

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

El proceso de elaboración de la tesis se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad de las Américas Puebla, utilizando el laboratorio 9 103 A para el proceso de secado de planta; en el laboratorio 9 107 se cuenta con microcopio con cámara electrónica digital; el laboratorio 9 203 A para la realización de pruebas químicas preliminares y cromatografía tanto de capa fina como en sílica; en este laboratorio se cuenta con rotavapor BUCHI Switzerland R-124. El análisis espectroscópico se realizó en el laboratorio 9 207 A, en el equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN VARIAN).

4.1 MATERIAL

4.1.1 COLECTA

Cuchillo de monte, hacha, tijeras de podar y azadón. (Domínguez, 1973)

4.1.2 CONSERVACIÓN DE LOS EJEMPLARES

Prensa, dos rejillas de 30 x 45 cm. de madera, correas para apretar las rejillas; cartones, papel periódico. (Domínguez, 1973)

4.1.3 CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA

Cámara digital incorporada a microscopio.

4.1.4 MACERACIÓN

Vaso de precipitado 5 litros, nicho de calentamiento con matraz de bola de 5 litros y equipo de reflujo (bomba sumergible en agua).

4.1.5 PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES

Rotavapor BUCHI Switzerland R-124, lámpara UV, campana de extracción, parrilla, baño María, material de vidrio (tubos de ensaye, pipetas pasteur, matraz Erlenmeyer, vaso de precipitados).

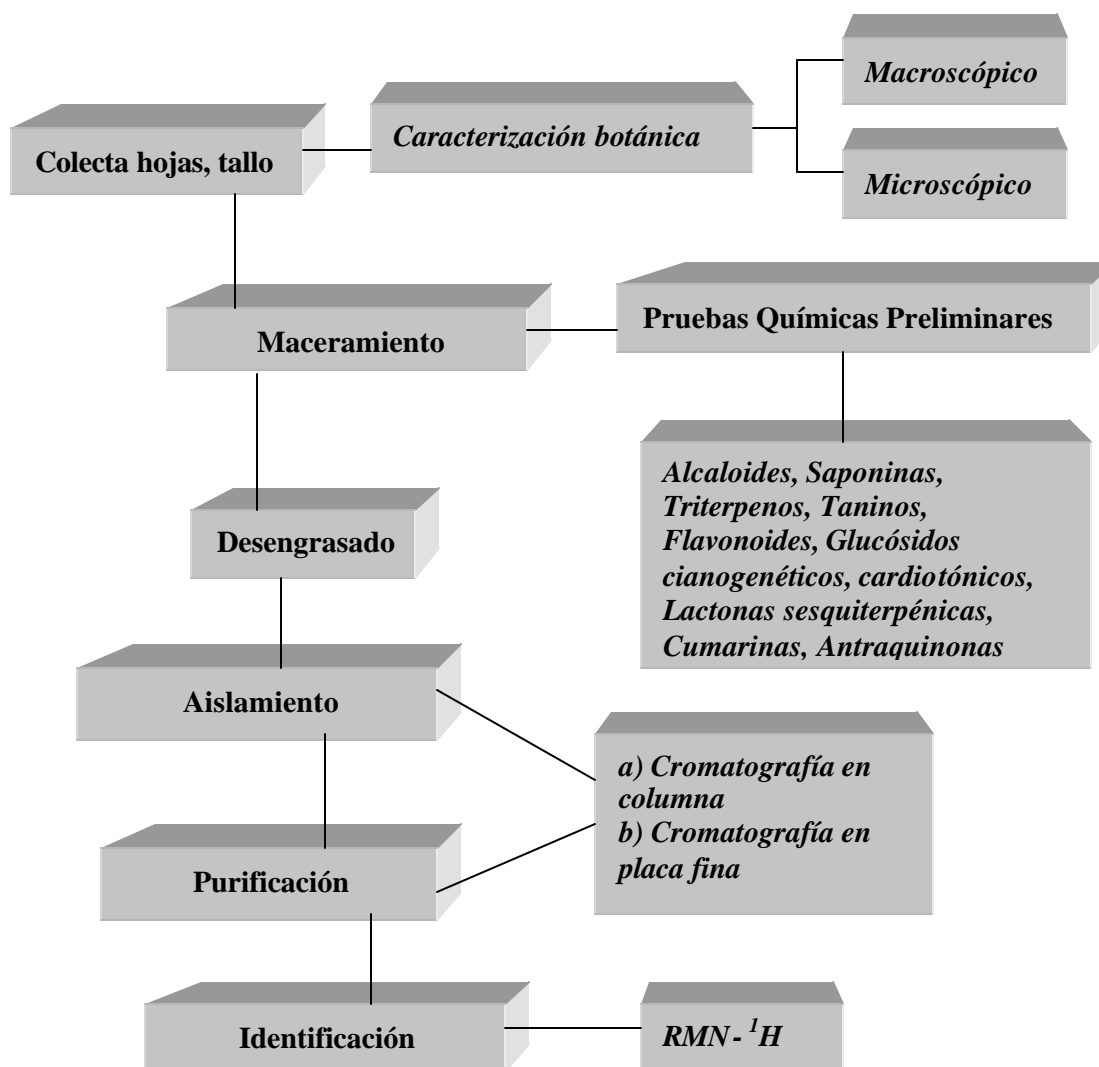
4.1.6 CROMATOGRAFÍA

- a) Capa fina: Placas de sílica de 20 x 20 cm. con lámina de aluminio Merck.
- b) Columna: Columna cromatográfica de 2 m, 5 cm. de diámetro, columna cromatográfica de 60 cm, 3 cm diámetro.

4.1.7 RMN

Tubos de RMN

4.2 MÉTODO



4.2.1 COLECTA

La identificación de un vegetal es indispensable en todo trabajo químico. Para esto se le examina ordenadamente según sus características morfológicas más sobresalientes y, a

medida que se va descendiendo en la escala de clasificación, se observan detalles más minuciosos, pasando a caracteres microscópicos y fisiológicos, hasta llegar a la especie en que todos los miembros son prácticamente iguales, aunque si se estudian cuidadosamente aún más hasta llegar al individuo. (Domínguez, 1973)

Es por eso que se debe de ubicar correctamente el lugar geográfico de crecimiento de la planta en estudio, para no tener incongruencias con los resultados obtenidos y la biogénesis de ésta.

La planta se coloca en prensas de madera para su transportación del lugar de colecta al área de observación y trabajo, además para su conservación para el proceso siguiente.

Ya que el agua que contienen las hojas y tallo interviene en el proceso, se elimina por medio de secado, colocándolos en campanas de extracción, cambiando el papel periódico constantemente, ya que este absorbe el agua.

4.2.2 CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA

Debido a la gran variedad de especies dentro de una misma familia, sin ser exclusivo el caso de *Ipomoea murucoides*, es necesario hacer un reconocimiento tanto macroscópico como microscópico de dicha planta, para asegurar que el estudio Fitoquímico sea aplicado a la planta medicinal antes mencionada.

La mayor parte de los árboles del mundo puede incluirse dentro de una de las siguientes clases: angiospermas, también conocidas como plantas con flor, cuyos árboles se caracterizan por tener hojas amplias y pueden ser tanto deciduos como perennes, y gimnospermas, el otro gran grupo de árboles que comúnmente tienen hojas aciculares (es decir, en forma de aguja) y que son perennes. Las plantas de este último grupo carecen de flores verdaderas, pero presentan semillas dentro de conos. (Jensen, 2000)

4.2.2.1 RECONOCIMIENTO MACROSCÓPICO

Para este proceso se necesita la observación inmediata de la forma de hoja, tallo y fruto; tomando en cuenta elementos climáticos y territoriales basándose en testimonios bibliográficos anteriormente recopilados.

En el análisis microscópico es necesario enervar las partes de una planta que son tallo, hojas, inflorescencia, flores y fruto.

Los tallos son de aspecto muy variado en tamaño (herbáceo, arbusto, árbol), estructura (estolones, rizomas, tubérculos, corticados y bulbos).

En la mayoría de los tallos, las hojas salen de los nodos, según forma y arreglo característico de cada especie. Las hojas pueden ser simples o compuestas, formadas por varios folíolos. Por su arreglo en el nodo pueden ser alternas, una por nodo: si en pares por nodo, opuestas si hay tres o más hojas en un solo nodo, verticiladas. (Domínguez, 1973)

Las partes principales de una hoja completa son: base foliar en contacto con el tallo o rama, el pecíolo (rabillo de la hoja) y la lámina o limbo. Detrás del pecíolo puede haber laminillas (estípulas). Frecuentemente puede faltar alguna parte, si es el pecíolo es sésil; si carece de lámina, se dilata el pecíolo, formando el filodio.

Por la morfología de la lámina, las hojas compuestas pueden ser hendidas (pinnatifidas o palmetifidas), partidas y seleccionadas. Los bordes de las hojas pueden ser enteros, ondulados, aserrados, doble aserrados, dentados, lobulados, partidos, etc.

Las formas de las hojas son muy variadas, aciculares, lineales, oblongas, ovoides, oblongo lanceolada, cordada, deltoide. (Domínguez, 1973)

La inflorescencia es todo sistema de ramificación que se resuelve en flores. Las inflorescencias se dividen en definidas, la flor más vieja remata el eje principal y la floración es descendente o exterior; e indefinidas en que la flor más joven remata el eje principal y la floración es ascendente o interior. Al tallo principal que soporta la inflorescencia, se le llama pedúnculo y los talluelos (cabillos) se denominan pedicelos. Las inflorescencias pueden estar rodeadas por hojas degeneradas, brácteas, en ocasiones más vistosas que las flores; pueden ser: racemosas (racimo, espiga, espádice, corimbo, umbela, capítulo), cimosas (dicasio, monocasco, cincino) y compuestas (panícula, tirso, umbela compuesta). (Domínguez, 1973)

Las partes de una flor completa son: cáliz, corola, androceo y gineceo. El cáliz se compone de sépalos, la corola de pétalos, el androceo de estambres y el gineceo de uno o varios pistilos, que se dividen en: ovario, estilo y estigma. Un pistilo está integrado por carpelos. El cáliz frecuentemente es verde y la corola, ordinariamente de colores diversos y son hojas modificadas que protegen a los órganos reproductores. Un estambre consta filamento y antera, en esta última se forman los granos de polen. En el ovario están los óvulos, que fecundados se convierten en fruto. (Domínguez, 1973)

Cuando en una misma planta se tienen flores masculinas y femeninas, se les llaman monoicas, cuando las flores masculinas están en una planta y las femeninas en otra son dioicas. En la mayoría de las flores, sus partes (sépalos, pétalos) se encuentran en verticelos o círculos en el eje de la flor o en espiral. Por su simetría, las flores son regulares, las partes del centro y son equidistantes o tienen un plano de simetría; o irregulares, uno o más miembros de un verticilo son desiguales por no salir del centro o no estar equidistantes. Por la unión (coalescencia) de los miembros de un verticilo, se distinguen la simpepalia, unión parcial o total de los sépalos a lo largo de sus orillas; por adherencia de los pétalos, simpétala. Las corolas simpétalas pueden tener forma de campana, tubo o embudo. La coalescencia de los estambres se llama sinandria; la de los carpelos del geneceo (sincarpia). (Domínguez, 1973)

El fruto es un ovario desarrollado y maduro. Los frutos típicos constan de epicarpio, mesocarpo y endocarpo; pueden ser carnosos y secos. Los últimos pueden ser dehiscentes e indehiscentes, según se abran o no espontáneamente. Los tipos principales de frutos son: Drupa, fruto indehiscente monoespermo, de mesocarpo carnosos y endocarpo huesos o leñoso; Baya, fruto carnosos, generalmente polispermo, endocarpo indistinguible del mesocarpo; Legumbre, (fruto propio de las leguminosas, consistente en un carpelo (vaina), que se abre a la vez por la sutura ventral, donde se insertan las semillas y por la línea media dorsal; Cápsula, fruto seco, sincarpo, dehiscente y generalmente polispermo; Cariopsis, fruto seco indehiscente, monoespermo, de pericarpo delgado; Aquenio, fruto seco, áptero, indehiscente. (Domínguez, 1973)

4.2.2.2 RECONOCIMIENTO MICROSCÓPICO

No es suficiente la observación inmediata de las características macroscópicas de la planta, por lo que la observación microscópica de estomas, fibras y glándulas de *Ipomoea murucoides* da información detallada y concisa para futuras investigaciones.

i. ESTOMAS

La epidermis de la planta contiene aberturas microscópicas rodeadas por dos células guardianas; dichas aberturas permiten que se lleve a cabo el intercambio gaseoso. La abertura o poro, junto con las células guardianas (u oclusivas) se denomina estoma. Estos se localizan tanto en las hojas y tallos de la mayor parte de las plantas, en las

partes florales y frutos. Se les puede encontrar en ambas superficies de una hoja; en ese caso por lo general son más comunes en la superficie inferior. El número de estomas que cada planta posee está determinado a nivel de especie. Las células guardianas tienen la capacidad de cambiar de forma, afectando el tamaño de la abertura estomática, provocando variaciones en la presión de turgencia dentro de dichas células. (Jensen, 2000)

ii. FIBRAS

Las fibras presentan paredes por lo general muy lignificadas bastante largas, terminan en punta. Las fibras están en diversos tejidos de la raíz, tallo, hojas, flores y frutos. Se les puede encontrar también en el xilema y floema, como una vaina que rodea los haces de tejido vascular, esto se observa principalmente en las hojas y tejido fundamental. Aun cuando las fibras se pueden encontrar en forma aislada, es más común hallarlas en grupos o haces. Las fibras se pueden agrupar en dos tipos, según la posición que ocupen: las fibras del xilema (madera) se conocen como fibras del xilema, mientras que las que se encuentran en otros sitios fuera del xilema reciben el nombre de fibras extraxilémicas. Ambos tipos de fibras tienen como función incrementar la fortaleza y apoyo de la planta. Cuando las fibras se desarrollan, por lo general sufren un alargamiento considerable porque las células dejan de dividirse antes que las células circundantes, pero continúan alargándose mientras el tallo siga creciendo por alargamiento como por división. Las paredes secundarias se forman una vez cesado el alargamiento; pueden adquirir un grosor considerable. En la mayor parte de las fibras, la pared se lignifica; sin embargo en otras pueden estar compuestas principalmente por celulosa y carecer de lignina.

Las fibras tienen una gran importancia comercial y son unas de las primeras partes de las plantas que el hombre empleó con fines diferentes a la alimentación. Es posible extraer grupos de hebras de fibras de una amplia gama de plantas, que pueden producir telas, sogas y cuerdas. Las fibras se clasifican en duras (para hacer cordeles) y suaves (para la creación de telas). (Jensen, 2000)

iii. GLÁNDULAS

En las glándulas se albergan los metabolitos secundarios en las plantas, así entre mayor es la cantidad de glándulas, mayor es la característica medicinal de la planta.

4.2.3 MACERAMIENTO

La planta seca se separa en hojas y tallo. Las hojas (1 kg) se coloca en un matraz con 4 litros de etanol durante 3 días ya que los metabolitos existentes en la hoja son arrastrados por este disolvente polar. El tallo (1 kg) se pone en reflujo en calor durante 4 horas en 3.5 litros de hexano.

Se hace el extracto etanólico de hojas y hexánico de tallo utilizando el rotavapor. Se pesa y se divide el extracto para la realización de pruebas preliminares y el extracto desengrasado para cromatografía en columna.

4.2.4 PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES

Alcaloides

A) Extracto Etanólico

Una porción del residuo se disuelve en ácido clorhídrico diluido, 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 positivas, las pruebas en las que se aparece un precipitado (Domínguez, 1973 y Barba, 1997).

Saponinas

A) Ensayo con agua caliente.

Disolver en un tubo una porción del residuo etanólico con agua caliente y agitar vigorosamente por algunos minutos. La formación de espuma estable por unos minutos con apariencia de panal de abejas se considera positiva. (Domínguez, 1973 y Barba, 1997).

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. (Barba, 1997).

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 (Domínguez, 1973 y Barba, 1997).

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-negrucos y los taninos condensados dan precipitados pardo-verdosos (Trase, 1986 y Barba, 1997).

Flavonoides

A) Reacción con vapores de amoníaco

Una porción del residuo etanólico se diluye con más etanol. Una tira de papel filtro se impregna 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 (Barba, 1997).

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 indican la presencia de una flavanona o dihidroflavonol. Dihidrochalconas y otros flavonoides no reaccionan (Harborne, 1989 y Barba, 1997)

C) Pew's

A un tubo con el extracto diluido se le agrega polvo de zinc o 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 (Harborne, 1989 y Barba, 1997).

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 (Barba, 1997).

Glucósidos cianogénicos

La presencia de ácido cianhídrico en este grupo de compuestos, puede observarse por su reacción con picrato de sodio (reacción de Guignard). Una tira de papel impregnado con reactivo de Guignard se pone en la boca de un tubo que contenga una pequeña cantidad del extracto con unas gotas de cloroformo. Se calienta a 30 o

35°C y se observa la coloración que aparece en el papel. Un color rojo o rosa se considera positivo (Farnsworth, 1966; Domínguez, 1973 y Barba, 1997).

Glucosidos cardiotónicos y lactosas sesquiterpénicas

A) Baljet

A 2 o 3 mL del extracto etanólico se le adicionan 3 o 4 gotas de reactivo, siendo positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura (Domínguez, 1973).

B) Legal

En una porción del extracto etanólico se disuelven 2 o 3 gotas de piridina. Después de añaden, una gota de solución reciente al 5% de nitroprusiato de sodio en agua y de 1 a 3 gotas de NaOH 2N. Se considera positivo cuando aparece un color rojo intenso (Domínguez, 1973).

C) Cloruro de Antimonio

El cloruro de antimonio se disuelve en cloroformo y se añade unas gotas al extracto etanólico, la aparición de una color violeta azulado se considera positiva (Villar, 1999).

Cumarinas

Las cumarinas sublimales se detectan calentando los extractos en un tubo de ensayo tapado con papel filtro impregnado de una solución alcalina. Las cumarinas se recogen en el papel. Si el papel exhibe puntos fluorescentes bajo la luz U.V. La prueba es positiva (Domínguez, 1973).

4.2.4.1 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. El reactivo sólo 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; aforada 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 o 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 Guignard: 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.

4.2.5 DESENGRASADO

El extracto etanólico de hojas se disuelve en 200 mL de metanol, se calienta, enfría y se filtra en proceso repetitivo hasta que ya no haya más precipitado. Este precipitado se lava nuevamente con metanol en un matraz Kitazato con filtro Büchner en vacío, hasta que el metanol sea transparente. El precipitado se analiza por RMN-¹H.

El resto de la muestra se aísla y purifica por medio de cromatografía en columna.

4.2.6 SEPARACIÓN DE EXTRACTOS

Este proceso permite separar los metabolitos presentes en las hojas de *Ipomoea murucoides* dependiendo de su polaridad en cromatografía en columna. Se prepara una columna de cromatografía con sílica relación (1:100) 1 gramo de muestra por cada 100 gramos de sílica, disuelta en hexano. Así el extracto desengrasado va separándose por diferentes polaridades en fracciones de 50 mL, que van de no polar a polar¹, en este caso hexano: acetato de etilo.

Se monta una segunda y tercera columna de las fracciones obtenidas en esta columna inicial. Para asegurar que la muestra esté cada vez más pura.

De cada una de las fracciones obtenidas durante este proceso, se utiliza una pequeña muestra para analizarla por cromatografía en placa fina para poder juntar las fracciones

¹ La polaridad es relativa, todo depende del solvente con que se compare.

que sean parecidas, dependiendo de la migración y manchas obtenidas. Se analizan por RMN-¹H.

4.2.7 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Una vez que una mezcla se ha separado en sus componentes, es frecuente el uso de técnicas espectroscópicas para identificar compuestos individuales. En este caso, identificar un metabolito secundario consiste en determinar su estructura molecular a partir de Resonancia Magnética Nuclear.

Resonancia es la condición en la cual la energía de radiofrecuencia aplicada coincide con la diferencia de energía entre los estados de mayor y menor energía de un núcleo colocado en un campo energético intenso, de modo que la energía se absorbe y causa que el espín se invierta del estado paralelo de menor energía al estado antiparalelo de mayor energía. (Fox, 2000)

Así, un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra. Tomando como máximo de frecuencia al Tetrametilsilano (TMS), que por definición es 0.00 ppm. La información que proporciona RMN-¹H:

- a) Número de señales: Los hidrógenos que tienen diferente desplazamiento químico son magnéticamente no equivalentes, ya que se encuentran en diferente ambiente molecular.
- b) Intensidad: Como medida del área bajo el pico.
- c) Patrón de acoplamiento: Multiplicidad, es decir, el ambiente magnético de un protón está influenciado por protones adyacentes.