

CAPITULO V

MATERIAL Y METODOLOGÍA

CAPÍTULO V

5. MATERIAL Y METODOLOGÍA

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos, Disolventes y Productos:

- Acetato de Etilo 99.5%. Reactivo Analítico
- Acetona 99.6%. Reactivo Analítico
- Ácido clorhídrico 37.0%.
- Ácido sulfúrico 97%.
- Benceno 99.8%. Reactivo Analítico
- Cloroformo 99.7%. Reactivo Analítico
- Etanol 96%. Reactivo Analítico
- Hexano 99.8% Reactivo Analítico
- Metanol. Reactivo Analítico
- Yodo
- Papel filtro
- Cloruro de sodio
- Ácido sulfúrico
- Reactivo de: Mayer, Dragendorff, Wagner y Hager
- Reactivo de Rosenthaler
- Anhídrido acético
- Cloruro férrico
- Reactivo de gelatina

- Sales de amoníaco
- Viruta de magnesio amalgamado
- Polvo de zinc
- Hidróxido de sodio
- Picrato de sodio
- Reactivo de Baljet
- Piridina
- Nitroprusiato de sodio
- Cloruro de antimonio
- Hidróxido de potasio
- Peróxido de hidrógeno
- Ácido acético
- Hidróxido de amonio
- Sulfato de sodio anhidro
- Bicarbonato de sodio
- Dicromato de potasio
- Ácido nítrico

5.1.2 Instrumentos y aparatos:

- Balanza granataria: Triple beam 700/800 series Ahaus. Con capacidad de 2,610 gr a 5 lb. 2 on.
- Licuadora
- Nicho de calentamiento

- Rotavapor Büchi R-124
- Baño de agua Büchi B-480
- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear Varian Gemini 2000 de 200 MHz
- Aparato de destilación
- Aparato de reflujo
- Columna de cristal 1: 84.4 cm de altura y 3 cm de diámetro
2: 90 cm de altura y 2 cm de diámetro
- Silica gel 60 (0.2 – 0.5 mm) para cromatografía en columna Merck KGaA
- Cromatoplasmas con zona de concentración Silgur-25 UV 254 nm 10x20 cm.
Macherey-Nagel
- Lámpara de UV: Translucent fair Light Ivory
- Material de cristal Pirex.

5.2 Metodología

5.2.1 Búsqueda Bibliográfica:

Se realizará una búsqueda bibliográfica para poder ubicar la región en que crece el *Agave salmiana* y sus características físicas y químicas más importantes para poder identificarla. Se buscarán diferencias entre *Agaves* como el largo y color de las espinas, la forma de la penca, el color de ésta y el tamaño y disposición de las pencas en el rosetón. Dentro de la investigación bibliográfica se buscará artículos científicos realizados anteriormente para poder verificar lo innovador del trabajo de tesis. Se revisarán los artículos de fitoquímica realizados con otros *Agaves* para poder así obtener una metodología probada y sistematizada la cual seguir. Se buscarán estos artículos en

buscadores del Internet como “Dialog” y en revistas científicas de publicación mensual como “Phytochemistry”.

5.2.2 Colecta de las Pencas:

Después de la determinación botánica en donde se identificará al *Agave salmiana* se buscará el área determinada donde crece este *Agave*. Ya realizado esto se trasladará a la región en donde crece la planta y se seleccionarán las pencas de los *Agaves* que más se acerquen a las cualidades necesitadas en el laboratorio, maduras antes de la floración. Una vez identificadas y seleccionadas las pencas se cortarán 3 pencas de 3 rosetones diferentes del *Agave salmiana*, se cortarán desde la base y se partirán a la mitad para poder transportarlas al laboratorio.

5.2.3 Desección y preparación de las pencas:

Una vez traídas las pencas al laboratorio se cortarán y se meterán en el desecador para evitar las reacciones de degradación que ocurren por la presencia de agua. El desecador de plantas se encuentra en el sótano del edificio 9 y se trata de una caja de madera provisto de varias bandejas en forma de rejilla para dejar pasar el aire. Esta caja tiene focos en la parte inferior permitiendo calentar el aire y evaporar el agua de las plantas.

Se guardarán ejemplares de pencas frescas para poder elaborar pruebas de identificación de estomas y fibras en las pencas. Se tomarán las pencas frescas y se les agregará una capa de unicel disuelto con xileno, técnica patentada por Maiti y col., ya secada la capa se pondrá un pedazo de cinta adhesiva y se tirará de ella para poder obtener los estomas y observarlos en el microscopio compuesto. Para poder observar las

fibras se cortará un pedazo de la penca y se sumergirá en una solución de dicromato de potasio y ácido nítrico 1:1 durante una hora en baño maría, después se observará por el microscopio.

Una vez secas las plantas, se muelen para tener un área mayor de contacto con el disolvente en la extracción. Se trozarán las pencas hasta obtener 1 kilo y medio de planta seca. Se utilizará el kilo para obtener extracto y el medio kilo se macerará para utilizar en las pruebas preliminares.

5.2.4 Pruebas preliminares:

Las pruebas químicas son útiles para estos casos ya que son sencillas, sensibles, específicas y rápidas de realizar. Las reacciones químicas de coloración y de precipitación que junto con propiedades físicas como la sublimación o la fluorescencia nos permiten observar la existencia de determinados compuestos químicos en las plantas. Estos ensayos fisicoquímicos cualitativos se pueden realizar sobre la misma droga, entera o pulverizada, o sobre extractos a partir de la droga con diferentes solventes. Generalmente se realiza una maceración con etanol, los extractos alcohólicos son útiles para averiguar la presencia de los principios activos más importantes, y luego se seca el extracto y utilizar el concentrado para realizar las pruebas (Domínguez, 1973).

Después de pulverizada las pencas se tomará medio kilo de muestra y se macerará con etanol. Se pondrá etanol en un recipiente conteniendo la muestra hasta cubrir ésta, luego se tapaná y se dejara reposar por 3 días. Pasados los 3 días se filtrará y este filtrado se colocará en el rotavapor para obtener el concentrado. De este concentrado se tomarán alícuotas para realizar las pruebas preliminares. A continuación se mencionarán algunas reacciones utilizadas para identificar metabolitos secundarios.

5.2.4.1 Metodología de reacciones:

Alcaloides

A) Extracto Etanólico.

Una porción del residuo se disuelve en ácido clorhídrico, se agita y se filtra hasta que el filtrado sea completamente transparente. El filtrado se ensaya con los reactivos para alcaloides; Mayer, Dragendorff, Wagner y Hager. Se considera como positiva, las pruebas en las que aparece un precipitado. (Domínguez, 1973)

B) Método rápido de Webb

Aplicable desde 0.1 a 0.5 gr, con 5 gr del material seco pulverizado o su equivalente en planta fresca triturada. Se mezclan con suficiente ácido clorhídrico al 1% para formar una suspensión y obtener 2 mL del filtrado. La suspensión se vierte en un matraz Erlenmeyer y se coloca al baño María a 80°C. La mezcla se calienta 4 horas y se agita periódicamente. Después se retira la suspensión, se deja enfriar y se filtra. Si el filtrado es menor de 2 mL se añade al residuo suficiente HCl al 1% hasta ajustarlo a 2 mL. Por separado se ensayan alícuotas de 0.2 mL del filtrado con volúmenes de 0.1 mL de reactivos de Mayer, Dragendorff, Wagner y Hager. Los resultados se registran como abundante (++++), moderado (++) , escaso (+), dudoso (\pm) y negativo (-). (Domínguez, 1973)

C) Método de Caín y colaboradores

El material seco, 5 gr, se tritura en una licuadora o en un mortero y se lleva a ebullición con etanol sobre una parrilla durante 30 minutos, tratando de no evaporar el alcohol, si es el caso se agrega más alcohol. A continuación, el etanol se evapora al vacío y el residuo rojo/café, semisólido se disuelve en un tubo de ensayo con HCl 2 N

saturado con NaCl, durante 20 minutos. La mezcla se filtra y se prueba con los siguientes reactivos: Mayer, Dragendorff, Wagner y Hager, se considera la prueba positiva la aparición de un precipitado. (Fragoso, 2001)

Saponinas

A) Ensayo con agua caliente

Una porción del residuo se disolvió con agua caliente durante 15 a 30 minutos, luego se agitó vigorosamente durante 3 a 5 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja, estable por unos 30 minutos, se considera positiva la prueba. (Domínguez, 1973)

B) Rosenthaler

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

Triterpenos

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

Taninos

Se disuelve en agua una porción del residuo etanólico; se filtra y se toman alícuotas de 1 mL para las pruebas con cloruro férrico y con reactivo de gelatina. En ambos casos se considera positiva la aparición de un precipitado.

Los taninos hidrolizables y condensados se diferencian según el color o precipitación con sales férricas; los hidrolizables dan coloración y precipitados azul-negruzcos y los taninos condensados dan precipitados pardo-verdoso. (Fragoso, 2001)

Flavonoides

A) Reacción con vapores de amoníaco

Una porción del residuo etanólico se diluye con más etanol. Se impregna una tira de papel filtro con el extracto diluido y se deja secar a temperatura ambiente; posteriormente, se someterá a la acción de vapores de amoníaco. El desarrollo de una coloración amarilla ocre se considera positiva. (Fragoso, 2001)

B) Shinoda

A un tubo con el extracto diluido se le agrega un trocito de viruta de magnesio amalgamado y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. La aparición de colores que van del rojo profundo a magenta indica la presencia de una flavanona o dihidroflavanol. Dihidrochalconas y otros flavonoides no reaccionan. (Fragoso, 2001).

C) Pew's

A un tubo con el extracto diluido se le agrega polvo de zinc y unas gota de ácido clorhídrico 5 N. Solo los dihidroflavonoles reaccionan para dar colores que van del rojo púrpura al rojo cereza. Flavononas, dihidrochalconas y otros flavonoides dan coloración rosa o café. (Fragoso, 2001)

D) Hidróxido de sodio

A un tubo del extracto diluido se le agregan unas gotas de hidróxido de sodio diluido. La aparición de colores amarillo o naranja se considera indicativa de la presencia de flavonoides. (Fragoso, 2001)

Glucósidos cianogénicos

La presencia de ácido cianhídrico en este grupo de compuestos puede observarse por su reacción con picrato de sodio (Reacción de Grignard). Se coloca el extracto etanólico en un tubo de ensaye junto con unas gotas de cloroformo, se coloca una tira de papel impregnado con reactivo de Grignard en la boca del tubo. Se calienta de 30 a 35°C y se observa la coloración que aparece en el papel. Un color rojo o rosa se considera positivo. (Fragoso, 2001)

Glucósidos cardiotónicos y lactosas sesquiterpénicas

A) Baljet

A 2 o 3 mL del extracto etanólico se le adicionan 3 o 4 gotas de reactivo de Baljet, si se forma coloración anaranjada o roja oscura se considera positiva. (Fragoso, 2001)

B) Legal

En una porción del extracto etanólico se disuelven 2 o 3 gotas de piridina, después se añaden, una gota de solución reciente al 5% de nitroprusiato de sodio en agua y de 1 a 3 gotas de NaOH 2 N. Se considera positivo cuando aparece un color rojo intenso. (Fragoso, 2001)

C) Cloruro de Antimonio

El cloruro de antimonio se disuelve en cloroformo y se añade unas gotas al extracto etanólico, la aparición de un color violeta azulado se considera positiva. (Fragoso, 2001)

Cumarinas

Las cumarinas sublimales se detectan calentando los extractos acuosos en un tubo de ensayo tapado con papel filtro impregnado de una solución alcalina. Las cumarinas se recogerán en el papel. Si el papel exhibe puntos fluorescentes bajo luz U.V. se considera positiva. (Fragoso, 2001)

Antraquinonas

A) Reacción de Borntrager

Se hierve unos cinco minutos 0.3 g de planta pulverizada con 10 mL de KOH 0.5 N y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 6%. Después se enfría la suspensión y se filtra o centrifuga. El filtrado se acidula con 10 gotas de ácido acético y después se extrae con 10 mL de benceno. La capa bencénica se pone amarilla, se separa y 5 mL de solución bencénica se agita con 2.5 mL de hidróxido de amonio. Las antraquinonas colorean la capa alcalina de rojo. (Domínguez, 1973)

5.2.4.2 Preparación de reactivos:

- 1.- Reactivo de Hager: Solución saturada de ácido pícrico en agua.
- 2.- Reactivo de Mayer: En un matraz Erlenmeyer de 125 mL, disolver 1.36 g de cloruro mercuríco 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.
- 3.- Reactivo de Wagner: En un matraz volumétrico de 100 mL, disolver 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua; aforar la solución a 100 mL con agua destilada.

4.- Reactivo de 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 1.18 g/mL, al 30 %). En otro matraz colocar 27.2 g de yoduro de potasio con 50 mL 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 100 mL. 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.

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

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

7.- Reactivo de gelatina: 1 g de gelatina pura se hidrata con 100 mL de agua.

8.- Reactivo de Grignard: Aforar 1 g de carbonato de sodio y 100 mg de ácido pícrico a 100 mL.

9.- Reactivo de Baljet: Solución A: 1 g de ácido pícrico se afora con 100 mL de etanol. Solución B: 10 g de hidróxido de sodio se afora a 100 mL con agua.

10.- Reactivo de Emerson: Disolver 0.5% de carbonato de sodio, 0.9% de 4-amino antipirina y 6.4 % ferrocianuro de potasio en agua.

(Fragoso, 2001)

5.2.5 Extracción:

Se tomará 1 kg de penca triturado y molida, se colocará en un matraz balón de 5 litros. Primero se llenará con 3 litros de hexano y se pondrá en reflujo por 4 horas, pasadas éstas se dejará enfriar y se filtrará el líquido. Después de filtrar se concentrará a

través de rotavapor, todos estos pasos se repetirán 3 veces para poder obtener suficiente extracto seco. Este procedimiento se llevará a cabo con benceno y acetato de etilo al igual para poder tener extractos con diferentes polaridades, arrastrando metabolitos con diferente polaridad. Se desengrasarán, eliminación de terpenos de cadena larga de la muestra, agregando metanol caliente y luego enfriando para precipitar el sólido, a continuación se filtrará, se repetirá el procedimiento hasta observar que no se obtiene mas sedimento.

5.2.6 Separación e identificación:

La separación de los metabolitos secundarios se llevará a cabo a través de columnas cromatográficas. Se tomará en cuenta la relación 1 gramo de muestra a 100 gramos de silica gel para montar la columna. Después de aplicada la muestra a la columna se correrá con hexano para bajar los compuestos no polares y se aumentará la polaridad con acetato de etilo o cloroformo en relación de 99:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 y 5:5 hexano: acetato de etilo. De esta forma se podrán separar los compuestos más selectivamente de acuerdo a su polaridad y así poderlos purificar.

Se verificará la forma en que se separan los compuestos con placas cromatográficas, las condiciones de separación se eligen en función de las características de la mezcla a separar. La cromatografía en capa fina es empleada en la separación de mezclas de toda clase de productos naturales. (Villar del Fresno, 1999)

Se realizará una hidrólisis ácida del extracto polar para poder obtener e identificar las saponinas de la planta. Se realizará esto a través de un sistema de reflujo conteniendo algún ácido para llevar a cabo la hidrólisis. Posteriormente se efectuarán lavados con

acetato de etilo para rescatar la fase orgánica y se harán lavados con una solución de agua:bicarbonato de sodio y se cristalizará con metanol para purificar e identificar los cristales. Se terminará de purificar los compuestos de la hidrólisis por medio de columna cromatográfica.

La identificación de los compuestos se hará por datos físicos y datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .