

5. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1 MATERIALES UTILIZADOS:

5.1.1 Reactivos y solventes:

Acetato de Etilo

Acetona

Hexano

Agua destilada

Metanol

Cloroformo

Etanol

Reactivo de Hager

Reactivo de Mayer

Reactivo de Wagner

Reactivo de Dragendorff

Reactivo de Rosenthaler

Reactivo gelatina

Acido clorhídrico 1%, 2N,

Cloruro de sodio

Anhídrido acético

Cloruro férrico

Amoniaco

Viruta de magnesio amalgamado

Hidróxido de sodio 2N

Polvo de zinc

Ácido sulfúrico concentrado y al 50%

Solución al 5% de nitroprusiato de sodio

TMS como referente

Metanol deuterado

Cloroformo deuterado

Silica gel

Yodo

Papel filtro

5.1.2 Instrumentos y aparatos:

Balanza granataria

Licuada

Rotavapor Büchi R-124

Baño de agua Büchi B-480

Aparato de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Varian Gemini 2000 de 200 MHz

Aparato de destilación

Bomba de vacío

Columnas para cromatografía de cristal

Placas cromatográficas

Lámpara de UV

Material de vidrio Pyrex

HPLC

Liofilizador

5.2 Pruebas fitoquímicas preliminares:

Alcaloides:

Una porción del residuo, una punta de espátula, se disuelve en 2mL de ácido clorhídrico al 50%, se agita y se filtra hasta que el filtrado sea completamente transparente. Se toma una alícuota del filtrado para cada ensayo con los reactivos para alcaloides; Mayer, Dragendorff, Wagner y Hager. Se considera como positiva las pruebas en las que aparece un precipitado (Domínguez, 1973).

Saponinas:

Ensayo con agua caliente.

Una porción del residuo de aproximadamente 10mg se coloca en un tubo de ensaye, para disolverlo se le agrega agua caliente (40 °C), se dejó reposar durante 15 a 30 minutos y luego se agitó manualmente durante 1 a 2 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja se considera positiva (Domínguez 1973).

Rosenthaler:

A otra porción del residuo (10mg aprox.) se añade una gota del reactivo de Rosenthaler y una gota de ácido sulfúrico concentrado. Las saponinas dan un color violeta (Fragoso, 2001).

Triterpenos:

Se disuelve en un tubo de ensaye una porción del residuo de aproximadamente una punta de espátula en 1mL de cloroformo. Se agrega resbalando por las paredes, 1mL de anhídrido acético y se deja reposar en frío. La aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase cuando se añaden 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, se considera positiva (Fragoso, 2001).

Taninos:

Se disuelve en agua 100mg de residuo; se filtra y se toman alícuotas de 1mL para las pruebas de cloruro férrico y reactivo gelatina en ambos casos se considera positiva la aparición de un precipitado (Fragoso, 2001).

Flavonoides:

Reacción con vapores de amoniac:

Una porción del residuo de 10mg se diluye con suficiente etanol hasta verse transparente. Se impregna en una tira de papel filtro con el extracto diluido y se deja

secar a temperatura ambiente, posteriormente se somete a la acción de vapores de amoníaco durante 2 minutos. La aparición de una coloración amarilla ocre se considera positiva (Fragoso, 2001).

Shinoda:

A un tubo con 1mL del extracto diluido se le agrega un trocito de viruta de magnesio amalgamado y cinco gotas de ácido clorhídrico concentrado. La aparición de colores que van del rojo a magenta indica la presencia de una flavanona o dihidroflavanol (Fragoso, 2001).

Pew's:

A un tubo con el extracto diluido se le agrega polvo de zinc y unas gotas de ácido clorhídrico 5N. Sólo los dihidroflavonoles reaccionan para dar colores que van del rojo púrpura al rojo cereza. Flavononas, dihidrochalconas y otros flavonoides dan coloración rosa o café.

Glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas:

Legal:

A una porción del extracto a analizar, se le agregan dos o tres gotas de piridina, después se añaden, una gota de solución reciente al 5% de nitroprusiato de sodio en agua y 3 gotas de NaOH 2 N, se considera positiva cuando aparece un color rojo intenso.

Preparación de reactivos:

Reactivo de Hager: solución saturada de ácido pícrico en agua.

Reactivo de Mayer: En un matraz Erlenmeyer de 125mL, disolver 1.36g de cloruro mercúrico con 60mL de agua. En otro matraz de la misma capacidad, disolver en agua 5g de yoduro de potasio. Mezclar las soluciones y aforar a 100mL 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 100mL, disolver 1.27g de yodo (resublimado) y 2 gotas de yoduro de potasio en 20mL de agua; aforar la solución con 100mL de agua destilada.

Reactivo de Dragendorff: En un matraz Erlenmeyer de 125mL disolver 8g de nitrato de bismuto pentahidratado con 20mL 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 reposo durante 24 horas. Decantar la solución (para separar residuos de cristales de nitrato de potasio) y aforar con agua a 100mL. Se puede recoger el precipitado marrón naranja una vez agregado el reactivo al extracto y liberar los alcaloides con solución de carbonato de sodio. Extraer con éter etílico.

Reactivo de Rosenthaler: Diluir 1g de vainillina en 100mL de etanol.

Cloruro férrico: Disolver 1.25g de cloruro férrico en 25mL de agua y aforar a 50mL con alcohol metílico.

Reactivo Gelatina: 1g de gelatina pura hidratada con 100mL de agua.

5.3 Liofilización:

El proceso de liofilizado es un método de secado de muestras que consiste en la previa congelación de las mismas a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en cajas Petri, para después, ya congeladas, se introducen a una cámara del liofilizador en la cual se secarán, dicho secado se logra a partir del fenómeno fisicoquímico llamado sublimación ya que una vez que las muestras congeladas se encuentran dentro, se prende la bomba de vacío para disminuir la presión y con esto conseguir dicho fenómeno.

Las cajas Petri permanecerán en este proceso hasta que el agua se haya sublimado completamente (24h. aproximadamente)

Acabado esto, se retiran de la cámara de liofilización y se cubren con su respectiva tapa y obligatoriamente se introducen en un desecador para que no se humedezcan.

Cromatografía en columna:

Para aplicar la muestra en columna cromatográfica se puso en práctica la elaboración de una pastilla que consiste en colocar la cantidad deseada del extracto seco en un matraz de bola de 500mL con el disolvente en el cual se solubiliza mejor, a dicha mezcla se le agrega unos 5g de sílica gel para iniciar el proceso. El matraz se coloca en el Rotavapor para evaporar todo el solvente y conseguir con esto que el extracto se adsorba en la sílica. Este proceso se repite hasta que la sílica adquiera un color homogéneo.

Este proceso es necesario realizarlo en los casos en que el extracto no es posible disolverlo en la fase móvil preparada para trabajar la columna.

5.4 Uso de HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución)

Otra técnica empleada en este trabajo fue el manejo del equipo de HPLC para purificar las fracciones obtenidas de las columnas cromatográficas. La metodología empleada para el uso de este aparato fue observar en qué proporción de una mezcla de metanol-agua la muestra encontraba su punto de insolubilidad y así usar esta polaridad como fase móvil.

La prueba de disolución se hizo en tubo de ensaye; la técnica consiste en disolver la muestra en la cantidad necesaria de metanol o acetonitrilo hasta no observar precipitados ni turbidez en el tubo, la cantidad de disolvente agregada debe ser controlada. Posteriormente, a la solución preparada se le agrega poco a poco agua hasta observar la aparición de opalescencia registrando también la cantidad adicionada. Esta solución antes de ser inyectada en el equipo de HPLC se filtró en filtros con poro de $0.45\mu\text{m}$.

Para la preparación de la fase móvil, los solventes utilizados se emplean en su presentación de grado HPLC, en caso de no ser así se procedió al proceso de bidestilar el solvente que se necesitaba, la mezcla destinada como fase móvil se filtró a vacío en un filtro con poros de $0.45\mu\text{m}$.

Se utilizó un detector de índice de refracción para identificar los compuestos, dicho instrumento funciona de manera que compara el índice de refracción del solvente puro con el índice de refracción que tiene la mezcla inyectada. Las variaciones arrojadas por el equipo fueron representadas en un cromatograma en forma de picos.

La cantidad de solución inyectada fue de 50µL como prueba para observar el cromatograma y 100µL repetidas veces para purificarla. La recolección de los picos se efectuó en matraces Erlenmeyer de distintos volúmenes según fuera necesario, posteriormente, fueron extraídos del disolvente y analizados por RMN.

5.5 Pruebas Biológicas de actividad insecticida.

Se pesan y cortan en forma de disco hojas de acelga con un diámetro de 2cm aproximadamente. Una vez pesados se hacen grupos de 6 para colocarlos en cajas Petri debidamente rotuladas con el peso, extracto utilizado y tipo de prueba a realizar. Se cuida que los pesos de cada una de los discos puestos en la misma caja sean lo más parecidos posible. El extracto a utilizar se encontraba lo más seco posible, dicho extracto se diluyó con acetona a una concentración de 5000ppm o 1000ppm. Por medio de una brochita se impregnan los discos con el extracto para realizar la prueba correspondiente. Una vez escogido el ensayo a realizar se colocó el insecto a utilizar, el gusano “soldado” (*Spodoptera exigua.*), dentro de la caja Petri estando éste en su fase de larva (Olguín 2002).

Se realizaron 2 tipos de experimentos, los ensayos de preferencia y los de no preferencia:

En los ensayos de preferencia, la larva puede elegir entre discos tratados y no tratados, lo que permitió evaluar el grado de percepción de un extracto por las larvas y su efecto disuasorio (“deterrent”) de la alimentación. Un extracto tiene efecto disuasorio cuando el insecto, después de probar los discos tratados, deja de alimentarse de éstos y continúa alimentándose de los discos control, a partir de éstos datos se calculó el índice de disuasión (ID). La fórmula para obtener este índice es la siguiente:

$$ID = [(Dc-Dt) / (Dc+Dt)] (100\%)$$

Dc y Dt son el consumo foliar de discos control y discos tratados, respectivamente.

En el ensayo de no preferencia, el insecto se alimenta de discos tratados o no ingiere alimento (índice antialimentario alto (IA)), lo que permitió evaluar el potencial del extracto para inhibir la alimentación del insecto en situaciones de no-elección (actividad “*antifeedant*”). Para obtener este índice se utiliza la siguiente fórmula:

$$IA = [(Dc-Dt) / Dc] (100\%)$$

Donde:

Dc= consumo foliar en el control

Dt= consumo foliar en los discos tratados

Para todos los ensayos de preferencia y de no preferencia se hicieron un total de 10 repeticiones cada uno.

Por otra parte, el índice de supresión de la alimentación (IS), mide el efecto de inhibición de la alimentación que puede producirse en discos foliares no tratados como consecuencia de haber ingerido discos tratados (toxicidad aguda potencial), en placas con discos tratados y no tratados (ensayos de preferencia), cuando se compara con el

consumo en las placas testigo de los ensayos de preferencia. La manera para determinar el IS es la siguiente fórmula:

$$IS = [(Ing\ Test - Ing\ Trat) / Ing\ Test]$$

Donde:

Ing Trat es el consumo foliar de discos tratados y no tratados en las placas del ensayo de preferencia, Ing Test es el consumo foliar en los controles que contienen sólo discos foliares no tratados.

Los resultados de estos 3 ensayos indicaron con cual extracto o fracción seguir trabajando.

5.6 Obtención de los extractos:

Croton ciliatoglanduliferus:

La colecta de la planta se llevó a cabo en región de Tehuacan, Puebla. Se secó al aire libre y en un lugar sombreado hasta encontrarse suficientemente seca para poder trabajarse. Se realizaron dos tipos de extractos de la planta seca, uno acuoso y otro clorofórmico.

Para el extracto acuoso se dejó macerando con 1.6L de agua durante dos noches en un matraz balón de 2L. Posteriormente se filtró y dicho filtrado fue llevado a liofilizar siguiendo todos los pasos de esta técnica (Ver pág. 33).

De todo el extracto seco obtenido se tomó una muestra de 30mg que fue utilizado para pruebas biológicas. Una pequeña porción de 3g fue utilizada para realizar

las pruebas preliminares correspondientes de Flavonoides, Alcaloides, Triterpenos, Saponinas y Taninos.

Trichilia havanensis:

Se hicieron dos recolecciones de la planta en el municipio de Xochitlán, localizado en la Sierra Norte de Puebla en distintos años, la primera fue realizada en el año 2000 y la segunda se realizó en el año 2005 por tal motivo se tomó una muestra de cada recolección para analizar su respectivo extracto acuoso y clorofórmico para posteriormente compararlos entre sí por medio de cromatografía de placa fina usando como eluyente mezclas de acetato de etilo y Metanol en las siguientes proporciones: 1:1, 3:1, 90:10, y 95:5. Como los resultados obtenidos de las semillas de ambas colectas fueron idénticos se decidió juntar las semillas.

Antes de colocar a macerar, se molió en licuadora hasta hacer polvo 1,200g de semillas sin hojas y esta cantidad se dividió en 2 porciones de 600g. Cada porción fue colocada en un vaso de precipitados de 2L, macerando durante dos noches uno con 1.8L de agua destilada y el otro con la misma cantidad de cloroformo. Una vez hecho el extracto clorofórmico se dejó secando el material vegetal para después realizarle un extracto acuoso, esto se realizó para observar si al realizarle primero un extracto no polar, el extracto acuoso se afectaba y perdía compuestos. Al material vegetal que se maceró con agua se le dejó secar, se volvió a macerar con agua dos noches liofilizándose el extracto obtenido para su posterior análisis. Todos los extractos acuosos se secaron por medio del uso del liofilizador.

Con el objetivo de encontrar el mejor disolvente para usarlo como fase móvil en columna cromatográfica para este extracto, se realizaron pruebas de solubilidad tomando 6 muestras de aproximadamente 0.25g cada una. Los solventes usados fueron: hexano, acetato de etilo, acetona, agua, metanol y etanol.

5.7 Separación y purificación de compuestos:

Croton ciliatoglanduliferus:

El extracto acuoso de la planta *Croton ciliatoglanduliferus* se trabajó en columna cromatográfica de sílica gel comenzando con la mezcla de acetato de etilo—hexano (55/45) como eluyente de la columna, dicha polaridad fue aumentando de 10 en 10 partes según el Rf de cada fracción recolectada. La cantidad aplicada en la columna fueron 5g de extracto seco obteniéndose 14 fracciones, se hizo también una columna cromatográfica del extracto clorofórmico obteniendo 7 fracciones

Trichilia havanensis:

Para la primera columna cromatográfica se utilizaron 10g del primer extracto acuoso seco utilizando la técnica de la pastilla para hacer una correcta aplicación. El disolvente utilizado como fase móvil inicial fue acetato de etilo y de acuerdo a los resultados arrojados por la cromatografía de placa fina la polaridad del eluyente se fue

aumentando con metanol, posteriormente se usó metanol, metanol-agua, para concluir la columna con agua pura. La cantidad recolectada proveniente de la columna fueron 50mL obteniéndose así 8 fracciones distintas y la mitad de cada fracción fue utilizada para sus correspondientes pruebas biológicas.

Se realizó también una columna cromatográfica para 2g del extracto acuoso del material vegetal previamente tratado con cloroformo, siguiendo la misma metodología que para la columna anterior obteniéndose 8 fracciones distintas.

De acuerdo con los resultados arrojados por las pruebas biológicas se decidió trabajar con la Fracción 8 de la primera columna, siguiendo la metodología anteriormente mencionada. Se comenzó con una mezcla acetato de etilo—metanol (60:40) como fase móvil y al igual que en las anteriores columnas se fue aumentando la polaridad conforme se corroboraba en cromatografía de placa fina, cada fracción de 20mL que salía de la columna. Se obtuvieron 7 fracciones distintas para purificar en HPLC. Siguiendo la técnica anteriormente mencionada en la página 32.