disponible para interactuar con otros compuestos. El hierro en su estado de oxidación +3 actúa como un agente redox (Martinez, 2020).

Cuando los glicósidos cardiotónicos están presentes, la parte aglicona de la molécula, que contiene varios grupos funcionales, puede formar complejos de coordinación con el hierro (III). Estos complejos son sensibles al pH del medio y pueden cambiar de color dependiendo de la interacción química que ocurre entre el hierro y los grupos funcionales del glicósido. Por último, el hierro (III) forma un complejo de coordinación con los grupos hidroxilo (-OH) y los enlaces éster presentes en la parte de la aglicona del glucósido. Este complejo de hierro-oxígeno cambia su estructura y sus propiedades ópticas, produciendo un cambio en el color, que es el indicador de la presencia de glicósidos, dando una coloración azul o roja

(Martínez, 2020). En la figura 38 podemos observar que los extractos reaccionaron positivos pero el estándar solo tiene una ligera turbidez azul, esto puede deberse a que el estándar a utilizar no es completamente puro debido a que se extrajo de una pastilla comercial. por lo cual, podemos decir que es positiva, pero la concentración es más pequeña que la de los extractos debido a interferencias (componentes de la tableta).

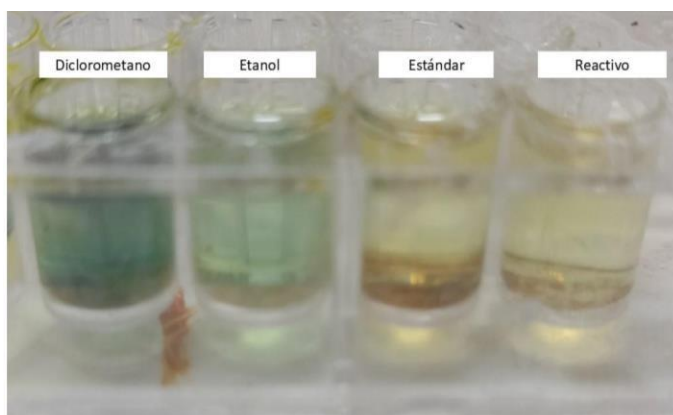


Figura 38. Ensayo colorimétrico de Keller -Kiliani

La reacción de los glicósidos cardiotónicos con el reactivo de Salkowski se debe a que el ácido sulfúrico concentrado actúa como un agente deshidratante lo cual rompe el enlace glucosídico, liberando la aglicona y permitiendo una reacción de acilación de la lactona para producir compuestos que generan una coloración característica (roja o amarilla) (Beltrán, 2019). En el caso de los extractos y el estándar podemos ver que todos reaccionaron dando una coloración rosada (Figura 39). En los extractos se ven coloraciones azules esto puede deberse a intermediarios que se forman en la reacción (Beltrán, 2019).



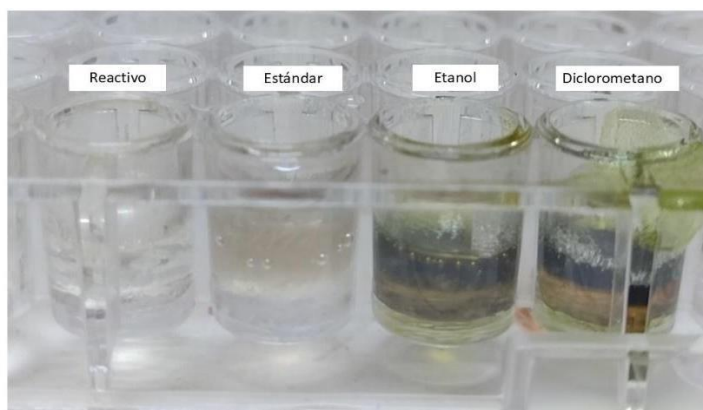


Figura 39. Ensayo colorimétrico de Salkowski

El ensayo colorimétrico de m-dinitrobenceno y NaOH no es el más recomendable para esta prueba debido a que los glucósidos cardiotónicos no contienen aminas primarias (ni grupos nucleofílicos de tipo amina) que reaccionaría con el m-dinitrobenceno, lo que hace que este tipo de reacción no sea una opción adecuada para su análisis (Silva y Villegas, 2023). Sin embargo, en algunas situaciones, un glucósido cardiotónico podría tener grupos hidroxilo que, en condiciones muy específicas, podrían reaccionar con el m-dinitrobenceno en presencia de una base fuerte. En tal caso, la base podría ayudar a desprotonar los grupos hidroxilo, convirtiéndolos en enolatos o en formas más nucleofílicas, lo que permitiría una reacción con el m-dinitrobenceno. Esto puede dar una coloración violeta o azul; sin embargo, para los glucósidos también se han reportado coloraciones naranjas o amarillas, todo dependerá de la unión entre el glucósido y el m-dinitrobenceno (Carvajal y col, 2009).



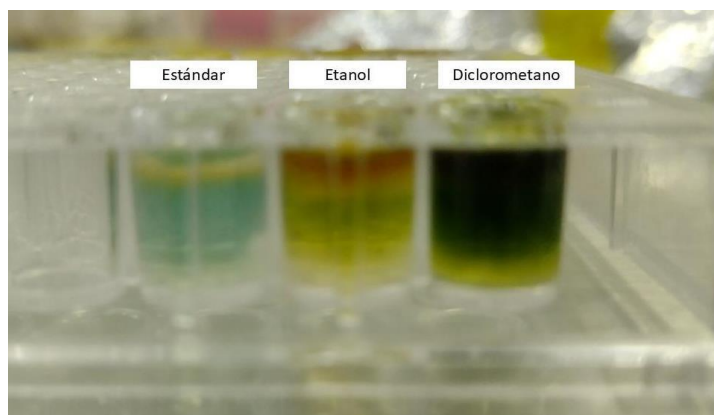


Figura 40. Ensayo colorimétrico de m-dinitrobenceno y NaOH

El ensayo colorimétrico de Liebermann-Burchard es una técnica que se utilizó para la identificación de triterpenos debido a que reacciona específicamente con las estructuras policíclicas (las cuales forman parte de la estructura de los glicósidos cardiotónicos). En este caso, la reacción con los glicósidos cardiotónicos induce un cambio en la estructura química del esteroide que da lugar a la formación de un complejo verde o azul (Hernández, 2018). En la figura 41 puede observarse la coloración mucho más notoria para el extracto con diclorometano por las razones que ya se habían expuesto para el caso particular de los glicósidos cardiotónicos de *Nerium oleander*.

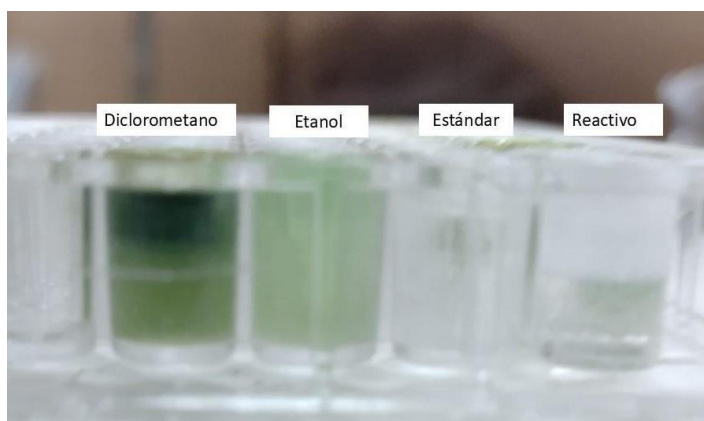
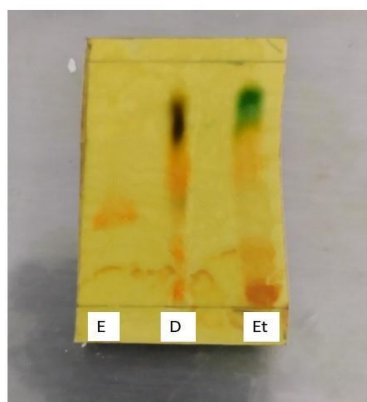


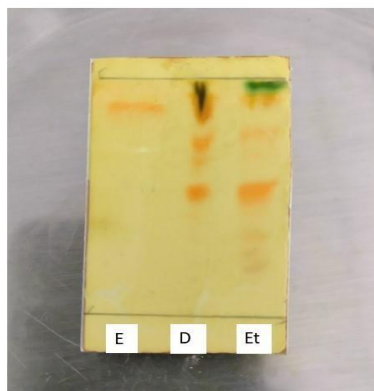
Figura 41. Ensayo colorimétrico con Liebermann-Burchard

En el caso de las cromatografías revelada con Baljet (Figura 42) podemos visualizar de mejor manera el comportamiento del estándar, así como también los distintos

componentes que se encuentran en los extractos. La mejor fase móvil para este tipo de extracto y revelador es la de cloroformo: metanol: agua (66:35:10) debido a que se ven mejor definidos y distribuidos los componentes de las muestras, al igual que la parte colorimétrica podemos ver que en el extracto con diclorometano tiene marcas mucho más claras y definidas lo que puede ser indicativo que están en mayor proporción estos glicósidos.



Fase Móvil: Acetato de etilo: Metanol: Agua  
(100:13.5:10)  
Revelador: Reactivo de Baljet



Fase Móvil: Cloroformo : Metanol: Agua  
(66:35:10)  
Revelador: Reactivo de Baljet

Figura 42: Cromatografías para identificación de glicósidos cardiotónicos.  
Revelador de Baljet. Estándar (E), muestra con diclorometano (D) y muestra con Etanol (Et)

Tal como se mencionó en la parte del colorimétrico con la prueba de m-dinitrobenceno y NaOH, este reactivo no es adecuado para este tipo de extractos, debido a que después de aplicar el revelador las placas no duraban mucho tiempo siendo visibles y comenzaban a tornarse de color gris, siendo un periodo muy corto en el que puede observarse la presencia de los glicósidos.

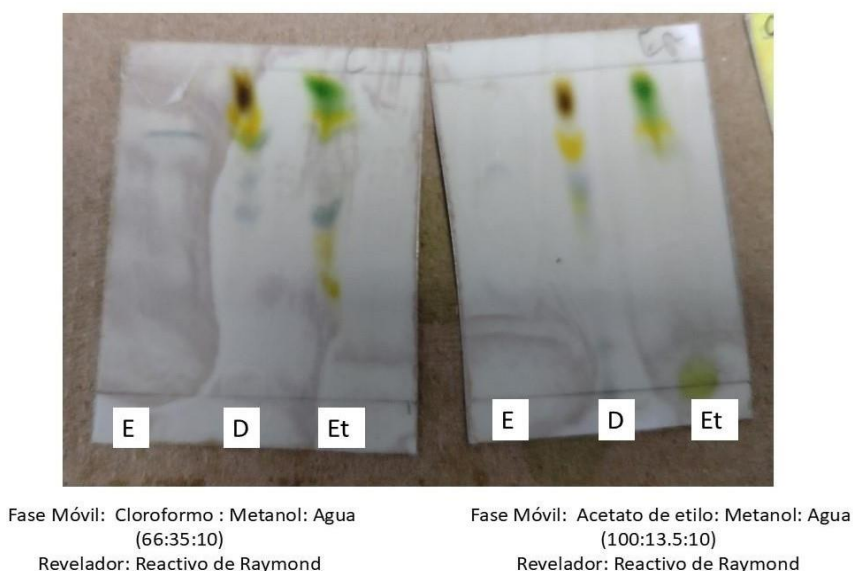


Figura 43. Cromatografía para identificación de glicósidos cardiotónicos. Revelador m-dinitrobenceno y NaOH. Estándar (E), muestra con diclorometano (D) y muestra con etanol (Et)

#### V.11 Alcaloides

En la planta de origen mexicano llamada chicalote (*Argemone mexicana*) se han encontrado varios alcaloides (Delgado y col, 2007), los cuales de acuerdo a la Figura 44 son identificables debido al cambio de color de los tres respectivos reactivos.

En el caso del inciso A, el extracto de etanol se hizo reaccionar con el reactivo de Drangendroff el cual contiene iones de bismuto ( $\text{Bi}^{3+}$ ) y yoduro de potasio (KI), formando el complejo  $[\text{BiI}_4]^-$  en solución ácida. Cuando los alcaloides (que son bases débiles) entran en contacto con este reactivo en medio ácido, reaccionan con los iones de bismuto, formando un precipitado insoluble de bismuto-alcaloide de color naranja o rojizo (Zavaleta y col, 2024), el cual puede visualizarse claramente.

En el caso de la prueba Wagner se basa en el uso del yodo ( $\text{I}_2$ ) en yoduro de potasio (KI) disuelto en agua o alcohol. Cuando los alcaloides (bases nitrogenadas) están presentes en la muestra, reaccionan con los iones yoduro ( $\text{I}^-$ ), formando un

precipitado de color marrón rojizo o amarillo. El cual puede visualizarse en el inciso B de esta misma Figura tornándose de un color rojizo/café (Pereira y col, 2009).

En el inciso C de la Figura 44 se observa la reacción del extracto con el reactivo de Mayer. Cuando los alcaloides entran en contacto con este reactivo, se forma un precipitado blanco que es un complejo insoluble formado con los iones de mercurio presentes (Coy, Parra y Cuca, 2014).

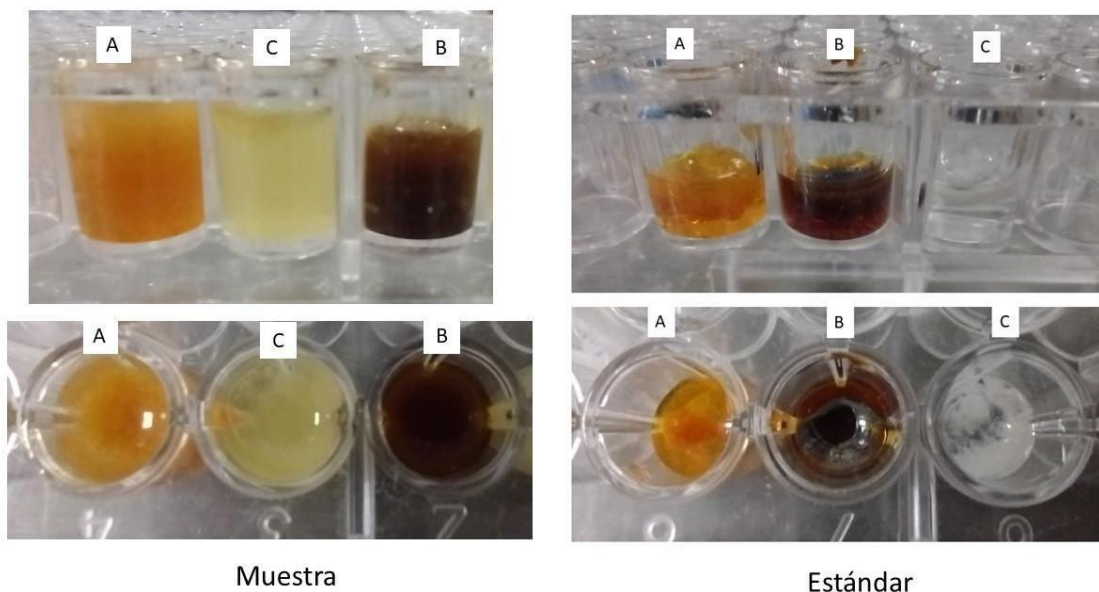


Figura 44. Ensayos colorimétricos para alcaloides. A: Dragendorff, B: Wagner, C: Mayer

El revelado de la cromatografía en capa fina tiene el mismo fundamento del reactivo de Dragendorff que en el ensayo colorimétrico, por lo cual se puede ver la presencia de alcaloides en el extracto vegetal como en la confirmación del estándar; sin embargo, podemos ver que en la muestra el valor es muy tenue esto puede deberse a que no es puro al contrario del caso del estándar.

A diferencia de otras técnicas o reactivos utilizados para el revelado, éste debe realizarse cuidadosa y uniformemente debido a que si no se llevan estas indicaciones la tinción marca manchas por donde pase el reactivo y hace que no sea visible la

línea tenue que suele marcar la muestra, por lo que se recomienda que la aplicación del revelador sea por aspersión.

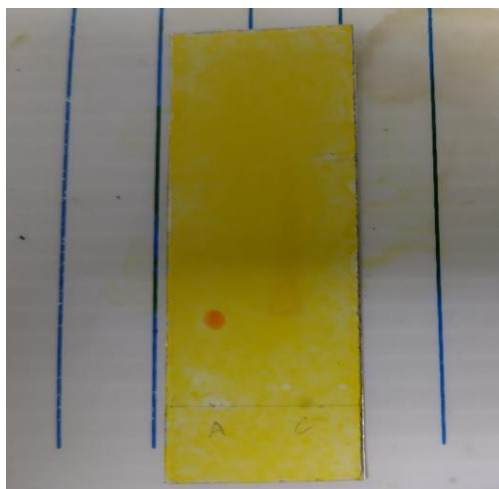


Figura 45. Cromatografía en capa fina para alcaloides. Fase móvil, acetato de etilo: metanol: hidróxido de amonio (8.5: 1: 0.5). Revelado con Dragendorff. A: estándar (atropina), C: extracto etanólico de chicalote.

#### V.12 Alcamidas

La figura 46 muestra la cromatografía realizada para la identificación de alcamidas en un extracto de chilcuague (*Heliopsis longipes*), planta en la que se ha comprobado la presencia de este tipo de metabolitos, siendo la mayoritaria la afinina, la cual se ha utilizado como estándar (Rodríguez, 2018). La placa cromatográfica fue revelada con anisaldehído, con el cual la afinina (izquierda de la placa) presenta una coloración morada; sin embargo, el anisaldehído es un revelador con el que puede identificarse la presencia de diferentes tipos de compuestos no polares (terpenos y fenilpropanoides entre otros) por lo que, aunque es útil en la detección de estos compuestos no ofrece una identificación específica de los mismos. En este extracto, podemos ver la presencia de varios componentes entre ellos líneas del mismo color del estándar. Respecto a las alcamidas, el anisaldehído en el reactivo tiene la capacidad de reaccionar el grupo amida, formando productos coloreados (a menudo,

complejos de tipo imino o nitrógeno-oxigenados) después de la acción del calor. La coloración también dependerá de los sustituyentes que tenga la molécula, si existen grupos conjugados o aromáticos la coloración será púrpura o morada como es el caso de la muestra (Rodríguez, 2018).



Figura 46. Cromatografía de alcamidas, revelado con anisaldehído - ácido sulfúrico

## **VI. CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos en las técnicas colorimétricas de los compuestos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides, antraquinonas, taninos y cumarina, podemos deducir que las técnicas colorimétricas son una opción viable como un estudio preliminar para poder identificar la presencia de estos metabolitos, así como darnos una idea de la naturaleza que tienen como en el caso de los taninos; Sin embargo, debemos saber que estas tienen ciertas limitaciones de acuerdo a su fundamento de reacción, como puede visualizarse en metabolitos donde se utilizó más de un método como en el caso de los terpenos donde se utilizaron dos técnicas, siendo la de Liebermann- Burchard la que da mejores resultados a la claridad de la reacción y se ve menos influida a la coloración natural del extracto. Respecto a la identificación de las saponinas lo mejor es utilizar la técnica de cromatografía ya que el de la espuma puede verse influida debido a la concentración de estos metabolitos. En relación a las lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos en ambos se utilizó una misma técnica (Baljet), la cual es adecuada para la identificación de las lactonas. Específicamente para identificación de los glicósidos cardiotónicos la prueba de Salkowski es la sugerida debido a la claridad de la reacción y a que es menos influenciado a condiciones de los reactivos o de la muestra. En el caso de los alcaloides cualquiera de las tres pruebas son factibles ya que son bastante claras a la hora de realizarlas; sin embargo, para el revelado de la placa cromatográfica la elección es el reactivo de Dragendorff. Finalmente, para la identificación de las alcaloides la única técnica factible es la de cromatografía ya que aún no se ha encontrado una técnica colorimétrica que sea acertada para este tipo de metabolito, sin embargo, tampoco se tiene un revelador específico para este tipo de metabolitos.

Es importante tomar en cuenta que a la hora de realizar estas técnicas se debe considerar la naturaleza del metabolito a analizar, para saber si cumple con las características para que reaccione con los reactivos correspondientes, así como el solvente apto para su extracción tal (Anexo 1). Así pues, podemos afirmar como conclusión que las metodologías utilizadas en el presente trabajo son factibles y reproducibles, para obtener una visión previa de los metabolitos especializados en

extractos vegetales en crudo, así como también poder visualizar de forma general la naturaleza de los componentes. Sin embargo, también es importante resaltar que las pruebas tienen sus limitaciones, por lo cual lo más conveniente es llevarlas a cabo en las condiciones dichas anteriormente. También se recomienda que si las técnicas pueden ser comprobadas con cromatografía sean realizadas, ya que éstas nos ayudan a visualizar y analizar los diversos componentes de los extractos y la naturaleza de los metabolitos presentes; tomando en cuenta que estas pruebas son ensayos preliminares que requieren estudios posteriores para corroborar la naturaleza de los compuestos tentativamente identificados.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, K.** (2023). Educar, Comunicar y socializar en la heterogeneidad. primera edición, Dykinson S.L. 2023. Madrid.
- Avalos, A.** y Pérez, E. (2009). Metabolitos secundarios de plantas, Reduca, Serie Fisiología Vegetal. 2(3); 119-145
- Bañuelos, R.,** Delgadillo, L., Echavarria, F., Delgadillo, O. y Meza, C. (2018) Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- Barrera, C.,** Parra, J. y Cuca, L. (2014) Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). Revista Elementos, 4. 31 -39.
- Beltrán, A.** (2019) Desarrollo de un método de extracción de Fito esteroides en plantas y la posterior separación por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC. [Trabajo para obtener el título de ingeniero en biotecnología, Facultad de Ingenierías y ciencias aplicadas.]
- Boluda, C.** y Terrero, D. (2013) Iridoides y secoiridoides: clasificación, biosíntesis, importancia ecológica, estrategias evolutivas y modificaciones semisintéticas. Revista de Fitoterapia. 13: 153-161.
- Bortolini, R.** (2018) Obtención de un extracto cuantificado a partir de las raíces de *Heliopsis longipes* con efecto analgésico. [Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias biológicas]. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Bruneton, J.** (2001) Farmacognosia. Fitoquímica plantas medicinales. 2da edición, Editorial ACRIBIA, S.A.
- Cabrera, J.** (2020) Identificación primaria de metabolitos secundarios de *Ulex europeus* L (Retano espinoso) y su actividad biológica. [Trabajo para obtener el título de biólogo, Universidad de la salle]. Departamento de ciencias básicas.
- Carreras, L.,** Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. Revista de nutrición clínicas y dietética hospitalaria. Vol. 32. 81-91.

- Carvajal, R.**, Hasta, U., Sierra, N. Y Rueda, D. (2009) Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupata (*Strychnis schultesiana* Krukoff). Colombia Forestal. 12, 161- 170.
- Castro-Ruiz, J.**; Rojas-Molina, A., Luna-Vázquez, F.; Rivero-Cruz, F.; García-Gasca, T. e Ibarra-Alvarado, C. (2017) Affinin, isolated from *Heliopsis longipes*, induces an antihypertensive effect that involves CB1 cannabinoid Receptors and TRPA1 and TRPV1 channel activation. International Journal of Molecular Sciences. 18(1), 218.
- Cerón, I.** (2009) Separación de metabolitos de los aceites esenciales de Eucalipto y cidrón por destilación molecular, [Trabajo para obtener el grado de maestría en Ingeniería química, Universidad Nacional de Colombia.]
- Cervantes, B.**, Omelas, J., Gardea, A., Yahai, E., Rios, C., Zamudio, P., Ruiz, S. y Ibarra, V. (2018) Compuesto fenólicos de tejocote (*Crataegus* spp): Su actividad biológica está asociada a la protección de la salud humana. Revista Fitotec México. 41 (3), 339 - 349.
- Conde, E.** (1994) Contribución al conocimiento de la composición polifenólica de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus camaldulensis*, E. Globulus y E. Rudis. [Tesis para obtener el grado de doctora en Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid]. Departamento de Bioquímica y Biología molecular.
- Delgado, J.**, Lopez, H., Beltran, M., Ochoa, Y., Cema, E. y Castro, E. (2007) Efecto insecticida del extracto metanólico de Argemone Mexicana para el control de *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera:Triozidea). Revista Bio Ciencias. 10 (404), 1 -17.
- Días MC**, Pinto DCGA, Silva AMS. (2021) Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. Molecules.4;26(17):5377. doi: 10.3390/molecules26175377. PMID: 34500810; PMCID: PMC8434187.
- Enriquez, A.** y Prieto, E. (2007) Estudio farmacognóstico y fitoquímico del Rizoma de Zingiber Officinale Roscoe “Jengibre” de la ciudad de Chanchamayo región de Junín- Perú.
- García, A.**, Ramírez, E. y Molina, J. (2004) El género *Heliopsis* (*Heliantheae*; *Asteraceae*) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. Acta Botánica mexicana. vol. 69: 115-131.

**Giovanni, E.** (2017) Técnicas colorimétricas. Visión Criminológica- Criminalística. 18-24.

[http://revista.cleu.edu.mx/new/descargas/1703/articulos/Articulo08\\_Tecnicas\\_colorimetricas.pdf](http://revista.cleu.edu.mx/new/descargas/1703/articulos/Articulo08_Tecnicas_colorimetricas.pdf)

**Góngora, G.,** Mendoza,J., Lopez,Y., Lopez,M. y Quihui,L. (2023) Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de Yucca: una revisión, Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 25(1), 147 - 155.

**Gonzales, F.** (2010) Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salviahispanica L.*), mediante electroforesis capilar. [Tesis de maestría en ciencias de los alimentos]. Instituto politécnico Nacional.

**Gullon, P.,** Gullon, B., Astray, G., Munekata, P., Pateiro, M. y Lorenzo, J. (2002) Value-added compound recovery from invasive forest for biofunctional applications: Eucalyptus species as a case study. MDPI, Molecules. 25, 4227.

**Gutierrez, D., Ortiz, C. y Mendoza, A.** (2008) Medición de fenoles y actividad antioxidante de maleza usadas para la alimentación de animales. Simposio de metrología.

**Hernandez, L.** (2018) Extracción de esteviósidos y cuantificación de terpenos en plantas de *Stevia rebajdiana* producidas in vitro. [Trabajo para obtener el título de ingeniero en biotecnología, universidad politécnica del valle de toluca. México]

**Hernández, M.,** Prieto, E. (1999) Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida., [versión electrónica] centro de investigación de biomédicas, Rev. cubana Invest. Biomed.18(1):12-4.

**Herrera, I.,** Quimis, K., Sarroza, N., Garcia, F., Mariscal,W. y Mariscal, R. (2017) Determinación de taninos y cumarinas presente en la planta tres filos. Polo del conocimiento. Universidad de Guayaquil.

**Inocente, M.,** Fuentes, C., Jurado, B., Mondragon, I. y Del Rosario, I. (2009) Cuantificación de taninos condensados en *Triplaris americana L.* (tangerana colorada)

**Isaza, J.,** Veloza, L., Ramírez, L. y Guevara, C. (2007) Estimación espectrofotométrica de taninos hidrolizables y condensados en plantas melastomataceae.Scientia et technica. 33, 261 - 266.

- López, F.,**Meza E., Jiménez, S., Martínez, M. y Manjarrez, J. (2013) Métodos de extracción e identificación de los bioactivos de la *Lavandula officinalis* y su potencial uso como agente sedante. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*. 44(1), 60 - 65.
- López, M.** (2013) Identificación y cuantificación del ácido clorogénico y de flavonoides presentes en hojas y frutos de *Crataegus gracilior* PHIPPS. [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio institucional DGBSDI- UAQ.
- Luz-Martínez, B.A.;** Marrero-Morfa, D.; Luna-Vázquez, F.J.; Rojas-Molina, A.; Ibarra-Alvarado, C. (2024). Affinin, isolated from *Heliopsis longipes*, induces an antihypertensive effect that involves cb1 cannabinoid receptors and trpa1 and trpv1 channel activation. *Planta Medica* 90(05), 380-387.
- Manrique, L.** (2015) Extracción y purificación de glicósidos presentes en *Nerium oleander* y *Thevetia peruviana* por UPLC acoplado a espectrómetro de masa a partir del material vegetal. [Tesis para obtener el título de pregrado de Químico Farmacéutico, Universidad ICESI.]
- Marcano, D.** y Hasegawa, M. (2018). Fitoquímica Orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV), Venezuela.
- Martínez, A.** (2020) Química de Productos Naturales. Universidad de Antioquia.
- Martínez, N.,** Camacho, M. y Martínez, J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad dietética*. 12(2): 64-88.
- Martino, V.** y Sülsen, V. (2018) Lactonas sesquiterpénicas: promisorio grupo de compuestos naturales bioactivos. *Revista CONICET*. 161(1): 24-37.
- Masullo, M.,** Pizza, C. y Piacente, S. (2016) *Ruscus* Genus: A Rich Source of Bioactive Steroidal Saponins. Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Salerno. 8(2). 1516 - 1524.
- Meza, R.** (2013). Estudio del papel de las alcamidas en el cultivo *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a condiciones de estrés hídrico. [Tesis para

obtener el grado de maestría en ciencias en procesos biológicos]. Universidad veracruzana.

**Montane, C.,** Arias, D. y Child, I. (2020) Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en un extracto blando de flores de *Calendula officinalis* Linn, orange journal. Vol. 2(3) 20 - 31. <https://orangejournal.info/check/03/2-20-31.pdf>.

**Muños, F.** (2016) Identificación de grupos funcionales y taninos naturales. Laboratorio de química, ingeniería forestal- régimen anual, Universidad de los Andes. Venezuela.

**Navarro, E.,** Rodriguez, B. Jiménez, D., Navarro, R. y Alonso S. (2012) Identificación y aislamiento de compuestos de Rumex Lunaria L. Endemismo canario con actividad farmacológica. Canarias médica y quirúrgica, 9(27), 53 -57.

**Ochoa, L. y Sarmiento, A.** (2018) Estudio fitoquímico de la especie vegetal, Bucquetia Glutinosa (L.f) DC. (Melastomataceae) y evolución de su actividad biológica. [Trabajo para obtener el título de Químico farmacéutico, Universidad de ciencias aplicadas y ambientales - U.D.C.A]. Vicerrectoría de investigaciones U.D.C.A.

**Olivas, F.,** Wall-Medrano, A., González, G., López, J., Álvarez, E. De la Rosa, L. y Ramos, A. (2015) Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud, Nutrición hospitalaria. 31(1):55-56.

**Ordoñez, A.** (2018) Identificación de alcanoides y ésteres  $\alpha$ -insaturados en *Piper auritum* Kunth y la actividad biológica de sus extractos. [Tesis para obtener el grado de maestría ciencias en biotecnología de plantas]. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

**Palacios, M** (2022) Glicósidos cardiotónicos y fenólicos, Práctica 6 y 7. Facultad de química, Universidad Católica los Ángeles Chimbote. 38 - 50. <https://es.scribd.com/document/568191761/PRACTICA-N%C2%BA-06-y-07#>

**Pereira, S.,** Vega, D., Saavedra, M. y Morales, G. (2009) Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la Trichilia hirta L. Revista Química Viva.

**Perez, V** (2014) Metabolismo secundario. Universidad Central de Venezuela  
<http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/7966/1/6.%20METABOLISMO%20SECUNDARIO%202013-2014.pdf>

**Ramos, L.** y Forero, J. (2016) Análisis fitoquímico preliminar de la especie vegetal *Duranta mutisii* (Bogotá - Colombia). Boletín Semillas Ambientales. 10(2), 46 - 54.

**Rengifo, R.** (2013) Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de petroleos. Revista farmacia diciembre, 1(2), 51- 56.

**Ríos, F.,** Quintero, A., Javier, P., Cariño, R. y Reyes, A. (2023) Compuestos bioactivos de la canela y su efecto en la disminución del síndrome metabólico: revisión sistemática. Revista de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. 73 (1). 74 - 85.

**Robles, M.,** Aguilar, A. Gutiérrez, L., Rodríguez, F., Morales, J., Guerrero, P., Madrigal, J. y Del-Toro, C. (2016) Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque Y (*Sideroxylum capiri* pittier), Universidad de Sonora, Revista de ciencias biológicas y de la salud, Biotecnia. Vol. 18(3): 3-8, México.

**Rodríguez, M.** (2018) Perfil fitoquímico de especies vegetales de Guanajuato y sus alrededores por cromatografía en capa fina de alta resolución HPTLC. [Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias, Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional.]

**Ruiz, B.** (2017) Quinonas. Instituto Mexico de Ciudad Juarez.  
<https://www.studocu.com/es-mx/document/best-notes-for-high-school-mx/quimica-ii/quinonas-equipo3-2-02-1/10507022>

**Ruiz, E.** y Suarez, M. (2014) Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Vol. 46(1), 9 - 24.

**Salazar, D.** (2017) Producción de sideróforos por cepas *Azotobacter* spp. Aisladas de los suelos de +cultivos hortícolas del altiplano cundiboyacense. Pontificia universidad Javeriana.

**Sánchez V.** (2009) Estudio de Antraquinonas presentes en extractos de mucílago y hojas de aloe vera de plantas cultivadas en la región cafetera. [Tesis para obtener el título de Tecnólogo en Química]. Universidad Tecnológica de Pereira.

- Sánchez, V.** y Santa, J. (2009) Estudio de antraquinonas presentes en el extracto de mucílago y hojas de Aloe vera de plantas cultivadas en la region cafetera. [Trabajo para obtener el título de Tecnólogo en química, Universidad tecnológica de pereira].
- Sánchez** y García Figueroa, F. L. (2022) Fitoquímica. Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza. México.
- Sedighi, M.** Seidi, H., Asadi, F., Biranvand, H., Banaei, P., Torkashvand, M., Nazari, A., Rafieian, M., Hashemzadeh, P., Kiani, A y Ghorbanzadeh, V. (2023). Cardioprotective effect of dichloromethane valerian (*Valeriana officinalis*) extract on ischemia- reperfusion- induced cardiac injuries in rats. *General endocrinology*, 14(2), 178 - 186.
- Sgariglia, M.**, Soberon, J., Sampietro, D. y Vattuone, M . (2010) Cromatografía: conceptos y aplicaciones. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Revista Arakuku. No. 1, 1 - 6.
- Silva, N.** y Villegas, E. (2023) Regeneración natural, diversidad y estructura de la vegetación del área disturbada del campus maría auxiliadora de la universidad politécnica salesiana Guayaquil, Ecuador. [Trabajo para obtener el título de ingeniero en biotecnología, Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.]
- Sun, W.**, y Shahrajabian, M. H. (2023) Therapeutic potential of phenolic compounds in medicinal plants—Natural health products for human health. *Molecules*, 28(4), 1845.
- Tenorio, M.** (2016). Flavonoides extraídos de la cáscara de naranja tangelo (*Citrus reticulata x Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sacha inchi (*Plukenetia volubilis*), *Scientia Agropecuaria*. Vol.7(4). 419-431.
- UAM.** (S/F) Cromatografía en capa fina. <http://www.qfa.uam.es/qb/practicas/P6-guion.pdf>
- Valdez, S.**, Gonzalez, L., Morales, S., Mendoza A. (2015). Ácido benzoico: biosíntesis, modificación y función en plantas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 6(7), 1667-1678. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S200709342015000700019&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342015000700019&lng=es&tlng=es).
- Valencia, C.** (1995). Fundamentos de fitoquímica, Editorial trillas, México, D.F.



**Valenzuela, A.,** Beleño, M., Torres, A., Pérez, L., Encinas, R., Torres, R. (2023) Evaluación de taninos condensados en tallo de algodón y paja de trigo utilizando métodos gravimétricos. *Journal of Basic Sciences*, 9(24) 37-43.

**Venancio, C.,** Pérez, C. y Ibarra, E. (2021). Cumarinas: metabolitos secundarios de amplia actividad en plantas, Instituto de ecología. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1311-cumarinas-metabolitos-secundarios-de-amplia-actividad-en-plantas#:~:text=Al%20igual%20que%20a%20la,eficiente%20actividad%20como%20insecticidas%20que>

**Verde, M.,** Garcia, S. y Rivas, C. (2016). Metodología científica para el estudio de las plantas medicinales. *OmniaScience*. 1, 1-40.

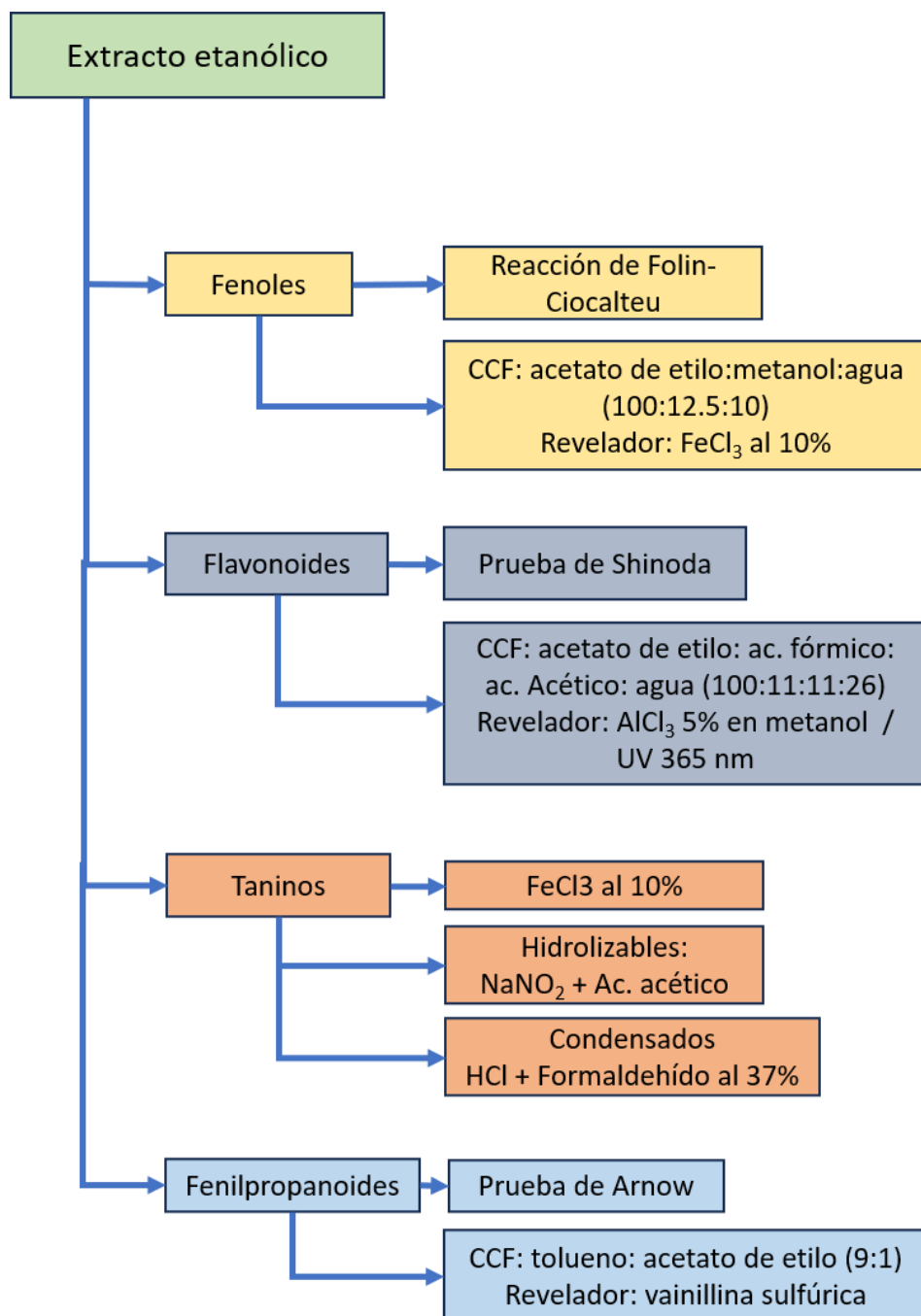
**Zavala, F.** (2019). Aislamiento, caracterización, identificación y evaluación de la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas mayoritarias de *Artemisia ludoviciana* subsp. mexicana. [Tesis para obtener el título de Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México.]

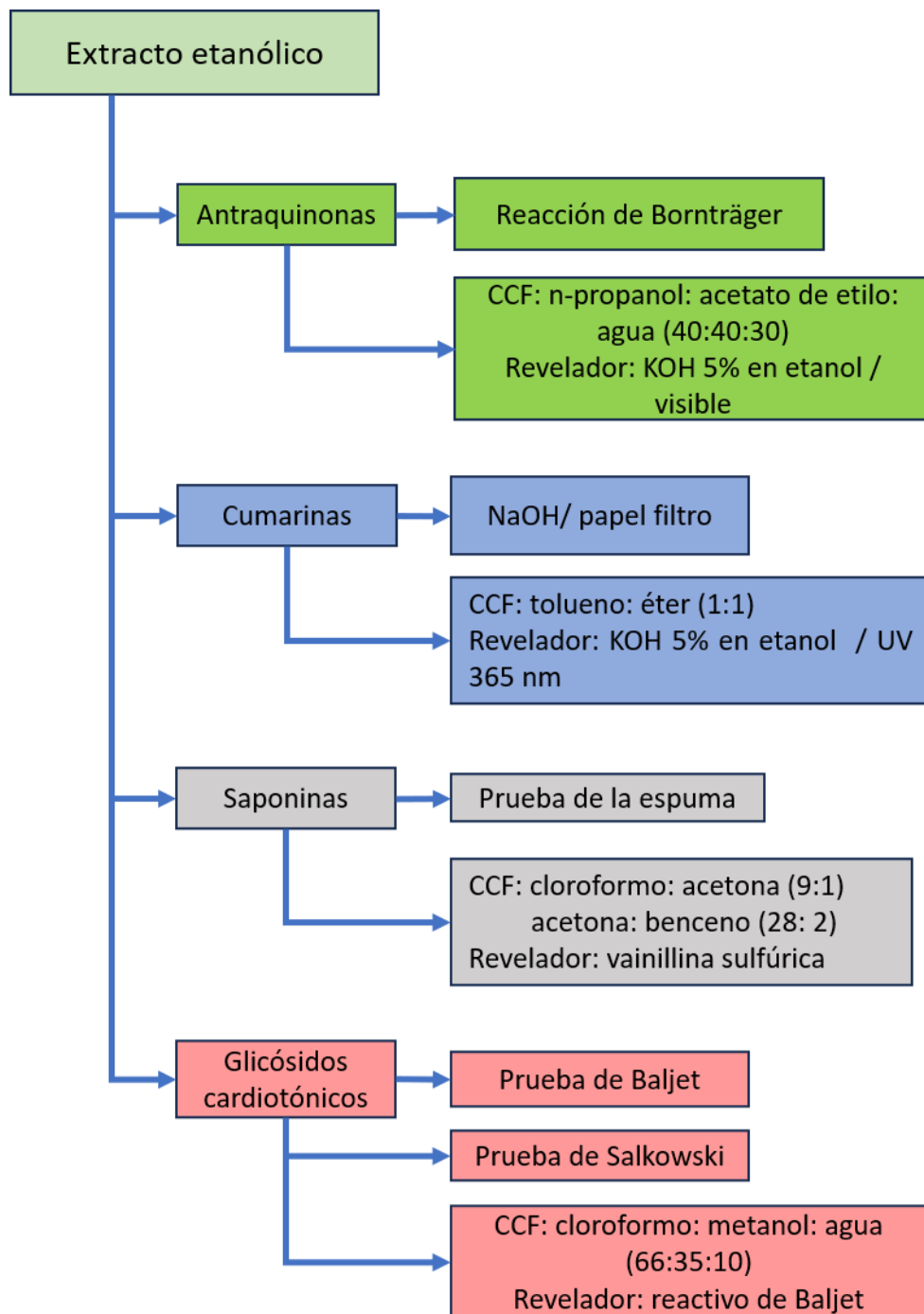
**Zavaleta, M.,** Castillo, E., La cunza, A., Noriega, J. y Reyes, C. (2024). Validación de un método analítico para la cuantificación de alcaloides totales. *Revista cubana de medicina militar*. 53(2).

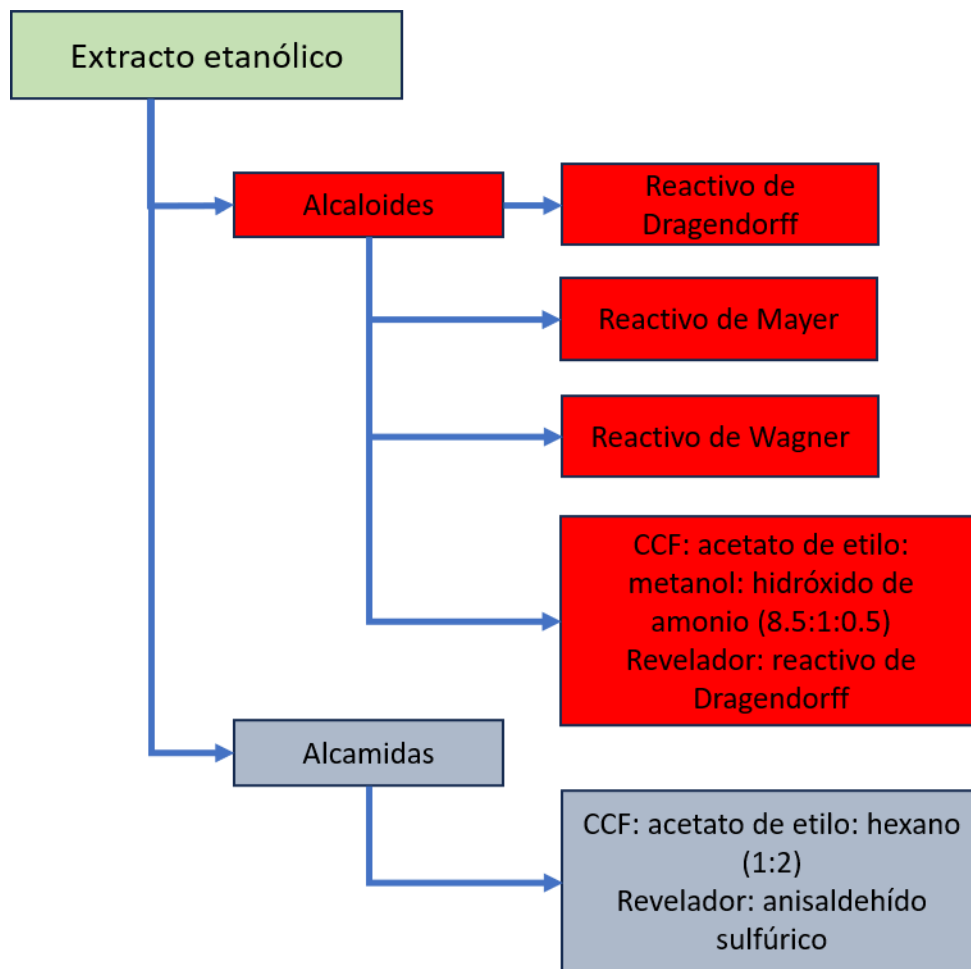


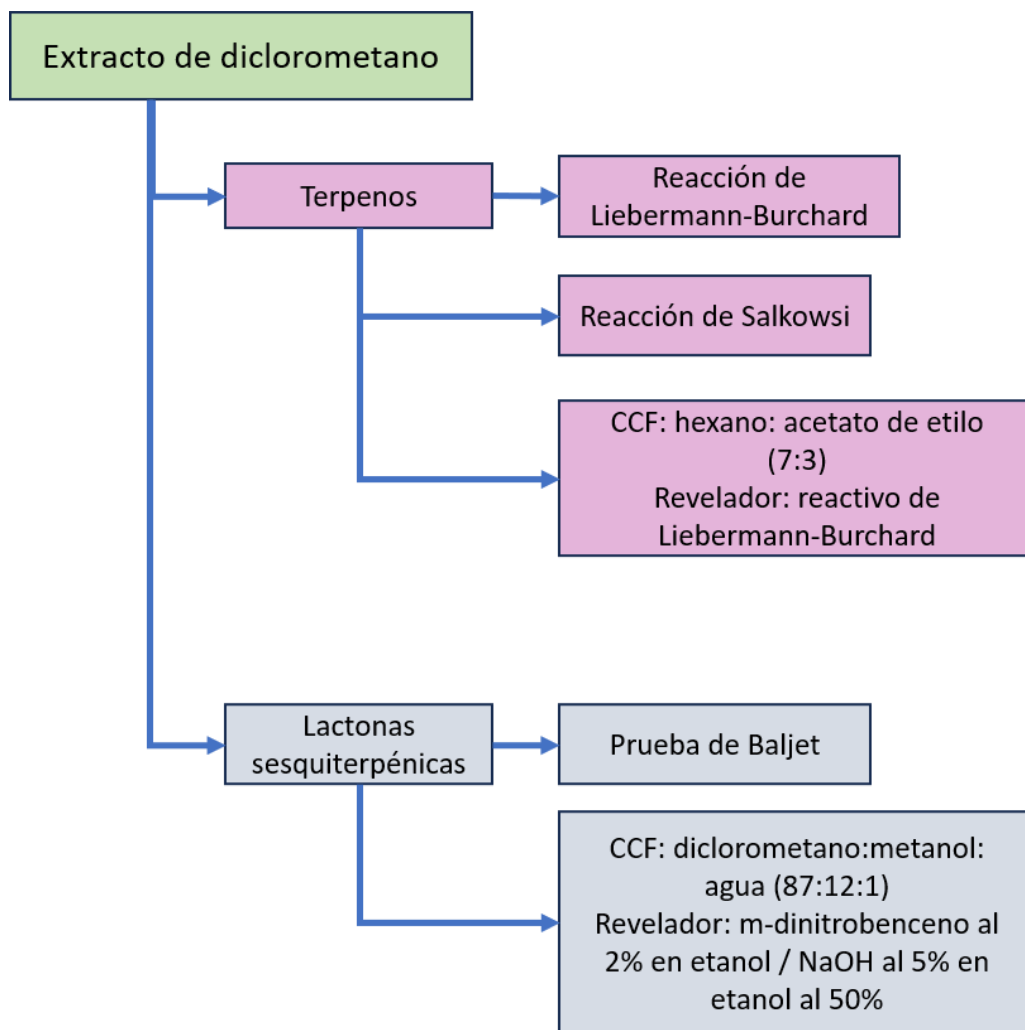
## VIII. ANEXO

### Marcha sistemática para la identificación preliminar de metabolitos especializados en extractos vegetales











UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

C.U., Querétaro, julio 24, 2024  
No. de oficio: CBQ24/081

**Dr. Francisco Javier Luna Vázquez**  
Investigador responsable

**Norma Ivonee Morales Barrera**  
Estudiante responsable

**Dra. Alejandra Rojas Molina**  
**Dr. Mamadou Moustapha Bah**  
**Dra. Dailenys Marrero Morfa**  
Colaboradores

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado **"Estandarización de la secuencia metodológica para la identificación de metabolitos especializados presentes en extractos vegetales"**, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **exento de dictamen ético** debido a que el proyecto no incluye estudios con animales de experimentación ni sujetos humanos.

Cabe mencionar que ningún integrante del Comité declaró conflicto de interés para la evaluación del protocolo de investigación. Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

**Iza Fernanda Pérez Ramírez**  
Presidente  
Comité de Bioética de la Facultad de Química  
Universidad Autónoma de Querétaro



Centro Universitario, Carr. de las Campanas, Santiago de Querétaro, Qro., México C.P. 76010  
Tel. 01 (442) 192 12 67 Fax 192 13 02