# 6. Resultados

## 6.1 Identificación Botánica

En la identificación botánica podemos observar características microscópicas y microscópicas.

Entre los resultados de los estudios macroscópicos se encuentran las siguientes características:

Se puede observar que *agave applanata* es un rosetón de tamaño mediano a largo, con crecimiento en el suelo. La penca presenta una forma de lanza o lanceolada. De un tono verde –grisáceo.

Figura 6.1.1 Rosetón de *Agave applanata.*

En esta fotografía se muestra que la forma de las espinas laterales de la penca son en forma de diente de tiburón; y que la espina terminal es gruesa de color oscuro, tanto del agave crecido, como el agave en etapa de crecimiento.

Figura 6.1.2 Espinas de *Agave applanata*.

En la figura 6.1.3 se observa un ejemplo de *Agave applanata.* La fotografía es tomada en un jardín de la UDLA,P.

Figura 6.1.3 Ejemplo de *Agave applanata.*

Entre las pruebas microscópicas se encuentran las siguientes características:

En esta fotografía de estoma se muestra el pequeño orificio con dos células guardianas.

Figura 6.1.4 Estomas 1

En esta fotografía de estoma se muestra el pequeño orificio con dos células guardianas.

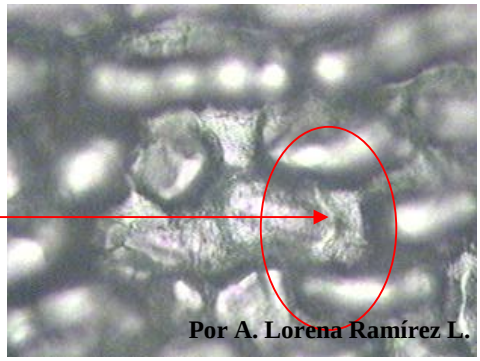


Figura 6.1.5 Estoma 2

También, es importante recalcar que los estomas están cerrados por que la penca de donde obtuve la muestra tenía tiempo guardada en el refrigerador, por lo tanto estas se mantenían cerradas para guardar por mas tiempo posible la poca agua que quedaba en la penca.

## 6.2 Pruebas preliminares

En el análisis de las pruebas de precipitación y coloración para la detección de metabolitos secundarios se obtuvieron los siguientes resultados; pruebas positivas para Alcaloides, Flavonoides, Taninos, Saponinas y Triterpenos; y pruebas negativas para Glucósidos cianogenéticos, Glucósidos cardiotónicos, Antraquinonas y Cumarinas. Las Pruebas positivas concordaron con lo descrito en la literatura para la fitoquímica del genero agave. En las pruebas de Alcaloides se realizaron el método de Webb rápido y Cain y colaboradores, donde salieron positivas. Así mismo, en lo que se refiere a Flavonoides, se realizaron las pruebas de Pew´s, Shinoda, KOH y vapores de amoniaco. Las pruebas Pew´s y KOH salieron positivas y las que restan negativas, pero como en la bibliografía dice que hay presencia de estos metabolitos secundarios en los agaves se toman encuenta estos estudios. En el caso de Saponinas, la prueba de Rosenthaler salio positiva, pero en Agua caliente negativa. Pero nuevamente, la bibliografía dice que en los agaves hay saponinas, por lo tanto se toma positiva la prueba. Los triterpenos salieron positivos, mientras que los Glucósidos cianogenéticos, los Glucósidos cardiotónicos, Antraquinonas y Cumarinas salieron negativos.

Una de las razones por las que pudieran salir así los resultados es porque la cantidad de compuesto activo no sea suficiente para que la prueba se torne de color o precipite, o ambas. Ya que esto depende de la concentración de compuesto que se halle en esos momentos en el extracto etanólico y en las pruebas. Si esta muy diluido puede que las pruebas salgan falsas negativas. La tabla de Pruebas preliminares se muestra en la figura 6.2.1.

## 6.3 Extractos

Los extractos obtenidos fueron los siguientes:

- El extracto hexánico, del que se obtenían los compuestos poco polares.
- El extracto benceno, del que se obtenían los compuestos medianamente polares.
- El extracto acetato de etilo, del que se obtenían los compuestos polares.

La polaridad cambia según los solventes utilizados, como se da a entender anteriormente. En la figura 6.3.1 se muestra el proceso de obtención del extracto que se obtuvo al realizar el reflujo de 4 horas. Después se desengrasa adicionando metanol, aproximadamente 250 mL y se realizan los métodos espectroscópicos convenientes para el análisis de la muestra. Se realizaron los espectros de RMN de $^{1}H$ para darnos una idea de lo que se tenía en el extracto y para compararlo mas adelante conforme se avanzara en la separación y en la purificación. Los espectros de los extractos hexánico, bencénico y de acetato de etilo desengrasado se observan en el Anexo II, III y IV.

| Grupos químicos | Prueba | Resultados | |
|---|---|---|---|
| | | *Webb rapido* | *Cain y Col.* |
| **Alcaloides** | *Dragendorff* | - | + |
| | *Wagner* | - | - |
| | *Hager* | + | + |
| | *Mayer* | - | + |
| **Flavonoides** | *Pew´s* | + | |
| | *Shinoda* | - | |
| | *KOH* | + | |
| | *Vapores de amoniaco* | - | |
| **Taninos** | *Cloruro férrico* | + | |
| | *Gelatina* | + | |
| **Saponinas** | *Agua caliente* | - | |
| | *Rosenthaler* | + | |
| **Triterpenos** | | + | |
| **Glucósidos cianogenéticos** | *Grignard* | - | |
| **Glucósidos cardiotónicos** | *Baljet* | + | |
| | *Legal* | - | |
| | *Cloruro de antimonio* | - | |
| **Antraquinonas** | | - | |
| **Cumarinas** | | - | |

Figura 6.2.1 Tabla de pruebas preliminares.

Filtrado

Filtrado antes del rotavapor

Durante el rotavapor para evaporar el solvente del extracto.

El extracto sin solvente sin desengrasar con metanol.

El desengrasado separado del extracto.

Figura 6.3.1 Pasos para obtención del extracto después del reflujo de 4 horas.

## 6.4 Separación del extracto.

En este paso se separó el extracto hexánico. Para realizarlo se montó una columna cromatográfica con Sílica Gel. Se tomó una muestra de 2.5 g de Extracto hexánico desengrasado y se separó en una columna con 250 g de sílica gel, utilizando una relación de 1 g de extracto por cada 100 g de sílica gel. Se hicieron las polaridades: Hexano y Hexano - $CHCl_3$ (9:1). Se analizaron las fracciones iniciales, las de en medio y las finales; realizando, primero, por cromatografía de placa fina para ver si había alguna muestra diferente y así juntar las fracciones iguales o con compuestos de alta afinidad o mismos grupos químicos.

Esto se ve si solo se muestra una mancha en la placa o varias manchas. En el caso de *Agave applanata* se observa siempre una mancha en la placa de Cromatografía de placa fina. Al finalizar esto, se realizó el análisis espectroscópico con $^{1}H$ para ver si se observaban impurezas y también si se había obtenido un compuesto puro.

En el caso de la primera columna cromatográfica, se observo que la fracción que mostró menos impurezas fue la 98-110 de la polaridad Hexano - $CHCl_3$ . El espectro se muestra en el Anexo V. A pesar de las impurezas que se tienen se observan señales de triterpeno.

Esta fracción pesó 1.5 g y se realizo otra separación y purificación con otra columna cromatográfica. En este caso se utilizaron 150 g de sílica gel usando la misma relación 1:100. Con este análisis se usaron las polaridades siguientes: Hexano, Hexano - $CHCl_3$ (9:1), Hexano - $CHCl_3$ (8:2), Hexano - $CHCl_3$ (7:3), Hexano - $CHCl_3$ (6:4), $CHCl_3$. Se realizaron las mismas pruebas de cromatografía de placa fina de cada fracción, y se realizaron los espectros de cada fracción agrupada dependiendo de sus características particulares en la placa, como se explicó anteriormente. Se realizó el análisis espectroscópico por medio de RMN de $^{1}H$, nuevamente, y se mostró interés en la fracción de Acetato de etilo, cuando se bajo la columna para arrastrar lo que quedaba de muestra. Esto fue porque los demás resultados solo mostraban impurezas. El espectro de Acetato de etilo de interés se muestra en el Anexo VI. Como en el espectro anterior, a pesar de las impurezas que se tienen se observan señales de triterpeno.

La fracción de Acetato de Etilo pesó 0.05 g y se separó en otra columna cromatográfica, utilizando 5 g de sílica gel realizando la misma relación anterior. Solamente que en este caso se hicieron 6 fracciones de polaridad Hexano, Hexano – Acetato de Etilo (9:1), Hexano – Acetato de Etilo (8:2), Hexano – Acetato de Etilo (7:3), Hexano – Acetato de Etilo (6:4), Acetato de Etilo. Después se realizaron los análisis espectroscópicos de RMN de $^{1}H$ observando en la fracción (7:3) una muestra con pocas impurezas pero

presentes. Este espectro se observa en el Anexo VII. En este espectro se observan señales que se compararon con los artículos encontrados, y se observó características de señales de un triterpeno. En este caso, en el artículo "Divergioic Acid, a Triterpene from *Vochysia divergens"*, se utiliza para comparar las señales de grupos básicos que pertenecen a los triterpenos, aunque el artículo no pertenezca al género *Agave*. Presentan señales que pueden ser de triterpenos en 4.97 ppm (1H), 4.80 ppm (1H) y en 1.81 ppm (3H). Así, se observan señales de 5 metilos en 3.44 ppm y de protones metileno a un desplazamiento de 1.77 ppm. En el desplazamiento de 4.30 y de 3.44, se observa como sigulete. (*Sonia C. Hess*a, *and Franco Delle Monache*b,1999 *)*. Aparte se observan las señales de impurezas en 4.2 que son 2 singuletes, y señales 7.45 ppm y 7.7 ppm que representan un protón aromático. Aparte de la señal de cloroformo en 7.2 ppm.

Un ejemplo de cromatografía en columna se muestra en la figura 6.4.1

Figura 6.4.1 Cromatografía en columna.

## 6.5 Hidrólisis de Saponinas

Al realizar la hidrólisis de saponinas se obtuvo un espectro de RMN de $^{1}$H. Este se separó y purifico en una columna cromatográfica con sílica. En este caso se utilizaron 11 g de sílica ya que de muestra se obtuvo 0.1 g. Se hicieron 6 fracciones con polaridad Hexano, Hexano

- $CHCl_3$ (9:1), Hexano - $CHCl_3$ (8:2), Hexano - $CHCl_3$ (7:3), Hexano - $CHCl_3$ (6:4), $CHCl_3$. En este caso solo se realizó 1 fracción para cada polaridad de 200 mL. Por lo tanto solo se realizaron espectros para cada fracción. Y la fracción que menos impurezas tenía es la ultima, que es la de $CHCl_3$. Este espectro se muestra en el Anexo VIII. En este caso, las señales que se observan son, de 0.8 – 1.4 ppm de protón en grupo metileno, y de 4.2 – 5.0 ppm de un protón unido a Oxígeno.