

DESARROLLO EXPERIMENTAL

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Recolección

La planta, objeto de estudio del presente trabajo se colectó en el sur de la ciudad de Xalapa perteneciente al Estado de Veracruz. Se realizaron dos colectas, una en Junio y otra en Diciembre del 2001 obteniendo muestras de hojas y tallos frescos.

5.2 Identificación botánica

La identificación botánica se realizó analizando cada una de las partes del ejemplar, describiendo con detalle las hojas, flores, tallo y fruto.

Para el estudio de tejidos, se sometieron los tallos y hojas a tratamientos con reactivos aclarantes y decolorantes:

Se colocaron separadamente en un tubo de ensaye una muestra de tallo y una de hoja, posteriormente se añadieron 5 ml de solución preparada con ácido crómico y ácido nítrico al 10% en partes iguales, se colocó en Baño María por 4 horas.

Posteriormente, se tomaron fragmentos de tallo y hoja y se colocaron en un portaobjetos sobre el cual se depositaron 2 gotas de glicerina-agua (1:2), esta mezcla es útil para fijar los tejidos y conservarlos por tiempo indefinido.

Una vez preparadas las muestras, se observaron en un microscopio acoplado a un monitor para llevar a cabo la identificación de las estructuras.

La descripción correcta incluye mencionar y describir cada uno de los tejidos encontrados haciendo referencia a las características más relevantes en cada órgano; forma de las células en los tejidos, número de capas, contenido, etc. Se debe de hacer énfasis en estructuras que puedan servir como referencia.²⁴

5.3 Secado y conservación

Posteriormente, los tallos y las hojas fueron deshidratadas a temperatura ambiente hasta que el material estuvo totalmente seco, la desecación no es más que el proceso de extraer la humedad que contiene la planta, para evitar que se descomponga, enferme o pierda las sustancias activas, es básica para conservar y valorar los principios activos ya que el contenido de ellos se expresa en función del peso seco de la droga. El proceso de secado empleado en este estudio fue por calor natural, protegiendo los componentes de la planta de la luz y de la humedad. Se revisó periódicamente para detectar cualquier alteración en el nivel de humedad, insectos y moho.

Finalmente las hojas y los tallos fueron trituradas y almacenadas en frascos para su conservación.

5.4 Pruebas preliminares

Se realizaron ensayos cualitativos que consisten en reacciones simples, de coloración o precipitación, que son específicas de algún principio activo o componente característico de la planta.

-Método rápido de Web para identificación de alcaloides:

Se emplean 5 g de la planta seca pulverizada, se mezcla con HCl al 1% hasta formar una suspensión. Se filtra hasta obtener 2 ml de filtrado el cual se coloca a baño María por 4 h. Se vuelve a añadir HCl al 1% para ajustar a 2 ml.

Posteriormente se ensaya con los siguientes reactivos:

Mayer: Se disuelven 1.36 g de HgCl_2 en 60 ml de agua y 5.0 g de KI en 10 ml de agua, se juntan las soluciones y se aforan a 100 ml. El reactivo sólo debe añadirse a soluciones aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluidos. El reactivo se añade gota a gota, ya que los

alcaloides son solubles en exceso de éste. La prueba se considera positiva en caso de observar la formación de precipitado.

Wagner: Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2.0 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua; la solución se afora con 100 ml de agua destilada. La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados floculentos color marrón.

Dragendorff: Se disuelven 8.0 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de HNO_3 y 27.2 g de KI en 50 ml de agua. Se mezclan las 2 soluciones y se dejan reposar 24 h. Se decanta la solución y se afora con agua a 100 ml, se usa sobre soluciones aciduladas. En presencia de alcaloides se forma un precipitado anaranjado-marrón.

-Método para identificación de glicósidos cardiotónicos:

Se extrae con etanol 2 g de planta seca. Una alícuota de 10 ml del extracto se centrifuga por 20 min. a 2,500 rpm. El sobrenadante se decanta y evapora a sequedad en baño María. El residuo se disuelve con etanol al 80%. Esta solución se corre en una placa de gel de sílice en un sistema diclorometano-etanol-agua (87:12:1). Utilizando como revelador una mezcla 1:1 formada por una solución al 2% de ácido 3,5-dinitrobenzónico en metanol y una solución de KOH 0.5 N en agua. La placa se observa con luz UV, las áreas coloreadas indican la presencia de glicósidos y la prueba es considerada positiva.

-Método para identificación de esteroides:

Se colocó el material seco y pulverizado de la planta en una placa y se añade 0.5 ml de ácido acético y 2 gotas de H_2SO_4 . Si se observa la aparición de una coloración púrpura la prueba se considera positiva.

-Método de identificación de antraquinonas:

Se colocan 0.3 g de la planta seca pulverizada con 10 ml de KOH 0.5 N y 1 ml de peróxido de hidrógeno al 6%. La suspensión se enfría y se filtra. Al filtrado se le añade ácido acético para acidular y posteriormente se extrae con benceno. La capa bencénica se separa y se toman 5 ml de ella y se le agrega 2.5 ml de NH₄OH. Para considerar la prueba positiva se debe observar la aparición de un color rojo en la capa alcalina.

-Método de identificación de glicósidos cianogénicos:

Se colocan 3 g de planta seca y pulverizada en un tubo de ensaye y agregar 4 gotas de cloroformo. En la parte superior del tubo se coloca un papel filtro impregnado con una solución de picrato de sodio, preparado con 1 g de carbonato de sodio y 10 mg de ácido pícrico. Si se observa la formación de una coloración roja en el papel filtro se considera la prueba positiva.

-Método de Cain para la identificación de alcaloides:

Se hace una extracción en Soxhlet con metanol a 25 g de la planta seca. El extracto se concentra hasta obtener un residuo semisólido. Una porción de este residuo se disolvió con HCl 2N saturado con NaCl. Posteriormente se filtra y se ensaya con los reactivos de Mayer, Dragendorff y Wagner.

-Método de Cain para la identificación de leucoantocianinas:

Se extrae en Soxhlet con metanol 25 g de la planta seca, después de eliminar el metanol y obtener un residuo semisólido, se disuelve éste en HCl 2N por 30 minutos. Si se detecta una coloración violeta la prueba se considera positiva.

-Método de Cain para identificación de saponinas:

Se lleva a cabo una extracción Soxhlet con metanol 25 g de la planta seca y una porción del residuo se disuelve por 30 min con agua caliente y se coloca en un tubo de ensaye para agitar con un vortex por 3 min. Si se forma una espuma tipo panal y se mantiene estable por 30 min la prueba se considera positiva

-Método de Cain para identificación de triterpenos:

Una porción del residuo extraído en Soxhlet con metanol se disuelve en una solución de anhídrido acético-H₂SO₄-cloroformo (10:1:25). Al observar una coloración púrpura intenso indica la presencia de triterpenos y la prueba se considera positiva.²⁵

5.5 Extracción y purificación de compuestos.

Compuesto 1

Las hojas secas y molidas (200 grs) de *B. frutescens* se sometieron a maceración por 5 días con hexano (4 l). Se obtuvieron 15 g de un aceite verde que fue desengrasado con metanol a 0° C. El aceite desengrasado (5 g) se cromatografió en una columna de vidrio empacada con gel de sílica como soporte y eluido con hexano-diclorometano-etanol (1:1:0.1) de las primeras fracciones (1-15) se obtuvo un residuo amarillo el cual cristalizó en forma de agujas color café, posteriormente los cristales fueron purificados por recristalización con diclorometano y hexano hasta obtener agujas finas e incoloras.

Compuesto 2

235 g de hojas secas de *B. frutescens* se sometieron a maceración con 2 litros de etanol, del cual se obtuvieron 15 g de extracto seco, el cual se colocó en una columna de vidrio empacada con sílica gel. Se comenzó a eluir con hexano hasta que no hubo residuos en las fracciones. Posteriormente se cambió el sistema de elusión hexano-acetato de etilo

(9:1), en las fracciones obtenidas se obtuvo un sólido que cristalizó de manera espontánea como rosetas amarillas, dichos cristales se recrystalizaron con mezclas de diclorometano y hexano hasta obtener cristales finos incoloros.

Compuesto 3

Las hojas secas de *B. frutescens* (235 g) se sometieron a maceración con 2 litros de etanol, del cual se obtuvieron 15 g de extracto seco, éste colocó en una columna de vidrio empacada con sílica gel.

Se comenzó a eluir con hexano en las fracciones obtenidas formó un residuo sólido y blanco insoluble en hexano, diclorometano a temperatura ambiente, sin embargo se logró disolver al ser calentado ligeramente, logrando así purificarlo por recrystalización.

Compuesto 4

De las primeras fracciones obtenidas al cromatografiar 15 g de extracto etanólico de las hojas de *B. frutescens* con una mezcla hexano-acetato de etilo (9.5-0.5), se obtuvo un residuo blanquecino, al correrlo en una placa de cromatografía en capa fina, se observó una mezcla con un compuesto mayoritario, ésta (60 mg) se colocó en una columna cromatográfica que fue eluida con hexano y se obtuvo un compuesto que cristalizó en forma de agujas finas incoloras.

5.6 Caracterización de compuestos

Todas las sustancias que se obtuvieron se identificaron por técnicas instrumentales empleando: Espectrofotómetro de Resonancia Magnética Nuclear de 400 MHz Varian, modelo Gemini 2000, Espectrofotómetro Infrarrojo IR-TF Biorad y Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible modelo Cary 100 Varian; el punto de fusión fue determinado en un aparato Fisher-Jhones.

5.7 Método biológico de evaluación

El método de difusión en agar, empleado para evaluar los extractos es uno de los bioensayos mas utilizados por su simplicidad y reproducibilidad.

Los microorganismos de referencia que se utilizaron en la prueba fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 4012), *Bacillus subtilis* (ATCC 465), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 260), *Escherichia coli* (ATCC 128).

Control positivo: Ciprofloxacina (5 µg/disco).

Control negativo: Agua destilada estéril.

Las cepas de referencia fueron inoculadas en 5 ml de caldo nutritivo y se incubaron durante 18 hrs a 37°C. La turbidez del inóculo fue ajustada en comparación con el tubo 5 del Nefelómetro de MacFarland (equivalente a 1.5×10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro).

El medio de cultivo utilizado fue Agar Müeller Hinton, preparando las cajas 24 hrs antes de la prueba y se colocaron a prueba de esterilidad en una estufa bacteriológica a 37°C.

Los extractos a probar se prepararon en una solución al 5% con disolvente.

Los discos de papel filtro se esterizaron y se depositaron 10 µl de las muestras y del control negativo, posteriormente se dejó evaporar el disolvente y se colocaron en las cajas de agar previamente inoculadas en forma masiva y uniforme en tres direcciones, con ayuda de un hisopo estéril, después fueron incubadas 24 hrs a 37°C.

Los casos positivos se determinaron por la presencia de un halo de inhibición alrededor del disco que contiene el extracto, el cual es medido con ayuda de una regla o Vernier.